

**Duplikationen und lateraler Transfer von Genen als Motor der Evolution:
Molekulare Studien am GAPDH-Gensystem von Grünalgen,
Landpflanzen und Chlorarachniophyta**

Der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
Dissertation

von Jörn Petersen
aus Minden

1. Referent: Prof. Dr. Rüdiger Cerff

2. Referent: Prof. Dr. Michael Wettern

eingereicht am: 22. Juli 1999

mündliche Prüfung (Disputation) am: 3. Dezember 1999

Druckjahr: 1999

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Prof. Dr. Rüdiger Cerff, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Petersen, J., McFadden, G., Cerff, R.: A novel type of chloroplast GAPDH gene in *Chlorarachnion*. *Endocytobiosis & Cell Research* 13, Supplement: 96 (1998)

Petersen, J., Brinkmann, H., Cerff, R.: Origin and evolution of a glycolytic GAPDH enzyme recruited by landplant chloroplasts. (1999) in preparation.

Tagungsbeiträge

Petersen, J., Brinkmann, H., Cerff, R.: Der Ursprung der Landpflanzen und die Entstehung neuer photosynthetischer Genfunktionen beim Übergang vom Wasser- zum Landleben. Vortrag auf der 9. Tagung „Molekularbiologie der Pflanzen“, Wernigerode, 5. bis 8. März 1996.

Petersen, J., Brinkmann, H., McFadden, G., Cerff, R.: A novel type of chloroplast GAPDH gene in *Chlorarachnion*. Posterbeitrag auf dem International Congress of Endocytobiology, Symbiosis and Biomedicine „Symbiogenesis and Carcinogenesis“: Endocytobiology VII, Freiburg im Breisgau, 5. bis 9. April 1998.

Petersen, J., Brinkmann, H., McFadden, G., Cerff, R.: Ursprung und Evolution photosynthetischer und glykolytischer GAPDHs aus der komplexen Alge *Chlorarachnion*. Vortrag auf der Jahrestagung der Deutschen Sektion in der International Society of Endocytobiology (ISE-G), Goslar, 17. bis 19. März 1999.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Entwicklung der Evolutionstheorie	1
1.2. Die modernen Konzepte der Evolutionsforschung	2
1.3. Die Entstehung der eukaryotischen Zellen	4
1.4. Der Ursprung der Landpflanzen	10
1.5.1. Das GAPDH System der Landpflanzen	11
1.5.2. Die GAPDH Gene der Eukaryoten sind eubakteriellen Ursprungs	13
1.5.3. Primär und sekundär erworbene GAPDH-Gene bei Algen	14
1.6. Ziele der Arbeit	16
2. Materialien und Methoden	17
2.1. Herkunft des Pflanzenmaterials	17
2.2. <i>E. coli</i> Stämme	17
2.3. Plasmid- und Bakteriophagen-Vektoren	17
2.4. Enzyme für die Molekularbiologie	18
2.5. Reagenzsätze (Kits)	18
2.6. Chemikalien	19
2.7. Geräte	19
2.8. Arbeiten mit <i>E. coli</i>	20
2.9. Arbeiten mit Nukleinsäuren	21
2.9.1. Standard-Methoden	21
2.9.2. RNA-Isolation	21
2.9.2.1. Isolation von Gesamt-RNA	21
2.9.2.2. Isolierung von Poly(A) ⁺ -mRNA	22
2.9.3. Northernblot Experimente verschiedener Paprikagewebe	23
2.9.4. Herstellung von cDNA-Banken	23
2.9.5. RT-PCR-Experimente zur Amplifikation von GAPDH-Genen	25
2.9.6. PCR zur Amplifikation von GAPDH aus <i>Chlorarachnion</i> Gesamt-DNA	27
2.9.7. Erstellung einer genomischen Bank aus <i>Capsicum annuum</i>	27
2.9.8. Klonierung der <i>GapCp</i> aus <i>Capsicum annuum</i> zur Überexpression	29
2.10. Arbeiten mit Proteinen	30
2.10.1. Überexpression in <i>E. coli</i>	30
2.10.2. Proteingehaltsbestimmung	30

2.10.3.	SDS-Proteingelelektrophorese	30
2.10.4.	GAPDH-Enzymtest	31
2.11.	Abkürzungen	32
3.	Ergebnisse	33
3.1.	<i>GapA</i> und <i>GapB</i> Sequenzen aus Charophyceen und Landpflanzen	33
3.1.1.	Sequenzanalyse und Alignment der <i>GapA</i> und <i>GapB</i> Sequenzen	33
3.1.2.	Phylogenetische Untersuchungen der <i>GapA</i> und <i>GapB</i> Sequenzen	38
3.2.	<i>GapC</i> und <i>GapCp</i> Sequenzen aus Charophyceen und Landpflanzen	41
3.2.1.	Sequenzanalyse und Alignment der <i>GapC</i> und <i>GapCp</i> Sequenzen	41
3.2.2.1.	Phylogenetische Analyse der <i>GapC</i> und <i>GapCp</i> Sequenzen	46
3.2.2.2.	Tests zur Verlässlichkeit der phylogenetischen Aussagen	48
3.2.3.	Charakterisierung des <i>GapCp</i> Gens aus <i>Capsicum annuum</i>	50
3.2.4.	Gewebespezifische Expression der GAPDH-Gene in Paprika	55
3.2.5.	Überexpression des <i>GapCp</i> Gens aus <i>Capsicum annuum</i> in <i>E. coli</i>	58
3.3.	Das GAPDH System der komplexen Alge <i>Chlorarachnion</i>	60
3.3.1.	Plastidäre und cytosolische GAPDH Sequenzen aus <i>Chlorarachnion</i>	60
3.3.2.	Phylogenetische Untersuchungen der GAPDHs der Chlorarachniophyta	63
3.3.3.	Genstruktur der <i>GapC</i> und <i>GapX</i> aus <i>Chlorarachnion</i>	67
4.	Diskussion	70
4.1.1.	Funktionsgewinn der <i>GapB</i> nach der <i>GapA/B</i> -Genduplikation	70
4.1.2.	Die <i>GapA/B</i> -Genduplikation und die Entstehung der Landpflanzen	71
4.2.1.	Die <i>GapC/Cp</i> Genduplikation und die Entstehung der Landpflanzen	75
4.2.2.	Möglicher Erwerb des <i>GapCp</i> Transitpeptides mittels Exonshuffling	78
4.2.3.	<i>GapCp</i> als Markerenzym der plastidären Glykolyse in Landpflanzen	79
4.3.1.	Plastidäre und cytosolische GAPDH Sequenzen aus <i>Chlorarachnion</i>	83
5.	Zusammenfassung	90
6.	Literaturverzeichnis	92
7.	Anhang	108

*Da steh ich nun, ich armer Tor!
Und bin so klug als wie zuvor;
Heiße Magister, heiße Doktor gar,
und ziehe schon an die zehn Jahr
Herauf, herab und quer und krumm
Meine Schüler an der Nase herum-
Und sehe, daß wir nichts wissen können!
Das will mir schier das Herz verbrennen. (...)*

*Drum hab ich mich der Magie ergeben,
Ob mir durch Geistes Kraft und Mund
Nicht manch Geheimnis würde kund;
Daß ich nicht mehr, mit sauerm Schweiß,
Zu sagen brauche, was ich nicht weiß;
Daß ich erkenne, was die Welt
Im Innersten zusammenhält (...)*

Johann Wolfgang Goethe

1. Einleitung

Nichts in der Biologie ergibt einen Sinn, wenn man es nicht im Lichte der Evolution betrachtet.

Theodosius Dobzhansky

1.1. Die Entwicklung der Evolutionstheorie

Charles Darwin hat durch die Theorie der biologischen Evolution in seinem Hauptwerk *On the Origin of Species by Means of Natural Selection* (1859) das natur- und geisteswissenschaftliche Weltbild der damaligen Zeit revolutioniert. Nicht zuletzt die Einbeziehung des Menschen in *The Descent of Man and Selection in Relation to Sex* (1874) führte zu einem Paradigmenwechsel von der Unveränderlichkeit der Arten zu dem evolutiven Ursprung aller Lebewesen. Im Zuge dieser Erkenntnisse wurde der mittelalterliche Dogmatismus der Theologen endgültig durch moderne Denkschemata rationaler Naturforscher ersetzt. Zwar stellte bereits *Jean-Baptiste de Lamarck* im Jahr 1800 die Theorie einer allmählichen Evolution auf, aber erst *Darwins* Theorien ermöglichten die Einordnung aller Organismen in ein „natürliches System“ (Mayr 1998). Frühere lineare Evolutionstheorien, in denen multiple Schöpfungsakte postuliert wurden, hat *Darwin* durch das Modell einer sich verzweigenden Abstammung ersetzt. Da sich alle Organismen so auf gemeinsame Vorfahren zurückführen lassen, liefert dieser Teil seiner Theorie eine Erklärung für das zuvor nur empirisch gestützte *Linnésche* System. Dieser Teil setzte sich aufgrund der Übereinstimmung mit den Forschungsinteressen der Morphologen und Systematiker rasch durch. Es dauerte aber noch rund achtzig Jahre, bis der zugrunde liegende Mechanismus evolutiver Veränderungen in Form von Variation und Selektion allgemein akzeptiert wurde. Nach der Wiederentdeckung der *Mendelschen* Regeln im Jahr 1900 bot die Genetik eine materielle Grundlage für die Wirkung von Selektion. Der Nachweis der DNA als Träger der genetischen Information durch *Oswald Avery* (1944) und die Entdeckung der DNA-Doppelhelixstruktur durch *James Watson* und *Francis Crick* (1953) läuteten die Ära der Molekularbiologie ein. Seit etwa 20 Jahren ist die genetische Information der DNA aufgrund der fortgeschrittenen Sequenzierungstechnik in großem Umfang verfügbar, dies eröffnete ungeahnte Perspektiven für die molekulare Evolutionsforschung. Einen Meilenstein stellte die

Ende der sechziger Jahre von Motoo Kimura entwickelte Theorie einer neutralen molekularen Evolution dar, die auf der Feststellung beruht, daß Gene über sehr lange Zeiträume hinweg Punktmutationen mit nahezu gleichbleibender Frequenz ansammeln (Konzept einer molekularen Uhr der Evolution). Die Neutralitäts- und Selektionstheorien scheinen sich auf den ersten Blick zu widersprechen, sie dominieren jedoch parallel zueinander auf verschiedenen Ebenen. In der DNA treten Mutationen statistisch verteilt nach dem Zufallsprinzip auf, die Selektion wirkt im von der DNA kodierten Protein direkt auf Veränderungen der Struktur und darüber hinaus auf die Organismen und Populationen. Durch einen Vergleich homologer Gene aus verschiedenen Organismen können Genstammbäume erstellt werden, diese spiegeln die evolutive Verwandtschaft der Arten wieder. Aufgrund ihres konstanten Tickers lassen sich diese „molekularen Uhren“ durch Fossilienfunde zeitlich eichen. So ließ sich beispielsweise die bereits von Darwin erkannte Verwandtschaft von Mensch und Schimpanse auf einen gemeinsamen Vorfahren vor etwas 5 Millionen Jahren zurückdatieren (Sarich und Wilson 1967; Li 1997).

1.2. Die modernen Konzepte der Evolutionsforschung

Die Erforschung der Entwicklungsgeschichte erfolgt durch einen Vergleich von Merkmalen, die bereits gemeinsame Vorfahren besessen haben (Konzept der Homologie). Dieser Ansatz wird unabhängig von der speziellen Untersuchungsmethode angewendet. Allerdings ist der Erkenntnisgewinn nicht zuletzt an den technischen Fortschritt gekoppelt. Bis zur Mitte unseres Jahrhunderts war das Auflösungsvermögen des Lichtmikroskops für die Bestimmung zellulärer Strukturen limitierend, erst die Entwicklung der Elektronenmikroskopie ermöglichte die Untersuchung und den Vergleich der zellulären Ultrastruktur. Auch Fossilien sind für evolutive Untersuchungen außerordentlich wichtig, da in ihnen der morphologische „Status quo“ über Jahrmillionen konserviert wurde. So können neben den rezenten Organismen auch deren Vorfahren direkt in die Untersuchungen miteinbezogen werden. Für viele Bereiche des Organismenstammbaumes liefern die traditionellen Methoden jedoch keine eindeutigen Ergebnisse, da sich die Frage nach der Homologie morphologischer Merkmale häufig nicht sicher beantworten läßt. Konvergente Evolution führte zu ähnlichen (analogen) Merkmalen in phylogenetisch unabhängigen Abstammungslinien, ein offensichtliches Beispiel sind die Flügel

der Vögel und Schmetterlinge. Aus analogen Vergleichen resultiert eine scheinbar uneinheitliche Evolution verschiedener Merkmalsgruppen, die für den Taxonomen ein großes Problem darstellt. Besonders in Bereichen, in denen es keine eindeutigen morphologischen Informationen gibt, ist die molekulare Phylogenetik äußerst wertvoll. Die Verwandtschaftsbeziehungen von Mikroorganismen konnten so analysiert werden (z.B. Woese 1987), aber auch sehr alte Ereignisse in der Evolutionsgeschichte wie etwa Endosymbiosen ließen sich mittels molekularer Analysen rekonstruieren (Gray 1992). Neue molekulare Techniken (PCR) ermöglichen die Einbeziehung bereits ausgestorbener Tiere in die Analysen. Im Gegensatz zu morphologischen Strukturen überdauert die DNA jedoch nicht hunderte von Millionen Jahren. Es konnten aber immerhin Sequenzen aus 100.000 Jahre alten Skelettresten eines Neandertalers amplifiziert und mit denen rezenter Menschen und Affen verglichen werden (Krings et al. 1997). Wie bei morphologischen Merkmalen müssen auch die analysierten Gene homolog sein. Wenn eine Genduplikation bereits vor der Artaufspaltung erfolgte, so repräsentieren diese paralogen Gene nicht die Evolution der Organismen und der Genstammbaum entspricht nicht dem Stammbaum der Organismen (Paralogieproblem). Sind Gene durch lateralen Gentransfer, z.B. in Form einer Endosymbiose, in die Wirtszelle gelangt, so muß dies bei der Analyse phylogenetischer Bäume berücksichtigt werden. Ein Vergleich paraloger Gene führt häufig zu Fehlinterpretationen, es werden „Äpfel mit Birnen“ verglichen. Das Konzept der „molekularen Uhr“ der Evolution basiert auf einem kontinuierlichen Erwerb von Mutationen in den Genen über lange Zeiträume. Da die Mutationsrate zeitlichen Schwankungen unterworfen ist, können sich die mit Hilfe von statistischen Modellen berechneten Phylogenien zwangsläufig nur der Wirklichkeit annähern. Allerdings sind über längere Zeiträume anhaltende Diversifikationen phylogenetisch sehr gut auflösbar, da die Gene währenddessen genügend Mutationen ansammeln. In der Evolution kam es aber immer wieder zu plötzlichen Radiationen der Organismen, ein Beispiel ist die Auftrennung der Tierstämme vor etwa 530 Millionen Jahren, die von Paläontologen auch als „Kambrische Explosion“ bezeichnet wird. Da die Gene dabei nur wenige Mutationen ansammeln konnten, sind solche Radiationen auch mittels molekularer Phylogenien nur sehr schwer aufzulösen (Literatur zu diesem Abschnitt: Mayr 1984, 1998; Lewin 1998).

1.3. Die Entstehung der eukaryotischen Zellen

Die ersten Organismen lebten in einer anoxygenen Umwelt und nutzten möglicherweise Schwefelverbindungen zur Energiegewinnung (Thioester-Welt). Ihr zellulärer Aufbau und die genetische Ausstattung dürfte einfacher als bei rezenten Organismen gewesen sein; das Genom bestand vermutlich aus RNA und nicht aus DNA (DeDuve 1994). Die heutigen Organismen können in Eukaryoten und Prokaryoten, also Lebensformen mit und ohne Zellkern eingeteilt werden. Allerdings zeigen phylogenetische Analysen ribosomaler 16S-rDNA-Sequenzen, daß diese Einteilung unzureichend ist, da die Prokaryoten aus zwei völlig distinkten Gruppen, den Eubakterien (Bacteria) und den Archaeobakterien (Archaea) bestehen (Review: Woese 1987). Bacteria und Archaea haben denselben systematischen Status wie die Eukaryoten, gemeinsam bilden sie die drei Domänen des Lebens, die sich wiederum in die verschiedenen Reiche aufgliedern (Woese et al. 1990). Die Existenz homologer Gene in den drei Domänen belegt einen gemeinsamen Ursprung aller Organismen (Gogarten et al. 1989; Iwabe et al. 1989). Die Beziehung der primären Gruppen zueinander ist allerdings noch ungelöst. Viele molekulare Marker deuten auf eine nahe Verwandtschaft der Eukaryoten mit den Archaea zum Ausschluß der Bacteria hin, beispielsweise zeigt ihr Transkriptionsapparat einen ähnlichen Aufbau. Andere Marker legen dahingegen eine nahe Verwandtschaft von Eukaryoten und Bacteria nahe (Zillig et al. 1992; Bell und Jackson 1998). Diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse führten zu der Fusionshypothese, nach der die Eukaryoten ein Fusionsprodukt aus Bacteria und Archaea sind (Zillig et al. 1989).

Die Eukaryoten repräsentieren die Domäne mit dem komplexesten Aufbau. Sie enthalten mit den Mitochondrien und Chloroplasten semiautonome Organellen, die ein eigenes Genom sowie eigene Transkriptions- und Translationsapparate besitzen. Die Endosymbiontenhypothese erklärt den Ursprung dieser Organellen, durch phylogenetische Analysen konnte sie eindeutig bestätigt werden und gilt heute als bewiesene Theorie (Review: Gray 1992). Demnach sind die nächsten freilebenden Verwandten der Mitochondrien α -Proteobakterien (Yang et al. 1985), die Chloroplasten entstammen einer Endosymbiose mit einem Cyanobakterium (Melkonian 1996). Auf der Suche nach dem Ursprung der Eukaryoten waren amitochondriale Protisten (Archaezoa) vielversprechende Kandidaten der eukaryotischen Wirtszelle für die mitochondriale Endosymbiose (Cavalier-Smith 1987). Bei einer Gruppe von Protisten findet man anstelle der Mitochondrien Hydrogenosomen (Müller 1993). Durch phylogenetische

Untersuchungen ist allerdings ein gemeinsamer Ursprung beider Organellen belegt (Bui et al. 1996), in den Hydrogenosomen des Ciliaten *Nyctotherus ovalis* wurde kürzlich sogar ein funktionelles Genom entdeckt (Akhmanova et al. 1998). Bei einer Reihe amitochondrialer Protisten, die weder Mitochondrien noch Hydrogenosomen besitzen (Microsporidia, Parabasalia/Trichomonaden, Diplomonaden), konnte ein sekundärer Verlust der Mitochondrien belegt werden (Clark und Roger 1995; Germot et al. 1997; Hirt et al. 1997; Roger et al. 1998, Hashimoto et al. 1998). Aufgrund dieser Ergebnisse ist fraglich, ob sich überhaupt rezente „missing links“ in Form amitochondrialer Protisten finden lassen (Vogel 1997). Nach einer neuen Hypothese („Wasserstoff Hypothese“) hat es einen solchen Organismus nie gegeben (Martin und Müller 1998). Hiernach entstanden Eukaryoten mit Promitochondrien direkt durch die endosymbiontische Aufnahme eines α -Proteobakteriums von einem Archaeobakterium. Eine solche Symbiose erklärt auch die chimäre Zusammensetzung eukaryotischer Genome aus archaealen und bakteriellen Komponenten.

Im Gegensatz zum Ursprung der Eukaryoten und Mitochondrien ist der Erwerb der Chloroplasten schon recht genau aufgeklärt. Mit bestechender Weitsicht publizierte C. Mereschkowsky bereits 1905 eine Theorie zum endosymbiontischen Ursprung der Chloroplasten. Aufgrund lichtmikroskopischer Untersuchungen erkannte er, daß in Pflanzenzellen nur die Plastiden (Chromatophoren) farbig sind. Daraus zog er den Schluß, es müsse sich bei diesen Strukturen um ehemals freilebende Organismen handeln, die mit der Wirtszelle eine Symbiose eingegangen sind. *„Die Chromatophoren (Plastiden) sind also keine Organe, die sich allmählich aus dem Zellenplasma herausdifferenziert hätten. Es sind fremde Körper, fremde Organismen, die ins farblose Plasma der Zelle eingedrungen und mit derselben in symbiotisches Zusammenleben getreten sind“*. Seine Vermutungen der an der Endosymbiose beteiligten Wirtszelle sowie des Endosymbionten *„Die Urpflanzen waren nichts anderes als Amöben oder Flagellaten, in welche Cyanophyceen eingewandert waren“* stellten sich als völlig korrekt heraus. Molekulare Analysen zeigen allerdings, daß die Plastiden der unterschiedlichen Algen mehrfach rekrutiert wurden (Delwiche und Palmer 1997), in Abhängigkeit des Mechanismus unterscheidet man dabei zwischen primären und sekundären Endosymbiosen (Abb. 1).

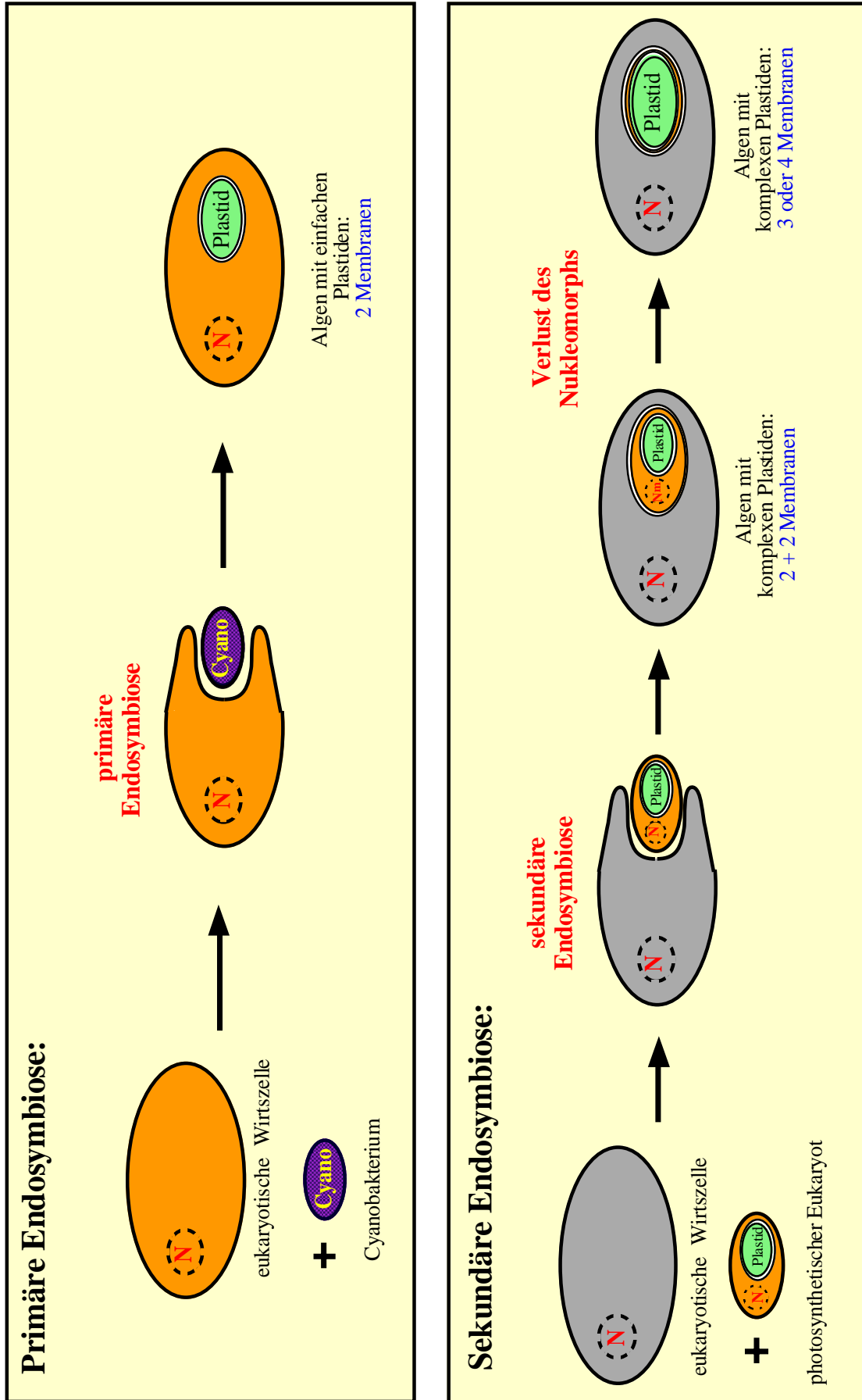


Abb. 1: Ursprung der Plastiden durch primäre und sekundäre Endosymbiosen.
 N: Nukleus, Nm: Nucleomorph

Bei der primären Endosymbiose (Abb. 1 A) hat eine eukaryotische Wirtszelle ein Cyanobakterium aufgenommen und zum Plastiden reduziert, dieser ist von zwei Membranen umgeben (Sitte 1993). Es wird angenommen, daß die äußere Membran von der Nahrungsvakuole der Wirtszelle und die innere Membran von einer Membran des Cyanobakteriums abstammt (Melkonian et al. 1995). Neben den Landpflanzen besitzen auch ihre phylogenetischen Vorläufer, die Grünalgen, sowie die Rotalgen und die Glaukophyta einen einfachen Plastiden (2 Membranen) (van den Hoek et al. 1993; Bhattacharya und Schmidt 1997). Mittlerweile geht man davon aus, daß diese drei Algenklassen von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen, der bereits einen Plastiden besessen hat (Kowallik 1994; Bhattacharya und Medlin 1995; Douglas 1998). Somit ebnete eine einzige primäre Endosymbiose den Weg zu photoautotrophem Wachstum aller plastidenhaltigen Eukaryoten inklusive der Landpflanzen (Abb. 2). „Tier + Cyanophyceae = Pflanze“ (Mereschkowsky 1905).

Neben den Gruppen mit einfachen Plastiden (2 Membranen) gibt es eine Reihe von Algen mit komplexen Plastiden, die von 3 oder 4 Membranen umgeben sind. Diese entstammen einer sekundären Endosymbiose (Abb. 1 B) (Sitte 1993). Dabei wurde ein bereits photosynthetischer Eukaryot von einer eukaryotischen Wirtszelle aufgenommen und zum Plastiden reduziert (Reviews: McFadden 1993; Häuber et al. 1994). Molekulare Analysen belegen, daß es mehrere sekundäre Endosymbiosen gab (Maier et al. 1991; Hallick et al. 1993; McFadden et al. 1994). Die Wirtszellen haben eine Grün- oder Rotalge „geschluckt“, dementsprechend können die komplexen Plastiden der „grünen“ oder „roten Linie“ zugeordnet werden (Abb. 2) (Delwiche und Palmer 1997). Eine evolutive Besonderheit stellen die Chlorarachniophyta („grüne Linie“) (McFadden et al. 1995; Van de Peer et al. 1996; Ishida et al. 1997) und die Cryptophyta („rote Linie“) (Douglas et al. 1991; Cavalier-Smith et al. 1996) dar. Die Plastiden beider Algengruppen sind von vier Membranen umgeben, sie besitzen jedoch zwischen dem äußeren und inneren Membranpaar ein zusätzliches Genom, das Nukleomorph (McFadden et al. 1997). Dabei handelt es sich um das extrem reduzierte Genom des jeweiligen Endosymbionten, im Fall der Chlorarachniophyta um das „Rest-Genom“ einer Grünalge. Die Nukleomorphe besitzen all das, was einen eukaryotischen Kern ausmacht, in den Chlorarachniophyta wurden drei lineare Chromosomen mit Telomeren sowie spleißosomale Introns gefunden (Gilson und McFadden 1996; 1997; Gilson et al. 1997). Es konnte gezeigt werden, daß neben den Plastiden der Chlorarachniophyta und Cryptophyta auch deren Wirtszellen einen unterschiedlichen evolutiven Ursprung haben (McFadden et al. 1994; Bhattacharya et al. 1995). Obwohl die

verschiedenen sekundären Endosymbiosen unabhängig voneinander erfolgten, stellen die Chlorarachniophyta und Cryptophyta entwicklungsgeschichtliche „connecting links“ bei der Etablierung komplexer Plastiden dar (Abb. 2) (Sitte 1993).

Durch die Endosymbiosen erwarben die Wirtszellen mit den zusätzlichen Organellen auch deren Genome. Allerdings lastet auf dem Genom des Endosymbionten ein starker Druck zur Reduktion, die Plastiden besitzen nur noch einen Bruchteil der genetischen Information freilebender Cyanobakterien (Martin et al. 1998). Die Funktionalität des Plastiden wird durch den Import nukleär kodierter Proteine sichergestellt. Die Gene dafür wurden vom Plastidengenom in den Nukleus transferiert oder entstammen duplizierten nukleären Kopien. Aufgrund dieser Mechanismen findet man in den Plastiden der Landpflanzen Proteine unterschiedlicher Herkunft, der Calvin Zyklus hat eine chimäre Zusammensetzung von Proteinen cyanobakteriellen und proteobakteriellen Ursprungs (Martin und Schnarrenberger 1997). Auch nach jeder sekundären Endosymbiose müssen die plastidären Genfunktionen individuell im Nukleus etabliert werden, darüber ist allerdings bislang noch sehr wenig bekannt.

Die Endosymbiosen machen deutlich, daß die *Darwin'sche* Sichtweise eines gemeinsamen Stammbaumes aller Organismen, der ausschließlich aus Bifurkationen besteht, erweitert werden muß. Die Entstehung der Organismen entspricht vielmehr einem komplexen evolutiven Netzwerk, in dem es mit dem Progenoten (Woese und Gupta 1981) einen gemeinsamen Ursprung und mit den heutigen Organismen definierte Endpunkte gibt. In der Evolution erfolgten multiple Verknüpfungen zwischen den Ästen des Baumes, wobei sowohl Gene als auch ganze Module (z.B. Plastiden) lateral transferiert wurden (Syvanen 1994; Gray 1992). Diese interspezifische Rekombination ist neben der Variation und Selektion die entscheidende Voraussetzung für die Evolution der Organismen.

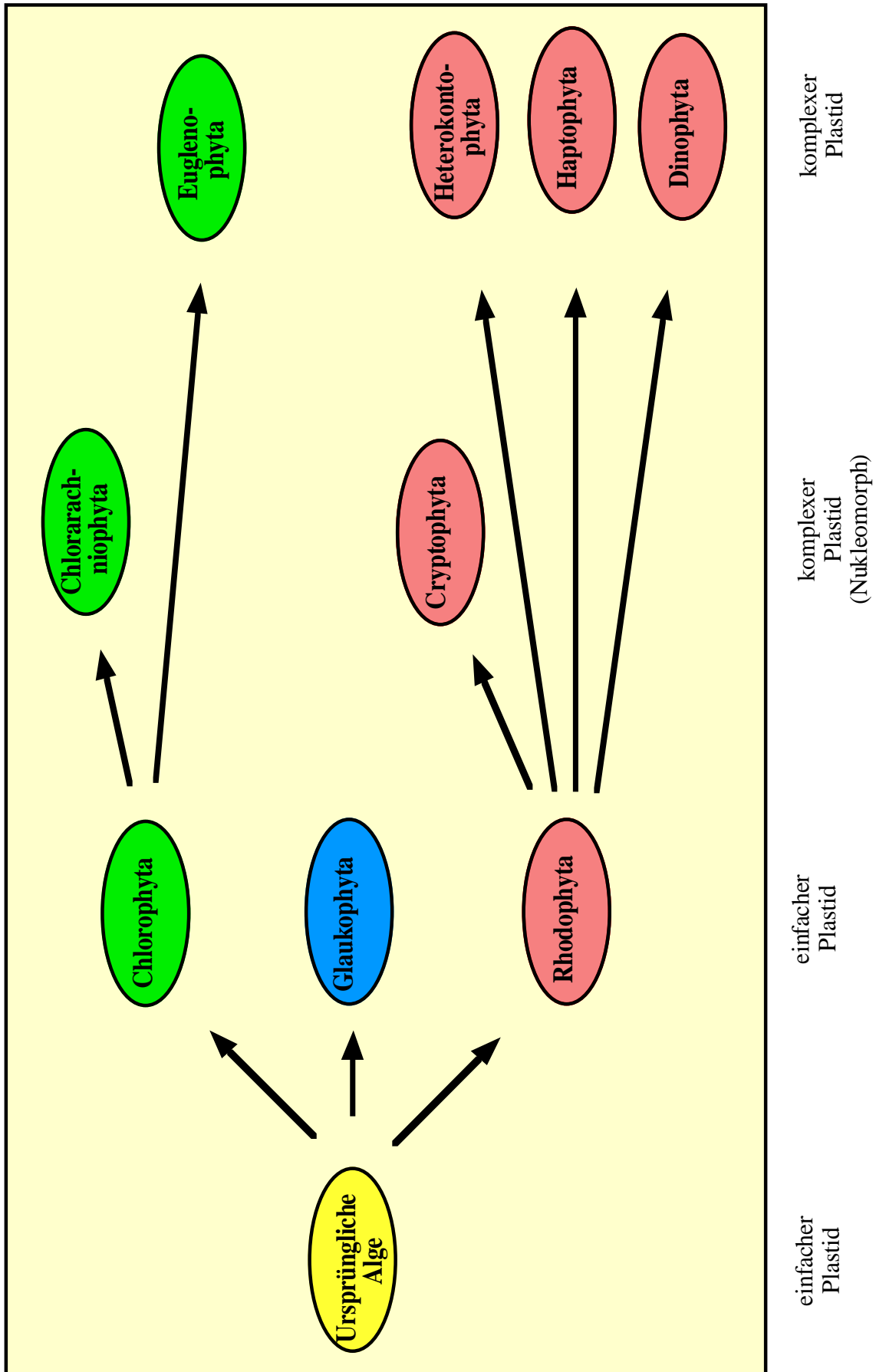


Abb. 2: Evolutive Herkunft der Plastiden unterschiedlicher Algenklassen.

1.4. Der Ursprung der Landpflanzen

Neben der Aufklärung genereller evolutiver Entwicklungslinien sind die Biologen im Besonderen an Detailfragen wie etwa der ungelösten Fragestellung nach der Besiedlung des Landes interessiert. Die Landpflanzen und Grünalgen haben einen gemeinsamen Ursprung und bilden eine monophyletische Gruppe (*Viridiplantae*) (Cavalier-Smith 1981). Morphologische und molekulare Analysen zeigen darüber hinaus, daß auch die Charophyceen, eine von vier Abteilungen der Grünalgen, zusammen mit den Landpflanzen eine monophyletische Gruppe bilden (Review: Friedl 1997). Diese Gruppe wird als Streptophyta (Bremer 1985) bezeichnet und den Chlorophyta *sensu stricto* (Sluiman 1985) mit den Prasinophyceae, Ulvophyceae und Chlorophyceae gegenübergestellt. Der genaue Übergang vom Wasser- zum Landleben ist allerdings umstritten. Ungeklärt ist auch die Frage, ob Charophyceen und Landpflanzen parallele Entwicklungslinien darstellen oder ob die Landpflanzen aus einer bestimmten Klasse der Charophyceen hervorgegangen sind (Mishler und Churchill 1985). Anhand morphologischer Eigenschaften wurden die Charales und Coleochaetales (Chlorophyta; Charophyceae) bereits seit Beginn dieses Jahrhunderts immer wieder als nächste Verwandte der Landpflanzen gehandelt (Bremer 1985; Graham 1984). Da der Übergang zum Landleben mit einer organismischen Radiation einher ging, ist das Auflösungsvermögen der molekularen Marker beschränkt (Graham 1993). Ein vielversprechender Ansatz zur Erforschung der Landpflanzenevolution ist eine Kombination aus Phylogenie und molekularer Kladistik (McCourt 1995). Generell sind für kladistische Untersuchungen die Merkmale besonders aussagekräftig, die auf singulären Ereignissen beruhen und eine klare Differenzierung zwischen ursprünglichem und abgeleiteten Zustand erlauben. Erste Erfolge zeigten sich bereits bei der Aufklärung der Landpflanzenevolution; die aus morphologischen Untersuchungen resultierende Annahme, Lebermoose seien die primitivsten Landpflanzen (Graham 1993; Edwards et al. 1995; Kenrick und Crane 1997), wird durch die Verteilung von drei mitochondrialen Introns unterstützt (Qiu et al. 1998). Neben Vergleichen von Intronmustern sind zentrale Genduplikationen im relevanten Zeitraum prädestinierte Marker für die Klassifikation, darüber hinaus sind auf Sequenzebene universelle Insertionen und Deletionen sowie konservierte Sequenzmotive von hohem diagnostischen Wert.

1.5.1. Das GAPDH System der Landpflanzen

Die in der Photosynthese gewonnene Energie kann in Form von Zucker gespeichert und so für den weiteren pflanzlichen Metabolismus verwendet werden. Die zentralen Stoffwechselwege der Pflanzenzelle sind der anabole Calvin Zyklus im Plastiden und die katabole Glykolyse im Cytosol (Abb. 3). Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenasen (GAPDH) sind Bestandteil beider Wege und nehmen damit eine Schlüsselrolle im pflanzlichen Energiestoffwechsel ein (Abb. 4). Im Plastiden findet man die GapAB und die GapCp, wohingegen die GapC ein cytosolisches Enzym ist.

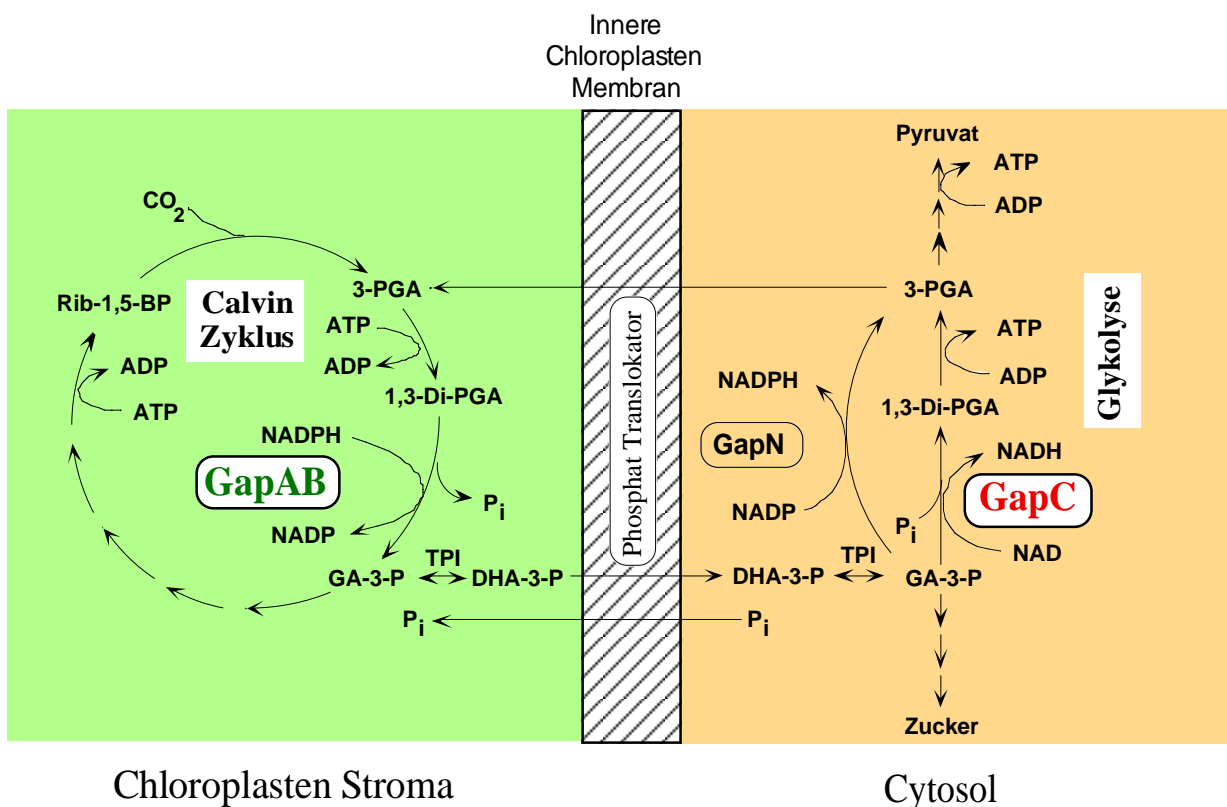


Abb. 3: Kompartimentierung der Pflanzenzelle und katalytische Funktionen der pflanzlichen GAPDH-Enzyme. Die Reaktion der GapN ist irreversibel. Nur die *in vivo* relevanten Reaktionsrichtungen der GapAB und GapC sind dargestellt. DHA-3-P: Dihydroxyaceton-Phosphat; 3-PGA: 3-Phosphoglycerat; 1,3-Di-PGA: 1,3-Dihydroxyaceton-Phosphat; Rib-1,5-BP: Ribulose-1,5-Bisphosphat; TPI: Triosephosphat Isomerase.

