

Rolle und Funktion von Peroxisomen in der Cryptomonade *Guillardia theta*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs Biologie der Philipps Universität Marburg

Vorgelegt von

M. Sc. Jana Vasilev

Aus Karassjowka, Kasachstan

Marburg an der Lahn

Dezember 2022

Die vorliegende Dissertation wurde von September/2018 bis Februar/2022 am Fachbereich Biologie, Zellbiologie unter der Leitung von Dr. Daniel Moog und später Prof. Dr. Uwe-G. Maier angefertigt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1180) als Dissertation angenommen am: 01.02.2023

Erstgutachter: Prof. Dr. Uwe-G. Maier

Zweitgutachter: Prof. Dr. Alfred Batschauer

Prüfer Prof. Dr. Andreas Brune

Prüfer Prof. Dr. Martin Thanbichler

Tag der Disputation am: 02.03.2023

Publikationen

Teil dieser Arbeit wurde publiziert in:

Vasilev, Jana; Mix, Ann-Kathrin; Heimerl, Thomas; Maier, Uwe G.; Moog, Daniel (2022): Inferred Subcellular Localization of Peroxisomal Matrix Proteins of *Guillardia theta* Suggests an Important Role of Peroxisomes in Cryptophytes. In: *Front. Plant Sci.* 13:889662. DOI: 10.3389/fpls.2022.889662.

*Der traurigste Aspekt derzeit ist, dass die Wissenschaft schneller Wissen sammelt,
als die Gesellschaft Weisheit.*

Issak Asimov

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	ix
Abbildungsverzeichnis	xii
Tabellenverzeichnis	xiv
Zusammenfassung	1
Summary	2
I Einleitung	3
I.1 Entstehung der komplexen Plastide durch sekundäre Endosymbiose.....	3
I.2 Die Cryptomonade <i>Guillardia theta</i>	6
I.3 Die Diatomee <i>Phaeodactylum tricornutum</i> als Modelorganismus	8
I.4 Peroxisomen: ubiquitäre eukaryotische Organellen mit dynamischer Funktion.....	9
I.4.1 Biogenese von Peroxisomen	11
I.4.2 Peroxine.....	13
I.4.3 Peroxisomaler Import	14
I.4.3.1 Import peroxisomaler Matrixproteinen mit PTS1 und PTS2 Motiven	15
I.4.3.2 Import peroxisomaler Membranproteine (PMP)	16
I.4.4 Typische peroxisomale metabolische Prozesse.....	17
I.4.4.1.1 ROS-Detoxifizierung durch den Ascorbat-Glutathion Zyklus	17
I.4.4.1.2 Kohlenhydrat-Metabolismus	18
I.4.4.1.3 Aminosäuren- und Amin-Metabolismus	18
I.4.4.1.4 Purin-Abbau.....	19
I.4.4.1.5 Etherphospholipid-Synthese: FAR, AGPS.....	20
I.4.4.1.6 Vitamin K: MenB	20
I.4.4.2 β -Oxidation von Fettsäuren	23
I.4.4.3 Glyoxylat Zyklus	25
I.4.4.4 Photorespiration	26
I.4.5 Bioinformatische Analysen von peroxisomalen Proteinen in <i>G. theta</i>	28
II Zielsetzung	30
III Ergebnisse	31
III.1 Studien des peroxisomalen Metabolismus in <i>G. theta</i>	31
III.1.1 Elf putative <i>G. theta</i> PTS1-Proteine wurden in Kolokalisationsstudien eingesetzt	31
III.1.2 Heterologe <i>in vivo</i> Lokalisationsstudien der elf PTS1-Kandidaten aus <i>G. theta</i> in <i>P. tricornutum</i>	33
III.1.3 Immunmarkierung von Gt_UO auf Zell-Dünnschnitten.....	38
III.1.3.1 Peroxisomale Lokalisation von Gt_UO in <i>G. theta</i> mit spezifischen Antikörpern bestätigt....	38

III.1.4	β-Oxidation von Fettsäuren in <i>G. theta</i>	40
III.1.4.1	<i>In silico</i> identifizierte putative <i>G. theta</i> Enzyme für die β-Oxidation von Fettsäuren.....	41
III.1.4.2	Lokalisation von identifizierten Faktoren der β-Oxidation aus <i>G. theta</i> in <i>P. tricornutum</i>	43
III.1.4.2.1	Lokalisierung von Gt_ACOX und Gt_ACAD und deren Charakterisierung	43
III.1.4.2.2	Lokalisierung von Gt_ECH, Gt_ECH-3HCD und Gt_KCT	46
III.1.5	Glyoxylat-Zyklus und Photorespiration in <i>G. theta</i>	48
III.1.5.1	<i>In silico</i> Analysen der an dem Glyoxylat-Zyklus beteiligten Enzymen in <i>G. theta</i>	48
III.1.5.2	<i>In silico</i> Analysen der an der Photorespiration beteiligten Enzymen in <i>G. theta</i>	49
III.1.5.3	Heterologe <i>in vivo</i> Lokalisationen von putativen Enzymen beteiligt an dem Glyoxylat-Zyklus und der Photorespiration	53
III.2	<i>In silico</i> Analysen der metabolischen Prozesse in <i>G. theta</i>	54
III.2.1	Ascorbat-Glutathion Zyklus.....	56
III.2.2	Purinabbau.....	56
III.2.3	Kohlenhydrate und Aminosäuren	57
III.2.4	Etherphospholipide	57
III.2.5	Vitamin K.....	58
III.3	Komparative Genomanalyse zur Identifizierung von Peroxinen in einzelligen- und mehrzelligen Algen 59	
III.3.1	Der Kernsatz von Peroxinen unterscheidet sich minimal zwischen Chlorophyten und Rhodophyten	60
IV	Diskussion	63
IV.1	<i>P. tricornutum</i> eignet sich für heterologe Lokalisationsstudien von PTS1-Proteinen aus <i>G. theta</i>	63
IV.2	Peroxisomen in <i>G. theta</i> sind an wichtigen metabolischen Prozessen beteiligt.....	65
IV.2.1	Peroxisomen in <i>G. theta</i> schirmen die Zelle gegen H ₂ O ₂ ab und bauen dieses mithilfe der Ascorbatperoxidase ab.....	65
IV.2.1.1	Gt_UO und Gt_MAO produzieren H ₂ O ₂ als Nebenprodukt	67
IV.2.2	β-Oxidativer Abbau von Fettsäuren findet in <i>G. theta</i> in Mitochondrien statt.....	69
IV.2.3	<i>G. theta</i> Peroxisomen sind nicht am Glyoxylat-Zyklus oder der Photorespiration beteiligt	73
IV.2.4	Weitere peroxisomale Stoffwechselprozesse in der Cryptomonade <i>G. theta</i>	75
IV.2.4.1	Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsel in <i>G. theta</i> -Peroxisomen	75
IV.2.4.2	Durch das peroxisomale MenB sind die Peroxisomen in <i>G. theta</i> an der Vitamin-K-Synthese beteiligt 77	
IV.2.4.3	Peroxisomale Gt_FAR und Gt_AGPS sind an der Ether-Phospholipid-Synthese beteiligt.....	79
IV.3	Rhodophyten haben im Vergleich zu Chlorophyten und Glaucophyten keinen PTS2-Import.....	80
V	Fazit.....	83
VI	Material und Methoden	84

VI.1	Material.....	84
VI.1.1	Mikroorganismen.....	84
VI.1.2	Verwendete Vektoren und Plasmide.....	84
VI.1.3	Oligonukleotide.....	87
VI.1.4	Nährmedien für die Anzucht von Mikroorganismen.....	89
VI.1.5	Chemikalien und Puffer.....	90
VI.1.6	Enzyme, Kits und DNA-/Protein-Leiter für molekularbiologische Arbeiten.....	92
VI.1.7	Antikörper.....	93
VI.1.8	Geräte.....	94
VI.1.9	Verbrauchsmaterialien.....	95
VI.1.10	Software und Internetanwendungen.....	96
VI.2	Methoden.....	99
VI.2.1	<i>In silico</i> Analysen.....	99
VI.2.1.1	Identifikation von PTS1-Proteinen.....	99
VI.2.1.2	KEGG Analysen von PTS1-Kandidaten und Hilfs-Proteinen.....	100
VI.2.1.3	<i>In silico</i> Analysen von β -Oxidation, Photorespiration und Glyoxylat-Zyklus.....	100
VI.2.1.4	Identifikation von Peroxinen in Chlorophyten, Rhodophyten und Glaucophyten.....	101
VI.2.1.5	CDS-Überprüfung mit Sequencher (EST und MMETSP Daten).....	101
VI.2.2	Kultivierung und Stammhaltung von Mikroorganismen.....	101
VI.2.2.1	Kultivierung und Stammhaltung von <i>E. coli</i> TOP10.....	101
VI.2.2.2	Kultivierung und Stammhaltung von <i>G. theta</i>	102
VI.2.2.3	Kultivierung und Stammhaltung von <i>P. tricornutum</i>	102
VI.2.2.3.1	Kryokonservierung von <i>P. tricornutum</i> Zellen.....	103
VI.2.3	Herstellung von chemisch - kompetenten <i>E. coli</i> TOP10 Zellen mit RbCl.....	104
VI.2.4	Nukleinsäure-Analytik.....	105
VI.2.4.1	Extraktion von Gesamt-DNA aus <i>G. theta</i> mit der CTAB-Methode.....	105
VI.2.4.2	Extraktion von Gesamt-RNA aus <i>G. theta</i> mit RNeasy® Mini Kit von QIAGEN.....	105
VI.2.4.3	Behandlung mit DNaseI der gRNA-Proben.....	106
VI.2.4.4	cDNA-Synthese mit <i>random hexamer</i> Oligonukleotiden.....	106
VI.2.4.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	108
VI.2.4.5.1	Kolonie-PCR mittels <i>Phire Plant Direct PCR Master Mix Kit</i>	109
VI.2.4.6	Agarosegelelektrophorese.....	109
VI.2.4.6.1	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	110
VI.2.4.7	Standard-Klonierung von Gensequenzen in Vektoren.....	110
VI.2.4.8	Klonierung mittels <i>Gibson Assembly</i>	112
VI.2.4.9	Hitzeschock-Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> TOP10.....	113
VI.2.4.10	Extraktion von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	114

VI.2.4.10.1	Extraktion von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> TOP10 für Testrestriktionen und Sequenzierungen.....	114
VI.2.4.10.2	Extraktion von reiner Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> TOP10 mittels NucleoBOND® Xtra MIDI Kit (Macherey-Nagel) für die Transfektion von <i>P. tricornutum</i>	115
VI.2.4.11	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Nanodrop.....	115
VI.2.4.12	Test-Restriktion von Plasmid-DNA	115
VI.2.4.13	Sequenzierung	116
VI.2.5	Biolistische Transfektion von <i>P. tricornutum</i> mittels <i>particle bombardment</i>	116
VI.2.6	Proteinanalytik.....	117
VI.2.6.1	Expression von transformierten Gensequenzen in <i>P. tricornutum</i>	117
VI.2.6.2	Lyse von <i>P. tricornutum</i> Zellen.....	117
VI.2.6.3	Lyse von <i>G. theta</i> Zellen.....	118
VI.2.6.4	TCA-Fällung von Proteinen	119
VI.2.6.5	Bestimmung der Proteinkonzentration mit Amidoschwarz 10B	119
VI.2.6.6	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE	120
VI.2.6.7	<i>Semidry</i> Western-Blot und Immunodetektion.....	121
VI.2.6.8	Chemilumineszenz mittels HRP-gekoppelter Antikörpern.....	122
VI.2.7	Mikroskopie	123
VI.2.7.1	Konfokale Laserscan Mikroskopie (KLSM)	123
VI.2.7.2	Elektronenmikroskopie.....	123
VII	Anhang.....	125
VII.1	Zusätzliche Abbildungen	125
VII.2	Plasmidkarten.....	129
VII.3	Kandidatenliste der putativen PTS1-Proteine in <i>G. theta</i>	131
VII.4	<i>In silico</i> Analysen der Stoffwechselwege in <i>G. theta</i>	134
VII.5	Digitaler Anhang	136
VII.6	PHYRE ² Analysen von ACOX und ACAD	137
VIII	Literaturverzeichnis.....	139
IX	Lebenslauf.....	165
X	Danksagung.....	166
XI	Eidesstaatliche Erklärung.....	167

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
12aaC	Die letzten 12 C-terminalen Aminosäuren
<i>A. thaliana</i> (At)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar(e)
Bsr	Gen gegen Basticidin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	2'-Desoxyribonukleosid-5'-phosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> (Grün-fluoreszierendes Protein)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>ER-associated degradation</i> (ER-assozierte Degradation)
EST	<i>expressed sequence tags</i>
et al.	<i>et alia</i>
f/2	Salzmedium für Protisten
FL	<i>full length</i> (volle Länge)
fw	<i>forward</i> , 5'-Richtung
g	Gramm
<i>G. theta</i> (Gt)	<i>Guillardia theta</i>
gDNA	genomische DNA
h	Stunde(n)

HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
kb	Kilobase(n)
KLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
L	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i> Medium für <i>E. coli</i>
M	Molar (Mol/L)
Mbp	mega Basenpaar(e)
MCS	<i>multiple cloning site</i> (multiple Klonierungsstelle)
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MMETSP	<i>marine microbial eukaryote transcriptome sequencing project</i>
mRuby3	Rot-fluoreszierendes Protein
mTP	<i>mitochondrial targeting peptide</i> (mitochondriales Targeting-Peptid)
NaNO ₃	Natriumnitrat
NAT	Nourseothricin
ng	Nanogramm
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
OD	optische Dichte
<i>P. tricornutum</i> (Pt)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
PAF	<i>plastidial autofluorescence</i> (Plastidenautofluoreszenz)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
Pex	Peroxin(e)
PIC	<i>protease inhibitor cocktail</i>
pmol	Pikomol
PMP	peroxisomale Membranprotein(e)
PTS	<i>peroxisomal targeting signal</i> (peroxisomales Zielsteuerungssignal)
RbCl	Rubidiumchlorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
rv	<i>reverse</i> , 3'-Richtung
sek	Sekunde(n)

SELMA	<i>symbiont-specific ERAD-like machinery</i>
SP	Signalpeptid
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TL	<i>transmitted light</i> (Durchlicht)
TMD	Transmembrandomäne
U	<i>unit(s)</i> ; Einheit(en)
ün	über Nacht
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumenanteil pro Volumen)
VE	Voll entsalzt
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewichtseinheit pro Volumen)
WB	Western Blot
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
Zeo	Zeocin

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. I-1: Entstehung der komplexen Plastide 4

Abb. I-2: Die Cryptomonade *Guillardia theta*..... 6

Abb. I-3: Die Morphotypen von *P. tricornutum* 9

Abb. I-4: Peroxisom-Biogenese im Überblick 12

Abb. I-5: Peroxisomaler Import in *G. theta* 16

Abb. I-6: Schematische Darstellung der Kompartimentierung der Phyllochinon-Biosynthese in photosynthetisch-aktiven Organismen..... 21

Abb. I-7: Vergleich der peroxisomalen und der mitochondrialen β -Oxidation von Fettsäuren 23

Abb. I-8: Schematische Übersicht des Glyoxylat-Zyklus 25

Abb. I-9: Schematische Darstellung der Photorespiration in Archaeplastida..... 26

Abb. I-10: Übersicht über die *in silico* Analysen von putativen PTS1-Proteinen in *G. theta* ... 28

Abb. III-1: Heterologe *in vivo* Lokalisation der *G. theta* PTS1-Kandidaten in *P. tricornutum* .. 35

Abb. III-2: Heterologe *in vivo* Lokalisationen von Gt_AGPS, Gt_AAT und Gt_MAO von *G. theta* in *P. tricornutum* als 12aaC-Versionen 37

Abb. III-3: Bindungsnachweis von α -Gt_UO.12aaC an Gt_UO des Proteingestamtextraktes aus *G. theta* mittels eines semi-dry Western-Blots 39

Abb. III-4: Immunmarkierung mit spezifischem Antikörper α -Gt_UO.12aaC..... 39

Abb. III-5: Schema der *in silico*-Analysen weiterer Faktoren in *G. theta* 40

Abb. III-6: Heterologe *in vivo* Lokalisation von Gt_ACOX und Gt_ACAD in *P. tricornutum* mR3-SKL..... 44

Abb. III-7: Heterologe *in vivo* Lokalisationen von Gt_ECH-3HCD, Gt_3HCD und Gt_Pre-KCT in *P. tricornutum*..... 47

Abb. III-8: Heterologe *in vivo* Lokalisation von putativen Faktoren beteiligt am Glyoxylat-Zyklus und Photorespiration 53

Abb. III-9: Putatives <i>men</i> -Cluster in <i>G. theta</i>	59
Abb. IV-1: Übersicht der peroxisomalen Faktoren in der Cryptomonade <i>G. theta</i>	64
Abb. IV-2: Schema des peroxisomalen Metabolismus in <i>G. theta</i>	66
Abb. S VII-1: Heterologe <i>in vivo</i> Lokalisation von Gt_UO aus vorherigen Studien.....	125
Abb. S VII-2: Heterologe <i>in vivo</i> Lokalisation von Gt_ACOX in <i>P. tricornutum</i> Wildtyp	126
Abb. S VII-3: Heterologe <i>in vivo</i> Lokalisation von GFP-Gt_MenB in <i>P. tricornutum</i>	127
Abb. S VII-4: Heterologe <i>in vivo</i> Lokalisation von Gt_ALN und Gt_ALC in <i>P. tricornutum</i> Wildtyp	128
Abb. S VII-5: Plasmidkarte pJet1.2/blunt (Thermo Scientific™)	129
Abb. S VII-6: Plasmidkarte pPhaNR.....	129
Abb. S VII-7: Markerbanden des prestained PAGERuler™ (Thermo Scientific™).....	130
Abb. S VII-8: Analysen von Gt_ACAD in Phyre ²	137
Abb. S VII-9 Analysen von Gt_ACOX in Phyre ²	138

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. I-1: Übersicht über Peroxine in <i>G. theta</i> und <i>P. tricornutum</i>	13
Tab. III-1: Übersicht der Lokalisierten <i>G. theta</i> Proteine mit entsprechenden Konstrukten...	32
Tab. III-2: Übersicht über <i>in silico</i> identifizierten Enzymen, welche an der Fettsäure β -Oxidation in <i>G. theta</i> beteiligt sein könnten.	42
Tab. III-3: Ergebnisse der bioinformatischen Suche nach Faktoren des Glyoxylat-Zyklus in <i>G. theta</i>	49
Tab. III-4: Bioinformatische Analyse der Faktoren beteiligt an der Photorespiration in <i>G. theta</i>	52
Tab. III-5: Übersicht der analytischen metabolischen Prozesse in <i>G. theta</i>	55
Tab. III-6: <i>In silico</i> identifizierten Peroxine in Chlorophyten, Rhodophyten und Glaucophyten	62
Tab. VI-1: In dieser Arbeit verwendete Mikroorganismen und ihre Eigenschaften.....	84
Tab. VI-2: In dieser Arbeit verwendete und für die Transfektion konstruierten Plasmide	84
Tab. VI-3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide	87
Tab. VI-4: Endkonzentrationen der verwendeten Antibiotika	90
Tab. VI-5: Verwendete Chemikalien	90
Tab. VI-6: Verwendete Enzymen im Rahmen dieser Arbeit.....	92
Tab. VI-7: Verwendete Kits für molekularbiologische Arbeiten.....	92
Tab. VI-8: Verwendete DNA- und Protein Leiter	93
Tab. VI-9: Verwendete Antikörper.....	93
Tab. VI-10: Verwendete Geräte während dieser Arbeit	94
Tab. VI-11: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	95
Tab. VI-12: Internetanwendungen.....	96
Tab. VI-13: Verwendete Software	98

Tab. VI-14: Komponenten vom LB-Medium zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	102
Tab. VI-15: Komponenten des f/2-Mediums zur Kultivierung von <i>P. tricornutum</i>	103
Tab. VI-16: Puffer für die Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> TOP10 Zellen	104
Tab. VI-17:Komponenten von dem CTAB-Puffer zur Extraktion von gDNA aus <i>G. theta</i>	105
Tab. VI-18: <i>DNase</i> I Behandlung der gRNA	106
Tab. VI-19: cDNA-Synthese mit FastGene55-Scriptase (Nippon)	107
Tab. VI-20: cDNA-Synthese mit FastGene Scriptase II (Nippon)	107
Tab. VI-21: Standard-PCR Reaktionsansatz zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mit der Q5®-Polymerase	108
Tab. VI-22: Standard-PCR Programm für spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten mit der Q5®-Polymerase	109
Tab. VI-23: Komponenten der benötigten Puffer für die Agarosegelelektrophorese	110
Tab. VI-24: Ligation von Gensequenzen in pJet1.2/blunt	111
Tab. VI-25: Komponenten für eine Plasmid-Restriktion	111
Tab. VI-26: Ligation von Gensequenzen in pPhaNR	111
Tab. VI-27: Gibson Reaktionsansatz.....	112
Tab. VI-28: Gibson Reaktionsmix	113
Tab. VI-29: 5x Isothermaler Mastermix (MM).....	113
Tab. VI-30: Komponenten hauseigener Puffer zur schnellen Plasmid-Extraktion aus <i>E. coli</i>	114
Tab. VI-31: Vorbereitung der Wolfram-Partikel für die biolistische Transfektion von <i>P. tricornutum</i>	116
Tab. VI-32: Verwendete Puffer und Zusätze zu Proteinextraktion aus Protisten	118
Tab. VI-33: Zusammensetzung von dem Harnstoffpuffer.....	119
Tab. VI-34: Verwendete Puffer zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels Amidoschwarz 10B Färbung	120
Tab. VI-35: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE.....	120

Tab. VI-36: Verwendete Puffer in der SDS-PAGE	121
Tab. VI-37: Verwendete Puffer für den <i>semidry</i> Western-Blot.....	122
Tab. VI-38: Verwendete ECL-Lösung für die Chemilumineszenz-Reaktion.....	122
Tab. S 1: Auflistung der 64 putativen PTS1-Kandidatenproteine in <i>G. theta</i>	131
Tab. S 2: Übersicht der <i>in silico</i> Analysen der Stoffwechselwege in <i>G. theta</i>	134

ZUSAMMENFASSUNG

Peroxisomen sind an mehreren wichtigen Stoffwechselprozessen in eukaryotischen Zellen beteiligt, wie der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) oder dem Abbau von Fettsäuren durch β -Oxidation, aber auch am Glyoxylat-Zyklus und der Photorespiration. Die Identifizierung von Peroxisom-spezifischen Peroxinen in der Cryptomonade *Guillardia theta* und anderen Chromalveolaten von Mix et al. (2018) bestätigte das Vorhandensein von Peroxisomen in Protisten mit der so genannten komplexen Plastide. Im Gegensatz zu Hefe-, Pflanzen- und Säugetierzellen ist über die Beteiligung der Peroxisomen zum zellulären Stoffwechsel in Cryptomonaden wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurden heterologe Lokalisationsstudien von Kandidatenproteinen aus *G. theta* mit einem putativen C-terminalen peroxisomalen Zielsteuerungssignal Typ 1 (*peroxisomal targeting signal*, PTS1) in der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* durchgeführt. Dabei konnten putative PTS1-Proteine mit dem peroxisomalen Marker (mRuby3-SKL) kolokalisiert werden, die an wichtigen metabolischen Prozessen wie Kohlenhydrat-, Etherphospholipid-, Nukleotid-, Vitamin-K-, ROS-, Aminosäure- und Aminstoffwechsel beteiligt sind. Darüber hinaus wurden Homologe zu Faktoren der peroxisomalen β -Oxidation, dem Glyoxylat-Zyklus und der Photorespiration bioinformatisch in *G. theta* analysiert und Kandidaten mit PTS1-ähnlichen Sequenzen in *P. tricornutum* lokalisiert. Eine Kolokalisation der *G. theta* Homologe mit mRuby3-SKL wurde heterolog nicht beobachtet und es ist anzunehmen, dass der Glyoxylat-Zyklus in *G. theta* nicht peroxisomal lokalisiert und dass die *G. theta* Peroxisomen nicht an der Photorespiration beteiligt sind. Des Weiteren ist der β -oxidative Abbau von Fettsäuren in *G. theta* vermutlich ausschließlich mitochondrial.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden durch komparative Genomanalysen ausgewählter Chlorophyten, Rhodophyten und Glaucophyten putative Peroxin-Sequenzen identifiziert, was auf das Vorhandensein von funktionalen Peroxisomen in den meisten untersuchten Organismen hindeutet. Des Weiteren deuten *in silico* Analysen darauf hin, dass in Chlorophyten und Glaucophyten neben dem PTS1-Import auch PTS2-Proteine importiert werden könnten. Das PTS2 ist ein N-terminales Nonapeptid, das jedoch im Vergleich zu dem PTS1 seltener vorkommt.

SUMMARY

Peroxisomes are involved in several important metabolic processes in eukaryotic cells, such as detoxification of reactive oxygen species (ROS) or degradation of fatty acids by β -oxidation, but also in the glyoxylate cycle and photorespiration. The identification of peroxisome-specific peroxins in the cryptomonad *Guillardia theta* and other chromalveolates by Mix et al. (2018) confirmed the presence of peroxisomes in protists with the so-called complex plastids. In contrast to yeast, plant, and mammalian cells, little is known about the peroxisomal participation in metabolic networks within the cell in unicellular microalgae.

In this work, heterologous localization studies of candidate proteins from *G. theta* with a putative C-terminal peroxisomal targeting signal type 1 (PTS1) were performed in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. This allowed the colocalization with the peroxisomal marker (mRuby3-SKL) of putative PTS1-proteins that might be involved in important metabolic processes such as carbohydrate, ether phospholipid, nucleotide, vitamin K, ROS, amino acid, and amine metabolism. In addition, *G. theta* homologs to factors of peroxisomal β -oxidation, the glyoxylate cycle, and photorespiration were analyzed *in silico*, and candidates with PTS1-like sequences were localized in *P. tricornutum*. Colocalization of these *G. theta* homologs with mRuby3-SKL was not observed heterologously and it is likely that the glyoxylate cycle in *G. theta* does not localize peroxisomally and that *G. theta* peroxisomes are not involved in photorespiration. Furthermore, the β -oxidative degradation of fatty acids in *G. theta* is probably exclusively mitochondrial.

In the second part of this work, comparative genomic analyses of selected chlorophytes, rhodophytes, and glaucophytes identified putative peroxin sequences, indicating the presence of functional peroxisomes in most organisms analyzed in this study. Furthermore, *in silico* analyses indicate that in chlorophytes and glaucophytes PTS2-containing proteins might be present and imported into peroxisomes in addition to PTS1-proteins. The PTS2 is an N-terminal nonapeptide and is less abundant compared to PTS1.

I EINLEITUNG

I.1 Entstehung der komplexen Plastide durch sekundäre Endosymbiose

Unter dem Begriff Plastide wird ein Organell eukaryotischer Zellen verstanden, welches aus endosymbiontisch lebenden Zellen entstanden ist. Es wird zwischen primären, sekundären und tertiären Plastiden unterschieden. Die Plastiden können verschiedene Funktionen in der Zelle ausführen wie z. B. die Photosynthese, die Biosynthese von Fettsäuren oder dienen als Speicherort für Lipide, Stärke oder Proteinen (Rolland et al. 2018; Sadali et al. 2019; Nonoyama et al. 2019). Die Plastide ist von mindestens zwei Membranen umgeben; die Anzahl der Membranen lässt sich auf eine oder mehrere Endosymbiosen zurückführen, was im Folgenden näher erläutert wird.

Bereits 1883 erkannten Wissenschaftler, dass die Plastide in der Vergangenheit ein frei lebender Organismus gewesen sein könnte (Schimper 1883). Diese erste Endosymbiontentheorie (früher bekannt als Symbiogenese) wurde durch den russischen Wissenschaftler Konstantin Mereschkowsky aufgegriffen, da er eine Ähnlichkeit zwischen der Plastide und den Cyanobakterien erkannte (Mereschkowsky 1905). Die moderne Endosymbiontentheorie wurde jedoch erst durch Lynn Sagan (später Margulis) im Jahr 1967 bekannter (Sagan 1967). Heutzutage glauben viele Wissenschaftler, dass die Mitochondrien der Eukaryoten durch die Aufnahme eines α -Proteobakterium von einer Archaea und die primäre Plastide durch die Aufnahme eines Cyanobakteriums von einem heterotrophen Eukaryoten entstanden sind. Primäre Plastiden sind von zwei Membranen umgeben, die den Membranen des phagozytierten Cyanobakteriums entsprechen (Cavalier-Smith 2000). Durch die primäre Endosymbiose entstanden Glaucophyta, Rhodophyta und Chlorophyta (Abb. I-1) (Gentil et al. 2017; Archibald 2015a). Eine Besonderheit stellt die Amöbe *Paulinella* spp. (Rhizaria) dar: es wird vermutet, dass eine ancestrale heterotrophe *Paulinella* Zelle ein α -Cyanobakterium phagozytierte, wodurch die *Paulinella* Chromatophoren entstanden (Abb. I-1) (Gentil et al. 2017; Delaye et al. 2016; Nowack et al. 2016).

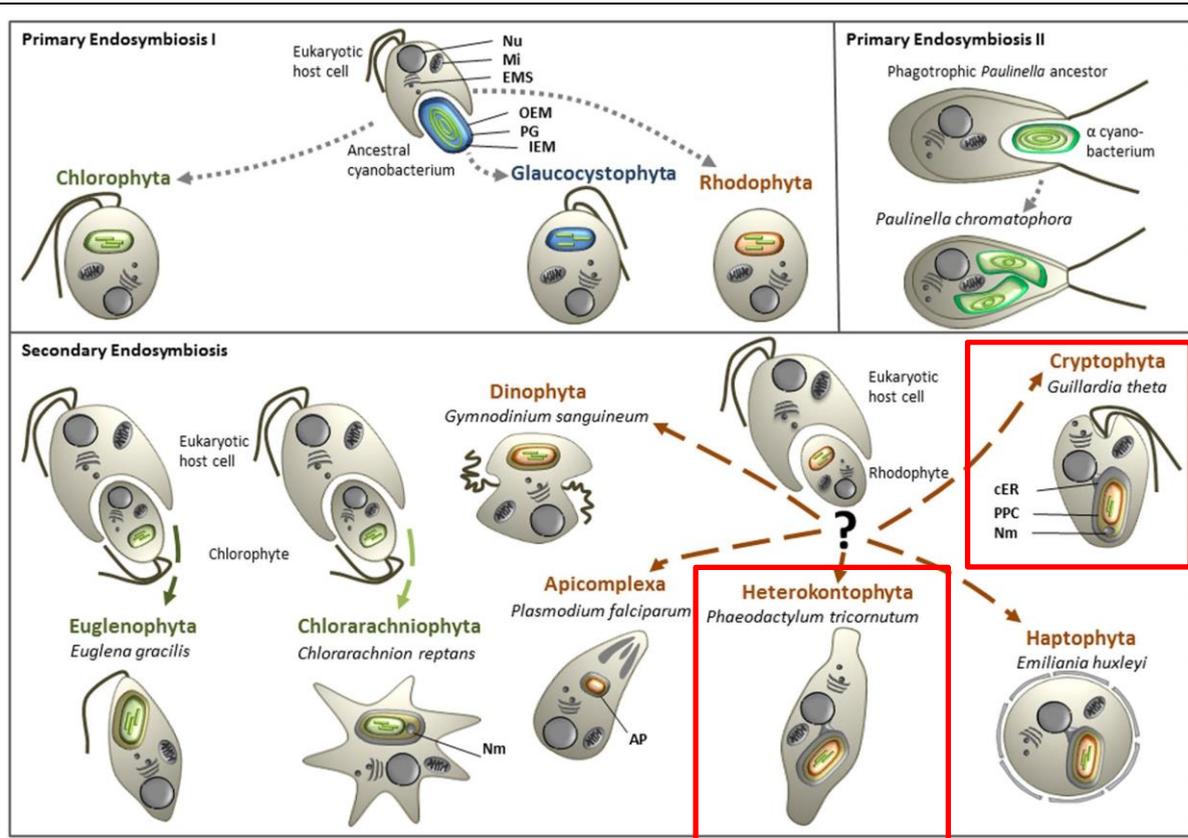


Abb. I-1: Entstehung der komplexen Plastide

Durch die Phagozytose eines ancestralen Cyanobakteriums durch einen heterotyphen Eukaryoten entstanden die Glaucophyta, Rhodophyta und Chlorophyta (primäre Endosymbiose I). Die primäre Endosymbiose II beschreibt die Entstehung der Chromatophore von Paulinella, indem eine ancestrale Paulinella Zelle ein α -Cyanobakterium phagozytierte. Durch die sekundäre Endosymbiose entstanden Eukaryoten mit komplexen Plastiden. Für mehr Information siehe Text.

Nu Nucleus, **Mi** Mitochondrium, **EMS** Endomembransystem, **OEM** outer envelop membrane, **IEM** inner envelop membrane, **PG** Peptidoglycan, **ER** Endoplasmatischen Retikulum, **cER** Chloroplasten-ER, **AP** Apiplast (modifiziert nach Gentil et al. 2017).

Plastiden mit drei oder vier Membranen werden als komplexe Plastide bezeichnet und sind durch sekundäre Endosymbiose entstanden (Archibald 2015b, 2015a; Gentil et al. 2017; Grisdale und Archibald 2017). Dabei phagozytiert ein heterotropher Eukaryot einen photosynthetisch aktiven Eukaryoten chlorophytischen oder rhodophytischen Ursprungs. Plastiden der Euglenophyta und Chlorarachniophyta stammen von den Chlorophyta ab, während die Plastiden der Dinophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Heterokontophyta und der photosynthetisch inaktiver Apicomplexa rhodophytischen Ursprungs sind (Gentil et al. 2017; McFadden 2014). Die beiden äußeren plastidären Membranen der komplexen Plastide mit vier Membranen stammen vermutlich von der Wirtszelle ab, während die beiden inneren Membranen die ursprünglichen Membranen der primären Plastide darstellen (Cavalier-Smith 2000; Stoebe und Maier 2002; Gould et al. 2015). Während der sekundären Endosymbiose

wurde das Symbiontengenom der phagozytierten Chlorophyta oder Rhodophyta (sekundärer Endosymbiont) stark reduziert und Gene wurden durch den endosymbiontischen Gentransfers (EGT) in das Wirtsgenom übertragen, was in den meisten Fällen zum Verlust des sekundären Symbionten-Nucleus führte (Gentil et al. 2017). Chlorarachniophyten und Cryptophyten dagegen weisen einen stark reduzierten sekundären Symbionten-Nucleus zwischen der zweiten und der dritten Membran im periplastidären Kompartiment (PPC) auf, welcher als Nucleomorph bezeichnet wird (Abb. I-1) (Curtis et al. 2012; Zauner et al. 2019; Greenwood 1977; Maier et al. 2000). Da die meisten plastidären Proteine Kern-codiert sind, müssen diese über die plastidäre Membranen unter anderem mit Hilfe einer Symbionten-spezifischen Transportmaschinerie, dem so genannten SELMA-Komplex (*symbiont-specific ERAD-like machinery*), transportiert werden (Bolte et al. 2011). Der SELMA-Komplex lokalisiert in der zweiten äußeren Membran komplexer Plastiden und transportiert die Vorgänger-Proteine in das PPC (Hempel et al. 2009; Hempel et al. 2010). Cryptophyta, Heterokontophyta und Haptophyta weisen eine weitere Besonderheit auf: das Chloroplasten-ER (cER) geht in das Wirt-ER über, welches mit der Kernhülle in Kontinuum steht (Abb. I-1) (Gentil et al. 2017). Die Entstehung der Kontinuität des Wirts-ER mit dem cER (äußerste Membran) der komplexen Plastide von Cryptomonaden, Haptophyta und Heterokontophyta lässt sich mit unterschiedlichen Modellen erklären (Melkonian 1996; Cavalier-Smith 2000; Gould et al. 2015). Das Modell von Gould et al. 2015 schlägt den Verlust von phagosomaler Membran und der äußeren Membran des sekundären Endosymbionten vor, nachdem der sekundäre Endosymbiont durch das Wirt-ER umgeben war (Gould et al. 2015). Durch die Reduktion des Symbiontengenoms zum Nucleomorph, wurde vermutlich auch der SELMA-Komplex vom Symbionten-ER zur periplastidären Membran (zweite äußere Membran der komplexen Plastide) verlagert (Gould et al. 2015).

I.2 Die Cryptomonade *Guillardia theta*

Die Cryptomonade *Guillardia theta* ist ein biflagellater Einzeller und besitzt ein Furchen-Schlund-System (Hill und Wetherbee 1990). Die einzige Plastide von *G. theta* ist von Thylakoiden durchzogen und besitzt zusätzlich ein Pyrenoid (Abb. I-2) (Hill und Wetherbee 1990). In Pyrenoiden wird hauptsächlich CO₂ fixiert und weitere Reservestoffe wie Stärke abgelagert, wodurch ein Stärkekorn im periplastidären Kompartiment (PPC) entsteht (Abb. I-2) (Hill und Wetherbee 1990). *G. theta* entstand durch eine sekundäre Endosymbiose, durch die Aufnahme einer rhodophytischen Zelle durch einen Eukaryoten und besitzt eine komplexe Plastide, die von insgesamt vier Membranen umgeben ist (Abb. I-2) (Gentil et al. 2017; Archibald 2015a). Im Gegensatz zu den meisten Protisten mit komplexen Plastiden, besitzt *G. theta* einen Nucleomorph (NM), ein stark reduziertes Nucleus-Genom des sekundären Symbionten, welches sich im (PPC) zwischen der zweiten und der dritten Membran befindet (Abb. I-2) (Archibald 2015a; Curtis et al. 2012). Eine weitere Besonderheit ist die Verbindung zwischen dem Wirts-ER und des cER (Chloroplasten ER) der Plastide (Abb. I-2) (Curtis et al. 2012) (siehe Kapitel I.1).

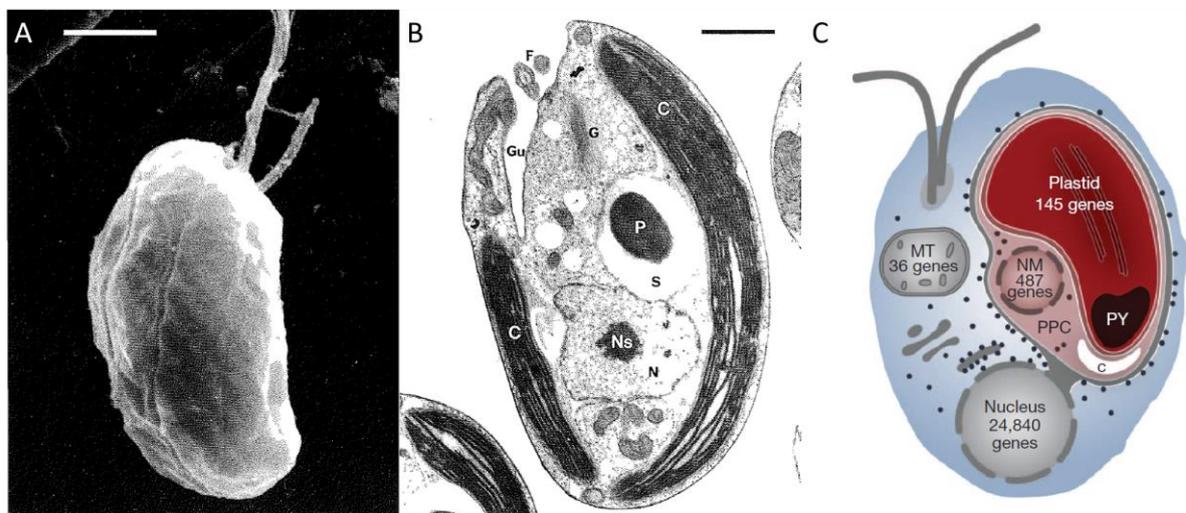


Abb. I-2: Die Cryptomonade *Guillardia theta*

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Cryptomonade *Guillardia theta* (A) und von longitudinalen Dünnschnitten (B). In (C) ist eine schematische Darstellung von *G. theta* gezeigt.

C Chromtophor (Plastide), **F** Flagellen, **G** Golgi, **Gu** Schlund, **N** Nucleus, **Ns** Nukleolus, **P/Y** Pyrenoid, **S/C** Stärke, **MT** Mitochondium, **NM** Nucleomorph, Maßstab 2 µm (Abbildungen A und B modifiziert nach Hill und Wetherbee, 1990; Abbildung C modifiziert nach Curtis et al., 2012).

Das komplette Kern-Genom der Cryptomonade sowie die Genome der Plastide, der Mitochondrien und des Nucleomorphs sind vollständig sequenziert (Curtis et al. 2012). Im Kern sind auf etwa 87 Mb (Mega-Basenpaare) über 24000 Proteine codiert (Curtis et al. 2012). Davon sind mehr als 85 % mit RNA-Seq Daten bestätigt worden. Etwa 51% von den vorhergesagten Gensequenzen sind *G. theta* spezifisch; sie weisen keine Homologien zu anderen bekannten Sequenzen auf. Im Vergleich zu den Diatomeen *Thalassiosira pseudonana* und *Phaeodactylum tricornutum* sind die *G. theta* Gene reich an Introns (über 80 %) und es existieren sehr viele paraloge Gene (Curtis et al. 2012). Die funktionelle Vorhersage aller putativen Proteine der Cryptomonade über 97 % der eukaryotischen Gene abdeckt (Curtis et al. 2012). Dazu gehören Komponenten des Endomembransystems, der Transkriptions- und Translationsmaschinerie, sowie Proteine involviert in post-transnationalen Modifikationen und Protein-Turnover. Im Nucleomorph Genom sind 487 Proteine codiert (Douglas et al. 2001), welche unter anderem Housekeeping- und einige plastidäre Proteine codieren (Curtis et al. 2012).

Da das Genom der Cryptomonade vollständig sequenziert ist, rückte *G. theta* in den Vordergrund für zellbiologische Studien als Modellorganismus der Cryptomonaden. Erste Untersuchung der metabolischen Prozesse in der Cryptomonade weisen auf das Vorhandensein von Peroxisomen, die in erster Linie für Zell-Detoxifizierung verantwortlich sind, hin (siehe Kapitel I.4 und Tab. I-1) (Mix et al. 2018). Für *G. theta* konnten bisher keine Transformationsmethoden etabliert werden, so dass die Expression modifizierter Gensequenzen, wie z. B. Fusionen an Fluoreszenzmarkergene, für *in vivo* Lokalisationsstudien zurzeit in *G. theta* nicht möglich ist. Aufgrund des evolutionären Ursprungs der komplexen Plastide und der ähnlichen intrazellulären Subkompartimentierung werden die Lokalisationsstudien der *G. theta* Proteine in der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* (siehe Kapitel I.3) durchgeführt (Mix et al. 2018; Vasilev et al. 2022).

I.3 Die Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* als Modelorganismus

Diatomeen mit photosynthetisch aktiven Plastiden tragen etwa 20 % zur Primärproduktion bei (Falkowski et al. 1998; Field et al. 1998). Ein Merkmal von Diatomeen ist die Ausbildung einer aus Silikat bestehenden Zellwand; sie werden daher auch als Kieselalgen bezeichnet. Ein Vertreter der Diatomeen ist *Phaeodactylum tricornutum* mit einer komplexen Plastide, die von vier Membranen umgeben ist (Abb. I-1) (Gentil et al. 2017). Im Gegensatz zu *G. theta* besitzt *P. tricornutum* keinen Nucleomorph im PPC; die Zellkompartimentierung beider Protisten ist dennoch sehr ähnlich (Archibald 2015b; Gentil et al. 2017).

Das Genom von *P. tricornutum* mit etwa 27 Mb ist vollständig sequenziert und codiert über 10000 Proteine (Bowler et al. 2008). *P. tricornutum* kann in vier verschiedenen Morphotypen vorkommen: oval, fusiform, triradiat und cruciform (Abb. I-3) (Tesson et al. 2009; He et al. 2014). Die in Studien eingesetzten Stämmen werden am häufigsten Zellen als ovaler oder fusiformen Morphotyp beobachtet, wobei *in vivo* Studien in fusiformen *P. tricornutum* Zellen am besten etabliert und untersucht sind (Gonzalez et al. 2011; Liu et al. 2016; Mix 2017; Moog et al. 2019). Durch relativ kurze Generationszyklen und einem kleinen Genom, eignet sich die Diatomee für molekularbiologische Studien als einer der Vertreter für Mikroalgen mit komplexen Plastiden als Modelorganismus. Für *P. tricornutum* wurden Transfektionsmethoden zur Integration von Fremd-DNA und deren Expression etabliert: biolistische Transfektion mittels Genkanone, Elektroporation, CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated*) und TALEN (*Transcription Activator-Like Effector Nuclease*) (Zaslavskaja et al. 2000; Bozarth et al. 2009; Butler et al. 2020; Stukenberg et al. 2018).

P. tricornutum spielt z. B. in der Erforschung des SELMA-Komplexes eine wichtige Rolle (Bolte et al. 2011; Stork et al. 2012; Flori et al. 2016), wird aber auch in Studien zur Produktion von Antikörpern oder zum Abbau von PET (Polyethylenterephthalat) durch Expression und Sekretion des Enzyms PETase eingesetzt (Hempel et al. 2011; Hempel und Maier 2012; Moog et al. 2019). Studien verschiedener metabolischer Prozesse führten unter anderem zur Identifizierung von Peroxinen (Pex), Peroxisom-spezifischer Proteine, die zur Biogenese und Erhaltung von Peroxisomen beitragen (siehe Kapitel I.4 und Tab. I-1) (Gonzalez et al. 2011; Mix et al. 2018). Des Weiteren sind in der Diatomee Marker-Proteine für Kollokalisationsstudien etabliert (Liu et al. 2016; Marter et al. 2020). So sind z. B. in dem *P. tricornutum* mRuby3-SKL

Stamm Kolokalisation studien mit dem peroxisomalen Marker mRuby3-SKL möglich (Marter et al. 2020).

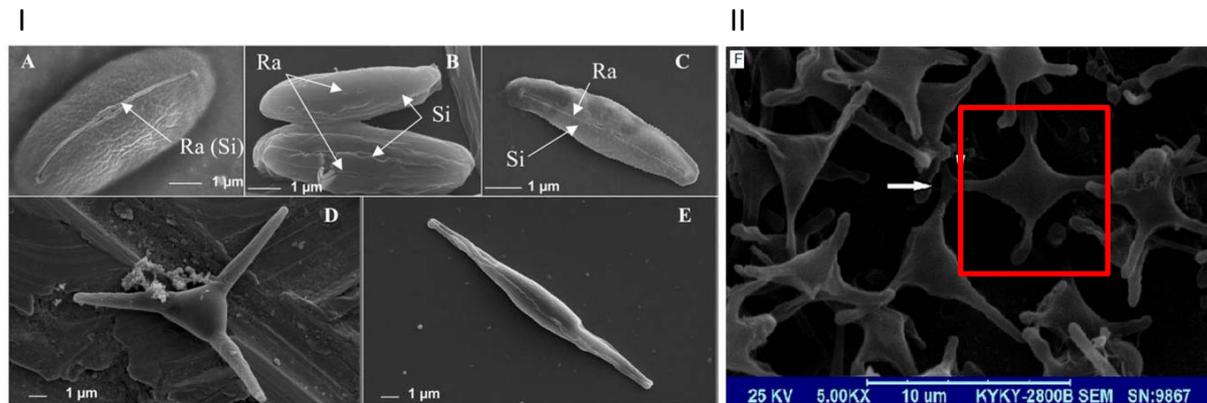


Abb. I-3: Die Morphotypen von *P. tricornutum*

In I A-E sind elektronenmikroskopische Aufnahmen der drei häufigsten Morphotypen von *P. tricornutum* dargestellt: A-C ovale Form, D triradiate Form, E fosiiforme Zelle (Abbildung aus Tesson et al., 2009). In II F ist im roten Kasten der Aufnahme der seltene cruciforme Morphotyp von *P. tricornutum* zu sehen (Abbildung modifiziert nach He et al., 2014).

I.4 Peroxisomen: ubiquitäre eukaryotische Organellen mit dynamischer Funktion

Peroxisomen sind von einer Membran umgebene Organellen und kommen nahezu ubiquitär in den Eukaryoten vor (Platta und Erdmann 2007; Bolte et al. 2015; Reumann und Bartel 2016; Moog et al. 2017). Erstmals wurden Peroxisomen als „Microbodies“ in Zellen der Mäusenieren beschrieben (Rhodin 1954) und sind noch heute Gegenstand wissenschaftlicher Studien in Säugetieren, Pilzen, Pflanzen und Algen (Mix 2017; Vasilev et al. 2022; Kato et al. 2022). Peroxisomen sind maßgeblich an der Synthese und der Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), unter anderem Wasserstoffperoxid (H_2O_2), beteiligt (de Duve und Baudhuin 1966). Die meisten Eukaryoten verfügen über eine peroxisomal lokalisierte Katalase, welche das meist als Nebenprodukt generierte H_2O_2 rasch zu Wasser und Sauerstoff umsetzen kann (Pieuchot und Jedd 2012). Peroxisomen sind nicht nur in Bezug auf die Größe und die Häufigkeit in verschiedenen Organismen und Zelltypen sehr dynamisch, sondern ebenfalls in Bezug auf die Stoffwechselkapazitäten (Gabaldón 2010; Hu et al. 2012). Unter Stressbedingungen wird in *Chlamydomonas reinhardtii* nicht nur die Peroxisom-Proliferation hochreguliert, sondern auch die Stoffwechselkapazität kann angepasst werden (Sandalio et al. 2021; Kato et al. 2022).

Lange wurde kontrovers über die den evolutionären Ursprung von Peroxisomen diskutiert. Die Vermutung liegt nahe, dass der peroxisomale Ursprung mit der Anreicherung der Atmosphäre mit Sauerstoff zusammenhängt (de Duve 1969). Da Peroxisomen im Vergleich zu Mitochondrien und Plastiden kein eigenes Genom und keine Transkriptionsmaschinerie besitzen, ist ein endosymbiontischer Ursprung eher unwahrscheinlich. Vermutlich hat die peroxisomale Membran ihren Ursprung in der Abknospung von der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), wobei ein einziger evolutionärer Ursprung vermutet wird (Schlüter et al. 2006; Gabaldón et al. 2006; Bolte et al. 2015). In einem zusammenfassenden Artikel von Mohanty und McBride (2013) wird ebenfalls ein Beitrag der Mitochondrien an der Entstehung der peroxisomalen Membran diskutiert.

An der Biogenese, dem Erhalt und dem Transport peroxisomaler Proteine sind die sogenannten Peroxine (Pex) beteiligt, die in unterschiedlichen Organismen konserviert sind (Michels et al. 2005). Es wurden in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* 34 Pex identifiziert (Platta und Erdmann 2007, S. 475; Smith und Aitchison 2013), wobei ein minimaler Kernsatz an *pex* Genen für funktionale Peroxisomen vorhanden sein muss (Mix et al. 2018). Mutationen in *pex* Genen können zu Beeinträchtigung der peroxisomalen Funktion führen (Pieuchot und Jedd 2012; Erdmann und Blobel 1995) und zur Letalität des Organismus (Goldfischer et al. 1973). Ein bekanntes Beispiel ist das „Zellweger-Syndrom“, eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit, bei welcher Mutationen in den *pex* Genen zu nicht-funktionalen Peroxisomen und zum Tod führen (Goldfischer et al. 1973; Heymans et al. 1983).

Neben der Abschirmung und dem Abbau von H_2O_2 beherbergen Peroxisomen weitere wichtige Stoffwechsel-Enzyme. So können Peroxisomen unter anderem an der β -Oxidation von Fettsäuren, an der Photorespiration oder dem Glyoxylat-Zyklus beteiligt sein (siehe Kapitel I.4.4) (Sandalio et al. 2021; Pan et al. 2020; Michels et al. 2005). Neben den Peroxisomen werden „Woronin Bodies“ in filamentösen Pilzen (Markham und Collinge 1987; Pieuchot und Jedd 2012), Glycosomen in Kinetoplastiden (Opperdoes und Borst 1977) und Glyoxysomen in höheren Pflanzen, Pilzen und einigen Protisten (Breidenbach und Beevers 1967; Tolbert und Essner 1981; Kunze und Hartig 2013) unterschieden. Namensgebend für die Glyoxysomen ist die Spezialisierung auf den Glyoxylat-Zyklus zur Bildung von Succinat (Schnarrenberger und Martin 2002), wobei Glycosomen hauptsächlich Enzyme für den Kohlenhydrat-Metabolismus und die Glykolyse beherbergen (Moyersoen et al. 2004).

I.4.1 Biogenese von Peroxisomen

Je nach Zelltyp und Organismus kann die Anzahl an Peroxisomen pro Zelle drastisch variieren. Umso wichtiger ist die Biogenese, Erhalt und Verteilung von Peroxisomen für eine effiziente Detoxifizierung von Zellen. Peroxisomen können als Vorläufer-Vesikel entweder *de novo* von dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) abgeschnürt oder durch Wachstum und Fragmentierung generiert werden (Abb. I-4) (zusammengefasst in Pieuchot und Jedd 2012).

Die Neubildung von Peroxisomen ist eine Abfolge von mehreren Prozessen. Eine Möglichkeit für die Peroxisom-Biogenese ist die Proliferation beschrieben durch das Wachstums-Teilungs-Modell (Lazarow und Fujiki 1985). Dabei spielt der Proliferationsfaktor Pex11 eine wesentliche Rolle bei der Elongation von Peroxisomen. Das Fehlen von Pex11 in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* resultierte in einer kleineren Anzahl und vergrößerten Peroxisomen (Erdmann und Blobel 1995). In *S. cerevisiae* können auch weitere Peroxine (Pex25, Pex17) an der Proliferation von Peroxisomen beteiligt sein, die ähnliche Eigenschaften wie Pex11 aufweisen (Rottensteiner et al. 2003). Die *pex11* Expression wird durch die Proliferation von Peroxisomen induziert (Smith et al. 2002; van Zutphen et al. 2010) und ist in Hefe unter anderem durch Phosphorylierung reguliert (Saleem et al. 2008; Knoblach und Rachubinski 2010). In *A. thaliana* wurden fünf Pex11 Proteine beschrieben, die in Abhängigkeit von biotischen Stressfaktoren hochreguliert werden und somit die Peroxisom-Proliferation induzieren (Sandalio et al. 2021). Nach der Elongation bedingt durch das Pex11, wird die Teilung der Peroxisomen durch GTPasen induziert. Dabei oligomerisieren Dynamin-ähnliche Proteine (DRP, *dynamin-related protein*) mit der GTPase-Aktivität um die peroxisomale Membran, so dass eine ringförmige Struktur entsteht. Nach der GTP-Hydrolyse entstehen nach der Abschnürung neue Peroxisomen (Abb. I-4) (Praefcke und McMahon 2004).

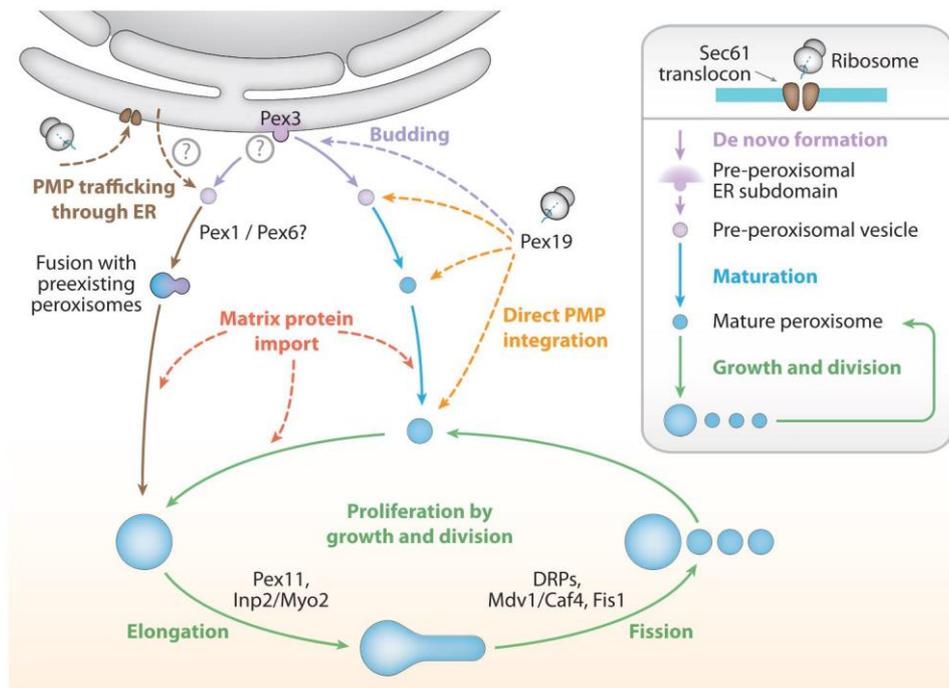


Abb. I-4: Peroxisom-Biogenese im Überblick

Peroxisomen können entweder durch Wachstum und Teilung proliferieren oder direkt *de novo* vom ER als Vorläufer-Vesikel abgeschnürt werden. Bei der *de novo* Bildung werden PMPs zum Teil über das ER in die peroxisomale Membran und zum Teil durch das Pex19 eingebaut, wodurch Vorläufer-Peroxisomen entstehen. Durch den post-translationalen Transport der peroxisomalen Matrixproteine und der Fusion mit bestehenden Proteinen wachsen Peroxisomen heran. Pex11 fördert das Wachstum und die Elongation von Peroxisomen, während DRPs neue Peroxisomen abschnüren.

PMP peroxisomales Membranprotein, **ER** Endoplasmatisches Retikulum, **DRP** *dynamamin-related protein* (Abbildung aus Pieuchot und Jedd, 2012).

Einige Komponenten peroxisomaler Membranen weisen Glykosilierungen auf, welche in der Regel im Lumen des ERs stattfinden. Dies deutet auf eine direkte Übertragung von einigen peroxisomalen Membranproteinen (PMP) vom ER auf Peroxisomen hin (Pieuchot und Jedd 2012). Vor allem trifft dies für den peroxisomalen Anker Pex3 zu, welcher als Docking-Komplex für den löslichen Rezeptor Pex19 fungiert (Hoepfner et al. 2005; Tam et al. 2005). In Pex3-GFP Lokalisationsstudien in Hefen wurde das Fusionsprotein zunächst im ER und anschließend in kreisförmigen Organellen beobachtet (Hoepfner et al. 2005). Für die Biogenese peroxisomaler Membranen spielen Pex3 und Pex19 eine entscheidende Rolle, da in Komplementationsstudien in Hefezellen von *pex3* und *pex19* Deletionsmutanten mit dem Wildtypgen die Neubildung von Peroxisomen beobachtet wurde (Tam et al. 2005; Pieuchot und Jedd 2012).

I.4.2 Peroxine

Peroxine (Pex) sind Peroxisom-spezifische Proteine, die für die Biogenese, den Erhalt und den Import peroxisomaler Proteine verantwortlich sind; einige Pex können jedoch auch im ER vorkommen. Insgesamt sind in *S. cerevisiae* 34 Peroxine bekannt (Smith und Aitchison 2013). Die meisten Peroxine sind in Pilzen gut beschrieben und dienen als Anhaltspunkt für ihre Funktion in anderen Organismen. Es wurde gezeigt, dass für funktionale Peroxisomen ein bestimmter Kernsatz an Peroxinen vorhanden sein muss (Tab. I-1) (Gonzalez et al. 2011; Mix et al. 2018; Moog et al. 2017). Dazu gehören nicht nur die cytosolischen Rezeptoren Pex5, Pex7 und Pex19, sondern auch integrale Membranproteine der Peroxisomen als Rezeptoren oder Docking-Komplex und Membrananker (Pex16, Pex13, Pex14, Pex22) und Peroxine für das Recycling der Rezeptoren (Pex4, Pex12, Pex1, Pex6). Für die Peroxisom-Proliferation ist Pex11 verantwortlich, welches oft in mehreren Isoformen vorkommt (siehe Kapitel I.4.1) (Mix et al. 2018; Sandalio et al. 2021).

