
**Systematische Proteomanalyse zur Optimierung des
biosolaren H₂-Produktionsprozesses in der
einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii***

**Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
vorgelegt
von**

Julia Beckmann

**Angefertigt an der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld
Lehrstuhl für Algenbiotechnologie und Bioenergie
unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Olaf Kruse**

Dezember 2012

1. ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2. EINLEITUNG.....	3
2.1 Zukünftige bioenergetische Perspektiven	3
2.1.1 Einzellige Grünalge <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	4
2.2 Photosynthese	5
2.2.1 Aerobe Photosynthese	5
2.2.2 Zyklischer Elektronentransport	8
2.2.3 Anoxygene Photosynthese	10
2.2.4 PS II unabhängige Elektronenquellen während der anoxygenen Photosynthese	11
2.2.5 Wasserstoff -Produzenten und wasserstoffsynthetisierende Enzyme	13
2.2.6 Konkurrenzreaktionen zur Hydrogenase	15
2.3 Intrazelluläre Veränderungen durch Schwefelmangel und Anaerobie	17
2.4 Reaktionen innerhalb der Mitochondrien	19
2.5 Die Umwandlungseffizienz von Licht zu Biomasse in <i>C. reinhardtii</i>	22
2.5.1 Lichtsammelantennenkomplexe	22
2.5.2 Cytosolischer Translationsrepressor NAB1	22
2.5.3 Photosynthetische Umwandlungseffizienz	23
2.6 Proteomics.....	25
2.6.1 Die Rich-Internet-Applikation QuPE	27
3. MATERIAL UND METHODEN.....	30
3.1 Eingesetzte Zelllinien, Kultivierungsbedingungen und Bezugsgrößen	30
3.1.1 Die einzellige Grünalge <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	30
3.1.2 <i>Escherischia coli</i> (<i>E. coli</i>)	31
3.1.3 Zellzahlbestimmung	32
3.1.4 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes	33
3.1.5 Messung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung	33
3.1.6 Chlorophyll a Fluoreszenz Messung mittels PAM-Fluorometrie	33
3.1.7 Proteinbestimmung nach Bradford	34
3.2 Molekularbiologische Methoden	35
3.2.1 DNA-Isolierung	35
3.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus <i>C. reinhardtii</i> mit der CTAB Methode	35
3.2.1.2 Isolierung von Plasmid DNA aus <i>Escherischia coli</i>	36
3.2.1.3 Plasmid-Isolierung mit Mini-Prep	36
3.2.2 RNA-Isolierung aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	37
3.2.2.1 RNA-Isolierung aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	37
3.2.2.2 DNaseI Verdau	38
3.2.2.3 Formaldehydgel	39
3.2.3 DNA-Transformationen von Zellkulturen	40
3.2.3.1 Kerntransformation von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	40
3.2.3.2 Konstruktion der <i>Chlamydomonas</i> Mutante <i>Stm6Glc4T7</i>	41
3.2.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	41
3.2.4.1 Standard-PCR	41
3.2.4.2 Amplifikation von RNA (RT-PCR, qRT-PCR)	42
3.2.4.3 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	43
3.2.4.4 Single-step real-time-PCR mit SYBR Green I.....	44
3.2.4.5 Bestimmungen der Expressionslevel	47
3.2.4.6 Verwendete Oligonukleotide	47
3.2.5 Bestimmung der Wasserstoffproduktionskapazität und des Proteomes von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	50
3.2.5.1 Aufbau der Wasserstoffexperimente und Algen-Kultivierung.....	50
3.2.5.2 Gaschromatographie	51
3.2.6 Proteom-Analysen	51
3.2.6.1 Chloroplasten-Isolierung	51
3.2.6.2 Immuno- <i>blot</i> -Experimente.....	52
3.2.6.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; 1D-Gelelektrophorese)	52
3.2.6.4 Elektrobplot und Detektion mittels Chemilumineszenz.....	53
3.2.6.5 Coomassie-Blau-Färbung	55

3.2.6.6	Tryptischer Verdau.....	56
3.2.6.7	Massenspektroskopie.....	57
3.2.6.8	Vorgehensweise zur Proteinidentifizierung und Quantifizierung.....	57
4.	ZIELSETZUNG	59
5.	ERGEBNISSE.....	60
5.1.1	Überexpression des modifizierten Translationsrepressors NAB1* in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Stm6Glc4</i> und Isolierung positiver Mutanten.....	60
5.1.1.1	Transformation des Vektors pGDN3Cys(181/226)Ser in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Stm6Glc4</i>	60
5.1.1.2	Ermittlung der nukleären Integration und Selektion der Zufalls-Insertions-Mutanten von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Stm6Glc4</i>	61
5.1.2	Phänotypische Charakterisierung der selektierten Mutanten <i>Stm6Glc4T7</i>, <i>T13</i>, <i>T22</i>, <i>T69</i>	63
5.1.2.1	Phänotypische Charakterisierung der selektierten Mutanten <i>Stm6Glc4T7</i> , <i>T13</i> , <i>T22</i> , <i>T69</i> durch spektrophotometrische Messung der Chlorophyll Parameter	64
5.1.2.2	Wachstumskinetiken von <i>Stm6Glc4T7</i> als Mutante mit verbesserter photochemischer Konversionseffizienz.....	65
5.1.2.2.1	Autotrophe Wachstumsexperimente unter Starklichtapplikation.....	65
5.1.2.2.2	Aufbau von Biomasse unter autotrophen Kultivierungsbedingungen	67
5.1.3	Analysen des modifizierten NAB1 auf unterschiedlichen Ebenen der Expression	69
5.1.3.1	Nachweis des <i>nab1</i> * Transkriptes mittels RT-PCR.....	69
5.1.3.2	Relative Quantifizierung des Transkriptlevels.....	70
5.1.3.3	Quantifizierung der modifizierten und der endogenen <i>nab1</i> -mRNA	72
5.1.3.4	Immunoblot-Experimente zum Nachweis funktioneller NAB1* Expression	73
5.1.4	Untersuchungen zur photosynthetischen Aktivität	74
5.1.4.1	Chlorophyll a Fluoreszenz als Indikator für photosynthetische Lichtumwandlung unter steigenden Lichtbedingungen.....	74
5.1.4.2	Sauerstoffmessung.....	76
5.1.4.3	Wasserstoff-Messungen	77
5.2	Ergebnisse der Proteom-Analyse.....	79
5.2.1	Ziel der Proteom-Untersuchung.....	79
5.3	Einführung und Vorversuche.....	81
5.3.1	Wasserstoffproduktion.....	81
5.3.2	Etablierung optimaler Bedingungen.....	81
5.3.3	Auswahl des geeigneten Vergleichsstamm	82
5.3.4	Analyse der H₂ Produktion.....	83
5.3.5	Proteomics	85
5.3.6	Überblick.....	91
5.4	Stoffwechsel Wege	95
5.4.1	Schwefel –Akquisition	95
5.4.2	Energie- und Kohlenhydrat Metabolismus.....	98
5.4.2.1	Photosynthese (Lichtreaktion).....	98
5.4.2.2	Calvin-Benson-Zyklus.....	105
5.4.2.3	Glykolyse	107
5.4.2.4	Stärkestoffwechsel.....	110
5.4.2.5	Pentosephosphat Zyklus	113
5.4.3	Mitochondrielle Stoffwechselwege	115
5.4.3.1	Citratzyklus	116
5.4.3.2	Atmungskette	120
5.4.3.3	Vergleich der Atmungsraten von <i>Stm6Glc4</i> und <i>cc406</i> unter Standardwachstumsbedingungen	127
5.4.4	Weitere Stoffwechselwege.....	129
5.4.4.1	Fermentation.....	129
5.4.5	Zusammenfassung beider Teilprojekte	132
6.	DISKUSSION	134
6.1	Erzeugung einer neuen Zelllinie <i>Stm6Glc4T7</i> mit einer verkleinerten Lichtsammelantenne	137
6.1.1	Gründe für die Auswahl der Mutante <i>Stm6Glc4</i> als parentalen Stamm.....	137
6.1.2	Die gezielte De-Regulation der cytosolischen Translation von LHCII mRNAs als Strategie zur Verkleinerung der Lichtsammelantenne.....	139

6.2	Proteom-Studie als Bestandteil eines systembiologischen Ansatzes zur Charakterisierung der Wasserstoffproduktion in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	142
6.2.1	Photobiologische Wasserstoffproduktion	143
6.2.2	Frühere Untersuchungen des Proteoms H₂ produzierender <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Zellen	145
6.2.3	Quantitative Proteom-Untersuchung mittels <i>sprctral counting</i> und ¹⁵N-Markierung	145
6.2.4	Der Schwefelstoffwechsel von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> unter H₂ produzierenden Bedingungen	149
6.2.5	Die Expression fermentativer Enzyme unter H₂ produzierenden Bedingungen 150	
6.2.6	Auswirkungen von Schwefelmangel und Anaerobie auf die Expression photosynthetischer Gene	153
6.2.7	Kohlenstoff-Metabolismus	156
6.2.7.1	Calvin Zyklus	156
6.2.7.2	Oxidativer Pentosephosphat Weg	157
6.2.7.3	Synthese und Abbau von Stärke	158
6.2.8	Ein erhöhter respiratorischer Acetat-Verbrauch führt zu einer erhöhten Wasserstoff-Produktion in <i>C. reinhardtii</i>	160
6.2.9	Zusammenfassung der erhaltenen Daten	163
6.2.10	Ausblick	166
7.	LITERATURVERZEICHNIS	168
8.	ABKÜRZUNGEN	187
9.	DANKSAGUNG	190
10.	GUTACHTER	191
11.	ERKLÄRUNG	192
12.	VERÖFFENTLICHUNGEN	193

1. Zusammenfassung

Pflanzliche Biomasse ist in den vergangenen Jahren zunehmend als nachhaltige und klima-freundliche Energieressource diskutiert worden. Der wirtschaftliche Nutzen phototropher Mikroorganismen als erneuerbarer Energieträger hängt von der Effizienz ab, mit der die Sonnenenergie in Biomasse oder in nachhaltige, hochwertige Produkte umgewandelt wird. Zudem nimmt der vielseitige und flexible Metabolismus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* durch sein komplexes Adaptationsverhalten auch unter anaeroben Bedingungen im Hinblick auf regenerierbare Energieträger eine besondere Stellung ein.

Mit der vorliegenden Arbeit wird das komplexe physiologische Netzwerk der photosynthetischen Umwandlungseffizienz aus verschiedenen Blickwinkeln betrachtet, weshalb die Arbeit aus zwei unterschiedlichen Vorgehensweisen besteht. Als Basis für eine zukünftige ökonomische Nutzung von Grünalgen verfolgen beide Ansätze die Untersuchung der Umwandlungseffizienz der absorbierten Lichtenergie in Biomasse oder in den Energieträger Wasserstoff (H_2). Dabei setzte die erste Strategie direkt am Photosynthese-Apparat an, indem das Photosystem II (PS II)-assoziierte Lichtsammelsystem durch gentechnologische Manipulation verkleinert werden soll. Während der zweite Ansatz auf einer Untersuchung des Proteoms zur Charakterisierung des photobiologischen H_2 -Produktionsprozesses nach Induktion durch Schwefelmangel abzielt, um die besten Konditionen für eine optimale und langanhaltende H_2 -Produktionskapazitäten in *Chlamydomonas reinhardtii* bestimmen zu können. Derartige Einblicke sollen zukünftig das Verständnis des H_2 -Produktionsprozesses verbessern.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die *Chlamydomonas* Mutante *Stm6Glc4T7* generiert, welche aus einer hochproduzierenden Wasserstoff-Mutanten-Linie hervorgegangen ist (Schönfeld et al., 2004; Kruse et al., 2005; Doebbe et al., 2007) und ein verkleinertes Lichtsammelsystem am Photosystem II besitzt. In *Stm6Glc4T7* konnte sehr erfolgreich die Akkumulation von Biomasse gegenüber den Vorgängern gesteigert werden (Beckmann et al., 2010). Die Reduktion der Antennengröße in *Stm6Glc4T7* um lediglich 10 – 17% im Vergleich zu *Stm6Glc4* resultierte in einer nahezu 50% Verbesserung der photosynthetischen Effizienz bei sättigenden Lichtbedingungen. Zudem wies diese dritte Generation hochproduzierenden H_2 -Zelllinien eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber photoinhibitorischen Effekten auf (Beckmann et al., 2009). Derart erweist sich die letzte Generation dieser Mutanten-Linie ebenfalls als ein vielversprechender Kandidat für

Optimierungen, in denen die Produktion von Wasserstoff im Fokus steht, allerdings sind hierfür weitere Analysen essentiell.

Mit dem zweiten Ansatz der vorliegenden Studie wurde die Veränderung der Proteinzusammensetzung einer stark H₂-produzierenden Mutante (*Stm6Glc4*) mit einem Wildtyp (*cc406*) vor und während der H₂-Produktion verglichen, um Unterschiede im Expressionsmuster zu bestimmen. Aufschlussreiche Ergebnisse konnten bereits vor der Induktion der Anaerobie- bzw. H₂-Produktion detektiert werden. Die Isocitratlyase, welche für einen effizienten Acetat-Katabolismus verantwortlich ist, wurde in der Mutante deutlich öfter detektiert und liefert damit eine mögliche Erklärung für den höheren Acetatverbrauch. Dieser wird durch höhere Atmungsraten aufgrund der verstärkten Expression einiger Atmungsketten-Komponenten begleitet. Zudem zeigen die Proteomdaten eine intensive Nutzung des Cyanid-insensitiven Weges der mitochondrialen Respiration an, da die Alternative Oxidase (AOX1) verstärkt exprimiert wird. Ergänzend nahm ein Kernelement des funktionellen PS II-Komplexes, das D1 Protein, im Wildtyp unter H₂-produzierenden Bedingungen stärker ab als in der Mutante. Auf diese Weise könnte die höhere Restaktivität von PS II unter H₂-produzierenden Bedingungen zur höheren H₂-Produktionsrate in *Stm6Glc4* beitragen.

Desweiteren existieren eine Vielzahl an Konkurrenzreaktionen hinsichtlich des fermentativen Wasserstoff-Metabolismus. In vorangegangenen Studien konnte beschrieben werden, dass der parentale Stamm von *Stm6Glc4* (*Stm6*) im Licht in *state I* blockiert ist (Schönfeld et al., 2004). Den Proteinen PGRL1 und PGR5 wird bei der Etablierung des zyklischen Elektronentransports eine wichtige Funktion zugeschrieben (Tolleter et al., 2011). Die höheren Mengen an PGR5 im Wildtypen korrelieren gut mit einer höheren Aktivität zyklischer Photo-Phosphorylierung, welche eine Konkurrenzreaktion zur H₂-Produktion über den linearen Weg darstellt. Des Weiteren wurden signifikante Unterschiede in der Expression der Alkohol-Dehydrogenase (ADH1) beobachtet, wobei höhere Proteinmengen in den Wildtyp-Zellen detektiert werden konnten. Diese verstärkte Expression der ADH im Wildtypen könnte eine Konkurrenzreaktion zur Hydrogenase ausmachen, wodurch die Mutante möglicherweise eine größere Menge an Wasserstoff produziert.

Zusammenfassend zeigten diese Untersuchungen, dass die komplexe Stressantwort von *Chlamydomonas reinhardtii* nicht nur bezüglich des fermentativen Stoffwechsel und somit der H₂ Produktion in biotechnologischer Hinsicht sehr interessant ist, sondern auch aufgrund der komplexen Veränderung aus biologisch regulatorischer Sicht dieser versatilen Zellen von immenser Bedeutung ist.

2. Einleitung

2.1 Zukünftige bioenergetische Perspektiven

Aufgrund des anhaltenden ökonomischen Interesses beschäftigen sich viele wissenschaftliche Zweige mit einem effizienten Aufbau nachhaltiger, photobiologisch generierter Produkte für den menschlichen Verbrauch. Die Produktion von Biomasse ist ein wichtiges Fundament für die wirtschaftliche Anwendung von Grünalgen unabhängig davon, welche Form von chemischen Bioenergieträgern (Biodiesel, Wasserstoff) oder hochwertiger Produkte (für die Nahrungsmittelindustrie oder Pharmazie) generiert werden sollen (Mayfield et al., 2007; Melis et al., 2007; Hu et al., 2008). Diesbezüglich ist Wasserstoff ein begehrter alternativer Energieträger, da dessen Verbrennung zu keinem weiteren CO₂ Ausstoß führt (Kruse et al., 2005b; Hankamer et al., 2007). Für diese biologischen Produktionsprozesse sind große Bioaktoren von besonderem Interesse, in denen die Umwandlung des Sonnenlichts in hochwertige Produkte durch Mikroalgen erfolgt (Prince and Kheshgi, 2005). Um solche Ansätze realisieren zu können, müssen photobiologische Umwandlungsprozesse mit höchstmöglicher Effizienz erfolgen. Werden Mikroalgen unter hohen Zelldichten kultiviert, stellt insbesondere die photosynthetische Energieumwandlung der Algen einen limitierenden Faktor dar (Polle et al., 2003; Mitra et al., 2012). Die Absorption von Licht und dessen Nutzung ist ein fundamentaler Prozess photosynthetischer Organismen. Algen verfügen über eine Vielzahl an Adaptions-Mechanismen, um die Lichtsammelkomplexe der Photosysteme I und II an umweltbedingte Lichtveränderung anzupassen und verfügen damit über einen Konkurrenzvorteil gegenüber benachbarten Zellen (Kirk, 1994). Der Nachteil der Assemblierung großer Lichtsammel-Komplexe in Grünalgen besteht in den niedrigen Umwandlungseffizienzen der solaren Lichtenergie in chemische Energieträger (Kok, 1953; Myers, 1957; Radmer & Kok, 1977) aufgrund des großen Verlustes der absorbierten Energie (bis zu 90%), um photooxidative Schäden zu vermeiden (Powles, 1984; Melis, 1999; Polle et al., 2003, Mitra et al., 2012).

Die folgenden Kapitel geben nun generelle Einblicke in die aktuellen bezugsorientierten Themen beginnend mit einem Überblick über den Modellorganismus *Chlamydomonas reinhardtii*, den photosynthetischen Prozessen unter aeroben und anaeroben Konditionen, sowie der zellulären Antwort auf anaerobe und fermentative Konditionen. Desweiteren werden in den folgenden Kapiteln Aspekte der vergleichenden Proteom-Untersuchungen erörtert. Im Anschluss an die Einleitung folgen eine Einführung in die verwendeten Methoden, sowie ein detaillierter Blick in die Thematik und Aufgabenstellung dieser Arbeit anhand dargestellter Ergebnisse und deren Interpretationen.

2.1.1 Einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii ist ein gut untersuchter und seit über 100 Jahren gut etablierter Modellorganismus und erweist sich aufgrund vieler Vorteile bis in die heutige Forschungsära als ein Mittelpunkt der Forschung (Harris, 2001). *Chlamydomonas reinhardtii* liegt in zwei geschlechtlichen Formen vor (*mating type* + oder -) und kann sich daher sowohl vegetativ, als auch in einem einfachen, geschlechtlichen Zyklus vermehren. Da *Chlamydomonas reinhardtii* im vegetativen Zustand nur über einen haploiden Chromosomensatz verfügt, sind Mutationen des Nukleus nicht rezessiv.

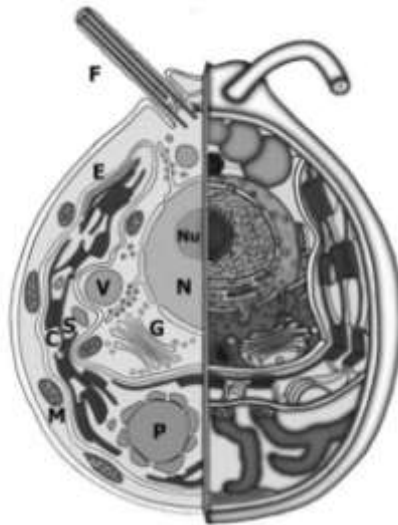


Abbildung 1: Subzelluläre Struktur von *Chlamydomonas reinhardtii*. Der Zwei- und Drei-Dimensionale Einblick in die Zelle zeigt den Kern (N) mit Nucleolus, die Flagellen (F), den becherförmigen Chloroplasten (C) mit dem Augenfleck (E), den Stärke-enthaltenen Pyrenoiden (P) und den Mitochondrien. Weiterhin lassen sich der Golgi-Apparat (G), Stärke-Körner und die Vakuole differenzieren. Aus: Nickelsen, J., Kück U., (2000)

Chlamydomonas hat bei einer Größe von ca. 10 μm den typischen Aufbau einer pflanzlichen Zelle, verfügt jedoch über nur einen Chloroplasten (Abbildung 1). Damit ist möglicherweise die beste Grundlage zur Manipulation der Chloroplasten-DNA geschaffen, weshalb dieser Organismus gerne als „green yeast“ bezeichnet wird (Gumpel et al., 1994; Rochaix 1995). Mitochondrien sind über das Cytosol verteilt und belegen nur 1 – 3 % des Zellvolumens in einer photosynthetisch-aktiven *Chlamydomonas reinhardtii*-Zelle. Als mixotropher Organismus kann Acetat als Kohlenstoffquelle genutzt werden, weshalb Mutationen im Photosynthese-Apparat nicht letal sein müssen. Weitere Vorteile beziehen sich auf die einfache und günstige Kultivierung, mit Verdopplungsraten von 10 – 15 Stunden abhängig von der kultivierten Spezies. Die Kultivierung kann in flüssigen-, als auch auf Agar-Medien erfolgen. Desweiteren machen die Entwicklung molekularer

Werkzeuge und effizienter Methoden für genetische Analysen diese Alge zu einem wertvollen Modellsystem (Rochaix, 1995). Alle drei Genome können transformiert werden (Boyton et al., 1988; Gumpel et al., 1994; Kindle, 1990). Besonders für die nukleären Gene existiert eine sehr einfache Technik (Kindle 1990). Außerdem besteht ein Transformationssystem, das die Expression endogener und heterologer DNA, sowie cDNA einfach und effizient macht (Fischer & Rochaix, 2001). Es existieren viele Selektionsverfahren für *Chlamydomonas reinhardtii* (Fleischmann et al., 1999; Kruse et al., 1999). Desweiteren bietet sich auch die Möglichkeit der experimentellen Stilllegung von Genen mittels der RNA Interferenz (RNAi) (Molnar et al., 2007).

Wie Pflanzen und andere eukaryotische Algen besitzt *Chlamydomonas* drei genetische Systeme, die im Zellkern, in den Chloroplasten und in den Mitochondrien lokalisiert sind. Das Genom ist auf allen drei Ebenen vollständig sequenziert. Mit ~ 100 Mbp befindet sich im Zellkern der Großteil der genetischen Information (Grossman et al., 2003), verteilt auf 17 Chromosomen (Kathir et al., 2003). Die Genomsequenz von *Chlamydomonas*, erhalten durch das DOE Joint Genome Institute, ist im Internet unter (<http://genome.jgi-psf.org/chlre1.home.html>) zugänglich. Insbesondere die vollständige Sequenzierung des Genoms (Merchant et al., 2007), macht *Chlamydomonas reinhardtii* für großangelegte Forschungszweige, wie die ~ omics-basierten Studien anwendbar, weil diese für die Auswertung der Ergebnisse auf etablierte Datenbanken angewiesen sind.

2.2 Photosynthese

Erst die photosynthetische Energieumwandlung der elektromagnetischen Strahlung der Sonne in chemische Energie macht den Erhalt von energiereichen Molekülen als auch von Biokraftstoffen jeglicher Art möglich. Die Photosynthese stellt fundamentale Energieressourcen, hergestellt aus Licht und Wasser, für alle lebenden Organismen bereit.

2.2.1 Aerobe Photosynthese

Die Energieumwandlung findet in der photosynthetischen Elektronentransportkette nach Absorption des Lichts statt. Die solare Umwandlung besteht in oxygenen phototrophen Organismen aus zwei Haupt-Protein-Komplexen (Photosystem I und Photosystem II, PS I und PS II), dem Cytochrom b_6f Komplex und dem ATP-Synthase Komplex (Blankenship, 2010). In einem sehr vereinfachten Schema des Prozesses nutzen die hintereinandergeschalteten Photosysteme, PS II und PS I, die Energie absorbierter Photonen, um Elektronen über die Membran zu transportieren, wodurch ein elektrochemischer Protonengradient aufgebaut wird, über den die Synthese von ATP

durch die chloroplastidäre ATP-Synthetase betrieben wird (Abbildung 2). Dieser Prozess wird als licht-induzierte Ladungstrennung beschrieben (Eberhard et al., 2008) und beginnt auf der luminalen Seite des PS II, im *oxygen evolving complex* (OEC), wo die Oxidation des Wassers katalysiert und Sauerstoff freigesetzt wird (Zouni et al., 2001; Ferreira et al., 2004; Hemschemeier and Happe, 2011). Das Chlorophyll a-Molekül ist in der Lage, nach Anregung in den ersten Singulett-Zustand, Elektronen an Phaeophytin abzugeben, welches dann innerhalb von Picosekunden an ein Plastoquinon-Molekül transferiert wird. Plastoquinon Moleküle sind in der Lage durch die doppellagige Thylakoidmembran zu diffundieren. Der Cyt b_6/f Komplex überträgt die Elektronen vom Plastoquinon-Pool auf das kupferhaltige Plastocyanin.

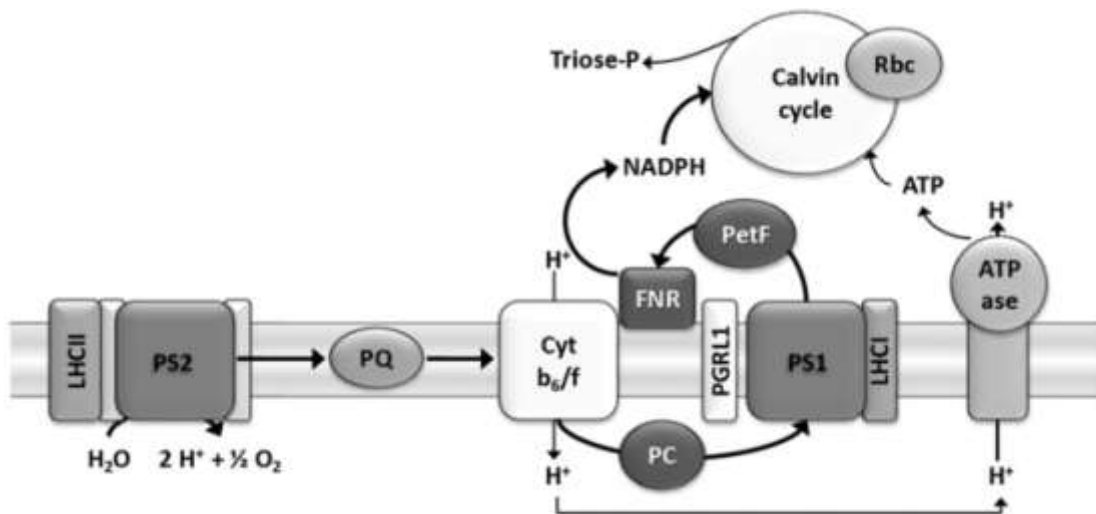


Abbildung 2: Schematische Darstellung des linearen photosynthetischen Elektronentransportes in *Chlamydomonas reinhardtii*. Bei der Photolyse des Wassers entstehen die Elektronen, die vom PS II (Photosystem II hier PS2) zum PS I (Photosystem I; PS1) via Plastoquinon (PQ), Cytochrome b_6/f (Cyt b_6/f) und Plastocyanin (PC) übermittelt werden. PS I ist dann der Elektronendonator für das Ferredoxin (PetF) bzw. PetF wiederum für die Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase (FNR). Während des Elektronentransport wird über der Membran ein elektrochemischer Gradient aufgebaut. Der Abbau des Gradienten mittels der ATP-Synthase (ATPase) dient der Synthese energiereicherer ATP Moleküle. Sowohl ATP, als auch NADP und NADPH₂ werden bei der CO₂ Fixierung im Calvin Zyklus gebraucht (Hemschemeier and Happe, 2011)

In *Chlamydomonas reinhardtii* kann unter Kupfermangel oder unter anaeroben Konditionen das kupferhaltige Protein Plastocyanin durch ein eisenhaltiges Cytochrome c_6 ersetzt werden (Quinn et al., 2000). Plastocyanin ersetzt den Elektronenmangel am PS I, der durch die Anregung des Lichts und die Weitergabe der Elektronen an Ferredoxin am PS I entstanden ist. Die primäre Aufgabe des PS I Komplex liegt in der Übertragung der Elektronen vom Plastocyanin auf das photosynthetische Ferredoxin (PetF). Ferredoxin ist ein kleines Protein mit einem Fe-S-Cluster auf der stromalen Seite der

Thylakoidmembran (Arnon, 1959; Fukuyama, 2004). Ferredoxin transferiert die Elektronen auf eine Ferredoxin- NADP⁺ Oxidoreduktase (FNR). Mit dem Elektronentransport ist eine Translokation von Protonen aus dem Stroma ins Lumen der Thylakoide verbunden, die zur ATP-Synthese genutzt wird. Zudem führt diese NADP⁺ Reduktion zur Kohlenhydrat Fixierung.

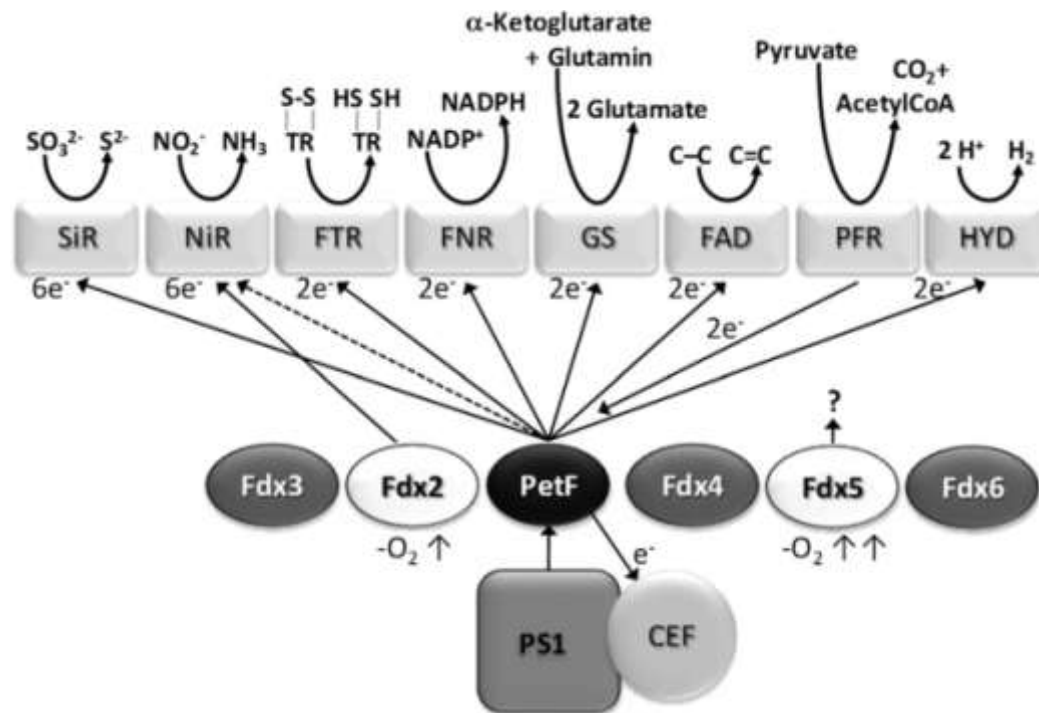


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Ferredoxin-abhängigen Enzyme und Reaktionen in *Chlamydomonas reinhardtii*. Fdx (Ferredoxin) ist der primäre Elektronenakzeptor vom PS1 und leitet die erhaltenen Elektronen an unterschiedliche Enzyme weiter. (Sulfit-Reduktase (SiR), Nitrit-Reduktase (NiR), Fdx-Thioredoxin Reduktase (FTR), Fdx-NADP⁺ Reduktase (FNR), Glutamat Synthase (GS), Fettsäure Desaturase (FAD) und Hydrogenase (HYD) (aus Hemschemeier & Happe, 2011)

Ferredoxin (Fdx) ist der Haupt-Elektronenakzeptor des PS I und verteilt die über die photosynthetische Elektronentransportkette bereitgestellten Elektronen an unterschiedliche reduktive Prozesse (Knaff et al., 1991) (Abbildung 3). Die Übertragung der Elektronen vom Fdx auf Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP⁺) durch die Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase katalysiert. Das gebildete NADPH übernimmt wichtige Funktionen im reduktiven biosynthetischen Stoffwechsel (Calvin Zyklus, Antioxidative-Systeme, Redox-Regulationen) (Agledal et al., 2010). Hinzu kommen verschiedene weitere Enzyme, die mit dem reduzierten Fdx als Elektronendonoren wechselwirken (Sulfit-Reduktase, SIR1 (Knaff et al., 1991), Glutamat-Synthase (Nakayama et al., 2000) und einige Fettsäure-Desaturasen (Shanklin et al., 1998). Desweiteren werden vom Ferredoxin (Fdx) Elektronen auf die Fe-Fe-Hydrogenase übertragen (Happe and Naber, 1993;

Winkler et al., 2009). Zudem wurde eine in *Chlamydomonas reinhardtii* in den Chloroplasten lokalisierte Pyruvat-Ferredoxin-Reduktase als weiterer Partner der Fdx beschrieben (Mus et al., 2007; Terashima et al., 2010; Hemschemeier and Happe, 2011). Sowohl in *Chlamydomonas reinhardtii* als auch in höheren Pflanzen sind mehr als eine Fdx beschrieben worden. Es konnte gezeigt werden, dass *Chlamydomonas* über sechs Pflanzen-spezifische Fdx kodierende Gene verfügt und alle Fdx, mit Ausnahme von Fdx4, im Chloroplasten lokalisiert sind (Merchant et al., 2006; Jacobs et al., 2009; Terauchi et al., 2009). Das Ferredoxin PetF (oft als Fdx1 bezeichnet) war das erste in Grünalgen isolierte Ferredoxin (Hanke et al., 2008). Anhand der hohen mRNA Mengen von PetF wird dieses als höchst-abundante Form betrachtet, obwohl Protein-Mengen nicht immer mit deren Transkript-Mengen übereinstimmen müssen (Terauchi et al., 2009; Jacobs et al., 2009).

2.2.2 Zyklischer Elektronentransport

Der photosynthetische Elektronfluss kann entweder über die nacheinander folgenden Reaktionen des PS II und PS I linear sein und ATP und NADP generieren, oder zyklisch verlaufen und damit einen Protonengradienten über die Thylakoidmembran aufbauen (Arnon, 1959). Im zyklischen Elektronentransport werden die Elektronen nach Durchlaufen des PS I zur erneuten Reduktion des Plastoquinons verwendet. Dieser Prozess dient ausschließlich der Generierung von ATP und stellt keine weiteren Reduktionsäquivalente bereit (Abbildung 4).

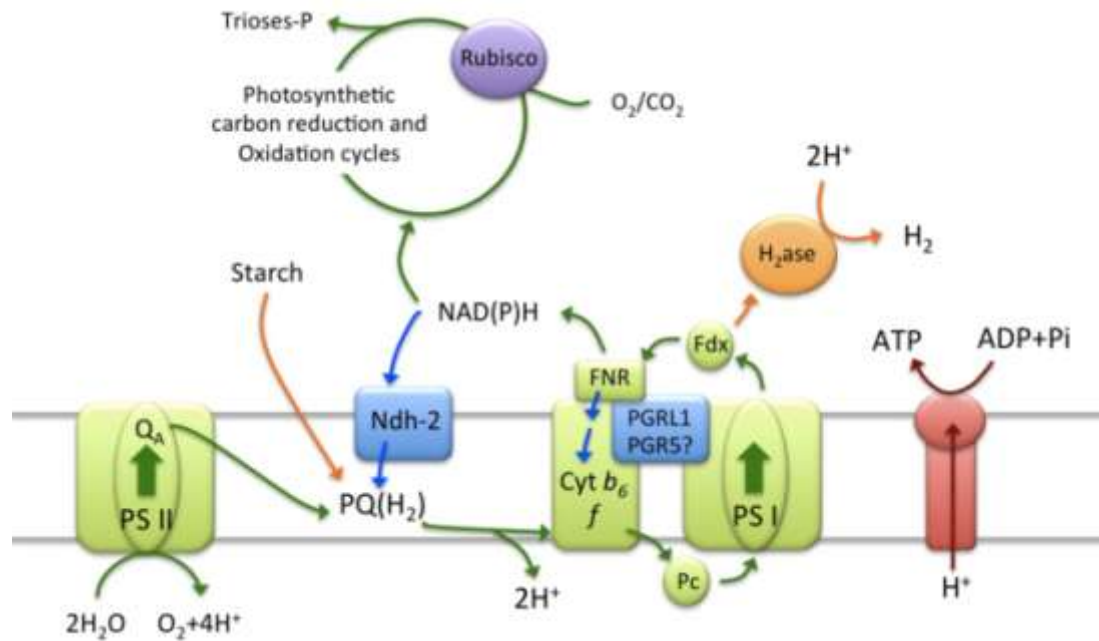


Abbildung 4: Schematischer Überblick über den linearen (grüne Pfeile) und zyklischen (blaue Pfeile) photosynthetischen Elektronentransport innerhalb der Chloroplasten eukaryotischer Algen. PGRL1 und möglicherweise PGR5 und die Typ II NAD(P)H Dehydrogenase (Ndh-2) sind an der Re-Reduzierung des Elektronentransports beteiligt (zyklischer Elektronentransport). Photosystem (PS); Cytochrom b_6f Komplex (cyt b_6f); Plastocyanin (PC); Ferredoxin (Fd); Ferredoxin NADP⁺ Reduktase (FNR); Plastoquinon(PQ); chloroplastidäre terminale Oxidase (PTOX); Typ I NDH Komplex (Ndh-1); Typ II NAD(P)H Dehydrogenase (Ndh-2); Flavoprotein (Flv); Hydrogenase (H_2ase). Abbildung nach (Iwai et al., 2010; Peltier et al., 2010)

Beim zyklischen Elektronentransport werden nach der Sensitivität gegenüber Antimycin A (Ravenel et al., Joët et al., 2001) zwei verschiedene Wege unterschieden. Neuen Studien zufolge wird davon ausgegangen, dass der Ferredoxin-abhängige Weg mit der Reaktion einer Ferredoxin-Plastoquinon-Reduktase verbunden ist (Bendall et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass zwei Proteine, PGR5 (*proton gradient regulation protein 5*) und das integrale Membranprotein PGRL1 (*PGR5-like photosynthetic phenotype*) am Transfer der Elektronen vom Ferredoxin zum Plastoquinon in *Arabidopsis thaliana* involviert sind (Munekage et al., 2004; DalCorso et al., 2008). Der Antimycin A insensitive Weg ist abhängig von einem NAD(P)H Dehydrogenase Komplex innerhalb der Thylakoid Membran, welcher ebenfalls in der Chlororespiration involviert ist (Rumeau et al., 2007; Shikanai et al., 2007). Diese Dehydrogenasen reduzieren den Plastoquinonpool in einem nicht photochemischen Weg. In höheren Pflanzen setzt sich dieser Komplex aus mehreren Untereinheiten zusammen (Suorsa et al., 2009; Peng et al., 2010). Die Gene des Dehydrogenase Komplexes konnten in *Chlamydomonas reinhardtii* nicht nachgewiesen werden, aber das Genom verfügt über eine monomere TypII NAD(P)

Dehydrogenase (Nda2), welche nicht-photochemisch den Plastoquinonpool reduzieren kann (de Cambiaire et al., 2006; Jans et al., 2008; Desplats et al., 2009).

Die exakte Route des Elektronentransfers des Actimycin sensitiven Weges vom FDX zurück zum PS I ist bisher noch nicht vollständig charakterisiert. Hingegen hat das Cytb₆f einen zusätzlichen Heme-Faktor, welches potentiell in einen Elektronentransfer involviert sein könnte (Stroebel et al., 2003). Zudem ist eine weitere Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase (FNR) charakterisiert worden, welche an der stromalen Seite des Cytb₆f andocken könnte und somit in einen zyklischen Elektronentransport involviert sein könnte (Zhang et al., 2001).

In *Chlamydomonas reinhardtii* könnten ebenfalls mehrere Stoffwechselwege für den zyklischen Elektronentransport bestehen (Peltier et al., 2010). PGRL1 wurde identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass es im zyklischen Elektronentransport involviert ist (Petroustos et al., 2009). In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte ein PS I Superkomplex, welcher am zyklischen Elektronentransport beteiligt ist, isoliert werden (Iwai et al., 2010). Dieser Superkomplex besteht aus PS I, LHCI, LHCII, FNR, Cytb₆f und PGRL1. In dieser Studie konnte PGR5 nicht isoliert werden. Möglicherweise ist es bei der Thylaokoid-Präparation aufgrund der Größe verloren gegangen, andererseits postulierten die Autoren, dass PETO, welches ebenfalls in dem Superkomplex präsent war, die Rolle von PGR5 in *Chlamydomonas reinhardtii* übernehmen könnte. Es wird postuliert, dass PGRL1 mit PGR5 Komplexe bildet und dieser Komplex mit PS I assoziiert ist, um so den zyklischen Elektronentransport zu unterstützen (Peltier et al., 2010; Iwai et al., 2010; DalCorso et al., 2008).

2.2.3 Anoxygene Photosynthese

Obwohl Algen oxygene Photosynthese betreiben, können sie in ihrer natürlichen Umgebung anaeroben Bedingungen ausgesetzt sein: Tümpel, Seen und Meer-Sedimente können nach unzureichender O₂-Zirkulation oder aufgrund von Algenblüten in eutrophen Gewässern anoxygen werden (Happe, 2002). Damit ist die Photoproduktion von molekularem Wasserstoff ein Beispiel dafür, wie der photosynthetische Elektronenfluss an unterschiedliche Konditionen adaptieren kann, um oxidativen Stress zu minimieren und ATP zu generieren (Abbildung 5). Generell sinkt die photosynthetische Kapazität unter Mangelzuständen. Das konnte bereits für den Mangel an Phosphat (Shimogawara et al., 1999; Wykoff et al., 1998), Nitrat (Peltier et al., 1991; Bulté et al., 1992) und Schwefel (Wykoff et al., 1998, Davies et al., 1996) gezeigt werden. Ein Grund für die Reduktion der photosynthetischen Aktivität ist die Beeinträchtigung des Wachstums der

Organismen, welches durch fehlende Makro-Nährelemente, hervorgerufen wird. Die im Labor induzierte Wasserstoffproduktion in *Chlamydomonas reinhardtii* ist innerhalb eines sog. *two-state*-Prozesses artifiziell induzierbar. Im Jahr 2000 ist es erstmals gelungen, in luftdicht verschlossenen, schwefel-defizienten *Chlamydomonas reinhardtii* Zellkulturen über mehrere Tage relativ große Mengen an Wasserstoff zu produzieren (Melis et al., 2000). Innerhalb dieses Prozesses erfolgen die normale Biomassengenerierende Photosynthese (*state I*, Schwefel-gesättigtes Medium) und die Wasserstoffproduktion (*state II*, Schwefelmangelbedingungen) zeitlich getrennt (Melis et al., 2000). Im *state II* findet die oxygene Photosynthese auf reduziertem Niveau statt. Dabei wird der Elektronentransport aufrechterhalten. Obwohl der *two-state*-Mechanismus technisch sehr erfolgreich ist, ist der durch Schwefelmangel induzierte Prozess für ökonomische Anwendung gegenwärtig zu teuer (Ghirardi & Seibert, 2003). Verantwortlich für die hohen Kosten ist die Überführung von Schwefel-gesättigtem Medium (*state I*) zu Mangelbedingungen (*state II*) (Ghirardi & Seibert, 2003). Aufgrund des starken biotechnologischen Potentials wurde in den letzten Jahren intensiv die Regulation des photosynthetischen Elektronentransportes in schwefel-defizienten *Chlamydomonas reinhardtii* Zellen, untersucht (Melis et al., 2001).

2.2.4 PS II unabhängige Elektronenquellen während der anoxygenen Photosynthese

Neben der PS II-abhängigen H₂-Photoproduktion ist eine alternative Elektronenquelle beschrieben worden, die dazu beiträgt, die photobiologische Reduktion von Protonen aufrechtzuerhalten. Der Abbau zelleigener Substrate (z.B. Stärke) stellt Reduktionsäquivalente bereit, die als Elektronendonatoren zur Reduktion des Plastoquinons verwendet werden (Gfeller & Gibbs, 1984; Bennoun 2001, 2002). Allerdings kann Stärke nicht das einzige Substrat sein, über welches Elektronen in den reversiblen H₂-Metabolismus einfließen (Melis, 2000). Eine geringe PS II Aktivität bleibt unter Schwefelmangel in *Chlamydomonas reinhardtii* Kulturen für mehrere Tage erhalten. Abgeleitet von Studien, in denen die Effekte eines spezifischen PS II Inhibitors (*3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff*; DCMU) auf die Wasserstoffproduktion untersucht wurde, kann postuliert werden, dass die Oxidation des Wassers am PS II signifikant Elektronen für die Reduktion von Fdx bereitstellt (Hemschemeier et al., 2008; Fouchard et al., 2005; Chochois et al., 2009). Bei einem Vergleich zweier Mutanten, denen Stärke-Reserven fehlten, zeigten Zellen nach DCMU Behandlung eine deutliche Reduktion der Wasserstoffproduktion. Dieses Ergebnis zeigt auf, dass PS II ein signifikanter Elektronendonator für die licht-abhängige Wasserstoffproduktion ist

(Zabawinski et al., 2001; Chochois et al., 2009). Jedoch inhibiert DCMU nur partiell die Wasserstoffproduktion in *Chlamydomonas reinhardtii* Wildtyp-Zellen, was auf eine nicht-photochemische Reduktion des Plastoquinonpool schließen lässt (Bennoun, 1982; Godde & Trebst, 1980; Godde, 1982). Zudem konnte bei der Untersuchung einer *nda2*-RNAi-Zelllinie gezeigt werden, dass die nicht-photochemische Einspeisung von Elektronen via Nda2 einen signifikanten Beitrag zur Wasserstoffproduktion besteuert (Jans et al., 2008). Der Abbau von Stärke wird als Elektronendonator für die Nda2 Aktivität betrachtet (Jans et al., 2008).

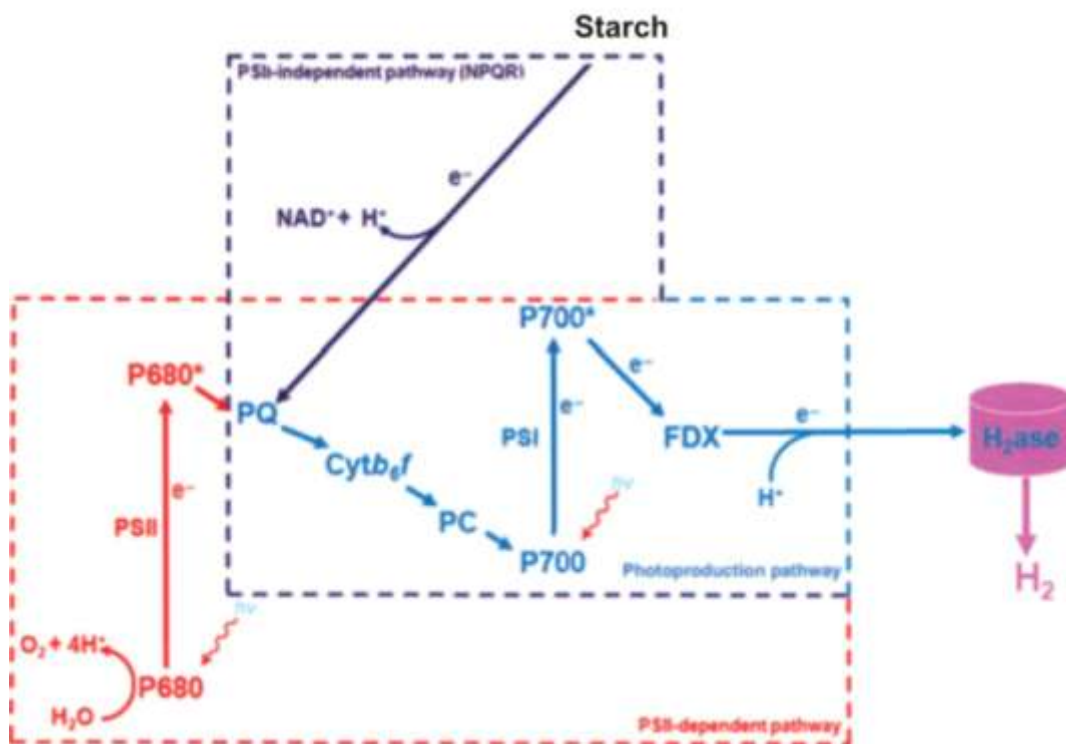


Abbildung 5: Wasserstoff-Produktionsweg in *Chlamydomonas reinhardtii*. Die dargestellten Wege sind mit der Photoproduktion von Wasserstoff verbunden. Mittels der roten gestrichelten Linie wird der PS II abhängige Weg beschrieben, während die lila gestrichelte Linie den PS II unabhängigen Weg darstellt. Dieser ist von NAD(P)H-Plastoquinon-Oxidoreduktase abhängig (NPQR). In beiden Stoffwechselwegen werden zunächst das Plastoquinon (PQ) und das Plastocyanin (PC) reduziert (blaue gestrichelte Linie). Zudem kann mittels der PS I Aktivität unter anaeroben Konditionen Ferredoxin (Fdx) reduziert werden. Im folgenden Schritt katalysiert die Hydrogenase die Reduktion der Protonen (blaue Linien); modifiziert nach Grossman et al., 2010

Die Stärkekonzentrationen steigen innerhalb der ersten Stunden unter Schwefelmangel stark an und nehmen dann, bei Beginn der Wasserstoffproduktion, ab (Melis et al., 2000). Andererseits nehmen die Acetat Depots, die zu Beginn dem schwefelfreien Medium beigesetzt sind, beim Übergang zur Anaerobie ab und bleiben dann, unter Wasserstoffproduzierenden Konditionen, relativ konstant (Melis et al., 2000). Aus diesem Grund

wird Acetat als Reduktionsquelle für den respiratorischen Sauerstoffverbrauch diskutiert (Melis et al., 2000). Ebenfalls konnte die Akkumulation von Fettsäuren unter Schwefelmangel dokumentiert werden (Chochois et al., 2009; Doebbe et al., 2010). Allerdings wird im Abbau der Fettsäuren kein wichtiger Beitrag für die nicht-photochemische Reduktion des Plastoquinonpools und damit für H₂ Produktion bestätigt (Doebbe et al., 2010). Es konnte an der Stärke-losen Mutante *sta6*, die sehr stark Fettsäuren akkumuliert, gezeigt werden, dass die H₂ Produktion nach der Inhibition von PS II sehr stark abnimmt (Chochois et al., 2009). Dies deutet an, dass die meisten nicht photochemisch generierten Elektronen aus dem Abbau der Stärke stammen. Diese wurde weiter durch die Zunahme glykolytischer Intermediate bestätigt (Doebbe et al., 2010). Ein weiterer Hinweis liefert zudem eine Mutante, die durch einen artifiziell inserierten Hexosetransporter aus *Chlorella kessleri* (*hup1*) zu einer gesteigerten H₂-Produktion unter Schwefelmangel bei Zufütterung von Glucose befähigt ist (Doebbe et al., 2007).

2.2.5 Wasserstoff-Produzenten und wasserstoffsynthetisierende Enzyme

Zum ersten Mal wurde der Wasserstoff-Metabolismus in Grünalgen vor 65 Jahren dokumentiert (Gaffron & Rubin, 1942; Melis et al., 2004). Dieser Prozess konnte in verschiedenen phototrophen Mikroorganismen, einschließlich vieler *Chlamydomonas* Spezies, nachgewiesen werden (Healey, 1970; Kessler, 1974; Weaver et al., 1980; Ghirardi et al., 2000; Melis & Happe, 2001; Happe et al., 2002; Boichenko et al., 2004; Kruse et al., 2005b; Seibert et al., 2008). *Chlamydomonas* entwickelte sich zum Modellorganismus zur Untersuchung des H₂ Photoproduktion. Zudem konnten mittlerweile vielversprechende Verbesserungen der H₂ Aktivität erzielt werden (Weaver et al., 1980; Ghirardi et al., 2000, Ghirardi et al., 2005; Melis & Happe, 2001; Kosourov et al., 2002; Fedorov et al., 2005; Kruse et al., 2005a).

Die reversible Protonen-Reduktion, und damit die Synthese von Wasserstoff, kann durch zwei Enzyme, Hydrogenasen oder Nitrogenasen, katalysiert werden (Weaver et al., 1980; Tamagnini et al., 2002; Boichenko et al., 2004; Kruse et al., 2005b). Bisher konnte die Expression von Nitrogenasen in Algen nicht nachgewiesen werden, hingegen sind zwei unterschiedliche Klassen von Hydrogenasen ([NiFe]- und [FeFe]-Hydrogenasen) in diversen Organismen weit verbreitet (Adams, 1990; Wu & Mandrand, 1993; Vignais et al., 2001; Vignais & Colbeau, 2004; Posewitz et al., 2008). Die Untergliederung der Klassen erfolgt nach dem Metallatoms des aktiven Zentrums (Vignais et al., 2001). Im Allgemeinen gelten die [NiFe]-Hydrogenasen als H₂ Aufnahme Enzyme, während [FeFe]-Hydrogenasen die Synthese von H₂ katalysieren, eine 10 – 100 mal höhere

Aktivität aufweisen (Frey, 2002) und deshalb als effizientere Enzyme gelten (Posewitz et al., 2008). Grünalgen verfügen über eine [FeFe]-Hydrogenase (Ghiradi et al., 2007).

Die erste publizierte Gensequenz einer [FeFe]-Hydrogenase stammte aus *Scenedesmus obliquus* (Florin et al., 2001; Wunschiers et al., 2001). *Chlamydomonas* besitzt zwei Isoformen dieser [FeFe]-Hydrogenase HydA1 und HydA2. 2002 veröffentlichten Happe & Kaninski die Sequenz für die Hydrogenase HydA1 in *Chlamydomonas* (Happe & Kaminsky, 2002), während Forestier und Mitarbeiter die HydA2-Gen-Sequenz aus *Chlamydomonas* 2003 publizierten (Forestier et al., 2003). In wie weit beide Enzyme physiologisch zur Produktion von Wasserstoff beitragen ist bisher nicht bekannt (Harris, 2009). Beide Gene kodieren für monomere Proteine mit einer Masse von 48 kDa (Happe et al., 2002). Die Genprodukte weisen eine 68% Identität in der Proteinsequenz auf. Funktionell können in *E. coli*, sowohl der HydA1 als auch der HydA2, heterolog exprimiert werden (King et al., 2006). Die [FeFe]-Hydrogenasen kodieren für Proteine mit einem relativ flexiblen N-Terminus, der F-Domäne, und einem homologen, katalytisch bedeutendem C-Terminus, der H-Domäne. Neben vier hochkonservierten Cysteinresten, die das 4Fe-4S-Cluster koordinieren und es mit dem 2Fe Subcluster verbinden, wurden zudem Komponenten identifiziert, die an der Strukturbildung des H-Clusters und an der Katalyse des Protonentransfers beteiligt sind. Diese Reste bilden zudem die hydrophobe Tasche, in der das katalytische Zentrum eingebettet ist (Nicolet et al., 2001). Für die Reifung einer funktionsfähigen [FeFe] Hydrogenase sind drei weitere Proteine, HydE, HydF und HydG, bedeutend (Bock et al., 2006; Posewitz et al., 2004), die an der Bildung des H Cluster involviert sind (Posewitz et al., 2004). HydG katalysiert die Synthese der CO und CN Liganden, während HydF möglicherweise stützend bei der Synthese des H-Clusters mitwirkt (Shepard et al., 2010). Mittels der Überexpression in *E. coli* konnte für die HydE und die HydF aus *Chlamydomonas reinhardtii* gezeigt werden, dass beide Enzyme für die Synthese eines aktiven Zentrums bedeutend sind (Posewitz et al., 2004).

Die Hydrogenasen in *Chlamydomonas* werden an cytosolischen Ribosomen synthetisiert und mittels einer Transit-Sequenz am N-terminus der [FeFe]-Hydrogenasen in den Chloroplasten transportiert und dort in Reaktion auf Anaerobie exprimiert (Roessler & Lien, 1984; Maione & Gibbs, 1986; Happe et al., 1994; Happe et al., 2002). Anaerobe Konditionen können im Labor durch unterschiedliche Techniken erzeugt werden und induzieren die Expression der Hydrogenase (Happe et al., 2002). Die Hydrogenasen der Grünalgen sind extreme Sauerstoff-sensitiv und innerhalb von Minuten unter atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen bereits irreversibel inaktiviert (Cohen et al., 2005). *Chlamydomonas reinhardtii* exprimiert das O₂ sensitivste Enzyme unter den

Hydrogenasen (Ghirardi et al., 1997; Cohen et al., 2005; King et al., 2006). Möglicherweise ist die physiologische Ursache der Hypersensitivität damit begründet, dass in Anwesenheit von Sauerstoff metabolische Prozesse mit einer höheren Effizienz erfolgen könnten und somit die Aktivität der Hydrogenase nur Übergangsweise genutzt wird und unmittelbar, in Reaktion auf sich ändernde Konditionen, reprimiert wird um andere terminale Elektronenakzeptoren zu nutzen (Posewitz et al., 2008). Es wird vermutet, dass die Sauerstoff-Inaktivierung durch die Bindung von Sauerstoff am 2 Fe Zentrum des H clusters erfolgt, wodurch der 4Fe-4S-Cluster zerstört wird. Sobald Sauerstoff-Moleküle Zugang zum aktiven Zentrum haben (Cohen et al., 2005), beeinflussen veränderte sterische Faktoren innerhalb des Gastunnels und des aktiven Zentrums die Erreichbarkeit von Sauerstoff zum H Cluster (Stripp et al., 2009). Dementin und Mitarbeiter konnten zeigen, dass der Austausch von Aminosäuren innerhalb des Gastunnels die Sauerstoff-Sensitivität von [NiFe]-Hydrogenasen reduzieren können (Dementin et al., 2009).

2.2.6 Konkurrenzreaktionen zur Hydrogenase

Sowohl in höheren Pflanzen (Harris et al., 1993; Joët et al., 2002) als auch in *Chlamydomonas reinhardtii* (Wollman et al., 1984; Finazzi et al., 1999; Finazzi et al., 2002) resultiert Anaerobie in einer Reduktion des Plastoquinonpools und der Migration der Lichtsammel-Komplexe II (LhcII) hin zu PS I (LHC state transition) (Delosme et al., 1996). Es wird diskutiert, dass der zyklische Elektronentransport, welcher in schwefeldefizienten, wasserstoffproduzierenden *Chlamydomonas reinhardtii* Zellen auftritt, eine Konkurrenzreaktion unter diesen Konditionen darstellt. Wird der Fdx-abhängige Weg des zyklischen Elektronenflusses mittels Antimycin A blockiert, kann die Wasserstoffproduktion stimuliert werden (Antal et al., 2009). Auf der anderen Seite nimmt die H₂ Produktion in *Chlamydomonas reinhardtii* merklich ab (Jans et al., 2008), sobald mittels Nda2 keine weiteren Elektronen aus dem Stärke Abbau in die photosynthetische Elektronentransportkette einfließen können (Chochois et al., 2009; Fouchard et al., 2005). Auf diese Weise kann geschlussfolgert werden, dass sowohl der Nda2- als auch der Fdx-abhängige Weg unter normalen aeroben photosynthetischen Konditionen im zyklischen Elektronentransport involviert sind, unter H₂ generierenden Bedingungen allerdings unterschiedliche Funktionen aufgrund der Anoxie ausgeführt werden. Während Nda2 externe Elektronen aus dem Abbau von Stärke einschleust, agiert der Antimycin A sensitive Weg nur im Hinblick des zyklischen Elektronentransportes und konkurriert aus diesem Grund mit der H₂ Produktion (Hemschemeier & Happe, 2011).

In *Stm6* (Schönfeld et al., 2004; Kruse et al., 2005a), dem parentalen Stamm der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien *Stm6Glc4*, ist der zyklische Elektronentransport inhibiert. Die Identifizierung und detaillierte molekulare Charakterisierung von der Mutante *Stm6* belegte, dass hier das Gen *moc1* deletiert ist (Schönfeld et al., 2004). Dieses Gen ist homolog zu einem humanen mitochondrialen transkriptionalen Terminationsfaktor. MOC1 und wird in die Mitochondrien dirigiert und lichtabhängig reguliert. Das Fehlen dieses Transkriptionsfaktors resultiert in einer veränderten Interaktion zwischen dem Chloroplast und den Mitochondrien (Schönfeld et al., 2004). In *Stm6* sind Teile des zellulären Metabolismus modifiziert was letztendlich zu einer Blockade der Zellen in LHC *state 1* und folglich zu einer sehr starken Einschränkung des zyklischen Elektronentransports um Photosystem I führte (Kruse et al. 2005a). Der zyklische Elektronentransport steht in direkter Konkurrenz zur Hydrogenase, welche die Elektronen zur Reduktion von Protonen benötigt. Daher hat der Defekt im zyklischen Elektronentransport eine stark gesteigerte Wasserstoffproduktion in *Stm6* zur Folge (Kruse et al. 2005a).

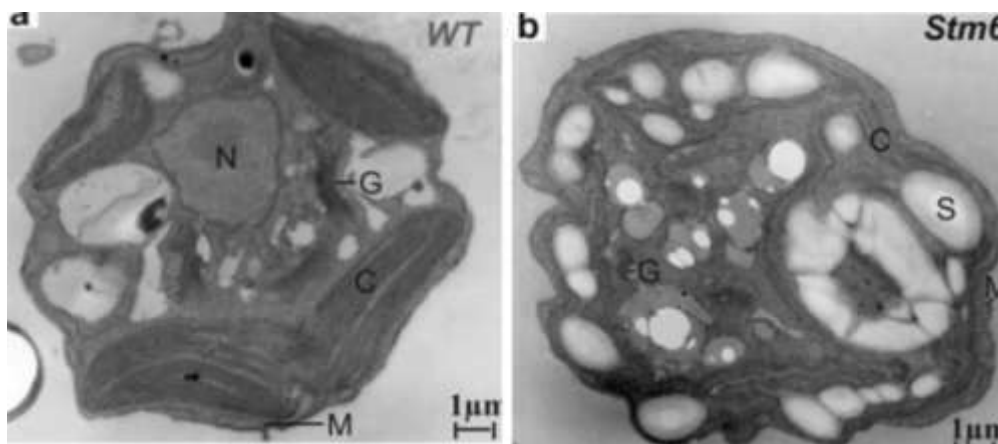


Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Chlamydomonas reinhardtii* (20000fache Vergrößerung). Die linke Abbildung zeigt den typischen Zellaufbau eines Wildtypen, in der rechten Abbildung ist *Stm6* dargestellt; dieser weist im Vergleich zum Wildtypen größere Stärkedepots auf. M: Mitochondrien; C: Chloroplast; N: Zellkern; G: Golgi-Apparat; S: Stärke (aus: Kruse et al., 2005)

Obwohl das kernkodierte Protein MOC1 ein mitochondrialer Transkriptionsfaktor ist, betreffen somit einige phänotypische Veränderungen den Chloroplasten. Neben der Inhibition des *state transition* Prozess werden große Mengen an Stärke eingelagert (Abbildung 6) (Schönfeld et al., 2004; Kruse et al., 2005a). Die nachweisliche Steigerung der H₂ Produktion im Vergleich zum parentalen Stamm resultiert sehr wahrscheinlich aus den synergetischen Effekten des veränderten Elektronentransportes und den großen Stärke-Depots (Kruse et al., 2005a).

2.3 Intrazelluläre Veränderungen durch Schwefelmangel und Anaerobie

Photosynthese betreibende Mikroorganismen sind hauptsächlich während der Nacht zeitweilig hypoxischen bzw. anoxischen Bedingungen, ausgesetzt. Jedoch können fermentative Prozesse auch im Licht unter sauerstoffarmen Bedingungen vorkommen. Mehrere Studien haben gezeigt, dass sich *Chlamydomonas reinhardtii* aufgrund des fermentativen Metabolismus schnell an anaerobe Konditionen akklimatisiert (Gfeller & Gibbs, 1984, 1985; Kreuzberg, 1984; Gibbs et al., 1986; Ohta u. a. 1987). Sowohl Gene als auch Proteine dieser fermentativen Stoffwechselwege sind im *Chlamydomonas reinhardtii* Genom identifiziert worden (Grossman et al., 2007; Merchant et al., 2007).

Schwefelmangel löst eine Veränderung auf Ebene der Genexpression, der Proteinsynthese und -Degradation und des metabolischen Fluxes in *Chlamydomonas reinhardtii* aus (Zhang & Melis 2002; Zhang et al., 2004; Ngyuen et al., 2008; Doebbe et al., 2010; Chen et al., 2010). Desweiteren verändert sich die Zellmorphologie und das zelluläre Volumen innerhalb der ersten 24 – 48 Stunden nach Entzug von Schwefel (Zhang et al., 2002). Nach ca. 15 Stunden verringert sich die Hydrolyse des Wassers. Zudem reduziert sich substantiell die Proteinabundanz der Ribulose-1,5-Biphosphat Carboxylse/Oxygenase (RuBisCo) in Reaktion auf Schwefelmangel (Zhang u. a. 2002; Zhang & Melis 2002), was auf eine schnelle und selektive Degradation rückschließen lässt. Organische Komponenten wie Format, Acetat und Ethanol werden generiert und sekretiert (Winkler et al. 2002; Kosourov et al. 2003; Hemschemeier & Happe, 2005). Terashima und Kollegen untersuchten die Induktion von Proteinen in *Chlamydomonas reinhardtii* als Antwort auf Anaerobie und lokalisierten mehrere dieser Proteine in verschiedenen Kompartimenten (Terashima et al., 2010). Zudem wurden auch eine Reihe Proteine mit unbekannter Funktion als Antwort auf anaerobe Konditionen entdeckt (Terashima et al., 2010). Werden anaerobe Konditionen in *Chlamydomonas reinhardtii* im Licht unter Schwefelmangel ausgelöst (Tsygankov et al., 2002; Zhang et al., 2002), treten Veränderungen bezüglich der Akkumulation von Metaboliten auf (Timmins et al., 2009; Doebbe et al., 2010). Pyruvate, das Endprodukt der Glykolyse, ist das Substrat für mehrere fermentative Stoffwechselwege (Abbildung 7). Unter diesen Konditionen werden verschiedene organische Säuren sekretiert (Format, Lactat, Malat, Acetat und Succinat), sowie alkoholische Verbindungen (Alkohol und Glycerin), als auch H₂ und CO₂ (Gfeller & Gibbs, 1984; Kreuzberg, 1984; Ohta et al., 1987; Tsygankov et al., 2002; Kosourov et al., 2003; Mus et al., 2007). Es gibt zwei Pyruvate-verbrauchen-Enzyme in *Chlamydomonas reinhardtii*, die Pyruvat-Format-Lyase 1 (PFL1) und die Pyruvat: Ferredoxin:Oxidoreductase 1 (PFR1) (Abbildung 7) (Grossman et al., 2010).

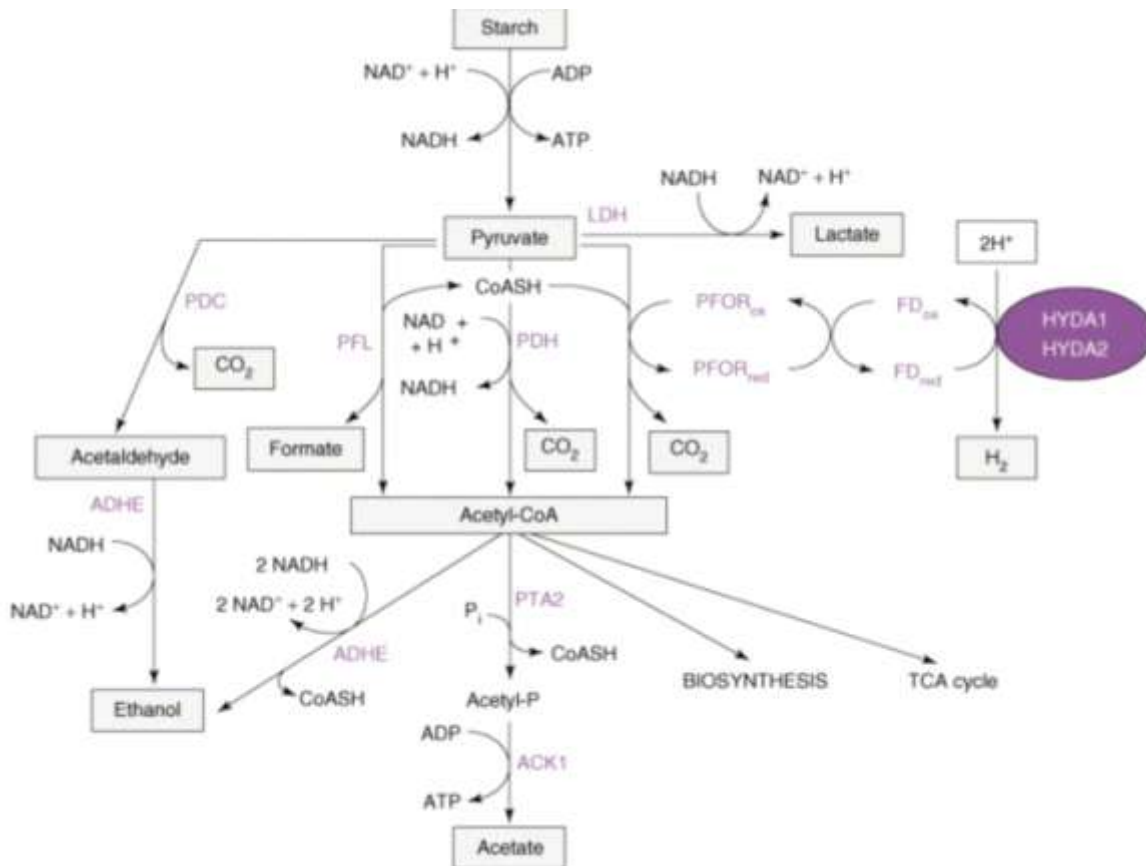


Abbildung 7: Fermentativer Stoffwechsel in *Chlamydomonas reinhardtii*. Unter anaeroben Konditionen treten diverse Stoffwechselwege in Kraft. Dargestellt sind die vier dominanten Pyruvat-Stoffwechsel-Wege in *Chlamydomonas* nach erfolgter anaerober Kultivierung im Dunkeln. (Phosphoenolpyruvat Carboxylase (PEPC); Pyruvat Carboxylase (PYC); Malatenzym (MME); Malat Dehydrogenase (MDH); Fumarase (FUM); Fumarat Reduktase (FMR); Laktat Dehydrogenase (LDH); Pyruvat Decarboxylase (PDC); Alkohol-Dehydrogenase (ADH1 und ADH2); Pyruvat-Format-Lyase (PFL1); Pyruvat-FDX-Oxidoreduktase (PFR1); Phosphat Acetyltransferase (PAT); Acetatkinase (ACK); Ferredoxin (FDX); Hydrogenase (HydA)) aus Grossman et al., 2010

Immunologische Analysen weisen darauf hin, dass die PFL1 sowohl in Mitochondrien als auch in Chloroplasten lokalisiert ist (Kreuzberg, 1984; Atteia et al., 2006). Die PFL1 katalysiert die Umsetzung von Pyruvate zu Acetyl-CoA und Format (Wagner et al., 1992), während die PFR1 es zu Acetyl-CoA und CO₂ umwandelt, wobei Ferredoxin (FDX) reduziert wird. Das reduzierte Fdx kann wiederum für die Reduktion der Hydrogenase genutzt werden. Das Acetyl-CoA, welches über die PFL1- und PFR1-Reaktionen generiert werden kann, kann entweder zu Ethanol durch die Alkohol-Dehydrogenase 1 (ADH1) reduziert werden (Hemschemeier & Happe, 2005; Atteia et al., 2006) oder zu Acetat umgesetzt werden (durch die Phosphoacetyl-Transferase (PAT) und die Acetat-Kinase (ACK)) (Atteia et al., 2006). Diese Reaktionen scheinen sowohl in

Mitochondrien (PAT1 als auch in ACK2) als auch in den Chloroplasten (PAT2 und ACK1) vorzukommen (Atteia et al., 2006; Terashima et al., 2010).