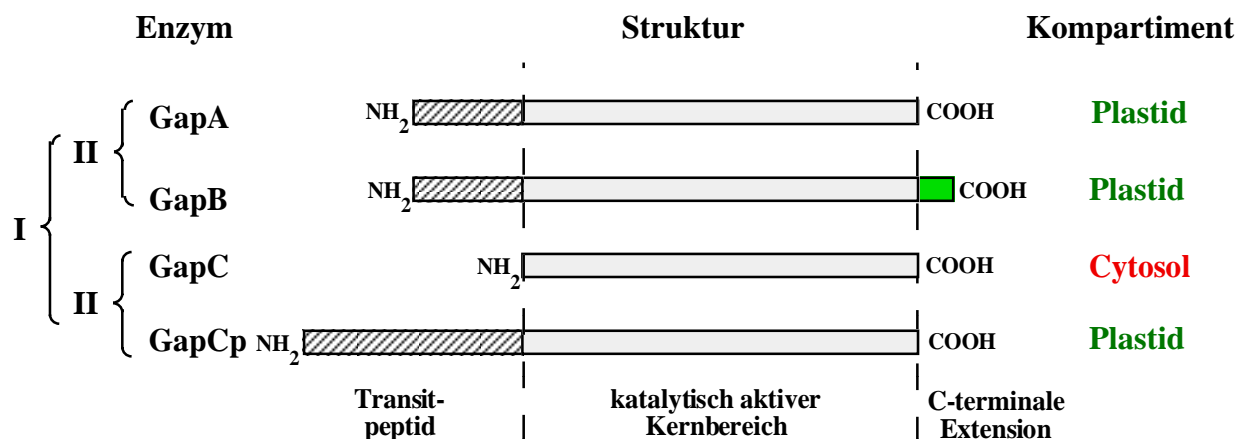


Abb. 4: Schematischer Aufbau pflanzlicher GAPDH Proteine

I: Genduplikation eines gemeinsamen Vorläufers vor der Endosymbiose

II: Genduplikation in der Pflanzenevolution

Die plastidäre GapAB (EC 1.2.1.13) katalysiert den reduktiven Schritt des Calvin Zyklus unter Verwendung des in der photosynthetischen Lichtreaktion gebildeten NADPHs. In Landpflanzen kommt die GAPDH des Calvin Zyklus in Form zweier Isoenzyme, eines A₂B₂ Heterotetramers und eines A₄ Homotetramers vor (Cerff 1979; 1982; Cerff und Chambers, 1979). Die GapA und GapB Untereinheiten unterscheiden sich in etwa 20% der Aminosäuren, die GapB hat aufgrund einer etwa 30 Aminosäuren langen C-terminalen Extension ein etwas höheres Molekulargewicht. Die *GapA* und *GapB* Gene der Landpflanzen sind kernkodiert, die Proteine werden durch Transitpeptide in den Chloroplasten transportiert. Die *GapB* entstammt einer Genduplikation der *GapA** innerhalb der Grünalgen (Petersen 1995). Die Rekrutierung der C-terminalen Verlängerung der GapB erfolgte vermutlich durch eine Fusion mit dem Protein CP12 (Pohlmeyer et al. 1996). CP12 stellt den Grundmechanismus der Lichtregulation der GAPDH und Phosphoribulokinase (PRK) sicher. In Abhängigkeit des NADPH-Gehaltes erfolgt im Dunklen die reversible Ausbildung eines enzymatisch inaktiven PRK/CP12/GAPDH-Komplexes (Wedel et al. 1997; Wedel und Soll, 1998). Funktionelles CP12 konnte in der Chlorophyceae *Chlamydomonas* und dem Cyanobakterium *Synechocystis* nachgewiesen werden, dementsprechend handelt es sich um einen sehr alten Regulationsmechanismus. Die GapB der Landpflanzen ermöglicht eine Verfeinerung des Grund-

mechanismus. Eine Enzymaktivierung erfolgt ebenfalls über die reversible Ausbildung von Enzymkomplexen, die hier allerdings durch das Thioredoxinsystem gesteuert wird (Scheibe 1991; Li et al. 1994). GapA₂B₂ Heterotetramere bilden dabei möglicherweise im Dunklen Aggregate, die bei Belichtung wieder zerfallen (Scagliarini et al. 1993; Baalman et al. 1994). Es handelt sich dabei um eine GapB spezifische Funktion, da GapA₄ Homotetramere *in vitro* nicht über diesen Regulationsmechanismus verfügen (Baalman et al. 1996).

Im Cytosol wird die Umwandlung von Triosephosphaten in 3-Phosphoglycerat durch zwei verschiedene GAPDH Enzyme katalysiert, einerseits durch die klassische phosphorylierende strikt NAD-spezifische GapC der Glykolyse (EC 1.2.1.12) und andererseits durch eine nicht-phosphorylierende NADP-spezifische GapN (EC 1.2.1.9) (Kelly und Gibbs, 1973; Habenicht 1994). Die NAD-spezifische GapC in Angiospermen ist ein Tetramer aus identischen oder elektrophoretisch unterscheidbaren Untereinheiten (Russell und Sachs, 1991), die durch Genfamilien kodiert sein können.

Mit der *GapCp* (siehe auch *GapC-I*; 1.5.3.) wurde eine weitere plastidäre GAPDH entdeckt (Meyer Gauen et al. 1994). Die *GapCp* entstammt einer Genduplikation der cytosolischen *GapC* und kommt in allen großen Abteilungen der Landpflanzen vor (diese Arbeit). Ein Transitpeptid sorgt für den Transport der *GapCp* in den Chloroplasten, als Reminiszenz an ihren evolutiven Ursprung zeigt dieses Enzym eine strikte NAD-Spezifität (Meyer Gauen et al. 1998).

1.5.2. Die GAPDH Gene der Eukaryoten sind eubakteriellen Ursprungs

Alle bislang entdeckten GAPDH-Gene der Eukaryoten sind eubakteriellen Ursprungs. Die eukaryotischen GAPDH-Gene stammen von lediglich zwei der zahlreichen distinkten eubakteriellen GAPDH Linien ab, diese Gene werden in Cyanobakterien *gap1* und *gap2* bezeichnet (Martin et al. 1993; Cerff 1995; Brown und Doolittle 1997; Martin und Schnarrenberger 1997). Die eubakterielle *gap1* ist nahe mit dem eukaryotischen *GapC* Gen verwandt, welches in der Regel die cytosolische GAPDH mit glykolytisch/glukoneogenetischer Funktion kodiert. Dieses kernkodierte Gen wurde wahrscheinlich von den proteobakteriellen Vorfahren der Mitochondrien erworben (Smith 1989, Martin et al. 1993; Liaud et

al. 1994), allerdings kommen orthologe *gap1* Gene auch in anderen eubakteriellen Phyla inklusive der Cyanobakterien vor. Das eubakterielle *gap2* Gen zeigt zur *gap1* nur 40 bis 50% Sequenz-Ähnlichkeit. Die cyanobakterielle *gap2* ist jedoch sehr nahe mit der eukaryotischen kernkodierte *GapA* verwandt, welche die plastidäre GAPDH des Calvin Zyklus in Grünalgen und Landpflanzen kodiert. Dieses Gen wurde mit der cyanobakteriellen Endosymbiose des Chloroplasten erworben (Brinkmann et al. 1989; Martin et al. 1993; Kersanach et al. 1994; Liaud et al. 1994; Henze et al. 1995). Eine Ausnahme ist die divergente GAPDH des amitochondrialen Protisten *Trichomonas vaginalis*, die möglicherweise einem unabhängigen lateralen Gentransfer entstammt (Markos et al. 1993; Viscogliosi und Müller 1998).

1.5.3. Primär und sekundär erworbene GAPDH-Gene bei Algen

Die Verteilung der GAPDHs der drei Algengruppen mit einem einfachen Plastiden, der einer primären Endosymbiose entstammt (Abb. 2), entspricht der Situation in Landpflanzen (siehe 1.3.1). Auch die Rotalgen, Glaukophyta und Grünalgen besitzen kernkodierte *GapA* und *GapC* Gene (Martin et al. 1993; Liaud et al. 1993, Garnier et al. in Vorbereitung). Die plastidäre *GapA* ist cyanobakteriellen Ursprungs und wurde nach der primären Endosymbiose in den Nukleus transferiert. Das Genprodukt wird mit Hilfe eines Transitpeptides zurück in den Plastiden transportiert (Cerff 1995; Figge et al. 1999).

Nach sekundären Endosymbiosen (Abb. 1 B) ist die Situation schwieriger, die komplexen Algen haben individuelle Lösungen zur Etablierung der plastidären GAPDH-Gene im Nukleus gefunden. Im Fall von *Euglena*, die einer sekundären Endosymbiose mit einer Grünalge entstammt („grüne Linie“), wurde das *GapA* Gen cyanobakteriellen Ursprungs ein zweites Mal vom Nukleus des chlorophytischen Endosymbionten in den Nukleus der Wirtszelle transferiert. Das korrespondierende Protein wird durch alle drei Membranen des Plastiden geschleust, um in das ursprüngliche Kompartiment zu gelangen (Gibbs 1978; Henze et al. 1995; Figge et al. 1999). Dahingegen besitzt keine der bisher untersuchten komplexen Algen der „roten Linie“ eine plastidäre *GapA*, obwohl in die Plastiden der Rotalgen eine typische cyanobakterielle *GapA* importiert wird (Liaud et al. 1994). Sowohl bei den Cryptophyta (Liaud et al. 1997), als auch den Dinophyta (Fagan et al. 1998) und den Heterokontophyta (Liaud et al. unveröffentlicht) übernimmt jeweils eine sogenannte *GapC-I* die Rolle der *GapA* im Calvin Zyklus.

Die *GapC-I* Gene entstammen einer Genduplikation der cytosolischen *GapC*, die Genprodukte werden mittels eines Signalpeptides durch alle vier Membranen des komplexen Plastiden transportiert. Die Produktion von NADPH im plastidären Photosystem I sorgte wahrscheinlich für den notwendigen Selektionsdruck zur Fixierung von drei Mutationen (Ala32, Ser187, Ser188), die einen Wechsel von der strikten NAD-Kosubstratspezifität (*GapC*) zu einer NAD/NADP-Bispezifität (*GapC-I*) bewirken (Didierjean et al. 1997; Liaud et al. 1997). Die *GapC-I* Enzyme der komplexen Algen sind damit ein funktionell gleichwertiger Ersatz für die plastidäre *GapA*.

1.6. Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden drei thematische Schwerpunkte untersucht. Ein Hauptaspekt (I) ist die Untersuchung des Ursprungs der Landpflanzen am Beispiel der *GapA/B*- und *GapC/Cp*-Genduplikationen. Da beide Genduplikation mit dem Übergang vom Wasser- zum Landleben korrelieren, ist das GAPDH-System für diese Fragestellung prädestiniert. Die Genduplikationen bilden somit die Eckpfeiler für diese Untersuchungen. In dieser Arbeit wurden *GapA* und *GapB* sowie *GapC* und *GapCp* Sequenzen aus allen fünf Klassen der Charophyceae sowie den Laub- und Lebermoosen etabliert, um daraus Rückschlüsse über die Eroberung des Landes zu ziehen.

Der zweite Schwerpunkt (II) betrifft die Frage nach der zusätzlichen Funktion der *GapCp* in den Plastiden, die bereits eine *GapAB* besitzen. Während der Arbeit erwies sich die Paprikapflanze (*Capsicum annuum*) als ideales Untersuchungssystem, zuvor waren lediglich *GapCp* Sequenzen aus *Pinus* und *Marsilea* (Farn) bekannt. Zum Einen sollte das Enzym aus Paprika in *E. coli* überexprimiert werden um die Substratspezifität des Enzyms zu bestimmen. Andererseits sollte die Gewebespezifität der Expression anhand verschiedener Paprikagewebe ermittelt werden, um so die physiologische Aufgabe der *GapCp* im plastidären Stoffwechsel aufzuklären.

Der dritte Aspekt (III) ist die Analyse des GAPDH-Systems der Chlorarachniophyta, die im Zuge einer sekundären Endosymbiose eine Grünalge als Plastiden rekrutiert haben. Neben der Bestimmung der cytosolischen GAPDH-Sequenz ist die Untersuchung der plastidären GAPDH von besonderem Interesse. Dazu soll untersucht werden, ob es in der „grünen“ und „roten Linie“ nach sekundären Endosymbiosen wiederkehrende Muster bei der Etablierung der plastidären Genfunktion gibt. Ist (i) die *GapA* wie bei *Euglena* in den Nukleus transferiert worden, (ii) wird die plastidäre GAPDH-Funktion wie in der „roten Linie“ durch eine *GapCp* wahrgenommen, oder (iii) hat *Chlorarachnion* eine alternative Möglichkeit gefunden, die plastidäre GAPDH-Funktion sicherzustellen? Außerdem sollen die Genstrukturen der plastidären und cytosolischen GAPDH Gene analysiert und die Intronpositionen mit denen bekannter Introns verglichen werden, um daraus Rückschlüsse über die Entstehung der Chlorarachniophyta zu ziehen.

2. Materialien und Methoden

Jede Berührung hinterläßt eine Spur.

Edmond Locard (franz. Kriminalwissenschaftler)

2.1. Herkunft des Pflanzenmaterials

Die Kulturen der Grünalgen *Klebsormidium flaccidum* (SAG: 121.80), *Spirogyra spec.* (SAG:170.80) und *Coleochaete scutata* (SAG: B 3.90) stammen aus der Sammlung für Algenkulturen in Göttingen (SAG). Eine akzenische Kultur des Lebermooses *Marchantia polymorpha* wurden freundlicherweise von S. Seufert von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) zur Verfügung gestellt. Pflanzenmaterial des Mooses *Sphagnum cuspidatum* und der Grünalge *Chara vulgaris* entstammen dem Freiland. Paprikapflanzen (*Capsicum annuum*) mit ausdifferenzierten grünen und roten Früchten wurden in einer Gärtnerei erworben.

2.2. *E. coli* Stämme

POP13	Schwarz-Sommer et al. (1987)
XL1-Blue	Stratagene
BI21(DE3)	Studier et al. (1990)
XL1-Blue MRA	Stratagene
XL1-Blue MRA (P2)	Stratagene
SOLR	Stratagene

2.3. Plasmid- und Bakteriophagen Vektoren

pBlueskript II SK+	Stratagene
NM1149	Murray (1983)

EMBL3	Stratagene
λZAP	Stratagene
pET3a	Studier et al. (1990)

2.4. Enzyme für die Molekularbiologie

Die verschiedenen Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Alkalische Phosphatase (Pharmacia), DNaseI (Boehringer), Klenow-Fragment (Amersham, MBI-Fermentas), Lysozym (Serva), Phosphoglycerat Kinase (Boehringer-Mannheim), Polynukleotid Kinase (Pharmacia), Proteinase K (Merck), Restriktionsendonukleasen (Amersham, Biolabs, Pharmacia, USB, MBI-Fermentas), RNAguard Ribonuclease Inhibitor (Pharmacia), SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Gibco/BRL), T4-DNA-Kinase (Biolabs, MBI-Fermentas), T4-DNA-Polymerase (USB, Pharmacia), Ampli-Taq-Polymerase (USB, Pharmacia, Qiagen)

2.5. Reagenzsätze (Kits)

QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen # 20021
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen # 28104
PolyATtract [®] mRNA Isolation System IV	Promega # Z5310
Lambda ZAP-cDNA [®] Synthesis Kit	Stratagene #200450
SizeSep 400 Spun Columns	Pharmacia #27-510501
Expand [™] High Fidelity PCR System	Boehringer Mannheim # 1732641
Rapid DNA Ligation Kit	Boehringer Mannheim # 1635379
Jetstar 2.0 Plasmid Maxi Säulen	Genomed

2.6. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen J.T.Baker, Biomol, BioRad, Bissendorf Biochemicals, BRL, Boehringer Mannheim, Fluka, Gibco BRL, Merck, Pharmacia, Riedel De Haen, Serva, Sigma, Sonnenberg und Wacker-Chemie.

Radiochemikalien lieferte die Firma Amersham Buchler, Braunschweig. Die Röntgenfilme (X-OMAT AR) sowie die Entwickler- und Fixierlösung stammten von der Firma Kodak.

2.7. Geräte

Autoklav:	Westima-Sauter Sterilisator 4.4.6 S1
Automatischer Sequenzierer:	Pharmacia LKB A.L.F. DNA Sequenzer mit Compaq DeskPro 386/20e und Hewlett Packard 7475A Plotter
Computersysteme:	MacIntosh G3 MacIntosh Laser Writer II NTX
Computersoftware:	Microsoft Word, Canvas, MacMolly GCG Sequence Software Package 6.0 Phylip-Package (Felsenstein) A.L.F. Manager Version 2.1
Destillator f. bidest. H ₂ O:	Heraeus Destimat
Eismaschine:	Ziegra Eismaschine
Elektrophorese-Kammern:	Gibco-BRL für Agarosegele Phase, Prot-Resolv für Proteingele Gibco-BRL für Sequenzgele
Elektrophorese-Netzgeräte:	Ingenieurbüro Fischer für Agarose- und Sequenzgele Pharmacia ECPS 3000/150 für Sequenzgele LKB 2297 Macrodrive 5 für Sequenzgele
Fluoreszenzphotometer:	Pharmacia LKB Novaspec II
Folienschweißgerät:	Krupps Vacupack 2 Plus
Geiger-Müller-Zähler:	Berthold LB 1200 und Berthold LB1210 B
Geltrockner:	Biotec Fischer PH-t 40

Kühlwasserbad:	Julabo F 10-Kryostat
Kühlzentrifugen:	Sorvall RC5B und Sorvall RC5C mit Rotoren: GS-3, GSA, SS 34, HB-4, HS-4
Magnetrührer:	Jahnke und Kunkel IKA-Combimag RET
Mikrowellenherd:	Siemens
Oligosynthesizer:	Pharmacia LKB Gene Assembler Plus
Peristaltikpumpe:	PA-M1 von Jahnke und Kunkel
pH-Meter:	Schott CG 840
Pipetten:	Gilson 20, 200, 1000
Schüttler:	Jahnke und Kunkel IKA-Vibrax-VXR
Schüttelplattform:	GFL 3015
Spektralphotometer:	Shimadzu UV-120-02
Sterilbank:	Heraeus LaminAir HLB 2472
Szintillationszähler:	Packard TriCarb 1000
Tischzentrifugen:	Heraeus, Biofuge 15
Ultrazentrifuge:	Beckmann TL100 mit Rotoren: Ti 70, TLA 100.2
UV-Handlampe:	Bachofer HL-6-KL
Vakuumpumpe:	Edwards High Vacuum Pump + Bachofer Kühlfalle KF
Waagen:	Satorius
Wasserbäder:	GFL
Thermostat:	Eppendorf 5320
Transilluminator:	Bachofer IL-350-M
Untertischzentrifugen:	Beckmann, GPKR

2.8. Arbeiten mit *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* auf Platten, in Flüssigmedien, die Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA und die Transfektion mit λ -DNA erfolgte nach Standardprotokollen (Sambrook et al. 1989). Zur Anzucht von *E. coli* Kulturen wurden folgende Medien verwendet: CY-Medium, LB-Medium, NZ-Medium.

2.9. Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.9.1. Standard-Methoden

Die Standard-Methoden beim Arbeiten mit Nukleinsäuren erfolgte nach Standardprotokollen (Sambrook et al. 1989). Es wurden folgende Methoden angewendet:

Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren (Plasmid-Minipräparationen aus *E. coli* Zellen, Präparative Isolation von Plasmiden aus *E. coli* Zellen, λ -Bakteriophagen-Minipräparationen).

Methoden zur Reinigung von Nukleinsäuren (Phenolisierung, Ethanolpräzipitation, Isopropanolpräzipitation, Sucrose- und CsCl-Dichtegradientenzentrifugation, Sephadex-G-50-Chromatographie, Agarose-Gelelektrophorese, Elektroelution von Restriktionsfragmenten, Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren).

Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren (Restriktionsschnitte, Ligation mit T₄-DNA-Ligase, Auffüllreaktion mit Klenow-Polymerase, Phosphorylierung von DNA mit T₄-Kinase, Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase).

2.9.2. RNA-Isolation

2.9.2.1. Isolation von Gesamt-RNA

Zum Zellaufbruch wurden 20 g des Pflanzengewebes in flüssigem Stickstoff sehr gründlich gemörsert. Direkt vor dem Aufnehmen des Pflanzenmaterials wurden den 100ml auf 65°C vorgewärmten Extraktionspuffer (2% (w/v) CTAB, 10 % Polyclar AT, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA pH 8,0, 2 M NaCl) 1 ml β -Mercaptoethanol zugesetzt. Der Ansatz wurde gründlich geschüttelt und bei 16000 g und 4°C 10 min zentrifugiert. Dieses Vorgehen sowie ein sorgfältiges Abnehmen der wässrigen Oberphase schloß sich allen nachfolgenden Schritten an. Nach dem ersten Schritt zur Abtrennung von Polyphenolen erfolgten zwei Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1)-Extraktionen zur quantitativen Präzipitation von

Proteinen. Diesem Überstand wurden 0,2 Volumina Ethanol unter Schütteln zugesetzt und eine weitere Extraktion mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) diente der selektiven Präzipitation von Polysacchariden. Der Überstand wurde mit 1/4 Vol. 10 M LiCl versetzt, die RNA-Präzipitation erfolgte ü.N. bei 0°C.

Nach 30 min Zentrifugation wurde das weiße RNA-Pellet in 2 x 2,5 ml SSE-Puffer (1 M NaCl, 0,5% (v/v) SDS, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) gelöst und mit 2 Vol. Ethanol 2 h bei -20°C gefällt. Aus dem Überstand wird die genomische DNA isoliert (s. 2.9.6). Nach erneuter Zentrifugation wurde das RNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 1 ml H₂O resuspendiert. 2 µl der RNA wurden zur photometrischen Konzentrationsbestimmung bzw. zur Qualitätskontrolle auf einem Agarosegel (0,7%) eingesetzt. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.9.2.2. Isolierung von Poly(A)⁺-mRNA

50 mg oligo dT Cellulose (Pharmacia) wurden in 25 ml Bindungspuffer (400 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,2% SDS) in sterilen Falcongefäßen suspendiert und 1 min bei 3000 g zentrifugiert. Nach Resuspendierung in 10 ml Bindungspuffer wurde 1 ml der Gesamt-RNA zugegeben und der Ansatz 30 min auf der Schüttlerplattform bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Cellulose drei Mal mit je 25 ml Bindungspuffer und ein Mal mit 25 ml Waschpuffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,2% SDS) gewaschen, auf eine Säule gegeben und mit weiteren 800 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 3 ml 55°C warmen Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5). Die Poly(A)⁺-mRNA wurde ü.N. mit 1/10 Vol. Natriumacetat (3 M pH 5,5) und 2 Vol. Ethanol in Corexröhrchen gefällt, bei 12000 g 1 h zentrifugiert und in 20 µl H₂O aufgenommen. Zur Qualitätsbestimmung wurde 1 µl der mRNA auf ein Agarosegel aufgetragen, undegradierete mRNA zeigt einen „Schmier“ mit einem Intensitätsmaximum um 1,5 kb.

2.9.3. Northernblot Experimente verschiedener Paprikagewebe

Für die Northernblots wird in einer Gärtnerei eine Paprikapflanze mit grünen und roten Früchten gekauft. Vor der Aufarbeitung der verschiedenen Gewebe wird die Pflanze für zwei Tage in der Klimakammer mit Dauerlicht gestellt. Aus je 140 g des grünen und roten Fruchtgewebes wurde Gesamt RNA und Die Poly(A)⁺-mRNA isoliert. Aufgrund hoher Sekundärstoffgehalte und RNase-Mengen im Blatt wurde die Gesamt-RNA aus 5 g Material mit 12 ml TRIzol Reagent (Gibco) nach Herstellerangabe isoliert. Die mRNA wurde jeweils in 30 µl H₂O gelöst und bei -80°C gelagert. Nach optischer und photometrischer Abschätzungen der RNA-Menge wurden gleiche Mengen (10 µg) in 6 µl H₂O verdünnt. Als Größenstandard wurden 4 µg der 0,16 - 1,77 kb Leiter von Gibco eingesetzt. Die Proben wurden nach Zugabe von 2,5 µl 10 x MOPS-Puffer, 12,5 µl Formamid, 4,0 µl Formaldehyd, 0,5 µl Ethidiumbromid und 1,5 µl Formaldehyde Gel-loading Puffer (Sambrock et al.) 10 min bei 68°C denaturiert, auf Eis gestellt und 11,5 h lang bei 25 Volt mittels eines 1,3 % (w/v) Formalingels elektrophoretisiert. Die RNA wurde mit 20 x SSC-Puffer auf Nylon Hybond N⁺ Membran ü.N. geblottet und 5 min mit UV-Licht auf der Membran fixiert. 60 ng Sonden-DNA werden mit je 5 µl α-³²P-dCTP und -dGTP markiert und über Sephadex G-50 Gelfiltration gereinigt. Die Prähybridisierung erfolgte in 40 ml des High-SDS-Buffers (Boehringer) für 3 h bei 52°C, die Hybridisierung in 15 ml des Puffers unter gleichen Bedingungen ü.N. Die Filter wurden 10 min mit 2 x SSC, 0,1% SDS (w/v) und 10 min sowie 20 min mit 1 x SSC, 0,1% SDS (w/v) gewaschen und 1 h, 3 h sowie ü.N. exponiert.

2.9.4. Herstellung von cDNA-Banken

Die cDNA-Banken wurden mittels des Lambda ZAP-cDNA[®] Synthesis Kit (Stratagene #200450) nach dem Herstellerprotokoll mit folgenden Veränderungen erstellt. Nach der Erststrangsynthese wurde der Reaktionsmix für eine weitere Stunde bei 42°C inkubiert. Die cDNA-Größenfraktionierung erfolgte nach Herstellerangaben mittels der SizeSep 400 Spun Columns (Pharmacia #27-510501). Die cDNA wurde in 5 µl H₂O aufgenommen, 1 µl davon wurde für die Ligation eingesetzt. Nach der Verpackung wurde die cDNA-Bank in 1 ml SM-Puffer (5g NaCl, 2g KCl, 25 ml 1 M Tris-HCl pH 7,4, 2 % Gelatine (w/v), 5 ml 1 M MgSO₄, ad. 1 l H₂O) aufgenommen.

Chara vulgaris:

Das Pflanzenmaterial stammte aus einem kleinen Teich im ehemaligen Erztagebau nahe Salzgitter-Gebhardshagen, wo die Alge in großen Mengen wuchs (Grabow und Wimmer 1998). Das Material wurde am 9.7.1996 gesammelt, von Verunreinigungen sowie Aufwuchs befreit, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die exakte Artbestimmung erfolgte von Herrn Dipl. Biol. W. Wimmer. Für die cDNA Synthese wurde die Poly(A)⁺-mRNA aus 100 g Algenmaterial eingesetzt.

Der Titer von zwei parallel erstellten cDNA-Banken betrug 2,69 und 3,50 Mio Pfu.

Marchantia polymorpha:

Eine sterile Kultur des Lebermooses stammte aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig/Stöckheim. Das Moos wurde im 20°C Lichtraum in Petrischalen gezüchtet. Das Medium (pH 5,5) enthielt pro Liter 50 ml Mineralkonzentrat (250 g KNO₃, 25 g MgSO₄ # 7 H₂O, 17,2 g NaH₂PO₄ # 1 H₂O, 15 g CaCl₂ # 2 H₂O, 13,4 g (NH₄)₂SO₄, 3,43 g Na₂ EDTA (Titriplex), 2,56 g FeSO₄ # 7 H₂O, 300 mg H₃BO₃, 300 mg ZnSO₄ # 7 H₂O, 100 mg MnSO₄ # 1 H₂O, 75 mg KJ, 25 mg Na₂MoO₄ # 2 H₂O, 25 mg CuSO₄ # 5 H₂O, 25 mg CoCl₂ # 6 H₂O ad 5 l), 5 ml Vitaminkonzentrat (10 g myo-Inosit, 1 g Thiaminiumdichlorid, 100 mg Nicotinsäure, 100 mg Pyridoxalhydrochlorid ad 500 ml), 20 g Haushaltszucker und 5 g Gelrite (Roth # 0039.1).

Aus 70 g Pflanzenmaterial wurde Poly(A)⁺-mRNA isoliert.

Der Titer von zwei parallel erstellten cDNA-Banken betrug 0,43 und 1,65 Mio Pfu.

Capsicum annuum (rote Frucht):

Die für die Erstellung der cDNA-Bank verwendete rote Paprikafrucht stammte aus einem Supermarkt. Für die cDNA-Synthese wurde die Poly(A)⁺-mRNA aus 50 g roten Gewebes eingesetzt.

Der Titer der cDNA-Bank betrug 1,76 Mio Pfu.

2.9.5. RT-PCR-Experimente zur Amplifikation von GAPDH-Genen

Von folgenden Organismen wurden RT-PCR-Experimente durchgeführt

Sphagnum cuspidatum:

Das Pflanzenmaterial wurde am 21.9.1996 aus einem Torfmoospolster im Großen Uchter Moor (Niedersachsen, geographisch zwischen Dümmer See und Steinhuder Meer) gesammelt. Die exakte Artbestimmung erfolgte von Herrn Dipl. Biol. W. Wimmer. 55 g Pflanzenmaterial wurden eingesetzt, die Poly(A)⁺-mRNA wurde in 40 µl H₂O gelöst.

Coleochaete scutata (B 3.90):

Der Stamm B 3.90 der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG) wurde im Basal Medium 1 der SAG (Schlösser 1994) in der 20°C Klimakammer in 2 l Erlenmeyerkolben unter Schütteln angezogen. Da *Coleochaete* in zusammenhängenden Kolonien extrem langsam wächst, wurden die Kolonien in einem Mörser steril zerkleinert und weiter angezogen. Nach 10 Monaten Wachstum betrug die Ausbeute an Pflanzenmaterial 4,2 g. Die daraus isolierte Poly(A)⁺-mRNA wurde in 20 µl H₂O gelöst.

Spirogyra ssp. (SAG 170.80):

Spirogyra wurde im Desmidiaceae Medium 7 der SAG (Schlösser 1994) in einem 2 l Erlenmeyerkolben am Fenster stehend angezogen. Aus 3 g Pflanzenmaterial wurde Gesamt-RNA isoliert und in 20 µl H₂O gelöst.

Klebsormidium flaccidum (SAG 121.80):

Klebsormidium wurde im Basal Medium 1 der SAG (Schlösser 1994) in einem 2 l Erlenmeyerkolben unter Schütteln (40 Upm) in der Lichtkammer angezogen. Aus 5 g Pflanzenmaterial wurde Gesamt-RNA isoliert und in 20 µl H₂O gelöst.

Capsicum annuum:

Aus je 20 g grünen und roten Paprikafrüchten wurde Poly(A)⁺-mRNA isoliert.

Mit Hilfe degenerierter hochkonservierter GAPDH-Primer wurden die exprimierten GAPDH-Gene aus Gesamt-RNA und Poly(A)⁺-mRNA der entsprechenden Gewebe amplifiziert.

3' Primer für die RT-Reaktion (18mer, 16-fach degeneriert):

5' CCAYTCRTRTCRTACCA 3' (WYDNE-)

5' Primer für die PCR-Reaktion (17mer, 384-fach degeneriert):

5' GSNATHAAYGGNTTYGG 3' (GINGFG+)

Für die Reverse Transkriptase Reaktion wurden 5 µl des dNTP-Mix (je 4 mM), 4 µl 5*RT-Puffer (Gibco), 1 µl WYDNE- Primer (100 p Mol), 2 µl 10 mM DTT (Gibco), 6 µl H₂O und 1 µl Poly(A)⁺-mRNA (bzw. Gesamt-RNA) eingesetzt. Nach 10 min bei 65°C zur Auflösung von Sekundärstrukturen wurde dem Reaktionsmix auf Eis 0,5 µl RNAGuard (39,5 U/µl) und 0,5 µl Reverser Transkriptase (200 U/µl) zugesetzt. Die Erststrangsynthese erfolgte bei 42°C für 30 min, es folgten 5 min bei 99°C und 5 min bei 5°C.

Für die PCR-Reaktion wurden zum RT-Ansatz 10 µl eines 350 mM KCl/ 9 mM MgCl₂-Mixes, 20 µl Puffer Q (Qiagen), 1 µl WYDNE- Primer (100 p Mol), 1 µl GINGFG+ Primer (100 p Mol) und 0,5 µl Taq-Polymerase (2,5 Units, Qiagen) zugegeben. Die PCR erfolgte in 35 Zyklen von 1 min 93°C, 1 min 50°C, 3 min 72°C.

Das zu klonierende PCR-Amplifikat wurde mittels des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen # 28104) aufgereinigt und in 42,5 µl H₂O aufgenommen. Nach Zugabe von 0,5 µl 0,1 M rATP und 5 µl 10 x Kinasepuffer und 10 U Polynukleotid Kinase wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgte ein Phenolisierungsschritt und eine Ethanol-Fällung. Die in 20 µl TE aufgenommene DNA wurde auf einem 0,7 % (w/v) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und das Amplifikat der gewünschten Größe wurde mittels des QIAEX II Gel Extraction Kits (Qiagen # 20021) oder der Verwendung von Whatman DE81 Papier aufgereinigt.

Ligationen erfolgten entweder mit dem Hexammincobalt-Chlorid-Puffer (Sambrock et al. 1989) ü.N. oder für 15 min mit dem Rapid DNA Ligation Kit (Boehringer Mannheim # 1635379). Transformationen erfolgten mit selbst hergestellten CaCl_2 -kompetenten oder hochkompetenten *E. coli* XL1blue (Stratagene # 200236).

2.9.6. PCR zur Amplifikation von GAPDH aus *Chlorarachnion* Gesamt-DNA

Mit je 300 ng Template DNA aus *Chlorarachnion* CCMP621, die freundlicherweise von G. McFadden zur Verfügung gestellt wurde, wurden PCR Amplifikationen mit homologen Primern der *GapX* und *GapC* Gene durchgeführt. Die Amplifikationen erfolgten mit Hilfe des ExpandTM High Fidelity PCR Systems (Boehringer Mannheim) nach Herstellerangaben in 100 μl Volumen. Für die PCR wurden folgende Zyklen verwendet (1 Zyklus von 2 min und 94°C; 10 Zyklen von 15 sek 94°C, 30 sek 54°C, 2 min 72°C; 25 Zyklen von 15 sek 94°C, 30 sek 54°C, 3 min 72°C und 1 Zyklus von 7 min und 72°C).

Bei fehlendem Produkt oder zu geringer Ausbeute wurden 10 μl des Ansatzes nochmals für eine Reamplifikation verwendet. Als Positivkontrolle wurden jeweils 1 ng des entsprechenden homologen cDNA-Klons verwendet.

2.9.7. Erstellung einer genomischen Bank aus *Capsicum annuum*

Die genomische DNA wurde aus dem Überstand der LiCl-Präzipitation bei der Gesamt-RNA Isolation gewonnen. Der Überstand wurde mit 1/10 Vol. 3 M NaOAc und 2 Vol. Ethanol gefällt in 1 ml TE aufgenommen und einer CsCl-Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Die gezapfte DNA-Bande wurde zur quantitativen Entfernung von CsCl-Ionen zwei Mal NaOAc präzipitiert, die Ausbeute an Gesamt-DNA beträgt 100 μg .

Für die Partialverdauung wurde das Enzym *Sau3AI* verwendet. In Vorversuchen wurde die optimale Enzymkonzentration ermittelt, bei denen die DNA-Fragmente eine Größe zwischen 15 und 20 kb aufwiesen. Für den Hauptversuch wurde zwei Mal parallel 45 μg Gesamt-DNA mit *Sau3AI*-Konzentration von 0,050 U/ μl und 0,038 U/ μl eingesetzt. Die DNA wurde in 1 x

All-Phor-One Puffer (Pharmacia) in 900 µl Vol. verdünnt, 90 µl *Sau3AI*-Enzym wurden ebenfalls im gleichen Puffer mit einer BSA (MBI) Konzentration von 0,2 µg/µl verdünnt. Nach 10 min Vorinkubation der Ansätze bei 37°C wurde die Partialverdauung durch Zugabe der Enzymlösung zur DNA gestartet. Nach exakt 60 Minuten wurden die Ansätze mit 180 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 abgestoppt, zwei Mal phenolisiert, gefällt und zusammen in 200 µl TE aufgenommen. Die Größenfraktionierung der DNA erfolgte mittels eines 10 - 40 %igen Saccharosegradienten (10 bzw. 40 % Saccharoselösung, 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) durch Zentrifugation im SW-40 Rotor für 22 h bei 22000 Upm und 20°C. Fraktionen von 250 µl wurden mit 0,6 Vol. Isopropanol und 1/10 Vol. 3 M NaOAc pH 6,5 gefällt, in 100 µl TE aufgenommen, nochmals mit Ethanol präzipitiert und in 20 µl TE aufgenommen.

Für die Ligation wurden 2,5 µl (250 ng) der durchschnittlich 18 kb großen Partialfraktion mit 0,5 µl 10 x Ligation Buffer (Stratagene), 0,5 µl 10 mM rATP (Stratagene) und 1,0 µl (1 µg) EMBL3-Vektor (*Bam*HI geschnitten und dephosphoryliert, Stratagene) sehr sorgfältig gemischt und 30 min bei 37°C vorinkubiert. Nach Zugabe von 0,5 µl T4-Ligase (4 U/µl, Stratagene) erfolgte die Ligation bei 4°C für 16 h. Die Verpackung des gesamten Ligationsansatzes erfolgte nach Herstellerangaben mit Gigapack III Gold Packaging Extracts (Stratagene). Der Titer aus zwei Ansätzen der Ligation und Verpackung der genomischen Bank (EMBL3) aus *Capsicum annuum* betrug 1,94 (0,64 und 1,30) Mio. Pfu. Legt man bei Paprika einen DNA-Gehalt der Zelle von 3,8 pg zugrunde (Bennett und Leitch, 1995) ist dieser mit ca 3,7 Mrd. bp mit dem des Menschen vergleichbar. Die Wahrscheinlichkeit bei dieser Genomgröße und 1,92 Mio Pfu ein Einzelgen kloniert zu haben kann nach der Poisson-Verteilung berechnet werden und beträgt 99,98%, im statistischen Mittel ist in der Genbank mit 9 bis 10 Klonen zu rechnen (5.1.1. → Ausubel et al. 1987).

2.9.8. Klonierung der *GapCp* aus *Capsicum annuum* zur Überexpression

Die cDNA der *GapCp* aus Paprika sollte mit geeigneten Primern mittels PCR amplifiziert, in Bluescript SK+ kloniert, kontrollsequenziert und in die *NdeI/BamHI* Schnittstellen des pET-3a Vektor subkloniert werden.