Tab. I-1: Übersicht über Peroxine in *G. theta* und *P. tricornutum*

Peroxin	Funktion	Gt ^a	Pt ^b
Pex1	AAA ATPase	+	+
Pex2	Ubiquitin-Ligase	+	+
Pex3	Lokalisierung und Stabilisation von PMPs	+	+
Pex4	Ubiquitin-Konjugations-Enzym	+	+
Pex5	Rezeptor für PTS1-Proteine	+	+
Pex6	AAA ATPase	+	+
Pex7	Rezeptor für PTS2-Proteine	+	nd
Pex10	Ubiquitin-Ligase	+	+
Pex11	Peroxisom Teilung und Proliferation	+2	+
Pex12	Ubiquitin Ligase	+	+
Pex13	Docking-Komplex der peroxisomalen Membran	nd	nd
Pex14	Docking-Komplex der peroxisomalen Membran	+	nd
Pex16	Rezeptor für Typ II PMPs und peroxisomale Biogenese	+	+ ^a
Pex19	Rezeptor für Typ I PMPs	+2	+
Pex22	Membrananker für Pex4	+	nd

Gt *Guillardia theta* CCMP2712, Pt *Phaeodactylum tricornutum* CCAP 1055/1, + eine Isoform vorhanden, +2 zwei Isoformen vorhanden, nd nicht identifiziert, PMP peroxisomale Membranproteine, a Mix et al. 2018, b Gonzalez et al. 2011

In der Cryptomonade *G. theta* wurde der Kernsatz der Peroxine identifiziert, was auf das Vorhandensein von Peroxisomen schließen lässt (Tab. I-1) (Mix et al. 2018). Dabei wurden jeweils zwei Isoformen für den Proliferationsfaktor Pex11 und den cytosolischen Rezeptor Pex19 für den Import peroxisomaler Membranproteine (PMP) identifiziert (Mix et al. 2018). Im Gegensatz zu *G. theta* scheint das Pex7, welches für den Import für Proteine mit PTS2 (peroxisomales Zielsteuerungssignal Typ 2) verantwortlich ist, in *P. tricornutum* zu fehlen (Gonzalez et al. 2011). Des Weiteren wurden bioinformatisch bisher keine Pex13 und Pex14 in *P. tricornutum* charakterisiert (Tab. I-1) (Gonzalez et al. 2011). *In vivo* Lokalisationsstudien von PTS1-Proteinen in *P. tricornutum* weisen jedoch darauf hin, dass peroxisomaler Import möglich ist und somit entsprechende Docking-Proteine vorhanden sein sollten (Gonzalez et al. 2011).

I.4.3 Peroxisomaler Import

Peroxisomale Proteine sind im Kern codiert und werden post-translational in die Peroxisomen transportiert, wobei einige Pex direkt am ER entstehen und durch Abschnürung von Vorläufer-Vesikeln in die peroxisomale Membran eingebaut werden (siehe Kapitel I.4.1). Bei dem post-translationalen Import löslicher Proteine entsteht vermutlich eine transiente Pore in der peroxisomalen Membran (Erdmann und Schliebs 2005), die den Transport von vollständig gefalteten Proteinen und sogar kleineren Komplexen ermöglicht (Erdmann und Schliebs 2005; Schrader und Fahimi 2008). Die Transportmaschinerie ähnelt dem ERAD (Endoplasmatisches Retikulum-assoziierte Protein-Degradation)-System, das missgefaltete Proteine über Ubiquitinierung aus dem ER entfernt und dem proteasomalen Abbau zuführt (Gabaldón et al. 2006; Schlüter et al. 2006; Bolte et al. 2011; Kienle et al. 2016). Für den peroxisomalen Import spielen peroxisomale Zielsteuerungssignale (PTS, *peroxisomal targeting signals*) eine wichtige Rolle, wobei auch PTS-unabhängiger Import z. B. durch den *piggy-back* Mechanismus möglich ist. Die PTS sind entweder N- oder C-terminal und werden von den entsprechenden Rezeptoren im Cytosol erkannt, woraufhin die Proteine zu den Peroxisomen transportiert werden (Kim und Hettema 2015; Rucktäschel et al. 2011). Peroxisomale Membranproteine (PMP) können entweder über einen cytosolischen Rezeptor erkannt und wie die peroxisomalen Matrixproteine zu der in der peroxisomalen Membran befindlichen Import-Maschinerie geführt werden (siehe Kapitel I.4.3.2) oder sie werden direkt über das

endoplasmatische Retikulum (ER) über den Vesikeltransport in die peroxisomale Membran eingebracht (siehe Kapitel I.4.1) (Pieuchot und Jedd 2012).

I.4.3.1 Import peroxisomaler Matrixproteinen mit PTS1 und PTS2 Motiven

Das am häufigsten vorkommende PTS1 besteht aus einem C-terminalen Tripeptid mit der Konsensussequenz [SAC]-[KRH]-[LM] (Gould et al. 1989; Brocard und Hartig 2006). Das PTS1 wird von dem cytosolischen Rezeptor Pex5 erkannt und zur peroxisomalen Membran transportiert (Abb. I-5) (Rucktäschel et al. 2011). Das N-terminale PTS2 ist ein Nonapeptid mit dem [RK]-[LVIQ]-X₅-[HQ]-[LAF] Konsensus, das sich in den ersten 50 Aminosäuren einer Proteinsequenz befindet und nach dem Import abgespaltet wird (Osumi et al. 1991; Swinkels et al. 1991; Petriv et al. 2004; Rucktäschel et al. 2011; Kunze et al. 2015). Für die Erkennung und den Transport von PTS2-Proteinen zu der peroxisomalen Membran ist der Pex7 Rezeptor verantwortlich (Smith und Aitchison 2013; Platta et al. 2014; Reumann und Bartel 2016). Im Gegensatz zu Pex5, benötigt Pex7 einen Co-Faktor für die vollständige Funktionalität (Abb. I-5) (Kunze et al. 2015; Mix et al. 2018). Diesen Co-Faktor kann z. B. eine längere Version des PTS1-Rezeptors Pex5L darstellen (Kunze et al. 2015; Freitag et al. 2012; Meinecke et al. 2016). In Hefen können auch Pex20p, Pex18p, und Pex21p als Co-Faktoren für den Pex7 Rezeptor fungieren (Braveman et al. 1998; Meinecke et al. 2016).

Pex5 ist nicht nur als PTS1-Rezeptor und Co-Faktor für Pex7 von Bedeutung, sondern ist ebenfalls an der Bildung der transienten Pore bei dem Import peroxisomaler Proteine verantwortlich (Abb. I-5 A) (Erdmann und Schliebs 2005; Meinecke et al. 2010). Dabei bindet Pex5 über WxxxF Domänen an die integralen Membran-Peroxine Pex13 und Pex14 (Schliebs et al. 1999; Otera et al. 2002; Moog et al. 2017). In *G. theta* wurde *in silico* nur ein Homolog zu Pex14 identifiziert (Tab. I-1) (Mix et al. 2018). Über eine transiente Pore wird das PTS1-Cargo in die peroxisomale Matrix abgegeben und Pex5 anschließend recycelt (Abb. I-5). Dabei wird das Pex5 vom membranständigen RING-Komplex, monoubiquitiniert. Der RING-Komplex besteht aus den Ubiquitin-Ligasen Pex2, Pex10, Pex12 dem dem Ubiquitin-Konjugations-Enzym Pex4, das an den Membrananker Pex22 gebunden ist. Durch zwei cytosolische AAA ATPasen, Pex1 und Pex6, wird Pex5 unter ATP-Verbrauch wieder in das Cytosol abgegeben (Pieuchot und Jedd 2012; Smith et al. 2012; Sandalio et al. 2021).

I.4.3.2 Import peroxisomaler Membranproteine (PMP)

Der Import von peroxisomalen Membranproteinen (PMPs) kann aufgrund unterschiedlicher Import-Strategien in zwei Klassen kategorisiert werden. Die PMPs der Klasse I werden über Membran-PTS (mPTS) durch den Pex19 Rezeptor im Cytosol erkannt, zu dem integralen Pex3 transportiert und anschließend in die Membran eingebaut (Abb. I-5 B) (Fujiki et al. 2006; Rucktäschel et al. 2011). Die PMPs der Klasse II dagegen werden direkt über die Integration in die ER Membran zu der peroxisomalen Membran transportiert (Kim und Hettema 2015; Mayerhofer 2016). An diesem Vorgang sind neben dem Pex16 Rezeptor vermutlich auch Sec61 und Get3 beteiligt (Kim und Hettema 2015; Mayerhofer 2016). Der Pex16 Rezeptor spielt auch bei der Biogenese von Peroxisomen eine wichtige Rolle (siehe Kapitel I.4.1)

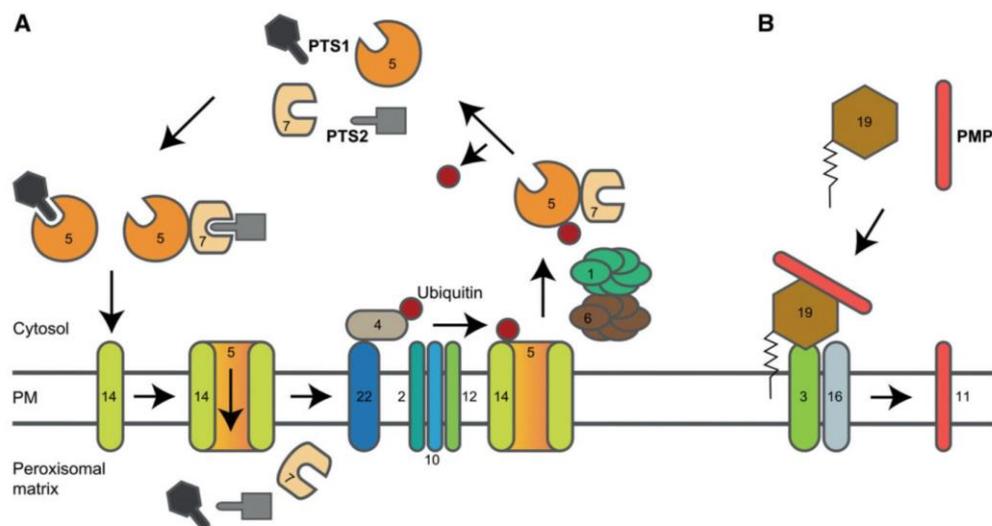


Abb. I-5: Peroxisomaler Import in *G. theta*

Der Import peroxisomaler Matrixproteine (A) erfolgt über die Bindung der cytosolischen Rezeptoren Pex5 (PTS1-Proteine) oder Pex7 (PTS2-Proteine). Anders als Pex5 benötigt Pex7 einen Co-Rezeptor (Pex5) für die Proteintranslokation zu der peroxisomalen Membran. Die beladenen Rezeptoren docken an das integrale Pex14 und es wird eine transiente Pore gebildet, wodurch die PTS1/PTS2-Proteine in die peroxisomale Matrix transportiert werden können. Durch Monoubiquitinierung der Rezeptoren werden diese ATP-abhängig wieder in das Cytosol recycelt. (B) Peroxisomale Membranproteine (**PMP**) werden durch Pex19 im Cytosol gebunden und über den Docking-Komplex aus Pex 3 und Pex16 in die peroxisomale Membran transportiert. Für weitere Details siehe Text.

PM Plasmamembran, **PTS1/2** Proteine mit peroxisomaler Zielsteuerungssequenz Typ 1 oder Typ 2, **Zahlen** stellen Peroxine dar (Abbildung aus Mix et al., 2018).

I.4.4 Typische peroxisomale metabolische Prozesse

Neben der namensgebenden und typischen Hauptfunktion der ROS-Detoxifizierung durch Katalasen und Peroxidasen, sind Peroxisomen an weiteren metabolischen Prozessen beteiligt. Darunter können Enzyme, die am Kohlenhydrat-, Aminosäuren-, Amin- und Purin-Metabolismus, der Etherphospholipid- und Vitamin K-Synthese beteiligt sind, peroxisomal lokalisieren (zusammengefasst in Sandalio et al. 2021).

I.4.4.1.1 ROS-Detoxifizierung durch den Ascorbat-Glutathion Zyklus

In der Regel reduzieren Peroxidasen giftige Peroxide wie z. B. das Wasserstoffperoxid in Entgiftungsreaktionen zu Wasser und Sauerstoff. Für eine effiziente Detoxifizierung von Zellen können Peroxidasen intrazellulär in mehreren Isoformen vorliegen und in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisieren (Amako et al. 1994; Sano et al. 2001; Shigeoka et al. 2002; Ishikawa und Shigeoka 2008). Die Ascorbat-Peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) nutzt in einer H_2O_2 -abhängigen Reaktion L-Ascorbat als Reduktionsmittel und setzt dieses zu Monodehydroascorbat (MDHA) unter Freisetzung von H_2O um. Die ROS-Detoxifizierung durch die APX ist ein wichtiger Reaktionsschritt des Ascorbat (AsA) - Glutathion (GSH) Zyklus (Asada 1992, 1997; Ishikawa und Shigeoka 2008). Dabei wird das entstandene MDHA durch eine MDHA-Reduktase (MDHAR; EC 1.6.5.4) wieder zu AsA reduziert. Alternativ kann MDHA spontan zu AsA und Dehydroascorbat (DHA) disproportionieren. Unter Verwendung von Glutathion (GSH) als Cofaktor wird DHA durch die DHA-Reduktase (DHAR; EC 1.8.5.1) zu AsA recycelt, wobei das oxidierte Glutathion-Disulfid (GSSG) entsteht. Zur Regeneration des oxidierten GSH wird GSSG durch GSH-Reduktase (GR; EC 1.8.1.7) reduziert (Shigeoka et al. 2002; Ishikawa und Shigeoka 2008; Tamaki et al. 2021).

In höheren Pflanzen, einzelligen Grünalgen und Rotalgen, aber auch in Euglenozoa wurde mindestens eine APX Isoform identifiziert (Shigeoka et al. 2002). Dabei wurden nur cytosolische APX Isoformen in *Chlorella* (einzellige Chlorophyte) und *Galdieria* (einzellige Rhodophyte) beschrieben (Takeda et al. 1998; Sano et al. 2001), wobei in *Chlamydomonas* die APX im Stroma der Plastide lokalisiert (Takeda et al. 1997). Neben den plastidären und cytosolischen APX Isoformen wurden ebenfalls peroxisomale APX beschrieben (Yamaguchi et al. 1995).

I.4.4.1.2 Kohlenhydrat-Metabolismus

Malat-Dehydrogenasen (MD; EC 1.1.1.37) katalysieren die reversible Reaktion von Malat zu Oxalacetat und sind an vielen metabolischen Prozessen beteiligt wie z.B. Metabolismus von Kohlenhydraten, TCA- und Glyoxylat-Zyklus (Sweetlove et al. 2010; Ludewig-Klingner et al. 2017; Kroth et al. 2008). Maleinenzyme (ME; EC 1.1.1.38, EC 1.1.1.39, EC 1.1.1.40) decarboxylieren Malat zu Pyruvat (Long et al. 1994; Tronconi et al. 2008). Abhängig von dem Co-Faktor und der Fähigkeit zur Decarboxylierung von Oxalacetat werden MEs in drei Enzym Klassen eingeteilt. Während MEs der EC 1.1.1.40 Klasse NADP nutzen, wird bei EC 1.1.38 und EC 1.1.1.39 NAD als Co-Faktor eingesetzt (Long et al. 1994; Tronconi et al. 2008). Des Weiteren können MEs der EC 1.1.1.39 Oxalacetat decarboxylieren (Long et al. 1994; Tronconi et al. 2008). MDs und MEs können in mehreren Isoformen auf dem Genom codiert sein und in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisieren (Tronconi et al. 2008). In höheren Pflanzen sind MDs und MEs gut untersucht; in grünen Algen und in einigen Diatomeen wurden kürzlich ebenfalls Untersuchungen von MD und ME Homologen im Hinblick auf das Vorhandensein, die Lokalisation und auch der Beteiligung am Metabolismus durchgeführt. So exprimiert *Chlamydomonas reinhardtii* vier NAD-abhängige MEs (Merchant et al. 2007), wobei MDH2 in den Peroxisomen lokalisiert (Hayashi und Shinozaki 2012; Lauersen et al. 2016; Kong et al. 2017). Ein Knock-out von MDH2 in *C. reinhardtii* führt nicht nur zur erhöhten Speicherung von Lipiden und Stärke bei Stickstoffmangel, sondern auch zu einer erhöhten Konzentration von H₂O₂ (Kong et al. 2018a). Anhand der *in silico* Analysen in *P. tricornutum* und *T. pseudonana* wurde ein Model für den Kohlenhydrat-Metabolismus in Diatomeen aufgestellt (Kroth et al. 2008). Dabei codiert *P. tricornutum* vermutliche zwei mitochondriale MEs und eine mitochondriale MD (Kroth et al. 2008).

I.4.4.1.3 Aminosäuren- und Amin-Metabolismus

Peroxisomen können durch Aminotransferasen und Amin-Oxidasen am Aminosäuren- und Amin-Metabolismus beteiligt sein. So setzt z. B. die Aspartat-Aminotransferase (AAT; EC 2.6.1.1), auch bekannt als Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), in einer reversiblen Reaktion Aspartat mit Ketoglutarat zu Glutamat und Oxalacetat um (Kirsch et al. 1984). Die Pyridoxalphosphat-abhängigen AATs sind am Metabolismus von Aminosäuren beteiligt und

spielen ebenfalls eine wichtige Rolle im mitochondrialen Malat-Aspartat-Shuttle (Kirsch et al. 1984; Toney 2014).

Neben AATs konnten auch Monoamin-Oxidasen (MAO; EC 1.4.3.4) mit den Peroxisomen der Mäuseleber assoziiert werden (Mann et al. 1992). Die MAO ist ein Flavoprotein mit dem Cofaktor FAD und nutzt Sauerstoff zur Desaminierung von Aminen, wobei das entsprechende Keton oder Aldehyd, H_2O_2 und Ammoniak entstehen (Gaweska und Fitzpatrick 2011; Abad et al. 2013). Da bei der Desaminierung H_2O_2 als Nebenprodukt entsteht, sollte neben MAO ein ROS-detoxifizierendes Enzym wie z. B. eine Katalase vorliegen.

I.4.4.1.4 Purin-Abbau

Da während der Purin-Degradation die Urat-Oxidase (UO; EC 1.7.3.3) Urat zu Allantoin oxidiert und dabei als Nebenprodukt H_2O_2 entsteht, lokalisiert UO peroxisomal und wird daher neben der Katalase als peroxisomaler Marker eingesetzt. Bereits in frühen Studien konnte ein kristalliner Kern der Urat-Oxidase in den Peroxisomen dargestellt werden (Tsukada et al. 1966; Lata et al. 1977). Das Allantoin wird anschließend je nach Organismus weiter entweder bis zur Harnstoff-Ausscheidung oder bis zum Ammonium-Recycling abgebaut.

Der Purinabbau beginnt mit der Desaminierung von Purin zu Xanthin, das durch Xanthin-Dehydrogenasen/Oxidasen (XDH/XO; EC 1.17.1.4/1.17.3.2) weiter zu Urat umgewandelt wird. Die XDH/XO-Aktivitäten können in der Xanthin-Oxidoreduktase (XOR) kombiniert werden (Nishino et al. 2008). Im nächsten Schritt oxidiert die UO das Urat zu 5-Hydroxyisurat, das weiter zu (S)-Allantoin umgewandelt wird (Kahn und Tipton 1998; Lamberto et al. 2010). (S)-Allantoin wird durch eine Allantoinase (ALN; EC 3.5.2.5) zu Allantoat umgewandelt, das dann von der Allantoikase (ALC; EC 3.5.3.4) zu Harnstoff und Ureidoglykolat verarbeitet wird. In einem weiteren Schritt kann Harnstoff durch das Enzym Urease (EC 3.5.1.5) zu CO_2 und Ammoniak recycelt werden. Alternativ kann entweder das Ureidoglykolat zu Glyoxylat umgesetzt werden oder der Harnstoff wird ausgeschieden. In photosynthetisch aktiven Organismen und vor allem in höheren Pflanzen wird durch den Purinabbau Stickstoff in Form vom Ammoniak recycelt.

I.4.4.1.5 Etherphospholipid-Synthese: FAR, AGPS

Etherphospholipide sind wesentliche Bestandteile von Zellmembranen, gehören der Unterklasse der Glycerolphospholipide an und weisen eine Alkyl-Gruppe an der *sn-1* Position auf, die durch eine Ether-Bindung gebunden ist (Dean und Lodhi 2018; Wanders und Brites 2010). Die Biosynthese von Etherphospholipiden startet in Peroxisomen und wird im ER finalisiert (Dean und Lodhi 2018). Der peroxisomale Teil der Biosynthese wird auch als Acyl-Dihydroxyaceton-Phosphat-(DHAP)-Weg bezeichnet, da DHAP als ein Vorstufe-Molekül für die Synthese von Glycerolphospholipiden und Etherphospholipiden genutzt wird (Hajra und Das 1996). Die Fettsäuren werden vermutlich bei der *de novo* Fettsäuren-Synthese durch die Fettsäuren-Synthetase (FAS) generiert, wobei FAS teilweise mit der peroxisomalen Membran assoziiert ist (Lodhi et al. 2015; Lodhi et al. 2012), und müssen vor der Synthese von Etherphospholipiden zunächst durch eine Acyl-CoA-Synthetase (ACS) durch die Bindung von Acyl-CoA aktiviert werden (Dean und Lodhi 2018). Danach wird DHAP durch die peroxisomale Glycerolphosphat O-Acyltransferase (GNPAT; EC 2.3.1.15) oder DHAP-Acyltransferase (DHAPAT; EC 2.3.1.42) an der *sn-1* Position acyliert (Acyl-DHAP), wobei anschließend die Acyl-Gruppe durch eine Alkyl-Gruppe von der peroxisomalen Alkyldihydroxyacetonphosphat-Synthase (AGPS; EC 2.5.1.26) ausgetauscht wird (Alkyl-DHAP) (Hajra und Bishop 1982; Hajra und Das 1996). Dabei wird der Alkylrest von Fettalkoholen, die von der peroxisomalen Fettsäure-Reduktase (FAR; EC 1.2.1.84) generiert werden, genutzt (Doan et al. 2009; Dean und Lodhi 2018; Honsho et al. 2010; Hofvander et al. 2011). Das generierte Alkyl-DHAP wird weiter in das ER transportiert, wo die Etherphospholipide reifen und an die Zellkompartimente verteilt werden (Dean und Lodhi 2018).

I.4.4.1.6 Vitamin K: MenB

In photosynthetisch-aktiven Organismen ist Vitamin K₁ (Phyllochinon) ein wichtiger Redox Co-Faktor im Photosystem I (Reumann 2013; Cenci et al. 2018). Phyllochinone sind strukturell nah verwandt mit Menachinonen (Vitamin K₂) und beide Gruppen sind Derivate von Naphthochinonen (Widhalm et al. 2012; Reumann 2013). Menachinone haben im Gegensatz zu Phyllochinonen eine ungesättigte Isoprenoid-Seitenkette (Reumann 2013). In Rotalgen und Diatomeen wurde an Stelle von Phyllochinone Menachinone gebunden an die Thylakoidmembran beobachtet (Yoshida et al. 2003; Ikeda et al. 2008). Die Biosynthese von

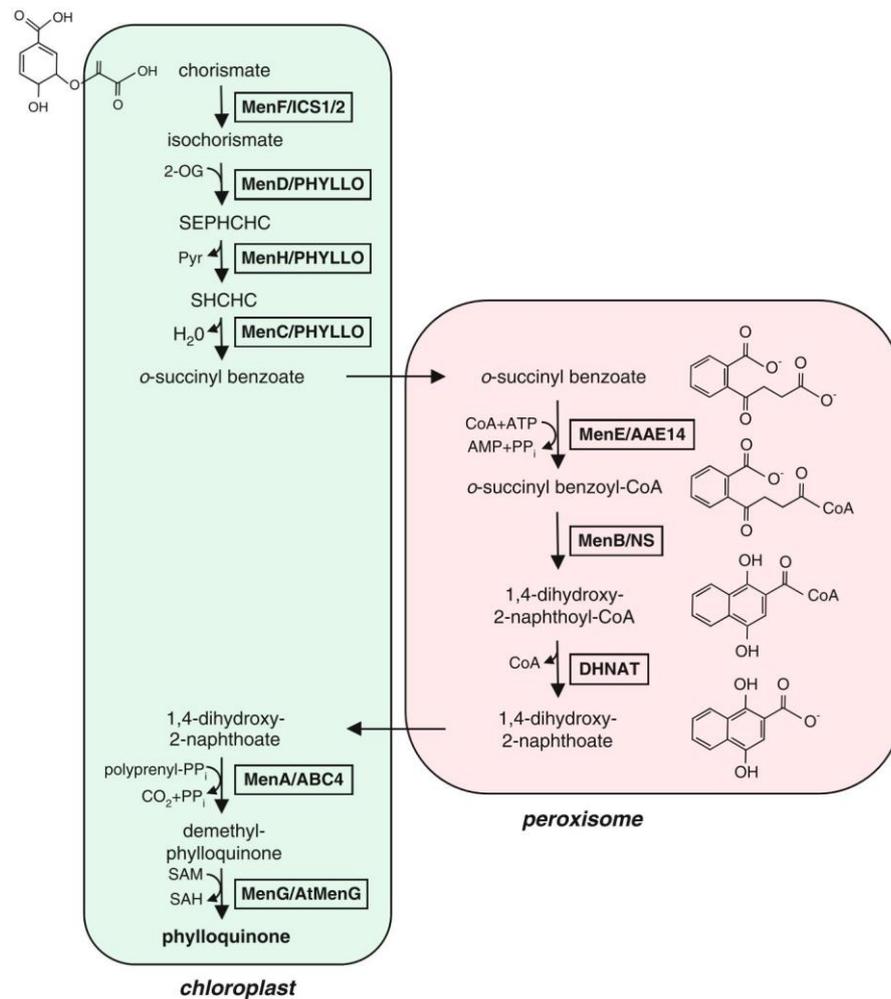


Abb. I-6: Schematische Darstellung der Kompartimentierung der Phyllochinon-Biosynthese in photosynthetisch-aktiven Organismen

Die Synthese von Phyllochinon (Vitamin K1) findet in neun Reaktionsschritten in der Plastide und zum Teil in Peroxisomen statt. Für weitere Informationen siehe Haupttext. (Abbildung aus Reumann, 2013)

Phyllochinon aus dem Vorläufer-Molekül Chorismat findet nicht nur, wie lange angenommen, in der Plastide statt; einige an der Biosynthese beteiligten Enzyme sind in Peroxisomen lokalisiert (Reumann 2013; Cenci et al. 2018).

In neun aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten wird Phyllochinon aus Chorismat, dem Produkt des Shikimatwegs, synthetisiert (Abb. I-6). In den ersten vier Schritten wird Chorismat in der Plastide zu *o*-Succinylbenzoat umgewandelt. Die an der Phyllochinon-Biosynthese beteiligten Proteine ähneln in ihrer Funktion den an der Menachinon-Biosynthese (Vitamin K2) beteiligten Enzymen und werden daher als Men-Enzyme bezeichnet. Die ersten vier Schritte sind in einem multifunktionalen Protein PHYLLO zusammengefasst, das MenF (Isochorismat-Synthase; EC 5.4.4.2)], MenD (Succinyl-Enolpyruvyl-Hydroxy-Cyclohexen-

Carboxylat-Synthase; EC 2.2.1.9), MenH (Succinyl-Hydroxy-Cyclohexadien-Carboxylat-Synthase; EC 4.2.99.20) und MenC (*o*-Succinylbenzoat-Synthase; EC 4.2.1.113) kombiniert (Gross et al. 2006; Gross et al. 2008; Cenci et al. 2018). In höheren Pflanzen kann die Isochorismat-Synthase (MenF) für die erste Reaktion der Vitamin K Synthese auch von einzelnen Genen codiert werden. Dies ermöglicht eine unabhängige Regulierung anderer Stoffwechselwege wie z. B. die Synthese von Salizylsäuren, die für die Pflanzenabwehr erforderlich sind (Gross et al. 2006; Gross et al. 2008). Die Aktivierung von *o*-Succinylbenzoat durch eine *o*-Succinylbenzoyl-CoA-Ligase (MenE; EC 6.2.1.26) wurde in den Peroxisomen von *A. thaliana* durch das peroxisomale Acyl-CoA-aktivierende Enzym (AAE14, At1g30520) mit einem nicht-kanonischen PTS1 „SSL“ identifiziert, das möglicherweise auch in Plastiden transportiert wird (Kim et al. 2008; Babujee et al. 2010; Reumann 2013).

Nach der Aktivierung von *o*-Succinylbenzoat katalysiert die 1,4-Dihydroxy-2-Naphtoyl-CoA (DHNA-CoA)-Synthase (MenB; EC 4.1.3.36), die Bildung des Naphthoattrings. Die MenB Synthase wird von einem einzigen Gen codiert und enthält ein konserviertes PTS2 in allen bisher analysierten putativen Orthologen in höheren Pflanzen (Reumann et al. 2007; Babujee et al. 2010). Anschließend produziert die DHNA-CoA-Thioesterase (DHNAT; EC 3.1.2.28) Dihydroxy-Naphthoat (DHNA), wobei CoA freigesetzt wird. In *Arabidopsis thaliana* wurden zwei für DHNAT kodierende Gene identifiziert; beide *A. thaliana* DHNAT Proteine enthalten je ein PTS1 und lokalisieren nachweislich in Peroxisomen (Reumann et al. 2009; Widhalm et al. 2012).

Die letzten beiden Schritte der Phyllochinon-Biosynthese finden in den Plastiden statt (Reumann 2013; Cenci et al. 2018). MenA (DHNA-Phytyl-Transferase; EC 2.5.1.130) bindet die Phytylkette an den Naphthoatring und MenG (Demethylphylloquinol-Methyltransferase; EC 2.1.1.329) methyliert die Vorstufe zu Phyllochinon (Reumann 2013; Cenci et al. 2018). In der plastidären Membran wird Vitamin K1 durch die Vitamin-K-Epoxid-Reduktase (VKOR; EC 1.17.4.4) reduziert (Tie und Stafford 2008b).

I.4.4.2 β -Oxidation von Fettsäuren

Durch die β -Oxidation werden Fettsäuren in mehreren Schritten abgebaut. Während dieser Prozess in Säugetieren sowohl in den Mitochondrien als auch in den Peroxisomen stattfinden kann, ist die β -Oxidation in Pflanzen und den meisten Pilzen ausschließlich peroxisomal (Poirier et al. 2006; Camões et al. 2015).

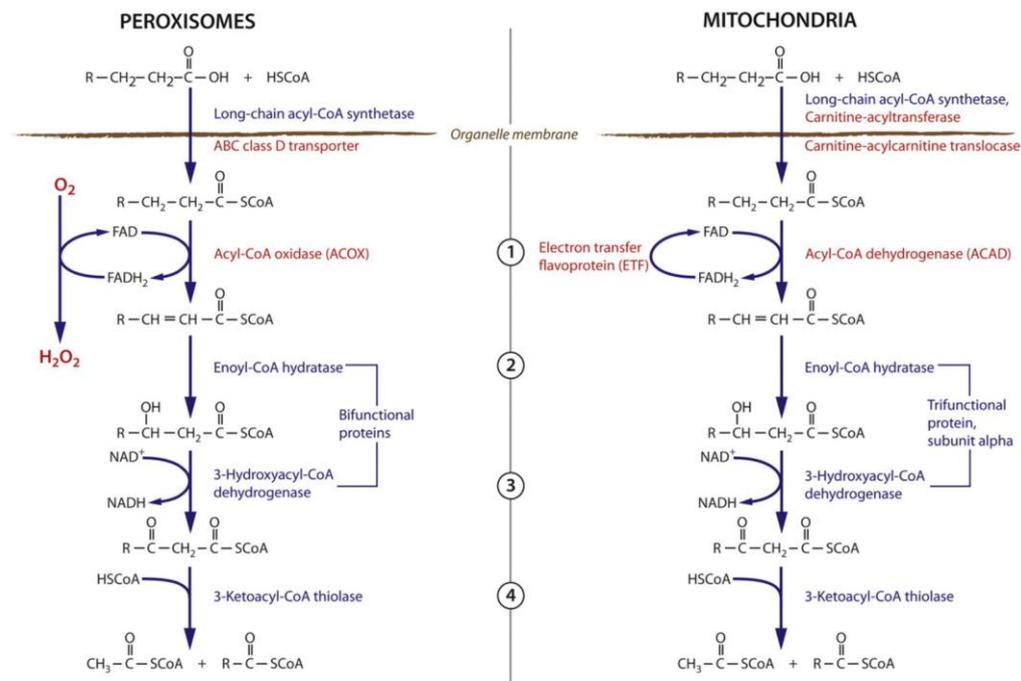


Abb. I-7: Vergleich der peroxisomalen und der mitochondrialen β -Oxidation von Fettsäuren

Die β -Oxidation von Fettsäuren kann in der Peroxisomen und Mitochondrien stattfinden. Ein wesentlicher Unterschied besteht im zweiten Reaktionsschritt: während die mitochondriale β -Oxidation zum Elektronentransfer beiträgt wird in den Peroxisomen H_2O_2 generiert. Für weitere Informationen siehe Haupttext. (Abbildung aus Camões et al., 2015)

In Mitochondrien und Peroxisomen werden Fettsäuren in vier nacheinander ablaufenden Reaktionsschritten zu Acyl-CoA und um zwei C-Atome kürzere Fettsäure abgebaut (Abb. I-7). Die nun verkürzte Fettsäure durchläuft den gesamten Prozess mehrmals bis zum vollständigen Abbau. Auch wenn die mitochondriale und die peroxisomale β -Oxidation sich sehr ähneln, weisen die Reaktionsabfolgen kleine Unterschiede auf (Abb. I-7). So werden in der mitochondrialen β -Oxidation lange bis kurze Fettsäuren durch die Acyl-CoA-Dehydrogenase (ACAD; EC 1.3.8.1) abgebaut, während in den Peroxisomen auch sehr lange und verzweigte Fettsäuren durch die Acyl-CoA-Oxidase (ACOX; EC 1.3.3.6) abgebaut werden können (Camões et al. 2015). Im Vergleich zu ACAD besitzen ACOX Enzyme am C-Terminus eine zusätzliche α -Domäne, was die Bindung von sehr langen und verzweigten Fettsäuren ermöglicht (Kim und

Miura 2004). Des Weiteren weisen beide Enzyme ACAD und ACOX Unterschiede in der enzymatischen Reaktion auf. Während ACAD zum Elektronentransfer der Atmungskette beiträgt, generiert die peroxisomale ACOX H_2O_2 , welches innerhalb von Peroxisomen rasch abgebaut werden muss (Abb. I-7) (Camões et al. 2015). Vor der Degradation müssen die Fettsäuren zunächst durch die Acyl-CoA Oxidase aktiviert und in das entsprechende Organell transportiert werden (Camões et al. 2015). Der Transport in die Peroxisomen erfolgt in der Regel über einen ABC-Transporter und in die Mitochondrien über die Carnitin-Acylcarnitin-Translokase (Camões et al. 2015). Nach der Bildung einer trans-Doppelbindung in dem Acyl-CoA-Thioester durch ACOX oder ACAD (Reaktion 1), erfolgen die weiteren Schritte entweder durch ein trifunktionales Enzym oder durch einzelne Enzyme (Camões et al. 2015). Weitere Reaktionen umfassen die Addition eines Wassermoleküls durch die Enoyl-CoA-Hydratase (ECH) (Schritt 2), die Dehydrierung durch 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (3HCD) (Schritt 3) und die abschließende Acylierung durch 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (3KCT) (Schritt 4), was zur Bildung von Acetyl-CoA und um zwei Kohlenstoffatome verkürztem Acyl-CoA führt (Abb. I-7) (Camões et al. 2015). Neben der einzeln vorliegenden Enzyme für Reaktionsschritte 2-4, können diese sowohl in Peroxisomen als auch in Mitochondrien in bifunktionalen, trifunktionalen oder multifunktionalen Enzymkomplexen vorliegen (Camões et al. 2015; Poirier et al. 2006). Zusätzlich dienen Dienoyl-CoA- und Trans-Enoyl-CoA-Isomerasen als Hilfsenzyme (Gurvitz et al. 1998; Camões et al. 2015).

Je nach Algenspezies wurde die β -Oxidation entweder ausschließlich mitochondrial oder peroxisomal beobachtet (Stabenau et al. 1984; Gross et al. 1985; Gross 1989; Kong et al. 2018b). In einigen Fällen ist eine duale Lokalisation vergleichbar mit der Situation in den Säugetieren anzunehmen (Winkler et al. 1988; Stabenau et al. 1989; Gonzalez et al. 2011; Jallet et al. 2020). In *P. tricornutum* wurden alle Homologe für die peroxisomale β -Oxidation mit PTS1 identifiziert (Gonzalez et al. 2011). Zusätzlich wurde eine mitochondriale ACAD Isoform beschrieben (Jallet et al. 2020), was auf eine duale Lokalisation der β -Oxidation in den Mitochondrien und auch in den Peroxisomen in der Diatomee *P. tricornutum* hindeutet.

I.4.4.3 Glyoxylat Zyklus

Der Glyoxylat-Zyklus ist ein wichtiger Prozess von Peroxisomen und ist namensgebend für die spezialisierte Glyoxysomen pflanzlicher Geweben (Tolbert und Essner 1981). In dieser metabolischen Reaktion wird Acetyl-CoA als Kohlenstoffquelle zur Bildung von Succinat genutzt (Kornberg und Krebs 1957; Kornberg und Madsen 1958). Der Glyoxylat-Zyklus ist ergänzend zu dem mitochondrialen TCA-Zyklus und wird für die Glukoneogenese von Kohlenhydraten in Verbindung zu dem Katabolismus von Lipiden eingesetzt (McCammon et al. 1990).

Fünf Enzyme sind am Glyoxylat-Zyklus beteiligt: die Aconitase (ACO; EC 4.2.1.3), die Isocitrat-Lyase (ICL; EC 4.1.3.1) die Malat-Synthase (MS; EC 2.3.3.9), die Malat-Dehydrogenase (MD; EC 1.1.1.37) und die Citrat-Synthase (CS; EC 2.3.3.1) (Ludewig-Klingner et al. 2017). Glyoxysomale Enzyme können in unterschiedlichen Kompartimenten innerhalb einer Zelle lokalisiert sein (Kunze et al. 2006). In höheren Pflanzen werden glyoxysomale ICL, MS und CS in die Peroxisomen importiert, während die MD und ACO im Cytosol verbleiben (Abb. I-8) (Ludewig-Klingner et al. 2017). Dadurch müssen die Intermediate des Zyklus über die peroxisomale Membran transportiert werden können (Kunze und Hartig 2013). Zusätzlich sind weitere Homologe für MD, CS und ACO mitochondrial und sind am TCA-Zyklus beteiligt (Schnarrenberger und Martin 2002). Bei ICL und MS dagegen handelt es sich um typische Enzyme des Glyoxylat-Zyklus, die üblicherweise als Markerproteine zur Identifizierung von Peroxisomen eingesetzt werden (Breidenbach und Beevers 1967; Tolbert und Essner 1981;

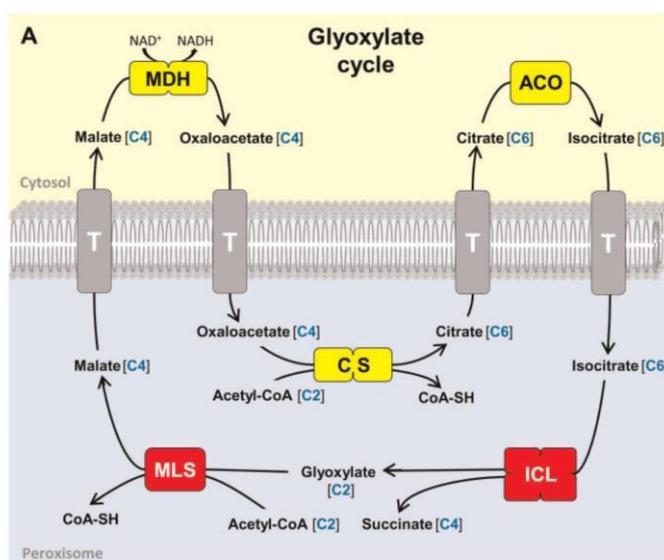


Abb. I-8: Schematische Übersicht des Glyoxylat-Zyklus

Der Glyoxylat-Zyklus findet anteilig in den Peroxisomen und anteilig im Cytosol statt. Für weitere Details siehe Haupttext.

MDH Malat-Dehydrogenase, **CS** Citrat-Synthase, **ACO** Aconitase, **ICL** Isocitrat-Lyase, **MLS** Malat-Synthase. In rot: Enzyme spezifisch für den Glyoxylat-Zyklus und werden als Markerproteine für Peroxisomen eingesetzt. In gelb: Homolog zu mitochondrialen Enzymen beteiligt am TCA-Zyklus (Abb. Modifiziert nach Ludewig-Klingner et al., 2017).

Lazarow und Fujiki 1985; Kunze et al. 2006). Dabei spaltet ICL Isocitrat zu Succinat und Glyoxylat, welches durch die MS mit Acetyl-CoA zu Malat verknüpft wird.

Für Apicomplexa wurde lange vermutet, dass diese Organismen keine Peroxisomen besitzen (Schlüter et al. 2006). Die Entdeckung des kompletten Kernsatzes an Peroxinen und allen am Glyoxylat-Zyklus beteiligten Enzyme mit PTS geben jedoch Hinweise darauf, dass Peroxisomen in einigen Apicomplexa existieren könnten (Moog et al. 2017; Ludewig-Klingner et al. 2017; Gabaldón et al. 2016). Dabei wurde neben den peroxisomalen Markern MS und ICL auch die CS mit PTS identifiziert, während MD und ACO in den Apicomplexa vermutlich cytosolisch lokalisieren (Ludewig-Klingner et al. 2017). In der Diatomee *P. tricornutum* wurden peroxisomale MS und ICL beschrieben, die am Glyoxylat Zyklus beteiligt sein könnten (Gonzalez et al. 2011; Davis et al. 2017).

I.4.4.4 Photorespiration

Die CO₂-Fixierung der photoautotrophen Organismen wird durch das zentrale bifunktionale Enzym RubisCO (Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase) katalysiert. RubisCO kann

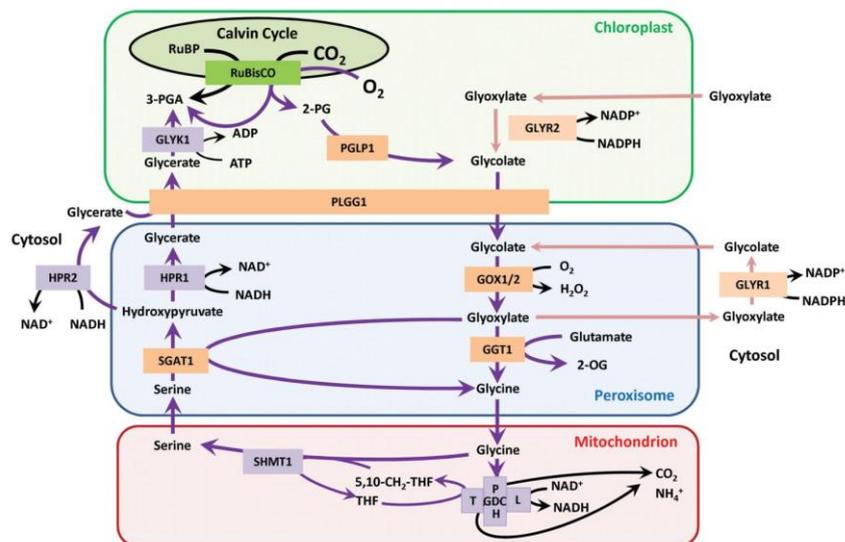


Abb. I-9: Schematische Darstellung der Photorespiration in Archaeplastida

Die Photorespiration erstreckt sich über mehrere subzelluläre Kompartimente, wobei ein Teil in den Peroxisomen stattfindet. Für mehr Informationen siehe Haupttext.

2-PG 2-Phosphogluconat, **PGLP** 2PG-Phosphatase, **GLYR** Glyoxylat-Reduktase, **PLGG** Glycolat/Glyoxylat-Transporter, **GOX** Glycolat-Oxidase, **GGT** Glutamat-Glyoxylat-Aminotransferase, **GDC** Glycin-Decarboxylase-Komplex (bestehend aus P, T, L und H Proteinen), **SHMT** Serin-Hydroxymethyl-Transferase, **SGAT** Serin-Glyoxylat-Aminotransferase, **HPR** Hydroxyppyruvat-Reduktase, **GLYK** Glycerat-Kinase, **3-PGA** 3-Phosphoglycerat (Abbildung aus Dellero *et al.*, 2016).

aber auch O₂ als Substrat verwenden, wobei als Nebenprodukt das toxische 2-Phosphoglycolat (2-PG) entsteht. Dieses kann in der Photorespiration unter hohem Energieaufwand zu 3-Phosphoglycerat (3-PGA) recycelt werden. Neben der erhöhten 2-PG Konzentration können erhöhte Glyoxylat und Glykolat Konzentrationen die Zellen schädigen (zusammengefasst in Dellero et al. 2016).

Die Photorespiration erstreckt sich über mehrere subzelluläre Kompartimente: Plastide, Peroxisom, Mitochondrium und Cytosol (Abb. I-9). In der Plastide wird das 2-PG zu Glykolat durch die Phosphoglycolat-Phosphatase (PGLP; EC 3.1.3.18) zu Glykolat dephosphoryliert (Christeller und Tolbert 1978; Seal und Rose 1987), welches über den plastidären Glykolat-Glycerat-Transporter (PLGG) in das Cytosol und anschließend in die Peroxisomen transportiert wird (Howitz und McCarty 1985; Howitz und McCarty 1986). Dabei lokalisiert der PLGG1 (At1g32080) aus *A. thaliana* in der inneren plastidären Membran (Pick et al. 2013). Das Glykolat kann zusätzlich von Glyoxylat-Reduktasen (GLYR; EC 1.1.1.79) durch die Reduktion von Glyoxylat bereitgestellt werden, wobei Glykolat anschließend in die Peroxisomen transportiert wird (Allan et al. 2009; Hoover et al. 2013).

In den Peroxisomen wird das Glykolat entweder durch die Glykolat-Oxidase (GOX; EC 1.1.3.15) zu Glyoxylat oxidiert oder durch die Glykolat-Dehydrogenase (GDH; EC 1.1.99.14) (GDH nicht in der Abbildung) (Esser et al. 2014; Maurino und Engqvist 2015). Während GOX hauptsächlich in höheren Pflanzen, Glaucophyten, Rhodophyten und Charophyten vorzufinden ist (Frederick et al. 1973; Stabenau 1976; Stabenau und Winkler 2005), werden in Chlorophyten und Cyanobakterien GDH Isoformen vorgefunden (Nelson und Tolbert 1970; Nakamura et al. 2005; Stabenau und Winkler 2005; Eisenhut et al. 2008; zusammengefasst in Dellero et al. 2016). In der Diatomee *T. pseudonana* wurden *in silico* zwei Gene codierend für GOX identifiziert (Kroth et al. 2008; Davis et al. 2017). Dabei wird für GOX1 mit dem C-terminalen Tripeptid „SKL“ eine peroxisomale Lokalisation vorhergesagt (Kroth et al. 2008; Davis et al. 2017), während für GOX2 eine mitochondriale Lokalisation *in vivo* bestätigt wurde (Davis et al. 2017). Zusätzlich zu GOX wurde *in silico* auch eine mitochondriale GDH in *T. pseudonana* identifiziert (Davis et al. 2017). Vermutlich ist in Diatomeen die mitochondrial lokalisierte GOX an der Photorespiration beteiligt (Kroth et al. 2008; Davis et al. 2017). Anschließend wird das Glyoxylat durch die Glutamat-Glykolat-Aminotransferase (GGT; EC 2.6.1.4), welches auch Alanin als Aminodonor nutzen kann, oder durch die Serin-Glyoxylat-Aminotransferase (SGAT; EC 2.6.1.45) zu Glycin umgesetzt.

Das Glycin wird in den Mitochondrien durch den Glycin-Decarboxylase-Komplex (GCD) und Serin-Hydroxymethyl-Transferase (SHMT) zu Serin umgewandelt. Nach dem Rücktransport von Serin in die Peroxisomen, entsteht durch SGAT Hydroxypyruvat. Die Hydroxypyruvat-Reduktase (HPR; EC 1.1.1.81) setzt Hydroxypyruvat zu Glycerat um, welches zurück über den PLGG in die Plastide transportiert wird. Neben der peroxisomalen HPR, wurden auch cytosolische Isoformen beschrieben (Timm et al. 2008; Timm et al. 2011). Zum Schluss wird Glycerat in der Plastide durch die Glycerat-Kinase (GLYK; EC 2.7.1.31), zu 3-Phosphoglycerat (3-PGA) umgesetzt (zusammengefasst in Dellerio et al. 2016).

I.4.5 Bioinformatische Analysen von peroxisomalen Proteinen in *G. theta*

Um einen Überblick über den peroxisomalen Metabolismus von *G. theta* zu erhalten, wurde das Genom auf Gene codierend für Proteine mit putativen PTS1 untersucht. Insgesamt 24840 kerncodierte *G. theta*-Proteine (Curtis et al. 2012) wurden mit Hilfe eines hauseigenen Skripts auf das Vorhandensein des C-terminalen PTS1 mit dem Konsensus [SAC]-[KRH]-[LM] untersucht (Abb. I-10). Die *in silico* identifizierten Proteinsequenzen wurden mittels BLAST und online Vorhersagetools analysiert (siehe Kapitel VI.2.1). Die bioinformatischen Analysen wurden in Vorfeld dieser Arbeit von Dr. Daniel Moog durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

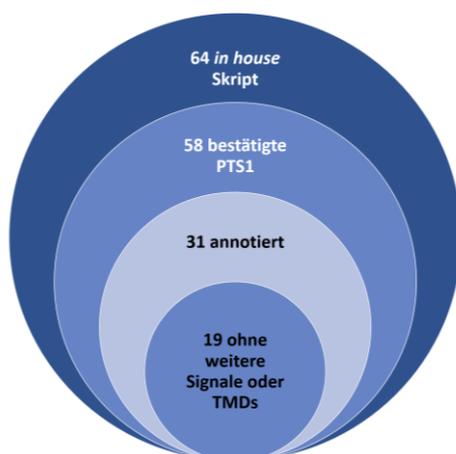


Abb. I-10: Übersicht über die *in silico* Analysen von putativen PTS1-Proteinen in *G. theta*

Insgesamt wurde für 58 von 64 mit dem hauseigenen (*in house*) Skript identifizierten PTS1 Proteinen in *G. theta* das PTS1 mit dem PTS1-Vorhersagetool bestätigt. 31 von 58 PTS1-Proteinen konnten mit BlastKOALA annotiert werden und 19 von 31 besitzen zudem keine weiteren vorhergesagten Zielsteuerungssignale oder TMDs (Transmembrandomänen).

Insgesamt wurden 64 Proteinsequenzen identifiziert, die ein putatives PTS1 enthalten (Tab. S 1). Mit einem PTS1-Vorhersagetool wurden die letzten C-terminalen 12 Aminosäuren (12aaC) auf ein mögliches PTS1 untersucht. Dabei wurde für 58 von 64 putativen PTS1-Kandidaten (90,6 %) das vorhergesagte PTS1 mit einem PTS1-Vorhersage Algorithmus (Neuberger et al.

2003a, 2003b) bestätigt (Tab. S 1, Abb. I-10). Die PTS1-Vorhersage basiert auf der Überprüfung der letzten 12aaC, die beim PTS1-Import eine wichtige Rolle spielen (Neuberger et al. 2003a). Da bis jetzt nur wenige PTS1-Proteine in Mikroalgen mit komplexen Plastiden bekannt sind, wurden die putativen 12aaC-Sequenzen mittels der allgemeinen Suchfunktion in dem Online-Tool analysiert (siehe Kapitel VI.2.1). Weiterhin wurden alle 58 *in silico* bestätigten PTS1-Proteine auf N-terminale Zielsteuerungssignale und Transmembrandomänen (TMDs) untersucht, um falsch-positive Kandidaten auszuschließen und Sequenzen mit einer mutmaßlichen dualen Zielsteuerung zu identifizieren (Tab. S 1).

Mit Hilfe von BlastKOALA wurden 1/3 der 64 putativen peroxisomalen Proteine annotiert, wobei mehrere wichtige Stoffwechselfunktionen abgedeckt zu sein scheinen (Tab. S 1). Insgesamt wurden 31 von 58 (53,44 %) der vorhergesagten peroxisomalen Proteinen identifiziert, die eine Rolle im peroxisomalen Stoffwechsel von *G. theta* spielen könnten. 19 von 31 (61,3 %) der putativen PTS1-Proteine wurden ohne zusätzliche Zielsteuerungssignale oder TMDs vorhergesagt (Abb. I-10). Anhand der BlastKOALA Annotationen und mittels der BlastP Analysen konnten mehrere klassische peroxisomale Enzyme identifiziert werden: Ascorbat-Peroxidase (APX), Urat-Oxidase (UO), 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoyl-CoA-Synthase (MenB) und Alkyldihydroxyacetonphosphat-Synthase (AGPS) (Tab. S 1). Außerdem wurden weitere Enzyme identifiziert, die z. B. am Kohlenhydrat-, Amin- und Aminosäurestoffwechsel beteiligt sind und ein putatives PTS1 am C-Terminus enthalten (Tab. S 1).

Obwohl *G. theta* den PTS2-Rezeptor Pex7 und das entsprechende Pex5 als potenziellen Co-Rezeptor mit einer Pex7-Bindungsdomäne enthält (Mix et al. 2018), ergaben bioinformatische Analysen mit dem hauseigenen Skript nur wenige potenzielle PTS2-Proteine mit dem Konsensus [RK]-[LVIQ]-X₅-[HQ]-[LAF] innerhalb der ersten 50 Aminosäuren (Osumi et al. 1991; Swinkels et al. 1991; Petriv et al. 2004; Rucktäschel et al. 2011). Der vielversprechendste Kandidat ist homolog zur Mevalonatkinase mit einer putativen PTS2 am N-Terminus, das aus „KLILFGEHF“ besteht.

II ZIELSETZUNG

Peroxisomen gelten als wichtige Kompartimente eukaryotischer Zellen und spielen insbesondere in der Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine wichtige Rolle. Ziel dieser Arbeit war es, in der Cryptomonade *Guillardia theta* die Rolle und Funktion von Peroxisomen zu analysieren. Hierzu sollten anhand von bioinformatischen Daten putative PTS1-Proteine identifiziert, an GFP (*green fluorescence protein*) fusioniert, heterolog in der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* exprimiert und *in vivo* lokalisiert werden. Hierfür wurde ein *P. tricornutum* Stamm eingesetzt, welcher einen peroxisomalen Marker mRuby3-SKL (mR3-SKL) exprimiert (Marter et al. 2020), um Kolokalisationsstudien durchführen zu können. Basierend auf der PTS1-Kandidatenliste von Dr. Moog wurden Proteine anhand ihrer vorhergesagten Funktion so ausgewählt, dass möglichst viele verschiedene metabolische Prozesse analysiert werden konnten. Dadurch sollte ein Überblick über die peroxisomale Stoffwechselkapazität der Cryptomonade *G. theta* ermöglicht werden. Des Weiteren sollten Faktoren homolog zu den Enzymen der β -Oxidation, Photorespiration und des Glyoxylat Zyklus bioinformatisch analysiert, auf PTS1/PTS2 untersucht und ebenfalls zum Teil in *P. tricornutum* lokalisiert werden.

In höheren Pflanzen, Pilzen und Säugetieren sind die Peroxisom-spezifischen Peroxine bekannt und gut untersucht, während in einzelligen und mehrzelligen Algen nur wenig über die Präsenz und Funktion von Peroxinen bekannt ist. In der Cryptomonade *G. theta* wurde kürzlich ein minimaler Kernsatz von Peroxinen identifiziert, was auf das Vorhandensein von funktionalen Peroxisomen schließen lässt (Mix et al. 2018). Um den Kernsatz an Peroxinen in Chlorophyten, Rhodophyten und Glaucophyten näher zu untersuchen, sollten im zweiten Teil dieser Arbeit *in silico* komparative Genomanalysen mit bekannten Peroxinsequenzen durchgeführt werden. Dabei sollte bestimmt werden, ob alle für die Biogenese wichtigen Peroxine vorhanden sind. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die ausgewählten Organismen sowohl zum PTS1- als auch zum PTS2-abhängigen Import befähigt sein könnten, da der PTS2-Import in der Diatomee *P. tricornutum* nicht vorhanden ist (Gonzalez et al. 2011).

III ERGEBNISSE

Peroxisomen übernehmen viele wichtige Funktionen. Sie detoxifizieren nicht nur die Zelle von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), sondern sind unter anderem an weiteren metabolischen Prozessen beteiligt: β -Oxidation von Fettsäuren, Photorespiration, Glyoxylat-Zyklus, Synthese und Degradation von Lipiden, Aminosäuren und Nukleinsäuren. In der Cryptomonade *Guillardia theta* wurde ein Kernsatz an Peroxinen nicht nur bioinformatisch identifiziert, sondern auch peroxisomal in heterologen Lokalisationsstudien in der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* nachgewiesen (Mix et al. 2018). Diese Arbeit liefert den ersten Einblick in die möglichen metabolischen Prozesse an welchen die Peroxisomen der Cryptomonade beteiligt sein könnten. Ein großer Teil der Ergebnisse ist in Vasilev et al. (2022) veröffentlicht.

III.1 Studien des peroxisomalen Metabolismus in *G. theta*

In diesem Teilprojekt wurde die Rolle und Funktion von Peroxisomen in der Cryptomonade *G. theta* mit Hilfe von heterologen Kolokalisationsstudien in der Diatomee *P. tricornutum* untersucht. Hierfür wurden zunächst putative peroxisomale Proteine mit einem C-terminalen PTS1 (peroxisomales Zielsteuerungssignal Typ 1) bioinformatisch von Dr. Daniel Moog identifiziert (siehe Kapitel I.4.5) und *in silico* auf die mögliche *in vivo* Lokalisation untersucht (siehe Kapitel III.1.2). Des Weiteren wurden die *G. theta* Proteine auf Homologien zu Faktoren der β -Oxidation, Photorespiration und des Glyoxylat-Zyklus untersucht und ausgewählte Kandidaten heterolog in der Diatomee *P. tricornutum* lokalisiert (siehe Kapitel III.1.4 und III.1.5).