2.4 Reaktionen innerhalb der Mitochondrien

In *Chlamydomonas* nehmen die Mitochondrien 1 - 3 % des Zellvolumens photoautotroph kultivierter Zellen ein. Im Gegensatz dazu machen Chloroplasten ungefähr 40 % des kompletten Volumens aus (Boynton et al., 1972; Schötz et al., 1972). Die redoxregulierten Reaktionen der Chloroplasten und Mitochondrien steuern als Antwort auf verschiedene Umweltveränderungen viele Abläufe in der pflanzlichen Zelle. Sowohl in den Mitochondrien als auch in den Chloroplasten werden über die Komponenten der Elektronentransportketten elektrochemische Gradienten aufgebaut, die lebensnotwendige Energie in Form von ATP liefern (Harris, 2009).

Aufgrund der Schwierigkeiten, die mit dem Erhalt ausreichend großer Mengen Zellmaterials für biochemischen Studien verbunden sind, wurden bisher nur die mengenmäßig am häufigsten vorkommenden Proteine charakterisiert. Dabei handelt es sich um Untereinheiten der Atmungskette (OXPHOS, *oxidative phosphorylation complexes*) (Atteia, 1994; Funes et al., 2002; van Lis et al., 2003; Cardol et al., 2004). Bisher sind 60 mitochondrielle Proteine in *Chlamydomonas* experimentell identifiziert worden (Cardol et al., 2004). Darüber hinaus ist nur wenig über die metabolischen Vorgänge dieses Kompartimentes bekannt (Atteia et al., 2009). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen die Mitochondrien von *Chlamydomonas* in unterschiedlichen Größen und Formen (Blank et al. 1980). Desweiteren stehen die Mitochondrien in sehr engem Kontakt mit dem Chloroplast in *Chlamydomonas*, weshalb angenommen wird, dass diese Organellen interagieren und untereinander wechselwirken. Es konnte gezeigt werden, dass Teile der Mitochondrien in den Chloroplast penetrieren (Harris, 2009).

Die oxidative Phosphorylierung der Mitochondrien umfasst einen Elektronentransport, welcher durch einen oxidativen Abbau zellulärer Substrate betrieben wird und aufgrund eines parallel aufgebauten elektrochemischen Gradienten an die Synthese von ATP gekoppelt ist. Die Oxidations-Reduktions-Reaktionen erfolgen über die Komplexe I bis V und zusätzlichen Oxidoreduktasen (Abbildung 8). Diese Reaktionen und deren beteiligten Komponenten werden unter OXPHOS (oxidative Phosphorylierung) zusammengefasst. Die Elektronen aus der Oxidation organischer Substrate können entweder über Komplex I, über die NAD(P)H Dehydrogenase, oder über Komplex II in den Ubiquinonpool in die Atmungskette eingespeist werden (Cardol et al., 2004).

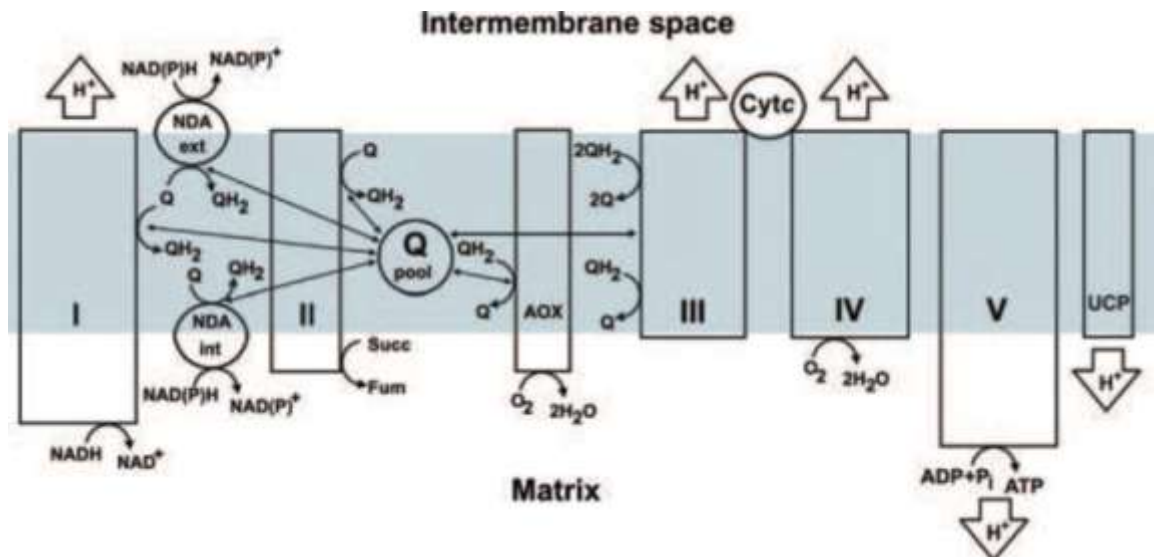


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Komponenten der Atmungskette (OXPHOS) in Pflanzen. Die Elektronen stammen aus der Oxidation des NADH bzw. NADPH und werden an das Coenzym Q über eine TypI NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I) oder eine TypII NADH Dehydrogenase (NDA) weitergeleitet. Stammen die Elektronen aus der Oxidation organischer Säuren werden sie zum Coenzym Q mittels der Succinat Dehydrogenase (Komplex II) transferiert. Die Cytochrome c Oxidoreduktase (Komplex III) katalysiert die Oxidation des Coenzym Q (QH₂) und reduziert mit erhaltenen Elektronen die Cytochrome c (Cyt c). Danach werden die Elektronen auf O₂ via der Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) übertragen. Mittels einer Alternativen Oxidase können die Elektronen direkt von QH₂ auf O₂ übertragen werden, wobei Komplex III und IV umgangen werden. Der Elektronentransfer über Komplex I, III und IV ist an den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten zur Synthese von ATP am Komplex V, der ATP Synthase, gekoppelt (aus Harris, 2009).

Der Komplex I (rotenone-sensitive NADH:ubiquinon-Oxidoreduktase) ist die größte Membran-gebundene Untereinheit der mitochondrialen Atmungskette mit einer durchschnittlichen Molekularmasse von 950 kD und 1000 kD. In *Chlamydomonas* besteht dieser Komplex aus 42 Proteinen zwischen 7 und 77 kDa (van Lis et al., 2003; Cardol et al., 2004). Fünf der Komplex I Untereinheiten sind im Organell eigenen Genom kodiert, wohingegen die restlichen Untereinheit kernkodiert sind (Cardol et al., 2005). Der Komplex II (Succinat:Ubiquinon-Oxidoreduktase) ist sowohl im mitochondrialen Elektronentransport involviert als auch im Tricarbonsäure-Zyklus. Es besteht aus vier kern-kodierten Untereinheiten (SDH1 (Flavoprotein), SDH2 (Eisen-Schwefel-Untereinheit) und zwei hydrophoben Ankern (SDH3 und SDH4) (Cecchini et al., 2002; Lemire & Oyedotun, 2002), welche alle auch in *Chlamydomonas* nachgewiesen wurden (Cardol et al., 2005). Komplex III (Ubiquinol:Cytochrome c Oxidoreductase; bc1 Komplex) setzt sich in *Chlamydomonas* aus 9 Untereinheiten zusammen mit molekularen Massen zwischen 10 und 50 kDa (Atteia, 1994; van Lis et al., 2003). Hingegen ergab die Untersuchung der Gensequenz 10 Untereinheiten. Zu diesen Untereinheiten gehören die *core I* und *core II* Proteine (QCR1 und QCR2), Cytochrom b, Cytochrome c1, RIP1, und

5 weitere Untereinheiten (Cardol et al., 2005). Komplex IV (Cytochrom *c* Oxidase) katalysiert den Elektronentransfer vom löslichen Cytochrom *c* hin zum Sauerstoff. Zudem trägt Komplex IV zum Aufbau des elektrochemischen Gradienten bei, welcher zur Synthese von ATP am Komplex V genutzt wird. Die Cytochrom *c* Oxidase in *Chlamydomonas* setzt sich aus 10 Polypeptiden (COX1, 2, 3, 4, 5b, 5c, 6a, 6b) mit einem Molekulargewicht zwischen 8 und 40 kDa zusammen (van Lis et al., 2003; Cardol et al., 2005). Zudem ist in *Chlamydomonas*, im Gegensatz zu den meisten Eukaryoten, COX 2 durch zwei separate Gene kodiert (Cox2a und Cox2b). Der Komplex V, die FoF1-ATP Synthase, katalysiert die Phosphorylierung des ADP mittels inorganischem Phosphat und nutzt dafür die Energie des elektrochemischen Gradienten. Der Proteinkomplex setzt sich aus einer membrangebundenen Fo Komponente, welche an der Protonen Translokation beteiligt ist, und einer F1 Domäne, welche die ATP Synthese katalysiert, zusammen. Der gesamte Komplex ist aus 14 Untereinheiten mit einer molekularen Masse zwischen 7 und 60 kDa aufgebaut (van Lis et al., 2003)

Neben der Protonen-translozierenden Komplex I NAD(P)H Dehydrogenase existieren in Pflanzen und Pilzen weitere Typ II NAD(P)H Dehydrogenasen. In *Chlamydomonas* konnten sechs Proteine mit Ähnlichkeiten zur Typ II NAD(P)H Dehydrogenase nachgewiesen werden (NDA1, 2, 3, 5, 6 und 7) (Cardol et al., 2005). Lecler und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die einzige in *Chlamydomonas* identifizierte Typ II NAD(P)H Dehydrogenase im Chloroplasten lokalisiert ist (Nda2) (Desplats et al. 2009; Jans et al. 2008). Für Nda2 konnte eine Beteiligung an der Reduktion des Plastoquinon-Pools demonstriert werden (Lecler et al., 2012). Terashima und Mitarbeiter konnten mittels ihrer Proteom-Untersuchungen zeigen, dass Nda3 ebenfalls im Chloroplasten lokalisiert ist (Terashima et al., 2010), allerdings ist diesem Enzym noch keine Funktion zuzuordnen.

In pflanzlichen Mitochondrien wurden zudem Alternative Oxidasen (AOX) exprimiert, welche Elektronen direkt von Ubiquinon-Pool zum molekularen Sauerstoff transferieren. Es wird angenommen, dass dieses nicht-phosphorylierende Enzym eine Schutzfunktion gegenüber oxidativen Schäden besitzt (Maxwell et al., 1999). In *Chlamydomonas* konnte die Expression von AOX1 und AOX2 bestätigt werden (Matagne et al., 1989; Eriksson et al., 1995; Dinant et al., 2001), wohingegen AOX1 öfters transkribiert wird (Dinant et al., 2001).

2.5 Die Umwandlungseffizienz von Licht zu Biomasse in *C. reinhardtii*

2.5.1 Lichtsammelantennenkomplexe

Um optimale Wachstumsbedingungen zu erlangen, können sich photosynthetische Organismen an wechselnde Lichtbedingungen akklimatisieren, indem sie Komponenten des Photosynthese-Apparates verändern. Diese Anpassungsreaktion betrifft insbesondere die Größe und Zusammensetzung der Lichtsammelkomplexe (LHC) (Escoubas et al., 1995; Durnford & Falkowski, 1997; Yang et al., 2001). Bisher sind in *Chlamydomonas reinhardtii* neun Lhc-Isoformen identifiziert, welche vorwiegend mit dem PS II assoziiert (Elrad & Grossman, 2004). Zudem konnte deren Protein-Expression bestätigt werden (Stauber *et al.*, 2003; Turkina et al., 2006) und Stauber und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Peptidsequenzen der Lhc-Proteine über große Abschnitte identisch und nur durch Massenspektrometrie voneinander unterscheidbar sind (Stauber et al., 2003). Sowohl in Grünalgen, als auch in höheren Pflanzen sind die Lhc-Gene kernkodiert. Es wird angenommen, dass sich die Isoformen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Lichtsammlung und ihrer protektiven Funktionen unterscheiden (Elrad et al., 2002). In *Chlamydomonas reinhardtii* konnten zwei Isoformen spezifische Funktionen zugeordnet werden. Zum einen konnte das Fehlen eines funktionellen *lhcbm1*-Gens in *Chlamydomonas reinhardtii* nicht durch eine vermehrte Expression anderer Isoformen kompensiert werden und resultierte in einer reduzierten Fähigkeit zur energieabhängigen Fluoreszenzlöschung (Elrad et al., 2002). Des Weiteren konnte Nguyen zeigen, dass *Lhcbm9* unter bestimmten Stresssituationen wie Schwefelmangel und Anaerobie verstärkt exprimiert wurde (Nguyen et al., 2008). Generell ist die Regulation der LHCII Expression von besonderer Bedeutung für den Photosynthese-Apparat, um auf variierende Lichtbedingungen und der sich daraus ergebenden Stresssituation (photooxidativer Schaden) zu reagieren (Anderson & Andersson, 1988). Die Regulation der Reaktionen auf veränderte Umwelteinflüsse kann auf Ebene der transkriptionellen Initiation (Maxwell et al., 1995; Millar et al., 1995) oder der post-transkriptionellen Stufe erfolgen (Flachmann & Kühlbrandt, 1995; Lindahl et al., 1995; Durnford et al., 2003).

2.5.2 Cytosolischer Translationsrepressor NAB1

Mussnug und Mitarbeiter konnten zeigen, dass bei der LHC Translationskontrolle in *Chlamydomonas reinhardtii* ein cytosolisches RNA-bindendes Protein NAB1 eine wichtige Funktion besitzt (Mussnug et al., 2005). Durch die Bindung der LHC-Lichtsammelantennen-Proteine mittels NAB1 wird die Größe und Zusammensetzung der LHC-Lichtsammelantenne reguliert (Mussnug et al., 2005; Wobbe et al., 2009). Dabei

bindet NAB1 spezifisch an Lhcbm-mRNAs (Wobbe et al., 2009). Wobbe et al. konnten zeigen, dass die NAB1-vermittelte Sequestrierung der RNA innerhalb von Ribonucleoprotein-Komplexen (mRNPs) stattfindet (Wobbe et al., 2009).

Mit der *knock out* Mutante *Chlamydomonas reinhardtii stm3*, in der das *nab1* Gen deletiert ist und damit keine funktionelle Expression erfolgt, konnte gezeigt werden, dass diese Mutation in einer Vergrößerung der Lichtsammelantenne des PS II um 30 – 40 % resultierte (Mussgnug et al., 2005). Desweiteren konnten Wobbe und Mitarbeiter demonstrieren, dass die Aktivität von NAB1 via zwei Cystein-Resten redox-kontrolliert ist (Wobbe et al., 2009). Diese Cysteine befinden sich an Positionen 181 und 226 innerhalb des C-terminalen *RNA Recognition Motif* (RRM). Werden diese Cysteine durch ortsspezifische Mutagenese gegen zwei redox-inaktive Serine ersetzt, resultiert diese Modifikation in einer permanent aktiven Form von NAB1. Diese ortsspezifische Mutation erzeugte einen Phänotypen mit einem reduzierten PS II-Antennensystem (Wobbe et al., 2009; Beckmann et al., 2009).

2.5.3 Photosynthetische Umwandlungseffizienz

Der Lichtsammelkomplex nimmt durch die Absorption des Lichtes eine zentrale Stellung im Rahmen der photosynthetischen Lichtreaktion ein. Bestimmte LHC-Untereinheiten üben eine wichtige Funktion bei der thermalen Dissipation von übermäßiger Anregungsenergie und verhindern auf diese Weise photooxidative Schäden, da es keiner photochemischen Nutzung der Lichtenergie kommt (Müller et al., 2001). Obwohl diese Schutzmechanismen eine wichtige Funktion für das Überleben der Zellen bedeuten, beeinträchtigen und minimieren sie desweiteren die photosynthetische Umwandlungseffizienz (*photon conversion efficiency*, PCE) und somit die Produktion von Biomasse (Prince & Kheshgi, 2005) (Abbildung 9). Eine Hitze-Dissipation im Rahmen des *non-photochemical quenching* (NPQ) gehört zu den wichtigsten Lichtakklimatisations-Prozessen als schnelle Antwort auf eine Erhöhung der Lichteinstrahlung (Müller et al., 2001) und ist des weiteren auch für ein, aus Sicht des Biotechnologen, zu geringe PCE verantwortlich.

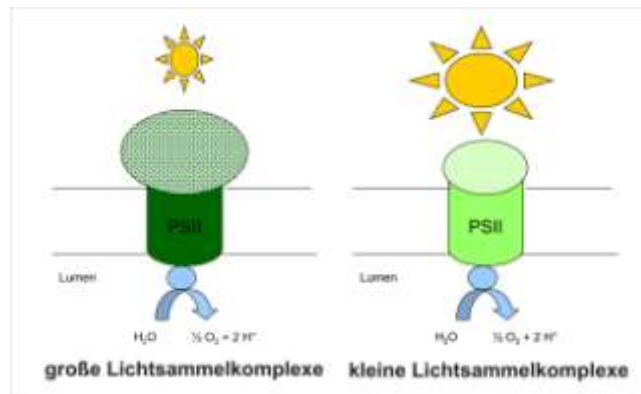


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Assemblierung von Lichtsammelkomplex-Preteinen in Reaktion auf den Faktor Licht. Um effizient Licht zu absorbieren ist es bei geringer Einstrahlung ergiebiger über große Antennen-Flächen aus LHC-Proteinen Photonen an das PS II weiterzuleiten. Hingegen tendieren eukaryotische Pflanzenzellen zu kleinen Lichtantennen unter Starklichtbedingungen, in dem Komponenten des einen Photosystems (hier PS II) zum anderen (PS I) migrieren (hier nicht dargestellt).

Für biotechnologische Applikationen sind hohe PCE Raten in geschlossenen Bioreaktoren für optimale Biomassenerträge, insbesondere unter Starklicht Applikationen wie sie im Freiland auftreten, essentiell (Polle et al., 2002, 2003; Kruse et al., 2005). Die Regulation der Lichtsammelantennen ist für die Verbesserung der Wachstumseffizienzen in großtechnischen Ansätzen von großer Bedeutung.

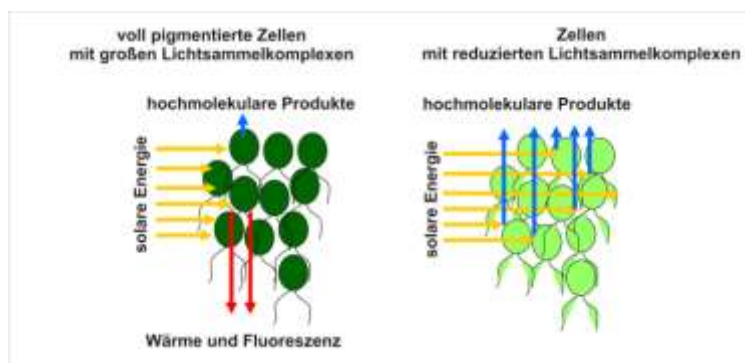


Abbildung 10: Dargestellt ist die modifizierte Lichtnutzung nach gentechnologischem Eingriff. Während in dichten Kulturen, Zellen aufgrund des reduzierten Lichtangebotes große Antennensysteme assemblieren und ein Großteil der absorbierten Energie photochemisch ungenutzt abgegeben wird (linker Abbildungsausschnitt), kann das Licht in Kulturen mit reduzierten Lichtantennen tiefer eindringen und höhere Umwandlungseffizienzen ermöglichen (rechter Abbildungsausschnitt) (modifiziert nach http://www.hydrogen.energy.gov/pdfs/review11/pd036_melis_2011_o.pdf)

Große Antennensysteme, die Algen unter natürlichen Lebensbedingungen konkurrenzfähig machen, haben einen deutlichen Nachteil im Rahmen ihrer biotechnologischen Nutzung (Abbildung 9). Zum einen führen sie zu einer geringen Lichtpenetration und stehen somit einem Erreichen hoher Zelldichten in Photo-

Bioreaktoren im Weg. Zum anderen wird ein großer Teil (80-90%) der absorbierten Lichtenergie nicht photochemisch genutzt und dient somit nicht der Erzeugung von Biomasse (Polle et al., 2003). Von den äußeren Schichten dieser Kulturen wird mehr Energie absorbiert als effizient genutzt werden kann und somit wird überschüssige Energie in Form eines essentiellen Schutzmechanismus gegenüber Photoinhibition oder photooxidativen Schaden als Wärme oder Fluoreszenz via nichtphotochemischer Energie-Dissipation wieder abgegeben (*non photochemical quenching*, NPQ) (Müller et al., 2001). Hinzu kommt das Zellen innenliegender Bereiche an Licht verarmen und damit deren Umwandlungseffizienten ebenfalls beeinträchtigt werden (Naus & Melis 1991; Neidhardt et al. 1998; Melis et al. 1999) (Abbildung 10). Von großem wissenschaftlichem Interesse ist deshalb die Identifizierung und Funktionsweise von Genen, die an der Regulation der Chlorophyll-Lichtantenne beteiligt sind und damit die Produktivität großtechnisch angelegter Kulturen optimiert (Nakajima & Ueda, 1997; Melis et al. 1999; Polle et al., 2002; Melis, 2009; Beckmann et al., 2009). Es konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden, dass eine Reduktion der Lichtsammelantenne die Umwandlungseffizienz der Kultur steigert, in dem der Energieverlust durch Dissipation von Wärme und Fluoreszenz der äußeren Schichten dichter Kulturen über die Regulation der Antennengröße minimiert werden konnte. Auf diese Weise konnte die Lichtpenetration ins Innere dichter Kulturen verbessert und somit die Produktivität der gesamten Zellkultur optimiert werden mit dem Resultat eines höheren und schnellerem Wachstum unter hohen Lichtbedingungen aufgrund reduzierter Photoinhibition (Mussgnug et al., 2007; Melis et al., 1999; Prince & Kheshgi, 2005; Neidhardt et al., 1998; Beckmann et al., 2009).

2.6 Proteomics

Die Sequenzierung ganzer Genome ermöglicht die Identifizierung der im Organismus vorhandenen Gene, und erlaubt damit die Quantifizierung der Transkriptmengen auf der Ebene der Genexpression (*transcriptomics*) (Schena et al., 1995). Die Abundanz der Transkripte unterliegt in Reaktion auf sich verändernde intrazelluläre Bedingungen dynamischen Veränderungen, allerdings können erst weitere Analysen an Proteinen (Proteomanalysen) eine eindeutige, ganzheitliche und regulatorische Veränderungen beschreiben (Yarmush & Jayaraman, 2002; Yates et al., 2009). Die Verbindung zweier Verfahren, der Flüssigchromatographie gekoppelt mit der Tandem Massenspektrometrie bietet die Möglichkeit viele Peptide einer einzigen Probe zu charakterisieren, worüber große Datenmengen generiert werden können (Wolters et al., 2001; Zhu et al., 2002; Mueller et al., 2008). Die grundsätzlichen Abfolgen im Massenspektrometer umfassen die Ionisierung des zu analysierenden Materials, dessen Separierung im Massenanalysator

und die darauffolgende Erfassung unterschiedlichster Massen, wodurch die Informationen in Form von Spektren für weitere Analysen aufgezeichnet werden (Yates et al., 2009).

Der LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer von Thermo Fischer Scientific ist ein Hybridmassenspektrometer mit einer sehr hohen Massengenauigkeit und Auflösung, welcher eine lineare Ionenfalle (LTQ) und einen Orbitrap Analysator kombiniert und in der vorliegenden Arbeit genutzt wurde. Die Verteilung der Substanzen und die Entstehung der ionisierten Tröpfchen erfolgt hier bei schonendem atmosphärischem Druck. Die Ionen mit unterschiedlich geladenen Massen werden dann, je nach Masse, im Massenspektrometer (MS) aufgetrennt (Smith et al., 2000). Das Orbitrap Spektrometer ist ein von Alexander Makarov entwickelter, neuer Massenanalysator (Thermo Electron, Bremen), welcher die einströmenden Ionen mittels eines statischen elektrischen Feldes einfängt (Hu et al., 2005). Das LTQ-Orbitrap verfügt über einen Massenanalysator mit einem Auflösungsvermögen von bis zu 150 000 (FWHM, *full width at half maximum*) und einer Massen-Genauigkeit von nahezu 2 ppm. Ist der Orbitrap an eine LTQ Ionenfalle gekoppelt, können beide Systeme im Zusammenschluss genutzt werden. Dabei wird der MS *full scan* in hoher Auflösung im Orbitrap durchgeführt und parallel dazu fragmentiert die LTQ Ionenfalle selektierte Ionen für die Identifikation der Peptide. Auf diese Weise ermöglicht das System eine schnellere Vermessung, wodurch mehr Spektren generiert werden können, da das Orbitrap permanent in hoher Auflösung Daten-Abfragungen durchführt (*high resolution full scan*). Im *full scan* werden nur die Masse-zu-Ladung Verhältnisse vermessen. Um Informationen zur Sequenz zu erhalten wird innerhalb einer Tandem MS (MS/MS) ein bestimmtes Peptid isoliert und dessen Ionen beschleunigt, in dem mit spezifischen Frequenzen die Kinetik des Systems erhöht wird. Das resultiert in einer Kollision der Ionen mit einem eingeleiteten stabilen Gas, wodurch eine Fragmentierung ausgelöst wird und bestimmte Muster entstehen. Diese Muster enthalten Informationen von denen die Aminosäuresequenz des Ions abgeleitet werden kann (Steen & Mann, 2004). Für die Fragmentierung in der LTQ Ionenfalle werden im vorliegenden Ansatz die fünf häufigsten Masse zu Ladungswerte ausgewählt (sog. „Big 5“ Ansatz) (Terashima et al., 2010). Die meisten Peptide werden an der Amino-Verbindung zwischen den Aminosäuren getrennt. Ein Fragment, welches die Ladung am Amino-Terminus trägt, wird als b-Ion bezeichnet, während das Fragment mit der Ladung am Carboxy-Terminus als y Ion bezeichnet wird (Steen & Mann, 2004). Von diesen aufgenommenen Spektren kann dann die Peptidsequenz abgeleitet werden. Diese Sequenzen bzw. die zugrundeliegenden MS/MS-Spektren werden durch den Abgleich mit Datenbanken einem Protein zugeordnet. Hierfür werden die Proteinsequenzen in den Datenbanken *in silico* mit Trypsin verdaut und die entstandenen hypothetischen

Fragmentmuster können dann mit den tatsächlich erhaltenen verglichen werden. In dieser Arbeit wurde der Datenbanken Vergleich zum einen mit einem Algorithmus, der als OMSSA (Open Mass Spectrometry Search Algorithm, Version 2.1.4) bezeichnet wird, durchgeführt (Stauber et al., 2003; Naumann et al., 2005; Elias & Gygi, 2007; Terashima et al., 2010), zu anderen mit der kommerziellen Software Mascot™ von Matrixscience. In beiden Fällen wurde ein TDA Ansatz (target decoy approach) verfolgt, bei dem Datenbanken von korrekten Sequenzen mit fehlerhaften Sequenzen bestückt werden, um darüber die Falsch-Positiv Rate zu determinieren und mit gewünschter Stringenz filtern zu können (Albaum et al., 2009; Terashima et al., 2010).

2.6.1 Die Rich-Internet-Applikation QuPE

Die fortschreitende Automatisierung und Optimierung von Analyseverfahren vor allem basierend auf Tandem-Massenspektrometrie mit gekoppelter Flüssigkeitschromatographie haben in den vergangenen Jahren die anfallenden Datenmengen im Bereich Proteomik rapide anwachsen lassen (Matthiesen, 2007). Die Rich-Internet-Applikation QuPE (Albaum et al., 2009) wurde speziell zur Speicherung und Auswertung dieser Hochdurchsatz-Proteomexperimente entwickelt. QuPE gewährleistet zum einen die zentrale Verwaltung experimenteller Daten und Metadaten, zum anderen werden umfassende Funktionen zur Analyse von quantitativen Proteomdaten bereitgestellt. Dabei adressiert QuPE alle Arbeitsschritte eines Proteomexperiments angefangen von Datenimport und -management, über die Identifikation von Proteinen aus massenspektrometrischen Daten, bis hin zur statistischen Analyse von Protein-Expressionsdaten. Dies beinhaltet Statistikfunktionen aus dem Bereich der Clusteranalyse (u.a. K-means Clustering) und der schließenden Statistik (u. a. Shapiro-Wilks Test für Normalverteilung, Kruskal-Wallis Ranksummentest) (Albaum et al., 2011).

Zur Proteinquantifizierung und Berechnung relativer Proteinabundanzen aus metabolisch markierten Proteinproben stellt QuPE spezielle Algorithmen zur Verfügung. Diese unterstützen im Besonderen die Proteinmarkierung mit stabilen Isotopen, wie z.B. ^{15}N , aber auch die Verwendung von „schweren“ Aminosäuren wie im sogenannten SILAC-Ansatz (Terashima et al., 2010; Schmollinger et al., 2012). Ein Alleinstellungsmerkmal von QuPE ist die Möglichkeit Isotop-markierter Proben mit variablen Einbauraten von beispielsweise ^{15}N (im Verhältnis zu ^{14}N) zu verarbeiten (Albaum et al., 2009). Das Verfahren wurde ursprünglich für die Untersuchung der beiden Komponenten des Protein-Turnovers – Synthese und Abbau – mit Hilfe von Pulse-Chase Experimenten entwickelt. Diese Experimente folgen dem Prinzip, eine zum Beispiel zunächst in unmarkiertem (^{14}N) Medium kultivierte Probe zu einem bestimmten Zeitpunkt in

markiertes Medium (^{15}N , Pulse) zu transferieren. Es ist zu erwarten, dass alle vom Organismus nach diesem Zeitpunkt neu-synthetisierten Proteine in zunehmendem Maße das schwere Isotop einbauen. Auf diesem Wege kann somit die Synthese von Proteinen verfolgt werden (Chase) (Abbildung 11) (Albaum et al., 2009; Albaum et al., 2011).

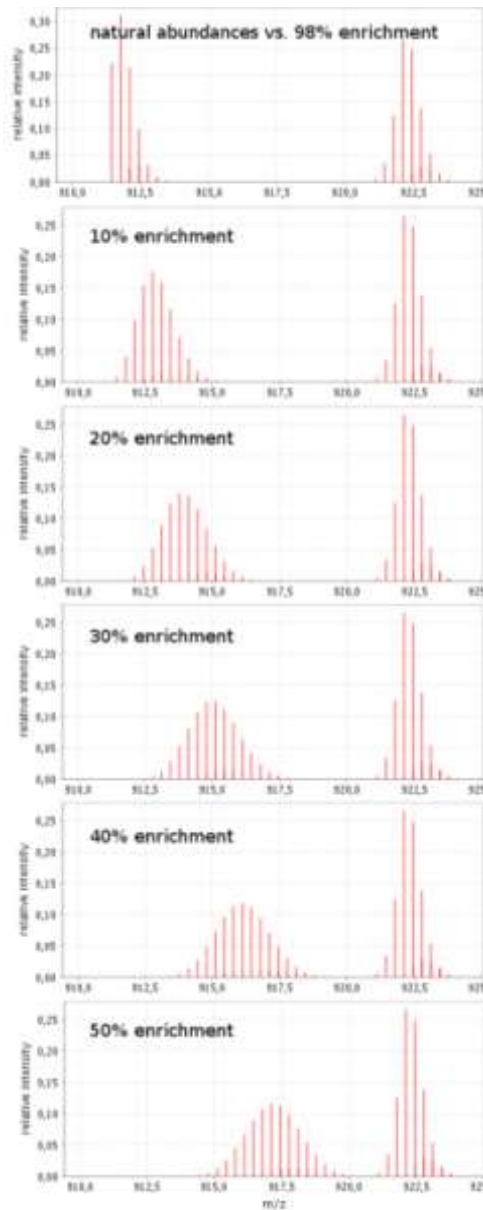


Abbildung 11: Die Abbildung zeigt die theoretisch zu erwartenden Isotopverteilungen eines Peptids bei unvollständigem Einbau von $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$. In allen sechs Fällen ist jeweils die Isotopverteilung eines vollständig ^{15}N -markierten Peptids auf der rechten Seite zu erkennen; links daneben findet sich jeweils die Isotopverteilung des in der Sequenz identischen, jedoch nur partiell ^{15}N gelabelten Peptids, angefangen von 0% bis hin zu 50% ^{15}N -Einbau. Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl die relative Position als auch die Form der Isotopverteilung deutlich von der jeweiligen Einbaurate abhängen (Albaum et al., 2011).

Neben der ursprünglichen Anwendung in Pulse-Chase-Experimenten ist das in QuPE implementierte Verfahren jedoch ebenso auf ein weiteres, häufig bei höheren Organismen auftretende Problem in der Proteinquantifizierung übertragbar: aufgrund des verhältnismäßig, insbesondere im Vergleich zu Bakterien, langsamen Stoffwechsels kommt es zum Auftreten unvollständig markierter Proteine. Diese zeichnen sich durch eine variable Verteilung und Anordnung der Isotop-Peaks aus, wie die Abbildung 11 am Beispiel eines vollständig ^{15}N -gelabelten sowie eines variabel ^{14}N zu ^{15}N -gelabelten Peptids zeigt. Der Algorithmus in QuPE ist in der Lage diese variable und *a priori* unbekannte Einbaurate zu bestimmen, und anschließend in der Berechnung relativer Proteinabundanz richtig zu berücksichtigen. Trötschel und Mitarbeiter liefern eine detaillierte Beschreibung des Algorithmus, dessen Validierung anhand eines Benchmark-Datensatzes sowie an der ausführlichen Evaluation am Beispiel der Untersuchung von Hitzestress erfolgt (Trötschel et al. 2012).

3. Material und Methoden

3.1 Eingesetzte Zelllinien, Kultivierungsbedingungen und Bezugsgrößen

3.1.1 Die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*

Die verwendeten *Chlamydomonas reinhardtii* Stämme sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die dauerhafte Haltung erfolgte durch mixotrophe Kultivierung in TAP-(Tris-Acetat-Phosphat) Vollmedium auf Agarplatten (Harris 1989, Gorman & Levine 1965). Durch Zugabe von Acetat als Kohlenstoffquelle und einer kontinuierlichen Weißlicht-Belichtung bei $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erfolgte die mixotrophe Anzucht in einem Lichtschrank (Rubarth Apparate GmbH) bei konstanter Temperatur (20°C). Flüssigkulturen wurden im entsprechenden Medium bei 23°C und $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht auf einem Schüttler (GFL, 3017) bei 110 rpm inkubiert. TAP-Agarplatten mit Zugabe von $100 \mu\text{M}$ Emetine wurden für die Selektion positiver Transformaten genutzt.

Neben der mixotrophen Anzucht wurden Zellen in bestimmten Fällen auch photoautotroph kultiviert. Für die photoautotrophe Anzucht wurde HSM (*high salt* Medium) genutzt und die Zellen mit CO_2 angereicherter Luft begast (Sueka et al, 1967). Dazu wurde der Luft 2% (v/v) CO_2 beigemischt. Autotrophes Zellwachstum wurde unter konstanter Belichtung bei $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ getestet. *Stm6Glc4* und *Stm6Glc4 T7* (*T13*, *T22*, *T69*) Kulturen wurden in 200 mL HSM mit einer o.D.₇₅₀ von 0.05 (entspricht $1-1.5 \times 10^6$ Zellen/mL) inokuliert und die Wachstumsraten über die Messung der optischen Dichte bei 750 nm und Zählung der Zellen mittels der Bürkerzellzählkammer (VWR) verfolgt.

Tabelle 1 Verwendete oder hergestellte *Chlamydomonas reinhardtii* Zelllinien

Stammname	Mutation	Charakterisierung	Literatur
cc406 cc3491		Wildtyp CC 400 (cw15 mt+) Wildtyp (cw15 mt-; 4x rückgekreuzt (CC-125 x CC- 406))	<i>Chlamydomonas</i> ressource centers
<i>Stm6 Glc4</i>	HUP1 Überexpression	Integration eines funktionalen Zuckertransporters aus <i>Chlorella kessleri</i>	Doebbe et al., 2007
<i>Stm6Glc4 T7</i> (T13,T22 und T69)	NAB1 ^c Überexpression	Reduzierter LHCII Lichtantenne	Beckmann et al., 2009

3.1.2 *Escherichia coli* (*E. coli*)

Für die Vervielfältigung und Isolierung von Plasmid-DNA wurden Derivate des zur Familie der Enterobacteriaceae gehörenden Bakterium *Escherichia coli*-Stammes K12 verwendet. Bei diesem Stamm handelt es sich um einen sog. Sicherheitsstamm, dem die Pathogenitäts-Gene fehlen (Toxine, Adhäsions- und Invasionsfaktoren, Oberflächenstrukturen). Zu diesen Stämmen zählte auch *Escherichia coli* DH5 α , ein Ampicillin-resistenter Stamm (Hanahan, 1983). Zur Anzucht wurde das Medium mit diesem Antibiotikum (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) versetzt. Flüssigkulturen von *E. coli* wurden durch Animpfen von 4 mL Luria Bertani (LB)-Medium (Sambrook et al. 2001) hergestellt und über Nacht (16 h) in einem Inkubationsschrank (New Brunswick Scientific INNOVA 4400 Incubation Shaker) bei 190 rpm und einer Temperatur von 37°C angezogen. Sofern eine größere Menge nötig war, wurde das entsprechende Volumen mit einer Übernachtkultur inokuliert.

Das Luria-Bertani-Medium besteht aus Bacto-Trypton (1%; w/v), Hefe-Extrakt (0,5%; w/v) und NaCl (1%; w/v); pH=7. Das flüssige Medium wird autoklaviert (Systec 3150 EL) und kann bei 4°C gelagert werden. Für die LB-Platten wurde vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar zugeben. Vor der Zugabe des Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sollte das Medium nicht wärmer als 60°C sein (Sambrook et al., 2001).

Zur kurzzeitigen Lagerung von *E. coli*-Stämmen wurden die Zellen auf eine Platte überimpft (LB-Medium, 1,5% Agar), über Nacht inkubiert (37°C) und bei 4°C gelagert.

E. coli Kulturen können dauerhaft in einem Medium bestehend aus 50% LB und 50% Glycerol bei -80°C aufbewahrt werden. Zellen der Glycerinkultur wurden bei Bedarf auf einer Agarplatten ausgestrichen. Von den Platten können einzelne Kolonien zur Inokulation des Flüssigmediums abgenommen werden.

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

Stammname	Genotyp und Literatur
DH5 α	<i>SupE44, ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15, <i>hsdR17</i>, <i>recA1</i>, <i>endA1</i>, <i>gyrA96</i>, <i>thi-1</i>, <i>relA1</i> (Hanahan, 1983)</i>
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_p</i> , <i>lacZΔM15</i> , Tn10 (<i>tet'</i>)] (Sambrook et al., 1989)

3.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl der Algensuspensionen wurde in einer Bürkerzellzählkammer (VWR) durchgeführt. Das Zählnetz der Kammer ist in 9 große Quadrate von je 1 mm Seitenlänge und je 1 mm² Fläche geteilt. Jedes Großquadrat ist in 16 Quadrate von je 0,2 mm Seitenlänge und je 0,04 mm² Fläche geteilt.

Volumen über einem Kleinquadrat = 0,00025 mm³

Volumen über einem Großquadrat = 0,004 mm³

Um auf ein Volumen von 1 mL zu kommen, müssen die Volumina sowohl der Groß-, als auch der Kleinquadrate mit einem sogenannten Kammerfaktor multipliziert werden

Kammerfaktor eines Kleinquadrates : 4×10^6 ($\times 0,00025 \text{ mm}^3 = 1000 \text{ mm}^3 = 1\text{mL}$)

Kammerfaktor eines Großquadrates : $2,5 \times 10^5$ ($\times 0,004 \text{ mm}^3 = 1000 \text{ mm}^3 = 1\text{mL}$)

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte, indem 1 mL Algenkultur abgenommen und mit 1 μl Jodlösung versetzt wurden. 100 μl der Lösung wurde auf die Zählkammer aufgetragen und mit Hilfe eines Lichtmikroskops die Anzahl der Algenzellen ausgezählt. Abhängig von der Zelldichte wurden in der Regel 4 Großquadrate ausgezählt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

(Zellzahl = Kammerfaktor x Mittelwert der ausgezählten Zellen)

3.1.4 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Aus den Algenkulturen (pelletiert durch Zentrifugation (2 min 3000 g)) wurden die Chlorophyll-Moleküle mit 80%igem Aceton extrahiert (15 s vortexen), zelluläre Bestandteile durch Zentrifugation bei 16100 g für 1 min sedimentiert und 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 des Aceton-Wassergemisches bei 645 nm (A_{645}) und 663 nm (A_{663}). Die Berechnung des Chl a/b Verhältnisses und des totalen Chlorophyllgehaltes wurde nach Arnon (1959) vorgenommen:

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

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

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

3.1.5 Messung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung

Zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration flüssiger Zellsuspension wurde eine Clark Elektrode (HansaTech), ein elektrochemischer Sensor basierend auf einer Platin-Kathode und Silber-Anode, verwendet. Die Kultivierung der Zellsuspensionen erfolgte für 3 Tage bei $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht. Die *Chlamydomonas*-Kulturen wurden vor der Messung auf gleiche Zellzahlen eingestellt (7×10^6 Zellen/mL). Die apparente Photosyntheserate wurde nach Zugabe von Natriumhydrogencarbonat (Endkonzentration 10 mM) bei steigenden Lichtintensitäten (16, 50, 90, 270, 923 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und konstanter Temperatur (25°C) über 3 min vermessen. Im Anschluss der jeweiligen Lichtphase wurde in einer 3 minütiger Dunkeladaptation die Respirationsrate ermittelt, die von der Nettophotosyntheserate (apparente O_2 -Produktion) subtrahiert wurde, um die Bruttophotosyntheserate zu ermitteln. Die photosynthetischen Lichtsättigungskurven wurden gegen die Zellzahl graphisch dargestellt.

3.1.6 Chlorophyll a Fluoreszenz Messung mittels PAM-Fluorometrie

Die Bestimmung der Chlorophyll-a-Fluoreszenz wurde bei Raumtemperatur mit der Mini-PAM (Walz, Deutschland) durchgeführt. Diese Methode liefert Aussagen über den physiologischen Zustand der Algen und speziell über die Effektivität des Photosynthese-Apparates. Eine Kenngröße der Aktivität von PS II (Photosystem II) ist die maximale

Quantenausbeute, die sich aus dem Quotienten von F_v/F_m ergibt. Die Messung der maximalen Quantenausbeute erfolgte nach 5 minütiger Dunkeladaptation flüssiger Zellkulturen (15 $\mu\text{g Chl/mL}$) durch Applikation eines Sättigungspulses mit einer Lichtintensität von $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Berechnung von F_v/F_m aus der maximalen Fluoreszenz (F_m) und der Grundfluoreszenz (F_0 ; Messlicht-induzierte Fluoreszenz) erfolgte nachfolgender Formel: $[F_v/F_m=(F_m-F_0)/F_m]$ (nach Maxwell & Johnson, 2000). Die apparente photosynthetische Quantenausbeute (*photosynthetic quantum yield*, $\Phi_{\text{PS II}}=(F_m'-F_t)/F_m'$) wurde anhand steigender Intensitäten (0, 54, 350, 850 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in flüssigen Zellkulturen (15 $\mu\text{g Chl/mL}$) ermittelt.

Bei den Wasserstoff Experimenten wurden ab der initialen Phase, bis zum Erreichen der anaeroben Phase alle 2 h die apparente photosynthetische Quantenausbeute der belichteten Kulturen ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bestimmt, um das Eintreten in letztere terminieren zu können.

3.1.7 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Bradford Test ist eine Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen bis in den Mikrogrammbereich pro mL. Der Farbstoff *Coomassie brilliant blue G-250* (Triphenylmethan-Farbstoff) bildet im sauren Milieu mit den kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen einen Komplex. Durch die Komplexbildung wird der Farbstoff vom kationischen in den anionischen Zustand überführt, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes verschiebt (465 nm ungebunden, 595 nm komplexiert). Da der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplex sehr viel höher im Vergleich zum ungebundenen Farbstoff ist, kann die Zunahme der Absorption bei 595 nm durch die Bildung des Komplexes gegen das freie Farbreagens photometrisch gemessen werden und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Zur Konzentrationsbestimmung eines Proteingemischs wurden Standardproteine (hier: Lysozym) zur Kalibrierung genutzt. Die Proteinbestimmung wurde handelsüblichen Reagenzien (Roti®-Quant, Roth) der Anweisung des Herstellers für einen Mikroansatz folgend durchgeführt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 DNA-Isolierung

3.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus *C. reinhardtii* mit der CTAB Methode

Die Inhaltsstoffe einer pflanzlichen Zelle erfordern besondere Detergenzien, um die DNA hinreichend rein zu isolieren. Die entscheidende Komponente des Lysispuffers ist das Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB). Das CTAB ist ein quatäres Ammoniumsalz und bildet mit Proteinen einen unlöslichen Komplex, der nach Zugabe des Lysepuffers ausfällt während die DNA im Überstand verbleibt. Die an die DNA gebundenen, zur strukturellen Organisation beitragenden Histone werden durch Behandlung mit Proteinase K gelöst. Durch die Behandlung mit Kaliumacetat wird SDS aus dem Ansatz entfernt, wobei die endgültige Aufreinigung der Nukleinsäurelösung mit einer Phenol-Chloroform-Extraktion erfolgt. Durch die anschließende Alkoholfällung werden verbliebene Phenolreste und Salze aus der Lösung entfernt.

5 mL Zellkultur (o.D.₇₅₀=0,6 (Photometer: Shimadzu UV 1202)) von *Chlamydomonas reinhardtii* wurden bei RT und 3000 g zentrifugiert (Heraeus Sapatech, Labofuge Ae). Das Zellpellet wurde in 1 mL sterilem H₂O aufgenommen und bei 16000 g für 5 min zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415-R). Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Pellet in 350 µl CTAB-Puffer (2% w/v CTAB; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH=8; 1,4 mM NaCl) resuspendiert, 50 µl Proteinase K – Lösung (2 mg/mL, in 50 mM Tris-HCl, pH=8; 50% w/v Glycerol; 5 mM CaCl₂) und 25 µl 20% SDS aufgenommen. Das Resuspendat wurde für 2 h in einem Wasserbad bei 55°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz auf Eis abgekühlt und 50 µl 5 M Kaliumacetat zugeben, kurz invertiert, 30 min auf Eis inkubiert und nachfolgend 15 min bei 13000 g zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415-R). Im weiteren Verlauf wird der Überstand mit gleichen Volumen Phenol/ Chloroform vermengt. Dazu wurde 1 Volumen Phenol/Chloroform zugeben, gut geschüttelt und zum Trennen der wässrigen Phase bei RT für 1-5 min bei 16000 g zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415-R). Mit der wässrigen Phase erfolgte im Anschluss gegebenenfalls eine zweite Phenol/Chloroform-Extraktion. Die so erhaltene, aufgereinigte wässrige Lösung wurde mit circa 1 mL –20°C kaltem Ethanol p.A. (Endkonzentration mind. 70% EtOH) aufgefüllt, wodurch die DNA ausgefällt und durch Zentrifugation (5 min; 16000 g; RT) pelletiert werden konnte (Eppendorf Zentrifuge 5415-R). Das DNA-Pellet wurde mit 70% EtOH p.A. gewaschen und 1 min

bei 16000 g zentrifugiert. Die getrocknete DNA wurde in 50 µl TE + 1 µl RNase (500 µg/mL) gelöst und für 30 min bei RT inkubiert.

3.2.1.2 Isolierung von Plasmid DNA aus *Escherichia coli*

Für die Lyse der Bakterien zur Gewinnung niedermolekularer DNA stehen mehrere Aufschlussmethoden zur Verfügung. Die hier verwendeten Kits (E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit1, PeqLab; PureYield™ Plasmid Midiprep System), sowie die Durchführung ohne Kit basieren auf dem Prinzip der alkalischen Lyse durch SDS/NaOH (Birnboim & Doly, 1979). Diese einfache und effiziente Methode nutzt die Vernetzung von chromosomaler DNA durch Denaturierung und Renaturierung über Änderung des pH-Wertes (Alkalidenaturierung) und eignet sich am besten für große Plasmide und *low-copy* Plasmide (Lottspeich, 1998). Zunächst wurden die Bakterien abzentrifugiert und die entstandenen Pellets in EDTA-haltigem Puffer resuspendiert. EDTA komplexiert zweiwertige Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+}), wodurch die bakterielle Zellwand destabilisiert und aufgebrochen wurde. Die Zugabe einer Mischung aus SDS und NaOH lysierte die Bakterien vollständig. Die Neutralisierung erfolgte mit saurem Kalium-Acetat Puffer. Denaturierte Proteine, RNA, denaturierte chromosomale DNA und bakterieller Zelldebris bilden in Anwesenheit von Kaliumdodecylsulfat unlösliche Komplexe und werden zusammen mit Salz präzipitiert. Die kleineren Plasmide bleiben in Lösung und können durch die Neutralisierung wieder renaturieren. Die unlöslichen Komponenten werden abzentrifugiert und die DNA kann weiter bearbeitet werden (Lottspeich, 1998).

3.2.1.3 Plasmid-Isolierung mit Mini-Prep

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des E.Z.N.A Plasmid Mini-Prep Kit I (PeqLAB) der Anweisung des Herstellers folgend. Durch Aufbrechen der Bakterienzellen und Fällung der DNA und den Proteinen werden die Plasmide durch Bindung an Kieselgel-Matrix-Säulen aufgereinigt, von Kontaminationen befreit und mit H_2O_{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. Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind Tabelle.3 aufgelistet.

Tabelle.3 In dieser Arbeit verwendete Plasmide und ihre Charakterisierung

<i>Plasmid</i>	<i>Charakterisierung</i>	<i>Information</i>
P613	Selektierbarer Marker: <i>cry</i> Gen vermittelt Resistenz gegenüber Emetine	Nelson et al., 1994
pGDNG3/Cys(181/226)Ser	Modifizierter Expressionsvektor pGenD für <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . Das in pKS kloniertes <i>PsaD</i> -Gens einschließlich der Promotor- und 5' untranslatierten Region (pGenD) wurde durch das mutagenisierte NAB1 Gen ersetzt	Fischer & Rochaix, 2001 Wobbe et al., 2009

3.2.2 RNA-Isolierung aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Die Gewinnung der Gesamt-RNA aus *Chlamydomonas reinhardtii* erfolgte mittels *single-step*-Methode nach Chomczynski & Sacchi (1987). Zunächst werden die Zellen durch die Behandlung mit Guanidinisothiocyanat (GTC) lysiert. GTC, ein chaotrophes Salz, welches Proteine denaturiert und effektiv inaktiviert. Während der Zentrifugation lysiert ein Teil der Zellen, woraufhin RNasen freigesetzt werden. Direkt im Anschluss wird der pH-Wert durch das saure Phenol gesenkt. Die Proteine denaturieren und können dadurch entfernt werden. Im sauren Phenol lösen sich ebenfalls kleinere DNA-Fragmente, während sich die größeren nach der Zentrifugation in der Interphase befinden. Im wässrigen Überstand verbleibt die RNA, die gefällt und gereinigt werden muss (Mühlhardt, 2003). Diese Gesamt-RNA besteht aus einem Gemisch ribosomaler RNA, Transfer-RNA und *messenger*-RNA (mRNA). Der Anteil an mRNA an der totalen RNA entspricht etwa 2%, dieser Anteil reicht für die meisten Anwendungen z.B. für die *real-time* PCR bereits aus.

3.2.2.1 RNA-Isolierung aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Die RNA-Isolierung erfolgte nach Chomczynski & Sacchi (1987). Pro Ansatz wurden jeweils 1×10^7 Zellen pelletiert (2 min, 3000 g) und mit 1 mL Denaturierungslösung (4 M Guanidinisothiocyanat, Roth; 25 mM Natriumcitrat pH=7, Sigma; 0.5% w/v N-Laurylsarcosin, Sigma) und 100 mM frisch zugesetzten β -Mercaptoethanol lysiert. β -Mercaptoethanol spaltet Disulfidbrückenbindungen und denaturiert Proteine. Das Lysat wurde mit 100 μ l 2 M Natriumacetat angesäuert, durchmischt und nach sukzessiver Zugabe von 1 mL Aqua-Phenol (Roth, pH=4,5–5) und 200 μ l Chloroform (Roth) nach jeder Zugabe intensiv, minutenlang *gevortext*. Der Ansatz wurde anschließend für 15 min auf Eis inkubiert und danach für 20 min bei 10000 g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415-R). Die wässrige Phase wurde entnommen und mit einem gleichen Volumen

Isopropanol überschichtet, wodurch die RNA ausfiel. Es folgte eine Inkubation des Fällungsansatzes bei -20°C über Nacht. Im folgenden Schritt wurde die Suspension 10 min bei 10000 g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415-R). Das Pellet wurde nochmals in 0,3 mL Denaturierungslösung + 2,1 μl β -Mercaptoethanol aufgenommen und ein zweites Mal mit 0,3 mL Isopropanol gefällt. Das durch die anschließende 15 minütige Zentrifugation bei 10000 g (Eppendorf Centrifuge 5415-R) erhaltene Pellet wurde mit 70%igem EtOH gewaschen, getrocknet und neu in 20 μl DMDC- H_2O gelöst. Der finale Zentrifugationsschritt (max. 1 min bei 10000 g) (Eppendorf Centrifuge 5415-R) pelletierte eventuell enthaltene Protein-Kontaminationen. Der Überstand wurde in ein neues, steriles 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt und gegebenenfalls mit 0,1 μl RNase-Inhibitor (RnaseOUT; Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen; 40 U/ μl)) versetzt. Die gereinigte RNA konnte in einem denaturierendem Formaldehydgel (s.3.2.2.3) überprüft und bei -80°C gelagert werden.

Lösungen, wie z.B. destilliertes Wasser, können durch die Behandlung mit 0,1% (w/v) DMDC (Dimethyldicarbonat) nahezu vollständig von RNasen gereinigt werden. Die Behandlung erfordert zunächst eine mindestens 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur, da DMDC an primäre und sekundäre Amine, z.B. Histidin bindet. Durch die Ausbildung kovalenter Bindungen wurde die Aktivität der RNasen und aller anderen Enzyme zerstört. Anschließend wird die Lösung zweimal autoklaviert (Systec 3150 EL), wodurch DMDC zu CO_2 und Methanol zerfällt. Alle Substanzen, die primäre Amine enthalten werden zerstört, weshalb diese Methode nicht zur Dekontamination von (z.B. Tris-haltigen) Puffern eingesetzt werden kann (Mühlhardt, 2003). Alternativ können Glaswaren zur Dekontamination bei $180\text{--}200^{\circ}\text{C}$ gebacken werden.

3.2.2.2 DNaseI Verdau

Bei der Mehrzahl der zur RNA Isolierung verwendeten Verfahren finden sich noch Spuren von DNA. Um solche Kontaminationen zu eliminieren, sollte vor der cDNA Synthese eine Behandlung des RNA Isolats mit DNaseI erfolgen. RNA-Proben lassen sich durch eine enzymatische Reaktion der RQ1 (RNase-freie Dnase (Promega)) von kontaminierenden DNA-Fragmenten aufreinigen. Ein weiterer entscheidender Schritt ist die Hitze-Deaktivierung der DNaseI, damit die RNA selbst intakt bleibt. Eine Inkubation bei 70°C und die Zugabe der DNaseI-Stop-Lösung führt zur Deaktivierung der DNaseI vor dem Einsatz der RNA in PCR-Experimenten. In der Tabelle 1.4 ist das Pipettierschema zum DNaseI Verdau aufgeführt

Tabelle 4: Pipettierschema zum DNase Verdau

RNA (mit DMDC-H ₂ O auf ein Gesamtvolumen von 7,75 µl auffüllen)	5 µg
10 x DNaseI Reaktionspuffer (mit DNaseI mitgeliefert)	1 µl
DNaseI (RQ1)	1 µl
RNase freie DNase M610A Promega)	
RNase Inhibitor (RNasin Plus)	0,25 µl
RNase Inhibitor N2611 Promega)	
Gesamtvolumen	10 µl

Der Verdau erfolgte bei Raumtemperatur für 30 min. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 1 µl RQ1-Stopp-Lösung beendet. Zudem erfolgte eine Inkubation bei 70°C für 20 min, um die DNaseI vollständig zu inaktivieren. Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert und 122 µl H₂O-DMDC zugegeben. Von dieser Verdünnung wurden 8 µl (=300 ng) für einen 25 µl (q-)RT- PCR Ansatz verwendet. RNA Proben wurden bei -80°C gelagert.

3.2.2.3 Formaldehydgel

Das Formaldehydgel dient zur Kontrolle des Reinheitsgrad und des Zustands der isolierten RNA, da Degradationen sehr gut zu erkennen sind. Eine exakte, reproduzierbare Analyse von RNA ist nur in denaturierenden Gelen möglich, da hier die verschiedenen Wasserstoffbrückenbindungen aufgehoben werden. Alle RNA-Moleküle laufen abhängig von ihrem Molekulargewicht. Die einzelsträngige RNA bildet durch intra- und intermolekulare Basenpaarung Sekundärstrukturen und Aggregate aus. Die denaturierende Wirkung von Formaldehyd beruht darauf, dass mit den Aminogruppen von Adenin, Guanin und Cytosin Schiffsche Basen ausgebildet werden. Deshalb stehen diese Aminogruppen nicht mehr zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu Verfügung, weshalb die Bildung von Sekundärstrukturen inhibiert ist. Da Formaldehyd auch mit den Aminogruppen von TRIS reagiert, wird als Laufpuffer 3-Morpholino-1-propansulfonsäure (MOPS) eingesetzt (Goldberg, 1980).

Eine weitere RNA-denaturierende Komponente ist das Formamid des Laufpuffers. Das Formamid zerstört die Basenpaarung der RNA und ermöglicht so eine Reaktion der Basen mit dem Formaldehyd (Lottspeich & Zorbas, 1998).

Das denaturierende Gel besteht aus 0,4 g Agarose, 3,3 mL 10 x MOPS (0,2 M MOPS, 0,05 M Natriumacetat, 0,01 M Na₂EDTA) und 24,3 mL Wasser. Dieses wurde in der Mikrowelle solange erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Bevor 5,7 mL 37 %

Formaldehyd zugegeben werden, musste die Gel-Lösung auf 60 °C abkühlen. Die Gel-Lösung und das Formaldehyd musste gut gemischt und dann in die Gelkammer überführt werden. Als Laufpuffer wird 1 x MOPS-Puffer verwendet. Das Gel lief unbeladen 10 min bei 80 mA vor. Es wurden jeweils 1 µg RNA ins Gel aufgetragen und zuvor mit einem Probenpuffer versetzt und auf ein Endvolumen von 10 µl gebracht. Der Probenpuffer besteht aus 2,5 µl 10 x MOPS, 12,5 µl deioniertem Formamid, 4,0 µl 37%igem Formaldehyd, 0,5 µl 1% Ethidiumbromid, 1,5 µl Stopplösung (95% v/v entionisiertes Formamid, 20 mM Na₂EDTA, 0,1 % w/v Bromphenolblau, 0,1 % w/v Xylencyanol). Von dieser Stammlösung wurden 8 µl eingesetzt. Die RNA wurde darin bei 68 °C 10 min denaturiert (Eppendorf Thermomixer comfort) und im Gel separiert. Die Auftrennung erfolgte bei 80 mA. Im Tranilluminator sollten die 28 S rRNA- und die 18 S rRNA-Banden gut zu erkennen sein.

3.2.3 DNA-Transformationen von Zellkulturen

3.2.3.1 Kerntransformation von *Chlamydomonas reinhardtii*

Die Kerntransformation zur Herstellung von Zufalls-DNA-Insertions-Mutanten der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* wurde nach der Methode von Kindle (1990) mit vereinzelt Abwandlungen durchgeführt. Zur stabilen zufälligen Integration von Plasmid-DNA wurde der Zellwand-reduzierte Stamm *Stm6Glc4* eingesetzt. Bei der Co-Kerntransformation wurden die Zellen zusammen mit zwei unterschiedlichen Plasmiden in kleine Glasröhrchen gegeben und mit 0,3 g Glaskügelchen (Ø=0,5 mm) versetzt. Durch anschließendes vortexen wird Plasmid-DNA in den Kern geschossen und integriert dort zufällig ins Kerngenom der Zelle. Dabei trug ein 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 µM Emetine zum TAP-Medium konnten Transformanten mit diesem Plasmid selektiert werden.

Das andere Plasmid, *pGDN3Cys(181/226)Ser*, 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 des Plasmides *pGDN3Cys(181/226)Ser* wurden zusammen mit 2 µg *p613* transformiert. Die Zellen wurden hierfür 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 überführt und für 100 h bei 23°C und 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht inkubiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 2000 g wurden die Zellpellets in 100 mL TAP-Medium resuspendiert, für weitere 8 h inkubiert, erneut pelletiert, in 10 mL TAP-Medium resuspendiert und je 1 mL auf eine TAP-Emetine-Agarplatte ausgestrichen. Emetine-resistente Transformanten konnten nach 10-12 Tagen Anzucht bei 23°C und 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht isoliert werden.

3.2.3.2 Konstruktion der *Chlamydomonas* Mutante *Stm6Glc4T7*

Über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *EcoRI* wurde das Gen, welches für NAB1 kodiert und dem Wildtypen entstammt, in das Plasmid *pGDNG3* inseriert (Fischer & Rochaix, 2001). NAB1 ist ein spezifisches Repressorprotein und reguliert die Expression der nukleär-kodierten LHC Proteine (Mussgnug et al., 2005, Wobbe et al., 2009). Das Plasmid *pGDN3Cys(181/226)Ser* wurde mittels sequenzspezifischer Mutogene (site-directed-mutagenesis-Kit, Promega) generiert. Der Austausch beider redoxaktiven Aminosäuren Cystein gegen Serin führt zu einem Translationsrepressor, welcher permanent aktiv ist und in *Stm6Glc4* mit der unter 3.2.3.1 beschriebenen Transformationsmethode inseriert wurde (Wobbe et al., 2009).

3.2.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

3.2.4.1 Standard-PCR

Sämtliche DNA Oligonukleotide, die als Primer verwendet wurden, sind in Abschnitt 3.2.4.6 aufgelistet. PCR Reaktionen (Saiki et al., 1985) wurden unter Verwendung der Taq-Polymerase (Genecraft) und den mitgelieferten Puffern durchgeführt. Die verwendeten Primer wurden mittels des Programms Primer3 (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/Primer3/Primer3_www.cgi) erstellt und bei der Firma Sigma APK synthetisiert.

Ein Standard-PCR-Ansatz setzte sich wie in der folgenden Tabelle dargestellt zusammen und wurde in einem Gesamtvolumen von 25 μl in einem 0,2 mL PCR Gefäß angesetzt.

Tabelle 5: Pipettierschema für eine Standard-PCR

forward primer	1 µl
reverse primer	1 µl
dNTPs (Endkonzentration je dNTP: 200 µM)	2,5 µl
10x Taq-Polymerase-Puffer (100 mM TrisHCl pH=8,3; 500 mM KCl)	2,5 µl
Taq-Polymerase	0,25 µl
H ₂ O bidest	x µl
Template (300 ng chromosomale DNA; 1–10 pg Plasmid-DNA)	x µl
Gesamtvolumen	25 µl

Es ist zu beachten, dass die Polymerase als letztes zum Ansatz pipettiert werden sollte, um einer Primerdegradation vorzubeugen. Nach Beendigung des Programms wird die DNA bei -20°C gelagert. Die Qualität und die Größe der erhaltenen Produkte kann in einem 1–2% Agarosegel überprüft werden, dazu werden $\sim 5 \mu\text{L}$ in das Gel eingetragen. Die Amplifikationen erfolgten in einem PTC-200 Thermocycler der Firma MJ Research nach folgendem Schema:

Tabelle 6: PCR-Zyklus der RT PCR

	<i>Initiale Denaturierung</i>	<i>Template Denaturierung</i>	<i>Primer Anlagerung</i>	<i>Extension/ Elongation</i>	<i>Finale Elongation</i>	<i>Lagerung</i>
Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	94	94	58	72	72	4
Dauer [s]	300	30	45	45	300	variabel
Zyklenzahl	1	35			1	1

3.2.4.2 Amplifikation von RNA (RT-PCR, qRT-PCR)

In der Molekularbiologie existieren zahlreiche Methoden zur Genexpressionsanalyse. Bei der Reversen Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und der quantitativen Real-time-PCR (qRT-PCR) erfolgt der Nachweis der Menge an mRNA indirekt über die Konzentration der synthetisierten cDNA. Während über die RT-PCR die Genexpression in der Zelle untersucht werden kann, lässt sich mit Hilfe der qRT-PCR die Menge einer spezifischen RNA bestimmen. Die cDNA wurde über die im Ansatz enthaltenen reversen Transkriptasen aus mRNA synthetisiert. Bei der qRT-PCR handelt es sich um ein modifiziertes, erweitertes Protokoll der RT-PCR. Im Gegensatz zum Northern Blot eignet sich diese Technik aufgrund der hohen Spezifität und Sensitivität speziell für die Analyse

und die Identifizierung von möglicherweise schwachen Transskripten. Selbst Transskripte die in geringer Anfangskonzentration vorliegen können amplifiziert werden, dies ist auf die Nutzung der Hot-Start-Enzyme, der HotStarTaq DNA Polymerase in Kombination mit spezialisierten Puffern zurückzuführen. Bei der qRT-PCR lässt sich, im Gegensatz zur RT-PCR, der Amplifikationsstatus der DNA im Reaktionsgefäß während des ganzen Verlaufs, mittels der Änderung der Fluoreszenzemission des im Ansatz enthaltenen SYBR green Farbstoffes, nachvollziehen (s.3.2.4.4).

3.2.4.3 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR bietet den Vorteil, dass nach verschiedenen Zyklen ein Aliquot entnommen werden kann. Damit ermöglicht diese Methode die Bestimmung der Zyklenzahl, nach der eine detektierbare Menge des Amplifikates nachweisbar ist.

Tabelle 7: PCR Schema für eine Reverse Transkription

forward primer (5 pmol)	3 µl
reverse primer (5 pmol)	1 µl
2x RT-PCR-Masterlösung	15 µl
QuantiTect-RT-Mix	2,5 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl
H ₂ O bidest	5,2 µl
RNA (100 ng/ µl) bzw. in der no template Kontrolle: durch DMDC H ₂ O ersetzen	3 µl
Gesamtvolumen	30 µl

Die Amplifikationen erfolgten in einem PTC-200 Thermocycler der Firma MJ Research nach folgendem Schema:

Tabelle 8: PCR-Zyklus der RT PCR

	<i>cDNA Synthese</i>	<i>Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase</i>	<i>Denaturierung</i>	<i>Annealing</i>	<i>Elongation</i>	<i>Erstellung der Schmelzkurve</i>
Temperatur [°C]	50	95	95	60	72	60-90
Dauer [s]	1800	900	20	30	40	30
Zyklenzahl	1	44			1	1

Die entnommene cDNA kann nach Entnahme aus dem Thermozykler bei -4°C oder -20°C gelagert werden. Das erhaltene Produkt kann qualitativ in einem 1–2%igem Agarosegel überprüft werden, dazu wurden $\sim 10\ \mu\text{l}$ in das Gel eingetragen.

3.2.4.4 Single-step real-time-PCR mit SYBR Green I

Es wurde das QuantiTect®SYBR®Green RT-PCR Kit von Quiagen verwendet. Die zu untersuchenden RNA Proben wurden mit einem *forward*- und *reverse*-Primer, einer 2 x RT-PCR Masterlösung und einem QuantiTect-RT-Mix versetzt. Die 2 x RT-PCR Masterlösung enthält unter anderem eine Taq-DNA-Polymerase, *SYBR-Green I*, dNTPs (einschließlich dUTPs), 5 mM Magnesiumchlorid und einem RT-PCR Puffer. Der QuantiTect-RT-Mix enthält eine Omniscript® und eine Sensiscript® Reverse Transkriptase. Da sich damit sowohl eine reverse Transkriptase als auch eine Taq-DNA-Polymerase im Ansatz befinden und beide Enzyme ihre Reaktionen in einem Reaktionsgefäß katalysieren, wird diese Methode als *one-step* oder auch *one tube real-time* PCR bezeichnet.