5'-Primer: 5' ATCTACATATGAAAACAAGGGTTGGTATAAAT 3'

3'-Primer: 5' ACTCATGATCATTCTATTTCAACTGGTGGCTGC 3'

Die PCR wurde mit der Pwo-Polymerase (Boehringer Mannheim) durchgeführt, da hier aufgrund der Proofreadingaktivität die PCR-Fehlerrate im Gegensatz zur herkömmlichen Taq Polymerase um den Faktor 10 geringer ist. Master Mix 1 enthielt einen je 400 µM dNTP, je 1 µl Primer (100 pM) und 100 ng aufgereinigtes *GapCp*-cDNA-Insert in 50 µl Vol., der Master Mix 2 enthielt in 50 µl Vol. 10 µl 10 x PCR-Puffer (Boehringer Mannheim) und 0,5 µl Pwo Polymerase (5U/µl). Die Mix wurden vermischt, es folgte ein PCR-Zyklus für 2 min bei 94°C, gefolgt von 30 Zyklen für 30 sek. bei 94°C, 1 min bei 50°C und 2 min bei 72°C denen sich noch eine 7 min Extension bei 72°C anschloß. Das Amplifikat wurde aufgereinigt, phosphoryliert, in die *EcoRV*-Schnittstelle des dephosphorylierten Bluescript SK+ Vektors kloniert und in *E. coli* XL1blue transformiert. Die Kontrollsequenzierung eines Klons zeigte, daß das *GapCp*-Gen fehlerfrei amplifiziert wurde und die Schnittstellen der Primer vorhanden sind. Der Klon wurde mit *NdeI* geschnitten. Da das *GapCp*-Gen eine interne *BamHI* Schnittstelle aufweist erfolgte der zweite Schnitt mittels einer partiellen Verdauung mit *BamHI*. Das vollständige *GapCp*-Amplifikat wurde in pET-3a kloniert, die Übergänge der Klonierungssites wurden kontrollsequenziert. Anschließend wurde das Plasmid in *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

2.10. Arbeiten mit Proteinen

2.10.1. Überexpression in *E. coli*

50 ml LB mit Ampicillin (100 µg/ml) werden mit 10 µl einer Vorkultur *E. coli* BL21(DE3) mit dem pET-3a Vektor, in den das GapCp Gen aus Paprika kloniert ist (siehe 2.9.8.), angeimpft und bei 30°C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 1,5 wird die Kultur mit 125 µl IPTG (c = 47,6) induziert und es werden alle 30 min 1 ml Probe entnommen und auf Eis gestellt. Die Proben werden 2 min bei 14000 Upm zentrifugiert, das Pellet wird mit 400 µl Lysispuffer (50 mM Tris HCl pH 8,0; 2 mM EDTA pH 8,0) gewaschen erneut zentrifugiert, in 400 µl Lysispuffer mit 100 µg/ml Lysozym aufgenommen und gründlich gevortext. Nach Inkubation von 15 min bei 30°C und erneutem Vortexen befinden sich die Proteine nach der Zentrifugation im Überstand.

2.10.2. Proteingehaltsbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Das Testreagenz (Biorad) wurde 1:5 verdünnt, in einer Plastikkuvette wurden von 1 ml davon 5 µl der Proteinlösung gegeben es wurde gründlich gemischt. Nach 10 Minuten wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen verdünntes Reagenz ohne Protein gemessen. Eine BSA-Lösung (Rinderserumalbumin) bekannter Konzentration diente zur Erstellung von Eichgeraden.

2.10.3. SDS-Proteingelelektrophorese

Die Gele sowie Lösungen für die SDS-Proteingelelektrophorese erfolgte nach Standardprotokollen (Ausubel et al. 1987; Sambrook et al. 1989). Die Acryl/Bisacrylamidkonzentrationen des Sammelgels betragen 8%, die des Trenngels 12%. 20 µl Proteinprobe wurden mit 20 µl 2x Laemmli-Puffer versetzt, 5 min bei 100 Grad denaturiert, anschließend auf Eis gestellt und dann zusammen mit dem 10 kDa Proteinstandard (GibcoBRL) auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 8 V/cm für das Sammelgel und 15 V/cm für das Trenngel.

2.10.4. GAPDH-Enzymtest

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte nach dem optisch-enzymatischen Test von Otto Warburg. Reduziertes NADH absorbiert im Gegensatz zu NAD Licht der Wellenlänge zwischen 300 und 400 nm. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die gemessene Extinktion proportional zur Konzentration von NADH.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

E: gemessene Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge

c: Konzentration der untersuchten Lösung in mmol/l

d: Länge des Lichtweges in cm

Bei 364 nm entspricht eine Extinktion von $E = 1,0$ einer Konzentration von 0,294 mmol/l reduziertem NADH.

Im Enzymtest wird die Oxidation von NAD zu NADH durch die Reduktion von 1,3-Diphosphoglycerat (1,3-DPG) zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (GA-3-P) gemessen, was der glukoneogenetischen Reaktionsrichtung entspricht. Zur Bereitstellung einer genügend großen Menge an 1,3-DPG als Substrat wurde ein gekoppelter Enzymtest durchgeführt, wobei 3-Phosphoglycerat (3-PGA) und Phosphoglyceratkinase in ausreichender Menge eingesetzt wurde. Zu 940 μ l Assay-Medium (0,1 M Tris-HCl pH 7,8 bei 25°C; 2 mM DTE; 1 mM EDTA; 8 mM MgSO₄; 2 mM ATP; 4,5mM PGA) wurden 20 μ l zu messende Proteinlösung in der Küvette zugegeben, gründlich durchmischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μ l PGK (10 μ l PGK (Boehringer Mannheim) in 0,1 M Tris-HCl pH 7.8) und 20 μ l NADH (15 mM in 0,1 m Tris-HCl pH 7.8) gestartet. Zur Ermittlung der Enzymaktivität wurde die Anfangsgeschwindigkeit anhand des Schreiberdruckes vom Photometer bestimmt.

Die gemessene Enzymaktivität wird in Units (U) angegeben, wobei eine Unit der Umwandlung von 1 Mikromol (μ M) Substrat pro Minute entspricht. Hier wurde die spezifische Enzymaktivität (μ M NADH/mg Protein \cdot min) angegeben.

2.11. Abkürzungen

as	Aminosäure(n)
bp	Basenpaar(e)
c	Konzentration in mg/ml
1,3-DPG	1,3-Diphosphoglycerat
DTE	erythro-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol
DTT	threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol
EST	expressed sequence tag
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GA-3-P	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GapAB	plastidäre GAPDH
GapC	glykolytische GAPDH
GapCp	plastidäre GapC
GapX	plastidäre GAPDH (<i>Chlorarachnion</i>)
h	Stunde
kDA	Kilo Dalton
NAD(P)H	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
min	Minute(n)
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
3-PG	3-Phosphoglycerat
PGK	Phosphoglyceratkinase
PRK	Phosphoribolukinase
rbcL	große Untereinheit der Ribulose-1,5-diphosphat-Carboxylase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion
Rubisco	Ribulose-1,5-diphosphat-Carboxylase
rpm	Rounds per minute
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vol	Volumen

3. Ergebnisse

Das Glück trifft nur den, der darauf vorbereitet ist.

Linus Pauling

3.1. *GapA* und *GapB* Sequenzen aus Charophyteen und Landpflanzen

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Charakterisierung von plastidären *GapA* und *GapB* Sequenzen aus Grünalgen und Landpflanzen unter besonderer Berücksichtigung der Charophyceae (Chlorophyta) und Moose. Die *GapA* und *GapB* Gene entstammen einer Genduplikation, eines hier als *GapA** bezeichneten Gens, innerhalb der Grünalgen. Zu Beginn der Arbeit waren *GapA* und *GapB* Sequenzen aus den drei Chlorophyteen *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Spermatozopsis similis*, der Ulvophyceae *Cladophora rupestris* sowie der Prasinophyceae *Scherffelia dubia* bekannt (Kersanach et al. 1994; Petersen 1995). Darüber hinaus waren *GapA* und *GapB* Sequenzen aus höheren Landpflanzen, aus Farnen, sowie aus der Charophyceae *Chlorokybus atmophyticus* verfügbar (Brinkmann et al. 1989; Pahnke 1994; Petersen 1995).

3.1.1. Sequenzanalyse und Alignment der *GapA* und *GapB* Sequenzen

Es wurden sechs *GapA* und vier *GapB* Sequenzen aus sieben Organismen kloniert und sequenziert (siehe Tabelle 1). *GapA* und *GapB* Klone wurden aus der Angiospermen *Capsicum annuum* und dem Lebermoos *Marchantia polymorpha* identifiziert. Bei ausgiebigem Durchmustern einer cDNA-Bank aus *Physcomitrella patens* wurde ein dritter allelischer *GapA* Klon identifiziert (*GapA1* und *GapA2*; Petersen 1995). Aus einem weiteren Laubmoos *Sphagnum cuspidatum* (Torfmoos) wurden ebenfalls insgesamt drei allelische *GapA* Klone isoliert. Die beiden sequenzierten Klone besitzen auf Ebene der Aminosäuren eine Identität von 95%. Da trotz intensiver Suche in Laubmoosen keine *GapB* gefunden wurde, deutet dies darauf hin, daß sie in dieser Organismengruppe nicht vorhanden ist. Weitere *GapB* Sequenzen konnten aber in den Charophyteen *Chara vulgaris* und *Coleochaete scutata* identifiziert werden. Aus den Charophyteen *Spirogyra spec.* und *Klebsormidium flaccidum* wurden *GapA* Sequenzen isoliert.

Tab. 1: Liste der isolierten und sequenzierten *GapA* und *GapB* Klone

Organismus	Gen	Klonierungsmethode	Länge cDNA (Bp)	Länge Reife Untereinheit (As)
1. <i>Capsicum annuum</i>	<i>GapA</i>	RT-PCR	942	314
2. <i>Capsicum annuum</i>	<i>GapB</i>	RT-PCR	954	317
3. <i>Sphagnum cuspidatum</i>	<i>GapA1</i>	RT-PCR	956	318
4. <i>Sphagnum cuspidatum</i>	<i>GapA2</i>	RT-PCR	852	284
5. <i>Marchantia polymorpha</i>	<i>GapA</i>	cDNA-Bank	1443	338
6. <i>Marchantia polymorpha</i>	<i>GapB</i>	cDNA-Bank	1380	351
7. <i>Spirogyra spec.</i>	<i>GapA</i>	RT-PCR	956	318
8. <i>Klebsormidium flaccidum</i>	<i>GapA</i>	RT-PCR	954	318
9. <i>Chara vulgaris</i>	<i>GapB</i>	cDNA-Bank	1104	368
10. <i>Coleochaete scutata</i>	<i>GapB</i>	RT-PCR	954	318

Abb. 5 enthält ein Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller in dieser Arbeit identifizierten *GapA* und *GapB* Klone zusammen mit weiteren repräsentativen GAPDH Sequenzen. Das Alignment gliedert sich in vier Blöcke, wobei die oberen beiden *GapA* bzw. *GapB* Sequenzen der höheren Pflanzen (Streptophyta; Bremer 1984) inklusive der Charophyceae und Landpflanzen enthalten und darunter alle bekannten *GapA** Sequenzen der Grünalgen im engeren Sinne (ohne die Charophyceae; Sluiman 1984) aufgelistet sind. Die *GapA* aus *Pisum* (Erbsen) wurde als Referenzsequenz verwendet. Sequenzvergleiche auf Aminosäureebene innerhalb der *GapA* und *GapB* Sequenzen ergeben vergleichbare Identitätswerte von mindestens 83%, die den sehr hohen Konservierungsgrad dokumentieren. Da in GAPDH Genen die N-terminale Kosubstratbindungsdomäne wesentlich variabler als die katalytische C-

3. Ergebnisse

Aminosäurealignment plastidärer *GapA* und *GapB* Sequenzen

```

                25ABC                66AB
            10  20  |||  30  40  50  60  70  80  90  100
1  KVAINGFGRIGRNFRLRCWHGR-KDSPLDVIAINDTGGVKQASHLLKYDSTLGI FADAVKPVGTGDISVDGKVIKVVSDRNPANLFPWKELGIDLVEGTGVFV
2  --G.....-.....E.....Q...N...S...GD.....
3  .....GDA.....DNA.....S...G.....
4  .....VV.....I T P QVA N.....V.....DYE.....P...
5  .G.....I.....-.....VV...X.....M T...A D S.....L...GAM.....
6  .....I...Q...-.....VV.....M T N...VE NNA.....L...GDMD.....
7  .G.....I.....-.....EIVV...L.....M T A...VD N S.....T.....L...G.....
8  .....I.....-.....E VV.....M...Y A D A...I I.....L...G M V.....
9  .....I.....-.....E.....M T G E I D A...H.....L M...G K M V.....
10 .G.....I.....-D...E.....A.....M...N...IADDNS.....I.....L...G M...I
11 --.....N...-EN...E VV.....-.....I T...V D A.....N D T K...G M N.....
12 -----S...

13 .....-.....E VV...S...N.....M T K E I L N N E T T...P.....S D L K...A...I.....
14 -----V V...S...N.....M T K...V D N E T...P.....N D L K...A...I.....
15 .....E...I...V V V...S...R N.....M T K...I D D T T...P T...S D L K...G...I.....
16 .G.....-.....E I...V...S...N.....M T K...I D D T H L...T T...S D L K...A D M...I.....
17 R.....G D E...E V V...S...N A.....M...K...V G D D T F L L...P T...N D L K...A...I.....
18 ----.....Y E -E...I E V...S...N A.....M T K E...A I D D K T L...G...P T...N D L K...A D...I.....I
19 .G.....L.....-P...E...S...T.....M T N...T D E T H...A...Q I...N D L K...A...I.....
20 R.....G D...E...S...T.....M T N N G I I D E K T...P T I...N D...Q...A.....

21 R.....-Q N T L...V...S.....T A...I D D S H...Q...I...S D L Q...M N.....I
22 -----D C...E L...V...S...A T...A M T...I D D T H F...N...Q...S D L Q...A D...I
23 -----I...D L Q...A M...I...L
24 .....-C S...G...V...S.....T G...Q I D D S H...T...A D L K...M...I.....
25 .....Q F L...-E N N E V V...S...A...I T E R X...E K I D D S T M A...N R I...N D T K X X...A D M V.....

26 R.....L...T...Q...E V G...S D P R T N A...R...M...K L...I S A D E N S...T N...T...C...L...A W N V...A...T

```

```

                123AB                AB
            110  120  ||  130  140|  150  160  170  180  190  200
1  DREGAGRHITAGAKKVLITAPRKG-DIPTYVVGVNADAYTHADD-II SNASCTINCLAPFVKVLDQKFGLI I K G T M T T H S Y T G D Q R L L D A S H R D L R R A R A A A
2  ....K.Q.....G.-.....L.NPDEP-.....I.....
3  ....K.Q.....G.-.....Q.NPDEP-.....
4  ....K.LQ.....G.-.....C...E.K.YP.EE-.....
5  .AD...K.....G.-A.....EEK.SPSEP-.....E.....
6  .EA...K.Q.....G.-A...F...EQD.K.S.A-.....E.....
7  .K...K.LK.....G.-A.....E.N.G.E-.....E.....
8  .K...K.LQ.....G.-P.....I...EEL.DPSEQ-.....E.....
9  .S...K.....G.-K.....QN.K.T.T-.....QI...A...L.....
10 .GP...K.E.....G.-P.....K.V.SEP-.....I.EE.....
11 .EA...K.LE.....G.-N...I...EEK.K.SEK-.....V.V.C.....
12 .SA...K.E.....A.S.....DQD.DPSAP-.....I.SD...V.....

13 .GP...K.Q...I...A.A...I...EQD.G.EVAD.....A...EES.V.....
14 .GP...K.Q...I...A.A...EQE...EVAN.V.....A.I...EE...V.....
15 .GP...K.Q...I...A.A...EGD.D.SVAD.....I.EE...V.....R
16 .GP...K.Q...I T P X A...M...EGD.D.DVAN.....EE...V.....
17 .GP...K.Q...I...A.A...M...EGD.S.EVAN.....E...V.....R
18 .GP...K.Q...I...A.A...D.D.DVAN.....I M A E...V.....
19 .GP...K.Q...I...A.SE...EGD.H.DVSN.....EE...V.....
20 .GP...K.LQ.....A.AE...E.Q.D.DASA.....EE...V.....

21 .KV...K.Q...S...A.DK...F...EGD.K.EYP-.....E...V.....
22 .TK...SK...E...A.S...EQD.K.S.A-.....E...V.....
23 .EA...K.L...I...A.K-S...F.I...DKD.K.EYP-V...M...C...A...V...V.....
24 .S...K...V...A.K.V...I...DKD.NPKT.H.V...V.E...V...M...R A...
25 SE...KALA...I...G.-G...F.M...S.D.K.E.-P...I V E...V V...

26 TH...TK.VQ.....G...P N G...H E K E E Y E V...I A...I N D N...I...

```

3. Ergebnisse

	210	220	230	240	249B	250	260	270	280	290	300							
1	LNIVPTS	TGAAKA	VALVLP	TLKGLN	GIALRV	PTPNVSV	VDLWVQ	VSKK-TF	AEVNEA	FPRESAA	KE-LTG	ILSVCDE	PLVSVDF	RCTDVS	SSTVDSS	SLTMVM		
2SSSSSSSSSSSSSSSS		
3SNLQDANEVSIASIASI		
4SNEATDKAISSISISI		
5	V.....NEASDAASISISISIS		
6NIEQDACQKVASISISIS		
7NEADASGPKASISISISI		
8NEAANGDMKASISISISI		
9QQITEAANGPKASISISI		
10SSITEAAGPMKVASISISI		
11SQITENANNKDNISISIS		
12QIITEAANGPKASISISI		
13SQNAGISDAKAEGPKDVSTIS		
14SQINEGITDAKDGPNAVSTIS		
15QINTGITDDAKAGPQMVDVSCIAS		
16SQINGISDSKADGPKASISISI		
17SQINTEGLTDNXANGPKAISISI		
18QINTGITDTNANGSKGSLISEI		
19TKNENGCTDKANGPKVASISIS		
20TQINTEGITDQAKAEGPNVASLIS		
21TSSTEAANGPMKVHEAIKQTSIA
22TKVTEAANGPKGSCKMNIS		
23TNFIIENAGMKVASISI		
24TGFTEQDAGPMKVAITISISI		
25TQELQDAGPKVGAIMKKSTIA	
26	V.....IEQENIQGVLKANTSKVEYTLESGCG

	310	320	330		Identität (%)						
1	GDDL	VKVI	AWYD	NEWGYSQR	VVDLAD	IVANNWK*	1	<i>Pisum sativum</i> GapA	100		
2	..MSCQ*		2	<i>Capsicum annuum</i> GapA	92		
3	..MSCQ*		3	<i>Zea mays</i> GapA	91		
4	..MVS*			4	<i>Pinus sylvestris</i> GapA	89		
5	..MVS*			5	<i>Matteucia struthiopteris</i> GapA	87		
6	..MVNLEKE*		6	<i>Physcomitrella patens</i> GapA	85		
7	..MVX*			7	<i>Sphagnum cuspidatum</i> GapA	86		
8	..MVNLEKTGA*		8	<i>Marchantia polymorpha</i> GapA	86		
9	..MVQ*			9	<i>Coleochaete scutata</i> GapA	86		
10	..MVL*			10	<i>Spirogyra spec.</i> GapA	84		
11	..MV*				11	<i>Klebsormidium flaccidum</i> GapA	83		
12	..MVSH*			12	<i>Chlorokybus atmophyticus</i> GapA	(85)		
13	..MVHLKPG>		13	<i>Pisum sativum</i> GapB	80	100	
14	..MIV*				14	<i>Capsicum annuum</i> GapB	81	93	
15	..MVHLAKPG>		15	<i>Zea mays</i> GapB	78	90	
16	..MV*				16	<i>Pilularia globulifera</i> GapB	80	90	
17	..MVHLAQPG>		17	<i>Marchantia polymorpha</i> GapB	79	88	
18	..MLV*				18	<i>Coleochaete scutata</i> GapB	78	85	
19	..MVHLAKPG>		19	<i>Chara vulgaris</i> GapB	81	86	
20	..MLVHPG>			20	<i>Chlorokybus atmophyticus</i> GapB	80	85	
21	..MVEVTKKVA>		21	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> GapA*	79	79	100
22	..MVAYTKHE*		22	<i>Chlorella vulgaris</i> GapA*	(79)	(78)	(82)
23	..MIVELASKA*		23	<i>Spermatozopsis similis</i> GapA*	(79)	(80)	(84)
24	..MIVELKKM*		24	<i>Scherffelia dubia</i> GapA*	79	78	83
25	..MVLELCEKE*	25	<i>Cladophora rupestris</i> GapA*	73	78	78
26	..GMEK*		26	<i>Synechococcus gap2</i>	73	69	70

Abb. 5: Aminosäurealignment der reifen Untereinheit plastidärer *GapA* und *GapB* Sequenzen aus Grünalgen und Landpflanzen. Als Outgroup wird die *gap2* von *Synechococcus* verwendet. Es sind die Identitäten der Aminosäuren angegeben, wobei die Sequenzen von *Pisum* (*GapA* und *GapB*) bzw. *Chlamydomonas* als Referenz verwendet werden. Identitäten partieller Sequenzen sind in Klammern gesetzt.

GapB		
Pea	<VANKWPGTPKVG---SGDPLEDFCETNPADEE CKVYE *	<i>Pisum sativum</i> GapB
Spi	<VANKWPGLEGSVA--SGDPLEDF CKDNP ADEE CKLYE *	<i>Spinacia oleracea</i> GapB
Tab	<VANNWPGSCSTG---SGDPLEDF CKTNP ADEE CKVYE *	<i>Nicotiana tabacum</i> GapB
Ara	<VASKWPGAEAVG---SGDPLEDF CKTNP ADEE CKVYD *	<i>Arabidopsis thaliana</i> GapB
Zea	<VAAKWPGAAAAG---SGDPLEDF CKDNP ETDE CKVYEA *	<i>Zea mays</i> GapB
Cha	<VANNWPGQKADSEEEESGDPLDKY CATN PEADE CRVYDE *	<i>Chlorokybus a.</i> GapB
Chv	<VAAKWPGAKPAPDGKDADPLGTY CESNP DAAE CRVFE *	<i>Chara vulgaris</i> GapB
	++ .+++ +++++. .+ ++ .+.+++	= Konsensus GapB
CP12		
Pea	<ELSAAASHARDRKK-ESDPLEDY CKDNP ETDE CKTYDN *	<i>Pisum sativum</i> CP12
Spi	<ELSAAASHARDKAK-DVEPLEEY CKDNP ETDE CRTYDN *	<i>Spinacia oleracea</i> CP12
Tab	<EASAAASHARDKKKESDPLENY CKDNP ETDE CRTYDN *	<i>Nicotiana tabacum</i> CP12
Chr	<ELSAAASHARDRKK-ESDPLEDY CKDNP -----	<i>Chlamydomonas r.</i> CP12
Syn	<ELEAEAQHQRQHP-TQLTTEKF CDENP DAAE CR IYDD*	<i>Synechocystis</i> CP12
	.+... .+ ++ ++. +.	= Konsensus GapBundCP12

Abb. 6: Homologie zwischen den C-terminalen Extensionen von GapB-Sequenzen (ab Aminosäure 330) und den C-Termini von CP12. Die universell konservierten Cystein-Reste im Alignment sind rot hervorgehoben. Die Konsensus-Sequenzen der GapB und der GapB & CP12 sind mit einem Plus (+) (identische Aminosäure, eine Ausnahme zugelassen) oder einem Punkt (.) (ähnliche Aminosäure) markiert.

terminale Domäne ist, sind die Identitäten partieller Sequenzen in Klammern gesetzt. Das Lebermoos *Marchantia polymorpha* besitzt im Vergleich mit der *GapA* von *Pisum* nur eine geringfügig höhere Identität als diese mit den Sequenzen der Charophyceen. Der Vergleich von *GapA* mit *GapB* Sequenzen ergibt eine Identität von ca. 80%. Betrachtet man *GapA* und *GapA** Sequenzen, so liegen die Werte in der gleichen Größenordnung. Selbst die Identität zur cyanobakteriellen Außengruppe, der *gap2* Sequenz von *Synechococcus*, beträgt immerhin noch 73%. Dies unterstreicht die langsame Evolutionsrate der *GapA** Sequenzen, die aus dem hohen auf sie wirkenden Selektionsdruck resultiert.

Auf Sequenzebene lassen sich *GapA* und *GapB* Klone anhand einer Reihe spezifischer Motive voneinander unterscheiden, die im Alignment grün hervorgehoben sind. Alle *GapB* Sequenzen haben zwei absolut spezifische Insertionen von jeweils einer Aminosäure in Position 140B und 249B (rot hervorgehoben). Am deutlichsten lassen sich vollständige *GapA* und *GapB* Sequenzen anhand der 30 Aminosäuren langen C-terminalen Extension der *GapB* voneinander unterscheiden. In Abb. 6 sind die C-terminalen Extensionen aller bekannten *GapB* Sequenzen und der dazu homologen C-Termini der verfügbaren CP12-Proteine (siehe Einleitung) aligned.

Abgesehen von einem kurzen Verbindungsbereich zu der eigentlichen reifen Untereinheit sind die C-terminalen Extensionen der *GapB* Sequenzen von Landpflanzen und Charophyceen hochkonserviert. Auch zu den C-Termini der CP12-Proteine ist eine deutliche Homologie erkennbar. Die beiden funktionellen Cystein Reste sind sowohl in der *GapB* als auch in CP12 absolut konserviert (in Abb. 6 rot hervorgehoben).

3.1.2. Phylogenetische Untersuchungen der *GapA* und *GapB* Sequenzen

Mittels phylogenetischer Analysen sollten die Verwandtschaftsbeziehungen von Grünalgen aus der Klasse der Charophyceae und den einfachen Landpflanzen genauer ermittelt werden. Anhand der Topologie des resultierenden Stammbaums sollte der Zeitpunkt der *GapA/B*-Genduplikation exakt bestimmt werden. Der Datensatz umfaßte 17 *GapA*, 11 *GapB* und 5 *GapA** Sequenzen von Grünalgen und Landpflanzen. Neben der Sequenz von *Euglena gracilis* (Euglenophyta) wurden die *GapA** Sequenzen von *Cyanophora paradoxa* (Glaukophyta) sowie der Rotalgen *Chondrus crispus* und *Gracilaria verrucosa* als Outgroup verwendet. Aufgrund des cyanobakteriellen Ursprungs der eukaryotischen *GapA** (siehe Einleitung) wurden auch die cyanobakteriellen *gap2* Sequenzen von *Anabaena*, *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Gloeobacter* und *Prochlorococcus* als Outgroup verwendet.

Der in Abb. 7 dargestellte phylogenetische Baum, der insgesamt 43 Sequenzen enthält, wurde basierend auf 316 eindeutig alignbaren Positionen berechnet. Die Astlängen des Baumes wurden unter Verwendung der „User defined Tree“ Option der Molphy Package Version 2.3 erstellt, wobei die Topologie des Dayhoff/Neighbor Joining Bootstrap-Consensus Baumes verwendet wurde. Der Bootstrap-Consensus Baum wurde basierend auf 100 Bootstrapanalysen, unter Verwendung der Dayhoff PAM Matrix zur Distanzberechnung mit Hilfe der Optionen „SEQBOOT“, „PROTDIST“, „NEIGHBOR“ und „CONSENSE“ der Phylip Package Version 3.5 berechnet. Die ermittelten Bootstrapwerte erlauben eine Einschätzung der statistischen Signifikanz des beobachteten Verzweigungsmusters, nur Werte über 50% werden gezeigt.

Der Bereich des Neighbor Joining Consensus Baumes, der die Grünalgen und Landpflanzen umfaßt, läßt sich in drei Teile gliedern. Im *GapA** Ast, der vor der *GapA/B*-Genduplikation abspaltet, befinden sich ausschließlich Grünalgensequenzen der Chlorophyceae, Ulvophyceae

und Prasinophyceae, jedoch keine Sequenzen der Charophyceae. Das Verzweigungsmuster ist allerdings nicht durch hohe Bootstrapwerte unterstützt. Die *GapA* und *GapB* Teilstammbäume sind in Folge der *GapA/B*-Genduplikation entstanden. Beide enthalten ausschließlich Sequenzen höherer Pflanzen (Streptophyta; Bremer 1984) einschließlich der Landpflanzen und Charophyceae. Im *GapA* Ast stehen die vier Sequenzen der Charophyceae, die jeweils eine unterschiedliche Ordnung repräsentieren, an der Basis. Die Landpflanzen bilden eine separate Gruppierung (88% Bootstrap Unterstützung) und gliedern sich einerseits in Moose und Farne und andererseits in Gefäßpflanzen auf. Innerhalb der Laubmoose erfolgten sowohl bei *Sphagnum* als auch bei *Physcomitrella* rezente Genduplikationen der *GapA*, die Sequenzen haben jeweils einen langen gemeinsamen Ast und werden durch Bootstrapwerte von 100% unterstützt. In dem *GapA* Teilstammbaum nehmen *Pinus* und Mais unerwartete Positionen ein, die sich nicht mit den gängigen Vorstellungen der Evolution von Gefäßpflanzen decken. Die allgemein akzeptierte Vorstellung über die evolutive Verwandtschaft von Samenpflanzen ist, daß die Monokotyledonen und Dikotyledonen innerhalb der Angiospermen distinkte Gruppen bilden, die wiederum zusammen mit den Gymnospermen eine monophyletische Gruppe zum Ausschluß der niedriger entwickelten Landpflanzen, wie etwa Farnen und Bärlappgewächsen, formen. Die Topologie des *GapA* Astes deutet darauf hin, daß es hier möglicherweise zwei weitere Genduplikationen (*?) gegeben hat.

Die *GapB* Sequenzen bilden einen distinkten Teilstammbaum, was durch einen 95%igen Bootstrapwert unterstützt wird. Die abgegrenzte Stellung des *GapB* Teilstammbaums wird durch den langen internen Ast von der *GapA/B*-Genduplikation bis zur Verzweigung der ersten Charophyteen unterstrichen. Diese horizontale Astlänge ist im *GapB* Teilstammbaum etwa acht Mal so lang wie im *GapA* Teilstammbaum, obwohl in beiden die gleiche evolutive Zeitspanne dargestellt wird. Auch im *GapB* Stammbaum befinden sich die Charophyceae mit den Sequenzen von *Chara* und *Chlorokybus* an der Basis. *Coleochaete* gruppiert zusammen mit dem Lebermoos *Marchantia* und dem Farn *Pilularia*, allerdings wird dieses Verzweigungsmuster nicht signifikant durch Bootstrapwerte unterstützt. Im Gegensatz zur Topologie des *GapA* Astes entspricht das Verzweigungsmuster der Gefäßpflanzen im *GapB* Ast den gängigen Vorstellungen der Landpflanzenevolution.

3. Ergebnisse

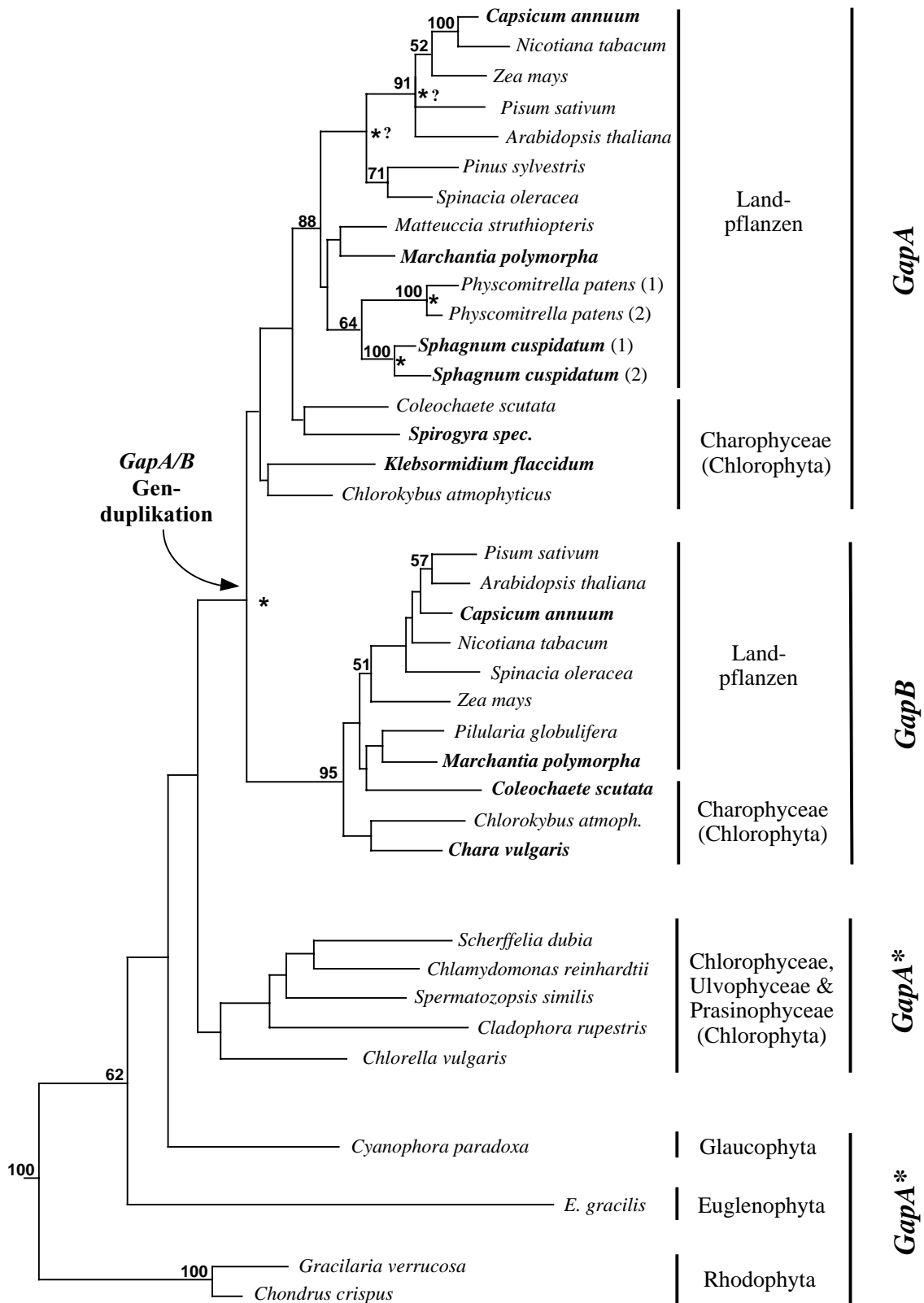


Abb. 7: Phylogenetischer Stammbaum der *GapA* und *GapB* Sequenzen. Neighbor Joining Bootstrap-Consensus Baum unter Verwendung der Dayhoff Korrektur basierend auf Aminosäure Sequenzen. Nur Bootstrapwerte über 50% wurden berücksichtigt. Sterne (*) markieren Genduplikationen.

3.2. *GapC* und *GapCp* Sequenzen aus Charophyceen und Landpflanzen

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit ist die Charakterisierung des *GapC* Gensystems. Wie bei der *GapA/B*-Genduplikation erfolgte eine Genduplikation der cytosolischen *GapC* wahrscheinlich früh in der Landpflanzenentwicklung. Die so entstandene *GapCp* wird aber im Gegensatz zur *GapC* mittels eines Transitpeptides in den Plastiden transportiert. *GapCp* Sequenzen konnten bereits aus der Gymnospermen *Pinus sylvestris* und dem Farn *Marsilea quadrifolia* isoliert werden (Meyer-Gauen et al. 1994, 1998). In dieser Arbeit wurde die phylogenetische Verbreitung der *GapCp* untersucht. Um den Zeitpunkt der *GapC/Cp*-Genduplikation näher zu ermitteln, konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Moose und die Grünalgen aus der Klasse der Charophyceae. Darüber hinaus wurde die *GapCp* Genstruktur und die Intronverteilung in Paprika (*Capsicum annuum*) bestimmt, das *GapCp* Protein wurde in *E. coli* überexprimiert und es schlossen sich Untersuchungen zur gewebespezifischen Expression der *GapCp* an.

3.2.1. Sequenzanalyse und Alignment der *GapC* und *GapCp* Sequenzen

Insgesamt wurden acht *GapC* und vier *GapCp* Sequenzen aus sieben Organismen isoliert und sequenziert (siehe Tabelle 2). Es handelt sich wie bei den *GapA* und *GapB* Sequenzen (siehe 3.1.1) um cDNA-Klone und Sequenzen aus RT-PCR Amplifikationen. Erstmals konnte eine *GapCp* aus Angiospermen identifiziert werden. Aus roten Paprikafrüchten (*Capsicum annuum*) wurde ein vollständiger *GapCp* cDNA Klon sowie zwei unterschiedliche *GapC* Klone (*GapC1* und *GapC2*; RT-PCR) isoliert. Aus den Laubmoosen *Physcomitrella patens* und *Sphagnum cuspidatum* sowie dem Lebermoos *Marchantia polymorpha* wurden sowohl *GapC* als auch *GapCp* Sequenzen isoliert. Außerdem konnten *GapC* Sequenzen aus den Charophyceae (Grünalgen) *Coleochaete scutata*, *Chara vulgaris* und *Klebsormidium flaccidum* amplifiziert und sequenziert werden. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller in dieser Arbeit etablierten Klone sind in Abb. 8 A aligned. Das Alignment läßt sich in drei Bereiche unterteilen, ein Teilbereich umfaßt zehn *GapC* Sequenzen von Landpflanzen und Charophyceen, ein weiterer fünf *GapCp* Sequenzen und der unterste Block enthält die *GapC* der Chlorophyceae *Chlamydomonas reinhardtii*. Die abgeleitete Aminosäuresequenz der *GapC1* von *Capsicum*,

Tab. 2: Liste der isolierten und sequenzierten *GapC* und *GapCp* Klone

Organismus	Gen	Klonierungsmethode	Länge cDNA (Bp)	Länge Reife Untereinheit (As)
1. <i>Capsicum annuum</i>	<i>GapCp</i>	cDNA-Bank	1663	340
2. <i>Capsicum annuum</i>	<i>GapC1</i>	RT-PCR	952	317
3. <i>Capsicum annuum</i>	<i>GapC2</i>	RT-PCR	942	314
4. <i>Physcomitrella patens</i>	<i>GapCp</i>	cDNA-Bank	1651	340
5. <i>Sphagnum cuspidatum</i>	<i>GapCp</i>	RT-PCR	916	305
6. <i>Sphagnum cuspidatum</i>	<i>GapC</i>	RT-PCR	944	314
7. <i>Marchantia polymorpha</i>	<i>GapCp</i>	cDNA-Bank	1560	341
8. <i>Marchantia polymorpha</i>	<i>GapC</i>	cDNA-Bank	1333	348
9. <i>Coleochaete scutata</i>	<i>GapC</i>	RT-PCR	944	314
10. <i>Chara vulgaris</i>	<i>GapC1</i>	RT-PCR	931	310
11. <i>Chara vulgaris</i>	<i>GapC2</i>	RT-PCR	937	312
12. <i>Klebsormidium faccidum</i>	<i>GapC</i>	RT-PCR	938	312

die als Referenz verwendet wurde, weist zu den anderen *GapC* Sequenzen der Landpflanzen eine Identität von mindestens 80% auf. Die Werte für die *GapCp* Sequenzen, hier wurde die *GapCp* von *Capsicum* als Referenz verwendet, liegen etwas niedriger, nichtsdestotrotz handelt es sich bei der *GapCp* um eine hochkonserviertes Protein. Auch zwischen *GapC* Sequenzen der Charophyceen und Landpflanzen besteht ein hoher Konservierungsgrad (73 bis 80%). Basierend auf dem *GapC* Datensatz ist *Coleochaete* deutlich näher mit den Landpflanzen

3. Ergebnisse

Aminosäurealignment von *GapC* und *GapCp* Sequenzen

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
1  ----GFGRIQRLVAVRVALQRDDVELVAVNDPFISTDYMTYMFKYDITVHGQWKHHELVQDEKTLLEFGEKSVRVFGIRNPEEIPWAEAGADFVVESTGVFT
2  KVGIN.....A..I.....L.....TV.....S.....NN.V..K.....F..P.T.Y.....EY.....
3  KIGIN.....A...T...I.L.G.....S...S.....S...K....VN.K.S...F.....A...C.....G.V..EY.....
4  KVGIN.....A...E...I.L..I...TPE.....ST....KT.VTLHS.GH.TF.GNP.A.YAC.D.S...GKH.....
5  -VGIN.....A..ISD...I.L.....SAE..A...F.S.....N.DI.A.N.NS.L.G.P.A.Y.LKD.S...GKH...YI.....
6  KIGIN.....A...E...I.L.....S.E.A.....S...RYTKNTIEAK.D...F.KFP.SI.QC.D.A...GQT..EY.....
7  KVGIN.....A...G...L..I...S.E.V.....S...R.G-GNVELK.A...FNG.P.N.YDK.DAA...S.M..EY.....Y.
8  -----L.A.NHPEI.V.....D.K.V.....S...F.-GKISAK...IING.E.A.Y.S.D.AA...SDT.VEV.....
9  KVGIN.....L.AS.NHPN.QV.....LDPE.IV.L.....KY.-G.VGLSAD.K.VVDG.EIAI.AL.D.AA...G...Y.....
10 LDGIN.....M.A.E.S...V.....DA..AI...T.S...EVQ-RDREE.AH-.IS.DGHD.AFYAA.D.S...GKH...Y.....