III.1.1 Elf putative *G. theta* PTS1-Proteine wurden in Kolokalisationsstudien eingesetzt

Aus der PTS1-Kandidatenliste von Dr. Moog (Tab. S 1) wurden 11 *G. theta* Proteine für die *in vivo* Lokalisation in *P. tricornutum* ausgewählt (Tab. III-1) und könnten laut BLAST-Analysen in wichtigen Stoffwechselwegen eine Rolle spielen. So könnte z. B. die putative Ascorbatperoxidase (Gt_APX) das peroxisomal produzierte H_2O_2 degradieren und die putative 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoyl-CoA-Synthase (Gt_MenB) an der Vitamin K Synthese beteiligt

sein. Des Weiteren könnten die Urat-Oxidase (Gt_UO), die Allantoinase (Gt_ALN) und die Allantoikase (Gt_ALC) zu katabolen Prozessen von Purinen beitragen. Die genannten Enzyme wurden vor dieser Arbeit zunächst in *P. tricornutum* WT lokalisiert, wobei Gt_APX und Gt_MenB in dieser Arbeit für Kollokalisationsstudien in *P. tricornutum* mR3-SKL zur Verifikation eingesetzt wurden (siehe Kapitel III.1.2). Gt_ALC wurde in KEGG identifiziert und ist nicht in der PTS1-Kandidatenliste enthalten, da das putative nicht-kanonische PTS1 „SKV“ erst nach der Berücksichtigung weiterer Sequenzier-Daten (EST- und MMETSP-Daten) bestimmt wurde (Tab. III-1).

Tab. III-1: Übersicht der Lokalisierten *G. theta* Proteine mit entsprechenden Konstrukten

Protein ID JGI	Abk.	Funktion (BlastP)	Metabolismus	PTS1	GFP-FL	GFP-12aaC
88523	Gt_APX	Ascorbat-Peroxidase	ROS	SKM	px	px*
85732	Gt_MenB	1,4-Dihydroxy-2-Naphthoyl-CoA-Synthase	Vitamin K	SRL	px	px*
161824	Gt_UO	Urat-Oxidase	Purin	SKL	px*	px*
67817	Gt_ALN	Allantoinase	Purin	AKL	c*	px*
71482	Gt_ALC	Allantoikase	Purin	SKV*	c*	c*
64327	Gt_MD	Malat-Dehydrogenase	Kohlenhydrat	SKL	px	nd
91319	Gt_NME	NAD-abhängiges Maleinenzym	Kohlenhydrat	CKL	px	nd
135385	Gt_FAR	Fettsäure-Acyl-CoA-Reduktase	Etherphospholipid	SRL	px	nd
157810	Gt_AGPS	Alkyldihydroxyacetonphosphat-Synthase	Etherphospholipid	SHL	c	c/px
158574	Gt_AAT	Aspartat-Amino-Transferase	Aminosäuren	SKL	c	px
122115	Gt_MAO	Monoamine-Oxidase	Amine	SRL	nd	px

Auswahl an PTS1-Proteinen aus *G. theta*, welche in verschiedenen Versionen in *P. tricornutum* lokalisiert worden sind. **ROS** reaktive Sauerstoffspezies, **PTS1** peroxisomales Zielsteuerungssignal Typ 1, **GFP** grün fluoreszierendes Protein, **FL** volle Länge, **12aaC** die letzten 12 C-terminalen Aminosäuren, **Px** peroxisomal, **C** cytosolisch, **nd** nicht lokalisiert, * Lokalisiert in *P. tricornutum* Wildtyp von Co-Autoren in Vasilev et al. (2022).

Repräsentativ für den Kohlenhydrat-Metabolismus wurden die putativen *G. theta* Malat-Dehydrogenase (Gt_MD) und das NAD-abhängiges Maleinenzym (NME) in heterologen Kollokalisationsstudien in *P. tricornutum* mR3-SKL untersucht (siehe Kapitel III.1.2). Für die Untersuchung der *in vivo* Lokalisationen von putativen PTS1-Proteinen, die an der Etherphospholipid-Synthese beteiligt sein könnten, wurden die heterologen Lokalisationen der Fettsäure-Acyl-CoA-Reduktase (Gt_FAR) und Alkyldihydroxyacetonphosphat-Synthase (Gt_AGPS) analysiert. Eine putative Aspartat-Amino-Transferase (Gt_AAT) und eine putative

Monoamine-Oxidase (Gt_MAO) wurden ebenfalls mittels Kolokalisationsstudien untersucht (siehe Kapitel III.1.2 und Tab. III-1).

Die repräsentativ für verschiedene Stoffwechselwege untersuchten *G. theta* PTS1-Proteine sollten möglichst unterschiedliche PTS1-Variationen aufweisen. Neben des typischen PTS1 „SKL“, wurden auch folgende PTS1-Varianten analysiert: „SKM“, „SRL“, „AKL“, „CKL“, „SHL“. Des Weiteren wurde ein PTS1-ähnliches C-terminales Peptid „SKV“ in der *in vivo* Studie getestet, um die Diversität der PTS1-Motive zu untersuchen (Tab. III-1).

III.1.2 Heterologe *in vivo* Lokalisationsstudien der elf PTS1-Kandidaten aus *G. theta* in *P. tricornutum*

Da für die Cryptomonade *Guillardia theta* noch keine Methoden für die Insertion von Fremd-DNA in das Genom durch Transfektion etabliert sind, wurden die putativen PTS1-Proteine aus *G. theta* in der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* heterolog lokalisiert. Die Diatomee *P. tricornutum* hat eine vergleichbar ähnliche zelluläre Subkompartimentierung und wurde schon in früheren Studien erfolgreich in heterologen Lokalisationsstudien von z. B. plastidären, nucleomorphen oder peroxisomalen Proteinen eingesetzt (Gould et al. 2006; Gile et al. 2015; Mix et al. 2018). In Mix et al. (2018) wurden Peroxisom-spezifische Peroxine als GFP-Fusionsproteine erfolgreich heterolog in den Peroxisomen von *P. tricornutum* lokalisiert. In dieser Arbeit, wurde eine *P. tricornutum* Zelllinie eingesetzt, welche den peroxisomalen Marker mRuby3-SKL (mR3-SKL) exprimiert (Marter et al. 2020). Durch das PTS1 „SKL“ am C-Terminus, wird der Fluoreszenzmarker mR3 durch die *P. tricornutum* endogene PTS1-Transportmaschinerie in die Peroxisomen importiert und erleichtert die *in vivo* Kolokalisationsstudien mit putativen PTS1-Proteinen aus *G. theta* fusioniert an GFP.

Untersuchte PTS1-Proteine und die entsprechenden lokalisierten Konstrukte sind in Tab. III-1 dargestellt. Vollständigkeitshalber sind in der Tabelle Proteine aus vorherigen Arbeiten inkludiert und sind in Vasilev et al. (2022) veröffentlicht. Insgesamt 11 der 64 *in silico* identifizierten PTS1-Kandidaten wurden heterolog in *P. tricornutum* mR3-SKL lokalisiert (Tab. III-1). Für einige der ausgewählten Kandidaten wurden unterschiedliche Versionen amplifiziert und getestet, um die Zuverlässigkeit des PTS1-Imports im heterologen Organismus zu überprüfen. Um das C-terminale PTS1 nicht zu maskieren, sollten die Proteine vorzugsweise in voller Länge (FL, *full length*) mit N-terminalen GFP (GFP-FL) lokalisiert werden. War die

Amplifikation des Gens in voller Version nicht möglich bzw. wenn eine eindeutige CDS (codierende Sequenz) aufgrund von fehlender oder unvollständiger EST (*expressed sequence tags*)-Daten nicht abgeleitet werden konnte, wurden die letzten 12 C-terminalen Aminosäuren (12aaC) an GFP fusioniert (GFP-12aaC). Somit konnten zumindest die letzten 12aaC auf die Fähigkeit hin untersucht werden, peroxisomales Targeting mittels des putativen PTS1 induzieren zu können.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden nicht nur die Peroxisom-spezifische Gt_UO in *P. tricornutum* Wildtyp lokalisiert, sondern auch ein Homolog für die Ascorbat-Peroxidase Gt_APX und ein Homolog für MenB (Mix 2017; Raap 2018). Für Gt_UO wurde in der Bachelorarbeit von Raap (2018) eine Kolokalisation mit dem peroxisomalen Marker mR3-SKL bestätigt (siehe Anhang Abb. S VII-1 C). Weitere Analysen zur Lokalisation von Gt_UO wurden mittels Immunmarkierungen auf Zell-Dünnschnitten durchgeführt, um die peroxisomale Lokalisation zu bestätigen (siehe Kapitel III.1.3). Für *in vivo* Lokalisationsstudien wurden die entsprechenden CDSs ohne Introns am 5'-Ende mit *gfp* fusioniert und in *P. tricornutum* WT (Wildtyp) exprimiert. GFP-Gt_UO (siehe Anhang Abb. S VII-1 A) und GFP-Gt_APX (Mix 2017) lokalisierten in kleinen runden konzentrierten Punkten, was auf eine peroxisomale Lokalisation hindeutet (Vasilev et al. 2022).

Gt_APX wurde in dieser Arbeit in *P. tricornutum* mR3-SKL mit dem peroxisomalen Marker mR3-SKL kolokalisiert (Abb. III-1). Auch für Gt_MenB konnte in den meisten Zellen eine Kolokalisation detektiert werden (Abb. III-1), wobei neben den typischen kleinen runden Lokalisationsmustern auch große runde Strukturen beobachtet wurden, die nicht mit dem peroxisomalen Marker mR3-SKL korrelierten (Abb. S VII-3). Des Weiteren wurde für Gt_MD, Gt_NME, Gt_FAR mit N-terminalem GFP eine Lokalisation in kleinen runden Strukturen in *P. tricornutum* beobachtet, die mit der Lokalisation des peroxisomalen Marker mR3-SKL korrelierte (Abb. III-1).

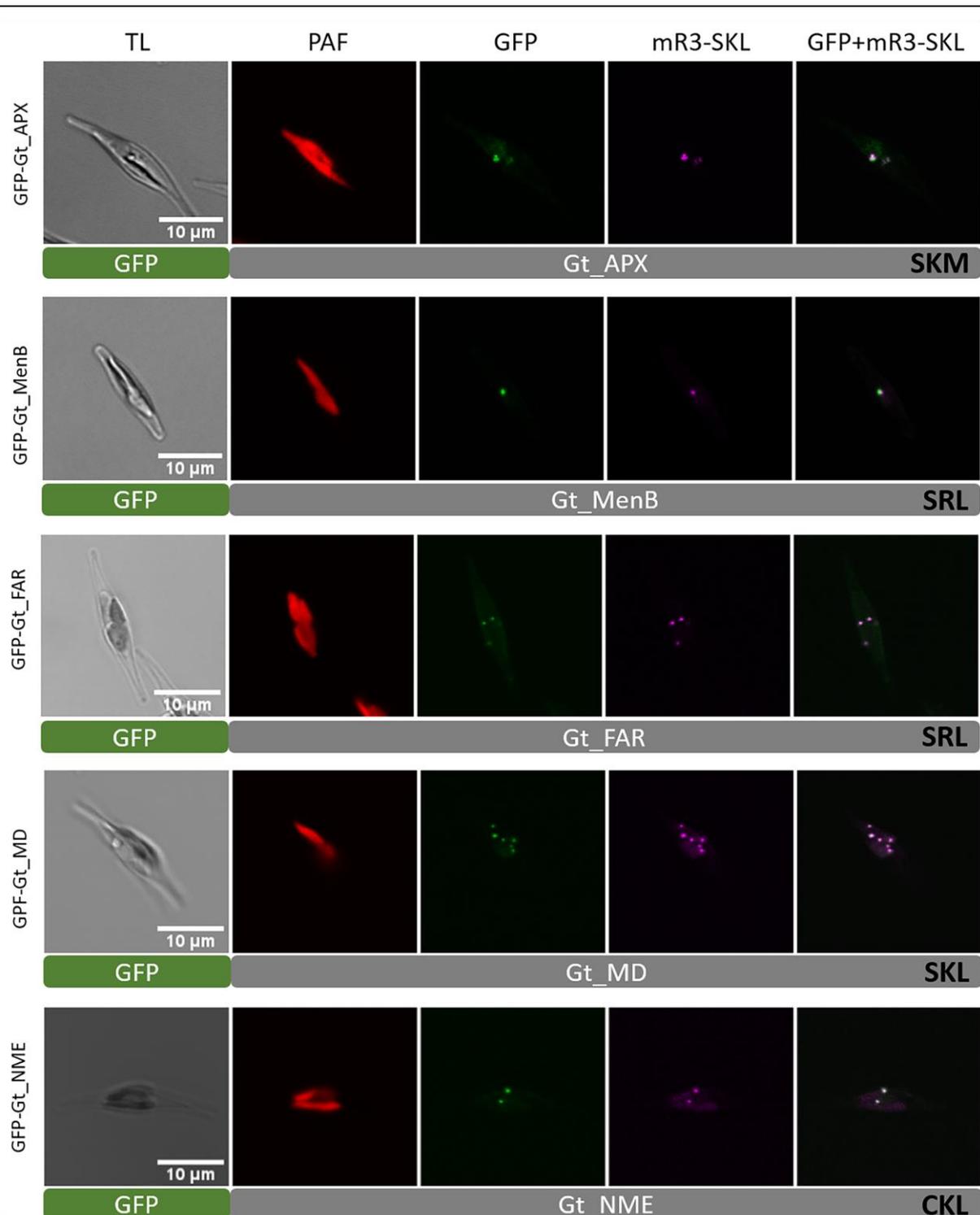


Abb. III-1: Heterologe *in vivo* Lokalisation der *G. theta* PTS1-Kandidaten in *P. tricornutum*

Die putativen PTS1-Proteine aus *G. theta* wurden in voller Länge in *P. tricornutum* mR3-SKL mit dem peroxisomalen Marker koexprimiert und die *in vivo* Lokalisation am KLSM dokumentiert. Für Gt_APX, Gt_MenB, Gt_FAR, Gt_MD, Gt_NME wurden überlappende Fluoreszenzmuster im GFP und mR3-SKL Kanal detektiert.

Gt *Guillardia theta*, **APX** Ascorbat-Peroxidase, **MenB** 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoyl-CoA-Synthase, **FAR** Fettsäure-CoA Reduktase, **MD** Malat-Dehydrogenase, **NME** NAD-abhängiges Maleinenzym, **TL** Durchlicht, **PAF** Plastidenautofluoreszenz, **GFP** grün fluoreszierendes Protein, **mR3-SKL** mRuby3-SKL als peroxisomaler Marker (Abbildung publiziert in Vasilev et al., 2022).

Im Gegensatz zu den eindeutigen Kollokationen, wurde für Gt_AGPS und Gt_AAT fusioniert in voller Länge an GFP ein Signal in der gesamten Zelle von *P. tricornutum* detektiert (Abb. III-2), was auf eine cytosolische Lokalisation hindeutet. Um die Auswirkungen der 12aaC der genannten Proteine inklusive potentiell PTS1 auf die Lokalisation des Fusionsproteins zu untersuchen, wurden diese an Stelle der FL Proteine an das GFP fusioniert und *in vivo* heterolog in *P. tricornutum* lokalisiert. Für die GFP-12aaC Fusionen wurden anders als bei FL-GFP Versionen Signale in kleinen runden Strukturen festgestellt (Abb. III-2), welche mit dem peroxisomalen Marker mR3-SKL kollokalisieren. Zusätzlich wurde für GFP-AGPS.12aaC neben der punktuellen Lokalisation auch Signale außerhalb der runden Strukturen detektiert (Abb. III-2).

Die Monoamine-Oxidase (Gt_MAO) konnte nicht in voller Länge aus *G. theta* cDNA amplifiziert werden. Nichtsdestotrotz, wurden die Gt_MAO.12aaC an GFP fusioniert und heterolog in *P. tricornutum* lokalisiert. Punktuelle Fluoreszenzsignale von GFP-Gt_MAO.12aaC korrelierten mit dem peroxisomalen Marker mR3-SKL (Abb. III-2).

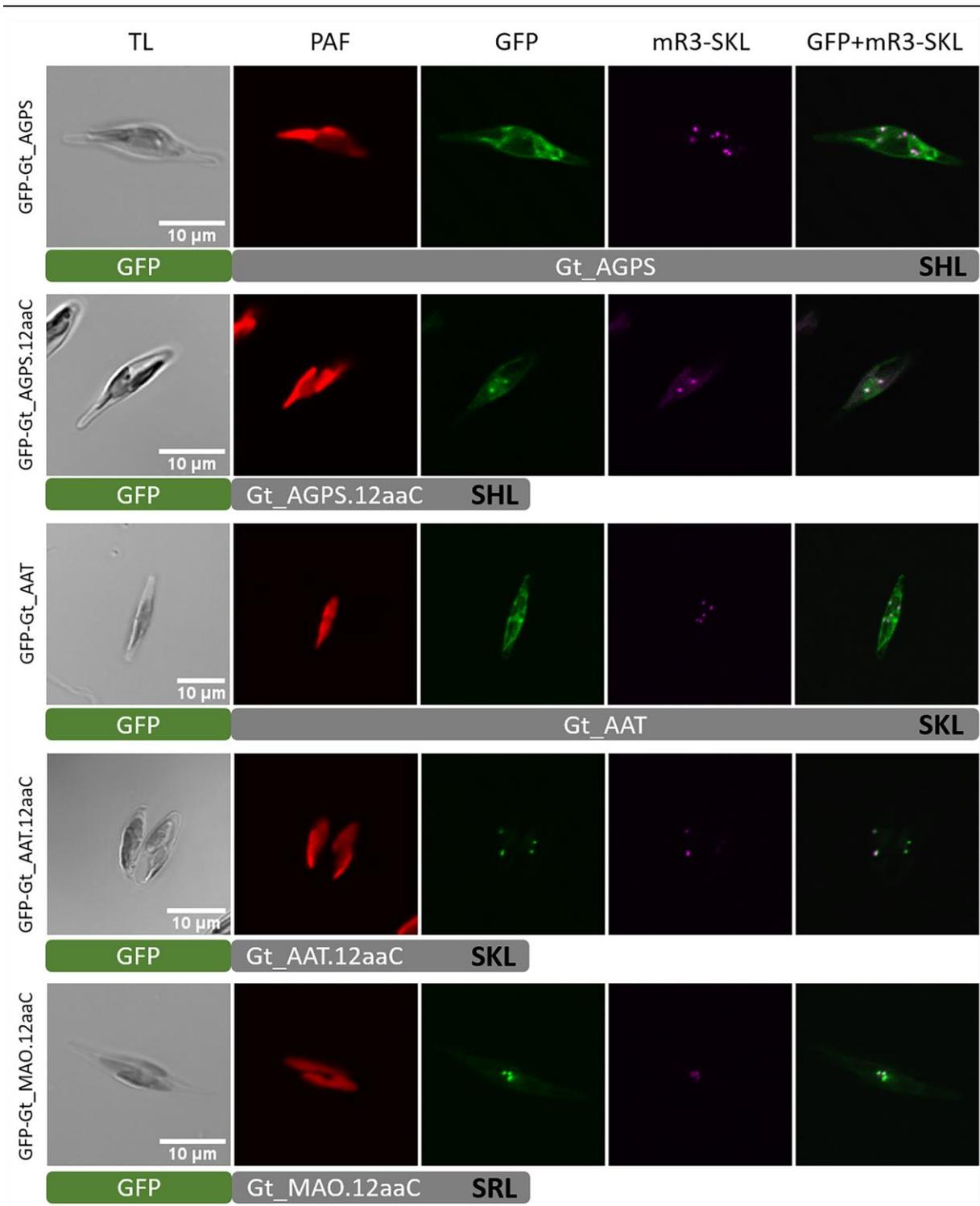


Abb. III-2: Heterologe *in vivo* Lokalisationen von Gt_AGPS, Gt_AAT und Gt_MAO von *G. theta* in *P. tricornutum* als 12aaC-Versionen

Die putativen PTS1-Proteine aus *G. theta* wurden entweder in voller Länge oder als kurze Version (12aaC) in *P. tricornutum* mR3-SKL mit dem peroxisomalen Marker koexprimiert und die *in vivo* Lokalisation am KLSM dokumentiert. Für Gt_AGPS, Gt_AAT wurden abweichende Fluoreszenzmuster im GFP und mR3-SKL Kanal festgestellt. Dagegen konnten sich überlagernde Fluoreszenzmuster für Gt_AGPS.12aaC, Gt_AAT.12aaC und Gt_MAO.12aaC im GFP und mR3-SKL Kanal beobachtet werden.

Gt *Guillardia theta*, **AGPS** Alkyldihydroxyacetonphosphat-Synthase, **AAT** Aspartat-Amino Transferase, **MAO** Monoamin-Oxidase, **12aa.C** die letzten 12 Aminosäuren, **TL** Durchlicht, **PAF** Plastidenautofluoreszenz, **GFP** grün fluoreszierendes Protein, **mR3-SKL** peroxisomaler Marker.

III.1.3 Immunmarkierung von Gt_UO auf Zell-Dünnschnitten

Um die *in vivo* Lokalisation der Peroxisom-spezifischen Gt_UO zu bestätigen, wurden Immunmarkierungen auf Zell-Dünnschnitten durchgeführt. Zunächst wurde hierfür im Vorfeld dieser Arbeit der mit GFP-Gt_UO transformierte *P. tricornutum* WT Klon eingesetzt, wobei GFP-Gt_UO mit α -GFP Antikörpern detektiert wurde (Abb. S VII-1 B). Zur Verifikation der Lokalisation in *G. theta*, wurden *G. theta* WT Zellen direkt mit einem gegen die Gt_UO spezifischen Antikörper immunmarkiert (siehe Kapitel III.1.3.1).

III.1.3.1 Peroxisomale Lokalisation von Gt_UO in *G. theta* mit spezifischen Antikörpern bestätigt

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde ein PTS1-Protein annotiert als Urat-Oxidase (Gt_UO) zunächst im *P. tricornutum* Wildtyp mittels KLSM in kleinen runden fluoreszierenden Punkten nahe der Plastide lokalisiert, was auf peroxisomale Lokalisation deutete (Mix 2017) (Abb. S VII-1 A). Die peroxisomale Lokalisation wurde durch Ko-Expression mit dem peroxisomalen Marker in *P. tricornutum* mR3-SKL bestätigt (Raap 2018) (Abb. S VII-1 C). Zusätzlich wurde mit Immunmarkierungen auf Dünnschnitten von einem *P. tricornutum* Klon mit GFP-Gt_UO Expression kleine runde Strukturen markiert, welches die peroxisomale Lokalisation untermauert (Abb. S VII-1). Eine Deletion von dem C-terminalen PTS1 resultierte in cytosolischer Lokalisation (Raap 2018) (Abb. S VII-1). Diese Ergebnisse sind in Vasilev et al. (2022) publiziert.

Um die peroxisomale Lokalisation des endogenen Gt_UO in *G. theta* zu bestätigen, wurden Analysen mittels spezifischer Immunmarkierungen auf Dünnschnitten von *G. theta* Wildtyp durchgeführt. Hierfür wurden Antipeptid-Antikörper gegen die letzten 12aaC von Gt_UO (PIDGPSGYITSSASLNRSKL) von der Firma Davids Biotechnologie hergestellt. Zunächst wurde die Bindung von α -Gt_UO.12aaC im Western-Blot gegen die aufgetrennten denaturierten Proteine aus *G. theta* analysiert. In Abb. III-3 ist die Bindungsspezifität des α -Gt_UO.12aaC gegen den Proteingestamtextrakt aus *G. theta* gezeigt. Hierfür wurden wie in Kapiteln VI.2.6.6 und VI.2.6.7 beschrieben je 5 μ g des Proteingestamtextraktes elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Detektion von Gt_UO wurde in Spur 2 das unaufgereinigte Antikörperserum (*raw sera*) 1:3000 eingesetzt; in Spur 3 wurde 1:3000 der aufgereinigte Antikörper verwendet. In beiden

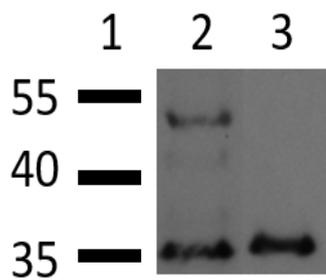


Abb. III-3: Bindungsnachweis von α -Gt_UO.12aaC an Gt_UO des Proteingesamtextraktes aus *G. theta* mittels eines semi-dry Western-Blots

Spezifische Bindung wurde mittels Western-Blot und Immundetektion mit dem Antipeptid-Antikörper α -Gt_UO.12aaC im Proteingesamtextrakt aus *G. theta* nachgewiesen. **1** prestained protein ladder (in kDa), **2** 1:3000 raw sera, **3** 1:3000 aufgereinigte Antikörper α -Gt_UO.12aaC (Abbildung publiziert in Vasilev et al., 2022).

Spuren konnte ein Protein mit ca. 35 kDa nachgewiesen werden, welches der kalkulierten molekularen Größe von Gt_UO entspricht (Abb. III-3). Da das unaufgereinigte Antikörperserum neben dem ermittelten 35 kDa Protein ein weiteres Protein mit einem ungefähren Molekulargewicht von 50 kDa bindet, wurde für die Immunmarkierung auf den Zell-Dünnschnitten der aufgereinigte α -Gt_UO.12aaC eingesetzt.

Zunächst wurde der α -Gt_UO.12aaC Antikörper auf GFP-Gt_UO exprimierenden *P. tricornutum* Klon getestet, um mittels Immunmarkierung die Bindung zu überprüfen. Wie auch schon durch α -GFP Antikörper (Abb. S VII-1 B) konnten bei einer Verdünnung von 1:1000 von α -Gt_UO.12aaC elektronendichte Markierungen in kleinen runden Strukturen mit einem Durchmesser von 200-400 nm beobachtet werden (Abb. III-4 A). Die spezifische Bindung von α -Gt_UO.12aaC konnte auch demnach auf Zell-Dünnschnitten von *P. tricornutum* nachgewiesen werden. Anschließend wurden Dünnschnitte von *G. theta* Wildtyp angefertigt, um die Bindung von α -Gt_UO.12aaC im homologen System nachweisen zu können und die peroxisomale Lokalisation von Gt_UO in *G. theta* endgültig zu verifizieren. In *G. theta* wurden bei einer

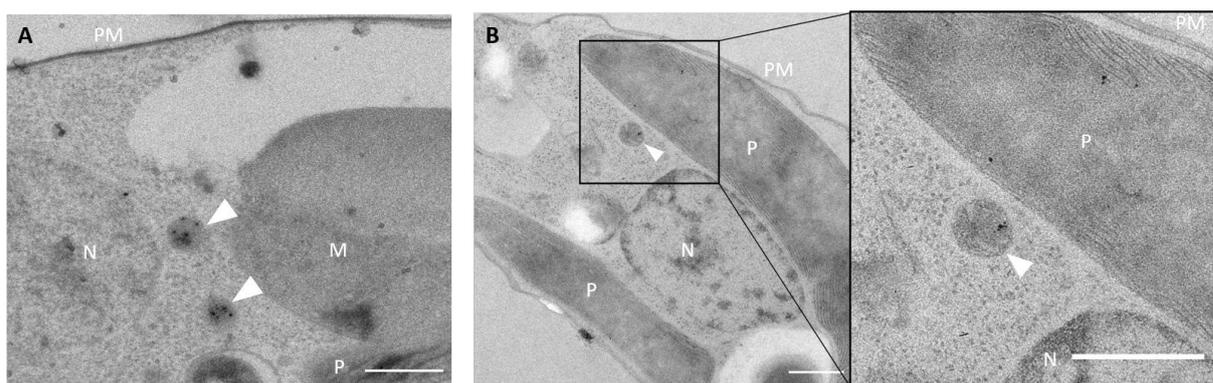


Abb. III-4: Immunmarkierung mit spezifischem Antikörper α -Gt_UO.12aaC

Der spezifische Antipeptid-Antikörper α -Gt_UO.12aaC wurde auf *P. tricornutum*, das die GFP-Gt_UO Fusion exprimiert, getestet (A) und anschließend für Immunmarkierung auf *G. theta* Dünnschnitten (B) eingesetzt. Elektronendichten Strukturen wurden in beiden Organismen in kleinen runden elektronendichten Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 200-400 nm detektiert (mit Pfeil markiert). **P** Plastide, **N** Nucleus, **PM** Plasmamembran, Maßstab 0,5 μ m.

Aufnahmen der Immunmarkierungen wurden von Dr. Thomas Heimerl angefertigt und in Vasilev et al. (2022) publiziert.

Verdünnung von 1:200 ebenfalls elektronendichte Markierungen in runden Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 200-400 nm detektiert, wobei die Markierungen zum Teil ebenfalls in der Plastide zu beobachten waren (Abb. III-4 B). Durch bioinformatische Analysen konnte kein N-terminales Signalpeptid für Gt_UO bestimmt werden. Daher muss weiter analysiert werden, ob Gt_UO tatsächlich sowohl im Peroxisom als auch in der Plastide lokalisiert ist oder ob die Markierung in der Plastide Artefakte darstellen.

III.1.4 β -Oxidation von Fettsäuren in *G. theta*

Die Kandidatenliste von Dr. Daniel Moog für PTS1-Proteine in *G. theta* von insgesamt 64 Proteinen enthielt keine an der β -Oxidation beteiligten Enzyme (Tab. S 1). Es ist bekannt, dass Peroxisomen an der β -Oxidation von Fettsäuren beteiligt sein können. Bei Säugetieren kann die β -Oxidation von Fettsäuren sowohl in den Mitochondrien, als auch in Peroxisomen stattfinden. In höheren Pflanzen und Pilzen ist dieser Prozess ausschließlich peroxisomal (Poirier et al. 2006). In beiden Organellen werden Acyl-CoA-Ester in vier ähnlichen Reaktionsschritten zu Acyl-CoA und eine um zwei C-Atome kürzere Fettsäure, welche die Oxidation bis zum kompletten Abbau durchläuft, umgewandelt.

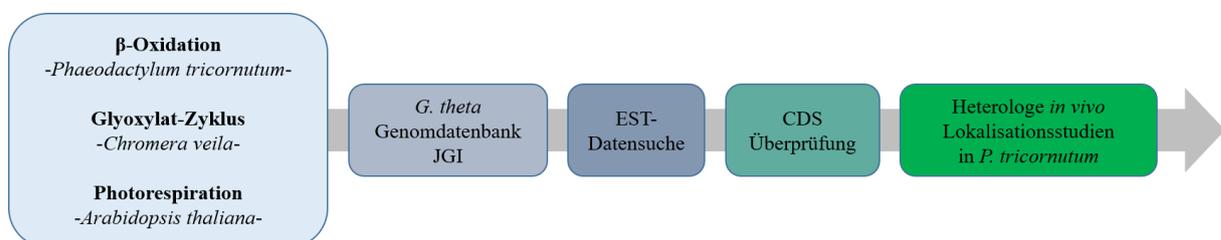


Abb. III-5: Schema der *in silico*-Analysen weiterer Faktoren in *G. theta*

Für die *in silico* Analysen der möglichen Faktoren, die an der β -Oxidation, der Photorespiration und des Glyoxylat-Zyklus beteiligt sein könnten, wurden bekannte Sequenzen aus *P. tricornerum*, *Chromera veila* und *Arabidopsis thaliana* als Abfragesequenzen in der *G. theta* Genomdatenbank eingesetzt. Nach der Ermittlung homologer Sequenzen in *G. theta* und der EST-Datensuche mittels Blast Analysen, wurden die codierenden Sequenzen (CDSs) überprüft und ggf. angepasst. Es folgten heterologe *in vivo* Lokalisationsstudien ausgewählter Kandidatenproteine in *P. tricornerum*.

Die *in silico* Analysen wurden von Dr. Daniel Moog im Hinblick auf die Faktoren der β -Oxidation in *G. theta* ausgeweitet und homologe Proteine dabei insbesondere auf nicht-kanonische PTS1-ähnliche Signale und potentielle PTS2 untersucht. Die Ergebnisse werden im Folgenden zusammengefasst (Tab. III-2). In Abb. III-5 sind die *in silico* Analysen für die Identifizierung der Faktoren für die β -Oxidation, Photorespiration und Glyoxylat-Zyklus schematisch dargestellt.

Zur Identifizierung möglicher Proteine der β -Oxidation in *G. theta* wurden bekannte Proteine der β -Oxidation aus *P. tricornutum* (Gonzalez et al. 2011) mittels BLAST mit der Genomdatenbank von *G. theta* abgeglichen. Potentielle Gensequenzen wurden mit Hilfe der EST-Daten überprüft und die CDS ggf. korrigiert. Ausgewählte Kandidaten wurden heterolog *in vivo* in der Diatomee *P. tricornutum* lokalisiert (Tab. III-2).

III.1.4.1 *In silico* identifizierte putative *G. theta* Enzyme für die β -Oxidation von Fettsäuren

In Peroxisomen wird der erste Schritt der β -Oxidation von Fettsäuren hauptsächlich durch eine Acyl-CoA-Oxidase (ACOX) durchgeführt, die H_2O_2 als Nebenprodukt produziert, während in Mitochondrien eine Acyl-CoA-Dehydrogenase (ACAD) den ersten Reaktionsschritt katalysiert und die Elektronen an die Atmungskette überträgt (Abb. I-7) (Camões et al. 2015). Durch bioinformatische Analysen wurde ein Kandidat für Gt_ACOX (ID_147553) und sechs putative Kandidaten für Gt_ACAD (ID_90066, ID_71221, ID_87673, ID_71272, ID_156886, ID_113578) identifiziert (Tab. III-2). Alle Kandidaten wurden mit mehreren Online-Vorhersagetools auf putative Zielsteuerungssequenzen, einschließlich des mTPs (mitochondriales Targeting-Peptid) und PTS1, untersucht (Tab. III-2). Für alle Gt_ACOX- und Gt_ACAD-Kandidaten wurde eine mitochondriale Lokalisierung vorhergesagt. Interessanterweise verfügt ACOX über ein C-terminales „SRS“ Tripeptid, während Gt_ACAD mit der Protein-ID_90066 „SAM“ am C-Terminus enthält. Beide putativen PTS1-Signale unterscheiden sich in einer Aminosäure von dem bekannten PTS1-Konsensus [SAC]-[KRH]-[LM]. Die Analyse der letzten 12 C-terminalen Aminosäuren mit dem PTS1-Vorhersagetool (Neuberger et al. 2003a, 2003b) ergab eine negative Vorhersage für „SRS“ als PTS1, wobei das putative PTS1 „SAM“ in Gt_ACAD zum peroxisomalen Import beitragen könnte (Tab. III-2). Zusätzlich konnte mittels *in silico* Analyse für den ACAD Kandidaten ID_156886 zwar kein PTS1 oder PTS1-ähnliches Signal detektiert werden, dennoch könnten die letzten 12aaC einen PTS1-abhängigen Import auslösen (TZ, *twilight zone*) (Tab. III-2).

Des Weiteren wurden Kandidaten-Proteine für die weiteren Schritte der β -Oxidation untersucht: Enoyl-CoA-Hydratase (ECH), 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (3HCD) und 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (KCT). *In silico* Analysen der der Enoyl-CoA-Hydratase (ECH), die normalerweise den zweiten Schritt der β -Oxidation katalysiert, ergaben drei putative Kandidaten in *G. theta* (ID_88345, ID_99846, ID_86481). Für diese Kandidaten wurde kein

peroxisomaler Import vorhergesagt; stattdessen besitzt jeder ECH-Kandidat ein vorhergesagtes mTP für mitochondriale Zielsteuerung (Tab. III-2). Interessanterweise wurde ein putatives multifunktionelles Enzym, das ECH und 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (3HCD) Gt_ECH-3HCD kombiniert und wahrscheinlich den zweiten und dritten Schritt der β -Oxidation katalysiert, mit dem Protein ID_121132 identifiziert, wobei das bifunktionale Enzym aus *P. tricornutum* für die *in silico* Analysen verwendet wurde. Nach der Überprüfung der CDS mit EST- und gDNA-Daten für Gt_ECH-3HCD (ID_121132) wurde kein PTS, sondern ein mutmaßliches mTP vorhergesagt (Tab. III-2), was auf eine ausschließlich mitochondriale Lokalisation hindeutet. Es ist anzumerken, dass das putative mTP in Gt_ECH-3HCD (ID_121132) nicht mit EST-Daten bestätigt werden konnte.

Tab. III-2: Übersicht über *in silico* identifizierten Enzymen, welche an der Fettsäure β -Oxidation in *G. theta* beteiligt sein könnten.

Trivialname	ID in JGI	BlastP	PTS1	PTS2	PLok	Lok <i>in vivo</i>
Acyl-CoA Oxidase	147553	Acyl-CoA-Oxidase/Dehydrogenase	SRS	-	M	M ^a
	71221	Acyl-CoA-Dehydrogenase	-	-	M	nd
Acyl-CoA Dehydrogenase	90066	Acyl-CoA-Dehydrogenase	SAM	-	M	C/? ^b
	71272	Acyl-CoA-Dehydrogenase	-	-	M	nd
	156886	Acyl-CoA-Dehydrogenase	- (TZ)	-	M	nd
	87673	Acyl-CoA-Dehydrogenase	-	-	M	nd
	113578	Acyl-CoA-Dehydrogenase	-	-	M	nd
Enoyl-CoA-Hydratase	121132	<i>trifunctional enzyme subunit alpha</i>	-	-	M	C ^{b*}
	88345	Enoyl-CoA-Hydratase	-	-	M	nd
	99846	Enoyl-CoA-Hydratase	-	-	M	nd
	86481	Enoyl-CoA-Hydratase	-	-	M	nd
3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase	161810	3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase	-	-	M	M ^b
3-Ketoacyl-CoA-Thiolase	159886	<i>trifunctional enzyme subunit beta</i>	-	-	M	M ^b

Bioinformatik von Dr. Daniel Moog, **TZ** mögliche Lokalisation in Peroxisomen mit PTS1-Vorhersage, **PLok** vorhergesagte Lokalisation mit den Internetanwendungen SignalP, TargetP, PredSL und Predotar (Tab. VI-12), **Lok *in vivo*** heterologe Lokalisation als GFP-Fusion **M** Mitochondrien, **C** Cytosol, **?** unbekannt, ^a in Mix 2017 lokalisiert, ^b diese Arbeit, ^{*} ohne putatives mTP lokalisiert, - nicht vorhanden, **nd** nicht lokalisiert.

Nur ein Kandidat für 3HCD für den individuellen dritten Schritt der β -Oxidation, der homolog zu dem bifunktionalen Enzym aus *P. tricornutum* ist, wurde durch BLAST-Analysen mit der

Protein-ID_161810 identifiziert (Tab. III-2). Vorhersageanalysen ergaben, dass Gt_3HCD (ID_161810) vermutlich in Mitochondrien lokalisiert und keine putativen PTS oder PTS-ähnliche Signale aufweist.

Für den vierten und letzten Schritt der β -Oxidation wird eine 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (KCT) benötigt. Peroxisomale Isoformen enthalten entweder eine PTS1 oder eine PTS2; mitochondriale Isoformen können ebenfalls in das trifunktionale Enzym integriert sein, das die Schritte 2 bis 4 kombiniert (Camões et al. 2015). Mit Hilfe der *in silico* Analysen konnte nur ein putativer Gt_KCT-Kandidat identifiziert werden (ID_159886). Gt_KCT besitzt ein mTP, keine PTS-ähnlichen Signale und ist homolog zu einem trifunktionalem Enzym (Tab. III-2).

III.1.4.2 Lokalisation von identifizierten Faktoren der β -Oxidation aus *G. theta* in *P. tricornutum*

Wenngleich die bioinformatischen Analysen auf eine mitochondriale β -Oxidation der Fettsäuren hindeuteten, wurden ausgewählte *G. theta* Kandidaten heterolog in *P. tricornutum* mR3-SKL (Marter et al. 2020) lokalisiert. Dabei lag der Fokus vor allem auf den Enzymen Gt_ACOX (ID_147553) und Gt_ACAD (ID_90066), welche die erste Reaktion in der β -Oxidation der Fettsäuren katalysieren, da diese den ersten Hinweis auf die Lokalisation der β -Oxidation in *G. theta* liefern könnten. Vollständigkeitshalber wurden auch Enzyme lokalisiert, die die weiteren Schritte ausführen.

III.1.4.2.1 Lokalisierung von Gt_ACOX und Gt_ACAD und deren Charakterisierung

Zur Bestimmung der *in vivo* Lokalisation der putativen peroxisomalen Gt_ACOX (ID_147553) und Gt_ACAD (ID_90066) wurden verschiedene Varianten der entsprechenden Gene als GFP-Fusion exprimiert und heterolog *in vivo* in *P. tricornutum* mRuby3-SKL (Marter et al. 2020) untersucht. Für erste Untersuchungen der Lokalisation von Gt_ACOX, wurden unterschiedliche Konstrukte generiert und *in vivo* in *P. tricornutum* WT heterolog lokalisiert (Mix 2017; Raap 2018). Gt_ACOX wurde in voller Länge mit N-terminalen GFP (GFP-Gt_ACOX) lokalisiert und es wurden die Präsequenz (Pre-Gt_ACOX-GFP) und der C-terminus (GFP-

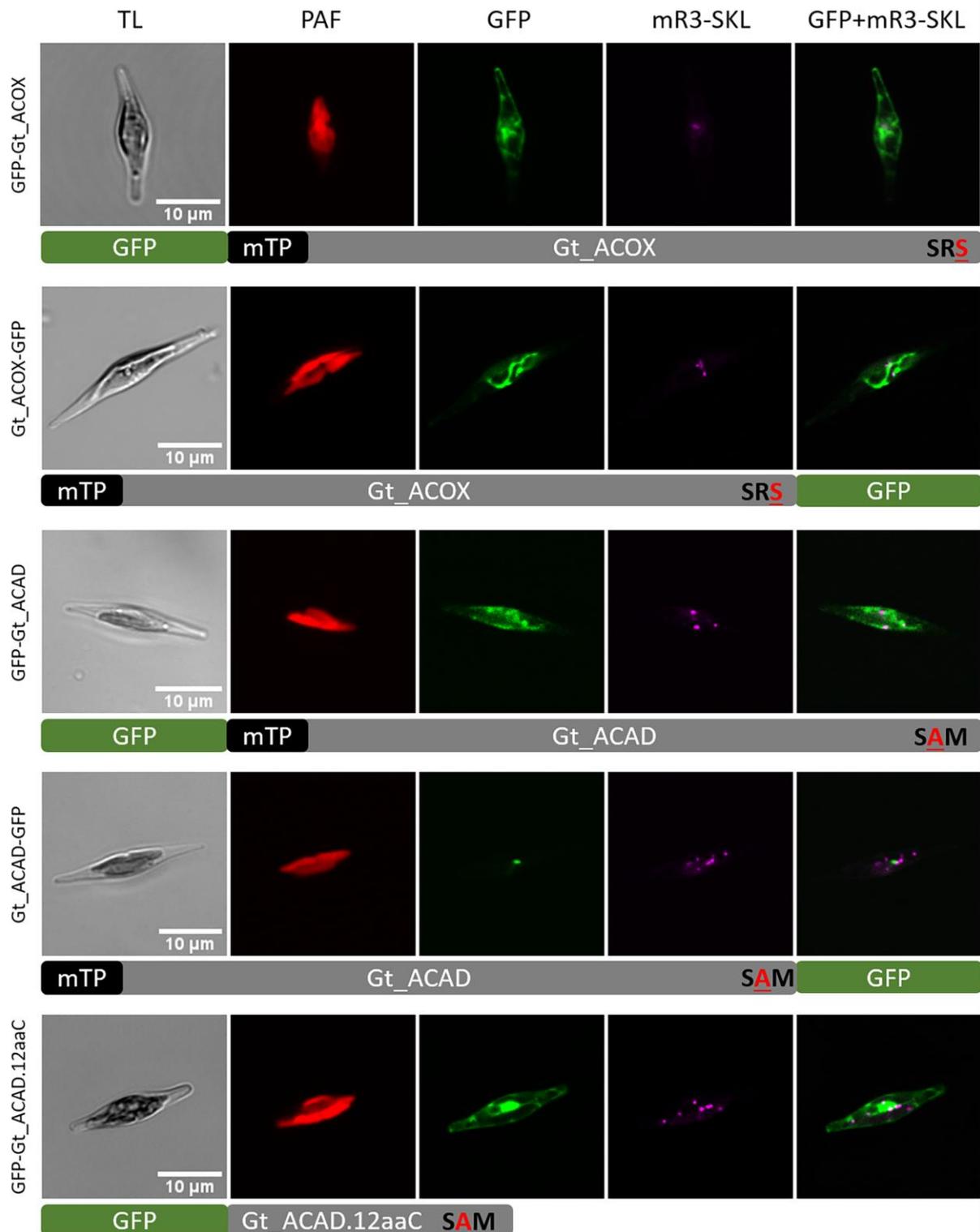


Abb. III-6: Heterologe *in vivo* Lokalisation von Gt_ACOX und Gt_ACAD in *P. tricornutum* mR3-SKL

Gt_ACOX (Acyl-CoA-Oxidase) lokalisierte mit N-terminalem GFP im Cytosol, während die C-terminale GFP-Fusion den Transport in die Mitochondrien begünstigte. Gt_ACAD (Acyl-CoA Dehydrogenase) lokalisierte mit N-terminalem GFP im Cytosol, während die C-terminale GFP-Fusion in punktartigen Strukturen resultierten, welche jedoch nicht mit mR3-SKL kolokalisierten. Auch die 12aaC-Versionen der beiden Enzyme lokalisierten cytosolisch.

TL Durchlicht, PAF Plastidenautofluoreszenz, GFP grün fluoreszierendes Protein, mR3-SKL peroxisomaler Marker, 12aaC die letzten 12 C-terminalen Aminosäuren; Maßstab 10 μ m.

Gt_ACOX.12aaC) analysiert (Abb. S VII-2). Während Pre-Gt_ACOX-GFP in länglichen Strukturen nahe der Plastide lokalisierte, wurde für GFP-Gt_ACOX und GFP-Gt_ACOX.12aaC eine cytosolische Lokalisation in *P. tricornutum* WT beobachtet. Vollständigkeitshalber wurden GFP-Gt_ACOX und Gt_ACOX-GFP im Rahmen dieser Arbeit in *P. tricornutum* mR3-SKL (Marter et al. 2020) erneut überprüft (Abb. III-6) (Ergebnisse publiziert in Vasilev et al. 2022).

Um das mTP in volle Länge Gt_ACOX und ebenfalls die Auswirkungen des nicht-kanonischen PTS1-ähnlichen Signals „SRS“ auf die Lokalisation von Gt_ACOX zu untersuchen, wurden GFP-Gt_ACOX und Gt_ACOX-GFP in der mR3-SKL Zelllinie exprimiert und lokalisiert. Gt_ACOX-GFP wurde mit dem peroxisomalen Marker mR3-SKL in länglichen Strukturen nahe der Plastide in *P. tricornutum* mR3-SKL kolokalisiert (Abb. III-6). GFP-Gt_ACOX dagegen wurde in der gesamten Zelle beobachtet (Abb. III-6).

Da Gt_ACAD (ID_90066) das putative PTS1-ähnliche Tripeptid „SAM“ enthält, welches laut der PTS1 Vorhersage einen peroxisomalen Import auslösen könnte (Tab. III-2), wurde heterologe *in vivo* Lokalisationsstudien in *P. tricornutum* mR3-SKL (Marter et al. 2020) mit unterschiedlichen GFP-Fusionen durchgeführt. Gt_ACAD wurde in voller Länge als GFP-Fusion N-/C-terminal lokalisiert (Abb. III-6). GFP-Gt_ACAD lokalisierte im gesamten Cytosol, während Gt_ACAD-GFP in einigen Fällen punktförmige Strukturen zeigte (Abb. III-6). Diese Strukturen waren jedoch deutlich größer als typische Peroxisomen und kolokalisierten nicht mit dem peroxisomalen Marker mR3-SKL (Abb. III-6). Analog zu Gt_ACOX wurden die letzten 12aaC von Gt_ACAD auf die Fähigkeit einen peroxisomalen Import auszulösen, untersucht. Hierfür wurde das GFP-Gt_ACAD.12aaC heterolog *in vivo* in *P. tricornutum* mR3-SKL lokalisiert. Für GFP-Gt_ACAD.12aaC konnten Signale in der gesamten Zelle beobachtet werden (Abb. III-6).

Die lokalisierten *G. theta* ACOX- (ID_147553) und ACAD- (ID_90066) Kandidaten wurden weiter analysiert. ACAD-Enzyme bestehen normalerweise aus einer α -Domäne am N-Terminus, gefolgt von einer mittleren β -Domäne und einer α -Domäne am C-Terminus (α - β - α), während ACOX eine ähnliche Struktur mit einer zusätzlichen C-terminalen α -Domäne (α - β - α - α) aufweist (Kim und Miura 2004). Die zusätzliche α -Domäne führt zu einer größeren Bindestelle des Proteins und ermöglicht die Bindung von sehr langen Fettsäuren, während die unterschiedlichen ACAD Isoformen normalerweise lange und kurze Fettsäuren binden. Da sich die Sequenzen von ACOX und ACAD sehr ähnlich sind, kann die Unterscheidung *in silico* schwierig sein. Bioinformatische Analysen sowohl der Proteinsequenzen in PHYRE² als auch

einer Proteindatenbank ergaben Ähnlichkeiten von *G. theta* ACOX mit anderen bekannten ACOX- und ACAD-Sequenzen, wobei für *G. theta* ACAD nur anderen ACAD-Sequenzen ähnelte. Obwohl *in silico*-Analysen auf eine ACOX-Identität für das Protein mit der ID_147553 hinweisen, war eine eindeutige funktionelle Zuordnung nicht möglich. Zur weiteren Differenzierung sollten phylogenetische Analysen und/oder *in vitro* Assays der Gt_ACOX und Gt_ACAD durchgeführt werden.

III.1.4.2.2 Lokalisierung von Gt_ECH, Gt_ECH-3HCD und Gt_KCT

Die nächsten Schritte der β -Oxidation werden entweder von einzelnen oder von multifunktionalen Enzymen, welche mehrere Reaktionsschritte katalysieren können, ausgeübt. Bioinformatische Analysen der Homologen für Enoyl-CoA-Hydratase (ECH) Hydroxyl-CoA-Dehydrogenase (3HCD) und Ketoacyl-CoA-Thiolase (KCT) resultierten in jeweils einem Kandidatengen für 3HCD und KCT, welche wahrscheinlich in den Mitochondrien lokalisieren (Tab. III-2). Dabei könnte es sich bei Gt_KCT um eine Untereinheit eines multifunktionalen Enzyms handeln (Tab. III-2). Die Ergebnisse von Homologie-Analysen von ECH deuten auf mehrere mitochondrial lokalisierte Gt_ECH-Isoformen in *G. theta* hin, wobei eines der Kandidaten Homologien zu einer Untereinheit eines multifunktionalen Enzyms aufweist (Tab. III-2). Für die Lokalisationsstudien wurden Gt_ECH-3HCD (ID_121132), Gt_3HCD (ID_161810), und Gt_KCT (ID_159886) mit C-terminalem GFP heterolog in *P. tricornutum* mR3-SKL lokalisiert, wobei von KCT nur die Präsequenz verwendet wurde (Pre-Gt_KCT-GFP) (Abb. III-7).

Für das putative multifunktionale Enzym Gt_ECH-3HCD (ID_121132) wurde ein mTP vorhergesagt, welches jedoch nicht durch EST-Daten bestätigt werden konnte. Ebenfalls konnte der codierende Bereich für das putative mTP aus *G. theta* cDNA nicht amplifiziert werden. Nichtsdestotrotz, wurde ECH-3HCD (ID_121132) in voller Länge (ohne das mTP) mit C-terminalem GFP in *P. tricornutum* mR3-SKL heterolog lokalisiert. Gt_ECH-3HCD-GFP lokalisierte im Cytosol der Diatomee (Abb. III-7). Ob das putative mTP in *G. theta* funktional ist, sollte in weiteren Studien näher untersucht werden.

Das putative Gt_3HCD wurde in voller Länge mit C-terminalem GFP in *P. tricornutum* lokalisiert. Mittels KLSM konnte ein GFP Signal in länglichen Strukturen nahe der komplexen Plastide detektiert werden (Abb. III-7).

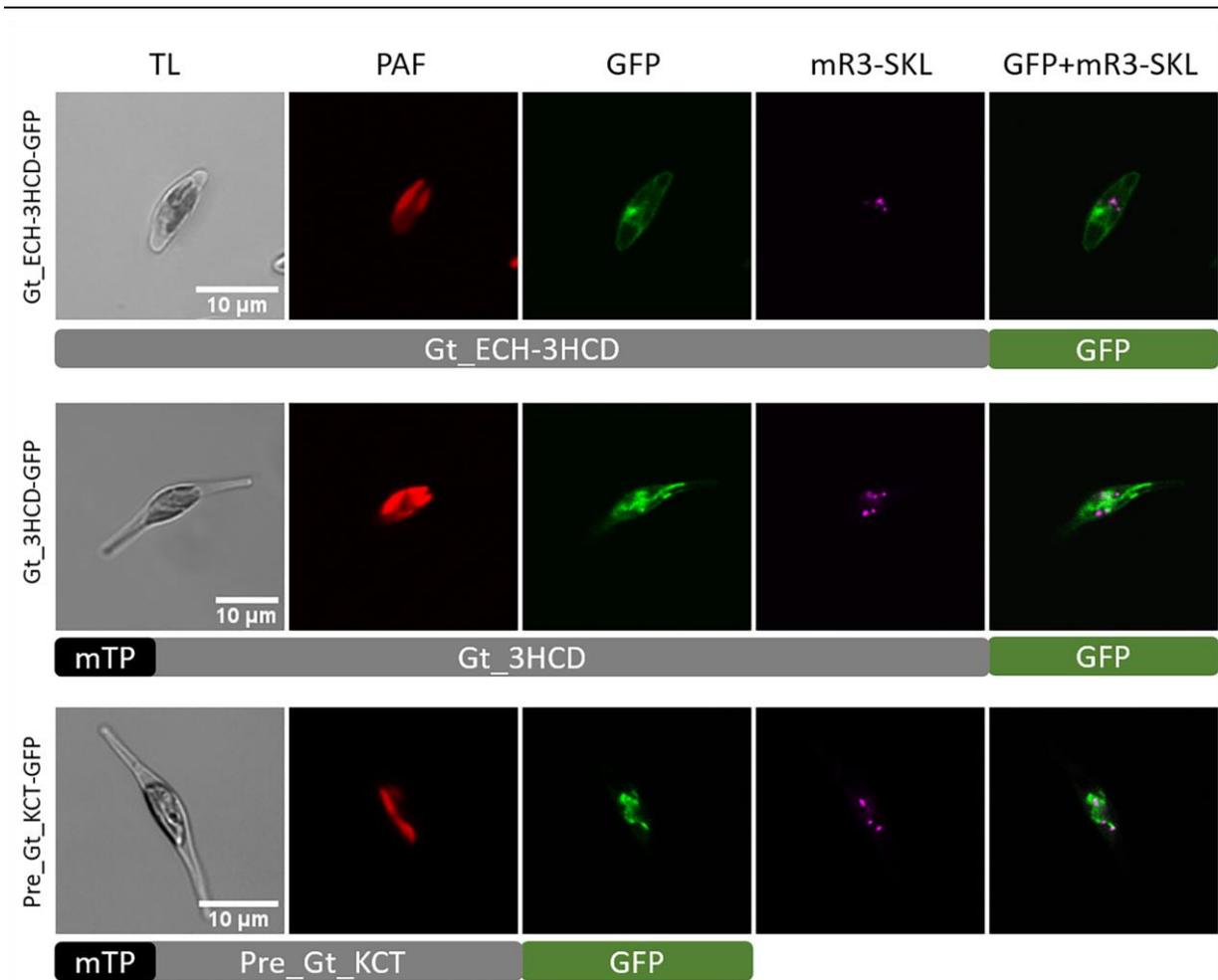


Abb. III-7: Heterologe *in vivo* Lokalisationen von Gt_ECH-3HCD, Gt_3HCD und Gt_Pre-KCT in *P. tricornutum*

Gt_3HCD (3-Hydroxyl-CoA-Dehydrogenase) wurde ohne das vorhergesagte mTP mit N-terminalem GFP im Cytosol von *P. tricornutum* lokalisiert, während Gt_ECH-3HCD (Enoyl-CoA-Hydratase-3HCD) und die Präsequenz Gt_Pre-KCT (Ketoacyl-CoA-Thiolase) mit N-terminalem GFP in den Mitochondrien lokalisierten.

TL Durchlicht, **PAF** Plastidenautofluoreszenz, **GFP** grün fluoreszierendes Protein, **mR3-SKL** peroxisomaler Marker, **mTP** mitochondriales Targeting-Peptid, Maßstab 10 μm.

Aufgrund eines unklaren Transkripts (das Genmodell wird nicht durch EST- oder Transkriptdaten gestützt) wurde die Präsequenz von Gt_KCT (ID_159886) mit C-terminalem GFP für die Lokalisationsstudien eingesetzt. Pre-Gt_KCT-GFP lokalisierte wie Gt_3HCD-GFP in länglichen Strukturen um die komplexe Plastide, was auf eine mitochondriale Lokalisierung hindeutet (Abb. III-7).

III.1.5 Glyoxylat-Zyklus und Photorespiration in *G. theta*

Der identifizierte Datensatz von 64 putativen PTS1-Proteinen in *G. theta* beinhaltet ebenfalls beinahe keine am Glyoxylat-Zyklus und der Photorespiration beteiligten Enzyme (Tab. S 1). Da die Peroxisomen in höheren Pflanzen an beiden Prozessen beteiligt sind, wurden in dieser Arbeit weitere bioinformatische Analysen durchgeführt, um mögliche peroxisomalen Komponenten mit nicht-kanonischen PTS1 oder PTS2 Sequenzen zu identifizieren (siehe Kapitel III.1.5.1). Ausgewählte Kandidaten wurden in Kolokalisationsstudien in *P. tricornutum* mR3-SKL analysiert (siehe Kapitel III.1.5.3).

III.1.5.1 *In silico* Analysen der an dem Glyoxylat-Zyklus beteiligten Enzymen in *G. theta*

Mit Hilfe von bioinformatischen Studien des Glyoxylat-Zyklus in *G. theta* wurden vier der fünf am Glyoxylat beteiligten Enzyme mit einer putativen PTS1 oder PTS1-ähnlichen Sequenz identifiziert (Tab. III-3). Dabei handelt es sich um Homologe zu der Aconitase (Gt_ACO, ID_102467), eine Isocitrat-Lyase (Gt_ICL, ID_67257), eine Malat-Synthase (Gt_MS, ID_97605) und Malat-Dehydrogenase (Gt_MD, ID_64327). Peroxisomale Lokalisation für Gt_MD mit „SKL“ als PTS1 wurde bereits in Kapitel III.1.2 beschrieben. Für die Kandidaten Gt_ACO, Gt_ICL und Gt_MS wurde nur eine PTS1-ähnliche Sequenz am C-Terminus identifiziert (Tab. III-3). Für Gt_ACO wurde neben der PTS1-ähnlichen Sequenz „AKV“ ein N-terminales Signalpeptid vorhergesagt. Des Weiteren könnte es sich laut BLAST-Analysen bei Gt_ACO um eine Isopropylmalat-Dehydrogenase an Stelle der Aconitase handeln (Tab. III-3). Aus diesem Grund wurde Gt_ACO nicht *in vivo* lokalisiert. Die putative Isocitrat-Lyase besitzt am N-Terminus ebenfalls ein Signalpeptid und eine C-terminale PTS1-ähnliche Sequenz „YKL“, welche laut dem PTS1-Vorhersagetool einen PTS1-abhängigen Import in die Peroxisomen auslösen könnte (Tab. III-3). Die putative Malat-Synthase besitzt neben der PTS1-ähnlichen Sequenz „SRK“ ein N-terminales mTP (Tab. III-3).