Die PCR beginnt mit einer halbstündigen durch die reverse Transkriptase katalysierte cDNA-Synthese, die in den folgenden Reaktionen der Taq-DNA-Polymerase als Template dient. Die Amplifikation der cDNA kann mittels des im Ansatz enthaltenen Fluoreszenzfarbstoff, *SYBR Green I*, verfolgt werden. Dieser Farbstoff bindet quantitativ an doppelsträngige DNA-Moleküle. Gebundenes *SYBR Green I* besitzt ein Absorptionsmaximum bei 494 nm. Die Fluoreszenzemission steigert sich nach Bindung an die DNA um ein Vielfaches und kann bei 521 nm detektiert werden (Wittwer et al. 1997). Die Fluoreszenzintensität steht in einem direkten Verhältnis zur in der Lösung vorliegenden doppelsträngiger DNA. Eine Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte nach jedem Elongationsschritt durch einen *real time cyler* (DNA Engine Opticon™ Continuous Fluorescence Detector, MJ Research) in Echtzeit und wurde mittels eines Computer-Programms ausgewertet (Opticon Monitor™ Analysis Software Version 1,06 2002, MJ Research).

Anhand der Fluoreszenzintensität (Reporter Signal) kann nun eine Quantifizierung der DNA stattfinden, indem die Kinetik der PCR Reaktion genutzt wird. Die Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Zyklenzahl ergibt die Amplifikationskurve. Dabei entsteht bei linearen Skalierungen eine sigmoide Amplifikationskurve. Die in den ersten Zyklen auftretende Grundlinie (*baseline*) entsteht dadurch, dass in den ersten Zyklen die Menge an Amplifikaten noch zu gering ist und die spezifische Fluoreszenz durch eine Farbstoff-unspezifische Fluoreszenz überlagert wird. Danach folgt die logarithmische

lineare Phase der Kurve, gekennzeichnet durch einen exponentiellen Anstieg der Fluoreszenzintensität und somit auch der Menge der DNA-Amplifikate. Mit zunehmender Zyklenzahl nehmen jedoch störende Einflüssen wie die Anhäufung von Pyrophosphat als Inhibitor, die Degradation der Taq-DNA-Polymerase und die Reduktion der zur Verfügung stehenden dNTPs zu und die Kurve flacht ab und erreicht ein Plateau. Zur Auswertung der Amplifikationskurve wird eine Grenzwert-Linie (*threshold*) parallel zur Abszisse gesetzt. Diese sollte über der *baseline* und signifikant unter dem Plateau liegen und die Kurve in der logarithmischen Phase schneiden. Der Schnittpunkt wird als CT-Wert (*threshold cycle*-Wert oder *crossing point*) bezeichnet. Der CT-Wert bezeichnet den Zyklus, bei dem eine signifikante detektierbare Fluoreszenzerhöhung zu messen ist und dient zur Bestimmung der Anfangskonzentration an Template. Je höher die Anfangskonzentration des zu detektierenden Template ist, desto früher wird die Grenzwertlinie geschnitten und umso kleiner wird der resultierende CT-Wert (Freeman et al., 1999).

Bei der real-time-PCR werden zwei Quantifizierungsmethoden unterschieden (absolute und relative Quantifizierung). In der vorliegenden Arbeit wurde die relative Quantifizierung betrachtet, dabei wird das betrachtete Gen in Relation zur transkribierten mRNA eines endogenen, konstitutiv exprimierten Referenzgenes gesetzt (Chelly et al., 1990). Zu berücksichtigen ist das das Expressionslevel des Referenzgenes nicht schwanken sollte, zudem muss die Vergleichbarkeit der Amplifikationseffizienzen zwischen Ziel und Referenzgen berücksichtigt werden. In der Regel werden dafür Haushaltsgene (z.B. β -Aktin) eingesetzt.

Bei der Primerauswahl sollte beachtet werden, dass die finalen Amplifikate nicht die Länge von 100-150 bp überschreiten. Vorteilhaft ist es wenn mindestens ein Primer über ein Intron gelegt wird, oder ein Intron im zu amplifizierendem Bereich lokalisiert ist, so dass keine kontaminierende DNA als Template dienen kann oder diese zumindest später im Agarosegel als größeres Fragment detektiert werden kann.

Tabelle 9: Pipettierschema für eine real-time PCR

forward primer (5 pmol)	3 µl
reverse primer (5 pmol)	1 µl
2x RT-PCR-Masterlösung	15 µl
QuantiTect-RT-Mix	2,5 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl
H ₂ O bidest	5,2 µl
RNA (100 ng/ µl)	3 µl
Gesamtvolumen	30 µl

Des Weiteren werden Negativkontrollen durchgeführt, in denen RNA durch RNase freies Wasser eingesetzt wird. Dieses dient zur Detektion möglicher Nukleinsäure Kontaminationen oder Primerdimeren, die zu unspezifischen Fluoreszenzintensitätsänderungen führen könnten. Zudem werden mit allen Proben minus RT Kontrollen angesetzt, in denen kein RT Mix und damit keine reverse Transkriptase enthalten ist. Anstatt der RT wird RNase freies Wasser in diese Ansätze gegeben. Werden in diesen Ansätzen Amplifikate detektiert, resultieren diese aus genomischer DNA Kontamination, welche das Ergebnis verfälscht. Um vorzeitige Reaktionen zu vermeiden, werden alle Arbeiten in einem Kühlblock (Eppendorf) durchgeführt.

Tabelle 10: PCR-Zyklus des DNA Engine Opticon™ Continuous Fluorescence Detector, MJ Research

	<i>cDNA Synthese</i>	<i>Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase</i>	<i>Denaturierung</i>	<i>Annealing</i>	<i>Elongation</i>	<i>Erstellung der Schmelzkurve</i>
Temperatur [°C]	50	95	95	60	72	60-90
Dauer [s]	1800	900	20	30	40	30
Zyklenzahl	1	44			1	1

3.2.4.5 Bestimmungen der Expressionslevel

Für den parentalen Stamm und die Mutanten wurden drei unabhängige PCR Experimente durchgeführt. In jedem Einzelexperiment wurde nach folgender Formel ein CT-Wert bestimmt.

$$\Delta CT = CT (\text{Zielgen}) - CT (\beta\text{-Aktin/ Referenzgen})$$

Aus den CT-Werten wurden die relativen Expressionsstärken für jede Probe nach folgender Formel berechnet:

$$rS = E^{-\Delta CT} \text{ mit } E \text{ als PCR-Effizienz des jeweiligen Primers}$$

Der rS-Wert des parentalen Stamms wurde für jedes Wertepaar (parentalen Stamm/ Mutante) auf 100% normiert und die Expression der Mutante relativ dazu bestimmt. Aus den Einzelwerten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

3.2.4.6 Verwendete Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für genomische PCR, RT- und qRT PCR wurden mit Primer3 (http://cbr-rbc.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/primer3_www.cgi) konzipiert und bei *Sigma Genosys* synthetisiert. Die nukleäre Integration des Plasmids *pGDNG3/Cys(181/226)Ser* wurde mit in Tabelle 11 aufgelisteten Primern und 300 ng DNA durchgeführt.

Tabelle 11: Oligonukleotide für genomische PCR

<i>Oligonukleotid</i>	<i>Sequenz</i>
PsaD5'UTR_Nab1_fow	5' gcggcgtgattattggatt3'
PsaD5'UTR_Nab1_rev	5' gatccactgcagcaccact 3'
Nox3F2	5' cagctcaaggaccactcaa 3'
Nox3R2	5' acggcaaactctcacatgg 3'

Gesamt-RNA wurde aus *C. reinhardtii* Kulturen nach Chomczynski & Sacchi (1987) isoliert (Abschnitt 3.2.2.1). Für die reverse Transkription (RT-PCR) wurde die komplementäre DNA aus 5 µg DNaseI-behandelter RNA synthetisiert. Zudem wurden 2 µg Template-spezifische- und Aktin spezifische Oligonukleotide eingesetzt. Die M-MLV-Reverse Transkriptase wurde den Hersteller Angaben folgend eingesetzt (Promega).

Tabelle 12: Oligonukleotide für reverse Transkription

<i>Oligonukleotid</i>	<i>Sequenz</i>
qRT_3'NAB*1_rev	5' cccgtatcaatcagcgaa 3'
Actin qPCR rp 102	5' ggagttgaaggtggtgctg 3'

Die Standard-PCR im Anschluss an die reverse Transkription wurde mit folgenden Oligonukleotiden durchgeführt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Oligonukleotide der Standard PCR im Anschluss an die RT-PCR

<i>Oligonukleotid</i>	<i>Sequenz</i>
qRT_3'NAB*1_fow	5'cgacaagttgaacaacagcc3'
qRT_3'NAB*1_rev	5' cccgtatcaatcagcgaa 3'
Actin qPCR fp 101	5' cgctggagaagacctacgag 3'
Actin qPCR rp 102	5' ggagttgaaggtggtgctg 3'

Die quantitative *real-time* PCR wurde mit dem SensiMixTM *one-step* Kit (Quantace) durchgeführt (Abschnitt 3.2.4.2). Für die PCR wurden die in Tabelle 14 aufgelisteten Oligonukleotide eingesetzt.

Tabelle 14: Oligonukleotide der qRT-PCR

<i>Oligonukleotid</i>	<i>Sequenz</i>
qRT_3'NAB*1_fow	5'cgacaagttgaacaacagcc3'
qRT_3'NAB*1_rev	5' cccgtatcaatcagcgaa 3'
NAB1-CDS lp	5' gctcaaggaccactcaagg 3'
NAB1-CDS rp	5' gtcgattggctgtgttca 3'
Actin qPCR fp 101	5' cgctggagaagacctacgag 3'
Actin qPCR rp 102	5' ggagttgaaggtggtcgt 3'

3.2.5 Bestimmung der Wasserstoffproduktionskapazität und des Proteomes von *Chlamydomonas reinhardtii*

3.2.5.1 Aufbau der Wasserstoffexperimente und Algen-Kultivierung

Für die Wasserstoffexperimente wurden die Zellen unter kontinuierlicher Belichtung bei $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht (gemessen mit QSL 2100 Laboratory Radiometer, Biospherical Instruments Inc.) bis zum Erreichen der *late mid* logarithmischen Phase kultiviert. Für die Induktion der Wasserstoffproduktion wurden die Zellkulturen unter Schwefelmangel und der daraus resultierenden Anaerobie kultiviert. Dafür wurde ein Wechsel des Medium durchgeführt (3-maliges Waschen mit TAP minus Schwefel (TAP-S), 2500 g, 3 min). Dieses Derivat des TAP Mediums enthält keine Schwefelquellen, alle schwefel-haltigen Komponenten sind durch deren chlorid-haltige Analoga ersetzt worden. Die Kulturen wurden für die Wasserstoffexperimente auf $1,3 \times 10^7$ Zellen/mL (=27 $\mu\text{g Chl/mL}$) eingestellt. Für eine optimale H_2 Produktion wurde 1 mM Glucose zum Ansatz (bei *Stm6Glc4* und *Stm6Glc4T7*) dazu gegeben.

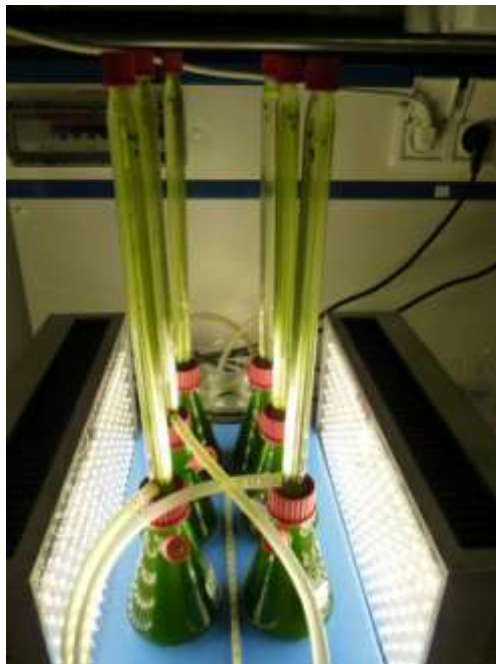


Abbildung 12: anaerobe Zellkulturen im selbstangefertigten Bioreaktorsystem mit angepasster Gasröhre

Die Zellkulturen wurden in selbstangefertigten Bioreaktorsystemen (modifizierte, gasdichte 250 mL Erlenmeyerkolben) mit einer festangepassten Gasröhre zum Auffangen

des produzierten Gases (Kruse et al., 2005) bei $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kontinuierlicher Beleuchtung für 120 h auf einem Magnetrührer inkubiert. Die produzierten Gase wurden aus den Gasröhren entnommen und qualitativ gaschromatographischen Analyse (GC-Analyse) und quantitativ (Gasvolumen) untersucht.

3.2.5.2 Gaschromatographie

Das produzierte Gas wurde in regelmäßigen Intervallen mit einer gasdichten, verschließbaren Spritze (Hamilton Syringe, SampleLock) aus den Säulen entnommen und in einem Gaschromatographen (Agilent Micro GC 3000) injiziert, welcher mit einer PlotU pre Säule (3 m x 0,32 mm) und einer MolSieve 5 A PloA Säule (10 m x 0,32 mm) ausgestattet ist. Als Trägergas diente Argon ($32,5 \text{ PS I cm}^{-2}$). Damit lassen sich gleichzeitig die Gasmengen von H_2 , O_2 und N_2 vermessen.

3.2.6 Proteom-Analysen

Für die Proteom-Analysen wurde die stark H_2 produzierende Mutante *Stm6Glc4* mit dem Wildtyp *Chlamydomonas reinhardtii cc406* verglichen. *cc406* wurde als Referenz- und Kontrollstamm ausgewählt, da *Stm6Glc4* auf einem ähnlichen genetischen Hintergrund basiert.

3.2.6.1 Chloroplasten-Isolierung

Zur Auftrennung subzellulärer Organellen (hier: Anreicherung von Chloroplasten) wurden für die Dichtegradientenzentrifugation Gradienten aus kolloidalem, mit Polymer beschichtete Silicapartikeln verwendet (Percoll, Sigma Aldrich). Percoll, bestehend aus Polyvinylpyrrolidon-(PVP-) beschichteten Silikapartikeln ($\text{Ø}=15\text{-}30 \text{ nm}$), wurde zur Erzeugung der diskontinuierlichen Dichtegradientenbildung in unterschiedlichen Konzentration innerhalb des Gradienten eingesetzt (von unten an: 80%, 60%). Auf diesen zweistufigen Gradienten wurde in einer 40% Percoll-Endkonzentration das Probenmaterial-Percoll-Gemisch aufgeschichtet. Nach der Zentrifugation mussten die getrennten Banden aus dem Zentrifugengefäß isoliert werden. Die interessante Fraktion befand sich an der Dichtegrenze zwischen der 60-40% Schicht und konnte mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt werden. Für die Isolierung der Chloroplasten pro Percollgradient wurden 200 mL Zellkultur aus diversen Phasen des

Wasserstoffexperimentes verwendet (Zeitpunkt t0, t1, t2, t3, t4 für die Mutante *Stm6Glc4* und zusätzlich die Zeitpunkte t5 und t6 für den Wildtypen *cc406*) und 5 min (3000 g) zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 10 mL *breaking buffer* (0.3 M Sorbitol; 50 mM Hepes/KOH pH=7,2; 2 mM EDTA pH=7,8; 1 mM MgCl₂) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte mittels Nebulizer bei ~1,4 bar. Das erhaltene Lysat wurde mit gleichem Volumen 80%igen Percoll zu einer 40%igen Zell-Percoll-Lösung verdünnt, auf den Gradienten aufgeschichtet und 30 min (5000 g, 4°C) mit niedriger Beschleunigung und Bremse zentrifugiert. Die untere, chloroplasten-haltige Bande wurde mit 2-3fachem Volumen des 1x *grinding buffer* (5 x Grinding buffer: 1,5 M Sorbitol; 0,25 M Tris HCl pH=7,9; 25 mM EDTA; 50 mM MgCl₂) verdünnt, erneut zentrifugiert (938 g, 4°C, 6 min), um im Anschluss das Pellet in 200 µl Buffer A (10 mM Tris-Cl pH=7,9; 1 mM EDTA) aufnehmen zu können. Das Material wurde aliquotiert und bei -80°C bis zur Proteinbestimmung gelagert.

3.2.6.2 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).

3.2.6.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; 1D-Gelelektrophorese)

200 mL *Stm6Glc4* und *Stm6Glc4T7* wurden photoautotroph bis zur mid-logarithmischen Phase kultiviert, auf gleiche Zellzahlen ($1,55 \times 10^7$ Zellen/mL) eingestellt und zentrifugiert (2000 g; 2 min). Das erhaltene Zellpellet wurde in 117,5 µl H₂O, zuzüglich 1 µl Benzonase, resuspendiert. Das Endvolumen der Proben betrug 20 µl und 27,5 µl für *Stm6Glc4* und *Stm6Glc4T7*. Die Proteine wurden im Verhältnis 1:1 mit denaturierendem Probenpuffer (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) 10 min bei 65°C inkubiert, in einem 10%, vertikalem Tris-Tricin-Gel mittels SDS Page entsprechend ihrem Molekulargewicht separiert (Schägger & Jagow, 1987). Für die Proteom-Analysen der Chloroplasten-Präparate wurden die Proteine (10 µg) im Verhältnis 1:1 mit denaturierendem Probenpuffer etwas anderer Zusammensetzung versetzt (10% (v/v) Glycerin; 5% (v/v) β-

Mercaptoethanol; 3,1% (w/v) SDS; 62,5 mM Tris/HCl pH=6,8; 0,001% (w/v) Bromphenolblau). Die weiteren Schritte für die Mini- und Midi-Systeme (Proben aus dem Wasserstoff-Experiment) wurden auf gleiche Weise wie im Folgenden beschrieben durchgeführt. 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) oder der Midi-Systeme (PeqLab) mit Laufpuffer (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). Das Auftrennen der Proteine erfolgte für 30 min mit einer Stromstärke von 15 mA und für weitere 120 min eine Stromstärke von 20–30 mA.

Im Fall von Immuno-*blot*-Experimenten wurden die Gele wie im Abschnitt 3.2.6.4 beschrieben weiterverwendet. Um die aufgetrennten Proteine anzufärben, wurde die „blue silver“ Methode angewendet.

3.2.6.4 Elektroblob und Detektion mittels Chemilumineszenz

Hierzu wurde eine Nitrocellulosemembran (Protean BA 85 Cellulosenitrat, 0,45 µM, Schleicher & Schüll) auf das SDS-PAGE-Gel gelegt (Whatmanpapier, Schwämme und Halterungen laut Herstellerangaben plaziert) und dieses Konstrukt 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 95V 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 (Tabelle 15) zugegeben und für 16 h bei 4°C inkubiert. Nach anschließendem 30-minütigem Waschen

(6 x 5 min) wurde die zweite Antikörper-Lösung (Anti-*Rabbit*-Peroxidase-Antikörper; Anti-*Mouse*-Peroxidase-Antikörper (Amerham Biosciences) in den Verdünnungen 1:2.000-1:10.000 zur Membran gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift für 30 min (6 x 5 min) bei RT wurden die entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe mittels Chemilumineszenz-Detektion sichtbar gemacht. In der Dunkelkammer wird ein Autoradiographiefilm (Hyperfilm ECL Amersham Bioscience) zurechtgeschnitten. Jeweils 500 µl Detektionsreagenz I werden mit 500 µl Detektionsreagenz II (ECL-Western Blot, Amersham Bioscience) vermischt. Diese Luminol-haltige Lösung wird gleichmäßig auf die Membran verteilt, welche wieder mit der Klarsichtfolie abgedeckt wird, um den Autoradiographiefilm zu schützen. Der Autoradiographiefilm wird auf die Folie gelegt und die Inkubationskammer geschlossen. Der Film wird für 4-10 min exponiert und dann in den Fotoentwickler gegeben. Sobald Banden auf dem Film sichtbar werden, wird der Film mit Wasser gewaschen und in Entwickler und Fixierer überführt.

Tabelle 15: Folgende Antikörper wurden in der vorliegenden Dissertation verwendet:

<i>Antikörper</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Verdünnung in TBS-Tween</i>
Anti-NAB1	SeqLab (Göttingen)	Polyklonales Antiserum gewonnen durch Immunisierung von Kaninchen mit dem rekombinanten His-markierten NAB1	1:10000 <i>final</i> bleeding
Anti-LHCII type I	Agrisera	Synthetische Peptide ausgewählt aus Lhcb1 Protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	1:2000
Anti-AOX1	Merchant, USA	Polyklonales Antiserum gewonnen durch Immunisierung von Kaninchen, zielgerichtet gegen das gesamte AOX-Protein	1:10 000
Anti-Cox2b	González-Halphen	Polyklonales Antiserum gewonnen durch Immunisierung von Kaninchen, zielgerichtet gegen das gesamte COX2b-Protein	1: 5000
Anti-Lhcbm9	Agrisera	Lhcbm9 spezifisch	1:10 000
Anti-LhcSR3	Prof. Dr. M. Hippler	LhcSR3 spezifisch ohne Interaktion zu LhcSR1	1:10 000
PRK	Jean David Rochaix	Phosphoribulokinase spezifisch	1: 10 000

3.2.6.5 Coomassie-Blau-Färbung

Die Proteine können direkt im SDS-Gel mit organischen Farbstoffen angefärbt werden. Ein vielverwendeter Farbstoff ist ein Triphenylmethanfarbstoff, das Coomassie Blau. Mit diesem Farbstoff gibt es verschiedene Varianten von Färbeprotokollen. Die höchste Nachweisgrenze wird mit kolloidaler Coomassie-Blau-Anfärbung erreicht (bis zu 30 ng Protein). Die hier verwendete „blue silver“ Färbelösung setzt sich aus 0,12% Coomassie Brilliant Blue G-250 (w/v); 10% Ammoniumsulfat (w/v); 10% Phosphorsäure (v/v); 20% Methanol (v/v) zusammen. Im Anschluss an die Elektrophorese werden die Gele in der Färbelösung bis zum Erreichen der gewünschten Intensität oder bis zum Endpunkt (über Nacht) inkubiert. Anschließend wird das Gel 2 x 30 min in Wasser gewaschen, um den Hintergrund zu entfärben.

3.2.6.6 Tryptischer Verdau

Für massenspektrometrische Analysen müssen Proteine enzymatisch hydrolysiert werden. Trypsin (23 kDa), als selektive Serinprotease, katalysiert die Spaltung von Peptidbindungen an der carboxyterminalen Seite von Arginin und Lysin ebenso wie deren Amide und Ester und liefert dabei als Endoprotease genau definierte Ladungsverteilungen. Die enzymatische Spaltung von Proteinen in Polyacrylamidgelen erfordert zuvor ausgiebiges Waschen mit Spaltpuffer, abwechselnd mit Schrumpfen des Gels durch Acetonitril. Das geschrumpfte Gel saugt sich im Anschluss mit Spaltpuffer und Trypsin voll. Die Elution der Spaltpeptide erfolgt mit organischen Lösungsmitteln (hier: Acetonitril).

Die ausgeschnittenen Banden wurden viermal in 500 µl HPLC geeignetem, gereinigtem H₂O (Roth) gewaschen und gevortext. Um SDS und Coomassie auszuwaschen wurden die Gelstücke mit 500 µl Acetonitril/Wasser (3:2) für 20 min dehydriert, 10 min zentrifugiert (speed-vac) und mit 50 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat rehydriert und alkalisiert. Das Ammoniumhydrogencarbonat wurde im Anschluss entfernt. Die Dehydrierung und Rehydrierung bzw. Alkalisierung wurde insgesamt 3mal wiederholt. Beim dritten Mal wurde die Rehydrierung mit Ammoniumhydrogencarbonat durch die Zugabe von 15 µl Trypsin (60 ng/µl) ersetzt. Um diese Konzentration zu erhalten wurde 20 µg getrocknetes Trypsin (*sequencing grade*, modified Trypsin, Promega) mit 40 µl des mitgelieferten Puffers (*resuspension buffer*, Promega) und 293 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat gelöst. Die komplett bedeckten Gelstücke wurden für 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde überschüssige Trypsinlösung entfernt, die Gelstücke jeweils mit Ammoniumhydrogencarbonat (~30 µl) bedeckt und für 10 min bei 30°C inkubiert. Danach erfolgte der tryptische Verdau über Nacht bei 37°C. Nach mindestens 16 h wurde die überschüssige Inkubationslösung in ein separates Eppendorfgefäß überführt, die Gelstücke jeweils mit Acetonitril (100 µl) überschichtet und für 2–3 h gevortext. Nach diesem Extraktionsschritt wurden beide Inkubationslösungen vereint und Proben in einer Vakuumzentrifuge (*Savant SPD121P Speed Vac*) getrocknet. Die getrockneten Proben konnten bei -80°C bis zur LC/MS-MS Analyse getrocknet werden (Protokoll wurde modifiziert nach Mortz et al., 1994 angewendet).

3.2.6.7 Massenspektroskopie

Die Aufbereitung der Proben für die massenspektrometrische Analyse erfolgte wie in Naumann et al. beschrieben (Naumann et al., 2005; siehe auch Abschnitt 3.2.6.1). Das angereicherte Probenmaterial wurde im SDS-Gel fraktioniert (Abschnitt 3.2.6.3), in 40 Banden zerlegt und tryptisch verdaut (Abschnitt 3.2.6.6). Die einzelnen Arbeitsschritte sind dem schematischen Diagramm (Abbildung 31 und Abbildung 32) zu entnehmen. Die LC-MS/MS Analyse mit entsprechenden Modifikationen erfolgte wie in Naumann et al. (2005) und Terashima et al. (2010) beschrieben. Die Proben wurden im Labor der Arbeitsgruppe von Michael Hippler (IBBP, Westfälische Wilhelms Universität Münster) vermessen. Die nano-LC wurde an einem Ultimate 3000 system (Dionex, Sunnyvale, CA) mit den in Stauber et al. (2003) und Naumann et al. (2005) beschriebenen Lösungen durchgeführt. Das LTQ Orbitrap XL (Thermo, Bremen, Deutschland) Massenspektrometer wurde mit dem „*FT Programs 2.0.7, Xcalibur 2.0.7, and LTQ Orbitrap XL MS 2.4 SP1*“ genutzt. Die Vermessung der Peptide erfolgte im FTMS (Fourier Transform Mass Spectrometer; Bereich 375–2000 m/z ; Auflösung, 60 000). Die Stoss-induzierte Fragmentierung (CID; *collision induced fragmentation*) erfolgte im Niedrigenergiebereich (35 V) nach der „Big 5“ Methode, bei der die fünf meist abundanten Ionen (precursor ions) im „full scan“ detektiert wurden (dieses erfordert eine minimale Precursor-Ladung von 2).

Für die die Protein Identifizierung der massenspektrometrischen Daten wurde OMSSA1 (Version 2.1.4) mit einem TDA (*target decoy approach*) genutzt (Stauber et al., 2003; Naumann et al., 2005; Terashima et al., 2010). Die maximal erlaubte falsch positive Rate betrug 2 (Massentoleranzen 0,02 Da für das Precursor Ion und 0,5 Da für das Produkt). Die JGI *Chlamydomonas gene model* Datenbank v3.1 wurde mit der NCBI Datenbank BK000554.2 und NC_001638.1 zusammengefügt, anhand derer dann die Datenbank Suche erfolgte, dabei wurde ein E-Value mit einer entsprechenden Falsch-Positiv-Rate auf 1% oder geringer eingestellt (Terashima et al., 2010).

3.2.6.8 Vorgehensweise zur Proteinidentifizierung und Quantifizierung

Zur Bestimmung von relativen Proteinabundanzen mit Hilfe von QuPE wurden alle Rohdaten aus dem proprietären Format des Massenspektrometer-Herstellers Thermo™ zunächst mit Hilfe des Software-Tools „ReAdW“ (Keller et al., 2002, Nesvizhskii et al., 2003) in das OpenSource-Format „mzXML“ (Pedrioli et al., 2004) umgewandelt. Diese Dateien konnten dann in die Rich-Internet-Applikation QuPE importiert werden. Zur Proteinidentifizierung wurde anschließend eine Mascot™ -Suche unter der Verwendung

einer Datenbank durchgeführt, die das bekannte Proteom von *Chlamydomonas reinhardtii* enthielt (JGI, Chlre3) (Albaum et al., 2009). Bei dieser Suche wurde die tolerierte Abweichung des Vorläuferions auf 10 ppm gesetzt, die entsprechende Toleranz der MS/MS-Fragmentionen auf 1000 mmu; des Weiteren sollten bei der Suche bis zu zwei verpasste Trypsin-Spaltstellen berücksichtigt werden. Eine Oxidierung von Methionin wurde als potentielle variable Modifikation konfiguriert. Es wurden nur Hits mit einer Mascot-Score über dem Mascot-eigenen Signifikanz-threshold ($p < 0.05$) in weiteren Analysen berücksichtigt. Folgend wurden relative Abundanzwerte für alle als valide identifiziert geltenden Proteine bzw. Peptide berechnet. Aufgrund des festgestellten unvollständigen Einbaus von ^{15}N in Proteinen des Wildtyps wurde hierzu, wie bereits beschrieben, die in QuPE implementierte Pulse-Chase Quantifizierung für variable Einbauraten eingesetzt (Abschnitt 2.6.1). Als Referenzwert für das ungelabelte Peptid wurden in allen Messungen natürliche Isotophäufigkeiten eingestellt. Für das variabel gelabelte Peptid wurde ein Einbau von mindestens 30% bis hin zu maximal 98% erwartet. Die Elution eines Peptids wurde im Zeitfenster von 60 Sekunden vor bzw. nach demjenigen Spektrum, das sich für die Identifizierung eines Peptids verantwortlich zeigte, bei der Quantifizierung berücksichtigt. Weitere Einstellungen zur Filterung unzureichend quantifizierter Peptide wurden eher streng gewählt (Regressionskoeffizient $r > 0.4$, Ähnlichkeit der Isotopverteilung mind. 0.9, Signal zu Rausch.Abstand mind. 3.0).

4. Zielsetzung

Die Basis für die Erzeugung nachhaltig generierter Biomasse ist die photobiologische Konvertierung von Licht in energiereiche Moleküle. Ein wichtiger Faktor für die Nutzung von Mikroalgen, unabhängig von der Form des generierten Energieträgers, ist der Prozess der Energieumwandlung über die Photosynthese. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Optimierung der Lichtkonversions-Effizienz, welches über zwei unterschiedliche Ansätze und Strategien verfolgt wurde.

Im Fokus des ersten Teilprojektes stand die Generierung von Biomasse mittels eines Ansatzes, welcher direkt am Photosynthese-Apparat ansetzt. In Form einer gentechnologischen Durchführung sollte eine *Chlamydomonas reinhardtii* Mutante mit einem am Photosystem II verkleinerten Lichtsammelsystem hergestellt werden. Mittels dieser Reduktion könnte die photo-inhibitorische Wirkung übermäßiger Absorptionen reduziert und die Transmission in tiefere Zellschichten dichter Kulturen, insbesondere für die Nutzung in großtechnischen Ansätzen, verbessert werden.

Der zweite Ansatz basiert auf der Charakterisierung des Proteoms unter photobiologischen H₂-Produktionsbedingungen nach Induktion durch Schwefelmangel. Für den Erhalt eines detaillierten Verständnisses über die zellulären Veränderungen auf Proteinebene in *Chlamydomonas reinhardtii* sollten massenspektrometrische Analysen zur Darstellung von Proteinexpressionsmustern angereicherter Chloroplasten durchgeführt werden. Dazu sollten zum einen Proben aus aerob kultivierten (t0) und wasserstoffproduzierenden (anaeroben, t4/t6) Zellen verglichen, und desweiteren die Daten eines Wildtyp-Stamm *cc406* mit einer stark H₂-produzierende Mutante *Stm6Glc4* gegenübergestellt werden. Mögliche Veränderungen des Proteinmusters im Wildtypen und der Mutante im zeitlichen Verlauf der durch Schwefelmangel erzeugten Anaerobie könnten zur Identifizierung von Proteinen beitragen, welche gegebenenfalls aufgrund von verschiedenartiger Expressionsniveaus zur gesteigerten Wasserstoffproduktions-Kapazität in der Mutante *Stm6Glc4* führen. Eine derart generierte Datenbasis sollte Ansatzmöglichkeiten für nachfolgende Untersuchungen schaffen, um Zelllinien mit einer veränderten, d.h. verbesserten Fähigkeit zur anaeroben H₂ Produktion, zu generieren. Identifizierte Zielgene könnten in zukünftigen Projekten gezielt manipuliert und die Funktion kodierter Proteine im Kontext der Wasserstoffproduktion durch biochemische und physiologische Untersuchungen näher untersucht werden, um ihre Eignung als Ansatzpunkt für ein „strain engineering“ zu validieren.

5. Ergebnisse

5.1 Konstruktion und Identifikation von Transformanten mit einer permanent aktiven Variante des LHC-Repressors NAB1

Im Fokus des ersten Teilprojektes dieser Dissertation stand die Herstellung einer *Chlamydomonas reinhardtii* Mutante mit einem verkleinerten Lichtsammelantennen-System am Photosystem II. Ein verkleinerter Chlorophyll-Lichtsammelkomplex soll die photo-destruktive Wirkung hoher Lichtintensitäten durch übermäßige Absorption, sowie die Dissipation der äußeren Zellschichten minimieren, als auch die Transmission des Lichtes innerhalb großer, biotechnologisch nutzbarer Massenkultur gewährleisten. Eine experimentelle Simulation im Labormaßstab sollte zeigen, dass die Sättigungsgrenze der verkleinerten PS II-Lichtsammelkomplexe erst bei höheren Lichtintensitäten erreicht wird und damit einhergehend eine höhere photosynthetische Produktivität in einem großen Maßstab erzielt werden kann.

Um die Effekte des permanent aktiven, modifizierten LHCII Translationsrepressor NAB1 (NAB1*) auf die Antennengröße und die Lichtnutzung transformierter *Stm6Glc4* Mutanten zu untersuchen, konnte zunächst eine Mutante mittels molekularbiologischer und biochemischer Methoden isoliert werden, welche dann im Anschluss phänotypisch und physiologisch charakterisiert wurde.

5.1.1 Überexpression des modifizierten Translationsrepressors NAB1* in *Chlamydomonas reinhardtii Stm6Glc4* und Isolierung positiver Mutanten

5.1.1.1 Transformation des Vektors pGDN3Cys(181/226)Ser in *Chlamydomonas reinhardtii Stm6Glc4*

Als Rezipient des Vektors pGDN3Cys(181/226)Ser und des Selektionsplasmid p613 (Nelson et al., 1994) wurde der Stamm *Stm6Glc4* ausgewählt und mittels der Glasskugelmethode nach Kindle (1990) co-transformiert.

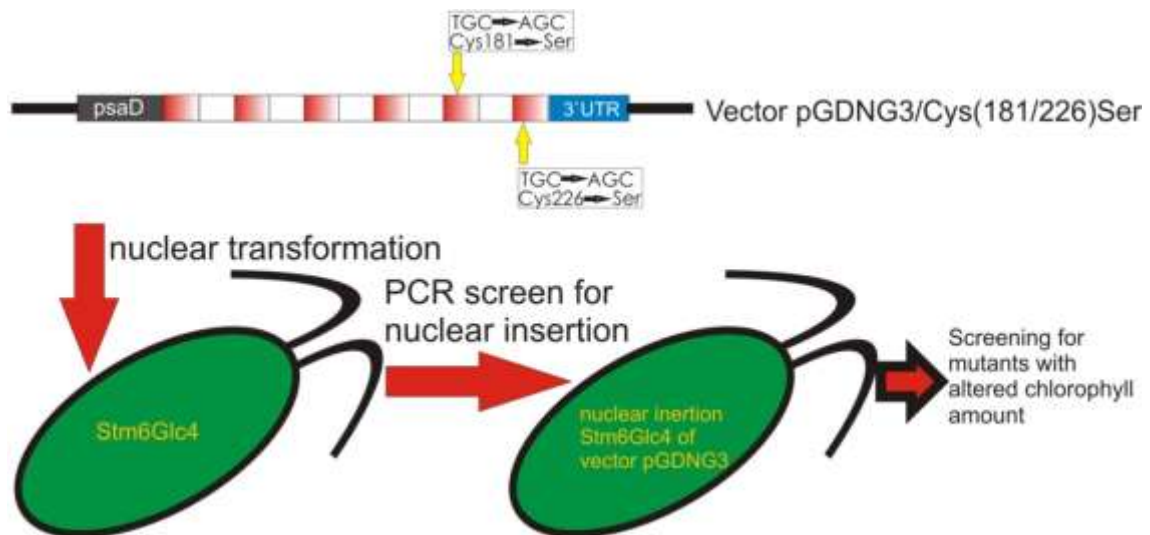


Abbildung 13: zeigt den zur Transformation von *Chlamydomonas reinhardtii* *Stm6Glc4* verwendeten Expressionsvektor pGDN3Cys(181/226)Ser. pGDN3Cys(181/226)Ser enthält das modifizierte *nab1* Gens (NAB1*, 4339 bp), welches durch den flankierenden PsaD-Promotor und die 3'UTR transkriptionell kontrolliert wird. Der PsaD Promotor umfasst 822 bp, die 3'UTR 559 bp.

Das Plasmid p613 enthielt den dominant, selektierbaren Marker, welcher durch die funktionelle Expression des *cry*-Gens eine Resistenz gegen das Antibiotikum Emetin vermittelte (Nelson et al., 1994) und darüber die Selektion positiver Transformanten ermöglichte.

Die transformierten Zellen wurden auf TAP-Emetin-Agarplatten unter einem Selektionsdruck von 10 µg µL⁻¹ Emetin kultiviert. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen bei 40 µmol m⁻² s⁻¹ Weißlicht. Nach ~15 Tagen waren die ersten Kolonien sichtbar. Insgesamt wurden 104 Emetin-resistente Transformanten auf erfolgreiche co-Integration des modifizierten *nab1** Gens mittels Standard-PCR getestet.

5.1.1.2 Ermittlung der nukleären Integration und Selektion der Zufalls-Insertions-Mutanten von *Chlamydomonas reinhardtii* *Stm6Glc4*

Die Selektion der NAB1* Mutanten sollte über die Existenz und den Nachweis der DNA mittels Standard-PCR erfolgen. Die zur Detektion des *nab1** Gens verwendeten Oligonukleotide hybridisierten an zwei unterschiedlichen Sequenzbereichen und bildeten Produkte unterschiedlicher Größe. Es wurden zwei spezifische Amplifikationsexperimente durchgeführt, in denen sowohl die 3' UTR Region als auch die 5' UTR Region abgedeckt wurde, um Mutanten zu isolieren, in denen sich eine vollständige nukleäre Integration des modifizierten *nab1** Gens nachweisen ließ.

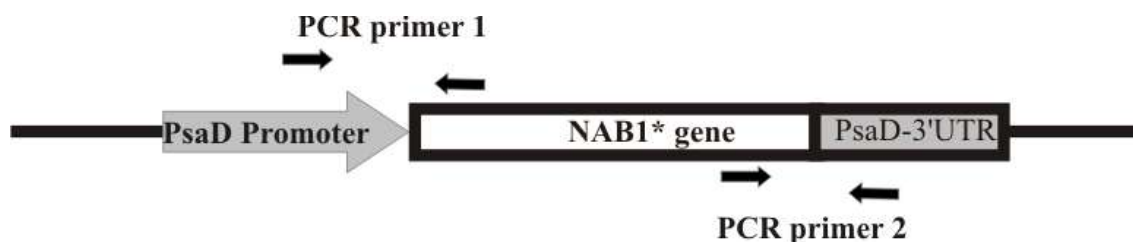


Abbildung 14: Bestätigung der nukleären Integration des Vektors pGDN3Cys(181/226)Ser unter Nutzung von zwei unterschiedlichen NAB1* spezifischen Standard-PCR-Oligonukleotiden. PCR Primer 1 erkennt eine Region innerhalb des PsaD Promotors und des ersten Introns im Vektor pGDN3Cys(181/226)Ser, während PCR Primer 2 im vorletzten Exon von *nab1** und in der 3'UTR Region hybridisierte. Die Nutzung beider Primer ermöglichte zum einen den Nachweis des vollständigen Integrationsereignisses und des weiteren die Unterscheidung zwischen dem endogenen *nab1* und des exogen inserierten *nab1** Gens.

Dabei amplifizierte der PCR Primer 1 eine spezifische Region der 5'UTR des PsaD Promotors einschließlich des ersten Introns des modifizierten *nab1** und bildete ein 471 bp großes Produkt. Ein weiteres Primerpaar, PCR Primer 2, amplifizierte 808 bp des vorletzten Introns des modifizierten *nab1** und umfasst einen Teil der 3'UTR des PsaD-Vektors.

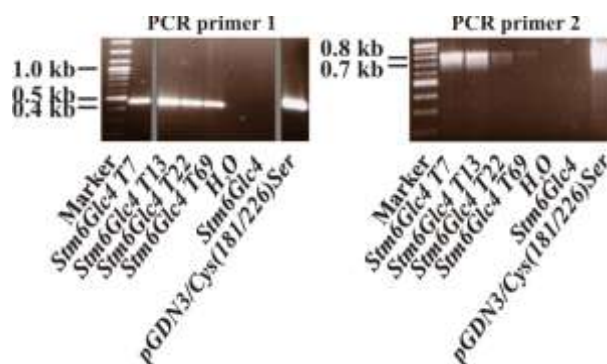


Abbildung 15: Produkte der Standard PCR als Nachweis der chromosomalen Integration. PCR primer 1: PsaD5'UTR_Nab1fow2 (5'gcggcgtgattattggatt3'), PsaD5'UTR_Nab1rev2 (5'gatccactgcagaccact3'), Produktgröße: 471 bp; PCR primer 2: Nox3F2 (5'cagctcaaggaccactcaa3') und Nox3R2 (5'acggcaaaactcatcatgg3') Produktgröße: 808 bp

Grundsätzliches Ziel dieser Untersuchung war der Nachweis und die Identifizierung möglicher Mutanten, die über den geforderten Sequenzabschnitt verfügten. Mittels dieser Methode konnten 4 Transformanten erfolgreich isoliert werden, deren biochemische und physiologische Untersuchungen im Anschluss folgen. Zukünftig werden diese Transformanten als *Stm6Glc4T7*, *T13*, *T22* und *T69* bezeichnet.

5.1.2 Phänotypische Charakterisierung der selektierten Mutanten *Stm6Glc4T7*, *T13*, *T22*, *T69*

Bei einer vergleichenden Analyse des Wachstumsverhaltens ausgewählter Mutanten waren unter Standardbedingungen keine Unterschiede zum parentalen Stamm *Stm6Glc4* detektierbar. Sowohl *Stm6Glc4* als auch die Mutanten erreichten nahezu zeitgleich die logarithmische Phase bei gleichen Zelldichten. Demnach wiesen die Transformanten unter Standard-Kultivierungsbedingungen (Tris-Acetat-Phosphat Medium, 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht) keine Wachstumsvor- und nachteile im Vergleich zu *Stm6Glc4* auf. Dieses Ergebnis deutet an, dass die Verteilung der Lichtenergie zwischen den Photosystemen nicht beeinträchtigt ist, so dass sehr ähnliche photosynthetische Aktivitäten unter mixotrophen Bedingungen erreicht wurden.

Dem optischen Eindruck nach schienen die Zellen der Mutanten in gleichen Wachstumsstadien, sowohl unter mixotrophen als auch autotrophen Anzuchtbedingungen, eine hellere Grünfärbung aufzuweisen als die Zellen des parentalen Stammes. Um dies zu quantifizieren wurden gleiche Volumina der Zellen bei identischer Zelldichte geerntet und zunächst der jeweilige Chlorophyll-Gehalt vermessen (siehe Abschnitt 5.1.2.1). Daran anschließend wurden autotrophe Wachstumsstudien unter Starklicht durchgeführt, um mögliche Strahlungsanpassungen, die sich unmittelbar auf die Photosynthese auswirken, zu testen (siehe Abschnitt 5.1.4).



Abbildung 16: Phänotyp von *Stm6Glc4* und *Stm6Glc4T7* sowohl nach photoautotropher Anzucht in HS-Medium und Starklichtapplikation (als auch unter Standard-Kultivierungsbedingungen). Die abgebildeten Zellkulturen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet (HS-Medium, 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht) und sind auf gleiche Zellzahlen eingestellt worden ($1,75 \times 10^7$ Zellen mL^{-1}).

5.1.2.1 Phänotypische Charakterisierung der selektierten Mutanten *Stm6Glc4T7*, *T13*, *T22*, *T69* durch spektrophotometrische Messung der Chlorophyll Parameter

Chlorophyll b wird ausschließlich durch Lichtsammelkomplexe gebunden und gibt somit eine Information über die Lichtsammelantenne in Relation zum gesamten Photosystem II Komplex an. Deswegen wäre der Phänotyp und die Indikatoren einer *Chlamydomonas reinhardtii*-Mutante mit einer verkleinerten Lichtantenne u.a. durch einen höheren Gehalt an Gesamt-Chlorophyll sowie ein reduziertes Chlorophyll a/b Verhältnis gekennzeichnet. Um dieses zu quantifizieren wurden gleiche Volumina der Zellen bei identischer Zelldichte geerntet und der jeweilige Chlorophyll-Gehalt gemessen. Photometrische Chlorophyll-Analysen der selektierten Zellkulturen unter mixotrophen Kultivierungsbedingungen führten zu dem aus Abbildung 17 hervorgehenden Ergebnis, dass diese bei gleicher Zelldichte geernteten 4 Mutanten im Vergleich zum Kontrollstamm *Stm6Glc4* einen reduzierten Gesamt-Chlorophyll-Gehalt und höhere Chlorophyll a/b Ratios aufwiesen. *Stm6Glc4T7* zeigte die stärkste Änderung der Chlorophyll a/b Ratio von 2,08 ($\pm 0,03$ SE) zu 2,21 ($\pm 0,041$ SE) und die stärkste Reduktion des Gesamt-Chlorophyll mit ~20 % im Vergleich zum parentalen Stamm *Stm6Glc4* (Abbildung 17, rechte Ordinate).

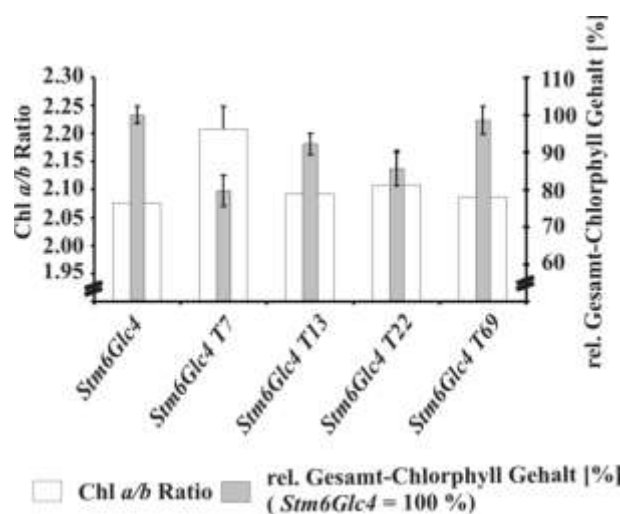


Abbildung 17: Chlorophyll-Parameter des parentalen Stammes *Stm6Glc4* und den Mutanten *Stm6Glc4T7*, *T13*, *T22* und *T69* während der Anzucht unter mixotrophen Bedingungen in TAP Medium und 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht. Die im Diagramm dargestellten Werte sind Mittelwerte, berechnen sich aus 3 unabhängigen Chlorophyll-Bestimmungen und wurden pro Zelllinie mittels drei technischer Replikate bestätigt. Die abgebildeten Fehlerbalken sind Standardfehler, die sich aus 9 Einzelwerten ergaben.

Demzufolge sollte ein permanent reduzierter Gehalt an LHC Proteinen unter strikt photoautotrophen Kultivierungsbedingungen mit gleichzeitig erhöhter Lichtintensität

einen Wachstumsphänotyp erzeugen, der unter autotropher Anzucht in HS-Medium unter CO₂ und Starklicht (700 μmol m⁻² s⁻¹ Weißlicht) geprüft wurde (siehe Abschnitt 5.1.2.2). Da *Stm6Glc4T7* unter diesen 4 Mutanten den größten Unterschied hinsichtlich der Chlorophyll-Parameter aufwies wurde dieser Stamm für die folgenden Wachstumsanalysen ausgewählt.

5.1.2.2 Wachstumskinetiken von *Stm6Glc4T7* als Mutante mit verbesserter photochemischer Konversionseffizienz

Die Anpassungsfähigkeit photosynthetischer Zellen wird unter Starklicht stärker beansprucht. Ein verkleinertes Lichtsammelantennen-System könnte die Defizite, welche bei Starklichtapplikationen (oxidativer Stress) oder innerhalb eines großtechnischen Ansatzes von Massenkulturvolumina (Licht-Penetration) auftreten, minimieren. Diese durch *genetic engineering* erzielte Modifikation (Ziel-gerichtete genetische Manipulation) sollte in einer veränderten photobiologischen Funktionsweise resultieren. Es wurde erwartet, dass die funktionelle Expression des permanent aktiven LHC II-Translationsrepressors NAB1* zu einer verbesserten photosynthetischen Produktivität unter autotrophen Starklichtbedingungen führt.

Um den Wachstumsphänotypen unter autotrophen Bedingungen der Antennenmutante mit den Wachstumsraten des parental Stammes *Stm6* bzw. *Stm6Glc4* zu vergleichen wurden zwei unterschiedliche Maßstabs-Ansätze ausgewählt.

Im ersten Experiment wurden die Zellen in einem kleinen Labor-Maßstab in 200 mL HS-Medium in Gaswaschflaschen angezogen (s. Abschnitt 5.1.2.2.1).

Im zweiten Experiment wurden die Zellen in einem geschlossenen 2,4 L Bioreaktor (BioengII) mit TAP minus Acetat angezogen, um die Übertragbarkeit auf einen größeren Ansatz zu überprüfen (s. Abschnitt 5.1.2.2.2; Beckmann et al., 2009).

5.1.2.2.1 Autotrophe Wachstumsexperimente unter Starklichtapplikation

In der experimentellen Simulation in Größe eines Labormaßstabes (200 mL Volumina) wurden die Anfangszelldichten auf $\sim 6 \times 10^5$ Zellen mL⁻¹ eingestellt und das Wachstum über einen Zeitraum von 110 h unter konstanten Lichtbedingungen (700 μmol m⁻² s⁻¹ Weißlicht) verfolgt.

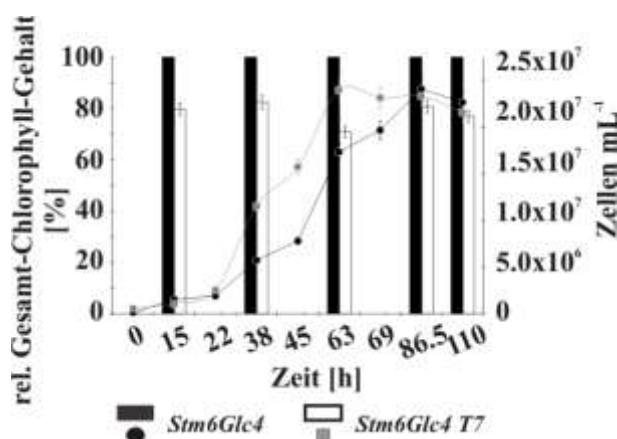


Abbildung 18: Photoautotrophe Wachstumskinetik unter kontinuierlichen Starklichtbedingungen ($700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht, HS-Medium) über 110 h. Rechte Ordinate: Zelldichten in Zellen pro mL. Linke Ordinate: Chlorophyll-Werte. Der Gesamt-Gesamtchlorophyll von *Stm6Glc4T7* wurde in Relation zum parentalen Stamm *Stm6Glc4* gesetzt (*Stm6Glc4*=100%).

In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der Wachstumsanalyse dargestellt. Die aufgenommene Wachstumskinetik demonstrierte das erwartete beschleunigte Wachstum der Transformante unter Starklichtbedingungen. Neben der Analyse der Zellzahl (rechte Ordinate), fand eine Untersuchung des Gesamtchlorophyll-Gehalts (linke Ordinate) statt.

Während sich innerhalb der ersten 22 Stunden keine Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit zeigten, divergierten die Kurven ab diesem Zeitpunkt für jede Zelllinie charakteristisch. Nach $\sim 22\text{h}$ erlangten beide Zelllinien ungefähr zeitgleich die logarithmische Phase, jedoch war der Replikationszyklus ab diesem Zeitpunkt von *Stm6Glc4T7* stark beschleunigt. Während *Stm6Glc4T7* innerhalb der ersten 38 h von $5,97 \times 10^5 \text{ Zellen mL}^{-1}$ (Anfangs-Zellzahl) zu $1,2 \times 10^7 \text{ Zellen mL}^{-1}$ anwuchs, erreichte der parentale Stamm in dieser Zeit $5,72 \times 10^6 \text{ Zellen mL}^{-1}$ und erst 12 – 15 h später $1,2 \times 10^7 \text{ Zellen mL}^{-1}$. Die stationäre Phase wurde von *Stm6Glc4* nach 86,5 h mit $2,4 \times 10^7 \text{ Zellen mL}^{-1}$ erreicht, während *Stm6Glc4T7* bereits 23,5 h vorher maximale Zelldichten von $2,4 \times 10^7 \text{ Zellen mL}^{-1}$ erreicht hatte und somit zu diesem Zeitpunkt 38,6 % über der Zelldichte von *Stm6Glc4* lag.

Der Gehalt an Chlorophyll während des Wachstums zeigte beim Vergleich von *Stm6Glc4* und *Stm6Glc4T7*, dass bei letzterer der Chlorophyll-Gehalt relativ zu *Stm6Glc4* konstant reduziert war. Die erwartete absolute Abnahme an Gesamtchlorophyll konnte unter den gewählten Kultivierungsbedingungen beobachtet werden. Eine Analyse der Chlorophyll a/b Ratio (Abschnitt 5.1.2.1) zeigte, dass dieses in *Stm6Glc4T7* deutlich erhöht vorlag. Demnach besaß diese Zelllinie während des Wachstums ein permanent verkleinertes

Antennensystem, was zu einem physiologischen Vorteil gegenüber *Stm6Glc4* führte, welcher im Vergleich ein größeres Antennensystem aufwies.

Diese Wachstumskurven wurden 5 mal wiederholt und die erhaltenen Tendenzen konnten repliziert werden.

Die exponentiellen Wachstumsraten von *Stm6Glc4T7* (Abbildung 19) waren bedeutend höher unter photoautotrophen Bedingungen ($0,028 \Delta \text{ Zellen mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ vs $0,018 \Delta \text{ Zellen mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Der Unterschied in der exponentiellen Wachstumsphase betrug ~53%, wobei die erhaltenen Werte von *Stm6Glc4* auf 100% gesetzt wurden.

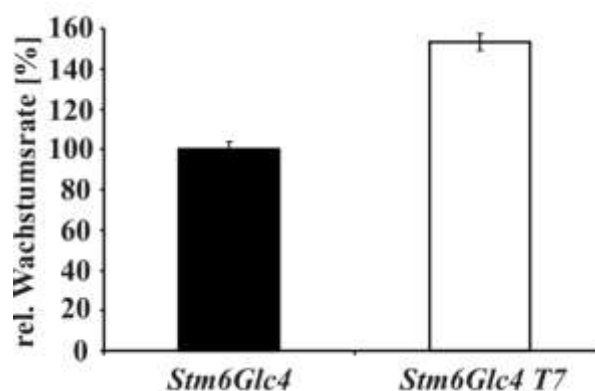


Abbildung 19: Wachstumsraten von *Stm6Glc4* und *Stm6Glc4T7* innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase unter photoautotrophen Kultivierungsbedingungen in HS-Medium und einer Dauerbelichtung mit $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Weißlicht. Die Bestimmung der Wachstumsrate repräsentiert die Zunahme der Zelldichten pro Stunde und wurde dargestellt in Prozentangaben.

5.1.2.2.2 Aufbau von Biomasse unter autotrophen Kultivierungsbedingungen

Für einen biotechnologischen Produktionsprozess ist die photosynthetische Produktivität von Massenkulturen, bei denen die Algen hohen Bestrahlungsstärken ausgesetzt sein können, sehr bedeutsam. Mit dem folgendem Versuch sollte untersucht werden, ob der Wachstumsvorteil der Mutante *Stm6Glc4T7* (Abschnitt 5.1.2.2.2, Abbildung 20) in einem größeren Maßstab im Bioreaktor reproduziert werden kann.

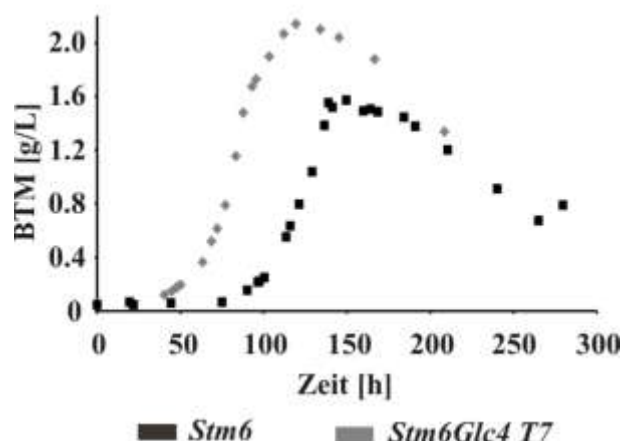


Abbildung 20: Photoautotrophes Wachstum von *Stm6* und *Stm6Glc4T7* unter Starklichtapplikation ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in Minimalmedium (TAP minus Acetat). Die Wachstumskinetik und Bestimmung der Biomasse erfolgte in einem 2,4 L Bio-Reaktor (BioengII) über eine Periode von 300 Stunden. Die Daten repräsentieren ein Einzelexperiment, welches nachfolgend mit zwei biologischen Replikaten reproduziert wurde.

1,8 L TAP Medium minus Acetat wurden mit einer Vorkultur auf eine Startbiomasse von $0,05 \text{ g L}^{-1}$ inokuliert. Die Zellkultur wurde mit 3% CO_2 mit einer kontinuierlichen Flussrate von $35 \text{ mL L}^{-1} \text{ min}$ begast und bei 250 rpm gerührt. Die Kultivierung in diesem Maßstab unter nochmals erhöhten Lichtintensitäten ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) steht in sehr guter Korrelation mit den erhaltenen Daten der 200 mL Kulturgefäße. Jedoch unterlag der Kontrollstamm einer ausgeprägten lag Phase, welche durch Starklicht-Stress der einzelnen Zellen in einer schwach inokulierten Kultur verursacht werden und somit in der initialen Wachstumsphase auftreten konnte. Maximale Zelldichten erreichte *Stm6Glc4T7* nach 119 h mit einer Trockenmasse von $2,136 \text{ g L}^{-1}$, ein Zeitpunkt, bei dem der Kontrollstamm erst 37% des maximalen Trockengewichts von *Stm6Glc4T7* erreicht hat ($0,794 \text{ g L}^{-1}$). Zudem lag das maximal erreichte Trockengewicht des Kontrollstamms ($1,57 \text{ g L}^{-1}$) nach $\sim 150 \text{ h}$ deutlich unter dem maximal erreichten Wert der Mutante *Stm6Glc4T7* bzw. dem zu diesem Zeitpunkt noch effektiv vorhandenen Gewicht von $2,038 \text{ g L}^{-1}$. Diese Ergebnisse bekräftigen die Annahme, dass Starklicht in *Stm6Glc4* während der log Phase einen Stressfaktor darstellt. Möglicherweise überschreiten die hohen Lichtintensitäten das durch die Lichtsammelantenne absorbierbare Licht, wodurch die Rate des photosynthetisch nutzbaren überschritten wird und es deshalb zu Einschränkungen der photosynthetischen Produktivität führt. Diese Einschränkung könnte durch Photoinhibition der äußeren Zellschichten durch Überangebot des Lichtes oder aufgrund eines Licht-Defizit im Inneren der Kultur verursacht worden sein. Zusammenfassend lässt sich postulieren, dass die De-Regulation der LHC Translation mittels des modifizierten NAB1 zu einem verkleinerten Lichtsammelsystem führt. Die

Überexpression des modifizierten NAB1* verursacht einen verkleinerten Lichtsammelkomplex, was im Vergleich zum parentalen Stamm zu einer höheren photosynthetischen Aktivität führt. Es ließ sich ein schnelleres Wachstum mit effektiveren Wachstumsraten, sowie höhere Zelldichten dokumentieren. Insgesamt konnten diese Wachstumskinetiken einen Phänotyp bestätigen, der deutlich darauf hinweist, dass *Stm6Glc4T7* einen enormen Vorteil bei der Anzucht in kleinem als auch in großem Maßstab unter autotrophen Starklichtbedingungen aufweist.

5.1.3 Analysen des modifizierten NAB1 auf unterschiedlichen Ebenen der Expression

Nach dem unter Abschnitt 5.1.2 gezeigt wurde, dass die NAB1* Expression einen entscheidenden Einfluss auf den spektro-photometrisch determinierten Chlorophyll-Gehalt und auf das Chlorophyll a/b Verhältnis, sowie auf den Wachstumsphänotypen zeigte, wurde die Untersuchungen auf eine Expressionsanalyse von NAB1* und NAB1 ausgeweitet. Hierzu wurden die Methoden der RT-PCR (Abschnitt 5.1.3.1), quantitativer real-time PCR (siehe Abschnitt 5.1.3.2) und Immunoblot Analysen (siehe Abschnitt 5.1.3.4) verwendet.

5.1.3.1 Nachweis des *nab1** Transkriptes mittels RT-PCR

Für die RT-PCR wurden Primer spezifisch für das Zielgen *nab1** verwendet. Als Referenzgen (interner Standard) wurde β -Aktin ausgewählt. Die Agarosegel-Analyse der durch RT-PCR erhaltenen Amplifikate zeigte, dass die verwendeten Oligonukleotide die geforderten Produktgrößen ergaben (150 bp). Alle PCR Reaktionen ergaben nur ein PCR-Produkt. Demnach konnte von spezifischen RT-PCR Bedingungen ausgegangen werden. Die Kontrollen ohne Zusatz der reversen Transkriptase (-RT-Proben) enthielten keine Amplifikate, so dass die jeweils erhaltenen PCR-Produkte auf der Amplifikation von RNA beruhte.

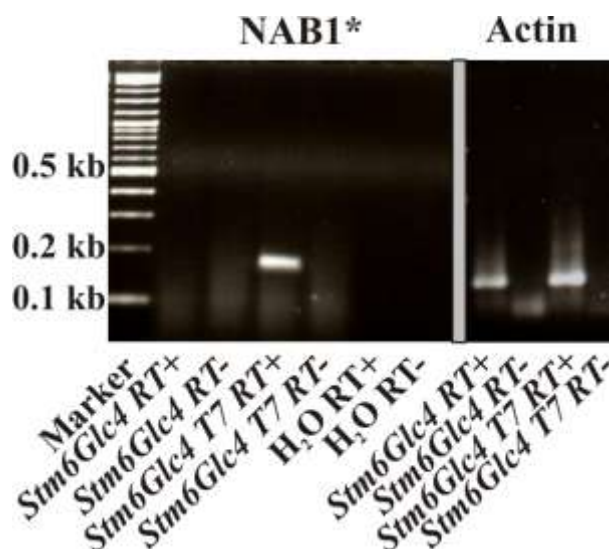


Abbildung 21: Beweis für die mRNA Expression von *nab1** in den unterschiedlichen Mutanten *Stm6Glc4T7*, *T13*, *T22*, *T69* mittels reverser Transkription. Die verwendeten Oligonukleotide qRT_3'NAB*1_fow und qRT_3'NAB*1_rev hybridisierten spezifisch in der modifizierten *nab1** Sequenz und im Vektor pGDN3Cys(181/226)Ser und bildeten ein 150 bp Produkt. Primer Actin qPCR fp 101, Actin qPCR rp 102 wurden als Kontrolle genutzt.

5.1.3.2 Relative Quantifizierung des Transkriptlevels

Die Quantifizierung der mRNA erfolgte mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR). Bei diesem Verfahren werden Amplifikate im Bereich von ~150 bis 200 bp erzeugt. Das bedeutet, dass auch im Fall von RNA-Degradationen Fragmente mit einer gewissen Abschlussgröße noch detektiert und amplifiziert werden können, so dass Ungenauigkeiten innerhalb des qRT-Verfahrens bezüglich der Fragmentgröße minimiert werden können.

Zur Analyse der Transkriptabundanz der *nab1** mRNA im parentalen Stamm *Stm6Glc4* und den NAB1* Transformanten (*Stm6Glc4T7*, *T13*, *T22*, *T69*) wurden Zellen dieser Stämme unter autotrophen Starklichtbedingungen ($700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht, HS-Medium + 2% CO_2) kultiviert, um nach Isolierung der Gesamt-RNA eine quantitative real-time PCR mit *nab1**-, *nab1*- und β -Aktin-spezifischen Oligonukleotiden durchzuführen. Die Primer hybridisierten so, dass eine spezifische Erkennung garantiert war. Für die relative Quantifizierung wurden die C(T) Werte auf das jeweilige Aktin-Signal normiert.

Die Expressionslevel der Tranformanten *Stm6Glc4T13*, *T22* und *T69* wurden dabei relativ zur Expression von *T7* angegeben, da diese im Vergleich zu den anderen NAB1* Mutanten einen signifikant höheren Gehalt an *nab1** Transkript besaß.

Die vergleichende Analysen der *nab1** Expressionslevels zwischen *Stm6Glc4T7*, *Stm6Glc4T13*, *T22* und *T69* identifizierten *Stm6Glc4T7* als Stamm mit dem höchsten *nab1** Gehalt (siehe Abbildung 22).

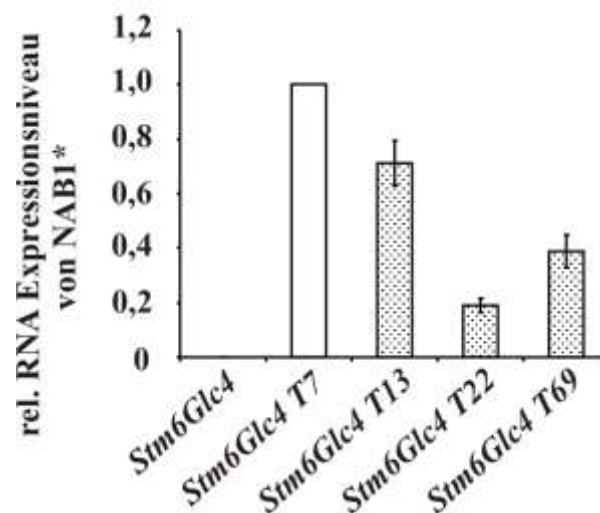


Abbildung 22: Vergleichende Analyse der mRNA Expression von *nab1** in den unterschiedlichen Mutanten *Stm6Glc4T7*, *T13*, *T22*, *T69* mittels quantitativer real-time PCR. Das Expressionslevel von *Stm6Glc4T7* wurde auf 1 gesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide qRT_3'NAB*1_fow und qRT_3'NAB*1_rev hybridisierten spezifisch in der modifizierten NAB1* Sequenz und im Vektor pGDN3Cys(181/226)Ser.

5.1.3.3 Quantifizierung der modifizierten und der endogenen *nab1*-mRNA

Quantifizierungen der Wildtyp *nab1* mRNA, welche im Hintergrund ebenfalls in allen Stämmen exprimiert wird, und der modifizierten *nab1** Variante mittels quantitativer real-time PCR führte zu dem Ergebnis, dass *Stm6Glc4T7* ein 6fach erhöhtes Expressionslevel der beiden Varianten aufweist als der parentale Stamm *Stm6Glc4*. Dieses Ergebnis demonstriert eindeutig, dass die höhere Expressionsrate durch das zusätzlich inserierte *nab1** verursacht wird (siehe Abbildung 23).

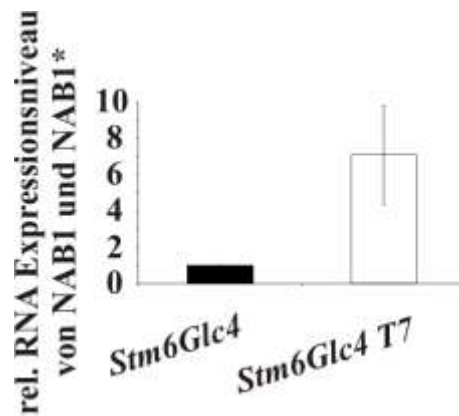


Abbildung 23: Quantifizierung des endogenen *nab1* und des modifizierten *nab1** Transkriptniveaus. Das Expressionslevel des parentalen Stamms *Stm6Glc4* wurde auf 1 gesetzt. β -Aktin Transkriptlevel wurden genutzt, um die zu analysierenden *nab1* und *nab1** Transkripte mittels der quantitativen real-time PCR zu normalisieren. Die verwendeten Primer qRT_3'NAB*1_fow und qRT_3'NAB*1_rev hybridisierten in der modifizierten *nab1** Sequenz und im Vektor pGDN3Cys(181/226)Ser um endogenes *nab1* von modifizierten *nab1** unterscheiden zu können; NAB1-CDS lp, NAB1-CDS rp erkannten die CDS Sequenz und aufgrund der Sequenzidentität sowohl endogenes als auch modifiziertes *nab1* und die Primer Actin qPCR fp 101, Actin qPCR rp 102 wurden als interner Standard genutzt.

5.1.3.4 Immunoblot-Experimente zum Nachweis funktioneller NAB1* Expression

Um Unterschiede in der Expression von LHC Proteinen zu untersuchen wurden Proben vom parentalen Stamm *Stm6Glc4* und *Stm6Glc4T7* in Immunoblot Experimenten analysiert, um den Einfluss von NAB1* auf LHCII Antennen Proteine, durch Nutzung eines polyklonalen Antikörpers gerichtet gegen die Gesamtheit aller LHCII Proteine, zu testen (Andersson et al., 2001; Asakura et al., 2004). Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt und demonstrieren, dass LHCII Proteine in *T7* im Vergleich zum parentalen Stamm *Stm6Glc4* deutlich reduziert sind.