11 RVGIN.....L.I.TF.N.I.V.....DAK..A..L...ST..VFR-GSIS.L.DT..EING.QIK.SSK.D.AD...GDL...Y...S.I..
12 KIGIN.....L..I.A...SKE.I.V..I...DAK..A..L...ST..VY.-GS..IV.DT..EIDGHRIT.NSK.D.A...GNY...EY...S.A..
13 RIGIN.C.....L..I.A...V.....D.K.A.LL...ST..LL.-S.VNAV.DN..QV.SQTIK...C.D.A...GSV.....
14 ---V.....L.IC..H..I.V.....DSK..A.....ST..IA.-VDHAV.D...QI.S.T.K...S.D.S...GS...I.....
15 KIGIN.....L.I..S...V.....LTA..VR.L...ST..VYP-G.VE.I..N..SVDGHKIKF..SKT.AD...GDS.V.Y.....

16 KIGIN.....M.ATML.P.I.V..I...DAE..A.....S..KT.P-GHVNGSKDG-F.VEGRKIHT.TESD.SK.N.GA...I..I.....

      110      120      130      140      150      160      170      180      190     200
1  DMDKAAAHKGGAKKVVVISAPSKDAPMFVVGVNENEYKPDLDIVSNASCTTNCLAPLAKVINDRFGIVEGLMITTVHAMTATQKTVDGPMSKDWRRGGRAAS
2  .K..T.....K.....N.....H.....SI.....A.....
3  .KE..S...A.....HQ..S.VN.....K.....SI.....N.....G.G
4  .K.....K.....M...K.S-E.....K..L.....T.....S.....S.A
5  .KA.....M...DK.TA.....K.....ST.....H.....G
6  TK.....A...M...K..TT.I.....H.K.....SI.....A.....G..
7  .....R.....HEK..-GEA.....V.....L.....SI.....S.....G.G
8  .K.....I.....I.....DK.T..T.....N.....SL.....G.....G.G
9  AK.....G.....M...DK.TA...VI.....M..N.....V.....G.....HG.G
10 .....I.....Y.M...HEK..TSD.VI.....M.V.NK..L.....T.....N.....G..

11 TV.R.SG.K.....A.....KT..ANM.V.....VHEE.....T.....G.G
12 TTE..S.....A.....GS..EMS.....V.EE..A.A...T.....G.G
13 AV..S..F.....M...QOS..DSMNV.....Q.N..E.....T.....G.G
14 TTA..E..F.....I...A...M...HEK..SGMN.....VH.N..I.....T.....G.....G..
15 NIA..S..Q...I...E...Y.M...EK.SA.QN.....IVHQE...Q.....T.....G.....G.G

16 .IA..T...T...I.T...N...Y.M...HEK.N.ADH.I.....V.SK...K.....T.....K.....VN

      210      220      230      240      250      260      270      280      290     300
1  FNIIPSSTGAAKAVGKVLPALNGKLTGMAFRVPTVDVSVVDLTVRLEKEASYDDIKAAIKEESEGLKGLGFTEDDVVSTDFVGDSSRSIFDAKAGIAL
2  .....S.....S.....T.E.....V.Y.....I..N.....
3  .....P.....S.T.E...A...N...Y..A...I...Q...
4  T...A.....E.....T.....P...A..T...A...QM...Y...IT...
5  V.....E.....I...P...A...RA.AN..M...Y..E...IT...
6  .....S...A...T..K.T.EEV...A...EM..M.Y...I...
7  .....E.....A.....A.T.E...L..A..AM...Y...IT.E..-V...
8  .....E.....A.....A.P...T..QC..AA..P...Y.DE.I...VI..AH..V...
9  ....G.....E.....I..A.....A.STT.E...V..KA..SD...Y.D...S..I..V...
10 T.....E.....S.A.....P.K...V...AAD.P...Y.S...Q..H...I...

11 Q.....E.....PN...C..N.S...V...YA...P...Y.NE...N.....G.
12 Q.....E.....PN...C...P...M.AA...S...Y.DE...N...A.....
13 Q.....E.....PN...K.SG.E...AA...PMY...Y...N...A.....
14 Q.....E.....S...PN...C.I.G...E...M.AA...PMF.Y..Y...
15 Q.....E.....PN...C...K...KV.AA...SSM...Y...A...S..I..A...H..G.