In heterologen Kolokalisationsstudien wurden folglich Gt_ICL (ID_67257) und Gt_MS (ID_97605) eingesetzt, da diese eindeutig annotiert wurden und PTS1-ähnliche Signale aufweisen. Um die Auswirkungen der PTS1-ähnlichen Signale von Gt_ICL und Gt_MS zu untersuchen, wurden die 12aaC mit N-terminalem GFP heterolog in *P. tricornutum* mR3-SKL analysiert und die *in vivo* Lokalisation mittels KLSM detektiert (siehe Kapitel III.1.5.3, Abb. III-8).

Tab. III-3: Ergebnisse der bioinformatischen Suche nach Faktoren des Glyoxylat-Zyklus in *G. theta*

Trivialname	Abk.	ID	BlastP	PTS1	PLok	In vivo GFP-12aaC	TMD
Aconitase	ACO	102467	Isopropylmalat-Dehydrogenase	<u>AKV</u>	SP (ASA-FAP) S	nd	0
		95798	Aconitat-Hydratase/Mathylisocitrat Dehydrogenase	-	M	nd	0
		102923	No hits			nd	
Citrat-Synthase	CS	87417	Citrat-Synthase	-	M	nd	0
		162281	Neuromodulin_N superfamily	-	SP (INA-DL) S	nd	1
		157241	Succinat-CoA Ligase	-	other	nd	0
Isocitrat-Lyase	ICL	67257	Isocitrat-Lyase	<u>YKL</u> (TZ)	SP (CSG-YI) S	C	1
		96465	Isocitrat-Lyase	-	other	nd	0
Malat-Synthase	MS	97605	Malat-Synthase	<u>SRK</u>	M	C	0
		178063	Putatives Kinesin K39	-	other	nd	0
Malat-Dehydrogenase	MD	64327	Malat-Dehydrogenase	SKL	Px	Px	0
		164740	Malat-Dehydrogenase	-		nd	
		42681	Malat-Dehydrogenase			nd	
		74129	Malat-Dehydrogenase	-	C	nd	0
		163842	Malat-Dehydrogenase	-	C	nd	
		154188	Malat-Dehydrogenase	-	M	nd	0

PTS1 peroxisomale Zielsteuerungssignal 1, **PLok**, vorhergesagte Lokalisation mit SignalP, TargetP, PredSL und Predotar (Tab. VI-12), **In vivo GFP-12aaC** heterologe Lokalisation in *P. tricornutum* wenn 12aaC des jeweiligen Proteins N-terminal mit GFP fusioniert sind, **TMD** Transmembrandomänen, **P** Plastide, **M** Mitochondrien, **Px** Peroxisomal, **TZ** mögliche Lokalisation in Peroxisomen mit PTS1-Vorhersage, **S** sekretorischer Weg, **C** Cytosol; unterstrichene Aminosäuren in PTS1-ähnlichen Sequenzen entsprechen nicht dem Konsensus [SAC]-[KRH]-[LM].

III.1.5.2 In silico Analysen der an der Photorespiration beteiligten Enzymen in *G. theta*

Für die *in silico* Detektion von möglichen photorespiratorischen Enzymen in *G. theta* wurden bekannte Proteinsequenzen aus *A. thaliana* eingesetzt (Dellero et al. 2016). Die photorespiratorischen Reaktionen involvieren in der Regel startend in der Plastide auch Peroxisomen und Mitochondrien in höheren Pflanzen. Für das Gesamtbild wurden nicht nur peroxisomale Enzyme *in silico* mit Hilfe von BlastP-Analysen und durch Stichwort-Suche in der *G. theta* Genomdatenbank untersucht.

Die Photorespiration startet in den Plastiden, wo das 2-Phosphoglykolat (2-PG) aus dem Calvin-Zyklus durch eine Phosphoglykolat-Phosphatase (PGLP) zunächst dephosphoryliert und anschließend durch einen plastidären Glykolat/Glycerat-Transporter (PLGG) in das Cytosol

transportiert wird. In *A. thaliana* sind zwei Proteine mit PGLP-Aktivität bekannt (Dellero et al. 2016) und beide Sequenzen wurden in der Genomdatenbank von *G. theta* mittels BlastP-Analysen untersucht. Neben zwei hypothetischen Proteinen (nicht dargestellt in Tab. III-4) konnten in *G. theta* zwei Homologe mit der Protein ID_158244 und ID_86375 mit n-terminalen Signalpeptiden identifiziert werden. Für den plastidären PLGG Transporter wurden in *G. theta* drei putative Kandidaten identifiziert: ID_99424, ID_138411 und ID_111530 (Tab. III-4). Alle PLGG Kandidaten weisen 8 oder 12 Transmembrandomänen auf und könnten somit als Membrantransporter fungieren. PLGG mit der ID_99424 weist zudem ein Signalpeptid auf, was auf eine plastidäre Lokalisation oder eine Sekretion hindeutet. Die beiden anderen Kandidaten werden laut Vorhersagetools über das ER sekretiert. Ob es sich bei allen drei Kandidaten tatsächlich um einen PLGG Transporter handelt, sollte zukünftig untersucht werden.

Die nächsten Schritte der Photorespiration finden in den Peroxisomen statt. Glykolat wird durch eine Glykolat-Oxidase (GOX) zu Glyoxylat oxidiert, wobei H_2O_2 als Nebenprodukt entsteht. Alternativ kann Glykolat von einer Glykolat-Dehydrogenase (GDH) zu Glyoxylat umgesetzt werden. In den Peroxisomen wird das Glyoxylat zu der Aminosäure Glycin aminiert, was durch zwei Reaktionen möglich ist, die parallel ablaufen können. So kann eine Glutamat-Glyoxylat-Transferase (GGT) den Aminorest von dem Donor Glutamat oder Alanin auf das Glyoxylat übertragen oder eine Serin-Glyoxylat-Aminotransferase (SGAT) überträgt den Aminorest von Serin auf das Glyoxylat. In *A. thaliana* sind 3 GOX Homologe und 2 Homologe für Hydroxy-Säure-Oxidasen (HAOX) annotiert, welche breitere Substratspezifitäten als GOX aufweisen (Maurino und Engqvist 2015). GOX und HAOX Homologe aus *A. thaliana* wurden in der Genomdatenbank von *G. theta* als Abfragesequenzen in den BLAST Analysen eingesetzt. Ein putativer Gt_GOX Kandidat konnte *in silico* identifiziert werden (Tab. III-4). Dabei könnte es sich bei dem Protein ID_159984 um eine weniger spezifische Hydroxy-Säure-Oxidase handeln; einfachheitshalber wurde das Protein ID_159984 in *G. theta* in dieser Arbeit als Gt_GOX annotiert. Zukünftige Studien sollte im Hinblick auf die Substratspezifität durchgeführt werden. Interessanterweise weist Gt_GOX ein PTS1-ähnliches Tripeptid „SKG“ am C-Terminus und ein mTP am N-Terminus auf. Um die Lokalisation *in vivo* zu untersuchen, wurden die 12aaC von Gt_GOX an das GFP fusioniert und *in vivo* lokalisiert (GFP-GOX.12aaC, siehe Kapitel III.1.5.3). Das *G. theta* Genom wurde zusätzlich auf das Vorhandensein einer peroxisomalen GDH untersucht. Hier konnten keine klaren Kandidaten identifiziert werden.

Ein Hinweis auf eine GDH könnten die FAD-bindenden Enzyme darstellen, die homolog zu GDH-Sequenzen sind (Tab. III-4). Hier sollten ebenfalls weitere Analysen auf die Substratspezifität erfolgen, um potentielle GDH Isoformen in *G. theta* zu identifizieren. Die GDH-Kandidaten in *G. theta* lokalisieren laut Vorhersage in der Plastide oder mitochondrial.

Die Umsetzung von Glyoxylat zu Glycin kann durch GGT oder SGAT erfolgen. In *G. theta* wurden keine peroxisomalen GGT oder SGAT identifiziert. *G. theta* Proteine, die homolog zu GGT oder SGAT Sequenzen aus *A. thaliana* sind, weisen Ähnlichkeiten zu Alanin-Aminotransferase oder Alanin-Glyoxylat-Transaminasen auf (Tab. III-4). *In silico* Analysen der Lokalisationen der potentiellen Aminotransferasen in *G. theta* deuten auf mitochondriale, plastidäre oder cytosolische Isoformen hin.

Die nächsten Schritte der Photorespiration finden in den Mitochondrien statt. Das in den Peroxisomen gebildete Glycin wird in die Mitochondrien transportiert, wo dieses zu Serin durch die Serin-Hydroxymethyl-Transferase (SHMT) oxidiert wird. Durch *in silico* Analysen wurden drei putative SHMT-Kandidaten in *G. theta* identifiziert werden (Tab. III-4). Nur das putative Gt_SHMT mit der Protein ID_119655 lokalisiert möglicherweise mitochondrial. Weitere *in vivo* Studien sind notwendig, um eine genauere Aussage treffen zu können.

Das Serin wird anschließend wieder in die Peroxisomen transportiert und durch die SGAT zu Hydroxypyruvat umgesetzt (HP). Das HP wird durch die HP-Reduktase (HPR) unter Verbrauch von NADH zu Glycerat reduziert, welches über den PLGG Transporter wieder in die Plastide transportiert wird. Plastidäre Glycerat-Kinase (GLYK) wird unter ATP-Verbrauch zu 3-Phosphoglycerat (3-PGA) umgesetzt. In der Cryptomonade *G. theta* konnte kein peroxisomal lokalisiertes Gt_SGAT mit Hilfe bioinformatischer Analyse identifiziert werden. Die potentiellen Gt_SGAT Kandidaten lokalisieren laut Vorhersagen entweder mitochondrial oder cytosolisch (Tab. III-4). Auch die identifizierten HPR-Kandidaten in *G. theta* lokalisieren laut Vorhersagen mitochondrial (Tab. III-4). Interessanterweise wies das Gt_HPR mit der Protein ID_91234 nach der CDS-Überprüfung mit EST- und gDNA-Daten im Sequencher ein „AKL“ als C-terminales Tripeptid, was auch das Vorhandensein eines PTS1 hindeutet. Bioinformatische Analysen des letzten Enzyms der photorespiratorischen Kette GLYK weisen entweder auf mitochondriale oder cytosolische Enzyme in *G. theta* hin (Tab. III-4). Das Endprodukt der Photorespiration in *G. theta* müsste demnach über den PLGG Transporter aus dem Mitochondrium oder dem Cytosol zurück in die Plastide transportiert werden.

Tab. III-4: Bioinformatische Analyse der Faktoren beteiligt an der Photorespiration in *G. theta*

Trivialname	Abk.	ID	BlastP	PTS1	PLok
Phosphoglykolat-Phosphatase	Gt_PGLP	158244	PGLP	-	SP (ATA-FS)
		86375	PGLP	-	SP (TDS-FL)
Glykolat/Glycerat-Transporter	Gt_PLGG	99424	PLGG	-	SP (VEA-MT) 12 TMD
		138411	PLGG	-	S, 8 TMD
		111530	PLGG	-	S, 8 TMD
Glykolat-Oxidase (GOX)	Gt_GOX/GDH	159984	Hydroxy-Säure-Oxidase (HOX)	SKG	M
		72404	FAD-bindendes Protein	-	SP (SAA-HQ) M
		96154	GDH	-	M
Glutamat-Glyoxylat Transferase	Gt_GGT	157749	Alanin-Aminotransferase	-	M
		103164	Alanin-Aminotransferase	-	M
		77426	Alanin-Aminotransferase	-	M
		159157	Alanin-Aminotransferase	-	SP (SLS-TP)
Serin-Glyoxylat Aminotransferase	Gt_SGAT	152799	Serin-Pyruvat Aminotransferase oder Alanin-Glyoxylat Transaminase	-	M
		146568	Serin-Pyruvat Aminotransferase oder Alanin-Glyoxylat Transaminase	-	C
		154135	Serin-Pyruvat Aminotransferase oder Alanin-Glyoxylat Transaminase	-	M
Serin-Hydroxymethyl-Transferase	Gt_SHMT	95571	SHMT	-	C
		119655	SHMT	-	M
		160011	SHMT	-	C
Hydroxypyruvat-Reduktase	Gt_HPR	91234	Glyoxylat-Reduktase Hydroxypyruvat-Reduktase	AKL	M/Px
		46401	Glyoxylate-Reduktase Hydroxypyruvat-Reduktase	-	S/M
Glycerat-Kinase	Gt_GLYK	138485	Glycerat-Kinase	-	M
		80135	Phosphoglycerat-Kinase	-	C
		80512	Phosphoglycerat-Kinase	-	C
		91943	Phosphoglycerat-Kinase	-	C
		149840	Phosphoglycerat-Kinase	-	C
Glyoxylat-Reduktase	Gt_GLYR	67772	Glyoxylat/Succinyl-Semialdehyd-Reduktase	-	SP (GMA-GN)
		157458	Glyoxylat/Succinyl-Semialdehyd-Reduktase	-	SP (AKA-YT)

Abk. Abkürzung, **ID** Protein-ID in *G. theta* Datenbank, **PTS** peroxisomale Zielsteuerung, **PLok** vorhergesagte *in silico* Lokalisation, - nicht vorhanden, **P** Plastide, **M** Mitochondrien, **Px** Peroxisomen, **S** sekretiert, **SP** Signalpeptid, **TMD** Transmembrandomäne(n), **C** Cytosol.

III.1.5.3 Heterologe *in vivo* Lokalisationen von putativen Enzymen beteiligt an dem Glyoxylat-Zyklus und der Photorespiration

Nach *in silico* Analysen potentiell peroxisomal lokalisierter Faktoren des Glyoxylat-Zyklus in *G. theta*, wurden für die Lokalisationsstudien Gt_ICL und Gt_MS ausgewählt (Tab. III-3). Da es sich bei dem einzigen Kandidaten für Gt_ACO mit einem PTS1-ähnlichem Signal vermutlich nicht um eine Aconitase handelt, wurde dieser Kandidat nicht *in vivo* lokalisiert. Für die

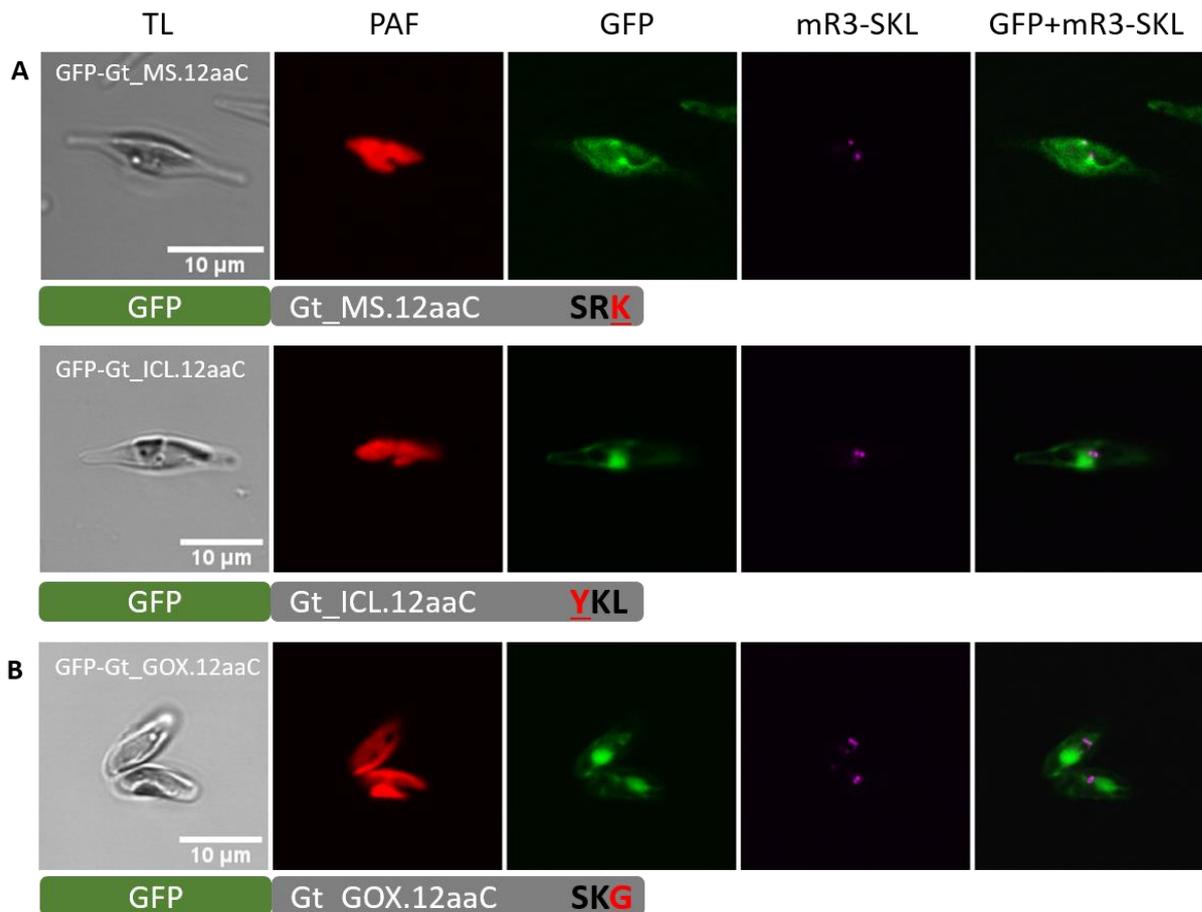


Abb. III-8: Heterologe *in vivo* Lokalisation von putativen Faktoren beteiligt am Glyoxylat-Zyklus und Photorespiration

Putative *G. theta* (Gt) Enzyme beteiligt am Glyoxylat-Zyklus (A) wie Malat-Synthase (MS) und Isocitrat-Lyase (ICL) wurden cytosolisch als GFP-12aaC Konstrukte *in vivo* in der Diatomee *P. tricornutum* lokalisiert. Gt_GOX als mögliches Enzym beteiligt an der Photorespiration wurde im Cytosol in *P. tricornutum* lokalisiert (B).

TL Durchlicht, PAF Plastidenautofluoreszenz, GFP grün fluoreszierendes Protein, mR3-SKL peroxisomaler Marker, 12aaC die letzten C-terminalen 12 Aminosäuren inklusive des putativen PTS1, Maßstab 10 µm

Kolokalisationsstudien von Gt_ICL und Gt_MS wurden nur die letzten 12 Aminosäuren (12aaC) des jeweiligen Enzyms an das GFP fusioniert, um deren Auswirkung auf den PTS1-abhängigen Import zu untersuchen.

Nach der Transfektion, Selektion und anschließend der 24-stündige Expression in *P. tricornutum* mR3-SKL, wurde die *in vivo* Lokalisation der Fusionsproteine GFP-Gt_ICL.12aaC und GFP-Gt_MS.12aaC am KLSM untersucht. Sowohl für GFP-Gt_MS.12aaC als auch GFP-Gt_ICL.12aaC wurde die GFP-Fluoreszenz in der gesamten Zelle detektiert (Abb. III-8). Es ist anzunehmen, dass die gewählten 12aaC der jeweiligen Proteine aus *G. theta* mit PTS1-ähnlichen „SRK“ und „YKL“ (Tab. III-3) Tripeptiden keinen PTS1-abhängigen Import im heterologen System auslösen.

Bioinformatische Analysen der Faktoren beteiligt an der Photorespiration zeigten nur zwei putativ-peroxisomale Enzyme auf: Gt_GOX (ID_159984) und Gt_HRP/GR (ID_91234). Gt_GOX wurde wie die Kandidaten für den Glyoxylat-Zyklus als 12aaC Version fusioniert an GFP heterolog in *P. tricornutum* exprimiert (GFP-Gt_GOX.12aaC), um die Auswirkungen des PTS1-ähnlichen Tripeptid mit „SKG“ zu untersuchen. GFP-Gt_GOX.12aaC konnte mittels KLSM im Cytosol lokalisiert werden (Abb. III-8), was darauf hinweist, dass „SKG“ in *P. tricornutum* nicht als PTS1 Signal fungiert. Es ist zu beachten, dass Gt_GOX laut *in silico* Analysen über ein N-terminale mTP verfügt und laut Zielsteuerungsanalysen in Mitochondrien lokalisieren könnte (Tab. III-4). In dieser Arbeit wurde das mTP von Gt_GOX nicht *in vivo* untersucht. Die *in vivo* Lokalisation von Gt_HRP/GR (ID_91234) konnte nicht bestimmt werden, da keine positiven Klone selektiert werden konnten.

III.2 *In silico* Analysen der metabolischen Prozesse in *G. theta*

Die *in vivo* (Ko-)Lokalisationsstudien der ausgewählten *G. theta* PTS1-Proteinen in *P. tricornutum* geben Hinweise darauf, dass die Peroxisomen an unterschiedlichen metabolischen Prozessen beteiligt sind. Häufig handelte es sich dabei um Proteine, die an Zwischenreaktionen einzelner biochemischer Pathways oder Reaktionsabfolgen beteiligt sind. Durch *in silico* Analysen sollte im Folgenden aufgeschlüsselt werden, in welchen Kompartimenten weitere Enzyme intrazellulär lokalisieren könnten (siehe Kapitel VI.2.1.2).

Die Tab. III-5 fasst die Resultate der bioinformatischen Analysen metabolischer Prozesse in *G. theta* zusammen. Für mehr Details siehe Tab. Digital 6 im digitalen Anhang.

Tab. III-5: Übersicht der analytischen metabolischen Prozesse in *G. theta*

Metabolismus	Abk.	ID	Funktion (BlastP)	PTS1	PLok	Lok <i>in vivo</i>
ROS	Gt_APX	88523	Ascorbatperoxidase	SKM	Px	Px
	Gt_MDHAR	-	Monodehydroascorbat-Reduktase	na	na	na
	Gt_DHAR	153349	Dehydroascorbat-Reduktase	-	?	nd
	Gt_GR	66527	Glutathiondisulfid-Reduktase	-	C	nd
	Gt_GR	83774	Glutathiondisulfid-Reduktase	<u>SRV</u>	Px	nd
Purinabbau	Gt_XDH/XO	164776	Xanthin-Dehydrogenase/Oxidase	-	SP C	nd
	Gt_UO	161824	Urat-Oxidase	SKL	Px	Px
	Gt_ALN	67817	Allantoinase	AKL	Px	Px ¹
	Gt_ALC	71482	Allantoikase	<u>SKV</u>	Px	C ¹
	Gt_Urease	116849	Urease	-	M/C	nd
Kohlenhydrate und Aminosäuren	Gt_NME	91319	NAD-Maleinenzym	CKL	Px	Px
	Gt_pMD	64327	Malat-Dehydrogenase	SKL	Px	Px
	Gt_AAT	158574	Aspartat-Amino-Transferase	SKL	Px	Px/C
	Gt_ASP	121809	Asparaginase	<u>PRL</u>	Px	nd
	Gt_cMD	163842	Malat-Dehydrogenase	-	C	nd
Etherphospholipid	Gt_FAR	135385	Fettsäure-Acyl-CoA-Reduktase	SRL	Px	Px
	Gt_GPAT/DHAPAT	139343	Glycerolphosphat-Acyltransferase/Dihydroxyacetone-Phosphat-Acyltransferase	-	TMD	nd
	Gt_GPAT/DHAPAT	163230	Glycerolphosphat-Acyltransferase/Dihydroxyacetone-Phosphat-Acyltransferase	-	S TMD	nd
	Gt_AGPS	157810	Alkyldihydroxyacetonphosphat-Synthase	SHL	Px	Px/C
Vitamin K	Gt_PHYLLO	72208	2-Succinyl-5-Enolpyruvyl-6-Hydroxy-3-Cyclohexen-1-Carbonsäure-Synthase	-	S	nd
	Gt_MenF	72190	Isochorismat-Synthase (Menachinon-spezifisch)	-	C	nd
	Gt_MenD	-	2-Succinyl-5-Enolpyruvyl-6-Hydroxy-3-Cyclohexen-1-Carboxylat-Synthase	na	na	na
	Gt_MenH	72176	2-Succinyl-6-Hydroxy-2,4-Cyclohexadien-1-Carboxylat-Synthase	-	S	nd
	Gt_MenC	-	o-Succinylbenzoat-Synthase	na	na	na
	Gt_MenE	139711	2-Succinylbenzoat-CoA-Ligase	-	SP (VRG-EL) 1 TMD	nd
	Gt_MenB	85732	1,4-Dihydroxy-2-Naphthoyl-CoA-Synthase	SRL	Px	Px/?
	Gt_DHNAT	-	1,4-Dihydroxy-2-Naphthoyl-CoA-Hydrolase	na	na	na
	Gt_MenA	-	2-Carboxy-1,4-Naphthochinon-Phytol-Transferase	na	na	na
	Gt_MenG	-	Demethylphyloquinol-Methyl-Transferase	na	na	na
Gt_VKOR	106868	Vitamin K Epoxid-Reduktase	-	?, 4 TMD	nd	

ROS reaktive Sauerstoffspezies, **PTS1/2** peroxisomale Targeting Sequenz Typ 1/2, **Px** peroxisomal, **SP** Signalpeptid, **C** cytosolisch, **TMD** mit Transmembrandomäne(n), **S** sekretorischer Weg, **?** unklare Lokalisation, **M** mitochondrial, **nd** nicht lokalisiert, - nicht identifiziert, **na** nicht zutreffend, ¹ Bacherloarbeiten Mix (2017) und Raap (2018).

III.2.1 Ascorbat-Glutathion Zyklus

Die Ascorbatperoxidase Gt_APX kolokalisierte mit dem mR3-SKL in *P. tricornutum* (Abb. III-1). Da APX am Ascorbat-Glutathion-Zyklus beteiligt ist (siehe Kapitel I.4.4.1.1), wurden *in silico* Analysen weiterer am AsA-GSH-Zyklus beteiligten Enzymen in *G. theta* durchgeführt.

Zunächst wurde in der entsprechenden Ascorbat-Metabolismuskarte in KEGG nach bereits annotierten *G. theta* Homologen gesucht. Dabei konnte kein Homolog für MDHAR (Monodehydroascorbat-Reduktase) und ein Kandidat für DHAR (Dehydroascorbat-Reduktase) (Protein ID_153349) identifiziert werden (Tab. III-5). Eine Stichwortsuche nach MDHAR in der *G. theta* Datenbank (Tab. VI-12) ergab keine Treffer. Des Weiteren konnte mittels KEGG und BLAST Analysen zwei Homologe für GR (Glutathiondisulfid-Reduktase) (ID_83774 und ID_83774) identifiziert werden (Tab. III-5). Die putativen Gt_DHAR und Gt_GR wurden *in silico* auf PTS-Signale und weitere Zielsteuerungssequenzen untersucht (siehe Kapitel VI.2.1). Dabei weist Gt_DHAR ein PTS2-ähnliches Nonapeptid „RLLLVLPLF“, ein putatives Signalpeptid am N-Terminus und eine TMD, wobei Gt_GR mit der ID_83774 ein C-terminales „SRV“ Tripeptid enthält (Tab. III-5 und Tab. S 2). Das Tripeptid „SRV“ entspricht nicht dem typischen PTS1-Konsensus, jedoch wurde mittels des PTS1-Vorhersagewerkzeugs eine peroxisomale Lokalisation für Gt_GR.12aaC vorhergesagt (Tab. III-5). Bioinformatische Analysen deuten auf eine cytosolische Lokalisation von GR mit ID_83774 hin (Tab. III-5).

III.2.2 Purinabbau

Die am Purinabbau beteiligten Enzyme Gt_UO, Gt_ALN und Gt_ALC wurden *in silico* identifiziert (Tab. III-1) und *in vivo* lokalisiert (Abb. S VII-1 und Abb. S VII-4). Das für Gt_UO benötigte Urat wird von Xanthin-Dehydrogenasen/Oxidasen (XDH/XO) oder von kombinierten Xanthin-Oxidoreduktasen (XOR) zur Verfügung gestellt (I.4.4.1.4).

Mittels *in silico* Analysen in KEGG konnte ein putatives Homolog zu XDH/XO (ID_164776) identifiziert werden (Tab. III-5). Manuel und mittels online Lokalisations-Vorhersagen konnten keine PTS-Signale in der Proteinsequenz von Gt_XDH/XO bestimmt werden. Laut Lokalisationsvorhersagen besitzt Gt_XDH/XO ein Signalpeptid am C-Terminus und wird über den sekretorischen Pathway transportiert (Tab. III-5). Weitere XDH/XO Homologe konnte in *G. theta* bioinformatische nicht bestimmt werden.

Der letzte Schritt beim Purin-Abbau wird durch eine Urease durchgeführt (siehe Kapitel I.4.4.1.4). Ein Urease Homolog konnte in *G. theta* mit der Protein ID_116849 *in silico* identifiziert werden (Tab. III-5). Bioinformatische Analysen deuten auf eine cytosolische Lokalisation von Gt_Urease hin (Tab. III-5), wobei manuell ein PTS2-ähnliches Nonapeptid „KLKRLARGL“ im N-Terminus bestimmt werden konnte (Tab. S 2).

III.2.3 Kohlenhydrate und Aminosäuren

Die am Kohlenhydrat- und Aminosäuren-Metabolismus beteiligten Enzyme Gt_NME, Gt_MD und Gt_AAT wurden *in silico* identifiziert (Tab. III-1) und *in vivo* lokalisiert (Abb. III-1 und Abb. III-2). Dabei nutzen MD und NME Malat als Substrat, wobei MD Oxalacetat produziert (siehe Kapitel I.4.4.1.2). Dieses kann von AAT zu Aspartat umgesetzt werden (siehe Kapitel I.4.4.1.3). Durch *in silico* Analysen des Aspartat-Stoffwechsels in *G. theta* mittels KEGG wurde eine putative Asparaginase (Gt_ASP, ID_121809) mit einem nicht-kanonischen Tripeptid „PRL“ am C-Terminus, identifiziert (Tab. III-5). Untersuchungen des C-terminus von Gt_ASP.12aaC *in silico* deuten auf eine peroxisomale Lokalisation hin (Tab. III-5 und Tab. S 2).

III.2.4 Etherphospholipide

Die an der Etherphospholipid-Synthese beteiligte Fettsäure-Reduktase Gt_FAR kolokalisiert mit dem mR3-SKL in *P. tricornutum* (Abb. III-1). Das entscheidende Enzym in der Etherphospholipid-Synthese ist Alkyldihydroxyacetonphosphat-Synthase (AGPS); das entsprechende Homolog enthält C-terminal ein „SHL“ als PTS1 (Tab. III-1), wurde *in vivo* heterolog in *P. tricornutum* nur in der GFP-Gt_AGPS.12aa.C Version mit dem peroxisomalen Marker kolokalisiert (Abb. III-2).

Da AGPS und FAR an der Etherphospholipid-Synthese beteiligt sind (siehe Kapitel I.4.4.1.5), wurden *in silico* Analysen weiterer Enzymen mit Fokus auf dem peroxisomalen Teil der Biosynthese in *G. theta* durchgeführt. Das Substrat für AGPS wird von Glycerolphosphat-Acyltransferase (GPAT) oder Dihydroxyacetonphosphat-Acyltransferase (DHAPAT) zur Verfügung gestellt. Mittels *in silico* Analysen in KEGG konnten zwei Homologe für Gt_GPAT/DHAPAT (ID_139343, ID_163230) detektiert werden (Tab. III-5). Beide Gt_GPAT/DHAPAT Homologe weisen 5-6 Transmembrandomänen (TMDs) auf, ohne Hinweise

auf PTS-ähnliche Signale oder mTPs. Für das Gt_GPAT/DHAPAT Homolog mit der Protein ID_16323 wurde ein N-terminaler Signal-Anker vorhergesagt, was auf einen sekretorischen Transport über das ER hindeutet (Tab. III-5).

III.2.5 Vitamin K

Das Vitamin K1 (Phyllochinon) ist in photosynthetisch aktiven Organismen eine wichtige Redox-Komponente der plastidären Membran. Dabei findet die Biosynthese des Naphthoatrings von Vitamin K in den Peroxisomen statt und wird durch das MenB katalysiert. Da Gt_MenB (1,4-Dihydroxy-2-naphtoyl-CoA-Synthase) in *P. tricornutum* mit dem peroxisomalen Marker mR3-SKL kolokalisiert (Abb. III-1 und Abb. S VII-3), wurden weitere Enzyme der Vitamin K Synthese *in silico* auf die mögliche intrazelluläre Lokalisation untersucht.

Gene codierend für die ersten vier Schritte der Vitamin K Synthese lokalisieren oft auf einem Locus in einem *men*-Cluster, wobei das Genprodukt als PHYLLO bezeichnet wird. Das PHYLLO besteht aus den ersten vier Men-Enzymen MenF, MenD, MenH und MenC. In *G. theta* wurde ein putatives Gt_PHYLLO (ID_72208) identifiziert, das über den sekretorischen Pathway transportiert wird (Tab. III-5). Neben PHYLLO können die Komponenten von PHYLLO, wie z. B. MenF (Isochorismat-Synthase), auch einzeln codiert auf dem Genom vorliegen. In KEGG ist Gt_MenF (ID_72109) annotiert (Tab. III-5), das vermutlich spezifisch für Menachinon (Vitamin K2) Synthese ist (Tab. S 2). Bioinformatische Lokalisationsanalysen deuten überwiegend auf eine cytosolische Lokalisation von Gt_MenF hin, wohingegen intensivere subzelluläre Vorhersagen mit DeepLoc 2.0 (Thumuluri et al. 2022) ebenfalls eine plastidäre Lokalisation und eine mögliche PTS nicht ausschließen (Tab. S 2). Neben MenF konnte auch ein Homolog für MenH identifiziert werden, dessen N-Terminus unvollständig ist. Dennoch wurde die Proteinsequenz von Gt_MenH (ID_72176) bioinformatisch untersucht und weist keine TMDs oder C-terminale Signale auf (Tab. III-5). Mittels TargetP 1.1 konnte ein Hinweis auf den sekretorischen Weg für MenH bestimmt werden (Tab. Digital 5). Auffällig ist, dass *Gt_menF*, *Gt_phyllo* und *Gt_menH* in direkter Nähe auf einem Locus des *G. theta* Genom lokalisieren und möglicherweise das *men*-Cluster darstellen könnten (Abb. III-9).

Ein Homolog für MenE (*o*-Succinylbenzoyl-CoA-Ligase) konnte mittels *in silico* Analysen identifiziert werden. Dabei befindet sich die wesentliche Domäne in Gt_MenE (ID_139711) als

o-Succinylbenzoat-CoA-Ligase am C-terminalen Ende des Proteins. Durch *in silico* Analysen wurden je ein Signalpeptid und eine TMD vorhergesagt (Tab. III-5). *G. theta* Homologe für MenA, MenG, MenC und DHNAT konnten bioinformatisch nicht identifiziert werden (Tab. III-5). Bei der Stichwortsuche nach DHNAT in der *G. theta* Genomdatenbank mehrere Acyl-CoA-Thioesterasen mit putativen Hotdog-Domänen identifiziert, wobei ein Homolog womöglich sekretiert wird (Tab. Digital 5).

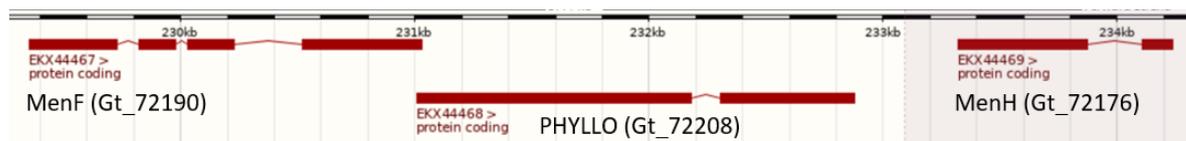


Abb. III-9: Putatives *men*-Cluster in *G. theta*

Gene codierend für Gt_MenF, Gt_PHYLLLO und Gt_MenH sind in *G. theta* auf einem Locus lokalisiert und könnten das *men*-Cluster darstellen.

In der plastidären Membran wird Vitamin K1 durch Vitamin-K-Epoxid-Reduktase (VKOR) reduziert (Tie und Stafford 2008b). Mittels *in silico* Analysen konnte Gt_VKOR (ID_106868) mit vier TMDs identifiziert werden. *In silico* Lokalisationsvorhersagen waren nicht eindeutig, da sowohl eine mitochondriale als auch eine plastidäre Lokalisation mit jeweils nur einem Vorhersagetool vorhergesagt wurde (Tab. III-5 und Tab. S 2).

III.3 Komparative Genomanalyse zur Identifizierung von Peroxinen in einzelligen- und mehrzelligen Algen

Während Peroxine in ihrer Komposition in höheren Pflanzen, Pilzen und Säugetieren sehr gut untersucht sind, ist nur wenig über die Peroxine in einzelligen und mehrzelligen Algen bekannt. Erst kürzlich wurde der Kernsatz an Peroxinen in der Diatomee *P. tricornutum* (Gonzalez et al. 2011), der Cryptomonade *G. theta* (Mix et al. 2018) und der Chlorarachniophyte (unpublizierte Daten von Dr. Moog) genauer untersucht (siehe Kapitel I.4.2). Um diese Lücke zu schließen wurden *in silico* komparative Genomanalysen selektierter Algenspezies der Chlorophyta, Rhodophyta und ebenfalls eines Vertreters der Glaucophyten durchgeführt. Diese Studie soll einen detaillierteren Überblick über den Kernsatz von Peroxinen in ausgewählten Mikro- und Makroalgen liefern.

III.3.1 Der Kernsatz von Peroxinen unterscheidet sich minimal zwischen Chlorophyten und Rhodophyten

Ausgehend von bekannten Peroxinsequenzen in *P. tricornutum* (Gonzalez et al. 2011; Mix et al. 2018), *G. theta* (Mix et al. 2018), *A. thaliana* (zusammengefasst in Nito et al. 2007) und *S. cerevisiae* (zusammengefasst in Kiel et al. 2006) wurden komparative Genomanalysen ausgewählter uni- sowie multizelluläre Vertreter der Chlorophyta, Rhodophyta und Glaucophyta durchgeführt. Hierfür wurden die Peroxinsequenzen in den entsprechenden Genomdatenbanken (Tab. VI-13) für Homologie-Analysen mittels der Protein BLAST-Funktion eingesetzt. Um die putativen homologen Sequenzen zu verifizieren, wurden diese in NCBI auf ihre Funktionen untersucht (Tab. Digital 7) und in Tab. III-6 zusammengefasst. Vollständigkeitshalber sind in der Tab. III-6 unpublizierte Daten der Chlorarachniophyte *Bigeloviella natans* von Dr. Moog für eine detailliertere Übersicht aufgeführt.

Zu den untersuchten Chlorophyten gehören die unizellulären Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* und *Ostreococcus tauri*. Neben den Einzellern wurde auch die mehrzellige Chlorophyte *Ulva mutabilis* untersucht. In allen Chlorophyten konnten die meisten Peroxine des minimalen Kernsatzes identifiziert werden (Tab. III-6), wobei in *C. reinhardtii* Pex13 als ein Teil des Docking-komplexes wie in *G. theta* nicht identifiziert werden konnte. Des Weiteren konnte in *C. reinhardtii* und *O. tauri* kein Homolog für den Biogenese-Faktor Pex3 bestimmt werden. Vergleichend mit der Cryptomonade *G. theta* wurden in den meisten untersuchten Chlorophyten mehrere Pex11 Isoformen *in silico* identifiziert. Ein Pex4 Homolog für das Pex5-Recycling konnte in *O. tauri* und *U. mutabilis* nicht mit Sicherheit bestimmt werden; es wurden mehrere Isoformen für Ubiquitin-Ligasen bestimmt, jedoch kein Homolog wurde eindeutig als Pex4 annotiert (Tab. III-6 und Tab. Digital 7). In allen untersuchten Chlorophyten wurden Homologe für Pex5 und Pex7 identifiziert, was auf das Vorhandensein von PTS1 und PTS2-Proteinen und deren peroxisomalen Import hindeutet.

Bei Rhodophyten lag der Fokus bei der Suche nach homologen Peroxinsequenzen ebenfalls auf unizellulären Organismen. Dazu zählen *Cyanidioschyzon merolae*, *Galdieria sulphuraria* und *Porphyridium purpureum*. In allen diesen Rhodophyten wurden die meisten Peroxine eindeutig identifiziert, was auf das Vorhandensein von Peroxisomen hindeutet (Tab. III-6). In

der mehrzelligen Rotalge *Chondrus crispus* dagegen, wurde eine sehr kleine Auswahl an Peroxinen identifiziert, darunter ein putatives Homolog für Pex5 (Tab. III-6). Dabei wurde in allen untersuchten Rhodophyten kein Homolog für Pex13, vergleichend mit *G. theta*, und in einigen Kandidaten auch kein Pex3 identifiziert (Tab. III-6). Interessanterweise konnte in allen untersuchten Rhodophyten ein Pex7 Homolog nicht eindeutig bestimmt werden, was der Situation in der Diatomee *P. tricornutum* entspricht (Tab. III-6). Die Rhodophyten exprimieren zwar eine Vielzahl an WD40-Proteinen; WD40-Proteine sind was ein wesentlicher Bestandteil des Pex7 Rezeptors, jedoch wurde mit Hilfe der *in silico* Analysen kein einziges Homolog eindeutig als Pex7 annotiert (Tab. Digital 7).

Die unizelluläre Süßwasserualge *Cyanophora paradoxa* wurde in der Analyse der Peroxinsequenzen als Vertreter der Glaucophyten eingesetzt. Die Glaucophyte scheint alle notwendigen Pex-Proteine zu codieren, darunter je ein Homolog für die beiden PTS-Rezeptoren Pex5 und Pex7 (Tab. III-6). Eine Eindeutige Identifikation der ATPasen Pex1 und Pex6 war mittels der *in silico* Analysen nicht möglich. Es wurden zwar mehrere Homologe für ATPasen identifiziert, jedoch konnte keine eindeutig als Peroxin annotiert werden (Tab. Digital 7). Neben der PTS-Rezeptoren Pex5, Pex7 und Pex19 wurde Pex14 als eine Komponente des Docking-komplexes und auch der Biogenese-Faktor Pex11 in *C. paradoxa* annotiert.

In silico Analysen von Peroxinen in *B. natans* wurden von Dr. Moog zur Verfügung gestellt. In der Chlorarachniophyte wurden die meisten Peroxine des minimalen Kernsatzes identifiziert (Tab. III-6). Dabei wurden sieben Isoformen des Biogenese-Faktors Pex11 annotiert und alle PTS-Rezeptoren: Bn_Pex5, Ben_Pex7, Bn_Pex6, Bn_Pex16 und Bn_Pex19. Interessanterweise scheint *B. natans* zwei Isoformen des PTS2-Rezeptors Pex7 zu codieren, was bis dato in anderen Organismen nicht beobachtet wurde.

Tab. III-6: *In silico* identifizierten Peroxine in Chlorophyten, Rhodophyten und Glaucophyten

Peroxin	D	Crp	Chlrp	Chlorophyten				Rhodophyten				Gl
	Pt ^a	Gt ^b	Bn	Cr	Cv	Ot	Um	Cc	Cm	Gs	Pp	Cp
Pex1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?
Pex2	+	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	+	+
Pex3	+	+	?	nd	+	nd	+	nd	+	+	nd	+
Pex4	+	+	+	+	+	?	?	+	+	+	+	+
Pex5	+	+	+	+ ^c	+	+	+	+	+	+	+	+
Pex6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd
Pex7	nd	+	+2	+ ^c	+	+	+	nd	nd	nd	nd	+
Pex10	+	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	+	nd
Pex11	+	+2	+7	+2	+2	+	+2	nd	+	+	+2	+
Pex12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pex13	nd	nd	?	nd	+	+	+	nd	nd	nd	nd	nd
Pex14	nd	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	+	+
Pex16	+	+	+	+	nd	nd	+	nd	nd	+	+	nd
Pex19	+	+2	+	+	+	nd	+	nd	+	+	+	+
Pex22	nd	+	nd	+	+2	nd	nd	nd	+	+	nd	nd

D Diatomeen, **Crp**, Cryptophyta, **Chlrp** Chlorarachniophyta, **Gl** Glaucophyta, **Pt** *Phaeodactylum tricornutum* CCAP 1055/1 (^a Gonzalez et al 2011), **Gt** *Guillardia theta* CCMP2712 (^b Mix et al 2018), **Bn** *Bigelowiella natans* (zur Verfügung gestellt von Dr. Moog, nicht publizierte Daten), **Cr** *Chlamydomonas reinhardtii* (^c Hayashi und Shinozaki 2012), **Cv** *Chlorella vulgaris*, **Ot** *Ostreococcus tauri*, **Um** *Ulva mutabilis*, **Cc** *Chondrus crispus*, **Cm** *Cyanidioschyzon merolae*, **Gs** *Galdieria sulphuraria*, **Pp** *Porphyridium purpureum*, **Cp** *Cyanophora paradoxa*, + vorhanden, nd nicht identifiziert, ? unklar; Genomdatenbanken in Tab. VI-13.

IV DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde die Rolle und Funktion von Peroxisomen in der Cryptomonade *G. theta* näher charakterisiert. Dazu wurde der peroxisomale Metabolismus untersucht, indem putative peroxisomale Proteine *in silico* identifiziert und zum Teil heterolog in der Diatomee *P. tricornutum* lokalisiert wurden. Des Weiteren wurden nicht nur putative PTS1-Proteine identifiziert, sondern auch weitere Komponenten unterschiedlicher Stoffwechselwege näher charakterisiert und die peroxisomale Beteiligung am Metabolismus der Cryptomonade untersucht. Teile der Diskussion sind in Vasilev et al. (2022) publiziert.

IV.1 *P. tricornutum* eignet sich für heterologe Lokalisationsstudien von PTS1-Proteinen aus *G. theta*

Diese Studie basiert auf heterologen Lokalisierungsstudien von *G. theta* Proteinen, die zusammen mit einem peroxisomalen Marker in *P. tricornutum* mR3-SKL (Marter et al. 2020) exprimiert wurden. Da die Kieselalge *P. tricornutum* zum PTS1-, aber nicht zum PTS2-Import fähig ist (Gonzalez et al. 2011), beschränken sich Lokalisierungsstudien von peroxisomalen Matrixproteinen auf putative PTS1-Proteine. Die Studie von Mix et al. (2018) zeigte, dass die Kieselalge *P. tricornutum* in der Lage ist, die Peroxisom-spezifischen Peroxine aus *G. theta* (Gt_Pexs) mit putativen Transmembrandomänen (TMDs) zur peroxisomalen Membran zu sortieren (Gt_Pex2, Gt_Pex10, Gt_Pex11-1, Gt_Pex11-2, Gt_Pex14, Gt_Pex16, Gt_Pex19-1, Gt_Pex22). Diese Arbeit sollte Einblicke in die Stoffwechselkapazitäten von *G. theta* Peroxisomen liefern, weshalb heterologe Kollokalisationsstudien von PTS1-Proteinen in der Diatomee durchgeführt wurden (Abb. IV-1).

Die PTS1-enhaltende Urat Oxidase (Gt_UO) wurde exemplarisch verwendet, um die PTS1-Erkennung von heterolog exprimierten Proteinen in *P. tricornutum* nachzuweisen. Die heterologe Expression von Gt_UO in voller Länge mit N-terminalem GFP (GFP-Gt_UO) wurde in *P. tricornutum* eindeutig mit dem peroxisomalen Marker mRuby3-SKL in kleinen punktförmigen Strukturen kollokalisiert (Abb. S VII-1) (Vasilev et al. 2022). Darüber hinaus wurden runde elektronendichte Strukturen mit dem spezifischen Antipeptid-Antikörper

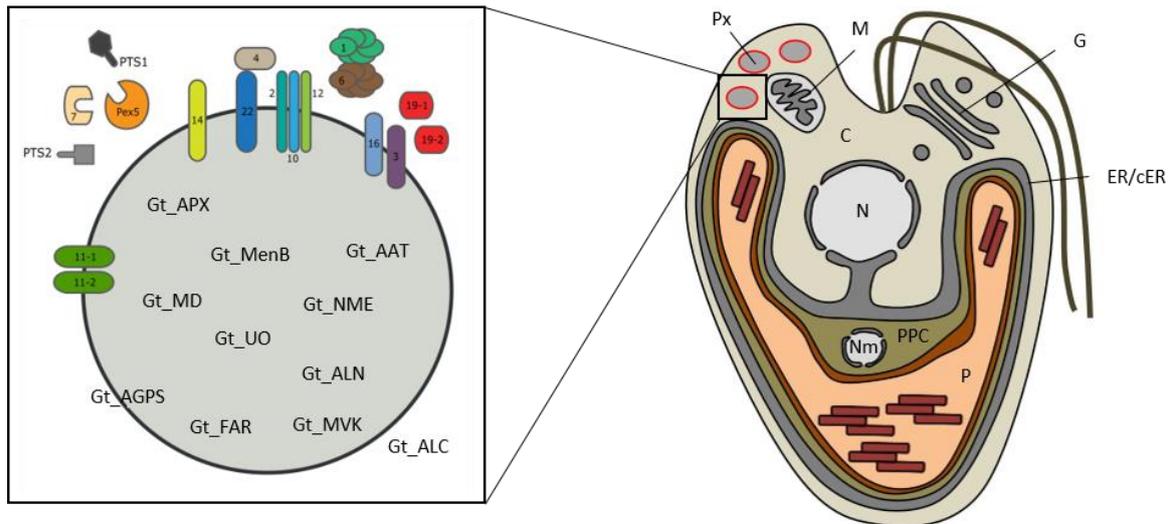


Abb. IV-1: Übersicht der peroxisomalen Faktoren in der Cryptomonade *G. theta*

Px Peroxisom, **M** Mitochondrium, **G** Golgi Apparat, **C** Cytosol, **N** Nucleus, **Nm** Nucleomorph, **ER/cER** (Chloroplasten-) Endoplasmatisches Retikulum, **PPC** periplastidäres Kompartiment, **P** Plastide (wesentliche Teile Abbildung (unpubliziert) wurden von Daniel Moog zur Verfügung gestellt und z. T. modifiziert Peroxine aus Mix et al. (2018)).

gegen den C-terminus von Gt_UO mit einem Durchmesser von 200-400 nm beobachtet, die auf Peroxisomen hinweisen (Abb. III-4). Die Deletion des C-terminalen PTS1 „SKL“ verlagerte Gt_UO- Δ SKL in das Cytosol (Abb. S VII-1) (Raap 2018; Vasilev et al. 2022). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass zumindest das am häufigsten vorkommende PTS1-Signal „SKL“ den PTS1-vermittelten Import von heterolog exprimierten *G. theta* Proteinen in der Diatomee auslöst (Vasilev et al. 2022).

Einige PTS1-Proteine von *G. theta* wurden jedoch nicht mit dem peroxisomalen Marker kolokalisiert, wenn sie in *P. tricornutum* in voller Länge heterolog exprimiert wurden (Abb. III-2). Alkyldihydroxyacetonphosphat-Synthase (Gt_AGPS, „SHL“) und Aspartat-Aminotransferase (Gt_AAT, „SKL“) befanden sich überwiegend im Cytosol, wenn sie als FL-Protein mit N-terminalem GFP exprimiert wurden; anders vermittelten die letzten C-terminalen 12 Aminosäuren (12aaC) beider Proteine peroxisomalen Import von GFP in *P. tricornutum* (Abb. III-2). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die letzten 12aaC am C-Terminus der heterolog exprimierten GFP-Fusionsproteinen vom endogenen Pt_Pex5-Rezeptor, der für den PTS1-Import verantwortlich ist, erkannt wurden. Wahrscheinlich ist das PTS1-Signal einiger FL-Proteine aufgrund der sterischen Anordnung der Tertiärstruktur der heterolog exprimierten *G. theta* Proteine für den PTS1-Rezeptor Pt_Pex5 nicht verfügbar (Vasilev et al. 2022). Daher

sollten diese Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden, da die intrazelluläre Proteinlokalisierung in *G. theta* von den Ergebnissen der heterologen Lokalisierungsstudien in *P. tricornutum* abweichen könnte. Da sich jedoch die vorhergesagte Lokalisierung der meisten *G. theta* Proteine in Kolokalisierungsstudien als korrekt erwiesen hat und durch detaillierte *in silico* Analysen der gesamten Proteinsequenzen weitgehend unterstützt wurde, kann *P. tricornutum* als geeigneter Modellorganismus für heterologe *in vivo* Lokalisierungsstudien von peroxisomalen *G. theta* Proteinen angesehen werden (Mix et al. 2018; Vasilev et al. 2022). *P. tricornutum* scheint sich nicht nur als geeignetes System für heterologe Lokalisationsstudien für Proteinen der Cryptomonaden, deren Plastide ebenfalls rhodophytischen Ursprungs ist, geeignet zu sein, sondern auch für die Chlorarachniophyte *Bigeloviella natans*, deren Plastide chlorophytischen Ursprungs ist. Im Rahmen einer Bachelorarbeit konnten heterolog BnPex10 und BnGSTK1 fusioniert an GFP heterolog in punktförmigen kleinen runden Strukturen mit dem peroxisomalen Marker mR3-SKL in *P. tricornutum* kolokalisiert werden (Andeberhan 2021).

IV.2 Peroxisomen in *G. theta* sind an wichtigen metabolischen Prozessen beteiligt

Bereits *in silico* Analysen von Dr. Daniel Moog deuteten auf eine Beteiligung der *G. theta* Peroxisomen an mehreren Stoffwechselwegen in der Cryptomonade hin (Tab. S 1). Die heterologen *in vivo* Lokalisationsstudien von putativen PTS1-Proteinen bestätigten diese Annahme. Im Folgenden werden die putativen metabolischen Wege anhand der heterologen Kolokalisations- und *in silico* Studien in der Cryptomonade *G. theta* analysiert und diskutiert.

IV.2.1 Peroxisomen in *G. theta* schirmen die Zelle gegen H₂O₂ ab und bauen dieses mithilfe der Ascorbatperoxidase ab

Bei katabolen Prozessen wie der peroxisomalen β -Oxidation, dem Purinabbau und der Desaminierung von Monoaminen entsteht als Nebenprodukt reaktives Wasserstoffperoxid (H₂O₂), das schnell entgiftet werden muss bevor es die Zelle schädigt. Ein typisches peroxisomales Enzym für die Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist die Katalase, die normalerweise als peroxisomaler Marker dient (de Duve und Baudhuin 1966; Ghosh und Hajra 1986). Bioinformatische Analysen ergaben kein homologes Gen, das für eine Katalase in

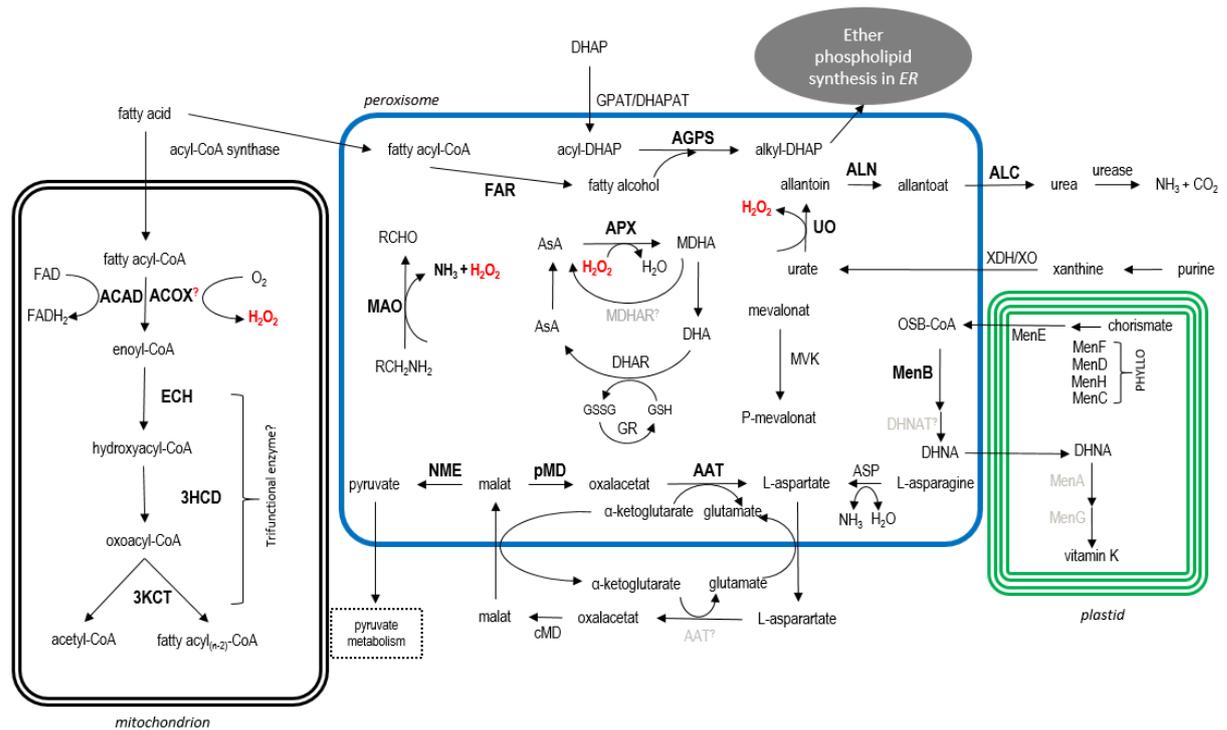


Abb. IV-2: Schema des peroxisomalen Metabolismus in *G. theta*

Eine detaillierte Beschreibung ist dem Text zu entnehmen.

ACAD Acyl-CoA-Dehydrogenase, **ACOX** Acyl-CoA-Oxidase, **ECH** Enoyl-CoA-Hydratase, **3HCD** 3-Hydroxyenoyl-CoA-Hydratase, **3KCT** 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase, **FAR** Fettsäure-Reduktase, **DHAP** Dihydroxyaceton-Phosphat, **GPAT/DHAPAT** Glycerolphosphat-Acyltransferase/Dihydroxyaceton-Phosphat-Acyltransferase, **AGPS** Alkyldihydroxyacetonphosphat-Synthase, **MAO** Monoamine-Oxidase, **AsA** Ascorbat, **APX** Ascorbat-Peroxidase, **MDHA** Monodehydroascorbat, **MDHAR?** MDHA-Reduktase, **DHA** Dehydroascorbat, **DHAR** DHA-Reduktase, **GSH** Glutathion, **GSSG** Glutathion-Disulfid, **GR** Glutathion-Reduktase, **XDH/XO** Xanthin-Dehydrogenase/Oxidase, **UO** Urat-Oxidase, **ALN** Allantoinase, **ALC** Allantoikase, **ASP** Asparaginase, **AAT** Aspartat-Amino-Transferase, **c/pMD** cytosolische/peroxisomale Malat-Dehydrogenase, **NME** NAD-Maleinenzym, **PHYLLLO** bestehend aus MenF, MenD, MenH, MenC, **MenB** 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoyl-CoA-Synthase, **DHAT** 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoyl-CoA-Hydrolase, **MenA** Phetyl-/Polyprenyl-Transferase, **MenG** Methyl-Transferase, **VKOR** Vitamin K1-Oxidoreduktase

Fett lokalisierte PTS1-Proteine, **schwarz** *in silico* Vorhersage, **grau** keine Homologe in *G. theta*

Die Abbildung ist in Vasilev et al. 2022 publiziert

G. theta codiert. Allerdings wurde neben zwei Isoformen, die vermutlich in der Plastide lokalisieren, eine weitere Isoform der L-Ascorbat-Peroxidase (Gt_APX) mit dem C-terminalen Tripeptid „SRM“ in Peroxisomen der Kieselalge *P. tricornutum* mit dem peroxisomalen Marker mR3-SKL kolokalisiert (Abb. III-1).

