

**Bedeutung von Methioninen im D1-Protein der Grünalge  
*C. reinhardtii* sowie deren potentielle Interaktion mit  
Methioninsulfoxid-Reduktasen unter oxidativen  
Stressbedingungen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
*Doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften -  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von

Jana Schulze, geb. Förster  
geboren am 29.01.1977 in Hohenmölsen

Gutachter:

1. Prof. Dr. U. Johannigmeier
2. Prof. Dr. K. Humbeck
3. Prof. Dr. Ch. Wilhelm

Halle (Saale), September 2013

Tag der öffentlichen Verteidigung: 29.04.2014

## Zusammenfassung

Methionine können als endogene Antioxidanzien ihre Protein-Umgebung vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) schützen. Um zu klären, ob auch Methionine im D1-Protein der Grünalge *C. reinhardtii* als endogene Antioxidanzien (ROS-Scavenger) fungieren, wurden die Methionine 172, 183, 194 und 293, die sich in räumlicher Nähe zu den Chlorophyllen des Reaktionszentrums von PSII befinden, ausgetauscht. Diese Chlorophylle gelten als eine Hauptquelle von ROS in Pflanzen. Während der Austausch von Methionin 293 keine physiologischen Veränderungen bewirkte, führte der Austausch von Methionin 172, 183 bzw. 194 zu Einschränkungen des photoautotrophen Wachstums sowie zu einem verstärkten D1-Abbau der jeweiligen Mutante im Starklicht. Eine Ursache für die Veränderungen der Mutanten könnten veränderte Bindungsverhältnisse zwischen D1-Protein und Mangan-Cluster sein. Da sich die Methionine 172, 183 und 194 in der für die Bindung des Clusters wichtigen *loop*-Region befinden bzw. an diese Region angrenzen, könnte deren Austausch die Bindung der beiden Untereinheiten beeinflussen. Eine schwächere Bindung des Mangan-Clusters kann die Bildung der Radikale P680<sup>•+</sup> oder auch Tyrosin Z<sup>•+</sup> begünstigen, da nicht ausreichend Elektronen aus der Wasserspaltung für deren Reduktion vom Mangan-Cluster geliefert werden. Durch diese Radikale könnte das D1-Protein verstärkt geschädigt und abgebaut werden, wie für die Mutanten gezeigt.

Entsprechend der Arbeitshypothese könnte aber auch der Verlust der Methionine als ROS-Scavenger in den Mutanten, deren physiologische Veränderungen erklären. Üben die Methionine also tatsächlich eine antioxidative Schutzfunktion (Scavenging-Funktion) aus, könnte das Fehlen dieser Scavenger in den Mutanten die intrazelluläre ROS-Konzentration erhöhen und damit zu einer erhöhten Schädigung des D1-Proteins sowie einem verstärkten Abbau führen. Um ein potentielles ROS-Scavenging durch Methionine des D1-Proteins zu ermöglichen, wäre darüber hinaus die Aktivität einer Methioninsulfoxid-Reduktase A bzw. B (MSRA bzw. MSRB) erforderlich. Die Arbeitshypothese untermauernd, konnten vier *msrA*-Gene im Kerngenom identifiziert werden. Alle vier Gene werden exprimiert und sind auf Transkriptebene nachweisbar. Die Gene *msrA1* bis *3* werden unter bestimmten Bedingungen, die oxidativen Stress verursachen, stärker transkribiert als unter normalen Wachstumsbedingungen. Für MSRA2 konnte neben einer *in vitro* Reduktase-Aktivität auch die Lokalisation im Chloroplasten, einer Hauptquelle von ROS in Pflanzen, nachgewiesen

werden. Damit konnte MSRA2 als potentieller Kandidat für eine Interaktion von D1-Protein und Methioninsulfoxid-Reduktase identifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern somit erste Hinweise, dass Methionine des D1-Proteins im Zusammenspiel mit einer Methioninsulfoxid-Reduktase einen effektiven Schutz der Zelle vor ROS darstellen könnten.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis .....	IX
Abkürzungsverzeichnis .....	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Photosystem II.....	1
1.2 ROS Bildung am PSII.....	4
1.3 Schutzmechanismen .....	6
1.4 Oxidativer Stress in Pflanzen.....	7
1.4.1 Photoinhibition.....	7
1.4.2 Oxidative Proteinschäden – Methioninoxidation durch ROS .....	9
1.5 Methioninsulfoxid-Reduktasen.....	10
1.5.1 Stereospezifität von MSR .....	11
1.5.2 Katalytischer Reaktionsmechanismus von MSRA .....	11
1.5.3 Physiologische Bedeutung von MSRA.....	12
1.6 Arbeitshypothese .....	14
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Chemikalien.....	15
2.1.2 Enzyme .....	15
2.1.3 Reaktionskits.....	16
2.1.4 Größenstandards .....	16
2.1.5 Algenstämme .....	16
2.1.6 Bakterienstämme und Plasmide .....	17
2.1.7 Oligonukleotide .....	17
2.2 Physiologische Methoden.....	19