16 G.....E.K.....N.....T...ATT.E.MK.L..A...EM..V.AY.DE...S...T.PA.CTV...M.

```

3. Ergebnisse

Aminosäurealignment von *GapC* und *GapCp* Sequenzen

	310	320	330			Identität (%)
1	SKKFVKLVS	WYDNEWGY	-----	1	<i>Capsicum annuum</i>	<i>GapC1</i> 100
2	.T	-----	2	<i>Capsicum annuum</i>	<i>GapC2</i> 90
3	.DN	SSRVVDLIVHMAATQ*	3	<i>Pinus sylvestris</i>	<i>GapC</i> 86
4	.DTASNRVVDLIVHMAKQGT SQ*	4	<i>Physcomitrella patens</i>	<i>GapC</i> 82
5	TDNA	5	<i>Sphagnum cuspidatum</i>	<i>GapC</i> 81
6	NDN	.MSNRVVDLILHMASTQ*	6	<i>Marchantia polymorpha</i>	<i>GapC</i> 80
7	NN	L-----	7	<i>Coleochaete scutata</i>	<i>GapC</i> 80
8	NDN	-----	8	<i>Chara vulgaris</i>	<i>GapC1</i> 77
9	NGN	-----	9	<i>Chara vulgaris</i>	<i>GapC2</i> 73
10	NDS	-----	10	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	<i>GapC</i> 75
11	.S	.MSTRVLDLIEHMALVAATS*	11	<i>Capsicum annuum</i>	<i>GapCp</i> 74 100
12	.ST	SNRVVDLISHMALVASRK*	12	<i>Pinus sylvestris</i>	<i>GapCp</i> 76 83
13	.D	SNRVVDLHLMAGVKANLY*	13	<i>Physcomitrella patens</i>	<i>GapCp</i> 77 78
14	NLN	.I	14	<i>Sphagnum cuspidatum</i>	<i>GapCp</i> 75 76
15	GDG	.M.FSNRVVDLIEHIAAVVSAKKN*	15	<i>Marchantia polymorpha</i>	<i>GapCp</i> 71 75
16	.PTASNRVVDLALHVAKKAQVKV*	16	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>GapC</i> 67 65

Abb. 8 A: Aminosäurealignment der reifen Untereinheit von *GapC* und *GapCp* Sequenzen aus Grünalgen und Landpflanzen. Es sind die Identitäten der Aminosäuren angegeben, wobei die Sequenzen von *Capsicum* als Referenz verwendet werden.

	-90	-80	-70	-60	-50	-40	-30	-20	-10	-1:
C.a.										
A.t.										
P.s.										
M.q.										
M.p.										
P.p.										

Abb. 8 B: Alignment der *GapCp* Transitpeptide von *Capsicum annuum* (C.a.- Angiospermae), *Arabidopsis thaliana* (A.t.-Angiospermae; EST); *Pinus sylvestris* (P.s.- Gymnospermae); *Marsilea quadrifolia* (M.q.- Farn); *Marchantia polymorpha* (M.p.- Lebermoos); *Physcomitrella patens* (P.p.- Laubmoos). (:) Processing Site

verwandt (80% Identität) als die restlichen Grünalgen aus der Klasse der Charophyceae. Die Identitätswerte liegen sogar in dem Bereich, der zwischen *Capsicum* und den Moosen gefunden wird. Im Kontrast zum hohen Konservierungsgrad zwischen Landpflanzen und Charophyceae ist die *GapC* der Chlorophycee *Chlamydomonas reinhardtii* innerhalb der Grünalgen die divergenteste Sequenz (67% Identität), sie wird als Outgroup für die *GapC* und *GapCp* Sequenzen der Charophyteen und Landpflanzen verwendet. Vergleiche zwischen *GapC* und *GapCp* zeigen, daß beide Gene mit ungefähr 75% Aminosäure-Identität eng miteinander verwandt sind, trotzdem sind einige Positionen wie Threonin 49 (T), Glutamin 201 (Q), Prolin 235 (P), Asparagin 236 (N) und Cystein 244 (C) jedoch eindeutig *GapCp*-spezifisch (Abb. 8 A; rot hervorgehoben). Alle bekannten *GapC* Sequenzen der Landpflanzen (über 40 Sequenzen; Alignment nicht gezeigt) besitzen eine hochspezifische Insertion von einer Aminosäure in Alignmentposition 54A (Abb. 8 A; grün hervorgehoben). In allen anderen GAPDHs sowohl den *GapCp* Sequenzen als auch den *GapC* Sequenzen der Grünalgen, Rotalgen und Glaukophyta fehlt diese Position. Neben dieser spezifischen Insertion gibt es in *GapC* Sequenzen von Landpflanzen einige konservierte Reste, wie etwa Ala 17 (A), Leu 27 (L), Ser/Thr 36 (S/T), Phe/Leu 66 (F/L) und Pro 70 (P), die für Landpflanzen spezifisch sind und sonst nur noch bei der Charophyceae *Coleochaete* gefunden werden (Abb. 8 A; blau hervorgehoben).

Aufgrund des hohen Konservierungsgrades der GAPDH Gene ist die reife Untereinheit der *GapCp* nicht für eine Datenbanksuche nach weiteren *GapCp* Sequenzen geeignet, da hunderte homologer *GapC* und *gap1* Sequenzen aus Pflanzen und Bakterien gefunden werden. *GapC* und *GapCp* Sequenzen höherer Pflanzen können jedoch anhand des *GapCp*-spezifischen Transitpeptides eindeutig voneinander unterschieden werden. Durch BLAST Recherchen in den EST (expressed sequence tag) Datenbanken mit der Nukleotidsequenz des *GapCp* Transitpeptides von *Capsicum annuum* wurde ein EST von *Arabidopsis thaliana* gefunden, der anhand von Aminosäure-Sequenzvergleichen klar als *GapCp* identifiziert werden konnte. Alle bekannten *GapCp* Transitpeptide, deren vollständige Sequenzlängen zwischen 80 und 94 Aminosäuren liegen, sind in Abbildung 8 B aligned. Im Gegensatz zur hochkonservierten reifen Untereinheit sind die Transitpeptidsequenzen aber sehr variabel. Abgesehen von den ersten Aminosäuren ist die N-terminale Hälfte des Transitpeptides kaum konserviert, die letzten 30 Aminosäuren im carboxyterminalen Bereich des Transitpeptides der *GapCp* Sequenzen zeigen jedoch deutliche Sequenzhomologien.

3.2.2.1. Phylogenetische Analyse der *GapC* und *GapCp* Sequenzen

Um die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Charophyceae (Chlorophyta) und Landpflanzen näher zu untersuchen erfolgten phylogenetische Analysen unter Verwendung von 31 *GapC* und 6 *GapCp* Sequenzen aus Grünalgen, Moosen, Farnen und Gefäßpflanzen. Da eukaryotische *GapC* und proteobakterielle *gap1* Sequenzen sehr nahe miteinander verwandt sind (siehe Einleitung), wurden eubakterielle *gap1* Sequenzen der Proteobakterien *E. coli* und *Haemophilus* sowie Sequenzen der Cyanobakterien *Synechocystis* und *Anabaena* als Outgroup verwendet. Der phylogenetische Baum in Abb. 9 basiert auf 41 Sequenzen mit 329 Positionen, die Distanzen wurden mittels der Dayhoff PAM Matrix der Phylip Package Version 3.5 berechnet. Zum Test der statistischen Signifikanz der Topologie wurden 100 Bootstrapanalysen durchgeführt, nur Werte über 50% sind gezeigt.

Der Neighbor-Joining Baum kann in drei Hauptäste aufgeteilt werden. Der obere und größte Hauptast des Baumes enthält cytosolische *GapC* Sequenzen der Landpflanzen und Charophyceae (Chlorophyta). Die *GapCp* Sequenzen bilden einen separaten Teilstammbaum, der einer frühen Genduplikation entstammt. Die *GapC* Sequenzen der Chlorophyceae *Chlamydomonas* und *Chlorella* sind die Outgroup zu den restlichen Pflanzensequenzen. Die Topologie des *GapC* Teilstammbaums stimmt mit den gängigen Vorstellungen über die Landpflanzenevolution überein. Die Dikotyledonen und Monokotyledonen bilden abgegrenzte Gruppen innerhalb der Angiospermen, diese wiederum entwickelten sich als Schwestergruppe der Gymnospermen. Die Abgrenzung aller Samenpflanzen von den Farnen und Moosen wird durch einen Bootstrapwert von 91% klar unterstützt. Die Farne, Lebermoose und Laubmoose verzweigen als nächstes und *Coleochaete*, *Chara* sowie *Klebsormidium*, alles Grünalgen aus der Klasse der Charophyceae, befinden sich an der Basis des *GapC* Teilstammbaums, wobei die dargestellte Topologie nicht durch hohe Bootstrapwerte unterstützt wird.

An der Diversifizierung der *GapC* Gene waren mindestens 5 Genduplikationen beteiligt, die in Abb. 9 mit Sternen markiert sind. Innerhalb der Solanaceae bildet die *GapC1* von *Capsicum* zusammen mit den *GapC* Sequenzen aus Kartoffeln, Tomaten und Tabak eine hoch unterstützte monophyletische Gruppe (99% Bootstrap Unterstützung), diese enthält jedoch nicht die Sequenz von *Petunia* und die *GapC2* von *Capsicum*. Die Daten legen nahe, daß früh in der Evolution der Solanaceae eine Genduplikation erfolgte. Eine weitere frühe Genduplikation in der Entwicklung der Monokotyledonen führte zu zwei separaten Linien, die jeweils Sequenzen

3. Ergebnisse

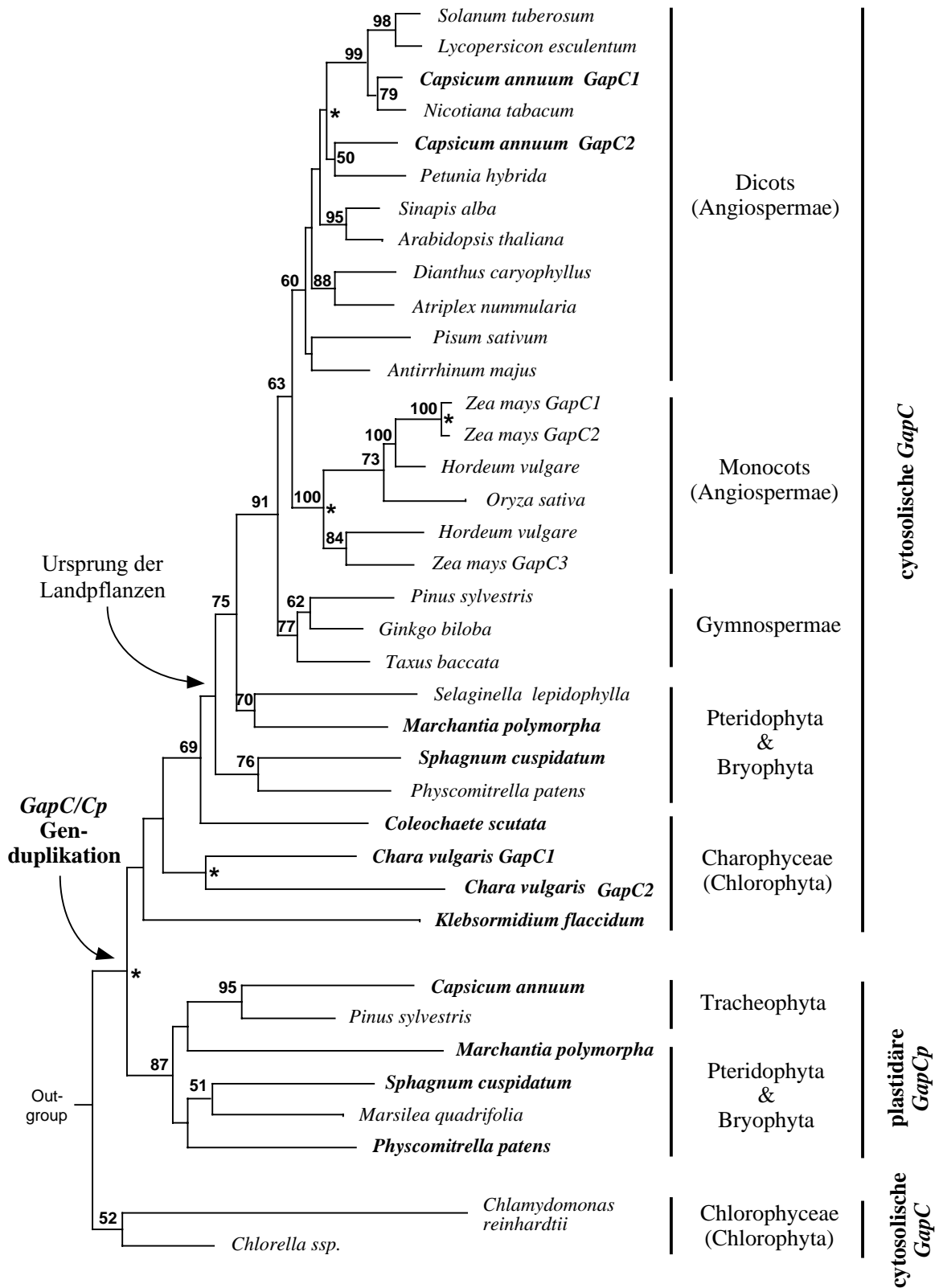


Abb. 9: Phylogenetischer Stammbaum der *GapC* und *GapCp* Sequenzen. Neighbor Joining Baum unter Verwendung der Dayhoff Korrektur basierend auf Aminosäure Sequenzen. Nur Bootstrapwerte über 50% werden berücksichtigt. Sterne (*) markieren Genduplikationen.

von Gerste und Mais enthalten. Rezente Genduplikationen des *GapC* Gens findet man bei Mais und *Chara*. In der vorliegenden Analyse ist die *GapC/Cp* Genduplikation das älteste Duplikationsereignis. Diese Genduplikation erfolgte in einer frühen Phase der Charophytenevolution (Abb. 9), möglicherweise sogar in einem gemeinsamen Vorfahren aller Charophyceae.

3.2.2.2. Tests zur Verlässlichkeit der phylogenetischen Aussagen

Um die Verlässlichkeit der Topologie des phylogenetischen Baums in Abb. 9 zu ermitteln wurden eine Reihe von Maximum Likelihood Analysen („protml“) durchgeführt, dazu wurden die „Local Rearrangement“ und „User Defined Tree“ Option der Molphy Package Version 2.3 verwendet. Die „Likelihood“ ist ein Maß der Wahrscheinlichkeit einer vorgegebenen Topologie. Im Vergleich mehrerer Bäume, die die gleichen Sequenzen beinhalten, ist die Topologie mit der höchsten „Likelihood“ die wahrscheinlichste. In diesen Analysen richtete sich das spezielle Interesse auf die phylogenetische Position von *Coleochaete* in bezug auf die Landpflanzen, die Datierung der *GapC/Cp*-Genduplikation und die Verlässlichkeit der Topologie innerhalb der *GapC* und *GapCp* Teilstammbäume.

Der phylogenetische Baum in Abb. 9 legt nahe, daß *Coleochaete* (Charophyceae) die am nächsten mit den Landpflanzen verwandte Grünalge ist, was durch einen Bootstrapwert von 69% unterstützt wird. Die *GapC* Sequenzen der Charophyteen *Chara* und *Klebsormidium* zweigen deutlich vor *Coleochaete* und den Landpflanzen ab. Die Ausgangs-Topologie für die protml Analyse wurde unter Verwendung der „NJDIST“ Option (ml Distanzeinschätzung –D in „protml“) bestimmt, daraus wurde mittels der „Local Rearrangement“ Option ein phylogenetischer Baum berechnet. Die „Likelihood“ dieses Baums ist deutlich höher als die „Likelihood“ des Originalbaums. In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen unterstützt diese „protml“ Analyse ebenfalls die Position von *Coleochaete* als nächsten Verwandten der Landpflanzen (Baum nicht gezeigt). Zusätzlich wurde die „User defined Tree“ Option (-u) des „protml“ Programms genutzt um alternative Topologien zu testen. Alle „User defined Trees“, in denen *Coleochaete* entweder innerhalb der Landpflanzen oder in einer basaleren Position plazierte wurde, erhielten in den Analysen eine signifikant niedrigere „Likelihood“. In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen unterstützen diese zusätzlichen Analysen klar eine Schwestergruppenbeziehung zwischen *Coleochaete* und den Landpflanzen zum Ausschluß aller anderen Grünalgen.

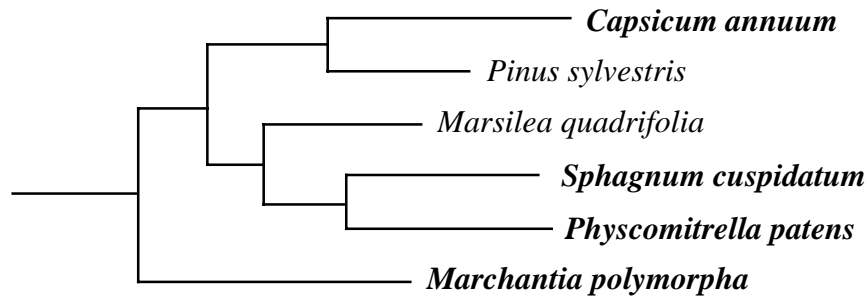


Abb. 10: „NJ-DIST“ Analyse des plastidären *GapCp* Teilstammbaums (Abb. 9) unter Verwendung der „Local Rearrangement“ Option.

Die Topologie in Abb. 9 deutet darauf hin, daß der *GapCp* Teilstammbaum vor den *GapC* Sequenzen aller in die Analyse einbezogenen Charophyceen abzweigt. Ein endgültiger Beweis steht allerdings noch aus, da in Charophyceen bisher noch keine *GapCp* Sequenz gefunden werden konnte. Es wurden verschiedene „User defined Trees“ analysiert, in denen sich das Verzweigungsmuster bezüglich des *GapCp* Astes unterschied, beispielsweise wurden die Sequenzen von *Klebsormidium* und *Chara* unterhalb der *GapC/Cp*-Genduplikation plaziert (Bäume nicht gezeigt). Dabei ist die Likelihood aller alternativer Topologien signifikant niedriger, als die des Originalstammbaums. Diese Ergebnisse unterstützen das in Abb. 9 präsentierte Verzweigungsmuster und legen nahe, daß die *GapC/Cp*-Genduplikation früh in der Evolution der Charophyceae (Grünalgen) erfolgte.

Die phylogenetische Analyse (Abb. 9) zeigt, daß die *GapCp* Sequenzen einen von den *GapC* Sequenzen klar unterscheidbaren Teilstammbaum bilden (87% Bootstrapunterstützung). Wenn von verschiedenen Spezies sowohl *GapC* als auch *GapCp* Sequenzen verglichen werden, sollte man in beiden Teilstammbäumen eine ähnliche Topologie erwarten. Die Abtrennung der Samenpflanzen von den niedriger entwickelten Pflanzen wird in beiden Teilstammbäumen durch hohe Bootstrapwerte von 91 und 95% unterstützt. Die Position des Farns *Marsilea* zwischen den zwei Moossequenzen von *Physcomitrella* und *Sphagnum* im *GapCp* Teilstammbaum ist wahrscheinlich ein Artefakt. Der unter Verwendung der „Local Rearrangement Option“ ermittelte *GapCp*-Teilstammbaum, der die höchste „Likelihood“ erhielt (Abb. 10), besitzt eine Topologie, die der des *GapC*-Baumes (Abb. 9) schon wesentlich näher kommt. In diesem Baum sind die beiden Laubmoose am nächsten miteinander verwandt und der Farn *Marsilea* repräsentiert eine separate Linie. Darüber hinaus wird eine basale Position des Lebermooses *Marchantia* gefunden. Diese Position unterscheidet sich zwar von der Topologie in Abb. 9, sie stimmt aber mit der Tatsache überein, daß *Marchantia* die divergenteste *GapCp* Sequenz besitzt (Abb. 8 A).

3.2.3. Charakterisierung des *GapCp* Gens aus *Capsicum annuum*

Aus der DNA von Paprika (*Capsicum annuum*) wurde eine genomische EMBL3 Genbank erstellt. Das Screening erfolgte mit einer homologen *GapCp* cDNA-Sonde, insgesamt wurden zehn unabhängig hybridisierende Klone weitergehend analysiert. Kombinierte Restriktions- und Hybridisierungsexperimente erfolgten mit Sonden aus dem Transitpeptid und der reifen Untereinheit der *GapCp* (Abb. 11). Die Ergebnisse legen nahe, daß alle zehn Klone aus derselben Region des Paprikagenoms stammen und es sich bei der *GapCp* von Paprika demzufolge wahrscheinlich um ein „single copy“ Gen handelt (Abb. 12). Die hybridisierenden Klone erstrecken sich über einen Bereich von insgesamt 44 kb des Paprikagenoms. Klon 24 enthält das vollständige *GapCp* Gen, das einschließlich seiner Promotorregion sequenziert wurde. Sowohl die kodierende Region, als auch der nichttranslatierte amino- und carboxyterminale Bereich stimmt mit der cDNA-Sequenz genau überein.

Das *GapCp* Gen enthält 13 splicosomale Introns, deren Exon/Intron Grenzen alle der GT-AG Regel folgen. Die ersten drei Introns trennen Exons des Transitpeptides, die folgenden zehn liegen in der reifen Untereinheit des *GapCp* Gens. Die Struktur des *GapCp* Gens ist im unteren Teil von Abb. 12 dargestellt. Neben der *GapCp* Genstruktur von *Capsicum* ist bisher lediglich die von *Pinus* bekannt (Meyer Gauen et al. 1998). Für die erste Intronposition von *Pinus* gibt es keine Sequenzdaten, alle anderen Intronpositionen sind sogar bezüglich der Phase des Leserasters vollständig konserviert (Tab. 3). Darüber hinaus findet man die zehn Introns aus der reifen Untereinheit der *GapCp* ebenfalls in den *GapC* Genen der Landpflanzen an identischen Positionen (Cerff 1995). Alle *GapC* Gene von Landpflanzen besitzen im N-terminalen Bereich des Gens ein Intron, das jeweils in Phase 1 liegt, jedoch in der exakten Alignmentposition um ein paar Aminosäuren variieren kann. Im Protein liegen die N- und C-Termini an der Oberfläche und sind deshalb in der Länge variabel. Insertionen oder Deletionen von 3 Nukleotiden sind in diesem Bereich möglich, da sie keine Leserasterverschiebung bewirken und so vom Protein toleriert werden. Das entscheidende Homologiekriterium für die in diesem Bereich liegenden Introns ist die Phase, dementsprechend können diese ersten Introns der *GapC* Gene als homolog betrachtet werden. Auch das dritte Intron der *GapCp* Gene befindet sich in einer vergleichbaren Position zum ersten Intron der *GapC* Gene und liegt ebenfalls in Phase 1 vor, dementsprechend sind wahrscheinlich auch diese Introns homolog.

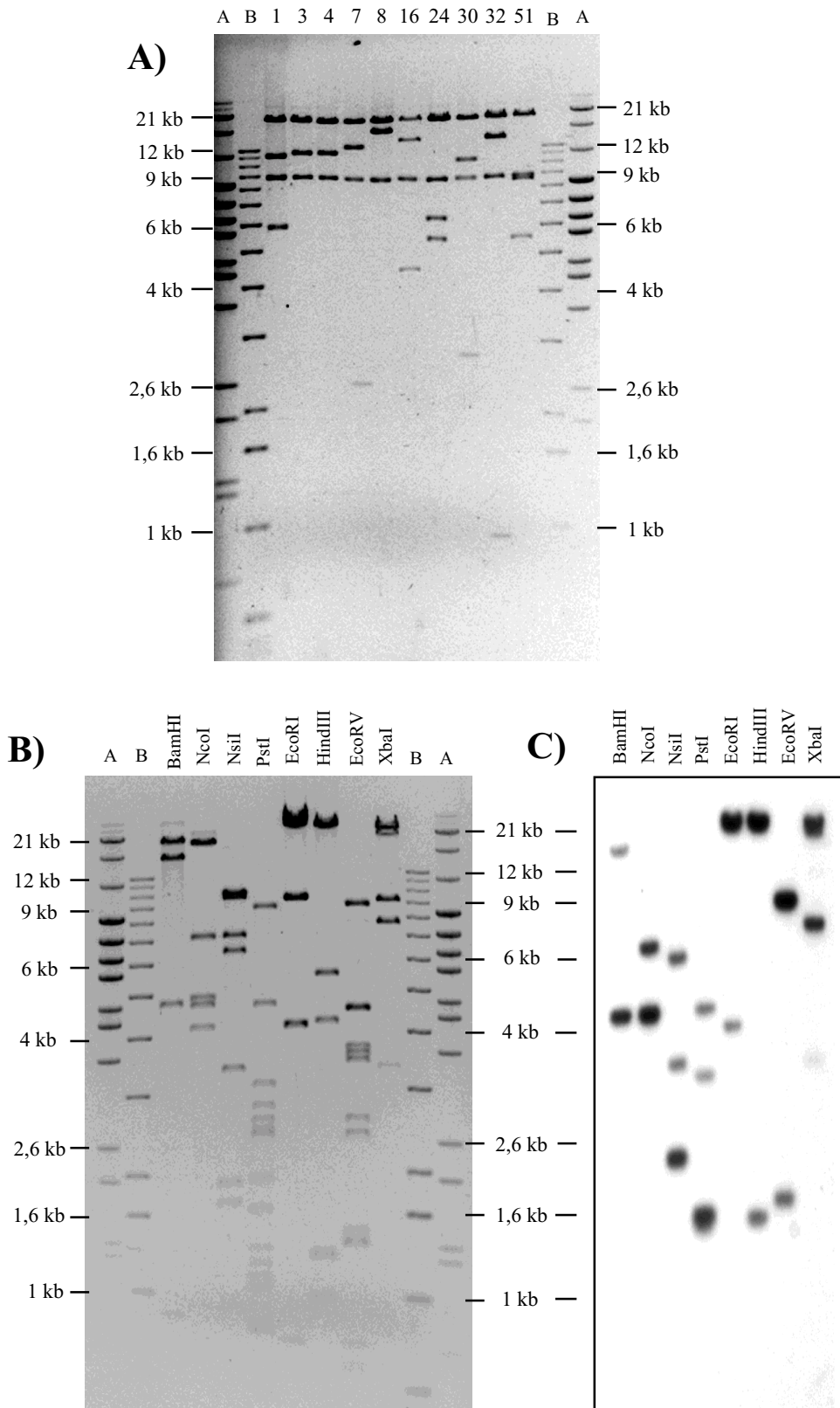


Abb. 11 A: *SalI*-Restriktionsspaltung verschiedener Klone einer genomischen EMBL3 Bank aus *Capsicum annuum*. **B:** Restriktionsanalyse von Klon 24 der genomischen Paprika Bank. **C:** Southern Blot mit *GapCp* cDNA-Sonde aus *Capsicum annuum*
A: λ Eco47III/Eco91I-Marker; B: 1kb Leiter

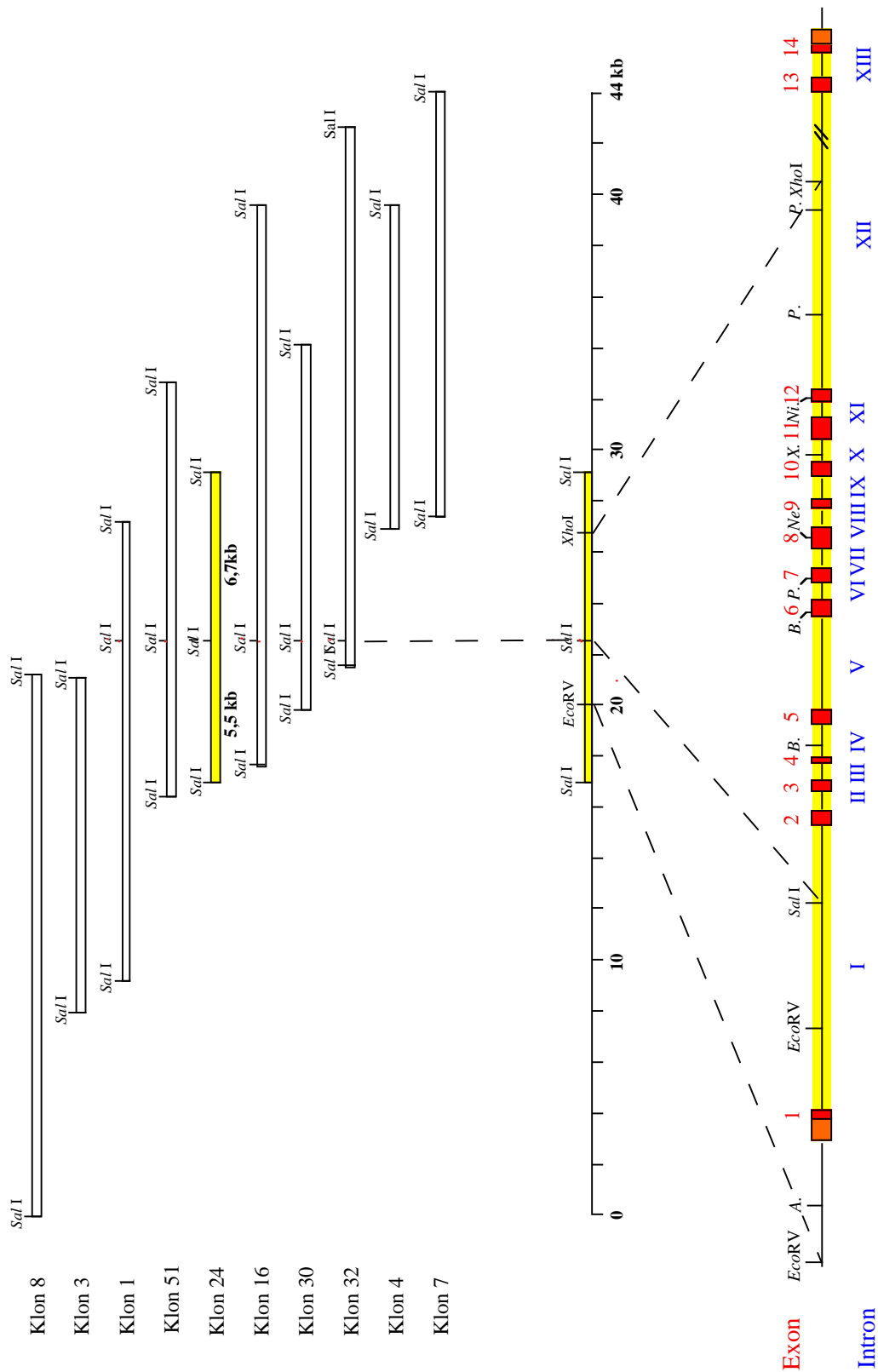


Abb. 12: Restriktionskarte der genomischen GapCp Klone aus *Capsicum annuum*. Anordnung der unterschiedlichen Klone und die Genstruktur des vollständigen Klons 24.

A: ApaI; B: BamHI; E: EcoRV; Ne: NheI; Ni: NsiI; P: PstI; X: XbaI

Tab. 3: Vergleich der Introns der *GapCp* Gene von *Capsicum annuum* und *Pinus sylvestris*

Intron Nummer	Intron Position und Phase	Intronlänge <i>Capsicum</i>	Intronlänge <i>Pinus</i>
I	-61 (0)	1890	---
II	-29 (2)	104	> 4194
III	-6 (1)	93	143
IV	7 (1)	194	118
V	41 (0)	596	503
VI	77 (2)	92	92
VII	111 (0)	100	213
VIII	160 (0)	93	177
IX	180 (1)	125	162
X	213 (0)	128	774
XI	260 (2)	85	248
XII	288 (2)	> 1000	76
XIII	318 (2)	145	319

Die reifen Untereinheiten der *GapCp* cDNA Sequenzen von *Capsicum* und *Pinus* haben auf Aminosäureebene eine Identität von 83%, dahingegen zeigen die korrespondierenden Intronsequenzen keinerlei Homologie und unterscheiden sich deutlich in der Größe (Tab. 3). Die Intronsequenzen scheinen schnell Veränderungen anzusammeln, man findet in Intron I des *GapCp* Gens von *Capsicum* ein Sequenzmotiv von etwa 280 Nukleotiden, das in vier leicht unterschiedlichen Kopien (nt 70 – 1180) tandemartig wiederholt auftritt. Darüber hinaus ergaben BLAST-Analysen der 13 Intronsequenzen von *Capsicum* eine deutliche Homologie zwischen einer etwa 90 Nukleotiden langen Region des Introns I (nt 1602 – 1687; siehe Anhang) und der TS Familie der „short interspersed repetitive elements“ (SINE) aus Tabak (Yoshioka et al. 1993). SINE-Elemente entstehen mittels Retrotransposition und sind innerhalb der Solanaceae weit verbreitet. Sowohl Retrotranspositionen als auch Sequenzduplikationen sind Faktoren, die zur schnellen Evolution der Intronsequenzen beitragen.

3.2.4. Gewebespezifische Expression der GAPDH-Gene in Paprika

Bei Untersuchungen der Enzymaktivitäten von Proteinextrakten isolierter Plastiden wurde eine NAD-spezifische GAPDH-Aktivität in Chromoplasten roter Paprikafrüchte beschrieben, diese Aktivität konnte weder in den Chloroplasten grüner Paprikafrüchte noch in denen von Spinatblättern nachgewiesen werden (Backhausen et al. 1998). Aufgrund der biochemischen Hinweise wurde in der vorliegenden Arbeit Paprika als angiospermes Modellsystem für molekulare Expressionsstudien ausgewählt. Anhand von Northernblot Experimenten wurde die gewebespezifische Expression der *GapCp* untersucht und mit den Expressionsmustern aller anderen GAPDH-Gene verglichen. Es sollte einerseits festgestellt werden, ob es sich bei der *GapCp* tatsächlich um ein chromoplasten-spezifisches Enzym handelt, andererseits sollte die Funktion der *GapCp* in Angiospermen bestimmt werden.

Alle zur Untersuchung verwendeten Gewebe stammen von einer Paprikapflanze, die zuvor drei Tage lang in weißes Dauerlicht gestellt wurde. Jeweils 40 µg Gesamt-RNA (pro Spur) aus Wurzel, Stengel, Blatt, grüner Frucht und roter Frucht wurde für die Northern Analysen eingesetzt. Die Membranen wurden mit der *GapA1* und *GapCp* Sonde hybridisiert (Abb. 13).

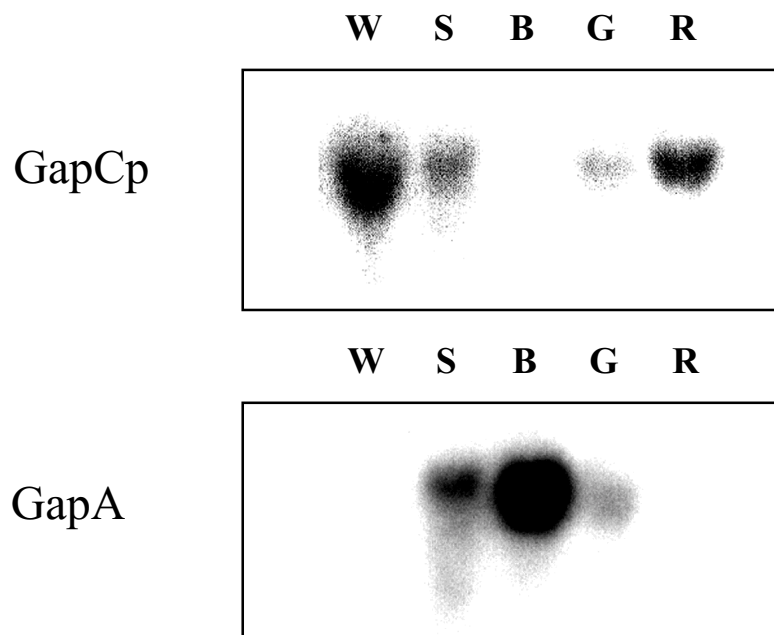


Abb. 13: Northern Blot Analyse mit Gesamt-RNA (40 µg) aus verschiedenen Paprika-Geweben.

W: Wurzel; S: Stengel; B: Blatt; G: grüne Frucht; R: rote Frucht

Außerdem wurden 10 µg Poly A⁺-mRNA aus Blättern, grünen und roten Früchten für weitere Northern Analysen eingesetzt. Unter der Annahme, daß der mRNA-Anteil ein Prozent der Gesamt-RNA ausmacht, kann durch die Verwendung von Poly A⁺-mRNA das Signal somit etwa um den Faktor 25 verstärkt werden. Für die Hybridisierung wurden in vier parallelen Experimenten Sonden der *GapA1*, *GapB*, *GapCp* und eine Mischung aus *GapC1* und *GapC2* eingesetzt (Abb. 14). Als *GapCp* Sonde wurde der vollständige cDNA Klon eingesetzt, die übrigen Sonden entstammen RT-PCR Amplifikationen.

Das *GapA* Gen ist in den Blättern hochexprimiert, in weiteren grünen Geweben wie Stengel und grüner Frucht ist die Expression viel geringer und in heterotrophem Gewebe aus Wurzeln und der roten Frucht ist kein Signal detektierbar (Abb. 13). Sogar unter Verwendung großer mRNA-Mengen ist nahezu kein *GapA* Transkript in roten Früchten nachweisbar (Abb. 14). In grüner Frucht ist die *GapB* zwar stärker exprimiert als die *GapA*, aber in rotem Fruchtgewebe ist die Expression der *GapB* ebenfalls extrem herunter reguliert (Abb. 14). Diese Befunde reflektieren die Umwandlung von photosynthetisch aktiven Chloroplasten (grüne Frucht) in heterotrophe Chromoplasten (rote Frucht) während der Reifung der Paprikaschoten (Camera et al. 1995). In heterotrophen Geweben ist der Calvin Zyklus inaktiviert und sowohl *GapA* als auch *GapB* Transkripte werden nicht mehr länger benötigt (Cerff et al. 1982; Rapp und Mullet 1991; Hahn et al. 1998). Im krassen Gegensatz dazu ist die *GapCp* Expression genau entgegengesetzt reguliert: Die größte Menge an Transkript findet man in Wurzeln und roter Frucht, in Stengeln und grüner Frucht ist eine geringere Menge und in Blättern ist kein Transkript nachweisbar (Abb. 13). Die Abwesenheit des *GapCp* Transkripts in Blättern wird durch Experimente mit großen mRNA-Mengen bestätigt, da sich auch hier kein Signal detektieren läßt (Abb. 14). cDNA-Banken werden meist aus gut belichteten grünem Blattgewebe erstellt, was möglicherweise erklärt warum in Angiospermen *GapCp* Klone bisher nicht entdeckt wurden.

Für die Expressionsexperimente mit Poly A⁺-mRNA (Abb. 14) wurden vier identische Filter hergestellt, die verwendeten Sonden besitzen eine vergleichbare DNA-Konzentration und auch der Einbau von P³² bei der Markierung ist vergleichbar. Die Filter wurden jeweils mit hoher Stringenz hybridisiert und gewaschen. Die absoluten Expressionsraten der *GapA*, *GapB* und *GapC* Gene scheinen höher als die des *GapCp* Gens zu sein. Überraschenderweise ist die Expression des *GapC* Gens in rotem Fruchtgewebe besonders stark, was möglicherweise auf eine hohe glykolytische Aktivität im Cytosol hindeutet. In den Northern Analysen mit der

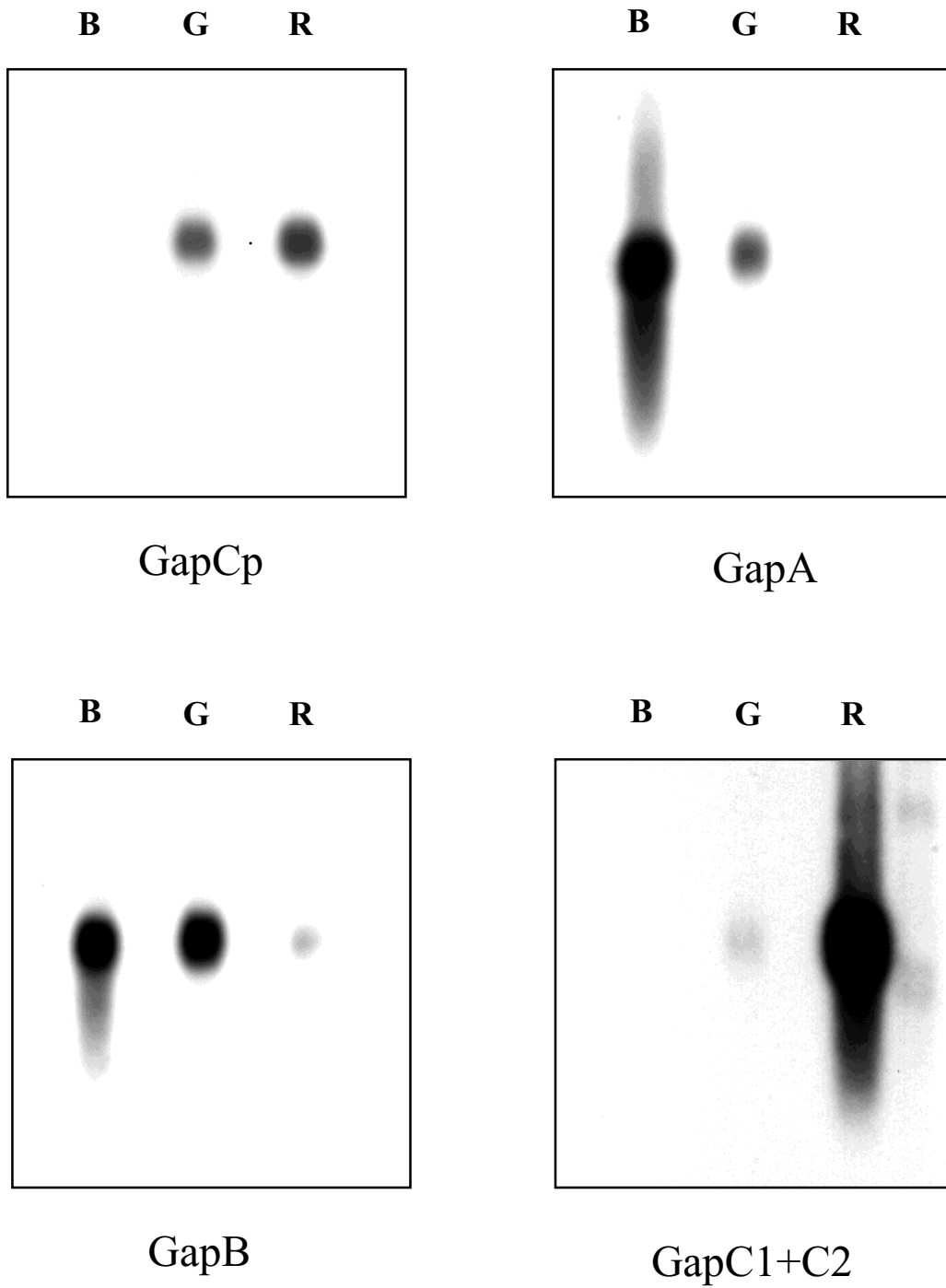


Abb. 14: Northern Blot Analyse mit Poly(A⁺) mRNA (10 µg) aus verschiedenen Paprika-Geweben.

B: Blatt; G: grüne Frucht; R: rote Frucht

GapCp Sonde ist die Signalstärke der roten Früchten im Vergleich zu den grünen Früchten nur leicht erhöht. Wenn die *GapCp* Sonde mit dem *GapC* Transkript cross-hybridisieren würde, sollte man in roten Früchten aufgrund der enormen Menge an *GapC* Transkript ein viel stärkeres Signal erwarten. Aufgrund der vergleichbaren Signalstärke kann davon ausgegangen werden, daß es zu keiner Cross-Hybridisierung zwischen *GapC* und *GapCp* kommt und das Northern Signal die tatsächliche *GapCp* Expression widerspiegelt.

Vergleicht man die Expression der plastidären GAPDH-Gene, so zeigt sich, daß *GapA* und *GapB* ausschließlich in photosynthetischen Geweben exprimiert werden, dahingegen ist die Expression der *GapCp* auf heterotrophe Gewebe beschränkt. Dementsprechend kann die *GapCp* als nicht-photosynthetisches Enzym des heterotrophen Plastidenstoffwechsels betrachtet werden.

3.2.5. Überexpression des *GapCp* Gens aus *Capsicum annuum* in *E. coli*

Das *GapCp* Protein aus *Capsicum annuum* wurde in *E. coli* überexprimiert. Für die Überexpression wurde das Studier-System (Studier et al. 1990) mit dem Vektor pET-3a verwendet. Da gezeigt werden konnte, daß das Transitpeptid des *GapCp* Proteins beim Transport in den

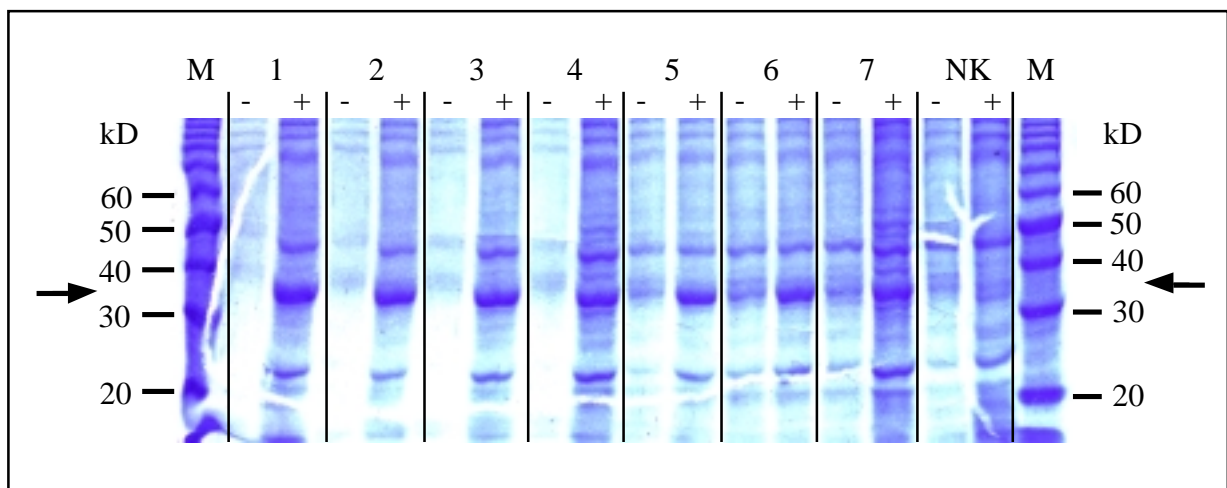


Abb. 15: Überexpression der *GapCp* aus Paprika (*Capsicum annuum*) in *E. coli*.
M: 10 kD Marker; - uninduzierter Proteinextrakt; + induzierter Proteinextrakt,
NK: Negativkontrolle; \rightarrow (erwartete) 37 kD Bande der *GapCp*.

Chloroplasten abgespalten wird (Meyer Gauen et al. 1994), wurde zur Überexpression lediglich die reife Untereinheit des Gens kloniert. Nach Amplifikation und Klonierung des Produktes in pET-3a wurde der Klon zur Kontrolle sequenziert (siehe Material 2.9.9.). Die Überexpression erfolgte im *E. coli* Stamm BL21(DE3) durch Induktion mit IPTG. Insgesamt wurden 7 unabhängige Klone für die Überexpression verwendet, als Negativkontrolle diente der pET-3a Vektor ohne Insertion. Die Probenahme erfolgte vor der Induktion und 3 h nach der Induktion. Der Vergleich von nicht induzierten und induzierten Proben auf einem denaturierenden SDS Polyacrylamidgel zeigt, daß nach der Induktion ein zusätzliches Produkt von etwa 35 kDa erscheint (Abb. 15). Im induzierten Proteinrohextrakt wird eine deutliche erhöhte spezifische GAPDH Aktivität gemessen, dementsprechend liegt das überexprimierte GapCp Enzym in nativer Form vor. Beim Vergleich der NAD abhängigen GAPDH Aktivitäten zwischen nicht induzierter und induzierter Probe ergibt sich bei Klon 1 eine Steigerung der spezifischen GAPDH-Aktivität um den Faktor 13,3 (Tab. 4). Im Rohextrakt läßt sich keine NADPH abhängige GAPDH Aktivität messen. Die Ergebnisse zeigen, daß das strikt NAD-abhängige GapCp Enzym aus Paprika erfolgreich in *E. coli* überexprimiert wurde.

Tab. 4: Spezifische Aktivitäten der überexprimierten GapCp im GAPDH-Enzymtest

Klon	nicht induziert	induziert	Faktor
1	1,76	23,49	x 13,3
2	2,35	1,93	-
3	2,48	3,59	x 1,4
4	1,54	7,37	x 4,8
5	1,84	9,86	x 5,4
6	3,02	7,64	x 2,5
7	1,70	6,77	x 4,0
8 (NK)	2,03	1,65	-

Dargestellt sind die spezifischen Aktivitäten (Units/mg-Protein).

NK: Negativkontrolle mit Vektor ohne Insertion

3.3. Das GAPDH-System der komplexen Alge *Chlorarachnion*

Von speziellem Interesse sind molekulare Untersuchungen an den Chlorarachniophyta, die ihre Plastiden, wie die Euglenophyta, durch eine sekundäre Endosymbiose mit einer Grünalge rekrutiert haben (Delwiche und Palmer 1997). Bisher ist aus dem Zuckerphosphatstoffwechsel der Chlorarachniophyta lediglich die plastidär kodierte große Untereinheit der Rubisco (*rbcL*) kloniert (McFadden et al. 1995). Hier werden die cytosolischen und plastidären GAPDH Sequenzen, Markerenzyme der Glykolyse und des Calvin Zyklus, näher untersucht. Für eine Einordnung der Sequenzen der Chlorarachniophyta besteht bereits ein geeigneter Rahmen an Sequenzen, da eine Vielzahl von GAPDH-Sequenzen sowohl aus Algenlinien mit einfachen Plastiden (Chlorophyta, Rhodophyta, Glaucophyta) (Martin et al. 1993; Liaud et al. 1993; Garnier et al. in Vorbereitung) als auch aus Linien mit komplexen Plastiden (Euglenophyta, Cryptophyta, Heterokontophyta, Dinophyta) (Henze et al. 1996; Liaud et al. 1997; Fagan et al. 1998) etabliert sind.

3.3.1. Plastidäre und cytosolische GAPDH-Sequenzen aus *Chlorarachnion*

Eine λ ZAP-cDNA Bank von *Chlorarachnion* CCMP621 wurde freundlicherweise von G. McFadden im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Für das Screening nach GAPDH Klonen wurden insgesamt 200.000 Phagen (Pfu) ausplattiert. Unter unstringenten Bedingungen wurde mit einem *GapC* Sondenmix bestehend aus *GapC* Sequenzen der Grünalgen *Coleochaete* und *Spirogyra* sowie der *GapC* und *GapCp* Sequenzen des Lebermooses *Marchantia* nach GAPDH-Klonen gescreent und es konnten zwei unterschiedliche Sequenzen identifiziert werden. Der eine GAPDH-Klon ist etwa 3 kb groß, das Startkodon beginnt bei Nukleotid 37 der cDNA Sequenz und das Enzym umfaßt 337 Aminosäuren. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *Chlorarachnion* mit prokaryotischen Sequenzen (Abb. 16) zeigt eine Homologie von 61% mit der *gap1* (\sim *GapC*) von *Escherichia coli*. Da ein Transitpeptid fehlt, handelt es sich bei diesem Klon wahrscheinlich um die cytosolische *GapC* mit einem langen untranslatierten 3'-Bereich. Der zweite unabhängige cDNA-Klon ist 444 Aminosäuren lang und läßt sich aufgrund des charakteristischen WYDNE-Motives ebenfalls eindeutig als GAPDH identifizieren.

	<i>E. coli</i> <i>GapC (gap1)</i>	<i>Synechocystis</i> <i>GapA (gap2)</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>GapX</i>
<i>Chlorarachnion</i> <i>GapC</i>	61	47	38
<i>Chlorarachnion</i> <i>GapX</i>	39	39	59

Abb. 16: Aminosäure Identitäten (%) der GAPDH Sequenzen von *Chlorarachnion* im Vergleich mit prokaryotischen GAPDH Sequenzen.

Die Homologie sowohl zu *gap1* (~*GapC*) als auch zu *gap2* (~*GapA*) aus *Synechocystis* ist mit 39% sehr niedrig. Allerdings besitzt die Sequenz eine hohe Homologie von 59% zu einer von drei GAPDH-Sequenzen aus *Pseudomonas aeruginosa*, im weiteren wird diese GAPDH als *GapX* bezeichnet (Abb. 16). Zwei unabhängige *GapX*-Klone (7 und 8) aus der *Chlorarachnion* cDNA-Bank wurden identifiziert und sequenziert. Im 5'-nicht translatierten Bereich findet man multiple GA-Dinukleotidwiederholungen unterschiedlicher Länge, Klon 7 und 8 weisen 12 bzw. 42 Wiederholungen auf (Abb. 17 A, B, C). Abgesehen von 9 Nukleotiden, die bei Klon 8 direkt im Anschluß an die GA-Wiederholungen fehlen, sind die Nukleotidsequenzen der cDNA-Klone sowohl im kodierenden als auch im nicht-kodierenden Bereich identisch (Abb. 17 C). Die *GapX* besitzt vermutlich eine 355 Aminosäuren umfassende reife Untereinheit und ein Signal-/Transitpeptid von 89 Aminosäuren. Dabei schließt sich einem gut 20 Aminosäuren langen hydrophoben Signalpeptid ein hydrophiles Transitpeptid mit geladenen Aminosäuren an (Abb. 17 D).

Cytosolische (~glykolytische) und plastidäre (~photosynthetische) GAPDH-Enzyme unterscheiden sich gewöhnlich durch eine unterschiedliche Kosubstratspezifität. Das Prolin in Aminosäureposition 188 ist für die strikte NADH-Spezifität aller cytosolischen *GapC*-Enzyme verantwortlich (Abb. 18); man findet Prolin 188 auch in der *GapC* von *Chlorarachnion*. Im Gegensatz zu den cytosolischen Enzymen sind die plastidären Isoenzyme NADH/NADPH-bispezifisch. Alle plastidären *GapA* Gene weisen in Position 188 eine Deletion auf, diese wird auch in der *GapX* von *Chlorarachnion* gefunden.

	Plastid	AS		AS			
		32	33	187	188		
Cytosol	<i>Anabaena gap1</i>		D -	G	P	GapC	Prolin 188 NADH- Spezifität
	<i>Cyanophora GapC</i>	einfach	D P	G	P		
	<i>Chondrus GapC</i>	einfach	D P	G	P		
	<i>Coleochaete GapC</i>	einfach	D P	G	P		
	<i>Marchantia GapC</i>	einfach	D P	G	P		
	<i>Chlorarachnion GapC</i>	komplex	D P	A	P		
	<i>Pyrenomonas GapC</i>	komplex	D P	G	P		
<i>Gonyaulax GapC</i>	komplex	D P	G	P			
Chloroplast	<i>Anabaena gap2</i>		D T	A	-	GapA	Kein Prolin 188 NADP-/NAD- Bi-Spezifität
	<i>Cyanophora GapA</i>	einfach	D T	A	-		
	<i>Chondrus GapA</i>	einfach	D T	A	-		
	<i>Coleochaete GapA</i>	einfach	D T	A	-		
	<i>Marchantia GapA</i>	einfach	D T	A	-		
	<i>Euglena GapA</i>	komplex	A G	G	-		
	<i>Pyrenomonas GapC-I</i>	komplex	A G	S S	GapC (I)	Kein Prolin 188 NADP-/NAD- Bi-Spezifität	
	<i>Gonyaulax GapC-I</i>	komplex	A -	S A			
	<i>Pseudomonas gap3</i>		K G	N -	GapX	Kein Prolin 188 NADP-/NAD- Bi-Spezifität?	
	<i>Chlorarachnion GapX</i>	komplex	Q P	N -			

Abb. 18: Aminosäurepositionen der GAPDH mit Bedeutung für die Kosubstratspezifität (Nummerierung entsprechend der GAPDH von *Bacillus stearothermophilus*)
einfach: Plastid entstammt primärer Endosymbiose
komplex: Plastid entstammt sekundärer Endosymbiose

3.3.2. Phylogenetische Untersuchungen der GAPDH-Sequenzen der Chlorarachniophyta

Aus der Abteilung der Chlorarachniophyta waren bisher keine GAPDH-Sequenzen verfügbar. Zur Einordnung der beiden neuen GAPDH-Klone aus *Chlorarachnion* erfolgte eine phylogenetische Analyse unter der Verwendung von *GapA* und *GapC* Sequenzen. Dazu wurden *GapA* und *GapB* Sequenzen der Chlorophyta im weiteren Sinne (Grünalgen und Landpflanzen), Rhodophyta und Glaukophyta sowie zwei homologe cyanobakterielle *gap2* Gene in die Analyse einbezogen. Aus den gleichen Abteilungen sowie aus Pilzen und Tieren wurden *GapC* und die dazu homologen *gap1* Sequenzen aus γ -Proteobakterien und Cyanobakterien ausgewählt. Die α -proteobakteriellen Sequenzen von *Rhodobacter* und *Xanthobacter* dienten als Outgroup.

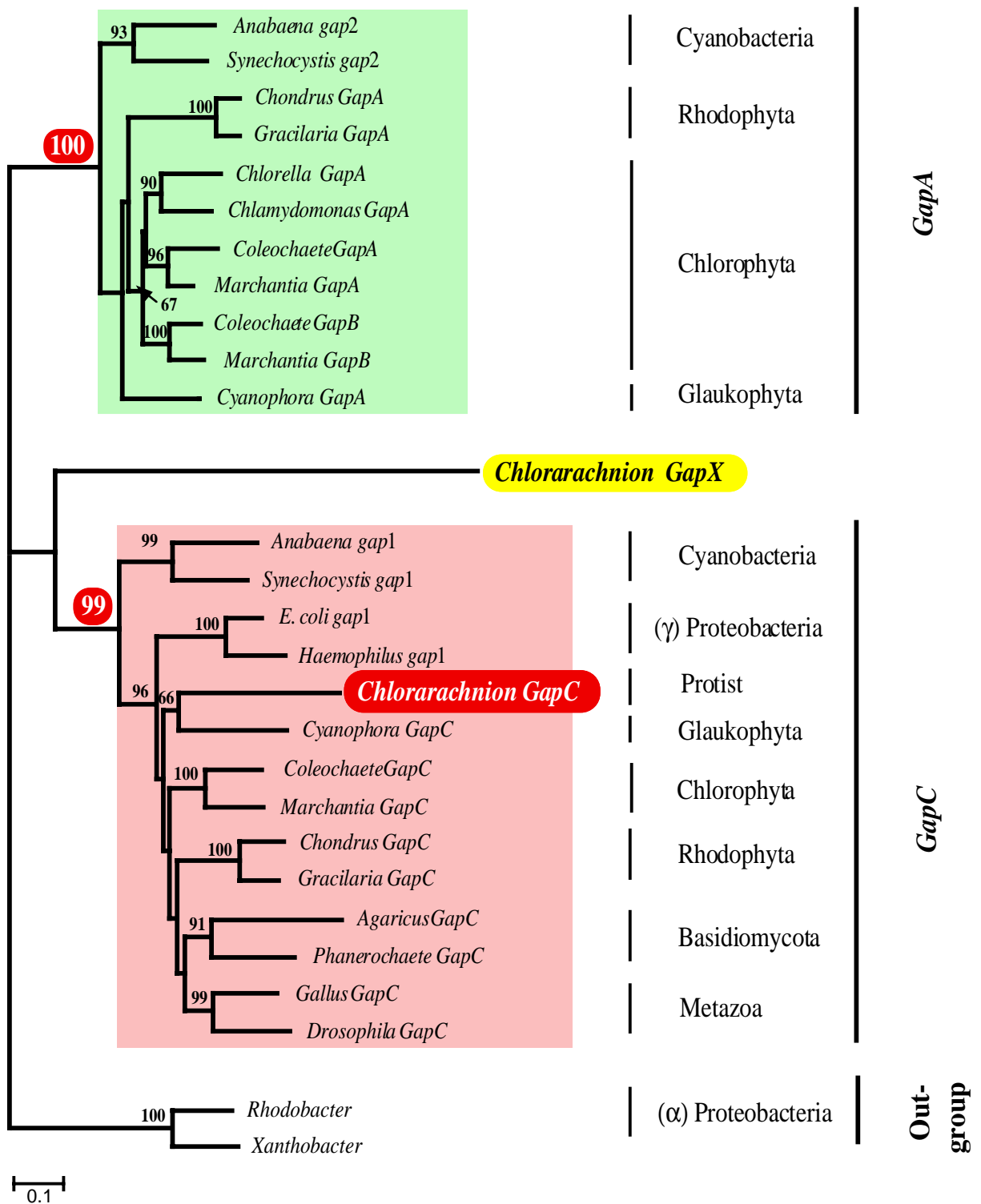


Abb. 19: Phylogenetische Position der GAPDH Gene von *Chlorarachnion*. Neighbor Joining Baum unter Verwendung der Kimura Korrektur basierend auf Aminosäuresequenzen. Nur Bootstrapwerte über 50% sind angegeben.

Der phylogenetische Neighbor Joining Baum in Abb. 19 wurde unter Verwendung der Kimura Korrektur aus 28 Sequenzen berechnet. Zur Einschätzung der statistischen Signifikanz der Topologie erfolgten 100 Bootstrap Analysen, nur Werte über 50% sind gezeigt. Im Neighbor Joining Baum bilden die *GapA* (*gap2*) und *GapC* (*gap1*) Sequenzen zwei monophyletische Teilstammbäume, deren Bootstrapunterstützung 99 bzw. 100% beträgt. Im *GapA* Teilstammbaum (grün unterlegt) repräsentieren die Sequenzen der Chlorophyta, Rhodophyta und Glaucophyta distinkte Linien, sie zweigen nach den cyanobakteriellen *gap2* Sequenzen ab. Die phylogenetische Analyse zeigt, daß sich die GAPDH-Sequenzen aus *Chlorarachnion* nicht dem *GapA* Teilstammbaum zuordnen lassen. Im *GapC* Teilstammbaum (rot unterlegt) bilden die Chlorophyta, Rhodophyta, Basidiomycota und Metazoa separate Linien, die durch hohe Bootstrapwerte unterstützt werden. Auch die *GapC* von *Chlorarachnion* befindet sich in diesem Teilstammbaum, ein Bootstrapwert von 66% deutet auf eine Affinität zur *GapC* von *Cyanophora* hin. Die nächste Outgroup für die *GapC* Sequenzen sind die *gap1* Sequenzen der γ -Proteobakterien, diese Topologie wird durch einen Bootstrapwert von 96% unterstützt, entfernter verwandt sind die cyanobakteriellen *gap1* Sequenzen. Die phylogenetische Analyse bestätigt, daß der 3 kb Klon aus *Chlorarachnion* eindeutig eine *GapC* ist, die in Abschnitt 3.3.1. verwendete Bezeichnung ist somit korrekt. Dahingegen bildet die *GapX* aus *Chlorarachnion* eine völlig separate Linie ohne signifikante Affinität zum *GapA* oder *GapC* Teilstammbaum.

Um die Frage zu klären, ob sich die *GapX* von *Chlorarachnion* einer anderen bakteriellen GAPDH-Linie zuordnen läßt, wurde eine weitere Neighbor Joining Analyse unter Verwendung der Kimura Korrektur mit 44 Sequenzen durchgeführt (Abb. 20). Der Großteil der Sequenzen besteht aus GAPDH-Sequenzen unterschiedlicher eubakterieller Linien. Viele Eubakterien besitzen mehrere sehr divergente GAPDH-Gene. So wurden vom Cyanobakterium *Anabaena variabilis* und von den Proteobakterien *Escherichia coli* bzw. *Pseudomonas aeruginosa* jeweils drei unterschiedliche Sequenzen mit in die Analyse einbezogen. Da es sich bei der Sequenz des extrem halophilen Archaeobakteriums *Haloarcula vallismortis* ebenfalls um eine Class I GAPDH handelt (Prüß et al. 1993), wurde auch diese Sequenz berücksichtigt. Auf Seite der Eukaryoten wurde neben der *GapX* Sequenz von *Chlorarachnion* die GAPDH des mitochondrialen Protisten *Trichomonas vaginalis*, die weder in die *GapA* noch die *GapC* Linie fällt (Markos et al. 1993), in die Gesamtanalyse miteinbezogen.

3. Ergebnisse

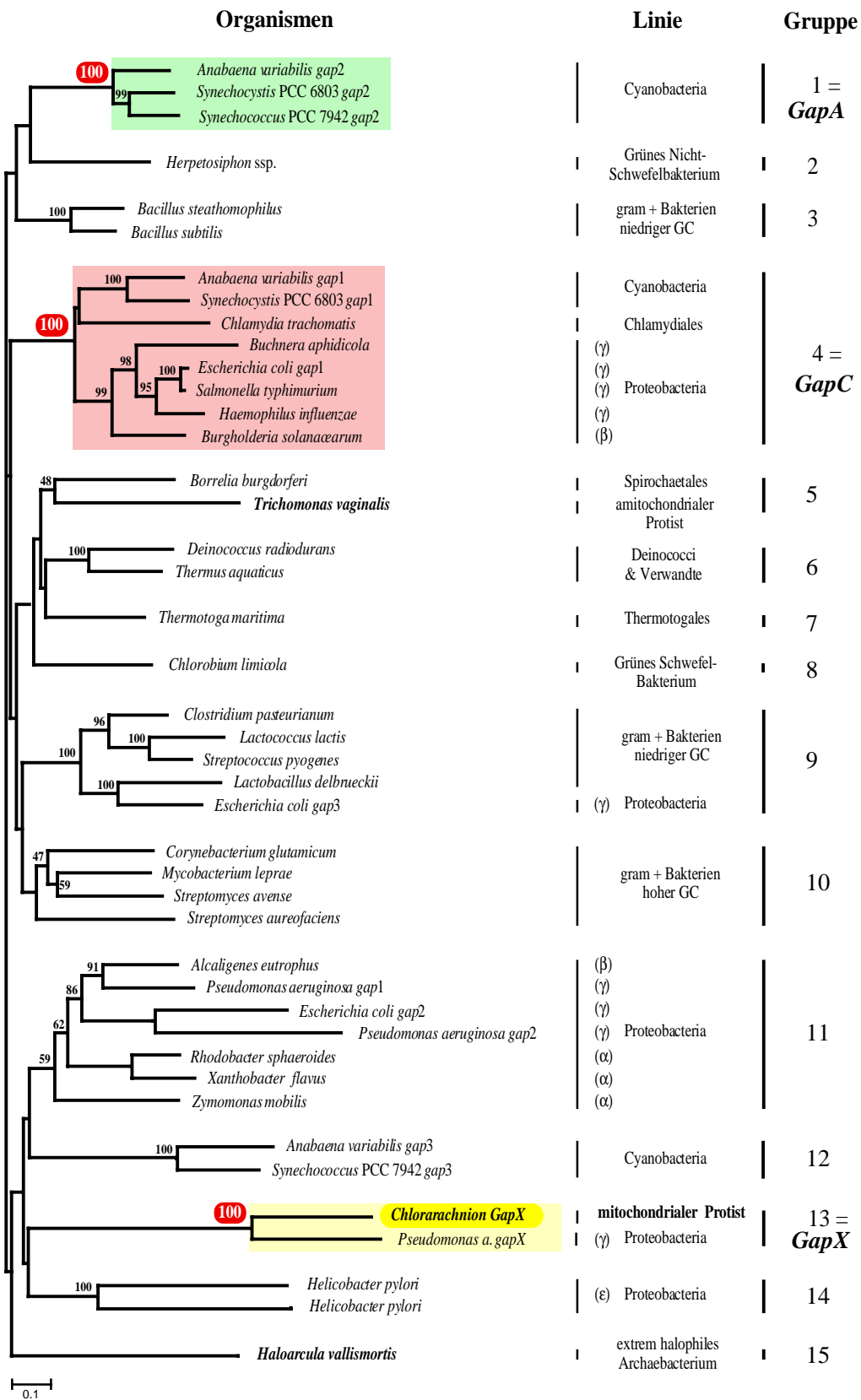


Abb. 20: GAPDH Gene aus Eubakterien, Archaea und Eukaryoten. Neighbor Joining Baum unter Verwendung der Kimura Korrektur basierend auf Aminosäure Sequenzen. Nur Bootstrapwerte über 50% wurden berücksichtigt.

Die Neighbor Joining Analyse (Abb. 20) zeigt die Existenz von einem guten Dutzend unabhängiger prokaryotischer GAPDH-Linien. Einige der Linien zeichnen sich durch einen relativ langen gemeinsamen Ast und durch hohe Bootstrapwerte aus. Allerdings ist bei den meisten GAPDH-Linien der Abstand von der Basis gering, sie haben sich wahrscheinlich früh in der prokaryotischen Evolution in Folge einer organismischen Radiation aufgetrennt. Die eukaryotischen Sequenzen von *Chlorarachnion* und *Trichomonas* und die archaeale Sequenz von *Haloarcula* befinden sich inmitten der eubakteriellen GAPDH-Linien und nehmen keine Sonderstellung ein. Die *gap1* und *gap2* Sequenzen, die den eukaryotischen *GapC* und *GapA* Teilstammbäumen entsprechen, sind auch hier rot bzw. grün hervorgehoben, die Monophylie beider Äste wird selbst im Gesamtspektrum eubakterieller GAPDH Sequenzen durch 100%ige Bootstrapwerte unterstützt. Die *GapX* Sequenz von *Chlorarachnion* bildet zusammen mit einer der *Pseudomonas* Sequenzen eine separate Linie in der eubakteriellen GAPDH-Radiation (gelb hervorgehoben). Wie im Fall der *GapA* und *GapC* wird auch der *GapX* Teilstammbaum durch einen 100%igen Bootstrapwert unterstützt. Diese Analyse belegt, daß es neben der *GapA* und *GapC* mit der *GapX* eine weitere distinkte eukaryotische GAPDH-Linie gibt, deren Gene sehr nahe mit eubakteriellen Sequenzen verwandt sind.

3.3.3. Genstruktur der *GapC* und *GapX* aus *Chlorarachnion*

Es ist besonders interessant die Genstruktur der *GapX* von *Chlorarachnion* zu untersuchen, um festzustellen ob dieses Gen Introns besitzt. Die beiden anderen eukaryotischen GAPDH-Linien, die *GapA* und *GapC*, sind eubakteriellen Ursprungs und stammen von Cyanobakterien (*gap2*) bzw. Proteobakterien (*gap1*) ab. Obwohl sich diese Gene bereits in einem prokaryotischen Vorfahren getrennt haben, besitzen sie einige Introns an absolut konservierten Positionen (Kersanach et al. 1994), was ein starkes Argument dafür ist, daß diese Introns sehr alt sind (Intron early Hypothese). Da die *GapX* eine dritte eukaryotische GAPDH-Linie prokaryotischen Ursprungs darstellt, würden konservierte Intronpositionen die Intron early Hypothese unterstützen.

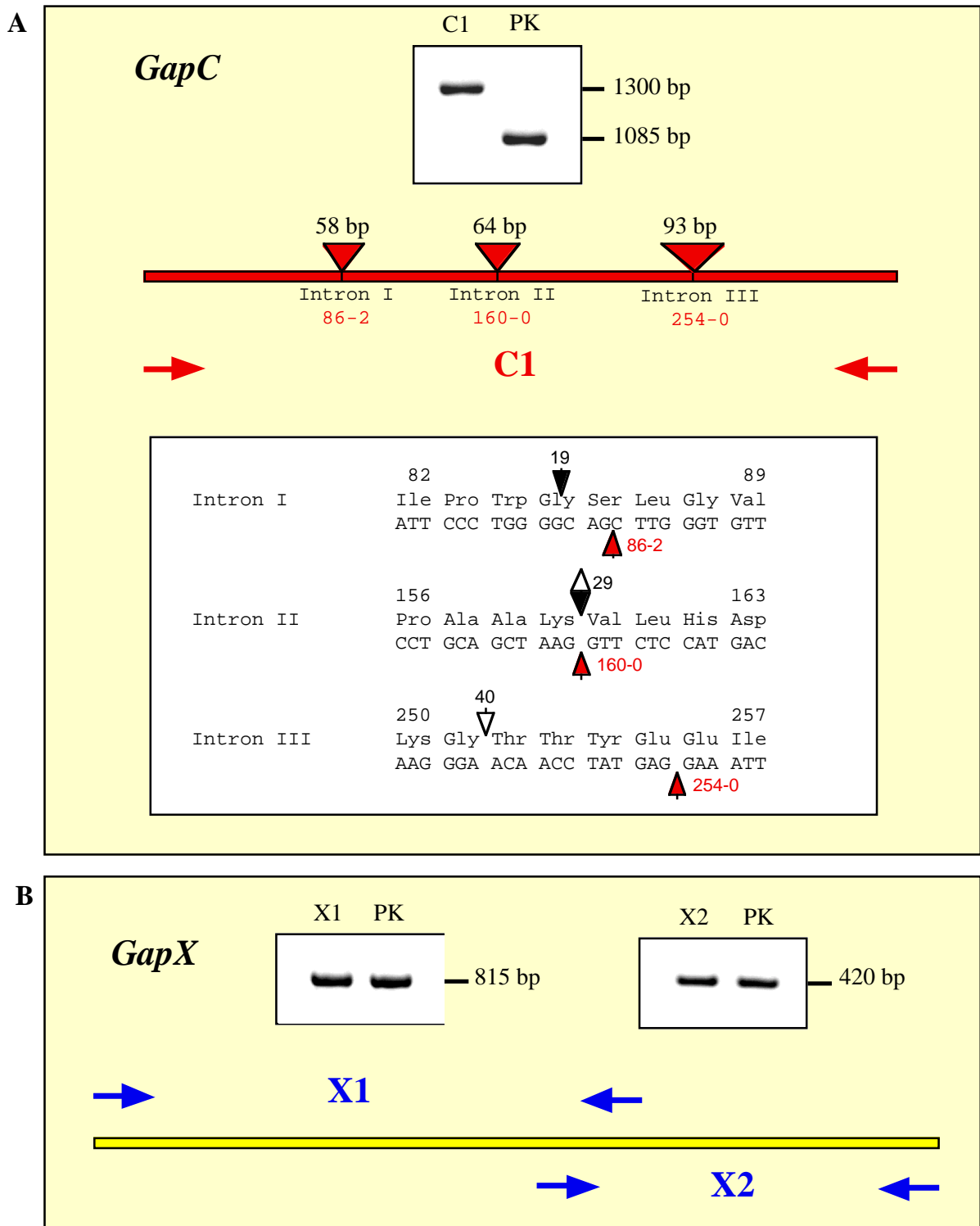


Abb. 21: PCR- Amplifikationen von GAPDH-Genen aus genomischer *Chlorarachnion* CCMP 621 DNA.

A) Amplifikation des vollständigen GAPC-Gens

Intronpositionen der *GapC* aus *Chlorarachnion* (rote Pfeile unter dem Alignment) und benachbarte Introns aus *GapA* und *GapC* Genen anderer Eukaryoten (weiße und schwarze Pfeile).

B) Amplifikation zweier partieller, überlappender *GapX*-Genbereiche

C1: GapC-Amplifikat; X1/X2: GapX-Amplifikate; PK: Positivkontrollen

Aus genomischer DNA von *Chlorarachnion* CCMP621, die freundlicherweise von G. McFadden zur Verfügung gestellt wurde, sollte mittels PCR sowohl das *GapX* aber auch das *GapC* Gen amplifiziert werden. Im Fall des *GapC* Gens konnte mit einem 5'-Primer, aus dem nichtkodierenden Bereich der cDNA-Sequenz vor dem Startkodon, und einem 3'-Primer, der hinter dem Stopkodon liegt, der gesamte kodierende Bereich der *GapC* amplifiziert werden (Abb. 21). Der Vergleich des Amplifikates mit der Positivkontrolle (Amplifikat der cDNA-Sequenz) zeigt einen Größenshift von 1085 bp zu 1300 bp. Die Sequenzierung des PCR-Fragments ergab, daß die *GapC* von *Chlorarachnion* drei kleine Introns besitzt. Die Angabe der Intronpositionen erfolgt nach der genauen Kodonposition im GAPDH-Alignment, dessen Nummerierung bezieht sich auf die erste kristallisierte GAPDH aus *Bacillus stearothermophilus*, außerdem ist die exakte Phase der Introns im Bezug auf das Leseraster angegeben. Diese Beschriftung stellt sicher, daß die Intronpositionen der verschiedenen GAPDH-Gene miteinander vergleichbar sind. Die Introns I (86-2), II (160-0) und III (254-0) der *GapC* aus *Chlorarachnion* folgen der GT-AG Regel und sind 58, 64 und 93 Basenpaare lang.

Für das *GapX* Gen wurden ebenfalls Primer konzipiert, die eine Amplifikation des kodierenden Bereiches erlauben. Zwei PCR-Reaktionen unter Verwendung von zusätzlichen internen Primern führten zu zwei partiellen aber überlappenden Amplifikaten des gesamten *GapX* Gens. Die Amplifikate X1 und X2 haben mit 815 und 420 bp allerdings eine zu den Positivkontrollen (cDNA) identische Größe. Die Sequenzierung der klonierten Amplifikate bestätigt, daß die *GapX* von *Chlorarachnion* keine Introns enthält.

4. Diskussion

Wenn die Lebewesen unter wechselnden Lebensbedingungen (...) Unterschiede aufweisen (was nicht bestritten werden kann) und wenn (...) ein harter Kampf ums Dasein stattfindet (was gleichfalls nicht bestritten werden kann), so wäre es (...) Zufall, wenn niemals Veränderungen vorkämen, die für das Gedeihen dieser Wesen (...) nützlich sind.

Charles Darwin

4.1.1. Funktionsgewinn der GapB nach der GapA/B-Genduplikation

Die *GapA/B*-Genduplikation ist das zweite einschneidende Ereignis in der Evolution plastidärer GAPDH Sequenzen nach dem lateralen Erwerb der *GapA* im Zuge der cyanobakteriellen Endosymbiose (Cerff 1995). *GapA* und *GapB* Sequenzen zeichnen sich durch eine langsame Evolutionsrate aus. Die Identitäten der abgeleiteten Aminosäuresequenzen zwischen Angiospermen und *Marchantia polymorpha*, einem Lebermoos, das möglicherweise die ursprünglichsten Landpflanzen repräsentiert (Qiu et al. 1998), betragen 86 bzw. 88% (Abb. 5). Dahingegen sind die Identitäten zwischen *GapC* bzw. *GapCp* Sequenzen, die ebenfalls aus einer Genduplikation hervorgegangen sind, im Schnitt etwa 10% niedriger und liegen bei ungefähr 75 % (Abb. 8 A). Der hohe Konservierungsgrad zeigt den starken, sowohl auf der *GapA* als auch auf der zusätzlichen *GapB* Funktion wirkenden Selektionsdruck. Die *GapA* und *GapB* Gene unterscheiden sich abgesehen von einigen spezifischen Sequenzsignaturen (Abb. 5) im wesentlichen durch eine zusätzliche C-terminale Extension der *GapB* von etwa 30 Aminosäuren. Diese Extension der *GapB* entstammt wahrscheinlich einer Fusion mit der C-terminalen Hälfte des *CP12* Gens (Pohlmeyer et al. 1996). Daß das *CP12* Gen evolutiv wesentlich älter als die *GapB* ist, wird dadurch deutlich, daß *CP12* bereits in der Grünalge *Chlamydomonas* und dem Cyanobakterium *Synechocystis* vorhanden ist (Wedel und Soll, 1998), wohingegen die *GapB* erstmals in den Charophyteen auftritt (Petersen 1995).

Seit etwa 20 Jahren sind aus *in vitro* Versuchen NAD(P) abhängige reversible Assoziationen der plastidären GAPDH aus Angiospermen bekannt, die möglicherweise eine Enzyminaktivierung bewirken. Zur Aggregation der plastidären GAPDH gibt es zwei Hypothesen. Das

Assoziationsmodell geht von einer Aggregation der plastidären GAPDH mit Hilfe einer zusätzlichen „Bindungsfraction“ (Fremdprotein) aus (Cerff 1978 a; b), wohingegen das Polymerisierungsmodell eine Komplexbildung ohne Hilfsfaktoren postuliert. Für das Polymerisierungsmodell sprechen *in vitro* Studien mit überexprimiertem GAPDH-Protein. Dabei wird bei sinkendem Reduktionspotential eine Aggregation von A₂B₂-Heterotetrameren beobachtet, wohingegen dieser Effekt bei Verwendung von A₄-Homotetrameren nicht auftritt (Scagliarini et al. 1993; Baalman et al. 1994; 1996). Mit CP12 wurde wahrscheinlich das postulierte Fremdprotein des Assoziationsmodells isoliert. Es wird angenommen, daß CP12 zusammen mit der GAPDH und der PRK (Phosphoribulokinase) im Dunkeln einen stabilen Komplex bildet und so für eine Inaktivierung der plastidären Enzyme sorgt. Bei Belichtung und einem hohen NADPH-Spiegel zerfällt dieser Komplex wieder (Wedel et al. 1997). Die beiden in Abb. 6 rot hervorgehobenen Cysteinreste sind für die CP12 abhängige Lichtregulation essentiell. Da diese Cysteine auch in allen GapB-Termini universell konserviert vorliegen, kann angenommen werden, daß sie auch für die Funktion der GapB entscheidend sind. Die eigentliche Funktion der GapB war lange Zeit unklar, die neuen Ergebnisse deuten darauf hin, daß die GapB mit dem C-Terminus von CP12 eine zusätzliche auf Protein-Protein Wechselwirkungen basierende regulatorische Funktion erworben hat. Die komplexeren Regulationsmöglichkeiten in Charophyceen, die hier exemplarisch anhand der *GapB* aufgezeigt sind, waren möglicherweise eine Voraussetzung für die Entstehung der Landpflanzen.

4.1.2. Die *GapA/B*-Genduplikation und die Entstehung der Landpflanzen

Die *GapA/B*-Genduplikation korreliert mit dem Übergang von Grünalgen zu Landpflanzen, die einen gemeinsamen Ursprung haben. Auch die Zusammensetzung des Pigmentmusters mit Chlorophyll a und b, sowie die Lagerung von Stärke als Reservepolysaccharid im Plastiden findet man in beiden Gruppen. Der monophyletische Ursprung aller grünen Pflanzen ist durch 16S rDNA Analysen eindeutig belegt (Bhattacharya und Medlin, 1995). Ultrastrukturelle Analysen legen die Gliederung in zwei Untergruppen nahe. Marchant und Pickett-Heaps (1973) haben Modi der Zellteilung bei Landpflanzen und Grünalgen untersucht und festgestellt, daß sowohl die Charophyceae als auch die Landpflanzen einen charakteristischen Phragmoplasten ausbilden, der aus senkrecht zur Zellteilungsebene angeordneten Mikrotubuli

