
Molekulargenetische und biochemische Charakterisierungen
redox-regulierter plastidärer Signal-Transduktionsmechanismen
in der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld.

Vorgelegt von
Jan H. Mußnug.

Bielefeld, Januar 2004

DANKSAGUNG

Vielen Dank allen, die mir durch ihre Unterstützung während der Arbeit geholfen haben.

Folgenden Personen möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen:

Meinen Eltern, Dr. C. Mußnug und Dr. H. Mußnug, für die Unterstützung, durch welche das Studium der Biologie möglich wurde.

Prof. Dr. G. H. Schmid und seiner Nachfolgerin, Prof.´in Dr. D. Staiger, für die Möglichkeit, am Lehrstuhl für molekulare Zellphysiologie der Universität Bielefeld forschen zu können.

PD Dr. O. Kruse für die ausgezeichnete betreuende Begleitung der Arbeit.

Dr. C. Schönfeld für Hilfen bei der Arbeit mit *Chlamydomonas*, insbesondere den *Mating*-Analysen, sowie für viele anregende Unterhaltungen, die maßgeblichen Anteil am guten Laborklima hatten.

R. Borgstädt für praktische Tipps und zahlreiche fruchtbare Diskussionen sowie L. Wobbe und den Diplomanden N. Motzkus, A. Kienast, S. Räker, M. Poppe und K. Bode für die gute Zusammenarbeit.

M. C. Hagenstein und Prof. Dr. N. Sewald sowie Prof. Dr. J. Mattay für die Zusammenarbeit im Forschungsschwerpunkt Kinase-Inhibitor H9.

A. Kapazoglou, M. Hamilton und Dr. P. J. Nixon sowie Dr. C. W. Mullineaux für die Bereitstellung der Mutante *Stm3* und ersten Vorarbeiten.

A. Fink und Dr. M. Hippler für die Zusammenarbeit bei 2D-Gelelektrophoresen und insbesondere für die Möglichkeit, diese Methodik bei einem kurzen Forschungsaufenthalt in Jena zu erlernen.

I. Elles und PD Dr. J. Nickelsen für die Zusammenarbeit bei RNA-Bindestudien.

Dr. U. Kahmann für die Anfertigung von elektronenmikroskopischen Bildern.

N. Küpper und HD Dr. K. Niehaus für MALDI-ToF-Analysen.

S. Klinnert für intensives Lesen sowie zahlreiche Korrekturvorschläge am Text.

S. Sahrhage für einige weitere Korrekturvorschläge am Text.

Prof.´in Dr. E. K. Pistorius und Dr. K. P. Michel für die Beantwortung vieler Fragen sowie den weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die angenehme kollegiale Zusammenarbeit.

Prof. Dr. K. J. Dietz für die Zusammenarbeit innerhalb der Forschergruppe.

Allen beteiligten, hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld, insbesondere des Lehrstuhls für Genetik, des Lehrstuhls für Biochemie und Physiologie der Pflanzen und des Lehrstuhls für Entwicklungsbiologie und molekulare Pathologie für die Bereitstellung von Geräten und der nötigen Expertise.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung finanzieller Mittel.

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und nur aufgeführte Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Alle vollständig oder teilweise aus der Literatur entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde weder vollständig noch teilweise einer anderen Fakultät zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Bielefeld, den 15. Januar 2004

Unterschrift _____

(Jan H. Mußnug)

ABKÜRZUNGEN

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Volumenbezogenes Massenprozent
1D / 2D	1-bzw. 2-dimensional
Å	Ångström
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A0	Chlorophyll des Photosystem I
A1	Phyllochinon des Photosystems I
A _{260/280nm}	Absorption bei 260 bzw. 280 nm
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat, p-Toluidinsalz
bidest.	Bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	Zyklisches AMP
cDNA	Complementary DNA
CF	Kopplungsfaktor
Chl	Chlorophyll
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CSD	Cold Shock Domain
Cyt	Cytochrom
Cyt-b ₆ f-Komplex	Cytochrom-b ₆ f-Komplex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxy-Nucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxy-Uridintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
EST	Expressed sequence tag
F _A	Protein des Photosystems I mit 4Fe-4S Komplex
F _B	Protein des Photosystems I mit 4Fe-4S Komplex
Fd	Ferredoxin
F _x	Polypeptid mit 4Fe-4S Zentrum des Photosystems I
Fm	Maximale Fluoreszenz

Fm'	Maximale Fluoreszenz unter Belichtung
Ft	Fluoreszenz unter Belichtung
Fv	Variable Fluoreszenz
GFP	Green fluorescent protein
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H9	N-(2-Aminoethyl)-5-isochinolinsulfonamid
H9-LPF	(S)-N-[Fluorescein-5(6)-carbonyl]-(4-benzoylphenyl)alanine-[8-(5-isochinolin-sulfonylamino)-3,6-diazaoct-1-yl]amid
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonsäure
HSM	High salt Medium, Minimalmedium
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
K	Kelvin
kg	Kilogramm
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LB _{Amp}	Luria-Bertani-Medium mit Ampicillin
LHC	Light harvesting complex, Lichtsammel-Komplex
LMS-PCR	Ligation mediated suppression PCR
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
M	Marker
mA	Milliampere
MALDI-ToF	Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight
Mbp	Millionen Basenpaare
MES	2-Morpholinoethan-sulfonsäure
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mRNA	Messenger RNA
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₃ -Citrat	Natriumcitrat
NAB1	Nucleic acid binding protein 1

NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NaF	Natriumfluorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumcarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	2,2' Di-p-nitrophenyl-5,5' diphenyl-3,3' [3,3' dimethoxy-4,4' diphenylene] ditetrazolium chloride
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NPQ	Nicht photochemische Fluoreszenzlöschung
o.D. _{600/750}	Optische Dichte bei 600 bzw. 750nm
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
OH [•]	Hydroxyl-Radikal
P680	Chlorophyllpigment 680 im Photosystem II
P700	Chlorophyllpigment 700 im Photosystem I
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pheo	Phäophytin
P _i	Phosphat
PS	Photosystem
Q _A	Plastochinon am D2 Protein im PS II
Q _B	Plastochinon am D1 Protein im PS II
Q _o	Plastochinol Bindestelle des Cyt-b ₆ -f-Komplexes
RRM	RNA Recognition Motif
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleotid-Protein
ROS	Reactive oxygen species, Reaktive Sauerstoff-Spezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR
SDS	Natriumdodecyl-Sulfat
Sek.	Sekunde
SSC	Natriumcitrat Salzlösung
Std.	Stunde(n)
Stm	LHCII state transitions-Mutante
Tab.	Tabelle
TAK	Thylakoid assoziierte Kinase in <i>A. thaliana</i>
TAP	Trisacetat-Phosphatpuffer
TBS	Tris-Puffer-Salzlösung
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	2-Amino-2-hydroxy-methylpropan-1,3,-diol

Tween	Polyoxyethylene-Sorbitan-Monolaurate
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp(s)
X-Gal	(5-bromo-4-chloro-3-indolyl)- β -D-galactosid

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 PHOTOSYNTHESE	2
1.1.1 Chloroplasten	2
1.1.2 Aufbau und Funktion der photosynthetischen Proteinkomplexe	4
1.1.2.1 Photosystem II	5
1.1.2.2 LHCI-Proteine	7
1.1.2.3 Cytochrom- b_6f -Komplex	10
1.1.2.4 Photosystem I	11
1.1.2.5 ATP-Synthase	13
1.2 ANPASSUNGSSTRATEGIEN PFLANZLICHER ORGANISMEN AN DEN UMWELTFAKTOR LICHT	15
1.2.1 Vermeidung von oxidativem Stress: Die Gefahr durch reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS)	15
1.2.1.1 Vermeidung von ROS	16
1.2.1.2 Detoxifikation von ROS	17
1.2.2 Reparatur geschädigter Moleküle	17
1.2.3 Einfluss von linearem und zyklischem Elektronentransport auf Redox- Homöostase und Energie-Haushalt: <i>LHC- state-transitions</i>	18
1.2.4 Protein-Phosphorylierung in photosynthetischen Zellen	20
1.2.4.1 Der Kinase-Inhibitor H9	21
1.3 DAS UNTERSUCHUNGSOBJEKT <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	21

2. MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 ZELLEN UND KULTIVIERUNGSMETHODEN	25
2.1.1 Verwendete <i>Escherichia-coli</i> -Bakterienstämme	25
2.1.2 Verwendete <i>Chlamydomonas-reinhardtii</i> -Stämme	25
2.1.2.1 Zellwachstum	26
2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	26
2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	26
2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	27
2.2.3 Isolierung von RNA aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	27
2.2.4 Restriktionsspaltung von DNA	27
2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten	27
2.2.6 Klonierungen von PCR-Fragmenten in den Vektor pGEM-T-Easy und Sequenzierungen	28
2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.2.7.1 Standard-PCR	28
2.2.7.2 Herstellung von spezifischen DNA-Sonden	29
2.2.8 Ligation mediated suppression-PCR (LMS-PCR)	29
2.2.9 Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR)	30
2.2.10 DNA-Hybridisierungsexperimente (<i>Southern-blots</i>)	31
2.2.11 Herstellung von <i>E.-coli</i> -Transformanten	31
2.2.11.1 Herstellung von elektroporations-kompetenten <i>E.-coli</i> -Zellen	31
2.2.11.2 Herstellung von hitzetransformations-kompetenten <i>E.-coli</i> -Zellen	32
2.2.11.3 Elektroporation	32
2.2.11.4 Hitzeschock-Transformation	32
2.2.12 Herstellung von <i>C.-reinhardtii</i> -Mutanten	33
2.2.12.1 Herstellung von Stm3	33
2.2.12.2 Co-Transformation mit p613 und pNab1 oder pNab2	33

2.2.13 Segregationsexperimente _____	34
2.2.14 Identifizierung des Nab1-Gens _____	34
2.2.14.1 <i>Screening</i> einer Phagenbank mit genomischen <i>C.-reinhardtii</i> -Fragmenten ____	34
2.2.14.2 Isolierung der Phagen-DNA _____	35
2.2.14.3 Restriktion, Subklonierung und Sequenzierung der DNA _____	35
2.2.15 Komplementierung der Mutante Stm3 _____	35
2.2.15.1 Herstellung der Komplementationsvektoren pNab1 und pNab2 _____	35
2.2.15.2 Herstellung und Identifizierung der komplementierten Mutante Stm3nc1 ____	36
2.2.16 Expression von rekombinantem, His-markierten NAB1-Protein in <i>E. coli</i> _____	36
2.2.17 Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen NAB1 _____	37
2.2.18 NAB1-RNA-Bindestudien _____	37
2.3 BIOCHEMISCHE METHODEN _____	38
2.3.1 Isolierung von <i>Chlamydomonas</i> -Thylakoiden _____	38
2.3.2 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes _____	38
2.3.3 1D-Gelelektrophoresen _____	38
2.3.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ____	38
2.3.3.1.1 Coomassie-Färbung _____	39
2.3.3.1.2 Silber-Färbung _____	39
2.3.3.2 Immuno- <i>blot</i> -Experimente _____	40
2.3.4 Untersuchung der LHC-Proteine _____	41
2.3.4.1 Phosphorylierung der LHCII-Proteine _____	41
2.3.4.1.1 Phosphorylierung <i>in vivo</i> _____	41
2.3.4.1.2 Phosphorylierung <i>in vitro</i> _____	41
2.3.4.2 1D-gelelektrophoretische Untersuchung der LHC-Expression _____	41
2.3.4.3 2D-gelelektrophoretische Untersuchung der LHC-Expression _____	42
2.3.5 Aufreinigung von NAB1 durch isoelektrische Fokussierung der löslichen <i>Chlamydomonas</i> -Proteine _____	42

2.3.6	Expressionsanalysen des Proteins NAB1 _____	42
2.3.6.1	Lokalisation von NAB1 _____	42
2.3.6.2	NAB1-Expression im Wachstumsverlauf _____	43
2.3.6.3	NAB1-Expression bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen _____	43
2.3.6.4	NAB1-Expression bei unterschiedlichen Lichtbedingungen _____	43
2.3.6.5	NAB1-Expression bei unterschiedlichen Lichtstärken _____	43
2.3.6.6	Expression von NAB1 in verschiedenen <i>C.-reinhardtii</i> -Linien _____	44
2.3.6.7	Post-translationale Modifikationen von NAB1 _____	44
2.3.7	Experimente mit dem Kinase-Inhibitor H9 und H9-Derivaten _____	44
2.3.7.1	Synthese von H9 und H9-Derivaten _____	44
2.3.7.2	Kovalente Bindung und Detektion von H9-LPF _____	44
2.3.7.3	Markierung verschiedener Kinasen mit H9-LPF _____	45
2.3.7.4	Detektion von Kreatinkinase in Thylakoid-Präparationen _____	45
2.3.7.5	Bestimmung der Selektivität der Fluoreszenzmarkierung _____	45
2.3.7.5.1	Denaturierung mit SDS _____	45
2.3.7.5.2	Test auf unspezifische Bindung von Teilkonstrukten von H9-LPF _____	45
2.3.8	MALDI-ToF-Analysen _____	45
2.4	BIOPHYSIKALISCHE METHODEN _____	46
2.4.1	Messungen der Chlorophyll-Fluoreszenz bei Raumtemperatur _____	46
2.4.1.1	Messungen der <i>LHC-state-transitions</i> bei RT _____	46
2.4.1.2	Chlorophyll-Fluoreszenzinduktion (Kautsky-Induktion) _____	46
2.4.1.3	Maximale Quantenausbeute von PSII (Fv/Fm) _____	46
2.4.1.4	Quantenausbeute von PSII (Φ_{PSII}) _____	47
2.4.2	Messungen der Chlorophyll-Fluoreszenz bei 77 K _____	47
2.4.3	Elektronenmikroskopische Aufnahmen _____	47
2.5	COMPUTER- UND DATENBANK-ANALYSEN _____	47

3. ERGEBNISSE	49
3.1 STRATEGIE I: UNTERSUCHUNGEN ZUM KINASE-INHIBITOR H9 UND H9-DERIVATEN	50
3.1.1 Vorversuche	50
3.1.2 Markierung unterschiedlicher Kinasen	51
3.1.3 Spezifität des Konstruktes H9-LPF	51
3.1.3.1 Denaturierung des ATP-Bindeproteins mit SDS	52
3.1.3.2 Bindungsanalyse von H9-LPF-Teilkonstrukten	52
3.1.4 Detektion von supplieder Kreatinkinase in Thylakoid-Präparationen	53
3.2 STRATEGIE II: ANALYSE DER NUKLEÄREN ZUFALLS-DNA-INSERTIONSMUTANTE STM3	56
3.2.1 Identifikation der Mutante Stm3	56
3.2.2 Fluoreszenzverhalten	56
3.2.2.1 Messungen bei Raumtemperatur	57
3.2.2.1.1 Messungen von <i>LHC-state-transitions</i> bei RT	57
3.2.2.1.2 Maximale Quantenausbeute von PSII (Fv/Fm)	58
3.2.2.1.3 Quantenausbeute von PSII (Φ PSII)	59
3.2.2.1.4 Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion bei Raumtemperatur	60
3.2.2.2 Messungen bei 77 K	62
3.2.2.2.1 Chlorophyll-Fluoreszenz unter <i>LHC-state-1</i> - und <i>LHC-state-2</i> -Bedingungen	62
3.2.3 Zellwachstum	63
3.2.4 Chlorophyll-Gehalt und -Zusammensetzung	65
3.2.4.1 Chlorophyll-Gehalt bei gleicher Zelldichte	65
3.2.4.2 Chlorophyll-a/b-Verhältnis	66
3.2.5 Untersuchung der LHC-Proteine	66
3.2.5.1 Phosphorylierung der LHC-Proteine <i>in vivo</i>	67
3.2.5.2 Phosphorylierung der LHC-Proteine <i>in vitro</i>	67

3.2.5.3	1D-gelelektrophoretische Analyse der LHC-Expression _____	69
3.2.5.4	2D-gelelektrophoretische Analyse der LHC-Expression _____	70
3.2.6	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von WT und Stm3 _____	71
3.2.7	Molekulargenetische Analysen der Mutante Stm3 _____	71
3.2.7.1	Ermittlung der Integrationshäufigkeit des Transformations-Plasmids durch <i>Southern-blot</i> -Analysen _____	72
3.2.7.2	Ermittlung des Integrationsortes des Transformations-Plasmids durch LMS- PCR _____	73
3.2.7.3	Identifikation des in Stm3 geschädigten Gens Nab1 _____	74
3.2.7.3.1	Isolierung eines Phagen mit dem genomischen Bereich des Integrationsortes	74
3.2.7.3.2	Restriktion, Subklonierung und Sequenzierung der genomischen DNA ____	75
3.2.7.3.3	Datenbank-Analysen _____	76
3.2.7.4	Komplementierung von Stm3 mit Nab1 _____	77
3.2.7.5	Vergleichende Analysen des NAB1- und des FRGY2-Proteins _____	80
3.2.7.6	Expression des NAB1-Proteins in <i>E. coli</i> und Herstellung von NAB1- Antikörpern _____	81
3.2.7.7	NAB1-RNA-Bindestudien _____	82
3.2.7.8	Expressionsanalysen des Proteins NAB1 _____	84
3.2.7.8.1	Lokalisation von NAB1 _____	84
3.2.7.8.2	NAB1-Expression im Wachstumsverlauf _____	84
3.2.7.8.3	NAB1-Expression bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen ____	85
3.2.7.8.4	NAB1-Expression bei unterschiedlichen Lichtbedingungen _____	85
3.2.7.8.5	NAB1-Expression bei unterschiedlichen Lichtstärken _____	86
3.2.7.8.6	Expression von NAB1 in verschiedenen <i>Chlamydomonas-reinhardtii</i> - Linien _____	86
3.2.7.9	Post-translationale Modifikationen von NAB1 _____	87

4. DISKUSSION	90
4.1 STRATEGIE I: H9-DERIVATE ZUR SELEKTIVEN MARKIERUNG ATP-BINDENDER ENZYME	90
4.1.1 Theoretische Überlegungen und Hintergründe	91
4.1.2 Bindungseigenschaften und Spezifität des Konstrukts H9-LPF	91
4.1.3 Die Eignung von H9-LPF zur selektiven Identifikation von ATP-Bindeproteinen in komplexen Proteingemischen	92
4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse von Strategie I und Ausblick	93
4.2 STRATEGIE II: ANALYSE VON NUKLEÄREN ZUFALLS-DNA-INSERTIONSMUTANTEN	93
4.2.1 Das Konzept der Analyse von Zufallsmutanten in der Photosyntheseforschung: Die Mutante <i>Stm3</i>	94
4.2.2 Die Bedeutung der Anzahl genetisch mutierter Loci für eine erfolgreiche Charakterisierung von Zufallsmutanten	94
4.2.3 Der Weg zur Identifikation des Gens <i>Nab1</i>	95
4.2.4 Spezifische Eigenschaften des nukleinsäurebindenden Proteins <i>NAB1</i>	95
4.2.5 Proteine mit RNA-Bindedomänen: Strukturelle und funktionelle Analogien der modular organisierten Proteine <i>NAB1</i> und <i>FRGY2</i>	96
4.2.6 Physiologische Konsequenzen eines Defektes von <i>NAB1</i> für die Grünalge <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	98
4.2.7 Die Regulation der <i>NAB1</i> -Aktivität	101
4.2.8 Physiologische Bedeutung der Expressionsregulation photosynthetischer Proteine auf Ebene der mRNA-Translation	103
4.2.9 Arbeitsmodell der physiologischen Funktionsweise von <i>NAB1</i>	104
4.2.10 Zusammenfassung der Ergebnisse von Strategie II und Ausblick	106
5. ZUSAMMENFASSUNG	108
6. LITERATURLISTE	110

7. ANHANG	129
7.1 EIGENE PUBLIKATIONEN	129
7.2 AKTIVE TEILNAHME AN TAGUNGEN UND SYMPOSIEN	129
7.3 VERÖFFENTLICHTE SEQUENZEN	130
7.3.1 Nab1-DNA-Sequenz (GenBank-Nummer AY157846)	130
7.3.2 NAB1-Aminosäure-Sequenz (TrEMBL-Nummer Q8GV23)	131
7.3.3 Lhcbm8-cDNA-Sequenz (GenBank-Nummer AF330793)	131
7.3.4 LHCBM8-Aminosäure-Sequenz (TrEMBL-Nummer Q9AXF6)	131

1. EINLEITUNG

Alle Lebewesen dieses Planeten sind komplizierte geordnete Organismen, die zur Aufrechterhaltung dieses Ordnungsgrades eine ständige Zufuhr von Energie benötigen. Diese Energie muss in Form von energiereichen chemischen Verbindungen bereitgestellt werden, welche die Organismen metabolisieren können. Die Synthese von solchen organischen Stoffen aus anorganischen Verbindungen bildet daher die Grundlage allen Lebens.

Viele Organismen haben im Lauf der Evolution die Fähigkeit erworben, die energiereiche elektromagnetische Strahlung der Sonne zu nutzen, um Wasser und Kohlendioxyd zu Kohlenhydrat-Verbindungen umzusetzen (photoautotrophe Organismen). Diesen Prozess, bei dem molekularer Sauerstoff freigesetzt wird, bezeichnet man als oxygene Photosynthese und die erzeugten energiereichen Verbindungen werden sowohl von photosynthetischen als auch von heterotrophen Organismen als Nahrungsgrundlage genutzt.

Astronomische und geologische Messungen legen nahe, dass unser Universum vor etwa 12,5 Milliarden Jahren entstanden ist (Cayrel et al. 2001) und sich der Planet Erde vor etwa 4,5 Milliarden Jahren formte (Jakobsen 2003). Vermutlich begannen erste prokaryontische Organismen schon vor über 2,8 Milliarden Jahren, oxygene Photosynthese zu betreiben (Des Marais 2000).

Seit dieser Zeit haben sich die photosynthetischen Organismen ständig weiterentwickelt. Auf Grund von Anpassungsvorgängen an wechselnde Umweltfaktoren werden heutige photosynthetische Organismen durch ein kompliziertes Netzwerk von regulativen Abläufen gesteuert. Die Zellen sind in der Lage, den aktuellen Zustand der photosynthetischen Abläufe zu perzipieren und auf auftretende Ungleichgewichte zu reagieren. Viele dieser Vorgänge sind heute noch nicht oder erst zum Teil verstanden. Unter den Anpassungsvorgängen spielt insbesondere die Akklimatisation an den Faktor Licht eine essentielle Rolle. Grund hierfür ist das ambivalente Verhältnis, welches photosynthetische Organismen zum Sonnenlicht haben. Auf der einen Seite ist die ausreichende Versorgung zur Aufrechterhaltung der Lebensvorgänge sowie für weiteres Wachstum unerlässlich. Andererseits kann die Überversorgung mit energiereicher Strahlung zur Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies führen, welche hochgradig toxisch für die Zellen sind.

Ein besonderes Kennzeichen photosynthetischer Organismen ist die sessile oder im Bewegungsspielraum stark eingeschränkte Lebensweise. Die Strahlung des Sonnenlichtes schwankt jedoch im Tages- und Jahresverlauf ausgesprochen stark, womit sich der evolutionäre Selektionsdruck zur Entwicklung von Licht-Akklimatisationsstrategien erklärt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zielten darauf ab, das Verständnis der Vorgänge zu erweitern, welche photosynthetische Organismen entwickelt haben, um sich dem Umweltfaktor Licht optimal anzupassen.

Das Kapitel 1.2 der Einleitung dient dazu, einen aktuellen Überblick über den Forschungsstand der zum Verständnis der vorliegenden Arbeit wichtigen Licht-Anpassungsreaktionen zu geben. Um diese Abläufe verstehen zu können, wird zuvor die

Organisation der in der Thylakoid-Membran lokalisierten photosynthetischen Multi-Proteinkomplexe sowie deren Zusammenspiel im photosynthetischen Elektronentransport dargestellt (Kapitel 1.1). Kapitel 1.3 beinhaltet Hintergrundinformationen über den Organismus *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*), dem Forschungsobjekt der vorliegenden Arbeit.

1.1 PHOTOSYNTHESE

Abgesehen von einigen spezialisierten Lebensformen, welche die Energie für endergonische Syntheseprozesse aus energiereichen chemischen Verbindungen beziehen (chemoautotrophe Organismen), wird von der Mehrzahl der autotrophen Lebewesen das Sonnenlicht genutzt, um Photosynthese zu betreiben. Die Photosynthese besteht aus zwei Teilvorgängen, für welche die Begriffe Licht- und Dunkelreaktionen geprägt wurden. Die Lichtreaktionen umfassen die Spaltung des Elektronendonors, die Weiterleitung der Elektronen in der Elektronentransportkette, die gekoppelte Protonen-Translokation nebst ATP-Synthese und die Reduktion von NADP^+ zu $\text{NADPH}+\text{H}^+$. In den Dunkelreaktionen findet die Reduktion von CO_2 -Molekülen zu Kohlenwasserstoff-Verbindungen unter Verbrauch von ATP und $\text{NADPH}+\text{H}^+$ statt. Im Gegensatz zu Cyanobakterien besitzen Grünalgen und Höhere Pflanzen abgegrenzte Kompartimente, in denen die Kernreaktionen der photosynthetischen Prozesse ablaufen. Diese werden als Chloroplasten bezeichnet.

1.1.1 Chloroplasten

Die Chloroplasten-Hülle besteht aus zwei galaktolipidreichen Membranen. Die äußere Membran ist auf Grund unspezifischer Porenkomplexe nahezu frei permeabel für Stoffe bis zu einem Molekulargewicht von ~ 10 kDa. Im Gegensatz dazu ist die innere Hüllmembran nur für kleine, ungeladene Moleküle wie O_2 oder NH_3 frei passierbar, und der Großteil des Metabolit-Austausches findet über Transporterkomplexe statt. Die von den Hüllmembranen eingeschlossene Matrix wird als Stroma des Chloroplasten bezeichnet. Eingebettet in das Stroma liegen die Thylakoide (Menke 1961), ein verzweigtes, abgeschlossenes Membransystem, welches einen Raum abgrenzt, der als Lumen bezeichnet wird. Hier ist das Zentrum der photosynthetischen Lichtreaktionen lokalisiert, da dieses Membransystem die Multi-Proteinkomplexe trägt, die für Lichtreaktionen verantwortlich sind (siehe Kapitel 1.1.2).

Im Zuge der Reifung der Chloroplasten bilden die Thylakoide vieler photosynthetischer Organismen gestapelte Bereiche aus, so genannte Grana-Thylakoide, welche im Elektronenmikroskop deutlich von den verbindenden Stroma-Bereichen zu unterscheiden sind (Abb. 1).

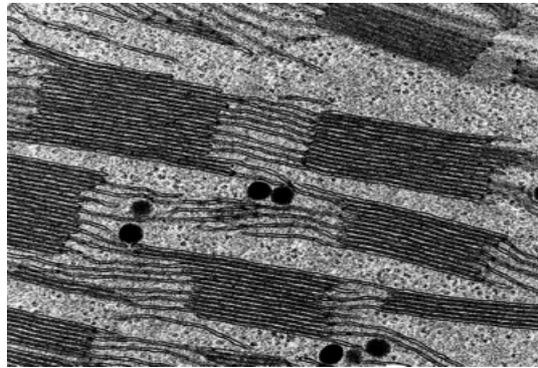


Abb. 1: Grana- und Stromabereiche in Gras-Thylakoiden.

Aus: Buchanan et al. (2000).

Die Thylakoide der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* weisen ebenfalls Grana- und Stroma-Thylakoide auf (Harris 2001). Die Stapelung der Grana-Bereiche ist jedoch nicht so ausgeprägt wie bei Höheren Pflanzen, weshalb sie auch als Pseudograna bezeichnet werden.

Manche der Multi-Proteinkomplexe (Photosystem II (PSII), siehe 1.1.2.1) treten vermehrt in den Granabereichen, andere (Photosystem I (PSI), ATP-Synthase, siehe 1.1.2.4, 1.1.2.5) nahezu ausschließlich in den Stromabereichen der Thylakoide auf (Vallon et al. 1986). Man spricht daher von einer lateralen Heterogenität innerhalb der Thylakoide.

Es ist heute allgemein akzeptiert, dass Chloroplasten von einem Vorläufer der Cyanobakterien abstammen, welcher von einer frühen eukaryontischen Vorgänger-Zelle endosymbiontisch aufgenommen worden war (Endosymbionten-Theorie). Diese Abstammung der Chloroplasten ist schon 1905 von Mereschkowsky postuliert worden (Mereschkowsky 1905) und erklärt die auffälligen Ähnlichkeiten zwischen Chloroplasten und Cyanobakterien. Beispielsweise besitzen Chloroplasten eine vergleichbare Größe, eine eigene genetische Ausstattung samt Transkriptions- und Translations-Komplexen sowie die Fähigkeit zur oxygenen Photosynthese durch zwei in Reihe geschaltete Photosysteme (PSII und PSI).

Durch evolutionäre Anpassungsvorgänge sind Chloroplasten heute nicht mehr eigenständig lebensfähig. Die Gene der meisten chloroplastidären Proteine sind im Kern lokalisiert (Martin et al. 1998, Abdallah et al. 2000) und werden in den Chloroplasten dirigiert (Schnell & Blobel 1993, Tian et al. 1995, Keegstra & Cline 1999). Man geht davon aus, dass bis zu 5.000 verschiedene chloroplastidäre Proteine im Kern und nur 60 - 200 im Chloroplasten codiert sind (Martin et al. 2002). Die Fragen, welche, wie viele und warum nicht alle Gene in den

Kern transferiert wurden, sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen und Diskussionen (Allen 1993, Martin et al. 2002, Raven & Allen 2003).

Um das Funktionsprinzip der in der Thylakoid-Membran lokalisierten photosynthetischen Prozesse verstehen zu können, werden im folgenden Abschnitt der Aufbau und die Funktionsweise der beteiligten Multi-Proteinkomplexe dargestellt.

1.1.2 Aufbau und Funktion der photosynthetischen Proteinkomplexe

Vier verschiedene Multiprotein-Komplexe der Thylakoide sind essentiell für Organismen, welche oxygene Photosynthese betreiben. Dies sind neben den Photosystemen I und II der Cytochrom- b_6f (Cyt- b_6f)-Komplex und die ATP-Synthase (Abb. 2).

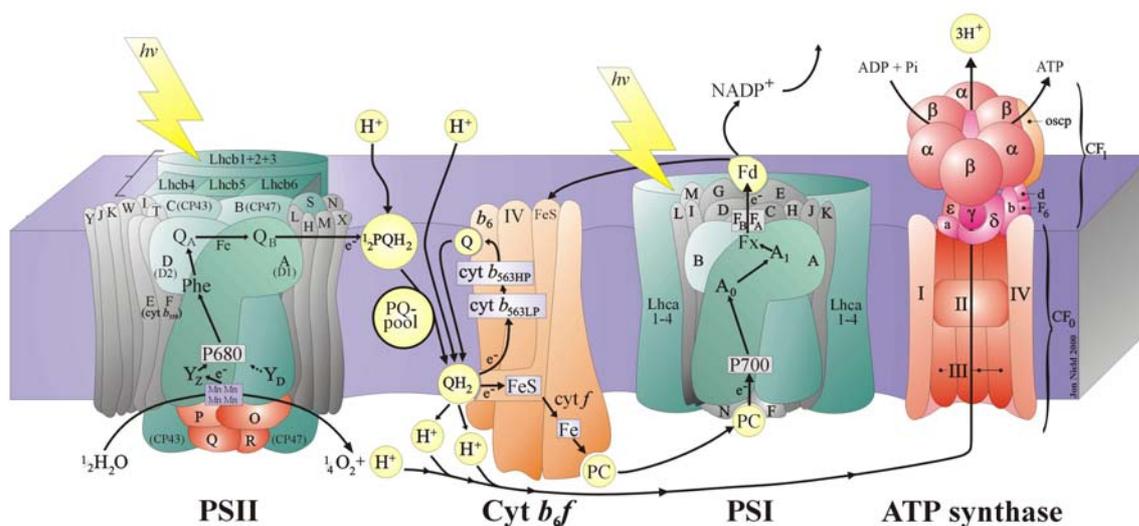


Abb. 2: Multi-Proteinkomplexe der photosynthetischen Thylakoid-Membran (Nield 2000, Imperial College London, U.K.).

Alle Multi-Proteinkomplexe der Thylakoid-Membran werden sowohl durch Gene im Kern als auch durch Gene in den Chloroplasten codiert. Somit erfordert die Assemblierung ein koordiniertes Zusammenspiel der Genexpression in den unterschiedlichen Kompartimenten.

1.1.2.1 Photosystem II

Die Struktur des PSII-Komplexes ist heute durch Röntgen-Strukturanalysen bis 3,8 Å aufgelöst (Rhee et al. 1998, Zouni et al. 2001).

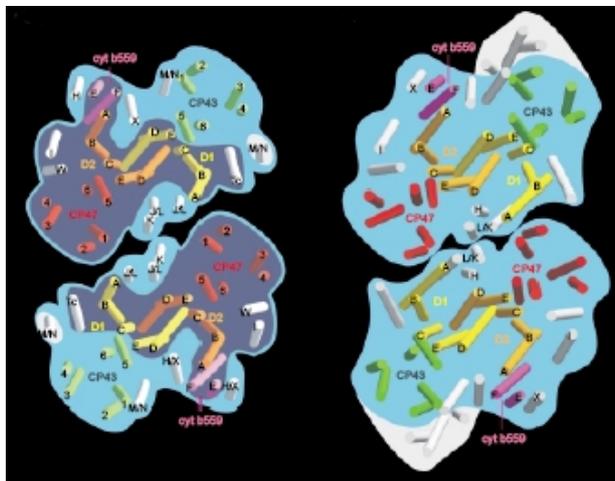


Abb. 3: Schematische Darstellung der Transmembran-Helices von PSII-Kern-Dimeren.

Links: Spinat, rechts: Synechococcus, Helix-Farben: gelb: D1, orange: D2, rot: CP47, grün: CP43, magenta: Cytochrom-b₅₅₉, weiß: andere PSII-Proteine

Aus: Barber (2002).

Es werden mindestens 25 verschiedene Untereinheiten zum PSII-Komplex gezählt (Hankamer et al. 1997a, Barber & Kühlbrandt 1999), welche durch die *Psb*-Gene codiert sind. Für die Mehrzahl der Proteine ist die Funktion nicht bekannt, auf Grund fehlender Pigment-Bindung werden jedoch Funktionen in der Assemblierung und/oder Strukturbildung angenommen (Barber & Kühlbrandt 1999). Seit langer Zeit existieren Hinweise darauf, dass PSII-Komplexe *in vivo* als funktionelle Dimere vorliegen (Rögner et al. 1987, 1996, Hankamer et al. 1997b, Kruse et al. 1997), wobei die Dimerisierung durch Phosphatidylglycerol vermittelt wird (Kruse et al. 2000, Kruse et al. 2002).

Auf der luminalen Seite der PSII-Komplexe findet die Oxidationsreaktion von Wasser-Molekülen statt. Dies geschieht im *oxygen evolving complex*, einem Komplex bestehend aus mindestens drei kerncodierten Proteinen (den Untereinheiten PSBO, PSBP und PSBQ) sowie einem Mn₄-Cluster (Murata & Miyao 1985), welcher zur Funktion Calcium und Chlorid-Ionen benötigt (Boussac & Rutherford 1994). Darüber hinaus wird dem PSBY-Protein eine Rolle in der Stabilisierung des Komplexes zugeschrieben (Gau et al. 1998).

Im Zentrum des PSII-Komplexes sind die D1- und D2-Proteine lokalisiert (Abb. 3). Sie ähneln den bakteriellen L- und M-Proteinen (Michel & Deisenhofer 1988) und sind als Heterodimer angeordnet. An ihnen sind die Co-Faktoren der primären und sekundären Elektronentransfer-Prozesse gebunden. Umgeben ist das D1-D2-Heterodimer von den inneren Antennenproteinen CP43 und CP47, den Untereinheiten des Häm-bindenden Cytochroms-b₅₅₉ (Alizadeh et al. 1999) sowie den weiteren PSII-Untereinheiten. Die inneren Antennenproteine

CP43 und CP47 binden Chlorophylle (Chl) vom a-Typ und erfüllen die Aufgabe, Anregungsenergie zum Reaktionszentrum zu leiten. Die Funktion des Cytochroms-b₅₅₉ ist bisher nicht eindeutig geklärt. Auf Grund der Nähe zum D1-D2-Heterodimer wird eine Rolle in der Protektion des PSII-Komplexes vor lichtinduzierten Schädigungen angenommen (Steward & Brudwig 1998). Untersuchungen an *Chlamydomonas*-Mutanten zeigten, dass die α -Untereinheit des Cytochroms-b₅₅₉ auch zur Assemblierung von intakten PSII-Komplexen essentiell ist (Morais et al. 1998).

Eine weitere PSII-Untereinheit, welcher eine Schutzfunktion zugesprochen wird, ist das PSBS-Protein. Eine Reihe von Experimenten deutet darauf hin, dass diese Untereinheit essentiell für die energieabhängige, nicht-photochemische Fluoreszenz-Löschung (siehe Kapitel 1.2.1.1) ist (Müller et al. 2001, Li et al. 2002). Der Untereinheit PSBZ wird in Grünalgen und Höheren Pflanzen die Funktion zugeschrieben, die Interaktion von Lichtsammel-Komplex (LHC)-Proteinen und dem PSII-Kern zu vermitteln (Swiatek et al. 2001).

Der Multi-Proteinkomplex Photosystem II erfüllt die Funktion einer lichtgetriebenen Wasser-Plastochinon-Oxidoreduktase.

Ein spezielles Chlorophyll-a (P680) ist in der Lage, bei Anregung in den ersten Singulett-Zustand ein Elektron an ein Phäophytin-Molekül abzugeben. Vom Phäophytin wird das Elektron dann innerhalb von 200 Pikosekunden auf ein gebundenes Plastochinon-Molekül (Q_A) transferiert, welches das Elektron an ein reversibel gebundenes Plastochinon-Molekül (Q_B) weiterleitet. Nach der Aufnahme eines weiteren Elektrons auf gleiche Weise und unter Bindung von zwei Protonen verlässt das reduzierte Plastochinol-Molekül den PSII-Komplex und tritt in den Plastochinon-Plastochinol-*pool* ein. Das oxidierte P680 wird durch Aufnahme eines Elektrons vom Tyrosin 161 des D1-Proteins reduziert, das Tyrosin wiederum bezieht das Elektron von dem im Lumen lokalisierten, extrinsischen Mangan-Proteinkomplex. Dabei muss für die Wasseroxidation ein Redox-Potential von ~1.200 mV aufgebracht werden. Die entstehenden Protonen werden in das Lumen der Thylakoide abgegeben, der Sauerstoff verlässt das PSII in molekularer Form.

Um ein solch hohes Redox-Potential zu erreichen, wird das PSII von einem ausgeprägten Antennensystem gespeist. In Cyanobakterien dienen Phycobilisome dieser Aufgabe, in Grünalgen und Höheren Pflanzen Lichtsammel-Komplex-Proteine.

1.1.2.2 LHCII-Proteine

Da die Lichtsammel-Komplex-Proteine, und insbesondere die LHCII-Proteine von *C. reinhardtii* in dieser Arbeit von herausragender Bedeutung sind, wird im folgenden Abschnitt der gegenwärtige Kenntnisstand zusammengefasst.

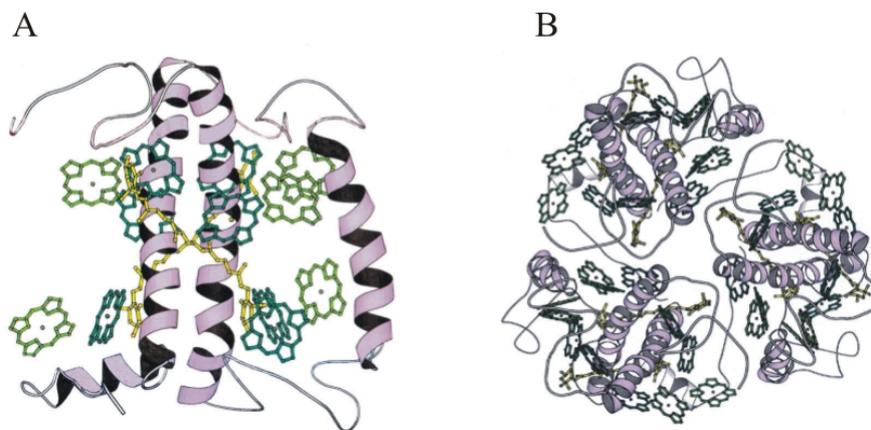


Abb. 4: Schematische Darstellung von LHCII-Monomer (A) und Trimer (B).

Dunkelgrün: Chl-a, hellgrün: Chl-b, gelb: Carotinoide.

Aus: Buchanan et al. (2000).

Die Struktur der LHC-Proteine ist heute bis zu 3,4 Å aufgeklärt (Abb. 4, Kühlbrandt et al. 1994). Sie besitzen drei Transmembran-Helices, wobei der N-Terminus auf der stromalen Seite und der C-Terminus im Lumen der Thylakoide liegt. LHC-Proteine binden den Großteil der Chlorophyllmoleküle. Im Gegensatz zu den weiteren PSII- und PSI-Proteinen binden sie neben Chlorophyll-a auch Chlorophyll-b (Paulsen 1995). Das Bindungsverhältnis wird dabei insbesondere durch die unterschiedlichen Affinitäten der Bindungsstellen determiniert (Hobe et al. 2003).

Bei *Chlamydomonas reinhardtii* liegt das Bindungsverhältnis von Chl-a zu Chl-b bei 1,4, da pro LHCII-Protein 7 Chlorophyllmoleküle vom Typ a und 5 Chlorophyllmoleküle vom Typ b gebunden werden. Neben Chlorophyllmolekülen können LHC-Proteine auch die Carotinoide Neoxanthin, Violaxanthin, Zeaxanthin und Lutein binden. Diesen Carotinoiden werden verschiedene Schutzfunktionen zugeschrieben (siehe Kapitel 1.2.1.1 und 1.2.1.2, Kühlbrandt et al. 1994, Müller et al. 2001, Trebst 2003). LHCII-Proteinen kommt neben der Aufgabe des Sammelns von Lichtenergie auch eine entscheidende Rolle in der energieabhängigen, nicht-photochemische Fluoreszenz-Löschung zu (siehe Kapitel 1.2.1.1).

Nach der von Jansson vorgeschlagenen Nomenklatur (Jansson 1999) werden die LHCII-Proteine bei *Arabidopsis thaliana* von den Genen Lhcb1 - 6 codiert. Die Gene Lhcb1 - 3 codieren für die Haupt-LHCII-Proteine, die Gene Lhcb4 - 6 für die Neben-LHCII-Proteine, die auch als CP29, CP26 und CP24 bezeichnet werden. Die Neben-LHCII-Proteine liegen *in vivo* als Monomere vor (Yakushevskaya et al. 2003), die Haupt-LHCII-Proteine Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3 können *in vivo* funktionelle Trimere unterschiedlicher Zusammensetzung bilden

(Jackowski et al. 2001). Diese Trimerisierung wird vermutlich durch Bindung von Phosphatidylglycerol (Remy et al. 1982) über spezielle Trimerisierungs-Motive (Hobe et al. 1995) vermittelt.

Die LHCII-Proteine von *Chlamydomonas reinhardtii* weisen eine hohe Homologie zu denen von *Arabidopsis* auf. Von den Neben-LHC-Proteinen konnten bei *C. reinhardtii* die Gene für CP29 und CP26, nicht aber für CP24 identifiziert werden (Teramoto et al. 2001). Auf Grund der hohen Homologie untereinander können die verschiedenen Isoformen der Haupt-LHCII-Proteine von *Chlamydomonas* nicht den Lhcb1 - 3 Genen von *Arabidopsis* zugeordnet werden. Hier ist eine eigenständige Nomenklatur erforderlich. Basierend auf Analysen von EST-Datenbanken werden heute zwei verschiedene Nomenklaturen vorgeschlagen. Teramoto et al. (2002) klassifizieren die Gene, welche für die Haupt-LHCII-Proteine codieren, nach Homologie in vier verschiedene Typen, die als LhcII-1 (mit den Isoformen LhcII-1.1, LhcII-1.2 und LhcII-1.3), LhcII-2, LhcII-3 und LhcII-4 bezeichnet werden. Elrad et al. (2002) bevorzugen die Einteilung nach Häufigkeit der EST-Sequenzen der unterschiedlichen Isoformen. Sie nehmen an, dass die LHCII-Familie aus 10 Isoformen besteht, welche von den Autoren als Lhcbm1 - 10 bezeichnet werden. Je geringer die Nummer der Lhcbm-Isoform, desto größer die Anzahl vorhandener EST-Sequenzen zum Zeitpunkt der Untersuchung.

In dieser Arbeit wird im weiteren Verlauf die Nomenklatur von Elrad et al. (2002) verwendet. Es wird jedoch eine Einschränkung dahingehend vorgenommen, die Isoformen Lhcbm7, Lhcbm9 und Lhcbm10 nicht zu berücksichtigen (siehe Kapitel 3.2.7.5).

Der Grund für die große Anzahl von nahezu identischen LHCII-Isoformen ist nicht vollständig geklärt. Eine absolute funktionelle Redundanz der Isoformen ist unwahrscheinlich, da das Beibehalten der Gen-Vielfalt dem Organismus einen evolutionären Selektionsvorteil bieten muss. Daher wird vermutet, dass jeder der Isoformen eine eigenständige Rolle in der Licht-Sammlung, Licht-Anpassung, Thylakoid-Organisation und in Schutz-Reaktionen zukommt. Experimentelle Hinweise für die Richtigkeit dieser Hypothese konnten in *A. thaliana* durch Untersuchungen von Antisense-Pflanzen erhalten werden. Die Antisense-Repression der Lhcb1 und Lhcb2-Gene hatte zur Folge, dass zur Kompensation die Lhcb3-, 5- und 6-Gene verstärkt exprimiert wurden. Dadurch konnten die Pflanzen zwar die Organisation des PSII-LHCII-Superkomplexes nahezu aufrechterhalten, sie unterschieden sich jedoch vom Wildtyp (WT) durch ein defizitäres Wachstumsverhalten (Ruban et al. 2003).

Bei Untersuchungen einer *C. reinhardtii* Mutante konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des Lhcbm1-Gens spezifische Auswirkungen auf die energieabhängige Fluoreszenzlöschung, nicht aber auf die lichtabhängige Verteilung von LHCII-Proteinen auf PSII oder PSI (*LHC-state-transitions*) hatte (Elrad et al. 2002). Diese Ergebnisse belegen eindeutig eine funktionelle Arbeitsteilung der unterschiedlichen LHCII-Proteine.

Die Regulation der LHCII-Protein-Expression ist erstaunlich vielfältig. Auf nahezu allen Ebenen der Proteinsynthese wurden Anhaltspunkte dafür gefunden, dass eine Regulation stattfindet.

In den Grünalgen *Chlamydomonas* bzw. *Dunaliella* konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von LHC-Proteinen auf Transkriptionsebene von den Faktoren Licht, Temperatur und Chlorophyllsynthese abhängt sowie einem circadianen Rhythmus unterliegt (Shepherd et al. 1983, Jasper et al. 1991, Hwang & Herrin, 1994, Escoubas et al. 1995, Maxwell et al. 1995, Jacobshagen et al. 1996, Hahn & Kück 1999, Teramoto et al. 2002, Mittag et al. 2003). Durch Untersuchungen an *Nicotiana tabacum* konnten darüber hinaus Hinweise gesammelt werden, dass die LHCII-Expression ebenfalls auf post-transkriptioneller Ebene reguliert wird (Flachmann & Kühlbrandt 1995). Zudem existieren Hinweise darauf, dass die LHCII-Proteine von *Spinacia oleracea* durch eine lichtregulierte Protease-Aktivität abgebaut werden (Lindahl et al. 1995). Neben der Regulation der LHCII-Proteinmenge finden auch chemische Modifikationen einzelner Isoformen statt. So ist bekannt, dass eine reversible Phosphorylierung bestimmter LHCII-Proteine durch eine membrangebundene Kinase im Zuge der *LHC-state-transitions* (siehe Kapitel 1.2.3) stattfindet (Allen et al. 1981, Allen & Forsberg 2001, Haldrup et al. 2001, Wollman 2001). Auch die differentielle Prozessierung von LHC-Enden konnte jüngst nachgewiesen werden (Stauber et al. 2003).

Wie eine differentielle Expression der LHCII-Isoformen mit unterschiedlichen Funktionen in den photosynthetischen Organismen angesteuert und reguliert wird, ist bislang weitgehend unklar. Um die differentielle Expression der unterschiedlichen Isoformen verfolgen zu können, ist es notwendig, trotz hoher Homologie spezifische Unterscheidungsmerkmale zwischen den einzelnen LHCII-Isoformen zu finden. Bei *Dunaliella tertiolecta* wurde gezeigt, dass die Transkription eines LHCII-Gens durch Bindung eines redox-regulierten DNA-Bindeproteins reprimiert werden kann. Bei dieser Regulation spielt offenbar ein Kinase-Phosphatase-Zyklus eine essentielle Rolle (Escoubas et al. 1995).

In *C. reinhardtii* wurden spezifische Genbereiche genutzt, um durch quantitative RT-PCR die differentielle Expression der Isoformen unter verschiedenen Licht-, Temperatur- und CO₂-Bedingungen zu studieren (Teramoto et al. 2002).

Auf Proteinebene ist die Unterscheidung zwischen den Isoformen noch schwieriger. Derzeit ist es nicht möglich, alle verschiedenen LHCII-Isoformen zu unterscheiden. Durch Kombination von 2D-Gelelektrophoresen und *Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight* (MALDI-ToF) (Karas & Hillenkamp 1990)-Analysen sowie mit spezifischen Antikörpern gegen die Lhcbm4- und 6-Isoformen ist es kürzlich jedoch gelungen, auch diesbezüglich Fortschritte zu erzielen (Hippler et al. 2001, Stauber et al. 2003).

1.1.2.3 Cytochrom-b₆f-Komplex

Die Struktur des Cytochrom-b₆f-Komplexes konnte in dem Cyanobakterium *Mastigocladus laminosus* bis zu 3 Å aufgeklärt werden (Kurusu et al. 2003, Stroebel et al. 2003). Strukturanalysen bestätigten, dass der Aufbau des Cyt-b₆f-Komplexes bei Cyanobakterien, Grünalgen und Höheren Pflanzen sehr ähnlich ist (Abb. 5).

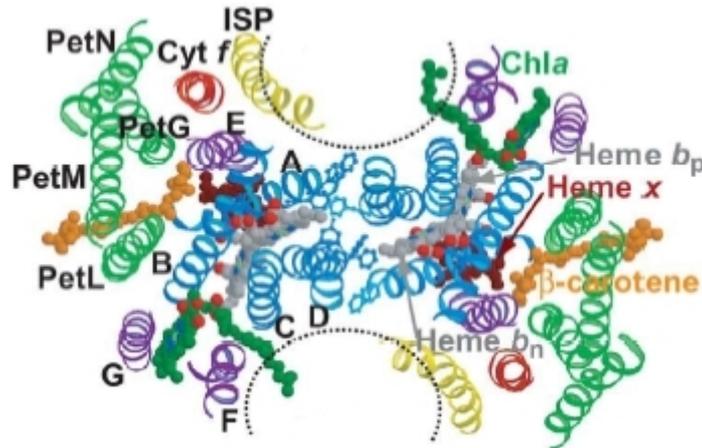


Abb. 5: Schematische Darstellung eines dimeren Cyt-b₆f-Komplexes.

Blau: Cyt-b₆, rot: Cyt-f, purpur: Untereinheit IV, gelb: Rieske-Protein (ISP), grün: PETG, L, M, N, dunkelrot, grau: prosthetische Häm-Gruppen (heme x, heme b_p, heme b_n), orange: β-Carotin (β-carotene).

Verändert nach Kurisu et al. (2003).

In *C. reinhardtii* konnten bislang neun Untereinheiten identifiziert werden, die jeweils einmal pro Komplex vorhanden sind (Wollman et al. 1999). Die Proteine werden von den Pet-Genen zum Teil im Kern (PetC, PetM, PetN, PetO), zum Teil im Chloroplasten (PetA, PetB, PetD, PetG, PetL) codiert (Hamel et al. 2000, Maiwald et al. 2003).

Cytochrom-b₆ und Cytochrom-f tragen prosthetische Häm-Gruppen. Das Cytochrom-b₆ beinhaltet 2 Häm-Gruppen des b-Typs (b_h und b_i), das Cytochrom-f trägt ein Häm des c-Typs. Darüber hinaus konnte in *Chlamydomonas* und in *Mastigocladus* die Existenz einer weiteren Häm-Gruppe nachgewiesen werden, welches als Häm-x bezeichnet wird (Kurusu et al. 2003, Stroebel et al. 2003). Das Rieske-Protein trägt als prosthetische Gruppe hingegen einen 2Fe-2S-Komplex. Sowohl in Cyanobakterien als auch in Algen und Höheren Pflanzen konnte das Vorhandensein eines Chlorophyll-a- und eines β-Carotin-Moleküls nachgewiesen werden (Huang et al. 1994, Pierre et al. 1997, Zhang et al. 1999). Dabei wird das Chlorophyll an die Untereinheit IV gebunden, das β-Carotin liegt zwischen den Transmembran-Helices der Untereinheiten PETL und PETM (Kurusu et al. 2003). Die weiteren Proteine tragen nach heutigem Kenntnisstand keine prosthetischen Gruppen. *In vivo* liegen die Cyt-b₆f-Komplexe als Dimere vor (Breyton et al. 1997).