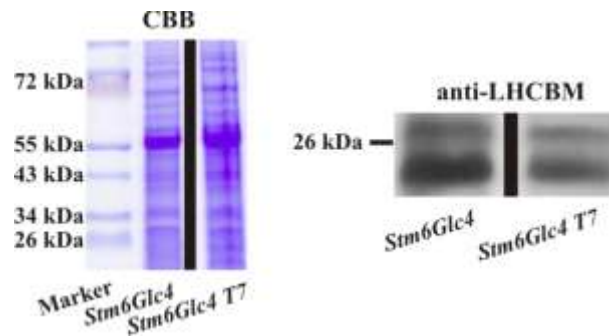


Abbildung 24: Ergebnisse der Immunoblot-Analyse der photoautotroph und unter Starklicht ($700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht in HS-Medium) kultivierten Stämme *Stm6Glc4* und *Stm6Glc4T7*. Zellen für die Gesamt-Proteinextraktion wurden der mid-logarithmischen Phase entnommen und vor dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran in einem 10% Tris-Tricin-SDS-Gel separiert. In der linken Abbildung wird die Beladungskontrolle (Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung) dargestellt und die rechte Abbildung zeigt den Immunoblot, bei der ein Antikörper spezifisch für alle LHCII Formen genutzt wurde.

Zusammenfassend dokumentieren die erhaltenen Daten, dass in der Zelllinie *Stm6Glc4T7* NAB1 in einem permanent aktiven, nicht regulierbaren Zustand (NAB1*) mit erhöhter RNA Bindeaffinität vorliegt, was in einer verminderten LHCII-Protein Expression resultiert. *Stm6Glc4T7* wies eine erhöhtes NAB1* Transkriptionslevel auf, was zu einer Regulation der Sequestrierung der *lhcbm*-RNA führte und damit eine verminderte LHC Proteinexpression und somit eine verkleinerte LHCII-Antenne zur Folge hatte. Diese Ergebnisse werden durch ein erhöhtes Chlorophyll a/b Verhältnis bei gleichzeitiger Reduktion des Gesamt-Chlorophyllgehaltes und die erhaltenen Wachstumskinetiken bekräftigt (siehe Abschnitt 5.1.2).

5.1.4 Untersuchungen zur photosynthetischen Aktivität

5.1.4.1 Chlorophyll a Fluoreszenz als Indikator für photosynthetische Lichtumwandlung unter steigenden Lichtbedingungen

Durch Messung der Chlorophyll a Fluoreszenz wurde die Effizienz der photosynthetischen Lichtverwertung (effektive Quantenausbeute) analysiert, um die Veränderungen der photochemischen Aktivität des Photosystem II unter steigenden Lichtintensitäten zu untersuchen ($54, 350, 850 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Über diese nicht invasive Messung können die Zellen hinsichtlich ihrer Lichtnutzungseffektivität und Empfindlichkeit gegenüber steigenden Lichtintensitäten (bis hin zu Starklichtapplikation) charakterisiert werden.

Wie aus Abbildung 25 ersichtlich ist, unterschieden sich die $\Phi_{\text{PS II}}$ Werte zwischen dem parentalen Stamm und der Mutante *Stm6Glc4T7*. Im parentalen Stamm

waren die Werte deutlich erniedrigt (% Angaben der rechten Ordinate), was den Schluss zulässt, dass hier im Verhältnis weniger einfallende Lichtenergie zur Photosynthese genutzt und mehr als Wärme und Fluoreszenz emittiert wurde.

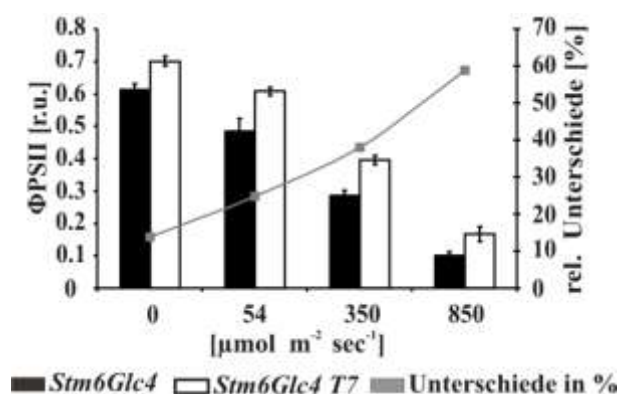


Abbildung 25: Chlorophyll a Fluoreszenzparameter. Der maximale Quantumyield (F_v/F_m) nach Dunkeladaptation und die effektive Quantenausbeute ($\Phi_{\text{PS II}} = F'_m - F_t / F'_m$) von Photosystem II in Abhängigkeit steigender Lichtintensitäten (54, 350, 850 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) von *Stm6Glc4* und *Stm6Glc4T7* wurden nach Maxwell et al., 2000 berechnet und auf der linken Ordinate in relativen Einheiten dargestellt. Die Veränderungen der relativen Differenzen der Fluoreszenzparameter zwischen den beiden *Chlamydomonas* Stämmen sind auf der rechten Ordinate dargestellt.

Ein erniedrigter F_v/F_m Wert deutet auf eine erniedrigte Effizienz hin, mit der von oxidiert vorliegenden Reaktionszentren Anregungsenergie aus den Antennenkomplexen aufgenommen wird. Bei vielen Pflanzenarten liegen die Maximalwerte von F_v/F_m in einem sehr engen Bereich von $0,832 \pm 0,004$ (Björkman & Demming, 1987). Die Verhältnisse von variabler zu maximaler Fluoreszenz unterschieden sich zwischen parentalem Stamm ($\emptyset = 0,615$) zur Mutante ($\emptyset = 0,7$). Zu beachten ist, dass die minimale Fluoreszenz im parentalen Stamm im Vergleich zur Mutante erhöht vorlag, wohingegen die maximale Fluoreszenz um 12% geringer war als in *Stm6Glc4T7* (hier nicht gezeigt). So dass trotz der Differenzen beim Vergleich der beiden Zelllinien als auch bei der Abweichung von den in der Literatur beschriebenen F_v/F_m Maximalwerten davon ausgegangen wurde, dass die Effizienz der Q_A Reduktion erfolgen kann und nicht signifikant eingeschränkt ist. Im Gegensatz zu der 14%igen Abweichung der maximalen Quantenausbeute (Abzisse: 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht) dunkeladaptierter *Stm6Glc4* und *Stm6Glc4T7* Zellen, war von besonderem Interesse, dass die Unterschiede der $\Phi_{\text{PS II}}$ Werte zwischen parentalem Stamm und *Stm6Glc4T7* mit zunehmenden Lichtintensitäten kennzeichnend von 25% bei 54 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und 38% bei 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hin zu 59% bei 850 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Weißlicht divergierten. Im Gegensatz zu den F_v/F_m Werten wurde hier der $\Phi_{\text{PS II}}$ Parameter unter Belichtung mit Anregungslicht unterschiedlicher Intensität ermittelt, also während photosynthetische Prozesse im Gang waren. Je größer

der $\Phi_{PS II}$ Parameter ist, desto mehr der gesammelten Lichtenergie wird photosynthetisch genutzt. Die photosynthetisch genutzte Lichtenergie lag im parental Stamm im Vergleich zur Mutante bei allen Lichtintensitäten stark erniedrigt vor. Von diesem Ergebnis ableitend lässt sich schließen, dass im parental Stamm im Verhältnis weniger der absorbierten Lichtenergie insbesondere unter hohen Intensitäten zur Photosynthese genutzt und mehr in Form von Fluoreszenz emittiert wurde. Dieses Ergebnis bestätigte eine reduzierte Effizienz der Reduktion von Q_A durch die Photosystem II Komplexe in *Stm6Glc4*.

5.1.4.2 Sauerstoffmessung

Abbildung 26 illustriert photosynthetische Lichtkurven von *Stm6Glc4* und *Stm6Glc4T7*. Dargestellt wurden die Wirkungen verschiedener Lichtstärken bei konstanter Temperatur auf die Photosynthese. In den lichtabhängigen Messungen der Sauerstoffentwicklung wies *Stm6Glc4T7*, verglichen mit *Stm6Glc4*, eine höhere photosynthetische Aktivität auf. Wie erwartet, stieg anfänglich die Photosynthese-Leistung mit wachsender Lichtintensität an, überschritt jedoch bei höheren Werten den erreichten maximalen Wert nicht (ab $\sim 300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Somit ist der Lichtsättigungspunkt beider Stämme nahezu bei gleicher Lichtintensität erreicht. Dabei unterschieden die beiden Zelllinien sich deutlich in der gemessenen Sauerstoffproduktionsrate. Bei diesen Messungen zeigte *Stm6Glc4T7* eine 25-28% höhere maximale photosynthetische Aktivität unter lightsättigenden Bedingungen als *Stm6Glc4* auf. Demnach sind die Ergebnisse übereinstimmend mit den in Abbildung 17 erhaltenen $\Phi_{PS II}$ Daten durch die PAM-Messung. Unter hohen Lichtintensitäten überschreiten die durch die Chlorophyll Lichtsammelantennen absorbierten Photonen die photosynthetisch nutzbare Rate. Die Messung der Sauerstoffaktivität deutete an, dass dieser photoinhibitorische Effekt im parental Stamm eintrat und somit zur Einschränkung der photosynthetischen Aktivität führte. Desweiteren waren die Zellen im Inneren der *Stm6Glc4T7* Kultur aufgrund der kleineren Lichtantennen und der daraus resultierenden verbesserten Lichtpenetration effizienter mit Licht versorgt, was einen verbesserten photosynthetischen Ertrag und Photoproduktivität reflektiert und durch die vermehrte Sauerstoff-Produktion der Zellen gezeigt wurde.

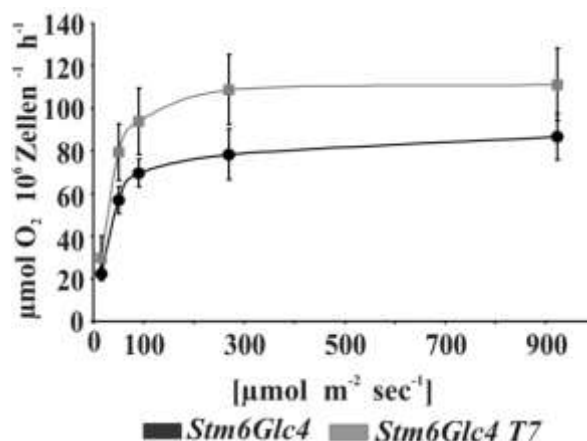


Abbildung 26: Photosyntheserate unter Einfluss verschiedener Lichtintensitäten. Die Kulturen wurden auf gleiche Zelldichten eingestellt ($7,2 \times 10^6$ Zellen mL^{-1}) und dann mit aktinischen Licht steigender Intensitäten ($16 - 923 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) während der Sauerstoff-Messung (HansaTech) inkubiert.

5.1.4.3 Wasserstoff-Messungen

Im letzten Abschnitt der Charakterisierung war zu prüfen, ob die Reduktion der Lichtsammelantenne Auswirkungen auf die Wasserstoff-Produktion hatte. Um dieses zu testen wurden *Stm6Glc4*- und *Stm6Glc4T7* Kulturen in TAP-Vollmedium bis zu einer Konzentration von 1×10^7 Zellen mL^{-1} kultiviert bevor durch die Schwefel-Depletion die H_2 -Produktion induziert wurde.

Die Ergebnisse dieses Experimentes demonstrierten, dass die verkleinerte Lichtsammelantenne mit dem H_2 -Produktionsprozess verlinkt war. Die Überexpression von NAB1* führte zu einer 17% Steigerung der maximalen H_2 -Produktionsrate.

Dieses Ergebnis basierte auf einer Messung, die drei technische Replikate umfasste. Um weitere Aussagen über die idealen Konditionen formulieren zu können sollten Folgeexperimente erarbeitet werden, in denen Kulturen systematisch variierenden Bedingungen unterlegt werden. Dazu würden unterschiedliche Zelldichten, sowie unterschiedliche Chlorophyll-Konzentrationen im Fokus stehen, als auch Expositionen der Kulturen unter verschiedenen Lichtintensitäten. Der große Vorteil der Mutante *Stm6Glc4T7* war der Wachstumsphänotyp unter Minimalbedingungen. Anzuchten unter diesen Kultivierungsbedingungen bieten einen enormen ökonomischen Vorteil und müssen deshalb in zukünftigen Arbeiten berücksichtigt werden.

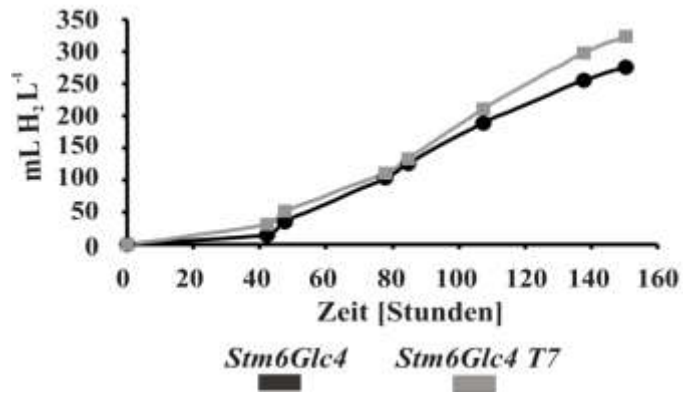


Abbildung 27: Maximale H₂ Produktionsraten von *Stm6Glc4* und *Stm6Glc4T7*. Jede Kurve repräsentiert eine Messung bestehend aus drei technischen Replikaten. Alle H₂-Zellkulturen wurden auf gleiche Chlorophyll-Mengen eingestellt (25 µg).

5.2 Ergebnisse der Proteom-Analyse

5.2.1 Ziel der Proteom-Untersuchung

Die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* besiedelt eine Vielzahl verschiedener Habitats mit zeitweise suboptimalen Umwelt- und Wachstumsbedingungen. Durch einen universellen, wandlungsfähigen Metabolismus verfügt *Chlamydomonas reinhardtii* über diverse komplexe Strategien, um auf spezifische Veränderungen abiotischer und biotischer (Stress-) Faktoren zu reagieren. Die Reaktionen auf Schwefelmangel sind eine modulierte Anpassung zahlreicher metabolischer Prozesse (Photosynthese, Kohlenhydrat-Metabolismus, Proteinsynthese und -degradation) und beinhalten eine Reorganisation der zellulären Proteinzusammensetzung (u.a. zur Konservierung vorhandener schwefelhaltiger Komponenten sowie zur Verbesserung der Schwefel-Akquisition mittels gesteigerter Aufnahme). Zudem wird durch die Kombination von Schwefelmangel und Anoxie die Wasserstoffproduktion induziert. Zahlreiche Studien untersuchten die Anpassung von *Chlamydomonas reinhardtii* an anoxische Bedingungen auf Ebene des Transkriptom (Nguyen et al., 2007, Mus et al., 2007), Metaboloms (Timmins et al., 2009, Doebbe et al., 2010) und Proteoms (Terashima et al., 2010, Chen et al., 2010). In einigen dieser Studien wurde Schwefelmangel zur Induktion der Anoxie verwendet, so dass Wasserstoffproduktionsbedingungen vorlagen (Chen et al., 2010).

Im Fokus der vorliegenden Proteom-Studie steht die Analyse des photobiologischen H₂ Produktionsprozesses nach Induktion durch Schwefelmangel. Um eine detaillierte Darstellung der Veränderungen des Stoffwechsel und der damit einhergehenden Veränderung auf Proteinebene zu erhalten, wurde die vielschichtig verzweigte Antwort auf den Schwefelmangel vor und während des H₂ Produktionsprozesses analysiert. Zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen wurden in dieser Studie massenspektrometrische Analysen zur Darstellung von Proteinexpressionsmustern angereicherter Chloroplasten aus *Chlamydomonas reinhardtii* genutzt. Dazu wurden Chloroplasten aus aerob kultivierten (t0) und wasserstoffproduzierenden (anaeroben, t4/t6) Zellen isoliert, wobei neben dem Wildtyp-Stamm *cc406* auch die stark H₂-produzierende Mutante *Stm6Glc4* verwendet wurde.

Zum einen sollte durch eine Analyse der im Wildtyp stattfindenden Proteom-Veränderung eine generelle Aussage über die Anpassung der Zelle an Schwefelmangel und Anaerobie erhalten werden. Zum anderen sollte ein Vergleich von Mutante und Wildtyp zur Identifizierung von Proteinen führen, deren vom Wildtyp abweichende

Expression zu einer erhöhten H₂-Produktion in *Stm6Glc4* führt. Dabei wird eine Datenbasis für nachfolgende Untersuchungen geschaffen, um Zelllinien mit einer veränderten, d.h. verbesserten Fähigkeit zur anaeroben H₂ Produktion, zu generieren.

Während vorherige Studien (Nguyen et al., 2008; Mus et al., 2007; Timmins et al., 2009; Terashima et al., 2010; Chen et al., 2010) ausschließlich nur das Transkriptom, Proteom oder Metabolom allein untersuchten ist die vorliegende Arbeit Teil eines detaillierten systembiologischen Ansatzes bei dem wasserstoffproduzierende Zellen auf allen drei Ebenen gleichzeitig analysiert werden (Doebbe et al., 2010; Nguyen et al., 2011). Insbesondere bei Transkriptom-Studien ist zu berücksichtigen, dass häufig keine direkte Korrelation zwischen Transkript- und Proteinmenge besteht, weil der *steady-state*-Gehalt einer mRNA keine Aussage über die Translationseffizienz erlaubt. Metabolom-Studien liefern Informationen über die Aktivität von Stoffwechselwegen und können verwendet werden um metabolische Flüsse zu untersuchen. Um Metabolom-Daten für eine gezielte gentechnische Optimierung von Organismen nutzen zu können, bedarf es des Proteom-Komplements, da nur die Kenntnis beteiligter Enzyme Ansätze für ein *strain engineering* bietet. Die Analyse des Proteoms liefert somit essentielle Informationen innerhalb eines systembiologischen Ansatzes.

Um die Proteinzusammensetzung unter verschiedenen Bedingungen (+ Schwefel und – Schwefel) voneinander unterscheiden zu können erfolgte die Einführung stabiler ¹⁵N Isotope durch Anreicherung des Kulturmediums *in situ*. Die Expressionsmuster des Wildtypen und der Mutante (Kontrollpunkt t0 und H₂-Hochproduktionsphase t4/t6, siehe Abbildung 30) wurden qualitativ und quantitativ untersucht. Dabei auftretende gemeinsame Expressionsmuster, die sowohl im chloroplastidären Subproteom des Wildtypen als auch in der Mutante *Stm6Glc4* detektiert wurden, sind für die Erstellung eines allgemeinen unter Schwefelmangel exprimierten Wasserstoff-Proteoms interessant. Desweiteren bietet der Vergleich der Expressionsmuster von Wildtyp und stark H₂-produzierender Mutante eine Basis für weiterführende Untersuchungen.

Identifizierte Zielgene können mit weiteren molekularbiologischen Techniken und biochemischen sowie physiologischen Untersuchungen weiter charakterisiert werden, um ihre mögliche Eignung als Zielgen für eine gentechnische Optimierung zu beurteilen. ,

5.3 Einführung und Vorversuche

5.3.1 Wasserstoffproduktion

Die H₂-Produktion durch *Chlamydomonas reinhardtii* in geschlossenen Bioreaktoren (hier: unter Schwefelmangel) ist abhängig von der Lichtintensität, der Zellzahl und dem Bioreaktordesign. Diese Faktoren müssen definiert werden, um eine optimale Menge an H₂ produzieren zu können.

Idealerweise sollte die Belichtung und die Zelldichte so gewählt werden, dass alle Zellen die gleiche Lichtmenge erreicht. Dies ist in den meisten Fällen nicht zu gewährleisten. Während Zellen der äußeren Schichten schneller photoinhibiert werden, sind Zellen im Inneren der Kultur aufgrund des Beschattungseffektes nicht ausreichend belichtet. Ist die Menge an Photonen pro Zelle im Reaktormittelpunkt zu niedrig, kann keine Photoinhibition und daraus resultierend keine Anaerobie erreicht werden, was im Endeffekt zu einer geringen Wasserstoff-Ausbeute führt. Zudem ist entscheidend, dass physiologische Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien existieren. Für reproduzierbare Ergebnisse müssen die einzelnen Parameter aufeinander abgestimmt werden.

Bekannt ist, dass ein verkleinerter Chlorophyll-Lichtsammelkomplex die photo-destruktive Wirkung hoher Lichtintensitäten durch übermäßige Absorption minimiert. Zudem reduziert sich die Dissipation aus den äußeren Zellschichten und gewährleistet eine bessere Licht-Penetration innerhalb großer, biotechnologisch nutzbarer Massenkulturen (Polle et al., 2002, Polle et al., 2003, Beckmann et al., 2009). Die Lichtantennen der verwendeten Zelllinien (*Stm6Glc4*, *cc406*) unterliegen einer Regulation durch die eingestrahlte Lichtintensität und -qualität während der Anzucht (Polle et al., 2002). Daher musste eine Zelldichte und Belichtungsstärke gefunden werden, die eine optimale Lichtpenetration erlaubt. Neben den optimalen H₂ Produktionsbedingungen, die bereits innerhalb eines anderen Schwerpunktes bestimmt wurden (Doebbe et al., 2007), mussten zusätzlich physiologisch reproduzierbare Parameter und Zeitpunkte bestimmt werden, um die individuellen Kinetiken der Wasserstoffproduktion vergleichbar zu machen.

5.3.2 Etablierung optimaler Bedingungen

In der vorliegenden Studie wurde die Mutante *Stm6Glc4* genutzt (Doebbe et al., 2007). *Stm6Glc4* wurde hergestellt, in dem die Mutante *Stm6* (*state transition mutante 6*, Schönfeld et al., 2004) zusätzlich mit einem Glukose-Transporter aus *Chlorella kesslerie*

(*hexose uptake protein*, HUP1) transformiert wurde. Nach heterologer Überexpression war die selektierte Mutante *Stm6Glc4* befähigt, Glukose aus dem Außenmedium aufzunehmen, was unter anaerober Schwefeldepletion in einer stärkeren H₂ Produktion im Vergleich zu *Stm6* und ausgewählten Wildtypen resultierte (Doebbe et al., 2007). Die optimale Glukose-Konzentration, die zu einer Steigerung der Wasserstoffproduktion führte lag bei 1 mM Glukose und eine optimale Zellzahl für *Stm6Glc4* wurde mit $1,2 \times 10^7$ Zellen mL⁻¹ festgestellt. Daraus resultierte eine optimale Wasserstoff-Ausbeute für diesen Stamm (Doebbe et al., 2007).

5.3.3 Auswahl des geeigneten Vergleichsstamm

Der parentale Stamm von *Stm6* war eine Arginin-auxotrophe Zelllinie (*cc1618*). *Stm6* wurde über Zufallsinsertion des Argininosuccinatlyase-Gens hergestellt (Schönfeld et al., 2004), so dass nach positivem Transformationsereignis die Zelllinie Arginin-autotroph wachsen konnte. Deshalb ist es möglich *Stm6* und *Stm6Glc4* ohne Zugabe von Arginin zu kultivieren. Weil eine Zugabe von Arginin Unterschiede im Wachstum und der Physiologie verursacht, konnte *cc1618* nicht als Referenz-Stamm ausgewählt werden. Deshalb wurden zwei verschiedene Wildtypen (*cc406* und *cc3491*), die abgesehen von dem Defekt im Argininosuccinat-Lyase-Gen, einen zu *Stm6Glc4* identischen genetischen Hintergrund besaßen, ausgesucht. Für diese wurde dann die Wasserstoffproduktionskapazität bestimmt.

Um die photosynthetische Lichtverwertung (effektive Quantenausbeute) und damit die Veränderungen der photochemischen Aktivität des Photosystems II zu bestimmen, wurden ΦPS II-Messung (Abbildung 28) direkt nach Überführung in schwefelfreies Medium und Überführung in die Bioreaktoren durchgeführt. Da bei einer effektiven Quantenausbeute nahe Null nur noch eine geringe Restaktivität von PS II vorliegt, übersteigt der respiratorische Sauerstoffverbrauch die photosynthetische Sauerstoffproduktion. Auf diese Weise ließ sich der Zeitpunkt der Anaerobie physiologisch in beiden Zelllinien bestimmen. Als Reaktion auf die abnehmende PS II-Funktion sank die effektive Quantenausbeute von *Stm6Glc4* innerhalb von 28 Stunden rapide ab. In der vorliegenden Studie wurden zusätzlich zwei Wildtypen miteinander verglichen (*cc406*, *cc3491*), wobei sich deutliche Unterschiede in den Kinetiken der beiden Zelllinien zeigten.

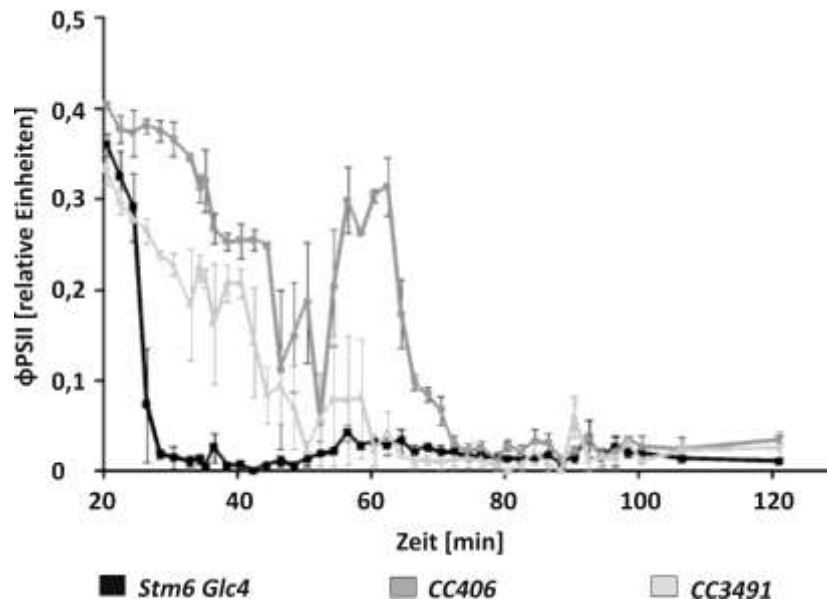


Abbildung 28: Bestimmung des Chlorophyll-Fluoreszenzparameters Φ PS II. Aus den gemessenen Fluoreszenzwerten wurde die effektive Quantenausbeute (Φ PS II = $F'_m - F_t / F'_m$) von Photosystem II für *Stm6Glc4*, *CC406* und *CC3491* unter Schwefeldepletion und Sauerstoffausschluss berechnet. Die Kulturen wurden auf $1,2 \times 10^7$ Zellen mL^{-1} eingestellt. Jeder Messpunkt repräsentiert einen Mittelwert aus mindestens 3 Messungen (Fehlerbalken=Standardfehler).

Die Messungen begannen für alle Zelllinien mit einem Φ PS II von 0,4. Die beiden Wildtyp-Zelllinien (*cc406*, *cc3491*) zeigten eine stark verzögerte Abnahme des Φ PS II im Vergleich zu *Stm6Glc4* an. Bei *cc406* konnte eine Reduktion der Quantenausbeute erst nach 38 Stunden gemessen werden, zudem oszillierten die Werte für weitere 30 Stunden zwischen 0,38 und 0,04 und erst nach 68 Stunden Schwefeldepletion erreichte dieser Wildtyp Werte um 0 und somit die Anaerobie.

Die effektive Quantenausbeute von *cc3491* zeigte nach 20 Stunden eine Reduzierung und fluktuierte zwischen 0,29 und 0,05 für weitere 30 Stunden. Erst 52 Stunden nach erfolgreichem Mediumwechsel erreichte *cc3491* Werte bei 0 und somit Anaerobie.

Die schnelle Abnahme des Φ PS II bei *Stm6Glc4* im Vergleich zu den Wildtypen deutete auf einen früheren Beginn der Wasserstoffproduktion hin.

5.3.4 Analyse der H_2 Produktion

Die Wasserstoffproduktion startete in der Mutante *Stm6Glc4* 51 Stunden eher im Vergleich zu den selektierten Wildtypen (Abbildung 29). 35 Stunden nach dem Mediumwechsel produzierte die Mutante Wasserstoff, während die Produktion in *cc3491* erst nach 68 Stunden und in *cc406* sogar erst nach 86 Stunden begann. Zudem konnte

dieser Prozess in der Mutante über einen längeren Zeitraum und mit höheren Raten gemessen werden. Verglichen mit *cc406* (auf 100 % gesetzt) produzierte *Stm6Glc4* 230% mehr Wasserstoff, während *cc3491* nur 44% H₂ im Vergleich zu *cc406* freisetzte. *Stm6Glc4* erreichte eine maximale Rate von 4,9 mL H₂ l⁻¹ h⁻¹ und eine Durchschnittsrate von 2,9 mL H₂ l⁻¹ h⁻¹ gemessen über 108 Stunden. Die maximale H₂ Produktionsrate von *cc3491* betrug 1,2 mL H₂ l⁻¹ h⁻¹, womit eine durchschnittliche Menge von 0,5 mL H₂ l⁻¹ h⁻¹ über 64 Stunden produziert wurde. Der Wildtyp *cc406* produzierte maximal 2,8 mL H₂ l⁻¹ h⁻¹ mit einer durchschnittlichen Produktionsrate von 1,3 mL H₂ l⁻¹ h⁻¹ über 57 Stunden.

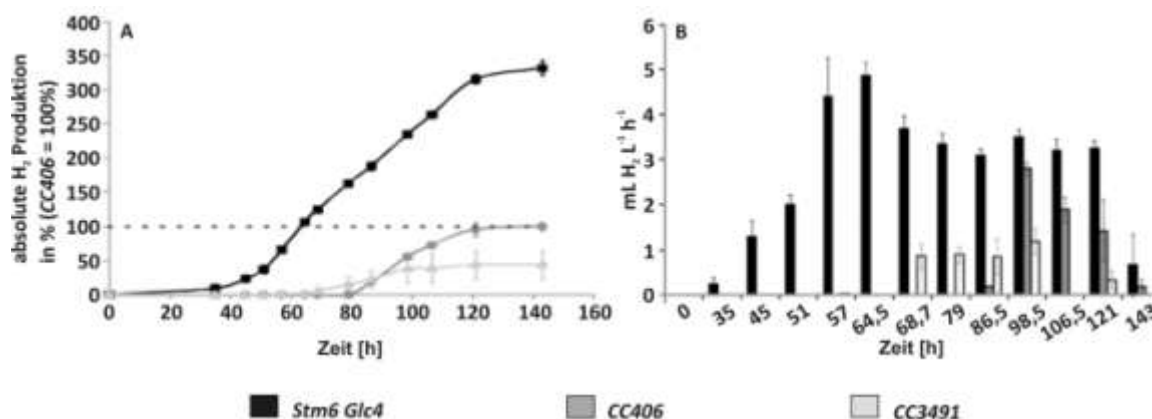


Abbildung 29: H₂ Produktion in *Stm6Glc4*, *CC406* und *CC3491*. Für die Untersuchung wurden die Kulturen auf eine Zellzahl von $1,2 \times 10^7$ Zellen mL⁻¹ eingestellt und mit 1 mM Glukose versetzt. A.) Dargestellt ist die absolute H₂ Produktionsmenge in allen, zur Auswahl stehenden Zelllinien. Die in *CC406* produzierte Menge Wasserstoff wurde auf 100% gesetzt. B.) Produktionskapazitäten der einzelnen Zelllinien über den zeitlichen Verlauf. Jeder Datenpunkt besteht aus mindestens drei Messungen, Fehlerbalken = Standardfehler).

Insgesamt zeigten die Φ PS II-Messungen und die Messung der Wasserstoffproduktionseffizienz große Unterschiede zwischen der Mutante *Stm6Glc4* und den ausgewählten Wildtypen *cc406* und *cc3491*. Das deutlich frühere Einsetzen der Wasserstoffproduktion der Mutante ist auf das schnellere Erreichen der Anaerobie zurückzuführen. Im Vergleich zu den Wildtypen *cc406* und *cc3491* setzte die Wasserstoffproduktion in der Mutante durchschnittlich 24-48 h eher ein. Desweiteren galt es Erntezeitpunkte zu bestimmen, in denen sich die Mutante und der ausgewählte Wildtyp (*cc406*) in vergleichbaren physiologischen Stadien befanden, da die Unterschiede zwischen den H₂ Produktionskinetiken groß waren.

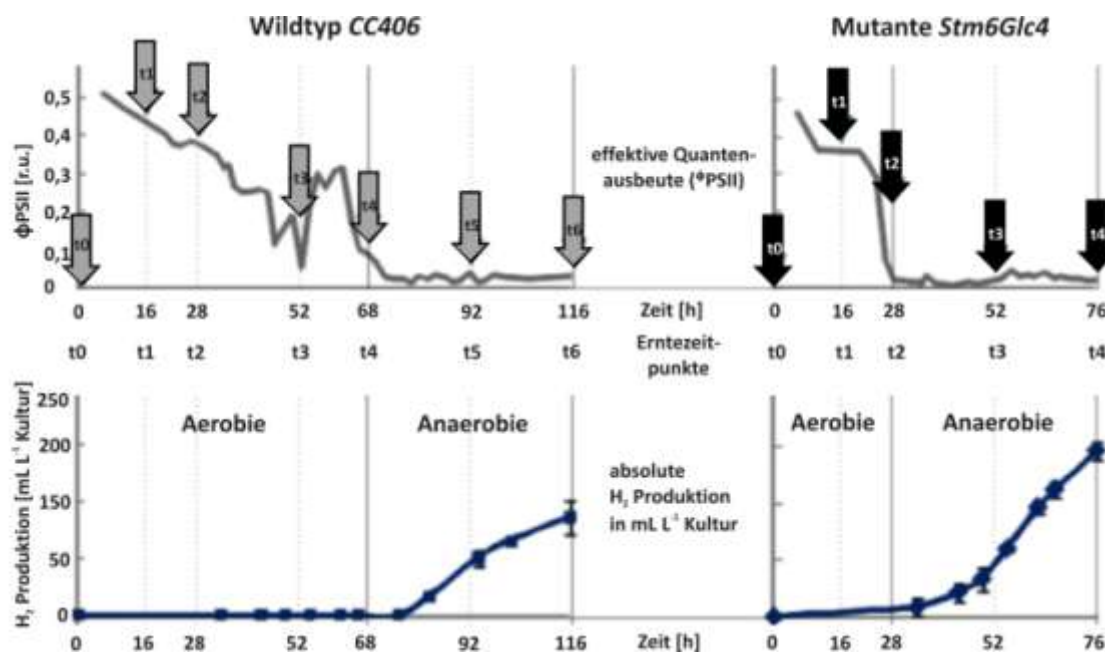


Abbildung 30: Zeitliche Veränderungen der effektiven Quantenausbeute des Photosystems II (Φ_{PSII} , obere Abbildung) unter wasserstoffproduzierenden Bedingungen (Anaerobie und Schwefelmangel) und der absoluten H_2 Produktion. Graue Pfeile markieren die Erntezeitpunkte des Wildtypen und schwarze Pfeile die der Mutante *Stm6Glc4*. (Abbildung modifiziert nach Nguyen et al., 2011).

Als Startzeitpunkt (t_0) wurde die Entnahme des Probenmaterials vor dem Mediumwechsel definiert. Die Stunde 16 nach dem Mediumwechsel repräsentiert den Zeitpunkt t_1 . In t_1 erfolgt noch Sauerstoffproduktion, wobei die Schwefeldepletion sich bereits auswirkt. Der Zeitpunkt t_2 wurde über die effektive Quantenausbeute determiniert. Da zu diesem Zeitpunkt die Messung 0 ergab, 24 Stunden nach dem der Φ_{PSII} -Wert auf 0 abgefallen war, wurden Proben aus den Kulturen entnommen, in denen die Wasserstoffproduktion begann. Zum Zeitpunkt t_4/t_6 befanden sich die Proben in der Hochproduktionsphase von Wasserstoff.

5.3.5 Proteomics

Um die molekularen Mechanismen der Wasserstoffproduktion zu verstehen wurde in dieser Studie eine 1-D-Gel-Elektrophorese gekoppelt mit der LC-MS-MS Technik genutzt (Abbildung 31). Dazu wurden die dynamischen Änderungen der Protein-Abundanzen in Chloroplasten-Präparaten in zwei verschiedenen Zeitpunkten (t_0/t_4 *Stm6Glc4* und t_0/t_6 WT; siehe Abbildung 30) ermittelt. Das Proteom wurde in Abhängigkeit der Zeit und des äußeren Einflusses (Schwefelmangel) in einem *label*-freien Ansatz (*spectral counting*) und nach erfolgter Markierung stabiler Isotopen betrachtet (^{15}N). Für die Vermessung der Proteine wurde das LTQ Orbitrap XL hybrid

FTMS (LC-MS/MS) (Terashima et al., 2011) genutzt. Um Proteine zu identifizieren wurden mindestens zwei spezifische Peptide benötigt, welche mittels OMSSA (OMSSA, *open mass spectrometry search algorithm*, Geer et al., 2004) identifiziert wurden. OMSSA ist eine Software für Proteinidentifikationen. Die verwendete Software für Proteinidentifikationen sucht dabei nach Korrelationen zwischen unidentifizierten MS/MS Spektren mit Aminosäuresequenzen der Datenbanken. Die Anzahl der identifizierten Proteine jeder einzelnen Kondition (aerobe und anaerobe) ist in Abbildung 35 gezeigt. Bei der relativen Quantifizierung mittels *spectral counting* wird die Anzahl der identifizierten Peptide als Maß für die Abundanz eines Proteins herangezogen, um damit Aussagen über die Proteinregulation bei physiologisch unterscheidbaren Bedingungen zu treffen. Dazu wurde die Anzahl aller erfolgreich identifizierten Peptide eines Proteins, die *spectral counts*, zwischen den einzeln zu betrachtenden Bedingungen (t0 plus Schwefel, t4/t6 minus Schwefel) miteinander verglichen.

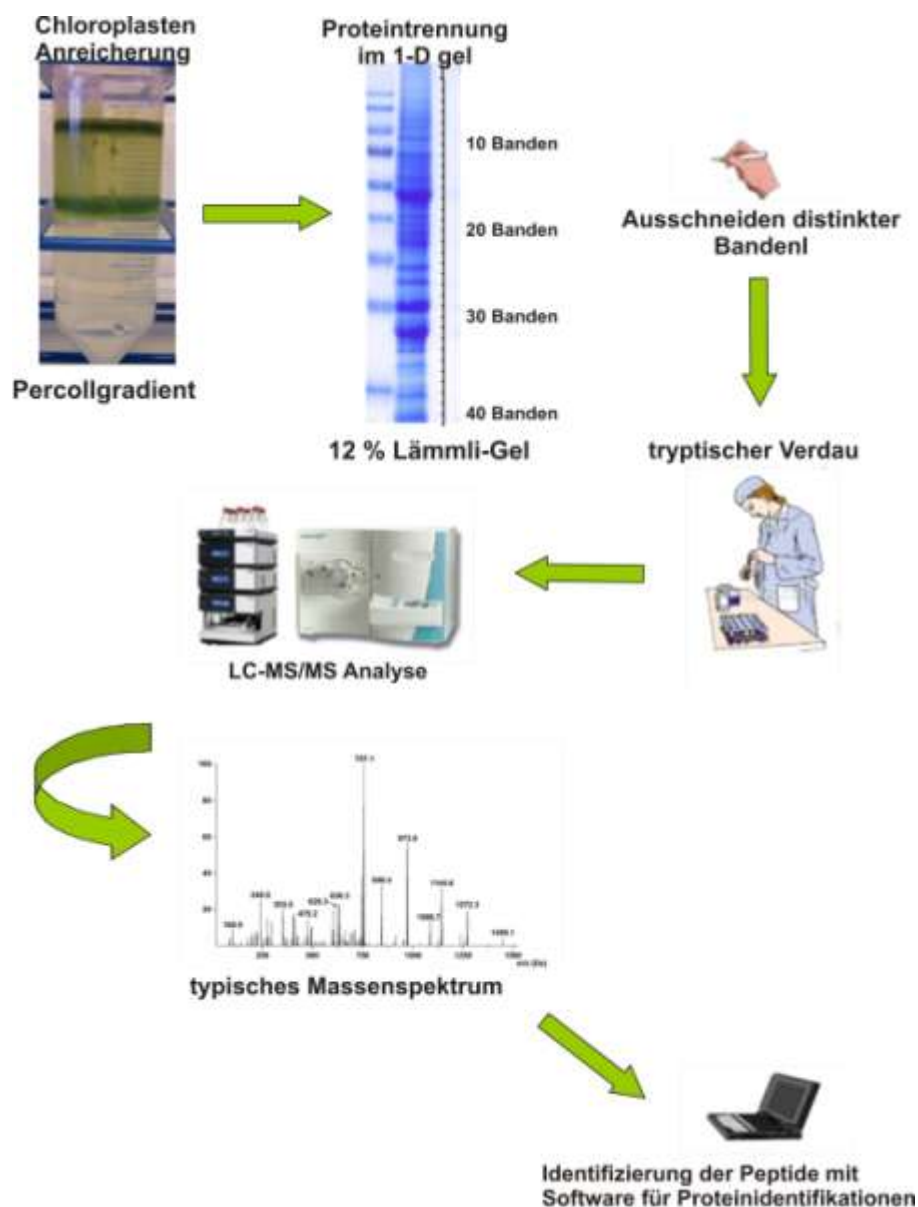


Abbildung 31: Dargestellt sind die Arbeitsabläufe beginnend bei der Aufreinigung des Probenmaterials bis hin zur Massenspektrometrie, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Über einen Percollgradienten erfolgte eine Chloroplasten-Anreicherung, welche im SDS-PAGE separiert wurde. Die Banden wurden ausgeschnitten und Proteine tryptisch verdaut. Die extrahierten Peptide wurden im LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer vermessen. Dieser experimentell erhaltene fragmentierte Scan wurde mit Proteinsequenzen einer allgemeinen Datenbank verglichen. Die verwendete Software für Proteinidentifikationen sucht dabei nach Korrelationen zwischen unidentifizierten MS/MS Spektren mit Aminosäuresequenzen der Datenbanken.

Um eine Vielzahl von Proteinen vor (t_0) und während der Wasserstoffproduktion (t_4 bzw. t_6) gleichzeitig quantitativ zu erfassen wurde von der Isotopenmarkierungstechnik Gebrauch gemacht. Dabei wurden über das Kulturmedium (TAP) stabile Isotope (hier: ^{15}N) *in vivo* in eine der beiden Proteomproben eingebracht. Somit wurde gewährleistet,

dass sich die Proteine aus beiden Proteomzuständen (t0 und t4/t6) im Trennverfahren identisch verhalten, in der Massenspektrometrie aber unterscheidbar sind. Die generierten Proteine unterscheiden sich in der Masse aufgrund der eingebrachten Isotope und können deshalb zusammengemischt werden. Der Vorteil dieser im Vergleich zu anderen Markierungsmethoden sehr günstigen Variante bestand darin, dass die unterschiedlich markierten Probenansätze unmittelbar nach der Zellernte vereinigt und gemeinsam prozessiert werden können. Auf diese Weise finden alle Arbeitsschritte (Trennung im SDS-PAGE, tryptischer Verdau, Elution aus dem Gel) unter absolut identischen Bedingungen statt. Im Massenspektrometer liegen die proteolytisch erzeugten Peptide aus t0 in der „leichten“ Form und jene aus der Wasserstoffproduktionsphase (t4, t6) in der „schweren“ Form vor, worüber die relative Quantifizierung ermöglicht wurde. In diesem Ansatz wurden zwei Zellproben separat kultiviert, eine davon unter Standardbedingungen (t0) und eine weitere Kultur in TAP Medium, in dem die stickstoffhaltigen Salze (TAP-Salze) durch $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ersetzt wurden (t4/t6). Um einen vollständigen Einbau zu gewährleisten wurden diverse Starterkultur-Zyklen durchlaufen, bevor mit der Proben-Herstellung begonnen wurde. Beide Ansätze wurden einheitlich behandelt. Auch die Zellen in Standardmedium durchliefen mehrere Starter-Zyklen. Nach 14 Tagen erfolgte dann für die $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ Ansätze ein Mediumwechsel, der die Wasserstoffproduktion induzieren sollte. Für das Waschen der Zellen und die anaerobe Kultivierung unter Schwefeldepletion wurde das Medium (TAP minus Schwefel) ebenfalls mit den schweren Stickstoffsalzen angereichert. Nach der Zellernte wurden die Proben dann in einem 1:1 Verhältnis gemischt und gemeinsam aufgearbeitet.

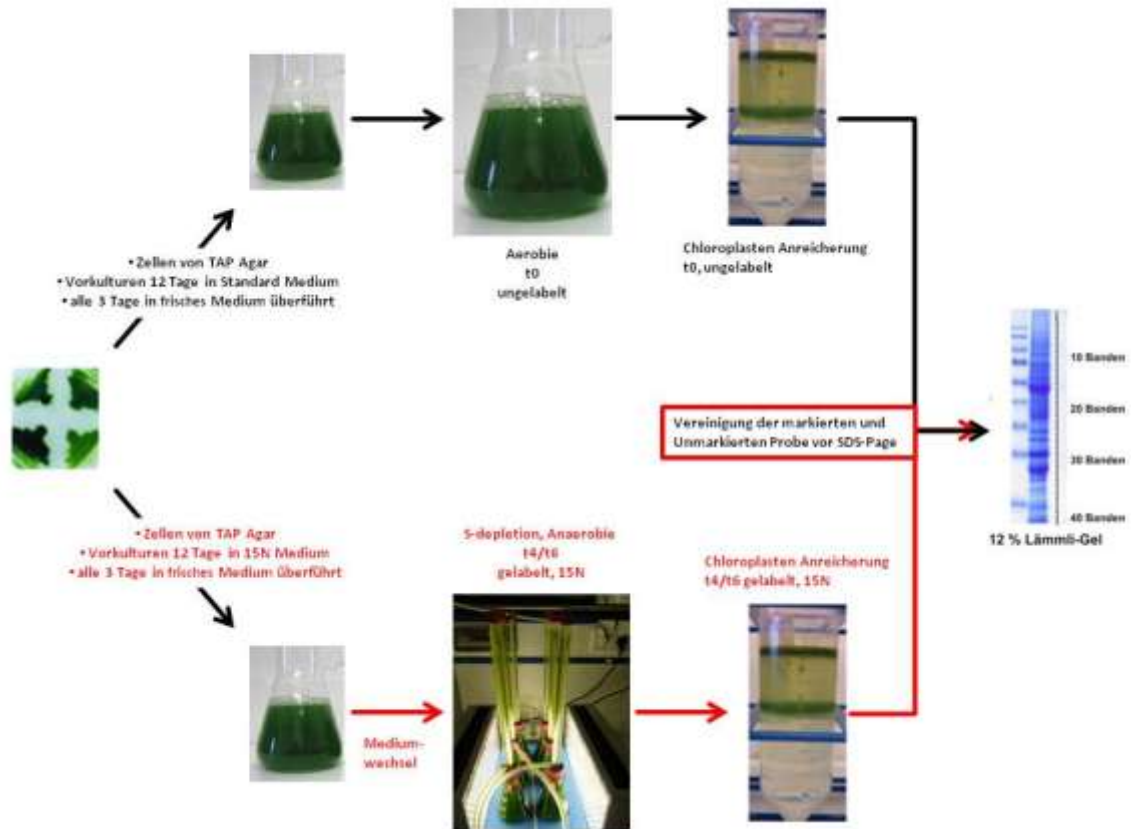


Abbildung 32: Arbeitsabläufe der Proteomanalyse mittels metabolischer Markierung mit stabilen Isotopen. Dargestellt ist das metabolische *Labeling* von Proteinen in TAP-Flüssigkulturen. Das Isotop-angereicherte Medium (^{15}N TAP-Salze) ist rot hervorgehoben, das Normalmedium schwarz. Für die relative quantitative MS-Analyse wurden die Zellen nach der Ernte in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und gemeinsam prozessiert.

Das Ziel aller Markierungsmethoden ist eine möglichst vollständige Isotopenmarkierung (> 95%) der Proben, um somit die Genauigkeit der quantitativen Proteinanalyse zu erhalten. Während die Mutante *Stm6Glc4* nahezu vollständig markiert werden konnte, wurde dieses Ergebnis für den Wildtypen nicht bestätigt, obwohl die beiden Zelllinien identisch behandelt wurden (Abbildung 33).

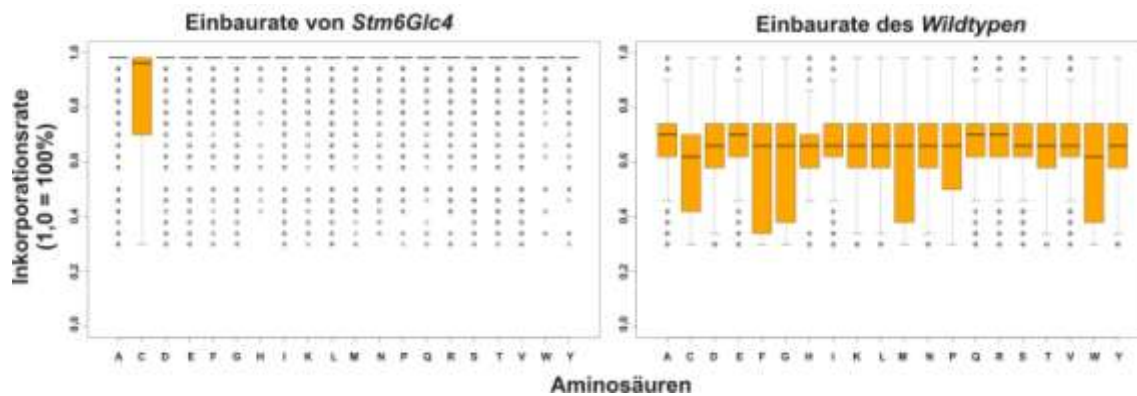


Abbildung 33: ^{15}N Isotopenmarkierung. Inkorporationsrate des ^{15}N innerhalb einzelner Aminosäuren. Die einzelnen Aminosäuren sind mittels Einbuchstabencode dargestellt. Bei der Abbildung handelt es sich um einen Box-Whisker-Plot. Der schwarze Balken in der Mitte markiert den Median-Wert, die farbige Box den Bereich in dem genau die Hälfte aller Werte liegen (sog. Interquartilabstand). Die Whiskers (gestrichelte Linien) markieren die beiden äußersten Datenpunkte (jeweils oben und unten), die aber nicht größer (bzw. kleiner) als der 1.5-fache Interquartilabstand sein dürfen. Gibt es extremere Werte, werden diese als Ausreißer bezeichnet und mit einem Kreis markiert

Die Vorkulturen wurden über 12 Tage in ^{15}N -markiertem TAP-Medium inkubiert, wobei die Zellen in einem Rhythmus von drei Tagen in frisches Medium überführt wurden. Nach 12 Tagen wurden diese Starterkulturen in ein ausreichend großes Kultur-Volumen überführt, um diese Kulturen für Wasserstoffproduktionsversuche zu verwenden. Ein Teil diente zur Zellernte zum Zeitpunkt t_0 , während beim Rest der Kultur mittels Mediumwechsel (TAP minus S plus ^{15}N) die Schwefeldepletion und somit die Wasserstoffproduktion induziert wurde. Im letzten Schritt der Arbeitsabläufe (siehe Abbildung 32), nach der Detektion im LC-MS/MS, wurde die nicht vollständige Markierungseffizienz des Wildtypen festgestellt. Um diesen nur zum Teil markierten Datensatz nutzbar zu machen, wurde ein Algorithmus zur Quantifizierung von LC-MS/MS-Daten partiell markierter Peptide eingesetzt, wie sie u.a. in *pulse chase* Experimenten vorkommen (Albaum et al., 2009, Albaum et al., 2011). Ursprünglich zielt QUPE (Albaum et al., 2009) darauf ab, das Verhältnis (Ratio M) zwischen einem vollständig und einem partiell markierten Peptid zu berechnen (z.B. synthetisierte Peptide vor oder nach dem *pulse chase*-Experiment.). Sofern ein (unmarkiertes) Peptid im LC-MS/MS detektiert wurde, sucht der Algorithmus für jedes zu quantifizierende Peptid automatisch nach der wahren Einbauraten. Die Zuverlässigkeit des verwendeten Algorithmus konnte in Validierungsexperimenten (Proben mit 0%/45%/70%igem ^{15}N -Einbau, jeweils gemischt in Verhältnissen 1:6, 6:1, 1:1 (Albaum et al., 2011)) gezeigt werden.

Der Ratiowert (M) ist das Verhältnis von unmarkiertem zu (teilweise/vollständig) markiertem Peptid. Die jeweilige Menge des "gelabelten" und des "ungelabelten" Peptids wird dabei über die Peak-Intensitäten, im Spektrum ermittelt und als log₂-Wert angegeben., Für die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse gilt, dass negative Ratiowerte mit einer erhöhten Expression des entsprechenden Proteins unter H₂-Produktionsbedingungen gleich zu setzen sind (t4 *Stm6Glc4* bzw. t6 WT), während positive Werte eine höhere Expression des Proteins vor Schwefelentzug unter Standardbedingungen bedeuten.

5.3.6 Überblick

Die im SDS-PAGE fraktionierten Proteine aus sowohl der aeroben (t0) als auch aus der anaeroben Phase (t4/t6) wurden als Gelbanden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mittels LC-MS/MS in der Arbeitsgruppe von Michael Hippler (IBBP, Westfälische Wilhelms Universität Münster) vermessen. Die Peptide und korrespondierende Proteine wurden identifiziert bevor mittels erhaltener *spectral counts* eine Aussage über die Proteinmenge getroffen wurde.

Für die Identifizierung mittels OMSSA waren mindestens zwei spezifische Peptide erforderlich (Terashima et al., 2011). Die Tabelle in der Abbildung 34 zeigt, wie viele Proteine unter den zwei untersuchten Bedingungen (vor und während der Wasserstoffproduktion) im Wildtypen (WT) bzw. in der Mutante (*Stm6Glc4*) identifiziert werden konnten. Verifiziert wurde dieser Datensatz mit einem weiteren biologischem Replikat, bei dem die Proteine des Zeitpunkts während der H₂ Produktion mit ¹⁵N markiert worden sind (siehe Abschnitt 5.3.5).

Durch die Vermessung von 156 Proben konnten 2009 Proteine im *spectral count* Datensatz identifiziert werden (Abbildung 34, A). Es wurde eine erwartete Falsch-Positiv-Rate (FPR) von 1 % kalkuliert, sofern mindestens zwei distinkte Peptide für die Identifizierung mittels OMSSA genutzt wurden.

A <i>spectral count</i> Datensatz				B ¹⁵ N Datensatz	
Identifizierte Proteine				Identifizierter Proteine	
<i>Stm6Glc4</i>		WT		<i>Stm6Glc4</i>	WT
1682		1494		935	506
Gemeinsames Proteom				Gemeinsames Proteom	
1169				442	
Differenzielles Proteom				Differenzielles Proteom	
<i>Stm6Glc4</i>		WT		<i>Stm6Glc4</i> H ₂	WT H ₂
Aerob	H ₂	Aerob	H ₂	62	102
832	120	409	291		

Abbildung 34: Anzahl identifizierter Proteine im *spectral count* Datensatz (A) und im isotoopenmarkierten Ansatz (B). A.) Insgesamt wurden im *spectral count* Datensatz 2009 Proteine identifiziert, 1682 in *Stm6Glc4* und 1494 Proteine im Wildtypen, davon wurden 1169 Proteine in beiden Zelllinien detektiert. In der nachfolgenden Spalte ist dargelegt wie viele Proteine jeweils nur zum Zeitpunkt t0 (aerob) bzw. t4/t6 (anaerob) identifiziert wurden. B.) Insgesamt wurden im ¹⁵N Datensatzes 1001 Proteine identifiziert. In *Stm6Glc4* konnten insgesamt 933 Proteine identifiziert werden und im Wildtypen 506. Das gemeinsame Proteom umfasste 442 Proteine. 256 von den 442 Proteinen wurden reguliert, waren also stärker unter aeroben Bedingungen präsent bzw. 119 waren eher unter wasserstoffproduzierenden Bedingungen vertreten (hier nicht gezeigt). Die restlichen, gemeinsam exprimierten Proteine blieben unverändert von t0 zu t4/t6. In der ersten Spalte ist dargelegt wie viele Proteine pro Zelllinie in diesem Ansatz detektiert werden konnten. Danach folgt eine Gliederung in anaeroben Stoffwechsel speziell für jede Zelllinie. Insgesamt kamen 62 Proteine unter H₂ produzierenden Bedingungen ausschließlich in der *Mutante* und 102 ausschließlich in *cc406* vor. Da die Werte des ¹⁵N Datensatzes dem Verhältnis aus t0 und t4 entsprechen, können hier keine absoluten Aussagen zu den einzelnen Zeitpunkten gemacht werden. t0 und t4 stehen pro Zelllinie separiert in ihrem jeweiligen Verhältnis (t0 unmarkiert/ t4 isotoopenmarkiert).

Insgesamt wurden im *spectral count* Datensatz 2009 Proteine identifiziert, 1682 in *Stm6Glc4* und 1494 Proteine im Wildtypen, davon wurden 1169 Proteine in beiden Zelllinien detektiert. Durch das Zählen der OMSSA Peptid-Spektrum-Treffer wurden die Peptid *spectral counts* bestimmt und basierend auf diesen Informationen können dann die Protein *spectral counts* bestimmt werden, in dem die Peptid *spectral counts* aller einem bestimmten Protein zugehörigen addiert werden. Dabei werden Peptide, die nicht zur eindeutigen Identifizierung eines Proteins verwendet werden können, verworfen.

Für die vorliegende Auswertung des *spectral count* Datensatzes wurde zunächst die Gesamtzahl der identifizierten Proteine berücksichtigt. Es bleibt zu diskutieren, ob eine Mindestanzahl an Peptid *spectral counts* gegeben sein muss, allerdings würden wenig abundante Proteine auf diese Weise nicht berücksichtigt werden (z.B. Hydrogenase HydA1 mit jeweils 1 bzw. 3 *spectral counts*).

Das Säulendiagramm in Abbildung 35 zeigt die Verteilung der absoluten *spectral counts*. Die Mehrheit der Proteine (75 %) wurde mit 1 bis 5 *spectral counts* sowohl im Wildtypen als auch in der Mutante vermessen.

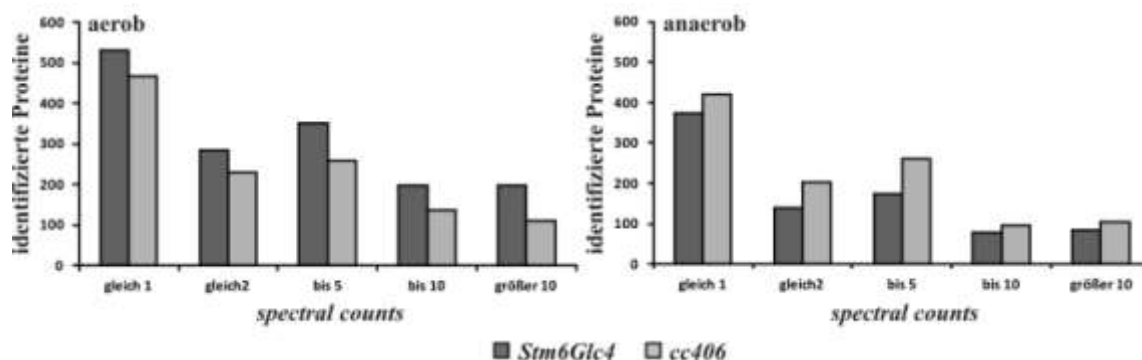


Abbildung 35: Dargestellt ist die Anzahl identifizierter Proteine (y-Achse) in Abhängigkeit der absoluten *spectral count* Zählungen (x-Achse). In dunkelgrau/schwarz ist die Mutante *Stm6Glc4* abgebildet und *cc406* in hellgrau.

Ein spezieller Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung metabolischer Prozesse, welche unter Schwefelmangel aktiviert bzw. reprimiert werden.

Um die Anzahl der Veränderungen im Proteinmuster überschaubar zu halten, wurden die Zellen fraktioniert (Chloroplasten-Anreicherung). Aufgrund der intensiven Interaktion von Chloroplasten und Mitochondrien ist eine Mitanreicherung von Mitochondrien während der Chloroplasten-Isolierung unvermeidbar. Um die in den Proteomdaten enthaltenen mitochondrialen Proteine auch in die Auswertung einfließen zu lassen wurden die *spectral counts* innerhalb jeder Probe (Wildtyp und Mutante) auf ein mitochondrielles Protein (MIT C), welches keiner Regulation unterlag und auch zwischen Wildtyp und Mutante keine Unterschiede aufwies, normalisiert. Auf diese Weise konnte die relative Häufigkeit bestimmter mitochondrialen Proteine (z.B. Atmungsketten Komponenten) innerhalb der mitochondrialen Subproteome vom Wildtyp und Mutante bestimmt werden, ohne das Unterschiede in der Anreicherungseffizienz von Mitochondrien zwischen verschiedenen Chloroplasten-Isolierungen eine Quantifizierung beeinträchtigen. Wie in Abschnitt 5.3.5 beschrieben wurden die erhaltenen Spektren des isotoopenmarkierten Ansatzes ausgewertet und führten zu den in der Abbildung 34b dargestellten Ergebnissen. Insgesamt wurden 1001 Proteine identifiziert. Des Weiteren erfolgte eine Gliederung in aeroben bzw. anaeroben Stoffwechsel. Da die Werte des ^{15}N Datensatzes das Verhältnis aus t0 und t4 wiedergeben, können hier keine Aussagen bezüglich der absoluten Proteinmengen zu den einzelnen Zeitpunkten gemacht werden. In *Stm6Glc4* wurden insgesamt 953 Proteine identifiziert und im Wildtypen 506. Das

gemeinsame Proteom umfasste 442 Proteine, wobei 375 differentiell exprimiert wurden. Innerhalb dieser Gruppe wurden 256 Proteine stärker unter aeroben Bedingungen exprimiert und 119 Proteine wurden eher unter wasserstoffproduzierenden Bedingungen detektiert. Die restlichen, gemeinsam exprimierten Proteine blieben unverändert von t0 zu t4/t6. Insgesamt wurden 62 Proteine unter H₂ produzierenden Bedingungen ausschließlich in der *Mutante* reguliert und 102 distinkt nur in *cc406* (siehe Abbildung 34).

Die Betrachtung der Schnittmenge zwischen dem *spectral count* Datensatz und dem ¹⁵N Datensatz ergab eine Anzahl von 690 Proteinen, die sowohl im ersten als auch im zweiten Datensatz detektiert wurden.

Da der *spectral count* Datensatz die größere Datenmenge umfasste, erfolgte die Auswertung anhand dieser Daten. In den folgenden Abschnitten werden einzelne Stoffwechselwege im Detail betrachtet und analysiert.

Bei genauerer Betrachtung der Veränderungen auf Proteinebene zwischen dem ersten (t0) und dem späteren Zeitpunkt (t4) und einem gleichzeitig erfolgendem Vergleich der beidem Methoden (*spectral count*- und ¹⁵N Datensatz) konnten sehr gute Korrelationen bezüglich der Tendenzen gemessen werden. Der Vergleich der Proteinregulationen von insgesamt 5 Stoffwechselwegen (Calvin-Benson-Zyklus, Glykolyse, Fermentation, Schwefel-Stoffwechsel und Pentose-Phosphat-Zyklus) zeigte eine Übereinstimmung der Tendenzen für 73% der differentiell exprimierten Proteine.

Des Weiteren konnten diese Datensätze noch experimentell mit Westernblot-Untersuchungen bzw. z.T. physiologisch (Abschnitt 5.4.3.3) mittels eines Vergleichs der Atmungsraten verifiziert werden.

5.4 Stoffwechsel Wege

5.4.1 Schwefel –Akquisition

Chlamydomonas reinhardtii reagiert auf Schwefelmangel mit einer Anzahl funktionsgerichteter und abgestimmter Prozessabläufe auf molekularer und zellulärer Ebene. So wird die Abundanz einer Vielzahl von Transkripten und Proteinen reguliert, welche in die Sulfat-Aufnahme und Assimilation involviert sind.

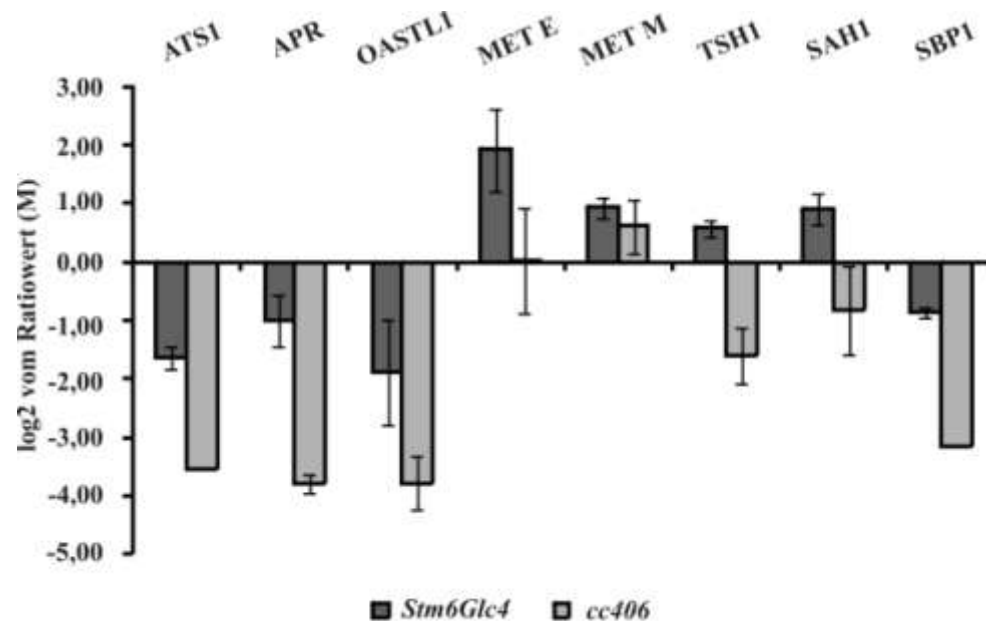


Abbildung 36: Dargestellt sind die detektierten, an der Schwefelassimilation beteiligten Enzyme. Da ein Teil der Enzyme in dem *spectral counts*-Datensatz mit nur wenigen Peptidzählungen oder gar nicht detektiert wurde, sind hier die relativen Ergebnisse der ^{15}N Messung dargestellt. Dabei drücken negative Werte eine höhere Peptidmenge unter H_2 produzierenden Bedingungen und positive Werte eine höhere Proteinmenge zum Zeitpunkt t0 aus. (ATP-Sulfurylase (ATSI); Adenosinphosphosulfat-Reduktase (APR); Cysteinsynthetase (OASTL1); Methionin-Synthetasen (MET E); Methionin-Synthetasen (MET M); (TSH1); S-Adenosyl-Homocysteinhydrolase (SAH1); *Seleno binding protein* (SBP1))

Nach der Spaltung von Sulfoestern durch die Arylsulfatase ARS1/2 kann Sulfat durch Sulfat Transporter aufgenommen werden. In diesem Ansatz konnte sowohl die Transkription als auch die Translation dieser Gene nachgewiesen werden. Dazu zählen SULTR2 ($\text{H}^+/\text{SO}_4^{2-}$ Transporter) und zwei putative $\text{Na}^+/\text{SO}_4^{2-}$ Transporter (SLT1, SLT2). Letzterer konnte nur in einem Datensatz nachgewiesen werden (*Stm6Glc4*, ^{15}N , t4). Das Sulfoester-spaltende Enzym (ARS1) wurde sowohl im Wildtypen als auch in der Mutante ausschließlich unter H_2 Produktionsbedingungen detektiert (Wildtyp und *Stm6Glc4*; *spectral counts*; t4/t6). Der Sulfat Transport in den Chloroplasten erfolgt normalerweise

durch die Transporter SULP1, SABC, SULP2, diese konnten in dieser Studie zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden.

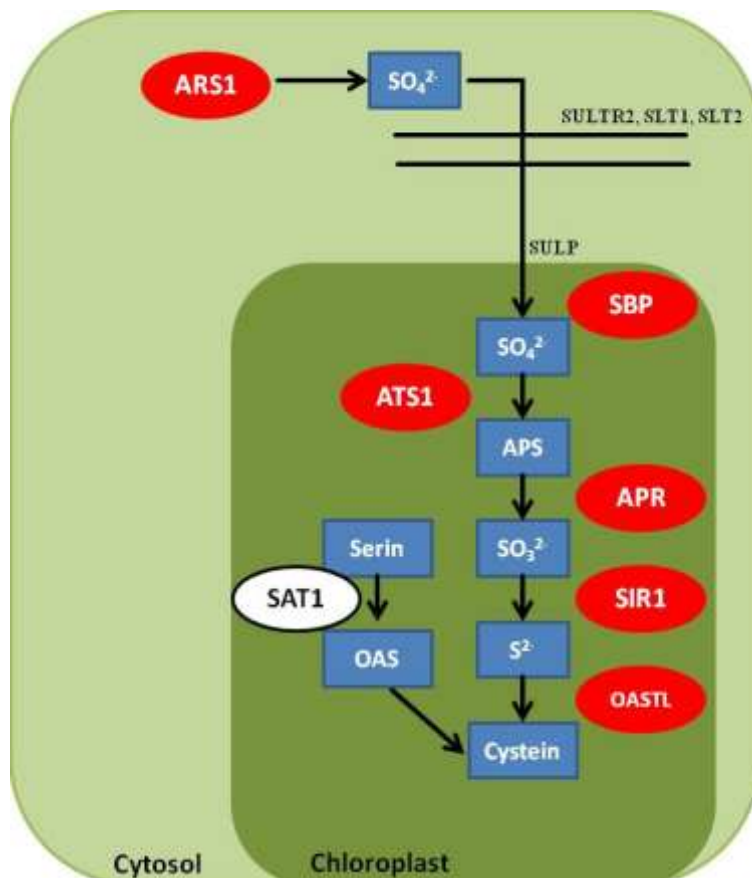


Abbildung 37: In der Abbildung sind Ausschnitte der Sulfat Assimilation mit den zugehörigen Zwischenprodukten (blau) und beteiligten Enzymen dargestellt (rot bzw. weiß). Die rot markierten Enzyme waren in beiden Zelllinien (unterschiedlich stark) in t4/t6 hochreguliert. SAT1 konnte in dieser Studie nicht identifiziert werden. (ATP-Sulfurylase (ATS1); Adenosinphosphosulfat-Reduktase (APR); Cysteinsynthetase (OASTL1); S-Adenosyl-Homocysteinhydrolase (SAH1); *Selenobinding Protein* (SBP1); Sulfit-Reduktase (SIR1))

Das *Selenobinding Protein* (SBP1) wurde sowohl im WT als auch in der Mutante in t4 mit höherer Peptidzahl gezählt. Dies ist ebenfalls bei anderen Proteinen, die dem Schwefelstoffwechsel zugeordnet werden, der Fall. Die ATP-Sulfurylase (ATS1), die Adenosinphosphosulfat-Reduktase (APR), als auch die Methionin-Synthetasen (MET C, METE, METM) und die S-Adenosyl-Homocysteinhydrolase (SAH1), die Ferredoxin-Sulfit-Reduktase (SIR2), sowie die Cysteinsynthetase (OASTL5) konnten nur in ^{15}N nachgewiesen werden und zeigten zum Zeitpunkt t4/t6 im Vergleich zu t0 eine höhere Abundanz auf. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Umwandlung des Sulfates bis hin zum Einbau in Cystein verstärkt unter H_2 produzierenden Bedingungen gewährleistet wird. Die Synthese vom Cystein hin zu Cystathion erfolgt im Chloroplasten. Die Enzyme,

die erforderlich sind für die Glutathion-Synthese und -Degradation, sind außerhalb des Chloroplasten lokalisiert und sind entweder sehr schwach verändert beim Vergleich der Zeitpunkte oder nehmen sowohl im WT als auch in der Mutante leicht ab. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegenden Daten sehr gut mit den parallel durchgeführten Transkriptom- und Metabolomuntersuchungen übereinstimmen (Nguyen et al., 2011, Doebbe et al., 2010). In der Transkriptom-Studie konnte der gleiche Trend wie in den Proteom-Untersuchungen nachgewiesen werden. Zum einen lagen die am Schwefelstoffwechsel beteiligten Enzyme, ebenso wie deren Transkripte, zum späteren Zeitpunkt induziert vor, zu dem war bei der Mehrheit der Transkripte als auch bei deren zugehörigen Proteinmengen die Induktion im Wildtyp höher als in *Stm6Glc4* (Nguyen et al., 2011). Dieses Ergebnis passte sehr gut zu den parallel durchgeführten Metabolom-Untersuchungen. Mit dieser Methode konnten höhere Mengen an Cystein im Wildtyp nachgewiesen werden, während bei den anderen Aminosäuren der gegenteilige Trend gezeigt wurde (Doebbe et al., 2010).