besteht, dahingegen erfolgt die Zellteilung der übrigen Grünalgen unter Bildung eines Phycoplasten, dessen Mikrotubuli parallel angeordnet sind. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine Einteilung in zwei große Gruppen vorgeschlagen, einerseits in die Chlorophyta im engeren Sinne (i.e.S.; Sluiman 1985) mit den Chlorophyceae, Ulvophyceae und Prasinophyceae und andererseits in die Streptophyta (Bremer 1985), die sich aus den Charophyceae (Grünalgen) und den Embryophyta zusammensetzen. Molekulare Untersuchungen, die auf einen monophyletischen Ursprung der beiden Gruppen hindeuten, unterstützen diese Klassifikation (Wilcox et al. 1993; Surek et al. 1994; Bhattacharya et al. 1994, 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden GAPDH Sequenzen von *Chlorokybus*, *Klebsormidium*, *Chara*, *Spirogyra* und *Coleochaete*, als charakteristischen Vertretern aller fünf Klassen der Charophyceae (Chlorokybales, Klebsormidiales, Charales, Zygnematales, Coleochaetales), analysiert. Außerdem wurden die Sequenzen von *Chlamydomonas*, *Spermatozopsis*, *Chlorella* (Chlorophyceae), *Scherffelia* (Prasinophyceae) und *Cladophora* (Ulvophyceae), die die Chlorophyta i.e.S. repräsentieren, mit in die Analyse einbezogen. Die Chlorophyta i.e.S. besitzen alle plastidäre GAPDH Gene vom *GapA** Typ, die phylogenetisch vor der *GapA/B*-Genduplikation abzweigen und somit älter als die *GapB* sind (Abb. 7). Erst bei den Charophyceae findet man sowohl *GapA* als auch *GapB* Sequenzen, die separate Teilstammbäume bilden. Die Astlänge von der Genduplikation bis zur Abzweigung der ersten Charophyteen im *GapB* Ast ist etwa acht Mal so lang wie im *GapA* Ast (Abb. 7), obwohl beide Äste die gleiche evolutive Zeitspanne repräsentieren. Die verlängerte Astlänge im *GapB* Teilstammbaum läßt sich entweder durch den Wegfall des weiterhin auf der *GapA* lastenden Selektionsdruckes oder durch positive Selektion auf die zusätzliche Funktion der *GapB* erklären (Li 1997). Im ersten Fall würde die stark erhöhte Mutationsrate an der Basis des *GapB* Astes bedeuten, daß die *GapB* in dieser Phase unter einem wesentlich geringeren Selektionsdruck stand, und die ursprüngliche Funktion nach der Genduplikation zunächst durch die *GapA* sichergestellt wurde. Die *GapB* konnte dementsprechend solange relativ frei Mutationen ansammeln, bis sie mit dem C-Terminus ihre zusätzliche Funktion erworben hat und der Selektionsdruck wieder anzog. Im Fall der positiven Selektion (Zhang et al. 1998) hätte die *GapB* nach der Genduplikation zügig die C-terminale Extension rekrutiert und damit eine zusätzliche Funktion erworben. Die akzeptierte Mutationsrate ist dementsprechend solange erhöht gewesen bis die neue Funktion optimiert war und sich weitere Mutationen wiederum negativ auswirkten. Welcher der beiden Mechanismen für die erhöhte Mutationsrate verantwortlich war läßt sich

nicht eindeutig entscheiden. Der phylogenetische Baum zeigt, daß die erhöhte Akkumulation von Mutationen in der *GapB* anscheinend nur nach der Genduplikation erfolgte (Abb. 7). Außerdem sind auch die *GapB* Sequenzen, wie die der *GapA*, hochgradig konserviert (Abb. 5 und 6), daraus kann gefolgert werden, daß die zusätzliche regulatorische Funktion für die Organismen einen erheblichen Vorteil darstellt. Da trotz intensiver Suche in Laubmoosen keine *GapB* gefunden werden konnte, *Sphagnum* und *Physcomitrella* jedoch mindestens drei rezent duplizierte *GapA* Gene besitzen, ist anzunehmen, daß die *GapB* in Laubmoosen entweder nicht mehr exprimiert wird oder verloren ging. Das Vorhandensein der *GapB* ist für Landpflanzen zwar vorteilhaft aber ein sekundärer Verlust scheint durchaus möglich zu sein. Bei den Charophyceae, bei denen nur *GapA* Sequenzen gefunden wurden (z.B. *Spirogyra* oder *Klebsormidium*), kann nicht automatisch auf die Existenz der *GapB* geschlossen werden. Im Gegensatz dazu ist es aber sehr wahrscheinlich, daß *Chara* neben der *GapB* auch eine *GapA* besitzt, da die plastidäre GAPDH *in vivo* nur als GapA-Homotetramer oder GapAB-Heterotetramer vorkommt und die Bildung von GapB-Homotetrameren lediglich *in vitro* gezeigt werden konnte (Baalman et al. 1996). Von Vertretern aller fünf Klassen der Charophyceae ist jeweils zumindest eine GAPDH Sequenz verfügbar, die sich klar zum *GapA* oder *GapB* Teilstammbaum zuordnen läßt. Die untersuchten Chlorophyceae i.e.S. (Chlorophyceae, Ulvophyceae, Prasinophyceae) besitzen dahingegen *GapA** Sequenzen. Folglich muß die *GapA/B*-Genduplikation in einem gemeinsamen Vorfahren aller Charophyceae nach deren Abspaltung von den Chlorophyta i.e.S. stattgefunden haben. Somit ist das singuläre Ereignis der *GapA/B*-Genduplikation das erste Merkmal, das auf molekularer Ebene die Monophylie aller Charophyceae zusammen mit den Landpflanzen eindeutig belegt. Da eine Klassifikation die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Organismen korrekt widerspiegeln sollte, die Grünalgen für sich jedoch keine monophyletische Gruppe darstellen, ist die von Sluiman und Bremer vorgeschlagene Einordnung sinnvoll. Grünalgen und Landpflanzen sind dementsprechend Chlorophyta im weiteren Sinne und teilen sich in die Chlorophyta im engeren Sinne (Sluiman 1985) und die Streptophyta (Bremer 1985) auf.

Die Bestimmung der ursprünglichsten und der höchstentwickelten Charophyteen ist schwierig. *Chlorokybus*, *Klebsormidium* und *Chara* zweigen im *GapA* bzw. *GapB* Ast früher als *Coleochaete* und *Spirogyra* ab, allerdings fehlt eine signifikante Bootstrapunterstützung der Topologie. Darüber hinaus legt der *GapB* Ast eine artefizielle und vermutlich falsche Gruppierung von *Coleochaete* zusammen mit dem Lebermoos *Marchantia* und dem Farn

Matteuccia nahe. Die Topologie innerhalb des *GapB* Teilstammbaums wird auch hier nur schwach durch Bootstrapwerte unterstützt. Der Grund dafür ist wahrscheinlich der hohe Konservierungsgrad der *GapA* und *GapB* Sequenzen (Abb. 5). Ein variablerer molekularer Marker, wie etwa die *GapC*, ist für die Auflösung der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Charophyceae möglicherweise besser geeignet.

4.2.1. Die *GapC/Cp*-Genduplikation und die Entstehung der Landpflanzen

Bei der Entstehung der Landpflanzen gab es neben der *GapA/B*-Duplikation im GAPDH System noch ein weiteres zentrales Ereignis, die Duplikation der *GapC* und die Entstehung einer plastidären *GapCp*. In dieser Arbeit wurde die *GapC/Cp*-Genduplikation im Kontext der Entstehung der Landpflanzen analysiert. Ein weiteres Anliegen war die Datierung der *GapC/Cp*-Genduplikation.

Der phylogenetische *GapC/Cp*-Baum (Abb. 9) läßt sich grob in drei Bereiche einteilen: Einen zahlenmäßig dominierenden Teilstammbaum cytosolischer *GapC* Sequenzen von Charophyceae (Grünalgen) und Landpflanzen, einen kleineren Teilstammbaum plastidärer *GapCp* Sequenzen und die *GapC* Sequenzen von *Chlamydomonas* und *Chlorella*, die vor der Genduplikation abzweigen. Die Topologie des großen Teilstammbaums mit den cytosolischen *GapC* Sequenzen stimmt mit den allgemein akzeptierten Vorstellungen der Evolution von Landpflanzen überein. Die Farne gehören zusammen mit den Laub- und Lebermoosen zu den frühesten Landpflanzen. Im *GapC* Teilstammbaum verzweigen diese nahe der Grünalgen *Coleochaete*, *Chara* und *Klebsormidium* aus der Klasse der Charophyceae, die an der Basis stehen. Die Insertion H/N/K in Aminosäureposition 54A des GAPDH Alignments (Abb. 8 A; grün hervorgehoben) wird bei allen *GapC* Sequenzen der Landpflanzen gefunden und fehlt in *GapC* Sequenzen aller anderen Organismen (Eubakterien und Eukaryoten) inklusive der Charo- und Chlorophyceae (Grünalgen). Diese Insertion unterstützt eine monophyletische Entstehung der Landpflanzen. Auch der *GapC* Ast zeigt diese Monophylie, allerdings ohne signifikante Unterstützung durch Bootstrapwerte. Die unterschiedlichen Klassen einfacher Landpflanzen sind dementsprechend keine evolutiven Sackgassen nach multiplen Besiedlungen des Landes (Sluiman 1983), sondern sie sind vielmehr frühe Abzweigungen einer gemeinsamen Entwicklungslinie (Graham 1993). Die Topologien der phylogenetischen Analysen deuten auf ein serielles Verzweigungsmuster der verschiedenen Klassen innerhalb der Charophyceen und Landpflanzen hin (Moose – Farne – Gymnospermen – Monokotyledonen – Dikotyledonen).

Der Ursprung der Landpflanzen ist umstritten, am besten unterstützt ist die Theorie, nach der die Lebermoose als die ursprünglichsten Landpflanzen angesehen werden und die anderen Moose Schwestergruppen zu den Gefäßpflanzen bilden (Graham 1993; Mishler et al. 1994; Hiesl et al. 1994; Bopp und Capesius 1996). Eine jüngst erschienene Publikation über die

Verteilung von drei mitochondrialen Gruppe II Introns unterstützt die Ansicht einer ancestralen Stellung der Lebermoose (Qiu et al. 1998). Diese Introns fehlen nur in den Lebermoosen und Charophyceen (*Chara* und *Klebsormidium*), in allen anderen Linien der Landpflanzen inklusive der Horn- und Laubmoose sind sie jedoch vorhanden. Da bei der phylogenetischen Analyse der *GapC* Sequenzen (Abb. 9) keine ancestrale Stellung des Lebermooses *Marchantia* gefunden wird, die protml Analyse des *GapCp* Teilstammbaums allerdings in dem Baum mit der höchsten Wahrscheinlichkeit eine solche basale Position von *Marchantia* unterstützt (Abb. 10), erlauben die *GapC/Cp*-Daten keine eindeutige Bestimmung der frühesten Landpflanze.

Auf Seite der Grünalgen wurden zwei der fünf Ordnungen der Charophyceen, die Coleochaetales und Charales, aufgrund morphologischer, ultrastruktureller und biochemischer Eigenschaften, als nächste Verwandte der Landpflanzen angesehen (Graham 1984; 1993). Molekulare Unterstützung für einen Ursprung der Landpflanzen aus den Charophyceen liefern u.a. phylogenetische *rbcL* Analysen (Graham et al. 1991; Manhart 1994; McCourt et al. 1996). Die Intronverteilung in *tRNA* Sequenzen deutet auf eine spezifische Verwandtschaft von *Coleochaete* (Coleochaetales) und *Nitella* (Charales) mit den Landpflanzen hin (Manhart und Palmer 1990). Die unterschiedlichen Analysen belegen, daß die Landpflanzen aus den Charophyceen hervorgegangen sind, aber der nächste Verwandte auf Seite der Charophyceae ist schwierig zu bestimmen. Alle phylogenetischen Analysen dieser Arbeit (NJ, MP, ProtML) deuten auf eine spezifische Verwandtschaft zwischen *Coleochaete* und den Landpflanzen zum Ausschluß der anderen Charophyceen hin. Einige Aminosäuren im *GapC* Alignment (17 A, 27 L, 36 S/T, 66 F/L und 70 P; Abb. 8 A, blau hervorgehoben) werden ausschließlich von Landpflanzen und *Coleochaete* geteilt, in allen anderen Sequenzen der Charo- und Chlorophyceae sind sie unterschiedlich. Zusammen mit den phylogenetischen Analysen demonstrieren diese konservierten Positionen klar die spezifische Verwandtschaft zwischen *Coleochaete* und den Landpflanzen. Diese Ergebnisse unterstützen eindeutig die Annahme, daß die Ordnung der Coleochaetales innerhalb der Charophyceae nicht nur eine Schwestergruppe der Landpflanzen darstellt, sondern daß die Landpflanzen vielmehr ihren Ursprung in den Coleochaetales genommen haben (Graham 1984).

Ein weiteres wichtiges aber älteres Ereignis in der GAPDH Evolution ist die *GapC/Cp*-Gen-duplikation. *GapCp* Sequenzen werden in Lebermoosen, Laubmoosen, Farnen, Gymnospermen und Angiospermen gefunden. Diese weite Verbreitung legt nahe, daß alle Gruppen der Land-

pflanzen das *GapCp* Gen besitzen, in den Charophyceae konnte die *GapCp* allerdings bisher noch nicht gefunden werden. Die phylogenetische Analyse in Abb. 9 deutet aber darauf hin, daß die *GapC/Cp*-Genduplikation bereits vor der Auftrennung der Charophyceen *Klebsor-midium* und *Chara* von *Coleochaete* und Landpflanzen erfolgte (*GapC* Ast), diese Topologie ist allerdings nicht durch hohe Bootstrapwerte unterstützt. Um die Signifikanz der Topologie zu überprüfen wurden weitere Analysen durchgeführt. Der wahrscheinlichste Baum der ProtML Analyse (höchste „Likelihood“) unterstützt ebenfalls eine basale Abspaltung des *GapCp* Teilstammbaums als Schwestergruppe zu den *GapC* Sequenzen der Streptophyta (inklusive aller Charophyceae und Landpflanzen; Bremer 1985). „User defined Trees“, die eine nähere Verwandtschaft des *GapCp* Teilstammbaum mit den *GapC* Sequenzen der Landpflanzen zum Ausschluß der Charophyceae vorschlagen, haben eine signifikant niedrigere „Likelihood“. Des weiteren wird die Topologie in Abb. 9 durch Sequenzsignaturen unterstützt. Die Insertion 54A (Abb. 8 A) wird in allen *GapC* Sequenzen der Landpflanzen gefunden, diese Insertion fehlt sowohl den *GapC* Sequenzen der Charophyceae als auch den *GapCp* Sequenzen. Darüber hinaus findet man spezifische Motive der *GapC* Sequenzen von *Coleochaete* und Landpflanzen (17 A, 27 L, 36 S/T, 66 F/L und 70 P; Abb. 8 A) weder in *GapC* Sequenzen anderer Charophyceae noch in *GapCp* Sequenzen. Dies deutet auf eine frühere Abspaltung des *GapCp* Teilstammbaums hin. Zusammenfassend legen die Ergebnisse nahe, daß die *GapC/Cp*-Genduplikation zumindest vor der Auftrennung von *Coleochaete* und Landpflanzen, aber möglicherweise bereits in einem gemeinsamen Vorfahren aller Charophyceae erfolgte. Die Tatsache, daß bisher keine *GapCp* cDNA Sequenz in Charophyceen gefunden wurde kann entweder durch einen sehr niedrigen Expressionsgrad (gewebespezifische Expression; siehe 3.2.4.) oder die Möglichkeit eines sekundären Verlustes des *GapCp* Gens in den Charophyceae erklärt werden. Der genaue Zeitpunkt der *GapC/Cp*-Genduplikation ist schwierig zu bestimmen, da paläobotanische Funde über den Ursprung der Charophyceae fehlen. Die ersten Landpflanzen tauchten jedoch vor etwa 500 Millionen Jahren auf (Graham 1993), dementsprechend muß die Genduplikation eindeutig älter sein.

4.2.2. Möglicher Erwerb des GapCp Transitpeptides mittels Exon Shuffling

Nach der *GapC/Cp*-Genduplikation hat das *GapCp* Gen ein Transitpeptid erworben, das den Transport des GapCp Proteins in den Chloroplasten ermöglicht. Die Carboxytermini aller analysierten GapCp Transitpeptide sind eindeutig homolog, was auf einen gemeinsamen Ursprung hindeutet. Bisher gibt es keine Arbeiten zum Ursprung von Transitpeptiden für den plastidären Proteinimport, aber einige Beispiele des Erwerbs N-terminaler Signalsequenzen für den Proteinimport in die Mitochondrien sind beschrieben (Nugent und Palmer 1991; Covello und Gray 1992; Grohman et al. 1992; Wischmann und Schuster, 1995). Signalpeptide haben vergleichbare Sekundärstrukturen, ihnen fehlen aber spezifische Konsensussequenzen (Baker und Schatz 1987; Schatz et al. 1996). Neue Signalpeptide können durch Duplikationen bereits vorhandener entstehen (Kadowaki et al. 1996), darüber hinaus wurde die Rekrutierung des N-terminalen Bereichs eines *GapC* Gens als mitochondriale Präsequenz beschrieben (Long et al. 1996). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, daß 3% zufällig ausgewählter *E. coli* Proteinsequenzen den Transport in die Mitochondrien ermöglichen (Baker und Schatz 1987). Zwei prinzipielle Mechanismen zur Rekrutierung von Transitpeptiden sind denkbar, diese basieren auf genomischer oder intronischer Rekombination (Exon Shuffling; Gilbert 1978). Rekombinationsereignisse erzeugen jedoch nur dann funktionelle chimäre Proteine, wenn das Leseraster des fusionierten Proteins nicht durch einen „Frameshift“ unterbrochen ist. Für den Spezialfall des Exon Shufflings werden für eine erfolgreiche Rekombination symmetrische Module, das heißt Exons, die von phasengleichen Introns flankiert sind, benötigt. Obwohl bei der Suche in Datenbanken kein potentieller Donor für das Transitpeptid der *GapCp* gefunden wurde, ist die wahrscheinlichste Erklärung für den Erwerb eine Fusion der *GapCp* mit einem bereits vorhandenen Protein. Wie in dem Ergebnisteil beschrieben, ist bei den Landpflanzen die erste Intronposition der verschiedenen *GapC* Gene wahrscheinlich zur dritten Intronposition innerhalb des *GapCp* Transitpeptides homolog, sie alle liegen in der Phase 1 vor. Aufgrund dieser Homologie der Intronpositionen ist anzunehmen, daß der Erwerb des Transitpeptides durch Exon Shuffling mit einer bereits vorhandenen Donorsequenz erfolgte. Dies liefert eine plausible Erklärung, wie die *GapCp* nach der Genduplikation zügig ein Transitpeptid erwerben konnte und so dem Chloroplasten eine zusätzliche katalytische Aktivität verliehen hat.

4.2.3. *GapCp* als Markerenzym der plastidären Glykolyse in Landpflanzen

GapCp Sequenzen sind bisher lediglich aus der Gymnospermen *Pinus* und dem Farn *Marsilea* beschrieben, in Angiospermen konnten sie nicht gefunden werden (Meyer Gauen et al. 1994, 1998). Biochemische Untersuchungen zur Enzymaktivität in isolierten Plastiden deuten darauf hin, daß diese strikt NAD-abhängige GAPDH in den Chromoplasten roter Paprikafrüchte (*Capsicum annuum*) vorhanden ist, aber in den Chloroplasten der Blätter fehlt (Backhausen et al. 1998). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine cDNA Bank aus PolyA⁺-RNA roter Paprikafrüchte erstellt, woraus die erste *GapCp* Sequenz einer angiospermen Pflanze isoliert werden konnte. Die unterschiedlichen Expressionsmuster des GAPDH Systems von Paprika wurden unter besonderer Berücksichtigung der *GapCp* (siehe 3.2.4) ausgiebig charakterisiert. Die Northern Analysen verschiedener Paprikagewebe (Abb. 13 und 14) zeigen eine ausschließliche Expression des *GapCp* Gens in heterotrophen Geweben wie Wurzeln und roten Früchten, dahingegen kann in autotrophen Geweben wie Blättern kein Transkript nachgewiesen werden. In dieser Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß alle großen Ordnungen der Landpflanzen funktionelle *GapCp* Gene besitzen. Aufgrund dessen stellt sich die Frage nach der physiologischen Funktion der *GapCp* in den Plastiden. Die exklusive Expression dieses Gens in nicht-photosynthetischen Geweben unterstützt das Vorkommen einer plastidären Glykolyse.

GAPDH Isoenzyme sind sowohl für die Glykolyse als auch den Calvin Zyklus essentiell. Im Cyanobakterium *Synechocystis* verwendet die *Gap2*, das homologe Enzym zur eukaryotischen *GapA*, unter physiologischen Bedingungen sowohl NADP als auch NAD als Kosubstrat (Koksharova et al. 1998). Bei vielen einzelligen Grünalgen, wie etwa *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae), konnten die Aktivitäten einiger glykolytischer Enzyme im Cytosol nicht nachgewiesen werden, dahingegen war der vollständige Satz glykolytischer Enzyme in den Chloroplasten vorhanden (Schnarrenberger et al. 1990). Da ein Zuckerphosphatstoffwechsel ganz ohne Glykolyse nur schwer vorstellbar ist, stellt möglicherweise auch die plastidäre *GapA* aus *Chlamydomonas* eine zusätzliche glykolytische Funktion sicher. Allerdings zeigt die *GapAB* der Landpflanzen unter physiologischen Bedingungen keine NAD-Aktivität (Cerff 1978). Die *GapAB* hat wahrscheinlich eine ausschließlich biosynthetische Funktion, dementsprechend kann in autotrophen Geweben auch keine plastidäre Glykolyse erfolgen. Die Hauptfunktion phototropher Plastiden während des Tages ist die Bildung von

Triose-Phosphat im Calvin Zyklus. Nachts ist der Abbau transitorischer Stärke und der Export von Triose-Phosphat ins Cytosol mittels des Triose-Phosphat-Translokators (Flügge et al. 1989) die vorherrschende metabolische Aktivität. Der Wechsel von autotrophen zu heterotrophen Bedingungen ist jedoch durch tiefgreifende Änderungen in der Genexpression und Morphologie der Plastiden charakterisiert (Review: Camara et al. 1995). In diesen Geweben ist der Calvin Zyklus dauerhaft inaktiviert und die Expression vieler photosynthetischer Gene einschließlich der *GapA* und *GapB* ist ausgeschaltet (Cerff et al. 1982; Rapp und Mullet 1991; Hahn et al. 1998). Die Expressionsstudien bei *Capsicum annuum* zeigen, daß in heterotrophen Geweben parallel zum Abschalten der *GapA* die Expression der *GapCp* extrem hochreguliert wird (Abb. 13 und 14). Dementsprechend besitzen die heterotrophen Plastiden eine strikt NAD-abhängige *GapCp*, das funktionelle Äquivalent zur glykolytischen *GapC* des Cytosols (Meyer Gauen et al. 1998). Alle bisher bekannten anabolen Reaktionen des Plastiden benötigen allerdings NADPH als Kosubstrat. Ein großer Überschuß an reduziertem NADH würde aufgrund eines Metabolitungleichgewichtes den plastidären Stoffwechsel stark beeinträchtigen. Es sind jedoch mindestens drei Mechanismen bekannt, die die Regeneration von NAD ermöglichen. (i) Es konnte im Plastiden eine NAD-Kinase nachgewiesen werden die unter ATP Verbrauch NADH zu NADPH umwandelt (Jalouzot et al. 1994). (ii) Jüngste Ergebnisse über einen funktionellen NADH-abhängigen Atmungskomplex (Burrows et al. 1998; Sazanov et al. 1998) und der Nachweis einer Endoxidase in den Plastiden (Carol et al. 1999) sprechen für die schon lange postulierte Existenz von Chlororespiration (Bennoun 1982). (iii) Weiterhin besteht die Möglichkeit NADH ins Cytosol zu transportieren. Dieser Mechanismus benötigt sowohl die plastidäre NAD abhängige Malatdehydrogenase (MDH), die Oxalacetat zu Malat reduziert, als auch das sogenannte Malat-Ventil, einen Antiporter von Malat (ins Cytosol) und Oxalacetat (in den Plastiden) (Berkemeyer et al. 1998; Backhausen et al. 1998). So werden die Reduktionsäquivalente in Form von Malat ins Cytosol transportiert und von der cytosolischen Malatdehydrogenase wieder freigesetzt. Da das NADH der mitochondrialen Atmung zugeführt werden kann stellt dieser Kreisprozeß sicher, daß keine Endprodukthemmung durch NADH auftritt. Durch diese Mechanismen kann in heterotrophen Plastiden die Glykolyse unter Einbezug der *GapCp* reibungslos verlaufen. Neben der Aktivität der NAD-abhängigen *GapCp* (Backhausen et al. 1998) konnten die Aktivitäten aller an der Glykolyse beteiligten Enzyme in zahlreichen nicht-photosynthetischen Plastiden nachgewiesen werden (Dennis et al. 1982; Schnarrenberger et al. 1983; Journet et al. 1985; Entwistle et al. 1988). Obwohl das Vor-

handensein der Glykolyse in den Plastiden teilweise kontrovers diskutiert wurde (Fischer et al. 1997), kann die Existenz dieses Stoffwechselweges zumindest in spezialisierten Plastiden nicht mehr bestritten werden (Plaxton 1996).

Die *GapC/Cp*-Genduplikation korreliert mit der Entstehung der Landpflanzen (siehe 4.2.1.). Der mit dem Erwerb der *GapCp* verbundene entscheidende Funktionsgewinn ist die Möglichkeit zur plastidären Glykolyse. Da die *GapAB* keine glykolytische Funktion zeigt, ist die *GapCp* somit ein spezifischer Indikator für die plastidäre Glykolyse in Landpflanzen. Der hohe Konservierungsgrad (siehe Ergebnisteil; Abb. 8 A) zeigt den bemerkenswerten Selektionsdruck, der auf das *GapCp* Gen wirkt. Auch das Vorkommen der *GapCp* in allen größeren Ordnungen der Landpflanzen (diese Arbeit) unterstreicht die Bedeutung der plastidären Glykolyse.

Ein schematischer Überblick des Kohlenhydratmetabolismus in heterotrophen Pflanzengewebe ist in Abb. 22 dargestellt. Der plastidäre Stoffwechsel heterotropher Plastiden unterscheidet sich stark von dem autotropher Chloroplasten (Martin und Herrmann, 1998). Auch heterotrophe Plastiden zeigen bemerkenswerte Biosyntheseaktivitäten. Beispielsweise benötigen Chromoplasten große Mengen an ATP, Reduktionsäquivalenten und C3-Metaboliten (z.B. GA-3-P und Pyruvat) für die Carotinoid- und Fettsäuresynthese (Hugueney et al. 1996; Lange et al. 1998). In heterotrophen Plastiden ermöglichen Oxidativer Pentose Phosphat Weg (OPPW) und Glykolyse eine Versorgung mit diesen Metaboliten. Allerdings hängt der Stoffwechsel nicht-photosynthetischer Plastiden von externer Metabolit- und Energieversorgung ab (Hill et al. 1991; Trethewey et al. 1994; Möhlmann et al. 1998). Effiziente Transportsysteme zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten sind notwendig um einen ungestörten Metabolismus zu ermöglichen. Im Fall des Plastiden stellen Kohlenhydrat-Translokatoren (Flügge et al. 1989; Trethewey und Rees 1994; Weber et al. 1995; Fischer et al. 1997) und der ATP-Translokator (Kampfenkel et al. 1995) den interkompartimentären Austausch sicher. Da ihre Austauschraten naturgemäß limitiert sind, stellen diese Translokatoren potentielle „Flaschenhälse“ des Metabolismus dar. Es wurde beispielsweise gezeigt, daß der Triose-Phosphat-Translokator (siehe Abb. 22, Translokator II) in heterotrophem Wurzelgewebe nicht exprimiert wird (Fischer et al. 1997). Ein paralleles Auftreten der Glykolyse im Cytosol und in den Plastiden sowie die Verknüpfung über Translokatoren schafft ein metabolisches Netzwerk, das äußerst flexibel auf den Kohlenhydrat- und Energiebedarf der Zelle reagieren kann.

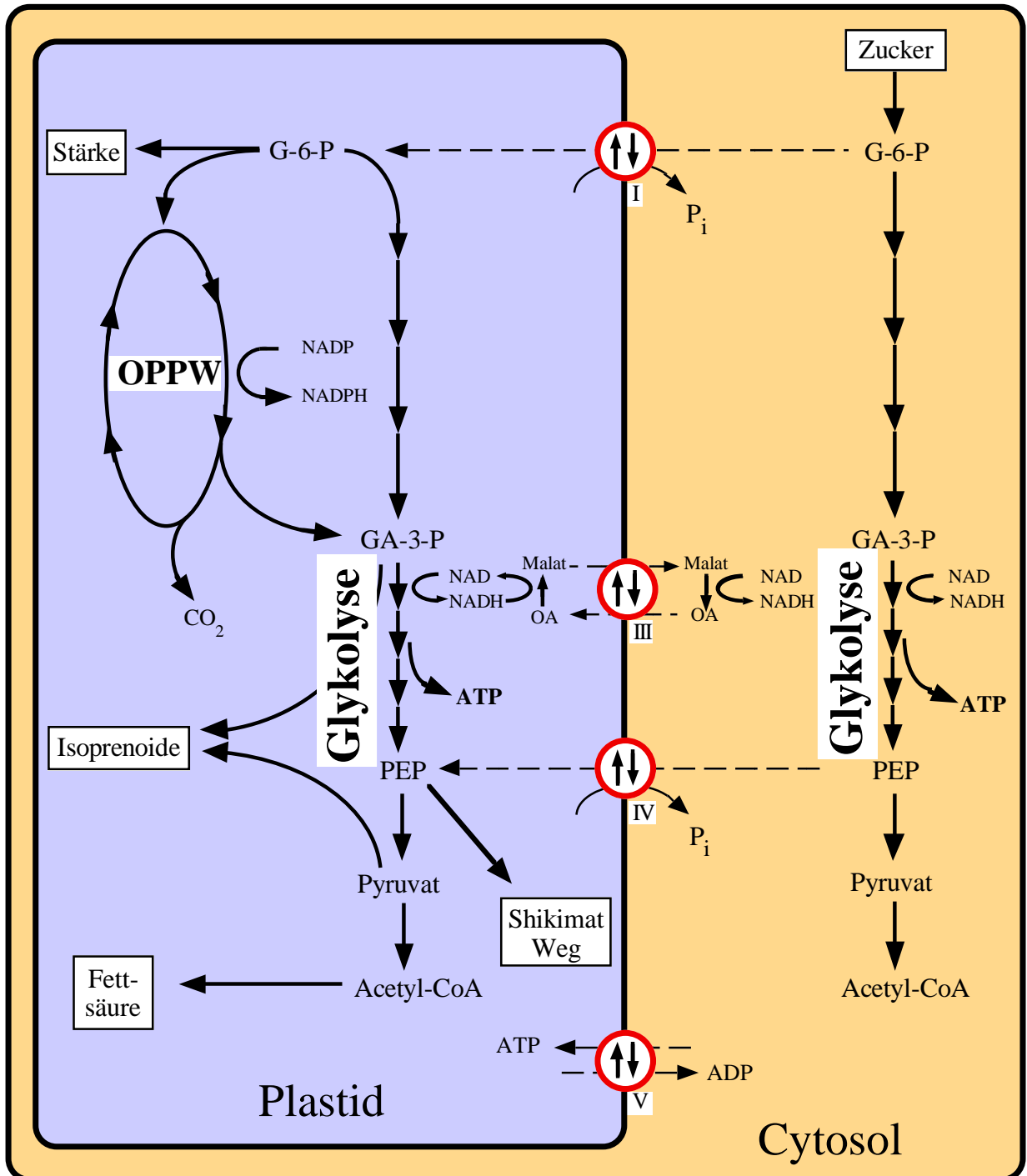


Abb. 22: Kohlenhydrat Stoffwechsel in heterotrophen Geweben.

G-6-P: Glukose-6-Phosphat, GA-3-P: Glycerinaldehyd-3-Phosphat, PEP: Phosphoenolpyruvat, OA: Oxalacetat, OPPW: Oxidativer Pentose Phosphat Weg

I: Hexose Translokator, II: Triose-Phosphat-Translokator (in heterotrophen Geweben nicht expremiert), III: "Malat Ventil", IV: PEP Translokator, V: ATP/ADP Translokator

4.3.1. Plastidäre und cytosolische GAPDH-Sequenzen aus *Chlorarachnion*

Die Entstehung der Algen Diversität mit mehr als 37.000 bekannten Arten ist ein Ergebnis sekundärer Endosymbiosen (Gilson et al. 1997). Der entscheidende Vorteil der Aufnahme eines Endosymbionten für die vormals heterotrophe Wirtszelle ist der Erwerb der Photoautotrophie. Allerdings lastet auf den Endosymbionten ein enormer Druck zur Reduktion der plastidären Genome (Melkonian 1996). Der eukaryotische Nukleus der „geschluckten“ Alge wurde nach der sekundären Endosymbiose vielfach vollständig eliminiert. Auch das eigentliche Plastidengenom lag wahrscheinlich schon zum Zeitpunkt der sekundären Endosymbiose in stark reduzierter Form vor (Delwiche und Palmer 1997). Bei den komplexen Algen sind zusätzliche Hüllmembranen um den Plastiden (insgesamt 3 oder 4) häufig die einzig verbleibende morphologische Reminiszenz an ihren evolutiven Ursprung durch sekundäre Endosymbiosen (Melkonian et al. 1995). Lediglich die Chlorarachniophyta und Cryptophyta besitzen noch ein extrem reduziertes eukaryotisches Restgenom des Endosymbionten, das Nukleomorph (Douglas 1998). Sie könnten damit als evolutive „connecting links“ im Prozeß der Etablierung komplexer Plastiden gesehen werden (Sitte 1993). Dementsprechend sind sie Schlüsselorganismen für das Studium der Integration sekundärer Endosymbionten und der Entstehung der Algenvielfalt.

In dieser Arbeit wurden erstmals GAPDH cDNA-Sequenzen und Kern-Gene der Chlorarachniophyta (Geitler 1930; Hibbert und Norris 1984) isoliert, sequenziert und analysiert. Von zwei unterschiedlichen cDNA Klonen läßt sich der Eine anhand von Homologievergleichen (Abb. 16) und einer phylogenetischen Analyse (Abb. 19) eindeutig als *GapC* identifizieren. Da in Aminosäureposition 188 ein Prolin vorkommt, das für eine strikte NADH-Kosubstratspezifität des Enzyms verantwortlich ist (Corbier et al. 1990; Clermont et al. 1993), und der Klon kein Transitpeptid besitzt, kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei dieser *GapC* aus *Chlorarachnion* um eine cytosolische GAPDH mit glykolytischer Funktion handelt. Die phylogenetische Analyse (Abb. 19) deutet auf eine schwache Affinität der *GapC* Sequenzen von *Chlorarachnion* und *Cyanophora* hin, allerdings lagen von den Chlorarachniophyta und Glaukophyta jeweils nur Einzelsequenzen vor, aus den übrigen Abteilungen standen jeweils zwei *GapC* Sequenzen zur Verfügung. Unter solchen Bedingungen ist auch bei unabhängigen Einzelsequenzen häufig die Bildung eines gemeinsamen Astes zu beobachten (Felsenstein

1978), dementsprechend ist die Affinität von *Chlorarachnion* und *Cyanophora* wahrscheinlich ein Baumbildungsartefakt. Eine umfangreichere phylogenetische Analyse von *GapC* Sequenzen (Baum ist nicht gezeigt) bestätigt, daß die *GapC* von *Chlorarachnion* keine signifikante Verwandtschaft zu bekannten *GapC* Sequenzen besitzt. 18S-rDNA Analysen belegen eine nahe Verwandtschaft der Chlorarachniophyta mit filösen Amöben (McFadden et al. 1994; Bhattacharya et al. 1995; Ishida et al. 1999). Aufgrund der evolutiven Herkunft der Wirtszelle wird man wahrscheinlich innerhalb der filösen Amöben eine zur *GapC* aus *Chlorarachnion* näher verwandte Sequenz finden.

Der hohe Konservierungsgrad ihrer Positionen macht Introns zu ausgezeichneten phylogenetischen Markern (z.B. Qiu et al. 1998). Bei der Untersuchung der Genstruktur des *GapC* Gens von *Chlorarachnion* wurden drei kleine Introns gefunden (Abb. 21). Intron II (160-0) kommt auch in *GapC* Sequenzen von Landpflanzen und in der *GapA* von *Chlamydomonas reinhardtii* vor (Kersanach et al. 1994). Das Vorhandensein dieser Intronposition in den *GapC* Genen von Landpflanzen und Chlorarachniophyta spricht dafür, daß dieses Intron bereits zum Zeitpunkt der Radiation der eukaryotischen „Crown-Groups“ existierte. Da die *GapA/GapC*-Genduplikation wahrscheinlich vor einer Aufspaltung der Organismen in distinkte Linien (Primärreiche) erfolgte (Cerff 1995), ist die Konservierung von Introns über die *GapA/GapC*-Grenze hinweg ein Argument für die „Intron-Early-Hypothese“ (Long et al. 1995). Intron I (86-2) liegt nur drei Nukleotide neben einem Intron aus der plastidären *GapA* (85-2) (Cerff 1995). Dennoch sind die Positionen von Intron I (86-2) und Intron III (254-0) innerhalb der bisher untersuchten GAPDH-Gene einzigartig. Aufgrund dessen ist zur genaueren Klärung der Verwandtschaftsbeziehungen von Chlorarachniophyta und Amöben neben phylogenetischen Untersuchungen auch eine vergleichende Analyse der *GapC*-Genstruktur ein vielversprechender Ansatz. Dies gilt insbesondere, da phylogenetische Analysen auf einen paraphyletischen Ursprung filöser und loböser Amöben hindeuten (Bhattacharya et al. 1995).

Das zweite Gen aus *Chlorarachnion*, die *GapX*, stellt unter den GAPDH Sequenzen eine absolute Besonderheit dar, da sie sich keiner bekannten eukaryotischen GAPDH-Linie zuordnen läßt (Abb. 20). Alle bisher untersuchten Eukaryoten der verschiedensten Abteilungen inklusive der Tiere, Pilze, Grünalgen und Landpflanzen, Rotalgen, Glaukophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Heterokontophyta, Euglenophyta und Trypanosomen besitzen ausschließlich *GapA* Sequenzen cyanobakteriellen oder *GapC* Sequenzen proteobakteriellen Ursprungs (Cerff 1995;

Liaud et al. 1997; Fagan et al. 1998; Liaud et al. unveröffentlicht). Als einzige Ausnahme besitzen die amitochondrialen Parabasalia (z.B. *Trichomonas vaginalis*) eine weitere GAPDH unbekannter Herkunft (Markos et al. 1993; Viscogliosi und Müller 1998).

Eine weitere Kuriosität der *GapX* sind multiple GA-Dinukleotidwiederholungen unterschiedlicher Länge im 5'-nichtkodierenden Bereich der cDNA (Abb. 17). Diese Wiederholungen werden auch im 5'-Bereich anderer cDNA-Klone entdeckt. Zwei unabhängige cDNA-Klone unterscheiden sich ausschließlich durch das Fehlen von 9 Nukleotiden direkt nach den GA-Wiederholungen (Abb. 17 C). Möglicherweise werden diese „Repeats“ posttranskriptionell angefügt, um die mRNA vor Degradierung zu schützen.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz der *GapX* legt nahe, daß dieses Protein eine 89 Aminosäuren lange Präsequenz mit zweigeteiltem Aufbau besitzt (Abb. 17 D), die den Transport des Proteins durch die vier Membranen in den komplexen Plastiden ermöglicht (Pancic und Strotmann 1993; Liaud et al. 1997; Lang et al. 1998). Alle bekannten plastidären GAPDH-Enzyme des Calvin Zyklus zeigen eine NADH/NADPH-Kosubstratspezifität. Eine diagnostische Aminosäure dafür ist die Alignmentposition 188, ein Prolin (188) wird in allen cytosolischen GapC Enzymen gefunden (Abb. 18) und ist für eine strikte NADH-Spezifität verantwortlich (Corbier et al. 1990; Clermont et al. 1993). Plastidäre GapA Enzyme weisen dagegen in Position 188 eine Deletion auf. Die ebenfalls plastidären GapC-I Enzyme von *Pyrenomonas* (Cryptophyta) und *Gonyaulax* (Dinophyta) sind zwar cytosolischer Herkunft, das Prolin in Position 188 wurde hier aber durch ein Serin bzw. Alanin ersetzt (Abb. 18). Der Wechsel der Kosubstratspezifität konnte experimentell durch eine Substitution Pro188 → Ser188 bei *Bacillus stearothermophilus* bestätigt werden (Didierjean et al. 1997). Die *GapX* von *Chlorarachnion* weist, wie die *GapA* Sequenzen, in Position 188 eine Deletion auf (Abb. 18), deshalb kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei der *GapX* um ein Enzym handelt, das NADP umsetzen kann. Die Abwesenheit von Pro 188 und die Anwesenheit einer Transitpeptid-ähnlichen Präsequenz sind deutliche Indizien für eine Calvin Zyklus spezifische Funktion der *GapX*.

Die evolutive Herkunft der *GapX* wurde durch eine phylogenetische Analyse bestimmt, die die ganze Diversität prokaryotischer und eukaryotischer GAPDH-Sequenzen umfaßt (Abb. 20). Bei Datenbankrecherchen in dem Totalsequenzierungsprojekten von *Pseudomonas aeruginosa* wurden drei GAPDH Sequenzen gefunden. Eine der Sequenzen bildet zusammen mit der *GapX* von *Chlorarachnion* neben den *GapA* und *GapC* Ästen (Martin et al. 1993) eine dritte unab-

hängige Linie eukaryotischer GAPDH-Gene, die möglicherweise eubakteriellen Ursprungs ist (Abb. 20; gelb unterlegt). Aufgrund der xenologen Herkunft erhielt dieses GAPDH-Gen der Chlorarachniophyta die Bezeichnung *GapX*. Die spezifische Verwandtschaft der beiden *GapX*-Sequenzen wird durch einen Bootstrapwert von 100% signifikant unterstützt. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der prokaryotischen und eukaryotischen *GapX* von *Pseudomonas* und *Chlorarachnion* zeigen mit 59 % Identität einen hohen Konservierungsgrad (Abb. 16).

Da der phylogenetische Baum lediglich die Verwandtschaft der analysierten Sequenzen widerspiegelt (Lewin 1998), bleibt die Frage offen ob der laterale Gentransfer der *GapX* vom Prokaryoten zum Eukaryoten oder *vice versa* verlief? Folgende Argumente sprechen gegen einen Transfer von Eukaryoten zu Prokaryoten. Die Hauptdiversität an GAPDH Sequenzen beschränkt sich auf die Prokaryoten (Abb. 20), in Eukaryoten findet man nur einen Bruchteil an Sequenzen. Außerdem ist kein plausibler Mechanismus bekannt, der einen Gentransfer von Eukaryoten zu Prokaryoten erklärt. Dahingegen stellen plastidäre und mitochondriale Endosymbiosen gut dokumentierte Mechanismen für den lateralen Gentransfer von Prokaryoten zu Eukaryoten dar. So läßt sich der cyanobakterielle und proteobakterielle Ursprung der eukaryotischen *GapA* und *GapC* Gene belegen. Wenn der Transfer von Eukaryoten zu Prokaryoten erfolgt wäre, hätte entweder die eukaryotische Wirtszelle (Sitte 1993) oder die aufgenommene Grünalge (McFadden et al. 1995) zum Zeitpunkt der sekundären Endosymbiose eine *GapX* besitzen müssen. Das GAPDH-System der Grünalgen ist sehr gut dokumentiert (Petersen 1995; diese Arbeit), die bisher untersuchten Chlorophyta besitzen ausschließlich *GapA* und *GapC* Sequenzen, und auch die Amöben benötigen wahrscheinlich lediglich glykolytische *GapC* Sequenzen. Nach *William von Occam* (1284-1347), „*Pluralitas non est ponenda sine neccesitate*“, ist von mehreren schlüssigen Hypothesen diejenige am wahrscheinlichsten, die mit den wenigsten Zusatzannahmen auskommt („*Occams razor*“). Da ein Szenario des Gentransfers der *GapX* von Eukaryoten zu Prokaryoten mit einer solchen Vielzahl unwahrscheinlicher Zusatzannahmen verbunden ist, kann man mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit von einem Gentransfer eines eubakteriellen Vorfahren der Pseudomonaden zu einem Vorfahren von *Chlorarachnion* ausgehen.

Die eigentliche Frage betrifft das Wann und Wie des *GapX* Gentransfers. Einen ersten Hinweis liefern die fehlenden Introns im *GapX* Gen von *Chlorarachnion* (Abb. 21). Sofern in der *GapX* des *Pseudomonas*-Vorfahren jemals Introns vorhanden waren, so erfolgte der Gentransfer erst relativ spät nach vollständigem Verlust dieser Introns (Kersanach et al. 1994; Logsdon et al.

1998). Wenn das Gen durch die mitochondriale Endosymbiose in den Eukaryoten gelangt wäre, hätten alle eukaryotischen Linien, bis auf die Chlorarachniophyta, die *GapX* parallel verlieren müssen. Eine Hypothese zur Evolution komplexer Plastiden besagt, daß die Wirtszelle vor einer sekundären Endosymbiose bereits einen primären Endosymbionten besessen hat (Häuber et al. 1994). Demnach hätte der primäre Endosymbiont seine Gene in den Nukleus der Wirtszelle übertragen können und er wäre nach der sekundären Endosymbiose wieder verloren gegangen. Für die Passage der Proteine durch die beiden äußeren Plastidenmembranen mußte ein Transportsystem entwickelt werden. Nach der obigen Hypothese bräuchten die plastidären Proteine dann nur noch eine zusätzliche kurze Präsequenz zu erwerben, um durch alle vier Membranen des komplexen Plastiden geschleust zu werden (Lang et al. 1998). Eine solche kryptische Endosymbiose eines primären Endosymbionten (Henze et al. 1995) könnte eine mögliche Erklärung für die Präsenz der *GapX* in *Chlorarachnion* liefern. Hiernach hätte die filöse Amöbe als Wirtszelle bereits einen Vorfahren von *Pseudomonas* als primären Endosymbionten aufgenommen, dieser wäre dann nach der sekundären Endosymbiose mit einer Grünalge wieder verloren gegangen. Dieses Szenario ist allerdings sehr spekulativ, zum einen sind keine Amöben bekannt die Pseudomonaden als Endosymbionten beherbergen, und zum anderen ist die *GapX* das bisher einzig bekannte Gen der Chlorarachniophyta, das aus einem *Pseudomonas*-Vorfahren stammt. Fest steht nur, daß es irgend eine Art eines lateralen Gentransfers eines *Pseudomonas*-Vorfahren zu *Chlorarachnion* gegeben haben muß. Möglicherweise haben auch Eubakterien, die in unmittelbarer Nähe der Amöben lebten, diesen als Nahrung gedient. DNA dieser Prokaryoten inklusive der *GapX* könnte dann durch horizontalen Gentransfer in das Amöbengenom integriert worden sein („*You are what you eat*“; Doolittle 1998). Es sind verschiedene Möglichkeiten horizontalen Gentransfers von Prokaryoten zu Eukaryoten bekannt, sehr gut dokumentiert ist die natürlich vorkommende Interaktion zwischen Agrobakterien und Pflanzen (Buchanan-Wollaston et al. 1987). Darüber hinaus konnte der Gentransfer von Agrobakterien auf Hefen (Heinemann und Sprague 1989; Bundock et al. 1995) und von humanpathogenen Bakterien auf menschliche Zelllinien (Courvalin et al. 1998) experimentell nachgewiesen werden. Neben Endosymbiosen ermöglichen diese Mechanismen einen direkten lateralen Gentransfer (Syvanen 1994) und es ist sehr wahrscheinlich, daß wir erst die Spitze des Eisberges sehen. Nach *Richard Dawkins* sind wir [die Menschen] nichts als „*gigantische Kolonien symbiotischer Gene*“ (Dawkins 1994).

Vergleicht man den Ursprung der photosynthetischen GAPDH in komplexen Algen so gibt es mehrere Möglichkeiten für den Erwerb. Prinzipiell konnte der Gentransfer von Eubakterien zu Eukaryoten vor oder nach der sekundären Endosymbiose erfolgen. Wenn der Gentransfer vor der sekundären Endosymbiose stattfand, so kommt das Gen der komplexen Alge aus dem Endosymbionten oder aus der Wirtszelle. Stammt das Gen aus dem Endosymbionten, so muß es nach dem Transfer in den Nukleus der Wirtszelle einen geeigneten Promotor und ein passendes Transitpeptid für den Transport des entsprechenden Enzyms zurück in den Plastiden erwerben (Weeden 1981). *Euglena* ist das bisher einzige Beispiel, wo eine *GapA* aus dem Nukleus des Endosymbionten (Grünalge) in den Nukleus der Wirtszelle transferiert wurde (Henze et al. 1995). Im Fall der Cryptophyta, Dinophyta und Heterokontophyta hat der komplexe Plastid ein dupliziertes cytosolisches Isoenzym der Wirtszelle (GapC-I) rekrutiert (Liaud et al. 1997; Fagan et al. 1998; Liaud et al. unveröffentlicht). Nach Erwerb eines geeigneten Transitpeptides setzte ein Prozeß evolutiver Biotechnologie ein, der für die passende plastidäre Kosubstratspezifität des GAPDH-Enzyms sorgte.

Für den Gentransfer von Eubakterien zu Eukaryoten nach der sekundären Endosymbiose ist bisher kein Beispiel bekannt.

Die sekundäre Endosymbiose der Chlorarachniophyta erfolgte einer Schätzung zufolge vor etwa 700 Millionen Jahren (Cavalier-Smith 1993). Im Fall von *Chlorarachnion* läßt sich nur sagen, daß die plastidäre *GapX* des Plastiden aus einem Pseudomonaden-ähnlichen Vorfahren stammt. Ob der Gentransfer in endosymbiontischen oder nicht-endosymbiontischen Kontext erfolgte und ob er vor oder nach der sekundären Endosymbiose stattfand muß durch weitere Untersuchungen an den Chlorarachniophyta und Amöben geklärt werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß der Zufall die entscheidende Rolle in der Evolution spielt (Darwin 1859; Kimura 1987). Gibt es mehrere Möglichkeiten ein bestimmtes Ziel zu erreichen, so werden jeweils individuelle Lösungsmöglichkeiten gefunden. *Francois Jakob* hat diesen Zusammenhang folgendermaßen ausgedrückt „*Die Arbeitsweise der Evolution gleicht eher der eines Kesselflickers, als der eines Ingenieurs*“. Diese Einstellung ist typisch für einen Naturwissenschaftler Mitte des 20igsten Jahrhunderts. Da in der Evolution keine wiederkehrenden Planungsstrategien erkennbar sind, werden individuelle Lösungen als Flickwerk betrachtet. *Ingo Rechenbergs* Statement „*Die Evolutionsstrategie verhält sich zur klassisch mathematischen Optimierung wie die Marktwirtschaft zur Planwirtschaft*“ stellt die gleiche Kernaussage in ganz anderem Licht dar. In der Planwirtschaft (→ mathematische Optimierung) gibt es nur ein kurzfristiges Ziel: Planerfüllung, dahingegen zeichnet sich das marktwirtschaftliche System (→ Evolution) durch Flexibilität und langfristiges Streben nach Optimierung aus (Wöhe 1993). Die Gegenüberstellung der Aussagen *Jakobs* und *Rechenbergs* verdeutlicht den Paradigmenwechsel bei der Beurteilung und Bewertung der Evolution, der sich parallel zur Etablierung der Molekularbiologie vollzog.

5. Zusammenfassung

*Jedes Naturgesetz, das sich dem Beobachter offenbart,
läßt auf ein höheres, noch unbekanntes schließen.*

Alexander von Humboldt

Eines der Hauptziele dieser Arbeit war die Untersuchung des GAPDH-Gensystems im Kontext der Landpflanzenentstehung. Dazu wurden auf molekularer Ebene zwei zentrale Genduplikationen des Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Gensystems, der plastidären *GapA* (Calvin Zyklus) und der cytosolischen *GapC* (Glykolyse), analysiert. Beide Ereignisse korrelieren zeitlich mit dem Übergang vom Wasser- zum Landleben. Die bei der Duplikation entstandenen Gene, *GapB* und *GapCp*, ermöglichen eine komplexere Regulation des Primärstoffwechsels. Zusammen mit weiteren Funktionsgewinnen war dies wahrscheinlich eine wichtige Voraussetzung für die Eroberung des Landes. Für die Analysen wurden aus *Chara vulgaris* (Grünalge), *Marchantia polymorpha* (Lebermoos) und *Capsicum annuum* (Paprika) cDNA-Banken erstellt und daraus die GAPDH-Sequenzen isoliert. Eine Reihe weiterer Sequenzen aus Grünalgen und Moosen wurde mittels RT-PCR erhalten. Der phylogenetische Baum zeigt eindeutig, daß die *GapA/B*-Genduplikation in einem gemeinsamen Vorfahren aller Charophyceae und Landpflanzen erfolgte. Damit ist das singuläre Ereignis der *GapA/B*-Genduplikation der erste molekulare Marker, der eindeutig belegt, daß alle Charophyceae und Landpflanzen eine monophyletische Gruppe zum Ausschluß der restlichen Grünalgen bilden. Die phylogenetischen Analysen der *GapC* und *GapCp* Sequenzen legen darüber hinaus nahe, daß sich die Landpflanzen aus einer *Coleochaete*-artigen Grünalge entwickelten.

Die *GapCp* entstammt einer Genduplikation der cytosolischen *GapC*, das Protein wird, wie auch die *GapA* und *GapB*, mittels eines Transitpeptides in den Plastiden transportiert. Kürzlich wurden *GapCp* Gene in *Pinus* (Gymnospermae) und *Marsilea* (Pteridophyta) gefunden. In der vorliegenden Arbeit gelang mit der Klonierung der *GapCp* aus Paprika (*Capsicum annuum*) der erste Nachweis dieses Gens in einer angiospermen Pflanze. Die cDNA aus Paprika wurde zur Überexpression des *GapCp*-Proteins in *E. coli* verwendet. Eine strikte NADH-Spezifität des Enzyms, welche durch Sequenzsignaturen (Fehlen von Prolin 188) nahegelegt wird, konnte so

experimentell bestätigt werden. Zur Analyse der Struktur des *GapCp* Gens wurde eine genomische Bank aus Paprika erstellt. Das *GapCp* Gen besitzt 13 Introns, die 10 Intronpositionen der reifen Untereinheit sind seit der *GapC/Cp*-Genduplikation, also seit über 500 Millionen Jahren, absolut konserviert. Intronvergleiche zwischen *GapC* und *GapCp* Genen legen nahe, daß das Transitpeptid der *GapCp* nach der Genduplikation mittels „Exon shuffling“ rekrutiert wurde. Paprika hat sich auch für physiologische Untersuchungen als prädestiniertes Modellsystem erwiesen. Die vorliegenden Expressionsstudien zeigen, daß die *GapCp* ausschließlich in heterotrophen Geweben wie Wurzeln und Chromoplasten exprimiert wird. Erst die Präsenz der *GapCp* in Landpflanzen ermöglicht eine plastidäre Glykolyse, aufgrund der spezifischen Expression im Dunkelmetabolismus ist die *GapCp* ein Markerenzym dieses Stoffwechselweges. Der Nachweis von *GapCp* Genen in allen großen Abteilungen der Landpflanzen unterstreicht die Bedeutung der Glykolyse in den Plastiden.

