

Deutsche Zusammenfassung

Der Basalapparat der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* besteht aus den beiden geißeltragenden Basalkörpern sowie aus zwei Probasalkörpern und assoziierten Fibrillen und Mikrotubuli. Der ultrastrukturelle Aufbau der Basalkörper stimmt weitgehend mit dem der Centriolen tierischer Centrosomen überein: Neun ringförmig angeordnete Mikrotubulitriplets bilden einen Zylinder von ca. 400 nm Länge. In Querschnitten lassen sich verschiedene Strukturen wie das „cartwheel“ im proximalen Bereich der Basalkörper oder die Sternstruktur in der Übergangsregion zur Geißel unterscheiden. Die beiden Basalkörper sind miteinander über Verbindungsfibrillen verbunden und durch die „transitional fibers“ an der Plasmamembran angeheftet. Ausgehend von den Basalkörpern verlaufen die sogenannten Geißelwurzeln ins Zellinnere. Sie verbinden den Basalapparat mit verschiedenen Zellorganellen und sind somit an der inneren Organisation der gesamten Zelle beteiligt. Da über die Proteinzusammensetzung der Basalapparate bisher wenig bekannt war, sollte in dieser Arbeit das Proteom der Basalapparate von *C. reinhardtii* näher charakterisiert werden.

Zur Identifikation der Proteine wurde zunächst eine Reinigungsmethode für Basalapparate von *C. reinhardtii* entwickelt. Die gereinigten Basalapparate wurden anschließend elektrophoretisch in einem 1D-SDS-PAGE aufgetrennt, das komplette Gel in 51 Banden zerschnitten und die Banden massenspektrometrisch analysiert. Dieser erste Ansatz lieferte insgesamt 1123 unterschiedliche Peptide. Die Peptide konnten 124 Genmodellen, aber auch EST-Einträgen sowie genomischen Positionen, an denen sich bisher keine Genmodelle befanden, zugeordnet werden. In einem 2. Ansatz wurde ein Basalapparat-Pellet nach dem MudPIT-Verfahren („multidimensional protein identification technology“) direkt – ohne vorherige elektrophoretische Auftrennung – untersucht. In diesem Ansatz wurden 450 Peptide in 295 Genmodellen identifiziert. Darüber hinaus wurden Basalapparate reproduzierbar mittels 2D-PAGE in ca. 60-75 Spots aufgetrennt.

Da zu diesem Zeitpunkt bereits eine Veröffentlichung des Proteoms der Basalkörper von *C. reinhardtii* vorlag (ebenfalls durch MudPIT ermittelt), war ein direkter Vergleich der jeweils identifizierten Genmodelle möglich. Der Vergleich der 295 mit dem MudPIT-Verfahren identifizierten Genmodelle mit dieser Veröffentlichung lieferte eine Liste von 35 z.T. bekannten (wie z.B. α - und β -Tubulin, Centrin) und neuen, potentiellen Basalapparatproteinen.

Im Folgenden wurden fünf dieser neuen, potentiellen Basalapparat-Proteine, die bei den unterschiedlichen Ansätzen (1D-Gel-Ansatz und MudPIT-Verfahren) mit mehreren Peptiden identifiziert worden waren, näher charakterisiert. Einer dieser Kandidaten ist

fälschlicherweise als mitochondrialer Translationsfaktor annotiert; hier wurden vermutlich zwei unterschiedliche Gene zu einem Modell zusammengefaßt. Für diesen Kandidaten wurde eine genomische Sequenzlücke geschlossen. Für die vier anderen Kandidaten wurden partielle cDNAs kloniert und zunächst sequenziert. Der Vergleich dieser Sequenzen mit den Genmodellen führte bei Kandidat 90 zur Entdeckung von zwei neuen Exons. Bei Kandidat 27 stellte sich heraus, dass Exon 6 um 42 bp länger ist als im Genmodell angegeben. Die cDNAs wurden in *E. coli* überexprimiert und die rekombinanten Proteine zur Erzeugung von polyklonalen Antikörpern in Kaninchen verwendet. In Western-Blots reagierten die Antikörper sowohl mit dem rekombinanten Protein der Bakterien als auch mit entsprechenden Proteinen in isolierten Basalapparaten. Drei der Proteine konnten mit Hilfe der Antikörper in der Immunfluoreszenzmikroskopie im Bereich des Basalapparates lokalisiert werden.

Englische Zusammenfassung/Abstract

The basal apparatus of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* consists of the two flagella-bearing basal bodies, two probasal bodies and numerous associated fibers and microtubules. The ultrastructure of the basal bodies bears resemblance to the centrioles found in animal centrosomes: nine microtubular triplets are arranged in a ring and form a cylinder with a length of about 400 nm. In cross-sections different structures like the cartwheel in the proximal region of the basal bodies or the stellate structure in the transition region towards the flagellum can be identified. The basal bodies are connected by connecting fibers and anchored to the plasmamembrane via the transitional fibers. From the basal bodies the so-called microtubular roots extend into the interior of the cell. They link the basal apparatus to different cell organelles and thus are involved in the internal organization of the entire cell. As rather little was known so far about the protein composition of the basal apparatus, the work presented here aimed at characterizing the proteome of the basal apparatus of *C. reinhardtii*.

To identify the proteins a purification method for the basal apparatus of *C. reinhardtii* was developed in a first step. The purified basal apparatus were then electrophoretically separated on a 1D-SDS-PAGE, the complete lane was cut into 51 slices and all slices were analyzed by mass spectrometry. This first approach resulted in 1123 different peptides. The peptides could be assigned to 124 gene models but also to EST-entries and genomic positions for which no gene models existed so far. In a second approach a basal apparatus pellet was directly analyzed by MudPIT (multidimensional protein identification technology) – without prior electrophoretic separation. In this approach 450 peptides in 295 gene models were identified. Furthermore basal apparatus were reproducibly separated into 60-75 spots via 2D-PAGE.

At this timepoint there was already a publication of the basal body proteom of *C. reinhardtii* (also determined by MudPIT) and therefore a direct comparison of the identified gene models was possible. Comparing the 295 gene models from the MudPIT- approach with this publication resulted in a list of 35 already known (like α - and β -tubulin, centrin) and new potential basal body proteins.

In the following five of these potential basal body proteins that had been identified with several peptides in the different approaches (1D-gel-approach and MudPIT-approaches) were further characterized. One of these candidates is wrongly annotated as mitochondrial translation factor; here two different genes were probably combined into one model.

For this candidate a genomic sequence gap was closed. For the other four candidates partial cDNAs were cloned and sequenced. The comparison of these sequences with the predicted gene models led – in the case of candidate 90 – to the identification of two new exons. Exon 6 of candidate 27 was found to be 42 bp longer than predicted in the gene model. The cDNAs were overexpressed in *E. coli* and the recombinant proteins were used to generate polyclonal antibodies in rabbits. In Western-Blot-analyses these antibodies not only detected the recombinant protein from the bacteria but also gave a signal on isolated basal apparatus. Three of the proteins could be localized to the basal apparatus in immunofluorescence-microscopy.