5.4.2 Energie- und Kohlenhydrat Metabolismus

5.4.2.1 Photosynthese (Lichtreaktion)

Der Photosyntheseapparat ist ein hochorganisiertes, Mehrkomponenten-System bestehend aus Membran-assoziierten, -integrierten und löslichen Protein-Untereinheiten.

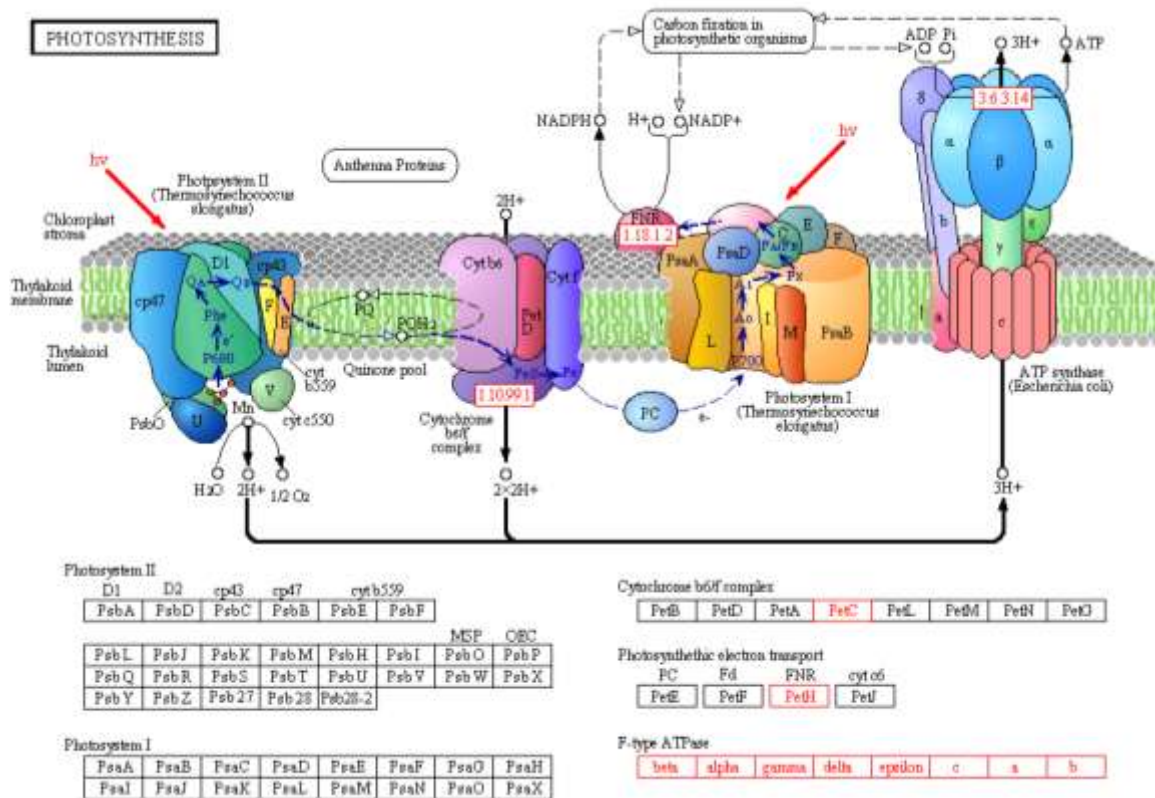


Abbildung 38: Darstellung der photosynthetischen Elektronentransportkette, sowie deren Zusammensetzung aus einzelnen Untereinheiten, <http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00195.html> und Nield et al., 2000)

Einige Komponenten des Multienzymkomplexes (Abbildung 38) unterlagen einer deutlichen Regulation unter Schwefelmangel-bzw wasserstoffproduzierenden Bedingungen.

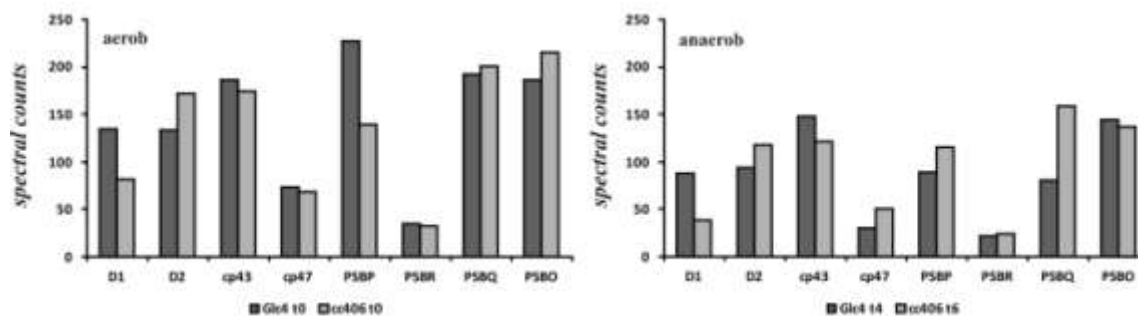


Abbildung 39: Untereinheiten des Photosystems II unter aeroben Bedingungen (t0, linke Seite) und wasserstoffproduzierenden Bedingungen (t4/t6, rechte Seite). Die Mengeneinheit der einzelnen Proteine wurde in *spectral counts* angegeben und bezog sich auf die Anzahl aller detektierten, zu dem speziellen Protein, gehörenden Peptide.

Für eine kontinuierliche Wasserstoffproduktion ist es essentiell den Elektronenfluss über die photosynthetischen Komponenten zur Hydrogenase aufrecht zu erhalten (Zhang et al., 2002). Andererseits entsteht bei der Oxidation des Wassers Sauerstoff, der als Inhibitor der Wasserstoff produzierenden Enzyme (HYD A1/A2) bekannt ist. Als Kernelement für ein funktionelles PS II gilt das D1 Protein. Dieses nahm in den erhaltenen Datensätzen in der Mutante vom Zeitpunkt t0 zu t4 um 35% ab. Hingegen konnte anhand der *spectral counts* im Wildtyp unter aeroben Bedingungen eine Reduzierung um 55% festgestellt werden, die Zeitpunkte t0 wurden jeweils auf 100% gesetzt. Es ist allgemein anerkannt, dass eine vollständige Inaktivierung von PS II zu einer verminderten Wasserstoffproduktion führt (ebenso wie DCMU die H₂ Produktion inhibiert) (Kruse et al., 2005a), da der lineare Elektronenfluss zur Hydrogenase stark zur Gesamtproduktion beiträgt. Diese höhere Restaktivität von PS II unter wasserstoffproduzierenden Bedingungen in *Stm6Glc4* könnte eine mögliche Erklärung für die höhere Produktionsrate sein, da eine gewisse Restaktivität von PS II vorliegen muss, um viel H₂ produzieren zu können (Zhang et al., 2002).

An der lumenalen Seite des PS II katalysiert ein *cluster* bestehend aus drei anorganischen Ionen, Mangan, Calcium und Chlorid die Oxidation des Wassers. Dieser Mn₄-Ca-Clx-Cluster des PS II ist umgeben von mehreren lumenalen, den cluster stabilisierenden, Proteinen. Das PsbP Protein, sowie PsbO und PsbQ sind Bestandteil dieses QEC Proteinkomplexes (*oxygen evolving complex*, OEC). Die Menge an PsbP wurde in *Stm6Glc4* von t0 zu t4 um mehr als die Hälfte reduziert und liegt zum Zeitpunkt t4 deutlich unter dem Detektionsniveau des Wildtypen, hingegen konnte im Wildtypen nur eine schwache Verringerung der Proteinmenge festgestellt werden (um~25% von t0 zu t4). Ein ähnliches Detektionsschema ergab sich für PsbQ. Im Gegensatz dazu konnte keine Veränderung der Anzahl der detektierten Peptide von PsbR bzw. PsbO festgestellt

werden und blieb sowohl in beiden Zelllinien als auch im zeitlichen Verlauf des Experimentes gleich.

Aus den Daten bezüglich der Komponenten des PS II kann geschlussfolgert werden, dass in beiden Zelllinien eine Restaktivität von PS II vorliegt. Sowohl D1 als auch andere wichtige Proteine des PS II und auch alle Komponenten des OEC konnten im Wildtypen unter wasserstoffproduzierenden Bedingungen in höherer Menge detektiert werden und können prinzipiell einen höheren Sauerstoffdruck auf die Hydrogenasen ausüben, welcher zu einer reduzierten Wasserstoffproduktion im WT führen könnte. Die mitochondrielle Respiration muss daher für eine schnelle Entsorgung des produzierten Sauerstoffes funktionell sein (siehe Abschnitt 5.4.3).

Von den 15 Untereinheiten des Photosystem I (PS I) konnten insgesamt 9 Proteine nachgewiesen werden, darunter fielen zwei der vier chloroplastidär kodierten Proteine (PsaA, PsaB). Die Untereinheiten PsaC (~9kDa) und PsaJ (~4kDa) fehlten in den Datensätzen. Des Weiteren fehlten die nukleär kodierten Proteine PsaI, M und X. Die Unterschiede im Detektionsniveau der verbleibenden Proteine (PsaB, D, E, F, G, H, K, L, M, N) waren im Vergleich Wildtyp zu Mutante sehr gering und die Anzahl der Peptide reduzierte sich in beiden Zelllinien geringfügig von t0 zu t4. Eine Ausnahme bildete PsaA (PS I P700 Chlorophyll a Apoprotein A1), das quantitative Expressionslevel (^{15}N Markierung) veränderte sich in der Mutante nicht $[-0,4 (\pm 0,12)]$, während es im Wildtypen zum Zeitpunkt t4 zunahm $[-1,29 (\pm 0,2)]$. Dabei ist zu beachten, dass durch negative Werte Proteinzunahmen zum Zeitpunkt t4 ausgedrückt werden. Insgesamt lassen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und Mutante bezüglich der Regulation von PS I-Komponenten feststellen.

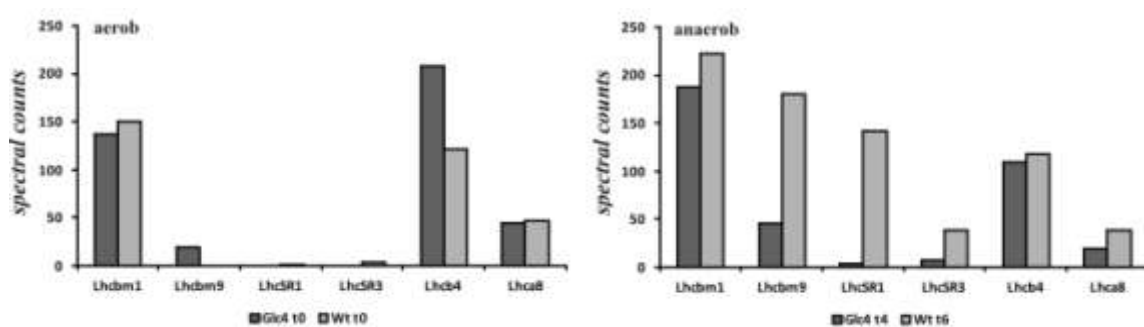


Abbildung 40: Lichtsammelantenne des PS II (Lhcbm1, Lhcbm9, LhcSR1, LhcSR3 und Lhcb4) und des PS I (Lhca8). In der linken Abbildung wurde die Zusammensetzung unter aeroben Bedingungen und rechts unter anaeroben Bedingungen (Schwefelmangel) dargestellt.

Die Transkriptgehalte der Lichtsammelantennen-Proteine werden unter Schwefelmangel sehr stark reduziert (Nguyen et al., 2011). Innerhalb der Lichtsammelproteine muss zwischen solchen unterschieden werden, die eine primäre Funktion in der effektive Lichtsammlung haben, und solchen, die eine eher protektive Aufgabe im Rahmen des nicht-photochemischen Quenching (NPQ) erfüllen (Elrad et al., 2004; Bonente et al., 2011; Ferrante et al., 2012). Die starke Herunter-Regulation unter S-Mangel betrifft dabei insbesondere Hauptlichtsammel-Proteine (Lhcbm-Isoformen). Interessant war daher der Befund, dass Lhcbm1 unter wasserstoffproduzierenden Bedingungen hochreguliert wurde. Die Isoform Lhcbm9 stellt eine Besonderheit innerhalb der Proteinfamilie dar, da die Expression dieses Proteins ausschließlich unter Nährstoffmangel (-S und -N) induziert wird (Nguyen et al., 2011). Die Proteom-Daten bestätigen die Ergebnisse der Transkriptom-Studien (Nguyen) in dieser Hinsicht und zeigen darüber hinaus, dass es Unterschiede zwischen WT und Mutante bezüglich der Induktionsstärke unter Schwefelmangel gibt. Lhcbm9 wird unter S-Mangel im WT deutlich stärker induziert. Der *knock-down* von *lhcbm9* (S. Grewe, unveröffentlicht) führt zu einer verminderten H₂-Produktion, so dass es momentan schwierig ist eine direkte Korrelation zwischen der verminderten Menge an Lhcbm9 in *Stm6Glc4* und der erhöhten H₂-Produktion zu sehen. Die Proteine LhcSR1/3 unterscheiden sich von Lhcbm-Proteinen durch ihre Pigment-Zusammensetzung (Bonente et al., 2011) und für LhcSR3 wurde eine Funktion innerhalb des Energie-abhängigen Quenching (qE) gezeigt (Bonente et al., 2011). Transkriptom-Untersuchungen (Nguyen) zeigten einen deutlichen Unterschied in der Induktion des *lhcsr3* Gens zwischen WT und Mutante unter S-Mangel. Diese können durch die Proteomdaten bestätigt werden. Zumindest für LhcSR3 ist jedoch unter Benutzung der knock-out-Mutante *npq4* gezeigt worden (Nguyen et al., 2011), dass die An- oder Abwesenheit dieses Proteins einen geringen Einfluss auf die H₂-Produktionskapazität besitzt. Entsprechende Daten liegen für LhcSR1 nicht vor, doch die starke Ähnlichkeit (83% Identität) lässt vermuten, dass die Inaktivierung des entsprechenden Gens ähnlich geringe Effekte auf die H₂-Produktion hat. Interessant wäre die Untersuchung einer Doppel-*knock-out*-Mutante.

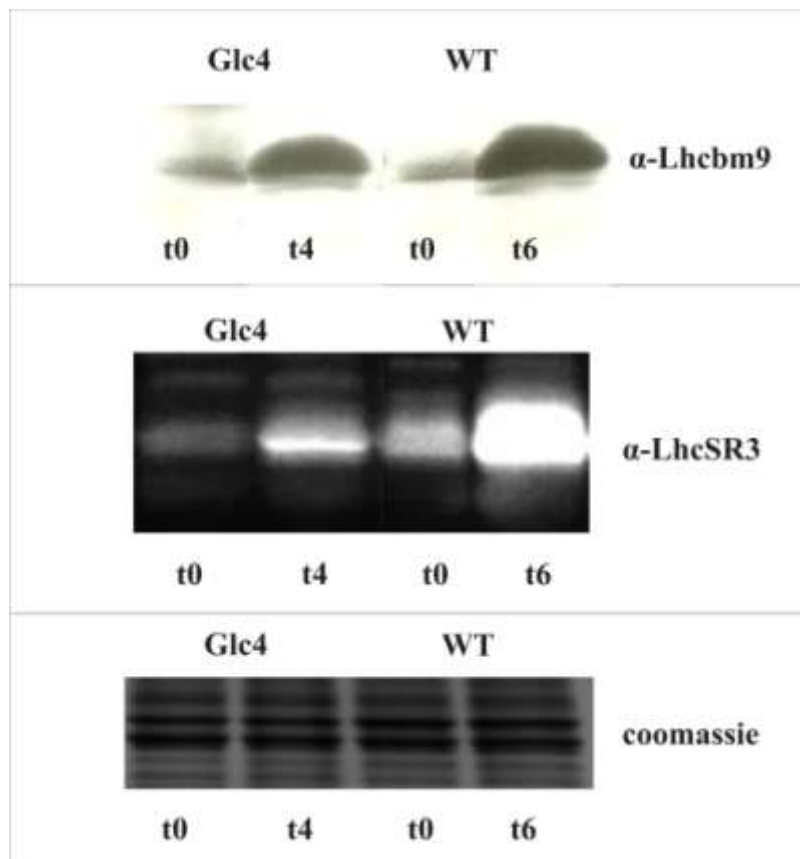


Abbildung 41: Westernblot zur Verifizierung der erhaltenen *spectral count* Daten von Lhcbm9 und LhcSR3. Die Präparate wurden jeweils aus zwei unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen, dabei entsprach t0 einer Entnahme vor dem Experiment, während t4/t6 der Situation in der Hoch-Wasserstoffproduktionsphase entsprach. Es wurden jeweils 5 µg Protein in einem 12%igen Lämmli-Gel aufgetrennt. Die Expressionsunterschiede zwischen Wildtyp und Mutante *Stm6Glc4* (hier Glc4) waren signifikant. Experimentell konnten damit die Proteom Daten verifiziert und zudem auch die Transkriptanalysen bestätigt werden (Nguyen et al., 2011).

Experimentell konnten die Daten bezüglich Lhcbm9 und LhcSR3 mit Westernblots (anti-Lhcbm 9, anti-LhcSR3) verifiziert werden (Abbildung 41).

Des Weiteren wurden die zusätzlichen Komponenten, die für den photosynthetischen Elektronentransport essentiell sind, sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante nachgewiesen. Dazu gehörten die Komponenten des Cytochrom-b₆f-Komplexes als auch die des Photosystem I und des ATP Synthase Komplexes.

Im Durchschnitt, mit Ausnahme einiger Proteine, nahm die Anzahl der Peptide der einzelnen Untereinheiten des Cytochrom b₆f und der ATP Synthase bei einem Vergleich von Wildtyp und Mutante entweder leicht ab oder blieben auf ähnlichem Niveau. Das Level der detektierten Peptide zum Zeitpunkt t0 im Vergleich der beiden Zelllinien variierte kaum, daher konnte eine identische Funktionalität unter mixotrophen

Kultivierungsbedingungen in beiden Kulturen geschlussfolgert werden. Ebenso bestätigten die Datensätze die Existenz des Komplexes unter Schwefeldepletion (t4, t6), allerdings bei einigen Komponenten mit veränderter Stöchiometrie zwischen WT und Mutante. Damit einhergehend könnten sich physiologische Unterschiede unter Schwefeldepletion bzw. in der Hochphase der Wasserstoffproduktion zwischen Wildtyp und Mutante abzeichnen.

Ausgehend vom Cytb₆f-Komplex hin zum PS I werden Elektronen über den mobilen Carrier Plastocyanin transferiert. In *Stm6Glc4* existierten keine Unterschiede in der Häufigkeit der detektierten Plastocyanin-Peptide zwischen den beiden Zuständen (t0, t4: ca. 40 *spectral counts*), während es im Wildtyp zu einer deutlichen Verringerung kam (t0: 93 *spectral counts*; t6: 58 *spectral counts*).

Unter aeroben *state I*-Bedingungen folgen die meisten Elektronen dem nichtzyklischen Elektronentransport und werden auf die Ferredoxin-NADP-Reduktase übertragen, wodurch das Endprodukt der Lichtreaktion (NADPH) entsteht. Die Menge an Ferredoxin-NADP-Reduktase unterscheidet sich zwischen den beiden Zeitpunkten in *Stm6Glc4* nicht [0,0 ($\pm 0,13$)] und auch im Wildtypen unterliegt dieses Proteins scheinbar keiner Regulation [0,8 ($\pm 2,45$)]. Dabei bedeuten negative Ratiowerte eine Zunahme des entsprechenden Proteins in t4 (minus Schwefel), während positive Werte ein Überschuss im unmarkierten Kontrollzustand (t0) signalisieren.

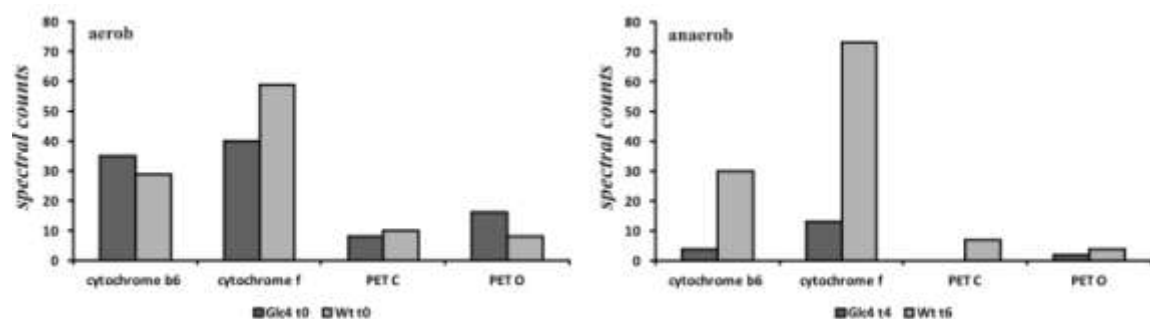


Abbildung 42: Komponenten des photosynthetischen Elektronentransportes. In der linken Abbildung sind die Verhältnisse unter mixotrophen Bedingungen dargestellt. Für einen direkten Vergleich ist auf der rechten Abbildung die Stöchiometrie der einzelnen Komponenten unter H₂ produzierenden Bedingungen in Abhängigkeit der *spectral counts* dargestellt.

Einige Elektronen werden von PS I in den Plastoquinonpool zurück geleitet (zyklischer Elektronentransport), und nicht durch die Ferredoxin-NADP-Reduktase verstoffwechselt. Dieser Mechanismus ermöglicht eine Feineinstellung des ATP/NADPH -Verhältnisses. Dabei werden zudem zusätzlich Protonen über die Thylakoidmembran transportiert. Dieser Protonengradient wird zur verstärkten Produktion von ATP genutzt, ohne dass

gleichzeitig NAD(P)H produziert wird. In *Chlamydomonas reinhardtii* ist ein Übergang von *state I* zu *state II* eine Grundvoraussetzung für aktiven zyklischen Elektronentransport (Cardol et al., 2009). Bei diesem Übergang wandern mobile Lichtsammelkomplexe von PS II zu PS I, so dass die Lichtsammelkapazität an PS I erhöht wird. Bezüglich der Nutzung des zyklischen Elektronentransports deuteten die Daten einen gravierenden Unterschied zwischen dem Wildtypen und der Mutante an. Während die *state transition* mutante *Stm6Glc4* im *state I* blockiert ist und keinen bzw. nur stark eingeschränkt den zyklischen Elektronentransport durchführen kann (Schönfeld et al., 2004; Kruse et al. 2005a), ist der Wildtyp befähigt den zyklischen Elektronentransports zu nutzen und exprimiert auch die erforderlichen Proteine auf einem stärkerem Niveau. So wurden zum Zeitpunkt t0 kaum (Cytochrom b6, PET C, PET O) bzw. leichte Unterschiede (Cytochrom f) in der Menge der detektierten Peptide zwischen dem Wildtypen und der Mutante festgestellt. Unter wasserstoffproduzierenden Bedingungen erhöhte sich die Anzahl der detektierten Peptide für diese Proteine im Wildtyp signifikant im Vergleich zu der Mutante. Besonders Peptide der Untereinheiten Cytochrom b6 und f wurden in hoher Zahl gefunden, allerdings werden diese Komponenten sowohl im nichtzyklischen als auch im zyklischen Elektronentransport zur Weiterleitung der Elektronen genutzt.

Des Weiteren wird den Proteinen PGRL1 und PGR5 eine wichtige Funktion bei der Etablierung des zyklischen Elektronentransports zugeschrieben. Es wird postuliert, dass PGRL1 mit PGR5 Komplexe bildet und dieser Komplex mit PS I assoziiert ist, um so den zyklischen Elektronentransport zu unterstützen (Peltier et al., 2010; Iwai et al., 2010; DalCorso et al., 2008). PGRL1 konnte in keinem der erhaltenen Datensätze nachgewiesen werden, während PGR5 zahlreicher im Wildtyp (t4) vorlag [-2,9 ($\pm 0,03$)] im Vergleich zur Mutante [-1,19] (negative Ratiowerte: Zunahme des entsprechenden Proteins in t4 (minus Schwefel); positive Werte: Überschuss im unmarkierten Kontrollzustand (t0)). Die höhere Menge an PGR5 im Wildtyp korreliert gut mit einer höheren Aktivität zyklischer Photophosphorylierung, welche eine Konkurrenzreaktion zur Wasserstoffproduktion über den linearen Weg darstellt. Dieser Befund trägt dazu bei die niedrigere Wasserstoffproduktion im Wildtyp zu erklären.

Der Abbau des erzeugten Protonengradienten ist mit der enzymatischen Synthese von ATP, katalysiert durch die CF₀CF₁-ATP Synthase, gekoppelt. Die CF₀ Untereinheiten sind hydrophobe Transmembranproteine, die einen Protonenkanal bilden.

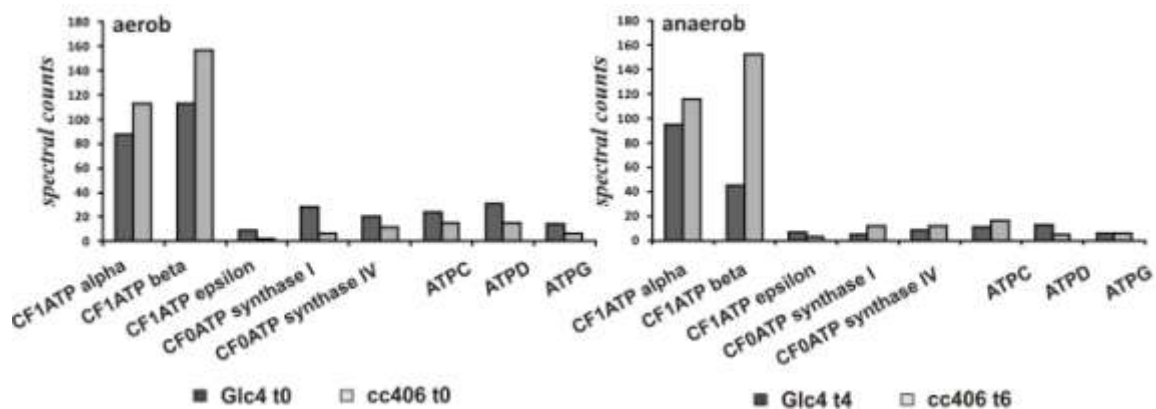


Abbildung 43: Untereinheiten des Multienzymkomplex ATP-Synthase der inneren Thylakoidmembran. In der linken Abbildung ist die Zusammensetzung vor dem Experiment (t0) dargestellt und rechts nach Inkubation in Schwefelmangel-Medium zur H₂ Hochproduktionsphase in Abhängigkeit der *spectral counts*.

Die peripheren Untereinheiten werden CF₁ genannt und sind aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt, wobei die beta Untereinheit die eigentlichen ATPase ist. Mit Ausnahme der Untereinheit CF₁ beta zeigten sich keine deutlichen Unterschiede zwischen WT und Mutante. Interessant ist jedoch der geringe Effekt der S-Depletion auf die Expression der ATP-Synthase-Untereinheiten, der vermutlich mit einer unveränderten Bedeutung dieses Komplexes erklärt werden kann. Unter anaeroben Bedingungen, wenn die mitochondrielle ATP-Produktion beeinträchtigt ist, muss vermehrt ATP über zyklische Photophosphorylierung im Chloroplasten hergestellt werden.

5.4.2.2 Calvin-Benson-Zyklus

Letztlich liefert die photosynthetische Elektronentransportkette die Reduktion- und Energieäquivalente, die im Calvin-Benson-Zyklus benötigt werden, um CO₂ in Form von Kohlenhydraten zu fixieren. Zudem werden Vorläufer-Metabolite für die Glykolyse, die Gluconeogenese und den Pentosephosphat-Stoffwechsel geliefert. Der Calvin-Benson-Zyklus besteht aus 11 verschiedenen Enzymen, welche 13 Reaktionen katalysieren. In dieser Studie konnten alle 11 individuellen Calvin-Benson-Zyklus Enzyme nachgewiesen werden (sowohl in t0 als auch in t4). Dabei ist festzuhalten, dass die vermessenen Peptidzahlen der Enzyme sehr stark zwischen den verschiedenen Zeitpunkten und zwischen beiden Zelllinien variierten.

Unter Schwefelmangel nimmt die Menge an Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCo), welche den ersten Schritt des Calvin-Benson-Zyklus katalysiert, noch rapider ab als die Menge an D1 (Zhang et al. 2002), so dass eine Inaktivierung des Calvin-Benson-Zyklus als einer der ersten und direktesten Effekte von Schwefel-Mangel angesehen werden kann (Gyhsels & Franck, 2010).

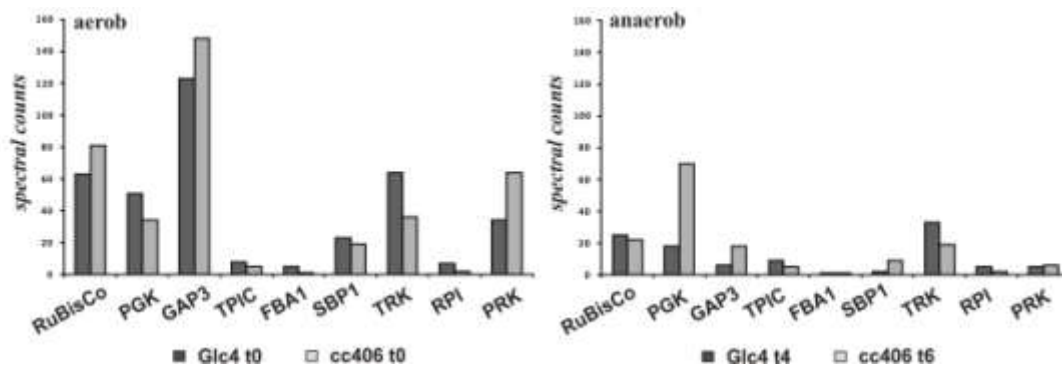


Abbildung 44: Dargestellt ist die relative Quantifizierung anhand des Vergleichs aller erfolgreich identifizierten Peptide der Proteine (*spectral counts*) des Calvin-Benson-Zyklus zum Zeitpunkt t0 (linke Abbildung) und t4/t6 (rechte Abbildung). Verglichen wurden relative Proteinmengen im Wildtyp *CC406* und der Mutante *Stm6Glc4* vor (t0) und während der Wasserstoffproduktion (t4/t6). (Ribulose-1,5-Biphosphat- Carboxylase/Oxygenase (RuBisCo); Phosphoglycerat-Kinase (PGK); Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAP3); Triosephosphat Isomerase (TPIC); Phosphofruktokinase (FBA1); Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase (SBP1); Ribose-5-phosphat-Isomerase (RPI), Transketolase (TRK); Phosphoribulokinase (PRK))

Die Proteomdaten zeigen die deutliche Herunter-Regulation des Calvin-Benson-Zyklus, wobei es abgesehen von der Phosphoglycerat-Kinase (PGK) wenig spezifische Unterschiede zwischen WT und Mutante gibt.

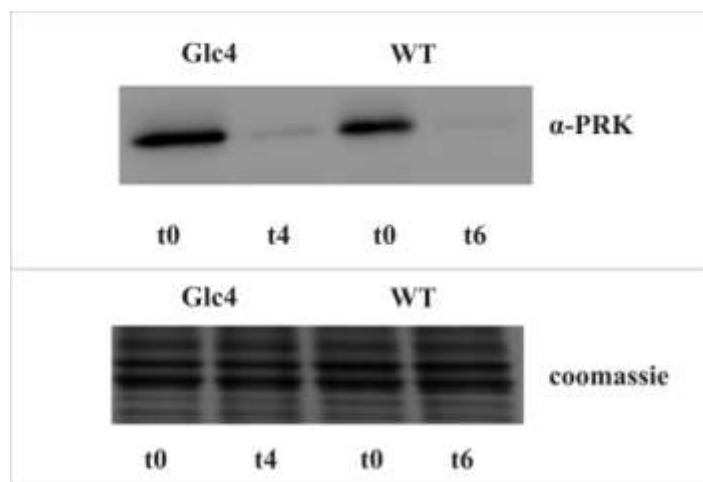


Abbildung 45: Westernblot zur Verifizierung der erhaltenen *spectral count* Daten einer Komponente des Calvin Zykluses, der Phosphoribulokinase (PRK). Die Präparate wurden jeweils an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen, dabei entsprach t0 einer Entnahme vor dem Experiment, während t4/t6 die Situation in der Hoch-Wasserstoffproduktionsphase widerspiegelt. Es wurden jeweils 5 µg Protein in einem 12%igen Lämmli-Gel aufgetrennt.

5.4.2.3 Glykolyse

Als kataboler Stoffwechsel kommt die Glykolyse sowohl im Cytoplasma als auch in den Chloroplasten vor, unabhängig davon, ob die Zelle aeroben oder anaeroben Bedingungen ausgesetzt ist. Aus den vorliegenden Daten konnten nur die Enzyme des Chloroplasten sicher analysiert werden, da als Ausgangsproben angereicherte Chloroplasten verwendet wurden.

In der Glykolyse wird in Gegenwart von Sauerstoff Glukose-1-phosphat zu Pyruvat umgesetzt. Die Produkte, Pyruvat und NADH, werden über Transportsysteme in die Mitochondrien transferiert und in der mitochondriellen Atmungskette umgesetzt. Unter anaeroben Bedingungen werden aus Pyruvat und NADH Gärungsprodukte synthetisiert (s. Abschnitt 5.4.4.1).

Die Enzyme der 10 Einzelschritte umfassende Glykolyse ausgehend von der Hexokinase bis zur Pyruvatkinase konnten unter aeroben Bedingungen (t0) und auch unter wasserstoffproduzierenden Bedingungen (t4, t6), sowohl mit den *spectral counts*-Datensätzen als auch mit den ^{15}N gelabelten Proben, nachgewiesen werden.

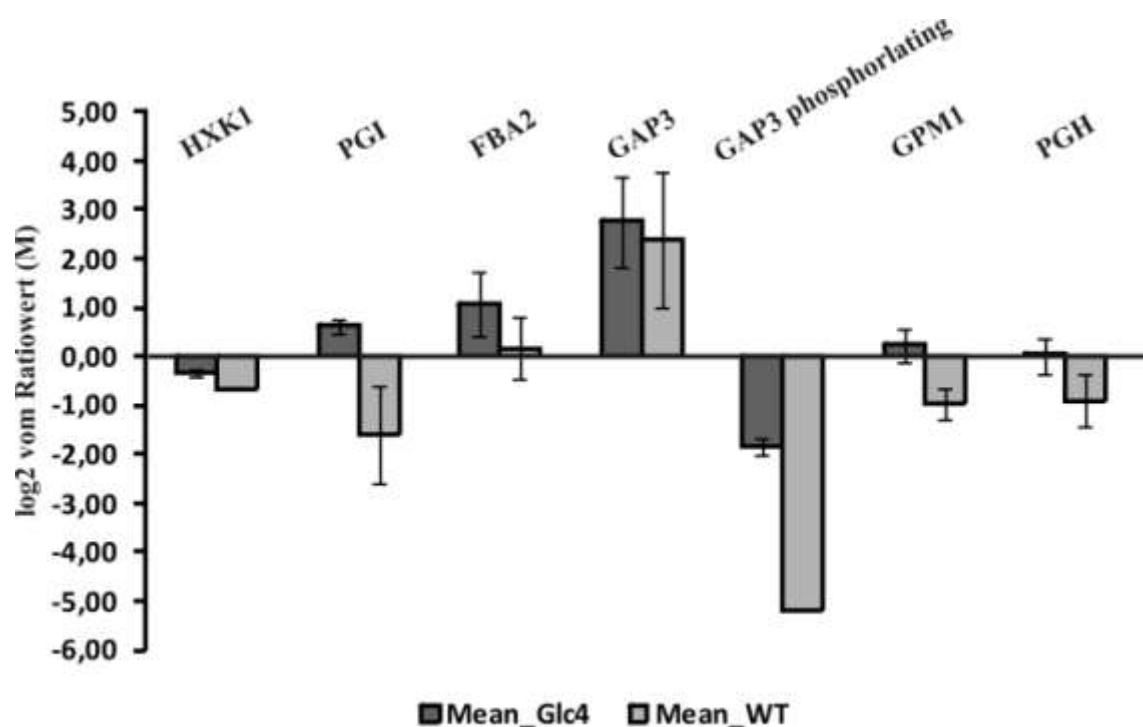


Abbildung 46: Dargestellt sind die detektierten, an der Glykolyse beteiligten Enzyme. Da ein Teil der Enzyme in dem *spectral counts*-Datensatz mit nur wenigen Peptidzählungen oder gar nicht detektiert wurde, sind hier die relativen Ergebnisse der ^{15}N Messung dargestellt. Dabei drücken negative Werte eine höher Peptidmenge unter H_2 produzierenden Bedingungen und positive Werte eine höhere Proteinmenge zum Zeitpunkt t0 aus. (Hexokinase (HXK1), Glukose-Phosphat-Isomerase (PGI), Phosphofruktokinase

(FBA2), Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAP3), Phosphoglycerat-Mutase (GPM1) und 2-Phosphoglycerat Dehydratase (Enolase, PGH))

Während die Enzyme in den *spectral counts*-Daten mit sehr wenigen Peptiden detektiert wurden (Ausnahme Phosphoglyceratkinase, PGK), konnten mittels des ¹⁵N Datensatzes differenzierte Aussagen zwischen den einzelnen Enzymen, Zeitpunkten und Zelllinien getroffen werden. Deshalb sind in der Abbildung 46 für die relevanten Enzyme der Glykolyse die ¹⁵N Datensätze abgebildet worden.

Die nachgewiesenen Glykolyse Enzyme blieben bei der Mutante in beiden Zeitpunkten relativ gleichverteilt, mit Ausnahme einer höheren Peptidzahl im Zeitpunkt t0 für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, GAP3. Die Ausnahme im Zeitpunkt t4 bildete die GAP3 phosphorylierte-Isoform, diese Isoform wurde mit höheren *spectral counts* detektiert (t4). Alle anderen Proteine lagen bis auf die Fruktose-Biphosphat-Aldolase (FBA2; 1+-0,62) unter der Grenze (0,5), ab der Unterschiede als signifikant erachtet wurden.

Die Proben des Wildtypen zeigten eine andere Mengen-Zusammensetzung der Enzyme der Glykolyse auf. Zwar waren auch hier einige Proteine bei einem Vergleich der Zeitpunkte sowohl in t0 als auch in t6 mengenmäßig gleichermaßen detektiert worden, und wiesen deshalb keine signifikanten Unterschiede zwischen t0 und t6 auf bzw. sind leicht erhöht unter anaeroben Bedingungen. Es konnten aber zum Zeitpunkt t6 einige Enzyme mit deutlich höherer Menge bestimmt werden. Dies betraf die GAP3-Isoform, die Phosphoglucoisomerase (PGI), die Phosphoglyceratmutase (GMP2), die Enolase (PGH) und die Phosphoglyceratkinase (PGK), welche unter H₂ produzierenden Bedingungen mit erhöhter Zahl nachgewiesen wurden.

Die Metabolomdaten aus der Studie von Doebbe et al. (2010) zeigten, dass der Wildtyp zum Zeitpunkt t6 stärker Intermediate der Glykolyse akkumuliert (Glucose, Glucose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat), während der Substratfluss in der Mutante *Stm6Glc4* aufgrund weniger ausgeprägter Akkumulation als stärker angenommen wurde. Aus den Proteomdaten könnte ein anderer Zusammenhang postuliert werden. Hier sind die meisten Enzyme der Glykolyse beim Wildtypen unter H₂ produzierenden Bedingungen in größerer Zahl nachgewiesen worden. Gerade die Hexokinase und die Phosphoglucoisomerase, die für die Umsetzung der Glucose hin zum Fructose-6-Phosphat entscheidend sind, wurden häufiger detektiert und könnten zu einem erhöhten Substratumsatz im Wildtyp zu diesem Zeitpunkt beitragen. Deutlich erhöht sind zudem PGI, GAP und PGK, wodurch einerseits eine Verbindung zum Aminosäurestoffwechsel (durch Fructose-6-Phosphat) ermöglicht wird und die durch FBA2 gebildeten

Triosephosphate das Glycin für die Biosynthese der Neutralfette und Phosphoglycerin liefern. Umgekehrt könnte auch Glycerin aus der Lipolyse in die Glykolyse oder Glukoneogenese einfließen, aber dies ist unter anaeroben Bedingungen sehr unwahrscheinlich. Allerdings können vollständige Aussage zu diesem Stoffwechselweg (und damit die Suche und Validierung von Schnittmengen zwischen Metabolom und Proteom Daten) nur durch zusätzliche Auswertung der Glykolyse-Proteine des Cytosols getroffen werden, da dieser Stoffwechselweg in mehreren Kompartimenten gleichzeitig auftritt.

Von besonderer Bedeutung erscheinen die energiekonservierenden Schritte der Glykolyse mittels der GAP bzw. der PGK. Während das in beiden Zelllinien in t4/t6 in höhere Menge nachgewiesene GAP zur Bildung eines energiereichen Substrates mit gemischter Säureanhydrid Bindung führt, deren Phosphat Anteil auf hohem chemischen Potential steht, exprimiert der Wildtyp auch verstärkt das PGK, welches an der an der Substratkettenphosphorylierung und somit an der eigentlichen Energiekonservierung beteiligt ist. Diese Reaktionsschritte würden einen erhöhten Verbrauch an ATP zum Zeitpunkt der Wasserstoffproduktion im WT bedeuten.

Glukose ist neben den Lipiden der wichtigste Energielieferant sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Kultivierungsbedingungen der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Während der Abbau von Stärke und dessen Umwandlung über den Kohlenhydrat Metabolismus höchstwahrscheinlich unter beiden Kultivierungsbedingungen erfolgte, stagniert der Abbau von Fetten unter anaeroben Konditionen. Metabolomdaten zeigten, dass Fettsäuren im Verlauf des Experimentes akkumulierten und aufgrund fehlenden Sauerstoffs und damit nicht funktionierender β -Oxidation nicht als Energielieferant für die H_2 Produktion dienen konnten (Doebbe et al., 2010).

Grundsätzlich kann aufgrund der Proteomdaten die Funktionalität der Glykolyse zu jedem Zeitpunkt des Experimentes nur in Kombination mit den Metabolom-Daten postuliert werden. Hier kann lediglich die Information über die Proteinkonzentration bzw. über deren Vorhandensein bestätigt werden. Allerdings gehen von der Glykolyse weitere wichtige Stoffwechselwege ab, diese konnten nicht im Detail analysiert werden, da Reaktionen, Enzyme und Substrate der Glykolyse oft zu mehreren Pfaden gehören ist die Einteilung in Stoffwechselwege nicht immer eindeutig möglich. Zudem kann eine vollständige Aussage nur durch zusätzliche Auswertung der Glykolyse-Proteine des Cytosols getroffen werden, da dieser Stoffwechselweg in mehreren Kompartimenten

gleichzeitig auftritt. Dies muss in Zukunft zusätzlich bearbeitet und berücksichtigt werden.

5.4.2.4 Stärkestoffwechsel

Enzyme die an der Stärke Synthese bzw. Degradation beteiligt sind, konnten in allen Datensätzen zu allen Zeitpunkten in beiden Zelllinien nachgewiesen werden, wobei erhebliche Veränderungen im Proteom zwischen den beiden Zeitpunkten in Zelllinien festgestellt werden.

Die Biosynthese von Stärke in *Chlamydomonas* startet mit der Synthese von Glucose-1-Phosphat. Diese Reaktion wird durch ADP-Glucose-Pyrophosphorylasen katalysiert. Daran beteiligt sind STA1 und STA6. Diese Proteine werden sowohl unter mixotrophen Bedingungen als auch unter Wasserstoffproduzierenden Bedingungen in einem stöchiometrisch gleichen Verhältnis zwischen Wildtyp und Mutante detektiert, nahmen zum Zeitpunkt t4/t6 hin aber ab. Signifikante Unterschiede ließen sich nicht feststellen.

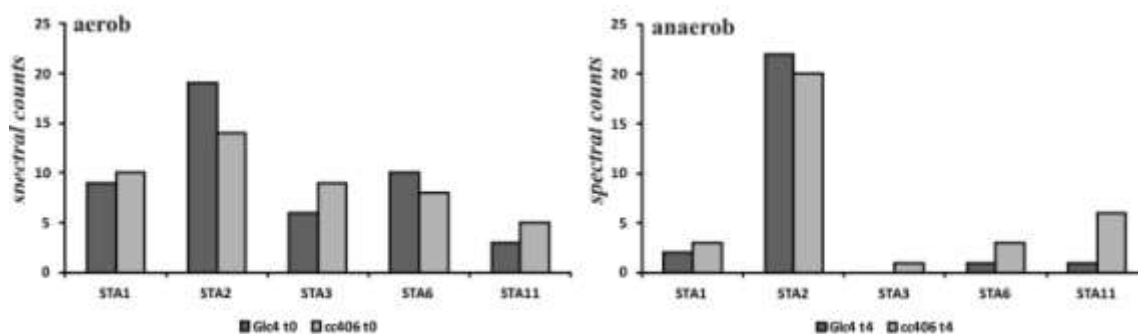


Abbildung 47: Dargestellt sind die detektierten, am Stärke-Stoffwechsel beteiligten Enzyme aus dem *spectral count* Datensatz. In dunkelgrau sind die Werte der Mutante *Stm6Glc4* dargestellt und in hellgrau jeweils die des Wildtypen *cc406* (ADP-Glukose Pyrophosphorylase (STA1); Stärke Synthase I (STA2); Glucotransferase (STA3); ADP-Glukose Pyrophosphorylase (STA6); Alpha-Glucotransferase (STA11))

Ein wichtiger Verzweigungspunkt für den Kohlenhydrat-Stärke-Flux ist die 3-PGA-(3-Phosphoglycerinaldehyd)-Produktion innerhalb des Calvin-Benson-Zyklus. Über das Enzym Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase sind Stärkesynthese und Photosynthese sehr eng miteinander verschaltet. Nach 3 Durchläufen im Calvin-Benson-Zyklus kann ein Molekül Glycerinaldehyd-3-Phosphat für weitere Stoffwechselwege abgezweigt werden. Diese Reaktion ist in beiden Zelllinien unter Wasserstoffproduzierenden Bedingungen sehr stark verändert. Die Abundanz der einzelnen Peptide, gemessen durch die *spectral counts*, ist deutlich reduziert beim Vergleich von t0 zu t4/t6, was auch durch die Quantifizierung über ^{15}N bestätigt werden

konnte. Dies impliziert eine deutliche Reduzierung der Stärkesynthese. Auch die Proteine für die Elongation des Amylopectin und der Amylose konnten detektiert werden. Die Stärke Synthase (STA3) produziert wachsende alpha 1,4 Verknüpfungen, indem Glukose Reste aus der ADP-Glucose an ein nicht reduzierendes Ende einer wachsenden 1,4 verknüpften Kette transferiert werden. STA3 ist in t0 in beiden Zelllinien detektiert worden und in t4 nur beim WT. Eine „Nichtdetektion“ schließt das Vorkommen des Proteins nicht vollständig aus, so dass unter H₂-Produktionsbedingungen noch Stärke Polymere aufgebaut werden könnten. Unterschiede konnten für STA2 festgestellt werden, Peptide dieses Proteins zeigten eine höhere Abundanz in t4 und dabei mehr in der Mutante als im WT. SBE-Enzyme (*starch branching enzymes*) katalysieren dann die Formation von alpha-1,6-Verbindungen, indem innerhalb der gebildeten Polymere die alpha 1,4-Bindung gespalten werden und dann das Fragment auf das nichtreduzierende Ende an alpha-1,6-Position einer Nachbar-Akzeptor-Kette transferiert wird. Die Enzyme dieser Reaktion waren in beiden Zuständen zu finden, wobei sie in der Mutante im zweiten Zeitpunkt deutlich weniger gezählt wurden als im Wildtyp.

Aber schon unter nicht produzierenden Bedingungen konnten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Mutante festgestellt werden. Beim Wildtyp wurde GAP3 in t0 öfters detektiert (16,9% Unterschied).

Zudem wurde in beiden Zelllinien eine GAP3-phosphorylating-Form nachgewiesen, die unter H₂ produzierenden Bedingung wahrscheinlich verstärkt exprimiert wurde und deutlich häufiger im WT im Vergleich zur Mutante detektiert wurde.

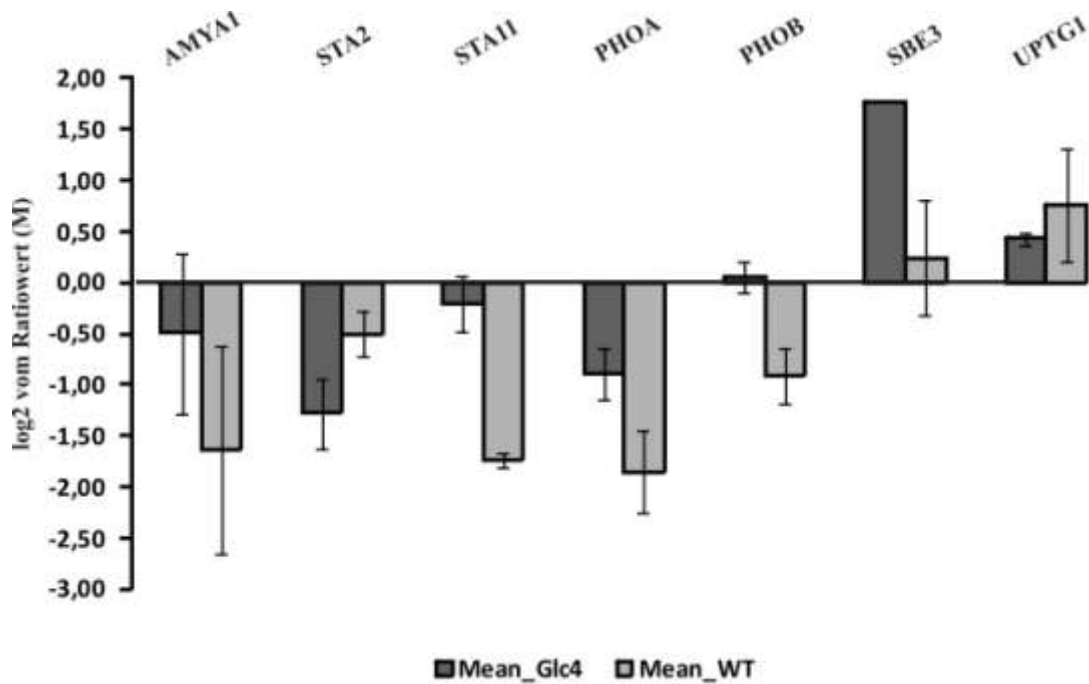


Abbildung 48: Dargestellt sind die detektierten, am Stärkestoffwechsel beteiligten Enzyme. Da ein Teil der Enzyme in dem *spectral counts*-Datensatz mit nur wenigen Peptidzählungen oder gar nicht detektiert wurde, sind hier die relativen Ergebnisse der ^{15}N Messung dargestellt. Dabei drücken negative Werte eine höher Peptidmenge unter H_2 produzierenden Bedingungen und positive Werte eine höhere Proteinmenge zum Zeitpunkt t0 aus. (AMYA: alpha-Amylase; STA2: Stärke-Synthase; STA11: Alpha-Glucotransferase; PHOA/PHOB: Stärke-Phosphorylasen, SBE: *starch branching enzyme*; UTPD: UDP-Glukose:Protein Transglucosylase)

Insgesamt lässt sich aus den Daten schließen, dass die an der Stärkesynthese beteiligten Enzyme nachweisbar waren und sowohl in der Mutante als auch im Wildtyp in beiden Zustände detektiert worden sind. In der Mutante wurden diese Enzyme jedoch im letzten Zeitpunkt t4 in größerer Zahl gefunden. Eine höhere Aktivität passt zudem sehr gut zu den höheren Stärkekonzentrationen, die in der Mutante durch einen Stärke-Assay nachgewiesen werden konnten (Doebbe et al., 2010).

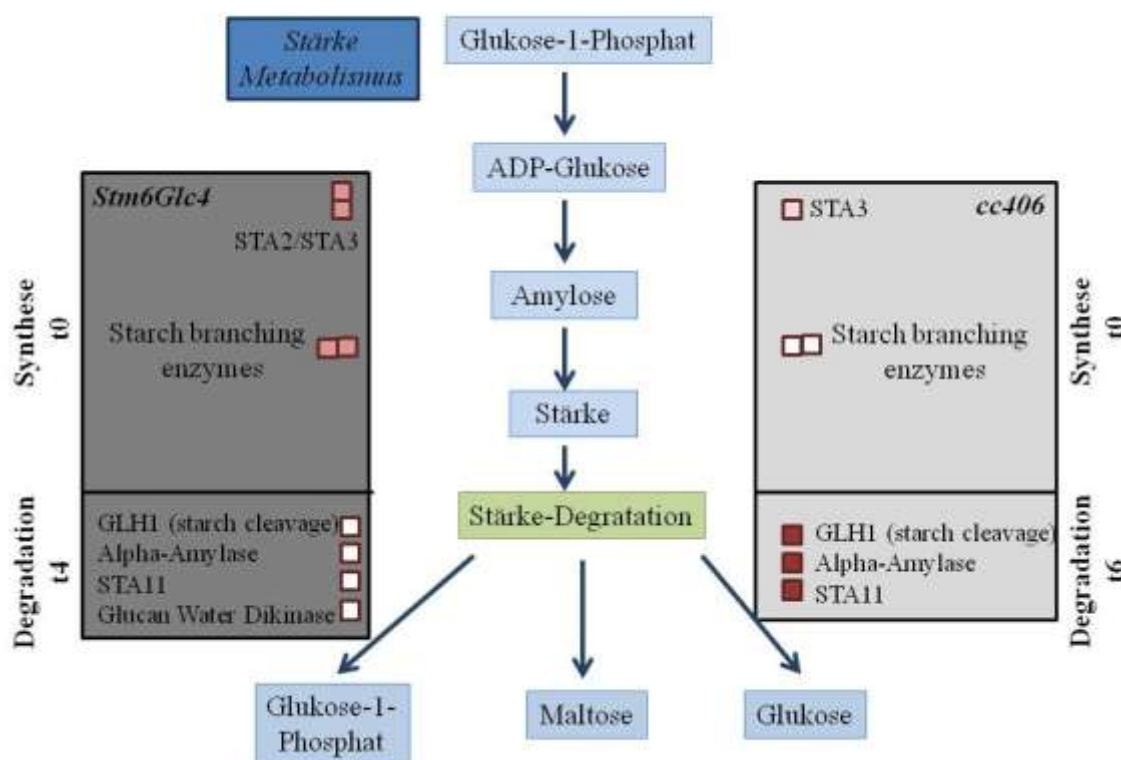


Abbildung 49: Die Abbildung veranschaulicht schematisch den Stärke Metabolismus. Dunkelgrau hinterlegt sind exemplarisch die Ergebnisse der Mutante zusammengefasst, hellgrau die des Wildtypen. Die Stärke der Expression ist anhand der rot markierten Rechtecke wiedergegeben. Je intensiver die Farbe, desto stärker die Expression.

Hingegen sind die an der Degradation (GLH1, alpha-amylase, Glucan-Water-Dikinase) beteiligten Proteine deutlich häufiger im Wildtyp unter H_2 produzierenden Bedingungen vorzufinden. Diese wurden im Wildtyp wahrscheinlich stärker exprimiert und auch hier konnte der erhöhte Abbau der Stärke durch den Assay bestätigt werden (70% der Stärke wurden im Wildtyp metabolisiert, im Vergleich zu 42 % in der Mutante, Dissertation Doebbe, 2010).

5.4.2.5 Pentosephosphat Zyklus

Schwefeldepletion und Anaerobie lösten in beiden Zelllinien nach mehrtägiger Inkubation eine starke Abnahme bei allen Calvin-Benson-Zyklus Enzymen (mit Ausnahme der Phosphoglyceratkinase (PGK) im Wildtypen aus.

Ein deutlich unterschiedliches Proteinmuster unter wasserstoffproduzierenden Bedingungen weist ein in den Chloroplasten an den Calvin-Benson-Zyklus gekoppelter

weiterer Weg, der oxidative Pentosephosphatweg (OPP), auf. Der Pentosephosphatweg lässt sich in einen oxidativen, irreversiblen und einen nicht-oxidativen (reduktiven, RPP), reversiblen Abschnitt aufteilen. RPP und OPP werden durch ein Ferredoxin/Thioredoxin System reguliert (Buchanan & Balmer 2005, Wilhelm, 2006). Beispielsweise wird im Zuge der CO₂ Assimilation nur der reduktive Weg eingeschlagen. Dieser war bei beiden Zelllinien unter H₂-Produktionsbedingungen wahrscheinlich deutlich eingeschränkt, da die beteiligten Enzyme (D-Ribulose-5-Phosphat-3-Epimerase (RPE), Ribose-5-phosphat-Isomerase (RPI), Transketolase (TRK), Transaldolase (TAL)) ähnlich wie die Enzyme des Calvin-Benson-Zyklus unter H₂ produzierenden Bedingungen im Zeitpunkt t4/t6 (in deutlich geringerer Anzahl) seltener im Vergleich zu t0 nachgewiesen wurden. Daraus lässt sich ableiten, dass der RPP bei beiden Zelllinien stark eingeschränkt ist und somit die Synthese von Pentosephosphate (Ribulose-5-Phosphat), welches für Biosynthesen von Aminosäuren, Nukleotiden und Fettsäuren verwendet werden kann, gehemmt ist (Abbildung 50).

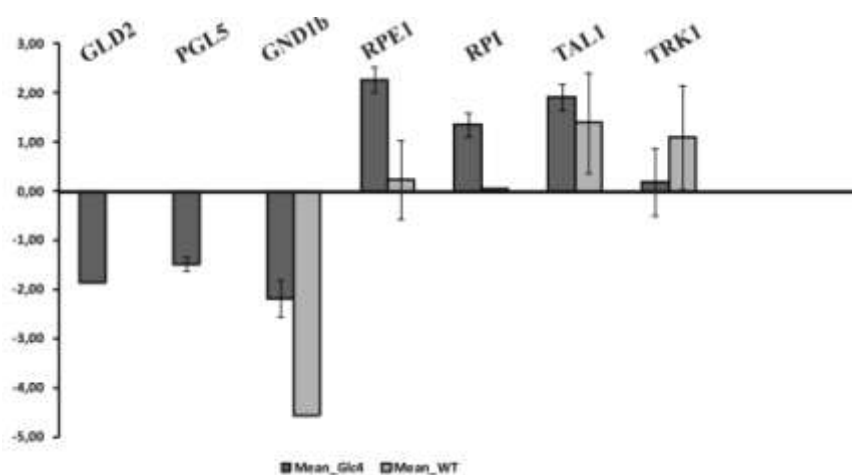


Abbildung 50: Die Proteine des Pentosephosphat Zyklus waren in beiden Zelllinien vorhanden (t0, t4). Da ein Teil der Enzyme in dem *spectral counts*-Datensatz mit nur wenigen Peptidzählungen oder gar nicht detektiert wurde, sind hier die relativen Ergebnisse der ¹⁵N Messung dargestellt. Dabei drücken negative Werte eine höher Peptidmenge unter H₂ produzierenden Bedingungen und positive Werte eine höhere Proteinmenge zum Zeitpunkt t0 aus. (Phosphogluconolat-Dehydrogenase (GND1); Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (GLD2); 6-Phosphogluconolactonase (PGL5); D-Ribulose-5-Phosphat-3-Epimerase (RPE), Ribose-5-phosphat-Isomerase (RPI), Transketolase (TRK), Transaldolase (TAL))

Demgegenüber lagen die Enzyme der oxidativen Reaktionen des Pentosephosphat-Weges unter H₂ produzierenden Bedingungen verstärkt vor. Neben der Photosynthese und dem Citratzyklus ist dieser Teil des Pentosephosphat-Weges die einzige Möglichkeit NADPH bzw. NADH zu generieren, welches neben Biosynthesen (Calvin Zyklus, Synthese von Fettsäuren und Steroiden) für mehrere reduzierende Prozesse benötigt wird. Zum Beispiel

wird H_2O_2 aus verschiedenen oxidativen Prozessen durch Glutathion Peroxidasen (selenhaltige Enzyme) zur Vermeidung organischer Hydroperoxide eliminiert, wobei Glutathion Disulfid (GSSG) entsteht. Die Reduktion von GSSG mittels NADPH und Glutathion Reduktase regeneriert dann GSH. Ständiger Nachschub von NADPH ist daher für Integrität der Zelle unter Stressbedingungen äußerst wichtig (Taiz & Zeiger, 2000).

Insbesondere für *Stm6Glc4* konnten alle drei Enzyme nachgewiesen werden, während für den Wildtyp nur das GND1 gefunden und verstärkt in t6 detektiert wurde und zudem deutlich stärker im Wildtyp als in der Mutante induziert war. Phosphogluconat-Dehydrogenase (GND1) katalysiert die oxidative Decarboxylierung der 6-Phosphogluconsäure zu Ribulose-5-Phosphat (Ru5P) und CO_2 , wobei NADPH entsteht. Dieses Ergebnis impliziert, dass im Wildtyp ein stärkerer Bedarf an Reduktionsäquivalenten besteht. In der Mutante konnten im Gegensatz dazu die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (GLD2) und 6-Phosphogluconolactonase (PGL5) vermehrt unter H_2 produzierenden Bedingungen nachgewiesen werden. Die GLD stellt als Schlüsselenzym die Hauptregulationsstelle des oxidativen Teils dieses Stoffwechselweges dar. Da die Nettoproduktion von NADPH und Pentosephosphaten an den aktuellen Bedarf über regulatorische Elemente angepasst wird, deuten diese Ergebnisse die reduzierte Bereitstellung des NADPH durch die photosynthetische Elektronentransportkette an und dienen damit als Beispiel für die Anpassungsfähigkeit beider Zelllinien unter Mangelbedingungen.

Insgesamt beinhalten die Daten des Wildtypen und der Mutante, dass der Pentosephosphat-Weg aktiviert, während die Funktionalität des Calvin-Benson-Zyklus durch Schwefeldepletion und Anaerobie stark beeinträchtigt war. Obwohl die Detektion der Ferredoxin-NADP-Reduktase sowohl im Wildtypen [0,83 ($\pm 0,24$)] als auch in der Mutante [0,001 ($\pm 0,13$)] vom ersten zum späteren Zeitpunkt (t0, t4/t6) gleich blieb, besteht verstärkter Bedarf an NADPH. Demzufolge kann unter den Konditionen einer eingeschränkten, funktionellen Photosyntheseleistung wie sie unter H_2 produzierenden Bedingungen auftritt, die erforderliche Menge an NADPH nur durch erhöhte OPP Aktivität gedeckt werden. Insgesamt lassen sich jedoch zwischen Wildtyp und Mutante keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Regulation des Pentosephosphat-Weges feststellen.

5.4.3 Mitochondrielle Stoffwechselwege

Der mitochondrielle Stoffwechsel, insbesondere die Respiration, spielt eine wichtige Rolle in der Optimierung der photosynthetischen Effizienz in Pflanzen (Schönfeld et al.,

2004), sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Analyse des Proteoms konnten interessante, klare Tendenzen und damit mögliche Hypothesen aufgestellt werden, welche zum einen das schnellere Erreichen der Anaerobie, aber auch den Schutz vor Überreduktion der mitochondrialen Atmungskette bewirken.

5.4.3.1 Citratzyklus

Unter mixotrophen Bedingungen wurden in der Mutante und im Wildtyp nahezu alle Proteine des Citratzyklus (Ausnahme: Succinyl-CoA) nachgewiesen. Einschränkend ist zu sagen, dass die meisten Proteine dieses Zyklus nur mit sehr wenigen *spectral counts* vermessen worden sind. Da für die Untersuchungen Chloroplastenanreicherungen eingesetzt wurden, können signifikante Aussagen nur für chloroplästidare Proteine getroffen werden. Das niedrige Detektionsniveau könnte daher als Folge einer Abreicherung der Mitochondrienfraktion angesehen werden, aber mittels Westernblot wurde für jede Präparation sowohl der beiden Zelllinien als auch für die unterschiedlichen Zeitpunkte cytosolische und mitochondriale Kontaminationsnachweise gemacht. Diese verifizierten, dass die mitochondriale Kontamination nahezu gleich blieb (Wt, Mutante, t0, t4/6). Es konnten in allen Beispielen die Proteomedaten verifiziert werden und somit sind vorsichtige Aussagen über Reaktionen innerhalb der Mitochondrien möglich.

Bei den meisten Proteinen gab es zwischen der Mutante und dem Wildtyp hinsichtlich des Peptid-Detektionsniveau unter aeroben Bedingungen keine Unterschiede (α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (OGD2), Succinat-Dehydrogenase (SDH1), Fumarase (FUM1)). Detektierbare Unterschiede in t0 konnten hinsichtlich der CIS, ACH1 und ICL1 festgestellt werden. Diese Proteine sind in der Mutante im Vergleich zum Wildtypen öfters detektiert worden.

Im Gegensatz dazu wurde festgestellt, dass unter H_2 produzierenden Bedingungen ebenfalls alle Proteine des Citratzyklus vorhanden waren, allerdings mit stark verringerter Peptidzahl bei beiden Zelllinien. Daraus lässt sich schließen, dass die Proteine des TCC herunter reguliert und die Aktivität des Zyklus beeinträchtigt war (t4) (Abbildung 51). Dieses passt gut zu der Hypothese, dass die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu AcetylCoA und der Citratzyklus nur unter aeroben Bedingungen stattfinden können bzw. unter mikroaeroben Bedingungen sehr stark eingeschränkt arbeiteten. Nur unter aeroben Bedingungen können die Elektronen der gebildeten Reduktionsäquivalente (NADH, FADH₂) in der Atmungskette auf O_2 übertragen und die Reduktionsäquivalente regeneriert werden, was für den Ablauf des Zyklus erforderlich ist.

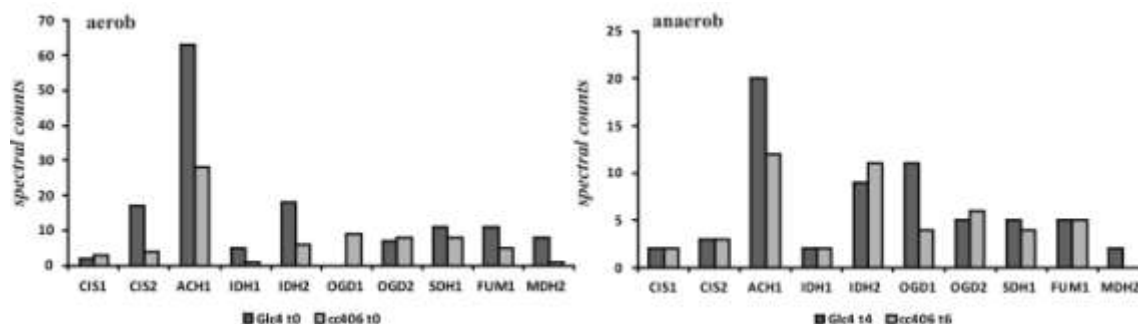


Abbildung 51: Dargestellt sind die Enzyme des Citratzyklus unter aeroben (t0, linke Seite) und anaeroben Bedingungen (t4/t6, rechte Seite) in Form von *Spectral counts*. *Spectral count* Daten ermöglichten eine Aussage über die Abundanz aller zu einem Protein detektierten Peptide. (Citratsynthase (CIS1,2); Aconitase (ACH1); Isocitrat-Dehydrogenase (IDH1); Oxoglutarat-Dehydrogenase (OGD1,2); Succinat-Dehydrogenase (SDH1); Fumerase (FUM); Malat-Dehydrogenase (MDH2))

Der Abbau von Makromolekülen (Proteine, Polysaccharide, Fette) konvergiert über gemeinsame Abbaustufen, diese führen zu wenigen Endprodukten (Pyruvat, Acetyl-CoA) und münden im zentralen Reaktionszyklus, dem Citratzyklus. Damit nimmt Pyruvat im Stoffwechsel eine sehr wichtige Rolle ein. Die essentiellen Metabolite des Citratzyklus werden durch anaplerotische Reaktionen nachgeliefert; die wichtigste Reaktion ist die Synthese von Oxalacetat aus Pyruvat und CO₂ durch die Pyruvat-Carboxylase (PYC).