Die wesentliche Funktion des Cyt-b₆f-Komplexes besteht in der Übertragung von Elektronen vom Plastochinon entweder auf das Kupfer enthaltende Plastocyanin oder auf das c-Typ-

Cytochrom- c_6 (Wollman 1999, Gupta et al. 2002). Mit dem Elektronentransport findet eine gekoppelte Translokation von Protonen vom Stroma ins Lumen der Thylakoide statt. Plastochinol bindet an der Qo-Bindungsstelle des Cyt- b_6f -Komplexes, welche von den Proteinen Cytochrom- b_6 , der Untereinheit IV und dem Rieske-Protein gebildet wird (Zito et al. 1999). Hier findet die Oxidation des Plastochinol-Moleküls zum Plastochinon statt, wobei die zwei freiwerdenden Protonen ins Lumen abgegeben werden. Ein Elektron wird vom Cyt- b_6f -Komplex auf den löslichen Elektronenakzeptor übertragen, das zweite Elektron wird dazu genutzt, ein Plastochinon-Molekül, welches an einer zweiten Bindungsstelle gebunden ist, zu Plastosemichinon zu reduzieren. Nachdem ein weiteres Plastochinol an der Qo-Bindungsstelle oxidiert wurde, wird das Plastosemichinon unter Bindung zweier Protonen aus dem Stroma zu Plastochinol reduziert. Diesen zyklischen Elektronentransport innerhalb des Plastochinon-Plastochinol-*pools* nennt man Q-Zyklus.

Neben den genannten Aufgaben im Elektronentransport wird dem Cyt- b_6f -Komplex zudem eine regulative Signalfunktion in *LHC-state-transitions* zugeschrieben (siehe Kapitel 1.2.3, Wollman 2001), da Mutanten des Komplexes Defekte in der lichtabhängigen Verteilung der LHC-Proteine zeigen (Zito et al. 1999) und die Untereinheit PETO in Abhängigkeit von *LHC-state-transitions* reversibel phosphoryliert wird (Hamel et al. 2000).

1.1.2.4 Photosystem I

Die dreidimensionale Struktur des PSI-Komplexes konnte in *Synechococcus elongatus* bis zu 2,5 Å aufgeklärt werden (Jordan et al. 2001). Im Vergleich zu PSI-Komplexen Höherer Pflanzen sind große Ähnlichkeiten vorhanden (Abb. 6). So sind von fast allen cyanobakteriellen Untereinheiten entsprechende Homologe in Höheren Pflanzen gefunden worden. Ausnahmen bilden die Untereinheit PSAM, die zwar in manchen Grünalgen, Moosen und Gymnospermen, nicht aber in Angiospermen nachgewiesen wurde, PSAX, die überhaupt nicht in Eukaryonten vorkommt, sowie die Untereinheiten PSAG, PSAH und PSAN, welche ausschließlich in Eukaryonten gefunden wurden (Scheller et al. 2001).

Insgesamt rechnet man heute damit, dass das PSI Höherer Pflanzen aus mindestens 13 verschiedenen Untereinheiten aufgebaut wird, die von den PsaA - PsaN Genen zum Teil im Kern und zum Teil im Chloroplasten codiert werden.

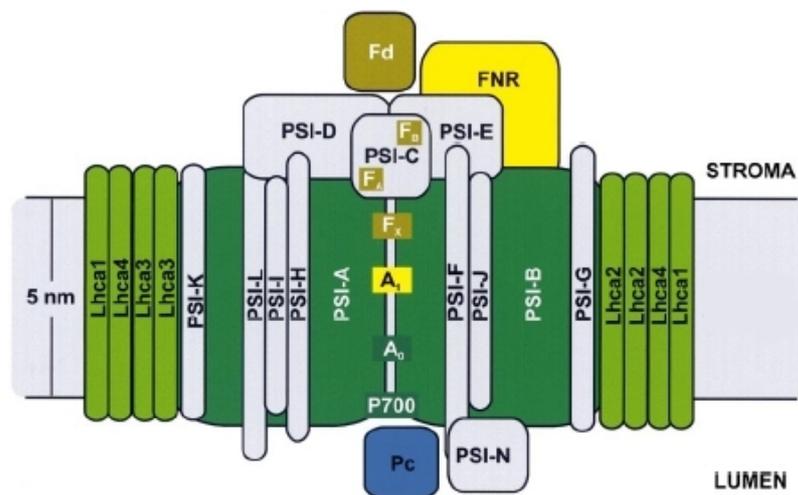


Abb. 6: Schematische Darstellung eines pflanzlichen PSI-Komplexes.

PSI-A - PSI-N: Produkte der PsaA - PsaN Gene, Lhca1 - 4: LHCI-Proteine, Fd: Ferredoxin, FNR: Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase, F_x, F_A, F_B: Fe-S-Zentren, P700: Chl-Dimer, A₀: Chl, A₁: Phyllochinon, Pc: Plastocyanin.

Aus: Scheller et al. (2001).

Im Kern von PSI liegt das PSAA-PSAB-Heterodimer, an welches ein Großteil der Co-Faktoren (~96 Chl-a, ~22 β -Carotine, Chlorophyll-Dimer P₇₀₀, Chlorophyll-A₀, Phyllochinon-A₁ und das 4Fe-4S-Zentrum-F_x) gebunden wird, der für die Elektronentransfer-Prozesse benötigt wird. Zwei weitere 4Fe-4S-Zentren werden vom PSAC-Protein gebunden. Den Untereinheiten PSAD und PSAE wird eine Rolle bei der Bindung von Ferredoxin (Fd) sowie bei zyklischen Elektronentransport-Prozessen zugeschrieben. Die PSAF und PSAN-Proteine wirken zusammen an der Bindung von Plastocyanin. Umgeben ist der PSI-Kern-Komplex von Lichtsammel-Komplex-Proteinen (LHCI-Proteine), die analog zu den ausführlich behandelten LHCII-Proteinen das PSI mit Lichtenergie speisen (Kargul et al. 2003). Die LHCI-Proteine sind den LHCII-Proteinen strukturell ähnlich, allerdings binden sie nur 10 Chlorophyllmoleküle im Chl-a/b-Verhältnis von 4. Ferner sind sie nicht als Trimere, sondern als Dimere organisiert (Jansson et al. 1996).

Gebunden werden diese LHCI-Proteine von den PSI-Untereinheiten PSAF, PSAG und PSAK. Auch LHCII-Proteine können im Zuge der *LHC-state-transitions* die Antenne des PSI-Komplexes vergrößern, was durch Bindung an das PSAH-Protein vermittelt wird. Den weiteren Untereinheiten wird eine stabilisierende Funktion zugeschrieben (Scheller et al. 2001). In Cyanobakterien wurde zudem eine alternative Antennenstruktur beschrieben,

welche unter Eisen-Mangelbedingungen synthetisiert wird (Bibby et al. 2001, Boekema et al. 2001).

Primäre Aufgabe des PSI-Komplexes ist die Übertragung von Elektronen vom Plastocyanin (oder Cytochrom- c_6) auf Ferredoxin (oder Flavodoxin). Der Elektronenakzeptor kann dann zur enzymatischen Reduktion von NADP^+ oder anderen Molekülen wie beispielsweise Thioredoxin verwendet werden. Neben diesem linearen Elektronentransport kann mittels des PSI-Komplexes auch ein zyklischer Elektronentransport stattfinden (Arnon 1959). Im zyklischen Elektronentransport werden die Elektronen nach Durchlaufen des PSI-Komplexes zur erneuten Reduktion von Plastochinon verwendet. Durch den folgenden Elektronentransport über den Cyt- b_6f -Komplex werden erneut Protonen transloziert, als Produkt entsteht hier folglich kein reduziertes $\text{NADPH}+\text{H}^+$, sondern ausschließlich ein Anstieg des Protonengradienten über die Thylakoid-Membran und damit die Produktion von ATP. Die einzelnen Schritte vom PSI zur Reduktion des Plastochinons sind noch nicht völlig geklärt. Zhang et al. (2001) schlagen vor, dass die Ferredoxin- NADP^+ -Oxidoreduktase direkt am Cyt- b_6f -Komplexes bindet und so zur Plastochinon-Reduktion verhilft. Munekage et al. (2002) identifizierten hingegen das membranständige Protein PGR5 und postulieren eine Funktion in der Vermittlung der Elektronenübertragung von der Ferredoxin- NADP^+ -Oxidoreduktase zum Cyt- b_6f -Komplex. Auf Grund von Homologie-Vergleichen wird darüber hinaus die Existenz einer chloroplastidären NADPH -Dehydrogenase angenommen (Allen 2002).

Der durch Wasserspaltung, linearen und zyklischen Elektronentransport erzeugte Protonengradient über die Thylakoid-Membran wird durch die Aktivität der ATP-Synthase zur Produktion von ATP genutzt. Dieser Kopplungsmechanismus wurde bereits im Jahr 1961 von Prof. Dr. Mitchell in der von ihm entwickelten chemiosmotischen Hypothese vorgeschlagen (Mitchell & Moyle 1965, Mitchell & Moyle 1967, Mitchell 1979).

1.1.2.5 ATP-Synthase

Chloroplastidäre ATP-Synthasen sind strukturell eng verwandt mit bakteriellen und mitochondriellen F_1 -ATP-Synthasen (Abb. 7). Sie bestehen aus einem in das Stroma ragenden CF_1 - und einem membranständigen CF_0 -Teil. Der CF_1 -Teil setzt sich aus fünf verschiedenen Polypeptiden (α , β , γ , δ und ϵ) zusammen, welche in der Stöchiometrie 3:3:1:1:1 vertreten sind und durch die *AtpA*-*AtpE*-Gene codiert werden.

Der membranständige CF_0 -Abschnitt besteht aus vier verschiedenen Polypeptiden (I, II, III und IV) in der Stöchiometrie 1:1:9-12:1 (Wollman et al. 1999). Diese Untereinheiten werden durch die Gene *AtpF* - *AtpI* codiert.

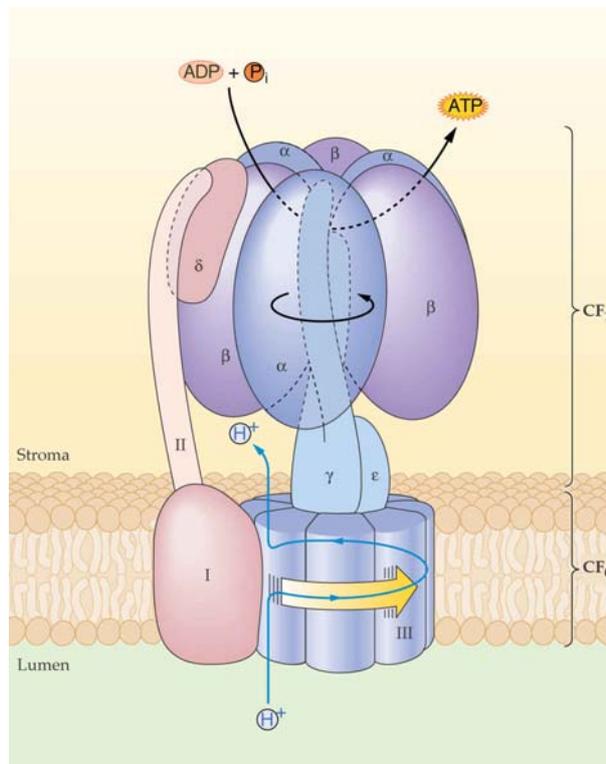


Abb. 7: Schematische Darstellung der chloroplastidären ATP-Synthase

α , β , γ , δ , ϵ : Proteinuntereinheiten des CF_1 -Teils, I, II, III: Proteinuntereinheiten des CF_0 -Teils, Untereinheit IV fehlt in der Darstellung.

Aus: Buchanan et al. (2000).

Wie bei den anderen Multiprotein-Komplexen der Thylakoid-Membran sind auch die Gene der chloroplastidären ATP-Synthase zum Teil im Kern (*AtpC*, *AtpD*, *AtpG*) und zum Teil im Chloroplasten (*AtpA*, *AtpB*, *AtpE*, *AtpF*, *AtpH*, *AtpI*) abgelegt (Wollman et al. 1999).

Das Funktionsprinzip dieses Proteinkomplexes ist heute weitgehend geklärt. Protonen strömen dem Konzentrationsgefälle folgend aus dem Lumen der Thylakoide durch den CF_0 -Teil in das Stroma des Chloroplasten. Hierdurch wird die γ -Untereinheit in Rotation versetzt (Noji et al. 1997). Im Zuge dieser Rotationsbewegung verändert sich die Konformation der CF_1 -Struktur, welche drei Nukleotid-Bindungsstellen aufweist. Katalysiert durch diese Konformationsänderung können in zyklischer Abfolge ATP-Moleküle aus $ADP+P_i$ synthetisiert werden (Groth & Strotmann 1999).

Die treibende Kraft zur ATP-Synthese wird durch das Konzentrationsgefälle und das elektrische Potential zusammengesetzt, welches auf Grund der positiven Ladung der Protonen über die Thylakoid-Membran besteht. Bezeichnet wird die Kraft als *pmf* (*proton motive force*). Lange Zeit galt dabei der Konzentrations-Unterschied als wesentlicher Antriebsfaktor der chloroplastidären ATP-Synthase. Neuere Untersuchungen zur nicht-photochemischen Fluoreszenz-Löschung und Messungen der Aktivität von Proteinen des

Thylakoid-Lumens weisen allerdings zunehmend auch auf die Wichtigkeit des elektrischen Potentials als treibende Kraft hin (Kramer et al. 2003).

1.2 ANPASSUNGSSTRATEGIEN PFLANZLICHER ORGANISMEN AN DEN UMWELTFAKTOR LICHT

Die ausreichende Versorgung mit Sonnenlicht ist für photosynthetische Organismen von essentieller Wichtigkeit, um den Energiebedarf durch Produktion von ATP und NADPH+H⁺ decken zu können. Allerdings beinhaltet die Nutzung dieser energiereichen elektromagnetischen Strahlung im Zuge der Photosynthese, insbesondere in Kombination mit molekularem Sauerstoff, auch beträchtliche Gefahren. Grund hierfür ist die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies, welche im photosynthetischen Organismus oxidativen Stress auslösen.

1.2.1 Vermeidung von oxidativem Stress: Die Gefahr durch reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS)

Ausgangsstoff für ROS ist der molekulare Sauerstoff der Atmosphäre. Dieser liegt im Grundzustand (Triplettzustand, ³O₂) als Biradikal vor und ist relativ stabil. Durch Übertragung von Energie angeregter Triplett-Chlorophylle kann das Molekül jedoch in den hochreaktiven Singulettzustand (¹O₂) wechseln. Singulett-Sauerstoff kann unter Aufnahme von jeweils einem Elektron stufenweise reduziert werden. Die dabei entstehenden Produkte sind Superoxidanion-Radikal (O₂+ e⁻→ O₂⁻), Wasserstoffperoxid (O₂⁻+ e⁻+ 2H⁺→ H₂O₂) sowie Hydroxyl-Radikal (H₂O₂+ e⁻+ H⁺→ H₂O+ OH⁻) (Schopfer & Brennicke 1999). Das Superoxid-Radikal kann zudem in der Mehler-Reaktion entstehen, wobei durch das PSI Elektronen direkt auf Sauerstoff übertragen werden (Mehler & Brown 1952, Asada et al. 1974). Darüber hinaus zählt das durch UV-Strahlung oder Verbrennung fossiler Brennstoffe entstehende Ozon (O₃) zu den ROS.

Alle ROS sind reaktiv und stellen wirksame Zellgifte dar, wobei die reaktivsten und folglich schädlichsten Formen der Singulett-Sauerstoff (¹O₂) und das Hydroxyl-Radikal (OH⁻) sind. Die schädigende Wirkung der ROS ist darauf zurückzuführen, dass sie praktisch alle organischen Moleküle wie Lipide, Proteine und Nukleinsäuren angreifen und schädigen können.

ROS innerhalb von photosynthetischen Zellen entstehen insbesondere dann, wenn die photosynthetischen Reaktionen nicht optimal ablaufen und die eingefangene Energie nicht vollständig zur Synthese von Kohlenhydraten genutzt werden kann. Die Gründe für diesen oxidativen Stress können vielfältig sein und lassen sich beispielsweise auf Luftverschmutzung durch Ozon oder Schwefeldioxyd, Schwermetalle, UV-Strahlung, Starklicht, Hitze, Kälte, Dürre, Verwundung, Pathogenbefall und Alterung zurückführen (Buchanan et al. 2000, Dietz 2003b). ROS treten in verschiedenen Kompartimenten auf, insbesondere dort, wo molekularer Sauerstoff produziert (Chloroplasten) oder verbraucht (Mitochondrien, Peroxisomen) wird.

Auf Grund der relativ hohen Permeabilität von Zellmembranen für H_2O_2 ist aber potentiell die gesamte Zelle durch ROS gefährdet.

Heutige photosynthetische Organismen sind das Produkt einer evolutionären Selektion über viele Jahrtausende. Im Bezug auf ROS wurden von den Organismen Strategien entwickelt, um der Gefahr, welche von der Produktion reaktiver Sauerstoff-Spezies ausgeht, zu begegnen. Diese Anpassungsvorgänge lassen sich prinzipiell in zwei Kategorien einteilen. Die erste Kategorie fasst die Vorgänge zusammen, welche darauf abzielen, die Entstehung von ROS zu vermeiden, die zweite Kategorie umfasst Strategien zur Detoxifikation bereits entstandener ROS.

1.2.1.1 Vermeidung von ROS

Um die Entstehung von ROS zu vermeiden haben photosynthetische Organismen eine ganze Reihe von Adaptationsmechanismen entwickelt. Manche Pflanzen sind in der Lage, die Blattstellung so zu verändern, dass unter Starklicht die bestrahlte Fläche minimiert wird. Auch die Lage der Chloroplasten innerhalb der Zelle wird unter Starklicht von der Zelloberfläche hin zu den Zellrändern verändert (*Chloroplast high-light avoidance response*, Kagawa et al. 2001, Kasahara et al. 2002). Einzellige Lebewesen wie die Grünalge *Chlamydomonas* haben zudem die Möglichkeit, Licht durch einen Augenfleck zu detektieren. Sofern sie sich in wässrigem Milieu aufhalten, können sie durch Geißel-Bewegung dem Starklicht aktiv ausweichen.

Auf subzellulärer Ebene sind die LHCI-Proteine Angriffspunkt gleich mehrerer Schutzmechanismen. Carotinoide übernehmen hier wichtige Funktionen, da sie in der Lage sind, die Energie des Triplett-Chlorophylls direkt zu übernehmen, was die Bildung von Singulett-Sauerstoff verhindert. Eine weitere Möglichkeit, die eingefangene Energie unschädlich abzugeben, besteht darin, sie in Form der Hitze-Dissipation abzustrahlen. Dieser Vorgang lässt sich bei Raumtemperatur als energieabhängige, nicht-photosynthetische Löschung der Chlorophyll-Fluoreszenz verfolgen (Müller et al. 2001). Initiiert wird dieser Schutzmechanismus durch das Absinken des luminalen pH-Wertes, was zur Folge hat, dass das Enzym Violaxanthin-Deepoxidase aktiviert wird und Violaxanthin über Antheraxanthin zu Zeaxanthin umwandelt. Darüber hinaus führt der niedrige pH-Wert im Lumen zu einer Konformationsänderung von Antennen-Proteinen wobei insbesondere das LHC-ähnliche PSBS-Protein essentiell zu sein scheint (Li et al. 2000). Die Konformationsänderung in Verbindung mit der Bindung des gebildeten Zeaxanthins führt dazu, dass der LHCI-Komplex erheblich an Effizienz verliert und einen Großteil der eingefangenen Energie in Form von Hitze wieder abgibt.

Auch die Expression von LHCI-Proteinen unterliegt sowohl auf transkriptioneller (Escoubas et al. 1995), translationaler (Flachmann & Kühlbrandt 1995) als auch auf post-translationaler Ebene (Lindahl et al. 1995) einer strikten, lichtabhängigen Redox-Regulation. Hierdurch wird die Größe der Antenne den jeweiligen Licht- und Temperaturbedingungen angepasst. Sobald

die gesammelte Lichtenergie die photosynthetische Kapazität übersteigt, wird die Größe des PSII-Antennenkomplexes verringert (Maxwell et al. 1995).

1.2.1.2 Detoxifikation von ROS

Sobald die photosynthetische Zelle die Bildung von ROS nicht mehr verhindern kann, treten Strategien zur Detoxifikation in Kraft.

Singulett-Sauerstoff und entstehende Radikale können durch Antioxidantien wie beispielsweise α -Tocopherol direkt abgefangen werden (Trebst 2003). Des Weiteren existieren verschiedene enzymatisch katalysierte Detoxifikationsmechanismen. Superoxid-Radikale können durch die Aktivität der Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid umgewandelt werden. Für Wasserstoffperoxid bestehen verschiedene enzymatische Abbauewege, welche alle Wasser zum Produkt haben. Eines der Enzyme, die H_2O_2 auf diese Weise detoxifiziert, ist die Katalase.

Ascorbat-Peroxidase hat eine ähnliche Funktion. Auch hier wird H_2O_2 zu H_2O umgesetzt. Das dabei entstehende Monodehydroascorbat kann entweder unter Verbrauch von reduziertem Ferredoxin oder enzymatisch unter Verbrauch von NADPH zum Ascorbat reduziert werden. Daneben kann Monodehydroascorbat auch zum Dehydroascorbat weiterreagieren, das im Anschluss durch die Dehydroascorbat-Reduktase reduziert wird. Dabei oxidiertes Glutathion wird unter Verbrauch von NADPH erneut reduziert (Asada 1999).

Peroxiredoxine können neben Wasserstoffperoxid auch andere organische Peroxide und Peroxinitrit entgiften. Alle vier Klassen der Peroxiredoxine (1-Cystein-Peroxiredoxin, 2-Cystein-Peroxiredoxin, Typ-II-Peroxiredoxin, Peroxiredoxin Q) nutzen zur Reduktion von Peroxid ein analoges katalytisches Prinzip, wobei ein Cystein des Peroxiredoxins zu Sulfensäure (R-SOH) oxidiert wird. Die Wiederherstellung des aktiven Enzyms, die Quartärstruktur sowie die zelluläre Lokalisation sind in den vier Klassen jedoch unterschiedlich (Dietz 2003a, Wood et al. 2003).

In Höheren Pflanzen werden alle vier Klassen exprimiert. Sie finden sich im Cytosol, in Chloroplasten, in Mitochondrien und im Kern. Insbesondere den chloroplastidären 2-Cystein-Peroxiredoxinen wird eine Schutzfunktion vor photosynthetischem oxidativem Stress zugeschrieben (Dietz 2003a).

1.2.2 Reparatur geschädigter Moleküle

Reichen die beschriebenen Schutzmechanismen nicht aus, kommt es zur Produktion von ROS und organische Moleküle werden durch oxidativen Stress geschädigt. Diese beschädigten Moleküle werden entweder durch Reparatur-Systeme repariert oder durch neu synthetisierte Moleküle ersetzt. Besonders gut erforscht ist in diesem Zusammenhang die Schädigung und der anschließende Reparatur-Zyklus des D1-Proteins vom Photosystem II, welches in besonderem Maße von photooxidativen Schädigungen betroffen ist. Die Schädigungen können prinzipiell zwei Ursachen haben. Werden Elektronen nicht schnell genug durch den

wasseroxidierenden Komplex nachgeliefert, so kommt es zur Ausbildung von $P680^+$ - und Tyr_z^+ -Molekülen. Da insbesondere $P680^+$ stark oxidierend wirkt, kann es das D1-Protein oxidativ angreifen und irreversibel schädigen. Diese Art der D1-Schädigung ist unabhängig vom Vorhandensein von Sauerstoff (Aro et al. 1993b). Im Gegensatz zu dieser donorseitigen Ursache wird D1 ebenfalls geschädigt, wenn Elektronen nicht schnell genug von der Akzeptor-Seite von PSII entfernt werden können. Die Folge ist, dass Q_A überreduziert wird und als abnormales Q_AH_2 die Bindestelle irreversibel verlässt. Ohne diesen Elektronenakzeptor kann das weiterhin produzierte primäre Radikal-Paar $P680^+/Pheo^-$ rekombinieren und zur Bildung von Triplett-Chlorophyll führen. Wie in Abschnitt 1.2 beschrieben resultiert hieraus die vermehrte Produktion von hochreaktivem Singulett-Sauerstoff, welcher seinerseits das D1-Protein angreift (Aro et al. 1993b).

In beiden Fällen führt die Schädigung des D1-Proteins zur Photoinhibition des betroffenen PSII-Komplexes (Aro et al. 1990). Bemerkenswert ist, dass beide Prozesse, sowohl der donorseitige als auch der akzeptorseitige, selektiv das D1-Protein betreffen (Andersson & Aro 2001). Es ist daher für photosynthetische Organismen notwendig, die permanente Schädigung von D1 zu kompensieren. Dies geschieht durch eine komplizierte und noch nicht völlig aufgeklärte Abfolge von Proteolyse des geschädigten D1-Proteins, Neusynthese und Einbau in den Photosynthese-Komplex. Dabei hat die Schädigung von D1 offensichtlich eine strukturelle Änderung des Proteins zur Folge, die es für die spezifische Protease zugänglich macht (Zer & Ohad 1995). Die an der Degradation beteiligten Proteasen sind bislang nicht zweifelsfrei identifiziert. Mit den Enzymen DEGP2 und FTSH konnten allerdings zwei Proteasen gefunden werden, die *in vitro* das D1-Protein spezifisch degradieren und somit als mögliche Kandidaten angesehen werden (Lindahl et al. 2000, Haußühl et al. 2001). Der Einbau von neu synthetisiertem D1-Protein findet in den Stroma-Thylakoiden statt und setzt eine De-Phosphorylierung der PSII-Phosphoproteine voraus (Rintamäki et al. 1996, Kruse et al. 1997).

1.2.3 Einfluss von linearem und zyklischem Elektronentransport auf Redox-Homöostase und Energie-Haushalt: *LHC-state-transitions*

Neben der in Kapitel 1.2.1.1 beschriebenen Regulierung der eingefangenen Lichtenergie durch Anpassung der Größe der LHC-Antennenproteine an die vorherrschenden Umweltbedingungen sind viele photosynthetische Organismen in der Lage, die Verteilung der eingefangenen Energie zwischen PSI und PSII zu kontrollieren. Dieser Vorgang wird als *LHC-state-transitions* bezeichnet und wurde erstmals vor über 30 Jahren beobachtet (Bonaventura & Myers 1969, Murata 1969). Sowohl Cyanobakterien (Mullineaux & Allen 1990, van Thor et al. 1998, Emlyn-Jones et al. 1999) als auch Algen und Höheren Pflanzen (Allen 1992, Allen & Forsberg 2001, Haldrup et al. 2001, Wollman 2001) sind in Reaktion auf ungleichmäßige Anregung der Photosysteme in der Lage, durch Verlagerung der Lichtsammel-Komplexe Lichtenergie vermehrt auf PSI (*state-2*) oder PSII (*state-1*) zu übertragen. Der zu Grunde liegende molekulare Ablauf unterscheidet sich jedoch zwischen

Cyanobakterien, Algen und Höheren Pflanzen, da Cyanobakterien anstelle der eukaryontischen LHC-Komplexe strukturell völlig anders organisierte Antennen, die Phycobilisome, besitzen.

In Algen und Höheren Pflanzen konnte durch zahlreiche Untersuchungen ein relativ detailliertes Bild der *LHC-state-transitions* gewonnen werden. Nach heutigem Forschungsstand ist der Redox-Zustand des Plastochinon-pools entscheidend für das Auslösen der *LHC-state-transitions*. Liegen die Plastochinon-Moleküle in oxidiertem Form vor, so sind die LHCII-Proteine nicht phosphoryliert und überwiegend mit den PSII-Komplexen aggregiert. Man spricht hier von *state-1*. Kommt es durch Fluktuationen der Lichtstrahlung zu einer überproportionalen Anregung der PSII-Komplexe, so wird der Plastochinon-pool reduziert. Als Folge der Anlagerung von Plastochinol-Molekülen an die Q_o-Bindungsstelle am Cyt-b₆f-Komplex wird mindestens eine membranständige Proteinkinase aktiviert (Vener et al. 1995, Vener et al. 1997, Snyders & Kohorn 1999, Zito et al. 1999, Depege et al. 2003). Die Kinase-Aktivität hat eine Phosphorylierung der PETO-Untereinheit des Cyt-b₆f-Komplexes zur Folge (Hamel et al. 2000) sowie die N-terminale Threonin-Phosphorylierung verschiedener LHCII-Proteine (Bennett 1979, Allen et al. 1981, Gal et al. 1997). Die Phosphorylierung der LHCII-Proteine führt dazu, dass sie sich vom PSII entkoppeln und stattdessen an PSI-Komplexe anlagern. Dieser Assoziations-Zustand wird als *state-2* bezeichnet. Nun werden verstärkt PSI-Komplexe mit Lichtenergie versorgt. Sobald der Plastochinon-pool oxidiert vorliegt, sorgt eine konstitutiv aktive Phosphatase für die De-Phosphorylierung der LHCII-Phosphoproteine, die sich dann wieder vermehrt den PSII-Komplexen anschließen (Abb. 8).

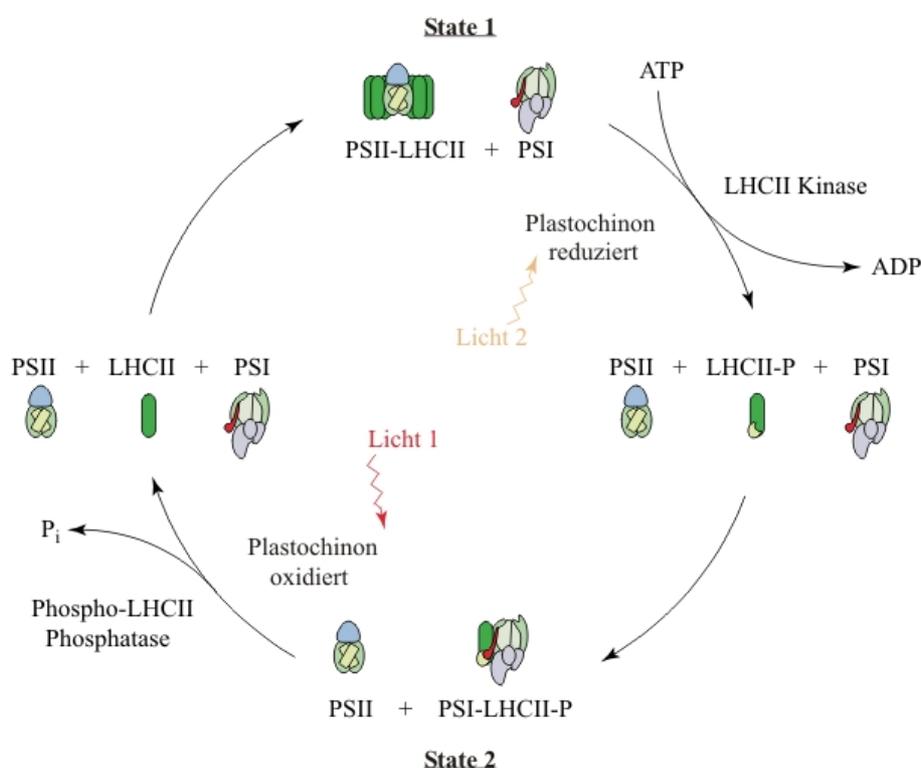


Abb. 8: Zyklus der *LHC-state-transitions*.
Verändert nach Allen & Forsberg (2001).

Neben der Threonin-Phosphorylierung der LHC-Proteine, welche durch eine *feed-back*-Regulation über das Ferredoxin-Thioredoxin-System reguliert wird (Rintamäki et al. 2000), ist auch eine Phosphorylierung von Tyrosin-Resten beobachtet worden, deren Einfluss auf die *LHC-state-transitions* allerdings nicht zweifelsfrei erwiesen ist (Forsberg & Allen 2001).

Als treibende Kraft der Verlagerung der LHCII-Proteine von den in den Grana-Bereichen der Thylakoide lokalisierten PSII-Komplexe hin zu den PSI-Komplexen in den Stroma-Thylakoiden werden zwei Modelle diskutiert (Allen & Forsberg 2001). Das erste Modell macht die zusätzliche negative Ladung der phosphorylierten LHCII-Proteine dafür verantwortlich, dass sie elektrostatisch aus den dicht gepackten Grana-Bereichen heraus geschoben werden. Neuere Untersuchungen an *Arabidopsis*-Mutanten sprechen jedoch dafür, dass die Andock-Stelle am PSI intakt sein muss, damit *state-transitions* ablaufen können und die Phosphorylierung alleine nicht zur Ablösung der LHCII-Proteine vom PSII führt (Lunde et al. 2000). Daher macht das zweite Modell die höhere Affinität von phosphorylierten LHCII-Proteinen zum PSI dafür verantwortlich, dass diese sich, einer chemischen Gleichgewichtsreaktion ähnlich, nach Phosphorylierung vermehrt am PSI sammeln.

Die physiologische Bedeutung, welche dieser in der Evolution konservierte Prozess der *LHC-state-transitions* besitzt, kann einerseits darin bestehen, dass durch die flexible Verlagerung der LHC-Proteine ein optimaler linearer Elektronentransport gewährleistet wird. Andererseits ist es dem Organismus durch *state-transitions* möglich, durch Übergang in *state-2* einen verstärkten zyklischen Elektronentransport um PSI und somit eine verstärkte Produktion von ATP anzusteuern (siehe Kapitel 1.1.2.4). Daher kann die größere physiologische Bedeutung der *LHC-state-transitions* für den Organismus auch in der Regulation der NADP⁺/NADPH und ADP/ATP-Verhältnisse begründet sein (Wollman 2001). Zur Klärung dieser Fragen und zur weiteren Eingliederung der *LHC-state-transitions* in die komplexen physiologischen Abläufe innerhalb der photosynthetischen Zelle werden seit einigen Jahren viel versprechende Untersuchungen an gezielten (Zito et al. 1999, Pesaresi et al. 2002) oder zufälligen (Kruse et al. 1999, Fleischmann et al. 1999, Strauss et al. 2001, Morgan-Kiss et al. 2002, Depege et al. 2003) *state-transitions* defizienten Mutanten durchgeführt. Eine als *state-transitions* defizient klassifizierte *Chlamydomonas reinhardtii* Mutante, die Mutante Stm3, wird in dieser Arbeit ausführlich vorgestellt.

1.2.4 Protein-Phosphorylierung in photosynthetischen Zellen

In der Literatur sind viele Beispiele dafür beschrieben, dass ATP-bindende Enzyme und insbesondere Proteinkinasen wichtige regulatorische Funktionen in einer Vielzahl von zellulären Anpassungsvorgängen ausüben (Hardie 1999). Auch in den Chloroplasten spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Lichtanpassung von photosynthetisch aktiven Zellen (siehe Kapitel 1.2.2 und 1.2.3). Man geht heute davon aus, dass die regulativen Vorgänge in der Thylakoid-Membran über die Aktivität der verantwortlichen Kinasen gesteuert werden, die antagonistischen Phosphatasen scheinen hingegen überwiegend konstitutiv aktiv zu sein (Silverstein et al. 1993). Es ist bekannt, dass sowohl manche der stark exprimierten LHCII-

Proteine, als auch Proteine des PSII und des Cyt-b₆f-Komplexes in Abhängigkeit des einfallenden Lichts als Substrate von Kinasen dienen (siehe Kapitel 1.2.2 und 1.2.3, Bennett 1977, Bennett 1979, Allen et al. 1981, Wollman & Delepelaire 1984, Bennett 1991, Allen 1992, Gal et al. 1997, Pursiheimo et al. 1998, Snyders & Kohorn 1999, Hamel et al. 2000, Forsberg & Allen 2001, Depege et al. 2003). Zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Arbeit war erst wenig über Identität und Beschaffenheit der verantwortlichen Kinasen bekannt. Es existiert jedoch eine Reihe von chemischen Stoffen, welche die Aktivität von Proteinkinasen hemmen. Einige der erzielten Einblicke in das Netzwerk regulativer Phosphorylierungen in den Chloroplasten sind dem gezielten Einsatz solcher Kinase-Inhibitoren zu verdanken (Farchaus et al. 1985, Ishak et al. 1991, Allen 1992). Eine Sonderstellung in dieser Arbeit nimmt der Kinase-Inhibitor H9 (N-(2-Aminoethyl)-5-isochinolinsulfonamid) ein.

1.2.4.1 Der Kinase-Inhibitor H9

H9 gehört zu der Klasse der Isochinolinsulfonamide (Hidaka et al. 1984, Inagaki et al. 1985). Diese Stoffe eignen sich als Inhibitoren von verschiedenen Proteinkinasen (Engh et al. 1996, Ono-Saito et al. 1999).

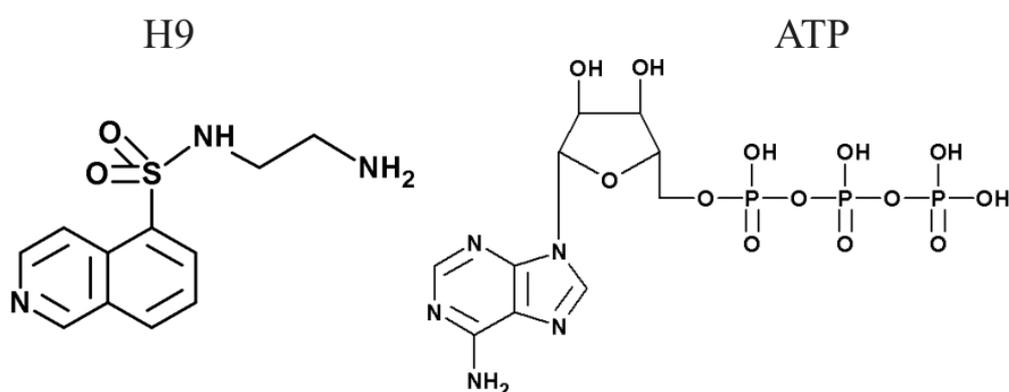


Abb. 9: Vergleich der chemischen Struktur von H9 und ATP.

Grund hierfür ist die strukturelle Ähnlichkeit zu ATP (Abb. 9). H9 kann kompetitiv und reversibel in die Bindetasche von ATP-bindenden Enzymen eingelagert werden und verhindert so effektiv die Aktivität dieser Enzyme (Ishak et al. 1991).

1.3 DAS UNTERSUCHUNGSOBJEKT *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

C. reinhardtii zählt zu den eukaryontischen, einzelligen Grünalgen und dient seit vielen Jahren als Untersuchungsobjekt verschiedener Forschungsschwerpunkte. So konnten mit diesem Organismus beispielsweise Einblicke in den Ablauf der Plastidenentwicklung, in Struktur und Funktion der Flagellen, in Gametenentwicklung und Paarung, in Phototaxis, Zellwandsynthese, zirkadianen Rhythmus sowie in Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefel-

Metabolismus und insbesondere in eine Vielfalt von photosynthetischen Prozessen gewonnen werden (Harris 2001).

Eine typische *C.-reinhardtii*-Zelle (Abb. 10) ist oval geformt, ~10 µm lang und ~3 µm breit (Rochaix 1995), wobei ihre Größe signifikanten Schwankungen im Verlauf des vegetativen Zellzyklus unterworfen ist (Harris 2001). Apikal der Zelle sind zwei Flagellen in Basalkörpern verankert. Zwischen Zellkern und Basalkörpern sind gewöhnlich zwei kontraktile Vakuolen lokalisiert.

Jede Zelle enthält einen Chloroplasten, welcher becherförmig um den Zellkern geschlungen ist und bis zu 40 % des Zellvolumens einnimmt. Neben den bereits beschriebenen Thylakoid-Membranen (siehe Kapitel 1.1.1) befindet sich ein Augenfleck anterior innerhalb des Chloroplasten. Er erscheint wegen der enthaltenen Carotinoide rötlich und enthält ein spezielles Rhodopsin-Molekül, welches der Lichtperzeption dient. Im Stroma des Chloroplasten ist ein Pyrenoid lokalisiert, welches von auffälligen Stärkeablagerungen umgeben sein kann und als Ort des CO₂-Fixierung gilt (Harris 2001).

Mitochondrien treten einzeln oder in Gruppen, bisweilen auch als verzweigtes Netzwerk auf (Harris 1998). Wildtyp-Zellen sind von einer komplexen Zellwand aus Glykoproteinen mit hohem Hydroxyprolin-Anteil umgeben. Da sich diese für manche Transformationsmethoden als störend erwies, wurden verschiedene zellwandreduzierte Mutanten-Linien hergestellt (Kindle 1990).

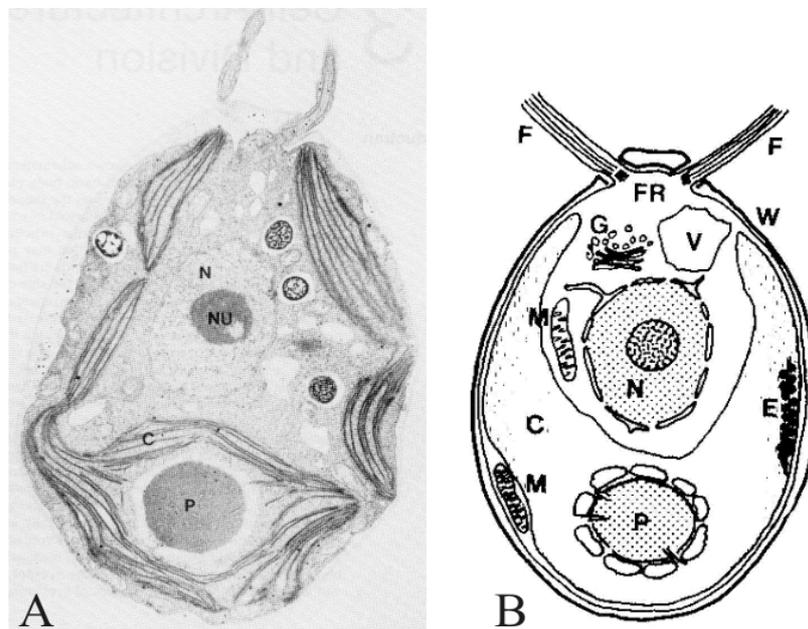


Abb. 10: Elektronenmikroskopische Aufnahme (A) und schematische Darstellung (B) einer *Chlamydomonas* Zelle.

C: Chloroplast, E: Augenfleck, F: Flagelle, FR: Ort der Flagellenbasis, G: Golgi-Apparat, M: Mitochondrium, N: Nukleus, NU Nukleulus, P: Pyrenoid, V: Vakuole, W: Zellwand.

Aus: Harris (1989).

Der Gattungsnahme *Chlamydomonas* (griechisch, chlamys: Umhang, monas: einsam) wurde im Jahr 1833 von C. G. Ehrenberg eingeführt. Der Artname *C. reinhardtii* stammt von P. A. Dangeard aus dem Jahr 1888. Schon im Jahre 1918 wurden mit Mutanten von *Chlamydomonas* erste Kreuzungsversuche durchgeführt, die systematische Erforschung des Organismus begann Mitte der vierziger Jahre mit der Isolierung und Verbreitung der wichtigsten Laborstämme. In der Photosyntheseforschung wurde *Chlamydomonas* Mitte der sechziger Jahre etabliert (Togasaki & Surzycki 1998).

Den mehr als 450 *Chlamydomonas*-Arten ist eine polare Struktur mit apikalen Flagellen und einem basalen Chloroplasten gemeinsam, welcher einen oder mehrere Pyrenoide einschließt. Die Arten können anhand unterschiedlicher Größe, Form, Flagellenzahl und anderer Kriterien unterschieden werden (Harris 2001). In der Regel sind die Arten der Gattung *Chlamydomonas* im wässrigen Milieu frei beweglich. *Chlamydomonas* ist weltweit verbreitet, kann in den unterschiedlichsten Habitaten, wie z.B. Süß- oder Salzwasser, aber auch auf Acker- oder Waldböden überleben (Harris 1989) und ist in der Lage, sich den vorherrschenden Umweltbedingungen in hohem Maße anzupassen (Grossman 2000a).

Die genetische Information der Zelle ist auf Kern, Chloroplast und Mitochondrien verteilt. Im Kern befindet sich mit ~100 Mbp der Großteil der DNA. Das für einen Eukaryonten relativ kleine Kern-Genom konnte bis auf wenige Bereiche sequenziert werden und wurde in einer ersten, nicht annotierten Version Anfang des Jahres 2003 veröffentlicht (<http://genome.jgi-psf.org/chlre1/chlre1.home.html>). Über die Anzahl der Chromosome herrscht allerdings noch immer keine definitive Klarheit. Man geht heute davon aus, dass die DNA auf 17 Chromosome verteilt vorliegt (Harris 2001). *C. reinhardtii* trägt im vegetativen Zustand den einfachen Chromosomen-Satz und zählt daher zu den Haplonten. Rezessive Mutationen im Kern sind folglich ausgeschlossen. Die DNA im Nukleus ist mit Histonen als Nukleosome organisiert. Sie weist einen ungewöhnlich hohen G/C-Gehalt von 62 % auf. Die proteincodierenden Gene bestehen typischer Weise aus dem Promotorbereich, welcher häufig eine TATA-Box etwa 30 bp 5' des Transkriptions-Startpunktes einschließt, dem codierenden Bereich, welcher mit dem Stopp-Codon abschließt und der 3' untranslatierten Region (UTR). Ein wichtiges Motiv dieses Bereichs ist das bei nahezu allen Kern-Genen vorkommende Polyadenylierungs-Signal. Im Zuge der Transkription initiiert es die Synthese einer Poly-Adenin-Kette mit 150 - 250 Resten (Silflow 1998).

Die Gene im Kerngenom enthalten im Regelfall relativ viele, kurze Intron-Bereiche, deren durchschnittliche Länge in etwa 220 bp beträgt. Da pro 1.000 bp codierenden Bereichs durchschnittlich vier Introns vertreten sind, beträgt das Verhältnis Exons/Introns ca. 1/1. Das Vorhandensein von Introns kann Auswirkungen auf die Expression des entsprechenden Genes haben (Silflow 1998).

Verschiedene Methoden sind etabliert, um selektiv und effizient das Kern-Genom zu transformieren (Kindle 1990, Shimogawara et al. 1998). Dabei wird die zur Transformation verwendete DNA überwiegend nicht über homologe Rekombination eingebaut, sondern integriert scheinbar zufällig ins Genom (Gumpel et al. 1994, Gumpel & Purton 1994), was die Herstellung und Analyse von Zufallsmutanten erlaubt (Tam & Lefebvre 1993).

Im Gegensatz zum haploiden Kerngenom liegt die DNA im Chloroplasten ringförmig in etwa 80 Kopien (Rochaix 1995) von jeweils 203 kb vor. Sie ist vollständig sequenziert (Maul et al. 2002) und in der Datenbank GenBank unter der Nummer BK000554 zugänglich. Im Chloroplasten sind insgesamt 99 Gene codiert. Mit biolistischen Methoden ist es möglich, das Chloroplasten-Genom selektiv zu transformieren (Boynton et al. 1988), wobei hier die DNA über homologe Rekombination eingebaut wird (Hippler et al. 1998). Der G/C-Gehalt der Chloroplasten-DNA beträgt in auffallendem Gegensatz zum Kerngenom nur 34 %.

Das mitochondrielle Genom von *C. reinhardtii* ist seit 1993 vollständig sequenziert (Vahrenholz et al. 1993) und unter der Nummer NC001638 in GenBank zugänglich. Es besteht aus einem linearen, 15,8 kb langen DNA-Molekül, welches in ~50 Kopien pro Zelle vorliegt (Rochaix 1995). Das Chondriom enthält 13 Gene, acht codieren für Proteine, drei für tRNAs und zwei für rRNAs.

Die Gründe, warum *C. reinhardtii* sich besonders für systematische Forschungsarbeiten eignet, liegen sowohl in der einfachen Haltung und Handhabung als auch in der Tatsache, dass *C. reinhardtii* in zwei geschlechtlichen Formen (*mating type* + oder -) vorkommt und sich daher sowohl vegetativ als auch in einem einfachen, geschlechtlichen Zyklus vermehren lässt. Die vegetative Verdopplungsrate beträgt in Flüssigkultur weniger als 10 Stunden (Dent et al. 2001), daher kann in kurzer Zeit eine große Menge an Material zu Untersuchungszwecken erhalten werden. Darüber hinaus ist fast die gesamte genetische Information des Organismus sequenziert und durch Datenbanken zugänglich (Shrager et al. 2003).

Insbesondere in der Photosynthese-Forschung ist *C. reinhardtii* als Modellorganismus etabliert (Grossman 2000b, Dent et al. 2001). Jede Zelle enthält nur einen Chloroplasten, was die Herstellung von homoplasmischen Mutanten erleichtert. Die Thylakoide und die photosynthetischen Multi-Proteinkomplexe sind denen Höherer Pflanzen ausgesprochen ähnlich, und viele regulatorische und funktionelle Abläufe können in ähnlicher Form beobachtet werden. Hinzu kommt, dass *C. reinhardtii* fakultativ heterotroph mit Acetat als alleiniger Kohlenstoffquelle kultivierbar ist. Dies ermöglicht die Herstellung und Untersuchung von Mutanten, deren Mutation in obligat photosynthetischen Organismen letal ist. Eine Reihe dominanter molekularer Marker ist zur Manipulation des haploiden Kern-Genoms und des Plasmons entwickelt worden (Grossman 2000b). Daneben stehen etablierte biochemische Verfahren zur Zellfraktionierung, Isolierung und Analyse von Thylakoiden und photosynthetischen Komplexen (Hippler et al. 1998, Hippler et al. 2001, Stauber et al. 2003) sowie diverse biophysikalische Verfahren (Hippler et al. 1998, Maxwell & Johnson 2000, Müller et al. 2001) zur Verfügung, welche reproduzierbare Untersuchungen der Mutanten erlauben.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 ZELLEN UND KULTIVIERUNGSMETHODEN

2.1.1 Verwendete *Escherichia-coli*-Bakterienstämme

Die verwendeten *E.-coli*-Stämme sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen in Medium bestehend aus 50 % LB (Sambrook et al. 1989) und 50 % Glycerol bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gehalten. Zur vorübergehenden Lagerung wurden die Zellen auf LB-Agarplatten überführt und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Flüssigkulturen wurden hergestellt durch Animpfen von 4 ml LB-Medium und Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 16 Std. im Inkubationsschrank (Memmert), sofern eine größere Menge nötig war, wurde mit dieser Übernachtkultur das entsprechende Volumen LB-Medium inokuliert. Bei Stämmen mit Ampicillin-Resistenz wurden dem Medium zusätzlich 100 mg/l des Antibiotikums Ampicillin appliziert (LB_{Amp}).

Stammname	Phänotyp und Literatur
DH5 α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> (Hanahan 1983).
NM538	r_k^- , <i>supF</i> , <i>hsdR</i> (Frischauf et al. 1983).
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' , <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> Δ M15, Tn10 (<i>tet</i> ^r)] (Sambrook et al. 1989).
M15	Δ <i>thi</i> , <i>ara</i> ⁺ , <i>gal</i> ⁺ , Δ <i>mtl</i> , Δ <i>F</i> , <i>recA</i> ⁺ , <i>uvr</i> ⁺ , <i>lon</i> ⁺ , <i>lacZ</i> Δ M15, pREP4 (Qiagen, Villarejo & Zabin 1974).

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme.

2.1.2 Verwendete *Chlamydomonas-reinhardtii*-Stämme

Die verwendeten *C. reinhardtii* Stämme sind in Tabelle 2 aufgelistet. Zur Herstellung von nukleären Zufalls-DNA-Insertionsmutanten wurde der Stamm Cw10 verwendet.

Die Haltung erfolgte durch mixotrophe Kultivierung der Stämme auf TAP-Vollmedium-Agarplatten (Harris 1989) in einem Lichtschrank (Rubarth Apparate GmbH) bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $15\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Weißlicht. Flüssigkulturen wurden im entsprechenden Medium durch überimpfen und mixotropher Anzucht bei $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Weißlicht auf einem Schüttler (GFL, 3017) bei 110 rpm erhalten.