---

2.2.1	Algenanzucht .....	19
2.2.2	Starklichtexperiment .....	20
2.2.3	<i>Dark recovery</i> Versuch .....	20
2.2.4	Messmethoden .....	21
2.2.5	Bakterienkulturen.....	23
2.3	Molekularbiologische Methoden .....	24
2.3.1	Isolierung von Gesamtzell-DNA .....	24
2.3.2	Präparation von Plasmiden .....	24
2.3.3	RNA Isolierung.....	24
2.3.4	cDNA Synthese.....	25
2.3.5	Polymerase-Kettenreaktion.....	26
2.3.6	Auftrennung und Aufreinigung von DNA .....	27
2.3.7	Gerichtete Mutagenese.....	27
2.3.8	Semiquantitative RT-PCR .....	28
2.3.9	Klonierung von DNA.....	29
2.3.10	Transfer von DNA .....	30
2.3.11	Sequenzierung von DNA .....	30
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	30
2.4.1	Proteinextraktion aus Algenkulturen.....	30
2.4.2	Proteinbestimmung nach Bradford .....	31
2.4.3	SDS-PAGE .....	32
2.4.4	Proteinfärbung .....	32
2.4.5	Western-Analyse.....	32
2.5	Heterologe Expression und Aufreinigung der HIS-Fusionsproteine .....	33
2.6	Messung der Enzymaktivität von MSRA2 und MSRA4 .....	34
2.7	Antikörperproduktion .....	35
2.8	Methoden zum Proteinimport .....	35
2.8.1	<i>In vitro</i> Transkription.....	35
2.8.2	<i>In vitro</i> Translation .....	36
2.8.3	Präparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus <i>Pisum sativum</i> .....	36

---

2.8.4	Einzelorganell-Import.....	39
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Methionin-Reste im D1-Protein von <i>C. reinhardtii</i> .....	41
3.1.1	Erzeugung und molekularbiologische Charakterisierung der Alanin- und Leucin-Mutanten.....	44
3.1.2	Physiologische Charakterisierung der Alanin- und Leucin-Mutanten.....	46
3.1.3	Zusammenfassung der physiologischen Untersuchungen.....	56
3.2	Methioninsulfoxid-Reduktasen in <i>C. reinhardtii</i> .....	57
3.2.1	<i>C. reinhardtii</i> Wildtyp besitzt vier <i>msrA</i> -Gene.....	57
3.2.2	Expressionsanalyse der vier <i>msrA</i> -Gene in <i>C. reinhardtii</i> .....	60
3.2.3	Heterologe Expression von MSRA2, 3 und 4 aus <i>C. reinhardtii</i> in <i>E. coli</i> .....	62
3.2.4	Nachweis der Reduktaseaktivität von MSRA-Proteinen aus <i>C. reinhardtii</i> .....	65
3.2.5	Analyse der MSRAs aus <i>C. reinhardtii</i> mit Hilfe eines Antikörpers.....	68
3.2.6	Lokalisierung der MSRA-Proteine in der Algenzelle.....	72
3.2.7	Zusammenfassung – MSRAs in <i>C. reinhardtii</i> .....	75
4	Diskussion.....	76
4.1	Methionine in Proteinen.....	76
4.2	Bedeutung der Methionine des D1-Proteins von <i>C. reinhardtii</i> .....	77
4.2.1	Die Methioninmutanten.....	77
4.2.2	Einfluss der Methionin-Substitution auf das photoautotrophe Wachstum.....	80
4.2.3	Einfluss der Methionin-Substitution auf den D1-Abbau.....	81
4.2.4	Einfluss der Methionin-Substitution auf die Synthese des D1-Proteins.....	83
4.2.5	Einfluss der Methionin-Substitution auf die <i>Dark recovery</i> .....	84
4.3	Methioninsulfoxid-Reduktasen in <i>C. reinhardtii</i> .....	85
4.3.1	MSRA1 ist ein Selenoprotein.....	85
4.3.2	Expression der <i>msrA</i> -Gene aus <i>C. reinhardtii</i> .....	87
4.3.3	Reduktaseaktivität der <i>Chlamydomonas</i> -MSRA.....	88
4.3.4	<i>In vivo</i> -Nachweis der MSRA-Proteine.....	90
4.3.5	Subzelluläre Lokalisation der MSRA.....	91
4.4	Ist das D1-Protein ein Substrat einer MSRA?.....	92