In beiden Zelllinien reduzierte sich die Anzahl der detektierten Peptide der PYC von t0 zu t4/t6. Interessanterweise konnte dieses Enzym unter aeroben Bedingungen in der Mutante deutlich öfter detektiert werden und damit konnte die Mutante potentiell mehr Oxalacetat in den Zyklus einfließen lassen. Unter H₂ produzierenden Bedingungen gab es bei der PDC keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zelllinien (Abbildung 52) bei deutlich niedrigeren *spectral counts*.

Dasselbe Muster ergab sich für die Acetyl-CoA-Synthase (ACS3), die wesentlich häufiger in der Mutante vermessen wurde als im Wildtyp (t0). Auch hier lieferten die *spectral counts* ein deutlich reduziertes Ergebnis zum späteren Zeitpunkt unter H₂ produzierenden Bedingungen. Die Substrate der Acetyl-CoA-Synthase sind Acetat und Coenzyme A. Sobald Acetyl-CoA gebildet wird, kann es im TCA oder in der Fettsäuresynthese genutzt werden. Eine andere gebräuchlichere Möglichkeit Acetyl CoA zu synthetisieren ist über Pyruvat mittels (Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, PDC).

Die erhaltenen Daten des TCC werden durch die Ergebnisse des Glykoxylat Zyklus erweitert. Sowohl die Isocitratlyase, als auch die Aconitase und die Citratsynthase liegen in der Mutante in höheren Mengen vor (Abbildung 52, linke Abbildung). Diese Enzyme

gehören zum Glykoxylat-Zyklus, einer Abkürzung des Citratzyklus, die Pflanzen ermöglicht auf Acetat als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen.

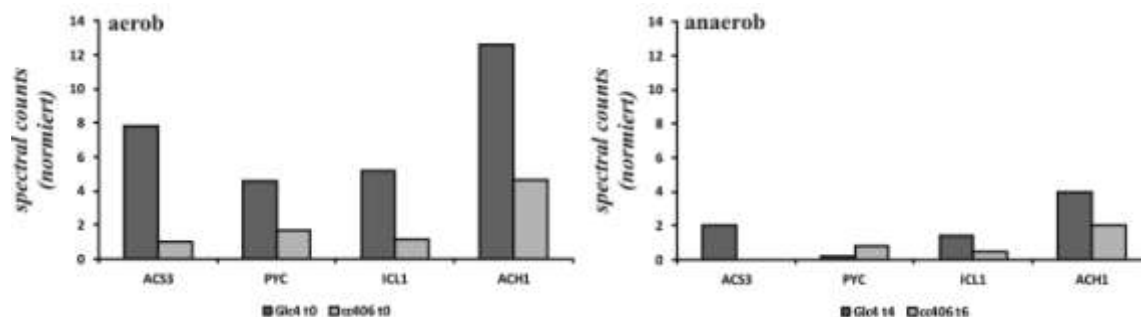


Abbildung 52: Glykoxylat –und Citratzyklus Enzyme, die unter mixotrophen Bedingungen vermehrt in der Mutante detektiert wurden (linke Seite). In der Abbildung (rechte Seite) wurden die gleichen Enzyme unter H_2 produzierenden Bedingungen dargestellt (t4/6). In beiden Fällen wurden sie in Abhängigkeit der detektierten und normierten *spectral counts* dargestellt. (Acetyl-CoA-Synthase (ACS3); Pyruvat-Carboxylase (PYC); Isocitrat-Lyase (ICL1); Aconitase (ACH1))

Die in der Arbeit erhaltenen Daten deuten an, dass Acetat in der Mutante verstärkt über die Acetyl-CoA-Synthase (ACS3) assimiliert und Acetyl-CoA generiert wurde. Der Glykoxylat Zyklus beginnt mit der Kondensation eines Moleküls Acetyl-CoA mit Oxalacetat. Letzteres wird über die PYC gebildet, welches ebenfalls in der Mutante öfters detektiert wurde (t0). Das daraus entstehende Citrat (katalysiert durch die Citratlyase (*Stm6Glc4* > WT, t0) wird durch die Aconitase in Isocitrat überführt. Durch Folgereaktionen werden Decarboxylierungsschritte des Citratzyklus umgangen.

Anstelle dessen katalysiert die Isocitrat Lyase die Umsetzung von Isocitrat zu Succinat und Glykoxylat. Letzteres wird durch Malatsynthase (MAS1) und Acetyl-CoA zu Malat kondensiert. Der Kreislauf schließt sich, in dem Malat zu Oxalacetat mittels Malat-Dehydrogenase oxidiert wird. Die Malat-Dehydrogenasen (MDHM, MDH6) konnten in beiden Zelllinien nachgewiesen werden und überwogen in der Mutante vor allem unter mixotrophen Konditionen (Abbildung 53).

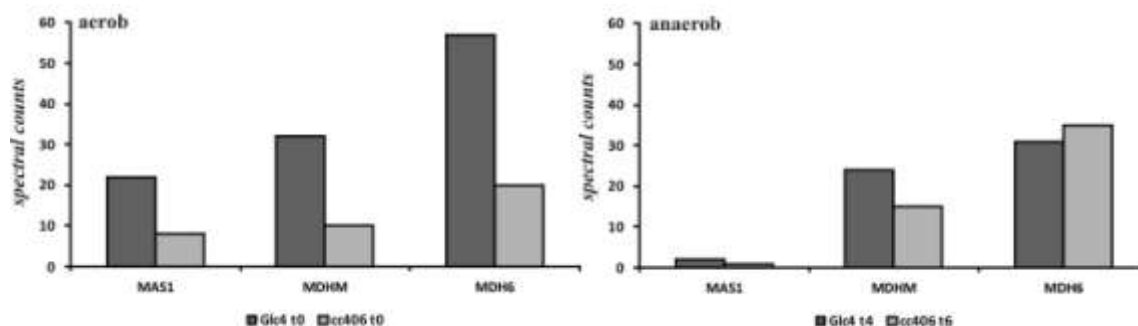


Abbildung 53: Die Umsetzung von Glykoylat zu Malat und Acetyl-CoA katalysierte die Malat-Synthase (MAS1). In nachfolgender Reaktion wurde Malat zu Oxalacetat mittels Malat-Dehydrogenase (MDHM, MDH6) umgesetzt. Die an den Reaktionen beteiligten Enzyme wurden in der Mutante öfter detektiert als im Wildtyp (t0, linke Abbildung), während sich unter anaeroben Bedingungen und Schwefelmangel (rechte Abbildung) keine signifikanten Unterschiede ergaben. Die Häufigkeitsangaben der Detektion wurden in *spectral counts* wiedergegeben.

Das entstandene Succinat wird über Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat mittels Phosphoenolpyruvat Carboxykinase umgewandelt. Dieses Enzym konnte nicht detektiert werden. Im Zuge der Gluconeogenese kann Succinat dann zu Glucose bzw. zu Stärke umgewandelt werden. Aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Schönfeld et al., 2005 und den Stärketests (Doebbe et al., 2009) war ersichtlich, dass die Mutante *Stm6Glc4* verstärkt Stärke akkumuliert. Die erhaltenen Daten würden auf diese Weise eine Begründung für die erhöhten Stärkedepots in *Stm6Glc4* liefern.

Insgesamt zeichnen sich bezüglich des Acetatkonsums zwischen Wildtyp und Mutante signifikante Unterschiede ab. Die Ergebnisse zeigen einen höheren Acetatkonsum in der Mutante *Stm6Glc4* auf. Dies beginnt bereits mit der Bereitstellung des Oxalacetats. Potentiell könnte in der Mutante vermehrt Oxalacetat in den Glyoxylat-Zyklus einfließen, da das bereitstellende Enzym, die Pyruvat Carboxylase (PYC) ebenfalls öfters in *Stm6Glc4* detektiert wurde. Insbesondere die Ergebnisse des Glyoxylat-Zyklus geben einen entscheidenden Hinweis darauf, dass in *Stm6Glc4* mehr Acetat verstoffwechselt wird. Auch die Enzyme aller Folgeschritte nach der Assimilation des Acetats hin zum Substrat der Gluconeogenese wurden in *Stm6Glc4* öfters vermessen. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Metabolom-Studie von Anja Doebbe (Doebbe et al., 2010).

5.4.3.2 Atmungskette

Zu den Hauptkontaminationsquellen eines Chloroplasten-Präparates gehören Mitochondrien, die z.T. frei in der Zelle vorliegen oder direkt an den Chloroplasten assoziiert sind. Deshalb wurden Westernblots durchgeführt, um die unterschiedlichen Kontaminationsgrade der einzelnen Präparate (Mutante, WT, t0, t4/t6) zu verifizieren.

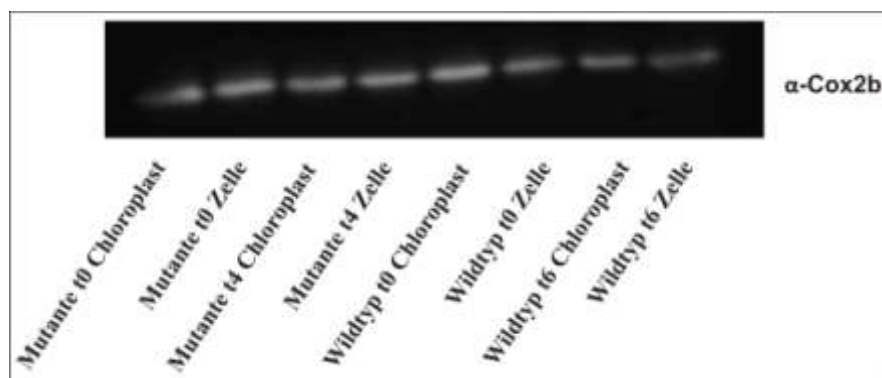


Abbildung 54: Westernblot zum Nachweis von Cox2b. Separiert verglichen wurden Chloroplasten-Anreicherungen mit einem Gesamt-Zellextrakt. Die Präparate wurden jeweils zwei unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen, dabei entsprach t0 einer Entnahme vor dem Experiment, während t4/t6 der Situation in der Hoch-Wasserstoffproduktionsphase entsprach. Es wurden jeweils 5 µg Protein in einem 12%igen Lämmli-Gel aufgetrennt.

Repräsentativ für die Komponenten der mitochondrialen Atmungskette wurden Anti-Cox2b und Anti-AOX1 Antikörper ausgewählt (Abbildung 54) und die Ergebnisse mit den Proteomdaten abgeglichen. Die *spectral counts* Analysen wiesen keine Unterschiede (cox2b, Komplex IV Untereinheit) bzw. nur marginale Unterschiede (AOX1, alternative Oxidase) für die beiden Zelllinien in Bezug auf die einzelnen Zeitpunkte auf. Während die identifizierten und gezählten Peptide für cox2b gleich blieben (WT, Mutante, beide Zeitpunkte), nahmen diese im Fall der AOX1 vom Zeitpunkte t0 zu t4/t6 leicht zu (WT und Mutante). Diese Ergebnisse ließen sich mit den Westernblot-Analysen verifizieren (Abbildung 58). Zudem wurden noch Chloroplasten-Anreicherung und Zellextrakt miteinander verglichen und es konnte festgestellt werden, dass die Kontaminierung durch Mitochondrien in allen Proben identisch war (Abbildung 54). Anhand der Übereinstimmung zwischen den massenspektrometrischen Analysen und den antikörperbasierten Kontrollen wurden die erhalten mitochondrialen Peptide ebenfalls berücksichtigt und unter Vorbehalt interpretiert. Da in dieser Studie kein spezielles Mitochondrienpräparat aufgereinigt wurde, konnte damit bestätigt werden, dass im Gegensatz zur stark variierenden und durch die Chloroplastenanreicherung abgereicherten cytosolischen Kontamination, tryptisch verdaute Peptidfragmente mitochondrialer Komponenten konstant detektiert werden konnten. Zudem konnte kein Unterschied

zwischen Zellextrakt und Chloroplasten-Anreicherung festgestellt werden, weshalb die Daten mit in diese Studie einfließen.

Die mitochondrielle Elektronentransportkette umfasst drei Multi-Proteinkomplexe (Komplex I, III, IV), die in der inneren Mitochondrien-Membran integriert sind, und zwei bewegliche Elektronenüberträger-Moleküle (Ubiquinon, Cytochrom c). Auch die dem Citratzyklus zugeordnete Succinat-Dehydrogenase (SDH1-4) fungiert als Teil des Komplexes II der Atmungskette. Obwohl die ATPase nicht am Elektronentransport beteiligt ist, wird sie als Komplex V mit in die Betrachtung der Atmungskette einbezogen.

Komplex I in *Chlamydomonas reinhardtii* besteht nach derzeitigem Wissensstand aus 41 Untereinheiten (Cardol et al., 2005; Atteia et al., 2009), von denen 23 in der vorliegenden Studie identifiziert wurden. In Abbildung 55 sind nur die Proteine dargestellt, bei denen zwischen Wildtyp und Mutante Unterschiede hinsichtlich der detektierten Peptidmenge auftraten. Aus diesen Daten konnten zwei Schlussfolgerungen gezogen werden. Erstens ergab sich schon für den ersten Zeitpunkt unter mixotrophen Kultivierungsbedingungen (t0) Unterschiede im Expressionsniveau für mehrere Untereinheiten des Komplex I. Dabei überwogen die vermessenen *spectral counts* der Mutante gegenüber denen des Wildtypen. Und Zweitens, unter wasserstoffproduzierenden Bedingungen waren diese Differenzen deutlich relativiert und es gab lediglich einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Peptidmenge in der Untereinheit NUOS1 (Mutante > Wildtyp).

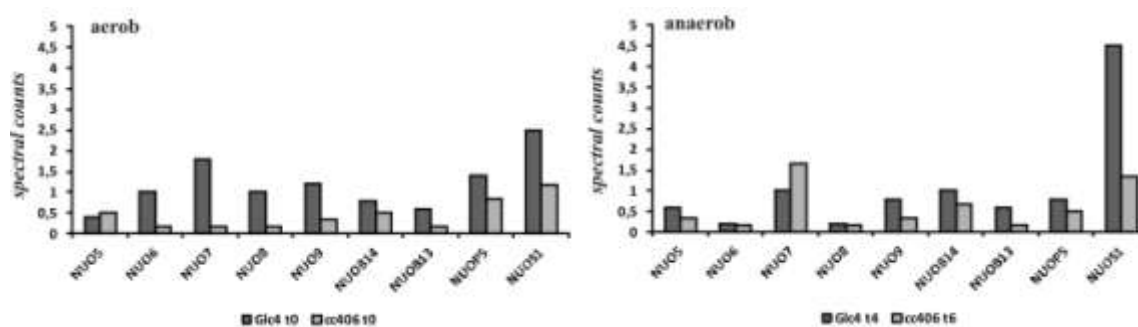


Abbildung 55: Untereinheiten des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Gezeigt werden die Unterschiede der *spectral counts* für Wildtyp (hellgraue Balken) und Mutante (dunkelgraue Balken) der identifizierten NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktasen (NUO, NUOB, NUOP, NUOS). In der linken Abbildung ist die Protein Zusammensetzung unter aeroben Bedingungen (t0) gezeigt, während in der rechten Abbildungen die detektierten Proteine unter wasserstoffproduzierenden Bedingungen gezeigt wurde.

Die insgesamt vier Untereinheiten des Komplex II, die Succinat-Dehydrogenase 1-4 (SDH1, 2, 3, 4) konnten für beide Zelllinien in beiden Zeitpunkten lediglich mit sehr

niedrigen *Spectral counts* nachgewiesen werden. Die einzige Ausnahme bildete die SDH1. Diese Untereinheit wurde in beiden Zeitpunkten für beide Zelllinien mit hohen Peptidmengen nachgewiesen ohne signifikante Unterschiede zu detektieren. Sowohl in t0 als auch in t4 waren die Messungen zwischen Wildtyp und Mutante sehr ähnlich, allerdings reduzierte sich die vermessene Peptidzahl leicht zwischen dem ersten und dem letzten Zeitpunkt. Somit sind Aussagen hinsichtlich dieses Komplexes nicht möglich.

Die Genomsequenz-Suche von Atmungsketten-Komponenten bei *Chlamydomonas reinhardtii* ergab 10 klassische Untereinheiten des Komplex III. Dieser unterteilt sich in *core I* und *core II* (QCR 1, 2), Cytochrome b, c1, RIP und fünf weitere Untereinheiten (QCR6, 7, 8, 9, 10). Von diesen 10 Untereinheiten konnten 6 nachgewiesen werden und eine Änderung der Peptidzahl wurde in drei Proteinen festgestellt. Die Daten für diese drei Untereinheiten zu beiden Zeitpunkten sind in Abbildung 56 dargestellt. Auch hier wurden wie für Komplex I unter aeroben Bedingungen Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante registriert, in der Mutante konnte wiederum eine höhere Peptidmenge für diese Proteine gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden. Unter Schwefelmangel bedingter Anoxie nahmen die jeweiligen *spectral counts* in der Mutante deutlich ab, während die gezählten Peptide im Wildtyp im Vergleich zum Zeitpunkt t0 kaum Veränderungen aufwiesen. Insgesamt wurden die Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante deutlich reduziert. Auch diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit den Komplex I Daten. Eine Ausnahme bildete QCR2, die unter anaeroben Bedingungen (t6) im Wildtyp im Vergleich zu t0 öfters detektiert wurde und dadurch mehr *spectral counts* als in der Mutante nachgewiesen wurden (t4/t6).

Abschließend konnten die Ergebnisse auch durch die *spectral counts* von RIP1 und Cytochrom c bestätigt werden. RIP1-Peptide wurden in der Mutante öfter als im Wildtypen detektiert (t0), während in t4/t6 keine Unterschiede zwischen den Zelllinien existierten. Cytochrom c wies unter aeroben Bedingungen ähnlich Ergebnisse auch wie für RIP1, während in t4 nur Peptide für die Mutante nachgewiesen werden konnten.

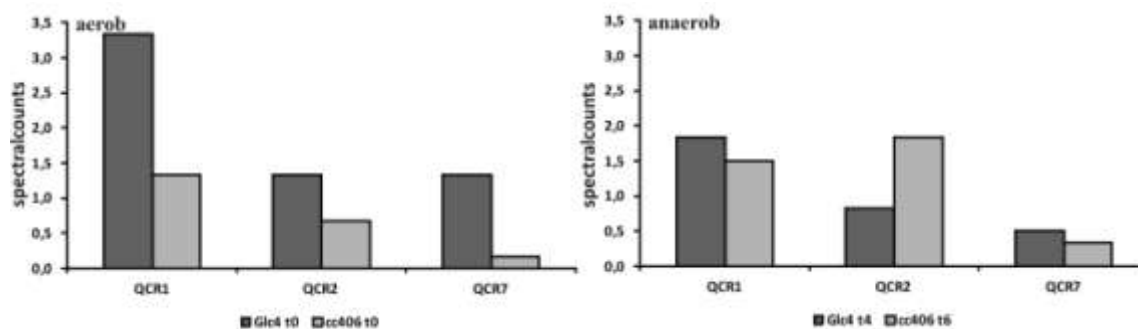


Abbildung 56: Untereinheiten des Komplex III der mitochondrialen Atmungskette. Gezeigt werden die *spectral counts* der zugehörigen Peptide der Ubiquinol:Cytochrom c Oxidoreduktase Untereinheiten des Wildtypen (hellgraue Balken) und der Mutante (dunkelgraue Balken). In der linken Abbildung ist die Protein Zusammensetzung unter aeroben Bedingungen (t0) gezeigt, während in der rechten Abbildungen die detektierten Proteine unter wasserstoffproduzierenden Bedingungen gezeigt wurde.

Von *Chlamydomonas* Komplex IV wird angenommen, dass dieser insgesamt neun Untereinheiten umfasst (Cardol et al., 2005). In dieser Arbeit wurden insgesamt 4 dieser Untereinheiten detektiert (Cox2b, Cox5c, Cox12 und Cox13), allerdings mit so geringer Peptidmenge, dass diese Studie lediglich bestätigte, dem Komplex zugeordnete tryptisch-verdaute Peptide identifiziert zu haben. Nur für Cox2b, welches zusätzlich mit Westernblots nachgewiesen werden konnte, lies sich feststellen das keine signifikante Änderung hinsichtlich der Proteinmenge detektiert werden kann.

In der vorliegenden Studie konnten insgesamt 14 Proteine des Komplex V nachgewiesen werden. Diese untergliederten sich in 5 von insgesamt 7 Untereinheiten der ATP-Synthase (ATP1-5) und fünf der insgesamt sieben Untereinheiten der ATP-Synthase assoziierten Proteine (ASA; ASA1-4, ASA7). Unter aeroben, mixotrophen Kultivierungsbedingungen (t0) ergaben sich markante Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante bezüglich ATP2, ATP4 und ASA 2, 4 und ASA7 (Mutante > Wildtyp). Während diese Untereinheiten ebenfalls in beiden Zelllinien in t4/t6 detektiert und somit als funktionell vorhanden bestimmt werden konnten, waren die Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante nicht mehr gegeben. Daher ergaben sich auch hier identische Verschiebungen hinsichtlich der Proteinmengen wie für Komplex I und Komplex II.

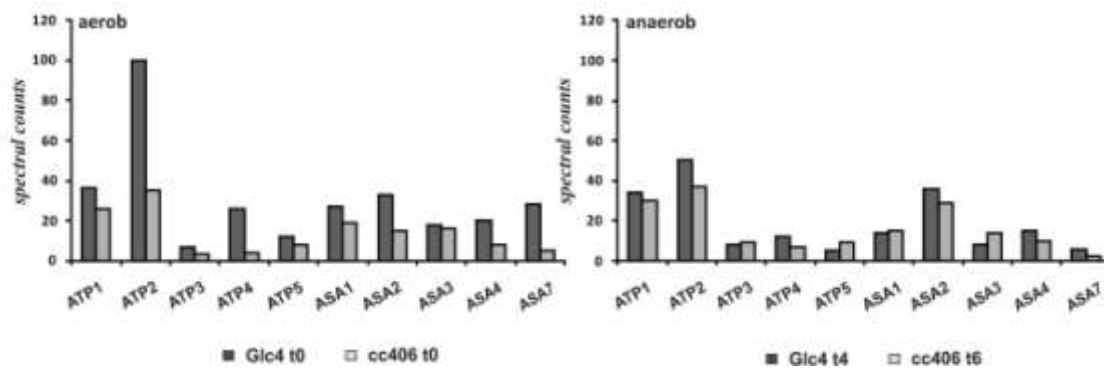


Abbildung 57: Gezeigt werden die *spectral counts* der zugehörigen Peptide des Komplex V für Wildtyp (hellgraue Balken) und Mutante (dunkelgraue Balken). In der linken Abbildung ist die Protein Zusammensetzung unter aeroben Bedingungen (t0) gezeigt, während in der rechten Abbildungen die detektierten Proteine unter wasserstoffproduzierenden Bedingungen gezeigt wurde. (F₁F₀ ATP synthase Untereinheiten (ATP1-5); F₁F₀ ATP Synthase assoziiertes Protein (ASA1-4;7))

Im Citratzyklus, dem Pentosephosphat-Weg und bei der Fettsäureoxidation entstehen Reduktionäquivalente, die in einer stark exergonischen Reaktion Sauerstoff zu Wasser reduzieren können. Die Übertragung der Elektronen von NADH und FADH₂ erfolgt sukzessive in hintereinander geschalteten Elektronenübertragungen, die in der Gesamtheit die mitochondrielle Atmungskette bilden und gekoppelte sind mit der Energiegewinnung durch die oxidative Phosphorylierung.

Der größte Teil des zellulären ATPs entsteht, neben der Photophosphorylierung und Substratkettenphosphorylierung, in der oxidativen Phosphorylierung. Unter Betrachtung der einzelnen Komponenten (Komplex I–V) der mitochondriellen Atmungskette deuteten die erhaltenen Ergebnisse Unterschiede zwischen der Konstitution des Wildtypen und der Mutante unter aeroben Bedingungen an (Abbildung 57). Alle detektierten, auswertbaren Komponenten wurden mit höherer Peptidzahl in der Mutante vermessen (t0). Dies deutet auf einen physiologischen Unterschied in der Mutante unter mixotrophen Bedingungen hin, welcher sich im Laufe des Experimentes minimiert. Zum Zeitpunkt der höchsten Wasserstoffproduktion konnten nahezu alle Peptide mit identischen *spectral counts* nachgewiesen werden. Interessanterweise konnten durch die Proteomdaten nicht die verstärkte transkriptionelle Expression der SDH1 in der Mutante bestätigt werden (Dissertation Nguyen, 2011). Sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen waren die Unterschiede zwischen den Zelllinien bezüglich der SDH1 nicht signifikant so dass sich daraus ableiten ließ, dass die Einführung von Elektronen mittels der aus der Oxidation von Succinat zu Fumarat freiwerdenden Elektronen funktionell genutzt werden können, aber nicht um die Einspeisung über Komplex I zu umgehen oder zu kompensieren. In der Metabolom Studie wurden erhöhte Mengen an Succinat im

Wildtyp im Vergleich zur Mutante vermessen. Möglich wäre es, dass aufgrund des erhöhten Glykolyat-Zyklus eine *steady state* Konzentration erhalten bleiben kann, weil dieses Metabolit permanent über die Gluconeogenese für den Stärkeaufbau genutzt werden könnte.

Unter anaeroben Bedingungen verringerten sich die Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante. Trotzdem deutete noch einiges auf die Funktionalität der Atmungskette, da ebenfalls eine Vielzahl der zugehörigen Proteine detektiert wurde.

Die Proteom-Daten der Komponenten der mitochondrialen Atmungskette lieferten eine gute Erklärung für den schnelleren Wechsel hin zur Anerobie durch schwefelfreies Medium und waren ebenfalls im Einklang mit den erhaltenen ϕ PS II-Fluoreszenzmessungen. In den Kulturen von *Stm6Glc4* konnte nach dem Experiment wesentlich schneller ein anaerober Zustand festgestellt werden. Ein Grund dafür könnte die potentiell erhöhte Fähigkeit zur Respiration im Vergleich zum Wildtyp dargestellt haben. Während sich die Sauerstoffentwicklung unter Schwefelmangel aufgrund der Degradation der Komponenten des PS II innerhalb weniger Stunden nach dem Wechsel des Mediums reduzieren sollte, kann hier davon ausgegangen werden das eine höhere Respirationsrate einen schnelleren Verbrauch von Sauerstoff fördern könnte. Da alle Komponenten der Atmungskette in der Mutante mit höherer Proteinmenge Vergleich zum Wildtypen vorlagen, konnte eine Anaerobiose schneller eintreten. Mittels Inhibitor-Studien konnten Antal und Mitarbeiter (2003) verifizieren, dass weniger die chloroplastidäre Oxidase als mehr die alternativen Oxidase und der Cytochrom c Komplex Ursache für die Nutzung des durch die Restaktivität des PS II-Komplexes entstandenen Sauerstoffs sind. Allerdings ließ sich für den Komplex IV nur eine Komponente zur Interpretation nutzen. Dies war die Untereinheit Cox2b, bei der sich sowohl in der Anzahl der detektierten Peptide als auch in Westernblots keine Unterschiede feststellen ließen.

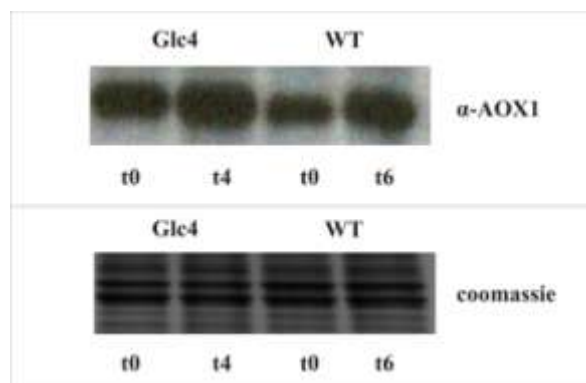


Abbildung 58: Westernblot zum Nachweis von AOX1 (Alternative Oxidase1). Separiert wurden Chloroplasten-Anreicherungen. Die Präparate wurden jeweils von zwei unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen, dabei entsprach t0 einer Entnahme vor dem Experiment, während t4/t6 der Situation in der Hoch-Wasserstoffproduktionsphase entsprach. Es wurden jeweils 5 µg Protein in einem 12%igen Lämmli-Gel aufgetrennt.

Interessanterweise zeigten auch die Untersuchungen mittels Westernblot, dass die Alternative Oxidase (AOX1) in der Mutante sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen in größeren Mengen vorlag als im Wildtypen. Dieses Ergebnis bestätigte die parallel durchgeführten Transkriptanalysen (Dissertation Nguyen, 2011). Auf diese Weise würde die AOX1 nicht nur zu einer schnelleren Einstellung der Anaerobie beitragen, was die Expression der Hydrogenase gewährleistet, sondern könnte auch eine Überreduktion der mitochondrialen Atmungskette vermeiden und die Regeneration von Reduktionsäquivalenten (Gykolyse, Citratzyklus) bewirken.

Insgesamt geben die erhaltenen Daten Hinweise auf eine stärkere Respiration in *Stm6Glc4*. Die vorliegenden Proteom-Daten können durch die parallel durchgeführte Metabolom Studie (Doebbe et al., 2010) verifiziert werden. In der Untersuchung des Metaboloms konnte insbesondere unter aeroben Bedingungen ein verstärkter Acetat-Konsum festgestellt werden. Dieser kam im Verlauf der Wasserstoffproduktion im Wildtyp früher zum Erliegen als in der Mutante *Stm6Glc4*. Damit kann die vorliegende Proteom Untersuchung die bereits erhaltenen Metabolom-Daten ergänzen und verfeinern. Auf mehreren zellulären Ebenen können die Daten eine höhere Bereitschaft und Fähigkeit hin zu höheren Atmungsraten unter aeroben als auch (mikro-) aeroben Konditionen in der Mutante erklären bzw. bestätigen. Ein Indiz wäre das höhere Detektionslevel der Alternativen Oxidase in *Stm6Glc4* insbesondere unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen, welches für höhere Atmungsraten in der Mutante spräche (Abbildung 58). In Zusammenschluss mit den Ergebnissen zum D1 Protein könnte man schlussfolgern (Abschnitt 5.4.2.1), dass der höhere Elektronenfluss inklusive der Sauerstoffproduktion durch die höheren Atmungsraten kompensiert wird und somit den höheren Acetatkonsum,

als auch die höheren Wasserstoffproduktionsraten in *Stm6Glc4* erklären könnte. Zudem zeigen die im folgenden Abschnitt dargelegten Sauerstoff-Messungen einen verstärkten Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit von Acetat unter aeroben Bedingungen in der Mutante an.

Der parentale Stamm der Mutante *Stm6Glc4* ist die Mutante *Stm6*. In *Stm6* führt die Abwesenheit des Transkription-Terminationsfaktors *Moc1* zu einer Veränderung der mitochondrialen Genexpression (Schönfeld et al., 2004; Wobbe persönliche Kommunikation). Interessanterweise ergaben die Proteom-Daten eine entgegengesetzte Tendenz, weshalb ein Kompensationseffekt sehr wahrscheinlich sein könnte. Die vorliegende Studie ergab eine Erhöhung der Menge an kernkodierten, mitochondrialen Genen. Daraus resultiert, dass die gestörte mitochondrielle Genexpression sehr wahrscheinlich Effekte auf die Expression kernkodierter Proteine hat und somit die Ebene der Expression moduliert wird. Dieses Ergebnis aus der vorliegenden Proteomstudie und vorangegangener Arbeit (Schönfeld et al., 2004) bzw. aktuellen, unveröffentlichten Studien (persönliche Kommunikation mit Dr. Lutz Wobbe) könnte ein Beispiel der Kompensations-Regulation für die intrazelluläre Kommunikation bzw. den retrograden Informationsfluss zwischen verschiedenen Zellkompartimenten (retrograde Signaltransduktion) innerhalb einer pflanzlichen Zelle sein. Signale aus den Mitochondrien informieren den Zellkern über die Stoffwechselaktivitäten und tragen somit zur Anpassung der kernlokalisierten Genexpression gemäß den Bedürfnissen der Organellen bei.

5.4.3.3 Vergleich der Atmungsraten von *Stm6Glc4* und *cc406* unter Standardwachstumsbedingungen

Um die ermittelten Unterschiede hinsichtlich der Aktivität des Citratzyklus und der Atmungskette zwischen den beiden Stämmen schon zum Zeitpunkt t_0 , also vor der Wasserstoffproduktion, zu verifizieren, wurden Photosynthese/Respirationsmessungen nach Acetat und Glukosezugabe durchgeführt. Als Kontrolle dienten phototroph wachsende Kulturen, die mit NaHCO_3 als Kohlenstoffquelle kultiviert wurden. In Abbildung 59 sind die prozentualen Respirationsraten in Abhängigkeit der Bruttphotosyntheserate dargestellt.

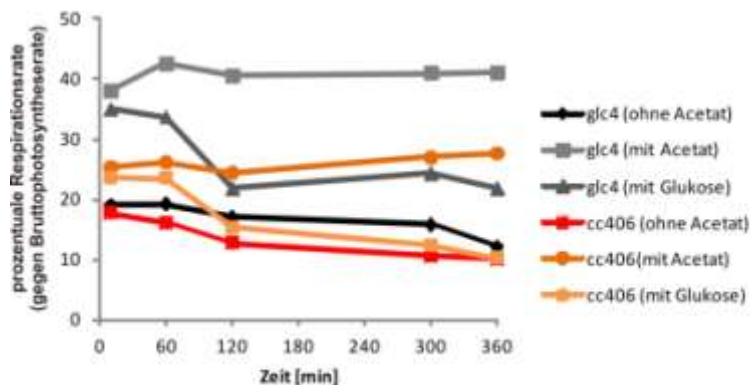


Abbildung 59: Atmungsraten in *Stm6Glc4* und *cc406* in Abhängigkeit von Acetat (10mM) und Glukose-Zugabe (1mM). Dargestellt sind die prozentualen Respirationsraten im Vergleich zu den Bruttphotosyntheseraten (n=3).

Die Respiration, also der Sauerstoffverbrauch, steigt in *Stm6Glc4* innerhalb von 10 min nach Acetatzugabe (10 mM) auf bis zu 50% der Bruttphotosyntheserate und verbleibt auf diesem hohen Niveau über den gesamten Versuchszeitraum von 6 Stunden. Auch in *cc406* konnte ein Anstieg detektiert werden, allerdings nur auf 35-30% der Bruttphotosyntheserate. In den Kontrollkulturen konnte dahingegen eine konstante Atmungsrate von etwa 10-15% der Bruttphotosyntheserate in beiden Stämmen gemessen werden. Die Zugabe von 1mM Glukose bewirkt auch einen Anstieg der Atmungsrate in *Stm6Glc4*, allerdings nur über zwei Stunden, da die Konzentration sehr gering gewählt wurde (siehe Doebbe et al. 2010, effektive Glukose-Konzentration zur Steigerung der Wasserstoffproduktion) kann davon ausgegangen werden, dass die Glukose in diesem Zeitraum vollständig assimiliert wurde. In *cc406* konnte erwartungsgemäß keine signifikante Änderung der Atmungsrate nach Glukose-Zufütterung gemessen werden.

Ein Vergleich der Atmungsraten unter Standardkultivierungsbedingungen ergab signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien. Mit dieser Untersuchung ließen sich die Proteom-Untersuchungen insbesondere bezüglich der Komponenten, die bei der Assimilation des Acetats involviert sind, physiologisch verifizieren. An dieser Stelle bilden die Ergebnisse aus Proteom-, Metabolom- und physiologischer Untersuchung eine Einheit. Unter nicht sättigenden Bedingungen konnte Doebbe et al. (2010) einen rapiden Verbrauch des Acetats, sowohl unter Standardbedingungen als auch nach Überführung der Zellen hin zu TAP minus Schwefel (zum Zeitpunkt des Mediumwechsels) zeigen. Alle für den Acetat Konsum benötigten Enzyme konnten in dieser Studie in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp in t0 öfter detektiert werden und passen somit sehr gut mit den physiologischen Untersuchungen zur Bruttphotosyntheserate überein (Abbildung 59).

5.4.4 Weitere Stoffwechselwege

5.4.4.1 Fermentation

Von besonderem Interesse unter anaeroben Bedingungen, induziert durch Schwefelmangel, waren die Proteine des fermentativen Metabolismus, da Wasserstoffproduktion und fermentativer Pyruvat-Metabolismus als Kompetitoren hinsichtlich der verfügbaren Elektronen angesehen werden. Einige dieser Enzyme sind innerhalb des Chloroplasten zu finden (Pyruvat-Ferredoxin-Reduktase (PFR1), Alkohol-Dehydrogenase (ADH), Acetat-Kinase (ACK1), Phosphotransacetylase (PAT2)), während andere Reaktionen in den Mitochondrien ablaufen (z.B.: PFL, ACK2, PAT1) wodurch die Bedeutung der Interaktion zwischen beiden Organellen deutlich wird. Insbesondere unter anaeroben Bedingungen ist *Chlamydomonas reinhardtii* zur Bildung von Formiat, Acetat, Lactat und Ethanol befähigt. Die Enzyme, die an diesen unterschiedlichen Pyruvat-Abbau-Wegen beteiligt sind, konnten sowohl im Wildtypen als auch in der Mutante in einigen Fällen zu beiden Zeitpunkten detektiert werden (t0, t4/6). Auffallend war, dass bis auf die Pyruvat-Formiat-Lyase und die Alkoholdehydrogenase (ADH), alle fermentativen Enzyme mit sehr wenigen Peptiden detektiert wurden. Dies galt auch für die hochaktive Hydrogenase, welche exklusiv nur unter anaeroben Bedingungen detektiert und offensichtlich funktionell exprimiert war, jedoch nur mit 3 Spectral-bzw. Peptidcounts vermessen wurde. Auch die Pyruvat-Ferredoxin-Reduktase, die Phosphotransacetylase und die Acetat-Kinase, die katalytisch aktiv waren, konnten nur in sehr geringer Menge nachgewiesen werden. Die Funktionalität dieser Enzyme und die Bedeutung der einzelnen Reaktionen wurde durch Metabolom-Untersuchungen durch den Nachweis von Formiat, Ethanol und Acetat erklärt (Doebbe et al., 2010).

Werden die einzelnen Enzyme im Detail betrachtet, fällt auf, dass die Spaltung des Pyruvats in Formiat und Acetyl CoA, welche durch die Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) katalysiert wird, auch unter aeroben Bedingungen nachgewiesen werden konnte. Zudem wird das gebildete Acetyl-CoA dann durch die Phosphotransacetylase (PAT1, 2) und durch die Acetat-Kinase (ACK1, 2) zu Acetylphosphat bzw. zu Acetat umgesetzt. Auch dieser Stoffwechselweg existierte ohne detektierbare Unterschiede in beiden Zelllinien ebenfalls unter aeroben Bedingungen. Das Coenzym A ist eine bedeutende Komponente des Energiestoffwechsels und somit ist zu erwarten, dass dieses auch unter aeroben Bedingungen wichtiges, permanent benötigtes Intermediat eventuell auch über diesen Weg synthetisiert wird. Unerwartet war, dass PFL-Konzentration hin zu anaeroben Bedingungen abnahm. Unter anaeroben Bedingungen existierte nur ein leicht erhöhter

PFL Spiegel in der Mutante. Die Enzyme der nachfolgenden Reaktionen, welche an der Umsetzung des Acetyl-CoA zu Acetat beteiligt waren (PAT, ACK) wurden ebenfalls mit wenigen *spectral counts* in t0 detektiert (Mutante & Wildtyp) allerdings in beiden Zeitpunkten ohne signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien.

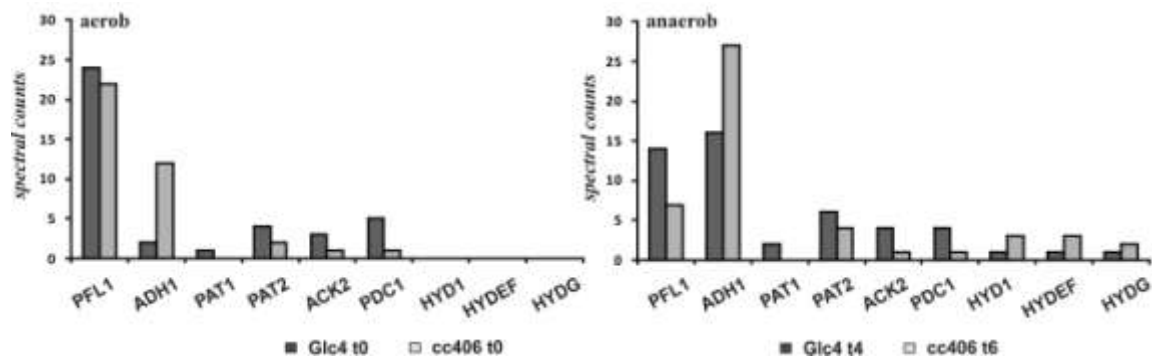


Abbildung 60: Dargestellt sind die Enzyme des Pyruvat- und Wasserstoff-Metabolismus, die unter mixotrophen Bedingungen detektiert wurden (linke Seite). In der Abbildung (rechte Seite) wurden die gleichen Enzyme unter H_2 produzierenden Bedingungen dargestellt (t4/6). In beiden Fällen wurden sie in Abhängigkeit der detektierten *spectral counts* dargestellt. (Pyruvat-Format-Lyase (PFL1); Alkohol-Dehydrogenase (ADH1); Phosphat Acetyltransferase (PAT1/2); Acetatkinase (ACK2); Pyruvat Decarboxylase (PDC); Hydrogenase (HYD))

Zu Beginn des Schwefelmangels zeigten die Metabolomstudien eine schnelle Assimilation des Acetats. Entweder waren die katalysierenden Enzyme ebenfalls hochaktiv wie im Fall der wenigen Peptidzahlen der Hydrogenase oder dieser Stoffwechselweg ist aufgrund weniger Enzyme unter anaeroben nicht dominant und besitzt nur eine besondere Bedeutung in der initialen Phase der Wasserstoffproduktion, in der Acetat verstärkt metabolisiert wird.

Die Wasserstoffproduktion steht in dieser Studie im besonderen Fokus und somit war der Nachweis der Hydrogenasen von besonderer Bedeutung. Die Hydrogenasen HydA1 und HydA2 dienen als Elektronenventil, um die Überreaktionen der photosynthetischen Elektronentransportkette zu verhindern und somit die Stressreaktionen zu reduzieren und das Überleben der Zellen unter anaeroben Bedingungen zu gewährleisten. Erst bei gleichzeitiger Expression der *assembly factors* HydEF und HydG resultiert die Expression der Hydrogenasen in einer funktionellen, aktiven Form. Der Nachweis von Proteinen unter aeroben Bedingungen (t0) war aufgrund der Sauerstoffsensitivität der Hydrogenasen nicht zu erwarten und die Ergebnisse entsprechen diesen Erwartungen. Die Hydrogenase HydA1 und deren *assembly factors* konnten exklusiv in t4 nachgewiesen werden (Abbildung 60). Überraschenderweise war die Peptidzahl sehr gering in beiden Zelllinien. Möglicherweise ist dies damit zu begründen, dass es sich bei der

eukaryotischen, in *Chlamydomonas* nachgewiesenen *uptake*-Hydrogenase im Vergleich zu anderen Organismen um ein hochaktives Enzym mit hoher Produkt-Umsetzungsrate handelt, so dass die Menge an Enzym nicht ausschlaggebend ist. Interessanterweise unterscheiden sich die beiden Zelllinien enorm in der absolut produzierten Wasserstoffmenge. Dieser Unterschied lässt sich vermutlich eher durch Konkurrenzreaktionen zur Hydrogenase als durch die absolute Konzentration des Enzyms erklären (siehe auch Abschnitt Photosynthese oder weiter unten Reaktionen der Alkoholdehydrogenase).

Die nötigen Elektronen für die Reduktion der Hydrogenasen können weiterhin durch die Decarboxylierung des Pyruvats bereitgestellt werden, bei der Ferredoxin durch die Pyruvat-Ferredoxin-Reduktase reduziert wird. Auch hier gab es im Detektionsniveau der PFR keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante, demzufolge sollten auch keine Unterschiede im Substratzufluss hin zur Hydrogenase existieren. Die PFR wurde ebenfalls ausschließlich nur unter Anoxie und Schwefelmangel detektiert.

Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Proteinmenge gab es nur in einem alternativen fermentativen Stoffwechselweg, die möglicherweise u.a. zu einer Erklärung für die großen Unterschiede hinsichtlich der H₂ Produktion zwischen Wildtyp und Mutante beitragen. Die detektierte Menge der Alkoholdehydrogenase unterschied sich im Wildtyp und in der Mutante sowohl unter aeroben Bedingungen (t0) als auch im zeitlichen Verlauf während der Wasserstoffproduktion (t4/t6). Die ADH konnte unter beiden Konditionen öfters im Wildtyp detektiert werden. Auf Basis des produzierten Produktes Ethanol konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Geringe Mengen an Ethanol wurden in t0 in beiden Zelllinien detektiert, jedoch akkumulierte der Wildtyp größere Mengen an Ethanol im zeitlichen Verlauf der Wasserstoffproduktion im Vergleich zur Mutante (Doebbe et al., 2010).

Die Versatilität der einzelligen Grünalge wurde über den erhaltenen Datensatz repräsentiert. Neben der H₂ Produktion umfasst der Pyruvat-Metabolismus diverse Reaktionen, die für die Regenerierung der Reduktionsäquivalente (Konstantes NAD(P)/NAD(P)H Verhältnis) verantwortlich sind. Zudem kann eine Bereitstellung weiterer Energieäquivalente unter Schwefelmangel und Anoxie gewährleistet werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich Wildtyp und Mutante auch in diesem Stoffwechselprozess auf Basis der Proteinmenge nur sehr gering voneinander unterscheiden. Einzig die verstärkte Expression der ADH im WT könnte eine Konkurrenzreaktion zur Hydrogenase ausmachen, wodurch in der die Mutante eine größere Menge an Wasserstoff produzieren könnte.

5.4.5 Zusammenfassung beider Teilprojekte

Biochemische Stoffwechselwege, die an der H₂ Produktion beteiligt sind, müssen im Detail verstanden werden, um vielversprechende Angriffspunkte für weitere Optimierungen durch gezielte Genmanipulation zu haben.

Der parentale Vorgängerstamm von *Stm6Glc4* (*Stm6*) wurde durch ein Zufalls-*screening* identifiziert. Während die Überexpression eines heterologen Zuckertransporter (*hup1*) in *Stm6* sehr erfolgreich zu einer Verbesserung der Wasserstoffproduktionsrate in *Stm6Glc4* führte (Doebbe et al., 2009), konnte mit der dritten Generation dieser Mutanten (*Stm6Glc4T7*), die in vorliegender Arbeit generiert und beschrieben wurde, die Akkumulation von Biomasse deutlich gegenüber den Vorgängern gesteigert werden. Die Reduktion der Antennengröße um lediglich 10 – 17% resultierte in einer nahezu 50% Verbesserung der photosynthetischen Effizienz bei sättigenden Lichtbedingungen (siehe Abschnitt 5.1.2). Zudem wies die dritte Generation dieser Zelllinien eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber photoinhibitorischen Effekten auf (siehe Abschnitt 5.1.4) (Beckmann et al., 2010). Derart erweist sich die letzte Generation dieser Mutanten-Linie ebenfalls als ein vielversprechender Kandidat für Optimierungen, in denen die Produktion von Wasserstoff im Fokus steht, allerdings sind hierfür weitere Analysen essentiell (siehe Abschnitt 5.1.4.3).

Wie auch die Daten der Mutante *Stm6Glc4T7* demonstrieren ist letztlich das zelluläre Netzwerk der Wasserstoffproduktion noch nicht im Detail verstanden. Jedoch gibt der nun mit der vorliegenden Arbeit abgeschlossene, systembiologische Ansatz (in Kooperation mit Doebbe et al., 2010 und Nguyen et al., 2011) mit einer stark H₂ produzierenden *Chlamydomonas* Mutante detaillierte Einblicke in die biochemische Funktionsweise durch die Analyse von Transkripten, Proteinen und Metaboliten. Mit dieser Arbeit konnten Ergebnisse untersucht und bestätigt werden, die sich physiologisch auf mehreren Ebenen verifizieren ließen (siehe einzelnen Abschnitte der Stoffwechselwege u.a. Schwefelstoffwechsel, Photosynthese und Calvin Zyklus, Stärke-Assimilation und –degradation, Fermentation).

	Transkriptom	Proteom	Metabolom
Schwefel Transport und Assimilation	▲	▲	n.d.
PS I & PS II	▼	▼	n.d.
Calvin Zyklus	▼	▼	n.d.
Citrat Zyklus	▼	▼	▼
Fermentation	▲	▲	▲
Stärke Abbau	▲	▲	▲
Pentose-Phosphat Weg	▲	▲	n.d.

Abbildung 61: Dargestellt sind die Ergebnisse der einzelnen -omics Untersuchungen des systembiologischen Ansatzes. Die Untersuchung erfolgte auf drei zellulären Ebenen (in Kooperation mit Doebbe et al., 2010 und Nguyen et al., 2011) mit Zellmaterial aus aeroben (t0) und anaeroben (t4, t6) *Chlamydomonas* Kulturen (Wildtyp (*cc406*) im Vergleich zu *Stm6Glc4*). Rot markierte Dreiecke signalisieren eine verstärkte Expression in t4/t6, während schwarze Dreiecke ein reduziertes Expressionslevel darstellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegenden Daten sehr gut mit den parallel durchgeführten Transkriptom- und Metabolomuntersuchungen übereinstimmen (Abbildung 61) (Nguyen et al., 2011, Doebbe et al., 2010). Sowohl in der Transkriptom- als auch in der Metabolom-Studie konnte für viele Beispiele der gleiche Trend nachgewiesen werden.

Desweiteren ist die Analyse des Proteoms ein wichtiger Bestandteil der systematischen Funktionsanalyse, da hier anders als bei den molekularen Transkript-Untersuchungen Aussagen über die aktuell in der Zelle vorhandenen Proteinmengen gemacht werden konnten. Während für die mitochondrielle Atmungskette, sowie für den photosynthetischen Elektronentransport, keine Metabolite in die Studie mit einfließen und somit die Untersuchungen des Metaboloms keine Übereinstimmungen liefern können, konnten die detektierten Proteomdaten interessante Einblicke in die Physiologie und damit in das Verständnis der Wechselwirkung zwischen Chloroplast und Mitochondrium liefern (siehe Abschnitt 5.4.3). Somit lieferten die Proteom-Daten der photosynthetischen Elektronentransport Komponenten, als auch der mitochondriellen Atmungskette eine gute Erklärung für den schnelleren Wechsel der Mutante hin zur Anaerobie unter Schwefelmangel. Diese Daten waren sowohl im guten Einklang mit den Φ PS II Fluoreszenzmessungen (siehe Abschnitt 5.3.2), als auch mit den Messungen zur Atmungsaktivität (siehe Abschnitt 5.4.3.3).

6. Diskussion

Die Nutzung von Mikroalgen in großtechnischen Ansätzen ist für viele industrielle Zweige von zunehmender kommerzieller Bedeutung. Sowohl die Lebensmittelindustrie, die Chemie- und Pharmaindustrie, als auch im Bereich der regenerierbaren Energiequellen sind photobiologische Produktionsprozesse von großem Interesse (Zaborsky, 1998). Im Laufe der Evolution haben Grünalgen Lichtsammelsysteme entwickelt, welche perfekt an das Sammeln von Licht unter Schwachlichtbedingungen angepasst sind, womit ihre Konkurrenzfähigkeit im natürlichen Lebensraum erhöht wird. (Kirk, 1994). Pflanzliche Biomasse ist in den vergangenen Jahren zunehmend als eine nachhaltige und klimafreundliche Energieressource diskutiert worden. Der Erfolg bzw. die wirtschaftliche Tragfähigkeit von Konzepten zur Nutzung von phototrophen Mikroorganismen als erneuerbarer Energieträger hängt dabei von der Effizienz ab, mit der Sonnenenergie in Biomasse umgewandelt wird. Große Antennensysteme, die Algen unter natürlichen Lebensbedingungen konkurrenzfähig machen, haben einen deutlichen Nachteil im Rahmen ihrer biotechnologischen Nutzung. Zum einen führen sie zu einer geringen Lichtpenetration und stehen somit einem Erreichen hoher Zelldichten in Photo-Bioreaktoren im Weg. Zum anderen wird ein großer Teil (80-90%) der absorbierten Lichtenergie nicht photochemisch genutzt und dient somit nicht der Erzeugung von Biomasse (Polle et al., 2003). Eine Hitze-Dissipation angeregter Zustände im Rahmen des *non-photochemical quenching* gehört zu den wichtigsten Lichtakklimations-Prozessen als schnelle Antwort auf eine Erhöhung der Lichteinstrahlung (Muller et al., 2001), ist jedoch auch verantwortlich für eine, aus Sicht des Biotechnologen, zu geringe PCE (*photosynthetic conversion efficiency*)-Rate. In Kulturen mit hoher Zelldichte, in großen Bioreaktoren, kann die Anzahl der LHC-Proteine Probleme verursachen, da die Umwandlungseffizienzen aufgrund der Energie-Dissipation und der Beschattungseffekte limitierend ist. Neben ihrer essentiellen Rolle im Lichteinfang, besitzen die LHC-Untereinheiten eine wichtige Funktion bei der Reduktion von oxidativen Schäden (Anderson & Andersson, 1988). Bestimmte LHC Untereinheiten werden benötigt, um überschüssige Lichtenergie als Hitze oder Fluoreszenz via *non-photochemical quenching* abzugeben, wenn die Lichteinstrahlungen photosynthetische Aktivitäten übersteigen. So gehört dieser Schutzmechanismus einerseits zu einer wichtigen Überlebensstrategie, andererseits reduziert dieser drastisch die photosynthetische Umwandlungseffizienz (PCE-Rate) und die Biomassenproduktion (Prince & Kheshgi, 2005). Mikroalgen verfügen über eine Vielzahl regulatorischer Mechanismen, um ihr Lichtsammel-System an das sich permanent ändernde Lichtangebot zu adaptieren. Im Rahmen der Langzeit-Akklimation des Lichtsammelsystems an veränderte Lichtbedingungen findet eine

Modulation der LHCII-Genexpression statt (Wobbe et al., 2008). Dabei wird die Expression der LHCII-Gene auf verschiedenen Ebenen reguliert. Eine Regulation der Transkriptions-Initiationsrate in Abhängigkeit von retrograden Signalen aus dem Chloroplasten (Chen et al., 2010) sowie die Kontrolle der cytosolischen Translation von LHCII-mRNA (Mussgnug et al., 2005) wurden bereits als wichtige Ansatzpunkte regulatorische Mechanismen beschrieben. Gezielte gentechnologische Eingriffe in bekannte Mechanismen stellen daher eine Strategie zur Erzeugung von neuen Zelllinien dar, welche ein verkleinertes Antennensystem besitzen.

Wasserstoff, hergestellt in photosynthetischen Mikroorganismen, kann als erneuerbarer und klimafreundlicher Energieträger angesehen werden. Die für diesen Prozess benötigte Energie wird von der größten zur Verfügung stehenden Energiequelle überhaupt, der Sonne, bereit gestellt und die Verbrennung des erzeugten Wasserstoffs führt zu keiner zusätzlichen Belastung der Atmosphäre mit Kohlenstoff-Dioxid, wenn phototrophe Mikroorganismen genutzt werden. Verschiedene Grünalgen-Spezies und einige zu den Cyanobakterien gezählte photosynthetische Prokaryoten besitzen die Fähigkeit zur lichtgetriebenen Wasserstoffproduktion. (Melis et al., 2000; Masukawa et al., 2004) In *Chlorophyta* wie *Chlamydomonas reinhardtii* ist die Fähigkeit zur Wasserstoffproduktion an die photosynthetische Elektronentransportkette in den Thylakoidmembranen gekoppelt. Die Reaktion wird von einem spezifischen, extrem sauerstoff-sensitiven Enzym, der (Fe-Fe)-Hydrogenase HydA1, katalysiert (Happe & Kaminski, 2002). Während der Photolyse des Wassers wird an Photosystem II Sauerstoff produziert. Die Inkompatibilität der Wasserspaltung und der H₂ Produktion kann durch Induktion von Anaerobie ausgelöst durch Schwefelmangel in einem zweistufigen Kultivierungsprozess umgangen werden (Melis et al., 2000). Das Fehlen von Schwefel im Medium erzwingt eine drastische Umstellung des zellulären Stoffwechsels. Zu den, im Zusammenhang mit Wasserstoffproduktion, wichtigsten Effekten des Schwefelmangels gehören die partielle Inaktivierung von PS II und des Calvin-Benson-Zyklus, wobei insbesondere die PS II-Inaktivierung auf einer gehemmten Proteinbiosynthese unter Schwefelmangel beruht (Melis et al 2000), welche zu einer Beeinträchtigung des PS II-Reparaturzyklus führt. Eine reduzierte Aktivität von PS II lässt die photosynthetische O₂-Produktion unter den respiratorischen Verbrauch sinken, so dass anaerobe Bedingungen für eine Induktion der Wasserstoff-Produktion etabliert werden. Unter diesen Bedingungen werden Elektronen zunächst auf Ferredoxin übertragen und anschließend durch die Hydrogenase genutzt um die Reduktion von Protonen zu katalysieren. (Antal et al., 2011).

Jedoch sind die derzeit beschriebenen Biowasserstoffproduktionsraten und somit die Effizienzen des Prozesses für eine kommerzielle Nutzung noch nicht ausreichend, (Kruse et al., 2005a). Seit Melis und Mitarbeiter mittels der zweistufigen Kultivierungsmethode die anhaltende Wasserstoffproduktion etabliert haben (Melis et al., 2000), wurden viele molekulargenetische und physiologische Untersuchungen durchgeführt, um detaillierte Einblicke in den Wasserstoffproduktionsprozess zu erhalten. Ein Ziel dieser Untersuchungen war es Konkurrenzreaktion und inhibitorische Effekte zu identifizieren und zu eliminieren, um so die H₂-Produktion in *Chlamydomonas reinhardtii* weiterhin zu steigern (Kruse & Hankamer, 2010).

Die vorliegende Arbeit setzt sich aus zwei unterschiedlichen Methoden und Vorgehensweisen zusammen, jedoch verfolgen beide Strategien dasselbe Ziel. Dieses besteht in einer Optimierung der Lichtkonversions-Effizienz. In einem Fall steht dabei die Umwandlung von Licht in Biomasse im Vordergrund, im anderen Fall die Nutzung absorbierter Lichtenergie zur Produktion von Wasserstoff. Generell ist ein effizienter Aufbau von Biomasse die Grundlage für jegliche ökonomische Nutzung von Grünalgen unabhängig davon, ob nachhaltig Biodiesel, Wasserstoff oder Hochwertprodukte hergestellt werden sollen.

Eine der beiden gewählten Strategien setzt direkt am Photosynthese-Apparat an, indem das Photosystem II-assoziierte Lichtsammelsystem durch gentechnologische Manipulation verkleinert werden soll. Der andere Ansatz basiert auf einer Proteom-Studie zur Charakterisierung des photobiologischen H₂ Produktionsprozesses nach Induktion durch Schwefelmangel.

Während des vorliegenden Projektes sollten die besten Konditionen für optimale Wasserstoffproduktionskapazitäten von *Chlamydomonas reinhardtii* cc406 (Wildtyp) und der Mutante *Stm6Glc4* bestimmt und verglichen werden, um unter definierten physiologischen Parametern das Proteom unter aeroben und anaeroben Bedingungen zu analysieren. Diese Methode wurde im speziellen Fall für einige Proteine mit parallel durchgeführten biochemischen Analysen verifiziert. Derartige Einblicke sollten das Verständnis des H₂ Produktionsprozesses verbessern. Zunächst wurden zwei Wildtypen untersucht, um einen geeigneten Vergleichsstamm auswählen zu können. Desweiteren wurden zwei verschiedene Techniken der Proteom Untersuchung (unter Standard-Konditionen als auch unter H₂ produzierenden Bedingungen) angewendet. Auf diese Art wird eine Datenbasis für nachfolgende Untersuchungen geschaffen, um Zelllinien mit einer verbesserten Fähigkeit zur H₂ Produktion zu generieren. Identifizierte Zielgene können in zukünftigen Projekten gezielt manipuliert und die Funktion kodierter Proteine

im Kontext der Wasserstoffproduktion durch biochemische und physiologische Untersuchungen näher untersucht werden, um ihre Eignung als Ansatzpunkt für ein „strain engineering“ zu validieren.

6.1 Erzeugung einer neuen Zelllinie *Stm6Glc4T7* mit einer verkleinerten Lichtsammelantenne

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin eine *Chlamydomonas*-Mutante zu erzeugen, welche eine geringere Menge an Lichtsammelproteinen akkumuliert. Eine Verkleinerung des PS II- assoziierten Lichtsammelkomplexes sollte zum einen zu einer effizienteren Nutzung des Lichtes beitragen, und zum anderen eine höhere Starklicht-Toleranz bewirken. Des Weiteren erhoffte man sich eine verbesserte Lichtpenetration in phototrophen Kulturen der neuen Zelllinie.

6.1.1 Gründe für die Auswahl der Mutante *Stm6Glc4* als parentalen Stamm

Die in der vorliegende Arbeit als Parentalstamm verwendete Zelllinie *Stm6Glc4* ist aus der Lichtakklimatisations-Mutante *Stm6* (*state transition mutante 6*) hervor gegangen. Es gibt eine Reihe zellulärer Reaktionen, die einen optimalen Elektronenfluss zur Hydrogenase beeinträchtigen, weil eine Konkurrenz um die benötigten Reduktionsäquivalente besteht. In *Stm6* sind einige dieser Konkurrenz-Reaktionen stark eingeschränkt, wodurch ein sehr interessanter Phänotyp im Hinblick auf die Wasserstoffproduktionskapazitäten entsteht. Zudem weisen die Proteom-Daten sehr interessante Übereinstimmungen und Erweiterungen zu Schönfelds Arbeiten auf (Schönfeld et al., 2004, siehe Abschnitt 5.4.3), weshalb an dieser Stelle auch die Erstellung und die wesentlichen Eigenschaften von *Chlamydomonas reinhardtii Stm6* beschrieben werden sollen.

Die Identifizierung und detaillierte molekulargenetische Charakterisierung der Mutante *Stm6* belegte, dass hier das Kerngen *moc1* deletiert ist (Schönfeld et al, 2004). Das kodierte Protein gehört der Familie der mTERF (*mitochondrial transcription termination factor*)-Proteine an, die bereits in einigen Vielzellern sowie in einzelligen Grünalgen, nicht aber in Pilzen identifiziert wurden (Linder et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass *MOC1* in die Mitochondrien dirigiert und lichtabhängig exprimiert wird (Schönfeld et al., 2004). Das Fehlen dieses Transkriptionsfaktors in der Mutante *Stm6* resultiert in einer starken Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien und hat weiterhin starke Auswirkungen auf die Physiologie des Chloroplasten. Zu den Auswirkungen einer beeinträchtigten mitochondrialen Funktion gehört die Arretierung

der Zellen im sogenannten LHC *state I* und folglich eine sehr starke Einschränkung des zyklischen Elektronentransports um Photosystem I (Kruse et al., 2005b), der eine Anlagerung von LHCII-Komplexen an PS I im Rahmen des Überganges von *state I* zu *state II* erfordert (Finazzi et al., 2002). Der zyklische Elektronentransport steht in direkter Konkurrenz zur Hydrogenase-Reaktion, welche die Elektronen zur Reduktion von Protonen benötigt. Daher hatte der Defekt im zyklischen Elektronentransport eine stark gesteigerte Wasserstoffproduktion zur Folge (Kruse et al., 2005b)(siehe Abschnitt 5.3.4).

Des Weiteren weist *Stm6* eine reduzierte Aktivität der rotenon-insensitiven NADPH-Dehydrogenase auf. Diese Aktivitätsminderung hat zur Folge, dass die im Chloroplasten gebildeten Reduktionsäquivalente, welche über *shuttle*-Systeme (z.B. Malat-Ventil) aus dem Chloroplasten exportiert werden, nicht in den Mitochondrien zur oxidativen Phosphorylierung genutzt werden können. Die gestörte Funktion der Mitochondrien in *Stm6* als „*electron sink*“ könnte eine Ursache für die erhöhte Stärkeeinlagerungen im Chloroplasten der Mutante sein (Kruse et al., 2005b). So verfügt *Stm6* auch unter anaeroben Bedingungen über sehr große Stärkedepots. Der Abbau dieser Depots und die anschließende Einschleusung entstehender Produkte in die Glykolyse führt zu einer Bildung von Reduktionsäquivalenten, die möglicherweise über eine NAD(P)H:Plastoquinonoxidoreduktase (Burrows et al., 1998; Sazanov et al., 1998a, b; Happe et al., 2002; Desplats et al., 2009; Jans et al., 2008) in den photosynthetischen Elektronentransport einfließen und damit für die Hydrogenase zur Synthese von H₂ verfügbar wären (Kruse et al., 2005b).

Weiterhin weist *Stm6* eine gesteigerte Aktivität der Alternativen Oxidase (AOX1) auf. Daraus ergibt sich eine niedrige intrazelluläre Konzentration an gelöstem Sauerstoff, die nur 40% von der des Wildtypen beträgt (Kruse et al., 2005b). Dieses Ergebnis passt ebenfalls sehr gut zu den mit *Stm6Glc4* erhaltenen Proteom-Daten, die zudem auch weiter verifiziert werden konnten (siehe Abschnitt 5.4.3.2). Abhängig von den Kulturbedingungen liegt die Kapazität von *Stm6* zur Wasserstoff Produktion 4,5 – 13 x über der des Wildtypen (Kruse et al., 2005b).

Stm6Glc4 ging aus der Mutante *Stm6* hervor, welche mit einem Hexose- H⁺-Symporter aus der einzelligen Grünalge *Chlorella kesslerie* (*hexose uptake protein, HUPI*) transformiert wurde. Nach heterologer Überexpression von *HUPI* war die selektierte Mutante *Stm6Glc4* befähigt externe Glukose aufzunehmen, was unter anaerober Schwefeldepletion in einer stärkeren H₂ Produktion im Vergleich zu *Stm6* und ausgewählten Wildtypen resultierte (Doebbe et al., 2007). Der Abbau von Stärke zur Erzeugung von Reduktionsäquivalenten und die PS II-unabhängige Reduktion des

mobilen Elektronen-Carriers Plastoquinon sind für den H₂ Produktionsprozess von essentieller Bedeutung (Fouchard et al., 2005) und so konnten Doebbe und Mitarbeiter (2007) erfolgreich demonstrieren, dass die Zufütterung von Glukose eine interessante und vielversprechende Strategie war, um die H₂ Produktion in *Chlamydomonas reinhardtii* weiter zu verbessern. Die Idee bestand darin, dass Reduktionsäquivalente aus dem Abbau aufgenommener Glukose-Moleküle über eine NADH-Dehydrogenase in die Elektronentransportkette eingeschleust werden damit auch unter Bedingungen reduzierter PS II-Aktivität der Elektronenfluss hin zur Hydrogenase aufrechterhalten bleibt (Cournac et al., 2000b; Cournac et al., 2000a; Happe et al., 2002; Peltier and Cournac, 2002; Desplats et al., 2009; Jans et al., 2008).

6.1.2 Die gezielte De-Regulation der cytosolischen Translation von LHCBII mRNAs als Strategie zur Verkleinerung der Lichtsammelantenne

In Grünalgen und höheren Pflanzen wird die Menge an gebildeten Lichtsammelproteinen durch cytosolische Translationskontrolle reguliert (Wobbe et al., 2008). In der Arbeitsgruppe von Prof. Olaf Kruse wurde im Rahmen eines *forward genetics*-Ansatzes die Insertionsmutante *stm3* identifiziert, deren Phänotyp durch eine erhöhte Akkumulation von PS II-assoziierten Lichtsammelproteinen (LhcbMs) gekennzeichnet ist. Das in der Mutante deletierte Kerngen, kodiert für das RNA-bindende Protein NAB1. Dieses cytosolische Protein bindet selektiv an einzelne Lhcbm-Isoform-abhängige mRNAs und sequestriert diese in subpolysomalen mRNP (*messenger ribonucleoprotein*)-Komplexen. Somit sind die Transkripte nicht mehr für Translations-Initiationsfaktoren zugänglich. Interessanterweise zeigt NAB1 neben einer generellen Erkennung von Lhcbm mRNAs eine starke Selektivität gegenüber distinkten Isoform-Transkripten aus der hoch-homologen *LHCBM*-Genfamilie. Insbesondere die mRNA des *LHCBM6*-Gens wird mit hoher Affinität gebunden (Mussgnug et al., 2005). Die C-terminale RRM (*RNA recognition motif*) Domäne von NAB1 besitzt 2 Cystein-Reste in Position 181 und 226. In einem zielgerichteten Mutagenese-Ansatz wurden diese beiden Cysteine gegen Serine ausgetauscht (Wobbe et al., 2009). NAB1*, die mutierte Version von NAB1, wurde dann genutzt, um die *NAB1*-Insertionsmutante zu komplementieren. Der resultierende Phänotyp unterschied sich drastisch von dem, der mit der Wildtyp-NAB1-Sequenz komplementierten Mutante. Phänotypische Untersuchungen zeigten, dass die Cystein-Doppelmutante einen hellgrünen Phänotyp besitzt, der auf einer stark verkleinerten Lichtsammelantenne beruht. *In vitro*-Studien mit dem rekombinanten Wildtyp-NAB1-Protein und einer Cystein-Einzelmutante (Cys226Ser) zeigten, dass eine Modifikation von Cysteinresten, insbesondere von Cys226, zu einer reduzierten RNA-Bindeaktivität

führt. Die Cystein-Doppelmutante ähnelt der vollständig reduzierten Form von NAB1, in der beide Cysteine in der Thiol-Form vorliegen. Im Unterschied zu der Dithiol-Form des Wildtyp-Proteins kann in der Doppelmutante NAB1* jedoch keine Thiol-basierte Modifikation mehr stattfinden. Diese Form des Proteins ist demnach in einem permanent aktiven Zustand arretiert.