Stammname	CC- Nummer	Mutationsmerkmal	Herkunft/Literatur
Cw10	CC849	Reduzierte Zellwand	Saul Purton, University College London, U.K.
CC125	CC125		<i>Chlamydomonas</i> Genetic Collection Centre, Duke University, USA
WT13			
PsbE(-)		PsbE-Gendefekt	Morais et al. (1998)
PsbH(-)		PsbH-Gendefekt	O'Connor et al. (1998)
Fud7	CC1284	PsbA-Gendefekt	Bennoun et al. (1986)
Stm3		Zufalls-Kernmutante von Cw10 durch transformation des Vektors pSp124S	Dr. P. J. Nixon, Imperial College London, U.K.
Stm3nc1-4		Mutante Stm3 co-transformiert mit den Vektoren pNab1 und p613	Siehe Kapitel 2.2.15.2

Tab. 2: Verwendete *Chlamydomonas*-Stämme.

2.1.2.1 Zellwachstum

Um photoautotrophes Wachstum zu untersuchen wurden die Zellen auf Minimalmedium (HSM)-Agarplatten (Harris 1989) für 25 Tage bei Raumtemperatur (RT) und $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Weißlicht angezogen. Zu Untersuchung des heterotrophen Wachstums wurden die Zellen auf TAP-Agarplatten bei RT für 6 Tage im Dunkeln inkubiert.

Um Wachstumskinetiken aufzunehmen, wurden die Zellen zunächst in 20 ml TAP-Medium bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Diese Kultur wurde anschließend zum Einstellen von 200 ml - 300 ml TAP-Medium auf eine je Versuchsdurchführung gleiche optischen Dichte bei 750 nm (o.D._{750}) von $< 0,1$ verwendet. Der Wachstumsverlauf dieser Flüssigkulturen wurde durch Bestimmung der o.D._{750} photometrisch (Shimadzu, UV 1202) verfolgt, wobei eine o.D._{750} von 1 in etwa 5×10^6 Zellen/ml Flüssigkultur entspricht. Die Zellen wurden bei RT entweder im Dauerlicht von $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ oder im Wechsellicht von je 30 min $11 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und 30 min $65 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Weißlicht angezogen.

2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Die DNA-Isolierung wurde mit Hilfe des DNeasy Plant Mini Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Hierbei werden die Zellen lysiert, die Proteine gefällt und die genomische DNA an Kieselgel-Matrix-Säulen gebunden. Kontaminationen werden durch Waschungen beseitigt, und die gereinigte DNA mit H_2O bidestilliert (bidest.) eluiert. 100 mg Zellen wurden pro

Ansatz den Anweisungen des Herstellers folgend aufgearbeitet und die DNA mit 100 µl H₂O bidest. eluiert. Die Ausbeute betrug in der Regel 5 - 10 µg an hochreiner genomischer DNA.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolierung von Plasmiden wurde mit Hilfe des E.Z.N.A. Plasmid Mini-Prep Kit I (PeqLAB) den Anweisungen des Herstellers folgend durchgeführt. Durch Aufbrechen der Bakterienzellen und Fällung von genomischer DNA und Proteinen werden die Plasmide durch Bindung an Kieselgel-Matrix-Säulen aufgereinigt, von Kontaminationen befreit und mit H₂O bidest. eluiert. Aus 4 ml Übernachtskultur von *E.-coli*-Zellen, welche *high-copy*-Plasmide enthielten, wurden auf diese Weise in der Regel mindestens 10 µg reine Plasmid-DNA gewonnen.

2.2.3 Isolierung von RNA aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Gesamt-RNA wurde isoliert unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen). 30 mg Zellen wurden pro Aufarbeitung eingesetzt und die Anweisungen des Herstellers befolgt. Die aufgereinigte Gesamt-RNA wurde mit 50 µl RNase-freiem H₂O eluiert. Konzentration und Reinheit der erhaltenen RNA wurden durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm (Perkin-Elmer, Lambda 25 UV/VIS Spectrometer) überprüft. Da RNA im Gegensatz zu Proteinkontaminationen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm besitzt, kann durch den Quotient der Absorptionen ($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$) eine Aussage über die Reinheit der RNA getroffen werden. Dieser lag bei den *Chlamydomonas*-Proben in der Regel bei 1,6 - 1,7, was einem relativ hohen Reinheitsgrad entspricht. Die Ausbeute betrug zwischen 25 und 50 µg Gesamt-RNA pro Isolierung.

2.2.4 Restriktionsspaltung von DNA

DNA-Restriktions-Endonukleasen der Firmen New England Biolabs, Genecraft oder Roche wurden mit den mitgelieferten Puffersystemen und den Beschreibungen des Herstellers gemäß verwendet. Um eine vollständige Restriktion sicherzustellen, wurde das Fünffache der empfohlenen Enzymmenge verwendet und die Reaktionsdauer auf 2 Std. verlängert.

2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Blunt-end- sowie *sticky-end-*Ligationen wurden mit T4 DNA-Ligase (Genecraft) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Ligationsreaktionen erfolgten, sofern nicht anders angegeben, für 16 Std. bei 4 °C.

2.2.6 Klonierungen von PCR-Fragmenten in den Vektor pGEM-T-Easy und Sequenzierungen

Um PCR-Fragmente sequenzieren zu lassen, wurden diese zunächst in den Vektor pGEM-T-Easy (Promega) kloniert. 50 ng Vektor-DNA wurden mit der fragmentlängenabhängigen Menge an PCR-Produkt den Anweisungen des Herstellers folgend für 16 Std. bei 4 - 10 °C ligiert und mittels der Hitzeschock-Transformation (siehe Kapitel 2.2.11.4) in *E.-coli*-Zellen transformiert. DNA-Sequenzierungen der Vektoren wurden durch die Firma SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Göttingen) mit den *Primern* M13UniBle und M13RevBle (siehe Tab. 3) durchgeführt.

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.7.1 Standard-PCR

Sämtliche DNA-Oligonukleotide, die als *Primer* verwendet wurden, sind in Tabelle 3 aufgelistet.

PCR-Reaktionen (Saiki et al. 1985) wurden unter Verwendung von Taq-DNA-Polymerase (Genecraft) und mit den mitgelieferten Puffern durchgeführt. Die verwendeten *Primer* wurden mittels des Programms *Primer3* (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/Primer/Primer3_www.cgi) erstellt und bei der Firma Sigma ARK synthetisiert.

Eine Standard PCR-Reaktion (10 % (v/v) 10x PCR-Puffer, 2,5 *Units* Taq-DNA-Polymerase, 200 µM je dNTP, 0,5 µM je *Primer*, 0,1 µg Ausgangs-DNA) wurde im 50 µl-Maßstab im sterilen 0,2 ml-PCR-Gefäß angesetzt. Die Amplifikation erfolgte in einem PTC-200 Thermocycler der Firma MJ Research nach folgendem Schema:

Temperatur in °C	94	94	55 - 60	72	72	4
Dauer in Sek.	300	45	45	variabel	300	variabel
Zyklenanzahl	1	38		1	1	

Zur Amplifizierung besonders G/C-reicher Abschnitte wie z.B. der Nab1-cDNA wurde 10 % (v/v) Q-Solution (Qiagen) zugegeben.

Primer-Name	Sequenz in 5'-3' Richtung
AP1	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	AATAGGGCTCGAGCGGC
AV629952F	GCCGACTGAGCGAGGAG
AV629952R	CCACCAGGCGTGATGAA
BleFwd	ATGGCCAGGATGGCCAAGC
BleRev	TTAGTCCTGCTCCTCGGCCACG
Lhcbm6-2	CATTCCTGCACGCTCGCTTG
Lhcbm6-6	TTAATCCAGTGTGTTTACAGGTGG
Lhcbm6-CSD	GGCCTTGAACCAGACAGCCT
Lhcbm6-T7-1	GTAATACGACATCACTATAGGGCCTGTTTGGCGCTTTTGTACACG
Lhcbm6-T7-5	GTAATACGACATCACTATAGGGCCTCGGCCTAATTTGTATGAGCG
Lhcbm6-T7-CSD	GTAATACGACATCACTATAGGGCTGGAGCTGATCCA
M13UniBle	GTTGTAAAACGACGGCCAGTG
M13RevBle	CAGGAAACAGCTATGACCATGA
NabOexF	ACGGGATCCGGCGAGCAGCTGAGG
NabOexR	CCGTAAGCTTTCAAGCGAAACGGTCGAG
SeqFlankF	TGGATGGGTTCGAGTCTTAC
SeqFlankR	CACGCGCATTCTAACAGTC
SeqFIR5	GTCCTCCTTGGTCGTGAAGC
SeqFIR6	AGACCCACCCAGAGTACG
SpBle5	GGGGCCCGGTACCCAATTC
SpBle6	CCTTGCAGCACATCCCCCTTTCG
Stm3RTF1b	GCCATGCAGGTCGTGAT

Tab. 3: Verwendete DNA-Oligonukleotid-Primer.

2.2.7.2 Herstellung von spezifischen DNA-Sonden

Zur Herstellung spezifischer Sonden wurden zusätzlich zum Standard-PCR-Ansatz 1,5 µl Digoxigenin-11-dUTPs (Roche) zugegeben. Die so synthetisierte DNA enthält neben Thymin-Nukleotiden auch Digoxigenin-markierte Uracil-Nukleotide, welche mittels spezifischer Antikörper detektiert werden können.

2.2.8 Ligation mediated suppression-PCR (LMS-PCR)

Um unbekannte DNA-Bereiche flankierend von Vektor-Insertionsmutanten zu analysieren, wurde die Methode der LMS-PCR (Siebert et al. 1995, Strauss et al. 2001) angewandt.

Das Prinzip der Methode besteht darin, genomische DNA einer nukleären Zufalls-DNA-Insertionsmutante mittels eines *blunt-end*-Restriktionsenzym zu verdauen und an die

erhaltenen Fragmente doppelsträngige DNA-Adapter zu ligieren. In einer anschließenden PCR werden ein Adapter-spezifischer sowie ein vom inserierten Vektor abgeleiteter *Primer* eingesetzt und somit der genomische DNA-Bereich der Mutante amplifiziert, welcher dem zur Herstellung der Zufalls-Mutante verwendeten Vektor benachbart ist. Die Amplifizierung ungewollter Adapter-Adapter-Fragmenten wird supprimiert, da die Adapter so konstruiert sind, dass sie mit sich selber hybridisieren und so die Anlagerung des Adapter-spezifischen *Primers* unterdrückt wird.

Jeweils 5 µg genomische DNA von WT und Mutante wurde mit dem Restriktionsenzym Eco147I verdaut. Anschließend wurden die *blunt-end*-Fragmente einer Phenol/Chloroform-Extraktion (Sambrook et al. 1989) nebst Natriumacetat/Ethanol-Fällung (Sambrook et al. 1989) unterzogen und das Pellet in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8) gelöst. 10 µl dieser Lösung wurden mit 5 µM Adapterlösung für 16 Std. bei 14 °C ligiert (siehe Kapitel 2.2.5). Durch Erhitzen für 10 min auf 70 °C wurde die Ligation gestoppt und der Reaktionsansatz mit TE-Puffer auf 200 µl aufgefüllt. Zur PCR (siehe Kapitel 2.2.7.1) wurde 1 µl der ligierten Fragmente zusammen mit den *Primern* SpBle5 und AP1 in folgendem, speziellen LMS-Programm eingesetzt:

Temperatur in °C	94	94	68	72	4
Dauer in Sek.	300	30	360	300	variabel
Zyklenanzahl	1	38		1	1

Im Unterschied zur Standard-PCR wurde 1 µl Taq-DNA-Polymerase erst nach dem ersten Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 94 °C zugegeben (*hot start* PCR).

Im Anschluss an diese erste PCR wurde eine zweite PCR-Reaktion angesetzt, in welcher *seminested* (SpBle5 und AP2) und parallel dazu *nested* (SpBle6 und AP2) gelegene *Primer* eingesetzt wurden. 1 µl des ersten PCR-Produkts (1:1.000 verdünnt) wurde als Matrize eingesetzt und die PCR analog zur ersten PCR, jedoch mit 20 statt 38 Amplifikations-Zyklen, durchgeführt.

Das 2,1 kb große Fragment wurde in pGem-T-Easy kloniert und sequenziert (siehe Kapitel 2.2.6).

2.2.9 Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Die Synthese von cDNA erfolgte, den Anweisungen des Herstellers folgend, unter Verwendung von reverser Transkriptase der Firma Genecraft. Im mitgelieferten Puffersystem wurden 2 µg Gesamt-RNA zusammen mit 100 *Units* reverser Transkriptase und dem *Primer* SeqFIR5 für 10 min bei RT und für weitere 40 min bei 42 °C inkubiert. Für die anschließende PCR wurde je 1 µl dieses Ansatzes eingesetzt.

2.2.10 DNA-Hybridisierungsexperimente (*Southern-blots*)

Eine 535 bp große Sonde wurde wie in Kapitel 2.2.7.2 beschrieben unter Verwendung der *Primer* BleFwd und BleRev nebst dem Plasmid pSp124S (Stevens et al. 1996, Lumberras et al. 1998) als Matrize hergestellt.

Für DNA-Hybridisierungsexperimente wurden je 2 µg genomische DNA von Cw10 und Stm3 mittels des Enzyms PvuII restringiert (siehe Kapitel 2.2.4). Die geschnittene DNA wurde im 1 %igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt und das Gel für je 40 min bei RT in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) und Neutralisierungslösung (1 M Tris-HCl, 2 M NaCl, pH = 8.0) inkubiert. Die DNA wurde im Anschluss in 20fach SSC-Puffer (0,3 M Na₃-Citrat, 3 M NaCl, pH = 7) durch Auflegen einer Protran BA85 Cellulosenitrat-Membran (Schleicher & Schuell) und beschweren derselben mit einem Gewicht von 1,5 kg für 16 Std. vom Gel auf die Nitrocellulose-Membran übertragen. Anschließendes Belichten mit UV-Strahlung (UVP, Transilluminator) für 5 min sorgte für kovalente Bindung der DNA. Die Membran wurde in Hybridisierungsröhren (Biozym) überführt, für 5 Std. bei 68 °C mit 20 ml Hybridisierungslösung (5fach SSC, 1 % (w/v) *Blocking Reagent* (Roche)) und für weitere 16 Std. bei 68 °C mit 0,5 µg Sonden-DNA in 7 ml Hybridisierungslösung inkubiert. Es folgten je zwei Waschschrte für 10 min bei RT mit Waschpuffer 1 (2fach SSC, 0,1 % (w/v) SDS) und mit Waschpuffer 2 (0,1fach SSC, 0,1 % (w/v) SDS). Nach kurzem Spülen mit Puffer 1 (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH = 7,5) wurde die Membran für 30 min bei 68 °C in Puffer 2 (1 % (w/v) *Blocking Reagent* in Puffer 1) inkubiert. Es folgte ein Waschschrte für 10 min bei RT in Puffer 1.

Die Antikörperbindung erfolgte durch Inkubation der Membran in 20 ml Puffer 1 mit 4 µl Anti-Digoxigenin-AP-Fab-Fragments (Roche) für 30 min bei RT. Im Anschluss wurde die Membran 2-mal für je 15 min in Puffer 1 bei RT gerollert, kurz mit AP-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH = 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) gespült und schließlich in 20 ml AP-Puffer unter Zugabe von 52,5 µl BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat p-Toluidin-Salz, 50 mg/ml in 100 % Dimethylformamid) und 45 µl NBT (Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid, 75 mg/ml in 70 % Dimethylformamid) entwickelt.

2.2.11 Herstellung von *E.-coli*-Transformanten

2.2.11.1 Herstellung von elektroporations-kompetenten *E.-coli*-Zellen

DH5α-*E.-coli*-Zellen wurden für 16 Std. in 2 ml LB-Medium angezogen. Mit dieser Lösung wurden 400 ml LB-Medium inokuliert und dieses bis zur optischen Dichte bei 600 nm (o.D.₆₀₀) (Perkin-Elmer, Lambda 3 UV/VIS Spectrophotometer) von 0,5 bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde für 15 min auf 4 °C gekühlt, die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 4.000 g (Beckman, J2-21 Centrifuge) pelletiert, 2-mal mit je 120 ml sterilem, 4 °C kaltem H₂O bidest. gewaschen, in 40 ml sterilem, 4 °C kaltem 15 %igem (v/v) Glycerol gelöst und durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 4.000 g erneut pelletiert. Schließlich wurde das Pellet in 1,5 Vol. sterilem, 15 %igem Glycerol resuspendiert, in 100-µl-Aliquots aufgeteilt

und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gelagert wurden die so hergestellten, kompetenten Zellen bei -80 °C.

2.2.11.2 Herstellung von hitzetransformations-kompetenten *E.-coli*-Zellen

XL1Blue-*E.-coli*-Zellen wurden in 4 ml für 16 Std. bei 37 °C angezogen. Mit dieser Kultur wurden 250 ml SOB-Medium (10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 2 % (w/v) Trypton (Roth), 0,5 % (w/v) Hefe Extrakt (Oxoid), pH = 6,8) inokuliert und die Zellen bis zur o.D.₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die Kultur wurde dann für 10 min bei 4 °C inkubiert und die Zellen für 10 min bei 4 °C und 2.500 g pelletiert. Das Pellet wurde in 80 ml TB-Medium (10 mM PIPES (Sigma), 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂, pH = 6,8) resuspendiert, 10 min bei 4 °C inkubiert, erneut bei 4 °C und 2.500 g zentrifugiert, in 20 ml TB-Medium aufgenommen, mit 7 % DMSO (Sigma) versetzt und schließlich in 100 µl Portionen aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.11.3 Elektroporation

100 µl elektroporations-kompetente *E.-coli*-Zellen (siehe Kapitel 2.2.11.1) wurden auf Eis mit 5 - 25 ng zu transformierender DNA versetzt und in Elektroporationsküvetten (PeqLab) überführt. Die Transformation erfolgte bei 2.500 V (Equibio, Easyject Prima). Im Anschluss wurden 500 µl SOC-Medium (Sambrook et al. 1989) zugegeben und die Zellen für 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Selektion der Transformanten fand durch Anzucht für 16 Std. bei 37 °C auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin statt.

2.2.11.4 Hitzeschock-Transformation

100 µl transformations-kompetente *E.-coli*-Zellen (siehe Kapitel 2.2.11.2) wurden mit 5 - 50 ng zu transformierender DNA versetzt und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Zur Transformation wurden die Zellen für 45 - 50 Sek. auf exakt 42 °C erhitzt, für 2 min auf 4 °C abgekühlt, mit 500 µl SOC-Medium versetzt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion von Transformanten wurde die Zellsuspension auf LB-Agarplatten pipetiert, welche das Antibiotikum Ampicillin enthielten (100 µg/ml) und für 16 Std. bei 37 °C inkubiert. Im Falle von pGEM-T-Easy-Klonierungen und Klonierungen in pBluescript-II-KS(+)-Vektoren (Stratagene) wurden Platten verwendet, welche zusätzlich 0,5 mM IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid, Biomol) und 80 µg/ml X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactoside, PeqLab) enthielten. Aufgrund der Konstruktion des pGEM-T-Easy und des pBluescript-II-KS(+)-Vektorsystems können durch blau/weiß-Selektion die Kolonien ausgeschlossen werden, welche kein ligiertes DNA-Fragment enthalten, da sie X-Gal metabolisieren und blau erscheinen.

2.2.12 Herstellung von *C.-reinhardtii*-Mutanten

Kernmutanten der Grünalge wurden mittel der *glass bead*-Methode (Kindle 1990) hergestellt. Zur stabilen, zufälligen Integration von Plasmid-DNA wurde der Zellwand-reduzierte Stamm Cw10 bzw. Mutanten desselben eingesetzt. Bei dieser Methode werden die Zellen zusammen mit dem zu transformierenden Plasmid in kleine Glasröhrchen gegeben und mit Glasskugelchen ($\varnothing = 0,5$ mm) versetzt. Durch anschließendes vortexen wird die Plasmid-DNA in den Kern geschossen und integriert dort zufällig ins Kerngenom der Zelle. Transformanten können durch auf dem Plasmid codierte Markerbereiche von nicht-transformierten Zellen selektiert werden.

2.2.12.1 Herstellung von Stm3

Zur Herstellung der nukleären Zufalls-DNA-Insertionsmutante Stm3 wurde das Plasmid pSp124S (Stevens et al. 1996, Lumberras et al. 1998) verwendet. Das auf diesem Plasmid codierte Ble-Gen vermittelt den Transformanten eine Resistenz gegen die Antibiotika Bleocin (Calbiochem), Phleomycin (Cayla) und Zeomycin (Cayla) und kann so als dominanter selektierbarer Marker genutzt werden.

100 ml *Chlamydomonas-reinhardtii*-Zellen des Stammes Cw10 wurden bis zur o.D.₇₅₀ von 0,6 in TAP-Medium angezogen, bei 2.000 g (Heraeus Sepatech, Megafuge 1.0) pelletiert und in 3 ml TAP-Medium resuspendiert. Pro Transformationsansatz wurden 300 μ l dieser Suspension zu 0,3 g in HCl gewaschener, steriler Glasskugelchen gegeben und mit 2 μ g BamHI-linearisiertem pSp124S-Plasmid versetzt. Die Transformation fand durch Vortexen (IKA-Labortechnik, VF2) für 15 Sek. auf maximaler Stufe statt. Die Transformationsansätze wurden hiernach zusammen in ein steriles Plastikgefäß überführt und mit 10 ml TAP-Medium für 16 Std. bei 23 °C und 40 μ mol·m⁻²·s⁻¹ Weißlicht inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut bei 2.000 g pelletiert, in 0,5 ml TAP-Medium resuspendiert, mit 3,5 ml 42 °C warmen TAP-Medium suppliert, mit 0,5 % Agar (Invitrogen) versetzt und auf TAP-Platten, welche 20 μ g/ml Bleocin enthielten, ausplattiert.

2.2.12.2 Co-Transformation mit p613 und pNab1 oder pNab2

Im Gegensatz zu der in Kapitel 2.2.12.1 beschriebenen Transformation mit nur einem Plasmid wurden in Co-Transformationsansätzen zwei unterschiedliche Plasmide zusammen transformiert. Dabei trug das eine Plasmid, p613 (Nelson et al. 1994), den dominanten selektierbaren Marker. Auf diesem Plasmid ist das CRY1-Protein codiert, welches eine Resistenz gegen das Antibiotikum Emetine (Sigma) vermittelt. Durch Zugabe von 100 μ M Emetine zum TAP-Medium konnten Transformanten mit diesem Plasmid selektiert werden.

Das andere Plasmid, pNab1 oder pNab2 (siehe Kapitel 2.2.15.1), trug keinen zur direkten Selektion geeigneten Marker. Durch die gemeinsame Transformation wurde das zweite Plasmid jedoch mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit (Kindle 1990) zusammen mit dem

Resistenz-Marker transformiert. Auf diese Weise konnten leichter Mutanten selektiert werden, die auch das Plasmid ohne dominanten Marker integriert hatten.

Jeweils 2 µg der Plasmide pNab1 oder pNab2 wurden zusammen mit 2 µg p613 wie in Kapitel 2.2.12.1 beschrieben transformiert. Die Zellen wurden hier jedoch in TAP-1/10-N-Medium resuspendiert, welches nur 1/10 der Ammoniumchlorid-Menge des Standard-TAP-Mediums enthielt. Im Anschluss an die Transformation wurden die Zellen in 100 ml TAP-1/10-N-Medium gegeben und für 100 Std. bei 23 °C und 40 µmol·m⁻²·s⁻¹ Weißlicht inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 2.000 g wurden die Zellen in 100 ml TAP-Medium resuspendiert, für weitere 8 Std. inkubiert, erneut pelletiert, in 10 ml TAP-Medium resuspendiert und je 1 ml auf eine TAP_{Emetine}-Agarplatte verteilt.

Emetine-resistente Transformanten konnten nach 10 - 12 Tagen Anzucht bei 23 °C und 40 µmol·m⁻²·s⁻¹ Weißlicht isoliert werden.

2.2.13 Segregationsexperimente

Segregationsexperimente wurden wie in Harris (1989) beschrieben durchgeführt. Die Antibiotika-Resistenz von 53 isolierten Tochterzellen wurde überprüft, indem sie auf TAP-Platten überimpft wurden, welche 20 µg/ml Bleocin enthielten. Der Phänotyp der Mutanten wurde durch Auswertung der RT-Fluoreszenz (siehe Kapitel 2.4.1.1) verifiziert.

2.2.14 Identifizierung des Nab1-Gens

2.2.14.1 Screening einer Phagenbank mit genomischen *C.-reinhardtii*-Fragmenten

Die EMBL3-Phagenbank mit genomischer WT-DNA von *C. reinhardtii* (Goldschmidt-Clermont & Rahire 1986) wurde zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. M. Goldschmidt-Clermont (Université de Genève), die 1.270 bp große Sonde wurde mittels der *Primer* SeqFlankF und SeqFlankR synthetisiert (siehe Kapitel 2.2.7.2).

200 ml LBM-Medium (1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1 % (w/v) NaCl, 0,2 % (w/v) MgSO₄·7 H₂O) wurden mit *E.-coli*-Zellen des Stammes NM538 inokuliert und für 16 Std. bei 37 °C angezogen. Anschließend wurde die Suspension in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert, bei 3.000 g zentrifugiert und mit 10 mM MgSO₄ auf eine o.D.₆₀₀ von 2 eingestellt. Die EMBL3-Phagenbank wurde auf 1:550.000 mit SM-Puffer (Sambrook et al. 1989) verdünnt. Je 100 µl der Phagensuspension wurden mit 100 µl Bakteriensuspension versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml 50 °C warmen LBM-Top-Mediums (LBM, 0,7 % Agarose) wurde die Suspension auf LB-Agarplatten verteilt und nach Aushärten für 16 Std. bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten für 1 Std. bei 4 °C gekühlt und eine Hybond-N⁺-Membran (Amersham) für 5 min aufgelegt. Stapel von je 3 Lagen Whatman-Filterpapier wurden vorbereitet und mit Denaturierungs-, Neutralisierungs- oder 2fach SSC-Lösung (siehe Kapitel 2.2.10) getränkt. Die Membrane wurden nun nacheinander für je 4 min bei RT auf diese Stapel überführt, anschließend getrocknet und für 2 Std. bei 80 °C gebacken.

Sonden-Hybridisierung und Detektion von positiven Phagen-Plaques erfolgte wie in Kapitel 2.2.10 beschrieben.

2.2.14.2 Isolierung der Phagen-DNA

Um ausreichende Mengen Phagen-DNA isolieren zu können, wurde der identifizierte Phage (siehe Kapitel 2.2.14.1) in großem Maßstab angezogen. 2l NZCYM-Medium (Sambrook et al. 1989) wurden hierzu angesetzt und die Präparation wie in Sambrook et al. (1989) beschrieben (*Infection at low multiplicity; Alternative methods for purification of bacteriophage Lambda; Extraction of bacteriophage Lambda DNA*) durchgeführt.

2.2.14.3 Restriktion, Subklonierung und Sequenzierung der DNA

Die isolierte Phagen-DNA wurde zur Analyse durch Sequenzierung geschnitten und die Fragmente in den Vektor pBluescript-II-KS(+) subkloniert.

150 µg Phagen-DNA wurden mit 600 *Units* des Restriktionsenzym *SalI* geschnitten (siehe Kapitel 2.2.4) und im Anschluss mit 15 µg RNase (DNase-frei, Roche) für 30 min bei 37 °C und 20 min bei 65 °C inkubiert. Die Lösung wurde im 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Neben den Fragmenten der Phagenarme wurden Fragmente von 1 kb, 2,8 kb, 3,3 kb und 5,5 kb Länge erhalten und diese durch Gelextraktion (Qiagen, QIAquick Gel Extraction Kit) und Elution in 50 µl H₂O bidest. isoliert.

1 µg des Vektors pBluescript-II-KS(+) wurde mit 10 *Units* des Enzyms *SalI* restringiert und mittels des PCR-Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt. Die Ligation erfolgte für 16 Std. bei 4 °C mit jeweils 150 ng Fragment und 200 ng Vektor im 20 µl Reaktionsansatz. 4 µl der Ligationsansätze wurden jeweils zur Elektroporation (siehe Kapitel 2.2.11.3) in *E. coli* des Stammes DH5α verwendet. Klone, welche eines der Fragmente enthielten, wurden isoliert und mit den *Primern* M13UniBle und M13RevBle ansequenziert. Die vollständige Sequenzierung erfolgte durch Auswahl weiterer, individuell abgeleiteter Primer.

2.2.15 Komplementierung der Mutante *Stm3*

2.2.15.1 Herstellung der Komplementationsvektoren pNab1 und pNab2

45 µg der isolierten Phagen-DNA (siehe Kapitel 2.2.14.2) wurden mittels 60 *Units* des Restriktionsenzym *AvrII* für 3 Std. bei 37 °C verdaut und die DNA-Fragmente mit der apparenten Größe von 3.700 bp, welche Promoterbereich und codierende Region des *Nab1*-Gens enthalten, isoliert (Qiagen, QIAquick Gel Extraction Kit).

Parallel wurden 5 µg des Vektors pBluescript-II-KS(+) mit 50 *Units* des Restriktionsenzym *XbaI* für 2 Std. bei 37 °C verdaut und mittels des PCR-Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt.

Für die folgende Ligationsreaktion wurden 75 ng Vektor- und 150 ng der isolierten *Nab1*-Fragmente eingesetzt (siehe Kapitel 2.2.5). Nach der Ligation wurde ¼ des Ligationsansatzes

in *E. coli* transformiert (siehe Kapitel 2.2.11.4) und der Transformations-Ansatz auf LB_{Amp/X-GAL/IPTG}-Platten für 16 Std. bei 37 °C inkubiert. Durch Selektion der weiß erscheinenden Kolonien konnten 2 Transformanten selektiert werden, welche beide den Vektor mitsamt des inserierten Nab1-Fragments enthielten. Die Plasmide wurden isoliert (siehe Kapitel 2.2.2) und als pNab1 bzw. pNab2 bezeichnet, wobei die beiden Konstrukte das inserierte Nab1-Fragment in entgegengesetzter Orientierung trugen.

2.2.15.2 Herstellung und Identifizierung der komplementierten Mutante Stm3nc1

Zur Herstellung der komplementierten Mutante Stm3nc1 wurde der Komplementationsvektor pNab1 zusammen mit dem Emetine-Resistenz vermittelnden Plasmid p613 wie beschrieben (siehe Kapitel 2.2.12.2) transformiert. Um Co-Transformanten identifizieren zu können, welche neben dem transformierten p613 auch das pNab1-Konstrukt trugen, wurden jeweils 15 Transformanten zusammen angezogen und die DNA isoliert. Der DNA-*pool* wurde mit den *Primer*-Paaren AV629952F-AV629952R und SeqFlankF-SeqFIR6 in PCR-Analysen untersucht. Sobald die entsprechenden DNA-Fragmente von 107 bp bzw. 307 bp vom Komplementationsvektors amplifiziert werden konnten, wurden die entsprechenden Transformanten einzeln angezogen. Die DNA der Transformanten wurde einzeln isoliert und in PCR-Analysen mit den *Primer*-Paaren AV629952F-AV629952R und Stm3RTF1b-SeqFIR5 (738 bp) untersucht. Die vier positiv identifizierten Mutanten wurden mit Stm3nc1 - 4 benannt (Stm3 nab cry 1 - 4). Zur Überprüfung der Expression wurde die Gesamt-RNA isoliert (siehe Kapitel 2.2.3) und revers transkribiert (siehe Kapitel 2.2.9). Im Anschluss wurden PCR-Analysen mit den *Primern* Stm3RTF1b und SeqFIR5 wie in Kapitel 2.2.7.1 beschrieben durchgeführt. Auf cDNA-Ebene werden durch die *Primer* Stm3RTF1b und SeqFIR5 Fragmente von 242 bp amplifiziert. Die Mutante, bei welcher das entsprechende Fragment auftrat, wurde als Stm3nc1 bezeichnet.

2.2.16 Expression von rekombinantem, His-markierten NAB1-Protein in *E. coli*

Die Nab1-cDNA wurde per PCR mit den *Primern* NabOexF und NabOexR durchgeführt. Als Vorlage wurde der Klon AV629952 vom Kazusa DNA Research Institute (Japan) verwendet, welcher die gesamte cDNA des Nab1-Gens enthält. Im Gegensatz zur Standard-PCR (siehe Kapitel 2.2.7.1) wurde dem Ansatz 1/5 Volumen Q-Solution (Qiagen), und die KlenTherm-Polymerase (Genecraft) erst nach Erhitzen des Ansatzes auf 94 °C zugegeben. Das amplifizierte, 760 bp große Fragment wurde mittels des PCR-Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt. Der Vektor pQE80L (Qiagen) wurde als Expressionsvektor verwendet. Die Restriktion von Vektor und PCR-Fragment wurde mit den Enzymen BamHI und HindIII durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.4) und die restringierten Fragmente aus dem Agarosegel isoliert. Zur Ligation wurde ein 6facher Überschuss des PCR-Fragments eingesetzt und die Ligation für 16 Std. bei 4 °C durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5). Das Ligationsprodukt wurde in den zur Expression verwendeten *E.-coli*-Stamm M15 (siehe Kapitel 2.1.1) transformiert (siehe Kapitel 2.2.11.3). Nach Selektion eines transformierten Klons erfolgte dessen Anzucht

für 16 Std. in 20 ml LB_{Amp}-Medium. Die Vorkultur wurde zum Animpfen von 400 ml LB_{Amp}-Medium verwendet. Inkubiert wurden die Zellen für 1 Std. bei 37 °C. Die Induktion der NAB1-Expression erfolgte bei einer o.D.₆₀₀ von 0,48 durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach weiteren 3,5 Std. Inkubation konnten die Zellen durch Zentrifugation für 15 min bei 3.000 g geerntet und in 5 ml Lysis-Puffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8, 10 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 5 µl Benzonase (Sigma), 1 mM PefaBlock (Merck)) resuspendiert werden. Die Suspension wurde dreimal in der Zellpresse (American Instrument Company, French pressure cell press) aufgebrochen und die Zellfragmente durch Zentrifugation für 20 min bei 20.000 g und 4 °C entfernt. Der Überstand wurde mit 1 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen) versetzt und für 30 min bei 4 °C inkubiert, in einen Plastik-Säule (Qiagen) gefüllt und dreimal mit Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl) gewaschen. Die Elution des NAB1-Proteins erfolgte durch Zugabe von Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8, 250 mM Imidazol, 300 mM NaCl).

2.2.17 Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen NAB1

800 µg des exprimierten, aufgereinigten und His-markierten NAB1-Proteins wurden der Firma SeqLab zur Injektion in ein Kaninchen geschickt. Das nach zwei Monaten gelieferte Antiserum konnte ohne weitere Aufreinigung zur Untersuchung der NAB1-Expression in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt werden.

2.2.18 NAB1-RNA-Bindestudien

NAB1-RNA-Bindestudien erfolgten mit rekombinantem NAB1-Protein (siehe Kapitel 2.2.16) und *in vitro* transkribierter RNA wie beschrieben in Ossenbühl & Nickelsen (2000) und Ossenbühl et al. (2002). Alle verwendeten *Primer* wurden von der cDNA-Sequenz des Lhcbm6-Gens abgeleitet. Für die Sonde der RNA-consensus-Bindedomäne wurde das *Primer*-Paar Lhcbm6-T7-CSD und Lhcbm6-CSD, für die Sonde des 5'-UTR-Bereichs das *Primer*-Paar Lhcbm6-T7-1 und Lhcbm6-2 und für die Sonde des 3'-UTR-Bereichs das *Primer*-Paar Lhcbm6-T7-5 und Lhcbm6-6 in PCR-Reaktionen mit genomischer DNA von *C. reinhardtii* eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde anschließend *in vitro* transkribiert, wobei allein die RNA abgeleitet von der RNA-consensus-Bindedomäne radioaktiv markiert wurde. In den Kompetitions-Studien wurde rekombinantes NAB1 zusammen mit der radioaktive Sonden-RNA alleine, oder zusammen mit der 5fachen Menge nicht-radioaktiv markierter RNA abgeleitet von der RNA-consensus-Bindedomäne, dem 5'-UTR oder dem 3'-UTR Bereich eingesetzt.

2.3 BIOCHEMISCHE METHODEN

2.3.1 Isolierung von *Chlamydomonas*-Thylakoiden

300 ml *Chlamydomonas-reinhardtii*-Kultur der späten logarithmischen Wachstumsphase wurden geerntet, in 30 ml Puffer A (25 mM HEPES, pH = 7,5, 1 mM MgCl₂, 0,3 M Sucrose) gelöst, durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 2.200 g pelletiert, in 8 ml Puffer A resuspendiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend wurden die Zellen in der Zellpresse aufgeschlossen und in 30 ml Puffer A aufgenommen. Nach Zentrifugation für 45 min bei 4 °C und 20.000 g wurde das Pellet in 30 ml Puffer B (5 mM HEPES, pH = 7,5, 10 mM EDTA, 0,3 M Sucrose) resuspendiert, für 45 min bei 4 °C und 48.000 g zentrifugiert und mit Puffer C (5 mM HEPES, pH = 7,5, 10 mM EDTA, 2,2 M Sucrose) auf eine Sucrose-Konzentration von 1,75 M eingestellt. Mit dieser Suspension wurden Zentrifugations-Röhrchen beladen, zur Hälfte mit 1,75 M Sucrose aufgefüllt, mit Puffer D (5 mM HEPES, pH = 7,5, 0,5 M Sucrose) überschichtet und für 60 min bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Thylakoide sammelten sich zwischen den Sucrose-Schichten, wurden entnommen und in 5fachem Volumen Puffer E (20 mM MES, pH = 6,3, 5 mM MgCl₂, 15 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol) aufgenommen. Die Suspension wurde dann für 20 min bei 48.000 g und 4 °C zentrifugiert und schließlich in MMNB-Puffer (25 mM MES, pH = 6,0, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 2 M Betaine) aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

2.3.2 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Chlorophyll-Moleküle wurden mit 80 % Aceton extrahiert, zelluläre Bestandteile durch Zentrifugation bei 16.100 g für 1 min entfernt.

Zur Bestimmung des Chlorophyllgehaltes bei gleicher Zelldichte wurden die Zellsuspensionen auf die o.D.₇₅₀ von 0,85 eingestellt und ein gleiches Volumen der jeweiligen Zellsuspensionen eingesetzt. Die Bestimmung des Chlorophyll-Gehalts erfolgte durch Messung der Absorption bei 645 nm (A₆₄₅) und 663 nm (A₆₆₃). Die Berechnung von Chl-a/b-Verhältnis und Chlorophyllgehalt wurde nach Arnon (1959) vorgenommen:

$$\text{Chl-a (mg/ml)} = [(A_{663} \times 0,0127) - (0,00269 \times A_{645})] \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{Chl-b (mg/ml)} = [(A_{645} \times 0,0229) - (0,00468 \times A_{663})] \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{Gesamt-Chlorophyll (mg/ml)} = \text{Chl-a} + \text{Chl-b.}$$

2.3.3 1D-Gelelektrophoresen

2.3.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine und Proteingemische dem Molekulargewicht entsprechend aufzutrennen, wurden sie der denaturierenden SDS-PAGE (Laemmli 1970) unterzogen.

Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 (v/v) mit denaturierendem Auftragspuffer (160 mM Tris-HCl, pH = 6,8, 4 mM EDTA, 0,8 M Sucrose, 0,7 % Glycerol, 24 mM DTT, 3,15 % SDS, etwas Bromphenolblau) versetzt und 15 - 30 min bei RT inkubiert.

Die Gelmatrix bestand aus zwei Phasen, einer oberen Sammelphase (5 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1, Merck), 0,7 M Tris-HCl, pH = 8,45, 0,07 % (w/v) SDS, 1,1 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (AMPS), 0,057 % (v/v) TEMED (Sigma) und einer unteren Trennphase (10 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 12,5 % (v/v) Glycerol, 0,94 M Tris-HCl, pH = 8,45, 0,094 % (w/v) SDS, 0,5 % (w/v) AMPS, 0,05 % (v/v) TEMED).

Nach Befüllen der Mini-Protean-II-TM-Kammer (Biorad) mit Anodenpuffer (0,2 M Tris-HCl, pH = 8,9) und Kathodenpuffer (0,1 M Tris-HCl, pH = 8,25, 0,1 M Tricine, 0,1 % (w/v) SDS) wurden die Proteinproben in die Taschen des Sammelgels gefüllt. Zum Abschätzen der Protein-Molekulargewichte diente ein Proteinmarker der Firma PeqLab (PeqGold Prestained Protein Marker) oder der Firma Biorad (Precision Plus). Zum Auftrennen der Proteine wurde für 30 min eine Stromstärke von 30 mA und für weitere 120 min eine Stromstärke von 60 mA angelegt.

Im Fall von Immuno-*blot*-Experimenten wurden die Gele wie im Kapitel 2.3.3.2 beschrieben weiterverwendet. Um die aufgetrennten Proteine anzufärben, wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet.

2.3.3.1.1 Coomassie-Färbung

Zur Coomassie-Färbung wurde das Gel für 16 Std. bei RT in Färbelösung (0,025 % (w/v) Coomassie R250, 0,025 % (w/v) Coomassie G250, 7 % (v/v) Essigsäure, 10 % (v/v) Ethanol) inkubiert. Anschließend wurde es für 5 Std. bei RT in Entfärbelösung (25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure) inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

2.3.3.1.2 Silber-Färbung

Die Silberfärbung erfolgte analog zur Beschreibung in Kruse et al. (1997). Das Gel wurde bei RT zunächst für 10 min in Fixierlösung (40 % (v/v) Methanol, 5 % (v/v) Formaldehyd), anschließend für 10 min in H₂O bidest., dann für 1 min in 0,02 % (w/v) Na₂S₂O₄ inkubiert und kurz mit H₂O bidest. gewaschen. Nach 10-minütiger Inkubation in Färbelösung (0,1 % (w/v) Silbernitrat) und kurzem Waschen mit H₂O bidest. wurde die Entwicklung durch Zugabe der Entwicklerlösung (3 % (w/v) Na₂CO₃, 0,05 % (v/v) Formaldehyd, 0,0004 % Na₂S₂O₄) begonnen. Sobald die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren, wurde die Färbereaktion durch Zugabe von Stopplösung (25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure) abgebrochen.

2.3.3.2 Immuno-blot-Experimente

Immuno-*blot*-Experimente ermöglichen es, mit Hilfe von spezifischen Antikörpern Proteine selektiv im Proteingemisch zu detektieren. Die Methode wird auch als *Western-blot* Verfahren bezeichnet (Burnette 1981, Turner 1983).

Hierzu wurde eine Nitrocellulosemembran (Protean BA 85 Cellulosenitrat, 0,45 µM, Schleicher & Schüll) auf das SDS-PAGE-Gel gelegt und dieses in eine Elektro-*blot*-Kammer (Biorad) überführt. Nach Befüllung der Kammer mit 4 °C kaltem Transferpuffer (0,192 M Glycine, 0,025 M Tris-HCl, 20 % (v/v) Methanol) wurden die Proteine bei 4 °C durch Anlegen von 95 V für 36 min auf die Membran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden durch die folgende 30-minütige Inkubation der Membran bei RT in TBS-Tween (50 mM Tris-HCl, pH = 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % (w/v) Tween20) und 3 % (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) abgesättigt. Alle folgenden Inkubations- und Waschschrte erfolgten in TBS-Tween-Lösung.

Zur Antigen-Antikörper-Reaktion wurde die erste Antikörper-Lösung (Tab. 4) zugegeben und für 16 Std. bei 4 °C inkubiert. Nach anschließendem 30-minütigem Waschen wurde die zweite Antikörper-Lösung (Anti-Rabbit IgG-Biotin konjugiert (Sigma) oder Anti-Mouse IgG-Biotin konjugiert (Sigma)) in den Verdünnungen 1:2.000-1:10.000 zur Membran gegeben und für 1 Std. bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrte für 30 min bei RT wurde Extravidine (Sigma) in der Verdünnung 1:20.000 zugegeben und erneut für 1 Std. bei RT inkubiert. Nach einem letzten Waschschrte für 30 min bei RT folgte die Entwicklung der Membran durch Zugabe von 10 ml AP-Puffer, 33 µl BCIP und 66 µl NBT. Die Farbreaktion wurde durch Spülen mit H₂O bidest. gestoppt.

Name	Herkunft	Verdünnung	2. Antikörper
<i>Monoclonal anti-phosphoserine antibody</i>	Sigma	1:1.000	Anti-Mouse-IgG
<i>Polyclonal rabbit anti-phosphothreonine antibody</i>	Zymed	1:1.000	Anti-Rabbit-IgG
<i>Monoclonal anti-phosphotyrosine antibody</i>	Sigma	1:2.000	Anti-Mouse-IgG
<i>Anti-Arginine (mono-and di-methyl) ab412</i>	Abcam	1:500	Anti-Mouse-IgG
Anti-LHCII	Prof. Dr. S. Jansson (Umea Universität, Schweden)	1:3.000	Anti-Rabbit-IgG
Anti-NAB1	Siehe Kapitel 2.2.17	1:10.000	Anti-Rabbit-IgG

Tab. 4: Verwendete Antiseren.

2.3.4 Untersuchung der LHC-Proteine

2.3.4.1 Phosphorylierung der LHCII-Proteine

Der Phosphorylierungszustand der LHCII-Proteine wurde *in vivo* und *in vitro* überprüft.

2.3.4.1.1 Phosphorylierung *in vivo*

Zellen von WT und Stm3 wurden bis zur o.D.₇₅₀ von 0,5 in TAP-Medium angezogen. Im Anschluss wurden sie durch Inkubation für 16 Std. im Dunkeln auf *LHC-state-1* eingestellt und der Chlorophyll-Gehalt bestimmt (siehe Kapitel 2.3.2). Ein Teil der Zellen wurde entnommen und durch anaerobe Inkubation für 30 min unter Stickstoff-Begasung in *LHC-state-2* überführt (Bulté & Wollman 1990). Proben gleichen Chlorophyll-Gehalts wurden durch 1D-SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western-blot* mit Anti-Phosphothreonin-Antikörpern analysiert (siehe Kapitel 2.3.3).

2.3.4.1.2 Phosphorylierung *in vitro*

Zellen von WT und Stm3 wurden angezogen und durch Inkubation für 16 Std. im Dunkeln auf *LHC-state-1* eingestellt. Thylakoide wurden isoliert (siehe Kapitel 2.3.1) und mit Phosphorylierungspuffer (100 mM Sucrose, 50 mM HEPES, pH = 8, 10 mM MgCl₂, 10 mM NaF) auf eine Chlorophyll-Konzentration von 0,2 mg/ml eingestellt. Jeweils 1 ml dieser Proben wurde in Erlenmeyer-Kolben überführt, mit je 20 µl ATP-Lösung (10 mM ATP (Sigma), 1 mCi/ml ATP³² (Amersham)) versetzt und bei RT mit 100 µmol·m⁻²·s⁻¹ Weißlicht inkubiert. Proben von je 200 µl wurden vor Belichtung und nach 2, 10 und 20 min entnommen, die Membrane durch Zentrifugation für 2 min pelletiert und anschließend auf 100 µl mit Phosphorylierungspuffer resuspendiert. Die Proteine wurden durch sofortige Zugabe von 100 µl Auftragspuffer (siehe Kapitel 2.3.3.1) denaturiert. Für *Western-blot*-Analysen wurden Proben von je 4 µg Chlorophyll eingesetzt (siehe Kapitel 2.3.3). Die Nitrocellulose-Membran wurde im Anschluss für 16 Std. auf einer *Storage-Phosphor-Screen-Platte* (Molecular Dynamics) fixiert und die übertragenen, radioaktiven Signale im Typhoon 8600 Variable Mode Imager (Molecular Dynamics) detektiert.

2.3.4.2 1D-gelelektrophoretische Untersuchung der LHC-Expression

Zellen von WT und Stm3 wurden in TAP-Medium angezogen und auf die o.D.₇₅₀ von 0,62 eingestellt. Jeweils 85 ml der Zellsuspensionen wurden bei 4 °C und 3.000 g für 20 min zentrifugiert, in je 2 ml SMNCB-Puffer (300 mM Sucrose, 25 mM MES, pH = 6,5, 10 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM NaHCO₃) resuspendiert und in der Zellpresse aufgeschlossen. Jeweils 4 µl der Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und der LHC-Gehalt durch *Western-blot*-Analysen mit einem Anti-LHCII-Antiserum untersucht (siehe Kapitel 2.3.3).

2.3.4.3 2D-gelelektrophoretische Untersuchung der LHC-Expression

Herstellung des LHCBM4/6-spezifischen Antiserums und Durchführung der 2D-Gelelektrophoresen sowie *Western-blot*-Analysen wurden durchgeführt wie beschrieben in Hippler et al. (2001).

Die verwendeten Kulturen wurden bei RT und $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Weißlicht angezogen, anschließend wurden die Thylakoidmembrane wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben isoliert.

An Stelle von 200 μg wurden jeweils 400 μg Thylakoid-Proteine von WT, *Stm3* oder *Stm3nc1* mit einer Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ für die Fällung und anschließende Auftrennung eingesetzt. Die densitometrische Auswertung der Intensität der Signale wurde mit dem Programm Quantity One (V. 4.1.1, BioRad) durchgeführt.

2.3.5 Aufreinigung von NAB1 durch isoelektrische Fokussierung der löslichen *Chlamydomonas*-Proteine

Es wurde 1l TAP-Medium mit Zellen des *C.-reinhardtii*-WT-Stammes Cw10 inokuliert und bis zur o.D.₇₅₀ von 1 angezogen. Die Kultur wurde für 16 Std. bei 23 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend in zwei Hälften aufgeteilt. Die eine Hälfte wurde für weiter 5,5 Std. im Dunkeln belassen, die andere Hälfte wurde für 5,5 Std. bei $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Weißlicht inkubiert. Die Zellen wurden bei 1.000 g für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in jeweils 20 ml 20 mM NaF resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in der Zellpresse aufgebrochen und die Membrane durch Zentrifugation für 1 Std. bei 40.000 g und 4 °C entfernt. Der Überstand wurde gesammelt, mit jeweils 180 ml Aceton versetzt und für 3 Std. bei -20 °C inkubiert. Die ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugation für 45 min bei 15.000 g und 4 °C gesammelt, der Überstand verworfen, das Pellet in jeweils 35 ml 6 M Urea gelöst und das unlösliche Präzipitat verworfen. Die Proben wurden dann auf 2 % Ampholyte (Bio-Lyte 8/10, BioRad) und 1 % CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1-propansulfonat, Sigma) eingestellt und in eine Rotofor-Kammer (BioRad) gegeben. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte für 4 Std. bei RT durch Anlegen der Spannung. 20 Fraktionen wurden erhalten und bei -80 °C gelagert.

2.3.6 Expressionsanalysen des Proteins NAB1

2.3.6.1 Lokalisation von NAB1

Zellen von WT und *Stm3* wurden in TAP-Medium bis zur o.D.₇₅₀ von 1,2 angezogen. Je 20 ml der Zellsuspensionen wurden bei 1.000 g pelletiert, in 1 ml SMNCB-Puffer resuspendiert, mit 0,5 μl Benzonase (Sigma) versetzt und in der Zellpresse aufgeschlossen. Die Membran-Anteile von jeweils 500 μl der Suspension aufgebrochener Zellen wurden durch Zentrifugation für 45 min bei 4 °C und 22.000 g pelletiert. Die lösliche Fraktion wurde gesammelt, das Membran-Pellet mit H₂O bidest. auf das Ausgangsvolumen von 500 μl eingestellt und die Membrane resuspendiert. Für die anschließenden *Western-blot*-Analysen

(siehe Kapitel 2.3.3) wurden von jeder Suspension jeweils 7,5 µl eingesetzt und die NAB1-Menge der Proben mit dem NAB1-Antiserum untersucht.

2.3.6.2 NAB1-Expression im Wachstumsverlauf

WT-Zellen wurden wie in Kapitel 2.1.2.1 beschrieben im Dauerlicht angezogen. Proben wurden zu Beginn der Messung und in unregelmäßigen Abständen innerhalb der folgenden 90 Std. entnommen. Das Entnahme-Volumen entsprach 20 ml einer o.D.₇₅₀ von 0,5. Das Volumen geringerer oder höherer Zelldichte wurde entsprechend angepasst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 500 g pelletiert, in 1 ml SMNCB-Puffer und 0,5 µl Benzonase resuspendiert, in der Zellpresse aufgeschlossen und nochmals für 10 min bei 4 °C und 16.100 g zentrifugiert. Je Probe wurden 10 µl des Überstands für *Western-blot*-Analysen (siehe Kapitel 2.3.3) mit dem NAB1-Antiserum eingesetzt.

2.3.6.3 NAB1-Expression bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen

600 ml WT-Zellsuspension wurden wie in Kapitel 2.1.2.1 beschrieben bis zu einer o.D.₇₅₀ von 0,4 angezogen und auf drei Ansätze verteilt. Die Ansätze wurden abgedunkelt und bei 4 °C, RT oder 40 °C inkubiert. Proben wurden zu Beginn des Versuchs und innerhalb der folgenden 45 Std. wie im Kapitel 2.3.6.2 beschrieben entnommen und im *Western-blot* analysiert.