APX katalysiert die H_2O_2 -abhängige Oxidation von L-Ascorbat zu Monodehydroascorbat (MDHA) unter Freisetzung von H_2O und ist ein wichtiger Akteur im Ascorbat (AsA) - Glutathion (GSH) Zyklus (siehe Kapitel I.4.4.1.1). Die am AsA-GSH-Zyklus beteiligten Enzyme wurden durch ein Screening der Genomdatenbank von *G. theta* identifiziert. Ein Schema der

möglichen peroxisomalen Stoffwechselprozesse in *G. theta*, einschließlich des AsA-GSH-Zyklus, ist in Abb. IV-2 dargestellt. Die peroxisomale Lokalisierung wurde durch heterologe Lokalisierungsstudien für Gt_APX in *P. tricornutum* bestätigt (Abb. III-1). Ein Homolog, das für MDHAR codiert, wurde durch bioinformatische Analysen in *G. theta* nicht identifiziert (Tab. III-5). Wahrscheinlich disproportioniert MDHA spontan zu DHA, das durch Gt_DHAR (ID_153349) wieder zu AsA reduziert werden könnte (Vasilev et al. 2022). Interessanterweise enthält das vorhergesagte Gt_DHAR nicht nur ein Nonapeptid „RLLLVLPF“ am N-Terminus, das Ähnlichkeiten mit PTS2 aufweist, sondern auch ein Signalpeptid (Tab. III-5). Weitere bioinformatische Analysen der Proteinsequenz von Gt_DHAR mit im Hinblick auf die subzelluläre Lokalisation mit dem online Vorhersagetool DeepLoc deuten auf eine plastidäre Lokalisation hin (Tab. III-5 und Tab. Digital 6). Somit könnte Gt_DHAR in *G. theta* sowohl zu den Peroxisomen, als auch zu der Plastide transportiert werden (Tab. III-5), was in zukünftigen *in vivo* Lokalisationsstudien untersucht werden sollte. BLAST- und KEGG-Analysen ergaben ein Homolog zu GR in *G. theta* mit der Protein-ID_83774 (Tab. III-5 und Tab. Digital 6). Dieses vorhergesagte Protein wird mit dem C-terminalen Tripeptid „SRV“ codiert, das nach der PTS1-Vorhersage den peroxisomalen Import auslösen könnte. Das Tripeptid „SRV“ ist jedoch kein klassisches PTS1-Signal, sodass dessen Zielsteuerungsfunktion in der Cryptomonade unklar bleibt. Dennoch wurde die Funktion von „SRV“ als PTS1-Signal in *Arabidopsis thaliana* validiert (Reumann et al. 2012) und auch subzelluläre Analysen mit DeepLoc deuten auf eine peroxisomale Lokalisation hin (Tab. Digital 6). Demnach sollten heterologe Lokalisationsstudien in *P. tricornutum* durchgeführt werden, um das Potential des Tripeptids „SKV“ als funktionales PTS1 zu untersuchen. Des Weiteren könnte die *in silico* Suche von PTS1-Proteinen in *G. theta* um das putative „SKV“ erweitert werden, um möglicherweise zusätzliche PTS1-Kandidaten in *G. theta* identifizieren zu können.

IV.2.1.1 Gt_UO und Gt_MAO produzieren H₂O₂ als Nebenprodukt

Das typische peroxisomale Enzym Uratoxidase (UO) produziert H₂O₂ als Nebenprodukt, indem es Urat zu 5-Hydroxyisurat oxidiert, das weiter zu Allantoin umgewandelt wird (siehe Kapitel I.4.4.1.4). UO ist ein wichtiges Enzym für den Purinabbau und das Recycling von Stickstoff sowie Glyoxylat in höheren Pflanzen (*A. thaliana* und Leguminosen) und in einigen

Apicomplexa (*Nephromyces* und *Cardiosporidium*) (Todd et al. 2006; Hauck et al. 2014; Paight et al. 2019).

Durch die *in vivo* Kollokalisationsstudien von GFP-Gt_UO in *P. tricornutum* kann von einem partiellen peroxisomalen Purinabbau in *G. theta* ausgegangen werden, der höchstwahrscheinlich zum Recycling von Ammoniak beiträgt (Vasilev et al. 2022). Wahrscheinlich produzieren im Cytosol lokalisierte Purindesaminasen (nicht in Abb. IV-2 enthalten) Xanthin, welches von Gt_XDH/XO (ID_164776) weiter in Urat umgewandelt wird. Für Gt_XDH/XO (ID_164776) wurden *in silico* keine PTS-Signale identifiziert und es ist ein sekretorischer Transportweg durch das N-terminale Signalpeptid vorhergesagt (Tab. III-5). Mittels subzellulären Analysen mit DeepLoc (Almagro Armenteros et al. 2017; Thumuluri et al. 2022) wurde eine cytosolische Lokalisation vorhergesagt (Tab. S 2 und Abb. IV-2). Ob Gt_XDH/XO (ID_164776) tatsächlich *in vivo* cytosolisch lokalisiert, sollte in weiteren Studien untersucht werden. In *G. theta* wurde die peroxisomale Lokalisierung von Gt_UO bestätigt (Abb. III-1 und Abb. S VII-1). Ein putatives Gt_ALN mit der Protein-ID_67817 enthält das klassische PTS1 „AKL“ als C-terminales Tripeptid (Tab. III-5).

Die putative Gt_ALN wurde heterolog in voller Länge im Cytosol von *P. tricornutum* beobachtet, während die 12aaC-Version (GFP-Gt_ALN.12aaC) peroxisomal lokalisierte (Abb. S VII-4). Da die kürzere Version von Gt_ALN peroxisomalen Import in *P. tricornutum* auslöst, kann von einer peroxisomalen Lokalisation in *G. theta* ausgegangen werden (Abb. IV-2). Für die vorhergesagte peroxisomale Gt_ALC (ID_71482) mit „SKV“ als C-terminalem Tripeptid, konnte keine peroxisomale Lokalisation *in vivo* in *P. tricornutum* bestätigt werden (Abb. S VII-4). Das PTS1-ähnliche Signal „SKV“ weicht in der letzten Aminosäure vom typischen PTS1-Muster ab (nicht-kanonisch), was die PTS1-Erkennung in *P. tricornutum* durch den endogenen PTS1-Rezeptor Pex5 beeinflussen könnte (Vasilev et al. 2022). Das Homolog der Urease mit der Protein ID_116849 in *G. theta* enthält kein vorhergesagtes PTS1, sondern „KLKRLARGL“ als N-terminales Nonapeptid, das an ein PTS2-Signal erinnert (Vasilev et al. 2022). Allerdings können PTS2-haltige Proteine aus *G. theta* nicht heterolog in *P. tricornutum* lokalisiert werden, da der PTS2-Importweg in der Kieselalge fehlt (Gonzalez et al. 2011; Mix et al. 2018). Da die *in vivo* Lokalisation von PTS2-Proteinen in *P. tricornutum* nicht möglich und *in silico* sowohl eine mitochondriale als auch cytosolische Lokalisation von Gt_Urease vorhergesagt ist, wäre eine cytosolische Lokalisation möglich (Tab. S 2 und Abb. IV-2).

Somit scheint der Purinabbau in *G. theta* nach den heterologen Lokalisationsstudien teilweise in Peroxisomen lokalisiert zu sein (Vasilev et al. 2022). Des Weiteren deuten bioinformatische Analysen auf den Abbau von Harnstoff hin, um CO₂ und Ammoniak zu recyceln. Es wurde gezeigt, dass grüne Süßwasseralgen Allantoin als Stickstoffquelle nutzen, was die bioinformatischer Vorhersagen in Bezug auf das N-Recycling stützt (Prasad 1983). Die unizelluläre Grünalge *C. reinhardtii* reguliert bei Stickstoffmangel unter anderem alle am Purin-Abbau beteiligten Enzyme, um Stickstoff in Form von Ammoniak zu recyceln (Park et al. 2015).

Ein weiteres Enzym, das an der H₂O₂-Bildung in *G. theta*-Peroxisomen beteiligt ist, wurde durch eine Signalsuche mit dem C-terminalen Tripeptid „SRM“ als Monoamin-Oxidase (MAO) klassifiziert. Heterologe Co-Lokalisationsstudien der letzten 12aaC von Gt_MAO in *P. tricornutum* bestätigten die peroxisomale Lokalisierung (Abb. III-2). MAO ist ein Flavoprotein mit dem Cofaktor FAD und nutzt Sauerstoff zur Desaminierung von Aminen, wobei das entsprechende Keton oder Aldehyd, H₂O₂ und Ammoniak entstehen (Gaweska und Fitzpatrick 2011; Abad et al. 2013).

Zusammenfassend legen *in vivo* Lokalisationsstudien und bioinformatische Analysen eine Abschirmung der H₂O₂-Bildung während des Purinabbaus oder der Amin-Desaminierung und der schnellen Entgiftung durch den AsA-GSH-Zyklus in den Peroxisomen der Cryptomonade *G. theta* nahe (Abb. IV-2) (Vasilev et al. 2022).

IV.2.2 β -Oxidativer Abbau von Fettsäuren findet in *G. theta* in Mitochondrien statt

Mittels *in silico* Analysen der putativen PTS1-Proteine (siehe Kapitel III.1) wurden mittels BLAST-Analysen keine konservierten Homologe identifiziert, die an der β -Oxidation teilnehmen könnten. Dies deutete darauf hin, dass Peroxisomen in *G. theta* möglicherweise nicht an der β -Oxidation von Fettsäuren beteiligt sind. Da *in silico* die Proteinsequenzen von *G. theta* vorrangig auf den typischen C-terminalen PTS1-Konsensus [SAC]-[KRH]-[LM] hin untersucht worden sind, wurden die nicht-kanonischen PTS1-ähnliche Sequenzen mit dieser Methode nicht identifiziert. Des Weiteren können peroxisomale Proteine ebenfalls mittels der N-terminalen PTS2-Sequenz in die Peroxisomen importiert werden. Durch BLAST-Analysen wurden Homologe, die in *G. theta* an der β -Oxidation beteiligt sein könnten identifiziert und

auf nicht-kanonische PTS1-ähnliche Sequenzen und manuell auch auf PTS2-Sequenzen untersucht.

In eukaryotischen Zellen kann die β -Oxidation von Fettsäuren entweder in Mitochondrien oder in Peroxisomen stattfinden. Die enzymatischen Reaktionen sind ähnlich und können in einzelnen Enzymen und/oder Komplexen variieren (siehe Kapitel I.4.4.2). In beiden Organellen wird Acyl-CoA durch Verkürzung von Acyl-CoA-Fettsäuren in ähnlichen Reaktionsschritten freigesetzt. Peroxisomale β -Oxidation von Fettsäuren beginnt mit der Acyl-CoA-Oxidase (ACOX), während die Acyl-CoA-Dehydrogenase (ACAD) hauptsächlich in Mitochondrien lokalisiert. Beide Enzyme, ACOX und ACAD, bilden eine trans-Doppelbindung in dem Acyl-CoA-Thioester. Die Schritte 2-3 der Fettsäure β -Oxidation werden in Peroxisomen durch bifunktionale Enzyme katalysiert; in Mitochondrien wurden einzelne Enzyme, aber auch trifunktionale Enzyme beobachtet, die die Schritte 2-4 kombinieren (Camões et al. 2015). Diese Reaktionen umfassen die Addition eines Wassermoleküls durch die Enoyl-CoA-Hydratase (ECH) (Schritt 2), die Dehydrierung durch 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (3HCD) (Schritt 3) und die abschließende Acylierung durch 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (3KCT) (Schritt 4), was zur Bildung von Acetyl-CoA und um zwei Kohlenstoffatome verkürztem Acyl-CoA führt (Camões et al. 2015).

Bei Pflanzen und Pilzen erfolgt die β -Oxidation ausschließlich peroxisomal, während bei Säugetieren beide enzymatischen Wege (Mitochondrien und Peroxisomen) vorhanden sind (Poirier et al. 2006; Camões et al. 2015). Bei den bisher untersuchten Algen wurden unterschiedliche Lokalisationen der an der β -Oxidation beteiligten Proteine beobachtet. Bei der Charophyte *Mougeotia* wurde eine ausschließlich peroxisomale β -Oxidation berichtet (Stabenau et al. 1984). In der Diatomee *P. tricornutum* wurden PTS1 Homologe für jeden Schritt der peroxisomalen β -Oxidation von Fettsäuren bestimmt (Gonzalez et al. 2011). Zusätzlich wurde eine mitochondriale KCT (ID_28068) in *P. tricornutum* annotiert und ein mitochondriales PtMACAD1, das von *Phatdraft3_J11014* codiert wird, identifiziert (Jallet et al. 2020). Das deutet darauf hin, dass der Abbau von Fettsäuren durch die β -Oxidation in Mitochondrien und Peroxisomen der Kieselalge stattfinden kann. Eine duale Lokalisierung von β -Oxidationsenzymen wurde in der Chlorophyte *Eremosphaera* und in mehreren Prasinophyten beobachtet (Winkler et al. 1988; Stabenau et al. 1989), ähnlich wie bei Säugetieren. Außerdem wurde im Xanthophyten *Bumilleriopsis* und in *Cyanidium* ausschließlich mitochondriale β -Oxidation beobachtet (Gross et al. 1985; Gross 1989). In der

Chlorophyte *C. reinhardtii* wurde ein ACOX das von *CrACX2* codiert wird, mit dem peroxisomalen *CrMDH2* in Peroxisomen kolokalisiert, was auf eine zumindest teilweise peroxisomale β -Oxidation von Fettsäuren hinweist (Kong et al. 2017).

In silico Analysen ergaben keine Homologe zu Enzymen, die an der β -Oxidation teilnehmen und das typische PTS1-Signal bestehend aus [SAC]-[KRH]-[LM] in *G. theta* enthalten (siehe Kapitel I.4.5). Kandidaten für den ersten Schritt der β -Oxidation (Gt_ACOX/Gt_ACAD) wurden durch die Bioinformatik mit nicht-kanonischen C-terminalen Tripeptiden identifiziert, die an ein PTS1-Signal („SRS“/„SAM“) erinnern (Tab. III-2). Allerdings beinhalten diese Kandidaten ein zusätzliches vorhergesagtes mTP am N-Terminus, was auf eine duale Zielsteuerung in die Peroxisomen bzw. die Mitochondrien von *G. theta* hindeuten könnte (Vasilev et al. 2022). Heterologe Kolokalisationsstudien in *P. tricornutum* mit dem peroxisomalen Marker mR3-SKL, deuten jedoch auf eine mitochondriale Lokalisierung beider *G. theta*-Enzyme hin (Abb. III-6 und Abb. S VII-2). Jedoch ist nicht auszuschließen, dass die die PTS1-ähnlichen Signale „SRS“/„SAM“ in *G. theta* einen peroxisomalen Import hervorrufen könnten, da heterologe Lokalisationsstudien durchgeführt wurden. Des Weiteren ist unklar, ob es sich bei Gt_ACOX (ID_147553) um ACOX oder ACAD handelt. In Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) konnten für Gt_ACOX Homologe für sowohl ACOX als auch ACAD bestimmt werden, während für Gt_ACAD (ID_90066) nur ACAD-Homologe zutrafen (Daten nicht gezeigt). Zur weiteren Differenzierung sollten phylogenetische Analysen und/oder *In vitro* Tests der *G. theta* ACOX und ACAD durchgeführt werden.

Weitere Schritte der β -Oxidation werden je nach Organismus und intrazellulärer Lokalisation entweder durch einzelne oder multifunktionelle Enzyme katalysiert. In *G. theta* wurden mehrere einzeln codierte Homologe für ECH, den zweiten Schritt der β -Oxidation, mit vorhergesagten mTPs identifiziert. Für das möglicherweise multifunktionale Gt_ECH-3HCD (ID_121132), das wahrscheinlich die Schritte 2-3 kombiniert, wurde nach der Überprüfung des Genmodells mit den EST-Daten ein N-terminales mTP identifiziert. Das putative mTP von ID_121132 wurde jedoch nicht durch EST-Daten unterstützt und konnte ebenfalls nicht aus der *G. theta* cDNA amplifiziert werden. Dennoch wurde das Gt_ECH-3HCD ohne das vorhergesagte mTP heterolog in *P. tricornutum* mR3-SKL mit C-terminalem GFP lokalisiert (Gt_ECH-3HCD-GFP), wobei die GFP-Fluoreszenz im Cytosol beobachtet wurde (Abb. III-7). Ob es sich bei Gt_ECH-3CH tatsächlich um ein cytosolisches Protein handelt und ob es in der Lage

ist die beiden oben genannten Reaktionsschritte zu katalysieren, muss noch genauer untersucht werden. Das einzige Homolog für den dritten Schritt der β -Oxidation Gt_3HCD (ID_161810) wurde in länglichen Strukturen nahe der Plastide in *P. tricornutum* lokalisiert, was auch eine mitochondriale Lokalisation deutet (Abb. III-7).

Zusätzlich wurde die Präsequenz von Gt_KCT (ID_159886), die den vierten und letzten Schritt der β -Oxidation katalysiert, als GFP-Fusionsprotein (Pre-Gt_KCT-GFP) heterolog in länglichen Strukturen nahe der Plastide in *P. tricornutum* beobachtet (Abb. III-7). Dies deutet auf eine mitochondriale Lokalisation von Gt_KCT hin (Abb. IV-2). Ob Gt_KCT in *G. theta* ein Teil des multifunktionalen Enzyms ist oder ob es eine einzelne Reaktion katalysiert, sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

Basierend auf den *in silico* Analysen und heterologen *in vivo* Lokalisationsstudien von *G. theta* Proteinen findet die β -Oxidation in den Mitochondrien statt (Abb. IV-2). Es kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass einige Reaktionsschritte peroxisomal oder dual in Peroxisomen und Mitochondrien lokalisiert sind (Vasilev et al. 2022). Die Enzyme Gt_ACOX/Gt_ACAD beinhalten nicht-kanonische PTS1-ähnliche Signale („SRS“/“SAM“), die den peroxisomalen Import in *G. theta* auslösen könnten und möglicherweise in *P. tricornutum* nicht erkannt werden (Vasilev et al. 2022). Interessanterweise wurde im ACOX-Homolog von *C. reinhardtii* zwar kein PTS-Signal identifiziert, wobei mCherry-CrACX2 dennoch mit dem peroxisomalen Marker kolokalisiert (Kong et al. 2017). Dies deutet auf einen PTS1-unabhängigen Import von CrAcX2 in *C. reinhardtii* hin (Kong et al. 2017), weshalb ein PTS1-unabhängiger Import in *G. theta* ebenfalls nicht auszuschließen ist. Da sowohl Gt_ACOX und Gt_ACAD ein N-terminales mTP besitzen, könnte das mTP mit der nicht-kanonischen PTS1 *in vivo* konkurrieren (Kunze und Berger 2015; Stehlik et al. 2020).

Zusätzlich wurden alle putativen *G. theta* Homologe der β -Oxidation auf PTS2-Signale untersucht. Dabei konnten keine PTS2-Sequenzen in den *G. theta* Kandidaten-Proteinen der β -Oxidation mit dem Konsensus [RK]-[LVIQ]-X5-[HQ]-[LAF] (Petriv et al. 2004) identifiziert werden. Neben den typischen PTS Sequenzen könnten auch nicht-kanonische PTS1/2 Sequenzen in *G. theta* vorliegen, die bis jetzt nicht identifiziert worden sind (Vasilev et al. 2022). Da heterologe Lokalisationsstudien in *P. tricornutum* bis dato auf PTS1-Proteine begrenzt sind (Gonzalez et al. 2011), können putative PTS2-Proteine von *G. theta* nicht heterolog *in vivo* lokalisiert werden (Vasilev et al. 2022).

In Anbetracht der bestätigten peroxisomalen Lokalisierung von *G. theta* PTS1-Proteinen und Studien von Mix et al. (2018) im heterologen System, sind die Lokalisationen in *P. tricornutum* in den meisten Fällen zuverlässig. Für weitere Analysen sollten Gt_ACOX und Gt_ACAD direkt in *G. theta* genauer charakterisiert werden, z. B. durch Immunolabeling mit spezifischen Antikörpern in *G. theta* mittels TEM (Vasilev et al. 2022).

IV.2.3 *G. theta* Peroxisomen sind nicht am Glyoxylat-Zyklus oder der Photorespiration beteiligt

In höheren Pflanzen ist der Glyoxylat-Zyklus ein wesentlicher Bestandteil von Peroxisomen, wobei vorrangig auf den Glyoxylat-Zyklus spezialisierten Peroxisomen als Glyoxysomen bezeichnet werden. Dabei findet der Zyklus in der Regel zum Teil in den Peroxisomen und zum Teil im Cytosol statt (siehe Kapitel 1.4.4.3). In der unizellulären *Vitrella brassicaformis* und weiteren Alveolata wurden alle glyoxysomalen Homologe identifiziert, wobei die Citrat-Synthase (CS), die Isocitrat-Lyase (ICL) und die Malat-Synthase (MS) *in silico* peroxisomale Zielsteuerung aufweisen (Ludewig-Klingner et al. 2017). Mittels *in silico* Analysen der putativen PTS1-Proteine wurden keine Homologen identifiziert, die am Glyoxylat-Zyklus in *G. theta* teilnehmen könnten (Tab. S 1). Mit Hilfe von BLAST-Analysen bekannter glyoxysomaler Proteine sollten putative Homologe *in G. theta* identifiziert werden, um die Rolle und die Funktion von Peroxisomen in der Cryptomonade detaillierter zu verstehen.

Durch *in silico* Analysen wurde je ein Kandidatenprotein für ICL (ID_67257) und MS (ID_97605) in *G. theta* bestimmt, das ein PTS1-ähnliches Signal am C-Terminus aufwies (Tab. III-3) und wurden heterolog in *P. tricornutum* mR3-SKL als GFP-12aaC Versionen lokalisiert (Abb. III-8). Eine peroxisomale Lokalisation konnte für die putativen Gt_ICL und Gt_MS nicht bestätigt werden (Abb. III-8). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Peroxisomen in *G. theta* vermutlich nicht am Glyoxylat-Zyklus beteiligt sind. Da die putative Gt_MS neben der PTS1-ähnlichen Sequenz „SRK“ ein putatives mTP am N-terminus codiert (Tab. III-3), ist eine mitochondriale oder sogar eine duale Lokalisation in den Mitochondrien und Peroxisomen in *G. theta* nicht auszuschließen. Das putative mTP in Gt_MS könnte kompetitiv zu dem PTS1-ähnlichen Motiv sein (Kunze und Berger 2015; Stehlik et al. 2020) und „SRK“ könnte in *P. tricornutum* nicht als ein PTS1 erkannt werden. Auch wenn die heterologen Kollokalisierung in *P. tricornutum* meistens der vorhergesagten Lokalisation entsprechen, sollten an dieser

Stelle weitere Analysen erfolgen. So könnten z. B. weitere Lokalisationsstudien das putative mTP am N Terminus von Gt_MS aufschlüsseln, ob die Malat-Synthase potentiell in die Mitochondrien transportiert wird, wo diese am TCA-Zyklus beteiligt sein könnte (Ludewig-Klingner et al. 2017). Die putative Gt_ICL besitzt neben dem nicht-kanonischen „YKL“ am C-Terminus ebenfalls eine N-terminale TMD und putatives Signalpeptid, was auf eine Sekretion hindeutet (Tab. III-3). Heterolog lokalisierte GFP-Gt_ICL.12aaC im Cytosol von *P. tricornutum* mR3-SKL (Abb. III-8). Das deutet daraufhin, dass „YKL“ zumindest in der Diatomee nicht als PTS1 erkannt wird. Ob Gt_ICL in *G. theta* auch tatsächlich nicht in den Peroxisomen lokalisiert, sollte in weiteren Lokalisationsstudien untersucht werden, vor allem im Hinblick auf das N-terminale Signalpeptid. Kürzlich wurde in der Diatomee *T. pseudonana* die peroxisomale Lokalisation von Tp_ICL *in vivo* bestätigt, wobei diese vermutlich sowohl am Glyoxylat- als auch am TCA-Zyklus beteiligt sei kann (Davis et al. 2017).

In der Chlorophyte *C. reinhardtii* peroxisomale MS und MD identifiziert (Hayashi et al. 2015). Dabei besitzt die Cr_MS ein PTS1 (Nogales et al. 2004), wohingegen Cr_MD ein PTS2 codiert (Hayashi und Shinozaki 2012). Interessanterweise besitzen weiteren glyoxysomalen Enzyme in *C. reinhardtii* keine PTS-Signale (Hayashi et al. 2015). Es ist unklar, ob die peroxisomal lokalisierte Gt_MD (ID_64327) in der Cryptomonade am Glyoxylat-Zyklus beteiligt ist.

Durch BLAST-Analysen bekannter photorespiratorischen Sequenzen in der Genom-Datenbank von *G. theta* wurden nur zwei putative Enzyme mit einem putativen PTS1 identifiziert (Tab. III-4). Dabei besitzt die Gt_GOX (ID_159984) ein nicht-kanonisches „SKG“ Tripeptid am C-Terminus wobei das Gt_HRP/GR (ID_91234) Enzym nach CDS-Überprüfung mit EST-Daten ein „AKL“ als putatives PTS1 aufweist (Tab. III-4). Heterologe *in vivo* Lokalisation von GFP-GOX.12aaC *P. tricornutum* wurde cytosolisch beobachtet (Abb. I-8). Dies deutet darauf hin, dass „SKG“ in *P. tricornutum* nicht als ein PTS1 erkannt wird. Ob Gt_HRP/GR peroxisomal lokalisiert, konnte in dieser Studie für das volle Länge Protein nicht bestimmt werden und es sollten weitere Lokalisationsstudien mit dem C-Terminus durchgeführt werden. Des Weiteren ist unklar, ob es sich bei dem putativen Protein mit der ID_91234 um eine Hydroxypyruvat-Reduktase (HRP) oder eine Glyoxylat-Reduktase (GR) handelt. Interessanterweise besitzen Gt_GOX (ID_159984) als auch Gt_HRP/GR (ID_91234) N-terminal ein putatives mTP, was *in vivo* zu einer dualen Lokalisation in Mitochondrien und Peroxisomen in *G. theta* führen könnte. Aufgrund der cytosolischen Lokalisation von Gt_GOX in *P. tricornutum*, lässt sich die peroxisomale Beteiligung an der Photorespiration in *G. theta* nicht bestätigen.

In den Diatomeen *P. tricornutum* und *T. pseudonana* wurden zwei GOX Proteine identifiziert, wobei GOX1 vermutlich in den Peroxisomen lokalisiert und GOX2 in Mitochondrien von *T. pseudonana* kolokalisiert wurde (Kroth et al. 2008; Davis et al. 2017). Vermutlich findet die Photorespiration in Diatomeen in der Plastide und den Mitochondrien, unabhängig von den Peroxisomen, statt (Kroth et al. 2008; Davis et al. 2017). Interessanterweise wurde in *P. tricornutum* und *T. pseudonana* bioinformatisch kein Homolog zu der Glycerat-Kinase (GLYK) identifiziert (Kroth et al. 2008). Mittels *in silico* Analyse in *G. theta* wurde eine wahrscheinlich mitochondriale Gt_GLYK (ID_138485) und weitere cytosolisch vorhergesagte Homologen identifiziert (siehe Tab. III-4).

In silico Analysen (Tab. III-4) und heterologe *in vivo* Lokalisationen (Abb. III-8B) putativer *G. theta* Homologe für photorespiratorische Enzyme weisen darauf hin, dass die Peroxisomen der Cryptomonade ähnlich der Peroxisomen der Diatomee nicht an der Photorespiration beteiligt sind. Höchstwahrscheinlich erstreckt sich die Photorespiration in *G. theta* über die Plastide, die Mitochondrien und das Cytosol.

IV.2.4 Weitere peroxisomale Stoffwechselprozesse in der Cryptomonade *G. theta*

IV.2.4.1 Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsel in *G. theta*-Peroxisomen

Neben der H₂O₂-Bildung und -Entgiftung wurden mehrere weitere *G. theta* PTS1-enhaltende Proteine identifiziert und heterolog in Peroxisomen von *P. tricornutum* lokalisiert, die zusammen mit mRuby3-SKL als dem peroxisomalen Marker exprimiert wurden. Die zusammengefasste Stoffwechselkarte in *G. theta* ist in Abb. IV-2 dargestellt. *G. theta*-Peroxisomen scheinen am Kohlenhydrat-Stoffwechsel beteiligt zu sein, da eine PTS1-haltige Malat-Dehydrogenase und ein NAD-abhängiges Maleinenzym mit mRuby3-SKL in *P. tricornutum*-Peroxisomen kolokalisiert wurden (Abb. III-1).

Malat-Dehydrogenasen (MD) wandeln Malat in Oxalacetat um und sind daher wichtige Schlüsselenzyme in verschiedenen Stoffwechselprozessen (Kroth et al. 2008; Davis et al. 2017). In *G. theta* sind drei MD-Isoformen in KEGG annotiert und wurden mittels Bioinformatik analysiert. Darunter wurde eine cytosolische Isoform (Gt_cMD) mit der ID_163842, eine vorhergesagte mitochondriale Isoform (Gt_mMD) mit der ID_154188 und eine peroxisomale Isoform (Gt_pMD) mit der Protein-ID_64327, die das typische „SKL“-Tripeptid am C-Terminus

enthält mittels *in silico* Analysen identifiziert (Tab. III-5). Die peroxisomale Lokalisierung wurde für Gt_pMD in heterologen Lokalisierungsstudien in *P. tricornutum* bestätigt (Abb. III-1). Darüber hinaus könnten Gt_pMD und Gt_cMD am Glyoxylat-Zyklus oder am Malat-Aspartat-Shuttle beteiligt sein (Vasilev et al. 2022), was noch eingehende Analysen erfordert. Höchstwahrscheinlich wird Malat im Cytosol oder in den Mitochondrien synthetisiert und über den Malat-Aspartat-Shuttle in die Peroxisomen von *G. theta* transportiert (der mitochondriale Malat-Aspartat-Shuttle ist in Abb. IV-2 nicht enthalten) (Vasilev et al. 2022). Eine bioinformatisch identifizierte Malat-Synthase (MS) mit der Protein-ID_97605 war im Cytosol lokalisiert (Abb. III-8 A), obwohl sie ein nicht-kanonisches PTS1-ähnliches Signal „SRK“ enthält, was darauf hindeutet, dass „SRK“ in *P. tricornutum* keinen PTS1-vermittelten Import auslöst. Außerdem könnte Gt_MS über ein N-terminales mTP in Mitochondrien importiert werden (Tab. III-3). Ob Gt_MS sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien vorkommt, sollte in zukünftigen Studien untersucht werden (nicht in Abb. IV-2 gezeigt). Die mitochondriale Isoform Gt_mMD könnte am TCA-Zyklus teilnehmen (Sweetlove et al. 2010 (nicht in Abb. IV-2 gezeigt), was in weiteren Studien untersucht werden muss. Malat kann zusätzlich durch das NAD(P)-abhängige Maleinenzym (ME) in Pyruvat umgewandelt werden (Tronconi et al. 2008) und könnte damit zum Pyruvat-Stoffwechsel beitragen (Abb. IV-2) (Vasilev et al. 2022). In *G. theta* wurde ein NAD-abhängiges ME (Gt_NME) nachgewiesen, das „CKL“ als putatives PTS1 enthält (Tab. I-1), und die peroxisomale Lokalisierung wurde durch heterologe Lokalisierungsstudien in *P. tricornutum* bestätigt (Abb. III-1). Der Kohlenhydrat-Stoffwechsel in den Kieselalgen *P. tricornutum* und *T. pseudonana* wurde *in silico* untersucht (Kroth et al. 2008; Davis et al. 2017). Im Vergleich zur Cryptomonade *G. theta* besitzen die Kieselalgen peroxisomale und mitochondriale Isoformen für MD, aber nur eine mitochondriale NME (Kroth et al. 2008; Davis et al. 2017).

Die früher als Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) bekannte Aspartat-Aminotransferase (AAT) setzt Aspartat mit Ketoglutarat zu Glutamat und Oxalacetat um (Kirsch et al. 1984). Für die volle Funktionalität der AAT ist Pyridoxal-5'-phosphat wichtig, das an die AAT gebunden ist (Kirsch et al. 1984; Toney 2014). AATs spielen normalerweise eine wichtige Rolle im mitochondrialen Malat-Aspartat-Shuttle und sind auch am Abbau von Aminosäuren beteiligt. Für das identifizierte Gt_AAT (ID_158574) mit „SKL“ als PTS1 wurde eine heterologe Lokalisierung in *P. tricornutum*-Peroxisomen bestätigt (Abb. III-2). Weitere bioinformatische Analysen des Aspartat-Stoffwechsels in *G. theta* ergaben eine putative Asparaginase (Gt_ASP,

ID_121809) mit nicht-kanonischem „PRL“ am C-Terminus, was auf ein putatives PTS1-Signal hinweist (Tab. III-5). Im Allgemeinen hydrolysiert ASP L-Asparagin zu L-Aspartat und setzt dabei Ammoniak frei. Die peroxisomale Lokalisierung wurde für mehrere Proteine mit einem „PRL“ als PTS1-Signal in höheren Pflanzen (*A. thaliana*), Hefe (*S. cerevisiae*) und auch in einem Ascomyceten-Pathogen (*Colletotrichum higginsianum*) bestätigt (Reumann et al. 2004; Reumann et al. 2012; Nötzel et al. 2016; Robin et al. 2018). Ob das C-terminale Tripeptid „PRL“ auch den peroxisomalen PTS1-abhängigen Import in *P. tricornutum* auslöst, muss in zukünftigen Studien validiert werden (Vasilev et al. 2022).

IV.2.4.2 Durch das peroxisomale MenB sind die Peroxisomen in *G. theta* an der Vitamin-K-Synthese beteiligt

Heterologe *in vivo* Lokalisierungsstudien von PTS1-haltigen Proteinen von *G. theta* in *P. tricornutum* bestätigten die peroxisomale Lokalisierung der *in silico* identifizierten 1,4-Dihydroxy-2-Naphtoyl-CoA (DHNA-CoA)-Synthase (MenB), die von *guithdraft_85732* in *G. theta* codiert wird. MenB ist eines der zentralen Enzyme, die an der Vitamin-K-Synthese beteiligt sind. In photosynthetisch-aktiven Organismen ist Vitamin K1 (Phyllochinon) ein wichtiger Elektronenträger im Photosystem I (Reumann 2013; Cenci et al. 2018). Daher ist die *de novo* Biosynthese von Phyllochinon ein essentieller Weg in höheren Pflanzen und photosynthetisch-aktiven Organismen. In dieser Arbeit wurden die an der Vitamin K Synthese beteiligten Enzyme bioinformatisch untersucht, in der Abb. IV-2 zusammengefasst und in Vasilev et al. (2022) publiziert.

In neun aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten wird Phyllochinon aus Chorismat, dem Produkt des Shikimatwegs, synthetisiert. Die ersten vier Schritte können in einem multifunktionalen Protein namens PHYLLLO zusammengefasst sein, das MenF, MenD, MenH und MenC kombiniert (Gross et al. 2006; Gross et al. 2008; Cenci et al. 2018). In höheren Pflanzen kann die Isochorismat-Synthase (MenF), die die erste Reaktion katalysiert, auch von einzelnen Genen codiert werden, was die unabhängige Regulierung anderer Stoffwechselwege wie die Synthese von Salizylsäuren ermöglicht, die für die Pflanzenabwehr erforderlich sind (Gross et al. 2006; Gross et al. 2008). Durch bioinformatische Analysen wurde ein putatives Gt_PHYLLLO-Protein mit der Protein-ID_72208 in *G. theta*, das MenD, MenH und MenC kombiniert und vermutlich über den sekretorischen Weg in die Plastide von *G. theta*

transportiert wird (Abb. IV-2). Jedoch sollte die *in vivo* Lokalisation des putativen Gt_PHYLLO in Lokalisationsstudien untersucht werden. Das möglicherweise einzeln codierte Gt_MenF (ID_72109) ist in KEGG als Menachinon-spezifische Isochorismat-Synthase annotiert (Tab. III-5). Zusätzlich wurde ein putatives Gt_MenH (ID_72176) codierendes Gen auf einem Locus zusammen mit ID_72208 und ID_72109 identifiziert (Abb. III-9). Ob die identifizierten Gt_MenF- und Gt_MenH-kodierenden Gene individuelle Gene sind oder Teil des PHYLLO-Clusters, muss in zukünftigen Studien untersucht werden (Vasilev et al. 2022).

Die Aktivierung von *o*-Succinylbenzoat durch eine *o*-Succinylbenzoyl-CoA-Ligase (MenE) wurde in den Peroxisomen von *A. thaliana* durch das peroxisomale Acyl-CoA-aktivierende Enzym (AAE14, At1g30520) mit dem nicht-kanonischen PTS1 „SSL“ und lokalisiert möglicherweise ebenfalls in der Plastide (Kim und Archibald 2008; Babujee et al. 2010; Del Río 2013 Kapitel 12 von S. Reumann). Laut den Lokalisierungsvorhersagetoools enthält das putative Gt_MenE (ID_139711) keine PTS-ähnlichen Signale und wird vermutlich über den sekretorischen Weg in die Plastide transportiert (Tab. III-5 und Abb. IV-2), wobei nur die letzte C-terminale Domäne als die putative *o*-Succinylbenzoat-CoA-Ligase vorhergesagt ist (Vasilev et al. 2022). Nach der Aktivierung von *o*-Succinylbenzoat katalysiert MenB die Bildung des Naphthoatrings. MenB wird von einem einzigen Gen codiert und enthält ein konserviertes PTS2 in allen bisher analysierten mutmaßlichen Orthologen höherer Pflanzen (Reumann et al. 2007; Babujee et al. 2010). Im Gegensatz zu höheren Pflanzen enthält Gt_MenB ein C-terminales „SRL“ als putatives PTS1 und peroxisomale Lokalisation konnte heterolog in *P. tricornutum* bestätigt werden (Abb. III-1). Neben der peroxisomalen Lokalisation von Gt_MenB wurden auch große punktuelle Anreicherung des GFP-Gt_MenB Fusionsprotein nahe der Plastide beobachtet, welche nicht mit dem peroxisomalen Marker kolokalisierten (Abb. S VII-3). Um welche Strukturen es sich hier handelt, sollte in zukünftigen Studien analysiert werden, z. B. mittels Immunmarkierungen auf Zell-Dünnschnitten am TEM. Interessanterweise wurde in *P. tricornutum* ein Homolog zu MenB codierend durch PHATR DRAFT_bd371 und mit einem „SKL“ als PTS1 mit KEGG-Annotationen identifiziert, was eine peroxisomale Beteiligung an der Vitamin-K-Biosynthese in der Kieselalge nahelegt (Vasilev et al. 2022).

Die DHNA-CoA-Thioesterase (DHNAT) produziert DHNA durch Freisetzung von CoA. In *Arabidopsis thaliana* wurden zwei für DHNAT kodierende Gene identifiziert, die beide PTS1-Signale enthalten und nachweislich in Peroxisomen lokalisiert sind (Reumann et al. 2009;

Widhalm et al. 2012). Im Rahmen des bioinformatischen Ansatzes wurde in *G. theta* kein DHNAT Homolog identifiziert (Tab. III-5). Stattdessen konnten mehrere Acyl-CoA-Thioesterasen mit mutmaßlichen Hotdog-haltigen Domänen identifiziert werden (Tab. Digital 5), die ebenfalls an der Synthese von Phyllochinonen beteiligt sein könnten (Dillon und Bateman 2004; Widhalm et al. 2009). Ob es sich bei einem dieser Kandidaten tatsächlich um DHNAT handelt, das an der Phyllochinon-Synthese in *G. theta* beteiligt ist, muss in zukünftigen Studien untersucht werden (Vasilev et al. 2022).

Die letzten beiden Schritte der Vitamin-K1-Biosynthese finden in der Plastide höherer Pflanzen statt. MenA (DHNA-Phytyl-Transferase) bindet die Phytylkette an den Naphthoatring und MenG methyliert die Vorstufe zu Phyllochinon. In *G. theta* wurden keine Homologe für Gt_MenA oder Gt_MenG identifiziert (Tab. III-5).

Schließlich wurde in *G. theta* eine Vitamin-K-Epoxid-Reduktase (VKOR) identifiziert (ID_106868) (Tab. III-5), deren *in silico* Lokalisationsvorhersage nicht eindeutig war (Tab. III-5 und Tab. S 2). Die VKOR lokalisiert normalerweise in der Thylakoid-Membran in höheren Pflanzen (Tie und Stafford 2008a; Feng et al. 2011). Aufgrund der vier TMDs und zumindest mit einem Vorhersagetool identifizierte plastidäre Lokalisation (Tab. S 2) könnte die putative Gt_VKOR ebenfalls in der plastidären Membran lokalisieren (Abb. IV-2) (Vasilev et al. 2022). Die genaue *in vivo* Lokalisation von Gt_VKOR sollte in zukünftigen Lokalisationsstudien näher beschrieben werden.

IV.2.4.3 Peroxisomale Gt_FAR und Gt_AGPS sind an der Ether-Phospholipid-Synthese beteiligt

Durch die bioinformatischen Analysen wurde eine putative peroxisomale Alkyldihydroxyacetonphosphat-Synthase (Gt_AGPS), das eine der peroxisomalen Reaktionen während der Etherphospholipid-Synthese katalysiert, identifiziert. Heterologe *in vivo* Kolokalisationsstudien in *P. tricornutum* sind nicht schlüssig, da für das Protein in voller Länge (GFP-Gt_AGPS) eine cytosolische Lokalisation beobachtet wurde, während GFP-AGPS.12aaC mit dem peroxisomalen Marker kolokalisierte (Abb. III-2). Da der C-terminale Teil von Gt_AGPS heterolog in *P. tricornutum* in Peroxisomen importiert wurde, kann von einer peroxisomalen Lokalisation in *G. theta* ausgegangen werden (Abb. IV-2). AGPS tauscht die Acyl-Gruppe mit einer Alkyl-Gruppe von Acyl-Dihydroxyacetonphosphat (Acyl-DHAP) aus, das

zuvor durch Glycerolphosphat-Acyltransferase (GPAT) oder Dihydroxyacetonphosphat-Acyltransferase (DHAPAT) acetyliert wird (Hajra und Bishop 1982; Hajra und Das 1996; Dean und Lodhi 2018). Überprüfungen mit KEGG in *G. theta* schlagen zwei Gt_GPAT/DHAPAT-Isoformen (ID_139343, ID_163230) mit 5-6 Transmembrandomänen ohne ein vorhergesagtes PTS oder mTP vor (Tab. III-5). Die zweite putative Gt_GPAT/DHAPAT Isoform (ID_163230) wird vermutlich sekretiert (N-terminales Signalpeptid) und ist höchstwahrscheinlich an der Triacylglycerid-Synthese (TAG) beteiligt (Vasilev et al. 2022). Die zweite putative Isoform von Gt_GPAT/DHAPAT (ID_139343) könnte möglicherweise DHAP aktivieren und an die peroxisomale Membran gebunden sein (Abb. IV-2), was weitere Analysen in der Zukunft erfordert. Neben DHAP als Zwischenprodukt benötigt AGPS auch Fettalkohole, die den Alkylrest liefern. Fettalkohole werden durch eine Fettsäure-Acyl-CoA-Reduktase (FAR) katalysiert. Das Gt_FAR-Homolog wurde mit einem putativen PTS1 am C-Terminus identifiziert und kolokalisiert heterolog in Peroxisomen von *P. tricornutum* (Abb. III-1). Zusammen mit Gt_AGPS ist Gt_FAR an den ersten Schritten der Etherphospholipid-Synthese beteiligt, die im endoplasmatischen Retikulum (ER) abgeschlossen wird (Abb. IV-2).

IV.3 Rhodophyten haben im Vergleich zu Chlorophyten und Glaucophyten keinen PTS2-Import

Für komparative Genomanalyse und zur *in silico* Identifikation putativer Peroxine und somit eines Peroxin-Kernsatzes in Mikro- und Makroalgen chlorophytischen, rhodophytischen und glaucophytischen Ursprungs wurden bekannte Peroxinsequenzen aus *P. tricornutum* (Gonzalez et al. 2011), *G. theta* (Mix et al. 2018), *A. thaliana* (zusammengefasst in Nito et al. 2007) und *S. cerevisiae* (zusammengefasst in Kiel et al. 2006) eingesetzt. Dabei konnte bei den meisten Vertretern ein minimaler Peroxin-Kernsatz identifiziert werden mit Peroxinen für die Biogenese, der Erhaltung und der Proliferation identifiziert (Tab. III-6).

In *G. theta* wurden 16 Peroxine identifiziert, wobei Pex11 und Pex19 vermutlich in jeweils zwei Isoformen vorliegen (Mix et al. 2018). Der PTS2-Import nicht nur in der Diatomee *P. tricornutum* zu fehlen (Gonzalez et al. 2011), sondern auch in weiteren Stramenopilen und den Haptophyten (Mix et al. 2018). Der minimale Kernsatz von *G. theta* beinhaltet die beiden Rezeptoren für lösliche Proteine Pex5 und Pex7; Pex14 des Docking-Komplexes; Pex2, Pex10 und Pex12 als Komponenten des RING-Komplexes; die Ubiquitin-Ligase Pex4 mit dem Pex22

als dessen Membran-Anker; die beiden ATPasen Pex1 und Pex6; die Komponenten verantwortlich für den Transport von peroxisomalen Membranproteinen Pex3, Pex16 und Pex19 und den Proliferationsfaktor Pex11 (Mix et al. 2018). In der Chlorarachniophyte *Bigelowiella natans* wurden im Vergleich zu *G. theta* zwei putative Pex7 Isoformen bioinformatisch identifiziert, was bisher in keinem weiteren Organismus beobachtet wurde (persönliche Kommunikation mit Dr. Moog). In *B. natans* wurden zwar kein Pex3 und kein Pex22 Homolog eindeutig identifiziert, wobei die Chlorarachniophyte über sieben Pex11 Homologe zu codieren scheint (Tab. III-6).

In den untersuchten Mikro- und Makroalgen chlorophytischen Ursprungs wurden in allen Organismen fast alle nötigen Peroxine für die Peroxisom-Biogenese und Proliferation identifiziert (Tab. III-6). Dabei konnte in dieser Arbeit in *Chlamydomonas reinhardtii* keine Homologe für Pex3 und Pex13 identifiziert werden, wobei Pex11, wie auch in anderen untersuchten Organismen, von zwei Genen codiert zu sein scheint (Tab. III-6). Der Peroxin-Kernsatz von *C. reinhardtii* wurde kürzlich in einer weiteren Studie näher untersucht, wobei neben den Peroxinen aus dieser Arbeit zusätzlich die Homologen für Pex3 und Pex13 *in silico* bestimmt werden konnten (Kato et al. 2022). Somit besitzt *C. reinhardtii* vergleichbar mit höheren Pflanzen wahrscheinlich alle nötigen Peroxine für die Biogenese, Erhalt, Transport und Proliferation. In *Ostreococcus tauri* konnte kein Homolog für Pex3 mittels Bioinformatik identifiziert werden (Tab. III-6); zur Identifizierung könnte in zukünftigen BLAST-Analysen das putative Pex3 von *C. reinhardtii* eingesetzt werden, da die Sequenzen beider Organismen womöglich näher verwandt sind als zu höheren Pflanzen oder Pilzen. Des Weiteren ist auffällig, dass bei *O. tauri* und *Ulva mutabilis* die Ubiquitin-Ligase Pex4 und deren Membran-Anker Pex22 nicht identifiziert werden konnten (Tab. III-6). Entweder sind die Pex-Sequenzen in *O. tauri* und *U. mutabilis* divergenter als bei bekannten Modellorganismen und konnten mit etablierten BLAST-Analysen nicht identifiziert werden, oder die Pex5 und Pex7 Rezeptoren werden nicht oder Pex4-unabhängig recycelt.

In den Mikro- und Makroalgen rhodophytischen Ursprungs wurde mit Ausnahme von *Chondrus crispus* die meisten Peroxine für die Peroxisom-Proliferation identifiziert (Tab. III-6). Dabei konnten keine Homologe für den PTS2-Rezeptor Pex7 und Pex13 als eine Komponente des Docking-Komplexes identifiziert werden. Schon frühere Studien in der einzelligen Rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae* deuteten auf das Fehlen vom PTS2-Proteinen (Shinozaki et al. 2009) und somit auf das Fehlen des Pex7 Rezeptors hin. In den untersuchten

Rhodophyten konnten keine Homologe für Pex13 und Pex7 identifiziert werden (Tab. III-6). Schlussfolgernd werden peroxisomale Matrixproteine in Rhodophyten vermutlich PTS1-abhängig vom Pex5-Rezeptor zu den Peroxisomen transportiert. Das Fehlen von PTS2-abhängigem Import peroxisomaler Proteine scheint keine Seltenheit zu sein, da dieser Importweg in Haptophyten, einigen Stramenopilen aber auch in der Rhodophyte *C. merolae* und dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* zu fehlen scheint (Gonzalez et al. 2011; Mix et al. 2018; Shinozaki et al. 2009; Motley et al. 2000).

In *C. crispus* wurden im Vergleich nur vier putative Peroxine *in silico* identifiziert: Pex4, Pex5, Pex6 und Pex12. Dies könnte entweder am bis dato unvollständigen Genom-Datensatz für *C. crispus* liegen oder die Peroxin-Sequenzen sind divergenter als bei bekannten Organismen. Zur Identifizierung von Peroxin-Sequenzen in *C. crispus* wurden nicht nur bekannten Sequenzen von *P. tricornutum*, *G. theta*, *A. thaliana* und *S. cerevisiae* eingesetzt, sondern auch die putativen Pex-Sequenzen in dieser Arbeit untersuchten einzelliger Rhodophyten. Daher kann nicht mit Sicherheit bestimmt werden, ob *C. crispus* tatsächlich funktionierende Peroxisomen ausbildet oder nicht.

In der Glaucophyte *Cyanophora paradoxa* wurde ein fast kompletter Minimal-Kernsatz an Peroxinen identifiziert; darunter die Rezeptoren Pex5 und Pex7, die Komponenten der RING-Komplexes bestehend aus Pex2 und Pex12, die für den transport peroxisomaler Membranproteine verantwortlichen Pex3 und Pex19, die Ubiquitin-Ligase Pex4, der Proliferations-Faktor Pex11 und Pex14 als Komponente des Docking-Komplexes (Tab. III-6). Auch wenn die beiden ATPasen Pex1 und Pex6 nicht eindeutig identifiziert werden konnten, lässt sich dennoch schlussfolgern, dass funktionierende Peroxisomen in der Glaucophyte vorhanden sein könnten. Vermutlich sind die nicht identifizierten Pex-Sequenzen in *C. paradoxa* divergenter als bei Chloro- und Rhodophyten und sollten in weiteren Studien näher charakterisiert werden.

Zusammenfassend besitzen die meisten untersuchten Chlorophyten, Rhodophyten und Glaucophyten höchstwahrscheinlich funktionale Peroxisomen, da die für die Peroxisom-Biogenese und Proliferation erforderlichen Peroxine *in silico* identifiziert wurden. Dabei werden peroxisomale Matrixproteine in Chlorophyten und vermutlich in Glaucophyten PTS1- und PTS2-abhängig in die Peroxisomen importiert, während in Rhodophyten der PTS2-Import zu fehlen scheint.

V FAZIT

Diese Studie präsentiert *in silico* und experimentelle Beweise für das Vorhandensein von metabolisch aktiven Peroxisomen in *G. theta*. Interessanterweise fehlen Peroxisomen in der Cryptophyte höchstwahrscheinlich Enzyme für die β -Oxidation von Fettsäuren, die einen klassischen Stoffwechselweg von Peroxisomen darstellt. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit nahelegen, scheint die β -Oxidation in *G. theta* ausschließlich mitochondrial zu erfolgen, was im Gegensatz zu den meisten anderen bisher untersuchten Organismen steht. Des Weiteren sind die Peroxisomen in *G. theta* vermutlich nicht am Glyoxylat-Zyklus oder der Photorespiration beteiligt. Dabei erstreckt sich die Photorespiration womöglich über die Mitochondrien und die Plastide.

Auch wenn die typische ROS-detoxifizierende Katalase nicht in *G. theta* identifiziert werden konnten, wird diese Funktion höchstwahrscheinlich durch die Ascorbat-Peroxidase komprimiert. So können die toxischen Nebenprodukte, die z. B. im Purinabbau und der Amin-Desaminierung entstehen, rasch abgebaut werden. Darüber hinaus spielen *G. theta* Peroxisomen eine wichtige Rolle im Aminosäurestoffwechsel, im Ascorbat-Glutathion-Zyklus, in der Vitamin-K- und Ether-Phospholipid-Synthese und sind mit einer Vielzahl anderer biochemischer Stoffwechselwege in der Cryptomonade verbunden. Somit sind Peroxisomen wichtige Kompartimente im komplexen Stoffwechsel von *G. theta*.

Des Weiteren deuten die Ergebnisse bioinformatischer Analysen von Peroxinen in Mikro- und Makroalgen chlorophytischen, rhodophytischen und glaucophytischen Ursprungs auf das Vorhandensein funktionaler Peroxisomen in den untersuchten Organismen hin. In Chlorophyten und der Glaucophyte *Cyanophora paradoxa* sind wahrscheinlich beide Importwege für peroxisomale Matrixproteine vorhanden (PTS1 und PTS2), wobei der PTS2-Importweg in den Rhodophyten zu fehlen scheint. Nichtsdestotrotz ist davon auszugehen, dass die Peroxisomen in Mikro- und Makroalgen durch Biogenese und Proliferation ausgebildet werden und an diversen metabolischen Stoffwechselwegen beteiligt sind.

VI MATERIAL UND METHODEN

VI.1 Material

VI.1.1 Mikroorganismen

Tab. VI-1: In dieser Arbeit verwendete Mikroorganismen und ihre Eigenschaften

Name	Beschreibung	Hersteller/Referenz
<i>Escherichia coli</i> TOP10, One Shot™	F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80LacZΔM15 Δ LacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen™
<i>Guillardia theta</i>	CCMP327/CCMP2712, Wildtyp	Hill und Wetherbee 1990
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	UTEX646, Wildtyp	Universität Konstanz, AG Prof. Dr. Kroth

VI.1.2 Verwendete Vektoren und Plasmide

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Vektoren dargestellt. Die zu untersuchten Gensequenzen wurden mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert und in die jeweilige multiple Klonierungsschnittstelle (*multiple cloning site* (MCS)) mittels Restriktion/Ligation oder Gibson-Assembly kloniert. Die pPhaNR-Derivate wurden für *in vivo* Lokalisationsstudien in *P. tricornutum* eingesetzt (Tab. VI-2).