Diese Erkenntnisse über NAB1 bzw. NAB1* (Wobbe et al., 2009) wurden in einem gentechnologischen Ansatz angewendet, um die stark H₂ produzierende Zelllinie *Stm6Glc4* (Doebbe et al., 2007) bezüglich der Antennen-Regulation am PS II zu modifizieren. Die Selektion und die Charakterisierung des vielversprechendsten Kandidaten *Stm6Glc4T7* bestätigte eindeutig (siehe Abschnitt 5.1.3), dass die permanent aktive Variante von NAB1 (NAB1*) eine Reduktion des LHC-Antennenkomplexes am PS II um 10 – 20 % verursachte (siehe Abschnitt 5.1.2; 5.1.4). Die Bestimmung der photosynthetischen Effizienz und die Analyse photoautotrophen Wachstums unter Starklicht belegte, dass die Reduktion der PS II Antennengröße um etwa 20% für eine beachtliche Steigerung der photosynthetischen Effizienz von PS II ausreicht (siehe Abschnitt 5.1.2.2; 5.1.2.2.1; 5.1.2.2.2). Weiterhin konnte die Empfindlichkeit gegenüber photoinhibitorischen Effekten unter Starklicht vermindert werden, was sich in Form einer geringeren Abnahme der Φ PS II Raten nach Erhöhung der Lichtstärke (siehe Abschnitt 5.1.4.1) zeigte. In guter Übereinstimmung mit den Messungen zur Bestimmung der Φ PS II Raten in Abhängigkeit der Lichtstärke produzierte *Stm6Glc4T7* unter Starklicht größere Mengen an Sauerstoff als der Parentalstamm (siehe Abschnitt 5.1.4.2).

Insbesondere die höhere photosynthetische Quanten-Ausbeute Φ PS II von *Stm6Glc4T7* unter Starklicht zeigte, dass in der neuen Zelllinie ein geringerer Anteil der aufgenommenen Lichtenergie als Hitze dissipiert oder Fluoreszenz re-emittiert wurde (siehe Abschnitt 5.1.4.1). Folglich resultierte die genetische Modifikation in einer schnelleren Biomassenakkumulation und zudem erreichten *Stm6Glc4T7* Zellkulturen eine höhere maximale Zelldichte als der Kontrollstamm *Stm6Glc4* (siehe Abschnitt 5.1.2.2.1; 5.1.2.2.2).

Rückschließend lässt sich basierend auf den vorliegenden Ergebnissen postulieren, dass die gezielte Reduktion der Antennengröße ein neues, vielversprechendes Werkzeug für die Erzeugung optimierter Zelllinien mit höherer Starklicht-Toleranz und einer gleichmäßigeren Verteilung des Lichtes innerhalb dichter Zellkulturen darstellt. Weiterhin unterstreicht der *Stm6Glc4T7* Phänotyp perfekt frühere Ergebnisse die mittels RNAi Ansätzen erhalten worden sind (Musgnug et al., 2005) und hat zudem eine Bedeutung für biotechnologische Anwendungen, in welchen zunehmend Mikroalgen als

alternative pflanzliche Biomasse genutzt werden (Puls & Gross, 2004; Hankamer et al., 2007). Die kommerzielle Anwendung von Mikroalgen im Bereich regenerierbarer Energiequellen ist von vielen Faktoren, u.a. den Kosten-Nutzen-Berechnungen, abhängig. Dabei ist die photosynthetische Produktivität von besonderer Wichtigkeit.

Mit der Mutante *Stm6Glc4T7* (Beckmann et al., 2010) konnte gezeigt werden, dass durch eine Reduktion der Lichtantennengröße von 10 – 17 % eine 50 %ige Steigerung der photosynthetischen Effizienz unter Starklichtbedingungen erreicht werden kann. Die Wasserstoffproduktion in *Chlamydomonas* wird durch ein zweistufigen Prozess induziert (Melis et al., 2000), der in zwei verschiedene Phasen aufgeteilt werden kann. In der ersten Phase wird in Schwefel-haltigem Medium Biomasse hergestellt, welche dann in der zweiten Phase und nach Entzug des Schwefels zur Produktion von H₂ genutzt wird. Auch wenn *Stm6Glc4T7* nach einer Einstellung gleicher Zelldichten nicht mehr Wasserstoff als der Parentalstamm produzierte (siehe Abbildung 5.1.4.3), ist der schnellere Aufbau der Biomasse von großem Vorteil, wenn der gesamte Prozess der Wasserstoffproduktion berücksichtigt wird. In einem vorangegangenen Experiment demonstrierten Mussnug und Mitarbeiter (2007) in einem zielgerichteten RNAi-Ansatz die Steigerung der photosynthetischen Effizienz durch eine drastisch reduzierte Lichtantenne-Größe. In der *Chlamydomonas* Mutante *Stm3LR3* wurden, im Gegensatz zu *Stm6Glc4T7*, die mRNA-Mengen sowohl von PS I- als auch von PS II-assoziierten Lichtsammelproteinen stark reduziert. Diese Mutante zeigte, ebenso wie *Stm6Glc4T7*, unter hohen Lichtstärken eine Steigerung der photosynthetischen Umwandlungsrate. Jedoch ist gut dokumentiert, dass ein durch RNAi hervorgerufener Phänotyp nach gewisser Zeit an Stabilität verlieren kann (Yamasaki et al., 2008). Deshalb beabsichtigte die vorliegende Arbeit die Reduktion des LHC Lichtsammelkomplexes durch die stabile Überexpression des permanent aktiven NAB1*. Der Vorteil dieses Ansatzes war die Repression der LHC-Antennen-Protein-Biosynthese mittels eines genetisch modifizierten Translationsrepressors NAB1*, womit die RNAi Technik umgangen werden konnte. Für zukünftige Anwendungen wird diese Technik als eine stabile und damit langläufigere Methode angesehen. Auch Durnford und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die post-transkriptionelle Regulation der *LHCBM*-Gene unter Starklichtbedingungen zu einer starken Reduktion der LHCBM Proteinmengen führte (Durnford et al., 2003).

6.2 Proteom-Studie als Bestandteil eines systembiologischen Ansatzes zur Charakterisierung der Wasserstoffproduktion in *Chlamydomonas reinhardtii*

Nach der Induktion von Schwefelmangel, mit dem Ziel die Wasserstoffproduktion in *Chlamydomonas reinhardtii* einzuleiten, reagiert der Einzeller mit einer Vielzahl von Antwortmechanismen. Ein ausgeprägter fermentativer Stoffwechsel in *C. reinhardtii* (Grossman et al., 2011) kann gut mit der Lebensweise dieser Grünalge als Bodenbewohner erklärt werden. Als terrestrische Alge (Zancan et al., 2006) durchlebt *Chlamydomonas reinhardtii* permanent anoxische Phasen, welche insbesondere zur Nachtzeit auftreten, wenn phototrophe Mikroorganismen keinen Sauerstoff produzieren. *Chlamydomonas reinhardtii* wird sowohl in terrestrischen als auch in aquatischen Ökosystemen gefunden und die Ubiquität dieser Spezies legt nahe, dass effiziente Mechanismen zur Aufnahme von Makroelementen wie Schwefel bestehen (Gonzales-Ballester et al., 2010). Unter H₂-Produktionsbedingungen hat eine *Chlamydomonas reinhardtii*-Zelle zum einen auf einer verminderte Verfügbarkeit von Schwefel, zum anderen auf die Abwesenheit von Sauerstoff zu reagieren, indem eine Modulation des Stoffwechsel weiterhin die Bereitstellung von ATP und NAD(P)H garantiert.

Um die H₂ Produktion in *Chlamydomonas reinhardtii* kontinuierlich zu verbessern ist ein detailliertes Verständnis der Hauptstoffwechselwege unter anaeroben Konditionen von fundamentaler Bedeutung. Dieser zweite Forschungsschwerpunkt der vorliegenden Studie basiert auf einer Analyse des kompletten Proteoms anhand einer massenspektrometrischen Untersuchung, um Protein-Abundanzen von *Chlamydomonas reinhardtii* unter wasserstoffproduzierenden Bedingungen zu vergleichen.

Mit der vorliegenden Studie werden weitere Erkenntnisse und Einblicke auf Ebene des Proteoms samt physiologischen Verifizierungen geliefert, welche die höhere Produktivität der stark H₂ produzierenden Mutante *Stm6Glc4* erklären können. *Stm6Glc4* hat eine im Vergleich zum Wildtypen deutlich gesteigerte Wasserstoffproduktionskapazität (Kruse et al., 2005; Doebbe et al., 2007) und gehört zu den, derzeit in der Literatur beschriebenen, am stärksten produzierenden *Chlamydomonas reinhardtii* Zelllinien (Kruse et al., 2005; Doebbe et al., 2007; Torzillo et al., 2009). Das Zellmaterial beider Zelllinien wurde jeweils aus der aeroben und anaeroben Phase entnommen, um ein Bild von den sich verändernden Stoffwechselwege zu erhalten. Die quantitativen Proteom-Studien der vorliegenden Arbeit, lieferten neue Erkenntnisse über im Wildtyp und in der Mutante *Stm6Glc4* differenziell regulierte Proteine und somit neue Anfangspunkte für weitere Untersuchungen mittels reverser Genetik. Gezielte Mutagenese der Gene, deren Proteine

in der Mutante vermehrt oder vermindert gebildet werden, kann eine Verwertung der erhaltenen Daten darstellen. Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung potentieller Zielgene wäre die Herstellung von *knock-down* Zelllinien, in denen die Menge eines Proteins stark verringert ist.

Abgesehen von der Optimierung der H₂ Produktion bzw. der fermentativen Prozesse in *Chlamydomonas reinhardtii*, kann durch bereits erhobene Transkript-, Metabolom- und Proteom-Daten ein Spektrum an Änderungen, die während der Anaerobie auftreten, beschrieben werden (Zhang et al., 2004; Mus et al., 2007; Nguyen et al., 2008; Timmins et al., 2009; Doebbe et al., 2010; Chen et al., 2010; Nguyen et al., 2011). Um solide Aussagen über die Funktion von Genen zu erhalten, müssen biologische Systeme jedoch auf mehreren zellulären Ebenen parallel untersucht werden. Transkript-Profile, erstellt mit *DNA-Microarrays*, stellen wichtige Daten hinsichtlich der transkriptionellen Regulation bestimmter Gene zur Verfügung. Hierarchische Cluster-Analysen können zusätzlich regulatorische Netzwerke identifizieren. Jedoch zielen Metabolom-Untersuchungen auf einen Schnappschuss der metabolischen Aktivität zu einem gegebenen Zeitpunkt ab. Damit stellt diese *omics*-Technik einen wichtigen Zusatz zu Transkriptom- und Proteom-Studien dar, da hier Rückschlüsse auf die Aktivität einzelner Enzyme und ganzer Stoffwechselwege gezogen werden können (Stitt, 1990; ter Kuile & Westerhoff, 2011). Proteom-Studien stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen Transkriptom- und Metabolom-Studien dar, da die Mengen an mRNA nicht immer direkt mit der Menge an Protein korreliert ist (z.B. aufgrund einer veränderten Translationseffizienz). Schlechte Übereinstimmungen von Transkriptom- und Metabolom-Daten können daher durch zusätzliche Proteom-Daten erklärt werden. Die vorliegenden Proteom-Untersuchungen waren Teil eines systembiologischen Ansatzes, dessen Ziel ein ganzheitlicher Eindruck des regulatorischen Netzwerkes der H₂ Produktion in *Chlamydomonas reinhardtii* war.

6.2.1 Photobiologische Wasserstoffproduktion

Die Mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii* wird als einer der besten eukaryotischen Wasserstoff-Produzenten bezeichnet. Basierend auf etlichen experimentellen Informationen ist mittlerweile bekannt, dass die photosynthetische Mikroalge über einen komplexen Metabolismus verfügt, der nicht nur unter aeroben Bedingungen respiriert, sondern auch über fermentative Prozesse unter anaeroben Konditionen energiereiche Äquivalente aufbauen kann (Mus et al., 2007; Posewitz et al., 2009; Timmins et al., 2009; Doebbe et al., 2010; Terashima et al., 2010; Chen et al., 2010; Nguyen et al., 2011). Diese metabolische Flexibilität ermöglicht die Akklimatisierung an sauerstoffreiche und

sauerstoffarme Konditionen unter nicht kontrollierbaren äußeren Umweltbedingungen. Zudem wird die Verwendbarkeit dieser Alge aufgrund des 2007 annotierten Genoms weiterhin gesteigert (Merchant et al., 2007).

Die Synthese von Wasserstoff in *Chlamydomonas reinhardtii* erfolgt in Abwesenheit von Sauerstoff und wird durch das extrem sauerstoff-sensitive Enzyme (HydA1) katalysiert (Happe & Naber, 1993). Um eine langanhaltende Wasserstoffproduktion aufrechterhalten zu können etablierten Melis und Mitarbeiter einen sog. Zwei-Phasen-Prozess (Melis et al., 2000), bei dem die Entwicklung des Sauerstoffs und die Produktion von Wasserstoff zeitlich voneinander getrennt wurden. Mit diesem Zwei-Phasen-Protokoll gelang Melis und Mitarbeitern der Durchbruch. Die erste, aerobe Phase dient der Kultivierung der Zellen, in welcher Biomasse generiert wird. In der zweiten anaeroben Phase, welche durch Schwefelmangel induziert wird, kann der Metabolismus umgestellt werden. Die Induktion von Wasserstoff durch Schwefelmangel wurde zur Methode der Wahl, um schrittweise die Wasserstoffproduktion in *Chlamydomonas reinhardtii* zu optimieren (Timmins et al., 2009; Doebbe et al., 2010; Chen et al., 2010; Nguyen et al., 2011). Dieses Zwei-Phasen-Protokoll ermöglichte nicht nur eine effiziente Methode für den Wechsel vom photosynthetischen Wachstum hin zur Photoproduktion von Wasserstoff, sondern bot eine zweckmäßige Plattform für tiefgreifende Untersuchungen der Wasserstoffproduktion in *Chlamydomonas*. Eine Vielzahl von Experimenten wurde auf der Basis dieses Protokolls durchgeführt (Melis et al., 2000; Zhang et al., 2002; Kosourov et al., 2002; Kosourov et al., 2003; Antal et al., 2003; Posewitz et al., 2004; Kruse et al., 2005; Mus et al., 2005; Surzycki et al., 2007; Hemschemeier et al., 2008; Chochois et al., 2009). Jedoch weist der Prozess der Wasserstoff Produktion auch Limitationen auf, weshalb molekular genetische Manipulationen zur Verbesserung des Prozesses erforderlich sind. Dafür sind gründliche Untersuchungen der Stoffwechselwege essentiell, um metabolische Konsequenzen der genetischen Interventionen abschätzen zu können (Zhang et al., 2004; Mus et al., 2007; Nguyen et al., 2008; Timmins et al., 2009; Doebbe et al., 2010; Chen et al., 2010; Nguyen et al., 2011). Mittlerweile sind einige gentechnologische Strategien zur Verbesserung der Wasserstoff-Produktion verwendet worden. Dazu gehörten Mutanten in denen z.B. der Sauerstoff-Konsum modifiziert oder die Expression der Sulfat-Permease reprimiert wurde (Wu et al., 2010; Chen et al., 2005). Weitere Targets waren die Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (Hemschemeier et al., 2008), die Photosysteme (Polle et al., 2002; Mussgnug et al., 2007; Beckmann et al., 2009), sowie der Abbau von Stärke (Chochois et al., 2009) als auch die Modifikation der Respiration (Rühle et al., 2008).

6.2.2 Frühere Untersuchungen des Proteoms H₂ produzierender *Chlamydomonas reinhardtii* Zellen

Mit Abschluss des *Chlamydomonas* – Genom Projektes im Jahr 2007 (Merchant et al., 2007) startete eine neue Ära in der *Chlamydomonas* Forschung. DNA *microarray* Untersuchungen zeigten, dass mehr als 100 Gene innerhalb der durch Schwefelmangel induzierten Wasserstoffproduktion verstärkt oder verringert exprimiert wurden und somit einer Regulation unter diesen Konditionen unterlagen (Nguyen et al., 2008; Nguyen et al., 2011). Diese Forschungsergebnisse lieferten einen großen Vorteil für das Verständnis des Wasserstoff-Metabolismus auf Basis der Genregulation in *Chlamydomonas*. Auf Proteinebene sind die experimentell erhaltenen Datensätze noch sehr limitiert. Mittlerweile existiert eine sehr umfassende Proteom-Lokalisations-Studie unter anaeroben Konditionen induziert durch Argon Begasung und eine Studie zum löslichen H₂-Proteom unter Schwefelmangel (Terashima et al., 2010; Chen et al., 2010). Frühere Experimente basierend auf SDS-Page Untersuchungen zeigten bereits dramatische Veränderungen der Expressionsprofile innerhalb der durch Schwefelmangel induzierten H₂ Produktion (Melis et al., 2000; Zhang et al., 2002). Allerdings umfassten diese Studien lediglich einen kleinen Ausschnitt des Proteoms, der mittels Westernblot Analyse betrachtet wurde. Diese sehr überschaubare Anzahl von Proteinen stand der Vielzahl unterschiedlich regulierter Gene aus den Transkriptanalysen in keinem Verhältnis gegenüber. Zudem schwebt immer die Frage im Hintergrund, in wieweit die Expressionsprofile, erhalten aus mRNA bzw. aus Protein-Untersuchungen, korrelieren?

6.2.3 Quantitative Proteom-Untersuchung mittels *spectral counting* und ¹⁵N-Markierung

Qualitative und quantitative Untersuchungen des *Chlamydomonas* Proteoms unter aeroben und anaeroben Kondition und gleichzeitigem Vergleich einer effizient produzierenden Wasserstoffmutante *Stm6Glc4* mit einem Wildtypen (*CC406*) erbrachte interessante Einblicke und neue Erkenntnisse. Erkenntnisbringend war zudem die Anwendung zweier unterschiedlicher Methoden. Das Proteom wurde in Abhängigkeit der Zeit und des äußeren Einflusses (Schwefelmangel) in einem *label*-freien Ansatz (*spectral counting*) und nach erfolgter stabiler Isotopen -Markierung betrachtet (¹⁵N). Für die Vermessung der Proteine wurde das LTQ Orbitrap XL hybrid FTMS (LC-MS/MS) (Terashima et al., 2011) genutzt. Die Prozessierung der Trypsin-verdauten Proteine erfolgte in beiden Ansätzen identisch. Um die molekularen Mechanismen der Wasserstoffproduktion zu verstehen wurde in dieser Studie eine 1-D-Gel-Elektrophorese gekoppelt mit der LC-MS-MS Technik genutzt. Der qualitative Ansatz (Identifikation

von Peptiden bzw. Proteinen) konnte mit dem *spectral counting* kombiniert werden. Derart diene das *spectral counting* ebenfalls als Indikator für Protein-Abundanzen und damit für die dynamischen Veränderungen innerhalb der verschiedenen Zeitpunkte. Bei diesem Ansatz wurde jede Kondition (vor der H₂ Produktion (t₀): Wildtyp aerob bzw. Mutante aerob/ während der H₂ Produktion (t₆/t₄): Wildtyp anaerob/ Mutante anaerob) unabhängig voneinander prozessiert und vermessen. Desweiteren wurden ein für *Chlamydomonas* sehr neuer Ansatz zur Bestimmung von Protein-Dynamiken in Abhängigkeit des zeitlichen Verlaufs verwendet. Bei diesem Ansatz wird eine vollständige metabolische Markierung (¹⁵N) mit der massenspektrometrischen Analyse (LC-MS/MS) kombiniert (Mühlhaus et al., 2011). Dabei wurden über das Kulturmedium (TAP) stabile Isotopen (hier: ¹⁵N) *in vivo* in eine der beiden Proteom-Proben eingebracht. Im TAP Medium wurden die stickstoffhaltigen Salze (TAP-Salze, NH₄Cl) durch ¹⁵NH₄Cl ersetzt. Der Vorteil dieser im Vergleich zu anderen Markierungsmethoden sehr günstigen Variante bestand darin, dass die unterschiedlich markierten Probenansätze unmittelbar nach der Zellernte vereinigt und gemeinsam prozessiert werden können. Auf diese Weise finden alle Arbeitsschritte (Trennung im SDS-PAGE, tryptischer Verdau, Elution aus dem Gel) unter absolut identischen Bedingungen statt. Im Massenspektrometer liegen die proteolytisch erzeugten Peptide aus t₀ in der „leichten“ Form und jene aus der Wasserstoffproduktionsphase (t₄, t₆) in der „schweren“ Form vor, worüber die relative Quantifizierung ermöglicht wurde.

Die detektierten Proteine aus dem unmarkierten *spectral counting* Ansatz wurden mittels OMSSA (OMSSA, *open mass spectrometry search algorithm*, Geer et al., 2004) identifiziert. OMSSA ist eine Software für Proteinidentifikationen. Die verwendete Software für Proteinidentifikationen sucht dabei nach Korrelationen zwischen unidentifizierten MS/MS Spektren mit Aminosäuresequenzen der Datenbanken.

QUPE war der verwendete Algorithmus zur Quantifizierung von LC-MS/MS-Daten (partiell-) markierter Peptide (Albaum et al., 2009). QUPE zielte darauf ab, das Verhältnis (Ratio M) zwischen einem vollständig und einem (partiell) markierten Peptid zu berechnen (z.B. synthetisierte Peptide vor oder nach dem *pulse chase*-Experiment). Sofern ein (unmarkiertes) Peptid im LC-MS/MS detektiert wurde, sucht der Algorithmus für jedes zu quantifizierende Peptid automatisch nach der wahren Einbaurate.

Die Kombination aus Massenspektrometrie und Markierung mittels stabiler Isotope ist eine weitverbreitete Methode, um Genexpressionen auf Proteinebene zu vermessen. Oftmals wird jedoch nicht berücksichtigt, dass zwei gegenläufige Prozesse, die Biosynthese und die Degradation, für die Proteinmengen in der Zelle verantwortlich sind.

Trötschel und Mitarbeiter etablierten einen integrativen Ansatz, der sich zum einen für einen hohen Durchsatz an Proteinen eignet und zum anderen Informationen sowohl aus Synthese als auch Degradation vom experimentellen Ansatz bis hin zur Auswertung berücksichtigt. Die Anwendbarkeit des *pulse chase* Ansatzes bis hin zur Auswertung mittels QUPE wurde erfolgreich an dem gut untersuchten Bakterium *Corynebacterium glutanicum* demonstriert (Trötschel et al., 2012; Albaum et al., 2009). Dieser *multilabeling* Ansatz, in dem sowohl mit Stickstoff als auch mit Kohlenstoff markiert wurde, belegte zum einen die Darstellung des Proteinumsatzes und bestätigte desweiteren sehr erfolgreich die statistische Auswertung mittels QUEPE. Obwohl diese Software ursprünglich in Bakterien Anwendung fand, konnte mit der vorliegenden Arbeit sehr erfolgreich die Anwendung an niederen Eukaryoten bestätigt und damit übertragen werden. Gerade weil QUPE auf *pulse chase* Experimente ausgelegt war, in denen nur partiell markierte Peptide ausgewertet wurden, fand QUPE in der vorliegenden Arbeit sehr zweckvoll Anwendung, da nicht alle Peptide des Wildtypen zu 100 % markiert waren. Trotz absolut identischer Behandlung lagen die Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante durchschnittlich bei 30%. Während die Einbaurate der Mutante 100 % betrug, reduzierte diese sich auf durchschnittlich 70 % im Wildtyp.

Mühlhaus und Mitarbeiter demonstrierten den ersten ^{15}N -markierten Versuchsaufbau für *Chlamydomonas reinhardtii*, um Protein-Dynamiken als Antwort auf Hitzestress zu untersuchen (Mühlhaus et al., 2011). Quantitative Proteom-Untersuchungen zielen darauf ab, Proteine unterschiedlichster biologischer Herkunft (gesundes Gewebe; pathogenes Gewebe) oder unterschiedlichster Behandlungsweisen (plus Schwefel; minus Schwefel) zu identifizieren, zu quantifizieren und zu vergleichen. Der Vorteil der *in vivo* Markierung liegt darin, dass es nicht zu Kreuzreaktionen kommen oder zu inkompletten Markierungen führen sollte. Zudem erfolgt die Markierung im frühest möglichen Stadium der Präparation, weshalb die Fehlerrate geringer als beim *spectral counting* ist, bei dem jeder Zustand separat prozessiert wird. Zudem sind ^{15}N Markierungen eine sehr kostengünstige Methode und eine gute Alternative zur in *Chlamydomonas* bisher verwendeten SILAC Methode (Terashima et al., 2011). Der Vorteil der ^{15}N Markierung liegt darin, dass jede Zelllinie Anwendung finden kann und nicht ein bestimmter genetischer Hintergrund existieren muss. SILAC ist sehr kostenintensiv und limitiert auf Organismen, die Arginin- oder Lysin-auxotroph sind. Zudem erschwert eine Arginin zu Prolin-Interkonversion, welche einen zusätzlichen Massenschift für jedes Peptid erzeugt, die Quantifizierung (Schmollinger et al., 2012).

Insgesamt wurden im *spectral count* Datensatz 2009 Proteine identifiziert, 1682 in *Stm6Glc4* und 1494 Proteine im Wildtypen. Einige Proteine sind sowohl im Wildtypen

als auch in der Mutante *Stm6Glc4* detektiert worden. Die Schnittmenge der Proteine, die sowohl im Wildtypen als auch in der Mutante identifiziert wurden, betrug 1169 (und/oder in t0 bzw. t4/t6). Desweiteren wurden einige Proteine sowohl in der Mutante *Stm6Glc4*, als auch im Wildtyp *cc406* differenziell reguliert. In *Stm6Glc4* wurden 832 Peptide nur im Zeitpunkt t0 (aerob) bzw. 120 Peptide ausschließlich in t4/t6 (anaerob) detektiert. In *cc406* wurden anteilig mehr Proteine ausschließlich unter aeroben Bedingungen detektiert (409 Proteine in t0), während 291 distinkt in t6 identifiziert wurden.

Da die Werte des ^{15}N Datensatzes das Verhältnis aus t0 und t4 wiedergeben, können hier keine Aussagen bezüglich der absoluten Proteinmengen zu den einzelnen Zeitpunkten gemacht werden. In *Stm6Glc4* wurden insgesamt 953 Proteine identifiziert und im Wildtypen 506. Das gemeinsame Proteom umfasste 442 Proteine, wobei 375 differentiell exprimiert wurden. Innerhalb dieser Gruppe wurden 256 Proteine stärker unter aeroben Bedingungen exprimiert und 119 Proteine wurden eher unter wasserstoffproduzierenden Bedingungen detektiert. Die restlichen, gemeinsam exprimierten Proteine blieben unverändert von t0 zu t4/t6. Insgesamt wurden 62 Proteine unter H_2 produzierenden Bedingungen ausschließlich in der *Mutante* reguliert und 102 ausschließlich in *cc406*.

Die Betrachtung der Schnittmenge zwischen dem *spectral count* Datensatz und dem ^{15}N Datensatz ergab eine Anzahl von 690 Proteinen, die sowohl im ersten als auch im zweiten Datensatz detektiert wurden.

Da der *spectral count* Datensatz die größere Datenmenge umfasste, erfolgte die Auswertung anhand dieser Daten. In den folgenden Abschnitten werden einzelne Stoffwechselwege im Detail betrachtet und analysiert.

Bei genauerer Betrachtung der Veränderungen auf Proteinebene zwischen dem ersten (t0) und dem späteren Zeitpunkt (t4) und einem gleichzeitig erfolgendem Vergleich der beidem Methoden (*spectral count*- und ^{15}N Datensatz) konnten sehr gute Korrelationen bezüglich der Tendenzen gemessen werden. Der Vergleich der Proteinregulationen von insgesamt 5 Stoffwechselwegen (Calvin-Benson-Zyklus, Glykolyse, Fermentation, Schwefel-Stoffwechsel und Pentose-Phosphat-Zyklus) zeigte eine Übereinstimmung der Tendenzen für 73% der differentiell exprimierten Proteine.

6.2.4 Der Schwefelstoffwechsel von *Chlamydomonas reinhardtii* unter H₂ produzierenden Bedingungen

Schwefel ist ein essentielles Element vorkommend in Proteinen, Lipiden und verschiedensten Metaboliten. Es ist äußerst wichtig in Assoziation mit Proteinen als Elektronenüberträger, in der Redox-Balance, der Photoprotektion oder Signaltransduktion. Wie erwartet zeigten die Proteom-Untersuchungen eine starke und anhaltende Antwort auf den Schwefelmangel. Da viele Organismen über keine großen Schwefel-Reserven verfügen, muss die kontinuierliche Aufnahmefähigkeit gewährleistet sein (Zhang et al., 2004). In vielen Fällen stimmten die vorliegenden Ergebnisse mit den Ergebnissen aus Schwefelmangel-Experimenten früherer Studien überein (Zhang et al., 2004; Ngyuen et al., 2008). Von Beginn des Experimentes an bis hin zur H₂-Hochproduktionsphase unterliegen die Zellen bedeutenden physiologischen Veränderungen. Anfänglich minimieren die Zellen als Antwort auf den Schwefelmangel den Verbrauch an Schwefel und konservieren die vorhandenen Schwefelreserven. Diese Adaptationsprozesse sind im Detail untersucht worden und zeigten, dass sich sowohl die Zellstruktur als auch der komplette Metabolismus an den Schwefelmangel adaptiert und letztlich die Anaerobie auslöst (Takahashi et al., 2001; Zhang et al., 2004; Pollok et al., 2005). Dazu zählten auf der eine Seite eine Verringerung der photosynthetischen Aktivität und die Abnahme der Proteinbiosynthese, als auch die Zunahme an Proteinen, die unter Stressbedingungen induziert werden (Zhang et al., 2004). Die starke Abnahme der photosynthetischen Aktivität konnte in dieser Studie ebenfalls bestätigt werden. Allerdings gab es zwischen Wildtyp und Mutante eine starke zeitliche Diskrepanz bei durchgeführten Chlorophyllfluoreszenz-Analysen. Insgesamt zeigten die Messungen der photosynthetischen Quanten-Ausbeute (Φ PS II-Messungen) und die Messung der Wasserstoffproduktions-effizienz große Unterschiede zwischen der Mutante *Stm6Glc4* und dem ausgewählten Wildtypen *cc406*. Das deutlich frühere Einsetzen der Wasserstoffproduktion der Mutante ist auf das schnellere Erreichen der Anaerobie (über die Φ PS II-Messungen nachvollziehbar) zurückzuführen. Im Gegensatz zu vielen stark abnehmenden Expressionsraten, wurden Proteine, die an der Schwefel-Assimilation beteiligt sind, häufiger detektiert. Darunter waren in allen Phasen der Wasserstoffproduktion viele Proteine, welche für das Akquirieren von Schwefel essentiell sind. Die extrazellulär lokalisierte Arylsulfatase (ARS) konnte in dieser Studie in beiden Zelllinien nur unter anaeroben Bedingungen detektiert werden und besaß eine größere Abundanz im Wildtypen. Mittels der ARS werden SO_4^{2-} -Ester hydrolysiert und Schwefelverbindungen assimilierbar gemacht. Eukaryotische Organismen haben diverse SO_4^{2-} -Transporter (Cherest et al., 1997; Clarkson et al., 1997; Hawkesford et al., 1993)

und in *Chlamydomonas* konnten bereits putative Transporter identifiziert werden, welche unter Schwefelmangel aktiviert werden (Yildiz et al., 1994; Davies et al., 1999). Mit der vorliegenden Studie können keine Aussagen über Transportsysteme gemacht werden, allerdings wurden viele an der Schwefelassimilation beteiligte Enzyme (*ATP Sulfurylase* ATS; *Adenylphosphosulfatreductase* APR; *Cysteinsynthase* OASTL; *S-adenosylhomocysteinhydrolase* SAH; *Selenobindingprotein* SBP1) verstärkt exprimiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegenden Daten darüber hinaus sehr gut mit den parallel durchgeführten Transkriptom- und Metabolomuntersuchungen übereinstimmen (Nguyen et al., 2011, Doebbe et al., 2010). In der Transkriptom-Studie konnte der gleiche Trend wie in den Proteom-Untersuchungen nachgewiesen werden. Zum einen lagen die am Schwefelstoffwechsel beteiligten Enzyme, ebenso wie deren Transkripte, zum späteren Zeitpunkt induziert vor, zusätzlich war bei der Mehrheit der Transkripte als auch bei deren zugehörigen Proteinmengen die Induktion im Wildtyp höher als in *Stm6Glc4*. Dieses Ergebnis passte zudem sehr gut zu den parallel durchgeführten Metabolom-Untersuchungen. Mit dieser Methode konnten höhere Mengen an Cystein im Wildtyp nachgewiesen werden, während bei den anderen Aminosäuren der gegenteilige Trend gezeigt wurde. In einem mehrstufigen Prozess wird Sulfat mittels der genannten Enzyme reduziert und zu Cystein und Methionin konvertiert. Cystein ist ein wichtiger Baustein für die Synthese von Glutathion. Als Reduktionsmittel ist Glutathion sehr wichtig für antioxidative Prozesse und die Aufrechterhaltung eines reduzierenden Milieus in Cytosol, Chloroplast und Mitochondrium. Mehrere vorangegangene Studien belegten den gleichen Trend wie die vorliegende Untersuchung indem sie ebenfalls zeigten (Gutierrez-Macros et al., 1996; Saito et al., 2000), dass die meisten Proteine, die an der Akquirierung, der Assimilation und der Nutzung von Schwefel beteiligt sind, ansteigen.

6.2.5 Die Expression fermentativer Enzyme unter H₂ produzierenden Bedingungen

Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* verfügt über ein Netzwerk an fermentativen Stoffwechselwegen, welche unter anaeroben Bedingungen aktiviert werden. Im Labor können diese Konditionen durch verschiedenste Methoden induziert werden (Begasung mit inerten Gasen, Nährstoffmangel, Anzucht im Dunklen). Schwefelmangel und höhere Lichtintensitäten können Anoxie verursachen und diesen Zustand in *Chlamydomonas* langanhaltend aufrecht erhalten. In Schwefel-verarmten Kulturen erfolgen photosynthetische Sauerstoffentwicklung und Respiration gleichzeitig, wohingegen die Respirationsraten die Photosynthese übersteigen (Wykoff et al., 1998; Ghiradi et al.,

2000; Melis et al., 2000). Die Proteine des fermentativen Stoffwechsels und die Expression der sauerstoff-sensitiven Hydrogenase sind dabei von besonderem Interesse. Proteine wie die Alkohol-Dehydrogenase (ADH1), Phosphat-Acetyltransferase (PAT2), Acetatkinase (ACK1) und Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFR1) wurden ausschließlich im Chloroplasten nachgewiesen. Auf der anderen Seite sind die ACK2 und die PAT1 häufiger in Mitochondrien-Präparationen detektiert worden (Terashima et al., 2010). Ist die Anaerobiose induziert, steigen einige Transkript-Mengen um signifikante Größenordnungen an. Dies gilt für *hydA1* und *hydA2*, als auch für deren Maturationsgene *hydEF* und *hydG* (Posewitz et al., 2005; Mus et al., 2007). Wie erwartet wurden in der Proteom-Untersuchung die Hydrogenase (HydA1) und deren Maturationsgene HydEF und HydG in beiden Zelllinien (*Stm6Glc4* und *cc406*) nur in der anaeroben Probe detektiert. Terashima und Mitarbeiter bestätigten die Identifizierung der Hydrogenase und deren Reifungsfaktoren in unter Anaerobie angereicherten Chloroplasten (Terashima et al., 2010). Durch diese Lokalisationstudie konnte deren Zusammenbau und auch die Relevanz für die Regulation des Redoxdruckes unter anaeroben Konditionen für den Chloroplasten beschrieben werden (Happe et al., 1993; Happe et al., 1994). Während der Anpassung der Zelle hin zur Anoxie konnten die Transkriptom Untersuchungen mit *qRT PCR* Daten, die einen 100fachen Anstieg im Transkriptlevel zeigten, verifiziert werden (Mus et al., 2007).

Die Abbildung 35 zeigt die unterschiedliche Verteilung und breite Streuung der experimentell mittels *spectral counts* determinierten Proteine. Würde ein Minimum an Detektionsereignissen zwischen 2 und 5 *spectral counts* festgelegt werden, könnten wenig abundante Proteine, zu denen auch die Hydrogenase gehört, in der Auswertung und für eine weitere Analyse nicht mit berücksichtigt werden. Terashima et al. charakterisierten erstmals die vielschichtigen anaeroben Stoffwechsel Reaktionen nach Argon Begasung auf Proteinebene (Terashima et al., 2010). Auch in dieser Studie wurde die Hydrogenase ebenfalls als wenig abundantes Protein vermessen. In einer Studie von Prince und Kheshgi wurden die Aktivitäten wasserstoffproduzierender Enzyme verglichen und bieten damit einen Erklärungsansatz für die niedrige Detektionsrate dieses Enzyms im Massenspektrum (Prince & Kheshgi 2004).

Zu den Wasserstoff-produzierenden Enzymen gehören die Hydrogenasen und die Nitrogenasen (Weaver et al., 1980; Tamagnini et al., 2002; Boichenko et al., 2004; Kruse et al., 2005b). Bisher konnte die Expression von Nitrogenasen in Algen nicht nachgewiesen. Nitrogenasen synthetisieren effizient Wasserstoff, aber es gibt einige Faktoren, die zudem eine ökonomische Anwendbarkeit ausschließen. Es werden pro Elektron 2 Moleküle ATP benötigt (Eady, 1996), was eine erhebliche Aktivität des

zyklischen Elektronentransportes erfordert. Im Gegensatz zur Nitrogenase benötigt die Hydrogenase kein ATP. Zudem bestehen große Unterschiede bezüglich der Aktivität der Enzyme. Die Umsatz-Rate der Hydrogenasen liegt mit 10^6 s^{-1} deutlich über der Nitrogenase-Aktivität (10 s^{-1}) (Prince & Kheshgi 2004). Somit hat die Wasserstoff-Produktion durch Grünalgen den Vorteil, dass hohe theoretische Effizienzen möglich sind und Wasser direkt als Reduktionsmittel genutzt werden kann ohne Energieäquivalente abzubauen (Seibert et al, 2002). Die Fe-Hydrogenasen der Grünalgen haben eine hohe spezifische Aktivität von $\sim 1000 \text{ Units} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$. Das entspricht einer 100fach höheren Aktivität gegenüber anderen wasserstoffproduzierenden Systemen (Adams, 1990). Möglicherweise könnte dies ein Erklärungsansatz für die niedrige Abundanz der Hydrogenase Komponenten in dieser Studie als auch in der Studie von Terashima et al. sein (Terashima et al., 2010).

Zu signifikanten Unterschieden hinsichtlich der Proteinmenge kam es nur in einem der vielfältigen alternativen fermentativen Stoffwechselwege, die möglicherweise u.a. zu einer Erklärung für die großen Unterschiede hinsichtlich der H_2 Produktion zwischen Wildtyp und Mutante beitragen. Die detektierte Menge der Alkoholdehydrogenase unterschied sich im Wildtyp und in der Mutante sowohl unter aeroben Bedingungen (t_0) als auch im zeitlichen Verlauf während der Wasserstoffproduktion (t_4/t_6). Die Alkohol-Dehydrogenase (ADH) konnte unter beiden Konditionen öfters im Wildtyp detektiert werden. Auf Basis des Produktes Ethanol konnten diese Ergebnisse auch mittels der parallel durchgeführten Metabolom Untersuchung bestätigt werden (Doebbe et al., 2010). Geringe Mengen an Ethanol wurden in t_0 in beiden Zelllinien detektiert, jedoch akkumulierte der Wildtyp größere Mengen an Ethanol im zeitlichen Verlauf der Wasserstoffproduktion im Vergleich zur Mutante (Doebbe et al., 2010). Terashima et al. konnte in ihrer Studie unter anaeroben Konditionen (induziert durch Argon-Begasung) ebenfalls eine Induktion der ADH1 in einem Wildtypen (*cc424*) nachweisen (Terashima et al., 2010). Zudem wurde die ADH1 ausschließlich im Chloroplasten nachgewiesen. Innerhalb einer anderen, die Mitochondrien untersuchenden Studie, wurde das Cytosol als Lokalisation vorgeschlagen. Allerdings konnte Terashima mit ihrer Proteom-basierten Lokalisationsstudie durch die verstärkte Abundanz im Chloroplasten eine Erklärung liefern, warum Atteia et al. den Nachweis in den Mitochondrien nicht erbringen konnte (Atteia et al., 2009; Terashima et al., 2010). Möglicherweise ist der Stoffwechselweg, in dem die ADH1 im Chloroplasten involviert ist, für dieses Kompartiment und deren metabolischen Abläufe von besonderer Bedeutung, da pro verbrauchtes Acetyl-CoA zwei NADH oxidiert werden. Unter anaeroben Konditionen akkumulieren verstärkt Reduktionsäquivalente schneller als diese verbraucht werden (Klein & Benz, 1978), so

dass dieser Stoffwechselweg einen Beitrag zur Re-Balancierung des NAD(P)H/NAD(P) Verhältnisses beitragen könnte. Die vorliegenden Ergebnisse gehen einher mit den Ergebnissen von Terashima et al. und Doebbe et al (Terashima et al., 2010; Doebbe et al., 2010) und zeigen darüber hinaus, dass der fermentative Metabolismus sowie die Wasserstoffproduktion dominierende Prozesse sowohl unter Schwefelmangel als auch unter Argon-Begasung sind. Die Unterdrückung der ADH1 Aktivität, wie sie auch in der vorliegenden Studie durch die niedrigere Abundanz in der H₂-Produktionsmutante (*Stm6Glc4*) bestätigt wird, könnte eine Genmanipulation z.B. über den Einsatz artifizieller micro-RNA sein. Auf diese Weise könnte die Menge an verfügbaren Reduktionsäquivalente innerhalb des Chloroplasten erhöht werden, um eine höhere Hydrogenase-Aktivität über den PII-unabhängigen Weg zu fördern. Die Inaktivierung des *ADH1*-Gens ist bereits in einem Wildtypen von *Chlamydomonas reinhardtii* durchgeführt worden (Magneschie et al., 2012). In diesem Fall führte der Verlust der ADH1 zu einer vermehrten Produktion alternativer Fermentationsprodukte (Acetat, Lactat und Glycerin), aber nicht zu einer erhöhten Menge an produzierten Wasserstoff. In dieser Arbeit wurde jedoch lediglich die Wasserstoffproduktion unter Anaerobie und gleichzeitiger Abwesenheit von Licht untersucht.

Die metabolische Versatilität der einzelligen Grünalge wurde über den erhaltenen Datensatz demonstriert. Neben der H₂ Produktion umfasst der Pyruvat-Metabolismus diverse Reaktionen, die für die Regenerierung der Reduktionsäquivalente (konstantes NAD(P)/NAD(P)H Verhältnis) verantwortlich sind. Zudem kann eine Bereitstellung weiterer Energieäquivalente unter Schwefelmangel und Anoxie gewährleistet werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich der Wildtyp und die Mutante auch in diesem Stoffwechselprozess auf Basis der Proteinmenge nur sehr gering voneinander unterscheiden. Einzig die verstärkte Expression der ADH im WT könnte eine Konkurrenzreaktion zur Hydrogenase ausmachen, wodurch in der die Mutante eine größere Menge an Wasserstoff produzieren könnte.

6.2.6 Auswirkungen von Schwefelmangel und Anaerobie auf die Expression photosynthetischer Gene

Während der, durch Schwefelmangel induzierten, Wasserstoffproduktion treten viele Reorganisationen innerhalb der Zelle auf, welche die Zellstruktur und den Stoffwechsel betreffen (Zhang et al., 2002; Nguyen et al., 2008; Timmins et al., 2009; Doebbe et al., 2010; Gonzales-Balester et al., 2010; Chen et al., 2010). Zu Beginn schaltet die Zelle auf eine erhöhte Schwefelassimilation um, mit der Folge einer erhöhten Expression beteiligter Gene und Proteine (Nguyen et al., 2010; Gonzales-Balester et al., 2010).

Parallel wird eine Reduktion vieler an der Photosynthese beteiligter Komponenten beobachtet. Dies betrifft weitestgehend die Lichtsammelproteine, Komponenten des photosynthetischen Elektronentransportes sowie Komponenten des Calvin-Benson-Zyklus (Zhang et al., 2002). Viele Proteine, welche am photosynthetischen Elektronentransport involviert sind, unterliegen unter Schwefel-Depletion einer deutlichen Regulation. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit zahlreichen vorhergehenden Studien (Zhang et al., 2004; Ngyuen et al., 2008; Nguyen et al., 2011). Während des Experiments werden einige Proteine konsequent unterdrückt. Dazu zählen Komponenten des Photosystem II (D1, D2, cp43, cp47, PsbP, PsbR, PsbQ, PsbO), aber auch die Untereinheiten des Photosystem I reduzierten sich in beiden Zelllinien (siehe Abschnitt 5.4.2.1; 5.4.2.2). Komponenten des Cytochrom b6/f Komplexes und der ATP Synthase nahmen sowohl in *Stm6Glc4* als auch in *cc406* leicht ab oder blieben auf ähnlichem Niveau. Für eine kontinuierliche Wasserstoffproduktion ist es essentiell den Elektronenfluss über die photosynthetischen Komponenten zur Hydrogenase aufrecht zu erhalten. Andererseits entsteht bei der Oxidation des Wassers Sauerstoff, der als Inhibitor der Wasserstoff produzierenden Enzyme (Hyd A1/A2) bekannt ist. Als Kernelement für ein funktionelles PS II gilt D1, dies nahm in den erhaltenen Datensätzen im Wildtyp stärker ab als in der Mutante. Es ist allgemein anerkannt, dass eine vollständige Inaktivierung von PS II zu einer verminderten Wasserstoffproduktion führt (ebenso wie DCMU die H₂ Produktion inhibiert) (Kruse et al., 2005a), da der lineare Elektronenfluss zur Hydrogenase stark zur Gesamtproduktion beiträgt. Dies bestätigen vorliegenden Daten ebenso wie die Ergebnisse der *Chlamydomonas reinhardtii* D1 Mutante L159I-N230Y, welche zu den produktivsten bekannten Zelllinien zählt (Kruse et al., 2005; Torzillo et al., 2009; Scoma et al., 2012). Wie *Stm6Glc4* weist diese Mutante einen höheren D1 Gehalt auf, verfügt über eine bessere Fähigkeit zur Einlagerung von Kohlenhydraten und eine anhaltende direkte PS II Beteiligung an der Wasserstoffproduktion unter Schwefelmangel (Scoma et al., 2012). Diese höhere Restaktivität von PS II unter wasserstoffproduzierenden Bedingungen in *Stm6Glc4* könnte damit eine mögliche Erklärung für die höhere Produktionsrate sein, da eine gewisse Restaktivität von PS II vorliegen muss, um viel H₂ produzieren zu können.

Aus den Daten bezüglich der Komponenten des PS II kann geschlussfolgert werden, dass in beiden Zelllinien eine Restaktivität von PS II vorliegt, diese jedoch in der Mutante *Stm6Glc4* erhöht ist. Der höhere D1 Protein Gehalt in der Mutante im Vergleich zum Wildtypen könnte, trotz der Erniedrigung der Expression unter wasserstoffproduzierenden Konditionen, zu einer effizienteren Aufrechterhaltung der Photosynthese beitragen. Die gleichzeitig erhöhten Respirationsraten ermöglichen es

höhere Photosynthese-Leistungen aufrecht zu halten ohne die sauerstoff-sensitive Hydrogenase zu inhibieren. Die mitochondrielle Respiration muss daher für eine schnelle Entsorgung des produzierten Sauerstoffes funktionell sein (siehe Abschnitt 5.4.3).

Unter anaeroben Konditionen werden mehrere Proteasen und Kinasen induziert, weshalb eine fortschreitende Adaptation des Proteoms an die sich verändernden Bedingungen angenommen werden kann (Zhang et al., 2004; Mus et al., 2007; Nguyen et al., 2008). Zellen, welche unter Schwefelmangel angezogen werden, induzieren eine große Menge an Stress-Genen, viele Chaperone und unter anderem auch stress-bezogene Komponenten des Lichtsammelkomplexes (LhcSR-Proteine), weshalb spezifische Reaktionen innerhalb der Zelle auf diese äußere Belastung angenommen werden können. Die Transkript-Gehalte der Lichtsammelantennen-Proteine werden unter Schwefelmangel sehr stark reduziert (Nguyen et al., 2011). Innerhalb der Lichtsammelproteine muss zwischen solchen unterschieden werden, die eine primäre Funktion in der effektive Lichtsammlung haben, und solchen, die eine eher protektive Aufgabe im Rahmen des nicht-photochemischen Quenching erfüllen (Elrad et al., 2004; Bonente et al., 2011; Ferrante et al., 2012). Die starke Herunter-Regulation unter Schwefel-Mangel betrifft dabei insbesondere Hauptlichtsammel-Proteine (Lhcbm-Isoformen). Interessant war daher der Befund, dass *Lhcbm1* unter wasserstoffproduzierenden Bedingungen hochreguliert wurde. Eine Analyse der *npq5* Mutante zeigte deutlich, dass diese Isoform essentiell für nicht-photochemische Quenching-Prozesse ist. Die Aufgabe dieser Isoform geht also über ein reines Einfangen von Lichtquanten hinaus und besteht zusätzlich darin photo-oxidative Schäden an PS II zu vermeiden. Solche protektiven Mechanismen besitzen unter Schwefelmangel eine besondere Relevanz, was auch an der starken Induktion der Proteine *LhcSR3* und *LhcSR1* zu sehen ist, deren primäre Aufgabe in einem effizienten Energie-abhängigen Quenching liegt. Die Isoform *Lhcbm9* stellt eine Besonderheit innerhalb der Proteinfamilie dar, da die Expression dieses Proteins ausschließlich unter Nährstoffmangel (-S und -N) induziert wird (Nguyen et al., 2011). Die Proteom-Daten bestätigen die Ergebnisse der Transkriptom-Studien (Nguyen) in dieser Hinsicht und zeigen darüber hinaus, dass es Unterschiede zwischen WT und Mutante bezüglich der Induktionsstärke unter Schwefelmangel gibt. *Lhcbm9* wird unter S-Mangel im WT deutlich stärker induziert. Der Knock-down von *lhcbm9* (S. Grewe, unveröffentlicht) führt zu einer verminderten H_2 -Produktion, so dass es momentan schwierig ist eine direkte Korrelation zwischen der verminderten Menge an *Lhcbm9* in *Stm6Glc4* und der erhöhten H_2 -Produktion zu sehen. Die Proteine *LhcSR1/3* unterscheiden sich von *Lhcbm*-Proteinen durch ihre Pigment-Zusammensetzung (Bonente et al., 2011) und für *LhcSR3* wurde eine Funktion innerhalb des Energie-abhängigen Quenching (qE) gezeigt (Bonente

et al., 2011). Transkriptom-Untersuchungen zeigten einen deutlichen Unterschied in der Induktion des *lhcsr3* Gens zwischen WT und Mutante unter Schwefel-Mangel (Nguyen et al., 2011). Diese können durch die Proteomdaten bestätigt werden. Aus den Transkript- als auch den Proteom-Daten dieses parallel durchgeführten ganzheitlichen Ansatzes unter Schwefelmangel geht klar hervor, dass die Expression stress-induzierter *lhcsr*-Gene sehr stark hochreguliert wird. Im Gegensatz dazu konnten diese Proteine in Zellen, die über eine Argon-Begasung in die Anaerobie geführt wurden, weder mittels Massenspektrometrie noch immunologisch nachgewiesen werden (Terashima et al., 2010), so dass Nährstoffmangel als primärer Induktor der LhcSR 3/1-Expression angesehen werden kann. Zumindest für LhcSR3 ist jedoch unter Benutzung der *knock-out*-Mutante *npq4* (Niyogi et al., 1997; Peers et al., 2009) gezeigt worden, dass die An- oder Abwesenheit dieses Proteins einen geringen Einfluss auf die H₂-Produktionskapazität besitzt. Entsprechende Daten liegen für LhcSR1 nicht vor, doch die starke Ähnlichkeit (83% Identität) lässt vermuten, dass die Inaktivierung des entsprechenden Gens ähnlich geringe Effekte auf die H₂-Produktion hat (Nguyen et al., 2011). Interessant wäre die Untersuchung einer Doppel-*knock-out*-Mutante.

6.2.7 Kohlenstoff-Metabolismus

6.2.7.1 Calvin Zyklus

Eine Abnahme der Komponenten des photosynthetischen Elektronentransfers ist ein frühes Ereignis in der Folge der Antworten auf die Schwefeldepletion, bevor die Synthese von Hauptkomplexen eingestellt wird. Des Weiteren löste Schwefeldepletion und Anaerobie in beiden Zelllinien eine Abnahme bei allen Calvin-Benson-Zyklus assoziierten Enzymen aus. Das Protein Level der Ribulose-1,5-Biphosphat-Carboxylase (RuBisCo), einem Schlüsselenzym der CO₂ Fixierung und Assimilierung, unterlag einer dramatischen Regulation unter Schwefelmangel und Anoxie. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass alle Komponenten und damit sowohl die RuBisCo als auch Phosphoribulokinase signifikant während der Wasserstoffproduktionsphase reduziert wurden. Insbesondere die letztgenannten Proteine katalysieren irreversible Reaktion, so dass die Annahmen eines stark eingeschränkten Calvin-Benson-Zyklus nachhaltig über die reduzierten Proteinlevel bekräftigt wurde (siehe Abschnitt 5.4.2.2).

Ein deutlich unterschiedliches Proteinmuster unter wasserstoffproduzierenden Bedingungen weist ein in den Chloroplasten an den Calvin-Benson-Zyklus gekoppelter weiterer Weg, der oxidative Pentosephosphatweg (OPP), auf. Dieser lässt sich

untergliedern in einen reduktiven und oxidativen Weg. Ersterer war aufgrund stark eingeschränkter Abundanzen der beteiligten Proteine unter H₂-Produktionsbedingungen ähnlich eingeschränkt wie der Calvin-Benson-Zyklus und somit ist folglich auch die mittels dieser Enzyme katalysierte Synthese von Ribulose-5-Phosphat, welches für die Biosynthese von Aminosäuren (z.B. Histidin), Nukleotiden und Fettsäuren (Biosynthese von Coenzym A) benötigt wird, gehemmt.

6.2.7.2 Oxidativer Pentosephosphat Weg

Demgegenüber lagen die Enzyme der oxidativen Reaktionen des Pentosephosphat-Weges unter H₂ produzierenden Bedingungen verstärkt vor. In der Mutante konnten die beteiligten Enzyme (Glucose-6-phosphate-Dehydrogenase (GLD2) und 6-Phosphogluconolactonase (PGL5)) vermehrt unter H₂ produzierenden Bedingungen nachgewiesen werden. Zudem stellt die GLD als Schlüsselenzym die Hauptregulationsstelle des oxidativen Teils dieses Stoffwechselweges dar (siehe Abschnitt 5.4.2.5). Neben der Photosynthese und dem Citratzyklus ist dieser Teil des Pentosephosphat-Weges die einzige Möglichkeit NADPH zu generieren, welches neben reduktiven Biosynthesen (Calvin-Benson-Zyklus, Synthese von Fettsäuren und Steroiden) für andere Redox-Reaktion benötigt wird. Insgesamt beinhalten die Daten des Wildtypen und der Mutante, dass der Pentosephosphat-Weg aktiviert, während die Funktionalität des Calvin-Benson-Zyklus durch Schwefeldepletion und Anaerobie stark beeinträchtigt war. Demzufolge kann unter den Konditionen einer eingeschränkten, funktionellen Photosynthese-Leistung, wie sie unter H₂ produzierenden Bedingungen auftritt, die erforderliche Menge an NADPH nur durch erhöhte OPP Aktivität gedeckt werden. Insgesamt lassen sich jedoch zwischen Wildtyp und Mutante keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Regulation des Pentosephosphat-Weges feststellen. Sehr wahrscheinlich ist ein NDH Komplex TypII an der Reduktion des Plastoquinonpools (PQ-Pool) unter Wasserstoffproduzierenden Konditionen beteiligt (Peltier & Cournac, 2002; Cournac et al., 2002; Mus et al., 2005). Dabei werden Elektronen vom NAD(P)H zum PQ-Pool transferiert. Auf diese Weise ist eine Verknüpfung zwischen der chloroplastidären Elektronentransportkette und des Kohlenhydrat-Metabolismus gewährleistet, worüber die H₂ Produktion angetrieben wird (Mus et al., 2005). Eine Komponente dieses NDH Komplexes des TypII konnte als Flavoprotein identifiziert werden und wies Ähnlichkeiten mit einem in höheren Pflanzen in den Mitochondrien lokalisierten Protein auf, welches NAD(P)H-Plastoquinon-Oxidoreduktase Aktivität aufweist und Elektronen von NAD(P)H zum PQ-Pool weiterleitet (Peltier & Cournac, 2002; Cournac et al., 2002; Mus et al., 2005). Ergebnisse von Desplats et al. und Jans et

al. können diese Beobachtung bestätigen (Desplats et al., 2009; Jans et al., 2008). Nda2 gehört zu der Familie der TypII NAD(P)H Dehydrogenasen in *Chlamydomonas reinhardtii* und kodiert für eine chloroplastidäre Dehydrogenase, welche nicht-photochemisch den PQ-Pool reduzieren kann (Desplats et al., 2009; Jans et al., 2008). Im vorliegenden Datensatz ist Nda2 nicht enthalten, aber *nda2*-RNAi Zelllinien zeigten eine reduzierte H₂-Produktion verglichen mit dem Wildtyp, so dass sich daraus eine wichtige Funktion der NAD(P) Dehydrogenase bezüglich der Bereitstellung des Substrates für die Hydrogenase ableiten lässt (Desplats et al., 2009; Jans et al., 2008).

Im Gegensatz zu den vorliegenden Daten, mit denen sowohl die parallel durchgeführten Transkript-Analysen als auch die Analysen von Zhang et al. bestätigt werden konnten (Zhang et al., 2004; Ngyuen et. al, 2008; Nguyen et al., 2010), konnten jedoch nicht die Ergebnisse einer Studie durchgeführt unter Anoxie (durch Argon Begasung) in Einklang gebracht werden (Terashima et al., 2010). Diese Studie führt zu einem in diesem Punkt gegensätzlichen Ergebnis. Anders als unter Schwefelmangel in Kombination mit Anoxie wurden unter anaeroben Konditionen in schwefelhaltigem Medium keine Proteine induziert, welche dem OPP angehören. Unter diesen Bedingungen war lediglich eine Komponente des reduktiven Teils, die Ribulose-Phosphate-3-Epimerase (RPE), stark induziert. Die genannten Unterschiede unterstreichen die Bedeutung der vorliegenden Studie in der wasserstoffproduzierende Bedingungen, d.h. Schwefelmangel kombiniert mit Anoxie, verwendet wurden. Offensichtlich sind Proteom-Studien, in denen ausschließlich Anoxie als experimentelle Bedingung verwendet wird, nur bedingt nutzbar, um eine Aussage über die zellulären Anpassungsmechanismen zu treffen, die der Wasserstoffproduktion in *C. reinhardtii* zu Grunde liegen.

6.2.7.3 Synthese und Abbau von Stärke

Für die Wasserstoff-Produktion in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ist der Stärke-Metabolismus von großer Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass Stärke innerhalb der ersten 24 Stunden bis zur 10-fachen Menge des Standardlevels akkumuliert (Zhang et al., 2002). Jedoch zehrt die Zelle bei anhaltenden Mangelbedingungen von diesen Depots, da die Degradation von Stärke Reduktionsäquivalente zur Verfügung stellt, die für die Aufrechterhaltung der Wasserstoffproduktion, bei gleichzeitig niedriger PS II-Aktivität, genutzt werden. Die Einspeisung der Elektronen erfolgt über den chloroplastidären Plastoquinon (PQ)-Pool (Zhang et al., 2002; Tsygankov et al., 2002; Chochois et al., 2009). Mittlerweile bestätigten eine Vielzahl von Studien die Bedeutung des Stärke-Abbaus für die nicht-photochemische Wasserstoff-Produktion (Posewitz et al.,

2004; Fouchard et al., 2005; Kruse et al., 2005a; Kruse et al., 2005b). Die Akkumulation von Stärke während der ersten 24 Stunden nach dem Wechsel des Mediums (von plus Schwefel hinzu minus Schwefel) (Zhang et al., 2002) konnte in beiden Zelllinien durch Doebbe et al. (2010) beobachtet werden. *Stm6Glc4* akkumulierte 26 % mehr Stärke als der Wildtyp *cc406* (Doebbe et al., 2010). Dieser Phänotyp konnte bereits im parentalen Stamm *Stm6* gezeigt werden (Kruse et al., 2005b) und ist sehr wahrscheinlich eine Konsequenz aus der beeinträchtigten Interaktion zwischen Chloroplast und Mitochondrien innerhalb der Mutante (Kruse et al., 2005b). Bisher ist die Verbindung, wie Schwefelmangel und Stärke-Akkumulation verknüpft sind, noch nicht vollständig verstanden. Ein möglicher Erklärungsansatz würde Reaktionen über das Oxalacetat, welches zu Phosphoenolpyruvat und letztlich schrittweise in Zuckerphosphate umgewandelt würde, in Betracht ziehen. Diese könnten dann für die Stärke-Synthese genutzt werden (Spalding, 2009). Höchstwahrscheinlich könnten diese Reaktionen über den Tricarbonsäure Zyklus (TCC) oder, nach den vorliegenden Proteom-Daten zu urteilen, über den Glyoxylat-Zyklus erfolgen und mit der Gluconeogenese verknüpft sein. Damit stimmen die Proteom-Daten mit den Metabolom-Daten überein. Letztere ergaben, dass die Intermediate des TCC bzw. des Glyoxylat-Zyklus mit fortschreitender H₂ Produktion zunächst anstiegen. Zudem kann über den Stärke-Nachweis ebenfalls eine Akkumulation nachgewiesen werden (Doebbe et al., 2010). Proteom- und Metabolom-Untersuchungen stimmen diesbezüglich mit früheren Studien überein, in denen eine 10fache Stärke-Akkumulation innerhalb der ersten 24 Stunden detektiert wurde (Zhang et al., 2002; Tsygankov et al., 2002).

Die an der Degradation (GLH1 (*starch cleavage*), alpha-Amylase, Glucan-Water-Dikinase) beteiligten Proteine waren deutlich häufiger im Wildtyp unter H₂ produzierenden Bedingungen vorzufinden. Diese wurden im Wildtyp wahrscheinlich stärker exprimiert und auch hier konnte der erhöhte Abbau der Stärke durch den Assay bestätigt werden (70% der Stärke wurden im Wildtyp metabolisiert, im Vergleich zu 42 % in der Mutante, Dissertation Doebbe, 2010). Die Tatsache, dass der Wildtyp offenbar mehr Stärke konsumiert und gleichzeitig weniger Wasserstoff produziert im Vergleich zur Mutante *Stm6Glc4* könnte durch die Zugabe der Glukose (1 mM) begründet sein. Um den zellulären Energiebedarf aufrechtzuerhalten, wird Stärke abgebaut und metabolisiert. Dieses konnte über die sich reduzierenden Stärke-Depots unter anaeroben Konditionen bestätigt werden (Doebbe et al., 2010). Der Proteom Ansatz eignet sich somit, um den Stärke-Metabolismus genauer zu charakterisieren. Zudem konnten die bestehenden Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante mittels dieser Ergebnisse ebenfalls sehr gut wiedergegeben werden. Mit der vorliegenden Studie konnte ein ganzheitlicher, kongruenter

Eindruck auf verschiedenen zellulären Untersuchungsebenen fertiggestellt werden (Metabolom- und Proteom-Ansatz). Mit den Ergebnisse dieser unterschiedlichen Untersuchungsansätze (Schönfeld et al., 2004; Kruse et al., 2005b; Doebbe et al., 2011; Ngyuen et al., 2011) konnte ein einheitliches und übereinstimmendes Bild des Gesamtsystems geliefert werden. Die Proteom-Daten der am Stärke-Stoffwechsel beteiligten Enzyme stehen in sehr genauer Übereinstimmung mit den einerseits parallel durchgeführten Metabolom-Untersuchungen, als auch mit der experimentell erhaltenen Charakterisierung des Phänotypen dieser Mutante *Stm6* (bzw. *Stm6Glc4*) (Schönfeld et al., 2004; Kruse et al., 2005b; Doebbe et al., 2011; Ngyuen et al., 2011).

6.2.8 Ein erhöhter respiratorischer Acetat-Verbrauch führt zu einer erhöhten Wasserstoff-Produktion in *C. reinhardtii*

Es ist bestens bekannt, dass das Mitochondrium wichtig für den optimalen Ablauf der Photosynthese ist (Raghavendra & Padmasree, 2003). Gegenwärtige Ideen haben die Bewegungen von Metaboliten zwischen den beiden Organellen hervorgehoben, so dass eine Störung der Respiration einen Effekt auf die chloroplastidäre Aktivität aufgrund sich verändernder Redox-Verhältnisse mit sich bringen würde (Schönfeld et al., 2004).

Damit besitzt der mitochondrielle Stoffwechsel, insbesondere die Respiration, eine wichtige Rolle in der Optimierung der photosynthetischen Effizienz in Pflanzen (Schönfeld et al., 2004), sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Analyse des Proteoms konnten interessante, klare Tendenzen und damit mögliche Hypothesen aufgestellt werden, welche zum einen das schnellere Erreichen der Anaerobie, aber auch den Schutz vor Überreduktion der mitochondriellen Atmungskette erklären. Bei einem Vergleich der photobiologischen H₂ Produktionskinetiken zwischen Mutante und Wildtyp ergab sich deutlich, dass die Mutante *Stm6Glc4* wesentlich eher anaerobe Bedingungen etabliert und somit früher H₂ produziert. Insgesamt zeichnen sich bezüglich des Acetatkonsums zwischen Wildtyp und Mutante signifikante Unterschiede ab. Die Ergebnisse zeigten einen höheren Acetatkonsum in der Mutante *Stm6Glc4* auf. *Chlamydomonas reinhardtii* assimiliert Acetat über den Glyoxylat-Zyklus, nachdem Acetat in Acetyl-CoA umgewandelt worden ist (Kornberg & Krebs, 1957). Für die Einspeisung von Acetat in den Glyoxylat-Zyklus stehen zwei Wege zur Verfügung. Zum einen kann Acetat direkt und ATP-abhängig über die Acetyl-CoA Synthetase (EC 6.2.1.1) in Acetyl-CoA konvertiert werden, zum anderen kann die Umwandlung in Acetyl-CoA über zwei aufeinanderfolgende Schritte erfolgen, die durch die Acetat-Kinase (EC 2.7.2.1) und die Phosphat-Acetyltransferase (EC 2.3.1.8) katalysiert werden. Zum Zeitpunkt t₀, also unter aeroben Bedingungen in Schwefel-

haltigem Medium, liegt in *Stm6Glc4* eine höhere Menge an ACS3, einer Acetyl-CoA Synthetase, vor (siehe Abschnitt 5.4.4.1). Weder die Acetat-Kinase, noch die Phosphat-Acetyltransferase konnten detektiert werden, so dass bezüglich dieses Weges keine Aussage gemacht werden kann. Neben einer erhöhten Einspeisung von Acetat in den Stoffwechsel durch die ACS3-katalysierte Reaktion deuten die Proteom-Daten zusätzlich eine insgesamt erhöhte Aktivität des Glyoxylat-Zyklus an. Für alle Enzyme des Glyoxylat-Zyklus konnten in *Stm6Glc4* zum Zeitpunkt t0 höhere Proteinmengen im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden (siehe Abbildung 52). Für *Chlamydomonas reinhardtii* wird angenommen, dass der Glyoxylat-Zyklus in sogenannten „Microbodies“ stattfindet, welche sich von den Peroxisomen und Glyoxysomen der höheren Pflanzen unterscheiden (*Chlamydomonas* Sourcebook, 2nd edition, 2009). Aus dem Glyoxylat-Zyklus stammendes Succinat wird in den mitochondriellen Citrat-Zyklus eingeschleust wobei letztlich Reduktionsäquivalente für die oxidative Phosphorylierung entstehen. In *Stm6Glc4* konnte eine höhere Expression der Fumarase (FUM1) und Malat-Dehydrogenase (MDH6) zum Zeitpunkt t0 festgestellt werden (siehe Abbildung 51; Abbildung 53). Gleichzeitig wurden in der Mutante Kern-kodierte Untereinheiten der Atmungsketten-Lomplexe I, III und V stärker akkumuliert (Abbildung 62). *In summa* lassen die erhaltenen Daten den Schluss zu, dass *Stm6Glc4* einen höheren respiratorischen Acetat-Verbrauch zu Beginn des H₂-Produktionsprozesses besitzt. In sehr guter Übereinstimmung stehen diese Ergebnisse mit der Metabolom Studie, welche ebenfalls einen höheren Acetat Verbrauch der Mutante demonstrierte (Doebbe et al., 2010). Zudem können diese Ergebnisse mit der Transkript-Untersuchung von Ahn-Vu Nguyen in Einklang gebracht werden (Dissertation Ngyuen, 2011; Nguyen et al., 2011). Vier Gene, welche am Kohlenhydrat-Metabolismus beteiligt sind, zeigten ebenfalls erhöhte Transkriptlevel. Der größte Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante ergab sich für das Isocitrat-Lyase Gen (ICL), welches in der Mutante deutlich abundanter war (Ngyuen et al., 2011).

Weiterhin sind die Ergebnisse kongruent mit den durchgeführten Respirationsmessungen (siehe Abbildung 59) und der Tatsache, dass die Sauerstoffkonzentration in *Stm6Glc4*-Kulturen nach Schwefelentzug schneller sinkt (Abbildung 28). Die Proteomdaten zeigen eine intensive Nutzung des Cyanid-insensitiven Weges der mitochondriellen Respiration an, da die Alternative Oxidase AOX1 verstärkt exprimiert wird. Dieser Befund ist im Einklang mit vorherigen Ergebnissen (Schönfeld et al., 2004), die eine stärkere AOX1 Expression in *Stm6* und eine gleichzeitig geringe Komplex IV-Aktivität anzeigten. Die Umgehung von Komplex IV reduziert die Mengen an synthetisierbarem ATP innerhalb der oxidativen Phosphorylierung. In zukünftigen Arbeiten sollte der zelluläre ATP-Gehalt

in *Stm6Glc4* unter H₂-produzierenden Bedingungen näher untersucht werden. Vorherige Arbeiten (Schönfeld et al., 2004) zeigten, dass die Menge an produziertem ATP in belichteten *Stm6*-Kulturen unter der des Parental-Stammes liegt. Die Arretierung der Mutante in *state 1* und die damit einhergehende, verminderte chloroplastidäre ATP-Herstellung über zyklische Photophosphorylierung ist jedoch schwierig vor diesem Hintergrund zu erklären.