2.3.6.4 NAB1-Expression bei unterschiedlichen Lichtbedingungen

300 ml TAP-Medium wurden wie in Kapitel 2.1.2.1 beschrieben auf eine o.D.₇₅₀ von 0,125 mit WT-Zellen angeimpft. Die Kultur wurde anschließend für 8 Tage bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde der Ansatz bei RT für weitere 24 Std. im Dauerlicht von 40 µmol·m⁻²·s⁻¹ Weißlicht inkubiert. Vor und nach dieser 24-stündigen Belichtung wurden Proben wie in Kapitel 2.3.6.2 beschrieben entnommen und die NAB1-Expression im *Western-blot* untersucht.

2.3.6.5 NAB1-Expression bei unterschiedlichen Lichtstärken

600 ml WT-Zellsuspension wurden wie in Kapitel 2.1.2.1 beschrieben bis zu einer o.D.₇₅₀ von 1 angezogen und dann für 16 Std. bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Suspension wurde auf drei Ansätze aufgeteilt, einer wurde für weitere 8 Std. bei RT im Dunkeln belassen, die anderen wurden bei RT für 8 Std. mit 200 µmol·m⁻²·s⁻¹ bzw. 400 µmol·m⁻²·s⁻¹ Weißlicht belichtet. Proben wurden wie in Kapitel 2.3.6.2 beschrieben entnommen und die NAB1-Expression im *Western-blot* untersucht.

2.3.6.6 Expression von NAB1 in verschiedenen *C.-reinhardtii*-Linien

Die *C.-reinhardtii*-Linien Cw10, Stm3, WT13, PsbE(-), PsbH(-) und CC1284 Fud7 wurden in jeweils 100 ml TAP-Medium wie in Kapitel 2.1.2.1 beschrieben angezogen, in der stationären Wachstumsphase geerntet, wie in Kapitel 2.3.6.2 dargestellt präpariert und im *Western-blot* analysiert.

2.3.6.7 Post-translationale Modifikationen von NAB1

Zur Untersuchung möglicher post-translationaler Modifikationen des NAB1-Proteins wurde die Fraktion 7 der isoelektrisch fokussierten, löslichen *C.-reinhardtii*-Proteine (siehe Kapitel 2.3.5) mit dem pH-Wert von 9,95 verwendet. Zum Nachweis möglicher Phosphorylierungen wurden jeweils 15 µl, zur Untersuchung der Arginin-Methylierung die 8fache Menge der Fraktion mit den entsprechenden Antiseren (siehe Kapitel 2.3.3.2) in *Western-blot*-Analysen eingesetzt.

2.3.7 Experimente mit dem Kinase-Inhibitor H9 und H9-Derivaten

2.3.7.1 Synthese von H9 und H9-Derivaten

Die Synthese des Kinase-Inhibitors H9 (N-(2-Aminoethyl)-5-isochinolinsulfonamid), des Konstrukts H9-LPF ((S)-N-[Fluorescein-5(6)-carbonyl]-(4-benzoylphenyl)alanine-[8-(5-isochinolin-sulfonylamino)-3,6-diazaoct-1-yl]amid) (Derivat 7), des Konstrukts LPF ((S)-N-[Fluorescein-5(6)-carbonyl]-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-amino-3,6-diaza-oct-1-yl]amid) (Derivat 9) sowie von 5(6)-Carboxy-fluorescein wurde durchgeführt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. N. Sewald (Universität Bielefeld, Lehrstuhl für organische Chemie III) und ist in Hagenstein et al. (2003) ausführlich beschrieben.

2.3.7.2 Kovalente Bindung und Detektion von H9-LPF

Um das Fluorescein-gekoppelte H9-LPF spezifisch und kovalent mit putativen ATP-Bindeproteinen zu binden, wurden die Proben im H9-Puffer (10 mM HEPES, pH = 7,3, 10 mM MgCl₂, 50 nM PefaBlock) in Borosilikat-Glasröhren gegeben und für 30 min bei RT mit 350 nm UV-Licht bestrahlt (Rayonet Photochemical Reactor, Southern N.E., Ultraviolet Co., RPR-3500 Lampen, 5 cm Abstand).

Zur Detektion der Fluoreszenz-Markierung wurden die Proben durch denaturierende SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel im Typhoon 8600 Variable Mode Imager (Molecular Dynamics) auf Fluorescein-Fluoreszenz untersucht und mit der mitgelieferten Software (Molecular Dynamics, ImageQuant V 5.2) densitometrisch analysiert.

2.3.7.3 Markierung verschiedener Kinasen mit H9-LPF

200 µg/ml der Kinasen Hexokinase (Sigma), Kaninchen-Kreatinkinase (Roche), 3-Phosphoglycerat-Phosphokinase (Sigma) und cAMP-Proteinkinase-A (Sigma) wurden in H9-Puffer gelöst. 100 µl der verschiedenen Lösungen wurden mit je 10 µl einer 2 mM-Lösung von H9-LPF gemischt und durch UV-Bestrahlung gekoppelt.

2.3.7.4 Detektion von Kreatinkinase in Thylakoid-Präparationen

Um die Möglichkeit zu simulieren, ein unbekanntes ATP-Bindeprotein in Thylakoidmembranen zu identifizieren, wurden Thylakoid-Präparationen des *Chlamydomonas-reinhardtii*-Stammes CC125 mit Kreatinkinase versetzt und mit H9-LPF gekoppelt.

Hierzu wurden 6 µl einer Kreatinkinase-Lösung (100 ng/µl) mit 6 µl Thylakoid-Membranproteinen (10 µg/µl) versetzt und im H9-Puffer mit 1,5 µl einer 2 mM Lösung von H9-LPF im UV-Reaktor gekoppelt. Nach anschließender 1D-Gelelektrophorese wurde die Kinase-Bande ausgeschnitten und einer MALDI-ToF-Analyse (siehe Kapitel 2.3.8) unterzogen.

2.3.7.5 Bestimmung der Selektivität der Fluoreszenzmarkierung

2.3.7.5.1 Denaturierung mit SDS

1 µg Kreatinkinase wurde im H9-Puffer mit bzw. ohne die Zugabe von 6 % (w/v) SDS vor der Kopplung im Reaktor für 15 min bei RT inkubiert. Die Fluoreszenz-Analyse erfolgte wie in Kapitel 2.3.7.2 beschrieben.

2.3.7.5.2 Test auf unspezifische Bindung von Teilkonstrukten von H9-LPF

Jeweils 666 ng Kreatinkinase wurde entweder mit 250 mM des kompletten Derivates H9-LPF, mit 250 mM des Derivates LPF (entspricht H9-LPF ohne den Kinase-Inhibitor-Teil) oder mit 250 mM 5(6)-Carboxyfluorescein (entspricht nur dem Fluorophor) versetzt und anschließend im UV Reaktor bestrahlt. Die Fluoreszenz-Analyse erfolgte wie in Kapitel 2.3.7.2 beschrieben.

2.3.8 MALDI-ToF-Analysen

MALDI-ToF-Analysen erfolgten am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld (Prof. Dr. A. Pühler) nach der Vorschrift des *W. M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory* (<http://info.med.yale.edu/wmkeck/prochem/geldig3.htm>).

2.4 BIOPHYSIKALISCHE METHODEN

2.4.1 Messungen der Chlorophyll-Fluoreszenz bei Raumtemperatur

Alle Fluoreszenzmessungen bei RT wurden mit *Chlamydomonas*-Linien durchgeführt, welche zuvor für 3 - 5 Tage mixotroph bei 23 °C und $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ auf TAP-Agarplatten angezogen wurden. Unmittelbar vor Beginn einer Messung wurden die Zellen für 5 min im Dunkeln gelagert. Die Chlorophyll-Fluoreszenz wurde mit dem Gerät FluorCam 690M (Photon System Instruments) und der mitgelieferten Software aufgenommen und ausgewertet. Die Lichtstärke des eingebauten Messstrahls des Gerätes betrug $2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

2.4.1.1 Messungen der *LHC-state-transitions* bei RT

Zellen des WT und der Mutante *Stm3* wurden bei RT durch Belichtung für 10 min mit $5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ dunkelrotem Licht (Emissionsmaximum bei 720 nm) auf *LHC-state-1* eingestellt und in das FluorCam-Gerät überführt. An Stelle des dunkelroten Lichts wurde nun hellrotes Anregungslicht (Emissionsmaximum bei 620 nm) von $55 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ zugeschaltet und nach 25 Sek. ein Bild der Fluoreszenz in *LHC-state-1* aufgenommen. Nach weiterer Belichtung für 5 min wurde ein Bild der Fluoreszenz in *LHC-state-2* aufgenommen. Um Unterschiede in der Fluoreszenz darzustellen, wurden beide Bilder mit dem Programm Corel Photo-Paint (V. 11.633, Corel Corporation) bearbeitet. Das Bild der *LHC-state-1*-Fluoreszenz wurde durch das Bild der *LHC-state-2*-Fluoreszenz dividiert, wodurch alle Bereiche, in welchen eine Abnahme der Fluoreszenz durch den Übergang in *LHC-state-2* stattgefunden hatte, im Divisionsbild dunkel dargestellt wurden.

2.4.1.2 Chlorophyll-Fluoreszenzinduktion (Kautsky-Induktion)

Die minimale Fluoreszenz der dunkel inkubierten Zellen wurde im Dunkeln durch den Messstrahl ermittelt. Im Anschluss wurde für 2 min hellrotes Anregungslicht (Emissionsmaximum bei 620 nm) von $55 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ zugeschaltet und die Fluoreszenz aufgenommen.

2.4.1.3 Maximale Quantenausbeute von PSII (Fv/Fm)

Um die maximale Quantenausbeute von PSII (Fv/Fm) (Maxwell & Johnson 2000) zu ermitteln, wurde zunächst die minimale Fluoreszenz F_0 der dunkel inkubierten Zellen bestimmt. Im Anschluss wurde die maximale Fluoreszenz (Fm) aufgenommen, indem die Zellen für 1.600 ms mit Weißlicht von $2.000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bestrahlt und die emittierte Fluoreszenz aufgenommen wurde. Die maximale Quantenausbeute wurde berechnet durch: $Fv/Fm = (Fm-F_0)/Fm$.

2.4.1.4 Quantenausbeute von PSII (Φ_{PSII})

Um die Quantenausbeute von PSII zu ermitteln, wurde die Zellen zunächst einem sättigenden Weißlicht-Blitz von 1.600 ms und $2.000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ausgesetzt. Nach einer Inkubation für 50 Sek. im Dunkeln wurde hellrotes Anregungslicht (620 nm) von $55 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ zugeschaltet. Nach weiteren 15 Sek. erfolgte erneut die Applikation eines Weißlicht-Blitzes von 1.600 ms und $2.000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Weitere vier Weißlicht-Blitze wurden nun nach jeweils 60 Sek. appliziert. Zur Berechnung wurde als Wert für die emittierte Fluoreszenz unter Belichtung (Ft) die Chlorophyll-Fluoreszenz bei $55 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Anregungslicht (620 nm) unmittelbar vor dem letzten Weißlicht-Blitz eingesetzt. Der Wert der Fluoreszenz, welche die Zellen während des letzten sättigenden Weißlicht-Blitzes emittierten, wurde als maximale Fluoreszenz unter Belichtung (F'm) eingesetzt. Die Quantenausbeute von PSII wurde berechnet durch: $\Phi_{\text{PSII}} = (F'm - Ft) / F'm$.

2.4.2 Messungen der Chlorophyll-Fluoreszenz bei 77 K

Zellen von WT und Stm3 wurden in TAP-Medium bis zu einer o.D.₇₅₀ von 0,6 - 0,8 angezogen. Die Chlorophyll-Konzentration der Proben wurde auf $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ eingestellt, um Re-Absorptionseffekte der Fluoreszenz zu vermeiden. *LHC-state-1* wurde eingestellt durch Inkubation der Zellen für 20 min bei RT und $5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ dunkelrotem Licht (Emissionsmaximum bei 720 nm). *LHC-state-2* wurde durch anaerobe Inkubation der Zellen für 30 min im Dunkeln unter Stickstoff-Begasung eingestellt (Bulté & Wollman 1990). Proben der Zell-Suspensionen wurden entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anregungsspektren der Chlorophyll-Fluoreszenz wurden im Fluoreszenz-Spektrometer aufgenommen (Perkin-Elmer, LS50B Luminescence Spectrometer).

2.4.3 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Zellen von WT und Stm3 wurden in TAP-Medium bei RT und $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Weißlicht bis zur o.D.₇₅₀ von 0,3 angezogen. Die Probenvorbereitung sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen dieser Kulturen wurden durchgeführt von Dr. U. Kahmann (Universität Bielefeld) wie in Engels et al. (1997) beschrieben.

2.5 COMPUTER- UND DATENBANK-ANALYSEN

Die Berechnung von homologen Sequenz-Bereichen mehrerer Sequenzen erfolgte durch Anwendung des Programms Clustal W (Thompson et al. 1994), zur graphischen Darstellung wurde das Programm GeneDoc (Nicholas & Nicholas 1997) genutzt.

Zur Erkennung funktioneller Aminosäure-Domänen wurde das Programm SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) sowie die Blast (Altschul et al. 1990, Altschul et al. 1997)-Funktion der Internet-Seite vom National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) verwendet. Neben der Datenbank GenBank wurden die

Datenbanken vom Kazusa-DNA-Research-Institute (<http://www.kazusa.or.jp/en/plant/chlamy/EST/>) sowie die Datenbanken vom *Chlamydomonas* Resource Center (http://www.biology.duke.edu/chlamy_genome/index.html) und vom *Chlamydomonas* Genomprojekt (<http://genome.jgi-psf.org/chlre1/chlre1.home.html>) genutzt.

3. ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Strategien angewendet, um Einblicke in die redox-regulierten Signaltransduktionswege der Lichtanpassung photosynthetischer Organismen zu erhalten.

Strategie I zielte darauf ab, eine Methode zu entwickeln, um selektiv Proteinkinasen in Thylakoiden markieren und identifizieren zu können. Diese Enzyme besitzen regulative Funktionen in vielen physiologischen Prozessen (Hardie 1999). Es ist heute allgemein akzeptiert, dass Kinasen auch in lichtregulierten Akklimatisationsreaktionen von entscheidender Bedeutung sind (siehe Kapitel 1.2.4). Die biochemische Identifikation thylakoidassoziierter Kinasen gestaltete sich in früheren Versuchen allerdings als ausgesprochen schwierig, da eine Aufreinigung nur begrenzt möglich war (Gal et al. 1990, Hind et al. 1995, Sokolenko et al. 1995). Um dieses Ziel zu erreichen, sollten neue Erkenntnisse in der Struktur- und Photochemie dazu genutzt werden, um eine neuen Methode zur selektiven Markierung von Proteinfamilien zu etablieren.

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. N. Sewald (Universität Bielefeld, Lehrstuhl für organische Chemie III) wurde der bekannte Kinase-bindende Inhibitor H9 chemisch modifiziert (siehe Kapitel 3.1). Die Modifikation war so konstruiert, dass das neue H9-Derivat selektiv und kovalent ATP-bindende Proteine wie Kinasen markieren sollte. Die anschließende Identifikation der markierten Proteine sollte durch 2D-Gelelektrophorese und MALDI-ToF erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, in wieweit sich das synthetisierte H9-Derivat als Markierungskonstrukt eignet. Die wichtigsten Ergebnisse, die mit diesem Ansatz erzielt werden konnten, wurden in der Zeitschrift *Angewandte Chemie* publiziert (Hagenstein et al. 2003).

Strategie II zielte auf ein breiteres Spektrum von Proteinen, die in Lichtanpassungsreaktionen von Bedeutung sein können. Hier sollte ein klassischer *forward-genetics*-Ansatz (vom Phänotyp zum Genotyp) mit der nukleären *Chlamydomonas-reinhardtii*-Zufalls-DNA-Insertionsmutante *Stm3* durchgeführt werden. Die Besonderheit des hierbei verfolgten Ansatzes bestand in der phänotypischen Selektion der Zufallsmutante. Vorausgegangene Arbeiten hatten zur Entwicklung einer Selektionsmethode geführt, welche die nicht-invasive Identifikation von potentiellen Mutanten der *LHC-state-transitions* ermöglichte (Kruse et al. 1999). Durch Anwendung dieser Methode konnte die Mutante *Stm3* isoliert werden, die im Rahmen dieser Arbeit eingehend molekulargenetisch, biochemisch und biophysikalisch charakterisiert werden sollte (siehe Kapitel 3.2). In Kombination mit der Identifikation des in der Mutante betroffenen Gens sollten neue Erkenntnisse über die physiologischen Abläufe in der kurzzeitigen Lichtanpassung erhalten werden.

Als Forschungsobjekt wurde die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* gewählt. Dies geschah, abgesehen von den generellen Vorteilen, die der Modellorganismus bietet (siehe Kapitel 1.3) auch aus einem weiteren Grund. In vorausgegangenen Arbeiten konnte eine neue Methode zur Analyse des Mutationsortes bei DNA-Zufallsmutanten (LMS-PCR, siehe Kapitel 2.2.8) für diesen Organismus etabliert werden (Strauss et al. 2001). Dabei waren

eigene Kenntnisse erworben worden, die eine erfolgreiche Identifikation des Mutationsortes realistisch erscheinen ließen.

3.1 STRATEGIE I: UNTERSUCHUNGEN ZUM KINASE-INHIBITOR H9 UND H9-DERIVATEN

Der Kinase-Inhibitor H9 bindet kompetitiv in die ATP-Bindetasche von ATP-bindenden Enzymen (siehe Kapitel 1.2.4). Diese zu Beginn der Arbeit bekannte Eigenschaft von H9 sollte in einer kooperativen Versuchsstrategie mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. N. Sewald genutzt werden, um ein Verfahren zur Identifikation potentieller thylakoidärer Proteinkinasen auf biochemischem Weg zu ermöglichen. Der Inhibitor H9 wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. N. Sewald chemisch modifiziert (Hagenstein et al. 2003). Über ein Verbindungsstück (L) wurden eine Photoaffinitäts-Gruppe (P) und eine Fluorescein-Gruppe (F) angehängt (H9-LPF, siehe Abb. 11).



Abb. 11: Modell des H9-Konstruktes H9-LPF.

Blau: H9, grau: Verbindungsstück (L), rot: Photoaffinitäts-Gruppe (P), grün: Fluorescein-Gruppe (F).

Wenn nun dieses Konstrukt in die ATP-Bindetasche von entsprechenden Enzymen eingelagert wird, sollten durch Bestrahlung mit UV-Licht kovalente Bindungen zwischen der Photoaffinitäts-Gruppe und benachbarten Aminosäuren des Enzyms geschlossen werden. So gebunden kann eine ein- oder zweidimensionale SDS-Gelelektrophorese angeschlossen werden, ohne dass die Markierung durch Denaturierung des Enzyms verloren geht. Markierte Proteine sollten im Anschluss über die abgestrahlte Fluoreszenz der Fluorescein-Gruppe detektiert, isoliert und sequenziert werden können.

3.1.1 Vorversuche

Unterschiedliche Puffersysteme, H9-LPF-Konzentrationen, UV-Belichtungszeiten und Fluoreszenz-Detektionsgeräte wurden systematisch getestet (nicht gezeigt), um optimale Versuchsbedingungen zu ermitteln (siehe Kapitel 2.3.7). Im Regelfall wurden verschiedene Proteine oder Proteinmischungen zum Markieren mit dem H9-LPF-Konstrukt bzw. entsprechenden Derivaten inkubiert und durch Bestrahlung mit UV-Licht kovalent verknüpft. Die Detektion der markierten Proteine erfolgte im Anschluss an die gelelektrophoretische Trennung durch Aufnahme der Fluoreszenz der Fluorescein-Gruppe.

3.1.2 Markierung unterschiedlicher Kinasen

Vier verschiedene, käufliche Kinasen wurden in Bindestudien eingesetzt, um die generelle Eignung von H9-LPF als Markierungskonstrukt ATP-bindender Enzyme zu überprüfen.

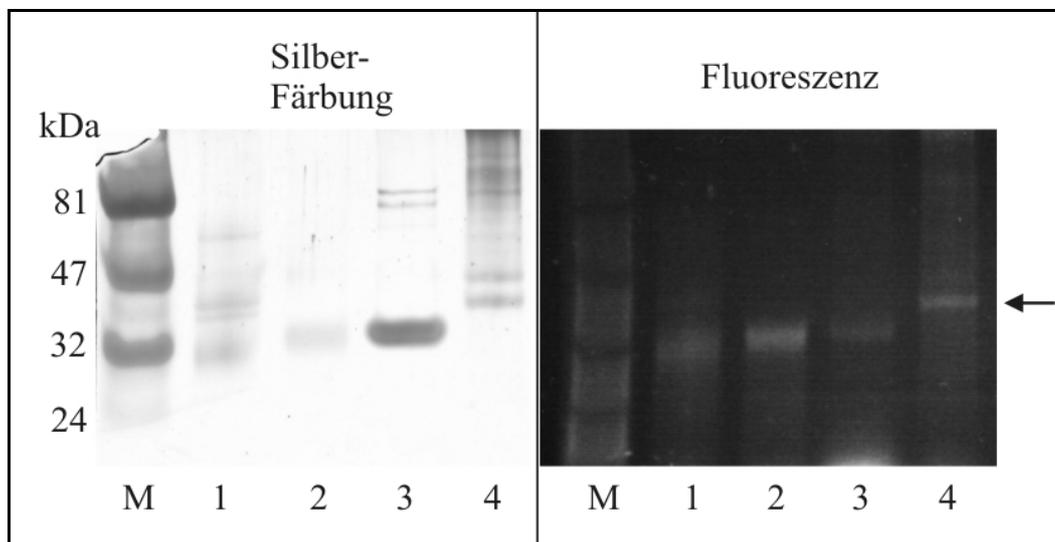


Abb. 12: Markierung unterschiedlicher Kinasen mit H9-LPF.

Bahnen 1: Hexokinase, Bahnen 2: Kreatinkinase, Bahnen 3: 3-Phosphoglycerat-Phosphokinase, Bahnen 4: cAMP-Proteinkinase-A, Pfeil: katalytische Untereinheit der cAMP-Proteinkinase-A, M: Marker.

Wie aus Abbildung 12 hervorgeht, wurden alle vier Kinasen markiert, wobei diese Markierungen jedoch unterschiedlich stark ausfielen. Die Markierung der 3-Phosphoglycerat-Phosphokinase war in Relation zur eingesetzten Menge auffällig gering (Abb. 12, Bahnen 3), die übrigen eingesetzten Kinasen wurden deutlich stärker markiert (Abb. 12, Bahnen 1, 2 und 4). Die Ergebnisse belegten, dass sich H9-LPF prinzipiell dazu eignet, Kinasen zu markieren. Zudem deutete sich eine gewisse Selektivität der Markierung an, da zum einen nicht alle Kinasen mit gleicher Effektivität, und zum anderen bei der eingesetzten cAMP-Proteinkinase-A nur die ATP-bindenden, katalytischen Untereinheiten von je 38 kDa markiert wurden (Abb. 12, Bahnen 4, Pfeil). Die zwei regulatorischen Untereinheiten von je 49 kDa des Tetramers wurden hingegen nicht markiert. Durch weitere Versuche wurde die Spezifität der Markierung näher untersucht.

3.1.3 Spezifität des Konstruktes H9-LPF

Auf Grund der beobachteten, effektiven Markierung der Kreatinkinase durch H9-LPF wurde dieses 43 kDa große Enzym als Studienobjekt für Spezifitätsversuche ausgewählt. Zwei verschiedene Ansätze wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Markierung spezifischer oder unspezifischer Natur war.

3.1.3.1 Denaturierung des ATP-Bindeproteins mit SDS

In dem ersten Ansatz wurde die Kinase vor der UV-induzierten, kovalenten Kopplung mit H9-LPF durch Inkubation mit SDS vollständig denaturiert. Setzt man eine spezifische Bindung von H9-LPF in die ATP-Bindetasche der Kinase voraus, so sollte nach Denaturierung keine Bindung und folglich keine Markierung zu erwarten sein. Erfolgte die beobachtete Kopplung von H9-LPF an die Aminosäure-Kette hingegen unspezifisch, so sollte sie auch nach vollständiger Denaturierung der Kinase ablaufen können.

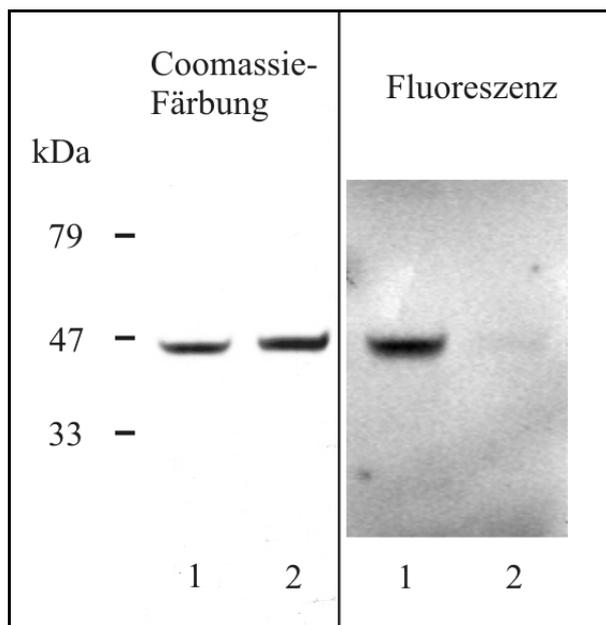


Abb.13: Denaturierung der Kinase durch SDS.

Bahnen 1: Kreatinkinase ohne SDS,
Bahnen 2: Kreatinkinase mit 6 % SDS.

Native Kreatinkinase wurde durch die Behandlung mit H9-LPF markiert und war durch Aufnahme eines Fluoreszenz-Bildes nach SDS-PAGE im Gel zu detektieren (Abb. 13 Bahnen 1). Wurde hingegen die Kinase durch Vorinkubation mit SDS vor der Kopplung denaturiert, so war eine Markierung der Kinase im Fluoreszenz-Bild nicht mehr zu detektieren (Abb. 13 Bahnen 2). Dieses Ergebnis spricht eindeutig dafür, dass die Bindung des H9-LPF-Konstruktes spezifischer Natur war.

3.1.3.2 Bindungsanalyse von H9-LPF-Teilstrukturen

Im zweiten Ansatz wurden verschiedene Teilstrukturen von H9-LPF eingesetzt, um zu untersuchen, ob diese eine unspezifische Bindung an native Kreatinkinase aufwiesen. Teilkonstrukt LPF entspricht dabei H9-LPF ohne den Kinase-Inhibitor-Anteil H9 und sollte daher nicht an die Kreatinkinase binden können und diese folglich auch nicht markieren. Gleiches gilt für Konstrukt F (5(6)-Carboxyfluorescein), da hier sowohl der Inhibitor-Anteil

(H9) als auch Verbindungsstück (L) und Photoaffinitäts-Gruppe (P) fehlen. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt.

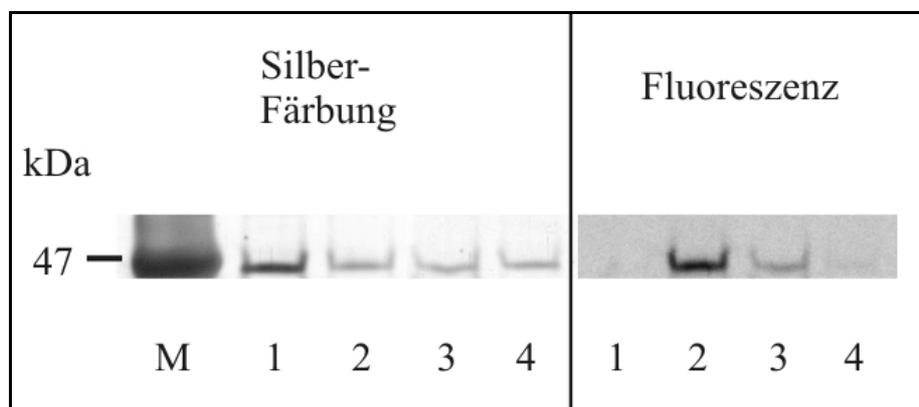


Abb. 14: Bindung unterschiedlicher H9-LPF-Teilstrukturen an native Kreatinkinase.
Bahnen 1: Kreatinkinase, Bahnen 2: Kreatinkinase + komplettes Konstrukt H9-LPF,
Bahnen 3: Kreatinkinase + Konstrukt LPF, Bahnen 4: Kreatinkinase + Fluorescein,
M: Marker.

Kreatinkinase alleine und Kreatinkinase mit H9-LPF (Abb. 14, Bahnen 1 bzw. Bahnen 2) stellen die Negativ- bzw. Positivkontrollen dar. Das Konstrukt LPF markierte das Enzym in einem deutlich geringem Maße als intaktes H9-LPF (Abb. 14, Bahnen 3). Die Intensität der Markierung entsprach densitometrischen Analysen zufolge ~24 % des H9-LPF-Niveaus. Reines Fluorescein hatte kaum eine Proteinbindung zur Folge (Abb. 14, Bahnen 4) und entsprach ~6 % des H9-LPF-Niveaus. Auch dieses Experiment zeigte, dass die Bindung von H9-LPF an Kreatinkinase überwiegend spezifischer Natur sein muss.

3.1.4 Detektion von supplieder Kreatinkinase in Thylakoid-Präparationen

Essentieller Teil der Versuchsstrategie war die Frage, ob sich ATP-bindende Proteine wie z.B. Kinasen nach Fluoreszenzmarkierung in Zellfraktionen detektieren und durch anschließende Sequenzierung eindeutig bestimmen lassen.

Um diese Fragestellung experimentell zu überprüfen, wurden isolierte *Chlamydomonas* Thylakoid-Proteine mit Kreatinkinase suppliert und diese Mischung der Markierungsprozedur unterzogen.

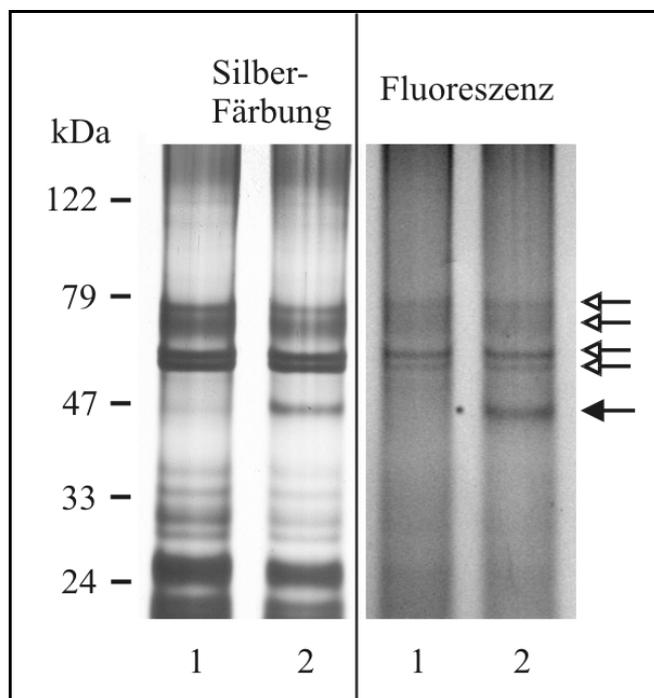


Abb. 15: Kreatinkinase in Thylakoid-Präparationen.

Bahnen 1: Thylakoid-Präparationen ohne Kreatinkinase,
Bahnen 2: Thylakoid-Präparationen mit 1 % Kreatinkinase
(geschlossener Pfeil), offene Pfeile: weitere Markierungen.

Wie aus Abbildung 15 ersichtlich, wurde die Kreatinkinase auch im Proteingemisch markiert und ließ sich eindeutig detektieren (Abb. 15, Bahnen 2, geschlossener Pfeil). Neben dieser Markierung sind weitere Banden im Fluoreszenzbild zu erkennen (Abb. 15, offene Pfeile). Als weiterer Hinweis auf die Selektivität der Markierung ist die Tatsache zu werten, dass die LHC-Proteine im Bereich von ~20 - 30 kDa trotz ihrer Abundanz nicht markiert wurden (Abb. 15, Bahnen 1 und 2).

Die der Kreatinkinase zugeordnete Bande wurde aus dem Gel extrahiert und einer MALDI-ToF-Analyse unterzogen. Die erhaltenen Peptid-Massen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Erwartete Masse in Da	Beobachtete Masse in Da	Peptid-Position	Peptid-Sequenz
906,79	907,8	308 - 314	FEEILTR
x	1.201,1	x	x
1.230,79	1.231,8	87 - 96	DLFDPIIQDR
1.507,19	1.508,2	157 - 170	LSVEALNSLTGEFK
1.529,89	1.530,9	117 - 130	GGDDLDPHYVLSSR
1.643,09	1.644,1	224 - 236	SFLVWVNEEDHLR
x	1.676,2	x	x
1.785,39	1.786,4	342 - 358	LGSSEVEQVQLVVDGVK
2.008,29	2.009,3	321 - 341	GTGGVDTAAVGSVFDISNADR
2.164,49	2.165,5	320 - 341	RGTGGVDTAAVGSVFDISNADR
x	2.211,6	x	x

Tab. 5: MALDI-ToF-Analyse der Kreatinkinase-Bande.

Von den erhaltenen 11 Peptidmassen ließen sich 8 als Fragmente der Kreatinkinase zuordnen (Abb. 16), womit eine eindeutige Identifizierung des Proteins möglich war.

1 MPFGNTHNKY KLNYKSEEEY PDLSKHNNHM AKVLTPDLYK KLRDKETPSG
51 FTLDDVIQTG VDNPGHPFIM TVGCVAGDEE SYTVFK**DLFD PIQDR**HGGF
101 KPTDKHKTDL NHENLK**GGDD LDPHYVLSSR** VRTGRSIKGY TLPPHCSRGE
151 RRAVEK**LSVE ALNSLTGEFK** GKYYPLKSMT EQEQQLIDD HFLFDKPVSP
201 LLLASGMARD WPDARGIWHN DNK**SFLVWVN EEDHLR**VISM EKGGMKEVF
251 RRFCVGLQKI EEIFKKAGHP FMWNEHLGYV LTCPSNLGTG LRGGVHVKLA
301 HLSKHPK**FEE ILTRLRLQKR GTGGVDTAAV GSVFDISNAD RLSSEVEQV**
351 **QLVVDGVK**LM VEMEKKLEKG QSIDDMIPAQ K

Abb. 16: Peptidsequenz der Kaninchen-Kreatinkinase.
Rot: Durch MALDI-ToF identifizierte Peptidfragmente.

Dieser Versuch belegte, dass das Konstrukt H9-LPF sich dazu eignet, Kinasen in komplexen Proteingemischen selektiv zu markieren. Darüber hinaus war es trotz der Markierung noch möglich, das Enzym durch MALDI-ToF-Analyse eindeutig zuzuordnen.

3.2 STRATEGIE II: ANALYSE DER NUKLEÄREN ZUFALLS-DNA-INSERTIONSMUTANTE STM3

Untersuchungen der Fluoreszenz von Chlorophyll-Molekülen photosynthetischen Gewebes stellen etablierte Methoden dar, um u. a. Aussagen über die Effizienz von photosynthetischem Elektronentransport, CO₂-Fixierung, Hitze-Dissipation von Anregungsenergie oder *LHC-state-transitions* treffen zu können (Kruse et al. 1999, Fleischmann et al. 1999, Li et al. 2000, Maxwell & Johnson 2000, Müller et al. 2001, Elrad et al. 2002).

In Vorarbeiten konnten durch Selektion von nukleären Zufalls-DNA-Insertionsmutanten der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* einige Mutanten gefunden werden, welche den Phänotyp einer vom WT abweichenden Chlorophyll-Fluoreszenz in der kurzzeitigen Lichtanpassung zeigten (siehe Kapitel 3.2.1, Kruse et al. 1999). Eine dieser Mutanten, Stm3, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch biochemische, biophysikalische und molekulargenetische Analysen eingehend untersucht werden. Der DNA-Bereich der Mutante, der durch die Zufalls-DNA-Insertion betroffen war, sollte ermittelt und in Zusammenhang mit den veränderten phänotypischen Ausprägungen gebracht werden. Die Untersuchungen sollten auf diese Weise zur Identifikation bisher unbekannter Genprodukte führen, welche in der photosynthetischen Lichtanpassung von Bedeutung sind.

3.2.1 Identifikation der Mutante Stm3

Die Mutante Stm3 wurde in Zusammenarbeit mit Dr. P. J. Nixon (Imperial College London, UK) durch zufällige Insertion von Plasmid-DNA in das Kerngenom von *Chlamydomonas*-Zellen der WT-Linie CW10 hergestellt. Das verwendete Plasmid pSp124S (Stevens et al. 1996, Lumberras et al. 1998) vermittelt eine Antibiotika-Resistenz gegen die Antibiotika Bleocin, Phleomycin und Zeomycin und erlaubte so die Selektion von transformierten Zellen. Das Chlorophyll-Fluoreszenzverhalten der Zufallsmutanten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. C. W. Mullineaux (University College London, UK) untersucht. Dabei wurde ein *Video-imaging*-Verfahren angewendet, welches zum Auffinden von Mutante mit Defekten in der reversiblen, lichtabhängigen Wanderung von LHCII-Proteinen (*LHC-state-transitions*) konzipiert war (Kruse et al. 1999). Eine der Mutanten-Linien, welche ein aberrantes Fluoreszenzverhalten zeigte, wurde als Stm3 (*state-transitions-mutant 3*) bezeichnet und eingehend untersucht.

3.2.2 Fluoreszenzverhalten

Das vom WT abweichende Chlorophyll-Fluoreszenzverhalten sollte durch Messungen der Fluoreszenz bei RT (Kapitel 3.2.2.1) und 77 K (Kapitel 3.2.2.2) näher analysiert werden.

Bei allen RT-Messungen wurden die Zellen von WT und Mutante nebeneinander auf einer TAP-Vollmedium-Platte kultiviert und parallel gemessen. Vor der Messung wurden die Zellen kurz dunkel-adaptiert.

Messungen bei 77 K wurden an Flüssigkulturen vorgenommen.

3.2.2.1 Messungen bei Raumtemperatur

Die Stärke der Chlorophyll-Fluoreszenz bei Raumtemperatur ist in erster Linie abhängig vom Zustand der Chlorophyll-Moleküle, welche direkt am PSII-Komplex gebunden sind oder indirekt durch am PSII gebundene LHCII-Proteine dieses mit Lichtenergie versorgen (Holzwarth 1986). Wird die von diesen Pigmenten aufgenommene Lichtenergie an die Elektronentransportkette weitergegeben, so sinkt die Fluoreszenz. Gleiches gilt, wenn die Energie in Form von Wärme abgegeben wird. Durch Messung der RT-Fluoreszenz können daher Hinweise über den Assoziations-Zustand und die Konformation des LHCII-PSII Superkomplexes gewonnen und Rückschlüsse auf den photosynthetischen Elektronentransport gezogen werden.

3.2.2.1.1 Messungen von *LHC-state-transitions* bei RT

Um Anhaltspunkte zu gewinnen, ob die Mutante *Stm3* in der Lage ist, *LHC-state-transitions* zu betreiben, wurden WT und *Stm3* auf *LHC-state-1* eingestellt und ein Bild der Chlorophyll-Fluoreszenz aufgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen auf *LHC-state-2* eingestellt und erneut ein Bild der Fluoreszenz aufgenommen. Zur Darstellung der Zellen, deren Chlorophyll-Fluoreszenz durch Übergang in *LHC-state-2* abgenommen hatte, wurde das *state-1*-Bild durch das *state-2*-Bild dividiert (Abb. 17).

Im Divisionsbild erscheinen Bereiche hell, die in den zwei Fluoreszenz-Bildern unverändert sind, da das verwendete Bildbearbeitungsprogramm den Zahlenwert 1, welcher durch Division gleicher Farbwerte resultiert, als weiß darstellt.

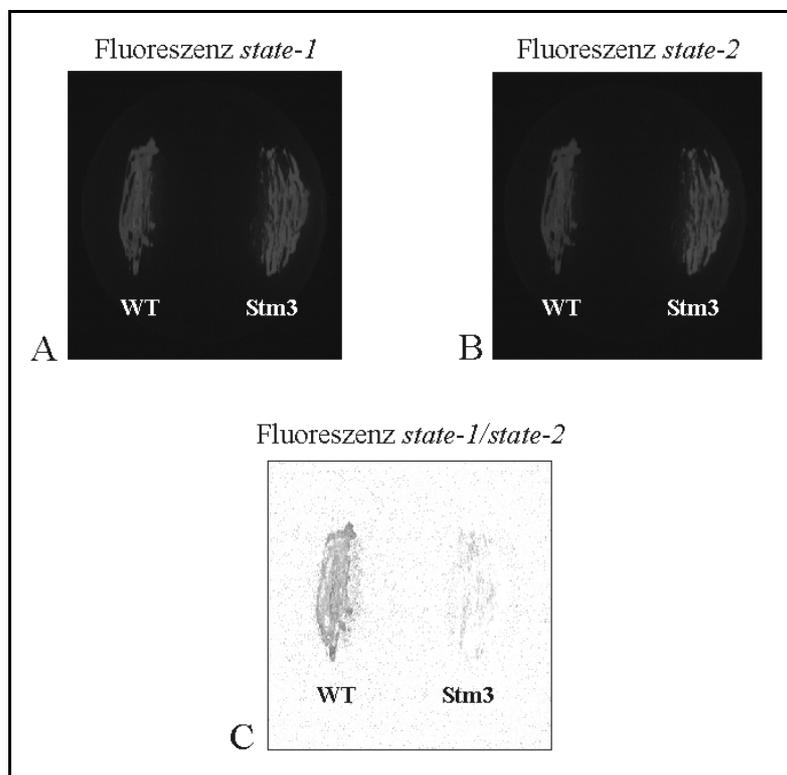


Abb. 17: Messung von *LHC-state-transitions* bei WT und *Stm3*.

Durch Belichtung wurden die Zellen auf *LHC-state-1* (A) oder *state-2* (B) eingestellt und je ein Bild der Chlorophyll-Fluoreszenz aufgenommen. Durch Division des *LHC-state-1*-Bildes durch das *state-2*-Bild erscheinen die Bereiche dunkel, in welchen die Fluoreszenz durch Übergang in *LHC-state-2* abgenommen hat.

In Abbildung 17 ist zu erkennen, dass die Zellen des WT eine deutlich stärkere Abnahme der Chlorophyll-Fluoreszenz beim Übergang in *LHC-state-2* zeigten, als dies bei *Stm3* der Fall war (Abb. 17, C). Bei der Mutante verblieb die Fluoreszenz im Messzeitraum auf relativ hohem Niveau.

Diese Messungen deuteten darauf hin, dass die lichtabhängige Verlagerung der LHCII-Proteine in der Mutante gestört war.

3.2.2.1.2 Maximale Quantenausbeute von PSII (Fv/Fm)

Der Fv/Fm-Wert ist ein Maß für die intrinsische Effektivität der PSII-Komplexe (Maxwell & Johnson 2000). Ein erniedrigter Fv/Fm-Wert deutet auf eine erniedrigte Effektivität der PSII-Komplexe zur Reduktion des Elektronenakzeptors Q_A z.B. in Folge photoinhibitorischer Blockierung hin (Aro et al. 1993a).

Für viele Pflanzen-Spezies ist ein optimaler Wert von $\sim 0,83$ typisch (Björkman & Demmig 1987).

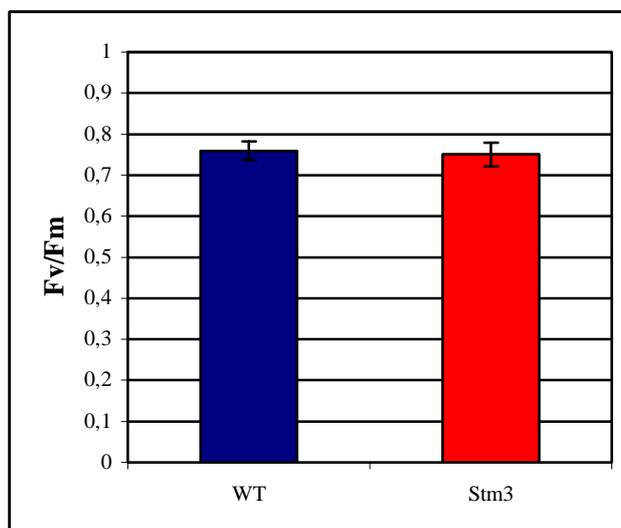


Abb. 18: Verhältnis von variabler Fluoreszenz (Fv) zu maximaler Fluoreszenz (Fm) bei WT und Mutante Stm3.

Balken: Standardabweichung.

Die Verhältnisse von variabler zu maximaler Fluoreszenz unterschieden sich nicht signifikant zwischen WT ($\bar{x} = 0,76$) und Mutante ($\bar{x} = 0,75$) (Abb. 18). Zu beachten ist aber, dass bei der Mutante sowohl der Wert der minimalen Fluoreszenz (F_0) als auch der Wert der maximalen Fluoreszenz (F_m) im Vergleich zum WT erhöht waren (nicht gezeigt). Da diese Erhöhung in annähernd gleicher Proportionalität auftrat ($\sim 110\%$ bzw. $\sim 113\%$ des WT-Niveaus), verliert sich dieser Effekt durch die Berechnung des Fv/Fm-Wertes nahezu vollständig. Die proportional nahezu gleiche Erhöhung der F_0 und F_m -Fluoreszenz deutet darauf hin, dass in der Mutante mehr fluoreszierende Chlorophyll-Moleküle als im WT immanent sind. Das nahezu identische Fv/Fm-Verhältnis belegt, dass trotz der Erhöhung der Fluoreszenz die Effizienz der Q_A -Reduktion in der Mutante nicht signifikant eingeschränkt ist.

3.2.2.1.3 Quantenausbeute von PSII (Φ_{PSII})

Der Φ_{PSII} -Wert ist ein Maß für das Verhältnis der eingefangenen Lichtenergie zu der in der photosynthetischen Elektronentransportkette genutzten Lichtenergie und wird berechnet durch: $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_t) / F_m'$ wobei F_m' den Wert der maximalen Fluoreszenz und F_t den Wert der *steady-state*-Fluoreszenz bei Belichtung repräsentiert. Je größer der Φ_{PSII} -Wert ist, desto mehr der bei Belichtung gesammelten Lichtenergie wird photosynthetisch genutzt (Maxwell & Johnson 2000).

Im Gegensatz zu den F_v/F_m -Werten wurde der Φ_{PSII} -Wert unter Belichtung mit Anregungslicht ermittelt, also während photosynthetische Prozesse im Gange waren.

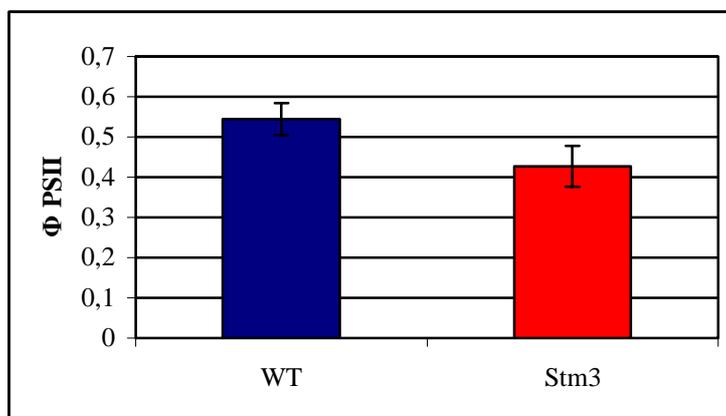


Abb. 19: Photosynthetische Quantenausbeute (Φ_{PSII}) von WT und Mutante Stm3 unter Belichtung.

Balken: Standardabweichung.

Wie in Abb. 19 zu erkennen, unterschieden sich der Φ_{PSII} -Wert zwischen WT und Mutante. In letzterer war der Wert signifikant erniedrigt (~78 % des WT-Niveaus), was den Schluss zulässt, dass hier im Verhältnis weniger der eingefangenen Lichtenergie zur Photosynthese genutzt und mehr in Form von Fluoreszenz emittiert wurde. Im Gegensatz zu den Werten der maximalen Quantenausbeute bei dunkel-adaptierten Zellen (siehe Kapitel 3.2.2.1.2) nahm also in der Mutante bei kontinuierlicher Belichtung das Verhältnis von eingefangener Lichtenergie zu der photosynthetisch genutzten Lichtenergie ab und damit die Effizienz der Reduktion von Q_A durch die PSII-Komplexe.

3.2.2.1.4 Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion bei Raumtemperatur

Die Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion wurde bei dunkel-adaptierten Zellen gemessen, welche im Anschluss an die Dunkel-Inkubation mit hellrotem Anregungslicht bestrahlt wurden.

Photosynthetische Zellen zeigen hierbei eine charakteristische Fluoreszenz-Induktion (Kautsky & Hirsch 1931).

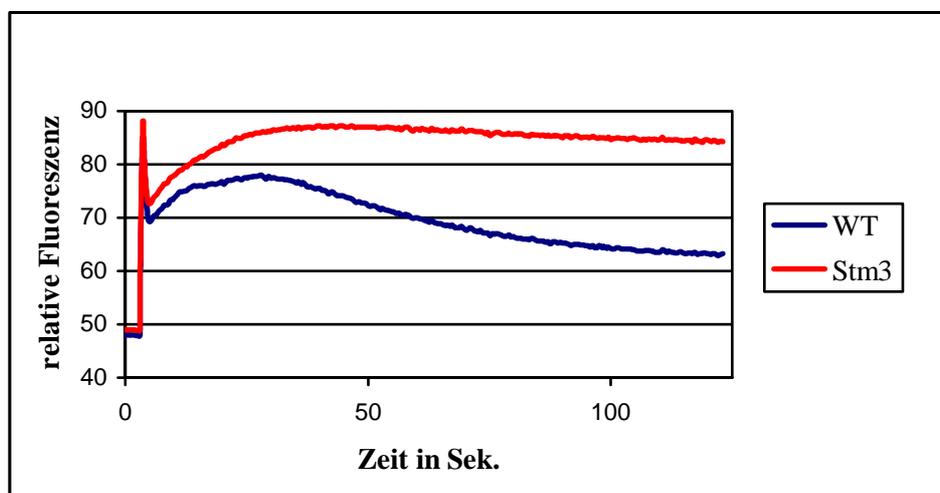


Abb. 20: Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion von WT (blau) und Mutante Stm3 (rot).

Abbildung 20 zeigt den Verlauf der Chlorophyll-Fluoreszenz-Induktion von WT und Mutante Stm3. Nach Zuschalten von Anregungs-Licht wurde die Chlorophyll-Fluoreszenz über 2 min aufgenommen. Der Kurvenverlauf der WT-Zellen (Abb. 20, blaue Kurve) ist typisch für photosynthetisch aktives Material. Der schnelle, starke Anstieg und Abfall der Fluoreszenz innerhalb weniger Sekunden (Kautsky-Induktion) spiegelt den Reduktionszustand der Elektronenakzeptoren des Plastochinon-pools wieder. Im Anschluss an die Kautsky-Induktion folgte der erneute Anstieg der Fluoreszenz mit einem temporären Maximum nach 28 Sekunden. Daraufhin fällt die Fluoreszenz erneut, bis sie sich einem stationären Niveau deutlich unterhalb der maximalen Fluoreszenz annähert. Dieser temporäre Anstieg und Abfall der Fluoreszenz wird photochemischen und nicht-photochemischen quenching-Prozessen zugeschrieben (Maxwell & Johnson 2000).

Der Kurvenverlauf der Mutante zeigte deutliche Unterschiede. Der Verlauf der Kautsky-Induktion war annähernd identisch dem des Wildtyps. Jedoch stieg bei Stm3 das Niveau der Chlorophyll-Fluoreszenz im Anschluss an die Kautsky-Induktion deutlich höher an als dies bei WT-Zellen der Fall war und verblieb nahezu unverändert über den Messzeitraum auf diesem hohen Niveau nahe der maximalen Fluoreszenz der Kautsky-Induktion (Abb. 20, rote Kurve). Die Mutante zeigte also unter kontinuierlicher Belichtung eine deutlich erhöhte Abstrahlung von aufgenommener Lichtenergie am PSII in Form von Fluoreszenz. Diese Messungen bestätigten daher die aufgenommenen Messungen der Quantenausbeute von PSII (Φ_{PSII}) unter Belichtung (siehe 3.2.2.1.3).

3.2.2.2 Messungen bei 77 K

3.2.2.2.1 Chlorophyll-Fluoreszenz unter *LHC-state-1*- und *LHC-state-2*-Bedingungen

Im Gegensatz zu Messungen der Fluoreszenz bei RT kann bei 77 K die Fluoreszenz von PSII-LHCII-Superkomplexen (Maximum bei 685 nm für *C. reinhardtii*) und die von PSI-LHC-Superkomplexen (Maximum bei 711 nm für *C. reinhardtii*) aufgelöst werden. Somit wird es direkt möglich, *LHC-state-transitions* zu verfolgen. Hierzu wurden Zellen von WT und Stm3 auf *state-1*- oder *state-2*-Bedingungen eingestellt und Spektren bei 77 K aufgenommen. Der jeweilige PSII-Scheitelpunkt wurde auf den Wert 100 normiert.