Tab. VI-2: In dieser Arbeit verwendete und für die Transfektion konstruierten Plasmide

Die grau-unterlegten Plasmide wurden für *in vivo* Lokalisationsstudien in *P. tricornutum* eingesetzt

Name	Beschreibung	Hersteller/Referenz
pJet1.2/blunt	2974 bp, rep (pMB1), ori, Amp ^R , <i>eco47I</i> , P _{lacUV5} , P _{T7} , MCS, Eingangsvektor für Klonierungen, linearisiert, mit <i>blunt</i> Enden	EF694056.1 Thermo Scientific™
pPhaNR_zeo	3860 bp, P _{NR} , T _{NR} , Amp ^R , Zeo ^R , MCS, Zielvektor/binärer Vektor; Expression in <i>P. tricornutum</i> unter der Kontrolle des NR-Promotors	JN180663 Stork et al. 2012
pPhaNR:GFP-GtUO	pPhaNR_zeo Derivat, beinhaltet die Gt_UO Gensequenz mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Mix, 2018
pPhaNR:GFP-GtMenB	pPhaNR_zeo Derivat, beinhaltet die Gt_MenB Gensequenz mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Mix, 2018

pJet:GtAGPS_F1	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_AGPS_F1 Fragment mit der Länge von 1108 bp (zzgl. Restriktionserkennungsstellen)	Diese Arbeit
pJet:GtAGPS_F2	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_AGPS_F2 Fragment mit der Länge von 769 bp (zzgl. Restriktionserkennungsstellen)	Diese Arbeit
pPhaNR:GFP-GtAGPS	pPhaNR_zeo Derivat, beinhaltet die Gt_AGPS Gensequenz mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pJet:GFP-GtAGPS12as	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet die letzten 12 Aminosäuren des C-terminus inkl. PTS1 von Gt_AGPS mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pPhaNR:GFP-GtAGPS12as	pPhaNR_zeo Derivat, beinhaltet die letzten 10 Aminosäuren inkl. PTS1 der Gt_AGPS Gensequenz mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pJet:GtFAR_F1	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_FAR_F1 Fragment mit der Länge von 581 bp (zzgl. Restriktionserkennungsstellen)	Diese Arbeit
pJet:GtFAR_F2	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_FAR_F2 Fragment mit der Länge von 903 bp (zzgl. Restriktionserkennungsstellen)	Diese Arbeit
pPhaNR:GFP-GtFAR	pPhaNR_zeo Derivat, beinhaltet die Gt_FAR Gensequenz mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pJet:GtMD	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_MD Fragment mit der Länge von 1014 bp (zzgl. Restriktionserkennungsstellen)	Diese Arbeit
pPhaNR:GFP-GtMD	pPhaNR_zeo Derivat, beinhaltet die Gt_MD Gensequenz mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pJet:GtNME_F1	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_NME_F1 Fragment mit der Länge von 832 bp (zzgl. Restriktionserkennungsstellen)	Diese Arbeit
pJet:GtNME_F2	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_NME_F2 Fragment mit der Länge von 913 bp (zzgl. Restriktionserkennungsstellen)	Diese Arbeit
pPhaNR:GFP-GtNME	pPhaNR_zeo Derivat, beinhaltet die Gt_NME Gensequenz mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pJet:GtAAT_F1	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_AAT_F1 Fragment mit der Länge von 694 bp (zzgl. Restriktionserkennungsstellen)	Diese Arbeit
pJet:GtAAT_F2	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_AAT_F2 Fragment mit der Länge von 587 bp (zzgl. Restriktionserkennungsstellen)	Diese Arbeit
pPhaNR:GFP-GtAAT	pPhaNR_zeo Derivat, beinhaltet die Gt_AAT Gensequenz mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit

pJet:GFP-GtAAT.12aa	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet die letzten 12 Aminosäuren des C-terminus inkl. PTS1 von Gt_AAT mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pPhaNR:GFP-GtAAT.12aa	pPhaNR_zeo Derivat, beinhaltet die letzten 10 Aminosäuren inkl. PTS1 der Gt_AAT Gensequenz mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pJet:GFP-GtAOL.12aa	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet die letzten 12 Aminosäuren des C-terminus inkl. PTS1 von Gt_AOL (später Gt_MAO) mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pPhaNR:GFP-GtAOL.12aa	pPhaNR_zeo Derivat, beinhaltet die letzten 10 Aminosäuren inkl. PTS1 der Gt_AOL (später Gt_MAO) Gensequenz mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pJet:Gt90066_F1	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_ACAD_F1 Fragment (Protein-ID 90066)	Diese Arbeit
pJet:Gt90066_F2	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_ACAD_F2 Fragment (Protein-ID 90066)	Diese Arbeit
pJet:Gt90066_F3	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_ACAD_F3 Fragment (Protein-ID 90066)	Diese Arbeit
pPhaNR:GFP-Gt90066	pPhaNR_zeo Derivat, beinhaltet die Gt_ACAD Gensequenz mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pJet:Gt90066-full	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet die komplette Gt_ACAD Gensequenz (Protein-ID 90066)	Diese Arbeit
pPhaNR:Gt90066-GFP	pPhaNR_zeo Derivat, beinhaltet die Gt_ACAD Gensequenz mit C-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pPhaNR:GtACOX-GFP	pPhaNR_zeo Derivat, beinhaltet die Gt_ACOX Gensequenz mit C-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pJet:Gt161810_F1	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_3HCD_F1 Fragment (Protein-ID 90066) mit der Länge von 396 bp (zzgl. Restriktionserkennungsstellen)	Diese Arbeit
pJet:Gt161810_F2	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_3HCD_F2 Fragment (Protein-ID 90066) mit der Länge von 694 bp (zzgl. Restriktionserkennungsstellen)	Diese Arbeit
pJet:Gt161810_F3	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_3HCD_F3 Fragment (Protein-ID 90066) mit der Länge von 480 bp (zzgl. Restriktionserkennungsstellen)	Diese Arbeit
pPhaNR:Gt161810-GFP	pPhaNR_zeo Derivat, beinhaltet die Gt_3HCD Gensequenz mit C-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pJet:Gt121132_F1	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_ECH_F1 Fragment	Diese Arbeit
pJet:Gt121132_F2	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_ECH_F2 Fragment	Diese Arbeit

pJet:Gt121132_F3	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_ECH_F3 Fragment	Diese Arbeit
pPhaNR:Gt121132-GFP	pPhaNR_zeo Derivat, beinhaltet die Gt_ECH Gensequenz mit C-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pJet:GtKCT	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet den N-Terminus inkl. eines putativen mTPs der Gt_KCT Gensequenz	Diese Arbeit
pPhaNR:GtKCT-GFP	pPhaNR_zeo Derivat, beinhaltet den N-Terminus inkl. eines putativen mTPs der Gt_KCT Gensequenz mit C-terminalen GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pJet:GFP-GtMLS12aa	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet die letzten 12 Aminosäuren des C-terminus inkl. PTS1 von Gt_MLS mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pPhaNR:GFP-GtMLS12aa	pPhaNR_zeo Derivat, beinhaltet die letzten 10 Aminosäuren inkl. PTS1 der Gt_MLS Gensequenz mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pJet:GFP-GtGOX12aa	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet die letzten 12 Aminosäuren des C-terminus inkl. PTS1 von Gt_GOX mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pPhaNR:GFP-GtGOX12aa	pPhaNR_zeo Derivat, beinhaltet die letzten 10 Aminosäuren inkl. PTS1 der Gt_GOX Gensequenz mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pJet:GFP-GtICL12aa	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet die letzten 12 Aminosäuren des C-terminus inkl. PTS1 von Gt_ICL mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pPhaNR:GFP-GtICL12aa	pPhaNR_zeo Derivat, beinhaltet die letzten 10 Aminosäuren inkl. PTS1 der Gt_ICL Gensequenz mit N-terminaler GFP-Gensequenz	Diese Arbeit
pJet:GtMVK1	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_MVK1 Fragment	Diese Arbeit
pJet:GtMVK2	pJet1.2/blunt Derivat, beinhaltet das Gt_MVK2 Fragment	Diese Arbeit

VI.1.3 Oligonukleotide

Tab. VI-3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Referenz
pJet1.2_fw	GCACAAGTGTTAAAGCAGTT	AG Maier
pJet1.2_rv	CTCTCAAGATTTTCAGGCTGTAT	AG Maier
pPha_NR_MCSfw	GGTCGGGTTTCGGATCCTCC	AG Maier

pPha_NR_MCSrv	GATGAACATAAAACGACGATGAG	AG Maier
eGFP_5'rv	GGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATG	
GtAGPSfwBglII	AGATCTATGTCCACCGCCAGACCCAGC	Diese Arbeit
GtAGPSF1rvSall	GCTCGTTGTCGACCAGTCGGAC	Diese Arbeit
GtAGPSF2fwSall	GTCCGACTGGTTCGACAACGAGC	Diese Arbeit
GtAGPSrvHindIII	AAGCTTACAGGTGAGACGTGGGTATC	Diese Arbeit
GtAGPS12AS_rv_HindIII	AAGCTTACAGGTGAGACGTGGGTATCTTCCCCTTGCCATCTCCCT TGACAGCTCGTCCATGCC	Diese Arbeit
GtFAR_BamHI_fw_new	GGATCCATGAAGGAGAAAGGCAGAGGAG	Diese Arbeit
GtFAR_F1_KpnI_rev	CAGTAATCCGCAGGTACCGACC	Diese Arbeit
GtFAR_F2_KpnI_fw	GGTCGGTACCTGCGGATTACTG	Diese Arbeit
GtFAR_HindIII_rev	AAGCTTCTACAGTCTTGATCGTTTCG	Diese Arbeit
GtNME_BglII_fw	AGATCTATGGAGAGGGCAAAGTTTGGG	Diese Arbeit
GtNME_F1_Bpu_rev	CAGCGCTTAGCAGGCCCGCAAG	Diese Arbeit
GtNME_F2_Bpu_fw	CTTGCGGGCCTGCTAAGCGCTG	Diese Arbeit
GtNME_HindIII_rev	AAGCTTTCATAGTTTACACATGGGCG	Diese Arbeit
GtMD_BamHI_fw	GGATCCATGCGGGTGTGCGTCACGGG	Diese Arbeit
GtMD_HindIII_rev	AAGCTTTCAGAGCTTCGACCGCGCAATG	Diese Arbeit
GtAAT_F1_BamHI_fw	GGATCCATGGCGGGGAAGTCGCGATGG	Diese Arbeit
GtAAT_F1_XhoI_rev	CTCGCTCGAGATCTCCACTGG	Diese Arbeit
GtAAT_F2_XhoI_fw	CCAGTGGAGATCTCGAGCGAG	Diese Arbeit
GtAAT_F2_XbaI_rev	TCTAGATCAAAGCTTCGAGCAGGAGTTG	Diese Arbeit
GtAAT12AS_rv_XbaI	TCTAGATCAAAGCTTCGAGCAGGAGTTGATTGCGTCCTTCATCGC CTTGACAGCTCGTCCATGCC	Diese Arbeit
GtAOL(MAO)12_HindIII_rev	AAGCTTTCATAGCCTTGACTCTGCGGGGCAGGTGGGGGTGAGCT GCTTGACAGCTCGTCCATGCCG	Diese Arbeit
Gt90066_fw_EcoRI	GAATTCATGCTCCGAGGAGTCTCTCG	Raap, 2019
Gt90066_fw_BamHI	GGATCCATGCTCCGAGGAGTCTCTCG	Raap, 2019
Gt90066_F1NrvHpaI	GGAGAAGTTAACTCTCATTCCC	Raap, 2019
Gt90066_F2NfwHpaI	GGGAATGAGAGTTAACTTCTCC	Raap, 2019
Gt90066_F2NrvSacI	CCAGCGTGAGCTCGCGTTGAAGC	Raap, 2019
Gt90066_F3NfwSacI	GCTTCAACCGGAGCTCACGCTGG	Raap, 2019
Gt90066_rv_BamHI	GGATCCCATGGCGCTCTTCTCGTGTGG	Raap, 2019
Gt90066_rv_XbaI	TCTAGATCACATGGCGCTTCTCGTGTGG	Raap, 2019
Gt90066_F1_rv_HindIII	CGATCACGGCAAGCTTCTCTGG	Raap, 2019

Gt90066_F2_fw_HindIII	CCAGGAGAAGCTTGCCGTGATCG	Raap, 2019
GFP-Gt90066_12asrvHindIII	AAGCTTTCACATGGCGCTTCTCTCGTGTTTGGTCTCCGACACAGA CTTGACAGCTCGTCCATGCC	Rapp, 2019
ACOX_fw_GA_NR	GTCACCACTTGTGCGAACGGATGTTCAAAGTTCGTTCAATG	Diese Arbeit
ACOX_rv_GA_GFP	CGGGAGATCTCGAGCGAGACATGTAGGAC	Diese Arbeit
GFP_fw_GA_ACOX	GTCTCGCTCGAGATCTCCCGGAGGAGGAG	Diese Arbeit
161810_F1EcoRI_fw	GAATTCATGCTCCTGCCACAGTGCTTTGC	Diese Arbeit
161810_F1PstI_rev	GCACCCCTGCAGCATCTTCG	Diese Arbeit
161810_F2PstI_fw	CGAAGATGCTGCAGGGGTGC	Diese Arbeit
161810_F2PvuI_rev	CCTGTCTGCGATCGTCCCTGC	Diese Arbeit
161810_F3PvuI_fw	GCAGGGACGATCGCAGACAGG	Diese Arbeit
161810_F3BamHI_rev	GGATCCACCGAGATACGGGACGTTCTGC	Diese Arbeit
121132F1_EcoRI_fw_neu	GAATTCATGATACAACGGATGATGTCC	Diese Arbeit
Gt121132_F1_rvNcoI	GCGCTCATCCATGGCAACTCTCCG	Raap, 2019
Gt121132_F2_fwNcoI	CGGAGAGTTGCCATGGATGAGCGC	Raap, 2019
Gt121132_F2_rvXhoI	GTGTGGTCTCGAGGAAAACCTGG	Raap, 2019
Gt121132_F3_fwXhoI	CCAAGTTTTCTCGAGACCACAC	Raap, 2019
Gt121132_rvBamHI	GGATCCCTGGTGGAACTTCTCCCTGC	Raap, 2019
GtKCT_fw	GAATTCATGCTGCGGCGGCTG	Diese Arbeit
GtKCT_rv	GGATCCTTCTCGTGAACGTTGGAGG	Diese Arbeit
MLS12AS_HindIII_rev	AAGCTTTCACTTGCGACTACCTCTCTGCCCCCTTGTAGTCCCTC TTGTACAGCTCGTCCATGCC	Diese Arbeit
GFP-GtGOX12as_rev_HindIII	AAGCTTCTATCCCTTTGAGATTCCATGTCTATGGTCACAAGCCTCC TTGTACAGCTCGTCCATGCC	Diese Arbeit
GFP-GtICL12AS_rev_XbaI	TCTAGACTAAAGCTTGTATCGTTCCTCTTCCGCATAATAATCATTC TTGTACAGCTCGTCCATGCC	Diese Arbeit
GtMVK.fw1.EcoRI	GAATTCATGACCTCATCAGAGTCTACTG	Diese Arbeit
GtMVK.fw2.EcoRI	GAATTCATGTCATCACATCGCGGATACG	Diese Arbeit
GtMVK.rev1.KpnI.int	ATACCCGAGGGGGTACCGTGGTATC	Diese Arbeit
GtMVK.fw3.3'part	TCGGAGAGCTGATGAACG	Diese Arbeit
GtMVK.fw4.3'part	AACGGGAAGAGGAGGCCTCATGC	Diese Arbeit
GtMVK.rev2.3'part	TTTCTCTCTACCATGG	Diese Arbeit

VI.1.4 Nährmedien für die Anzucht von Mikroorganismen

Die Zusammensetzung verwendeter Nährmedien ist in dem jeweiligen Methodenteil beschrieben.

Alle Medien wurden in dH₂O angesetzt und anschließend autoklaviert. Bei Fest-Medien wurde 1,5 % (w/v) Agar hinzugesetzt. Bei dem f/2-Flüssig-Medium wurde der pH Wert auf 8 eingestellt und die Stickstoffquelle als auch die Spurenelemente und die Vitamine erst nach dem Autoklavieren und kurz vor dem Gebrauch zugesetzt. Nach dem Autoklavieren wurden die Festmedien bei RT heruntergekühlt und vor dem Gießen mit gewünschten Antibiotikum versetzt (Tab. VI-4). Die Flüssig-Medien und LB-Platten wurden bei 4 °C gelagert, die f/2-Platten bei 16 °C.

Tab. VI-4: Endkonzentrationen der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	50 mg/mL	50 µg/mL
Zeocin (Zeo)	100 mg/mL	75 µg/mL
Nourseothricin (Nat)	100 mg/mL	100 µg/mL

VI.1.5 Chemikalien und Puffer

Verwendete Puffer sind in dem dazugehörigen Methodenteil beschrieben.

Tab. VI-5: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1,4- Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich®
Aceton	Carl Roth®
Agar-Agar	Carl Roth®
Agarose Standard	Carl Roth®
Amidoschwarz 10B	Carl Roth®
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich®
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth®
Bromphenolblau	Merck
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Sigma-Aldrich®
Chloroform	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Carl Roth®
Essigsäure	Carl Roth®
Ethanol HPLC grade (≥ 99,8 %)	Carl Roth®
Ethanol vergällt, (≥ 96 %)	Carl Roth®

Ethyldiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz Dihydrat (Na ₂ EDTA)	Carl Roth®
Glycerin	Carl Roth®
Glycin	Carl Roth®
Hefeextrakt	Carl Roth®
Isopropanol	Carl Roth®
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth®
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth®
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth®
Luminol	Carl Roth®
Magermilch	Carl Roth®
Methanol (amidoschwarz färbung?)	Carl Roth®
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth®
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich®
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth®
Natriumnitrat (NaNO ₃)	Carl Roth®
p-Cumarsäure	Carl Roth®
Pepton aus Casein	Carl Roth®
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth®
Röntgenfilm Fixierer	Kodak
Röntgenfilm Entwickler	Kodak
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30 % (29:1)	Carl Roth®
Roti-Safe® GelStain	Carl Roth®
Rubidiumchlorid (RbCl)	Carl Roth®
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth®
Salzsäure (HCl - <i>hydrophobic acid</i>), 37%	Carl Roth®
Spermidin	Sigma Aldrich®
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth®
Trichloressigsäure (trichloroacetic acid, TCA)	Carl Roth®
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich®
Triton X-100	Carl Roth®
Tropic Marin (Meersalz)	Dr. Biener GmbH
Tween® 20	Sigma-Aldrich®
Urea (Harnstoff)	Carl Roth®
Wasserstoffperoxid, 30 % (H ₂ O ₂)	Carl Roth®

β -Mercaptoethanol	Carl Roth®
ROTI-Safe® GelStain	Carl Roth®

Puffer: Verwendete Puffer sind bei der jeweiligen Methode aufgelistet

VI.1.6 Enzyme, Kits und DNA-/Protein-Leiter für molekularbiologische Arbeiten

Tab. VI-6: Verwendete Enzymen im Rahmen dieser Arbeit

Enzym	Hersteller
<i>DNase</i> I (1 U/ μ L)	Thermo Scientific™
<i>Phire Hot-Start</i> II DNA-Polymerase (Kolonie PCR)	Thermo Scientific™
Q5® <i>High-Fidelity</i> DNA Polymerase	New England BioLabs®
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs®/ThermoFischer
<i>RNase</i> A	Thermo Scientific™
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific™
<i>Taq</i> -Polymerase	Biotoools
Antipain	Biochemica
Aprotinin	AppliChem
Chymostatin	AppliChem
Trypsin-Inhibitor	AppliChem
Papstain A	AppliChem
Leupeptin	AppliChem
Elastatinal	Calbiochem

Tab. VI-7: Verwendete Kits für molekularbiologische Arbeiten

Kit	Hersteller
2x PCR Super Master Mix <i>including loading dye</i>	Biotoools
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Thermo Scientific™
<i>FastGene Scriptase</i> 55 cDNA Kit	Nippon Genetics
<i>FastGene Scriptase</i> II cDNA Kit	Nippon Genetics
Monarch® DNA Gel Extraction Kit	New England BioLabs®

NucleoBOND® Xtra MIDI Kit	Macherey-Nagel
<i>Phire Plant direct</i> PCR Master Mix Kit	Thermo Scientific™
Q5® <i>High-Fidelity</i> PCR Kit	New England BioLabs®
<i>RNase free DNase</i> Set	QIAGEN
RNeasy® <i>Plant mini Kit</i>	QIAGEN
Zymoclean Gel DNA Recovery	Zymo Research

Tab. VI-8: Verwendete DNA- und Protein Leiter

Leiter	Hersteller
1 kb Marker	GeneDireX
100 bp Marker	GeneDireX
Marker aus Plant Phire Kit	QIAGEN
PageRuler™ (<i>Prestained protein Ladder</i>)	Thermo Scientific™

VI.1.7 Antikörper

Tab. VI-9: Verwendete Antikörper

Primärantikörper	Konzentration	Hersteller
α -GFP (α -Ziege)	1:3000	Rockland™
α -Gt_UO.12aaC (α -Kaninchen)	1:3000	Davids Biotechnologie
α -Gt_ACOX	1:3000 – 1:500	Davids Biotechnologie
α -Gt_ACAD	1:3000 – 1:500	Davids Biotechnologie
α -Gt_MVK	1:3000 – 1:500	Davids Biotechnologie
α -AGPS	1:3000 – 1:500	ThermoFischer
α -flag (α -Kaninchen)	1:2000	Agrisera
α -flag, HRP-gekoppelt	1:2000	Miltenyi Biotec
α -Rbcl (α -Kaninchen)	1:7500	Agrisera
α -PsbD (α -Kaninchen)	1:7500	Agrisera
Sekundärantikörper		
α -Ziege, HRP-gekoppelt	1:10000	Sigma-Aldrich (Merck)
α -Kaninchen, HRP-gekoppelt	1:10000	Sigma-Aldrich (Merck)

VI.1.8 Geräte

Tab. VI-10: Verwendete Geräte während dieser Arbeit

Gerät	Hersteller
Autoklav	Systemec
Autoklav 130HPO®	Matachana Group
Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System	BioRad
Certomat R Schüttler	Braum Biotech
ECL Chemostar	Intas Science Imaging
<i>Electrophoresis Power Supply</i> EPS 301/601	Amersham Biosciences
Electrophoresis Power Supply EPS 301/601	Amersham biosciences
Electrophoresis Power Supply EPS200	Pharmacia Biotech
<i>Elektrophoresis Power Supply</i> EPS200	Pharmacia Biotech
Gelkammern für Agarosegelelektrophorese	Uni Marburg
Gelkammern für SDS-PAGE	Uni Marburg
Heiz- und Magnetrührer ROTILABO® MH 15	Carl Roth®
Inkubationsschränke	Heraeus Instruments
JEOL JEM2100 TEM (Transmissions-elektronenmikroskop)	JEOL GmbH
Klimakammer MLR-350 SANYO	Ewald GmbH
Konfokales Lasermikroskop Leica TCS SP2	Leica
Konfokales Lasermikroskop Leica TCS SP5	Leica
<i>Mastercycler gradient</i>	Eppendorf
<i>Mastercycler nexus X2</i>	Eppendorf
<i>Mastercycler personal</i>	Eppendorf
Nanodrop ND-1000 photometer	peqlab
pH-Meter 526	WTW
pH-Tischmessgerät, Orion Star™ A211	Thermo Scientific™
Präzisionswaage Pioneer PX3202/E	OHAUS
Präzisionswaage Precision PR223/E	OHAUS
Rollenmischer TRM50	MAGV
SDS-PAGE Gelkammer	Universität Marburg
Sterilbank, ScanLaf Mars	LaboGene

Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph
TE 77 Semi-Dry Transfer Unit	Amersham biosciences
TE77 Semi-Dry Transfer Unit	Amersham Biosciences
Thermocycler 60	Biomed
Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf
Thermoschüttler TRM-V	MAGV
Transilluminator	Peqlab
Ultramikrotom Leica EM UC7 RT	Leica
Vortexer VF2	IKA®-Labortechnik
Vortex-Genie® 2	Carl Roth®
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf
Zentrifuge 5430 R	Eppendorf
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf

VI.1.9 Verbrauchsmaterialien

Tab. VI-11: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser	Carl Roth®
Hepta <i>Stopping Screens</i>	Bio-Rad
Küvetten	Eppendorf, Hamburg
M10 Wolframkarbidpartikel, Ø 0,7 µm	Bio-Rad
Medical X-Ray Film (Röntgenfilm)	Fujifilm
<i>Microcarrier</i>	Bio-Rad
Nitrilhandschuhe	<i>sempercare</i> ®
Nitrocellulosemembran, Parablot NCP	Macherey-Nagel
Objektträgern, Polylysin-beschichtet	Thermo Scientific™
Objektträger	Thermo Scientific™
Objektträger mit positiven Beschichtung	Thermo Scientific™
Parafilm™	Bemis™
Pasteur Glaspipetten	Carl Roth

Rapture Disc, 1350 psi	Bio-Rad
Reaktionsgefäße (Schraubrohre), 50 mL	Sarstedt
Reaktionsgefäße, 0,25 mL	Sarstedt
Reaktionsgefäße, 1,5 mL	Sarstedt
Reaktionsgefäße, 15 mL	Sarstedt
Reaktionsgefäße, 2 mL	Sarstedt
Rupture Discs 1350 psi	BioRad
Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm	Whatmann
Sterile Einmalspritzen, 50 mL	B. Braun
Sterilfilter FB30/0,2 CA-S	Schleicher&Schuell
Whatmann™ Filterpapier, 3 mm	Schleicher&Schuell

VI.1.10 Software und Internetanwendungen

Tab. VI-12: Internetanwendungen

Name	Internetlink und kurze Beschreibung
<i>Arabidopsis thaliana</i>	https://www.arabidopsis.org/ Genomdatenbank <i>A. thaliana</i>
Benchling	https://www.benchling.com/# Analyse und Darstellung von Nukleinsäuren und Proteinsequenzen
BlastKOALA	https://www.kegg.jp/blastkoala/ Annotierung von Proteinen in KEGG
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	https://mycocosm.jgi.doe.gov/Chlre5_6/Chlre5_6.home.html Genomdatenbank <i>C. reinhardtii</i>
<i>Chlorella vulgaris</i>	https://mycocosm.jgi.doe.gov/Coc_C169_1/Coc_C169_1.home.html Genomdatenbank <i>C. vulgaris</i>
<i>Chondrus crispus</i>	https://mycocosm.jgi.doe.gov/Chocri1/Chocri1.home.html Genomdatenbank <i>C. crispus</i>
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/ Genomdatenbank <i>C. merolae</i>
<i>Cyanophora paradoxa</i>	http://cyanophora.rutgers.edu/cyanophora/ Genomdatenbank <i>C. paradoxa</i>
DeepLoc-1.0	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?DeepLoc-1.0 Subzelluläre Vorhersage eukaryotischer Proteine

	(Almagro Armenteros et al. 2017)
DeepLoc-2.0	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?DeepLoc-2.0 Subzelluläre Vorhersage eukaryotischer Proteine (Thumuluri et al. 2022)
<i>Galdieria sulphuraria</i>	https://phycocosm.jgi.doe.gov/Galsul1/Galsul1.home.html Genomdatenbank <i>G. sulphuraria</i>
<i>Guillardia theta</i>	https://mycocosm.jgi.doe.gov/Guith1/Guith1.home.html https://protists.ensembl.org/Guillardia_theta/Info/Index Genomdatenbank <i>G. theta</i>
KEGG	https://www.kegg.jp/ <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
NCBI BlastN, BlastP	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi <i>National Center for Biotechnology Information, Alignments, Screenings</i>
NEBuilder	https://nebuilder.neb.com/#!/ Ableiten von Oligonukleotiden für Gibson-Assembly
<i>Ostreococcus tauri</i>	https://mycocosm.jgi.doe.gov/Ostta4221_3/Ostta4221_3.home.html Genomdatenbank <i>O. tauri</i>
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	https://mycocosm.jgi.doe.gov/Phatr2/Phatr2.home.html https://protists.ensembl.org/Phaeodactylum_tricornutum/Info/Index Genomdatenbank <i>P. tricornutum</i>
PHYRE2	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index Vorhersage von Struktur und möglichen Funktion von Proteinen
<i>Porphyridium purpureum</i>	http://cyanophora.rutgers.edu/porphyridium/ Genomdatenbank <i>P. purpureum</i>
Predotar	https://urgi.versailles.inra.fr/predotar/ Lokalisationsvorhersagen von Proteinen
PredSL	http://aias.biol.uoa.gr/PredSL/input.html Lokalisationsvorhersagen von Proteinen
PTS1 predictor	https://mendel.imp.ac.at/pts1/PTS1predictor.jsp Vorhersage von putativen PTS1 (Neuberger et al., 2003a und 2003b)
RCSB PDB	https://www.rcsb.org/ Proteindatenbank über bekannte 3D Strukturen von Proteinen
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	https://www.yeastgenome.org/ Genomdatenbank <i>S. cerevisiae</i>

SignalP – 4.1	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1 Vorhersage von Signalpeptiden in Proteinen (Petersen et al. 2011)
TargetP – 1.1	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP-1.1 Lokalisationsvorhersagen von Proteinen (Emanuelsson et al. 2000)
TargetP – 2.0	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP Lokalisationsvorhersagen von Proteinen (Emanuelsson et al. 2000)
THMHH – 2.0	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0 Vorhersage von Transmembrandomänen von Proteinen (Möller et al. 2001; Krogh et al. 2001)
Tm Calculator	https://tmcalculator.neb.com/#!/main Berechnung der Tm Temperatur der Oligonukleotide für PCR
<i>Ulva mutabilis</i>	https://mycocosm.jgi.doe.gov/Ulvmu1/Ulvmu1.home.html Genomdatenbank <i>U. mutabilis</i>

Tab. VI-13: Verwendete Software

Software	Beschreibung
ImageJ (Fiji)	Bildbearbeitung
Microsoft Office 2013/2019®	Word, Excel und PowerPoint
Local Blast	NCBI
LAS AF lite 4.0	Leica
Sequencher Version 5.3	Analyse von Nukleotidsequenzen
Citavi 6.10	Zitations-Software

VI.2 Methoden

Im Folgenden werden zell-, molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden beschrieben.

VI.2.1 *In silico* Analysen

Vor molekularbiologischen Arbeiten und zur Identifizierung von Kandidatenproteinen für *in vivo* Lokalisationsstudien wurden *in silico* Analysen durchgeführt. Diese beinhalteten nicht nur Motivsuche mit Hilfe eines hauseigenen Skripts, sondern auch Untersuchungen mittels Internetanwendungen, welche im Folgenden erläutert werden.

VI.2.1.1 Identifikation von PTS1-Proteinen

In silico Identifikation von PTS1-Proteinen wurde von Dr. Daniel Moog im Vorfeld dieser Arbeit wie folgt durchgeführt:

Mit Hilfe eines hauseigenen Skripts wurden die Kern-codierten Proteine von *G. theta* (Curtis et al. 2012) nach dem PTS1-Konsensus [SAC]-[KRH]-[LM] in den letzten drei C-terminalen Aminosäuren durchsucht. Die identifizierten putativen PTS1-Kandidaten wurden durch Internetanwendungen (Tab. VI-12) genauer analysiert, um weitere Domänen und Zielsteuerungssignalen zu identifizieren. Zunächst wurden die Proteinsequenzen mittels BlastKOALA annotiert, um somit einen ersten Hinweis auf deren mögliche Beteiligung an metabolischen Prozessen zu erhalten. Zur Überprüfung der katalytischen Funktion, wurden die Proteinsequenzen in NCBI mit BlastN untersucht. Des Weiteren wurden die PTS1-Kandidaten auf Transmembrandomänen (TMD) und Zielsteuerungssignalen wie das mTP (*mitochondrial targeting peptide*) und Signalpeptiden (SP) untersucht, um falsch-positive Kandidaten auszuschließen. Dabei waren die Kriterien *eukaryotes*, *non-plant* oder *animals*. Mittels des PTS1 *predictor* wurde die Funktion der letzten 12 Aminosäuren am C-terminus, unter welchen sich das putative PTS1 befindet, mit der *general*-Funktion analysiert. Die 64 putativen PTS1-Kandidatenproteine sind im Anhang in Tab. S 1 (Kapitel VII.3) aufgelistet.

VI.2.1.2 KEGG Analysen von PTS1-Kandidaten und Hilfs-Proteinen

Die KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) Datenbank wurde in unterschiedlichen Ansätzen zur Identifikation von Proteinsequenzen eingesetzt. Zum einen wurde die BlastKOALA Funktion zur Annotierung von mittels des hauseigenen Skriptes identifizierten PTS1-Kandidaten zur Annotierung derer metabolischer Beteiligung eingesetzt. Zum anderen dienten die in KEGG vorhandenen metabolischen Karten zur Identifizierung weiterer Proteine in *G. theta*, die zusammen mit den PTS1-Kandidaten in verschiedenen Zyklen beteiligt sind. Zur näheren Charakterisierung wurden diese analog zu den PTS1-Kandidaten mit Hilfe der Internetanwendungen untersucht (siehe Kapitel VI.2.1.1).

VI.2.1.3 *In silico* Analysen von β -Oxidation, Photorespiration und Glyoxylat-Zyklus

Zur Identifizierung von orthologen Gensequenzen codierend für Proteine, welche nicht nur an dem Fettsäureabbau durch die β -Oxidation, sondern auch an der Photorespiration und dem Glyoxylat-Zyklus beteiligt sein könnten, wurden bekannte Proteinsequenzen aus anderen Modelorganismen eingesetzt.

Dabei wurden für die Faktoren der β -Oxidation bekannte Proteinsequenzen aus *P. tricornutum*, *S. cerevisiae* und *A. thaliana* als Vorlage in der Genomdatenbank von *G. theta* eingesetzt, wobei die *P. tricornutum* Sequenzen (Gonzalez et al. 2011) bevorzugt eingesetzt worden sind. Bekannte *A. thaliana* Proteine, welche an der Photorespiration beteiligt sind (Dellero et al. 2016), wurden als Vorlage in der *G. theta* Datenbank eingesetzt, um die *G. theta* Faktoren der Photorespiration zu untersuchen. Zur Identifikation von Glyoxylat-Zyklus-Proteinen in *G. theta*, wurden bekannte Sequenzen auch *Chromera veila* (Ludewig-Klingner et al. 2017) eingesetzt. Gefilterte Proteinmodelle wurden anschließend analog zu den PTS1-Kandidaten (siehe Kapitel VI.2.1.1) auf weitere Zielsteuerungssignale überprüft, wobei der Fokus auf putativen C-terminalen PTS1 lag. Des Weiteren wurden alle interessanten Kandidaten manuell auf das Vorhandensein eines PTS2-(ähnlichen) Motivs innerhalb der ersten 50 N-terminalen Aminosäuren untersucht.

Für die *in vivo* Lokalisationsstudien (siehe Kapitel III.1.4.2 und III.1.5.3) wurden Proteine, nach CDS-Überprüfung mit EST (*expressed sequence tags*)-Daten, mit PTS1-ähnlichen Signalen ausgesucht (Tab. III-2 (β -Oxidation), Tab. III-3 (Glyoxylat-Zyklus) und Tab. III-4 (Photorespiration)).

VI.2.1.4 Identifikation von Peroxinen in Chlorophyten, Rhodophyten und Glaucophyten

Bekannte Peroxin-Sequenzen aus *S. cerevisiae*, *A. thaliana* und *P. tricornutum* wurden zum Abgleich der Datenbanken der Chlorophyta (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Ostreococcus tauri*, *Ulva mutabilis*), Rhodophyta (*Chondrus crispus*, *Cyanidioschyzon merolae*, *Galdieria sulpharia*, *Porphyridium purpureum*) und Glaucophyta (*Cyanophora paradoxa*) genutzt. Die identifizierten potentiellen Kandidaten wurden in NCBI mit BlastP auf die potentielle Funktion untersucht, um falsch positive Proteinsequenzen auszuschließen (Tab. III-6).

VI.2.1.5 CDS-Überprüfung mit Sequencher (EST und MMETSP Daten)

Die codierende Sequenz (CDS) der für die *in vivo* ausgesuchten Proteine wurde vor molekularbiologischen Arbeiten mit EST (*expressed sequence tags*) und MMETSP (*marine microbial eukaryote transcriptome sequencing project*) Daten überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Die entsprechenden EST-Daten sind auf der *G. theta* Genomdatenbank zu finden (Tab. VI-12). MMETSP Daten wurden auf der entsprechenden Seite heruntergeladen und lokal über die Windows-Kommandozeile über eine NCBI Blast Funktion ausfindig gemacht.

Mit Hilfe von Sequencher v.5.3 (Tab. VI-13) wurde die CDS unter Berücksichtigung der EST und die MMETSP Daten, der Gensequenz aus JGI (Tab. VI-12) und der Gensequenz flankiert von zusätzlichen *up-* und *downstream* 2000 bp analysiert. Anschließend wurden die Introns manuell überprüft und entfernt bis ein offener Leserahmen entstand. Die überprüfte CDS wurde erneut auf das Vorhandensein von einem PTS1 untersucht, falls die CDS-Überprüfung zu einer von der JGI abweichenden CDS führte.

VI.2.2 Kultivierung und Stammhaltung von Mikroorganismen

VI.2.2.1 Kultivierung und Stammhaltung von *E. coli* TOP10

Transformierte *E. coli* Klone wurden auf LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht (üN) bei 37 °C kultiviert. Für Kryokonservierung wurden die Flüssigkulturen 1:1 mit

Glycerin in einem Endvolumen von 1 mL durch vortexen gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für Plasmid-Präparationen wurden *E. coli* Klone entweder in 4 mL (Testrestriktionen, siehe Kapitel VI.2.4.5.1) oder in 50 mL (Transfektion von *P. tricornutum*, siehe Kapitel VI.2.5) üN bei 37 °C schüttelnd mit entsprechendem Antibiotikum kultiviert.

Tab. VI-14: Komponenten vom LB-Medium zur Kultivierung von *E. coli*

Medium	Komponente	Konzentration
LB-Medium	Trypton	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	10 g/L

Bei Bedarf: Zugabe von Ampicillin zu einer Endkonzentration von 50 µg/mL.

VI.2.2.2 Kultivierung und Stammhaltung von *G. theta*

Die Cryptomonade *Guillardia theta* (CCAM2327/CCMP2712) wurde stationär in 200 mL f/2-Medium (3 % w/v Tropic Marin (Dr. Biener GmbH), 5 mM Tris/HCl (pH 8,0) und 500 mM NH₄Cl) bei 21 °C kultiviert und einem Tag/Nacht Zyklus kultiviert. Zur Stammhaltung wurden *G. theta* Zellen in regelmäßigen Abständen in frisches Medium überführt (von E. Utesch).

VI.2.2.3 Kultivierung und Stammhaltung von *P. tricornutum*

Die Diatomee *P. tricornutum* wurde im f/2-Medium (Guillard und Ryther 1962; Guillard 1975) entweder in einer Klimakammer oder in dem Klimaschrank MLR-350 SANYO bei 22 °C bei Dauerlicht (8000 – 11000 Lux) kultiviert. Flüssigkulturen wurden beim Kultivieren geschüttelt (150 rpm). Den f/2-Platten wurde 1,5 % (w/v) Agar hinzugefügt. Sollte nach einer Transformation die Proteinexpression unter dem Nitrat-Promotor aktiviert werden, wurde nach einmaligem waschen mit 1x PBS (Komponenten in Tab. VI-32) dem Medium Nitrat an Stelle von Ammonium als Stickstoffquelle zugesetzt. Selektion von transfizierten Klonen erfolgte unter Zugabe vom entsprechenden Antibiotikum: 100 µg/mL Nourseothricin (Nat) oder 75 µg/mL Zeocin (Zeo).

f/2 Medium wurde ohne Vitamine und Spurenelemente autoklaviert und bei 4 °C gelagert. Vor der Kultivierung von Zellen wurde das f/2-Medium auf Raumtemperatur vorgewärmt und steril wurden 1:1000 von den Stammlösungen der f/2-Spurenelementen und f/2-Vitaminen zugesetzt (Tab. VI-15).

Tab. VI-15: Komponenten des f/2-Mediums zur Kultivierung von *P. tricornutum*

Medium/Zusätze	Komponenten	Konzentration
f/2-Medium	Tropic Marin, Meersalz	1,6 % (w/v)
	Tris-HCl (pH 8)	2 mM
	NaH ₂ PO ₄	36 µM
	NH ₄ Cl (nicht induzierend)	1,5 mM
	NaNO ₃ (induzierend)	0,89 mM
f/2-Spurenelemente	FeCl ₃	11,65 mM
	Na ₂ EDTA	11,71 mM
	CuSO ₄	39 µM
	ZnSO ₄	77 µM
	CoCl ₂	42 µM
	MnCl ₂	910 µM
	Na ₂ MoO ₄	26 µM
f/2-Vitamine	Biotin	2 µM
	Cyanocobalmin	0,37 µM
	Thiamin-HCl	297 µM

Zur Stammhaltung auf Platte wurden wie Zellen alle 6 – 8 Wochen auf frische Platten ausgestrichen.

VI.2.2.3.1 Kryokonservierung von *P. tricornutum* Zellen

Positive *P. tricornutum* Klone wurden vor der Kryokonservierung in 50 mL f/2-Medium kultiviert für eine Woche schüttelnd und bei Dauerlicht kultiviert (siehe Kapitel VI.2.2.3). Die Zellen wurden bei 1500 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 2 mL f/2 mit 5 % (v/v) Glycerin gemischt und in einer CoolBox® bei -80 °C üN eingefroren. Die Lagerung der kryokonservierten *P. tricornutum* Zellen erfolgte bei -80 °C.

VI.2.3 Herstellung von chemisch - kompetenten *E. coli* TOP10 Zellen mit RbCl

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* TOP10 Zellen wurde zunächst eine 3 mL Vorkultur in LB-Medium (Tab. VI-14) mit Streptomycin (10µg/mL) üN bei 37°C schüttelnd kultiviert. Mit der Vorkultur wurde in 100 mL LB-Medium (Tab. VI-14) eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und mit sterilem MgSO₄ und MgCl₂ versetzt. Die Zellen wurden erneut bei 37°C schüttelnd inkubiert, bis die OD₆₀₀ einen Wert von 0,6 erreicht. Daraufhin wurden die *E. coli* Kulturen auf Eis für ca. 30 min gekühlt und anschließend bei 3000 x g und 4°C für 10 min geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 33 mL TFB I-Puffer resuspendiert und erneut für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen wie in dem vorherigen Schritt beschrieben geerntet und das Zellpellet in 5 mL TFB II-Puffer resuspendiert. Nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis wurden die chemisch-Kompetenten *E. coli* TOP10 Zellen zu je 100 µL auf 1,5 mL Reaktionsgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Tab. VI-16: Puffer für die Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* TOP10 Zellen

Puffer	Komponente	Konzentration
TBF I-Puffer	CaCl ₂	10 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
	KOAc	30 mM
	MnCl ₂	30mM
	RbCl ₂	100 mM
	pH mit 0,2M Acetat auf 5,8 einstellen und steril filtrieren	
TBF II-Puffer	CaCl ₂	75 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
	MOPS	10 mM
	RbCl ₂	10 mM
	pH wird mit 1 M NaOH auf 5,8 eingestellt und steril filtriert	

VI.2.4 Nukleinsäure-Analytik

VI.2.4.1 Extraktion von Gesamt-DNA aus *G. theta* mit der CTAB-Methode

Zur Extraktion von Gesamt-DNA (gDNA) aus *G. theta* wurde eine 2-Wochen alte Kultur verwendet. *G. theta* Zellen wurden bei 3200 x g bei RT für 10 min geerntet. Das Zellpellet wurde in 800 µL CTAB-Puffer unter Abzug resuspendiert, für 30 min bei 70 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei *full speed* zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß übertragen, mit 2/3 Volumeneinheit (VE) mit 100 % Isopropanol versetzt und durch auf- und abpipettieren gut gemischt. Anschließend wurde der Lösung 1/10 VE von NaAc (3M, pH 4,8) hinzugegeben und für 10 min bei 4°C und *full speed* zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde unter Abzug entfernt und das DNA-Pellet mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen. Es folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 4 °C und *full speed*. Zum Schluss wurde das Ethanol verworfen, das Pellet getrocknet und in 20 µL sterilem ddH₂O gelöst. Für weitere Arbeiten wurde die Konzentration photometrisch mittels Nanodrop ND-100 Spektrophotometer (OD₂₆₀) bestimmt und bei -20 °C gelagert.

Tab. VI-17:Komponenten von dem CTAB-Puffer zur Extraktion von gDNA aus *G. theta*

Puffer	Komponente	Konzentration
CTAB-Puffer	CTAB	2 % (w/v)
	Na ₂ EDTA, pH 8,6	0,02 M
	NaCl	1,4 M
	Tris-HCl, pH 8	0,1 M

VI.2.4.2 Extraktion von Gesamt-RNA aus *G. theta* mit RNeasy® Mini Kit von QIAGEN

Extraktion der gesamten RNA aus *G. theta* erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit (QIAGEN). Hierfür wurden *G. theta* Zellen in 200 mL f/2-Medium schüttelnd für 1 - 2 Wochen unter Dauerlicht kultiviert und bei 3200 x g für 10 min geerntet. Die pelletierten Zellen wurden in 350 µL RLT Puffer resuspendiert und für 30 sek gevortext. Weitere Isolationschritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierte RNA wurde in 30 µL RNase freiem Wasser aufgenommen. Isolierte RNA wurde anschließend nach Herstellerangaben mit DNaseI (Thermo Scientific™) inkubiert, um mögliche Rest-DNA zu restringieren und somit die Reinheit der RNA zu maximieren (siehe Kapitel VI.2.4.3). Schließlich wurde die RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt (siehe Kapitel VI.2.4.4).

VI.2.4.3 Behandlung mit *DNaseI* der gRNA-Proben

Um die Reinheit der isolierten gRNA zu maximieren, wurde die Rest-DNA mit *DNaseI* (Thermo Scientific™) abgebaut (Tab. VI-18). Dabei kann 1 µL der *DNaseI* pro 1000 ng gRNA eingesetzt werden.

Tab. VI-18: *DNaseI* Behandlung der gRNA

Komponente	Volumen
gRNA (1000 ng)	x µL
10x MgCl ₂ <i>DNaseI</i> Puffer	1 µL
<i>DNaseI</i> (1U/µL)	1 µL
ddH ₂ O, <i>RNase</i> frei	Ad 10 µL

Die Behandlung mit *DNaseI* wurde die Reaktion für 30-60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 1 µL 50 mM EDTA für 10 min bei 65 °C deaktiviert. Nach dem DNA-Abbau in der isolierten gRNA wurde diese bei -20 °C gelagert und für die cDNA-Synthese eingesetzt (siehe Kapitel VI.2.4.4).

VI.2.4.4 cDNA-Synthese mit *random hexamer* Oligonukleotiden

Zur Gewinnung von komplementären DNA (cDNA) wurde mit *DNaseI* behandelte RNA verwendet. Es wurden die FastGene 55-Scriptase (Nippon) oder die FastGene Scriptase II (Nippon) für die cDNA – Synthese nach Herstellerangaben eingesetzt. Die mit *random hexamer* Oligonukleotiden synthetisierte cDNA wurde zur Amplifizierung von spezifischen Gensequenzen in einer Standard-PCR (siehe Kapitel 0) eingesetzt. cDNA wurde nach dem Amplifizieren bei -20 °C gelagert.

cDNA-Synthese mit FastGene 55-Scriptase (Nippon)

FastGene55-Scriptase (Nippon) ist thermostabil (42-60 °C) und kann bis zu 20 kbp amplifizieren. Für die cDNA-Synthese wird die gesamte gRNA nach dem DNA-Abbau eingesetzt (siehe Kapitel VI.2.4.3).

Tab. VI-19: cDNA-Synthese mit FastGene55-Scriptase (Nippon)

Komponente	Volumen
gRNA (<i>DNaseI</i> -behandelt)	10 µL
<i>random hexamer</i> Oligonukleotide (µM)	1 µL
5 min bei 65 °C	
10 min bei 25 °C	
10x FastGene55-Scriptase Puffer	2 µL
dNTPs (2 mM)	2 µL
FastGene55-Scriptase (200 U/µL)	1 µL
<i>RNase</i> -Inhibitor	0,5 µL
ddH ₂ O, <i>RNase</i> frei	Ad 20 µL
1h bei 55 °C	
5min bei 95 °C	

cDNA-Synthese mit FastGene Scriptase II (Nippon)

FastGene Scriptase II (Nippon) ist thermostabil (42-50°C) und kann bis zu 1,2 kbp cDNA amplifizieren.

Tab. VI-20: cDNA-Synthese mit FastGene Scriptase II (Nippon)

Komponente	Volumen
gRNA (<i>DNaseI</i> -behandelt)	9,5 µL
<i>random hexamer</i> Oligonukleotide (100 µM)	1 µL
dNTPs (2 mM)	2 µL
5 min bei 65 °C	
Danach direkt auf Eis	
5x FastGene Scriptase II Puffer	4 µL
DTT (0,1 M)	2 µL
<i>RNase</i> -Inhibitor	0,5 µL
2 min bei 42 °C	
2 min 30 sec bei 25 °C	
FastGene Scriptase II	1 µL
2 min 30 sec bei 25 °C	
50 min bei 42 °C	
15 min bei 70 °C	

VI.2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) wurde zur Amplifikation von allen Gensequenzen mit genspezifischen Oligonukleotiden unter der Verwendung der Q5[®] High Fidelity Polymerase (New England BioLabs[®]) eingesetzt. Genspezifische Oligonukleotiden wurden mit spezifischen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen konstruiert (Tab. VI-3), wobei die Q5[®]-Polymerase *blunt ends* (glatte Enden) synthetisiert, was eine Ligation in den Eingangsvektor pJet[®] (Thermo Scientific[™]) ermöglicht (siehe Kapitel VI.2.4.7). Die Hybridisierungstemperaturen für die Oligonukleotide wurde vor der PCR mit dem *T_m calculator* (New England BioLabs[®]) bestimmt. Bei *T_m* größer 72 °C wurde standardmäßig bei 50 °C hybridisiert. Die Elongationszeiten wurden an die Länge des zu amplifizierendes Genfragments angepasst (20-30 sek/1 kb).

Tab. VI-21: Standard-PCR Reaktionsansatz zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mit der Q5[®]-Polymerase

Komponente	Volumen	Konzentration
2x Q5 Mastermix	12,5 µL	1x
Oligonukleotid fw (5 µM)	2,5 µL	1,25 µM
Oligonukleotid rv (5 µM)	2.5 µL	1,25 µM
Templat (cDNA/gDNA/Plasmid-DNA)	2 µL (cDNA) oder 1 ng - 1 µg (gDNA) oder 1 pg - 10 ng (Plasmid-DNA)	/
ddH ₂ O	ad. 25 µL	

Tab. VI-22: Standard-PCR Programm für spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten mit der Q5®-Polymerase

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	30 sek	1
Denaturierung	98 °C	10 sek	29 - 34
Hybridisierung	50 – 72 °C	15 sek	
Elongation	72 °C	20-30 sek/1kb	
Finale Elongation	72 °C	2 min	1
Kühlen	4 °C	∞	1

VI.2.4.5.1 Kolonie-PCR mittels *Phire Plant Direct PCR Master Mix Kit*

Die transfizierten *P. tricornutum* Klone wurden gegebenenfalls vor der *in vivo* Lokalisation auf die Integration der transferierten Fremd-DNA in das Genom mittels einer Kolonie PCR untersucht. Dabei wurde das *Phire Plant Direct Master Mix Kit* (Thermo Scientific™) nach Herstellerangaben eingesetzt. Es wurde eine Wasserkontrolle, als auch gDNA von einer nicht-transferierten *P. tricornutum* Zelllinie eingesetzt (WT oder mR3-SKL). Als Positivkontrolle diente das entsprechend transferierte Plasmid.

VI.2.4.6 Agarosegelelektrophorese

Nukleinsäuren wurden mit dem DNA-Ladepuffer gemischt und in einem 0,8 %, 1 % oder 2 % (w/v) Agarosegel mit einer Spannung von 150 - 180 V elektrophoretisch aufgetrennt. Vorher wurde dem Agarosegel Roti® GelStain (Carl Roth®) nach Herstellerangaben zugesetzt.

Tab. VI-23: Komponenten der benötigten Puffer für die Agarosegelelektrophorese

Puffer	Komponente	Konzentration
1x TBE Puffer	Borsäure	100 mM
	Tris	83 mM
	Na ₂ EDTA	1 mM
6x DNA-Ladepuffer	Harnstoff	4 M
	Saccharose	50 % (w/v)
	Na ₂ EDTA	50 mM
	Bromphenolblau/Xylencyanol	0,1 % (w/v)
	Xylencyanol	0,1 % (w/v)
Nukleinsäure-Farbstoff	ROTI-Safe® GelStain	3% (v/v)

VI.2.4.6.1 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten nach einer PCR (siehe Kapitel 0) oder Restriktion (siehe Kapitel VI.2.4.7) wurde entweder das Monarch Kit (New England BioLabs®) oder ZymoClean (Zymo Research) benutzt. Die Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben.

VI.2.4.7 Standard-Klonierung von Gensequenzen in Vektoren

Klonierung in pJet1.2/blunt Vektor

Für die Klonierung in den Eingangsvektor pJet1.2/blunt wurde zunächst die gewünschte Gensequenz mittels der PCR amplifiziert (siehe Kapitel 0), wobei durch die Q5-Polymearse *blunt ends* generiert wurden. Dadurch konnte nach der Extraktion der amplifizierten Gensequenz aus einem Agarosegel (siehe Kapitel VI.2.4.6.1) diese direkt durch den Einsatz der T4-Ligase in pJet1.2/blunt ligiert werden (Tab. VI-24). Die Ligation wurde 20-60 min bei RT inkubiert.

Tab. VI-24: Ligation von Gensequenzen in pJet1.2/blunt

Komponente	Volumen
Eluat der Gensequenz	x μL
10x T4-Ligase Puffer	1 μL
pJet1.2/blunt	0,5 μL
T4-Ligase (5U/ μL)	0,5 μL
ddH ₂ O, steril	Ad 10 μL

Klonierung in pPhaNR Vektoren

Zu klonierenden PCR-Amplifikate und entsprechende Vektoren wurden mit spezifischen Restriktionsenzymen von New England BioLabs® oder ThermoFischer bei entsprechender Temperatur (meist 37 °C) für 1 h restringiert (Tab. VI-25). Anschließend wurde die Restriktionsreaktion im Agarosegel überprüft (siehe Kapitel VI.2.4.6), die Fragmente aus dem Gel zusammen eluiert (siehe Kapitel VI.2.4.6.1) und mit T4-Ligase (Thermo Scientific™) im T4-Ligationspuffer (Thermo Scientific™) für 1 h bei RT oder bei 16 °C üN inkubiert (Tab. VI-26). Ligationen wurden anschließend mittels Hitzeschock-Transformation (siehe Kapitel VI.2.4.9) in *E. coli* TOP10 transformiert.

Tab. VI-25: Komponenten für eine Plasmid-Restriktion

Komponente	Volumen
Plasmid-DNA	x μL
1 Restriktionsenzym	0,25 μL
2 Restriktionsenzym	0,25 μL
10x SDB-Puffer	1 μL
ddH ₂ O, steril	10 μL

Tab. VI-26: Ligation von Gensequenzen in pPhaNR

Komponente	Volumen
Eluat der Gensequenz(en) und pPhaNR- <i>backbone</i>	x μL
10x T4-Ligase Puffer	2 μL
T4-Ligase (5U/ μL)	1 μL
ddH ₂ O, steril	Ad 20 μL

Puffer	Komponente	Konzentration
10x-SDB Puffer (Sperm Dilution Buffer)	DTT	50 mM
	KOAc	500 mM
	MgOAc	100 mM
	Spermidin	49 mM
	Tris-Acetat, pH 7,0	300 mM
10x T4-Ligase Puffer (Thermo Scientific™)	Tris-HCl	400 mM
	MgCl ₂	100 mM
	ATP	5 mM
	DTT	100 mM
	Polyethylenglycol	25% (w/v)

VI.2.4.8 Klonierung mittels *Gibson Assembly*

Alternativ wurde statt der klassischen Klonierung das Gibson-Assembly für Die Klonierung in den pPhaNR Vektor eingesetzt. Das Gibson Assembly basiert auf einer einzigen isothermalen Reaktion. Dafür brauchen die zu klonierenden Gensequenzen komplementäre Überhänge, welche mit Hilfe des online NEBuilder® abgeleitet wurden. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden Insert(s) und die Plasmid-DNA im Verhältnis von 3:1 in der Gibson-Reaktion bei 50 °C für 1 h inkubiert und anschließend in *E. coli* TOP10 Zellen mittels Hitzeschock transformiert (siehe Kapitel VI.2.4.9).

Tab. VI-27: Gibson Reaktionsansatz

2-3 Fragment Assembly	
Gesamtmenge der Fragmente	0,02-0,5 pmol*
Gibson Reaktionsmix	15 µL
ddH ₂ O, steril	Ad 20 µL

Tab. VI-28: Gibson Reaktionsmix

Komponente	Volumen
5x Isothermaler MM	320 µL
T5 Exonuklease (10 U/µL)	0,64 µL
Phusion Polymerase (2 U/µL)	20 µL
Taq DNA-Ligase (40 U/µL)	0,16 µL
ddH ₂ O	860 µL

Tab. VI-29: 5x Isothermaler Mastermix (MM)

Komponente	Volumen
Tris-HCl (1 M, pH 8)	3 mL
MgCl (1M)	300 µL
dGTP (100 mM)	60 µL
dATP (100 mM)	60 µL
dCTP (100 mM)	60 µL
dTTP (100 mM)	60 µL
DTT	300 µL
PEG-800	1,5 g
NAD (10 mM)	300 µL

VI.2.4.9 Hitzeschock-Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* TOP10

Plasmid-DNA wurde in *E. coli* TOP10 chemisch kompetenten Zellen mittels Hitzeschock transformiert. Hierfür wurden zunächst die *E. coli* Zellen zusammen mit der Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 1 min mit anschließend sofortiger Platzierung der Zellen auf Eis. Die Selektion positiv transformierter Zellen erfolgte über Nacht auf LB-Agar Platten mit 50 µg/mL Amp bei 37 °C.

VI.2.4.10 Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli*

VI.2.4.10.1 Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli* TOP10 für Testrestriktionen und Sequenzierungen

Zur Identifizierung und Überprüfung von positiv transformierten *E. coli* Klonen wurde die modifizierte Lyse (Becker *et al.*, 1993) basierend auf der alkalischen Lyse durchgeführt. Die zu untersuchenden transformierten *E. coli* TOP10 Klone wurden in 4 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37 °C über Nacht kultiviert. Davon wurden jeweils 1,5 mL bei 14000 x g für 1 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die pelletierten *E. coli* Zellen wurden in 200 µl P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl P2-Puffers und mehrmaligen Invertieren wurden die *E. coli* Zellen für 3-5 min bei Raumtemperatur lysiert. Mit der Zugabe von 200 µl P3-Puffers wurden die Lyse-Reaktionen neutralisiert. Zur Phasentrennung wurden 20 µl Chloroform zugegeben und durch starkes Schütteln gemischt. Anschließend wurde 10 min bei 20000 x g und 4 °C zentrifugiert. Zum Präzipitieren der Plasmid-DNA wurde der Überstand auf 400 µl Isopropanol überführt, durch invertieren gemischt und 30 min bei 20000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die pelletierte Plasmid-DNA wurde in 400 µl 70% (v/v) Ethanol aufgenommen und für 10 min bei 20000 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Ethanol-haltige Überstand verworfen und die gefällte Plasmid-DNA mit offenem Deckel bei RT oder 50 °C getrocknet bis der Restethanol verdampft ist. Schließlich wurde die Plasmid-DNA in 40 µl sterilem ddH₂O gelöst und für Restriktionsanalysen und Klonierung eingesetzt.

Tab. VI-30: Komponenten hauseigener Puffer zur schnellen Plasmid-Extraktion aus *E. coli*

Puffer	Komponente	Konzentration
P1 Puffer (pH 8)	Tris/HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	<i>RNaseA</i>	100 µg/mL
P2 Puffer	NaOH	200 mM
	SDS	1% (w/v)
P3 Puffer (pH 5,1)	KAc	2,8 M

VI.2.4.10.2 Extraktion von reiner Plasmid-DNA aus *E. coli* TOP10 mittels NucleoBOND® Xtra MIDI Kit (Macherey-Nagel) für die Transfektion von *P. tricornutum*

Das NucleoBOND® Xtra MIDI Kit (Macherey-Nagel) wurde zur Extraktion von reiner Plasmid-DNA verwendet. Hierfür wurden die *E. coli* TOP10 Zellen mit dem gewünschten Plasmid in 50 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum schüttelnd bei 37 °C über Nacht kultiviert. Die gesamte Kultur wurde bei 6000 x g und 4 °C für 10 min mit einem Festrotor geerntet. Die Extraktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei die zur Isolation benutzten Puffer an das Kulturvolumen angepasst wurden. Die Plasmid-DNA wurde je nach Größe des Pellets in 50 – 100 µl sterilem ddH₂O gelöst und für die biolistische Transformation (siehe Kapitel VI.2.5) von *P. tricornutum* verwendet.

VI.2.4.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Nanodrop

Konzentrationen von Nukleinsäuren wurden mittels Nanodrop PD-100 (PeqLab) photometrisch bestimmt. Als Nullwert diente das Lösungsmittel der Nukleinsäuren (ddH₂O oder Elutionspuffer der entsprechenden Kits). Bei einer Wellenlänge von 230, 260 und 280 nm wurden die Absorptionswerte gemessen. Anhand der Werte bei 230 und 280 nm wird die Verunreinigung der Proben mit phenolischen Komponenten (230 nm) oder Proteinen (280 nm) bestimmt. Die Absorptionsquotienten 260/230 und 260/280 liegen bei relativ reinen Nukleinsäure-Proben bei etwa 2. Quotienten kleiner/größer 2 deuten auf Verunreinigung hin.

VI.2.4.12 Test-Restriktion von Plasmid-DNA

Zur Überprüfung der Plasmide nach der Transformation in *E. coli* TOP10, wurden diese zunächst isoliert (siehe Kapitel VI.2.4.10.1). Danach erfolgte eine Testrestriktion mit den zum Klonieren eingesetzten Enzymen oder mit weiteren geeigneten Restriktionsendonukleasen. Diese wurde in der Regel für 1 h bei 37 °C (Tab. VI-25) inkubiert und anschließend elektrophoretisch in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kapitel VI.2.4.5.1).

VI.2.4.13 Sequenzierung

Zur Überprüfung von klonierten Gensequenzen wurden diese von der Firma Macrogen sequenziert. Die Sequenzierreaktion wurde nach Angaben des Herstellers in 10 µL vorbereitet. Dabei betrug die effektive Menge an Plasmid-DNA 500 ng mit 5 µL Sequenzier-Oligonukleotid (5 mM).

VI.2.5 Biolistische Transfektion von *P. tricornutum* mittels *particle bombardment*

Für die Transfektion der Diatomee *P. tricornutum* wurde die Genkanone von BioRad benutzt. Hierfür wurde der zu transformierende *P. tricornutum* Stamm für 7-12 Tage wie beschrieben schüttelnd kultiviert (siehe Kapitel VI.2.2.3). Mit einer Thoma-Zellkammer (Tiefe 0,1 mm, Kleinstquadrat 0,0025 cm²) wurde die Zellzahl bestimmt und 10⁸Zellen/100 µL pro Transfektionsansatz benutzt. Die Zellen wurden auf f/2-Platten ohne Antibiotikum mittig ausplattiert und getrocknet. In der Zwischenzeit wurden die M10-Wolfram Partikel mit einem Durchmesser von 0,7 µm für die Transfektion vorbereitet. Die Plasmid-DNA aus der MIDI-Präparation (siehe Kapitel VI.2.4.10.2) wurde dabei in Anwesenheit von CaCl₂ (2,5 M) und Spermidin an die Partikel gebunden (Tab. VI-31). Die beschichteten Partikel wurden steril auf die Microcarrier (Trägermembran) pipettiert und nach Zusammenbauen der Genkanone nach Herstellerangaben auf die ausplattierten Zellen im Vakuum bei einem Druck von 1350 psi geschossen. Danach wurden die beschossenen Zellen für 24 h bei Dauerlicht inkubiert und wurden anschließend für die Selektion von potentiell-positiven *P. tricornutum* Kolonien auf f/2-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Nach 4-6 Wochen wurden die gewachsenen Kolonien auf frische f/2-Platten übertragen und analysiert.