4.5	Schlussfolgerung und Ausblick .....	93
5	Literaturverzeichnis.....	95
Anhang A	.....Sequenzrohdaten der Mutanten	
Anhang B	.....Wachstumskurven der Mutanten	
Anhang C	..... Nukleinsäuresequenz der <i>msrA</i> - Gene aus <i>C. reinhardtii</i>	
Anhang D	..... Rohdaten der Starklichtexperimente	
Anhang E	..... Mutation im codierenden Bereich des <i>msrA3</i> -Gens von <i>C. reinhardtii</i>	

---

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1.1: ENTSTEHUNG REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES AM PSII.	4
ABBILDUNG 1.2: DIE REDUKTION VON METHIONINSULFOXID.	10
ABBILDUNG 3.1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER AMINOSÄURESEQUENZ DES D1-PROTEINS AUS <i>C. REINHARDTII</i> .	41
ABBILDUNG 3.2: KONSERVIERTE METHIONINE IM D1-PROTEIN.	42
ABBILDUNG 3.3: DREI-DIMENSIONALE STRUKTUR DES PHOTOSYSTEMS II.	43
ABBILDUNG 3.4: TEST AUF HOMOPLASMIE DER TRANSFOMANTEN.	45
ABBILDUNG 3.5: D1-STABILITÄT DES REFERENZSTAMMES IL UNTER STARKLICHTBEDINGUNGEN ( $1.800 \mu\text{E M}^{-2}\text{S}^{-1}$ ) IN ABHÄNGIGKEIT DER ZEIT.	47
ABBILDUNG 3.6: ABBAU DES D1-PROTEINS DER MUTANTEN M172A, M183A, M194A, M293A (A) UND M172L, M183L, M194L (B) IM VERGLEICH ZUM REFERENZSTAMM IL UNTER STARKLICHTBEDINGUNGEN ( $1.800 \mu\text{E M}^{-2}\text{S}^{-1}$ ) IN GEGENWART VON CAP (200 $\mu\text{G/ML}$ ).	49
ABBILDUNG 3.7: STABILITÄT DES D1-PROTEINS DER MUTANTEN M172L, M183L UND M194L SOWIE DES REFERENZSTAMMES IL OHNE BELICHTUNG IN GEGENWART VON CAP.	50
ABBILDUNG 3.8: TURNOVER DES D1-PROTEINS DER MUTANTEN IM STARKLICHT OHNE CAP.	51
ABBILDUNG 3.9: RECOVERY-VERMÖGEN DER MUTANTEN M172L, M183L UND M194L SOWIE DES REFERENZSTAMMES IL.	53
ABBILDUNG 3.10: EINFLUSS VON SINGULETT-SAUERSTOFF ( $^1\text{O}_2$ ) BZW. WASSERSTOFFPEROXID ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) AUF DAS WACHSTUM DER MUTANTEN M172L, M183L UND M194L SOWIE DES REFERENZSTAMMES IL.	55
ABBILDUNG 3.11: VERGLEICH DER AMINOSÄURESEQUENZEN VON MSRA1, 2, 3 UND 4 AUS <i>C. REINHARDTII</i> .	58
ABBILDUNG 3.12: TRANSKRIPTMENGEN DER <i>MSRA</i> -GENE SOWIE DES <i>AKTIN</i> -GENS IN <i>C. REINHARDTII</i> UNTER VERSCHIEDENEN STRESSBEDINGUNGEN.	61
ABBILDUNG 3.13: KLONIERUNG VON <i>MSRA2</i> , <i>MSRA3</i> UND <i>MSRA4</i> .	63
ABBILDUNG 3.14: EXPRESSIONSANALYSE DER REKOMBINANTEN FUSIONSPROTEINE HIS- <i>MSRA2</i> , HIS- <i>MSRA3</i> UND HIS- <i>MSRA4</i> IN <i>E. COLI</i> .	64
ABBILDUNG 3.15: ERGEBNIS DER NI-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE DER FUSIONSPROTEINE HIS- <i>MSRA2</i> UND HIS- <i>MSRA4</i> .	65
ABBILDUNG 3.16: SULINDAC ALS SUBSTRAT FÜR <i>MSRA</i> .	65
ABBILDUNG 3.17: VERGLEICH DER AMINOSÄURESEQUENZEN DER <i>MSRAS</i> AUS <i>C. REINHARDTII</i> UND <i>A. THALIANA</i> .	69
ABBILDUNG 3.18: ERKENNUNG DER REKOMBINANTEN <i>MSRA</i> -PROTEINE.	70
ABBILDUNG 3.19: ERKENNUNG VON ANTIGENEN IN VERSCHIEDENEN PROTEINFRAKTIONEN VON <i>C. REINHARDTII</i> DURCH $\alpha$ - <i>MSRA</i> BZW. $\alpha$ - <i>LHC</i> .	71