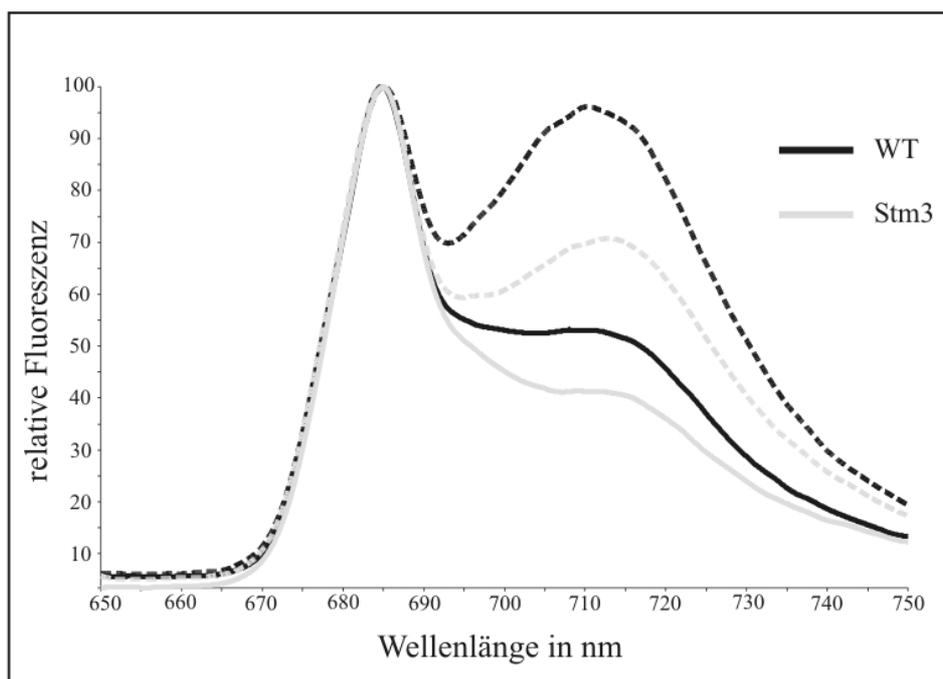


Abb. 21: Spektren der Chlorophyll-Fluoreszenz bei 77 K von WT (schwarz) und Stm3 (grau).

Durchgezogene Linien: Zellen in *state-1*, gestrichelte Linien: Zellen in *state-2*.

Sowohl die Zellen des WT als auch jene der Mutante zeigten einen proportional ähnlichen Anstieg der Fluoreszenz am PSI (Abb. 21, gestrichelte Linien) beim Wechsel von *state-1*- auf *state-2*-Bedingungen. Daher muss gefolgert werden, dass die Anlagerung von LHCII-Molekülen an PSI-Komplexe in der Mutante prinzipiell möglich ist und die veränderte RT-Fluoreszenz (siehe Kapitel 3.2.2.1) nicht auf einen primären Defekt der *LHC-state-transitions* zurückzuführen sein kann.

Auffällig war allerdings, dass durch die Normierung auf die PSII-Maxima die Fluoreszenz bei 711 nm, welche auf PSI-LHC zurückzuführen ist, in der Mutante geringer als im WT war. Dies galt sowohl für *state-1*- als auch für *state-2*-Bedingungen (Abb. 21). In der Mutante war also die Fluoreszenz der PSII-LHCII-Superkomplexe im Vergleich zu der Fluoreszenz der

PSI-LHC-Komplexe generell erhöht. Dies lässt darauf schließen, dass in der Mutante proportional mehr PSII-LHCII als im WT vorhanden sein musste.

3.2.3 Zellwachstum

Das Zellwachstum der Mutante *Stm3* wurde unter unterschiedlichen Bedingungen mit dem Wachstum des WT verglichen. Analog dem WT war die Mutante sowohl in der Lage, heterotroph auf Vollmedium im Dunkeln (Abb. 22, A) als auch photoautotroph auf Minimalmedium im Licht (Abb. 22, B) zu wachsen.

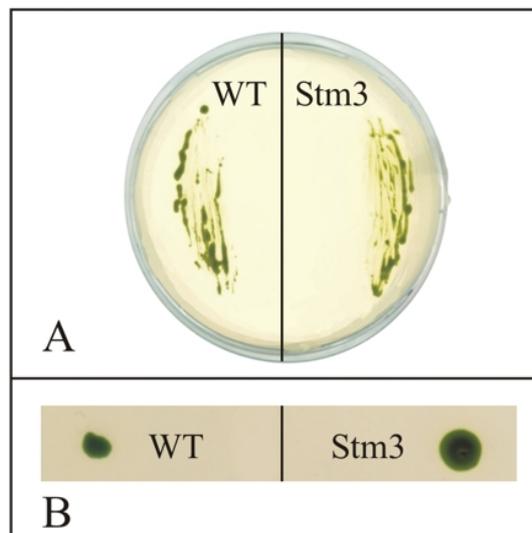


Abb. 22: Wachstum von WT und *Stm3*.

Zellen von WT und *Stm3* wurden für 6 Tage im Dunkeln auf Vollmedium (A) oder für 25 Tage im Licht auf Minimalmedium (B) angezogen.

Wachstums-Kinetiken wurden mixotroph in TAP-Flüssigmedium aufgenommen. Unter konstanten Lichtbedingungen unterschied sich das Wachstum von WT und Mutante *Stm3* nicht signifikant (Abb. 23, A).

Die Anpassungsfähigkeit photosynthetischer Zellen wird unter wechselnden Lichtverhältnissen stärker beansprucht als unter Dauerlicht. Daher wurden parallel Wachstums-Kinetiken unter Dauerlicht und unter halbstündig wechselnden Lichtintensitäten aufgenommen (Abb. 23, B). Mit diesem Versuchsaufbau sollte untersucht werden, ob das mixotrophe Wachstum der Mutante hier beeinträchtigt war.

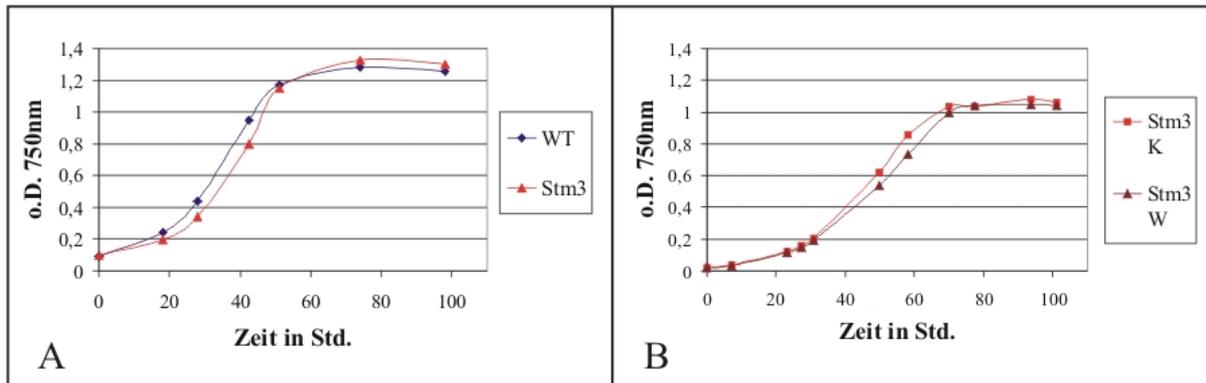


Abb. 23: Mixotrophes Wachstum von WT und Stm3.

Chlamydomonas-reinhardtii-Zellen wurden in TAP-Flüssigmedium unter konstanten Lichtbedingungen von $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (A, B (Stm3 K)) oder unter wechselnden Lichtbedingungen ($30 \text{ min } 11 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $30 \text{ min } 65 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (B (Stm3 W)) angezogen.

Wie in Abb. 23, B ersichtlich, wurde das Wachstum der Mutante unter alternierenden Lichtbedingungen nicht signifikant verlangsamt.

3.2.4 Chlorophyll-Gehalt und -Zusammensetzung

3.2.4.1 Chlorophyll-Gehalt bei gleicher Zelldichte

Dem optischen Eindruck nach schienen Zellen der Mutante in gleichem Wachstumsstadium eine dunklere Grünfärbung aufzuweisen als Zellen des WT (Abb. 24, A). Um dies zu quantifizieren wurden gleiche Volumina der Zellen bei identischer Zelldichte ($\text{o.D.}_{750} = 0,85$) geerntet und der jeweilige Chlorophyll-Gehalt gemessen.

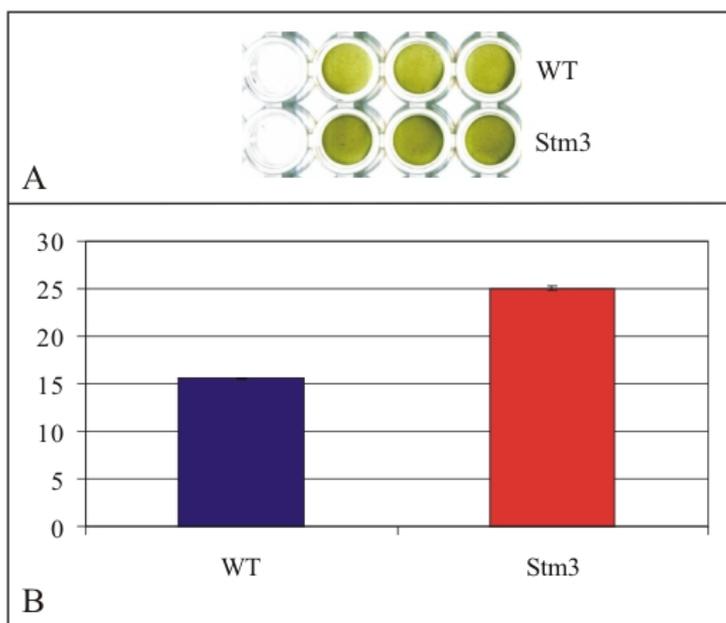


Abb. 24: Chlorophyll-Gehalt von WT und Stm3 bei gleicher Zelldichte.

Balken: Standardabweichung.

Wie aus Abbildung 24 hervorgeht, ist bei gleicher Zelldichte der Gesamt-Chlorophyll-Gehalt in der Mutante mit 161 % des WT Niveaus deutlich erhöht (Abb. 24, B).

3.2.4.2 Chlorophyll-a/b-Verhältnis

Um die Verhältnisse von Chlorophyll-a zu Chlorophyll-b zu ermitteln, wurden Zellproben in unterschiedlichen Wachstumsphasen entnommen und spektroskopisch analysiert. Die gemittelten Werte sind in Abbildung 25 zusammengefasst.

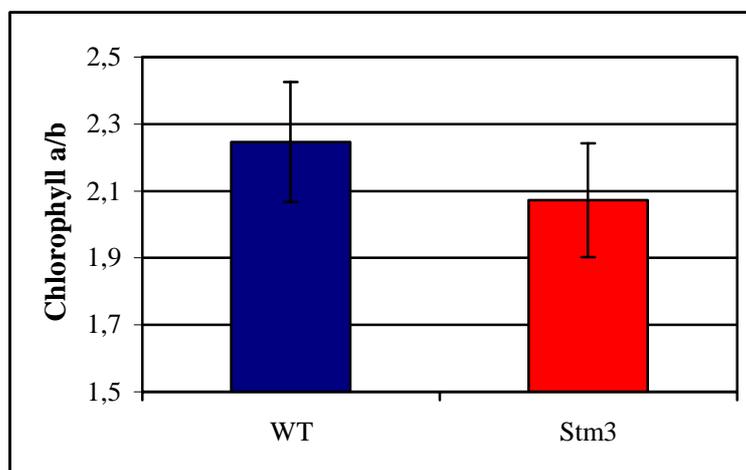


Abb. 25: Chlorophyll-a/b-Verhältnisse von WT und Stm3.

Balken: Standardabweichung.

Im Mittel betrug das Verhältnis von Chlorophyll-a/b in der Mutante 93 % des WT-Niveaus (Abb. 25). Dieses geringere Chlorophyll-a/b-Verhältnis in Stm3 deutet darauf hin, dass der erhöhte Chlorophyll-Gehalt bei gleicher Zelldichte (siehe 3.2.4.1) in der Mutante auf eine verstärkte Expression von LHC-Proteinen zurückzuführen ist, da diese als einzige Proteine in *Chlamydomonas* neben Chlorophyll-a auch Chlorophyll-b gebunden haben.

3.2.5 Untersuchung der LHC-Proteine

Da die Phosphorylierung der LHCII-Proteine eine wichtige Rolle in den *LHC-state-transitions* spielt, wurde zunächst untersucht, ob sich die lichtabhängige Phosphorylierung zwischen WT und Stm3 unterscheidet.

3.2.5.1 Phosphorylierung der LHC-Proteine *in vivo*

Für Phosphorylierungsversuche *in vivo* wurden intakte Zellen in *LHC-state-1* oder *LHC-state-2* gebracht und der Zustand der Phosphorylierung mit Anti-Phosphothreonin-Antikörpern im *Western-blot* überprüft.

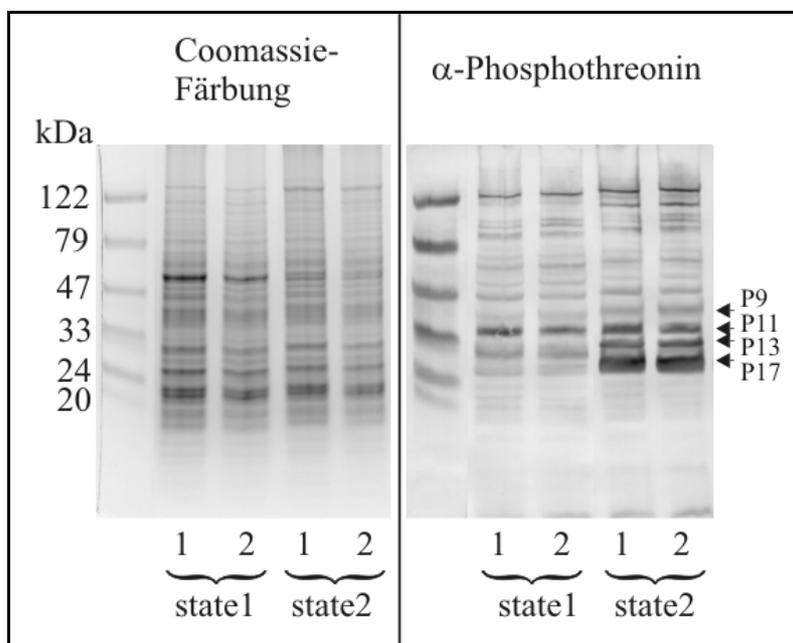


Abb. 26: Phosphorylierungszustand von WT und Stm3 *in vivo*.

Bahnen 1: WT, Bahnen 2: Stm3, *state-1*: Zellen eingestellt auf *state-1*-Bedingungen, *state-2*: Zellen eingestellt auf *state-2*-Bedingungen, P9, P11, P13, P17: LHC-Banden benannt nach Chua & Bennoun (1975).

In eindimensionaler Auftrennung der Proteine wies das Bandenmuster zwischen WT und Stm3 keine erkennbaren Unterschiede auf (Abb. 26). Dies deutet darauf hin, dass der Phosphorylierungszustand in der Mutante sowohl in *LHC-state-1* als auch in *LHC-state-2* dem des WT entspricht.

3.2.5.2 Phosphorylierung der LHC-Proteine *in vitro*

Zur Untersuchung der LHC-Phosphorylierung *in vitro* wurden Thylakoide von WT und Stm3 im *LHC-state-1* isoliert. Nach Zugabe von ATP³² wurden die Ansätze belichtet und Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen, im eindimensionalen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und das radioaktive Signal aufgenommen.

Sowohl im WT als auch in der Mutante wurden die LHC-Proteine *in vitro* deutlich phosphoryliert.

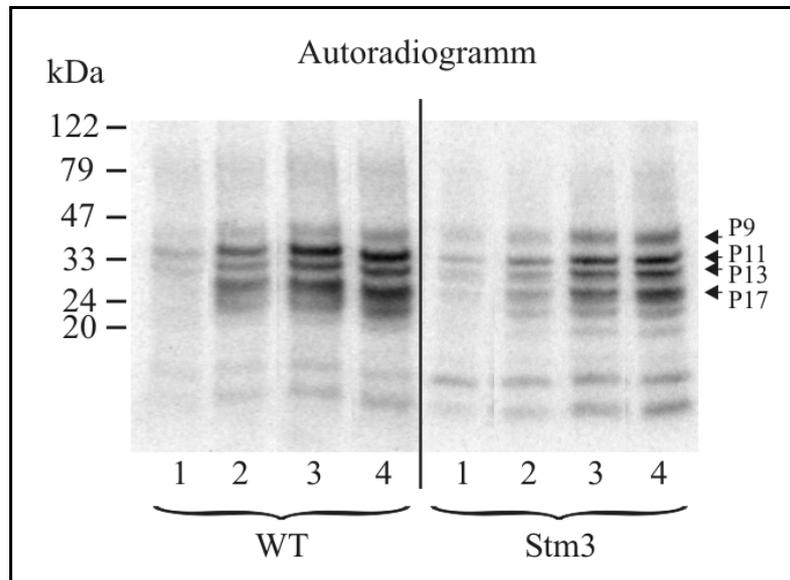


Abb. 27: *In vitro*-Phosphorylierung von Thylakoid-Proteinen.

Bahnen 1: Proben vor Belichtung mit $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Weißlicht,
 Bahnen 2: Belichtung für 2 min, Bahnen 3: Belichtung für 10 min,
 Bahnen 4: Belichtung für 20 min.

P9, P11, P13, P17: LHC-Banden benannt nach Chua & Bennoun (1975).

Erneut waren im Bandenmuster zwischen WT und Stm3 keine qualitativen Unterschiede erkennbar (Abb. 27). Die unterschiedliche Stärke des radioaktiven Signals bei WT und Mutante ist auf unterschiedliche Expositionszeiten zurückzuführen. Das Ergebnis dieses Experiments deutet darauf hin, dass die lichtabhängige Phosphorylierung der Thylakoid-Proteine in der Mutante nicht gestört war.

3.2.5.3 1D-gelelektrophoretische Analyse der LHC-Expression

Um Unterschiede in der Expression der LHC-Proteine zu untersuchen wurden Proben gleicher Zellmengen von WT und *Stm3* in *Western-blots* mit einem Antiserum gegen LHC-Proteine analysiert (Abb. 28).

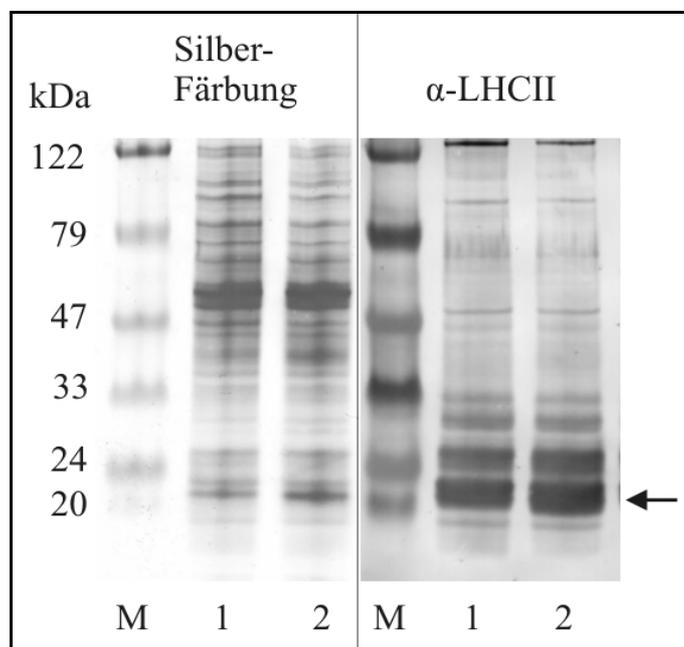


Abb. 28: Untersuchung der LHC-Expression durch 1D-SDS-PAGE und *Western-blot*-Analyse.

Bahnen 1: WT, Bahnen 2: *Stm3*, Pfeil: Lhcbm2/8 Bande, M: Marker.

Die Expression der LHC-Proteine bei gleicher Zellmenge war in der Mutante erhöht. Besonders auffällig erschien der Unterschied bei einer Bande, die im 1D-Gel bei etwa 22 kDa detektiert wurde (Abb. 28, Bahnen 2, Pfeil).

```

1 MAAIMKSSVRSSVRSTVSSRSARVVPRAAIEWYGPDRPKFLGPFSEGDTP
51 AYLTGEFPGDYGWDTAGLSADPETFKRYRELELIHARWAMLGALGCITPE
101 LLAKNGIPFGEAVWFKAGAQIFAEGGLNYLGNENLIHAQSIATLAFQVV
151 VMGLAEAYRANGGPLGEGLDPLHPGGAFDPLGLADDPDTFAELKVKEIKN
201 GRLAMFSMFGFFVQAIVTGKGPIQNLDHLANPTAVNAFAYATKFTPSA

```

Abb. 29: Peptidsequenz von LHCBM8.
Rot: Durch MALDI-ToF identifizierte Peptidfragmente.

Durch Gel-Extraktion und MALDI-ToF-Analyse konnten die LHCII-Proteine LHCBM2 und/oder LHCBM8 als Bestandteile dieser Bande identifiziert werden (Abb. 29).

3.2.5.4 2D-gelelektrophoretische Analyse der LHC-Expression

Die Auflösung der vielen, nahezu identischen LHCII-Proteine von *Chlamydomonas reinhardtii* ist im eindimensionalen Polyacrylamid-Gel nur begrenzt möglich (siehe Kapitel 3.2.5.3). Um eine bessere Trennung zu erzielen, wurde die Expression der LHCII-Proteine in Zusammenarbeit mit A. Fink und Dr. M. Hippler (Universität Jena, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie (Prof. Dr. R. Oelmüller)) in zweidimensionaler Gelelektrophorese untersucht.

In *Western-blots* wurde hier ein Antiserum eingesetzt, welches spezifisch mit den Isoformen LHCBM4 und LHCBM6 reagiert.

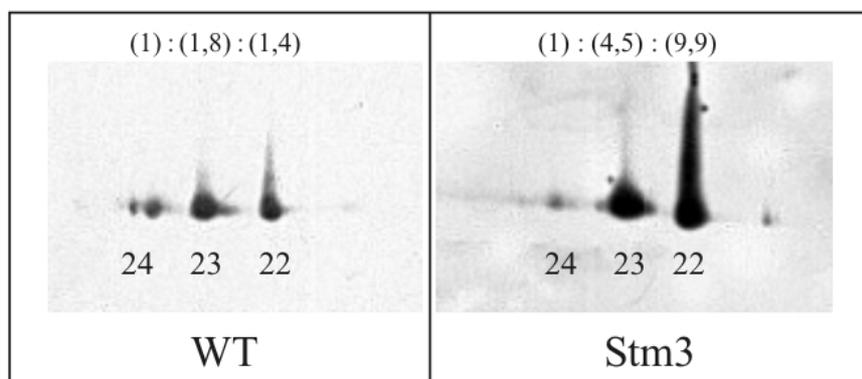


Abb. 30: 2D-*Western*-Analysen von LHCII-Proteinen isolierter Thylakoide. Das eingesetzte Antiserum markiert spezifisch die LHCII-Isoformen LHCBM4 und LHCBM6.

22, 23, 24: Nummerierung der Protein-*Spots* nach Hippler et al. (2001). Densitometrisch ermittelte, relative Intensität der Signale ist eingeklammert.

Wie in Abb. 30 zu erkennen, unterschied sich das Verhältnis der Protein-*Spots* 22, 23 und 24 zwischen WT und *Stm3*. Das Verhältnis des Signals der beiden *Spots* 22 und 23 im Vergleich zum *Spot* 24 ist in der Mutante deutlich zu Gunsten der *Spots* 22 und 23 verschoben.

In den *Spots* 22 und 23 konnte durch MALDI-ToF die Isoform LHCBM6 eindeutig nachgewiesen werden (Stauber et al. 2003). Für *Spot* 24 war dies nicht definitiv möglich. Hier konnte nur ein Fragment ermittelt werden, welches auf Grund der Sequenz-Homologie sowohl von LHCBM4 als auch von LHCBM6 stammen konnte (Stauber et al. 2003).

Die Ergebnisse dieses Versuchs legen nahe, dass die Markierung in *Spot* 24 von LHCBM4 stammt, da offensichtlich eine differentielle Expression der in den *Spots* 22, 23 und 24 enthaltenen Proteine zu beobachten war (Abb. 30). Trifft diese Annahme zu, wurde in der Mutante die LHCBM6-Isoform im Vergleich zur LHCBM4-Isoform verstärkt synthetisiert.

3.2.6 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von WT und Stm3

Da LHCII-Proteine auch im Zusammenhang mit der Grana-Stapelung der Thylakoide von Wichtigkeit sind wurde anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen die ultrastrukturelle Organisation der Mutante untersucht.

Zellen von WT und Stm3 wurden in Vollmedium bis zum Beginn der logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Elektronenmikroskopische Bilder von Proben gleicher Zelldichte wurden von Dr. U. Kahmann (Universität Bielefeld) angefertigt (Abb. 31).

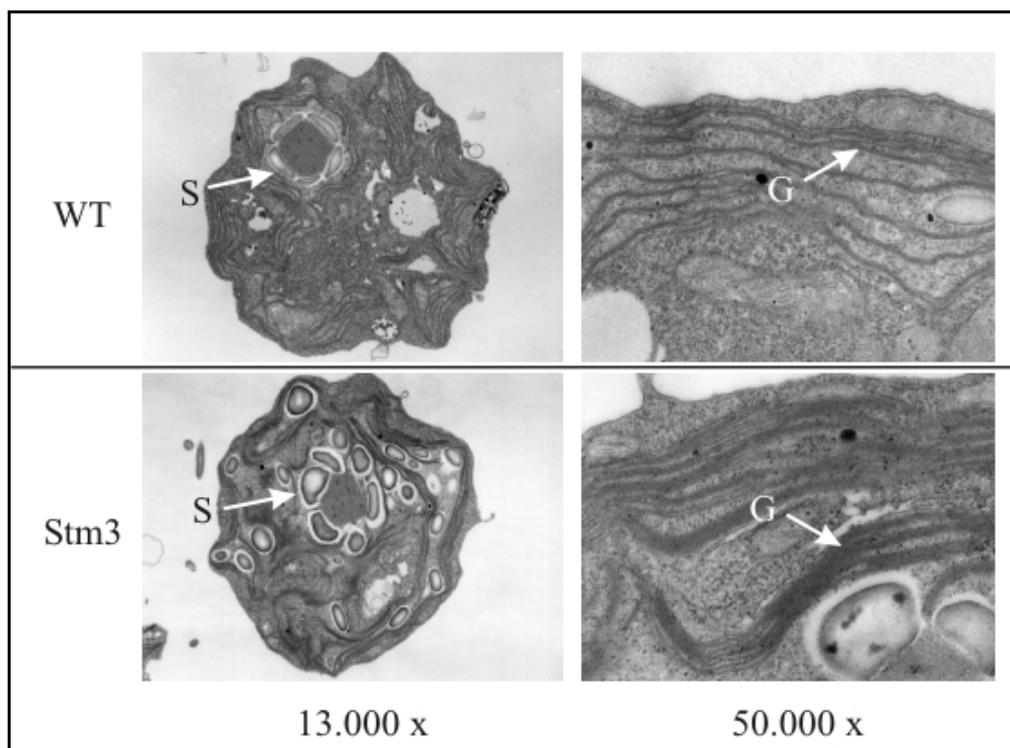


Abb. 31: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von WT und Stm3.
S: Stärkeablagerung, G: Grana-Thylakoide. x: Vergrößerungsfaktor.

Im Vergleich zwischen WT und Mutante wird deutlich, dass Stm3 im Gegensatz zum WT eine ungewöhnlich ausgeprägte Stapelung der Thylakoide aufwies (Abb. 31, G). Auch eine vermehrte Ablagerung von Stärke konnte in der Mutante registriert werden (Abb. 31, S).

3.2.7 Molekulargenetische Analysen der Mutante Stm3

Durch molekulargenetische Analysen sollte der DNA-Bereich ermittelt werden, dessen Mutation für die veränderten Phänotypen von Stm3 verantwortlich war. Zunächst wurde durch *Southern-blot*-Analysen die Häufigkeit ermittelt, mit der das verwendete Insertions-Plasmid in das Kerngenom der WT-Zelle transformiert worden war. Durch Identifikation und Analyse des Integrationsortes sollte das betroffene nukleäre Gen ermittelt und zur Komplementation eingesetzt werden.

3.2.7.1 Ermittlung der Integrationshäufigkeit des Transformations-Plasmids durch *Southern-blot*-Analysen

Durch *Southern-blot*s mit einer für das Transformations-Plasmid spezifischen Sonde sollte herausgefunden werden, wie häufig das Plasmid in das Kerngenom integriert worden war, da bei der zur Herstellung von Stm3 verwendeten Transformationsmethode eine Mehrfach-Integration des verwendeten Plasmids nicht ausgeschlossen ist.

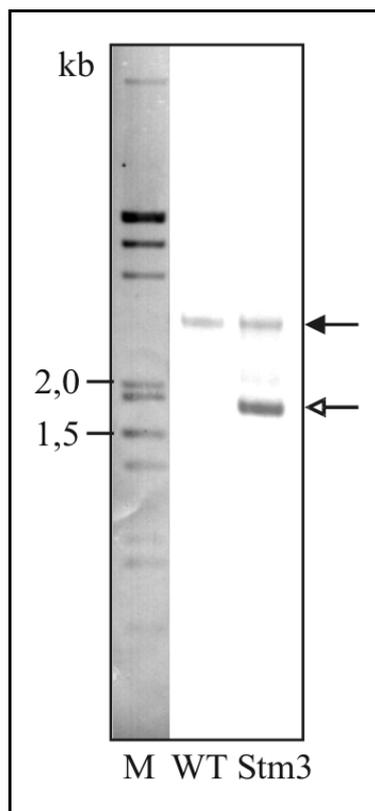


Abb. 32: *Southern*-Analyse von WT und Stm3.

Genomische DNA wurde durch PvuII restringiert und mit einer pSp124S-spezifischen Sonde hybridisiert. Geschlossener Pfeil: unspezifisches Signal in WT und Stm3, offener Pfeil: spezifisches Signal in Stm3. M: DNA-Marker in kb.

Sowohl im WT als auch in der Mutante konnte ein Signal detektiert werden, welches offensichtlich von einer unspezifischen Hybridisierung der Sonde mit der genomischen DNA stammte (Abb. 32, geschlossener Pfeil). In Stm3 konnte darüber hinaus eine Bande detektiert werden, die im WT nicht vorhanden war (Abb. 32, offener Pfeil). Abgesehen von dieser Bande war keine weitere, zusätzliche Bande bei Stm3 zu erkennen. Daher war zu folgern, dass das zur Herstellung der Zufallsmutante Stm3 verwendete Plasmid pSp124S nur ein einziges Mal in das Kerngenom integriert worden war.

Durch Segregationsexperimente wurde festgestellt, dass diese Plasmid-Insertion in allen 53 untersuchten Tochterzellen zusammen mit dem Phänotyp der Mutante vererbt wurde (nicht

gezeigt) und sich folglich zumindest auf dem gleichen Chromosom befinden musste, wie die für den Phänotyp verantwortliche Mutation. Folglich war ein ursächlicher Zusammenhang von Plasmid-Insertion und Phänotyp der Mutante relativ wahrscheinlich. Daher sollte der Ort der Plasmid-Insertion im Genom bestimmt werden.

3.2.7.2 Ermittlung des Integrationsortes des Transformations-Plasmids durch LMS-PCR

Versuche, den Integrations-Ort im Genom der Mutante durch Anwendung der *Plasmid-rescue*-Methode zu ermitteln, schlugen fehl (nicht gezeigt). Daher wurde die Methode LMS-PCR (Siebert et al. 1995, Strauss et al. 2001) eingesetzt, um den flankierenden DNA-Bereich neben dem inserierten Plasmid zu ermitteln. Hierzu wurde die genomische DNA der Mutante isoliert und mit einem *blunt-end*-Restriktionsenzym verdaut. Im Anschluss wurden spezielle DNA-Adapter an die Enden ligiert und PCR mit plasmidspezifischen und adapterspezifischen *Primern* durchgeführt (Abb. 33).

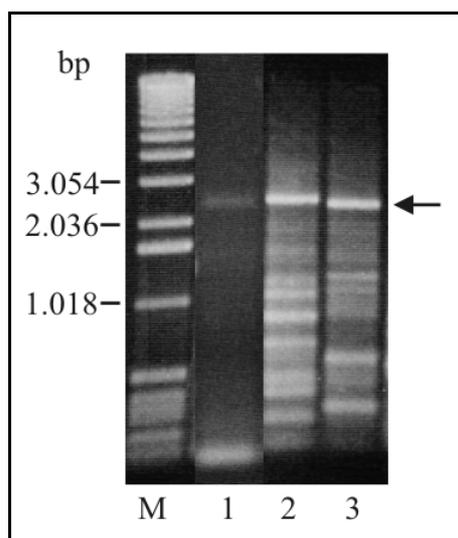


Abb. 33: Produkte der LMS-PCR.

Bahn 1: Erster PCR-Durchgang, Bahnen 2 und 3: Zweiter PCR-Durchgang mit *semi-nested* (Bahn 2) und *nested* (Bahn 3) lokalisierten *Primern*. M: DNA-Größenmarker.

Für den ersten PCR-Durchgang wurde ein relativ weit außen lokalisiertes *Primer*-Paar eingesetzt, das Produkt dieser PCR wurde in einem zweiten PCR-Durchgang zusammen mit weiter innen liegenden *Primern* (*semi-nested* und *nested*) verwendet.

3.2.7.3.2 Restriktion, Subklonierung und Sequenzierung der genomischen DNA

Die Phagen-DNA wurde vermehrt und isoliert. Zur Sequenzierung wurde die enthaltene *Chlamydomonas-reinhardtii*-DNA geschnitten (Abb. 35).

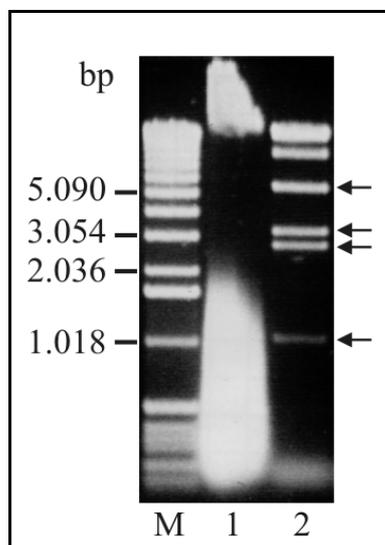


Abb. 35: EMBL3-Phagen-DNA.

Bahn 1: Isolierte Phagen-DNA vor Restriktion. Bahn 2: DNA nach Restriktion. Pfeile: *Chlamydomonas*-DNA-Fragmente von ~1 kb, ~2,8 kb, ~3,3 kb, ~5,5 kb. Die Fragmente von ~9,2 kb und ~20 kb entsprechen den EMBL3-Phagenarmen. M: DNA-Größenmarker.

Die erhaltenen *Chlamydomonas*-DNA-Fragmente wurden isoliert, jedes in einen Vektor kloniert und schrittweise sequenziert. Um die Orientierung und Abfolge der einzelnen Fragmente zu bestimmen, wurden *Primer* konstruiert, welche von den einzelnen Fragmenten nach außen orientiert waren. Durch PCR-Analysen mit diesen verschiedenen *Primer*-Kombinationen konnten Reihenfolge und Orientierung ermittelt werden. Die genomische Abfolge der Fragmente war:

Fragment 1 kb - Fragment 3,3 kb - Fragment 5,5 kb - Fragment 2,8 kb.

Da mittlerweile eine Rohversion des *Chlamydomonas*-Genoms veröffentlicht worden war, konnten diese Daten verifiziert werden. Die Rohdaten der Genom-Sequenzierung sind als Abschnitte (*scaffolds*) abgelegt (<http://genome.jgi-psf.org/chlre1/chlre1.home.html>). Die Fragmente von 1 kb, 3,3 kb und ein Teil des 5,5-kb-Fragments waren auf Abschnitt 1.636 lokalisiert, der Rest des 5,5-kb-Fragments und das 2,8-kb-Fragment lagen revers-komplementär auf Abschnitt 290. Da das sequenzierte Fragment somit zwei Abschnitte überspannte, konnten Abfolge und Orientierung dieser beiden Abschnitte dem für die Sequenzierung des *Chlamydomonas*-Genoms verantwortlichen DOE Joint Genome Institute (JGI, USA) übermittelt werden.

3.2.7.3.3 Datenbank-Analysen

Um Gene identifizieren zu können, die in Stm3 potentiell mutiert worden waren, wurde die gesamte DNA-Sequenz des Abschnitts 1.636 (15.552 bp) durch Abgleich mit den EST-Datenbanken auf das Vorhandensein transkribierter Bereiche untersucht. Durch Analyse der erhaltenen EST-Fragmente konnten sechs transkribierte Abschnitte zugeordnet werden.

EST	Start- und Stopposition (in bp, relativ zum Abschnitt 1.636)	Größe	Besonderheiten
1	10.474 – 10.664	191 bp	Potentielles Startcodon 10.557 – 10.559
2	10.993 – 11.121	129 bp	
3	11.342 – 11.474	133 bp	
4	12.221 – 12.363	143 bp	
5	12.616 – 12.728	112 bp	
6	12.973 – 14.283	1.311 bp	Potentielles Stoppcodon 13.088 – 13.090, potentielles Poly-Adenylierungssignal 13.317 – 13.321

Tab. 6: Identifizierte EST-Sequenzen auf *Chlamydomonas*-Genom-Abschnitt 1.636.

5' von EST 1 wurde ein weiterer, potentieller EST-Bereich gefunden (9.146 bp – 9.323 bp). Dieser ist jedoch nicht von den typischen Intron-Grenzmotiven umgeben und im Gegensatz zu den EST 1 - 6 enthielt er relativ viele Abweichungen von der Genom-Sequenz (~4 %). Des Weiteren kommt die potentielle EST-Sequenz in vielfacher Kopie im Genom vor (>20 Mal). Daher handelt es sich hierbei vermutlich um eine repetitive Sequenz und nicht um ein zugehöriges EST dieses Abschnitts. Folglich wurde es nicht mit in die Tabelle 6 aufgenommen.

In den EST-Datenbanken waren keine Sequenzen vorhanden, welche EST 3 und EST 4 verbanden. Um zu untersuchen, ob die EST 1 - 3 und 4 - 6 für ein gemeinsames oder für zwei verschiedene Proteine codieren, wurde der Sequenzier-Klon AV629952 vom Kazusa DNA Research Institute bestellt und sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass die EST 1 - 6 für eine transkribierte Einheit und somit für nur ein Gen stehen. Ein Startcodon konnte im EST 1 identifiziert werden, das entsprechende Gen wurde Nab1 genannt (s.u.).

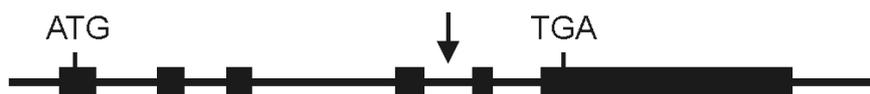


Abb. 36: Genmodell des Nab1-Gens.

ATG: Startcodon, TGA: Stoppcodon, Pfeil: Mutationsort in Mutante Stm3.

In der Mutante Stm3 ist das zur Transformation verwendete Plasmid pSp124S in Intron vier inseriert (Abb. 36, Pfeil).

Die Translation der insgesamt 741 bp resultierte in einer Aminosäure-Sequenz von 247 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 26,54 kDa und dem theoretischen isoelektrischen Punkt von 9,47.

Durch Homologie-Vergleiche konnten zwei Domänen in der Aminosäure-Sequenz identifiziert werden, welche für nukleinsäure-bindende Proteine diagnostisch sind (Abb. 37). Dies war zum einen das N-terminal lokalisierte CSD-(*Cold Shock Domain*)-Motiv (BLAST-E-Wert = $1 \cdot 10^{-8}$ (Altschul et al. 1997)), und zum andern die C-terminal gelegene RRM-(*RNA Recognition Motif*)-Domäne (BLAST-E-Wert = $8 \cdot 10^{-14}$).

Das Protein wurde daher nach seiner potentiellen Funktion NAB1 (Nucleic Acid Binding-Protein 1) genannt und in GenBank veröffentlicht (Acc. No. AY157846).



Abb. 37: Schematische Darstellung des NAB1-Proteins.

CSD (blau): putative Kälteschock-Domäne, RGG- und RXR-Motive (rot): putative Arginin-Methylierungsdomänen, RRM (grün): putative RNA-Bindedomäne.

Da weder im nahezu vollständig sequenzierten Kerngenom noch in den EST-Datenbanken von *C. reinhardtii* ein weiteres Protein codiert ist, welches das hoch konservierte CSD-Motiv trägt, ist davon auszugehen, dass NAB1 das einzige Protein in *C. reinhardtii* darstellt, welches diese CSD-Domäne besitzt. Im Gegensatz dazu sind bislang drei Proteine mit RRM-Domäne in *C. reinhardtii* identifiziert und veröffentlicht worden.

Ein weiteres auffälliges Sequenz-Motiv konnte im Bereich der Aminosäuren 86 - 101 in Form von vier Aminosäure-Triplets der Sequenz RGG oder RXR gefunden werden. Diese Arginin-Glycin-Abfolgen sind relativ häufig in RNA-bindenden Proteinen anzutreffen, ihnen wird eine regulatorische Bedeutung beigemessen. Die Arginine innerhalb dieser Motive können reversibel in einfach- oder zweifach-methylierter Form vorliegen. Es wird angenommen, dass der Methylierungszustand des Motivs von Bedeutung für die Aktivität des Enzyms ist (McBride & Silver 2001).

3.2.7.4 Komplementierung von Stm3 mit Nab1

Nach der Identifikation des in Stm3 mutierten Gens Nab1 sollte überprüft werden, ob die phänotypische Ausprägung der Mutante durch Re-Transformation des intakten Nab1-Gens reversibel war. Dazu wurde die genomische DNA des isolierten Phagen (siehe Kapitel 3.2.7.3.1) mit dem Enzym AvrII restringiert. Dieses Enzym schneidet ein 3.708 bp großes Fragment aus, welches die komplette codierende Region des Nab1-Gens, 817 bp 5' des Startcodons sowie 357 bp 3' des Stoppcodons umfasst. Zur Herstellung des Komplementationsvektors pNab1 wurde dieses Fragment in einen Vektor kloniert. Anschließend wurde der Komplementationsvektor zusammen mit dem dominanten Resistenzmarker p613, welcher eine Emetine-Resistenz vermittelt, in Stm3-Zellen co-

transformiert. Zur Identifikation von Co-Transformanten wurden dann jeweils 15 Emetine-resistenten Transformanten zusammen in Flüssigmedium angezogen und die DNA isoliert. Diese Misch-DNA wurde PCR-Analysen unterzogen. Für die PCR-Analysen wurden *Primer*-Paare eingesetzt, welche entweder vom 5'-oder vom 3'-Bereich des Nab1-Gens abgeleitet waren. Da diese DNA-Bereiche in der Mutante Stm3 nicht mehr vorhanden waren, konnten so Co-Transformanten isoliert werden, welche zusätzlich zum Plasmid p613 das Plasmid pNab1 integriert hatten (Abb. 38, A). Im Falle eines positiven Signals wurden die vormals zusammen angezogenen Transformanten einzeln kultiviert und erneut PCR-Analysen unterzogen (Abb. 38, B).

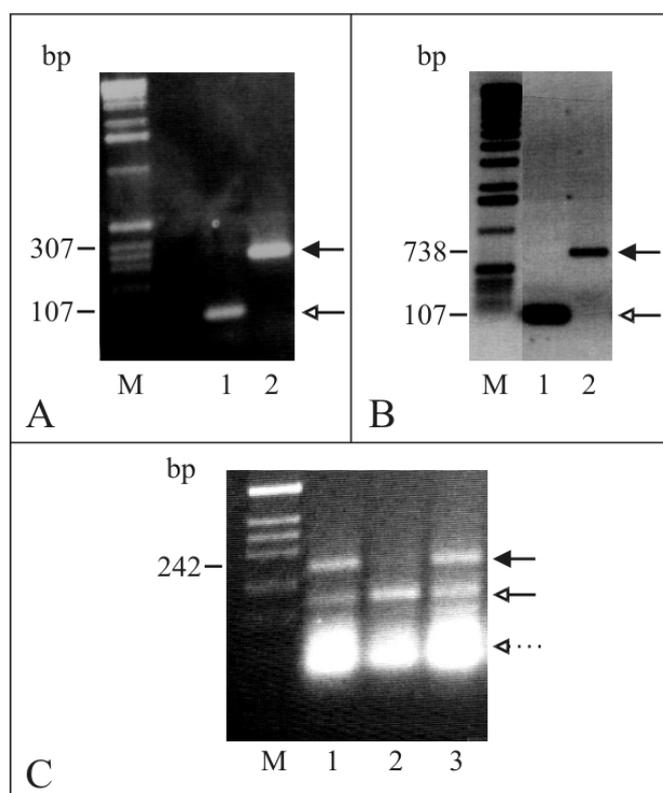


Abb. 38: Identifikation der komplementierten Mutante Stm3nc1.

(A): PCR-Analysen von 15 gemischten Transformanten mit *Primern*, abgeleitet vom 5'- (Bahn 1, offener Pfeil) oder 3'-Bereich (Bahn 2, geschlossener Pfeil) des Nab1-Gens.

(B): PCR-Analysen der isolierten Mutante Stm3nc1 mit *Primern*, abgeleitet vom 5'- (Bahn 1, offener Pfeil) oder 3'-Bereich (Bahn 2, geschlossener Pfeil) des Nab1-Gens.

(C): RT-PCR-Analysen mit *Primern* des Nab1-Gens, Bahn 1: WT, Bahn 2: Stm3, Bahn 3: Stm3nc1, geschlossener Pfeil: spezifische Amplifikation des Nab1-Gens, offener Pfeil: unspezifische Amplifikation, offener, gepunkteter Pfeil: degradierte RNA, M: Marker.

Auf diese Weise konnten insgesamt vier Mutanten isoliert werden, in welche das Nab1-Gen re-transformiert worden war. Diese potentiell komplementierten Mutanten wurden als Stm3nc (Stm3-Nab1-Cry1) 1 - 4 bezeichnet. Analysen mittels RT-PCR zeigten, dass in der Mutante Stm3nc1 das Nab1-Gen exprimiert wurde (Abb. 38, C, geschlossener Pfeil) und diese somit erfolgreich genetisch komplementiert wurde.

Der Phänotyp der komplementierten Mutante *Stm3nc1* wurde untersucht durch Messung der Quantenausbeute von PSII (Φ_{PSII}) (Abb. 39, A), der RT-Fluoreszenz-Induktion (Abb. 39, B), durch *Western*-Analysen auf 2D-Ebene (Abb. 39, C) und durch Messung des Chlorophyll-Gehaltes (nicht gezeigt).

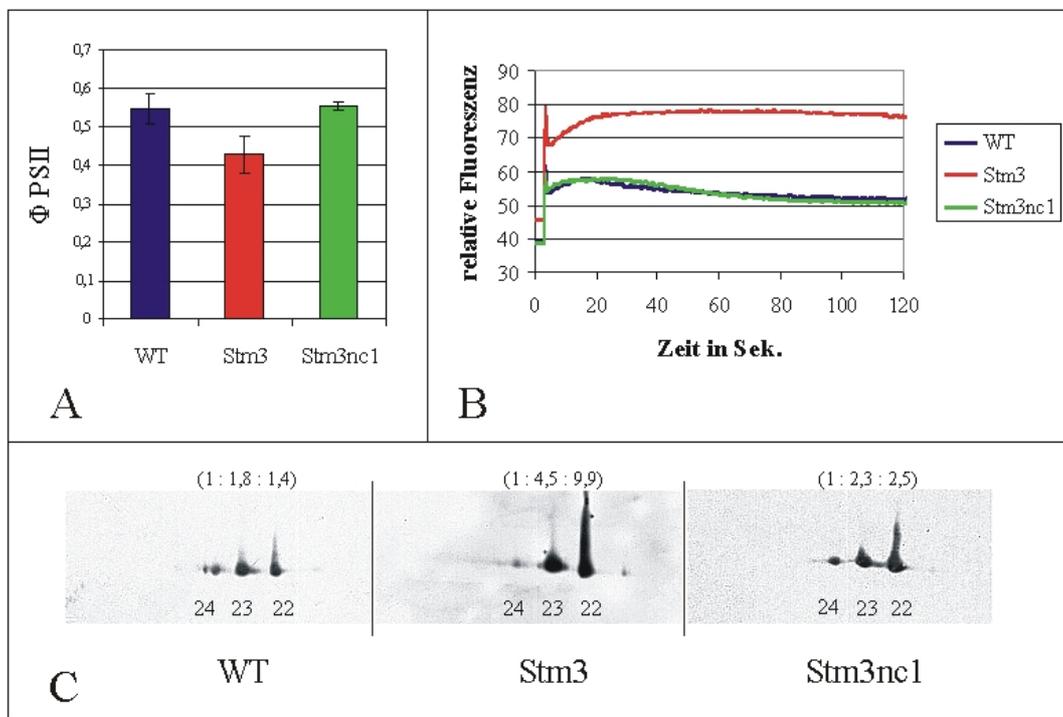


Abb. 39: Untersuchungen der komplementierten Mutante *Stm3nc1*.

Dargestellt sind Quantenausbeute von PSII (A), RT-Fluoreszenz-Induktion (B) und 2D-*Western-blot*-Analyse von LHCBM4 und LHCBM6 (C). Balken in (A): Standardabweichung. 22, 23, 24 in (C): Nummerierung der Protein-*Spots* nach Hippler et al. (2001). Densitometrisch ermittelte, relative Intensität der Signale in (C) ist eingeklammert.

Sowohl der Φ_{PSII} -Wert als auch die Fluoreszenz-Induktion und das Verhältnis der LHCBM4- und LHCBM6-Proteine in den *Spots* 22 - 24 zeigten, dass die Re-Transformation des *Nab1*-Gens in *Stm3* den Phänotyp der Mutante weitestgehend aufhob. Dafür sprach ebenfalls eine deutlich gesunkene Chlorophyll-Konzentration bei gleicher Zelldichte von *Stm3nc1* im Vergleich zu der Mutante *Stm3* (nicht gezeigt).

3.2.7.5 Vergleichende Analysen des NAB1- und des FRGY2-Proteins

Durch Datenbank- und Literatur-Recherchen konnte ermittelt werden, dass die Aminosäure-Sequenz von NAB1 insbesondere im N-terminalen Bereich des CSD-Motivs große Ähnlichkeiten mit FRGY2, einem 37 kDa Protein von *Xenopus laevis* (Matsumoto et al. 1996, Manival et al. 2001), aufweist (Abb. 40).

```

NAB1 : MGEQLRQ-----OGTVKWFNATKGFGLTPGGGGEDLFVHQTININSEG---FRSLRE : 49
FRGY2 : MSEAEAEQEPPEPVPQPESEPEIQKPGIAAARNQANKKVLATQVQGTVKWFNVRNGYGFINRNDTKEDVFVHQTATKKNNPRKFLRSVGD : 88

NAB1 : GEVVEFEVEEACPDERSKFNVTGPGGAPEG---AP---RNFN-----GGGRGRGR---ARCARGGYAAAYGYPMAPVY : 116
FRGY2 : GETVEFDVVECEKQ--AEANVTGPGGVVVKGSRFADNRRRFRRRFYRPRADTAGESGGEVSPEQMSERGETSPQQRPRRRRPP : 175

NAB1 : GNY--FFPADPTGRGRGRGG-----RGGAMPAMOGVMPG-----VAYGCMEMGGVGMETGEP SGLQVVVHNLDP : 179
FRGY2 : FEYRRRFRRGPRPNNQQNQCAEVTEQSENKDPVAPTSEALASGDDPQRPPRRFRQRFRRPFRPRPAPQQTPEGGDGEAKAESGEDPR : 263

NAB1 : SCWQQLKDHFKFWRRVER--ADVVDATWERSRFGFTVRFTHKEDAAACDKLINSQIDGRTISVRIIDRFA--- : 247
FRGY2 : PEPQRQRNRFPYVQRRRRQCATQVAATAQCEGKAEPTQHPASEEGTSPDSPTDDGAPVQSSAPDPGADTDPAPE : 336

```

Abb. 40: Homologie-Vergleich zwischen NAB1 und FRGY2.

Eine weitere Gemeinsamkeit beider Proteine ist neben dem CSD-Motiv das Auftreten einer weiteren RNA-Bindeaktivität am C-Terminus. In NAB1 ist dieses durch eine RRM-Domäne repräsentiert, in FRGY2 kommen im C-Terminus verstärkt basische und aromatische Aminosäure-Reste vor (B/A-Inseln), für welche eine unspezifische RNA-Affinität experimentell nachgewiesen wurde (Matsumoto et al. 1996).