Tab. VI-31: Vorbereitung der Wolfram-Partikel für die biolistische Transfektion von *P. tricornutum*

Bestandteil	Konzentration/Volumen
M10-Wolfram Partikel (0,7 µm)	50 µL (ca. 60 mg)
Plasmid-DNA	5 µg
CaCl ₂ (2,5 M)	50 µL
Spermidin (0,1 M)	20 µL

VI.2.6 Proteinanalytik

VI.2.6.1 Expression von transformierten Gensequenzen in *P. tricornutum*

Zur Expression rekombinanter Gene wurde der verwendete Nitrat-Promoter mit Zugabe von Nitrat (0,9 mM) induziert. In der Regel wurden die Expression der transformierten *P. tricornutum* Kolonien für 24 h schüttelnd in 50 mL f/2-Medium unter Dauerlicht induziert (siehe Kapitel VI.2.2.3). Für einige Konstrukte wurde die Proteinexpression auf Nitrat-haltigen f/2 Agarplatten für 3 Tage unter Dauerlicht induziert.

VI.2.6.2 Lyse von *P. tricornutum* Zellen

Für den Proteinrohextrakt aus *P. tricornutum* wurden 50 mL Kultur für 5 min bei 1500 x g und 21 °C zentrifugiert und anschließend in 10 mL 1x PBS-Puffer (Tab. VI-32) gewaschen. Das Zellpellet wurde in 200 µl Lysepuffer (Tab. VI-32) resuspendiert und auf Eis für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit sterilem ddH₂O auf 1 mL aufgefüllt und im Anschluss eine Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt (siehe VI.2.6.4).

Tab. VI-32: Verwendete Puffer und Zusätze zu Proteinextraktion aus Protisten

Puffer	Komponente	Konzentration
1x PBS-Puffer (<i>phosphate buffer saline</i>)	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	2 mM
Lysepuffer (Proteinextraktion aus <i>P. tricornutum</i>)	NaOH	1,85 M
	PIC	0,5 % (v/v)
	β-Mercaptoethanol	7,5 % (v/v)
	! PIC und β-Mercaptoethanol kurz vor der Benutzung hinzugefügt	
Extraktionspuffer (Proteinextraktion aus <i>G. theta</i>)	Tris-HCl (pH 8)	125 mM
	SDS	3 % (w/v)
	Triton X-100	0,2 % (v/v)
	PIC	0,5 % (v/v)
	! PIC kurz vor der Benutzung hinzugefügt	
PIC (<i>protease inhibitor cocktail</i>)	Antipain	200 µg/mL
	Chymostatin	200 µg/mL
	Aprotinin	200 µg/mL
	Trypsin-Inhibitor	200 µg/mL
	Pepstatin A	200 µg/mL
	Leupeptin	200 µg/mL
	Elastatinal	200 µg/mL
	Na ₂ -EDTA	200 µg/mL

VI.2.6.3 Lyse von *G. theta* Zellen

Für den Proteinrohextrakt aus *G. theta* wurden 50 mL Kultur für 5 min bei 1500 x g und 21 °C zentrifugiert und anschließend in 10 mL 1x PBS-Puffer (Tab. VI-32) gewaschen. Das Pellet wurde in 500 µl Extraktionspuffer (Tab. VI-32) resuspendiert und für 10 min bei 96 °C schüttelnd inkubiert. Für die folgende TCA-Fällung von Proteinen (siehe Kapitel VI.2.6.4) wurden die Proben zunächst auf Eis für einige Minuten vorgekühlt und mit sterilem ddH₂O auf 1 mL aufgefüllt.

VI.2.6.4 TCA-Fällung von Proteinen

Zu den lysierten *P. tricornutum* (siehe Kapitel VI.2.6.2) oder *G. theta* (siehe Kapitel VI.2.6.3) Zellen wurde 70 % Trichloressigsäure (TCA) hinzugegeben, so dass eine Endkonzentration von 10% (v/v) in der Probe erreicht wurde. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proteinproben für 15 min bei 4 °C und 20000 x g zentrifugiert. Der TCA-Überstand wurde verworfen und das Pellet im eiskalten 80% Aceton mehrmals gewaschen, wobei das Pellet bei jedem Waschschrift mit einem Eppi-Potter in dem frischen Aceton resuspendiert wurde. Der Waschschrift wurde so lange wiederholt, bis der Überstand klar wurde. Anschließend wurde das Pellet unter Vakuum getrocknet, in 100 – 200 µl Harnstoffpuffer aufgenommen und für 20 min bei 60 °C schüttelnd gelöst. Zum Schluss wurde die Proteinprobe 1 min bei 20000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert oder direkt in einem SDS-Gel aufgetrennt (siehe Kapitel VI.2.6.6).

Tab. VI-33: Zusammensetzung von dem Harnstoffpuffer

Puffer	Komponente	Konzentration
Harnstoffpuffer	Harnstoff	8 M
	Tris-HCl (pH 6,8)	200 mM
	EDTA	0,1 mM
	SDS	5 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,03 % (w/v)
	β-Mercaptoethanol	1 % (v/v)
	! Das β-Mercaptoethanol wurde kurz vor der Benutzung hinzugefügt.	

VI.2.6.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Amidoschwarz 10B

Konzentrationsbestimmung der gefällten Proteine wurde mittels Amidoschwarz 10B bestimmt (Schaffner und Weissmann 1973). Dabei lagert sich Amidoschwarz 10B an die Proteine an und die Konzentration kann photometrisch bei 615 nm bestimmt werden. Für die Konzentrationsbestimmung wurden 5µL der Proteine in Harnstoffpuffer mit 495 µL ddH₂O gemischt und 1:1 mit der Amischwarz-Färbelösung durch vortexen gemischt. Anschließend wurden die gefärbten Proteinproben 10 min bei 14000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Proteine 1x mit der Amidoschwarz-Färbelösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proteine für ca. 10 min getrocknet und anschließend in 1 mL 200 mM NaOH resuspendiert. Die OD₆₁₅ wurde

für jeden Proteinprobe bestimmt und anhand der Eichgerade ($y = 0,0268x + 0,0298$) die Konzentration pro μL bestimmt. Als Nullwert diente 1 mL 200 mM NaOH.

Tab. VI-34: Verwendete Puffer zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels Amidoschwarz 10B Färbung

Puffer	Komponente	Konzentration
Amidoschwarz-Färbelösung	Methanol	90 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	Amidoschwarz 10B	0,01 % (w/v)
Amidoschwarz-Waschlösung	Methanol	90 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)

VI.2.6.6 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Die denaturierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) der Größe nach aufgetrennt. Dabei wurde ein diskontinuierliches Polyacrylgel gegossen, bestehend aus (meist) 12,5 % Trenngel und obigem Sammelgel (Tab. VI-35). Es wurden insgesamt mindestens 5 μg an Gesamt-Proteinen für die Auftrennung eingesetzt. Die Proteine wurden bei 200 V und 25 mA (Sammelgel) bzw. 35 mA (Trenngel) in einer geschlossenen Gelkammer aufgetrennt. Als Massenstandard wurden 5 μL PAGERuler™ *Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific™) aufgetragen (siehe Anhang, Abb. S VII-5).

Tab. VI-35: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE

Komponente	Trenngel		Sammelgel
	12,5 %	15 %	
Acrylamid, 30 % (v/v)	4,1 mL	5,0 mL	0,9 mL
dH ₂ O	3,2 mL	2,3 mL	2,8 mL
4x Trenngelpuffer	2,5 mL	2,5 mL	/
4x Sammelgelpuffer	/	/	1,25 mL
TEMED	20 μL	20 μL	15 μL
APS, 10% (w/v)	150 μL	150 μL	85 μL

Tab. VI-36: Verwendete Puffer in der SDS-PAGE

Puffer	Komponente	Konzentration
4x Sammelpuffer	Tris-HCl, pH 6,8	0,5 M
	SDS	0,4 % (w/v)
4x Trenngelpuffer	Tris-HCl, pH 8,8	1,5 M
	SDS	0,4 % (w/v)
1x SDS-Laufpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,1% (w/v)

VI.2.6.7 *Semidry* Western-Blot und Immunodetektion

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine, wurden diese mittels einem *semidry* Western-Blot (Towbin et al. 1979) aus dem Polyacrylgel auf eine Nitrocellulose-Membran mit dem TE 77 Semi-Dry Transfer System (GE-Healthcare) übertragen. Hierfür wurde das Whatman-Papier und die Nitrocellulose-Membran passend zum Gel zugeschnitten und nach Herstellerangaben blasenfrei übereinander platziert. Alle Komponenten wurden vor dem Transfer im WB-Transferpuffer equilibriert. Der Transfer erfolgte für 1 h 10 min mit einer konstanten Stromstärke (0,8mA pro cm²).

Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose-Membran zunächst für 1 h bei RT in der Block – Reagenz inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen zu blockieren. Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran mit dem primären Antikörper (Tab. VI-9) verdünnt in der Blocking – Reagenz für 1 h bei RT oder bei 4°C üN inkubiert. Danach wurde die Membran 3x für je 10 min mit TBS – Puffer gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundären Antikörper (1:1000) (Tab. VI-9) in der Block – Reagenz für 1 h bei RT. Final wurde die Membran 3x mit TBS – Puffer für 10 min, 1x 10 min mit TBS-T – Puffer und anschließend mit dH₂O gewaschen, bevor die Bindung mittels ECL (*enhanced chemiluminescence*) detektiert wurde. Die verwendeten Puffer sind in Tab. VI-36 dargestellt.

Tab. VI-37: Verwendete Puffer für den *semidry* Western-Blot

Puffer	Komponente	Konzentration
1x WB-Transferpuffer	Tris-HCl (pH 8,5)	25 mM
	Glycin	192 mM
	Isopropanol	10 % (v/v)
1x TBS – Puffer	Tris-HCl (pH 7,5)	100 mM
	NaCl	150 mM
1x TBS-T – Puffer	Tris-HCl (pH 7,5)	100 mM
	NaCl	150 mM
	Tween® 20	0,1 % (v/v)
Block – Reagenz	5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x TBS-T – Puffer	

VI.2.6.8 Chemilumineszenz mittels HRP-gekoppelter Antikörpern

Für die Immunodetektion der HRP-gekoppelten Antikörper gebunden an Proteine auf der Nitrocellulosemembran wurde die ECL-Lösung kurz vor Gebrauch angesetzt. Dabei wurde die Nitrocellulosemembran mit der ECL-Lösung für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend folgte die Entwicklung des Röntgenfilms mithilfe von XGB Röntgenentwickler/-fixierer (XGB Developer/Fixer Replenisher Solutions, Kodak) in der Dunkelkammer oder die Chemilumineszenz wurde mit Hilfe vom ECL Chemostar (Intas Science Imaging) detektiert..

Tab. VI-38: Verwendete ECL-Lösung für die Chemilumineszenz-Reaktion

Puffer	Komponenten	Konzentration
ECL-Lösung	Cumarinsäure in DMSO	90 mM
	Luminol in DMSO	250 mM
	Tris-HCl (pH 8,5)	200 mM
	dH ₂ O	ad. 20 mL
	H ₂ O ₂ (30%)	1:1000
	H ₂ O ₂ wurde kurz vor Gebrauch der Lösung zugesetzt.	

VI.2.7 Mikroskopie

VI.2.7.1 Konfokale Laserscan Mikroskopie (KLSM)

Die *in vivo* Lokalisationsstudien von GFP-Fusionsproteinen erfolgte mittels der konfokalen Laserscan Mikroskopie. Hierfür wurden entweder das TCS SP2 mit dem Objektiv HCX PL APO 40_/1.25-0.75 Oil CS oder TCS SP5 mit dem Objektiv HCX PL APO 40x/1.25-0.75 Oil Lbd. bl. der Firma Leica Microsystems eingesetzt. Der 65 mW oder 100 mW Argon-Laser wurde zur Anregung der GFP-Fluoreszenz und der Plastidenautofluoreszenz bei 488 nm mit Emissionsspektren von 500-520 nm (für GFP) bzw. 625-720 nm (für die Plastidenautofluoreszenz) verwendet. Der peroxisomale Marker mRuby3-SKL wurde bei 543 nm mit dem HeNe-Laser mit 1,2 mW am TCS SP2 oder bei 561 nm mit dem DPSS-Laser mit 10 mW bei 561 nm am TCS SP5 angeregt, und die Emission wurde in einem Bereich von 580-605 nm nachgewiesen (Marter et al. 2020).

Die GFP-Fusionsproteine und der peroxisomalen Marker wurden unter der Kontrolle des endogenen Nitratpromoters für 24 h koexprimiert und die Lokalisation mittels eines konfokalen Laserscan-Mikroskopes (KLSM) detektiert. Da der peroxisomale Marker mR3-SKL bei hoher Expression ebenfalls mit dem Argon-Laser bei 488 nm detektiert werden kann und die Fluoreszenzkapazität der Fluorophore schnell erschöpft ist, wurde vor der GFP-Detektion zunächst mR3-SKL mit einem zweiten Laser einzeln bei 543/561 nm angeregt bevor der Argonlaser bei 488 nm hinzugeschaltet wurde, um die GFP Fluoreszenz detektieren zu können. Nach dem Scannen der mR3-SKL Fluoreszenz wurde zusätzlich der Argonlaser eingeschaltet um die GFP-Fluoreszenz anzuregen.

VI.2.7.2 Elektronenmikroskopie

P. tricornutum Klone, die GFP-Gt_UO exprimieren, wurden mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) weiter analysiert. Dazu wurden einwöchige Flüssigkulturen (unter nicht-induzierenden Bedingungen) für 24 h mit 0,89 mM NaNO₃ induziert. Die Zellen wurden geerntet (Zentrifugation bei 1500 x g, 21 °C, 5 min) und mit Hochdruck eingefroren (Wohlwend HPF Compact 02). Nach anschließender Gefriersubstitution (mit Aceton, enthaltend 0,25% Osmiumtetroxid, 0,2% Uranylacetat, 0,05% Rutheniumrot und 5% Wasser) (Leica AFS2) wurden die Zellen in Epon812-Ersatzharz (Fluka)

eingebettet. Die eingebetteten Zellen wurden mit Leica EM UC7 RT in 60 μm dünne Schnitte geschnitten, die für die Immunfärbung mit α -GFP (Rockland; Verdünnungen 1:500 und 1:1000) oder einem spezifischen Anti-Peptid-Antikörper (α -Gt_UO.12aaC) gegen die letzten C-terminalen 12 Aminosäuren von Gt_UO von David's Biotechnology (Verdünnungen 1:200, 1:500 und 1:1000) verwendet wurden.

Zusätzlich wurden ultradünne Schnitte von *G. theta* Wildtyp Zellen für die Immunmarkierung mit α -Gt_UO.12aaC verwendet. Als Sekundärantikörper wurden Ziegen-Antikaninchen- bzw. Kaninchen-Anti-Ziegen-Antikörper verwendet, die an ultrakleine Goldpartikel gekoppelt waren (Aurion, Verdünnung 1:100). Anschließend erfolgte eine Silberanreicherung (Danscher, 1981) und eine Nachfärbung der Schnitte mit 2 % Urynylacetat und 0,5 % Bleizitrat. Die Analyse der Proben wurde mit einem JEOL JEM2100 TEM durchgeführt, das mit einer Fast-Scan 2k CCD TVIPS (Gauting, Deutschland) F214 Kamera ausgestattet ist.

TEM-Arbeiten wurden von Thomas Heimerl durchgeführt und die Dünnschnitte Marion Schön vorbereitet.

VII ANHANG

VII.1 Zusätzliche Abbildungen

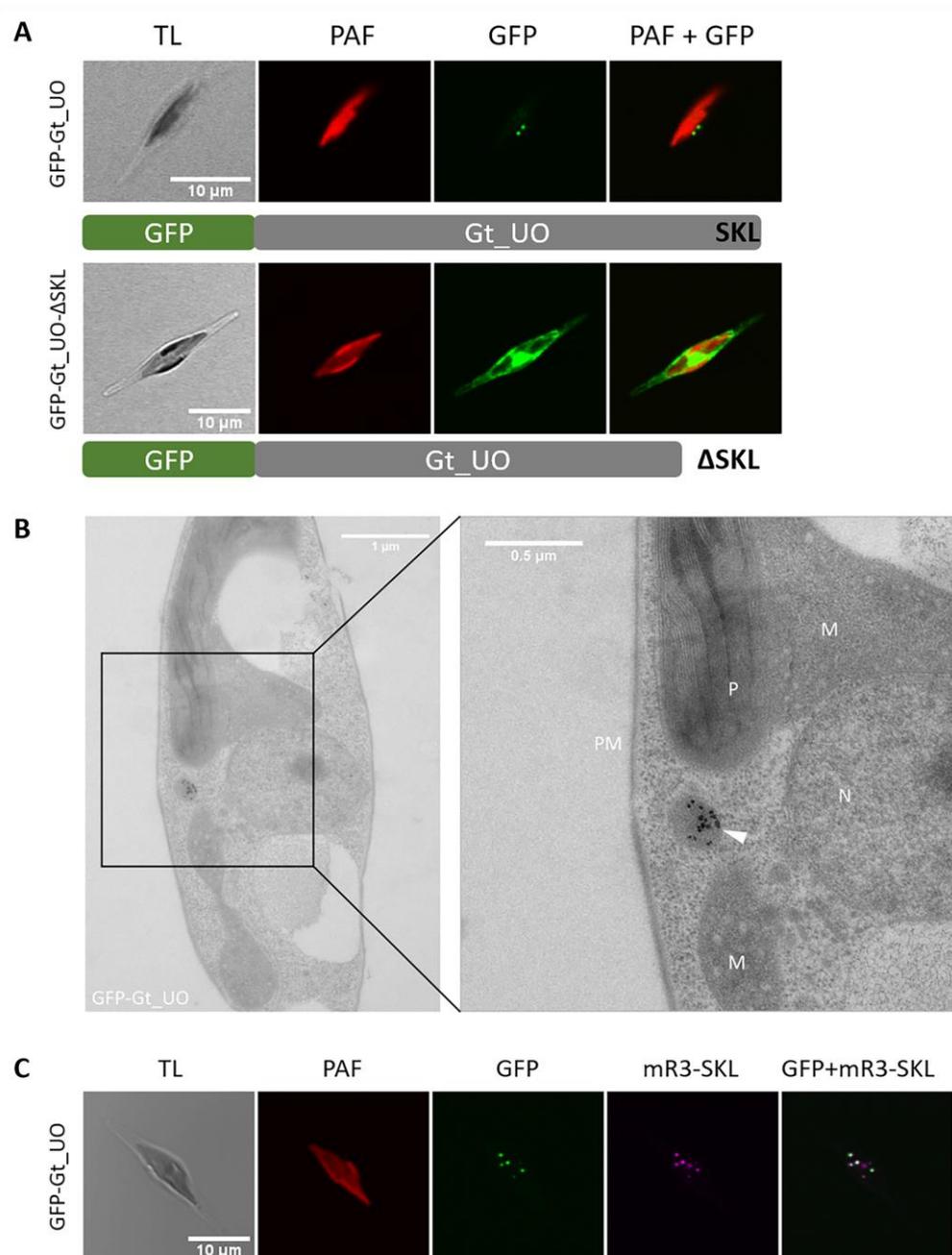


Abb. S VII-1: Heterologe *in vivo* Lokalisation von Gt_UO aus vorherigen Studien

(A) In *P. tricornutum* Wildtyp wurde das volle Länge Gt_UO mit N-terminalem GFP (GFP-Gt_UO) in kleinen runden Organellen nahe der Plastide lokalisiert, während die Deletion des C-terminalen Tripeptids "SKL" (GFP-Gt_UO-ΔSKL) in cytosolischer Lokalisation resultierte. (B) Immunmarkierungen mittels α -GFP in *P. tricornutum* GFP-Gt_UO exprimierenden Klon resultierten in Elektronen-dichten Strukturen in kleinen runden Organellen, die vermutlich Peroxisomen darstellen. **P** Plastide, **M** Mitochondrium, **N** Nukleus, (C) Ko-Expression von GFP-Gt_UO mit dem peroxisomalen Marker mRuby3-SKL in *P. tricornutum* resultierte in Kolokalisation beider Konstrukte in kleinen runden Strukturen. **TL** Durchlicht, **PAF** Plastidenautofluoreszenz, **GFP** grün fluoreszierendes Protein, **mR3-SKL** peroxisomaler Marker, **12aaC** die letzten 12 C-terminalen Aminosäuren, Maßstab 10 μ m in (A) und (B) und 1 μ m (Übersicht) oder 0,5 μ m (Nahaufnahme) in (C). Aufnahmen der Immunmarkierungen wurden von Dr. Thomas Heimerl angefertigt und die Abbildung in Vasilev et al. (2022) publiziert.

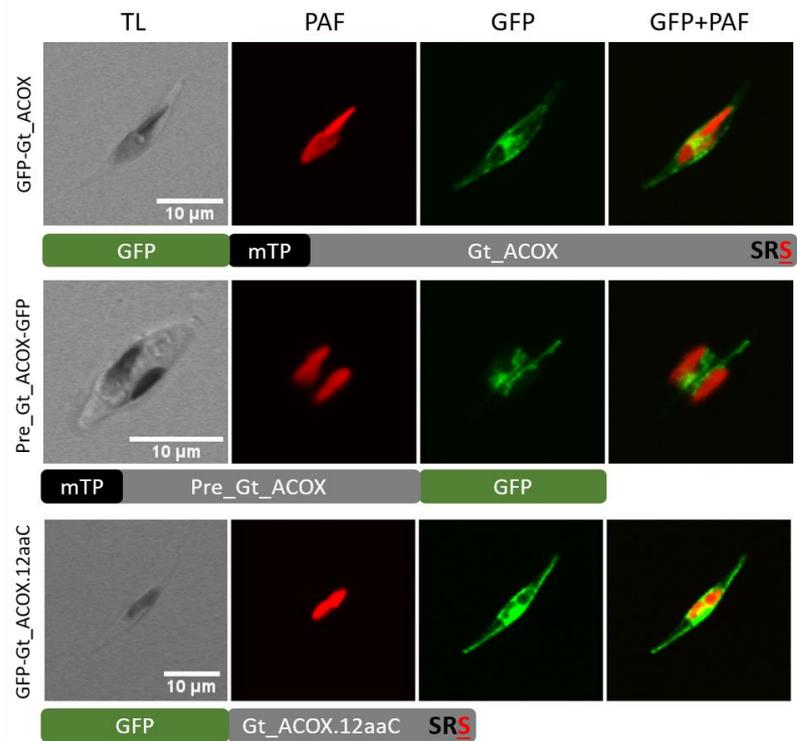


Abb. S VII-2: Heterologe *in vivo* Lokalisation von Gt_ACOX in *P. tricornutum* Wildtyp

Gt_ACOX lokalisiert in voller Länge (GFP-Gt_ACOX) und als 12aaC-Version (GFP-Gt_ACOX.12aaC) im Cytosol von *P. tricornutum*, wobei das putative mTP (Pre_Gt_ACOX-GFP) den Import in länglichere Strukturen, vermutlich Mitochondrien, vermittelt. **TL** Durchlicht, **PAF** Plastid autofluoreszenz, **GFP** grün fluoreszierendes Protein, **12aaC** die letzten 12 C-terminalen Aminosäuren, Maßstab 10 µm.

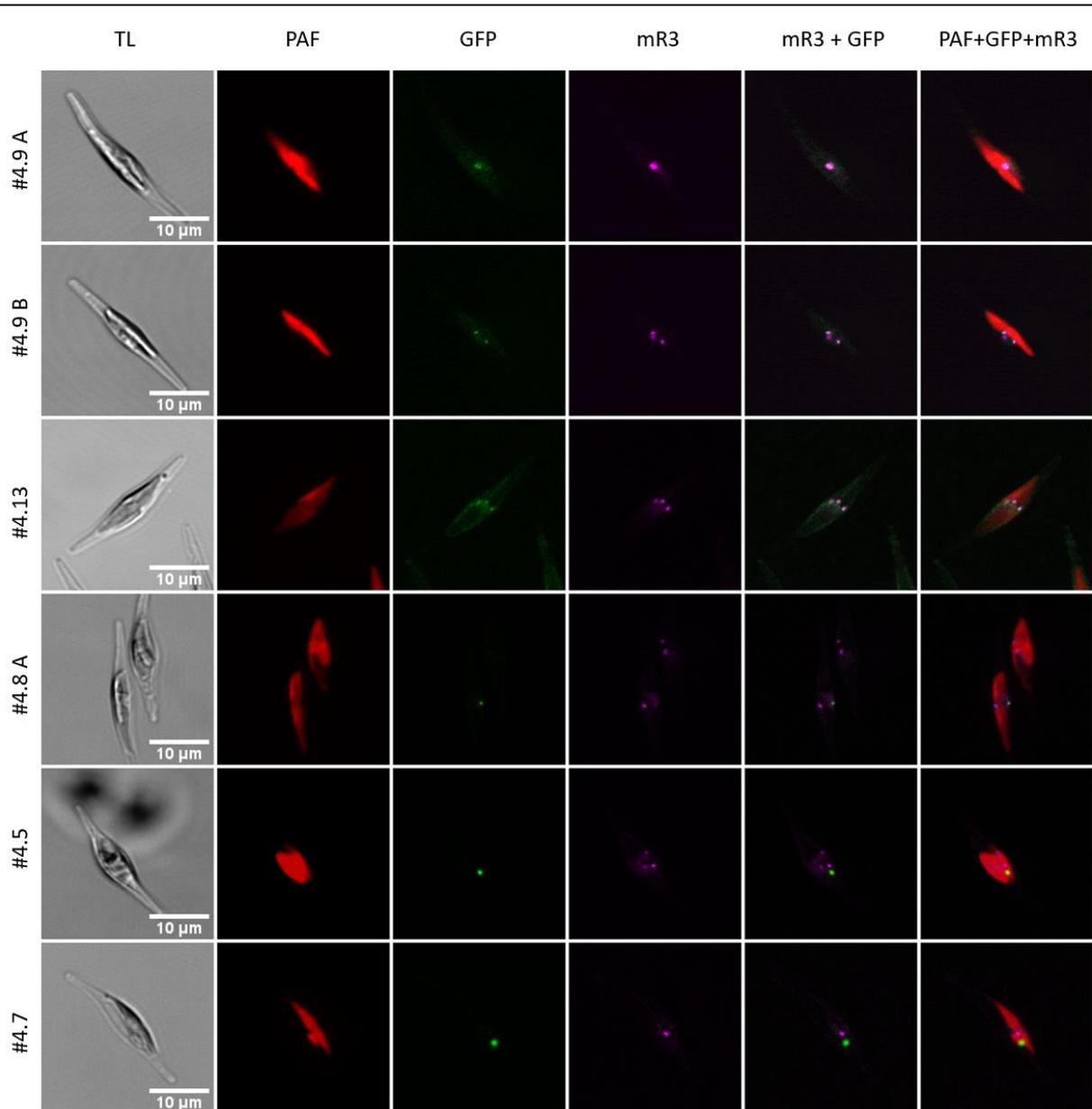


Abb. S VII-3: Heterologe *in vivo* Lokalisation von GFP-Gt_MenB in *P. tricornutum*

Neben der Kolokalisation mit dem peroxisomalen Marker mR3-SKL (siehe Haupttext) lokalisierte Gt_MenB in einigen *P. tricornutum* Klonen zwar in runden Organellen/Vesikeln, die größer als typische Strukturen von Peroxisomen waren und mit diesen ebenfalls nicht korrelierten. **TL** Durchlicht, **PAF** Plastidenautofluoreszenz, **GFP** grün fluoreszierendes Protein, **mR3-SKL** peroxisomaler Marker, **12aaC** die letzten 12 C-terminalen Aminosäuren, Maßstab 10 µm.

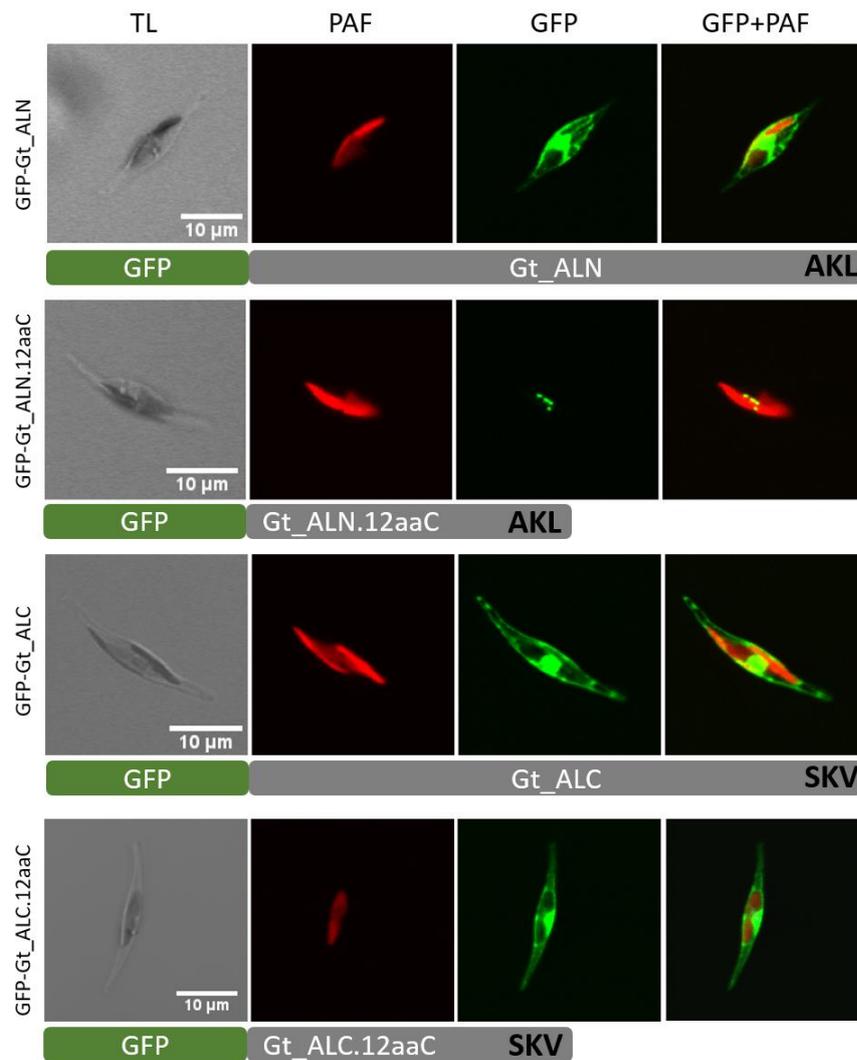


Abb. S VII-4: Heterologe *in vivo* Lokalisation von Gt_ALN und Gt_ALC in *P. tricornutum* Wildtyp

Die putative Allantoinase in *G. theta* lokalisierte als volle Länge (GFP-Gt_ALN) zwar im Cytosol von *P. tricornutum*, aber deren C-Terminus (GFP-Gt_ALN.12aaC) scheint die Fähigkeit zu besitzen den peroxisomalen Import auszulösen. Stattdessen lokalisierte die putative Allantoikase in beiden Versionen (GFP-Gt_ALC und GFP-Gt_ALC.12aaC) im Cytosol von *P. tricornutum*. **TL** Durchlicht, **PAF** Plastidenautofluoreszenz, **GFP** grün fluoreszierendes Protein, **12aaC** die letzten 12 C-terminalen Aminosäuren, Maßstab 10 μm .

VII.2 Plasmidkarten

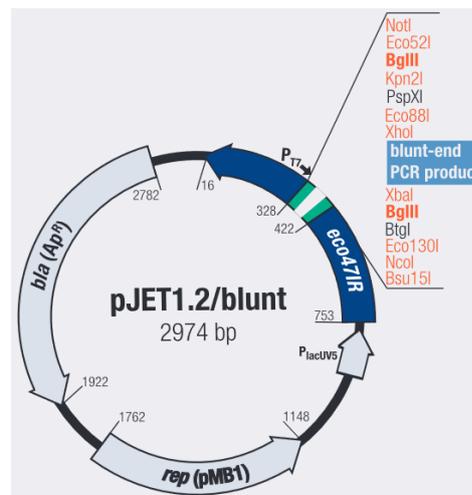


Abb. S VII-5: Plasmidkarte pJet1.2/blunt (Thermo Scientific™)

Blunt-Klonierungsvektor zur Verifikation der amplifizierten DNA und Vermehrung in *E. coli*.

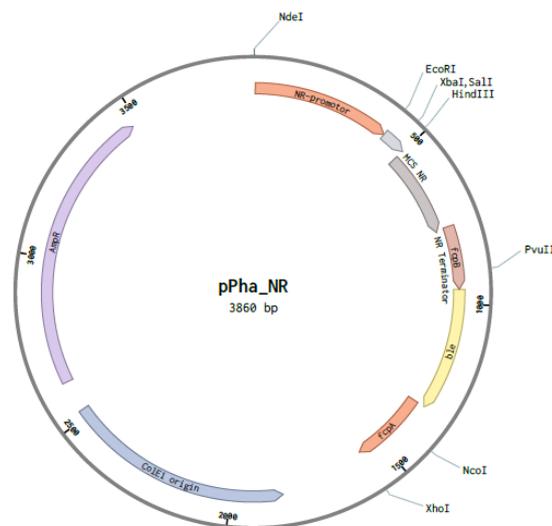


Abb. S VII-6: Plasmidkarte pPhaNR

Binärer Klonierungsvektor zur Selektion in *E. coli* (AmpR) und *P. tricornutum* (ZeoR). Multiple Klonierungsstelle (MCS) mit *EcoRI* und *HindIII*. Expression in *P. tricornutum* unter der Kontrolle des induzierbaren Nitrat (NR)-Promoters.

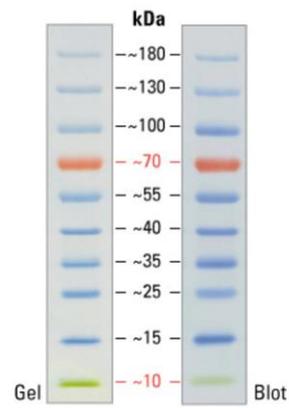


Abb. S VII-7: Markerbanden des prestained PAGERuler™ (Thermo Scientific™)

Die Proteinleiter wurde bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von denaturierten Proteinen in der SDS-PAGE eingesetzt.

VII.3 Kandidatenliste der putativen PTS1-Proteine in *G. theta*

Tab. S 1: Auflistung der 64 putativen PTS1-Kandidatenproteine in *G. theta*

Nr.	Protein ID	Name	Metabolismus/Funktion (BlastP)	C- Terminus	PTS1 Predictor	SignalP 4.1	TargetP 1.1	Predotar	PredSL	TMHMM
1	jgi Guith1 91319	NAD-abhängiges Maleinenzym	Kohlenhydrat-Metabolismus	CKL	+	N	–	–	–	0
2	jgi Guith1 149708			SKL	+	N	–	–	–	0
3	jgi Guith1 99105			SKM	+	N	M	–	M	0
4	jgi Guith1 149777	Phosphoserin Phosphatase	Aminosäuren-Metabolismus	SRL	+	N	–	M	–	0
5	jgi Guith1 132604	Phosphoserin Phosphatase	Aminosäuren-Metabolismus	AKL	+	N	–	M	–	0
6	jgi Guith1 64327	Malat-Dehydrogenase	Kohlenhydrat-Metabolismus	SKL	+	N	M	–	S	0
7	jgi Guith1 150427	NAD-abhängige Epimerase	Flavonoid-Metabolismus	SKL	+	N	S	–	–	1
8	jgi Guith1 101448	Peroxiredoxin	Antioxidatives System	SKL	+	N	M	–	–	0
9	jgi Guith1 133924	DP_E2F-like	Transkriptionsfaktor	SRM	+	N	–	–	–	0
10	jgi Guith1 150776	Hypothetisches Protein	Nukleotid-Metabolismus	SRL	+	N	S	–	–	0
11	jgi Guith1 134387	Hypothetisches Protein	Proteinprozessierung	SRM	+	N	–	–	–	0
12	jgi Guith1 102860	Uncharakterisiertes Protein	Signalwege	ARL	+	N	–	–	–	0
13	jgi Guith1 103016	Aminosäure/Polyamin Transporter II		SHL	TZ	N	S	–	–	8
14	jgi Guith1 103054			SHL	+	Y	S	ER	M	0
15	jgi Guith1 159337	ATP-Phosphoribosyl-Transferase	Nukleotid-Metabolismus	SRM	-	N	S	–	–	0
16	jgi Guith1 134757			CRL	TZ	N	–	–	–	1
17	jgi Guith1 66588	Hypothetisches Protein	Antioxidatives System?	SRL	+	N	–	–	–	0
18	jgi Guith1 161824	Uricase	Purin-Metabolismus	SKL	+	N	S	–	–	0
19	jgi Guith1 135385	Fettsäure-Acyl-CoA-Reduktase	Fettsäure-Oxidation	SRL	+	N	–	M	–	0
20	jgi Guith1 67817	Allantoinase	Purin-Metabolismus	AKL	+	N	–	–	–	0

21	jgi Guith1 85732	1,4-Dihydroxy-2-Naphthoyl-CoA Synthase	Menachinon-Metabolismus	SRL	+	N	M	-	-	0
22	jgi Guith1 104947			SRM	+	N	-	M	-	0
23	jgi Guith1 105385	Hypothetisches Protein		AKL	TZ	Y	-	ER	S	0
24	jgi Guith1 151678			SKM	+	N	-	M	M	2
25	jgi Guith1 105698	Hypothetisches Protein		SRM	+	N	-	-	-	0
26	jgi Guith1 105821			ARL	+	Y	S	ER	S	0
27	jgi Guith1 69367	Ankyrin repeat protein		SRM	+	N	-	no Met	-	0
28	jgi Guith1 162684			ARM	+	N	M	-	-	0
29	jgi Guith1 152152			SRL	+	Y	-	ER	S	0
30	jgi Guith1 152285			SRL	+	Y	S	ER	S	0
31	jgi Guith1 152286			SRL	+	Y	S	ER	S	0
32	jgi Guith1 107828			ARM	+	N	-	-	-	0
33	jgi Guith1 157810	Alkyldihydroxyacetonphosphat-Synthase	Etherphospholipid-Synthase	SHL	+	N	-	-	-	0
34	jgi Guith1	Inositol-Polyphosphat Phosphatase-1-like	Inositolphosphat-Metabolismus	SRL	-	Y	S	ER	S	1
35	jgi Guith1 152749	CoA-bindendes Protein	Fatty acid transport	SRM	+	N	-	-	-	0
36	jgi Guith1 153241			SKM	+	N	-	-	-	1
37	jgi Guith1 153287			SRL	+	N	-	-	-	0
38	jgi Guith1 140912			SRL	+	N	S	-	-	0
39	jgi Guith1 111863			SKL	+	N	-	-	-	0
40	jgi Guith1 153804	tRNA(uracil-5)-Methyltransferase Homolog A	tRNA-Methylierung	SKL	+	N	-	-	-	0
41	jgi Guith1 88523	Ascorbatperoxidase	Antioxidatives System	SKM	+	N	-	-	-	0
42	jgi Guith1 113334	Hypothetisches Protein		SRL	+	N	-	-	-	0
43	jgi Guith1 160025	Putative GDP-L-Fruktose-Synthetase	Zucker-Metabolismus	CRM	+	N	M	-	S	0

44	jgi Guith1 114994	Hypothetisches Protein		SKL	+	N	M	–	–	0
45	jgi Guith1 154637			CRL	+	N	–	–	M	0
46	jgi Guith1 115292			SRL	+	Y	–	ER	S	0
47	jgi Guith1 144150	E3- Ubiquitin-Ligase	Ubiquitinierung	CRM	+	Y	M	ER	S	1
48	jgi Guith1 158574	Aspartat-Amino-Transferase	Aminosäuren-Metabolismus	SKL	+	N	–	–	–	0
49	jgi Guith1 78170	CoA-Disulfid-Reduktase	Detoxifizierung	CRL	+	N	–	ER	–	0
50	jgi Guith1 165488	Ribose-Phosphat-Pyrophospho-Kinase	Nukleotid-Metabolismus	SRL	+	Y	–	ER	S	3
51	jgi Guith1 89759	Nacetyl-Transferase	Zucker-Metabolismus	AKL	+	N	M	–	–	0
52	jgi Guith1 89772	AAA-ATPase	Proteinprozessierung	AKL	+	N	–	–	S	0
53	jgi Guith1 116860	Ribose-Phosphat-Pyrophospho-Kinase 3	Nukleotid -Metabolismus	SRL	+	N	–	–	–	0
54	jgi Guith1 117798			ARM	-	Y	M	ER	S	1
55	jgi Guith1 155394	Prostaglandin-E-Synthase 2-like	Glutathion-Metabolismus	CRM	+	N	S	–	–	0
56	jgi Guith1 155502			SKM	+	N	M	–	–	0
57	jgi Guith1 166158	Aquaporin TIP2-2	Membrantunnel	SRL	+	N	–	–	S	6
58	jgi Guith1 155968			CHM	+	N	S	–	–	0
59	jgi Guith1 120422			SRM	+	N	–	–	–	0
60	jgi Guith1 156200			CKL	+	N	–	–	M	0
62	jgi Guith1 121642			SKL	+	N	S	–	–	0
62	jgi Guith1 122115	Monoamin-Oxidase	Amine-Metabolismus	SRL	+	N	S	–	–	0
63	jgi Guith1 166930	Hypothetisches Protein	Antioxidatives System	SRM	+	N	S	M	–	1
64	jgi Guith1 149569		Kohlenhydrat-Metabolismus	ARL	+	N	–	–	–	0

VII.4 *In silico* Analysen der Stoffwechselwege in *G. theta*

Tab. S 2: Übersicht der *in silico* Analysen der Stoffwechselwege in *G. theta*

Abk.	ID	Funktion (BlastP)	PTS1	PTS2	PTS1 Predictor	SignalP 3.0/4.1	TargetP 2.0	Predotar	PredSL	TMHMM 2.0	DeepLoc 1.0/2.0	Lok <i>in vivo</i>
Gt_APX	88523	Ascorbatperoxidase	SKM	-	+	N/N	other	none	other	0	C/Px	Px
	153788	Ascorbatperoxidase	-	-	-	Y/Y(AEA-YI)	SP	ER	S	0	M/P	nd
	65752	Ascorbatperoxidase	-	-	-	N/N	other	none	other	0	C/C	nd
Gt_DHAR	153349	Dehydroascorbat-Reduktase	-	RLLLVLPF	-	Y/Y(LEA-FS)	SP	ER	S	1	P/P	nd
Gt_GR	66527	Glutathiondisulfid-Reduktase	-	-	-	N/N	other	none	other	0	M/M	nd
Gt_XDH/XO	83774	Glutathiondisulfid-Reduktase	SRV	-	+	N/N	other	none	other	0	C/C	nd
	164776	Xanthin-Dehydrogenase/Oxidase	-	-	-	Y/Y(LIA-KE)	SP	ER	secreted	0	C/C	nd
Gt_UO	161824	Urat-Oxidase	SKL	-	+	N/N	other	none	other	0	C/Px	Px
Gt_ALN	67817	Allantoinase	AKL	-	+	N/N	other	none	other	0	C/Px	Px ¹
Gt_ALC	71482	Allantoikase	SKV	-	+	N/N	other	none	other	0	C/Px	C ¹
Gt_Urease	116849	Urease	-	KLKRLARGL	-	N/N	other	mito	other	0	M/C	nd
Gt_ASP	121809	Asparaginase	PRL	-	+	N/N	other	none	other	0	C/Px	nd
Gt_FAR	135385	Fettsäure-Acyl-CoA-Reduktase	SRL	-	+	N/N	other	mito	other	0	Px/Px	Px
Gt_GPAT/DHAPAT	139343	Glycerolphosphat-Acyltransferase/Dihydroxyacetone-Phosphat-Acyltransferase	-	-	-	N/N	other	none	other	5	ER/ER	nd
Gt_GPAT/DHAPAT	163230	Glycerolphosphat-Acyltransferase/Dihydroxyacetone-Phosphat-Acyltransferase	-	-	-	N (signal anchor) /N	other	none	other	6	ER/ER	nd
Gt_AGPS	157810	Alkyldihydroxyacetonephosphat-Synthase	SHL	-	+	N/N	other	none	other	0	Px/C with PTS	Px/C
Gt_PHYLLO	72208	2-Succinyl-5-Enolpyruvyl-6-Hydroxy-3-Cyclohexen-1-Carbonsäure-Synthase	-	-	-	N/N	other	mito	S	0	Px/C	nd
Gt_MenF	72190	Isochorismat-Synthase (Menachinon-spezifisch)	-	-	-	N/N	other	none	other	0	C/C+P (PTS)	nd
Gt_MenD	-	2-Succinyl-5-Enolpyruvyl-6-Hydroxy-3-Cyclohexen-1-Carboxylate-Synthase	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na

Gt_MenH	72176	2-Succinyl-6-Hydroxy-2,4-Cyclohexadiene-1-Carboxylat-Synthase	-	-	-	N/N	other	no „met“	other	0	C/C	nd
Gt_MenC	-	o-Succinyl-Benzoat-Synthase	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
Gt_MenE	139711	2-Succinylbenzoate-CoA-Ligase	-	-	-	N/N	SP (VRG-EL)	ER	S	1	M/GA (SP + PTS)	nd
Gt_MenB	85732	1,4-Dihydroxy-2-Naphthoyl-CoA-Synthase	SRL	-	+	N/N	other	none	other	0		Px/Px
Gt_DHNAT	-	1,4-Dihydroxy-2-Naphthoyl-CoA-Hydrolase	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
Gt_MenA	-	Phytyl-/Polyprenyl-Transferase	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
Gt_MenG	-	Methyl-Transferase	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
Gt_VKOR	106868	Vitamin K Epoxid-Reduktase	-	-	-	N/N	other	none	mito	4	ER/P	nd

VII.5 Digitaler Anhang

Tab. Digital 1: BlastP_gt_PTS1_vs_nr_best+consensus_end_last3.xlsx

Tab. Digital 2: Gt_Beta-Oxidation_BLAST_analysis.xlsx

Tab. Digital 3: Bioinformatik_Glyoxylat_Zyklus_G.theta.xlsx

Tab. Digital 4: Bioinformatik_Photorespiration_G.theta.xlsx

Tab. Digital 5: Vitamin K Synthese_components2.xlsx

Tab. Digital 6: Bioinformatik Metabolismus in G. theta.xlsx

Tab. Digital 7: Komparative Genomanalysen_Pex.xlsx

VII.6 PHYRE² Analysen von ACOX und ACAD

Phyre² Description: ACAD90066
Date: Tue Sep 10 09:31:58 BST 2019
Unique Job ID: 980e514778e9f947

Detailed template information

#	Template	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% I.d.	Template Information
1	c2uxwA	Alignment		100.0	23	PDB header: oxidoreductase Chain: A; PDB Molecule: very-long-chain specific acyl-coa dehydrogenase; PDBTitle: crystal structure of human very long chain acyl-coa dehydrogenase2 (acadv1)
2	c3zwaC	Alignment		100.0	20	PDB header: oxidoreductase Chain: C; PDB Molecule: acyl-coa dehydrogenase; PDBTitle: crystal structure of acyl-coa dehydrogenase complexed with fad from2 bacillus anthracis
3	c2z1oA	Alignment		100.0	25	PDB header: oxidoreductase Chain: A; PDB Molecule: acyl-coa dehydrogenase; PDBTitle: crystal structure of acyl coa dehydrogenase
4	c6llcA	Alignment		100.0	17	PDB header: oxidoreductase Chain: A; PDB Molecule: acyl-coa dehydrogenase family protein; PDBTitle: structure of mmpa-coa dehydrogenase from roseovarius rubinhibens sm
5	c6e2aA	Alignment		100.0	22	PDB header: flavoprotein Chain: A; PDB Molecule: acyl-coa dehydrogenase; PDBTitle: methylsuccinyl-coa dehydrogenase of paracoccus denitrificans with2 bound flavin adenine dinucleotide
6	c2ix5A	Alignment		100.0	25	PDB header: oxidoreductase Chain: A; PDB Molecule: acyl-coenzyme a oxidase 4, peroxisomal; PDBTitle: short chain specific acyl-coa oxidase from arabidopsis thaliana, acx42 in complex with acetoacetyl-coa
7	c1z0B	Alignment		100.0	24	PDB header: oxidoreductase Chain: B; PDB Molecule: acyl-coa dehydrogenase family member B, mitochondrial; PDBTitle: crystal structure of isobutyryl-coa dehydrogenase complexed with2 substrate/ligand.
8	c5zw2A	Alignment		100.0	21	PDB header: biosynthetic protein Chain: A; PDB Molecule: l-prolyl-[peptidyl-carrier protein] dehydrogenase; PDBTitle: fad complex of piga
9	c4y0lB	Alignment		100.0	14	PDB header: oxidoreductase Chain: B; PDB Molecule: protein acdh-11, isoform b; PDBTitle: crystal structure of caenorhabditis elegans acdh-11
10	c1sl6A	Alignment		100.0	22	PDB header: oxidoreductase Chain: A; PDB Molecule: glutaryl-coa dehydrogenase; PDBTitle: the crystal structure and mechanism of human glutaryl-coa2 dehydrogenase

Abb. S VII-8: Analysen von Gt_ACAD in Phyre²

Dargestellt sind die ersten 10 Treffer in PHYRE² mit Gt_ACAD (90066) als Analysesequenz. Es konnten nur ACAD Sequenzen identifiziert werden.

Phyre² Description: Gt_ACOX_ACAD_Mito_aus_Sequencher
 Date: Mon Sep 9 14:28:37 BST 2019
 Unique Job ID: a0fd05778c953787

Detailed template information

#	Template	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% I.d.	Template Information
1	c5ys9A	Alignment		100.0	22	PDB header: oxidoreductase Chain: A; PDB Molecule: acyl-coenzyme a oxidase 3; PDBTitle: crystal structure of acyl-coa oxidase3 from yarrowia lipolytica
2	c5y3IA	Alignment		100.0	18	PDB header: oxidoreductase Chain: A; PDB Molecule: acyl-coenzyme a oxidase; PDBTitle: crystal structure of acyl-coa oxidase-2 in caenorhabditis elegans2 bound with fad, ascaroside-coa, and atp
3	c5y9dA	Alignment		100.0	21	PDB header: oxidoreductase Chain: A; PDB Molecule: acyl-coenzyme a oxidase 1; PDBTitle: crystal structure of acyl-coa oxidase1 from yarrowia lipolytica
4	c5k3IH	Alignment		100.0	17	PDB header: oxidoreductase Chain: H; PDB Molecule: acyl-coenzyme a oxidase; PDBTitle: crystal structure of acyl-coa oxidase-1 in caenorhabditis elegans2 complexed with fad and atp
5	c2fonA	Alignment		100.0	17	PDB header: oxidoreductase Chain: A; PDB Molecule: peroxisomal acyl-coa oxidase 1a; PDBTitle: x-ray crystal structure of acyl-coa oxidase from2 lycopersicon esculentum (tomato)
6	c1w07A	Alignment		100.0	17	PDB header: oxidoreductase Chain: A; PDB Molecule: acyl-coa oxidase; PDBTitle: arabidopsis thaliana acyl-coa oxidase 1
7	c2ddhA	Alignment		100.0	18	PDB header: oxidoreductase Chain: A; PDB Molecule: acyl-coa oxidase; PDBTitle: crystal structure of acyl-coa oxidase complexed with 3-oh-dodecanoate
8	c3owaF	Alignment		100.0	19	PDB header: oxidoreductase Chain: C; PDB Molecule: acyl-coa dehydrogenase; PDBTitle: crystal structure of acyl-coa dehydrogenase complexed with fad from2 bacillus anthracis
9	c2uwaA	Alignment		100.0	19	PDB header: oxidoreductase Chain: A; PDB Molecule: very-long-chain specific acyl-coa dehydrogenase; PDBTitle: crystal structure of human very long chain acyl-coa dehydrogenase2 (acadv1)
10	c2z1aA	Alignment		100.0	16	PDB header: oxidoreductase Chain: A; PDB Molecule: acyl-coa dehydrogenase; PDBTitle: crystal structure of acyl-coa dehydrogenase

Abb. S VII-9 Analysen von Gt_ACOX in Phyre²

Dargestellt sind die ersten 10 Treffer in PHYRE² mit Gt_ACOX (ID_147553) als Analysesequenz.

Es konnten sowohl ACOX als auch ACAD Sequenzen identifiziert werden.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- Abad, Enrique; Zenn, Roland K.; Kästner, Johannes (2013): Reaction mechanism of monoamine oxidase from QM/MM calculations. In: *The journal of physical chemistry. B* 117 (46), S. 14238–14246. DOI: 10.1021/jp4061522.
- Allan, Wendy L.; Clark, Shawn M.; Hoover, Gordon J.; Shelp, Barry J. (2009): Role of plant glyoxylate reductases during stress: a hypothesis. In: *The Biochemical journal* 423 (1), S. 15–22. DOI: 10.1042/BJ20090826.
- Almagro Armenteros, Jose Juan; Sønderby, Casper Kaae; Sønderby, Søren Kaae; Nielsen, Henrik; Winther, Ole (2017): DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. In: *Bioinformatics* 33 (24), S. 4049. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx548.
- Amako, Katsumi; Chen, Gong-Xiang; Asada, Kozi (1994): Separate Assays Specific for Ascorbate Peroxidase and Guaiacol Peroxidase and for the Chloroplastic and Cytosolic Isoenzymes of Ascorbate Peroxidase on Plants. In: *Plant Cell Physiol.* 35 (3), S. 497–504.
- Andeberhan, Moana (2021): Heterologous Colocalization of Peroxisomal Proteins from *Bigeloviella natans* in *Phaeodactylum tricornutum* and In Silico Identification of Peroxins in Chlorarachniophytes. Bachelorarbeit.
- Archibald, John M. (2015a): Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. In: *Current biology : CB* 25 (19), R911-21. DOI: 10.1016/j.cub.2015.07.055.
- Archibald, John M. (2015b): Genomic perspectives on the birth and spread of plastids. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (33), S. 10147–10153. DOI: 10.1073/pnas.1421374112.
- Asada, Kozi (1992): Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. In: *Physiologia Plantarum* 85 (2), S. 235–241. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1992.tb04728.x.
- Asada, Kozi (1997): The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. In: *Oxidatives Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, S. 715–735. Online verfügbar unter <https://ci.nii.ac.jp/naid/10004490351/>.

- Babujee, Lavanya; Wurtz, Virginie; Ma, Changle; Lueder, Franziska; Soni, Pradeep; van Dorsselaer, Alain; Reumann, Sigrun (2010): The proteome map of spinach leaf peroxisomes indicates partial compartmentalization of phylloquinone (vitamin K1) biosynthesis in plant peroxisomes. In: *Journal of experimental botany* 61 (5), S. 1441–1453. DOI: 10.1093/jxb/erq014.
- Bolte, Kathrin; Gruenheit, Nicole; Felsner, Gregor; Sommer, Maik S.; Maier, Uwe-G; Hempel, Franziska (2011): Making new out of old: recycling and modification of an ancient protein translocation system during eukaryotic evolution. Mechanistic comparison and phylogenetic analysis of ERAD, SELMA and the peroxisomal importomer. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 33 (5), S. 368–376. DOI: 10.1002/bies.201100007.
- Bolte, Kathrin; Rensing, Stefan A.; Maier, Uwe-G (2015): The evolution of eukaryotic cells from the perspective of peroxisomes: phylogenetic analyses of peroxisomal beta-oxidation enzymes support mitochondria-first models of eukaryotic cell evolution. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 37 (2), S. 195–203. DOI: 10.1002/bies.201400151.
- Bowler, Chris; Allen, Andrew E.; Badger, Jonathan H.; Grimwood, Jane; Jabbari, Kamel; Kuo, Alan et al. (2008): The Phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. In: *Nature* 456 (7219), S. 239–244. DOI: 10.1038/nature07410.
- Bozarth, Andrew; Maier, Uwe-G; Zauner, Stefan (2009): Diatoms in biotechnology: modern tools and applications. In: *Applied microbiology and biotechnology* 82 (2), S. 195–201. DOI: 10.1007/s00253-008-1804-8.
- Braveman, Nancy; Dodt, Gabriele; Gould, Stephen J.; Valle, David (1998): An isoform of the Pex5p, the human PTS1 receptor, is required for the import of PTS2 proteins into peroxisomes. In: *Human Molecular Genetics* 7 (8), S. 1195–1205.
- Breidenbach, R. W.; Beevers, Harry (1967): Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 27 (4), S. 462–469. DOI: 10.1016/S0006-291X(67)80007-X.

- Brocard, Cécile; Hartig, Andreas (2006): Peroxisome targeting signal 1: is it really a simple tripeptide? In: *Biochimica et biophysica acta* 1763 (12), S. 1565–1573. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.08.022.
- Butler, Thomas; Kapoore, Rahul Vijay; Vaidyanathan, Seetharaman (2020): Phaeodactylum tricorutum: A Diatom Cell Factory. In: *Trends in Biotechnology* 38 (6), S. 606–622. DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.12.023.
- Camões, Fátima; Islinger, Markus; Guimarães, Sofia C.; Kilaru, Sreedhar; Schuster, Martin; Godinho, Luis F. et al. (2015): New insights into the peroxisomal protein inventory: Acyl-CoA oxidases and -dehydrogenases are an ancient feature of peroxisomes. In: *Biochimica et biophysica acta* 1853 (1), S. 111–125. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.10.005.
- Cavalier-Smith, Thomas (2000): Membrane heredity and early chloroplast evolution. In: *Trends in plant science* 5 (4), S. 174–182. DOI: 10.1016/S1360-1385(00)01598-3.
- Cenci, U.; Qiu, H.; Pillonel, T.; Cardol, P.; Remacle, C.; Colleoni, C. et al. (2018): Host-pathogen biotic interactions shaped vitamin K metabolism in Archaeplastida. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 15243. DOI: 10.1038/s41598-018-33663-w.
- Christeller, John T.; Tolbert, N. E. (1978): Phosphoglycolate Phosphatase. In: *Journal of Biological Chemistry* 253 (6), S. 1780–1785. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)62321-5.
- Curtis, Bruce A.; Tanifuji, Goro; Burki, Fabien; Gruber, Ansgar; Irimia, Manuel; Maruyama, Shinichiro et al. (2012): Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. In: *Nature* 492 (7427), S. 59–65. DOI: 10.1038/nature11681.
- Davis, Aubrey; Abbriano, Raffaella; Smith, Sarah R.; Hildebrand, Mark (2017): Clarification of Photorespiratory Processes and the Role of Malic Enzyme in Diatoms. In: *Protist* 168 (1), S. 134–153. DOI: 10.1016/j.protis.2016.10.005.
- de Duve, Christian (1969): Evolution of the peroxisome. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 168 (2), S. 369–381. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1969.tb43124.x.
- de Duve, Christian; Baudhuin, Pierre (1966): Peroxisomes (microbodies and related particles). In: *Physiological Reviews* 46, S. 323–357.
- Dean, John M.; Lodhi, Irfan J. (2018): Structural and functional roles of ether lipids. In: *Protein & cell* 9 (2), S. 196–206. DOI: 10.1007/s13238-017-0423-5.