ABBILDUNG 3.20: *IN ORGANELLO* IMPORT DER PROTEINE MSRA2 UND MSRA3 IN CHLOROPLASTEN UND MITOCHONDRIEN.

74

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 3.1: PHOTOAUTOTROPHE WACHSTUMSRATEN DER ALANIN- UND DER LEUCIN-MUTANTEN.	47
TABELLE 3.2: PSII-EFFIZIENZ DER MUTANTEN M172L, M183L, M194L SOWIE DES REFERENZSTAMMES IL.	52
TABELLE 3.3: METHIONINSULFOXID-REDUKTASEN IN C. REINHARDTII: SEQUENZCHARAKTERISTIKA	59
TABELLE 3.4: ÜBERSICHT DER WACHSTUMSBEDINGUNGEN UNTER DENEN C. REINHARDTII WILDTYP INKUBIERT WURDE.	60
TABELLE 3.5: REDUKTASE AKTIVITÄT DER VERSCHIEDENEN E. COLI-LYSATE.	66
TABELLE 3.6: AKTIVITÄT VON C. REINHARDTII MSRA2 UND MSRA4.	67
TABELLE 3.7: VORHERSAGEN ZUR SUBZELLULÄREN LOKALISIERUNG DER MSRA PROTEINE AUS C. REINHARDTII.	73
TABELLE 4.1: CHARAKTERISIERUNG DER MUTANTEN.	78
TABELLE 4.2: CHARAKTERISIERUNG DER METHIONINSULFOXID-REDUKTASEN AUS C. REINHARDTII.	86

---

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Å	Angström
ADP	Adenosindiphosphat
APX	Ascorbat-Peroxidase
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CAP	Chloramphenicol
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
Chl	Chlorophyll
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CP43	zentrales Chlorophyll <i>a</i> -Protein des LHCII am Photosystem II
CP47	zentrales Chlorophyll <i>a</i> -Protein des LHCII am Photosystem II
Cyt	Cytochrom
D1	32 kDa Protein-Untereinheit des Photosystems II
D2	32 kDa Protein-Untereinheit des Photosystems II
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteri
F <sub>0</sub>	minimale Fluoreszenz
F <sub>M</sub>	maximale Fluoreszenz
F <sub>V</sub>	variable Fluoreszenz
G	Guanin
GPX	Glutathion-Peroxidase
GQ	Großquadrat
Hsp	Hitzeschockprotein
kDa	kilo Dalton
KQ	Kleinquadrat
HS	High Salt Media
LB	Luria-Bertani
LHC	Light-harvesting complex
mind.	mindestens
MetO	Methioninsulfoxid
Met-S, L-O	Methionin-S, L-sulfoxid

---

MSR	Methioninsulfoxid-Reduktase
MSRA, MSRB	Methioninsulfoxid-Reduktase A bzw. B
n. b.	nicht bestimmt
NADP	Nikotinsäureamidadenindinukleotidphosphat
OD	optische Dichte
OEE1, 2, 3	Proteine des <i>Oxygen evolving complexes</i> mit Molekulargewichten von 33, 23 bzw. 16 kDa
ox	oxidiert
p.A.	pro analysi
P <sub>680</sub>	primärer Elektronendonator des Photosystems II (entspricht Chlorophyll-Paar P <sub>D1</sub> /P <sub>D2</sub> )
P680 <sup>+</sup>	oxidiertes P680
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	Polymerase Chain Reaction
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
Q <sub>A</sub>	primäres Plastochinon des Photosystems II
Q <sub>B</sub>	sekundäres Plastochinon des Photosystems II
Q <sub>B</sub> H <sub>2</sub>	Plastochinol
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species = Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR nach reverser Transkription der mRNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOD	Superoxid-Dismutase
T	Thymin
TAP	Tris-Acetat-Phosphat Medium
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
v/v	<i>volume/volume</i>
vgl.	vergleiche
w/v	<i>weight/volume</i>
WT	Wildtyp
Y <sub>Z</sub>	redoxaktiver Tyrosinrest am Photosystem II
Y <sub>D</sub>	redoxaktiver Tyrosinrest am Photosystem II

**Schreibweise:**

Begriffe, die aus der englischen Sprache ohne Übersetzung als Eigenname übernommen wurden, sind kursiv hervorgehoben.