Durch intensive Bindestudien konnte für das CSD-Motiv des FRGY2-Proteins eine RNA-consensus-Sequenz ermittelt werden, an welche die CSD-Domäne bindet. Sie besteht aus 13 Nukleotiden mit der Abfolge GCCANACCAC/UCGC (Manival et al. 2001). Domänen mit ähnlicher Sequenz konnten auf den cDNAs der Haupt-LHCII-Proteine von *C. reinhardtii* identifiziert werden (Abb. 41).

```

Lhcbm1 : AGTTCCC CGGTGACTACGGCTGGGACACCGCCGGTCTGTCGCTGACCCG
Lhcbm2 : TGGGCCCTTCTCGGAGGGGACACCCCGCCTACCTGACTGGCGAGTTC
Lhcbm3 : GTTCAGATGCGTTCGGAGCTGGACACCGTCACGACAGCCCCAACAAA
Lhcbm4 : TGCTGGGCGCCCTGGGCTGCCTGACCCCGAGCTGCTGGCCAAGAGCGGC
Lhcbm5 : TGCTGGGCGCTCTGGGCTGCATCACCCCGAGCTGCTGGCCAAGAACGGC
Lhcbm6 : TGCTGGGCGCCCTGGGCTGCCAGACCCCGAGCTGCTGGCCAAGAGCGGC
Lhcbm8 : TGGGCCCTTCTCGGAGGGGACACCCCGCCTACCTGACTGGCGAGTTC
CSD    : -----GCCANACCACCG-----

```

Abb. 41: Homologie-Vergleich zwischen Lhcbm1 - 8 und der RNA-consensus-Bindedomäne des CSD-Motivs (CSD).

Schwarz: Identität aller acht Sequenzen, grau: Identität von 6 - 7 Sequenzen, weiß: Identität von <6 Sequenzen.

Die größte Übereinstimmung zur RNA-consensus-Bindedomäne des CSD-Motivs wurde auf den cDNAs von Lhcbm2, Lhcbm6 und Lhcbm8 festgestellt. Hier waren jeweils 10 der 13 Nukleotide (exklusive des N der RNA-consensus-Bindedomäne) identisch. Darüber hinaus war nur bei diesen drei Isoformen ein Adenosin an Position vier der CSD-Domäne konserviert.

Die von Elrad et al. (2002) postulierten, putativen LHCII-Isoformen Lhcbm7, Lhcbm9 und Lhcbm10 wurden in den Homologie-Vergleichen nicht berücksichtigt, weil in eigenen Analysen keine der drei Untereinheiten in der Kerngenom-Sequenz gefunden werden konnte. Zudem konnte bislang keine der postulierten Isoformen als Protein eindeutig nachgewiesen werden, obwohl verschiedene Arbeitsgruppen die Zusammensetzung der LHCII-Proteine in *Chlamydomonas* intensiv untersucht haben (Stauber et al. 2003, mündliche Information von PD Dr. L. Eichacker, LMU München). Daher handelt es sich bei diesen als eigenständige Gene postulierten EST-Sequenzen vermutlich nicht um wirklich vorhandene Gene, sondern um Fehler in den EST-Sequenzierungen der übrigen sieben Lhcbm-Gene.

Die große Ähnlichkeit im Bereich der RNA-consensus-Bindedomäne deutete darauf hin, dass diese drei Lhcbm-Isoformen mögliche Bindepartner des CSD-Motivs von NAB1 sein könnten. Da zudem die gelelektrophoretischen Untersuchungen zur LHC-Expression auf eine Störung der Expression gerade dieser Isoformen in der NAB1-Mutante Stm3 hindeuteten (siehe Kapitel 3.2.5.3 und 3.2.5.4), sollten nun direkte Bindestudien mit NAB1 und RNA der Lhcbm-Gene durchgeführt werden. Dafür wurden der RNA-consensus-Bereich des Lhcbm6-Gens sowie zur Kontrolle Bereiche der 5'- und 3'-UTR ausgewählt (siehe Kapitel 3.2.7.7).

3.2.7.6 Expression des NAB1-Proteins in *E. coli* und Herstellung von NAB1-Antikörpern

Um NAB1-RNA-Bindestudien durchführen zu können sowie zur Herstellung spezifischer Antikörper, sollte das NAB1-Protein in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt werden.

Dazu wurde die cDNA des Gens zunächst mit speziellen *Primern* amplifiziert, in den Expressionsvektor pQE-80L ligiert und dieses Konstrukt in *E. coli* transformiert (Abb. 42).

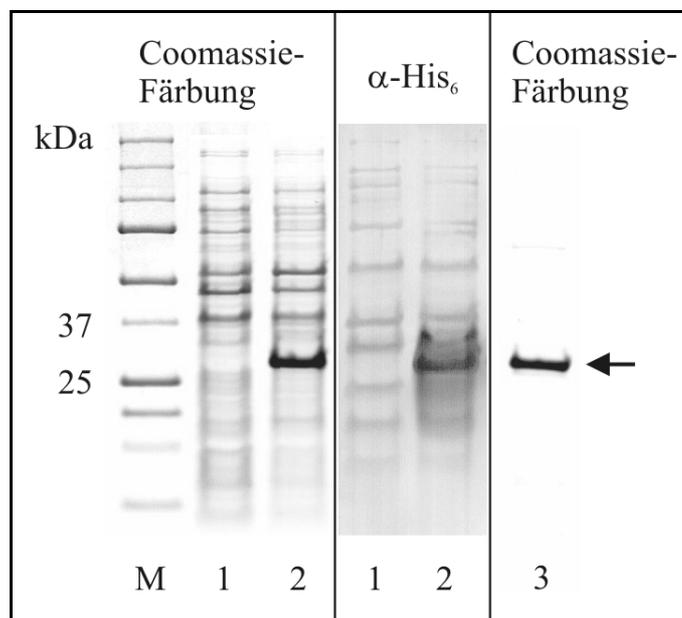


Abb. 42: Expression von NAB1 in *E. coli*.

Coomassie-Färbung und Anti-Histidin-Western-blot. Bahnen 1: *E. coli*-Lysat vor IPTG-Expressionsinduktion, Bahnen 2: *E. coli*-Lysat nach IPTG-Expressionsinduktion, Bahnen 3: NAB1-Protein nach Ni-NTA-Aufreinigung.

Die Sequenzierung des Expressionsvektors zeigte, dass zwei Nukleotide im Vergleich zum ursprünglichen Gen ausgetauscht waren. Diese Substitutionen hatten zur Folge, dass an Position 96 des ursprünglichen Proteins anstelle von Arginin ein Serin eingebaut wurde, was durch MALDI-ToF-Analysen des rekombinanten Proteins bestätigt wurde. Das exprimierte Protein wurde über die N-terminal angefügte Histidin-Markierung aufgereinigt und an die Firma SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) zur Herstellung von spezifischen Antikörpern geschickt.

3.2.7.7 NAB1-RNA-Bindestudien

In Zusammenarbeit mit I. Elles und PD Dr. J. Nickelsen (Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl für allgemeine und molekulare Botanik (Prof. Dr. U. Kück)) wurde das aufgereinigte, rekombinante NAB1-Protein zu RNA-Bindestudien verwendet. Hierfür wurde eine radioaktive RNA-Sonde vom Bereich der RNA-consensus-Bindedomäne (siehe Kapitel 3.2.7.5) synthetisiert. Nicht-radioaktive RNA wurde vom Bereich der RNA-consensus-Bindedomäne, vom 5'-UTR-Bereich und vom 3'-UTR-Bereich des Lhcbm6-Gens synthetisiert. Im Anschluss fanden Kompetitions-Studien statt. Hierfür wurde das NAB1-Protein entweder mit reiner radioaktiver RNA versetzt (Abb. 43, Bahn 2) oder mit Gemischen

aus radioaktiver RNA und dem 5fachen Überschuss der nicht-radioaktiven Lhcbm6-RNA-Bereiche (Abb. 43, Bahnen 3 - 5).

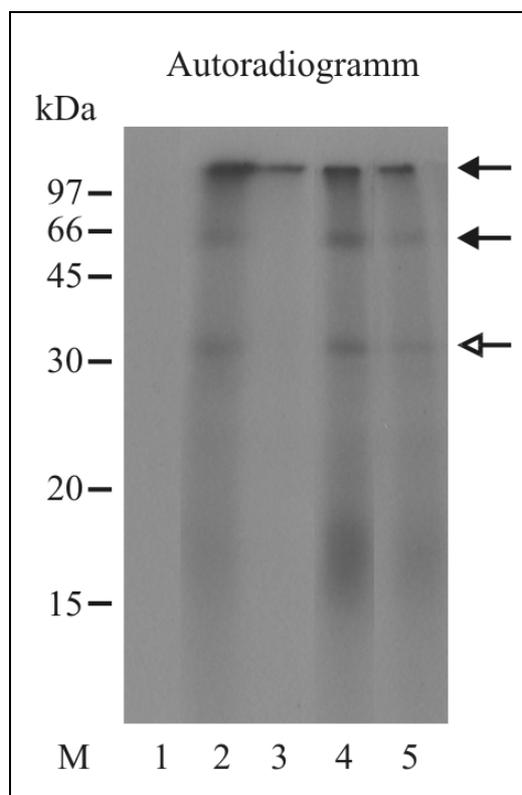


Abb. 43: Bindestudien von NAB1 mit verschiedenen Lhcbm6-RNA-Bereichen.

Bahn 1: Radioaktive RNA des RNA-consensus-Bindungsbereichs ohne NAB1,
 Bahn 2: NAB1 und radioaktive RNA des RNA-consensus-Bereichs,
 Bahn 3: Wie Bahn 2 + 5facher Überschuss von nicht-radioaktiver RNA des RNA-consensus-Bereichs,
 Bahn 4: Wie Bahn 2 + 5facher Überschuss von nicht-radioaktiver RNA des 5'-UTR-Bereichs,
 Bahn 5: Wie Bahn 2 + 5facher Überschuss von nicht-radioaktiver RNA des 3'-UTR-Bereichs, Pfeile: NAB1-RNA-Signale, M: Marker.

Die radioaktiven Signale bei ~33 kDa zeigten, dass NAB1 die RNA abgeleitet vom RNA-consensus-Bindungsbereich des Lhcbm6-Gens bindet und deshalb deutlich markiert wurde (Abb. 43, Bahnen 2, 4, 5, offener Pfeil). Durch vorherige Zugabe des 5fachen Überschusses von nicht-radioaktiver RNA desselben Bereiches wurde das Signal reprimiert (Abb. 43, Bahn 3, offener Pfeil). Durch Zugabe des 5fachen Überschusses von RNA des 5'- oder 3'-Bereichs von Lhcbm6 hingegen wurde das Signal nur geringfügig abgeschwächt (Abb. 43, Bahnen 4 und 5, offener Pfeil). Dies zeigte, dass die Bindung zwischen NAB1 und RNA-consensus-Bereich überwiegend spezifischer Natur war. Neben der Bande bei ~33 kDa konnten radioaktive Signale bei ~66 kDa und bei >100 kDa detektiert werden (Abb. 43, geschlossene Pfeile). Diese Signale weisen auf verschiedene Oligomerisierungszustände der NAB1-RNA-Komplexe hin, da sie zum einen beim vielfachen Molekulargewicht des monomeren Signals

auftraten und zum andern durch die Konkurrenz mit nicht-radioaktiver RNA in analoger Weise abgeschwächt wurden.

3.2.7.8 Expressionsanalysen des Proteins NAB1

Um Hinweise zur Lokalisation und Expression des NAB1-Proteins *in vivo* zu erhalten, wurden mit Hilfe des spezifischen NAB1-Antiserums Expressionsversuche unter verschiedenen äußeren Bedingungen durchgeführt.

3.2.7.8.1 Lokalisation von NAB1

Die Analyse der Aminosäure-Sequenz von NAB1 deutete darauf hin, dass NAB1 ein lösliches Protein ist. Dies wurde durch Zellfraktionierung und Antikörper-Analyse überprüft.

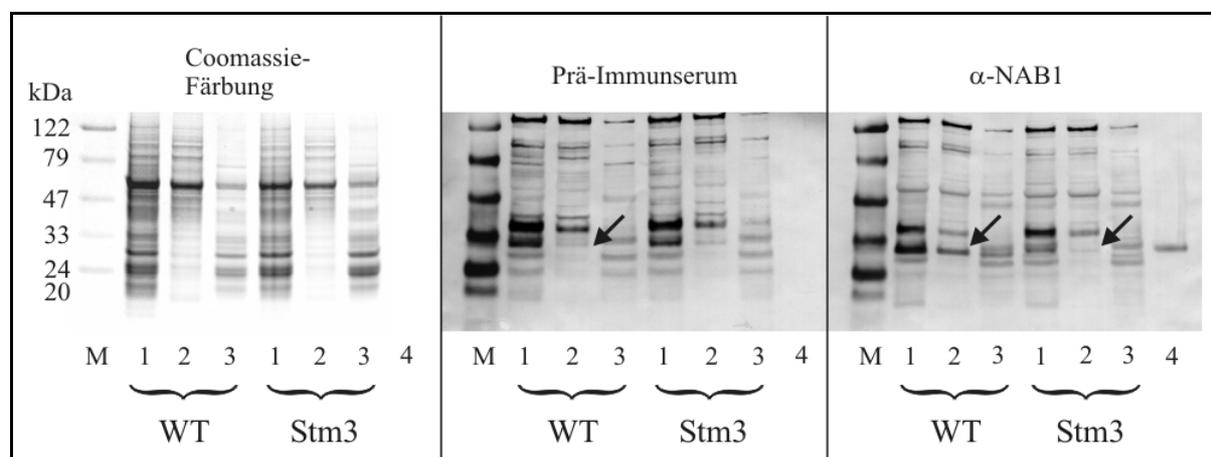


Abb. 44: Western-blot zur Lokalisation von NAB1.

Bahnen 1: Ganze Zellen, Bahnen 2: Lösliche Protein-Fractionen, Bahnen 3: Membran-Fractionen, Bahnen 4: Isoliertes NAB1-Protein, M: Marker.

Trotz zahlreicher unspezifischer Markierungen des NAB1-Antiserums (Abb. 44, Prä-Immunsersum) konnte das NAB1-Protein als Bestandteil der löslichen Protein-Fraction identifiziert werden, da die entsprechende Markierung bei ~ 26 kDa sowohl beim Prä-Immunsersum als auch bei der Mutante Stm3 fehlt (Abb. 44, Pfeile).

3.2.7.8.2 NAB1-Expression im Wachstumsverlauf

Als Kontrollexperiment wurden Zellen des WT im Dauerlicht angezogen und eine Wachstumskurve aufgenommen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben gleicher Zellmengen entnommen und die NAB1-Expression ermittelt. Es konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede im Verlauf des Zellwachstums nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die Expression des Proteins scheint daher nicht von der Wachstumsphase der Zellsuspension abhängig zu sein.

3.2.7.8.3 NAB1-Expression bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen

Auf Grund der identifizierten Kälteschock-Domäne in NAB1 sollte untersucht werden, ob das Protein unter Kälte-Einwirkung stärker exprimiert wird als bei Raumtemperatur.

WT-Zellen wurden angezogen, aufgeteilt und unter unterschiedlichen Temperaturbedingungen (4 °C, RT, 40 °C) inkubiert. Um die Ergebnisse nicht durch die Einwirkung des Lichts zu verfälschen, wurden alle Proben im Dunkeln gehalten. Proben gleicher Zellmenge wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Beobachtungszeitraum geerntet und der NAB1-Gehalt durch *Western-blots* ermittelt.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Expressionsverlauf beobachtet werden (nicht gezeigt). Daher ist zu folgern, dass die Protein-Expression trotz der vorhandenen Kälteschock-Domäne nicht durch Kälte induziert wird.

3.2.7.8.4 NAB1-Expression bei unterschiedlichen Lichtbedingungen

Zellen des WT wurden für 8 Tage im Dunkeln angezogen. Die Kultur wurde aufgeteilt, ein Teil wurde für weitere 24 Std. im Dunkel belassen, der andere Teil wurde für 24 Std. mit Weißlicht belichtet. Proben gleicher Zellmenge wurden entnommen und im *Western-blot* verglichen.

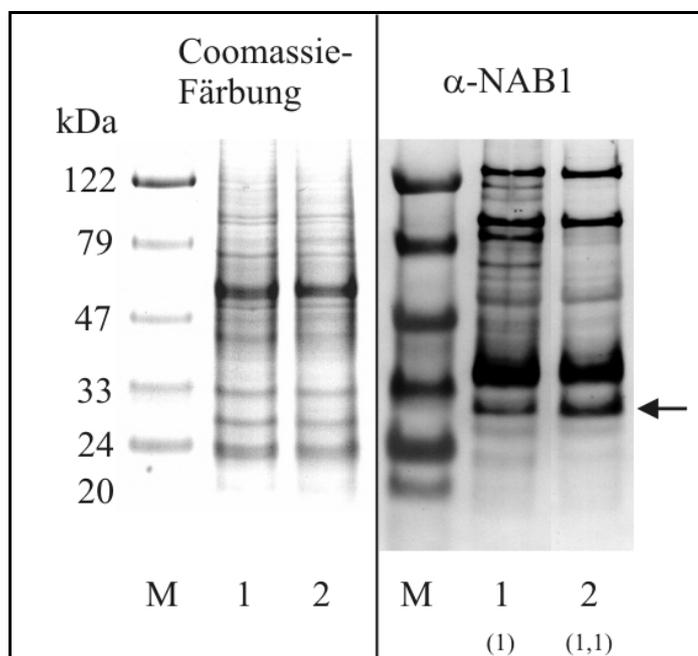


Abb. 45: NAB1-Expressionsvergleich im Dunkeln und im Licht.

Bahnen 1: Zellen nach Anzucht im Dunkeln, Bahnen 2: Zellen nach Belichtung für 24 Std. mit Weißlicht ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), Pfeil: NAB1-Antikörper-Reaktion, densitometrisch bestimmte, relative Bandenintensität ist eingeklammert. M: Marker.

Wie in Abb. 45 erkennbar, konnte eine leicht verstärkte NAB1-Expression in der belichteten Probe nachgewiesen werden (Abb. 45, Pfeil).

3.2.7.8.5 NAB1-Expression bei unterschiedlichen Lichtstärken

In weiteren *Western-blots* wurde überprüft, wie sich die Expression von NAB1 bei moderaten Starklichtbedingungen verhält. Dazu wurden die Proben im Licht bis zum Beginn der stationären Wachstumsphase angezogen und für 16 Std. im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden Proben bei RT für weitere 8 Std. entweder im Dunkeln gehalten, oder bei RT mit $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bzw. $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Weißlicht inkubiert. Gleiche Zellmengen wurden geerntet und erneut der NAB1-Gehalt ermittelt.

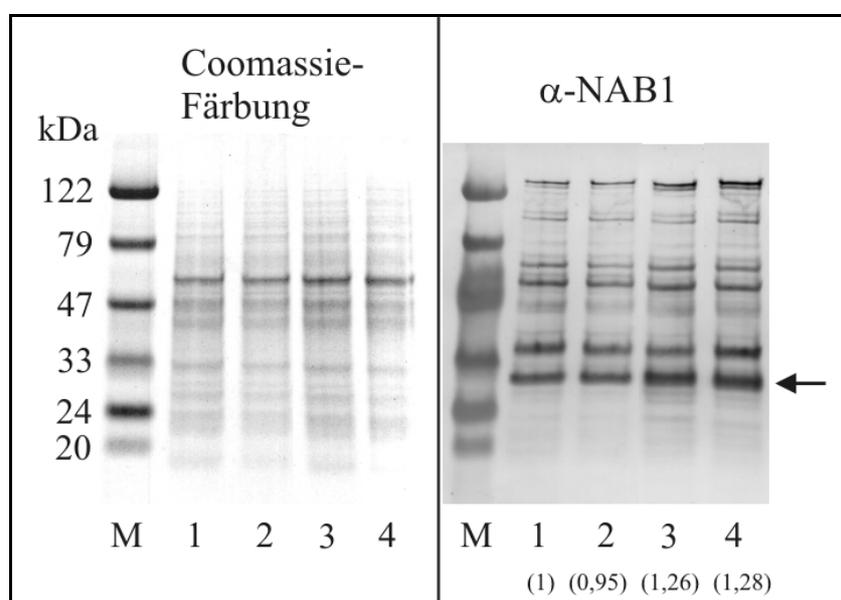


Abb. 46: NAB1-Expression bei unterschiedlichen Lichtintensitäten.

Bahnen 1: Zeitpunkt T_0 , Bahnen 2: 8 Std. Inkubation im Dunkeln, Bahnen 3: 8 Std. bei $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Weißlicht, Bahnen 4: 8 Std. bei $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Weißlicht, Pfeil: NAB1-Antikörper-Reaktion, densitometrisch bestimmte, relative Bandenintensität ist eingeklammert. M: Marker.

Aus Abb. 46 geht hervor, dass das NAB1-Protein bei stärkerer Lichteinstrahlung verstärkt exprimiert wurde (Abb. 46, Pfeil).

3.2.7.8.6 Expression von NAB1 in verschiedenen *Chlamydomonas-reinhardtii*-Linien

Die *Chlamydomonas-reinhardtii*-Mutanten PsbE(-) (Morais et al. 1998), PsbH(-) (O'Connor et al. 1998) und CC1284-Fud7 (Bennoun et al. 1986) sind chloroplastidäre Mutanten des psbE-, psbH- bzw. psbA-Gens. Die Mutationen des psbA- oder psbE-Gens haben zur Folge, dass diese Mutanten kein Photosystem II assemblieren und daher keine Photosynthese mehr betreiben können. Die Mutation im psbH-Gen, dessen Funktion noch nicht zweifelsfrei

geklärt ist, erlaubt trotz des Fehlens dieser PSII-Untereinheit die Assemblierung der Photosysteme.

Um die Auswirkungen des Fehlens dieser Proteine auf die Expression von NAB1 zu untersuchen, wurden Zellen im Licht angezogen und in der frühen stationären Wachstumsphase geerntet. Die NAB1-Expression wurde im *Western-blot* analysiert.

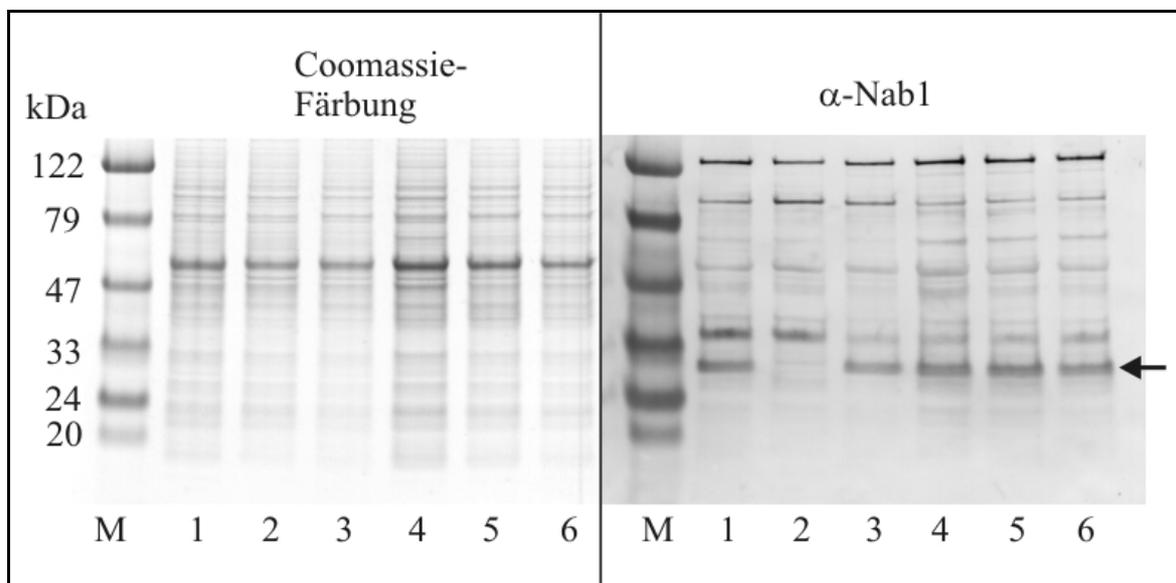


Abb. 47: *Western-blot*s zur NAB1-Expression in verschiedenen *C.-reinhardtii*-Mutanten.

Bahnen 1: WT (Cw10), Bahnen 2: Mutante *Stm3*, Bahnen 3: WT (WT13), Bahnen 4: Mutante *PsbE(-)*, Bahnen 5: Mutante *PsbH(-)*, Bahnen 6: Mutante *CC1284-Fud7*, Pfeil: NAB1-Antikörper-Reaktion, M: Marker.

Der zusätzlich zum WT Cw10 verwendete zweite WT (WT13) diente als weitere Positiv-Kontrolle und zeigte die erwartete NAB1-Antikörper-Reaktion (Abb. 47, Bahnen 3).

In allen getesteten Mutanten wurde das NAB1-Protein weiterhin exprimiert (Abb. 47). Dies galt sowohl für die Mutante *PsbH(-)*, welche noch PSII assembliert (Abb. 47, Bahnen 5), als auch für die Mutanten *PsbE(-)* und *CC1284-Fud7*, welche kein PSII mehr assemblieren und folglich völlig ohne Photosynthese auskommen (Abb. 47, Bahnen 4, 6). Dieses Experiment belegte, dass die Expression von NAB1 auch in Abwesenheit des photosynthetischen Elektronentransports stattfindet.

3.2.7.9 Post-translationale Modifikationen von NAB1

RNA-bindende Proteine werden in vielen Fällen post-translational modifiziert und auf diese Weise in ihrer Aktivität reguliert. Neben weiteren Modifikationen sind in diesem Zusammenhang Phosphorylierungen sowie einfache oder doppelte Arginin-Methylierungen beschrieben (siehe Kapitel 4.2.7). Da NAB1 ein Proteinmotiv enthält, welches potentiell einer regulativen Arginin-Methylierung unterliegen könnte (siehe Kapitel 3.2.7.3.3), sollte der

Zustand des NAB1-Proteins mit spezifischen Antikörpern auf mögliche Phosphorylierungen und Arginin-Methylierungen untersucht werden.

Der Ansatz machte es notwendig, das Protein aus dem löslichen Zellextrakt aufzureinigen, um andere modifizierte Proteine, wie beispielsweise phosphorylierte LHCII-Proteine, zu entfernen. Der theoretische isoelektrische Punkt des NAB1-Proteins liegt mit 9,47 relativ hoch und unterscheidet sich sehr deutlich vom isoelektrischen Punkt der stark phosphorylierten LHCII-Proteine. Aus diesem Grund wurde die Aufreinigung über eine fraktionierte, isoelektrische Fokussierung der löslichen Proteine ganzer Zellen durchgeführt (siehe Abb. 48).

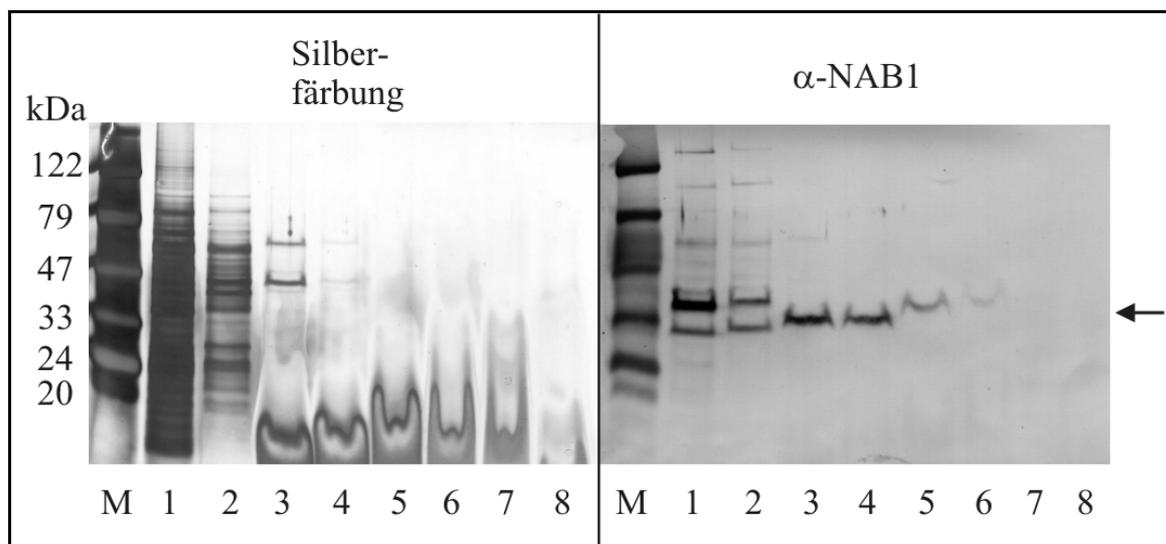


Abb. 48: Aufreinigung von nativem NAB1 durch isoelektrische Fokussierung der löslichen Proteine.

Anti-NAB1-Western-blots mit Proben verschiedener Proteinfractionen, Bahnen 1: Fraktion 1 mit pH = 4,2, Bahnen 2: Fraktion 2 mit pH = 8,9, Bahnen 3: Fraktion 5 mit pH = 9,75, Bahnen 4: Fraktion 8 mit pH = 10, Bahnen 5: Fraktion 11 mit pH = 10,3, Bahnen 6: Fraktion 14 mit pH = 10,9, Bahnen 7: Fraktion 17 mit pH = 11,7, Bahnen 8: Fraktion 20 mit pH = 12,8. Pfeil: NAB1-Antikörper-Reaktion, M: Marker.

In den Fraktionen mit pH 9,4 - pH 10,9 konnte das NAB1-Protein nachgewiesen werden, der maximale NAB1-Gehalt konnte für die Fraktion mit pH 9,95 ermittelt werden. Diese Probe wurde im Anschluss in *Western-blot*-Versuchen mit spezifischen Antikörpern eingesetzt, um das NAB1-Proteins auf das Vorhandensein von post-translationalen Modifikationen zu untersuchen.

Proben zweier unterschiedlicher Lichtbedingungen wurden verglichen, Probe eins wurde nach Dunkel-Inkubation und Probe zwei nach Belichtung mit Standard-Anzuchtlicht aufgearbeitet und untersucht (Abb. 49).

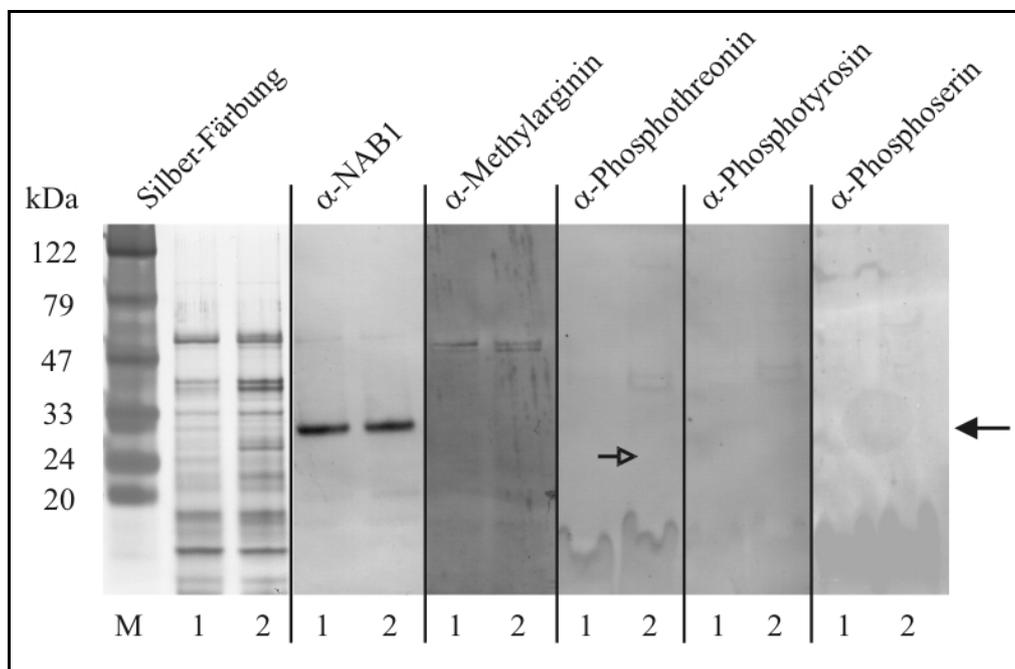


Abb. 49: Untersuchung auf post-translationale Modifikationen von NAB1 mit spezifischen Antikörpern.

Eingesetzt wurden isoelektrisch fokussierte, lösliche Proteine mit pH 9,95. Bahnen 1: Dunkel-Proben, Bahnen 2: Licht-Proben (Dunkel-Proben belichtet für 5,5 Std. mit $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Weißlicht), geschlossener Pfeil: Bereich von NAB1, offener Pfeil: Bereich der LHC-Proteine, M: Marker.

Die Proteinfraction mit pH 9,95 enthielt nach isoelektrischer Fokussierung noch immer eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine (Abb. 49, Silber-Färbung). Die partielle Aufreinigung war jedoch insoweit erfolgreich, als die LHC-Proteine, welche unter Belichtung an Threonin-Resten phosphoryliert werden, vollständig entfernt werden konnten (Abb. 49, α-Phosphothreonin, offener Pfeil).

Unter den untersuchten Versuchsbedingungen konnte weder eine Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Phosphorylierung noch eine Arginin-Methylierung von NAB1 nachgewiesen werden. Dies galt sowohl für die dunkel-inkubierten als auch für die im Licht inkubierten Proben (Abb. 49, geschlossener Pfeil).

4. DISKUSSION

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, das Verständnis von redox-regulierten Lichtanpassungsreaktionen photosynthetischer Organismen sowie deren Kontrollmechanismen zu erweitern. Dieses Ziel sollte durch Anwendung zweier unterschiedlicher Strategien erreicht werden. Die erste Strategie bestand darin, einen artifiziell synthetisierten, photoaffinitäts- und fluoreszenzmarkierten Kinase-Inhibitor zu konstruieren und im Anschluss seine Bindungseigenschaften zu charakterisieren. Mit Hilfe eines solchen, effektiven Markierungssystems sollte es zukünftig möglich werden, bisher unbekannte ATP-bindende Enzyme wie z.B. Proteinkinasen zu charakterisieren.

Die zweite Strategie bestand darin, durch phäno- und genotypische Charakterisierung einer Kern-Zufallsmutante der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* neue Erkenntnisse über Genprodukte zu erhalten, die in der kurzzeitigen Lichtanpassung photosynthetischer Organismen von Bedeutung sind.

Auf Grund der Unterschiedlichkeit beider Strategien werden sie im Folgenden unabhängig voneinander diskutiert.

4.1 STRATEGIE I: H9-DERIVATE ZUR SELEKTIVEN MARKIERUNG ATP-BINDENDER ENZYME

Den Ausgangspunkt zur Entwicklung der Strategie stellte die Frage dar, wie sich Serin-/Threonin-Kinasen, deren besondere Bedeutung in Lichtanpassungsreaktionen photosynthetischer Zellen gut dokumentiert ist (siehe Kapitel 1.2.4), selektiv und spezifisch in komplexen Proteingemischen identifizieren lassen.

Ein Spezifikum dieser Enzyme ist die reversible Bindung von Adenosinphosphaten. Mittels verschiedener Inhibitor-Verbindungen ist es möglich, die entsprechende Bindungsstelle im Enzym zu blockieren, weshalb sich derartige Stoffe prinzipiell auch zur selektiven Markierung eignen sollten. Um jedoch ein Auffinden des markierten Enzyms zu ermöglichen, muss der Inhibitor weitere Kriterien erfüllen. Zum einen muss es möglich sein, den Inhibitor kovalent an das Enzym zu koppeln, damit die Markierung auch nach anschließenden Experimenten wie z.B. denaturierender SDS-PAGE gebunden bleibt. Zum andern muss der Inhibitor eine Markierung tragen, welche sich leicht und eindeutig registrieren lässt.

Da kein bekannter natürlicher Stoff diese Eigenschaften aufwies, sollte er konstruiert und synthetisiert werden. Die entsprechenden Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. N. Sewald (Universität Bielefeld, Lehrstuhl für organische Chemie III) durchgeführt und sind ausführlich beschrieben in Hagenstein et al. (2003). Bestandteil der vorliegenden Arbeit waren biochemische Untersuchungen zu den Bindungseigenschaften der synthetisierten Inhibitor-Derivate.

4.1.1 Theoretische Überlegungen und Hintergründe

Der Kinase-Inhibitor H9 gehört zu der Klasse der Isochinolinsulfonamide (siehe Kapitel 1.2.4.1, Hidaka et al. 1984), deren Potential zur Bindung und Inhibition von Kinasen sowie deren Struktur ausführlich dokumentiert sind (Inagaki et al. 1985, Ono-Saito et al. 1999). Insbesondere die Tatsache, dass eine Inhibition der Phosphorylierung von LHCII-Proteinen durch H9 bekannt war (Ishak et al. 1991), machte diesen Stoff zur geeigneten Ausgangsverbindung für die Umsetzung der Strategie. Darüber hinaus existierten Kristallstruktur-Analysen von Kinase-Inhibitor-Komplexen mit H8, einem sehr engen Verwandten von H9 (Engh et al. 1996). Diese Informationen ermöglichten, ausgehend von H9, die maßgeschneiderte Konstruktion des Derivates H9-LPF. Die Synthese von H9-LPF erfolgte durch Kopplung eines polaren Verbindungsstücks (L), einer photoreaktive Gruppe (4-Benzoylphenylalanin, (P)) sowie der fluoreszierenden Gruppe (5-(6-) Carboxyfluorescein, (F)) an den Inhibitor H9 (Abb. 50, Hagenstein et al. 2003). Die photoreaktive Gruppe besitzt die Eigenschaften, durch UV-Strahlung in Anregungs-Relaxations-Zyklen aktivierbar zu sein und im Triplett-Zustand bevorzugt in C-H-Bindungen zu inserieren, welche bis zu 3,1 Å vom Carbonylsauerstoff entfernt sein können. Nur wenn sich also die photoreaktive Gruppe in Folge der Bindung des H9-Anteils von H9-LPF in die Bindungstasche des Enzyms in unmittelbarer räumlicher Nähe zum Protein befindet, sollte eine kovalente Kopplung erfolgen können. Durch den Carboxyfluorescein-Anteil kann dann eine Fluoreszenz-Detektion der markierten Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgen.

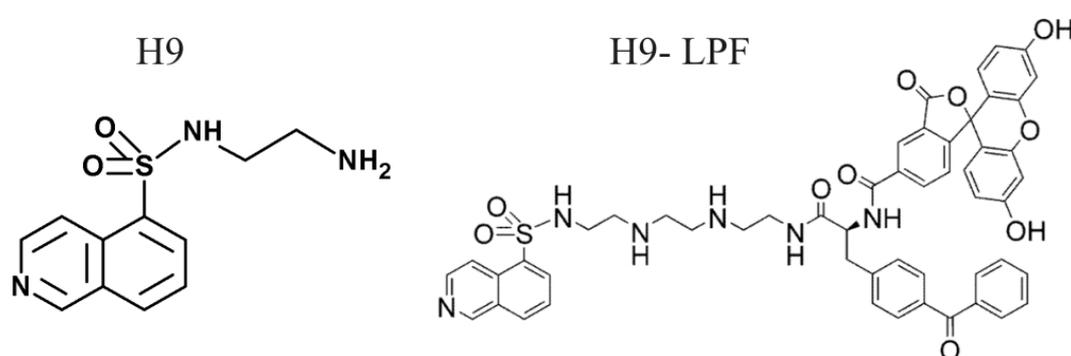


Abb. 50: Strukturvergleich von H9 und Derivat H9-LPF.

Nach der Synthese dieses H9-Derivats sollten die Bindungseigenschaften des Stoffes und insbesondere die Spezifität einer möglichen Markierung untersucht werden.

4.1.2 Bindungseigenschaften und Spezifität des Konstrukts H9-LPF

Nachdem in Vorversuchen optimale Versuchsbedingungen ermittelt worden waren (siehe Kapitel 2.3.7 und 3.1.1) konnte gezeigt werden, dass Kinasen durch H9-LPF prinzipiell markierbar sind (siehe Kapitel 3.1.2). Zudem deuteten erste Hinweise auf die Spezifität dieser Markierung hin, da nicht alle Kinasen in gleichem Maße markiert wurden. Darüber hinaus

wurde im Fall der cAMP-Proteinkinase-A nur die ATP-bindenden, katalytischen Untereinheiten, nicht jedoch die regulatorischen Untereinheiten markiert (siehe Kapitel 3.1.2). Da die Frage der Spezifität von entscheidender Wichtigkeit für die Anwendbarkeit des Konstruktes H9-LPF im Sinne der entwickelten Versuchsstrategie war, wurden weiterführende Spezifitätsversuche angeschlossen. Auf Grund der starken und reproduzierbaren Markierung wurde hierfür exemplarisch das Enzym Kreatinkinase ausgewählt.

Durch Denaturierungsversuche mit SDS konnte festgestellt werden, dass sich eine kovalente Bindung von H9-LPF mit der Kinase nur dann nachweisen ließ, wenn die Kinase vor der Inkubation mit H9-LPF nicht denaturiert vorlag (siehe Kapitel 3.1.3.1). Dies deutete darauf hin, dass die Voraussetzung zur kovalenten Verknüpfung nur dann bestand, wenn die ATP-Bindungstasche intakt war und somit spezifisch von H9-LPF okkupiert werden konnte. In einem weiteren Experiment wurde untersucht, in wieweit auch Teilkonstrukte von H9-LPF, welchen entweder die H9-Gruppe fehlte (LPF) oder H9 samt Linker und photoreaktiver Gruppe nicht vorhanden waren (F), zur unspezifischen Bindung in der Lage waren.

Die in Kapitel 3.1.3.2 gezeigten Resultate demonstrierten, dass die Markierung der Kinase mit Abstand am stärksten war, wenn das komplette H9-LPF-Konstrukt eingesetzt worden war. Allerdings konnte insbesondere bei der Verwendung von LPF ebenfalls eine Markierung registriert werden. Diese unspezifische Markierung betrug ~24% vom H9-LPF-Niveau. Aus diesem Experiment muss gefolgert werden, dass es bei der Verwendung von H9-LPF auch zu unspezifischen Hintergrundmarkierungen kommen kann, wenn komplexe Proteingemische untersucht werden sollen. Diese Eigenschaft impliziert die Konsequenz, dass das selektive Auffinden von ATP-bindenden Enzymen in Proteingemischen erschwert ist und auch andere Proteine unspezifisch isoliert werden könnten. Da jedoch die spezifische Markierung deutlich stärker war, erschien die spezifische Identifikation von ATP-bindenden Enzymen mit Hilfe von H9-LPF prinzipiell möglich zu sein. Daher sollte unter kontrollierten Bedingungen versucht werden, ob sich eine künstlich applizierte Kinase im komplexen Proteingemisch der *Chlamydomonas*-Thylakoide eindeutig wieder finden ließ.

4.1.3 Die Eignung von H9-LPF zur selektiven Identifikation von ATP-Bindeproteinen in komplexen Proteingemischen

Isolierte *Chlamydomonas-reinhardtii*-Thylakoid-Präparationen wurden mit Kreatinkinase versetzt (siehe Kapitel 3.1.4). Es konnte gezeigt werden, dass nach der Markierungsprozedur die Kinase eindeutig im Fluoreszenz-Bild wieder zu finden war. Darüber hinaus wurden weitere positiv markierte Banden identifiziert. Die Frage, ob es sich hierbei um spezifisch markierte, ATP-bindende Proteine handelte, konnte nicht beantwortet werden, da für *C. reinhardtii* zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch nicht die Möglichkeit bestand, die Fragment-Massen der MALDI-ToF-Untersuchungen mit Genom- bzw. Proteom-Daten abzugleichen. Die zugegebene Kreatinkinase konnte hingegen nach tryptischem Verdau und

MALDI-ToF-Analyse auf Grund der bekannten Aminosäure-Sequenz eindeutig zugeordnet werden (siehe Kapitel 3.1.4).

Dieses Ergebnis zeigte, dass es prinzipiell möglich ist, H9-LPF-markierte Enzyme durch MALDI-ToF Untersuchungen eindeutig zu identifizieren. Darüber hinaus kann die erfolgreiche MALDI-ToF-Analyse auch als weiterer Hinweis auf die Spezifität der Markierung gewertet werden. Die kovalente Bindung von H9-LPF an die Aminosäure-Kette der Kinase musste eine Änderung der Masse des betroffenen Fragments zur Folge haben. Wären also viele oder alle Fragmente der Kreatinkinase durch eine unspezifische, kovalente Bindung mit H9-LPF betroffen, so hätten die erhaltenen Fragmente nicht mehr dem Fragmentmuster der nativen Kreatinkinase entsprochen und eine Identifikation wäre folglich nicht möglich gewesen. Als weiteres Indiz für die Spezifität der Bindung ist die Tatsache zu werten, dass die LHC-Proteine, welche in sehr großer Menge in Thylakoiden vertreten sind, durch H9-LPF nicht markiert wurden (siehe Kapitel 3.1.4).

4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse von Strategie I und Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit dem artifiziell synthetisierten Kinase-Inhibitor-Konstrukt H9-LPF zeigten, dass es sich zur selektiven und spezifischen Markierung von ATP-bindenden Enzymen wie Kinasen in komplexen Proteingemischen eignete. Dies steht in Einklang mit weiteren biochemischen und biophysikalischen Experimenten, die im Rahmen der Kooperation mit diesem Konstrukt durchgeführt wurden (Hagenstein et al. 2003). Fortschritte in Analyse und Annotation der kürzlich veröffentlichten Genomsequenz von *C. reinhardtii* (<http://genome.jgi-psf.org/chlre1/chlre1.home.html>) sowie die Anwendung der Methode auf Organelle besser untersuchter Organismen wie *Arabidopsis thaliana* sollten es daher möglich machen, ATP-bindende Enzyme spezifisch zu detektieren und so eine funktionelle Zuordnung zu ermöglichen.

4.2 STRATEGIE II: ANALYSE VON NUKLEÄREN ZUFALLS-DNA-INSERTIONSMUTANTEN

Diese Strategie sah vor, Zufallsmutanten des Kerngenoms von *Chlamydomonas reinhardtii* herzustellen, phänotypisch zu selektieren und im Anschluss eingehend zu untersuchen. In Vorarbeiten wurde durch Fluoreszenz-Selektion (Kruse et al. 1999) aus $3 \cdot 10^4$ Transformanten eine Kollektion von Mutanten mit potentiellen Defekten in *LHC-state-transitions* erstellt. Eine dieser Mutanten, Stm3, sollte in der vorliegenden Arbeit eingehend studiert werden. Zunächst sollte der mutierte Locus identifiziert und durch Analyse des mutierten Genombereichs das betroffene Gen (oder die betroffenen Gene) identifiziert und charakterisiert werden. Da die Mutanten auf Grund abweichenden Verhaltens in der kurzzeitigen Lichtanpassung selektiert worden waren, sollte das Fehlen des Gens in der Mutante im Zusammenhang mit weiteren, detaillierten Untersuchungen der phänotypischen

Ausprägung Rückschlüsse auf regulatorische Prinzipien der photosynthetischen Abläufe ermöglichen.

4.2.1 Das Konzept der Analyse von Zufallsmutanten in der Photosyntheseforschung: Die Mutante Stm3

Die Untersuchung von Zufallsmutanten stellt eine etablierte und häufig angewandte Methode dar, um unbekannte Genprodukte und deren Zusammenspiel in physiologischen Prozessen zu analysieren (Ebersold 1967, Luck 1984, Kindle 1990, Wollman 1999, Kruse et al. 1999, Fleischmann et al. 1999, Schönfeld et al. 2004). Im Gegensatz zur gezielten Mutation einzelner Gene besteht hier auch die Möglichkeit, unbekannte Gene zu identifizieren. Da die Zufallsmutanten nach definierten Phänotypen selektiert werden, können auf diese Weise Genprodukte identifiziert werden, deren Mitwirken an bestimmten zellulären Abläufen zuvor nicht erwartet wurde. Auf diese Weise können Einsichten in bislang unbekannte physiologische Zusammenhänge ermöglicht werden (Schönfeld et al. 2004).

In dieser Arbeit sollte die *C.-reinhardtii*-Mutante Stm3 untersucht werden, eine nukleäre Zufalls-DNA-Insertionsmutante, hergestellt durch Transformation eines Resistenz-Plasmids in das Kerngenom einer Zelle vom WT Cw10. In Zusammenarbeit mit Dr. P. J. Nixon (Imperial College London, U.K.) und Dr. C. W. Mullineaux (University College London, U.K.) wurde Stm3 durch Anwendung einer gezielten Suchstrategie nach Mutanten mit Defekten in kurzzeitigen Lichtanpassungsreaktionen (Kruse et al. 1999) gefunden und isoliert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Mutante mit molekulargenetischen, biochemischen und biophysikalischen Methoden eingehend untersucht werden.

4.2.2 Die Bedeutung der Anzahl genetisch mutierter Loci für eine erfolgreiche Charakterisierung von Zufallsmutanten

Bei der zur Transformation verwendeten Methode ist es möglich, dass das Transformations-Plasmid in mehreren Kopien unabhängig in das Kerngenom inseriert (Kindle et al. 1990). Da eine Mehrfach-Insertion des Plasmids die Schädigung von verschiedenen Loci zur Folge hat, ist in diesem Fall die weitere Analyse der Mutante außerordentlich erschwert. Insbesondere die Zuordnung der phänotypischen Ausprägung der Mutante zu einem dieser Loci kann sich als nahezu unmöglich darstellen. Daher wurde zunächst untersucht, wie häufig das Plasmid in das Kerngenom der Mutante Stm3 inseriert worden war. *Southern*-Hybridisierungsexperimente erwiesen, dass das Plasmid nur in einer Kopie transformiert worden war (siehe Kapitel 3.2.7.1). Segregationsexperimente zeigten, dass Genotyp und Phänotyp der Mutante zusammen vererbt wurden (siehe Kapitel 3.2.7.1) und dass der Phänotyp der Mutante daher vermutlich auf diese Mutation und nicht auf eine gleichzeitig zufällig aufgetretene, zweite Mutation zurückzuführen war. In weiteren molekulargenetischen Untersuchungen sollte der betroffene Bereich der Mutante identifiziert und analysiert werden.

4.2.3 Der Weg zur Identifikation des Gens Nab1

In Vorarbeiten war die Methode der LMS-PCR zur Analyse nukleärer Zufalls-DNA-Insertionsmutanten von *C. reinhardtii* in der Arbeitsgruppe von PD Dr. O. Kruse etabliert worden (Strauss et al. 2001). Durch Anwendung dieser Methode (siehe Kapitel 3.2.7.2) konnte der Ort der Mutation in Stm3 identifiziert werden. Wie sich in späteren Analysen zeigte, hatte das Transformations-Plasmid die bakterielle Ampicillin-Resistenzkassette im Zuge der Transformation verloren. Daher mussten Versuche zur Ermittlung des mutierten Locus mit der Methode des *Plasmid-rescue* erfolglos bleiben (nicht gezeigt).

Als Ergebnis der LMS-PCR-Untersuchungen konnte ein genomischer Bereich sequenziert werden, welcher unmittelbar 3' des inserierten Plasmids lokalisiert ist. Zu diesem Zeitpunkt war das Kerngenom von *C. reinhardtii* noch nicht sequenziert und die erhaltenen Sequenzdaten reichten nicht aus, um die in Stm3 mutierten Bereiche definierten Genen zuzuordnen zu können. Daher wurde eine genomische Phagenbank, welche Abschnitte des Kerngenoms von *C. reinhardtii* enthielt, nach diesem flankierenden Bereich durchsucht. Ein Phage konnte isoliert und sequenziert werden (siehe Kapitel 3.2.7.3.1 und 3.2.7.3.2). Durch Abgleich der erhaltenen DNA-Sequenzen mit den bereits veröffentlichten EST-Sequenzen des Organismus war es möglich, ein Gen zu identifizieren, welches durch die Mutation in Stm3 geschädigt worden war (siehe Kapitel 3.2.7.3.3). Das komplette, zu diesem Zeitpunkt nicht veröffentlichte Gen, wurde Nab1 genannt und in GenBank unter der Nummer AY157846 veröffentlicht. Das NAB1-Protein wurde in *E. coli* exprimiert (siehe Kapitel 3.2.7.6) und zur Herstellung von spezifischen Antikörpern verwendet. Mit Hilfe dieser Antikörper konnte gezeigt werden, dass die Mutante Stm3 kein NAB1-Protein mehr exprimiert und demnach eine NAB1-Nullmutante darstellt. Die Komplementierung führte zur Aufhebung aller untersuchten phänotypischen Ausprägungen der Mutante (siehe Kapitel 3.2.7.4).

4.2.4 Spezifische Eigenschaften des nukleinsäurebindenden Proteins NAB1

Die Analyse der Aminosäure-Sequenz enthüllte einige besondere Merkmale des NAB1-Proteins. Es besteht aus 247 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 26,54 kDa, der isoelektrische Punkt liegt mit pH 9,47 relativ hoch. Der hydrophile Charakter zeichnet NAB1 als lösliches Protein aus, was durch Fraktionierungsexperimente nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 3.2.7.8.1). In der Aminosäure-Abfolge konnten zwei Domänen identifiziert werden, welche NAB1 als Nukleinsäure-Bindeprotein kennzeichnen. N-terminal wurde ein CSD- (*Cold Shock Domain*)-Motiv (siehe Kapitel 4.2.5) lokalisiert und C-terminal konnte eine RRM- (*RNA Recognition Motif*)-Domäne (siehe Kapitel 4.2.5) gefunden werden.