Eine höhere mRNA-Expression des *aox1*-Gens konnte die parallel durchgeführte Transkriptanalyse (Nguyen et al., 2011) ebenfalls bestätigen. Die höhere Expression der AOX1 könnte nicht nur zu einer schnelleren Einstellung der Anaerobie beitragen, was die Expression der Hydrogenase gewährleistet, sondern könnte auch eine Überreduktion der mitochondrialen Atmungskette vermeiden und die Regeneration von NAD⁺ als Redox-Cofaktor für die Glykolyse und den Citratzyklus bewirken.

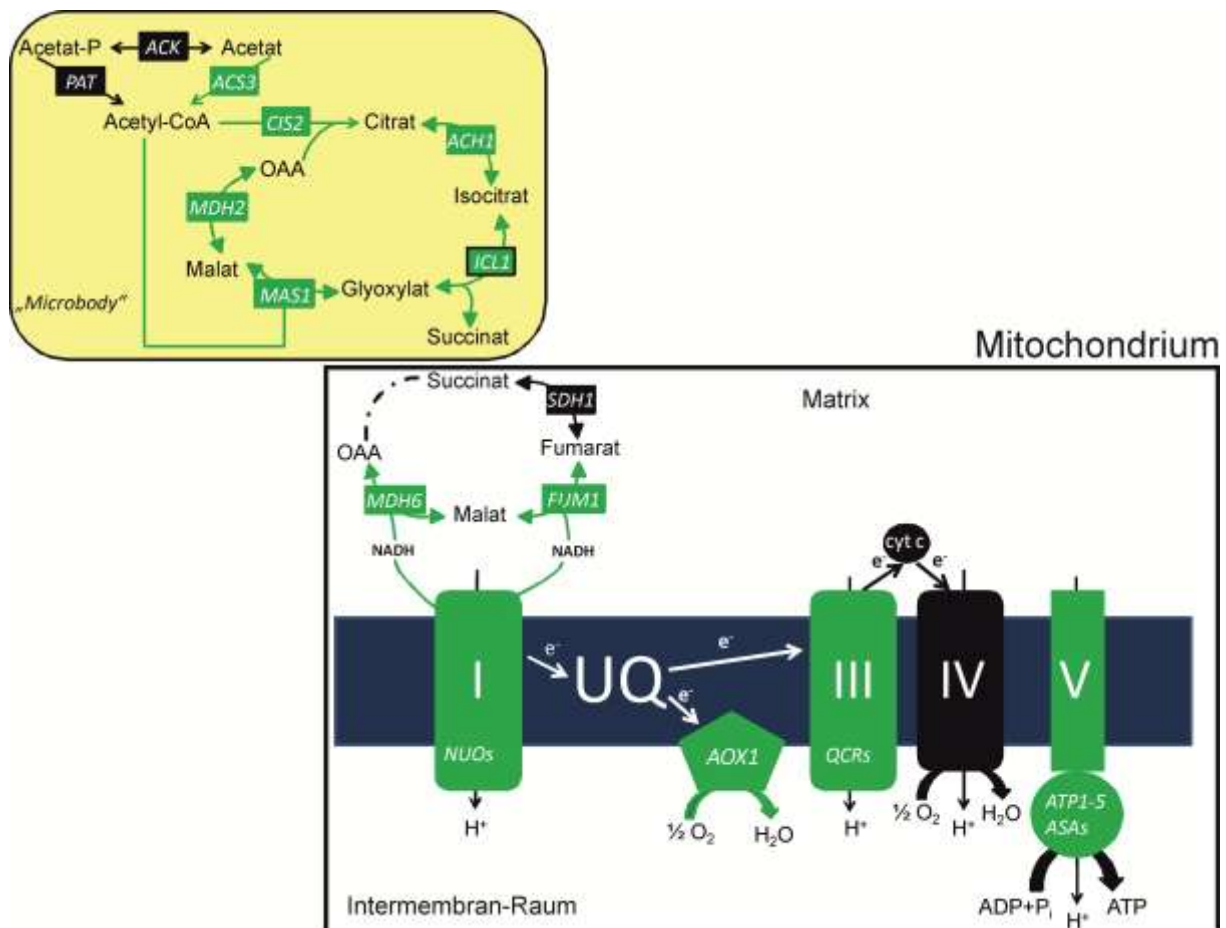


Abbildung 62: Respiratorischer Acetatverbrauch unter aeroben Konditionen in *Stm6Glc4*. Dargestellt sind die Stoffflüsse des Glyoxylat-Zyklus innerhalb der *Microbodies* und die Komponenten der mitochondrialen Respiration in *Chlamydomonas reinhardtii Stm6Glc4*. Grün hinterlegte Komponenten sind im Vergleich zum Wildtyp stärker akkumuliert, während schwarz hinterlegte Enzyme: keiner Regulation unterlagen

Der parentale Stamm der Mutante *Stm6Glc4* ist die Mutante *Stm6*. In *Stm6* führt die Abwesenheit des Transkriptions-Terminationsfaktors *MOC1* zu einem reduzierten Transkript-Level mitochondriell-kodierter Genen (Schönfeld et al., 2004; Lutz Wobbe persönliche Kommunikation). Interessanterweise ergaben die Proteom-Daten eine entgegengesetzte Tendenz, weshalb ein Kompensationseffekt sehr wahrscheinlich sein könnte. Die vorliegende Studie ergab eine Erhöhung der Menge an kernkodierten, mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung-(OXPHOS)-Komplex-Untereinheiten. Dieses Ergebnis aus der vorliegenden Proteomstudie und vorangegangener Arbeit (Schönfeld et al., 2004) bzw. aktuellen, unveröffentlichten Studien (persönliche Kommunikation mit Dr. Lutz Wobbe) könnte ein Beispiel für den retrograden Informationsfluss zwischen Mitochondrien und Zellkern innerhalb einer pflanzlichen Zelle sein.

6.2.9 Zusammenfassung der erhaltenen Daten

Mit der vorliegenden Studie wurden die Veränderung der Proteinzusammensetzung einer stark Wasserstoff-produzierenden Mutante mit einem Wildtyp verglichen, um Unterschiede im Expressionsmuster zu bestimmen, welche die höheren produzierten Wasserstoffmengen und den früheren Beginn der Wasserstoff-Produktion erklären. Informative Details konnten bereits unter mixotrophen Bedingungen, bevor der Schwefelmangel die Anaerobie und die Wasserstoffproduktion induziert, detektiert werden. Die Isocitratlyase, welche für einen effizienten Acetat-Katabolismus verantwortlich ist, wurde in der Mutante deutlich öfter detektiert und liefert damit eine mögliche Erklärung für den höheren Acetatverbrauch. Dieser wird durch höhere Atmungsraten aufgrund der verstärkten Expression einiger Atmungsketten-Komponenten begleitet, was zu einer niedrigeren Sauerstoff-Konzentration in *Stm6* Kulturen führt (Kruse et al., 2005). Die niedrigeren Sauerstoff-Konzentrationen lassen sich möglicherweise durch eine höhere cyanid-insensitive Respiration (Schönfeld et al., 2004, Ngyuen et al., 2011; vorliegende Studie) erklären. Möglicherweise resultieren die höheren H₂ Produktionskapazitäten auf genannten Fakten in Kombination mit einem höheren Anteil an PS II Untereinheiten (D1). Als Kernelement für ein funktionelles PS II gilt D1. Dieses nahm in den erhaltenen Datensätzen im Wildtyp unter H₂-produzierenden Bedingungen stärker ab als in der Mutante. Es ist allgemein anerkannt, dass eine vollständige Inaktivierung von PS II zu einer verminderten Wasserstoffproduktion führt (ebenso wie DCMU die H₂ Produktion inhibiert) (Kruse et al., 2005a), da der lineare Elektronenfluss zur Hydrogenase stark zur Gesamtproduktion beiträgt. Dies bestätigen die vorliegenden Daten ebenso wie die Ergebnisse der *Chlamydomonas reinhardtii* D1

Mutante L159I-N230Y belegen konnten, dass diese zu den produktivsten bekannten Zelllinien zählt (Kruse et al., 2005; Torzillo et al., 2009; Scoma et al., 2012). In dieser Mutante führt die Substitution von Aminosäuren an zwei Stellen der D1-Aminosäuresequenz zu einer erhöhten Stabilität des Proteins unter H₂-Produktionsbedingungen. Wie *StmGlc4* weist diese Mutante einen höheren D1 Gehalt auf, verfügt über eine bessere Fähigkeit zur Einlagerung von Kohlenhydraten und eine anhaltende PS II-Beteiligung an der Wasserstoffproduktion unter Schwefelmangel (Scoma et al., 2012). Die höhere Restaktivität von PS II unter wasserstoffproduzierenden Bedingungen in *Stm6Glc4* könnte damit eine mögliche Erklärung für die höhere Produktionsrate sein, da eine gewisse Restaktivität von PS II vorliegen muss, um viel H₂ produzieren zu können. In Zusammenschluss mit den Ergebnissen zum D1 Protein könnte man schlussfolgern, dass der höhere Elektronenfluss inklusive der Sauerstoffproduktion durch die höheren Atmungsraten kompensiert wird und somit den höheren Acetatkonsum, als auch die höheren Wasserstoffproduktionsraten in *Stm6Glc4* erklären könnte.

Zudem verfügt *Stm6Glc4* über größere Stärke-Depots (Schönfeld et al., 2004; Doebbe et al., 2010). Der Abbau von Stärke kann Reduktionsäquivalente liefern, welche über die nicht-photochemische Reduktion von Plastoquinon mittels der Nda2, einer NAD(P)H-Plastoquinon-Oxidoreduktase, in die photosynthetische Elektronentransportkette eingeschleust werden können und somit einen PS II unabhängigen Weg für die H₂ Produktion liefern (Jans et al., 2008; Chochois et al., 2009). In der einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* wurden neben dem lang bekannten PetF (photosynthetisches Ferredoxin) weitere Isoformen identifiziert, die unter variierenden Umweltbedingungen differentiell exprimiert werden (Winkler et al., 2010). Kürzlich wurde die unter anaeroben Konditionen exprimierte Fdx5- und die Fdx2-Untereinheit, welche in der Reduktion von Nitrit involviert ist, genauer charakterisiert (Winkler et al., 2010). Jedoch ist PetF die abundanteste Variante und ein geeigneter Donor für die Hydrogenase. Bedauerlicherweise konnte dieses Enzym in der vorliegenden Studie nicht identifiziert werden. Allerdings gibt es eine Vielzahl an konkurrierenden Reaktionen, welche die Aktivität der Hydrogenase möglicherweise beeinträchtigen. Viele Redoxreaktionen innerhalb des Chloroplasten sind auf die Verfügbarkeit von Ferredoxin angewiesen. So kann die stärkere Expression der Ferredoxin-Sulfit-Reduktase (SIR-) mRNA auf Proteinebene durch ein höheres Detektionsniveau im Massenspektrum des Wildtypen unter H₂-Produktionsbedingungen bestätigt werden. Dies könnte einen weiteren Erklärungsansatz für die niedrigeren H₂ Produktionsraten im Wildtypen liefern. Zudem ist in vorangegangenen Studien beschrieben worden, dass der parentale Stamm von *Stm6Glc4* (*Stm6*) im Licht in *state I* blockiert ist (Schönfeld et al., 2004). Die mobilen

Anteile des Lichtsammelkomplexes können nicht, in Reaktion auf den Redox-Status der Zelle, von einem Photosystem zum anderen migrieren (hier von PS II zu PS I). Damit ist eine Konkurrenzreaktion zur Hydrogenase stark eingeschränkt. Werden nun die Substratzuflüsse hin zur Hydrogenase verglichen, müsste die Bereitstellung von Elektronen in *Stm6Glc4* größer sein und sich in der Produktionskapazität zeigen (Doebbe et al., 2007). Den Proteinen PGRL1 und PGR5 wird eine wichtige Funktion bei der Etablierung des zyklischen Elektronentransports zugeschrieben. Es wird postuliert, dass PGRL1 mit PGR5 Komplexe bildet und dieser Komplex mit PS I assoziiert ist, um so den zyklischen Elektronentransport zu unterstützen (Peltier et al., 2010; Iwai et al., 2010; DalCorso et al., 2008). PGRL1 konnte in keinem der erhaltenen Datensätze nachgewiesen werden, während PGR5 zahlreicher im Wildtyp (t4) vorlag. Die höhere Menge an PGR5 im Wildtyp korreliert gut mit einer höheren Aktivität zyklischer Photo-Phosphorylierung, welche eine Konkurrenzreaktion zur Wasserstoffproduktion über den linearen Weg darstellt. Zudem haben neue Publikationen aufgezeigt, dass die Wasserstoffproduktion in einer *Chlamydomonas reinhardtii* Mutante, in der die Expression von PGRL1 reduziert ist, signifikant nach der Induktion durch Schwefelmangel steigt (Tolte et al., 2011). In *Arabidopsis thaliana* wurde PGRL1 als wichtige Komponente am zyklischen Elektronentransport beschrieben (DalCorso et al., 2008). Neben der Wasserstoffproduktion verfügt *Chlamydomonas reinhardtii* über eine Vielzahl an alternativen Stoffwechselwegen unter anaeroben Konditionen. Zu signifikanten Unterschieden hinsichtlich der Proteinmenge kam es nur in einem der vielfältigen alternativen fermentativen Stoffwechselweg, die möglicherweise u.a. zu einer Erklärung für die großen Unterschiede hinsichtlich der H₂ Produktion zwischen Wildtyp und Mutante beitragen. Die detektierte Menge der Alkoholdehydrogenase unterschied sich im Wildtyp und in der Mutante sowohl unter aeroben Bedingungen (t0) als auch im zeitlichen Verlauf während der Wasserstoffproduktion (t4/t6). Die ADH1 konnte unter beiden Konditionen öfters im Wildtyp detektiert werden. Auf Basis des produzierten Produktes Ethanol konnten diese Ergebnisse auch mittels der parallel durchgeführten Metabolom Untersuchung bestätigt werden (Doebbe et al., 2010). Geringe Mengen an Ethanol wurden in t0 in beiden Zelllinien detektiert, jedoch akkumulierte der Wildtyp größere Mengen an Ethanol im zeitlichen Verlauf der Wasserstoffproduktion im Vergleich zur Mutante (Doebbe et al., 2010). Terashima et al. konnte in ihrer Studie unter anaeroben Konditionen (induziert durch Argon-Begasung) ebenfalls eine Induktion der ADH1 in einem Wildtypen (*cc424*) nachweisen (Terashima et al., 2010).

6.2.10 Ausblick

Die systembiologische Analyse der Wasserstoffproduktion in *Stm6Glc4* im Vergleich zu einem Wildtypen lieferte wertvolle Einblicke in die molekularen Mechanismen, die der erhöhten H₂-Produktion in der Mutante zu Grunde liegen. Der Verlust des Transkriptions-Terminators *MOCI* führt zu einer erhöhten Respiration in *Stm6Glc4*. Eine erhöhte Respiration beschleunigt nicht nur das Erreichen anaerober Bedingungen sondern ermöglicht eine höhere Restaktivität von PS II und linearen Elektronentransport als effizienten Weg der Wasserstoffproduktion. Eine hohe Restaktivität von PS II ist nur dann mit der Produktion von Wasserstoff vereinbar, wenn entstehender Sauerstoff mit hoher Rate verbraucht wird. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse lassen sich verschiedene Ansätze zur Verbesserung der H₂-Produktion in *Chlamydomonas reinhardtii* formulieren. Darunter könnte die gezielte gentechnologische Manipulation des Glyoxylat-Zyklus oder der mitochondrialen Respiration fallen, um ähnlich wie in *Stm6Glc4*, eine höhere Respirationsrate zu erreichen. So könnte die Isocitrat-Lyase oder die Acetyl-CoA-Synthetase überexprimiert werden. Daneben sollte die AOX1 ein weiteres Zielenzym darstellen. Weiterhin könnte *MOCI* als Zielgen für ein *strain engineering* genutzt werden, indem die Expression von *MOCI* konditional nur unter Schwefelmangelbedingungen herunter reguliert wird. Entsprechende artifizielle Mikro-RNA-Konstrukte stehen momentan jedoch noch nicht zur Verfügung. Ein konditionaler *knock-down* von *MOCI* könnte das Problem der erhöhten Lichtsensitivität von *Stm6* umgehen, da der RNAi-Effekt während der Phase des Biomasse-Aufbaus in Anwesenheit von Schwefel nicht zum Tragen käme.

Die Expression des mutierten Translationsrepressors NAB1* in *Stm6Glc4* konnte durch Verkleinerung der PS II-Lichtsammelantenne eine erhöhte Starklicht-Toleranz bewirken. Eine Steigerung der Wasserstoffproduktion durch verbesserte Lichtpenetration konnte jedoch nicht erreicht werden. In der Arbeitsgruppe von Ben Hankamer (IMB, Queensland, Australien) wird momentan ein anderer Weg zur gezielten Verkleinerung der PS II-Antenne in *Stm6* beschrritten. Dabei sollen spezifisch nur ausgewählte Isoformen der PS II-Lichtsammelproteine mittels amiRNA herunter reguliert werden, so dass funktionelle Unterschiede zwischen den Isoformen (effektive Lichtsammlung vs. Quenching) berücksichtigt werden. Erste Ergebnisse weisen darauf hin, dass dieser Ansatz sehr vielversprechend in Bezug auf eine Verbesserung der H₂-Produktionsraten ist.

Neben der vorliegenden Studie weisen andere Arbeiten auf die Bedeutung von Stärke-Depots für den H₂-Produktionsprozess hin. Die im Rahmen des systembiologischen

Projektes durchgeführten Metabolom-Studien (Doebbe et al., 2010) haben klar gezeigt, dass *Stm6Glc4* bevorzugt Stärke als Energiereservoir nutzt und vergleichsweise wenig Triacylglyceride (TAGs) während der aeroben Phase, vor der H₂-Produktion, generiert. Auch hier bieten sich demnach Ansatzpunkte für eine gezielte Optimierung von Wildtyp-Stämmen, wobei das Enzym GWD2 (*glucan-water dikinase*) hier genannt werden kann.

Die Regulation des photosynthetischen Elektronenflusses hat einen großen Einfluss auf die H₂-Produktionskapazität. Eine intensive Nutzung des zyklischen Elektronentransportes steht dabei der Wasserstoffproduktion im Wege, da unter diesen Bedingungen weniger Elektronen für die Hydrogenase verfügbar sind. Der Phänotyp von *Stm6* verdeutlicht die Bedeutung des zyklischen Elektronentransportes als Konkurrenzreaktion zur Hydrogenase-Reaktion und Arbeiten an einer PGRL1-Insertionsmutante, welche erhöhte H₂-Produktionsraten aufweist, können als weitere Bestätigung angesehen werden. Das im Wildtypen verstärkt exprimierte Protein PGR5, welches in die Induktion zyklischen Elektronentransportes involviert ist, könnte ein Zielgen für künftige gentechnologische Ansätze sein.

7. Literaturverzeichnis

- Adams, M.W.W (1990). The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1020, 115 – 145.
- Agledal, L., Niere, M., Ziegler, M. (2010). The phosphate makes a difference: cellular functions of NADP, *Redox Rep.* 15, 2–10.
- Albaum, S.P., Neuweger, H., Franzel, B., Lange, S., Mertens, D., Trotschel, C., Wolters, D., Kalinowski, J., Nattkemper, T.W., and Goesmann, A. (2009). Qupe--a Rich Internet Application to take a step forward in the analysis of mass spectrometry-based quantitative proteomics experiments. *Bioinformatics* 25, 3128-3134.
- Albaum, S.P., Hahne, H., Otto, A., Haussmann, U., Becher, D., Poetsch, A., Goesmann, A., and Nattkemper, T.W. (2011). A guide through the computational analysis of isotope-labeled mass spectrometry-based quantitative proteomics data: an application study. *Proteome Sci* 9, 30.
- Anderson, J.M., Andersson, B., 1988. The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. *Trend. Biochem. Sci.* 13, 351-355.
- Anderson, J.M., Chow, W.S., Park, Y.I., Franklin, L.A., Robinson, S.P.A., van Hasselt, P.R., 2001. Response of *Tradescantia albiflora* to growth irradiance: Change versus changeability. *Photosynthesis Research* 67, 103-112.
- Antal, T.K., Krendeleva, T.E., and Rubin, A.B. (2011). Acclimation of green algae to sulfur deficiency: underlying mechanisms and application for hydrogen production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89, 3-15.
- Atteia, A. (1994). Identification of mitochondrial respiratory proteins from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *C.R. Acad. Sci. Paris* 317, 11 – 19.
- Atteia, A., van Lis, R., Gelius-Dietrich, G., Adrait, A., Garin, J., Joyard, J., Rolland N., and Martin, W. (2006). Pyruvate formate-lyase and a novel route of eukaryotic ATP synthesis in *Chlamydomonas* mitochondria. *J. Biol. Chem.* 281, 9909 – 9918.
- Atteia, A., Adrait, A., Brugiere, S., Tardif, M., van Lis, R., Deusch, O., Dagan, T., Kuhn, L., Gontero, B., Martin, W., Garin, J., Joyard, J., and Rolland, N. (2009). A proteomic survey of *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria sheds new light on the metabolic plasticity of the organelle and on the nature of the alpha-proteobacterial mitochondrial ancestor. *Mol Biol Evol* 26, 1533-1548.
- Beckmann, J., Lehr, F., Finazzi, G., Hankamer, B., Posten, C., Wobbe, L., and Kruse, O. (2009). Improvement of light to biomass conversion by de-regulation of light-harvesting protein translation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol* 142, 70-77.
- Bendall, D.S., Manasse, R.S. (1995). Cyclic photophosphorylation and electron transport, *Biochim. Biophys. Acta* 1229, 23–38.

- Bennoun, P. (1982). Evidence for a respiratory chain in the chloroplast, PNAS 79, 4352–4356.
- Bennoun, P. (1998). Chlororespiration, sixteen years later. Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in *Chlamydomonas* (Rochaix, J.-D. et al., eds), 675 – 683.
- Bennoun, P. (2001). Chlororespiration and the process of carotenoid biosynthesis. Biochem Biophys Acta 1506, 133 – 142.
- Bennoun, P. (2002). The present model for chlororespiration. Photosynth Res 73, 273 - 277.
- Blank, R. and Arnold, C.-G. (1980). Variety of mitochondrial shapes, sizes, and volumes in *Chlamydomonas reinhardtii*. Protoplasma 104, 187 – 191.
- Blankenship, R.E. (2010). Early evolution of photosynthesis. Plant Physiol 154, 434-438.
- Bock, A., King, P.W., Blokesch, M., and Posewitz, M.C. (2006). Maturation of hydrogenases. Adv. Microb. Physiol. 51, 1 – 71.
- Boichenko, V.A., Greenbaum, E., and Seibert, M. (2004). Hydrogen production by photosynthetic microorganisms. Photoconversion of Solar Energy, Molecular to Global Photosynthesis, Vol. 2 (M.D. Archer and J. Barber, Eds.), pp. 397 – 452 Imperial College Press, London.
- Bonente, G., Pippa, S., Castellano, S., Bassi, R., and Ballottari, M. (2012). Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to different growth irradiances. J Biol Chem 287, 5833-5847.
- Boynton, J.E., Gillham, N.W., and Chabot, J.F. (1972). Chloroplast ribosome deficient mutants in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the question of chloroplast ribosome function. J. Cell Sci. 10, 267 – 305.
- Buchanan, B.B. and Balmer, Y. (2005). Redox regulation: A broadening horizon. Annu. Rev. Plant Biol. 56, 187 – 220.
- Bulte, L., and Wollman, F.A. (1992). Evidence for a selective destabilization of an integral membrane protein, the cytochrome b6/f complex, during gametogenesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. Eur J Biochem 204, 327-336.
- Burnette, W.N. (1981) Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl-sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem. 112, 195 – 203.
- Burrows, P.A., Sazanov, L.A., Svab, Z., Maliga, P., and Nixon, P.J. (1998). Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. EMBO J 17, 868-876.
- Cardol, P., Vanrobaeys, F., Devreese, B., Van Beeumen, J., Matagne, R., and Remacle, C. (2004). Higher plant-like subunit composition of the mitochondrial complex I

- from *Chlamydomonas reinhardtii*: 31 conserved components among eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* 1658 , 212 – 224.
- Cardol, P., González-Halphen, D., Reyes-Prieto, A., Baurain, D., Matagne, R.F., and Remacle, C. (2005). The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the Genome Sequencing Project. *Plant Physiol.* 137, 447 – 459.
- Cecchini, G., Schroder, I., Gunsalus, R.P., and Maklashina, E. (2002). Succinatedehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1553 , 140 – 157.
- Chen, M, Zhao, K, Sun, YL, Cui, SX, Zhang, LF, Yang, B, Wang, J, Kuang, TY & Huang, F (2010), 'Proteomic Analysis of Hydrogen Photoproduction in Sulfur-Deprived *Chlamydomonas* Cells', *Journal of Proteome Research*, 3854-66.
- Chochois, V., Dauvillee, D., Beyly, A., Tolleter, D., Cuine, S., Timpano, H., Ball, S., Cournac, L., and Peltier, G. (2009). Hydrogen production in *Chlamydomonas*: photosystem II-dependent and -independent pathways differ in their requirement for starch metabolism. *Plant Physiol* 151, 631-640.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single – step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*162, 156–159.
- Cohen, I., Knopf, J.A., Irihimovitch, V., and Shapira, M. (2005). A proposed mechanism for the inhibitory effects of oxidative stress on RuBisCo assembly and its subunit expression. *Plant Physiol.* 137, 738 – 746.
- Cournac, L., Redding, K., Ravenel, J., Rumeau, D., Josse, E.M., Kuntz, M., and Peltier, G. (2000a). Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *J Biol Chem* 275, 17256-17262.
- Cournac, L., Josse, E.M., Joet, T., Rumeau, D., Redding, K., Kuntz, M., and Peltier, G. (2000b). Flexibility in photosynthetic electron transport: a newly identified chloroplast oxidase involved in chlororespiration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355, 1447-1454.
- DalCorso, G., Pesaresi, P., Masiero, S., Aseeva, E., Schunemann, D., Finazzi, G., Joliot, P., Barbato, R., and Leister, D. (2008). A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in Arabidopsis. *Cell* 132, 273-285.
- Davies, J.P., Yildiz, F.H., and Grossman, A. (1996). Sac1, a putative regulator that is critical for survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur deprivation. *EMBO J* 15, 2150-2159.
- Davies, J.P., Yildiz, F.H., and Grossman, A.R. (1999). Sac3, an Snf1-like serine/threonine kinase that positively and negatively regulates the responses of *Chlamydomonas* to sulfur limitation. *Plant Cell* 11, 1179 – 1190.

- Delosme, R., Olive, J., and Wollman, F.A. (1996). Changes in light energy distribution upon state transitions: An in vivo photoacoustic study of the wild type and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1273, 150 – 158 .
- Desplats, C., Mus, F., Cuine, S., Billon, E., Cournac, L., and Peltier, G. (2009). Characterization of Nda2, a plastoquinone-reducing type II NAD(P)H dehydrogenase in *Chlamydomonas* chloroplasts. *J Biol Chem* 284, 4148-4157.
- Dinant, M., Baurain, D., Coosemans, N., Joris, B., and Matagne, R.F. (2001). Characterization of two genes encoding the mitochondrial alternative oxidase in *Chlamydomonas reinhardtii* . *Curr. Genet.* 39 , 101 – 108.
- Doebbe, A., Rupprecht, J., Beckmann, J., Mussgnug, J.H., Hallmann, A., Hankamer, B., and Kruse, O. (2007). Functional integration of the HUP1 hexose symporter gene into the genome of *C. reinhardtii*: Impacts on biological H₂ production. *J Biotechnol* 131, 27-33.
- Doebbe, A., Keck, M., La Russa, M., Mussgnug, J.H., Hankamer, B., Tekce, E., Niehaus, K., and Kruse, O. (2010). The interplay of proton, electron, and metabolite supply for photosynthetic H₂ production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* 285, 30247-30260.
- Durnford, D.G., Falkowski, P.G., 1997. Chloroplast redox regulation of nuclear gene transcription during photoacclimation. *Photosynthesis Research* 53, 229-241.
- Durnford, D.G., Price, J.A., McKim, S.M., and Sarchfield, M.L. (2003). Light-harvesting complex gene expression is controlled by both transcriptional and post-transcriptional mechanisms during photoacclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiologia Plantarum* 118, 193-205.
- Elrad, D., Grossman, A.R., (2004). A genome's-eye view of the light-harvesting polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Genetics* 45, 61-75.
- 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.
- Eriksson, M., Gardstrom , P., and Samuelsson, G. (1995). Isolation, purification, and characterization of mitochondria from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 107, 479 – 483.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10237-10241.
- Ferrante, P., Ballottari, M., Bonente, G., Giuliano, G., and Bassi, R. (2012). LHCBM1 and LHCBM2/7 polypeptides, components of major LHCII complex, have distinct functional roles in photosynthetic antenna system of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* 287, 16276-16288.

- Ferreira, K.N., Iverson, T.M., Maghlaoui, K., Barber, J., and Iwata, S. (2004). Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* 303, 1831-1838.
- Fedorov, A.S., Kosourov, S., Ghirardi, M.L., and Seibert, M. (2005). Continuous hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: Using a novel two-stage, sulfate-limited chemostat system. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 4, 121 – 124, 403–412.
- Finazzi, G., Büschlen, S., de Vitry, C., Rappaport, F., Joliot, P., and Wollman, F.A. (1997). Function-directed mutagenesis of the cytochrome b₆ f complex in *Chlamydomonas reinhardtii*: Involvement of the cd loop of cytochrome b₆ in quinol binding to the Q_o site. *Biochemistry* 36, 2867 – 2874.
- Finazzi, G., Zito, F., Barbagallo, R.P., and Wollman, F.A. (2001). Contrasted effects of inhibitors of cytochrome b₆ f complex on state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*: The role of Q_o site occupancy in LHClI kinase activation. *J. Biol. Chem.* 276, 9770 – 9774.
- Finazzi, G., Rappaport, F., Furia, A., Fleischmann, M., Rochaix, J.D., Zito, F., and Forti, G. (2002). Involvement of state transitions in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO*, 280 – 285
- Fischer, N., Rochaix J.D., (2001). The flanking regions of PsaD drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Genetics and Genomics* 265, 888-894.
- Flachmann, R., Kühlbrandt, W., (1995). Accumulation of plant antenna complexes is regulated by post-transcriptional mechanisms in tobacco. *Plant Cell* 7, 149-160.
- Florin, L., Tsokoglou, A., and Happe, T. (2001). A novel type of iron hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 276, 6125 – 6132.
- Forestier, M., King, P., Zhang, L., Posewitz, M., Schwarzer, S., Happe, T., Ghirardi, M.L., Seibert, M. (2003). Expression of two [Fe]-hydrogenases in *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic conditions. *Eur. J.* 270, 2750 - 2758
- Fouchard, S., Hemschemeier, A., Caruana, A., Pruvost, J., Legrand, J., Happe, T., Peltier, G., and Cournac, L. (2005). Autotrophic and mixotrophic hydrogen photoproduction in sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells. *Appl Environ Microbiol* 71, 6199-6205.
- Funes, S., Davidson, E., Claros, M.G., van Lis, R., Pérez-Martínez, X., Vázquez-Acevedo, M., King, M.P., and González-Halphen, D. (2002). The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F₁F₀-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 277, 6051 – 6058.
- Gaffron, H., Rubin, J. (1942). Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *J. Gen. Physiol.* 26, 219 – 240.

- Geer, L.Y., Markey, S.P., Kowalak, J.A., Wagner, L., Xu, M., Maynard, D.M., Yang, X., Shi, W., and Bryant, S.H. (2004). Open mass spectrometry search algorithm. *J Proteome Res* 3, 958-964.
- Gfeller, R.P. and Gibbs, M. (1984). Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Analysis of fermentative products from starch in dark and light. *Plant Physiol.* 75, 212 – 218.
- Gfeller, R.P. and Gibbs, M. (1985). Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. II. Role of plastoquinone. *Plant Physiol.* 77, 509– 511.
- Ghirardi, M. L., Togasaki R. K., Seibert, M. (1997). Oxygen sensitivity of algal H₂-production, *Appl Biochem Biotech* 63, 141 - 151.
- Ghirardi, M.L., Zhang, L., Lee, J.W., Flynn, T., Seibert, M., Greenbaum, E., Melis, A. (2000). Microalgae: a green source of renewable H₂. *Trends Biotechnol* 18, 506– 511.
- Ghirardi, M.L., Seibert, M. (2003). Algal Systems for Hydrogen Photoproduction. Hydrogen, Fuel Cells, and Infrastructure Technologies. FY 2003 Progress Report.
- Ghirardi, M.L. (2006). Hydrogen production by photosynthetic green algae. *Indian J. Biochem. Biophys.* 43, 201 – 210.
- Ghirardi, M.L., King, P.W., Posewitz, M.C., Maness, P.C., Fedorov, A., Kim, K., Cohen, J., Schulten, K., and Seibert, M. (2005). Approaches to developing biological H₂ - photoproducing organisms and processes. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 70 – 72.
- Godde, D., Trebst, A. (1980). NADH as electron donor for photosynthetic membranes of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Arch. Microbiol.* 127, 245–252.
- Godde, D. (1982). Evidence for membrane bound NADH-plastoquinone-oxidoreductase in *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15, *Arch. Microbiol.* 131, 197–202.
- Gorman, D.S. and Levine, R.P. (1966). Photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. IV. Purification and properties of plastocyanin. *Plant Physiol.* 41, 1637 – 1642.
- Greenbaum, E. (1982). Photosynthetic hydrogen and oxygen production: kinetic studies, *Science* 196: 879 – 880.
- Gonzalez-Ballester, D., Casero, D., Cokus, S., Pellegrini, M., Merchant, S.S., and Grossman, A.R. (2010). RNA-seq analysis of sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells reveals aspects of acclimation critical for cell survival. *Plant Cell* 22, 2058-2084.
- Grossman, A.R., Harris, E.E., Hauser, C., Lefebvre, P.A., Martinez, D., Rokhsar, D., Shrager, J., Silflow, C.D., Stern, D., Vallon, O., and Zhang, Z. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* at the crossroads of genomics. *Eukaryot Cell* 2, 1137-1150.

- Grossman, A.R., Croft, M., Gladyshev, V.N., Merchant, S.S., Posewitz, M.C., Prochnik, S., and Spalding, M.H. (2007). Novel metabolism in *Chlamydomonas* through the lens of genomics. *Curr Opin Plant Biol* 10, 190-198.
- Grossman, A.R., Catalanotti, C., Yang, W., Dubini, A., Magneschi, L., Subramanian, V., Posewitz, M.C., and Seibert, M. (2011). Multiple facets of anoxic metabolism and hydrogen production in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *New Phytol* 190, 279-288.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557 – 580.
- Hankamer, B., Lehr, F., Rupprecht, J., Mussgnug, J.H., Posten, C., and Kruse, O. (2007). Photosynthetic biomass and H₂ production by green algae: from bioengineering to bioreactor scale-up. *Physiol Plant* 131, 10-21.
- Hanke, G.T., Endo, T., Satoh, F., and Hase, T. (2008). Altered photosynthetic electron channelling into cyclic electron flow and nitrite assimilation in a mutant of ferredoxin:NADP(H) reductase. *Plant Cell Environ* 31, 1017-1028.
- Happe, T., and Naber, J.D. (1993). Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* 214, 475-481.
- Happe, T., Mosler, B., and Naber, J.D. (1994). Induction, localization and metal content of hydrogenase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* 222, 769 – 774.
- Happe, T., Hemschemeier, A., Winkler, M., and 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.
- Harris, E.H. (1989). The *Chlamydomonas* Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. Academic Press, San Diego.
- Harris, E.H. (1998). Introduction to *Chlamydomonas*. In: The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in *Chlamydomonas* (J.-D. Rochaix, M.G. Oldschmidt-Clermont, and S. Merchant, Eds.), 1– 11, Kluwer Academic, Dordrecht.
- Harris, E.H. (2009) The *Chlamydomonas* Sourcebook. Introduction to *Chlamydomonas* and its laboratory use, Volume 1. 2nd Ed., San Diego: Academic Press, San Diego, pp. 25-64.
- Healey, F.P. (1970). The mechanism of hydrogen evolution by *Chlamydomonas moewusii*. *Plant Physiol.* 45, 153 – 159.
- Heldt, H.W. (1999) Pflanzenbiochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Hemschemeier, A., Happe, T. (2005) The exceptional photofermentative hydrogen metabolism of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem Soc Trans*, 33, 39-41.

- Hemschemeier, A., Jacobs, J., Happe, T. (2008) Biochemical and physiological characterization of the pyruvate formate-lyase Pfl1 of *Chlamydomonas reinhardtii*, a typically bacterial enzyme in a eukaryotic alga. *Euk Cell*, 7, 518-526.
- Hemschemeier, A., Melis, A., and Happe, T. (2009). Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae. *Photosynth Res* 102, 523-540.
- Hemschemeier, A., and Happe, T. (2011). Alternative photosynthetic electron transport pathways during anaerobiosis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 1807, 919-926.
- Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., Graham Cooks, R. (2005). The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom* 40: 430 – 443
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., and Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J* 54, 621-639.
- Iwai, M., Takizawa, K., Tokutsu, R., Okamuro, A., Takahashi, Y., and Minagawa, J. (2010). Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis. *Nature* 464, 1210-1213.
- Jacobs, J., Pudollek, S., Hemschemeier, A., and Happe, T. (2009). A novel, anaerobically induced ferredoxin in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* 583, 325-329.
- Jans, F., Mignolet, E., Houyoux, P.A., Cardol, P., Ghysels, B., Cuine, S., Cournac, L., Peltier, G., Remacle, C., and Franck, F. (2008). A type II NAD(P)H dehydrogenase mediates light-independent plastoquinone reduction in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20546-20551.
- Joët, T., Cournac, L., Horvath, E.M., Medgyesy, P., Peltier, G. (2001). In Increased sensitivity of photosynthesis to antimycin A induced by inactivation of the chloroplast *ndhB* gene. Evidence for a participation of the NADH-dehydrogenase complex to cyclic electron flow around photosystem I, *Plant Physiol.* 125, 1919–1929.
- Joliot P., Joliot A., (2005). Quantification of cyclic and linear flows in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 4913-4918
- Kathir, P., LaVoie, M., Brazelton, W.J., Haas, N.A., Lefebvre, P.A., Silflow, C.D. (2003). Molecular map of the *Chlamydomonas reinhardtii* nuclear genome. *Eukaryot. Cell* 2,362-379
- Keller, A., Nesvizhskii, A.I., Kolker, E. & Aebersold, R (2002). Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search *Analytical Chemistry*, 5383-5392
- Kessler, E. (1974). Hydrogenase, photoreduction and anaerobic growth. *Algal Physiology and Biochemistry* (W.D.P. Stewart, Ed.), pp. 456 – 473 . Blackwell , Oxford .

- Kindle, K.L., 1990. High frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1228–1232.
- King, P.W., Posewitz, M.C., Ghirardi, M.L., and Seibert, M. (2006). Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an Escherichia coli biosynthetic system. J. Bacteriol. 188 , 2163 – 2172 .
- Kirk, J.T.O. (1994) Light and photosynthese in aquatic ecosystems, 2nd edition Cambridge
- Kosourov, S., Tsygankov, A., Seibert, M. , and Ghirardi, M.L. (2002). Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of culture parameters. Biotechnol. Bioeng. 78 , 731 – 740 .
- Kosourov, S., Makarova, V., Fedorov, A.S., Tsygankov, A., Seibert, M., and Ghirardi, M.L. (2005). The effect of sulfur re-addition on H₂ photoproduction by sulfur-deprived green algae . Photosynth. Res. 85 , 295 – 305 .
- Kosourov, S., Patrusheva, E., Ghirardi, M.L., Seibert, M., and Tsygankov, A. (2007). A comparison of hydrogen photoproduction by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions. Biotechnol. J. 128, 776 – 787.
- Kreuzberg, K. (1984). Evidences for the role of the chloroplast in algal fermentation. Adv. Photosynth. Res. 3 , 437 – 440 .
- Kruse, O., Rupprecht, J., Mussgnug, J.H., Dismukes, G.C., and Hankamer, B. (2005a). Photosynthesis: a blueprint for solar energy capture and biohydrogen production technologies. Photochem Photobiol Sci 4, 957-970.
- Kruse, O., Rupprecht, J., Bader, K.P., Thomas-Hall, S., Schenk, P.M., Finazzi, G., and Hankamer, B. (2005b). Improved photobiological H₂ production in engineered green algal cells. J Biol Chem 280, 34170-34177.
- Kornberg HL, Krebs HA (1957) Synthesis of cell constituents from C₂-Units by a modified tricarboxylic acid cycle. Nature 179: 988–991.
- Lemire, B.D. and Oyedotun, K.S. (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase . Biochim. Biophys. Acta 1553, 102 – 116 .
- 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 enzymatic system. Eur. J. Biochem. 231, 503–509.
- Lottspeich, F., Zorbas, H. (eds.) (1998). Bionalytik. Spektrum Akademischer Verlag. 1. Auflage.
- Magneschi, L., Catalanotti, C., Subramanian, V., Dubini, A., Yang, W., Mus, F., Posewitz, M.C., Seibert, M., Perata, P., and Grossman, A.R. (2012). A mutant in the ADH1 gene of *Chlamydomonas reinhardtii* elicits metabolic restructuring during anaerobiosis. Plant Physiol 158, 1293-1305.

- Maione, T. and Gibbs, M. (1986). Association of the chloroplastic respiratory and photosynthetic electron transport chains of *Chlamydomonas reinhardtii* with photoreduction and the oxyhydrogen reaction. *Plant Physiol.* 80 , 364 – 368 .
- Masukawa, H., Yoshino, F., Wakai, M., and Sakurai, H. (2004). Photobiological H₂ production utilizing heterocystous cyanobacteria. *Plant and Cell Physiology* 45, S23-S23.
- Matagne, R.F., Michel-Wolwertz, M.R., Munaut, C., Duyckaerts, C., and Sluse, F.(1989). Induction and characterization of mitochondrial DNA mutants in *Chlamydomonas reinhardtii* . *J. Cell. Biol.* 108 , 1221 – 1226.
- Mathy, G., Cardol, P., Dinant, M., Blomme, A., Gerin, S., Cloes, M., Ghysels, B., DePauw, E., Leprince, P., Remacle, C., Sluse-Goffart, C., Franck, F., Matagne, R.F., and Sluse, F.E. (2010). Proteomic and functional characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant lacking the mitochondrial alternative oxidase 1. *J Proteome Res* 9, 2825-2838.
- Matthiesen, R. (2007). Methods, algorithms and tools in computational proteomics: a practical point of view. *Proteomics*, 7, 2815-2832
- Maxwell, D.P., Wang, Y., and McIntosh, L. (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells . *Proc. Natl. Acad. Sci.U. S. A.* 96 , 8271 – 8276 .
- Maxwell, K., Johnson, G.N., (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668
- Mayfield, S.P., Manuell, A.L., Chen, S., Wu, J., Tran, M., Siefker, D., Muto, M., and Marin-Navarro, J. (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Curr Opin Biotechnol* 18, 126-133.
- Maxwell, D. P., Laudénbach, D.E., Huner N.P.A., (1995). Redox Regulation of Light Harvesting Complex-II and Cab Messenger-RNA Abundance in *Dunaliella-Salina*. *Plant Physiology* 109, 787-795.
- Melis, A. (1999). Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends in Plant Science* 4, 130-35.
- Melis, A. and Happe, T. (2001). Hydrogen production. Green algae as a source of energy . *Plant Physiol.* 127 , 740 – 748 .
- Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M.L., and 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., Seibert, M., and Happe, T. (2004). Genomics of green algal hydrogen research. *Photosynth Res* 82, 277-288.
- Melis, A. and Happe, T. (2004). Trails of green alga hydrogen research: From Hans Gaffron to new frontiers . *Photosynth. Res.* 80 , 401 – 409 .

- Melis, A., Seibert, M., and Ghirardi, M.L. (2007). Hydrogen fuel production by transgenic microalgae. *Adv Exp Med Biol* 616, 110-121.
- Merchant, S.S., Allen, M.D., Kropat, J., Moseley, J.L., Long, J.C., Tottey, S., and Terauchi, A.M. (2006). Between a rock and a hard place: trace element nutrition in *Chlamydomonas*. *Biochim Biophys Acta* 1763, 578-594.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G. B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Maréchal-Drouard, L., (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318, 245–250.
- Mitra, M., Kirst, H., Dewez, D., and Melis, A. (2012). Modulation of the light-harvesting chlorophyll antenna size in *Chlamydomonas reinhardtii* by TLA1 gene over-expression and RNA interference. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 3430-3443.
- Molnar, A., Schwach, F., Studholme, D.J., Thuenemann, E.C., and Baulcombe, D.C. (2007). miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* 447, 1126-1129.
- Mueller, L.N., Brusniak, M.Y., Mani, D.R., and Aebersold, R. (2008). An assessment of software solutions for the analysis of mass spectrometry based quantitative proteomics data. *J Proteome Res* 7, 51-61.
- Müller, P., Li, X.P., Niyogi, K.K., (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125, 1558–1566.
- 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.
- Mus, F., Dubini, A., Seibert, M., Posewitz, M.C., and Grossman, A.R. (2007). Anaerobic acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*: anoxic gene expression, hydrogenase induction, and metabolic pathways. *J Biol Chem* 282, 25475-25486.
- Mussnug, J.H., Wobbe, L., Elles, I., Claus, C., Hamilton, M., Fink, A., Kahmann, U., Kapazoglou, A., Mullineaux, C.W., Hippler, M., Nickelsen, J., Nixon, P.J., Kruse, O., (2005). NAB1 is an RNA binding protein involved in the light regulated differential expression of the light-harvesting antenna of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 17, 3409-3421.
- Mussnug, J.H., Thomas-Hall, S., Rupprecht, J., Foo, A., Klassen, V., McDowall, A., Schenk, P.M., Kruse, O., Hankamer, B., (2007). Engineering photosynthetic light capture: Impacts on improved solar energy to biomass conversion. *Plant Biotechnology Journal* 5, 802-814.
- Nakajima, Y. Ueda, R. (1999). Improvement of microalgal photosynthetic productivity by reducing the content of light harvesting pigment. *Journal of Applied Phycology* 11: 195–201

- Naus, J., Melis, A. (1991). Changes of Photosystem Stoichiometry during Cell Growth in *Dunaliella salina* Cultures. *Plant Cell Physiol.* 32, 569-575
- Neidhardt, J., Benemann, J.R., Zhang, L.P., Melis, A., (1998). Photosystem-II repair and chloroplast recovery from irradiance stress: relationship between chronic photoinhibition, light-harvesting chlorophyll antenna size and photosynthetic productivity in *Dunaliella salina* (green algae). *Photosynthesis Research* 56, 175-84.
- Nelson, J.A.E., Savereide P.B., Lefebvre P.A., (1994). The Cry1 Gene in *Chlamydomonas reinhardtii* - structure and use as a dominant selectable marker for nuclear transformation. *Molecular and cellular biology* 14, 4011-4019.
- Nesvizhskii, A.I., Keller, A., Kolker, E. & Aebersold, R. (2003) A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry *Analytical Chemistry*, 2003, 75, 4646-4658
- Niyogi, K.K., Bjorkman, O., and Grossman, A.R. (1997). *Chlamydomonas* Xanthophyll Cycle Mutants Identified by Video Imaging of Chlorophyll Fluorescence Quenching. *Plant Cell* 9, 1369-1380.
- Nield, J., Kruse, O., Ruprecht, J., da Fonseca, P., Buchel, C. & Barber, J. (2000). Three-dimensional structure of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechococcus elongatus* Photosystem II complexes allows for comparison of their oxygen-evolving complex organization. *J. Biol. Chem.*, 275, 27940-27946
- Nguyen, A.V., Thomas-Hall, S.R., Malnoe, A., Timmins, M., Mussgnug, J.H., Ruprecht, J., Kruse, O., Hankamer, B., and Schenk, P.M. (2008). Transcriptome for photobiological hydrogen production induced by sulfur deprivation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* 7, 1965-1979.
- Nguyen, A.V., Toepel, J., Burgess, S., Uhmeyer, A., Blifernez, O., Doebbe, A., Hankamer, B., Nixon, P., Wobbe, L., and Kruse, O. (2011). Time-course global expression profiles of *Chlamydomonas reinhardtii* during photo-biological H₂ production. *PLoS One* 6, e29364.
- Ohta, S., Miyamoto, K., and Miura, Y. (1987). Hydrogen evolution as a consumption mode of reducing equivalents in green algal fermentation. *Plant Physiol.* 83, 1022 – 1026.
- Pedrioli, P.G., Eng, J. K., Hubley, R., Vogelzang, M, Deutsch, E. W., Raught, B., Pratt, B., Nilsson, E., Angeletti, R. H., Apweiler, R., Cheung, K., Costello, C.E., Hermjakob, H., Huang, S., Julian, R.K., Kapp, E., McComb, M.E., Oliver, S.G., Omenn, G., Paton, N.W., Simpson, R., Smith, R., Taylor, C. F., Zhu, W. & Aebersold, R (2004). A common open representation of mass spectrometry data and its application to proteomics research *Nature Biotechnology* 22, 1459-1466
- Peers G, Truong TB, Ostendorf E, Busch A, Elrad D, Grossman AR, Hippler M, Niyogi KK (2009) An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis. *Nature* 462:518–521

- Peltier, G., and Schmidt, G.W. (1991). Chlororespiration: an adaptation to nitrogen deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci U S A 88, 4791-4795.
- Peltier, G., and Cournac, L. (2002). Chlororespiration. Annu Rev Plant Biol 53, 523-550.
- Peltier, G., Tolleter, D., Billon, E., and Cournac, L. (2010). Auxiliary electron transport pathways in chloroplasts of microalgae. Photosynth Res 106, 19-31.
- Peng, L., Yamamoto, H., and Shikanai, T. Structure and biogenesis of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. Biochim Biophys Acta 1807, 945-953.
- Petroutsos, D., Terauchi, A.M., Busch, A., Hirschmann, I., Merchant, S.S., Finazzi, G., and Hippler, M. (2009). PGRL1 participates in iron-induced remodeling of the photosynthetic apparatus and in energy metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. J Biol Chem 284, 32770-32781
- Polle, J.E.W., Kanakagiri, S., Jin, E., Masuda, T., Melis, A., (2002). Truncated chlorophyll antenna size of the photosystems - a practical method to improve microalgal productivity and hydrogen production in mass culture. International Journal of Hydrogen Energy 27, 1257-1264.
- Polle, J.E., Kanakagiri, S.D., and Melis, A. (2003). tla1, a DNA insertional transformant of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with a truncated light-harvesting chlorophyll antenna size. Planta 217, 49-59.
- Pollock, S.V., Pootakham, W., Shibagaki, N., Moseley, J.L., and Grossman, A.R. (2005). Insights into the acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to sulfur deprivation. Photosynth Res 86, 475-489.
- Posewitz, M.C., Smolinski, S.L., Kanakagiri, S., Melis, A., Seibert, M., and Ghirardi, M.L. (2004). Hydrogen photoproduction is attenuated by disruption of an isoamylase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell 16, 2151-2163.
- Posewitz, M.C., King, P.W., Smolinski, S.L., Smith, R.D., Ginley, A.R., Ghirardi, M.L., and Seibert, M. (2005). Identification of genes required for hydrogenase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochem. Soc. Trans. 33, 102 - 104.
- Posewitz, M.C., Mulder, D.W., and Peters, J.W. (2008). New frontiers in hydrogenase structure and biosynthesis. Curr. Chem. Biol. 2, 178-199.
- Prince, R.C., and Kheshgi, H.S. (2005). The photobiological production of hydrogen: potential efficiency and effectiveness as a renewable fuel. Crit Rev Microbiol 31, 19-31.
- Pulz, O., Gross W., (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology 65, 635-48.
- Quinn, J.M., Barraco, P., Eriksson, M., and Merchant, S. (2000). Coordinate copper- and oxygen-responsive Cyc6 and Cpx1 expression in *Chlamydomonas* is mediated by the same element. J Biol Chem 275, 6080-6089.

- Raghavendra, A.S., and Padmasree, K. (2003). Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends Plant Sci* 8, 546-553.
- Ravenel, J., Peltier, G., Havaux, M. (1994). The cyclic electron pathways around photosystem-I in *Chlamydomonas reinhardtii* as determined in vivo by photoacoustic measurements of energy storage, *Planta* 193, 251–259.
- Reidegeld, K.A., Eisenacher, M., Kohl, M., Chamrad, D., Körting, G., Blüggel, M., Meyer H. E. & Stephan C. (2008). An easy-to-use Decoy Database Builder software tool, implementing different decoy strategies for false discovery rate calculation in automated MS/MS protein identifications *Proteomics* 8, 1129-1137
- Rumeau, D., Peltier, G., Cournac, L., (2007) Chlororespiration and cyclic electron flow around PS I during photosynthesis and plant stress response, *Plant Cell Environ.* 30, 1041–1051.
- Roessler, P.G. and Lien, S. (1984). Activation and de novo synthesis of hydrogenase in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* 76, 1086 – 1089.
- Rühle, T., Hemschemeier, A., Melis, A., Happe, T. (2008). A novel screening protocol for the isolation of hydrogen producing *Chlamydomonas reinhardtii* strains *BMC Plant Biol* 17, 107
- Saito, K. (2000). Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 188– 195.
- Sambrook, J., Russel, D.W., (2001). Cold Spring Harbor Laboratory Press third ed. In: *Molecular cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY.
- Sazanov, L.A., Burrows, P.A., and Nixon, P.J. (1998a). The plastid ndh genes code for an NADH-specific dehydrogenase: isolation of a complex I analogue from pea thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1319-1324.
- Sazanov, L.A., Burrows, P.A., and Nixon, P.J. (1998b). The chloroplast Ndh complex mediates the dark reduction of the plastoquinone pool in response to heat stress in tobacco leaves. *FEBS Lett* 429, 115-118
- Schutz, K., Happe, T., Troshina, O., Lindblad, P., Leitao, E., Oliveira, P., and Tamagnini P. (2004). Cyanobacterial H₂ production—a comparative analysis. *Planta* 218, 350–359.
- Schmollinger, S., Strenkert, D., Offeddu, V., Nordhues, A., Sommer, F., and Schroda, M. (2012). A Protocol for the Identification of Protein-protein Interactions Based on ¹⁵N Metabolic Labeling, Immunoprecipitation, Quantitative Mass Spectrometry and Affinity Modulation. *J Vis Exp*.
- Schägger, H., Jagow, G. (1987). Tricin-sodium-dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379

- Smith, R.D., Anderson, G.A., Lipton, M.S., Pasa-Tolic, L., Shen, Y., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., and Udseth, H.R. (2002). An accurate mass tag strategy for quantitative and high-throughput proteome measurements. *Proteomics* **2**, 513-523.
- Schönfeld, C., Wobbe, L., Borgstadt, R., Kienast, A., Nixon, P.J., and Kruse, O. (2004). The nucleus-encoded protein MOC1 is essential for mitochondrial light acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **279**, 50366-50374.
- Schötz, F., Bathelt, H., Arnold, C.-G., and Schimmer, O. (1972). Die Architektur und Organisation der *Chlamydomonas*-Zelle. Ergebnisse der Elektronenmikroskopie von Serienschnitten und der daraus resultierenden dreidimensionalen Rekonstruktion. *Protoplasma* **75**, 229 – 254 .
- Scoma, A., Krawietz, D., Faraloni, C., Giannelli, L., Happe, T., and Torzillo, G. (2012). Sustained H₂ production in a *Chlamydomonas reinhardtii* D1 protein mutant. *J Biotechnol* **157**, 613-619.
- Shena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expressions patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**: 467 - 470
- Shikanai, T. (2007). Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches, *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**, 199–217
- Shimogawara, K., Wykoff, D.D., Usuda, H., and Grossman, A.R. (1999). *Chlamydomonas reinhardtii* mutants abnormal in their responses to phosphorus deprivation. *Plant Physiol* **120**, 685-694.
- Sueoka, N., Chiang, K.S. and Kates, J.R. (1967). Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii* Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores. *J. Mol. Biol.* **25**, 44-67.
- Suorsa, M., Sirpiö, S., Aro, E.M. (2009). Towards characterization of the chloroplast NAD (P)H dehydrogenase complex, *Mol. Plant* **2**, 1127–1140.
- Stauber, E. J., Fink, A., Markert, C., Kruse, O., Johanningmeier, U., Hippler, M., (2003). Proteomics of *Chlamydomonas reinhardtii* light-harvesting proteins. *Eukaryotic Cell* **2**, 978-994.
- Steen, H., and Mann, M. (2004). The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 699-711.
- Stripp, S.T., and Happe, T. (2009). How algae produce hydrogen--news from the photosynthetic hydrogenase. *Dalton Trans*, 9960-9969.
- Surzycki, R., Cournac, L., Peltier, G., Rochaix, J. D. (2007) Potential for hydrogen production with inducible chloroplast gene expression in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 17548-53
- Taiz, L., Zeiger, E. (eds.) (2000). *Physiologie der Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag

- Takahashi, H., Braby, C.E. and Grossman, A.R. (2001) Sulfur economy and cell wall biosynthesis during sulfur limitation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 127, 665–673.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wunschiers, R., and Lindblad, P. (2002). Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol.Mol. Biol. Rev.* 66, 1 – 20.
- Terashima, M., Specht, M., Naumann, B., and Hippler, M. (2010). Characterizing the anaerobic response of *Chlamydomonas reinhardtii* by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 9, 1514-1532.
- Terauchi, A.M., Lu, S.F., Zaffagnini, M., Tappa, S., Hirasawa, M., Tripathy, J.N., Knaff, D.B., Farmer, P.J., Lemaire, S.D., Hase, T., and Merchant, S.S. (2009). Pattern of expression and substrate specificity of chloroplast ferredoxins from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* 284, 25867-25878.
- Timmins, M, Zhou, WX, Rupprecht, J, Lim, L, Thomas-Hall, SR, Doebbe, A, Kruse, O, Hankamer, B, Marx, UC, Smith, SM & Schenk, PM 2009, 'The Metabolome of *Chlamydomonas reinhardtii* following Induction of Anaerobic H₂ Production by Sulfur Depletion', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 35, pp. 23415-25.
- Tolteer, D., Ghysels, B., Alric, J., Petroutsos, D., Tolstygina, I., Krawietz, D., Happe, T., Auroy, P., Adriano, J.M., Beyly, A., Cuine, S., Plet, J., Reiter, I.M., Genty, B., Cournac, L., Hippler, M., and Peltier, G. (2011). Control of hydrogen photoproduction by the proton gradient generated by cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 23, 2619-2630.
- Towbin, H., T. Staehelin, Gordon J., (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.
- Trötschel, C., Albaum, S.P., Wolff, D., Schröder, S., Goesmann, A., Nattkemper, W., Rögnier, M. & Poetsch, A. (2012). Protein turnover quantification in a multi-labeling approach--from data calculation to evaluation *Molecular and Cellular Proteomics*, 11, 512-526
- Tsygankov, A., Kosourov, S., Seibert, M., and Ghirardi, M. (2002). Hydrogen photoproduction under continuous illumination by sulfur-deprived, synchronous *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *Int. J. Hyd. Energy*, 27, 1239 – 1244.
- Turkina M.V., Kargul J., Blanco-Rivero A., Villarejo A., Barber J., Vener A.V., (2006). Environmentally modulated phosphoproteome of photosynthetic membranes in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Cell Proteomics*. 5, 1412-1425.
- van Lis, R., Atteia, A., Mendoza-Hernández, G., and González-Halphen, D. (2003). Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach. *Plant Physiol.* 132, 318 – 330.

- van Lis, R., González-Halphen, D., and Atteia, A. (2005). Divergence of the mitochondrial electron transport chains from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its colorless close relative *Polytomella* sp. *Biochim. Biophys. Acta* 1708, 23 – 34 .
- van Lis, R., Mendoza-Hernández, G., Groth, G., and Atteia, A. (2007). New insights into the unique structure of the F₀F₁-ATP synthase from the Chlamydomonad algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii* . *Plant Physiol.* 144, 1190 – 1199 .
- Vignais, P.M., Billoud, B., and Meyer, J. (2001). Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 455 – 501 .
- Vignais, P.M. and Colbeau, A. (2004). Molecular biology of microbial hydrogenases . *Curr. Issues Mol. Biol.* 6, 159 – 188 .
- Vignais, P.M., Billoud, B., and Meyer, J. (2001). Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 455 – 501 .
- Weaver, P.F., Lien, S., and Seibert, M. (1980). Photobiological production of hydrogen. *Solar Energy* 24, 3 – 45 .
- Wilhelm, C., et al. (2006). The regulation of carbon and nutrient assimilation in diatoms is significantly different from green algae. *Protist.* 157, 91–124.
- Winkler, M., Hemschemeier, A., Gotor, C., Melis, A., and Happe, T. (2002). [Fe]-hydrogenases in green algae: Photo-fermentation and hydrogen evolution under sulfur deprivation . *Int. J. Hyd. Energy*, 27, 1431 – 1439 .
- Winkler, M., Kuhlger, S., Hippler, M., and Happe, T. (2009). Characterization of the key step for light-driven hydrogen evolution in green algae. *J Biol Chem* 284, 36620-36627.
- Wobbe L, Schwarz C, Nickelsen J, Kruse O., 2008. Translational control of photosynthetic gene expression in phototrophic eukaryotes. *Physiol Plant.* 133, 507-515.
- Wobbe, L., Blifernéz, O., Schwarz, C., Mussnug, J.H., Nickelsen, J., and Kruse, O. (2009). Cysteine modification of a specific repressor protein controls the translational status of nucleus-encoded LHCII mRNAs in *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13290-13295.
- Wolters, D.A., Washburn, M.P., and Yates, J.R., 3rd. (2001). An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem* 73, 5683-5690.
- Wu, L.F. and Mandrand, M.A. (1993). Microbial hydrogenases: Primary structure, classification, signatures and phylogeny . *FEMS Microbiol. Rev.* 10, 243 – 269 .
- Wünschiers, R., Stangier, K., Senger, H., and Schulz, R. (2001). Molecular evidence for a Fe-hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Curr. Microbiol.* 42, 353–360.

- Wolters, D.A., Washburn, M.P., and Yates, J.R., 3rd. (2001). An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem* **73**, 5683-5690.
- Wykoff, D.D., Davies, J.P., Melis, A., and Grossman, A.R. (1998). The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **117**, 129-139.
- Yamasaki, T., Miyasaka, H., and Ohama, T. (2008). Unstable RNAi effects through epigenetic silencing of an inverted repeat transgene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **180**, 1927-1944.
- 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 - Cytochrome b(6)f deficient *Lemna perpusilla* plants are locked in a state of high-light acclimation. *Photosynthesis Research* **68**, 163-174.
- Yarmush, M.L., Jayaraman, A. (2002). Advances in proteomic technologies. *Annu Rev Biomed Eng* **4**: 349-373
- Yates, J.R., Ruse, C.I., Nakorchevsky, A. (2009). Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng* **4**: 49 - 79
- Yildiz, F.H., Davies, J.P., and Grossman, A.R. (1994). Characterization of sulfate transport in *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur-limited and sulfur sufficient growth. *Plant Physiol.* **104**, 981 - 987.
- Zabawinski, C., Van Den Koornhuise, N., D'Hulst, C., Schlichting, R., Giersch, C., Delrue, B., Lacroix, J.M., Preiss, J., and Ball, S. (2001). Starchless mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lack the small subunit of a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase. *J Bacteriol* **183**, 1069-1077.
- Zaborsky, O.R., (1998) *BioHydrogen*, Plenum Press, New York and London
- Zhang, L., Happe, T., and Melis, A. (2002). Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta* **214**, 552-561.
- Zhang, L. and Melis, A. (2002). Probing green algal hydrogen production. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **357**, 1499 - 1507.
- Zhang, Z., Shrager, J., Jain, M., Chang, C.W., Vallon, O., and Grossman, A.R. (2004). Insights into the survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur starvation based on microarray analysis of gene expression. *Eukaryotic Cell* **3**, 1331 - 1348.
- Zancan, S., R. Trevisan and M.G. Paoletti, (2006). Soil algae composition under different agro-ecosystem in North-Eastern Italy. *Agric. Ecosyst. Environ.*, **112**: 1-12.
- Zehr, J.P., Jenkins, B.D., Short, S.M., and Steward, G.F. (2003). Nitrogenase genediversity and microbial community structure: A cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* **5**, 539-554.

Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., and Orth, P. (2001). Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature* 409, 739-743.

8. Abkürzungen

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Abb.	Abbildung
ACK	Acetat-Kinase
ADH1	Alkohol-Dehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	ATP-Synthase
AOX	Alternative Oxidase
	5-bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat, p-
BCIP	Toluidinsalz
bidest.	Bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
cDNA	Complementary DNA
Chl	Chlorophyll
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSD	Cold Shock Domain
Cyt	Cytochrom
Cyt b ₆ f	
Komplex	Cytochrom-b ₆ f-Komplex
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxy-Nucleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz
EDTA	Dihydrat
Fd /Fdx	Ferredoxin
FNR	Ferredoxin-NADP ⁺ -Oxidoreduktase
FTR	Fdx-Thioredoxin Reduktase
GS	Gluthamat-Synthase
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HSM	High salt Medium, Minimalmedium
<i>hup</i>	hexose uptake protein
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton

Kg	Kilogramm
L	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LB _{Amp}	Luria-Bertani-Medium mit Ampicillin
Lhc	Light harvesting complex, Lichtsammel-Komplex
M	Marker
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mM	Messenger RNA
mm	Millimeter
mRNA	Natriumcarbonat
Na ₂ CO ₃	Citrat Natriumcitrat
NAB1	Nucleic acid binding protein 1
NaOH	Natriumdihydrogenphosphat
nm	Nanomol
OEC	oxygen evolving complex
NPQ	non photochemical quenching
o.D.	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P _i	anorganisches Phosphat
PS I	Photosystem II
PS II	Photosystem II
PTOX	chloroplastidäre terminale Oxidase
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleotid-Protein
ROS	Reactive oxygen species, Reaktive Sauerstoff-Spezies
RRM	RNA Recognition Motif
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR
SDS	Natriumdodecyl-Sulfat
Sek.	Sekunde
Std. (h)	Stunde(n)
Stm	State transitions-mutant
Tab.	Tabelle
TAP	Trisacetat-Phosphatpuffer
TDA	target decoy approach

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol

9. Danksagung

Ich möchte mich bei folgenden Menschen und Tieren bedanken, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben.

Vielen Dank an:

Prof. Dr. Olaf Kruse für die Möglichkeit meine Dissertation anfertigen (und beenden) zu können und für die stetige Unterstützung

Prof. Dr. Karsten Niehaus für die Übernahme des Zweitgutachtens

Prof. Dr. Michael Hippler von der Universität Münster für die unzähligen Messungen, die Diskussionsbereitschaft, Hilfe und Unterstützung

Dr. Mia Terashima für die unendlich hilfsbereite, geduldige und liebevolle Zusammenarbeit

Dr. Stefan Albaum, der mir die Auswertung der Daten unglaublich erleichtert hat und ständig beratend beseite stand

Ferry, er weiß wofür!

Meinen Freunden und meiner Familie, die die Hoffnung und den Glauben nicht aufgegeben haben, insbesondere meinem zukünftigen Mann☺

Meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Algenbiotechnologie, insbesondere Dr. Lutz Wobbe für die unglaublich sensible und kompetente Betreuung meiner Arbeit und Dr. Joerg Toepel für die nicht nur beruflich hitzigen Diskussionen

Und für die tolle, unterhaltsame und z.T. sehr freundschaftliche Zusammenarbeit danke ich: Dr. Olga Blifernez-Klassen, Dr. Anja Doebbe, Lisa Schierenbeck, Sabrina Grewe, Andreas Uhmeyer, Kristin Rogge, Viktor Klassen, Christian Boge, Ahn-Vu Nguyen und Marko La Russa

10. Gutachter

Erstgutachter: Prof. Dr. Olaf Kruse

Zweitgutachter: Prof. Dr. Karsten Niehaus

11. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle aus der Literatur ganz oder teilweise entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation keiner anderen Fakultät zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt wurde.

Bielefeld, den 30.11.2012

Unterschrift _____

(Julia Beckmann)

12. Veröffentlichungen

Eigene Publikationen

Beckmann, J., Lehr, F., Finazzi, G., Hankamer, B., Posten, C., Wobbe, L., and Kruse, O. (2009). Improvement of light to biomass conversion by de-regulation of light-harvesting protein translation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol* 142, 70-77.

Doebbe, A., Rupprecht, J., **Beckmann, J.**, Mussnug, J.H., Hallmann, A., Hankamer, B., and Kruse, O. (2007). Functional integration of the HUP1 hexose symporter gene into the genome of *C. reinhardtii*: Impacts on biological H₂ production. *J Biotechnol* 131, 27-33.

Aktive Teilnahme an Tagungen, Workshops und Symposien

Symposium der DFG Forschergruppe FOR387 (2007) in Bielefeld, Posterpräsentation

Botanikertagung (2007) in Hamburg, Posterpräsentation

Symposium der DFG Forschergruppe FOR504/2 (2007) in Freiburg, Posterpräsentation

Solar H₂-Workshop der EU (2008) in Bochum, Posterpräsentation

Solar BioFuels Tagung (2008) in Bielefeld, Posterpräsentation

Teilnahme an der Summer School des Solar H₂-Netzwerks der EU (2008) in Uppsala, Schweden

Solar H₂-Workshop der EU (2009) in Tarragona, Spanien, Posterpräsentation