- Del Río, Luis A. (2013): Peroxisomes and their Key Role in Cellular Signaling and Metabolism. Dordrecht: Springer Netherlands (69).
- Delaye, Luis; Valadez-Cano, Cecilio; Pérez-Zamorano, Bernardo (2016): How Really Ancient Is *Paulinella Chromatophora*? In: *PLoS Currents* 8. DOI: 10.1371/currents.tol.e68a099364bb1a1e129a17b4e06b0c6b.
- Dellero, Younès; Jossier, Mathieu; Schmitz, Jessica; Maurino, Veronica G.; Hodges, Michael (2016): Photorespiratory glycolate-glyoxylate metabolism. In: *Journal of experimental botany* 67 (10), S. 3041–3052. DOI: 10.1093/jxb/erw090.
- Dillon, Shane C.; Bateman, Alex (2004): The Hotdog fold: wrapping up a superfamily of thioesterases and dehydratases. In: *BMC bioinformatics* 5, S. 109. DOI: 10.1186/1471-2105-5-109.
- Doan, Thuy T. P.; Carlsson, Anders S.; Hamberg, Mats; Bülow, Leif; Stymne, Sten; Olsson, Peter (2009): Functional expression of five Arabidopsis fatty acyl-CoA reductase genes in *Escherichia coli*. In: *Journal of plant physiology* 166 (8), S. 787–796. DOI: 10.1016/j.jplph.2008.10.003.
- Douglas, S.; Zauner, S.; Fraunholz, M.; Beaton, M.; Penny, S.; Deng, L. T. et al. (2001): The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. In: *Nature* 410 (6832), S. 1091–1096. DOI: 10.1038/35074092.
- Eisenhut, Marion; Ruth, Wolfgang; Haimovich, Maya; Bauwe, Hermann; Kaplan, Aaron; Hagemann, Martin (2008): The photorespiratory glycolate metabolism is essential for cyanobacteria and might have been conveyed endosymbiontically to plants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (44), S. 17199–17204. DOI: 10.1073/pnas.0807043105.
- Emanuelsson, O.; Nielsen, H.; Brunak, S.; Heijne, G. von (2000): Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. In: *Journal of molecular biology* 300 (4), S. 1005–1016. DOI: 10.1006/jmbi.2000.3903.
- Erdmann, Ralf; Blobel, Günter (1995): Giant peroxisomes in oleic-acid induced *Saccharomyces cerevisiae* lacking the peroxisomal membrane protein Pmp27p. In: *The Journal of cell biology* 128 (4), S. 509–523.

- Erdmann, Ralf; Schliebs, Wolfgang (2005): Peroxisomal matrix protein import: the transient pore model. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 6 (9), S. 738–742. DOI: 10.1038/nrm1710.
- Esser, Christian; Kuhn, Anke; Groth, Georg; Lercher, Martin J.; Maurino, Veronica G. (2014): Plant and animal glycolate oxidases have a common eukaryotic ancestor and convergently duplicated to evolve long-chain 2-hydroxy acid oxidases. In: *Mol Biol Evol* 31 (5), S. 1089–1101. DOI: 10.1093/molbev/msu041.
- Falkowski; Barber; Smetacek (1998): Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. In: *Science (New York, N.Y.)* 281 (5374), S. 200–207. DOI: 10.1126/science.281.5374.200.
- Feng, Wei-Ke; Wang, Liang; Lu, Ying; Wang, Xiao-Yun (2011): A protein oxidase catalysing disulfide bond formation is localized to the chloroplast thylakoids. In: *The FEBS journal* 278 (18), S. 3419–3430. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08265.x.
- Field; Behrenfeld; Randerson; Falkowski (1998): Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. In: *Science (New York, N.Y.)* 281 (5374), S. 237–240. DOI: 10.1126/science.281.5374.237.
- Flori, Serena; Jouneau, Pierre-Henri; Finazzi, Giovanni; Maréchal, Eric; Falconet, Denis (2016): Ultrastructure of the Periplastidial Compartment of the Diatom *Phaeodactylum tricorutum*. In: *Protist* 167 (3), S. 254–267. DOI: 10.1016/j.protis.2016.04.001.
- Frederick, S. E.; Gruber, P. J.; Tolbert, N. E. (1973): The occurrence of glycolate dehydrogenase and glycolate oxidase in green plants: an evolutionary survey. In: *Plant physiology* 52 (4), S. 318–323. DOI: 10.1104/pp.52.4.318.
- Freitag, Johannes; Ast, Julia; Bölker, Michael (2012): Cryptic peroxisomal targeting via alternative splicing and stop codon read-through in fungi. In: *Nature* 485 (7399), S. 522–525. DOI: 10.1038/nature11051.
- Fujiki, Yukio; Matsuzono, Yuji; Matsuzaki, Takashi; Fransen, Marc (2006): Import of peroxisomal membrane proteins: the interplay of Pex3p- and Pex19p-mediated interactions. In: *Biochimica et biophysica acta* 1763 (12), S. 1639–1646. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.09.030.

- Gabaldón, Toni (2010): Peroxisome diversity and evolution. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 365 (1541), S. 765–773. DOI: 10.1098/rstb.2009.0240.
- Gabaldón, Toni; Ginger, Michael L.; Michels, Paul A. M. (2016): Peroxisomes in parasitic protists. In: *Molecular and biochemical parasitology* 209 (1-2), S. 35–45. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2016.02.005.
- Gabaldón, Toni; Snel, Berend; van Zimmeren, Frank; Hemrika, Wieger; Tabak, Henk; Huynen, Martijn A. (2006): Origin and evolution of the peroxisomal proteome. In: *Biology direct* 1, S. 8. DOI: 10.1186/1745-6150-1-8.
- Gaweska, Helena; Fitzpatrick, Paul F. (2011): Structures and Mechanism of the Monoamine Oxidase Family. In: *Biomolecular concepts* 2 (5), S. 365–377. DOI: 10.1515/BMC.2011.030.
- Gentil, J.; Hempel, F.; Moog, D.; Zauner, S.; Maier, U. G. (2017): Review: origin of complex algae by secondary endosymbiosis: a journey through time. In: *Protoplasma* 254 (5), S. 1835–1843. DOI: 10.1007/s00709-017-1098-8.
- Ghosh, Mridul K.; Hajra, Amiya K. (1986): A rapid method for the isolation of peroxisomes from rat liver. In: *Analytical Biochemistry* 159 (1), S. 169–174. DOI: 10.1016/0003-2697(86)90323-4.
- Gile, Gillian H.; Moog, Daniel; Slamovits, Claudio H.; Maier, Uwe-G; Archibald, John M. (2015): Dual Organellar Targeting of Aminoacyl-tRNA Synthetases in Diatoms and Cryptophytes. In: *Genome biology and evolution* 7 (6), S. 1728–1742. DOI: 10.1093/gbe/evv095.
- Goldfischer, S.; Moore, C. L.; Johnson, A. B.; Spiro, A. J.; Valsamis, M. P.; Wisniewski, H. K. et al. (1973): Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. In: *Science (New York, N.Y.)* 182 (4107), S. 62–64. DOI: 10.1126/science.182.4107.62.
- Gonzalez, Nicola H.; Felsner, Gregor; Schramm, Frederic D.; Klingl, Andreas; Maier, Uwe-G; Bolte, Kathrin (2011): A single peroxisomal targeting signal mediates matrix protein import in diatoms. In: *PloS one* 6 (9), e25316. DOI: 10.1371/journal.pone.0025316.
- Gould, Stephen J.; Keller, Gilbert-Andre; Hosken, Nancy; Wilkinsin, Jack; Subramani, Suresh (1989): A conserved Tripeptide sorts proteins to peroxisomes. In: *The Journal of cell biology* 108, S. 1657–1664.

- Gould, Sven B.; Maier, Uwe-G; Martin, William F. (2015): Protein import and the origin of red complex plastids. In: *Current biology : CB* 25 (12), R515-21. DOI: 10.1016/j.cub.2015.04.033.
- Gould, Sven B.; Sommer, Maik S.; Kroth, Peter G.; Gile, Gillian H.; Keeling, Patrick J.; Maier, Uwe-G (2006): Nucleus-to-nucleus gene transfer and protein retargeting into a remnant cytoplasm of cryptophytes and diatoms. In: *Molecular biology and evolution* 23 (12), S. 2413–2422. DOI: 10.1093/molbev/msl113.
- Greenwood, A. D. (1977): Chloroplasts and cell compartments in Cryptophyceae. In: *Br. Phycol. J.* 12, S. 119. Online verfügbar unter <https://ci.nii.ac.jp/naid/10008778905/>.
- Grisdale, C. J.; Archibald, J. M. (2017): Secondary and Tertiary Endosymbiosis ☆. In: Reference Module in Life Sciences: Elsevier.
- Gross, Jeferson; Cho, Won Kyong; Lezhneva, Lina; Falk, Jon; Krupinska, Karin; Shinozaki, Kazuo et al. (2006): A plant locus essential for phylloquinone (vitamin K1) biosynthesis originated from a fusion of four eubacterial genes. In: *The Journal of Biological Chemistry* 281 (25), S. 17189–17196. DOI: 10.1074/jbc.M601754200.
- Gross, Jeferson; Meurer, Jörg; Bhattacharya, Debashish (2008): Evidence of a chimeric genome in the cyanobacterial ancestor of plastids. In: *BMC evolutionary biology* 8, S. 117. DOI: 10.1186/1471-2148-8-117.
- Gross, W. (1989): Intracellular Localization of Enzymes of Fatty Acid-beta-Oxidation in the Alga *Cyanidium caldarium*. In: *Plant physiology* 91 (4), S. 1476–1480. DOI: 10.1104/pp.91.4.1476.
- Gross, Wolfgang; Winkler, Uwe; Stabenau, Helmut (1985): Characterization of Peroxisomes from the Alga *Bumilleriopsis filiformis*. In: *Plant physiology* (77).
- Guillard, Robert R. L. (1975): Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: Walter L. Smith und Matoira H. Chanley (Hg.): Culture of marine invertebrate animals. Proceedings of the Conference on Culture of Marine Invertebrate Animals, held in Greenport, New York, in October 1972. Softcover reprint of the hardcover 1st ed. 1975, Plenum Press, New York [u.a.]. Boston, MA: Springer US, S. 29–60.

- Guillard, Robert R. L.; Ryther, J. H. (1962): Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. In: *Canadian journal of microbiology* 8, S. 229–239. DOI: 10.1139/m62-029.
- Gurvitz, A.; Mursula, A. M.; Firzinger, A.; Hamilton, B.; Kilpeläinen, S. H.; Hartig, A. et al. (1998): Peroxisomal Delta3-cis-Delta2-trans-enoyl-CoA isomerase encoded by ECI1 is required for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on unsaturated fatty acids. In: *The Journal of Biological Chemistry* 273 (47), S. 31366–31374. DOI: 10.1074/jbc.273.47.31366.
- Hajra, Amiya K.; Bishop, James E. (1982): Glycerolipid biosynthesis in peroxisomes via the acyl dihydroacetone phosphate pathway. In: *Ann NY Acad Sci* 386.
- Hajra, Amiya K.; Das, Arun K. (1996): Lipid Biosynthesis in Peroxisomes. In: *Ann NY Acad Sci* (804).
- Hauck, Oliver K.; Scharnberg, J.; Escobar, Nieves Medina; Wanner, Gerhard; Giavalisco, Patrick; Witte, Claus-Peter (2014): Uric Acid Accumulation in an Arabidopsis Urate Oxidase Mutant Impairs Seedling Establishment by Blocking Peroxisome Maintenance. In: *The Plant cell* 26, S. 3090–3100.
- Hayashi, Yasuko; Sato, Nagisa; Shinozaki, Akiko; Watanabe, Mariko (2015): Increase in peroxisome number and the gene expression of putative glyoxysomal enzymes in *Chlamydomonas* cells supplemented with acetate. In: *Journal of plant research* 128 (1), S. 177–185. DOI: 10.1007/s10265-014-0681-8.
- Hayashi, Yasuko; Shinozaki, Akiko (2012): Visualization of microbodies in *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Journal of plant research* 125 (4), S. 579–586. DOI: 10.1007/s10265-011-0469-z.
- He, Liyan; Han, Xiaotian; Yu, Zhiming (2014): A rare *Phaeodactylum tricornutum* cruciform morphotype: culture conditions, transformation and unique fatty acid characteristics. In: *PLoS one* 9 (4), e93922. DOI: 10.1371/journal.pone.0093922.
- Hempel, Franziska; Bullmann, Lars; Lau, Julia; Zauner, Stefan; Maier, Uwe G. (2009): ERAD-derived preprotein transport across the second outermost plastid membrane of diatoms. In: *Mol Biol Evol* 26 (8), S. 1781–1790. DOI: 10.1093/molbev/msp079.

- Hempel, Franziska; Felsner, Gregor; Maier, Uwe G. (2010): New mechanistic insights into pre-protein transport across the second outermost plastid membrane of diatoms. In: *Molecular microbiology* 76 (3), S. 793–801. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07142.x.
- Hempel, Franziska; Lau, Julia; Klingl, Andreas; Maier, Uwe G. (2011): Algae as protein factories: expression of a human antibody and the respective antigen in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: *PloS one* 6 (12), e28424. DOI: 10.1371/journal.pone.0028424.
- Hempel, Franziska; Maier, Uwe G. (2012): An engineered diatom acting like a plasma cell secreting human IgG antibodies with high efficiency. In: *Microbial cell factories* 11, S. 126. DOI: 10.1186/1475-2859-11-126.
- Heymans, Hugo S. A.; Schutgens, Ruud B. H.; Tan, Raymond; van den Bosch, Henk; Borst, Piet (1983): Severe plasmalogen deficiency in tissues of infants without peroxisomes (Zellweger syndrome). In: *Nature* 306 (3), S. 69–70.
- Hill, David R. A.; Wetherbee, Richard (1990): *Guillardia theta* gen. et sp.nov. (Cryptophyceae). In: *Can. J. Bot.* 68 (9), S. 1873–1876. DOI: 10.1139/b90-245.
- Hoepfner, Dominic; Schildknecht, Danny; Braakman, Ineke; Philippsen, Peter; Tabak, Henk F. (2005): Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. In: *Cell* 122 (1), S. 85–95. DOI: 10.1016/j.cell.2005.04.025.
- Hofvander, Per; Doan, Thuy T. P.; Hamberg, Mats (2011): A prokaryotic acyl-CoA reductase performing reduction of fatty acyl-CoA to fatty alcohol. In: *FEBS letters* 585 (22), S. 3538–3543. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.10.016.
- Honsho, Masanori; Asaoku, Shunsuke; Fujiki, Yukio (2010): Posttranslational regulation of fatty acyl-CoA reductase 1, Far1, controls ether glycerophospholipid synthesis. In: *The Journal of Biological Chemistry* 285 (12), S. 8537–8542. DOI: 10.1074/jbc.M109.083311.
- Hoover, Gordon J.; Jørgensen, René; Rochon, Amanda; Bajwa, Vikramjit S.; Merrill, A. Rod; Shelp, Barry J. (2013): Identification of catalytically important amino acid residues for enzymatic reduction of glyoxylate in plants. In: *Biochimica et biophysica acta* 1834 (12), S. 2663–2671. DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.09.013.

- Howitz, Konrad T.; McCarty, Richard E. (1986): D-glycerate transport by the pea chloroplast Glycolate Carrier: Studies on [1-C]D-glycerate uptake and D-glycerate dependent O₂ evolution. In: *Plant physiology* 80, S. 390–395.
- Howitz, Konrad T.; McCarty, Richard E. (1985): Kinetic characteristics of the chloroplast envelope glycolate transporter. In: *Biochemistry* 24, S. 2645–2652. DOI: 10.1021/bi00332a009?casa_token=avg7fx6s2cmaaaaa:jsho-wgzgcpfxpp_roi9cmfougic7pmyyqqpl5jqe5agv1nfh3umzxcdygp5szhkjnpobumeanhke0.
- Hu, Jianping; Baker, Alison; Bartel, Bonnie; Linka, Nicole; Mullen, Robert T.; Reumann, Sigrun; Zolman, Bethany K. (2012): Plant peroxisomes: biogenesis and function. In: *The Plant cell* 24 (6), S. 2279–2303. DOI: 10.1105/tpc.112.096586.
- Ikeda, Yohei; Komura, Masayuki; Watanabe, Mai; Minami, Chie; Koike, Hiroyuki; Itoh, Shigeru et al. (2008): Photosystem I complexes associated with fucoxanthin-chlorophyll-binding proteins from a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*. In: *Biochimica et biophysica acta* 1777 (4), S. 351–361. DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.01.011.
- Ishikawa, Takahiro; Shigeoka, Shigeru (2008): Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. In: *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 72 (5), S. 1143–1154. DOI: 10.1271/bbb.80062.
- Jallet, Denis; Xing, Denghui; Hughes, Alexander; Moosburner, Mark; Simmons, Mark P.; Allen, Andrew E.; Peers, Graham (2020): Mitochondrial fatty acid β -oxidation is required for storage-lipid catabolism in a marine diatom. In: *The New phytologist* 228 (3), S. 946–958. DOI: 10.1111/nph.16744.
- Kahn, K.; Tipton, P. A. (1998): Spectroscopic characterization of intermediates in the urate oxidase reaction. In: *Biochemistry* 37 (33), S. 11651–11659. DOI: 10.1021/bi980446g.
- Kato, Naohiro; McCuiston, Clayton; Szuska, Kimberly A.; Lauersen, Kyle J.; Nelson, Gabela; Strain, Alexis (2022): *Chlamydomonas reinhardtii* Alternates Peroxisomal Contents in Response to Trophic Conditions. In: *Cells* 11 (17). DOI: 10.3390/cells11172724.
- Kiel, Jan A. K. W.; Veenhuis, Marten; van der Klei, Ida J. (2006): PEX genes in fungal genomes: common, rare or redundant. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 7 (10), S. 1291–1303. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2006.00479.x.

- Kienle, Nickias; Kloepper, Tobias H.; Fasshauer, Dirk (2016): Shedding light on the expansion and diversification of the Cdc48 protein family during the rise of the eukaryotic cell. In: *BMC evolutionary biology* 16 (1), S. 215. DOI: 10.1186/s12862-016-0790-1.
- Kim, E.; Archibald, J. M. (2008): Diversity and Evolution of Plastids and Their Genomes. In: Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Plant Cell Monographs).
- Kim, Hyun Uk; van Oostende, Chloë; Basset, Gilles J. C.; Browse, John (2008): The AAE14 gene encodes the Arabidopsis o-succinylbenzoyl-CoA ligase that is essential for phylloquinone synthesis and photosystem-I function. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 54 (2), S. 272–283. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03416.x.
- Kim, Jung-Ja P.; Miura, Retsu (2004): Acyl-CoA dehydrogenases and acyl-CoA oxidases: Structural basis for mechanistic similarities and differences. In: *Eur. J. Biochem.* (271), S. 483–493.
- Kim, P. K.; Hettema, E. H. (2015): Multiple pathways for protein transport to peroxisomes. In: *Journal of molecular biology* 427 (6 Pt A), S. 1176–1190. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.02.005.
- Kirsch, Jack F.; Eichele, Gregor; Ford, Geoffrey C.; Vincent, Michael G.; Jansonius, Johan N.; Gehring, Heinz; Christen, Philipp (1984): Mechanism of action of aspartate aminotransferase proposed on the basis of its spatial structure. In: *Journal of molecular biology* 174 (3), S. 497–525. DOI: 10.1016/0022-2836(84)90333-4.
- Knoblach, Barbara; Rachubinski, Richard A. (2010): Phosphorylation-dependent activation of peroxisome proliferator protein PEX11 controls peroxisome abundance. In: *The Journal of Biological Chemistry* 285 (9), S. 6670–6680. DOI: 10.1074/jbc.M109.094805.
- Kong, Fantao; Burlacot, Adrien; Liang, Yuanxue; Légeret, Bertrand; Alseekh, Saleh; Brotman, Yariv et al. (2018a): Interorganelle Communication: Peroxisomal MALATE DEHYDROGENASE2 Connects Lipid Catabolism to Photosynthesis through Redox Coupling in *Chlamydomonas*. In: *The Plant cell* 30 (8), S. 1824–1847. DOI: 10.1105/tpc.18.00361.
- Kong, Fantao; Liang, Yuanxue; Légeret, Bertrand; Beyly-Adriano, Audrey; Blangy, Stéphanie; Haslam, Richard P. et al. (2017): *Chlamydomonas* carries out fatty acid β -oxidation in ancestral peroxisomes using a bona fide acyl-CoA oxidase. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 90 (2), S. 358–371. DOI: 10.1111/tpj.13498.

- Kong, Fantao; Romero, Ismael Torres; Warakanont, Jaruswan; Li-Beisson, Yonghua (2018b): Lipid catabolism in microalgae. In: *The New phytologist* 218 (4), S. 1340–1348. DOI: 10.1111/nph.15047.
- Kornberg, H. L.; Krebs, H. A. (1957): Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle. In: *Nature* 179 (4568), S. 988–991. DOI: 10.1038/179988a0.
- Kornberg, H. L.; Madsen, N. B. (1958): The metabolism of C2 compounds in microorganisms. 3. Synthesis of malate from acetate via the glyoxylate cycle. In: *The Biochemical journal* 68 (3), S. 549–557. DOI: 10.1042/bj0680549.
- Krogh, Anders; Larsoon, Björn; Heijne, Gunnar von; Sonnhammer, Erik L. L. (2001): Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. In: *Journal of molecular biology* 305 (3), S. 567–580. Online verfügbar unter <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283600943158>.
- Kroth, Peter G.; Chiovitti, Anthony; Gruber, Ansgar; Martin-Jezequel, Veronique; Mock, Thomas; Parker, Micaela Schnitzler et al. (2008): A model for carbohydrate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* deduced from comparative whole genome analysis. In: *PloS one* 3 (1), e1426. DOI: 10.1371/journal.pone.0001426.
- Kunze, Markus; Berger, Johannes (2015): The similarity between N-terminal targeting signals for protein import into different organelles and its evolutionary relevance. In: *Frontiers in physiology* 6, S. 259. DOI: 10.3389/fphys.2015.00259.
- Kunze, Markus; Hartig, Andreas (2013): Permeability of the peroxisomal membrane: lessons from the glyoxylate cycle. In: *Front. Physiol.* 4, S. 204. DOI: 10.3389/fphys.2013.00204.
- Kunze, Markus; Malkani, Naila; Maurer-Stroh, Sebastian; Wiesinger, Christoph; Schmid, Johannes A.; Berger, Johannes (2015): Mechanistic insights into PTS2-mediated peroxisomal protein import: the co-receptor PEX5L drastically increases the interaction strength between the cargo protein and the receptor PEX7. In: *Journal of Biological Chemistry* 290 (8), S. 4928–4940. DOI: 10.1074/jbc.M114.601575.
- Kunze, Markus; Pracharoenwattana, Itsara; Smith, Steven M.; Hartig, Andreas (2006): A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. In: *Biochimica et biophysica acta* 1763 (12), S. 1441–1452. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.09.009.

- Lamberto, Ilaria; Percudani, Riccardo; Gatti, Rita; Folli, Claudia; Petrucco, Stefania (2010): Conserved Alternative Splicing of Arabidopsis Transthyretin-Like Determines Protein Localization and S-Allantoin Synthesis in Peroxisomes. In: *The Plant cell* (22), S. 1564–1574.
- Lata, G. F.; Mamrak, F.; Bloch, P.; Baker, B. (1977): An electron microscopic and enzymic study of rat liver peroxisomal nucleoid core and its association with urate oxidase. In: *Journal of Supramolecular Structure* 7 (3-4), S. 419–434. DOI: 10.1002/jss.400070313.
- Lauersen, Kyle J.; Willamme, Rémi; Coosemans, Nadine; Joris, Marine; Kruse, Olaf; Remacle, Claire (2016): Peroxisomal microbodies are at the crossroads of acetate assimilation in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Algal Research* 16, S. 266–274. DOI: 10.1016/j.algal.2016.03.026.
- Lazarow, P. B.; Fujiki, Y. (1985): Biogenesis of peroxisomes. In: *Annu. Rev. Cell. Biol.* 1 (1), S. 489–530. DOI: 10.1146/annurev.cb.01.110185.002421.
- Liu, Xiaojuan; Hempel, Franziska; Stork, Simone; Bolte, Kathrin; Moog, Daniel; Heimerl, Thomas et al. (2016): Addressing various compartments of the diatom model organism *Phaeodactylum tricornutum* via sub-cellular marker proteins. In: *Algal Research* 20, S. 249–257. DOI: 10.1016/j.algal.2016.10.018.
- Lodhi, Irfan J.; Wei, Xiaochao; Yin, Li; Feng, Chu; Adak, Sangeeta; Abou-Ezzi, Grazia et al. (2015): Peroxisomal lipid synthesis regulates inflammation by sustaining neutrophil membrane phospholipid composition and viability. In: *Cell metabolism* 21 (1), S. 51–64. DOI: 10.1016/j.cmet.2014.12.002.
- Lodhi, Irfan J.; Yin, Li; Jensen-Urstad, Anne P. L.; Funai, Katsuhiko; Coleman, Trey; Baird, John H. et al. (2012): Inhibiting adipose tissue lipogenesis reprograms thermogenesis and PPAR γ activation to decrease diet-induced obesity. In: *Cell metabolism* 16 (2), S. 189–201. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.06.013.
- Long, J. J.; Wang, J. L.; Berry, J. O. (1994): Cloning and analysis of the C4 photosynthetic NAD-dependent malic enzyme of amaranth mitochondria. In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (4), S. 2827–2833. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)42017-5.
- Ludewig-Klingner, Ann-Kathrin; Michael, Victoria; Jarek, Michael; Brinkmann, Henner; Petersen, Jörn (2017): Distribution and Evolution of Peroxisomes in Alveolates

- (Apicomplexa, Dinoflagellates, Ciliates). In: *Genome biology and evolution* 10 (1), S. 1–13. DOI: 10.1093/gbe/evx250.
- Maier, U. G.; Douglas, S. E.; Cavalier-Smith, T. (2000): The nucleomorph genomes of cryptophytes and chlorarachniophytes. In: *Protist* 151 (2), S. 103–109. DOI: 10.1078/1434-4610-00011.
- Mann, Vincent M.; Nwosu, Victor U.; Silcox, Anne; Jones, Carolyn J.P.; Burdett, Keit; Connock, Martin J. (1992): Association of monoamine oxidase and malate dehydrogenase with liver peroxisomes of genetically obese (*ob/ob* and *db/db*) mice. In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 102 (3), S. 561–571. DOI: 10.1016/0305-0491(92)90048-V.
- Markham, Paul; Collinge, Annette J. (1987): Woronin bodies of filamentous fungi. In: *FEMS Microbiology Reviews* 46 (1), S. 1–11.
- Marter, Pia; Schmidt, Sebastian; Kiontke, Stephan; Moog, Daniel (2020): Optimized mRuby3 is a Suitable Fluorescent Protein for in vivo Co-localization Studies with GFP in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Protist* 171 (1), S. 125715. DOI: 10.1016/j.protis.2020.125715.
- Maurino, Veronica G.; Engqvist, Martin K. M. (2015): 2-Hydroxy Acids in Plant Metabolism. In: *arbo.j* 13, e0182. DOI: 10.1199/tab.0182.
- Mayerhofer, Peter U. (2016): Targeting and insertion of peroxisomal membrane proteins: ER trafficking versus direct delivery to peroxisomes. In: *Biochimica et biophysica acta* 1863 (5), S. 870–880. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.09.021.
- McCammon, M. T.; Veenhuis, M.; Trapp, S. B.; Goodman, J. M. (1990): Association of glyoxylate and beta-oxidation enzymes with peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Journal of bacteriology* 172 (10), S. 5816–5827. DOI: 10.1128/jb.172.10.5816-5827.1990.
- McFadden, Geoffrey I. (2014): Apicoplast. In: *Current biology : CB* 24 (7), R262-3. DOI: 10.1016/j.cub.2014.01.024.
- Meinecke, Michael; Bartsch, Philipp; Wagner, Richard (2016): Peroxisomal protein import pores. In: *Biochimica et biophysica acta* 1863 (5), S. 821–827. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.10.013.

-
- Meinecke, Michael; Cizmowski, Christian; Schliebs, Wolfgang; Krüger, Vivien; Beck, Sabrina; Wagner, Richard; Erdmann, Ralf (2010): The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. In: *Nature cell biology* 12 (3), S. 273–277. DOI: 10.1038/ncb2027.
- Melkonian, Michael (1996): Phylogeny of photosynthetic protists and their plastids. In: *Verhandlungen-deutschen zoologischen Gesellschaft* 89, S. 71–96.
- Merchant, Sabeeha S.; Prochnik, Simon E.; Vallon, Olivier; Harris, Elizabeth H.; Karpowicz, Steven J.; Witman, George B. et al. (2007): The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. In: *Science (New York, N.Y.)* 318 (5848), S. 245–250. DOI: 10.1126/science.1143609.
- Mereschkowsky, Constantin (1905): Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. In: *Biologisches Centralblatt* 25, S. 293–604. Online verfügbar unter <https://ci.nii.ac.jp/naid/10020710100/>.
- Michels, Paul A. M.; Moyersoer, Juliette; Krazy, Hanane; Galland, Nathalie; Herman, Murielle; Hannaert, Véronique (2005): Peroxisomes, glyoxysomes and glycosomes (review). In: *Molecular membrane biology* 22 (1-2), S. 133–145. DOI: 10.1080/09687860400024186.
- Mix, Ann-Kathrin (2017): Charakterisierung der Peroxisomen von *Guillardia theta* mittels heterologen Lokalisationsstudien in *Phaedactylum tricornutum* und in silico Identifizierung putativer Peroxine der Chromalveolata. Bachelorarbeit.
- Mix, Ann-Kathrin; Cenci, Ugo; Heimerl, Thomas; Marter, Pia; Wirkner, Marie-Louise; Moog, Daniel (2018): Identification and Localization of Peroxisomal Biogenesis Proteins Indicates the Presence of Peroxisomes in the Cryptophyte *Guillardia theta* and Other "Chromalveolates". In: *Genome biology and evolution* 10 (10), S. 2834–2852. DOI: 10.1093/gbe/evy214.
- Mohanty, Abhishek; McBride, Heidi M. (2013): Emerging roles of mitochondria in the evolution, biogenesis, and function of peroxisomes. In: *Front. Physiol.* 4, S. 268. DOI: 10.3389/fphys.2013.00268.
- Möller, S.; Croning, M. D.; Apweiler, R. (2001): Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. In: *Bioinformatics* 17 (7), S. 646–653. DOI: 10.1093/bioinformatics/17.7.646.

- Moog, Daniel; Przyborski, Jude M.; Maier, Uwe G. (2017): Genomic and Proteomic Evidence for the Presence of a Peroxisome in the Apicomplexan Parasite *Toxoplasma gondii* and Other Coccidia. In: *Genome biology and evolution* 9 (11), S. 3108–3121. DOI: 10.1093/gbe/evx231.
- Moog, Daniel; Schmitt, Johanna; Senger, Jana; Zarzycki, Jan; Rexer, Karl-Heinz; Linne, Uwe et al. (2019): Using a marine microalga as a chassis for polyethylene terephthalate (PET) degradation. In: *Microbial cell factories* 18 (1), S. 171. DOI: 10.1186/s12934-019-1220-z.
- Motley, A. M.; Hetteema, E. H.; Ketting, R.; Plasterk, R.; Tabak, H. F. (2000): *Caenorhabditis elegans* has a single pathway to target matrix proteins to peroxisomes. In: *EMBO reports* 1 (1), S. 40–46. DOI: 10.1093/embo-reports/kvd010.
- Moyersoen, Juliette; Choe, Jungwoo; Fan, Erkang; Hol, Wim G. J.; Michels, Paul A. M. (2004): Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target. In: *FEMS Microbiology Reviews* 28 (5), S. 603–643. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.06.004.
- Nakamura, Yoshiko; Kanakagiri, Saradadevi; Van, Kyujung; He, Wei; Spalding, Martin H. (2005): Disruption of the glycolate dehydrogenase gene in the high-CO₂-requiring mutant HCR89 of *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Can. J. Bot.* 83 (7), S. 820–833. DOI: 10.1139/b05-067.
- Nelson, Edward B.; Tolbert, N. E. (1970): Glycolate dehydrogenase in green algae. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 141 (1), S. 102–110. DOI: 10.1016/0003-9861(70)90112-8.
- Neuberger, Georg; Maurer-Stroh, Sebastian; Eisenhaber, Birgit; Hartig, Andreas; Eisenhaber, Frank (2003a): Motif Refinement of the Peroxisomal Targeting Signal 1 and Evaluation of Taxon-specific Differences. In: *Journal of molecular biology* 328 (3), S. 567–579. DOI: 10.1016/S0022-2836(03)00318-8.
- Neuberger, Georg; Maurer-Stroh, Sebastian; Eisenhaber, Birgit; Hartig, Andreas; Eisenhaber, Frank (2003b): Prediction of Peroxisomal Targeting Signal 1 Containing Proteins from Amino Acid Sequence. In: *Journal of molecular biology* 328 (3), S. 581–592. DOI: 10.1016/S0022-2836(03)00319-X.

- Nishino, Tomoko; Okamoto, Ken; Eger, Bryan T.; Pai, Emil F.; Nishino, Takeshi (2008): Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. In: *The FEBS journal* 275 (13), S. 3278–3289. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06489.x.
- Nito, Kazumasa; Kamigaki, Akane; Kondo, Maki; Hayashi, Makoto; Nishimura, Mikio (2007): Functional classification of Arabidopsis peroxisome biogenesis factors proposed from analyses of knockdown mutants. In: *Plant & cell physiology* 48 (6), S. 763–774. DOI: 10.1093/pcp/pcm053.
- Nogales, J.; Guijo, M. I.; Quesada, A.; Merchán, F. (2004): Functional analysis and regulation of the malate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Planta* 219 (2), S. 325–331. DOI: 10.1007/s00425-004-1223-8.
- Nonoyama, Tomomi; Kazamia, Elena; Nawaly, Hermanus; Gao, Xia; Tsuji, Yoshinori; Matsuda, Yusuke et al. (2019): Metabolic Innovations Underpinning the Origin and Diversification of the Diatom Chloroplast. In: *Biomolecules* 9 (8). DOI: 10.3390/biom9080322.
- Nötzel, Christopher; Lingner, Thomas; Klingenberg, Heiner; Thoms, Sven (2016): Identification of New Fungal Peroxisomal Matrix Proteins and Revision of the PTS1 Consensus. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 17 (10), S. 1110–1124. DOI: 10.1111/tra.12426.
- Nowack, Eva C. M.; Price, Dana C.; Bhattacharya, Debashish; Singer, Anna; Melkonian, Michael; Grossman, Arthur R. (2016): Gene transfers from diverse bacteria compensate for reductive genome evolution in the chromatophore of *Paulinella chromatophora*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (43), S. 12214–12219. DOI: 10.1073/pnas.1608016113.
- Opperdoes, Fred R.; Borst, Piet (1977): Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. In: *FEBS letters* 80 (2), S. 360–364.
- Osumi, Takashi; Tsukamoto, Toshiro; Hata, Shingo; Yokota, Sadaki; Miura, Satoshi; Fujiki, Yukio et al. (1991): Amino-terminal presequence of the precursor of peroxisomal 3-

- ketoacyl-CoA thiolasa is a cleavable signal peptide for peroxisomal targeting. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 181 (3), S. 947–954.
- Otera, Hidenori; Setoguchi, Kiyoko; Hamasaki, Maho; Kumashiro, Toshitaka; Shimizu, Nobuhiro; Fujiki, Yukio (2002): Peroxisomal targeting signal receptor Pex5p interacts with cargoes and import machinery components in a spatiotemporally differentiated manner: conserved Pex5p WXXXF/Y motifs are critical for matrix protein import. In: *Molecular and cellular biology* 22 (6), S. 1639–1655. DOI: 10.1128/MCB.22.6.1639-1655.2002.
- Paight, Christopher; Slamovits, Claudio H.; Saffo, Mary Beth; Lane, Christopher E. (2019): Nephromyces Encodes a Urate Metabolism Pathway and Predicted Peroxisomes, Demonstrating That These Are Not Ancient Losses of Apicomplexans. In: *Genome biology and evolution* 11 (1), S. 41–53. DOI: 10.1093/gbe/evy251.
- Pan, Ronghui; Liu, Jun; Wang, Saisai; Hu, Jianping (2020): Peroxisomes: versatile organelles with diverse roles in plants. In: *The New phytologist* 225 (4), S. 1410–1427. DOI: 10.1111/nph.16134.
- Park, Jeong-Jin; Wang, Hongxia; Gargouri, Mahmoud; Deshpande, Rahul R.; Skepper, Jeremy N.; Holguin, F. Omar et al. (2015): The response of *Chlamydomonas reinhardtii* to nitrogen deprivation: a systems biology analysis. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 81 (4), S. 611–624. DOI: 10.1111/tpj.12747.
- Petersen, Thomas Nordahl; Brunak, Søren; Heijne, Gunnar von; Nielsen, Henrik (2011): SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. In: *Nat Methods* 8 (10), S. 785–786. DOI: 10.1038/nmeth.1701.
- Petriv, Oleh I.; Tang, Ling; Titorenko, Vladimir I.; Rachubinski, Richard A. (2004): A new definition for the consensus sequence of the peroxisome targeting signal type 2. In: *Journal of molecular biology* 341 (1), S. 119–134. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.05.064.
- Pick, Thea R.; Bräutigam, Andrea; Schulz, Matthias A.; Obata, Toshihiro; Fernie, Alisdair R.; Weber, Andreas P. M. (2013): PLGG1, a plastidic glycolate glycerate transporter, is required for photorespiration and defines a unique class of metabolite transporters. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (8), S. 3185–3190. DOI: 10.1073/pnas.1215142110.

- Pieuchot, Laurent; Jedd, Gregory (2012): Peroxisome Assembly and Functional Diversity in Eukaryotic Microorganisms. In: *Annu. Rev. Microbiol.* (66), S. 237–263.
- Platta, Harald W.; Erdmann, Ralf (2007): Peroxisomal dynamics. In: *Trends in cell biology* 17 (10), S. 474–484. DOI: 10.1016/j.tcb.2007.06.009.
- Platta, Harald W.; Hagen, Stefanie; Reidick, Christina; Erdmann, Ralf (2014): The peroxisomal receptor dislocation pathway: to the exportomer and beyond. In: *Biochimie* 98, S. 16–28. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.12.009.
- Poirier, Yves; Antonenkov, Vasily D.; Glumoff, Tuomo; Hiltunen, J. Kalervo (2006): Peroxisomal beta-oxidation--a metabolic pathway with multiple functions. In: *Biochimica et biophysica acta* 1763 (12), S. 1413–1426. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.08.034.
- Praefcke, Gerrit J. K.; McMahon, Harvey T. (2004): The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (2), S. 133–147. DOI: 10.1038/nrm1313.
- Prasad, Devi P. V. (1983): Hypoxanthine and allantoin as nitrogen sources for the growth of some freshwater green algae. In: *New Phytol.* 83, S. 575–580.
- Raap, Luisa (2018): Lokalisation von peroxisomalen Matrixproteinen aus *Guillardia theta* in *Phaeodactylum tricornutum*. Bachelorarbeit.
- Reumann, Sigrun (2013): Biosynthesis of vitamin K1 (phylloquinone) by plant peroxisomes and its integration into signaling molecule synthesis pathways. In: *Sub-cellular biochemistry* 69, S. 213–229. DOI: 10.1007/978-94-007-6889-5_12.
- Reumann, Sigrun; Babujee, Lavanya; Ma, Changle; Wienkoop, Stephanie; Siemsen, Tanja; Antonicelli, Gerardo E. et al. (2007): Proteome Analysis of Arabidopsis Leaf Peroxisomes Reveals Novel Targeting Peptides, Metabolic Pathways, and Defense Mechanisms. In: *The Plant cell* 19 (10), S. 3170–3193.
- Reumann, Sigrun; Bartel, Bonnie (2016): Plant peroxisomes: recent discoveries in functional complexity, organelle homeostasis, and morphological dynamics. In: *Current opinion in plant biology* 34, S. 17–26. DOI: 10.1016/j.pbi.2016.07.008.

- Reumann, Sigrun; Buchwald, Daniela; Lingner, Thomas (2012): PredPlantPTS1: A Web Server for the Prediction of Plant Peroxisomal Proteins. In: *Frontiers in plant science* 3, S. 194. DOI: 10.3389/fpls.2012.00194.
- Reumann, Sigrun; Ma, Changle; Lemke, Steffen; Babujee, Lavanya (2004): AraPeroX. A database of putative Arabidopsis proteins from plant peroxisomes. In: *Plant physiology* 136 (1), S. 2587–2608. DOI: 10.1104/pp.104.043695.
- Reumann, Sigrun; Quan, Sheng; Aung, Kyaw; Yang, Pingfang; Manandhar-Shrestha, Kalpana; Holbrook, Danielle et al. (2009): In-Depth Proteome Analysis of Arabidopsis Leaf Peroxisomes Combined with in vivo Subcellular Targeting Verification Indicates Novel Metabolic and Regulatory Functions of Peroxisomes. In: *Plant physiology* 150, S. 125–143.
- Rhodin, Johannes (1954): Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. In: *Doctoral Thesis., Karolinska Institutet, Stockholm, Aktiebolaget Godvil* 1. Online verfügbar unter <https://ci.nii.ac.jp/naid/20000957461/>.
- Robin, Guillaume P.; Kleemann, Jochen; Neumann, Ulla; Cabre, Lisa; Dallery, Jean-Félix; Lapalu, Nicolas; O'Connell, Richard J. (2018): Subcellular Localization Screening of Colletotrichum higginsianum Effector Candidates Identifies Fungal Proteins Targeted to Plant Peroxisomes, Golgi Bodies, and Microtubules. In: *Frontiers in plant science* 9, S. 562. DOI: 10.3389/fpls.2018.00562.
- Rolland, Norbert; Bouchnak, Imen; Moyet, Lucas; Salvi, Daniel; Kuntz, Marcel (2018): The Main Functions of Plastids. In: *Plastids: Humana Press, New York, NY*, S. 73–85.
- Rottensteiner, Hanspeter; Stein, Katharina; Sonnenhol, Eike; Erdmann, Ralf (2003): Conserved function of pex11p and the novel pex25p and pex27p in peroxisome biogenesis. In: *Molecular biology of the cell* 14 (10), S. 4316–4328. DOI: 10.1091/mbc.e03-03-0153.
- Rucktäschel, Robert; Girzalsky, Wolfgang; Erdmann, Ralf (2011): Protein import machineries of peroxisomes. In: *Biochimica et biophysica acta* 1808 (3), S. 892–900. DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.07.020.

- Sadali, Najiah M.; Sowden, Robert G.; Ling, Qihua; Jarvis, R. Paul (2019): Differentiation of chromoplasts and other plastids in plants. In: *Plant cell reports* 38 (7), S. 803–818. DOI: 10.1007/s00299-019-02420-2.
- Sagan, Lynn (1967): On the origin of mitosing cells. In: *Journal of Theoretical Biology* 14 (3), 225–274. DOI: 10.1016/0022-5193(67)90079-3.
- Saleem, Ramsey A.; Knoblach, Barbara; Mast, Fred D.; Smith, Jennifer J.; Boyle, John; Dobson, C. Melissa et al. (2008): Genome-wide analysis of signaling networks regulating fatty acid-induced gene expression and organelle biogenesis. In: *The Journal of cell biology* 181 (2), S. 281–292. DOI: 10.1083/jcb.200710009.
- Sandalio, Luisa M.; Peláez-Vico, Maria Angeles; Molina-Moya, Eliana; Romero-Puertas, Maria C. (2021): Peroxisomes as redox-signaling nodes in intracellular communication and stress responses. In: *Plant physiology* 186 (1), S. 22–35. DOI: 10.1093/plphys/kiab060.
- Sano, S.; Ueda, M.; Kitajima, S.; Takeda, T.; Shigeoka, S.; Kurano, N. et al. (2001): Characterization of ascorbate peroxidases from unicellular red alga *Galdieria partita*. In: *Plant & cell physiology* 42 (4), S. 433–440. DOI: 10.1093/pcp/pce054.
- Schaffner, W.; Weissmann, C. (1973): A Rapid, Sensitive, and Specific Method for the Determination of Protein in Dilute Solution. In: *Analytical Biochemistry* (56), S. 502–514. DOI: 10.1016/0003-2697(73)90217-0.
- Schimper, Andreas Franz Wilhelm (1883): Ueber die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. In: *Botanische Zeitung* 41, 105-114; 121-131; 137-141; 153-162.
- Schliebs, W.; Saidowsky, J.; Agianian, B.; Dodt, G.; Herberg, F. W.; Kunau, W. H. (1999): Recombinant human peroxisomal targeting signal receptor PEX5. Structural basis for interaction of PEX5 with PEX14. In: *The Journal of Biological Chemistry* 274 (9), S. 5666–5673. DOI: 10.1074/jbc.274.9.5666.
- Schlüter, Agatha; Fourcade, Stéphane; Ripp, Raymond; Mandel, Jean Louis; Poch, Olivier; Pujol, Aurora (2006): The evolutionary origin of peroxisomes: an ER-peroxisome connection. In: *Molecular biology and evolution* 23 (4), S. 838–845. DOI: 10.1093/molbev/msj103.
- Schnarrenberger, Claus; Martin, William (2002): Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants. A case study of endosymbiotic gene

- transfer. In: *European journal of biochemistry* 269 (3), S. 868–883. DOI: 10.1046/j.0014-2956.2001.02722.x.
- Schrader, Michael; Fahimi, H. Dariush (2008): The peroxisome: still a mysterious organelle. In: *Histochemistry and cell biology* 129 (4), S. 421–440. DOI: 10.1007/s00418-008-0396-9.
- Seal, S. N.; Rose, Z. B. (1987): Characterization of a phosphoenzyme intermediate in the reaction of phosphoglycolate phosphatase. In: *Journal of Biological Chemistry* 262 (28), S. 13496–13500. DOI: 10.1016/s0021-9258(19)76454-0.
- Shigeoka, Shigeru; Ishikawa, Takahiro; Tamoi, Masahiro; Miyagawa, Yoshiko; Takeda, Toru; Yabuta, Yukinori; Yoshimura, Kazuya (2002): Regulation and Function of Ascorbate Peroxidase Isoenzymes. In: *Journal of experimental botany* 53 (53), S. 1305–1319.
- Shinozaki, Akiko; Sato, Nagisa; Hayashi, Yasuko (2009): Peroxisomal targeting signals in green algae. In: *Protoplasma* 235 (1-4), S. 57–66. DOI: 10.1007/s00709-009-0031-1.
- Smith, Jennifer J.; Aitchison, John D. (2013): Peroxisomes take shape. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 14 (12), S. 803–817. DOI: 10.1038/nrm3700.
- Smith, Jennifer J.; Marelli, Marcello; Christmas, Rowan H.; Vizeacoumar, Franco J.; Dilworth, David J.; Ideker, Trey et al. (2002): Transcriptome profiling to identify genes involved in peroxisome assembly and function. In: *The Journal of cell biology* 158 (2), S. 259–271. DOI: 10.1083/jcb.200204059.
- Smith, Sarah R.; Abbriano, Raffaella M.; Hildebrand, Mark (2012): Comparative analysis of diatom genomes reveals substantial differences in the organization of carbon partitioning pathways. In: *Algal Research* 1 (1), S. 2–16. DOI: 10.1016/j.algal.2012.04.003.
- Stabenau, H. (1976): Microbodies from spirogyra: organelles of a filamentous alga similar to leaf peroxisomes. In: *Plant physiology* 58 (5), S. 693–695. DOI: 10.1104/pp.58.5.693.
- Stabenau, H.; Winkler, U.; Säftel, W. (1984): Enzymes of β -Oxidation in Different Types of Algal Microbodies. In: *Plant physiology* (75), S. 531–533.
- Stabenau, H.; Winkler, U.; Säftel, W. (1989): Compartmentalization of Peroxisomal Enzymes in Algae of the Group of Prasinophyceae. In: *Plant physiology* (90), S. 754–759.
- Stabenau, Helmut; Winkler, Uwe (2005): Glycolate metabolism in green algae. In: *Physiologia Plantarum* 123 (3), S. 235–245. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2005.00442.x.

- Stehlik, Thorsten; Kremp, Marco; Kahnt, Jörg; Bölker, Michael; Freitag, Johannes (2020): Peroxisomal targeting of a protein phosphatase type 2C via mitochondrial transit. In: *Nature communications* 11 (1), S. 2355. DOI: 10.1038/s41467-020-16146-3.
- Stoebe, Bettina; Maier, Uwe-G (2002): One, two, three: nature's tool box for building plastids. In: *Protoplasma* 219 (3-4), S. 123–130. DOI: 10.1007/s007090200013.
- Stork, Simone; Moog, Daniel; Przyborski, Jude M.; Wilhelmi, Ilka; Zauner, Stefan; Maier, Uwe G. (2012): Distribution of the SELMA translocon in secondary plastids of red algal origin and predicted uncoupling of ubiquitin-dependent translocation from degradation. In: *Eukaryotic Cell* 11 (12), S. 1472–1481. DOI: 10.1128/EC.00183-12.
- Stukenberg, Daniel; Zauner, Stefan; Dell'Aquila, Gianluca; Maier, Uwe G. (2018): Optimizing CRISPR/Cas9 for the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Frontiers in plant science* 9, S. 740. DOI: 10.3389/fpls.2018.00740.
- Sweetlove, Lee J.; Beard, Katherine F. M.; Nunes-Nesi, Adriano; Fernie, Alisdair R.; Ratcliffe, R. George (2010): Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. In: *Trends in plant science* 15 (8), S. 462–470. DOI: 10.1016/j.tplants.2010.05.006.
- Swinkels, Bart W.; Gould, Stephen J.; Bodnar, Andrea G.; Rachubinski, Richard A.; Subramani, Suresh (1991): A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. In: *The EMBO Journal* 10 (11), S. 3255–3262.
- Takeda, T.; Yoshimura, K.; Ishikawa, T.; Shigeoka, S. (1998): Purification and characterization of ascorbate peroxidase in *Chlorella vulgaris*. In: *Biochimie* 80 (4), S. 295–301.
- Takeda, Toru; Ishikawa, Takahiro; Shigeoka, Shigeru (1997): Metabolism of hydrogen peroxide by the scavenging system in *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Physiologia Plantarum* 99 (1), S. 49–55. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb03429.x.
- Tam, Yuen Yi C.; Fagarasanu, Andrei; Fagarasanu, Monica; Rachubinski, Richard A. (2005): Pex3p initiates the formation of a preperoxisomal compartment from a subdomain of the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280 (41), S. 34933–34939. DOI: 10.1074/jbc.M506208200.
- Tamaki, Shun; Mochida, Keiichi; Suzuki, Kengo (2021): Diverse Biosynthetic Pathways and Protective Functions against Environmental Stress of Antioxidants in Microalgae. In: *Plants (Basel, Switzerland)* 10 (6). DOI: 10.3390/plants10061250.

- Tesson, Benoit; Gaillard, Cedric; Martin-Jézéquel, Veronique (2009): Insights into the polymorphism of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. In: *botm* 52 (2), S. 104–116. DOI: 10.1515/BOT.2009.012.
- Thumuluri, Vineet; Almagro Armenteros, José Juan; Johansen, Alexander Rosenberg; Nielsen, Henrik; Winther, Ole (2022): DeepLoc 2.0: multi-label subcellular localization prediction using protein language models. In: *Nucleic Acids Res* 50 (W1), W228–34. DOI: 10.1093/nar/gkac278.
- Tie, Jian-Ke; Stafford, Darrel W. (2008a): Structure and function of Vitamin K epoxide reductase. *Vitamins and Hormones*. *Vitamins and Hormones*, Volume 78: Elsevier.
- Tie, Jian-Ke; Stafford, Darrel W. (2008b): Structure and Function of Vitamin K Epoxide Reductase. In: Gerald Litwack (Hg.): *Vitamin K*, Bd. 78. s.l.: Elsevier textbooks (*Vitamins and hormones*, v. 78), S. 103–130.
- Timm, Stefan; Florian, Alexandra; Jahnke, Kathrin; Nunes-Nesi, Adriano; Fernie, Alisdair R.; Bauwe, Hermann (2011): The hydroxypyruvate-reducing system in Arabidopsis: multiple enzymes for the same end. In: *Plant physiology* 155 (2), S. 694–705. DOI: 10.1104/pp.110.166538.
- Timm, Stefan; Nunes-Nesi, Adriano; Pärnik, Tiit; Morgenthal, Katja; Wienkoop, Stefanie; Keerberg, Olav et al. (2008): A cytosolic pathway for the conversion of hydroxypyruvate to glycerate during photorespiration in Arabidopsis. In: *The Plant cell* 20 (10), S. 2848–2859. DOI: 10.1105/tpc.108.062265.
- Todd, Christopher D.; Tipton, Peter A.; Blevins, Dale G.; Piedras, Pedro; Pineda, Manuel; Polacco, Joe C. (2006): Update on ureide degradation in legumes. In: *Journal of experimental botany* 57 (1), S. 5–12. DOI: 10.1093/jxb/erj013.
- Tolbert, N. E.; Essner, E. (1981): Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. In: *Journal of Cell Biology* 91 (3 Pt 2), 271s–283s. DOI: 10.1083/jcb.91.3.271s.
- Toney, Michael D. (2014): Aspartate aminotransferase: an old dog teaches new tricks. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 544, S. 119–127. DOI: 10.1016/j.abb.2013.10.002.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 (9), S. 4350–4354. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350.

- Tronconi, Marcos A.; Fahnenstich, Holger; Gerrard Weehler, Mariel C.; Andreo Carlos S.; Flügge, Ulf-Ingo; Drincovich, María F.; Maurino Verónica G. (2008): Arabidopsis NAD-Malic Enzyme Functions as a Homodimer and Heterodimer and Has a Major Impact on Nocturnal Metabolism. In: *Plant physiology* 146 (4), S. 1540–1552.
- Tsukada, H.; Mochizuki, Y.; Fujiwara, S. (1966): The nucleoids of rat liver cell microbodies. Fine structure and enzymes. In: *J Cell Biol* 28 (3), S. 449–460. DOI: 10.1083/jcb.28.3.449.
- van Zutphen, Tim; Baerends, Richard J. S.; Susanna, Kim A.; Jong, Anne de; Kuipers, Oscar P.; Veenhuis, Marten; van der Klei, Ida J. (2010): Adaptation of *Hansenula polymorpha* to methanol: a transcriptome analysis. In: *BMC Genomics* 11 (1), S. 1. DOI: 10.1186/1471-2164-11-1.
- Vasilev, Jana; Mix, Ann-Kathrin; Heimerl, Thomas; Maier, Uwe G.; Moog, Daniel (2022): Inferred Subcellular Localization of Peroxisomal Matrix Proteins of *Guillardia theta* Suggests an Important Role of Peroxisomes in Cryptophytes. In: *Front. Plant Sci.* 13, Artikel 889662. DOI: 10.3389/fpls.2022.889662.
- Wanders, Ronald J. A.; Brites, Pedro (2010): Biosynthesis of ether-phospholipids including plasmalogens, peroxisomes and human disease: new insights into an old problem. In: *Clinical Lipidology* 5 (3), S. 379–386. DOI: 10.2217/clp.10.16.
- Widhalm, Joshua R.; Ducluzeau, Anne-Lise; Buller, Nicole E.; Elowsky, Christian G.; Olsen, Laura J.; Basset, Gilles J. C. (2012): Phylloquinone (vitamin K(1)) biosynthesis in plants: two peroxisomal thioesterases of Lactobacillales origin hydrolyze 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 71 (2), S. 205–215. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2012.04972.x.
- Widhalm, Joshua R.; van Oostende, Chloë; Furt, Fabienne; Basset, Gilles J. C. (2009): A dedicated thioesterase of the Hotdog-fold family is required for the biosynthesis of the naphthoquinone ring of vitamin K1. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (14), S. 5599–5603. DOI: 10.1073/pnas.0900738106.
- Winkler, U.; Säftel, W.; Stabenau, H. (1988): β -Oxidation of fatty acids in algae: Localization of thiolase and acyl-CoA oxidizing enzymes in three different organisms. In: *Planta* 175 (1), S. 91–98. DOI: 10.1007/BF00402885.

- Yamaguchi, K.; Mori, H.; Nishimura, M. (1995): A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. In: *Plant & cell physiology* 36 (6), S. 1157–1162. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078862.
- Yoshida, Emi; Nakamura, Akimasa; Watanabe, Tadashi (2003): Reversed-phase HPLC determination of chlorophyll a' and naphthoquinones in photosystem I of red algae: existence of two menaquinone-4 molecules in photosystem I of *Cyanidium caldarium*. In: *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* 19 (7), S. 1001–1005. DOI: 10.2116/analsci.19.1001.
- Zaslavskaja, Lioudmila A.; Lippmeier, J. Casey; Kroth, Peter G.; Grossman, Arthur R.; Apt, Kirk E. (2000): Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. In: *Journal of phycology* 36 (2), S. 379–386. DOI: 10.1046/j.1529-8817.2000.99164.x.
- Zauner, Stefan; Heimerl, Thomas; Moog, Daniel; Maier, Uwe G. (2019): The Known, the New, and a Possible Surprise: A Re-Evaluation of the Nucleomorph-Encoded Proteome of Cryptophytes. In: *Genome biology and evolution* 11 (6), S. 1618–1629. DOI: 10.1093/gbe/evz109.

IX LEBENS LAUF

Aus Datenschutzgründen entfernt.

X DANKSAGUNG

Zu allererst möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Uwe-G. Maier für das Bereitstellen eines interessanten Promotionsthemas und die Möglichkeit meine Fachkompetenzen in seiner Arbeitsgruppe vertiefen zu können, bedanken. Vielen Dank für die konstruktiven Fachgespräche und das Erstellen des Erstgutachtens.

Mein Dank gilt zudem Prof. Dr. Batschauer für die Erstellung des Zweitgutachtens meiner Arbeit. Zudem möchte ich mich bei weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission Prof. Dr. Brune und Prof. Dr. Thanbichler bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Daniel Moog, der mich während meiner gesamten Promotionszeit aktiv bei allen Belangen beraten, unterstützt und motiviert hat. Vielen Dank für die Ausarbeitung eines interessanten Themas und der Bereitstellung bioinformatischer Daten. Vielen Dank für die Unterstützung bei der Veröffentlichung der Daten und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich möchte mich ebenfalls bei Dr. Stefan Zauner und der gesamten AG-Maier für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die tolle gemeinsame Zeit mit und ohne Kanutour, das Tischtennisturnier und nicht zu vergessen die beliebten Barbecues bedanken. Ein großer Dank an meine Kollegen Neri und Gianluca, die mich sowohl fachlich als auch mental während meiner Promotion unterstützt haben.

Des Weiteren möchte ich mich bei Marion Schön und Dr. Thomas Heimerl für die Vorbereitung von Zelldünnschnitten und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, Freunden und besonders bei meinem Lebenspartner Pascal für die außerordentliche mentale Unterstützung bedanken.

XI EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

Rolle und Funktion von Peroxisomen in der Cryptomonade *Guillardia theta*

selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe.

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

Marburg, den 15.12.2022

Jana Vasilev