NAB1 scheint in zweierlei Hinsicht einmalig zu sein. Auf Grund von Datenbank-Recherchen ist aller Wahrscheinlichkeit nach davon auszugehen, dass NAB1 das einzige Protein in *C. reinhardtii* darstellt, welches das in vielen Spezies hochgradig konservierte CSD-Motiv besitzt (siehe Kapitel 3.2.7.3.3). Darüber hinaus ist bislang noch kein zweites Protein in den Datenbanken beschrieben, welches die Kombination von CSD- und RRM-Motiv aufweist. Gut möglich ist aber, dass zukünftig Genom-Sequenzierungen, insbesondere von

phylogenetisch nahe verwandten Organismen, zum Auffinden ähnlicher Proteine mit dieser Domänen-Struktur führen.

4.2.5 Proteine mit RNA-Bindedomänen: Strukturelle und funktionelle Analogien der modular organisierten Proteine NAB1 und FRGY2

Proteine mit CSD-Motiv oder RRM-Domäne sind weit verbreitet. Sie werden unabhängig voneinander und zum Teil in Kombination mit weiteren Domänen sowohl in RNA- als auch in DNA-bindenden Proteinen gefunden (Petracek et al. 1994, Ladomery & Sommerville 1995, Weighardt et al. 1996, Moss et al. 1997, Matsumoto & Wolffe 1998, Sommerville 1999). In Eukaryonten sind CSD-Motive Bestandteil der Klasse der Y-Box-Proteine (Matsumoto & Wolffe 1998), Cyanobakterien hingegen besitzen zwar Proteine mit RRM-Domänen, jedoch im Gegensatz zu anderen Prokaryonten keine CSD-Proteine.

Im Vergleich zum CSD-Motiv ist die RRM-Domäne weniger konserviert. Das Kennzeichen für eine RRM-Domäne ist das Vorhandensein der RNP-1- und RNP-2-Motive (Burd & Dreyfuss 1994), welche aus einem konservierten Oktamer (RNP-1) bzw. Hexamer (RNP-2) bestehen. Es wird angenommen, dass die aromatischen Aminosäure-Reste dieser Motive eine Rolle in der RNA-Interaktion der RRM-Domäne vermitteln (Manival et al. 2001).

CSD-Motive gehören zu den konserviertesten Aminosäure-Domänen überhaupt, welche mit Nukleinsäuren interagieren (Sommerville 1999, Karlson & Imai 2003). Auch sie beinhalten das RNP-1-Motiv (Landsman 1992). Ursprünglich wurde das CSD-Motiv in CSPA (*Cold Shock Protein A*) identifiziert, einem RNA-Chaperon von *E. coli*, welches unter Kälte-Stress verstärkt exprimiert wird (Jones et al. 1987, Goldstein et al. 1990, Schindelin et al. 1994, Newkirk et al. 1994, Jiang et al. 1997, Feng et al. 1998). Der abgeleitete Name CSD ist jedoch irreführend, da sich in späteren Untersuchungen an weiteren Spezies herauskristallisierte, dass eine Kälte-Induktion der Expression zwar für manche (Jiang et al. 1997, Karlson et al. 2002, Karlson & Imai 2003), jedoch bei weitem nicht für alle Proteine mit CSD-Motiv nachweisbar ist (Moss et al. 1997, Matsumoto & Wolffe 1998, Sommerville 1999). Auch die Funktion von CSD-Proteinen ist nicht auf Kälte-spezifische Reaktionen beschränkt, vielmehr können sie in unterschiedlichen zellulären Vorgängen wie beispielsweise Reifungsprozessen von Oocyten (Matsumoto et al. 1996) oder dem zeitlichen Ablauf der Larvenentwicklung (Moss et al. 1997) wichtige Rollen spielen.

Viele der CSD-Proteine tragen zusätzliche Domänen (Graumann & Marahiel 1996). Auch die modulare Kombination von CSD mit einer weiteren RNA-bindenden Domäne wie der S1-RNA-Bindedomäne ist nicht ungewöhnlich, wenngleich die Kombination von CSD und RRM in NAB1, wie bereits erwähnt, bisher nicht beschrieben ist (siehe Kapitel 4.2.4).

Durch EST-Analysen konnte das CSD-Motiv im Pflanzenreich in 19 Gattungen gefunden werden (Karlson & Imai 2003). Bislange sind hier jedoch erst zehn vollständige Proteine mit einem CSD-Motiv beschrieben, fünf davon in *A. thaliana* (AtGRP2, AtGRP2b, At2g17870, At4g36020, At4g38680), zwei in *Oryza sativa* (OSJNBA0026J14.15, P0582D05.12) und je eins in *Nicotiana glauca* (GRP2), *Triticum aestivum* (WCSP1) und *Chlamydomonas*

reinhardtii (NAB1). Über die Funktionsweisen dieser Proteine existierten bislang wenig Erkenntnisse, lediglich ein Anstieg oder Abfall der Expression unter Kälte-Stress konnte in den CSD-Proteinen von *T. aestivum* (Karlson et al. 2002) und *A. thaliana* (Karlson & Imai 2003) beobachtet werden. Auf welche Weise die Proteine mit Nukleinsäuren interagieren, wurde bislang nicht untersucht.

Ein genauer untersuchtes CSD-Protein, welches große strukturelle Ähnlichkeit zu NAB1 aufweist, ist das FRGY2-Protein (siehe Kapitel 3.2.7.5) von *Xenopus laevis*, dem Krallenfrosch. Es enthält, wie auch NAB1, neben dem CSD-Motiv eine weitere, unspezifischere RNA-Bindeaktivität am C-Terminus. Die Funktion von FRGY2 besteht darin, in *Xenopus*-Oocyten maternale mRNAs zu maskieren und so die Expression durch Sequestrierung zu kontrollieren (Sommerville 1999). Untersuchungen dieses Vorgangs legten nahe, dass der CSD-Bereich für die spezifische Bindung von Protein und mRNA zuständig ist (Matsumoto et al. 1996, Manival et al. 2001). Im Anschluss an die spezifische Bindung erfolgt die Anlagerung weiterer FRGY2-Proteine vermittelt durch die unspezifischere, C-terminale RNA-Bindungsaktivität. Detaillierte Analysen der Protein-RNA-Interaktion führten zur Identifikation einer RNA-consensus-Bindedomäne, an welche der CSD-Bereich von FRGY2 bevorzugt bindet (Manival et al. 2001).

Durch Homologie-Vergleiche konnte auf den cDNAs von Lhcbm2, Lhcbm6 und Lhcbm8 eine Region ermittelt werden, welche eine relativ hohe Ähnlichkeit zur RNA-consensus-Bindedomäne des FRGY2-Proteins aufwies. Diese mögliche spezifische Bindungsstelle für NAB1 liegt nicht im 5'- oder 3'-untranslatierten Bereich, sondern direkt auf den proteincodierenden Abschnitten der Gene, welche alle für Isoformen der Haupt-LHCII-Proteine codieren (siehe Kapitel 3.2.7.5).

Durch RNA-Binde- und Kompetitions-Studien, die in Kooperation mit I. Elles und PD Dr. J. Nickelsen (Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl für allgemeine und molekulare Botanik) durchgeführt wurden, konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass rekombinantes NAB1-Protein (siehe Kapitel 3.2.7.6) den Bereich der RNA-consensus-Bindedomäne von Lhcbm6 spezifisch und mit hoher Affinität bindet (siehe Kapitel 3.2.7.7). Auf Grund der Homologie von NAB1 und FRGY2 sowie der starken, spezifischen Interaktion von NAB1 mit diesem Bereich, liegt die Vermutung nahe, dass NAB1 auch *in vivo* die mRNA des Lhcbm6-Gens bindet.

In funktioneller Analogie zum FRGY2-Protein kann darüber hinaus angenommen werden, dass im Anschluss an die CSD-abhängige, spezifische Bindung der mRNA eine eher unspezifische, RRM-abhängige Anlagerung weiterer NAB1-Proteine erfolgt. Durch die Abschirmung der mRNA sollte eine effektive Translation verhindert sein. Als Anhaltspunkt für die Richtigkeit dieser Annahme kann gewertet werden, dass NAB1 in den durchgeführten RNA-Bindestudien nicht nur als Monomer an Lhcbm6 band, sondern offenbar auch oligomere RNA-Protein-Komplexe bildete (siehe Kapitel 3.2.7.7).

Im Bereich der RNA-consensus-Bindedomäne weisen die verschiedenen mRNAs der Lhcbm-Isoformen eine relativ große Ähnlichkeit auf. Daher ist es möglich, dass NAB1 neben der experimentell nachgewiesenen Bindung an Lhcbm6-mRNA auch weitere der Lhcbm-mRNAs

binden könnte. Die größten Übereinstimmungen von RNA-consensus-Bindedomäne und Lhcbm-mRNA wurden für die Untereinheiten Lhcbm2, Lhcbm6 und Lhcbm8 ermittelt. Bei den restlichen Lhcbm-Isoformen wichen ein bis zwei weitere Nukleotide von der RNA-consensus-Bindedomäne ab (siehe Kapitel 3.2.7.5). Daher ist es denkbar, dass die Bindungsaffinität von NAB1 für die verschiedenen LHCII-Isoformen unterschiedlich stark ausfällt.

Die Frage, ob NAB1 exklusiv an mRNAs von LHCII-Proteinen bindet, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht mit Sicherheit beantworten. Die RNA-consensus-Bindesequenz, welche für FRGY2 ermittelt wurde und die auch für NAB1 eine gewisse Gültigkeit besitzt, ist mit 13 Nukleotiden nur recht kurz. Erschwerend kommt hinzu, dass sie gewissen Variabilitäten unterliegt (Manival et al. 2001) und noch dazu von einem phylogenetisch weit entfernten Organismus stammt. Daher ist es nicht möglich, sie zum Ausgangspunkt von Datenbank-Analysen in *C. reinhardtii* zu machen. Es ist folglich nicht auszuschließen, dass NAB1 mit mRNAs weiterer Proteine interagiert und deren Expression beeinflusst.

4.2.6 Physiologische Konsequenzen eines Defektes von NAB1 für die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*

Biochemische und biophysikalische Untersuchungen zeigten, dass Chlorophyll-Gehalt und -Zusammensetzung in Stm3 verändert sind. Für die Mutante wurde ein deutlich höherer Chlorophyll-Gehalt pro Zelle und ein geringeres Chl-a/b-Verhältnis im Vergleich zum WT festgestellt (siehe Kapitel 3.2.4). LHC-Proteine binden als einzige Proteine in *C. reinhardtii* Chl-a und Chl-b, wohingegen die weiteren chlorophyllbindenden Proteine nur Chlorophylle des a-Typs gebunden haben. Die Haupt-LHCII-Proteine von *C. reinhardtii* (wie LHCBM2, 6 und 8) binden Chl-a und Chl-b im Verhältnis 7/5 (=1,4).

Da Chlorophylle vermutlich auf Grund des hohen Risikos der Bildung von Singulett-Sauerstoff nicht ungebunden vorkommen (Paulsen 1997), weist eine Erniedrigung des Chlorophyll-a/b-Verhältnisses bei gleichzeitigem Anstieg der Gesamt-Chlorophyll-Menge eindeutig auf eine verstärkte Expression von LHCII-Proteinen hin. Neben den direkten Chlorophyll-Messungen konnte die veränderte LHC-Zusammensetzung in der Mutante anhand verschiedener Parameter auch indirekt festgemacht werden.

Im Gegensatz zu Messungen der Chlorophyll-Fluoreszenz bei RT kann bei 77 K die Fluoreszenz von LHCII-PSII-Komplexen und jene der LHC-PSI-Komplexe aufgelöst werden. Durch Messungen der Fluoreszenz bei 77 K konnte sowohl unter *LHC-state-1*- als auch unter *LHC-state-2*-Bedingungen in der Mutante ein relativer Anstieg der Menge von LHCII-PSII-Komplexen im Vergleich zur Menge von LHC-PSI-Komplexen festgestellt werden (siehe Kapitel 3.2.2.2). Auch diese Messungen deuteten also auf die verstärkte Expression von LHCII-Molekülen hin, welche zudem funktionell mit PSII-Komplexen verbunden sind.

Die Annahme, dass die PSII-Komplexe in der Mutante verstärkt mit Anregungsenergie durch LHCII-Proteine versorgt werden, konnte zudem durch vergleichende Messungen der RT-Chlorophyll-Fluoreszenz erhärtet werden. Im Anschluss an den typischen, raschen Anstieg

der Fluoreszenz (Kautsky-Induktion) stieg die Fluoreszenz in der Mutante unter Belichtung deutlich höher an, als dies im WT der Fall war (siehe Kapitel 3.2.2.1.1 und 3.2.2.1.4). Dieser Anstieg kann darauf zurückzuführen sein, dass die in der Mutante zusätzlich aufgenommene Lichtenergie nicht durch die photosynthetische Elektronentransportkette abgeleitet werden kann und somit in Form der konkurrierenden Chlorophyll-Fluoreszenz abgegeben wurde. Dieser Effekt wurde durch Messung der Quantenausbeute von PSII (Φ_{PSII}) quantifiziert (siehe Kapitel 3.2.2.1.3).

Daneben kann die erhöhte Fluoreszenz bei RT auch auf eine Einschränkung der *LHC-state-transitions* zurückzuführen sein. Die Ergebnisse der Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen bei 77 K belegen zwar, dass die Veränderung der LHCII-Zusammensetzung in Stm3 die Fähigkeit zu *LHC-state-transitions* nicht prinzipiell verhindert (siehe Kapitel 3.2.2.2). Diese Messungen stellen jedoch nur Momentaufnahmen dar und erlauben keine Aussage über die Geschwindigkeit, mit der *LHC-state-transitions* in der Mutante ablaufen. Die bei RT erhöhte Fluoreszenz kann daher als Hinweis darauf gewertet werden, dass die Geschwindigkeit der *LHC-state-transitions* in der Mutante erniedrigt ist. Eine verlangsamt ablaufende Wanderung der LHCII-Proteine stellt sich auch im Hinblick auf die veränderte Ultrastruktur der Thylakoide (siehe Kapitel 3.2.6) als durchaus wahrscheinlich dar. So weist die Mutante im Vergleich zum WT deutlich stärker ausgeprägte Grana-Stapelungen auf. Da die Ausprägung von Grana-Bereichen in Korrelation zu der Menge von LHCII-Proteinen steht (Yang et al. 2001), liegt es nahe zu vermuten, dass die veränderte Ultrastruktur der Mutante ebenfalls in direktem Zusammenhang mit der veränderten LHCII-Zusammensetzung steht.

Durch Kombination von 1D- und 2D-SDS-PAGE mit MALDI-ToF-Analysen, welche zum Teil in Zusammenarbeit mit A. Fink und Dr. M. Hippler (Universität Jena, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie) durchgeführt wurden, konnte die Expression einzelner LHCII-Isoformen näher untersucht werden (siehe Kapitel 3.2.5.3 und 3.2.5.4). Es wurde festgestellt, dass die Expression des LHCBM2- und/oder LHCBM8-Proteins sowie der LHCBM6-Isoform in der Mutante Stm3 deutlich erhöht war (siehe Kapitel 3.2.5.3 und 3.2.5.4).

Das Fehlen des NAB1-Proteins in Stm3, für das die spezifische Bindung an Lhcbm6-mRNA *in vitro* nachgewiesen worden war (siehe Kapitel 3.2.7.7), hat also die verstärkte Expression dieser LHCII-Isoformen zur Folge. Im Umkehrschluss kann daher gefolgert werden, dass NAB1 im WT in aktiver Form durch Bindung und Sequestrierung von Lhcbm6- und vermutlich ebenso Lhcbm2/8-mRNAs die Expression der entsprechenden Isoformen kontrolliert. Gestützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass gerade diese drei Lhcbm-Isoformen mit der RNA-consensus-Bindedomäne von FRGY2 die größte Homologie aufwiesen (siehe Kapitel 3.2.7.5). Für dieses *Xenopus*-Protein konnte nachgewiesen werden, dass es maternale mRNAs bindet und sequestriert und so zur Maskierung derselben führt (siehe Kapitel 4.2.5).

Das Modell zur NAB1-Funktion steht in Einklang mit den anfangs diskutierten Ergebnissen von Chlorophyll- und Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen, welche für eine gestiegene Expression von LHCII-Proteinen sprechen. Besondere Beachtung verdient die Tatsache, dass LHCBM6 in *C. reinhardtii* ein Bestandteil der trimeren LHCII-Komplexe ist (mündliche

Informationen von Dr. P. J. Nixon (Imperial College London) und PD Dr. L. Eichacker (LMU München)). Da die Zusammensetzung der trimeren LHCII-Komplexe wichtig für funktionelle *LHC-state-transitions* ist, deutet auch die veränderte LHCII-Zusammensetzung in *Stm3* auf einen eingeschränkten Ablauf dieses kurzzeitigen Akklimatisationsprozesses in der Mutante hin.

Das Phosphorylierungsmuster der Thylakoid-Proteine erschien trotz der veränderten LHCII-Expression in der Mutante unverändert zu sein (siehe Kapitel 3.2.5.1 und 3.2.5.2). Der Grund dafür, dass die LHC-Bandenstärke in Abb. 26 und Abb. 27 zwischen WT und *Stm3* vergleichbar intensiv war liegt in der Methodik begründet. Um die relative Phosphorylierung der verschiedenen Proteinbanden zwischen WT und Mutante vergleichen zu können, wurden die Proben für die *Western-blot*s auf einen gleichen Chlorophyll-Gehalt normiert, was zu einer Nivellierung der aufgetragenen LHCII-Menge im Gel und folglich der Banden-Intensität führen musste. Somit konnte gezeigt werden, dass die veränderte NAB1- und LHCII-Expression die Aktivität der Thylakoid-Kinasen nicht wesentlich beeinflusst.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien zum Wachstumsverhalten von *Stm3* zeigten keine signifikanten Unterschiede zum WT (siehe Kapitel 3.2.3). Die erhöhte Expression von LHCII-Proteinen führte unter den gewählten Versuchsbedingungen offenbar nicht zu einem positiven oder negativen Effekt auf die Wachstumsgeschwindigkeit. Auch in Versuchen zur Starklicht-Sensitivität konnten bislang keine Unterschiede zum WT ermittelt werden (nicht gezeigt). Allerdings konnten in parallel durchgeführten Versuchen zum Reparatur-Zyklus des D1-Proteins in der Arbeitsgruppe von Dr. P. J. Nixon und PD Dr. O. Kruse Hinweise erhalten werden, dass Starklicht in der Mutante, im Vergleich zum WT, schwerwiegendere Schädigungen auslöste (mündliche Informationen von Dr. P. J. Nixon und PD Dr. O. Kruse). Diese Beobachtung entspricht der theoretischen Überlegung, dass die fehlende Regulation durch NAB1 negative physiologische Konsequenzen für *Stm3* nach sich ziehen sollte. LHCII-Proteine in photosynthetischen Organismen unterliegen einer ausgesprochen strengen Expressionskontrolle auf praktisch allen Ebenen der Genexpression (siehe Kapitel 1.1.2.2). Daraus lässt sich folgern, dass das Bereitstellen der richtigen LHCII-Menge unter den jeweils vorherrschenden Umweltbedingungen von großer Wichtigkeit sein muss.

Der Grund hierfür ist die ambivalente Stellung, welche LHC-Proteine in photosynthetischen Zellen einnehmen. Auf der einen Seite müssen genügend LHCII-Proteine bereitgestellt werden, um eine optimale Energieversorgung auch unter Schwachlicht zu ermöglichen. Andererseits hingegen kommt es zur vermehrten Bildung von hoch toxischen reaktiven Sauerstoff-Spezies, sobald die eingefangene Lichtenergie die photosynthetische Kapazität übersteigt (siehe Kapitel 1.2). Auf Grund der Tatsache, dass die vermehrt produzierten LHCII-Proteine zumindest teilweise mit den PSII-Komplexen assoziiert sind (siehe Kapitel 3.2.2.2), ist folglich davon auszugehen, dass in der Mutante unter Starklicht eine vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies stattfinden müsste, was wiederum ein eingeschränktes Wachstumsverhalten zur Folge haben sollte. Gleiches dürfte im Übrigen auch unter anderen photosynthetischen Stress-Bedingungen wie Kälte, Hitze oder Wassermangel

gültig sein, vorausgesetzt, die in *Stm3* zusätzlich zugeführte Energie führt zum Übersteigen der photosynthetischen Kapazität der Zelle (siehe Kapitel 4.2.10).

4.2.7 Die Regulation der NAB1-Aktivität

Die im vorigen Kapitel diskutierten, physiologischen Auswirkungen einer Mutation von NAB1 werfen die Frage nach der Kontrolle der Aktivität des NAB1-Proteins im WT auf. Den dargestellten Ergebnissen zufolge kontrolliert NAB1 die Synthese von LHCII-Proteinen auf translationaler Ebene. Dabei muss schon bei moderaten Lichtintensitäten eine substantielle NAB1-Aktivität in WT-Zellen vorhanden sein, da die NAB1-Mutante *Stm3* bereits unter diesen Bedingungen einen deutlich ausgeprägten Phänotyp zeigt. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen allerdings keine direkten Schlüsse darauf zu, unter welchen physiologischen Bedingungen die NAB1-Aktivität herauf- oder herunterreguliert wird. Außer Frage steht jedoch die Feststellung, dass die Aktivität einer Kontrolle unterliegen sollte, da diesem Protein andernfalls keinerlei physiologische Bedeutung zukäme. Im Gegenteil würde die unkontrollierte Aktivität von NAB1 dazu führen, dass mRNA-Moleküle, welche unter Verbrauch von Energie synthetisiert wurden, sequestriert und früher oder später wieder degradiert würden. Ein solcher Vorgang der Energieverschwendung kann sich evolutionär nicht durchsetzen.

Es war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, die Aktivität von NAB1 direkt an der Größe der LHCII-Antenne festzumachen, weil die vielen Isoformen der LHCII-Proteine sehr homolog sind und noch dazu auf allen bislang untersuchten Ebenen der Genexpression reguliert werden (siehe Kapitel 1.1.2.2 und 1.2.1.1). Um Unterschiede in der LHCII-Menge definitiv der Aktivität von NAB1 zuordnen zu können, müssen neue Versuchsstrategien entwickelt werden (siehe Kapitel 4.2.10). In dieser Arbeit wurde daher der Versuch unternommen, indirekt Hinweise zur Aktivität von NAB1 zu erhalten.

Prinzipiell bestehen für die Zelle zwei Möglichkeiten, die NAB1-Aktivität zu steuern. Zum einen kann die Menge von synthetisiertem NAB1 reguliert werden, zum andern kann die Aktivität der bestehenden NAB1-Proteine durch post-translationale Modifikationen kontrolliert werden. Die Ergebnisse der Versuche, die zur Kontrolle der NAB1-Aktivität durchgeführt wurden, sind in den Kapiteln 3.2.7.8.3 bis 3.2.7.8.6 und in Kapitel 3.2.7.9 dargestellt.

Durch *Western*-Analysen konnte gezeigt werden, dass der Faktor Licht einen Einfluss auf die Expression von NAB1 ausübt. Eine Erhöhung der Lichtintensität hatte eine Zunahme der NAB1-Menge zur Folge. Da auch Photosynthese-defiziente Mutanten eine mit dem WT vergleichbare Expression von NAB1 zeigten (siehe Kapitel 3.2.7.8.6), wird die Lichtintensität offenbar nicht über Änderungen der Redox-Homöostase in den Chloroplasten, sondern auf eine andere, bislang nicht identifizierte Weise perzipiert.

Vordergründig spricht die lichtabhängige NAB1-Expression dafür, dass die Aktivität von NAB1 *in vivo* über die Quantität des Proteins gesteuert wird. Gegen diese Annahme spricht jedoch, dass die Zunahme der NAB1-Expression im Zeitraum von einigen Stunden erfolgte.

Die Vermutung ist jedoch nahe liegend, dass eine post-transkriptionelle Regulation von LHCII-Proteinen von besonderer Bedeutung in raschen Antwort-Reaktionen an wechselnde Umweltbedingungen sein sollte, da durch einen derartigen Mechanismus die Expression bereits synthetisierter mRNAs schnell und effektiv kontrolliert werden kann (siehe Kapitel 4.2.8). Zudem wurde auch bei Zellen, welche in absoluter Dunkelheit angezogen worden waren, eine deutliche Expression von NAB1 nachgewiesen (siehe Kapitel 3.2.7.8.4). Die relativ langsame Änderung der konstitutiven Expression spricht daher dafür, dass der beobachtete Effekt eine mittelfristige Anpassung der NAB1-Menge an den Bedarf darstellte.

Post-translationale Modifikationen von RNA-bindenden Proteinen sind vielfältig dokumentiert. Insbesondere sind Phosphorylierungen (Danon & Mayfield 1994, Weighardt et al. 1996, Matsumoto & Wolffe 1998) und Arginin-Methylierungen (McBride & Silver 2001) beschrieben. Auch die Glykosylierung durch O-glykosidisch gebundenes N-Acetylglucosamin konnte nachgewiesen werden (Soulard et al. 1993). Eine weitere post-translationale Modifikation, die bislang nicht in RNA-bindenden, dafür jedoch in DNA-bindenden Proteinen identifiziert wurde, stellt die reversible Acetylierung von Aminosäure-Resten dar (Kouzarides 2000).

Die Vermutung, dass NAB1 durch Methylierung an Argininen kontrolliert werden könnte, wurde gestützt durch die Identifikation von typischen Arginin-Methylierungsdomänen in der Aminosäuresequenz (siehe Kapitel 3.2.7.3.3). Daher wurde versucht, durch *Western-blots* regulative Modifikationen in unterschiedlich belichteten WT-Zellen zu identifizieren (siehe Kapitel 3.2.7.9). Unter den gewählten Bedingungen konnten jedoch weder Arginin-Methylierungen noch Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Phosphorylierungen detektiert werden.

Dieses Ergebnis lässt sich auf verschiedene Weisen interpretieren. Nicht auszuschließen ist die Möglichkeit, dass NAB1 überhaupt nicht post-translational reguliert wird. Auf Grund der vermuteten Rolle von NAB1 in der kurzzeitigen Lichtanpassung ist jedoch eine post-translationale Modifikation als wahrscheinlich anzusehen (siehe Kapitel 4.2.8).

Es besteht die Möglichkeit, dass NAB1 unter den untersuchten Bedingungen nicht in dem Umfang modifiziert war, der eine Identifikation durch isoelektrische Fokussierung und *Western-blots* erlaubte.

Eine weitere Möglichkeit ist es, dass NAB1 durch Modifikationen reguliert wird, welche nicht untersucht wurden. Das Vorhandensein von zwei Cysteinen in der Aminosäure-Kette von NAB1 lässt prinzipiell die Bildung von Disulfid-Brücken zu, was regulatorische Auswirkungen auf die NAB1-Aktivität haben könnte. Auch könnten andere Aminosäure-Reste als Arginin reversibel methyliert werden (Clarke 1993) und so die NAB1-Aktivität steuern. Weitere in der Literatur beschriebene, regulative Modifikationen sind reversible Acetylierungen oder Glykosylierungen der Aminosäure-Kette (Kouzarides 2000, Vosseller et al. 2002). Auch sie könnten potentiell die NAB1-Aktivität regulieren.

Da die durchgeführten Versuche, eine post-translationale Modifikation über *Western-blots* und MALDI-ToF-Analysen nachzuweisen, nicht erfolgreich waren, kann bislang keine

Aussage darüber getroffen werden, ob NAB1 durch die vermutete Modifikation aktiviert oder inaktiviert wird (siehe Kapitel 4.2.10).

4.2.8 Physiologische Bedeutung der Expressionsregulation photosynthetischer Proteine auf Ebene der mRNA-Translation

Die Expression von LHCII-Proteinen wird stark auf Ebene der Transkription reguliert (siehe Kapitel 1.1.2.2). Wird die Zelle nicht ausreichend mit Lichtenergie versorgt, erfolgt ein Anstieg der Neusynthese von LHCII-mRNAs. Sobald jedoch die photosynthetische Kapazität überschritten wird, erfolgt ein Abfall derselben (siehe Kapitel 1.2.1.1). Dies führt zu der Frage, welche physiologische Bedeutung eine LHCII-Regulation auf translationaler Ebene hat und ob sie nicht als redundant betrachtet werden kann.

Zur Diskussion dieser Frage muss auf die Sonderstellung von photosynthetischen Genen hingewiesen werden. Für alle Proteine, die für den Ablauf der photosynthetischen Reaktionen wichtig sind, ist die rasche und flexible Anpassung der Proteinmenge wichtig, damit die lebensnotwendigen photosynthetischen Abläufe optimal koordiniert werden können. Alle photosynthetischen Multi-Proteinkomplexe werden zudem durch Proteine aufgebaut, die zum Teil im Kern und zum Teil im Chloroplasten codiert sind. Diese Tatsache veranlasste Forscher zur Entwicklung der Idee, dass ein wesentlicher Grund für die Aufrechterhaltung eines eigenen Genoms im Chloroplasten (und ebenso im Mitochondrium) die Möglichkeit zu schnellen, redox-regulierten Antwortreaktionen auf Änderungen der Redox-Homöostase des Kompartiments ist (Allen 1992, Allen 2003).

Für chloroplastidäre Gene ist eine Expressionsregulation sowohl durch Transkription als auch durch Translation beschrieben (Danon & Mayfield 1994, Pfannschmidt et al. 1999, Allen & Pfannschmidt 2000, Drapier et al. 2002). Daher lässt sich ableiten, dass trotz der räumlichen Nähe von Chloroplastengenom und Zielort der Genprodukte der Verzicht auf eine Kontrolle der Translation von evolutivem Nachteil sein muss. Bei photosynthetischen Genen, die im Kern codiert sind, ist der räumliche Abstand zwischen genetischer Information und Zielort des Proteins erheblich größer und zudem durch Kompartiment-Grenzen getrennt. Daher muss auch die Zeitspanne, die zwischen dem Auslösen des Signals zur Regulation und der Expressionsantwort liegt, größer sein, als dies bei chloroplastidär codierten Genen der Fall ist.

In dieser Zeit werden mRNAs in Mengen produziert, welche der aktuellen Umweltsituation nicht mehr angemessen sind. Es erscheint daher sinnvoll, dass die Expression bereits produzierter mRNAs einer weiteren, nachgeschalteten Kontrolle unterliegt. Durch Sequestrierung von mRNAs kann darüber hinaus sichergestellt werden, dass sie im Bedarfsfalle sofort und ohne vorherige Neusynthese zur Translation bereitstehen.

Der entscheidende Vorteil der Translationskontrolle sollte also darin bestehen, dass auf veränderte Umwelteinflüsse rascher und flexibler geantwortet werden kann, als dies bei alleiniger Transkriptionskontrolle möglich wäre (Sommerville 1999). Umgekehrt folgt daraus, dass die Translationskontrolle der Expression insbesondere wichtig für Proteine sein sollte,

die besonders schnell an veränderte Umweltbedingungen angepasst werden müssen, was aus den dargestellten Gründen auch für LHC-Proteine zutrifft (siehe Kapitel 4.2.6).

Auf Grund der vorangestellten Überlegungen ist es nicht überraschend, dass Hinweise für eine Translationskontrolle nicht nur bei chloroplastidären, sondern auch bei nukleären, photosynthetischen Genen gefunden werden konnten (Flachmann & Kühlbrandt 1995, Petracek et al. 1997). Bisher konnten jedoch keine Proteine identifiziert werden, welche durch mRNA-Bindung regulativ in die Expression der entsprechenden Proteine eingreifen. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass NAB1 ein solches Protein ist.

4.2.9 Arbeitsmodell der physiologischen Funktionsweise von NAB1

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse werden im Folgenden in Form eines Arbeitsmodells zusammengefasst. Abbildung 51 stellt ein einfaches, schematisches Modell zur Funktion von NAB1 im physiologischen Kontext dar, welches im Text näher erläutert wird. Der Übersichtlichkeit halber wird im graphischen Modell die mittelfristige, transkriptionelle Anpassung der LHCII-mRNA-Produktion nicht einbezogen.

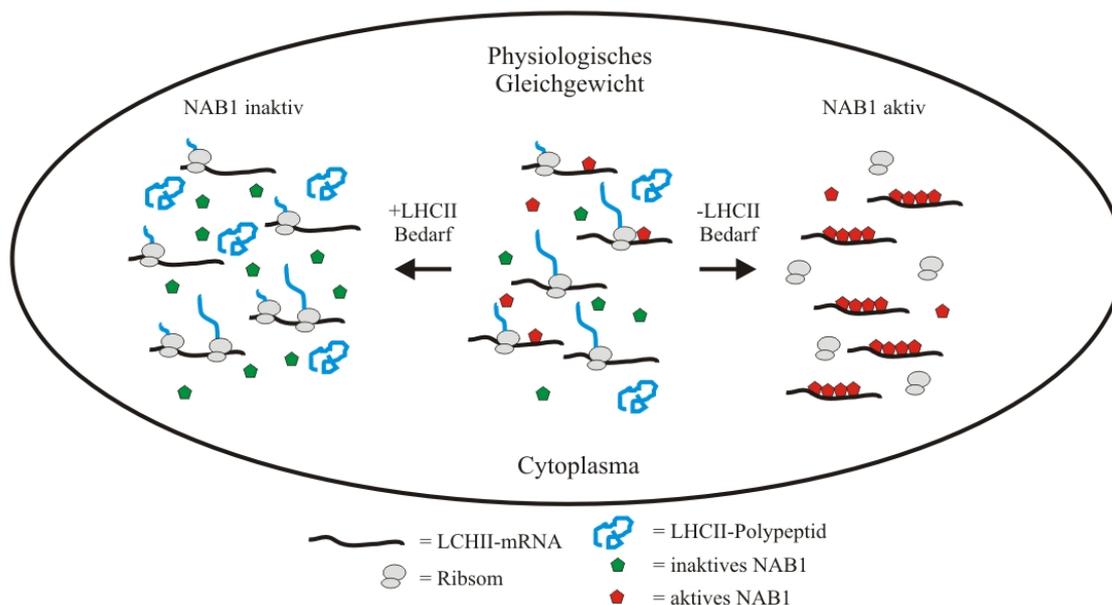


Abb. 51: Arbeitsmodell der NAB1-Funktion.

Befindet sich die photosynthetische Zelle im physiologischen Gleichgewicht, so wird ein Teil der transkribierten LHCII-mRNA durch Bindung von NAB1 und eventuell weiterer, bislang nicht identifizierter Faktoren sequestriert (siehe Kapitel 4.2.5). Auch bei moderaten Lichtbedingungen werden nicht alle der transkribierten LHCII-mRNAs translatiert, ein Teil wird in Ribonukleotid-Protein-(RNP)-Komplexen gespeichert. Das Verhältnis von sequestrierter zu translatierter mRNA hängt vom Grad der NAB1-Aktivität ab. Je mehr NAB1-Proteine in aktiver Form vorliegen, desto geringer die Translationsrate. Dabei wird der

Grad der NAB1-Aktivität durch eine post-translationale Modifikation bestimmt, die NAB1-Menge kann zudem mittelfristig dem Bedarf angepasst werden.

Nicht alle LHCII-Isoformen werden in gleichem Umfang kontrolliert, die Affinität für NAB1 wird vom Vorhandensein einer konservierten, spezifischen RNA-consensus-Bindedomäne determiniert. Darüber hinaus ist es möglich, dass NAB1 mit weiteren mRNAs, welche diese Domäne tragen, interagiert (siehe Kapitel 4.2.5).

Ändern sich die Umweltbedingungen dergestalt, dass eine rasche, vermehrte Produktion von LHCII-Proteinen erforderlich ist, so folgt die Deaktivierung der NAB1-Proteine und die RNP-Komplexe geben die LHCII-mRNAs zur Translation frei. Diese Situation ist *in vivo* durch plötzliches Aufziehen von Bewölkung oder durch vorübergehende Beschattung durch andere Pflanzen vorstellbar. Da in *Stm3* das NAB1-Protein permanent inaktiviert ist, kann in der Mutante schon unter Standard-Anzuchtbedingungen diese verstärkte LHCII-Expression in all ihren physiologischen Ausprägungen beobachtet werden.

Sollen hingegen weniger LHCII-Proteine synthetisiert werden, erfolgt eine post-translationale Aktivierung von NAB1. Die Proteine lagern sich in Oligomeren an LHCII-mRNAs an und verhindern so die Expression. Dabei wird die RNA in RNP-Komplexen sequestriert und kann im Falle steigenden LHCII-Bedarfs erneut zur Synthese freigegeben werden. Durch diesen Schutzmechanismus wird verhindert, dass nach raschem Anstieg der Lichtintensität oder durch das Auftreten anderer Stress-Bedingungen, die zur Überschreitung der photosynthetischen Kapazität führen, überflüssige LHCII-Proteine photooxidative Schädigungen auslösen.

Die Art der post-translationalen NAB1-Modifikation sowie das Signal, welches die Modifikation bedingt, sind bislang unbekannt (siehe Kapitel 4.2.10).

Ferner ist anzunehmen, dass die im Modell dargestellte Kontrolle der LHCII-Expression auf Ebene der Translation eng gekoppelt ist mit der Regulation auf transkriptioneller Ebene und das beide Prozesse über bislang unbekannt Signal-Transduktionsmechanismen verknüpft sind.

Da bislang kein weiteres Protein identifiziert werden konnte, welches die Kombination von CSD- und RRM-Motiv aufweist, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht mit Sicherheit gesagt werden, in wieweit sich das vorgeschlagene Regulationsmodell auf weitere Spezies übertragen lässt. Es existiert jedoch bereits eine Reihe von Hinweisen darauf, dass auch in Höheren Pflanzen eine Expressionskontrolle von nukleär codierten, photosynthetisch relevanten Genen auf Ebene der Translation stattfindet (siehe Kapitel 4.2.8). Ob CSD-Proteine hierbei eine Rolle spielen, ist bislang nicht bekannt. Einige Ansätze zur Beantwortung dieser und weiterer offener Fragen sollen im folgenden Kapitel dargestellt werden.

4.2.10 Zusammenfassung der Ergebnisse von Strategie II und Ausblick

Durch Anwendung der Strategie II war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit möglich, einige neue Einblicke in regulative Abläufe kurzzeitiger Lichthanpassungsvorgänge zu erhalten. Da in jüngster Vergangenheit weitere Arbeiten publiziert wurden, in welchen die gleiche Strategie verfolgt wurde (Depege et al. 2003, Schönfeld et al. 2004), lässt sich konstatieren, dass die gewählte Strategie einen durchaus viel versprechenden Ansatz darstellt, um einzelne Faktoren in regulativen Abläufen zu identifizieren und ihrem physiologischen Kontext zuordnen zu können.

Im Zuge der Untersuchungen konnte das vorher nicht beschriebene Protein NAB1, welches in der Mutante *Stm3* nicht mehr exprimiert wird, identifiziert und als Auslöser der phänotypischen Ausprägungen in der Mutante festgemacht werden.

NAB1 ist ein 26,54 kDa großes, lösliches Protein mit einem N-terminal lokalisierten CSD-Motiv und einer C-terminal gelegenen RRM-Domäne. Es ist vermutlich das einzige Protein in *C. reinhardtii* mit einem CSD-Motiv und die Kombination von CSD und RRM in einem Protein war bislang nicht beschrieben.

Dieses RNA-bindende Protein interagiert *in vitro* spezifisch mit einem definierten Bereich der *Lhcbm6*-RNA. In der NAB1-Mutante wird das entsprechende Protein LHCBM6 verstärkt exprimiert. Zudem werden weitere LHCII-Proteine ebenfalls verstärkt exprimiert, was insgesamt zu einem deutlich erhöhten LHCII-Gehalt in der Mutante unter Standard-Anzuchtbedingungen führt. Offenbar ist daher *in vivo* eine Hauptaufgabe von NAB1, mRNAs von Genen zu sequestrieren, die für Proteine der LHCII-Komplexe codieren und somit deren sofortige Translation zu unterbinden.

Die neuen Erkenntnisse werfen eine Reihe von neuen Fragen auf, für deren Beantwortung kurz einige experimentelle Herangehensweisen skizziert werden sollen.

Da manche Y-Box-Proteine trotz des Fehlens eines offensichtlichen Kern-Importsignals als Transkriptionsfaktoren funktionieren (Matsumoto & Wolffe 1998), sollte zunächst die intrazelluläre Lokalisation von NAB1 in *C. reinhardtii* zweifelsfrei ermittelt werden. Durch GFP-Markierung von NAB1 oder durch Immuno-Gold-Markierung von Schnittpräparaten könnte festgestellt werden, ob NAB1 vermehrt im Zellkern oder im Zytoplasma lokalisiert ist. Eine Reihe von RNA-Bindeproteinen ist Teil von größeren RNA-Proteinkomplexen. Daher sollte experimentell die Frage untersucht werden, ob auch NAB1 mit weiteren Faktoren interagiert. Methodisch könnte diese Fragestellung beispielsweise über Hefe-*two-hybrid*-Analysen angegangen werden.

Im Rahmen einer Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von PD Dr. O. Kruse (Universität Bielefeld, Lehrstuhl für molekulare Zellphysiologie) ist geplant, einen weiteren Ansatz zu verfolgen, durch den weitere Erkenntnisse über die Umstände der NAB1-Aktivierung erhalten werden sollen. Dazu ist geplant, das *Lhcbm6*-Gen zu markieren und unter die Kontrolle des *PsaD*-Promoters zu bringen. Dieser Promoter soll dafür sorgen, dass die markierte Form von *Lhcbm6* in ausreichender Menge (Fischer & Rochaix 2001) und unabhängig vom eigenen Promoter exprimiert wird. Im Anschluss soll dieses Konstrukt in WT und zur Kontrolle in

Stm3 transformiert werden. Die Expression des markierten Lhcbm6-Proteins kann anschließend durch die Markierung auf Protein-Ebene unter unterschiedlichsten experimentellen Bedingungen eindeutig verfolgt werden. Sobald Bedingungen gefunden werden, bei denen sich die Menge der LHCBM6-Proteine im WT ändert, nicht jedoch in der Mutante, kann dieser Effekt nicht durch eine geänderte Transkriptionsrate bedingt sein, sondern muss Folge der Aktivität von NAB1 sein. Sind auf diese Weise Bedingungen ermittelt, unter denen NAB1 inaktiv oder aktiv ist, können intensive MALDI-ToF-Analysen angeschlossen werden, um die vermutete post-translationale Modifikation zu ermitteln.

Parallel zu diesem Ansatz ist weiterhin von Interesse, die Konsequenzen der NAB1-Mutation näher zu untersuchen. Hier könnten insbesondere detaillierte Wachstumskinetiken Aufschluss über die physiologische Bedeutsamkeit des NAB1-Proteins ermöglichen. Zum einen ließe sich das Zellwachstum von WT und Stm3 in Minimalmedium unter verschiedensten Stress-Bedingungen wie Hitze, Kälte und Starklicht analysieren, zum andern könnten kontrollierte Wachstumsversuche unter Freilandbedingungen durchgeführt werden.

Die Vermutung ist naheliegend, dass das Fehlen von NAB1 Auswirkungen auf die Expression anderer Gene in der Mutante hat. Durch *Microarray*-Studien könnte versucht werden, Gene zu ermitteln, die *in vivo* im Zusammenspiel mit NAB1 funktionieren.

Da NAB1 das bislang einzige bekannte Protein mit der Kombination von CSD und RRM ist, fällt es schwer Aussagen darüber zu treffen, ob homologe Proteine in anderen photosynthetischen Spezies ähnliche Aufgaben übernehmen, wie dies in der vorliegenden Arbeit für NAB1 beschrieben wurde. Da der Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* nur fünf Proteine mit CSD-Motiv besitzt, sollte versucht werden, Mutanten aller fünf CSD-Proteine zu erwerben. Durch Vergleich der jeweiligen phänotypischen Ausprägungen mit den Phänotypen der Mutante Stm3 können möglicherweise funktionelle Homologien zu NAB1 ermittelt werden. Für diesen Ansatz ist von bedeutendem Vorteil, dass heute große Mutanten-Kollektionen von *A. thaliana* angelegt und verfügbar sind.

Neben den dargestellten Ansätzen, mehr über die NAB1-vermittelte Translationskontrolle zu erfahren, sind auch erste Überlegungen dazu angestellt worden, die Funktion von NAB1 technisch nutzbar zu machen. Zellen von *Chlamydomonas reinhardtii* sind in der Lage, unter bestimmten Bedingungen molekularen Wasserstoff durch direkte Übertragung von Elektronen auf Protonen zu produzieren. Diese Reaktion wird durch eine sauerstoffsensitive Hydrogenase katalysiert (Melis & Happe 2001, Happe et al. 2002). Da ein großes ökologisches und wirtschaftliches Interesse an molekularem Wasserstoff als erneuerbare Energiequelle besteht, wurden bereits viele Versuche unternommen, um die Wasserstoff-Produktion in *C. reinhardtii* zu optimieren (Melis & Happe 2001). Als problematisch erwies sich jedoch oftmals die angesprochene extreme Sauerstoff-Sensitivität der Hydrogenase (Melis et al. 2000). Durch Kenntnis der Interaktion von NAB1- und LHCBM6-Proteinen könnte nun versucht werden, durch vermehrte Expression oder künstliche Aktivierung von NAB1 die Größe der LHCBM6-Komplexe zu verringern. Dadurch könnte es gelingen, die Aktivität von PSII und folglich die Produktion von Sauerstoff zu minimieren, was wiederum eine gesteigerte Produktion von molekularem Wasserstoff zur Folge haben sollte.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Photosynthetische Organismen nutzen Sonnenlicht, Kohlendioxyd und Wasser zur Produktion von energiereichen Kohlenstoff-Verbindungen. Sie sind dabei ständigen Änderungen der äußeren Bedingungen ausgesetzt. Im Lauf der Evolution haben photosynthetische Zellen daher eine Reihe physiologischer Strategien entwickelt, durch welche eine optimale Anpassung an die vorherrschende Umweltsituation gewährleistet wird.

Der Faktor Licht ist hierbei von besonderer Bedeutung. Im Tages- und Jahresverlauf können sowohl Quantität und Qualität des Sonnenlichts als auch photosynthetischer Bedarf der Zelle an Lichtenergie stark schwanken. Dazu kommt, dass diese Schwankungen innerhalb von wenigen Minuten auftreten können. Unter diesen Bedingungen muss zum einen die ausreichende Versorgung mit Lichtenergie gesichert sein, zum anderen muss eine Überversorgung vermieden werden, da eine solche zu photooxidativen Schädigungen der Zellen führt. Photosynthetische Organismen müssen daher eine extreme Flexibilität in der kurzzeitigen Lichtanpassung aufweisen. Als zentrales Regulativ ist dabei der Redox-Zustand von Komponenten, die an der Elektronentransportkette beteiligt sind, durch zahlreiche Untersuchungen bestätigt worden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch Anwendung zweier unterschiedlicher Strategien neue Erkenntnisse über solche Vorgänge zu gewinnen, die in der kurzzeitigen, redox-regulierten Lichtanpassung von Bedeutung sind.

Strategie I zielte darauf ab, eine neue Methodik zu entwickeln, die es ermöglichen sollte, beteiligte Proteinkinasen zu identifizieren. Die Wichtigkeit von Protein-Phosphorylierungen in regulativen Signal-Transduktionsmechanismen ist seit vielen Jahren bekannt. Beteiligte Enzyme hingegen sind noch immer weitestgehend nicht identifiziert.

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. N. Sewald (Universität Bielefeld) sollte ein neues Verfahren entwickelt werden, um Kinasen selektiv markieren und auf diese Weise isolieren zu können. Als Ausgangsstoff wurde der bekannte Kinase-Inhibitor H9 gewählt. Das Derivat H9-LPF wurde durch Anhängen eines Verbindungsstücks sowie einer Photoaffinitäts-Gruppe und einer Fluorescein-Gruppe synthetisiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob dieses Konstrukt geeignet ist, selektiv ATP-bindende Proteine zu markieren und so deren Isolierung zu ermöglichen. Im Anschluss an die Etablierung optimaler Puffersysteme, H9-LPF-Konzentrationen, UV-Belichtungszeiten sowie Fluoreszenz-Detektionsgeräte wurde untersucht, ob Proteinkinasen durch H9-LPF markiert werden können und wie spezifisch diese Markierung ist. Durch eine Reihe von Bindestudien konnte gezeigt werden, dass Kinasen durch H9-LPF markiert werden und dass die Markierung größtenteils spezifischer Natur ist. Um die Identifikation unbekannter Kinasen in komplexen Proteingemischen zu simulieren, wurden im Anschluss isolierte Thylakoid-Präparationen künstlich mit einer Proteinkinase versetzt. Durch Anwendung der H9-LPF-Markierung in Kombination mit massenspektrometrischen Analysen konnte so demonstriert werden, dass es prinzipiell möglich ist, markierte Enzyme eindeutig zu

identifizieren. Die Etablierung von H9-LPF als Markierungskonstrukt von ATP-bindenden Proteinen durch die durchgeführten Experimente bildet die Grundlage, um mit diesem Verfahren zukünftig unbekannte Proteinkinasen selektiv isolieren und ihrem physiologischen Kontext zuordnen zu können. Die wichtigsten Ergebnisse der kooperativen Versuchsstrategie wurden veröffentlicht in Hagenstein et al. (2003).

In Strategie II sollte ein klassischer *forward-genetics*-Ansatz (vom Phänotyp zum Genotyp) zur Anwendung kommen. Die durchgeführte Selektionsmethode zielte darauf ab, nukleäre Zufallsmutanten der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* mit einem Defekt in *LHC-state-transitions*, der lichtabhängigen Verteilung von LHCII-Proteinen auf Photosystem I oder Photosystem II, zu identifizieren. Auf diese Weise konnte die Zufalls-DNA-Insertionsmutante Stm3 isoliert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Mutante eingehend molekularbiologisch, biochemisch und biophysikalisch untersucht. Auf diese Weise sollten Genprodukte gefunden werden, die an kurzzeitigen Lichtanpassungsreaktionen photosynthetischer Organismen von essentieller Bedeutung sind.

Durch Kombination von LMS-PCR, *screening* einer Phagenbank und Analyse von Datenbankinformationen konnte das bislang unbekannte Gen Nab1 identifiziert und veröffentlicht werden (GenBank Nummer AY157846), welches in der Mutante Stm3 durch die Zufalls-DNA-Insertion betroffen ist. Es codiert für ein Protein mit 247 Aminosäuren, dem Molekulargewicht von 26,54 kDa und dem theoretischen isoelektrischen Punkt von 9,47.

NAB1 besitzt zwei putative nukleinsäure-bindende Domänen, eine N-terminal lokalisierte CSD-Domäne sowie eine C-terminal lokalisierte RRM-Domäne. Es ist mit hoher Wahrscheinlichkeit das einzige CSD-Protein in *C. reinhardtii* und darüber hinaus das einzige bekannte Protein mit der modularen Kombination von CSD- und RRM-Domäne.

Durch Expression von rekombinantem NAB1 und folgenden RNA-Interaktionsstudien konnte eine spezifische Bindung von NAB1 mit einem definierten LHCII-mRNA-Bereich ermittelt werden.

In der Mutante Stm3 wird NAB1 nicht mehr exprimiert. Das Fehlen des Proteins hat eine gesteigerte Expression von LHCII-Proteinen zur Folge, was durch Messungen von Chlorophyll-Gehalt, Chlorophyll-a/b-Verhältnis, 1D- und 2D-Western-Analysen sowie durch MALDI-ToF-Untersuchungen nachgewiesen werden konnte. Die veränderte LHCII-Zusammensetzung führt zu einer veränderten Ultrastruktur der Thylakoide und einem vom WT abweichenden Chlorophyll-Fluoreszenzverhalten bei RT und 77 K. Durch Komplementierung der Mutante konnte nachgewiesen werden, dass das Fehlen des Nab1-Gens ursächlich verantwortlich für die phänotypischen Ausprägungen in der Mutante war.

Die dargestellten Ergebnisse sprechen dafür, dass NAB1 *in vivo* die Funktion besitzt, selektiv mRNA von spezifischen LHCII-Isoformen zu binden und zu sequestrieren.

Die physiologische Bedeutung, welche die dargestellte Translationskontrolle der LHCII-Expression durch NAB1 in der kurzzeitigen Anpassung photosynthetischer Zellen auf veränderte Umwelteinflüsse besitzt, wird in der vorliegenden Arbeit diskutiert.

6. LITERATURLISTE

Abdallah, F., Salamin, F, Leister, D. (2000) A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of Arabidopsis. *Trends Plant Sci* 4: 141-142.

Alizadeh, S., Morais, F., Barber, J. and Nixon, P.J. (1999) Isotopic labelling of the polypeptide subunits of the isolated photosystem II reaction-centre complex of *Chlamydomonas reinhardtii* suggests an $\alpha\beta$ heterodimeric structure for cytochrome b-559. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 48: 148-153.