Die Evolution der terrestrischen Ökosysteme geht auf die Eroberung des Landes durch die Grünalgen vor 500 Millionen Jahren zurück. Neben dem Ursprung der Landpflanzen sind die Grünalgen auch Ausgangspunkt für weitere evolutive Entwicklungen. Die Chloroplasten der Chlorarachniophyta und Euglenophyta entstammen einer sekundären Endosymbiose mit einer Grünalge. In dieser Arbeit wurde erstmals das GAPDH-System der Chlorarachniophyta (*Chlorarachnion* CCMP621) untersucht und es konnte die cytosolische sowie die plastidäre GAPDH-Sequenz kloniert werden. Alle bisher untersuchten photosynthetischen Eukaryoten besitzen ausschließlich *GapA* und/oder *GapC* Gene. Mit der plastidären *GapX* aus *Chlorarachnion* wurde ein völlig neuer eukaryotischer GAPDH-Typ entdeckt. Durch Datenbankrecherchen konnte eine mit der *GapX* aus *Chlorarachnion* spezifisch verwandte Sequenz aus *Pseudomonas aeruginosa* identifiziert werden. Phylogenetische Analysen belegen eindeutig einen gemeinsamen Ursprung dieser Sequenzen. Vermutlich haben die Chlorarachniophyta die plastidäre *GapX* durch einen lateralen Gentransfer aus einem Vorfahren der Pseudomonaden rekrutiert. In anderen Algen mit komplexen Plastiden (sekundäre Endosymbiose) wurde entweder das Gen der plastidären GAPDH in den Nukleus transferiert (*GapA*: *Euglena*) oder die Funktion durch ein dupliziertes cytosolisches Isoenzym ersetzt (*GapC-I*: Cryptophyta, Heterokontophyta, Dinophyta). Die Präsenz der *GapX* in *Chlorarachnion* verdeutlicht, daß die Evolution nach sekundären Endosymbiosen jeweils individuelle Wege beschreitet, um die plastidären Genfunktionen sicherzustellen.

6. Literaturverzeichnis

Es ist unklug zu behaupten, die Evolution habe dies nicht tun können oder jenes tun müssen, außer im allgemeinsten Sinne. Der Biologe sollte grundsätzlich von der Regel ausgehen, daß die Evolution sehr viel klüger ist als er.

Francis Crick

- Akhmanova, A.**, Voncken, F., van Alen, T., van Hoek, A., Boxma, B., Vogels, G., Veenhuis, M., and Hackstein, J. H. (1998). A hydrogenosome with a genome. *Nature* 396, 527-8.
- Ausubel, F. M.**, Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1987). Current protocols in molecular biology, Volume 1-3, V. B. Chanda, ed.
- Avery, O. T.**, MacLeod, C. M., and McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* 98, 451-460.
- Baalmann, E.**, Backhausen, J. E., Kitzmann, C., and Scheibe, R. (1994). Regulation of NADP-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase activity in spinach chloroplasts. *Botanica Acta* 107, 313-320.
- Baalmann, E.**, Scheibe, R., Cerff, R., and Martin, W. (1996). Functional studies of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase subunits A and B expressed in *Escherichia coli*: formation of highly active A4 and B4 homotetramers and evidence that aggregation of the B4 complex is mediated by the B subunit carboxy terminus. *Plant Mol Biol* 32, 505-13.
- Backhausen, J. E.**, Vetter, S., Baalmann, E., Kitzmann, C., and Scheibe, R. (1998). NAD-dependent malate dehydrogenase and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoenzyme play an important role in dark metabolism of various plastid types. *Planta-Berlin*. 205, 359-366.
- Baker, A.**, and Schatz, G. (1987). Sequences from a prokaryotic genome or the mouse dihydrofolate reductase gene can restore the import of a truncated precursor protein into yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3117-21.
- Bell, S. D.**, and Jackson, S. P. (1998). Transcription and translation in Archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends in Microbiology* 6, 222-227.
- Bennett, M. D.**, and Leitch, I. J. (1995). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany* 76, 113-176.

- Bennoun, P.** (1982). Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4352-4356.
- Berkemeyer, M.,** Scheibe, R., and Ocheretina, O. (1998). A novel, non-redox-regulated NAD-dependent malate dehydrogenase from chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* L. *J Biol Chem* 273, 27927-33.
- Bhattacharya, D.,** Friedl, T., and Damberger, S. (1996). Nuclear-encoded rDNA group I introns: origin and phylogenetic relationships of insertion site lineages in the green algae. *Mol Biol Evol* 13, 978-89.
- Bhattacharya, D.,** Helmchen, T., and Melkonian, M. (1995). Molecular evolutionary analyses of nuclear-encoded small subunit ribosomal RNA identify an independent rhizopod lineage containing the Euglyphina and the Chlorarachniophyta. *J Eukaryot Microbiol* 42, 65-9.
- Bhattacharya, D.,** and Medlin, L. (1995). The phylogeny of plastids: a review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. *Journal of Phycology* 31, 489-498.
- Bhattacharya, D.,** and Schmidt, H. A. (1997). Division Glaucocystophyta. In *Origins of algae and their plastids*, D. Bhattacharya, ed. (Wien: Springer-Verlag), pp. 139-148.
- Bhattacharya, D.,** Surek, B., Rusing, M., Damberger, S., and Melkonian, M. (1994). Group I introns are inherited through common ancestry in the nuclear-encoded rRNA of Zygnematales (Charophyceae). *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9916-20.
- Bopp, M.,** and Capesius, I. (1996). New aspects of bryophyte taxonomy provided by a molecular approach. *Botanica Acta* 109, 368-372.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72, 248-254.
- Bremer, K.** (1985). Summary of green plant phylogeny and classification. *Cladistics* 1, 369-385.
- Brinkmann, H.,** Cerff, R., Salomon, M., and Soll, J. (1989). Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding the cytosolic precursors of subunits GapA and GapB of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pea and spinach. *Plant Mol Biol* 13, 81-94.
- Brown, J. R.,** and Doolittle, W. F. (1997). Archaea and the Prokaryote-to-Eukaryote Transition. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, 456-502.
- Buchanan-Wollaston, V.,** Passiatore, J. E., and Cannon, F. (1987). *Nature* 328, 172-175. The mob and oriT mobilization functions of a bacterial plasmid promote its transfer to plants. *Nature* 328, 172-175.

- Bui, E. T.,** Bradley, P. J., and Johnson, P. J. (1996). A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9651-6.
- Bundock, P.,** den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A., and Hooykaas, P. J. J. (1995). Trans-kingdom T-DNA transfer *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* 14, 3206-3214.
- Burrows, P. A.,** Sazanov, L. A., Svab, Z., Maliga, P., and Nixon, P. J. (1998). Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *EMBO Journal* 17, 868-76.
- Calvin, W. H.** (1997). Der Strom, der bergauf fließt. Eine Reise durch die Evolution. (München: Deutscher Taschenbuch Verlag).
- Camara, B.,** Hugueney, P., Bouvier, F., Kuntz, M., and Moneger, R. (1995). Biochemistry and molecular biology of chromoplast development. *Int Rev Cytol* 163, 175-247.
- Carol, P.,** Stevenson, D., Bisanz, C., Breitenbach, J., Sandmann, G., Mache, R., Coupland, G., and Kuntz, M. (1999). Mutations in the *Arabidopsis* gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *The Plant Cell* 11, 57-68.
- Cavalier-Smith, T.** (1981). Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems* 14, 461-81.
- Cavalier-Smith, T.** (1987). The origin of eukaryote and archaeobacterial cells. *Annals of the New York Academy of Science* 503, 17-54.
- Cavalier-Smith, T.** (1993). The origin, losses and gains of chloroplasts. In *Origins of plastids*, R. A. Lewin, ed. (New York, pp. 291-348.
- Cavalier-Smith, T.,** Couch, J. A., Thorsteinsen, K. E., Gilson, P. R., Deane, J. A., Hill, D. R., and McFadden, G. I. (1996). Cryptomonad nuclear and nucleomorph 18S rRNA phylogeny. *European Journal of Phycology* 31d, 315-328.
- Cerff, R.** (1978; a). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP) from *Sinapis alba* L.: NAD(P)-induced conformation changes of the enzyme. *Eur J Biochem* 82, 45-53.
- Cerff, R.** (1978; b). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP) from *Sinapis alba* L.: Reversible association of the enzyme with a protein factor as controlled by pyridine nucleotides *in vitro*. *Plant Physiol* 61, 369-72.
- Cerff, R.** (1979). Quaternary structure of higher plant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *Eur J Biochem* 94, 243-7.
- Cerff, R.,** and Chambers, S. E. (1979). Subunit structure of higher plant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases (EC 1.2.1.12 and EC 1.2.1.13). *J Biol Chem* 254, 6094-8.

- Cerff, R.** (1982). Evolutionary divergence of chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from angiosperms. *Eur J Biochem* 126, 513-5.
- Cerff, R.,** and Kloppstech, K. (1982). Structural diversity and differential light control of mRNAs coding for angiosperm glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7624-7628.
- Cerff, R.** (1995). The chimeric nature of nuclear genomes and the antiquity of introns as demonstrated by the GAPDH gene system. In Proceedings of the 20th Taniguchi International Symposium "Tracing Biological Evolution in Protein and Gene Structures", M. G. a. P. Schimmel, ed. (Nagoya, Japan: Elsevier Science, Amsterdam), pp. 205-227.
- Clark, C. G.,** and Roger, A. J. (1995). Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6518-21.
- Clermont, S.,** Corbier, C., Mely, Y., Gerard, D., Wonacott, A., and Branlant, G. (1993). Determinants of coenzyme specificity in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: role of the acidic residue in the fingerprint region of the nucleotide binding fold. *Biochemistry* 32, 10178-10184.
- Corbier, C.,** Clermont, S., Billard, P., Skarzynski, T., Branlant, C., Wonacott, A., and Branlant, G. (1990). Probing the coenzyme specificity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 29, 7101-7106.
- Courvalin, P.,** Goussard, S., and Grillot-Courvalin, C. (1998). Gene transfer from bacteria to mammalian cells. In *Horizontal gene transfer*, M. Syvanen and C. I. Kado, eds. (London: Chapman & Hall), pp. 107-117.
- Covello, P. S.,** and Gray, M. W. (1992). Silent mitochondrial and active nuclear genes for subunit 2 of cytochrome c oxidase (cox2) in soybean: evidence for RNA-mediated gene transfer. *EMBO Journal* 11, 3815-20.
- Crick, F. H.** (1979). Thinking about the brain. *Sci Am* 241, 219-32.
- Darwin, C.** (1874). *The descent of man and selection in relation to sex*, 2nd Edition.
- Darwin, C.** (1859). *On the origin of species by means of natural selection*.
- Dawkins, R.** (1994). *Das egoistische Gen* (Heidelberg: Spektrum akademischer Verlag).
- deDuve, C.** (1994). *Ursprung des Lebens
Präbiotische Evolution und Entstehung der Zelle* (Heidelberg und Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH).
- Delwiche, C. F.,** and Palmer, J. D. (1997). The origin of plastids and their spread via secondary symbiosis. In *Origin of algae and their plastids*, D. Bhattacharya, ed. (Wien: Springer Verlag).

- Dennis, D. T.**, and Miernyk, J. A. (1982). Compartmentation of non-photosynthetic carbohydrate metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 27-50.
- Didierjean, C.**, Rahuel-Clermont, S., Vitoux, B., Dideberg, O., Branlant, G., and Aubry, A. (1997). A crystallographic comparison between mutated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *Bacillus stearothermophilus* complexed with either NAD⁺ or NADP⁺. *J Mol Biol* 268, 739-59.
- Doolittle, W. F.** (1998). You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. *Trends in Genetics* 14, 307-311.
- Douglas, S. E.** (1998). Plastid evolution: origins, diversity, trends. *Curr Opin Genet Dev* 8, 655-61.
- Douglas, S. E.**, Murphy, C. A., Spencer, D. F., and Gray, M. W. (1991). Cryptomonad algae are evolutionary chimaeras of two phylogenetically distinct unicellular eukaryotes. *Nature* 350, 148-51.
- Edwards, D.**, Duckett, J. G., and Richardson, J. B. (1995). Hepatic characters in the earliest land plants. *Nature* 374, 635-636.
- Entwistle, G.**, and Rees, T. A. (1988). Enzymic capacities of amyloplasts from wheat (*Triticum aestivum*) endosperm. *Biochem J* 255, 391-6.
- Fagan, T.**, Woodland Hastings, J., and Morse, D. (1998). The phylogeny of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase indicates lateral gene transfer from cryptomonads to dinoflagellates. *J Mol Evol* 47, 633-9.
- Felsenstein, J.** (1978). Cases in which parsimony and compatibility methods will be positively misleading. *System. Zool.* 27, 401-410.
- Figge, R. M.**, Schubert, M., Brinkmann, H., and Cerff, R. (1999). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene diversity in eubacteria and eukaryotes: Evidence for intra- and inter-kingdom gene transfer. *Molecular Biology and Evolution* 16, 429-440.
- Fischer, K.**, Kammerer, B., Gutensohn, M., Arbing, B., Weber, A., Hausler, R. E., and Flügge, U. I. (1997). A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter. *Plant Cell* 9, 453-62.
- Flügge, U. I.**, Fischer, K., Gross, A., Sebald, W., Lottspeich, F., and Eckerskorn, C. (1989). The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the in vitro synthesized precursor protein into chloroplasts. *EMBO Journal* 8, 39-46.
- Friedl, T.** (1997). The evolution of the green algae. In *Origins of algae and their plastids*, D. Bhattacharya, ed. (Wien: Springer-Verlag), pp. 87-101.

- Geitler, L.** (1930). Ein grünes Filarplasmodium und andere neue Protisten. *Archiv für Protistenkunde* 69, 615-636.
- Germot, A., Philippe, H., and Le Guyader, H.** (1997). Evidence for loss of mitochondria in Microsporidia from a mitochondrial- type HSP70 in *Nosema locustae*. *Mol Biochem Parasitol* 87, 159-68.
- Gibbs, S.** (1978). The chloroplasts of *Euglena* may have evolved from symbiotic green algae. *Canadian Journal of Botany* 56, 2883-2889.
- Gilbert, W.** (1978). Why genes in pieces? *Nature* 271, 501.
- Gilson, P. R., Maier, U. G., and McFadden, G. I.** (1997). Size isn't everything: lessons in genetic miniaturisation from nucleomorphs. *Curr Opin Genet Dev* 7, 800-6.
- Gilson, P. R., and McFadden, G. I.** (1997). Good things in small packages: the tiny genomes of chlorarachniophyte endosymbionts. *Bioessays* 19, 167-73.
- Gilson, P. R., and McFadden, G. I.** (1996). The miniaturized nuclear genome of eukaryotic endosymbiont contains genes that overlap, genes that are cotranscribed, and the smallest known spliceosomal introns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7737-42.
- Gogarten, J. P., Kibak, H., Dittrich, P., Taiz, L., Bowman, E. J., Bowman, B. J., Manolson, M. F., Poole, R. J., Date, T., Oshima, T., and et al.** (1989). Evolution of the vacuolar H⁺-ATPase: implications for the origin of eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6661-5.
- Grabow, K., and Wimmer, W.** (1998). Die Graue Armleuchteralge *Chara canescens* Desvaux et Loeseleur 1810 in Niedersachsen. *Braunschweiger naturkundliche Schriften* 5, 759-762.
- Graham, L. E.** (1984). *Coleochaete* and the origin of land plants. *American Journal of Botany* 71, 603-608.
- Graham, L. E.** (1993). *Origin of land plants* (New York: J. Wiley & Sons).
- Graham, L. E., Delwiche, C. F., and Mishler, B. D.** (1991). Phylogenetic connections between the 'green algae' and the 'bryophytes'. *Advances in Bryology* 4, 213-244.
- Gray, J.** (1993). Major Paleozoic land plant evolutionary bio-events. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 104, 153-169.
- Gray, M. W.** (1992). The endosymbiont theory/hypothesis revisited. In *International Review of Cytology*, D. R. Wolstenholme and K. W. Jeon, eds.
- Grohmann, L., Brennicke, A., and Schuster, W.** (1992). The mitochondrial gene encoding ribosomal protein S12 has been translocated to the nuclear genome in *Oenothera*. *Nucleic Acids Res* 20, 5641-6.

- Habenicht, A.**, Hellman, U., and Cerff, R. (1994). Non-phosphorylating GAPDH of higher plants is a member of the aldehyde dehydrogenase superfamily with no sequence homology to phosphorylating GAPDH. *J Mol Biol* 237, 165-71.
- Hahn, D.**, Kaltenbach, C., and Kuck, U. (1998). The Calvin cycle enzyme sedoheptulose-1,7-bisphosphatase is encoded by a light-regulated gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* 36, 929-34.
- Hallick, R. B.**, Hong, L., Drager, R. G., Favreau, M. R., Monfort, A., Orsat, B., Spielmann, A., and Stutz, E. (1993). Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. *Nucleic Acids Res* 21, 3537-44.
- Hashimoto, T.**, Sanchez, L. B., Shirakura, T., Müller, M., and Hasegawa, M. (1998). Secondary absence of mitochondria in *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* revealed by valyl-tRNA synthetase phylogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6860-5.
- Häuber, M. M.**, Müller, S. B., Speth, V., and Maier, U. G. (1994). How to evolve a complex plastid?-A hypothesis. *Botanica Acta* 107, 383-386.
- Heinemann, J. A.**, and Sprague, G. F. J. (1989). Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacterial and yeast. *Nature* 340, 205209.
- Henze, K.**, Badr, A., Wetter, M., Cerff, R., and Martin, W. (1995). A nuclear gene of eubacterial origin in *Euglena gracilis* reflects cryptic endosymbioses during protist evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9122-6.
- Hibbert, D. J.**, and Norris, R. E. (1984). Cytology and ultrastructure of *Chlorarachnion reptans* (Chlorarachniophyta Divisio nova, Chlorarachniophyceae Classis nova). *Journal of Phycology* 20, 310-330.
- Hiesel, R.**, Combettes, B., and Brennicke, A. (1994). Evidence for RNA editing in mitochondria of all major groups of land plants except the Bryophyta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 629-33.
- Hill, L. M.**, and Smith, A. M. (1991). Evidence that glucose-6-phosphate is imported as the substrate for starch synthesis by the plastids of developing pea embryos. *Planta* 185, 91-96.
- Hirt, R. P.**, Healy, B., Vossbrinck, C. R., Canning, E. U., and Embley, T. M. (1997). A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Curr Biol* 7, 995-8.
- Huguency, P.**, Bouvier, F., Badillo, A., Quennemet, J., d'Harlingue, A., and Camara, B. (1996). Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits. *Plant Physiol* 111, 619-26.

- Ishida, K.**, Cao, Y., Hasegawa, M., Okada, N., and Hara, Y. (1997). The origin of chlorarachniophyte plastids, as inferred from phylogenetic comparisons of amino acid sequences of EF-Tu. *J Mol Evol* 45, 682-7.
- Ishida, K.**, Green, B. R., and Cavalier-Smith, T. (1999). Diversification of a chimaeric algal group, the chlorarachniophytes: phylogeny of nuclear and nucleomorph small-subunit rRNA genes [In Process Citation]. *Mol Biol Evol* 16, 321-31.
- Iwabe, N.**, Kuma, K., Hasegawa, M., Osawa, S., and Miyata, T. (1989). Evolutionary relationship of archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9355-9.
- Jalouzot, R.**, Pou, M. A., Aubry, C., and Laval-Martin, D. (1994). The NAD kinase: a phosphoryltransferase displaying an oxido-reductase activity - an electrophoretic study. *Arch Biochem Biophys* 309, 281-7.
- Journet, E. P.**, and Douce, R. (1985). Enzymic capacities of purified cauliflower (*Brassica oleracea*) bud plastids for lipid synthesis and carbohydrate metabolism. *Plant Physiology* 79, 458-467.
- Kadowaki, K.**, Kubo, N., Ozawa, K., and Hirai, A. (1996). Targeting presequence acquisition after mitochondrial gene transfer to the nucleus occurs by duplication of existing targeting signals. *EMBO Journal* 15, 6652-61.
- Kampfenkel, K.**, Möhlmann, T., Batz, O., Van Montagu, M., Inze, D., and Neuhaus, H. E. (1995). Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a novel putative adenylate translocator of higher plants. *FEBS Lett* 374, 351-5.
- Kelly, G. J.**, and Gibbs, M. (1973). Nonreversible D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase of plant tissue. *Plant Physiology* 52, 111-118.
- Kenrick, P.**, and Crane, P. R. (1997). The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389, 33-39.
- Kersanach, R.**, Brinkmann, H., Liaud, M. F., Zhang, D. X., Martin, W., and Cerff, R. (1994). Five identical intron positions in ancient duplicated genes of eubacterial origin. *Nature* 367, 387-9.
- Kimura, M.** (1987). Die Neutralitätstheorie der molekularen Evolution (Berlin und Hamburg: Paul Parey).
- Koksharova, O.**, Schubert, M., Shestakov, S., Cerff, R. (1998). Genetic and biochemical evidence for distinct key functions of two highly divergent GAPDH genes in catabolic and anabolic carbon flow of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Molecular Biology* 36, 183-194.
- Kowallik, K.** (1994). From endosymbionts to chloroplasts: (evidence for a single prokaryotic/eukaryotic endocytobiosis. *Endocytobiology & Cell Research* 10, 137-149.

- Kranz, H. D.**, Miks, D., Siegler, M. L., Capesius, I., Sensen, C. W., and Huss, V. A. (1995). The origin of land plants: phylogenetic relationships among charophytes, bryophytes, and vascular plants inferred from complete small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *J Mol Evol* 41, 74-84.
- Krings, M.**, Stone, A., Schmitz, R. W., Krainitzki, H., Stoneking, M., and Paabo, S. (1997). Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90, 19-30.
- Lang, M.**, Apt, K. E., and Kroth, P. G. (1998). Protein transport into "complex" diatom plastids utilizes two different targeting signals. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 30973-30978.
- Lange, B. M.**, Wildung, M. R., McCaskill, D., and Croteau, R. (1998). A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2100-4.
- Lewin, R.** (1998). Die molekulare Uhr der Evolution
Gene und Stammbäume (Heidelberg und Berlin: Spektrum Akademischer Verlag).
- Li, D.**, Stevens, F. J., Schiffer, M., and Anderson, L. E. (1994). Mechanism of light modulation: identification of potential redox-sensitive cysteines distal to catalytic site in light-activated chloroplast enzymes. *Biophys J* 67, 29-35.
- Li, W. H.** (1997). In *Molecular Evolution* (Sunderland Massachusetts: Sinauer Associates), Molecular phylogenetics: Man's closest relatives. pp. 149-155.
Roles of Mutation and Selection in Molecular Evolution. pp. 428-432.
- Liaud, M. F.**, Brandt, U., Scherzinger, M., and Cerff, R. (1997). Evolutionary origin of cryptomonad microalgae: two novel chloroplast/cytosol-specific GAPDH genes as potential markers of ancestral endosymbiont and host cell components. *J Mol Evol* 44 Suppl 1, S28-37.
- Liaud, M. F.**, Valentin, C., Brandt, U., Bouget, F. Y., Kloareg, B., and Cerff, R. (1993). The GAPDH gene system of the red alga *Chondrus crispus*: promoter structures, intron/exon organization, genomic complexity and differential expression of genes. *Plant Mol Biol* 23, 981-94.
- Logsdon, J. M. J.**, Stoltzfus, M., and Doolittle, W. F. (1998). Recent cases of spliceosomal intron gain? *Current Biology* 8, 560-563.
- Long, M.**, de Souza, S. J., Rosenberg, C., and Gilbert, W. (1996). Exon shuffling and the origin of the mitochondrial targeting function in plant cytochrome c1 precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7727-31.
- Long, M.**, Rosenberg, C., and Gilbert, W. (1995). Intron phase correlations and the evolution of the intron/exon structure of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 12495-12499.

- Maier, U. G.,** Hofmann, C. J., Eschbach, S., Wolters, J., and Igloi, G. L. (1991). Demonstration of nucleomorph-encoded eukaryotic small subunit ribosomal RNA in cryptomonads. *Mol Gen Genet* 230, 155-60.
- Manhart, J. R.** (1994). Phylogenetic analysis of green plant rbcL sequences. *Mol Phylogenet Evol* 3, 114-27.
- Manhart, J. R.,** and Palmer, J. D. (1990). The gain of two chloroplast tRNA introns marks the green algal ancestors of land plants. *Nature* 345, 268-70.
- Marchant, H. J.,** and Pickett-Heaps, J. D. (1973). Mitosis and cytokinesis in *Coleochaete scutata*. *Journal of Phycology* 13, 255-264.
- Markos, A.,** Miretsky, A., and Müller, M. (1993). A glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with eubacterial features in the amitochondriate eukaryote, *Trichomonas vaginalis*. *J Mol Evol* 37, 631-43.
- Martin, W.,** Brinkmann, H., Savonna, C., and Cerff, R. (1993). Evidence for a chimeric nature of nuclear genomes: eubacterial origin of eukaryotic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8692-6.
- Martin, W.,** and Cerff, R. (1986). Prokaryotic features of a nucleus-encoded enzyme. cDNA sequences for chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from mustard (*Sinapis alba*). *Eur J Biochem* 159, 323-31.
- Martin, W.,** and Herrmann, R. G. (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol* 118, 9-17.
- Martin, W.,** Lydiate, D., Brinkmann, H., Forkmann, G., Saedler, H., and Cerff, R. (1993). Molecular phylogenies in angiosperm evolution. *Mol Biol Evol* 10, 140-62.
- Martin, W.,** and Müller, M. (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392, 37-41.
- Martin, W.,** and Schnarrenberger, C. (1997). The evolution of the Calvin cycle from prokaryotic to eukaryotic chromosomes: a case study of functional redundancy in ancient pathways through endosymbiosis. *Curr Genet* 32, 1-18.
- Martin, W.,** Stoebe, B., Goremykin, V., Hansmann, S., Hasegawa, M., and Kowallik, K. V. (1998). Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* 393, 162-165.
- Mayr, E.** (1998). ...Das ist Biologie... (Heidelberg und Berlin: Spektrum Akademischer Verlag).

- Mayr, E.** (1984). Die Entwicklung der biologischen Gedankenwelt Vielfalt, Evolution und Vererbung (Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer-Verlag).
- McCourt, R. M.** (1995). Green algal phylogeny. *Trends in Ecology & Evolution* 10, 159-163.
- McCourt, R. M.,** Karol, K. G., Guerlesquin, M., and Feist, M. (1996). Phylogeny of extant genera in the family Characeae (Charales, Charophyceae) based on rbcL sequences and morphology. *American Journal of Botany* 83, 125-131.
- McFadden, G. I.** (1993). Second-hand chloroplasts: evolution of cryptomonad algae. *Advances in Botanical Research* 19, 189-230.
- McFadden, G. I.,** Gilson, P. R., Douglas, S. E., Cavalier-Smith, T., Hofmann, C. J., and Maier, U. G. (1997). Bonsai genomics: sequencing the smallest eukaryotic genomes. *Trends Genet* 13, 46-9.
- McFadden, G. I.,** Gilson, P. R., and Hill, D. R. (1994b). *Goniomonas*: rRNA sequences indicate that this phagotrophic flagellate is a close relative of the host component of cryptomonads. *European Journal of Phycology* 29, 29-32.
- McFadden, G. I.,** Gilson, P. R., Hofmann, C. J., Adcock, G. J., and Maier, U. G. (1994a). Evidence that an amoeba acquired a chloroplast by retaining part of an engulfed eukaryotic alga. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3690-4.
- McFadden, G. I.,** Gilson, P. R., and Waller, R. F. (1995). Molecular phylogeny of chlorarachniophytes based on plastid rRNA and rbcL sequences. *Archiv für Protistenkunde* 145, 231-239.
- Melkonian, M.** (1996). Systematics and evolution of the algae: Endocytobiosis and evolution of the major algal lineages. *Progress in Botany* 58, 281-311.
- Melkonian, M.,** Marin, B., and Surek, B. (1995). Phylogeny and evolution of the algae. In *Biodiversity and Evolution*, R. Arai, M. Kato and Y. Doi, eds. (Tokyo: The National Science Museum Foundation), pp. 153-176.
- Mereschkowsky, C.** (1905). Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biologisches Zentralblatt* 25, 593-604.
- Meyer-Gauen, G.,** Herbrand, H., Pahnke, J., Cerff, R., and Martin, W. (1998). Gene structure, expression in *Escherichia coli* and biochemical properties of the NAD⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Pinus sylvestris* chloroplasts. *Gene* 209, 167-74.
- Meyer-Gauen, G.,** Schnarrenberger, C., Cerff, R., and Martin, W. (1994). Molecular characterization of a novel, nuclear-encoded, NAD(+) - dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in plastids of the gymnosperm *Pinus sylvestris* L. *Plant Mol Biol* 26, 1155-66.

- Mishler, B. D.**, and Churchill, S. P. (1985). Transition to a land flora: Phylogenetic relationships of the green algae and bryophytes. *Cladistics* 1, 305-328.
- Mishler, B. D.**, Lewis, L. A., Buchheim, M. A., Renzaglia, K. S., Garbary, D. J., Delwiche, C. F., Zechman, F. W., Kantz, T. S., and Chapman, R. L. (1994). Phylogenetic relationships of the "green algae" and "Bryophytes". *Annals of the Missouri Botanical Garden* 81, 451-483.
- Möhlmann, T.**, Tjaden, J., Schwoppe, C., Winkler, H. H., Kampfenkel, K., and Neuhaus, H. E. (1998). Occurrence of two plastidic ATP/ADP transporters in *Arabidopsis thaliana* L.--molecular characterisation and comparative structural analysis of similar ATP/ADP translocators from plastids and *Rickettsia prowazekii*. *Eur J Biochem* 252, 353-9.
- Müller, M.** (1993). The hydrogenosome. *J. Gen. Microbiol.* 139, 2879-2889.
- Murray, N. E.** (1983). Lambda II. In *Lambda II* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Nugent, J. M.**, and Palmer, J. D. (1991). RNA-mediated transfer of the gene *coxII* from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell* 66, 473-81.
- Pahnke, J.** (1994). Untersuchungen zum Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase-System in Farnen (Felicinae): Diplomarbeit TU Braunschweig
- Pancic, P. G.**, and Strotmann, H. (1993). Structure of the nuclear encoded gamma subunit of CF0CF1 of the diatom *Odontella sinensis* including its prsequence. *FEBS Letters* 29, 61-66.
- Petersen, J.** (1995). Phylogenetische und molekularbiologische Untersuchungen am Gensystem der plastidären Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenasen (GAPDH) aus Grünalgen und Landpflanzen: Diplomarbeit TU Braunschweig
- Plaxton, W. C.** (1996). The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 185-214.
- Pohlmeyer, K.**, Paap, B. K., Soll, J., and Wedel, N. (1996). CP12: a small nuclear-encoded chloroplast protein provides novel insights into higher-plant GAPDH evolution. *Plant Mol Biol* 32, 969-78.
- Prüß, B.**, Meyer, H. E., and Holldorf, A. W. (1993). Characterization of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from the extremely halophilic archaebacterium *Haloarcua vallismortis*. *Arch Microbiol* 160, 5-11.
- Qiu, Y. L.**, Cho, Y., Cox, J. C., and Palmer, J. D. (1998). The gain of three mitochondrial introns identifies liverworts as the earliest land plants. *Nature* 394, 671-4.

- Rapp, J. C.**, and Mullet, J. E. (1991). Chloroplast transcription is required to express the nuclear genes *rbcS* and *cab*. Plastid DNA copy number is regulated independently. *Plant Mol Biol* 17, 813-23.
- Roger, A. J.**, Svard, S. G., Tovar, J., Clark, C. G., Smith, M. W., Gillin, F. D., and Sogin, M. L. (1998). A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 229-34.
- Russell, D. A.**, and Sachs, M. M. (1991). The maize cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family: organ-specific expression and genetic analysis. *Mol Gen Genet* 229, 219-28.
- Sambrook, J.**, Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning-a laboratory manual (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sarich, V. M.** and Wilson, A. C. (1967). Immunological time scale for hominid evolution. *Science* 158, 1200-3
- Sazanov, L. A.**, Burrows, P. A., and Nixon, P. J. (1998). The plastid *ndh* genes code for an NADH-specific dehydrogenase: isolation of a complex I analogue from pea thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1319-24.
- Scagliarini, S.**, Trost, P., Pupillo, P., and Valenti, V. (1993). Light activation and molecular mass changes of NAD(P)-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase of spinach and maize leaves. *Planta* 190, 313-319.
- Schatz, G.**, and Dobberstein, B. (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271, 1519-26.
- Scheibe, R.** (1991). Redox-modulation of chloroplast enzymes. A common principle for individual control. *Plant Physiology* 96, 1-3.
- Schlösser, U. G.** (1994). SAG-Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen. Catalogue of Strains 1994. *Botanica Acta* 107, 113-186.
- Schnarrenberger, C.**, Herbert, M., and Krüger, I. (1983). Intracellular compartmentation of isozymes of sugar phosphate metabolism in green leaves. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 8, 23-51.
- Schnarrenberger, C.**, Jacobshagen, S., Müller, B., and Krüger, I. (1990). Evolution of isozymes of sugar phosphate metabolism in green algae. *Prog Clin Biol Res* 344, 743-64.
- Schwarz-Sommer, Z. S.**, Shepherd, N., Tacke, E., Gierl, A., Rohde, W., Leclerc, L., Mattes, M., Berndtgen, R., Petersen, P. A., and Saedler, H. (1987). Influence of transposable elements on the structure and function of the *A1* gene of *Zea mays*. *EMBO Journal* 6, 287-294.

- Sitte, P.** (1993). Symbiogenetic evolution of complex cells and complex plastids. *European Journal of Protistology* 29, 131-143.
- Sluiman, H. J.** (1985). A cladistic evaluation of the lower and higher green plants (Viridiplantae). *Pl Syst Evol* 149, 217-232.
- Sluiman, H. J.** (1983). The flagellar apparatus of the zoospore of the filamentous green alga *Coleochaete pulvinata*: Absolute configuration and phylogenetic significance. *Protoplasma* 115, 160-175.
- Studier, F. W.,** Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. (1990). Use of T₇ RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* 185, 60-89.
- Surek, B.,** Beemelmans, U., Melkonian, M., and Bhattacharya, D. (1994). Ribosomal RNA sequence comparisons demonstrate an evolutionary relationship between Zygnematales and charophytes. *Plant Systematics and Evolution* 191, 171-181.
- Syvanen, M.** (1994). Horizontal gene transfer: evidence and possible consequences. *Annu Rev Genet* 28, 237-61.
- Trethewey, R. N.,** and ap Rees, T. (1994). A mutant of *Arabidopsis thaliana* lacking the ability to transport glucose across the chloroplast envelope. *Biochem J* 301, 449-54.
- Trethewey, R. N.,** and ap Rees, T. (1994). The role of the hexose transporter in the chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* L. *Planta* 195, 168-174.
- Van de Peer, Y.,** Rensing, S. A., Maier, U. G., and De Wachter, R. (1996). Substitution rate calibration of small subunit ribosomal RNA identifies chlorarachniophyte endosymbionts as remnants of green algae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7732-6.
- van den Hoek, C.,** Jahns, H. M., and Mann, D. G. (1993). *Algen*, 3 Edition (Stuttgart: Georg Thieme Verlag).
- Viscogliosi, E.,** and Müller, M. (1998). Phylogenetic relationships of the glycolytic enzyme, glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase, from parabasalid flagellates. *J Mol Evol* 47, 190-9.
- Vogel, G.** (1997). Searching for living relics of the cell's early days. *Science* 277, 1604.
- Watson, J. D.,** and Crick, F. H. C. (1953). Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738.
- Weber, A.,** Menzlaff, E., Arbinger, B., Gutensohn, M., Eckerskorn, C., and Flügge, U. I. (1995). The 2-oxoglutarate/malate translocator of chloroplast envelope membranes: molecular cloning of a transporter containing a 12-helix motif and expression of the functional protein in yeast cells. *Biochemistry* 34, 2621-7.

- Wedel, N.,** and Soll, J. (1998). Evolutionary conserved light regulation of Calvin cycle activity by NADPH-mediated reversible phosphoribulokinase/CP12/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complex dissociation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9699-704.
- Wedel, N.,** Soll, J., and Paap, B. K. (1997). CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10479-84.
- Weeden, N. F.** (1981). Genetic and biochemical implications of the endosymbiotic origin of the chloroplast. *Journal of Molecular Evolution* 17, 133-139.
- Wilcox, L. W.,** Fuerst, P. A., and Floyd, G. A. (1993). Phylogenetic relationships of four charophycean green algae inferred from complete nuclear-encoded small subunit rRNA gene sequences. *American Journal of Botany* 80, 1028-1033.
- Wischmann, C.,** and Schuster, W. (1995). Transfer of rps10 from the mitochondrion to the nucleus in *Arabidopsis thaliana*: evidence for RNA-mediated transfer and exon shuffling at the integration site. *FEBS Lett* 374, 152-6.
- Woese, C. R.** (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51, 221-71.
- Woese, C. R.,** and Gupta, R. (1981). Are prokaryotes merely derived 'prokaryotes'? *Nature* 289, 95-96.
- Woese, C. R.,** Kandler, O., and Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4576-9.
- Wöhe, G.,** and Döring, U. (1993). Einführung in die Allgemeine Betriebswirtschaftslehre, 18. überarbeitete und erweiterte Auflage Edition (München: Verlag Franz Vahlen).
- Yang, D.,** Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G. J., and Woese, C. R. (1985). Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4443-7.
- Yoshioka, Y.,** Matsumoto, S., Kojima, S., Ohshima, K., Okada, N., and Machida, Y. (1993). Molecular characterization of a short interspersed repetitive element from tobacco that exhibits sequence homology to specific tRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6562-6.
- Zhang, J.,** Rosenberg, H. and Nei, M. (1989). Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3708-13.
- Zillig, W.,** Klenk, H. P., Palm, P., Puhler, G., Gropp, F., Garrett, R. A., and Leffers, H. (1989). The phylogenetic relations of DNA-dependent RNA polymerases of archaeobacteria, eukaryotes, and eubacteria. *Can J Microbiol* 35, 73-80.

- Zillig, W.**, Palm, P., Langer, D., Klenk, H.-P., Lanzendörfer, M., Hüdepohl, U., and Hain, J. (1992). RNA polymerases and transcription in archaeobacteria. In *The Archaeobacteria: Biochemistry and Biotechnology*, M. J. Danson, D. W. Hough and G. G. Lunt, eds. (London: The Biochemical Society), pp. 79-88.

6. Anhang

Wer der Evolution jedoch kosmische Ziele unterstellt, macht jede weitere Diskussion unmöglich.

William Calvin

GapCp Gen aus *Capsicum annum*

10 30 50 70
gatatcctctctatatccttgtgaatagcagagcttcttgacgcgggantgcattttgcactagcggctacaaaatggagttt
EcoRV

90 110 130 150
ttgttcgttatattcctccgcatcaaccaaaaaggagaatttctacattcattcttatagtcttacgcccttgtaatg

170 190 210 230
ttcaaaccttgagttgatacatccaaatcgcacggtcaatgtaccacgtataaattttagagttaaaattattccaaag

250 270 290 310
acgatgatagtattaggtgcaaattgttatttgaaagtgccttttgcttcatgtcatcaggtacaaaatccaacatccat

330 350 370 390
cctccctggcacgtgcttccaaatttctccaccgaacgcgcgtctttcgggccaacccatcttgcttgcttacgtaacgcct

410 430 450 470
gaccccatgtgggatgtctcatcgaacttctcgtcacctatcttgctttctttactatattaattagagttttatt

490 510 530 550
acgtccttgctaatacattggtgactaattgaacctttgttaataaatgtccattgtcaatttcaactcccatatgtaa

570 590 610 630
catgagtttttatactcgaagtaaataggaaattgtttaaagtattgaaatggacaggaagccgggcccactttcggcc

650 670 690 710
cagtcaactacaaaagcagacgtgtgtagtggttacagaatcagattcggcccggcccggcctagtgactttccgc

730 750 770 790
ctccgtgctgttcgaggttggttaggtggtgtatgctgtacaatacacaaccagcttgcttatttataagaatctccg

810 830 850 870
cttCTATCCTTCTCATTTTACTAATATTTTTTTTTCTTCCTTCACCAAAACACATACTAACCCTTTTTGTGTTTAGGGTTCT

Beginn cDNA-Sequenz

Anhang A: GapCp Gen aus Capsicum annuum

890 910 930 950
TTGAATAGTATATTTTACATAAAAACATAGAGATTACACAAACTCTCTTGCATTTTGTGACTCTTCAATGGCCTTCTCTT
M A F S S

970 990 1010 1030
CTCTTCTCAAACCTACCGCTCCCTTGTTCGTCATCCCATCGCTCCCAGGtaatatatatgtgtgtgtgtgtgtgtgta
L L K P T A S L V R P S H R S Q

1050 1070 1090 1110
tttagatctctctttttcatttccgtcaactttgtttattatctcttctgaattttacttgtattgttttcgctatttgtc
Intron I

1130 1150 1170 1190
atcttcctttctcctcgatttgcgttcatcataaccttttagctccaaactacaacgctgtcaactcattatcagtcgat

1210 1230 1250 1270
ctggttttttcttagcttttgataaatagtgccggagctagaatttttcacggttcaacatcaattatataaaaacaag
Intron I

1290 1310 1330 1350
taattttaaacatgtatagatagtaatttttcgtaaagtaatgcttcagctgcgtttgaatattttacatgtacataagc

1370 1390 1410 1430
ttggtctaagccttcgtcaacctttttcttttgaattttacttgtatttctctacttttcgtccactttttcatcgtcct

1450 1470 1490 1510
ttctcctctgttcgtgtaatacacaagcttttagctccaagctacaacgctgtgaactcattaccagtcgatctgaatt

1530 1550 1570 1590
ttttacgcttttgatatacagtggaagagtagaatttcacttaagtgtcaaaatcgaaagaaattagcacacgaactagct
EcoRV

1610 1630 1650 1670
gaaggaggttcaacattaactatataataaaaaataattttaacatgtataaatagtataattttttggaaatttatgc

1690 1710 1730 1750
ttcagctggatttgaatattttacatgtacataagcttggagtaaacttcgtcaactttttttcttctgaattttactt

1770 1790 1810 1830
gtatttctctactttcatccacttttcattgtcctttctcctctattcgtgttaatacataagcttttagctccaaccta

1850 1870 1890 1910
cgacgctgtgaactcattaccagtcgatctgaattttttacacttctgataatcagtgccagagctagaaattttcacta

1930 1950 1970 1990
taagtggttcaaaatagaaagacgtaagcacaggaactagcgaaggcagttcaacatcaactatataataaaaaataaa

2010 2030 2050 2070
aattttaatcatgtataaatagtataatttttcgtaaatttatgtttcagctggatttgaatattttacatgtacataag

2090 2110 2130 2150
ctgggtgtaaacttcggcgaactttttcttctgaattttacttgtatttctctacttttcgttcaactttctcatcttc

Anhang A: GapCp Gen aus Capsicum annuum

2170 2190 2210 2230
ctttctcctccattcgtgtaatacataagcttttagttcgaagtttcaacgatgtgaatttatgcttcagctttacttaa

2250 2270 2290 2310
aatatttgattctatgtctttaccagtcgatcttatttttttttttttttttacaaaaaacaacttacacgtttgatga

2330 2350 2370 2390
tgaatttgagttgtttgcattgtaaataaggttggtggtcggcaagtcatatgaattttccttggtggtttcatcaagtt

2410 2430 2450 2470
tatttattaatggaagctttttatgaatctggttggaacgacaactttgtttattgtctcttctgtattttctctactt

Intron I

2490 2510 2530 2550
ttgtcgactttgtcatcttctttctcattgatgcacgttcatcataagcttttagctccaaattacaaccggtggaatt

SaII

2570 2590 2610 2630
catgcttcaacaacagcaacaacataaccagtgattcccacctagtttattcccacctagtggtctggggagggtag

2650 2670 2690 2710
agtgtatgcacaccataccactacctaagagaagtagagaggtgtttccgatagacaaaatatttgattctccgtctt

2730 2750 2770 2790
taccagttgatcgatttgcttttaacgcttttgataatgaatataatgcttcagctgcattttaaatttttacatgtacat

2810 2830 2850 2870
aagcttgggtgtccaacaaggcataatgcgttttttccttatggttttgatcaagtttatataatggaagcttttgac

2890 2910 2930 2950
tttttgtaaactggttcagGCATCATGTGTAGGCCCTTCAACACAGTTCTAACTCTGTCAAATTACAATCAGCTATCTTC

A S C V G L Q H S S N S V K L Q S A I F

2970 2990 3010 3030
GGAGATGTTGTCTCAATCGCGCAATCTTCGTCCTTACAgtaaaccattctcttaattgagttttactatgcttagaaagt

G D V V S I A Q S S S L Q **Intron II**

3050 3070 3090 3110
aagaaagtataaatgaaatataaatattttttcttagctgatataaaaaattaaacctgcagAAACTCTGGTGCCTGCAG

N S G A C S

3130 3150 3170 3190
CATTCAACCAATCAGAGCAACTGCTACTGAGTTGCCTCCAACAGTTCCAAGtaaggcttcttactatatctacctcaatc

I Q P I R A T A T E L P P T V P K **Intron III**

3210 3230 3250 3270
cctctgatttttgatgatctaacctgttactgagatgattgaatttgggtggtttctcagAGTCACAGACGGGTGGG

S Q T G G

3290 3310 3330 3350
AAAACAAGGGTTGGTATAAATGgtatgtttctctttttgctttgctctgattacgtaattctcaaggatccccgagtaga

K T R V G I N G

Anhang A: GapCp Gen aus Capsicum annuum

3370 3390 3410 3430
aacattagtgcccttggcttctgaaatctctcaatcttctgtcccttgtaacaagttatcaaatttctgtgtgacccta
Intron IV

3450 3470 3490 3510
tacagttgtcatagaacctgcattaatgcatgtctaaagatgttcaagccttgagGTTTTGGACGTATTGGGAGATTAG
F G R I G R L V

3530 3550 3570 3590
TATTAAGAATTGCAACATTCAGGGATGATATTGAGGTAGTTGCAGTTAATGACCCATTTATTGATGCAAAGTACATGgta
L R I A T F R D D I E V V A V N D P F I D A K Y M

3610 3630 3650 3670
agaatatactcatgaaaatattgctgttattctgctgaaattgggattggtagagaaagtccccagtgctctgtag
Intron V

3690 3710 3730 3750
aatgaaatattgcatcactaggacttgcttattgattatgataataggaagggctttcctgatttaaagaggatacatt

3770 3790 3410 3430
taaaaagcactgtcattaacaaatagttgacactgtgtccaagcaattaatggtgaaaatagcaactctagcattagat

3450 3470 3490 3510
ctccagatccttattttcttttggcttattgattatgagtcacttctcctctttgggtctatttgatgctttcatcttc

3530 3550 3570 3590
tgatggagaagcaccttctttcctgcaaaacaggtccattctctatctttctttatctacttctgctagtagattctta

3610 3630 3650 3670
accttttgaggaatagctgataaaggaggaaagcctagtaatgaagaaactgtaatttatcaccaaggggaacaaagtgg

3690 3710 3730 3750
ggaagggccattggttaggttctgcccaggggtttgaggaaaatgtgtttatcatatcataagaaaaaaaaatcttggtt

3770 3790 3810 3830
aaagatgtaacattttctgttccattcgttttagGCTTACATGCTCAAGTACGACTCCACCCATGGAGTTTTTCAGAGGATC
A Y M L K Y D S T H G V F R G S

3850 3870 3890 3910
CATCAGTGTCTGATGACACTACTTTGGAAATCAACGGGAAGCAGATTAAAGTCAGTAGCAAAAAGgtatgacagttaag
I S V L D D T T L E I N G K Q I K V S S K R

3930 3950 3970 3990
ttaatagttacaagtaaaacagtaaaatgaatcaagtaagttatcttttctcactcatgcaaacttctcttgatgcagGG
Intron VI D

4010 4030 4050 4070
ACCCTGCAGATATCCATGGGGTGATTTAGGTGCAGATTATGTTGTTGAATCTTCTGGTATCTTCACAACCTGTTGACAGG
P A D I P W G D L G A D Y V V E S S G I F T T V D R

4090 4110 4130 4150
GCTTCAGGACATAAGAAGggttgagaacatggtattttattgctgtccttaaagctctttccttgcccaacgtattcatg
A S G H K K **Intron VII**

4170 4190 4210 4230
cagctcttcgtattgatactttctgtttgattgtgcagGGTGGTGCAAAGAAGGTCGTAATCTCAGCCCCATCAGCTGAT
G G A K K V V I S A P S A D

Anhang B: *GapC* Gen aus *Chlorarachnion*