Allen, J.F., Bennett, J., Steinback, K.E. & Arntzen, C.J. (1981) Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature.* 291: 21-25.

Allen, J.F. (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1098: 275-335.

Allen, J.F. (1993) Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. *J Theor Biol*, 165(4): 609-31.

Allen, J.F., Pfannschmidt, T. (2000) Balancing the two photosystems: photosynthetic electron transfer governs transcription of reaction centre genes in chloroplasts. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355: 1351-1359.

Allen, J.F., Forsberg, J. (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci.* 6: 317-326.

Allen, J.F. (2002) Photosynthesis of ATP-electrons, proton pumps, rotors, and poise. *Cell.* 110: 273-276.

Allen, J.F. (2003) The function of genomes in bioenergetic organelles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358: 19-38.

Allen, K.D., Staehelin, L.A. (1991) Resolution of 16 to 20 chlorophyll-protein complexes using a low ionic strength native green gel system. *Anal Biochem.* 194: 214-222.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215: 403-410.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

Andersson, B., Aro, E.M. (2001) Regulation of photosynthesis. Chapter 22: Photodamage of photosystem II, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Arnon, D.I. (1959) Conversion of light into chemical energy in photosynthesis. *Nature*. 184: 10-21.

Aro, E.M., Hundal, T., Carlberg, I., Andersson, B. (1990) In vitro studies on light-induced inhibition of photosystem II and D1-protein degradation at low temperatures. *Biochim Biophys Acta* 1019: 269-275.

Aro, E.M., McCaffery, S., Anderson, J.M. (1993a) Photoinhibition and D1 protein degradation in peas acclimated to different growth irradiances. *Plant Physiol*. 103: 835-843.

Aro, E.M., Virgin, I., Andersson, B. (1993b) Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta* 1143: 113- 134.

Asada, K., Kiso, K., Yoshikawa, K. (1974) Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination. *J. Biol. Chem*. 249: 2175-2181.

Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601-639.

Barber, J., Kühlbrandt, W. (1999) Photosystem II. *Curr Opin Struct Biol* 9: 469-475.

Barber, J. (2002) Photosystem II: a multisubunit membrane protein that oxidises water. *Curr Opin Struct Biol*. 12: 523-30.

Bennett, J. (1977) Phosphorylation of chloroplast membrane polypeptides. *Nature*. 269: 344-346.

Bennett, J. (1979) Chloroplast phosphoproteins. The protein kinase of thylakoid membranes is light-dependent. *FEBS Lett*. 103: 342-344.

Bennett, J. (1991) Protein phosphorylation in green plant chloroplasts. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 281-311.

Bennoun, P., Spierer-Herz, M., Erickson, J., Girard-Bascou, J., Pierre, Y., Delosme, M., Rochaix, J.D. (1986) Characterization of photosystem II mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking the psbA gene. *Plant Mol Biol* 6: 151-160.

Bibby, T.S., Nield, J., Barber, J. (2001) Iron deficiency induces the formation of an antenna ring around trimeric photosystem I in cyanobacteria. *Nature*. 412: 743-745.

Björkman, O., Demmig, B. (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504.

Boekema, E.J., Hifney, A., Yakushevskaya, A.E., Piotrowski, M., Keegstra, W., Berry, S., Michel, K.P., Pistorius, E.K., Kruijff, J. (2001) A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria. *Nature*. 412: 745-748.

Bonaventura, C., Myers, J. (1969) Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim Biophys Acta* 189: 366-383.

Boussac, A., Rutherford, A.W. (1994) Electron transfer events in chloride-depleted photosystem II. *J. Biol. Chem.* 269: 12462-12467.

Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, J.P., Johnson, A.M., Jones, A.R., Randolph-Anderson, B.L., Robertson, D., Klein, T.M., Shark, K.B., et al. (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*. 1988 240: 1534-1538.

Breyton, C., Tribet, C., Olive, J., Dubacq, J.P., Popot, J.L. (1997) Dimer to monomer conversion of the cytochrome b6 f complex. Causes and consequences. *J. Biol. Chem.* 272: 21892-21900.

Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (2000) *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists (ASPP), Rockville, Maryland, USA.

Bulté, L., Wollman, F.A. (1990) Stabilization of states I and II by p-benzoquinone treatment of intact cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 1016: 253-258.

Burd, C.G., Dreyfuss, G. (1994) Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*. 265: 615-621.

Burnette, W.N. (1981) „Western Blotting“: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* 112: 195-203.

Cayrel, R., Hill, V., Beers, T.C., Barbuy, B., Spite, M., Spite, F., Plez, B., Andersen, J., Bonifacio, P., Francois, P., Molaro, P., Nordstrom, B., Primas, F. (2001) Measurement of stellar age from uranium decay. *Nature*. 409: 691-692.

Chua, N.H., Bennoun, P. (1975) Thylakoid membrane polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii*: wild-type and mutant strains deficient in photosystem II reaction center. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 72: 2175-2179.

Clarke, S. (1993) Protein methylation. *Curr Opin Cell Biol.* 5: 977-983.

Danon, A., Mayfield, S.P. (1994) Light-regulated translation of chloroplast messenger RNAs through redox potential. *Science*. 266: 1717-1719.

- Dent, R.M.**, Han, M., Niyogi, K.K. (2001) Functional genomics of plant photosynthesis in the fast lane using *Chlamydomonas reinhardtii*. *Trends Plant Sci.* 6: 364-371.
- Depege, N.**, Bellafiore, S., Rochaix, J.D. (2003) Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHCII phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science.* 299: 1572-1575.
- Des Marais, D.J.** (2000) When did photosynthesis emerge on earth? *Science.* 289: 1703-1705.
- Dietz, K.J.** (2003a) Plant peroxiredoxins. *Annu Rev Plant Biol.* 54: 93-107.
- Dietz, K.J.** (2003b) Redox control, redox signaling, and redox homeostasis in plant cells. *Int Rev Cytol.* 228: 141-193.
- Drapier, D.**, Girard-Bascou, J., Stern, D.B., Wollman, F.A. (2002) A dominant nuclear mutation in *Chlamydomonas* identifies a factor controlling chloroplast mRNA stability by acting on the coding region of the *atpA* transcript. *Plant J.* 31: 687-697.
- Ebersold, W.T.** (1967) *Chlamydomonas reinhardtii*: heterozygous diploid strains. *Science.* 157: 447-449.
- Elrad, D.**, Niyogi, K.K., Grossman, A.R. (2002) A major light-harvesting polypeptide of photosystem II functions in thermal dissipation. *Plant Cell.* 14: 1801-1816.
- Emlyn-Jones, D.**, Ashby, M.K., Mullineaux, C.W. (1999) A gene required for the regulation of photosynthetic light harvesting in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Mol Microbiol.* 33: 1050-1058.
- Engels, A.**, Kahmann, U., Ruppel, H.G., Pistorius, E.K. (1997) Isolation, partial characterization and localization of a dihydrolipoamide dehydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Biochim Biophys Acta* 1340: 33-44.
- Engh, R.A.**, Girod, A., Kinzel, V., Huber, R., Bossemeyer, D. (1996) Crystal structures of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with isoquinolinesulfonyl protein kinase inhibitors H7, H8, and H89. Structural implications for selectivity. *J. Biol. Chem.* 271: 26157-26164.
- Escoubas, J.M.**, Lomas, M., LaRoche, J., Falkowski, P.G. (1995) Light intensity regulation of *cab* gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 10237-10241.
- Farchaus, J.**, Dilley, R.A., Cramer, W.A. (1985) Selective inhibition of the spinach thylakoid LHCII protein kinase. *Biochim Biophys Acta* 809: 17-26.

- Feng, W.**, Tejero, R., Zimmerman, D.E., Inouye, M., Montelione, G.T. (1998) Solution NMR structure and backbone dynamics of the major cold-shock protein (CspA) from *Escherichia coli*: evidence for conformational dynamics in the single-stranded RNA-binding site. *Biochemistry*. 37: 10881-10896.
- Fischer, N.**, Rochaix, J.D. (2001) The flanking regions of PsaD drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Genet Genomics*. 265: 888-894.
- Fleischmann, M.M.**, Ravanel, S., Delosme, R., Olive, J., Zito, F., Wollman, F.A., Rochaix, J.D. (1999) Isolation and characterization of photoautotrophic mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in state transition. *J. Biol. Chem.* 274: 30987-30994.
- Forsberg, J.**, Allen, J.F. (2001) Protein tyrosine phosphorylation in the transition to light state 2 of chloroplast thylakoids. *Photosynth. Res.* 68: 71-79.
- Flachmann, R.**, Kühlbrandt, W. (1995) Accumulation of plant antenna complexes is regulated by post-transcriptional mechanisms in tobacco. *Plant Cell*. 7: 149-160.
- Frischauf, A.M.**, Lehrach, H., Poustka, A., Murray, N. (1983) Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J Mol Biol.* 170: 827-842.
- Gal, A.**, Hauska, G., Herrmann, R., Ohad, I. (1990) Interaction between light harvesting chlorophyll-a/b protein (LHCII) kinase and cytochrome b6/f complex. In vitro control of kinase activity. *J Biol Chem.* 265: 19742-19749.
- Gal, A.**, Zer, H., Ohad, I. (1997) Redox-controlled thylakoid protein phosphorylation. *News and views Physiol. Plant.* 100: 869-885.
- Gau, A.E.**, Thole, H.H., Sokolenko, A., Altschmied, L., Hermann, R.G., Pistorius, E.K. (1998) PsbY, a novel manganese-binding, low-molecular-mass protein associated with photosystem II. *Mol. Gen. Genet.* 260: 56-68.
- Goldschmidt-Clermont, M.**, Rahire, M. (1986) Sequence, evolution and differential expression of the two genes encoding variant small subunits of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Mol Biol.* 191: 421-432.
- Goldstein, J.**, Pollitt, N.S., Inouye, M. (1990) Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 283-287.
- Graumann, P.**, Marahiel, M.A. (1996) A case of convergent evolution of nucleic acid binding modules. *Bioessays*. 18: 309-315.
- Grossman, A.R.** (2000a) Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to its nutrient environment. *Protist.* 151: 201-224.

- Grossman, A.R.** (2000b) *Chlamydomonas reinhardtii* and photosynthesis: genetics to genomics. *Curr Opin Plant Biol.* 3: 132-137.
- Groth, G.,** Strotmann, H. (1999) New results about structure, function and regulation of the chloroplast ATP synthase (CF₁CF₀). *Physiol. Plant.* 106: 142-148.
- Gumpel, N.J.,** Purton, S. (1994) Playing tag with *Chlamydomonas*. *Trends Cell Biol.* 4: 299-301.
- Gumpel, N.J.,** Rochaix, J.D., Purton, S. (1994) Studies on homologous recombination in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet.* 26: 438-442.
- Gupta, R.,** He, Z., Luan, S. (2002) Functional relationship of cytochrome c6 and plastocyanin in *Arabidopsis*. *Nature.* 417: 567-571.
- Hagenstein, M.C.,** Mussgnug, J.H., Lotte, K., Plessow, R., Brockhinke, A., Kruse, O., Sewald, N. (2003) Affinity-based tagging of protein families with reversible inhibitors: a concept for functional proteomics. *Angew. Chem. Int Ed.* 42: 5635-5638.
- Hahn, D.,** Kück, U. (1999) Identification of DNA sequences controlling light- and chloroplast-dependent expression of the *lhcb1* gene from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet.* 34: 459-466.
- Haldrup, A.,** Jensen, P.E., Lunde, C., Scheller, H.V. (2001) Balance of power: a view of the mechanism of photosynthetic state transitions. *Trends Plant Sci.* 6: 301-305.
- Hamel, P.,** Olive, O., Pierre, Y., Wollman, F.A., Vitry, C. (2000) A new subunit of cytochrome b6f complex undergoes reversible phosphorylation upon state transition. *J. Biol. Chem.* 275: 17072-17079.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hankamer, B.,** Barber, J., Boekema, E.J., (1997a) Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 641-671.
- Hankamer, B.,** Nield, J., Zheleva, D., Boekema, E., Jansson, S. and Barber, J. (1997b) Isolation and biochemical characterisation of monomeric and dimeric photosystem II complexes from spinach and their relevance to the organisation of photosystem II in vivo. *Eur J Biochem.* 243: 422-429.
- Happe, T.,** Hemschemeier, A., Winkler, M., Kaminski, A. (2002) Hydrogenases in green algae: do they save the algae's life and solve our energy problems? *Trends Plant Sci.* 7: 246-250.

- Hardie, D.G.** (1999) Plant protein serine/threonine kinases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 97-131.
- Harris, E.H.** (1989) *The Chlamydomonas sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use.* Academic Press, San Diego, CA.
- Harris, E.H.** (1998) Introduction to Chlamydomonas. In: *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas* (Rochaix, J.D., Goldschmidt-Clermont, M., Merchant, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, Kap. 1: 1-11.
- Harris, E.H.** (2001) Chlamydomonas as a model organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 363- 406.
- Haußühl, K.,** Andersson, B., Adamska, I. (2001) A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *EMBO J.* 20: 713-722.
- Hidaka, H.,** Inagaki, M., Kawamoto, S., Sasaki, Y. (1984) Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry.* 23: 5036-5041.
- Hind, G.,** Marshak, D.R., Coughlan, S.J. (1995) Spinach thylakoid polyphenol oxidase: cloning, characterization, and relation to a putative protein kinase. *Biochemistry.* 34: 8157-8164.
- Hippler, M.,** Redding, K., Rochaix, J.D. (1998) Chlamydomonas genetics, a tool for the study of bioenergetic pathways. *Biochim Biophys Acta* 1367: 1-62.
- Hippler, M.,** Klein, J., Fink, A., Allinger, T., Hoerth, P. (2001) Towards functional proteomics of membrane protein complexes: analysis of thylakoid membranes from Chlamydomonas reinhardtii. *Plant J.* 28: 595-606.
- Hobe, S.,** Förster, R., Klingler, J., Paulsen, H. (1995) N-proximal sequence motif in light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein is essential for the trimerization of light-harvesting chlorophyll a/b complex. *Biochemistry.* 34: 10224-10228.
- Hobe, S.,** Fey, H., Rogl, H., Paulsen, H. (2003) Determination of relative chlorophyll binding affinities in the major light-harvesting chlorophyll a/b complex. *J Biol Chem.* 278: 5912-5919.
- Holzwarth, A.R.** (1986) Fluorescence lifetimes in photosynthetic systems. *Photochem Photobiol* 43: 707-725.

- Huang, D.**, Everly, R.M., Cheng, R.H., Heymann, J.B., Schagger, H., Sled, V., Ohnishi, T., Baker, T.S., Cramer, W.A. (1994) Characterization of the chloroplast cytochrome b6f complex as a structural and functional dimer. *Biochemistry*. 33: 4401-4409.
- Hwang, S.**, Herrin, D.L. (1994) Control of *lhc* gene transcription by the circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol*. 26: 557-569.
- Inagaki, M.**, Watanabe, M., Hidaka, H. (1985) N-(2-Aminoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide, a newly synthesized protein kinase inhibitor, functions as a ligand in affinity chromatography. Purification of Ca²⁺-activated, phospholipid-dependent and other protein kinases. *J. Biol. Chem*. 260: 2922-2925.
- Ishak, Z.**, White, I.R., Millner, P.A. (1991) Sensitivity of protein phosphorylation in tobacco thylakoids to protein kinase C inhibitors and synthetic peptides. *Biochem Soc Trans*. 20: 8S.
- Jackowski, G.**, Kacprzak, K., Jansson, S. (2001) Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 heterotrimers of the main light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of Photosystem II (LHC II). *Biochim Biophys Acta* 1504: 340-345.
- Jacobshagen, S.**, Kindle, K.L., Johnson, C.H. (1996) Transcription of CABII is regulated by the biological clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol*. 31: 1173-1184.
- Jakobsen, S.B.** (2003) Geochemistry. How old is planet Earth? *Science*. 300: 1513-1514.
- Jansson, S.**, Andersen, B., Scheller, H.V. (1996) Nearest-neighbor analysis of higher-plant photosystem I holocomplex. *Plant Physiol*. 112: 409-420.
- Jansson, S.** (1999) A guide to the *lhc* genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends in plant science* 4: 236-240.
- Jasper, F.**, Quednau, B., Kortenjann, M., Johanningmeier, U. (1991) Control of *cab* gene expression in synchronized *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *J Photochem Photobiol B*. 11: 139-150.
- Jiang W.**, Hou, Y., Inouye, M. (1997) CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J Biol Chem*. 272: 196-202.
- Jones, P.G.**, VanBogelen, R.A., Neidhardt, F.C. (1987) Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 169: 2092-2095.
- Jordan, P.**, Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W., Krauss, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*. 411: 909-917.

- Kagawa, T.**, Sakai, T., Suetsugu, N., Oikawa, K., Ishiguro, S., Kato, T., Tabata, S., Okada, K., Wada, M. (2001) Arabidopsis NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science*. 291: 2138-2141.
- Karas, M.**, Hillenkamp, W. (1990) Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods in Enzymology*. 193: 280-295.
- Kargul, J.**, Nield, J., Barber, J. (2003) Three-dimensional reconstruction of a light-harvesting complex I-photosystem I (LHCI-PSI) supercomplex from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Insights into light harvesting for PSI. *J. Biol. Chem.* 278: 16135-16141.
- Karlson, D.**, Nakaminami, K., Toyomasu, T., Imai, R. (2002) A cold-regulated nucleic acid-binding protein of winter wheat shares a domain with bacterial cold shock proteins. *J Biol Chem*. 277: 35248-35256.
- Karlson, D.**, Imai, R. (2003) Conservation of the cold shock domain protein family in plants. *Plant Physiol*. 131: 12-15.
- Kasahara, M.**, Kagawa, T., Oikawa, K., Suetsugu, N., Miyao, M., Wada, M. (2002) Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature*. 420: 829-832.
- Kautsky, H.**, Hirsch, A. (1931) Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften* 19: 964.
- Keegstra, K.**, Cline, K. (1999) Protein import and routing system of chloroplasts *Plant Cell* 11: 557-570.
- Kindle, K.L.** (1990) High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1228-1232.
- Kouzarides, T.** (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* 19: 1176-1179.
- Kramer, D.M.**, Cruz, J.A., Kanazawa, A. (2003) Balancing the central roles of the thylakoid proton gradient. *Trends Plant Sci.* 8: 27-32.
- Kruse, O.**, Zheleva, D., Barber, J. (1997) Stabilization of photosystem two dimers by phosphorylation: Implication for the regulation of the turnover of D1 protein. *FEBS Letters* 408: 276-280.
- Kruse, O.**, Nixon, P.J., Schmid, G.H., Mullineaux, C.W. (1999) Isolation of state transition mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* by fluorescence video imaging. *Photosynth. Res.* 61: 43-51.

- Kruse, O.**, Hankamer, B., Konczak, C., Gerle, C., Morris, E., Radunz, A., Schmid, G.H., Barber J. (2000) Phosphatidylglycerol is involved in the dimerization of photosystem II. *J. Biol. Chem.* 275: 6509-6514.
- Kruse, O.**, Borgstädt, R., Mussnug, J.H., Schönfeld, C. (2002) Structural and functional aspects of phosphatidyl glycerol binding and covalent modification by reversible phosphorylation in the LHCII-PSII supercomplex. *Recent Res. Devel. Plant Physiol.* 3: 211-225.
- Kühlbrandt, W.**, Wang, D.N., Fujiyoshi, Y (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex. *Nature.* 350: 614-621.
- Kurisu, G.**, Zhang, H., Smith, J.L., Cramer, W.A. (2003) Structure of the Cytochrome b6f Complex of Oxygenic Photosynthesis: Tuning the Cavity. *Science.* Im Druck.
- Ladomery M.**, Sommerville, J. (1995) A role for Y-box proteins in cell proliferation. *Bioessays.* 17: 9-11.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Landsman, D.** (1992) RNP-1, an RNA-binding motif is conserved in the DNA-binding cold shock domain. *Nucleic Acids Res.* 20: 2861-2864.
- Li, X.P.**, Björkman, O., Shih, C., Grossman, A.R., Rosenquist, M., Jansson, S., Niyogi, K.K. (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature.* 403: 391-395.
- Li, X.P.**, Müller-Moulé, P., Gilmore, A.M., Niyogi, K.K. (2002) PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 15222-15227.
- Lindahl, M.**, Yang, D.H., Andersson, B. (1995) Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II by a light-induced membrane-associated enzymic system. *Eur J Biochem.* 231: 503-509.
- Lindahl, M.**, Spetea, C., Hundal, T., Oppenheim, A.B., Adam, Z., Andersson, B. (2000) The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell.* 12: 419-431.
- Luck, D.J.** (1984) Genetic and biochemical dissection of the eucaryotic flagellum. *J Cell Biol.* 98: 789-794.
- Lumbreras, V.**, Stevens, D.R., Purton, S. (1998) Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. *Plant J.* 14: 441-447.

- Lunde, C.**, Jensen, P.E., Haldrup, A., Knoetzel, J., Scheller, H.V. (2000) The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis. *Nature*. 408: 613-615.
- Maiwald, D.**, Dietzmann, A., Jahns, P., Pesaresi, P., Joliot, P., Joliot, A., Levin, J.Z., Salamini, F., Leister, D. (2003) Knock-Out of the Genes Coding for the Rieske Protein and the ATP-Synthase delta-Subunit of Arabidopsis. Effects on Photosynthesis, Thylakoid Protein Composition, and Nuclear Chloroplast Gene Expression. *Plant Physiol*. 133: 191-202.
- Manival, X.**, Ghisolfi-Nieto, L., Joseph, G., Bouvet, P., Erard, M. (2001) RNA-binding strategies common to cold-shock domain- and RNA recognition motif-containing proteins. *Nucleic Acids Res*. 29: 2223-2233.
- Martin, W.**, Stoebe, B., Goremykin, V., Hapsmann, S., Hasegawa, M., Kowallik, K.V. (1998) Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature*. 393: 162-165.
- Martin W.**, Rujan T., Richly E., Hansen A., Cornelsen S., Lins T., Leister D., Stoebe B., Hasegawa M., Penny D. (2002) Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 12246-12251.
- Matsumoto, K.**, Meric, F., Wolffe, A.P. (1996) Translational repression dependent on the interaction of the *Xenopus* Y-box protein FRGY2 with mRNA. Role of the cold shock domain, tail domain, and selective RNA sequence recognition. *J Biol Chem*. 271: 22706-22712.
- Matsumoto, K.**, Wolffe, A.P. (1998) Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol*. 8: 318-323.
- Maul, J.E.**, Lilly, J.W., Cui, L., dePamphilis C.W., Miller, W., Harris, E.H., Stern, D.B. (2002) The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *Plant Cell*. 14: 2659-2679.
- Maxwell, D.P.**, Laudenbach, D.E., Huner, N.P.A. (1995) Redox Regulation of light-harvesting complex II and cab mRNA abundance in *Dunaliella salina*. *Plant Physiol*. 109: 787-795.
- Maxwell, K.**, Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence- a practical guide. *J. Exp. Bot*. 51: 659-668.
- McBride, A.E.**, Silver, P.A. (2001) State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell*. 106: 5-8.

- Mehler, A.H.**, Brown, A.H. (1952) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. III. Simultaneous photoproduction and consumption of oxygen studied with oxygen isotopes. Arch Biochem Biophys. 38: 365-370.
- Melis, A.**, Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M.L., Seibert, M. (2000) Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. 122: 127-136.
- Melis, A.**, Happe, T. (2001) Hydrogen production. Green algae as a source of energy. Plant Physiol. 127: 740-748.
- Menke, W.** (1961) Über die Chloroplasten von *Anthoceros punctatus*. Zeitschrift für Naturforschung 16 (b): 334-336.
- Mereschkowsky, C.** (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. Biol. Centralbl. 25: 593-604.
- Michel, H.**, Deisenhofer, J. (1988) Relevance of the photosynthetic reaction centre from purple bacteria to the structure of photosystem II. Biochemistry 27: 1-7.
- Mitchell, P.**, Moyle, J. (1965) Evidence discriminating between the chemical and the chemiosmotic mechanisms of electron transport phosphorylation. Nature. 208: 1205-1206.
- Mitchell, P.**, Moyle, J. (1967) Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. Nature. 213: 137-139.
- Mitchell, P.** (1979) The Ninth Sir Hans Krebs Lecture. Compartmentation and communication in living systems. Ligand conduction: a general catalytic principle in chemical, osmotic and chemiosmotic reaction systems. Eur J Biochem. 95: 1-20.
- Mittag, M.**, Wagner, V. (2003) The circadian clock of the unicellular eukaryotic model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. Biol Chem. 384: 689-695.
- Morais, F.**, Barber, J., Nixon, P.J. (1998) The chloroplast- encoded α subunit of cytochrome b-559 is required for assembly of the photosystem two complex in both the light and the dark in *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Biol. Chem. 273: 29315-29320.
- Morgan-Kiss, R.M.**, Ivanov, A.G., Huner, N.P. (2002) The Antarctic psychrophile, *Chlamydomonas subcaudata*, is deficient in state I-state II transitions. Planta. 214: 435-445.
- Moss, E.G.**, Lee, R.C., Ambros, V. (1997) The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. Cell. 88: 637-646.
- Müller, P.**, Li, X.P., Niyogi, K.K. (2001) Non- photochemical quenching. A response to excess light energy. Plant Phys. 125: 1558-1566.

Mullineaux, C.W., Allen, J.F. (1990) State1- state2 transitions in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 are controlled by the redox state of electron carriers between photosystems I and II. *Photosynth. Res.* 23: 297-311.

Munekage, Y., Hojo, M., Meurer, J., Endo, T., Tasaka, M., Shikanai, T. (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell.* 110: 361-371.

Murata, N. (1969) Control of excitation transfer in photosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 172: 242-251.

Murata, N., Miyao, N. (1985) Extrinsic membrane proteins in the photosynthetic oxygen-evolving complex. *Trends Biochem. Sci.* 10: 122-124.

Nelson, J.A., Savereide, P.B., Lefebvre, P.A. (1994) The CRY1 gene in *Chlamydomonas reinhardtii*: structure and use as a dominant selectable marker for nuclear transformation. *Mol Cell Biol.* 14: 4011-4019.

Newkirk, K., Feng, W., Jiang, W., Tejero, R., Emerson, S.D., Inouye, M., Montelione, G.T. (1994) Solution NMR structure of the major cold shock protein (CspA) from *Escherichia coli*: identification of a binding epitope for DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 5114-5118.

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

Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., Kinosita Jr., K. (1997) Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature.* 386: 299-302.

O'Connor, H.E., Ruffle, S.V., Cain, A.J., Deak, Z., Vass, I., Nugent, J.H., Purton, S. (1998) The 9-kDa phosphoprotein of photosystem II. Generation and characterisation of *Chlamydomonas* mutants lacking PSII-H and a site-directed mutant lacking the phosphorylation site. *Biochim Biophys Acta* 1364: 63-72.

Ono-Saito, N., Niki, I., Hidaka, H. (1999) H-series protein kinase inhibitors and potential clinical applications. *Pharmacol Ther.* 82: 123-131.

Ossenbühl, F., Nickelsen, J. (2000) cis- and trans-Acting determinants for translation of psbD mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cell Biol.* 20: 8134-8142.

Ossenbühl, F., Hartmann, K., Nickelsen, J. (2002) A chloroplast RNA binding protein from stromal thylakoid membranes specifically binds to the 5' untranslated region of the psbA mRNA. *Eur J Biochem.* 269: 3912-3919.

Paulsen, H. (1995) Chlorophyll a/b-binding proteins. *Photochem Photobiol.* 62: 367-382.

- Paulsen, H.** (1997) Pigment ligation to proteins of the photosynthetic apparatus in higher plants. *Physiol Plant.* 100: 760-768.
- Pesaresi, P.,** Lunde, C., Jahns, P., Tarantino, D., Meurer, J., Varotto, C., Hirtz, R.D., Soave, C., Scheller, H.V., Salamini, F., Leister, D. (2002) A stable LHCII-PSI aggregate and suppression of photosynthetic state transitions in the *psae1-1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 215: 940-948.
- Petracek, M.E.,** Konkkel, L.M., Kable, M.L., Berman, J. (1994) A *Chlamydomonas* protein that binds single-stranded G-strand telomere DNA. *EMBO J.* 13: 3648-3658.
- Petracek, M.E.,** Dickey, L.F., Huber, S.C., Thompson, W.F. (1997) Light-regulated changes in abundance and polyribosome association of ferredoxin mRNA are dependent on photosynthesis. *Plant Cell.* 9: 2291-2300.
- Pfannschmidt, T.,** Nilsson, A., Allen, J.F. (1999) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature.* 397: 625-628.
- Pierre, Y.,** Breyton, C., Lemoine, Y., Robert, B., Vernotte, C., Popot, J.L. (1997) On the presence and role of a molecule of chlorophyll a in the cytochrome b6 f complex. *J. Biol. Chem.* 272: 21901-21908.
- Pursiheimo, S.,** Rintamäki E., Baena-Gonzalez, E., Aro, E.M. (1998) Thylakoid protein phosphorylation in evolutionally divergent species with oxygenic photosynthesis. *FEBS Lett.* 423: 178-182.
- Raven, J.A.,** Allen, J.F. (2003) Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants? *Genome Biol.* 4 (3): 209-209.5.
- Remy, R.,** Tremolieres, A., Duval, J.C., Ambard-Bretteville, F., Dubacq, J.P. (1982) Study of the supramolecular organization of light-harvesting chlorophyll protein (LHCP): Conversion of the oligomeric form into the monomeric one by phospholipase A2 and reconstitution with liposomes. *FEBS Lett.* 137: 271-175.
- Rhee, K.H.,** Morris, E.P., Barber, J., Kühlbrandt, W. (1998) Three- dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8Å resolution. *Nature.* 396: 283-286.
- Rintamäki, E.,** Kettunen, R., Aro, E.M. (1996) Differential D1 dephosphorylation in functional and photodamaged photosystem II centers. Dephosphorylation is a prerequisite for degradation of damaged D1. *J. Biol. Chem.* 271: 14870-14875.
- Rintamäki, E.,** Martinsuo, P., Pursiheimo, S., Aro, E.M. (2000) Cooperative regulation of light-harvesting complex II phosphorylation via the plastoquinol and ferredoxin-thioredoxin system in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 11644-11649.

- Rochaix, J.D.** (1995) *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annu Rev Genet.* 29: 209-230.
- Rögner, M.,** Dekker, J.P., Boekema, E.J., Witt, H.T. (1987) Size, shape and mass of the oxygen-evolving photosystem II complex from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. *FEBS Lett.* 219: 207-211.
- Rögner, M.,** Boekema, E.J., Barber, J. (1996) How does photosystem 2 split water? The structural basis of efficient energy conversion. *Trends in Biochemical Sciences* 21: 44-49.
- Ruban, A.V.,** Wentworth, M., Yakushevskaya, A.E., Andersson, J., Lee, P.J., Keegstra, W., Dekker, J.P., Boekema, E.J., Jansson, S., Horton, P. (2003) Plants lacking the main light-harvesting complex retain photosystem II macro-organization. *Nature.* 421: 648-652.
- Saiki, R.K.,** Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230: 1350-1354.
- Sambrook, J.,** Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) In: *Molecular cloning* (Ford, N., Nolan, C., Ferguson, M. eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition.
- Scheller, H.V.,** Jensen, P.E., Haldrup, A., Lunde, C., Knoetzel, J. (2001) Role of subunits in eukaryotic Photosystem I. *Biochim Biophys Acta* 1507: 41-60.
- Schindelin, H.,** Jiang, W., Inouye, M., Heinemann, U. (1994) Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 5119-5123.
- Schönfeld, C.,** Borgstädt, R., Kienast, A., Nixon, P.J., Kruse, O. (2004) Mitochondrial transcription factor MOC1 is important for coordinating photosynthesis and respiration in plant cells. Zur Veröffentlichung eingereicht.
- Schnell, D.J.,** Blobel, G. (1993) Identification of intermediates in the pathway of protein import into chloroplasts and their localization to envelope contact sites. *The Journal of Cell Biology* 120: 103-115.
- Schopfer, P.,** Brennicke, A. (1999) *Pflanzenphysiologie.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Deutschland.
- Shepherd, H.S.,** Ledoigt, G., Howell, S.H. (1983) Regulation of light-harvesting chlorophyll-binding protein (LHCP) mRNA accumulation during the cell cycle in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell.* 32: 99-107.
- Shimogawara, K.,** Fujiwara, S., Grossman, A., Usuda, H. (1998) High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics.* 148: 1821-1828.

- Shrager, J.**, Hauser, C., Chang, C.W., Harris, E.H., Davies, J., McDermott, J., Tamse, R., Zhang, Z., Grossman, A.R. (2003) *Chlamydomonas reinhardtii* genome project. A guide to the generation and use of the cDNA information. *Plant Physiol.* 131: 401-408.
- Siebert, P.D.**, Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S.A. (1995) An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 23: 1087-1088.
- Silflow, C.D.** (1998) Organization of the nuclear genome; In: *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas* (Rochaix, J.D., Goldschmidt-Clermont, M., Merchant, S. eds.); Kluwer Academic Publishers; Kap. 3: 25-40.
- Silverstein, T.**, Cheng, L., Allen, J.F. (1993) Chloroplast thylakoid protein phosphatase reactions are redox-independent and kinetically heterogeneous. *FEBS Letters* 334: 101-105.
- Snyders, S.**, Kohorn, B.D. (1999) TAKs, Thylakoid membrane protein kinases associated with energy transduction. *J. Biol. Chem.* 274: 9137-9140.
- Sokolenko, A.**, Fulgosi, H., Gal, A., Altschmied, L., Ohad, I., Herrmann, R.G. (1995) The 64 kDa polypeptide of spinach may not be the LHCII kinase, but a lumen-located polyphenol oxidase. *FEBS Lett.* 371: 176-180.
- Sommerville, J.** (1999) Activities of cold-shock domain proteins in translation control. *Bioessays.* 21: 319-325.
- Soulard, M.**, Della Valle, V., Siomi, M.C., Pinol-Roma, S., Codogno, P., Bauvy, C., Bellini, M., Lacroix, J.C., Monod, G., Dreyfuss, G., et al. (1993) hnRNP G: sequence and characterization of a glycosylated RNA-binding protein. *Nucleic Acids Res.* 21: 4210-4217.
- Stauber, E.J.**, Fink, A., Markert, C., Kruse, O., Johanningmeier, U., Hippler, M. (2003) Proteomics of *Chlamydomonas reinhardtii* Light-Harvesting Proteins. *Eukaryot Cell.* 2: 978-994.
- Stevens, D.R.**, Rochaix, J.D., Purton, S. (1996) The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol Gen Genet.* 251: 23-30.
- Stewart, D.H.**, Brudvig, G.W. (1998) Cytochrome b559 of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1367: 63-87.
- Strauss, C.**, Mussnug, J.H., Kruse, O. (2001) Ligation-mediated suppression-PCR as a powerful tool to analyse nuclear gene sequences in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.* 70: 311-320.
- Stroebel, D.**, Choquet, Y., Popot, J.L., Picot, D. (2003) An atypical haem in the cytochrome b(6)f complex. *Nature.* 426: 413-418.

- Swiatek, M.**, Kuras, R., Sokolenko, A., Higgs, D., Olive, J., Cinque, G., Müller, B., Eichacker, L.A., Stern, D.B., Bassi, R., Herrmann, R.G., Wollman, F.A. (2001) The chloroplast gene *ycf9* encodes a photosystem II (PSII) core subunit, PsbZ, that participates in PSII supramolecular architecture. *Plant Cell* 13(6): 1347-1356.
- Tam, L.W.**, Lefebvre, P.A. (1993) Cloning of flagellar genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by DNA insertional mutagenesis. *Genetics* 135: 375-384.
- Teramoto, H.**, Ono, T., Minagawa, J. (2001) Identification of Lhcb gene family encoding the light-harvesting chlorophyll-a/b proteins of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 42: 849-856.
- Teramoto, H.**, Nakamori, A., Minagawa, J., Ono, T.A. (2002) Light-intensity-dependent expression of Lhc gene family encoding light-harvesting chlorophyll-a/b proteins of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 130: 325-333.
- Thompson, J.D.**, Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Tian, F.**, Ma, Y., Kouranov, A., LaSala, S.E., Schnell, D.J. (1995) Molecular dissection of the mechanism of protein import into chloroplasts. *Cold spring harbor symposia on quantitative biology* Vol. LX.
- Togasaki, R.K.**, Surzycki, S.J. (1998) Perspectives on early research on photosynthesis in *Chlamydomonas*; In: *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas* (Rochaix, J.D., Goldschmidt-Clermont, M., Merchant, S. eds.); Kluwer Academic Publishers; Kap. 2: 13-23.
- Trebst, A.** (2003) Function of beta-carotene and tocopherol in photosystem II. *Z Naturforsch [C]*. 58: 609-620.
- Turner, B.M.** (1983) The use of alkaline-phosphate-conjugated second antibody for the visualization of electrophoretically separated proteins recognized by monoclonal antibodies. *Journal of immunological methods* 63: 1-6.
- Vahrenholz, C.**, Riemen, G., Pratje, E., Dujon, B., Michaelis, G. (1993) Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication. *Curr Genet.* 24: 241-247.
- Vallon, O.**, Wollman, F.A. and Olive, J. (1986) Lateral distribution of the main protein complexes of the photosynthetic apparatus in *Chlamydomonas reinhardtii* and in spinach: an immunocytochemical study using intact thylakoid membranes and PS II enriched membrane preparation. *Photobiochem. Photobiophys.* 12: 203-220.

van Thor, J.J., Mullineaux, C.W., Matthijs, H.C.P., Hellingwerf, K.J. (1998) Light harvesting and state transitions in cyanobacteria. *Bot. Acta* 111: 430-443.

Vener, A.V., van Kan, P.J.M., Gal, A., Andersson, B., Ohad, I. (1995) Activation / deactivation cycle of redox - controlled thylakoid protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 270: 25225-25232.

Vener, A.V., van Kan, P.J.M., Rich, P.R., Ohad, I., Andersson, B. (1997) Plastochinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome bf mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: thylakoid protein kinase deactivation by a single-turnover flash. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1585-1590.

Villarejo, M.R., Zabin, I. (1974) Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J. Bacteriol.* 120: 466-474.

Vosseller, K., Sakabe, K., Wells, L., Hart, G.W. (2002) Diverse regulation of protein function by O-GlcNAc: a nuclear and cytoplasmic carbohydrate post-translational modification. *Curr Opin Chem Biol.* 6: 851-857.

Weighardt, F., Biamonti, G., Riva, S. (1996) The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNP) in RNA metabolism. *Bioessays.* 18: 747-756.

Wollman, F.A., Delepelaire, P. (1984) Correlation between changes in light energy distribution and changes in thylakoid membrane polypeptide phosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol.* 98: 1-7.

Wollman, F.A., Minai, L., Nechushtai, R. (1999) The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1411: 21-85.

Wollman, F.A. (2001) State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO J.* 20: 3623-3630.

Wood, Z.A., Schröder, E., Harris, J.R., Poole, L.B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci.* 28: 32-40.

Yakushevskaya, A.E., Keegstra, W., Boekema, E.J., Dekker, J.P., Andersson, J., Jansson, S., Ruban, A.V., Horton, P. (2003) The structure of photosystem II in *Arabidopsis*: localization of the CP26 and CP29 antenna complexes. *Biochemistry.* 42: 608-613.

Yang, D.H., Andersson, B., Aro, E.M., Ohad, I. (2001) The redox state of the plastoquinone pool controls the level of the light-harvesting chlorophyll a/b binding protein complex II (LHC II) during photoacclimation. *Photosynth. Res.* 68: 163-174.

Zer, H., Ohad, I. (1995) Photoinactivation of photosystem II induces changes in the photochemical reaction center II abolishing the regulatory role of the QB site in the D1 protein degradation. *Eur J Biochem.* 231: 448-453.

Zhang, H., Huang, D., Cramer, W.A. (1999) Stoichiometrically bound beta-carotene in the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis protects against oxygen damage. *J. Biol. Chem.* 274: 1581-1587.

Zhang, H., Whitelegge, J.P., Cramer, W.A. (2001) Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase is a subunit of the chloroplast cytochrome b6f complex. *J. Biol. Chem.* 276: 38159-38165.

Zito, F., Finazzi, G., Delosme, R., Nitschke, W., Picot, D., Wollman, F.A. (1999) The Qo site of cytochrome b6f complexes controls the activation of the LHCII kinase. *EMBO J.* 18: 2961-2969.

Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., Orth, P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongates* at 3.8Å resolution. *Nature.* 409: 739-742.

7. ANHANG

7.1. EIGENE PUBLIKATIONEN

Mussnug, J.H. (2000) Systematische molekulargenetische Identifizierung von TAK Insertionsmutanten der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Diplomarbeit angefertigt an der Universität Bielefeld, Lehrstuhl für Zellphysiologie.

Strauss, C., Mussnug, J.H., Kruse, O. (2001) Ligation-mediated suppression-PCR as a powerful tool to analyse nuclear gene sequences in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth Res.* 70: 311-320.

Kruse, O., Borgstädt, R., Mussnug, J.H., Schönfeld, C. (2002) Structural and functional aspects of phosphatidyl glycerol binding and covalent modification by reversible phosphorylation in the LHCII-PSII supercomplex. *Recent Res. Devel. Plant Phyiol.* 3: 211-225.

Hagenstein, M.C., Mussnug, J.H., Lotte, K., Plessow, R., Brockhinke, A., Kruse, O., Sewald, N. (2003) Affinity-based tagging of protein families with reversible inhibitors: a concept for functional proteomics. *Angew. Chem. Int Ed.* 42: 5635-5638.

Mussnug, J.H., Hamilton, M., Elles, I., Kapazoglou, A., Fink, A., Kahmann, U., Mullineaux, C.W., Nickelsen, J., Hippler, M., Nixon, P.J., Kruse, O. (2004) The nuclear factor NAB1 controls translation of LHCII proteins in *Chlamydomonas reinhardtii*. Wird zur Veröffentlichung eingereicht.

7.2. AKTIVE TEILNAHME AN TAGUNGEN UND SYMPOSIEN

Botanikertagung (2000) in Jena, Poster-Präsentation.

Symposium der Forschergruppe FOR 387 (2001), Vortrag, Poster-Präsentation.

10. Photosynthese Workshop NW der GBM (2001) in Münster, Vortrag.

Dabringhausen (2002), Poster-Präsentation.

Botanikertagung (2002) in Freiburg, Poster-Präsentation.

Internationale Redox- Tagung (2002) in Bielefeld, Poster-Präsentation.

11. Photosynthese Workshop NW der GBM (2002) in Bielefeld, Organisation und Chair.

12. Photosynthese Workshop NW der GBM (2003) in Bochum, Vortrag.

7.3. VERÖFFENTLICHTE SEQUENZEN

7.3.1. Nab1-DNA-Sequenz (GenBank-Nummer AY157846)

ccgaaacaaccactgaacgtctttgacgtggtataaatgcatctgtccccagtgcccctacctaacacccgagcagactcaagccccaccaa
 atccgtgataggcagttgtccagggtttccattgctcgcacaaatatttattaataaattaaagcaataaagacacagagtcagcaaaaatgg
 cctgcaagcgagagagtgcccttcgagcattgacagccgggagggctctgcgtcgcgcacgccaagctacggcacaattcagtagcttta
 tcatctgccaagtcagaactgcgtgtcagcgcgaatgcccgggaaagcaaacgtcggcgtaccgagatccgtacagagatcggggca
 atctcccgaagcacactgacgctgcgctgtcgtcgggttcgcccagacctgttacatctacctgggcatcgcgtgccctgcgtgccc
 acaagctggccccagaccgcccactgagcaggggggctcggggaatgggagcagcagctgaggcaacaggggaaccgtaaaagtg
 tcaacgccaccaaaaggcttcggcttcatcacgcctgggtggggggcagggacctcttctgaccaggtcagcaagctggcgtggcgatg
 ggccccccgatacgcgggaccgggtcagggctggaggccatcgcgcgcagcagtggtgctgacgtggatcatttctgcagcgcggggc
 ctgtcagctgcggtgacgtccgattatgactgtcgttcggcatgcccggctgcccgcacattcagctctcagctgacgtctccgggtaccag
 cgcattggggccgggctgacaatgattacagctgcggtaatatttccgtagtatcgcggcaatcggcgcctcagcagcaaacgcattcgtg
 cgttggcatgctccgcgagaccaacatcaactcggagggttccgcagcctcggggaggggtaagtcgtcaggtcaggggtgaggtcggg
 ccggatggacgcttaaggctgtgaacgtgacgggccccggaggggccgcggccaggtgaggggagccaggggtttgcgtcgtcggcct
 gcgcgcggccgactggccatcgcgcgatgctcaaatgtagcaaggatgatgatgctcatttttctgatttccgacgcgagcggggtcgc
 ggtaacgattggagcgggagctgtcgcgaactgcctgcacacgcttttaccggcctgctcggccctgcgttctgacacccggcgcagggc
 gctccgcggaacttccgcggtggcggccgcggccgcggcgcctcgcggcggccgcggcggctatgctgctgcgtacggctaccgcag
 atggcgcggcttaccggctactacttcttccccgggtggggtggcaccagaattgctgatgggtcgggagcgtaacgggtgggtatgga
 tattgtaatgccagcgcagcggcagtcagcgtcaggaagcacatggtggagcaacaggcgtggcggcggcagttggagcagcagcaa
 cagcagccccggcggagttgtagctgacgtggtgacggcggcagcggactctccagtcgcggctgctgacgtgatggcgcgagagttcac
 ggagacgtctgggctaaggcagcagctcaggttggccggcgggtcagcagcagcagctgacgtcttatttggcggcgtggtggcggg
 ggggagcgtgctgagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 cgacgcagggcgggagagcgtgacgtcgtccccggctcggacgctcggctgacgttaccaccaggagcagagcgggcccgcgcgatt
 gccgacgcttgcgtcagcgtccgtagtccgcagtggtcagctatcagggaaccgcttctgggagatggtgggtgcgtgctcgggctc
 gtcacagcctgggagctccacaagtgtattatgctgtgtgctcctctcggcaccgctcggctcattgcaaccccgccgctcgcgcccgtc
 ccacgttaacctgcttccgcttgcgtctacctgcctcgcgcagaccacgggcccggggaggggtcgcggcggccgcggcggcggc
 catgcccgcctcagggcgtgatcggggtgggcgtaccgggcatgcccattggcgggggtgggcatggagccgacgggagcagccgtc
 ggggtcgcaggtgaggagcagcggagcgggcccggggcggaaagggcggtaggggcccaggggtggagagctgggtggcgtgcat
 gggggtggggcggcaggctgtgtttgtgagcagtagccgtggcgcaggggtggcgcgtgccaggcggcgtggatgggtcagcttaccg
 tcgaagacggaccgacctgtgctgtggaaccaccgcatgctgaccgctcgcgtgctgctccccgccccacgacagtggtggtg
 cacaacctgcccgtggagctgccagtgccagtcagcagcctcaaggaccactcaaggagtggcgggtggagcgcgacagctgctgacgagcc
 tggggccgctcgcgtgagaacgcgggagcgggtggaggggaggggctcgggtgggtggaaggctgtgggtggcgcggggtcgtactc
 tggggtgggtcctaaggagtgaaactggtggtcaccagggtatggtcagctgtgacaggaaggcagggctcctcggggcatttcc
 tatcatatttcttagccttcatctgcggtttgtgtggttctcgtcaccgctgacccgtgttggctacaggggtcggcaccgtgcttaccgac
 caaggaggacggcggcagcggcgtgcgacaagtgaacaacagccaaatcgacgggcccagcagataagcgtccggctcagccgttctgctg
 agggccggtgacggctcccacgcatatctgaccaggccgcgctcgggtgacagccaagctgcccgcctgaccagactgctgcc
 gccgctgttcccacaatcacggctggcgcactgaagcagcagctccagcgcagcagcattcccgcgccaaggccgggcccgggtggtg
 ggtgtgtagcagctgtggcggatgtattcagccgacgacagcactgtaggaagatgtgtgctggagccaatctgccccttcaatgcaaggctg
 ggcttctagctcaaaccagagaagagattaccacaactcggcagcttccgcagtttgcagatagaaatagggtatccctagggtcac
 ccatgcccttgcggcctgtacacatccattgacaactccgtgccagcgcctgactcccccttggactagtgcttttattgactcatatggttggctg
 ctatccggtgtgctcggcggccgggagggcgtcgtgctctcatgtgtcgggtgtgtgaccgggtgtgtggcctgtgcaatccgttgatgca
 agccaaatccaggacgtccgtcattcgggtgtgaccccgcctgaggctcggcagcagattgctcgaatcggcttggcaacagttgacagtagt
 gctgcaatggactgttagaatgcgcgtggttggcgcggaaggctgtgtctcggggcagatggttattggcggcccgtgactactagcc
 gcaacacgggtgtgtggcagctgtttacgggctgctgctcgggttgcggcgtcggggtgacaggtgcccggcgttaggataggcgtgc
 gtccggcattgctgttggctcctccccggcggcgtgggattgaagttaggcagagggcggcaatcgcaatgttcggggcggggtgggctgt
 tgcagcgaataaggctggaagctcagcagcggcgcgaagatcgggacagaatgagcgcgctgtcagctggtcccacgactaagtc
 cgagtggagttccgaaaatgacaggaggagtgatgtgagtcgggtccagacacggatgacgaggggtcgtggccatccccctgtgttgg
 gtgcaaggcggccccccagaagtgaggaccgaccagcgcgctactgctgtaaacggccccgactggatggcactggaccgaccac
 actgcaaccaacacgggtatgacggcgtggaagagtggtcaaacagcagcagcgggtctggaagagtg

Farblich markiert sind Startcodon (grün), Stoppcodon (rot) sowie dazwischen gelegene Exons (gelb).

7.3.2. NAB1-Aminosäure-Sequenz (TrEMBL-Nummer Q8GV23)

MGEQLRQQGTVKWFNATKGFGITPGGGEDLFVHQTINSEGFRLREGEVVEFEVEAGPDGRSK
 AVNVTGPGGAAPEGAPRNF RGGGRGRGRAR GARGGYAAAYGYPQMAPVYPGYFFPADPTGRGR
 GRGGRRGAMPAMQGVMPGVAYPGMPMGVGMPTGEPGLQVVVHNLPSQWQQLKDFKE
 WRVERADVYDAWGRSRGFGTVRFTTKEDAATACDKLNNSQIDGRTISVRLDRFA

Farblich markiert sind CSD-Bereich (blau), RGG und RXR-Motive (rot) und RRM-Bereich (grün).

7.3.3. Lhcbm8-cDNA-Sequenz (GenBank-Nummer AF330793)

agcaggctgtctataccaatcaaaatg gccgccatcatgaagtcctccgtccgcagctccgtgcctccaccgtgagcagccggctctgctcgcg
 tgggtccccgcgctgccatcgagtggtacggccccgaccgcccgaagttcctggcccccttctggaggcgacacccccgcctacctgactg
 gcgagttccccggcgactacggctgggacaccgcccgtctgctggctgacccggagacctcaagcgtaccgcgagctggagctgatcca
 cggccgctgggcatgctggcgctctggctgcatcaccgagctgctggccaagaacggcatcccgttcggtgaggctgctggtcaa
 ggccggcgcccagatctcgtgagggcgctgaaactacctcggaacgagaacctgatccacgcccagtcctcatcgccaccctggcct
 tccaggttggtgatggcctggctgaggcctaccgccaacggctggccccctggcgaggcctggacccccctgacccccggtggtgcc
 ttgacccccctggcctggctgacgacccccgacacctcgtgagctgaaggtgaaggagatcaagaacggccgctggtatggttccatgt
 tcggcttctcgtccaggccatcgtgaccggcaaggccccatccagaacctggacgaccacctggccaacccccaccgcccgtgaacgcgttc
 gcctacgccaccaagttacccccctggcc taaattttggcctcggcagctgcatgtactggcgtgattgagcggagatgaagaggagcgc
 ggtgtcgatacagtgtagccttttcacaggcttaggagcgcgagggacgtgcgattaaccgaagtggcgggtgctacgtgctacggaggt
 tcaggtttgtgctgggtttgcttgcggctcatgacgccccctgagaagactaaaaatggctgacggccactggtatggtggttgcgattgcc
 ttggtgtaaacaggcaaggattcaaaaaaaaaaaaaaaaa

Farblich markiert sind Startcodon (grün), Stoppcodon (rot).

7.3.4. LHCBM8-Aminosäure-Sequenz (TrEMBL-Nummer Q9AXF6)

MAAIMKSSVRSSVRSTVSSRSARVVPRAAIEWYGPDRPKFLGPFSEGDTPAYLTGEFFPGDYGWDTA
 GLSADPETFKRYRELELIHARWAMLGALGCITPELLAKNGIPFGEAVWFKAGAQIFAEGGLNYLGNEN
 LIHAQSIIATLAFQVVVMGLAEAYRANGGPLGELDPLHPGGAFDPLGLADDPDTFAELKVKEIKNGRL
 AMFSMFGFFVQAIVTGKGPIQNLDDHLANPTAVNAFAYATKFTPSA