```
1210          1230          1250          1270
CTCAACCCGATGCGTGGATCTTATCGAACACATGGCTAAGGTTGACTCTGCTTAAaaaaagcaaaatctggaccgtgtaa
S T R C V D L I E H M A K V D S A Stop

1290
ACAAACTTCGTTCCCTATCCACA
```

Anhang B: Genstruktur der *GapC* aus *Chlorarachnion* CCMP621

Der genomische Bereich des *GapC* Gens aus *Chlorarachnion* ist über einen Bereich von etwa 1300 Nukleotiden dargestellt. Die Exonbereiche des Gens sind in Großbuchstaben dargestellt, für die 5' und 3' nichtkodierenden Bereiche sowie die Introns wurden Kleinbuchstaben verwendet. Die aus den Exonsequenzen abgeleiteten Aminosäuren befinden sich unterhalb des ersten Nukleotids eines kodierenden Triplets. Das Start- und Stopkodon sind unterstrichen.

Charophyceae (Chlorophyta)

Charales

<i>Chara vulgaris</i> GapB	AJ246014
<i>Chara vulgaris</i> GapC1	AJ246015
<i>Chara vulgaris</i> GapC2	AJ246016

Klebsormidiales

<i>Klebsormidium flaccidum</i> GapA	AJ246029
<i>Klebsormidium flaccidum</i> GapC	AJ246020

Zygnematales

<i>Spirogyra</i> sp. GapA	AJ246030
---------------------------	----------

Coleochaetales

<i>Coleochaete scutata</i> GapB	AJ246028
<i>Coleochaete scutata</i> GapC	AJ246019

Embryophyta

Marchantiales (Marchantiopsida)

<i>Marchantia polymorpha</i> GapA	AJ246026
<i>Marchantia polymorpha</i> GapB	AJ246027
<i>Marchantia polymorpha</i> GapC	AJ246023
<i>Marchantia polymorpha</i> GapCp	AJ246024

Sphagnales (Bryopsida)

<i>Sphagnum cuspidatum</i> GapA1	AJ246031
<i>Sphagnum cuspidatum</i> GapA2	AJ246032
<i>Sphagnum cuspidatum</i> GapC	AJ246021
<i>Sphagnum cuspidatum</i> GapCp	AJ246022

Funariales (Bryopsida)

<i>Physcomitrella patens</i> GapCp	AJ246025
------------------------------------	----------

Solanales (Magnoliophyta)

<i>Capsicum annuum</i> GapA1	AJ246008
<i>Capsicum annuum</i> GapA2	AJ246009
<i>Capsicum annuum</i> GapB	AJ246010
<i>Capsicum annuum</i> GapC1	AJ246011
<i>Capsicum annuum</i> GapC1	AJ246012
<i>Capsicum annuum</i> GapCp	AJ246013

Chlorarachniophyta

Chlorarachniophyceae

<i>Chlorarachnion</i> CCMP621 <i>GapC</i>	AJ246017
<i>Chlorarachnion</i> CCMP621 <i>GapX</i>	AJ246018

Anhang C: Accession Nummern aller in dieser Arbeit etablierten cDNA-Sequenzen

Die Sequenzen sind in der „EMBL Nucleotide Sequence Database“ unter den Accession Nummern AJ24008 bis AJ23032 hinterlegt. Die Hinterlegung erfolgte vertraulich, die Sperrfrist läuft am 31. Dezember 2001 aus.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Rüdiger Cerff, für die Bereitstellung des Themas, für die anregenden Diskussionen und seine Unterstützung. Er hat mir stets genügend Freiraum gelassen, individuellen Forschungsinteressen nachzugehen und die eigenen Ideen zu verwirklichen.

Herrn Prof. Dr. Michael Wettern danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr. Henner Brinkmann möchte ich ganz besonders für sein fortwährendes Interesse an meinen Arbeiten und seine Kooperativität danken. Seine ständige Diskussionsbereitschaft, sowie die praktische Unterstützung auf vielen Feldern hat mir die Arbeit erheblich erleichtert.

Herrn Prof. Dr. Geoff McFadden der University of Melbourne danke ich für die Überlassung einer cDNA-Bank und genomischer DNA von *Chlorarachnion* CCMP621. Frau Steph Seufert der DSMZ danke ich für die Überlassung der akzenischen Kultur des Lebermooses *Marchantia polymorpha*. Herrn Walter Wimmer danke ich für den Hinweis des Vorkommens sowie die Artbestimmung der Grünalge *Chara vulgaris* sowie des Torfmooses *Sphagnum cuspidatum*.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Genetik danke ich für die freundschaftliche Unterstützung und das gute Arbeitsklima, das über die Institutsgrenzen hinausreichte. Großen Dank schulde ich Rainer Figge für seine Hilfe und Diskussionsfreude, seine konstruktiven Vorschläge und Kritikpunkte. Stefan Gerdt möchte ich für seine Unterstützung zur Erlangung persönlicher Ziele danken. Alle haben zu einer zumeist positiven Arbeitsatmosphäre beigetragen, die ein angenehmes Arbeiten erlaubte.

An dieser Stelle möchte ich meinen Eltern danken, die mich stets vorbehaltlos unterstützt und gefördert haben. Dies war für mich der wichtigste Rückhalt zum Erreichen meiner Ziele.

Lebenslauf

Name: Jörn Petersen

Geburtsdatum: 15. Mai 1970

Geburtsort: Minden

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

August 1976 – Juli 1980: Grundschule Uchte

August 1980 – Mai 1989: Städtisches Gymnasium Petershagen

Berufsausbildung:

Oktober 1989 – August 1991: Grundstudium der Biologie an der TU Braunschweig
Vordiplom im August 1991

September 1991 – Juli 1995: Hauptstudium der Biologie an der TU Braunschweig
Diplomprüfungen im April 1994

Mai 1994 – Juli 1995: Diplomarbeit am Institut für Genetik der TU
Braunschweig
Thema der Diplomarbeit:
Phylogenetische und molekularbiologische
Untersuchungen am Gensystem der plastidären
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)
aus Grünalgen und Landpflanzen.

Berufstätigkeit:

seit August 1995: Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik
der TU Braunschweig im Rahmen einer DFG
geförderten Promotionsarbeit
Thema der Dissertation:
Duplikationen und lateraler Transfer von Genen als
Motor der Evolution: Molekulare Studien am GAPDH-
Gensystem von Grünalgen, Landpflanzen und
Chlorarachniophyta