## 1 Einleitung

Während der Photosynthese werden mit Hilfe von Strahlungsenergie aus Kohlendioxid und Wasser energetisch hochwertige Kohlenhydrate synthetisiert. Dabei wird Sauerstoff photolytisch aus Wasser freigesetzt und NADPH und ATP werden gebildet. Die oxygene Photosynthese bildet damit die Grundlage allen aeroben Lebens, da Sauerstoff als End-Akzeptor der Atmungskette dient. Molekularer Sauerstoff ist aber auch die Vorstufe von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die in geringen Konzentrationen eine wichtige Funktion bei der Infektionsabwehr bzw. bei der Signaltransduktion ausüben, in höheren Konzentrationen aber auch Proteine, Lipide und Nukleinsäuren oxidativ schädigen (LALOI ET AL. 2004; APEL & HIRT 2004; KIM ET AL. 2008). Vor allem photosynthetisch aktive Organismen sind unter bestimmten Stressbedingungen höheren ROS-Konzentrationen ausgesetzt und haben unterschiedliche Abwehr- und Reparaturmechanismen entwickelt, um sich vor der schädigenden Wirkung der ROS zu schützen (DAT ET AL. 2000; ASADA 2006; KRIEGER-LISZKAY ET AL. 2008).

### 1.1 Photosystem II

In höheren Pflanzen und Grünalgen findet die NADPH- und ATP-Synthese lichtabhängig in bzw. an der Thylakoidmembran des Chloroplasten statt (Licht-Reaktion), während die CO<sub>2</sub>-Fixierung und -Reduktion sowie weitere Umwandlungen der Reaktionsprodukte im Stroma ablaufen (Dunkel-Reaktion). In die Thylakoidmembran sind die beiden Protein-Pigment-Komplexe Photosystem I und II (PSI und PSII) inseriert. PSII ist eine Wasser-Plastoquinon-Oxidoreduktase. Das Strukturverständnis von PSII basiert auf Vergleichen zum Reaktionszentrum der Purpurbakterien (CARDONA ET AL. 2012; MICHEL & DEISENHOFER 1988), dessen Struktur seit langem bekannt ist (MICHEL 1982). In den letzten Jahren wurde dieses Bild durch die Kristallstruktur von PSII aus *Synechococcus elongatus* bei einer Auflösung von 3,8 Å (ZOUNI ET AL. 2001) bis hin zur Kristallstruktur von PSII aus *Thermosynechococcus vulcanus* bei einer Auflösung von 1,9 Å (UMENA ET AL. 2011) ergänzt und verfeinert. PSII besteht aus 17 in der Membran lokalisierten Untereinheiten, drei peripheren Proteinen sowie verschiedenen Cofaktoren und hat eine Gesamtmasse von 350 kDa (ZOUNI ET AL. 2001; FERREIRA ET AL. 2004; KAMIYA & SHEN 2003). Bestandteile sind unter anderem die zentralen Proteine D1 und D2, die chlorophyllhaltigen inneren Antennen

CP43 und CP47,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des Cytochrom-*b*<sub>559</sub> Komplexes sowie weitere kleine Untereinheiten. Das zentrale D1/D2-Heterodimer bildet das PSII-Reaktionszentrum und enthält die meisten redox-aktiven Komponenten, wie die zwei miteinander interagierenden Chlorophyll *a*-Moleküle, P<sub>D1</sub> und P<sub>D2</sub>, die zwei Chlorophyll *a*-Moleküle Chl<sub>D1</sub> und Chl<sub>D2</sub>, den Tetra-Mangancluster, zwei redox-aktive Tyrosinreste (Y<sub>Z</sub> und Y<sub>D</sub>), zwei Phäophytine (Ph<sub>D1</sub> und Ph<sub>D2</sub>) und die zwei Plastochinone Q<sub>A</sub> und Q<sub>B</sub>. Weiterhin ist ein Nicht-Häm Eisen zwischen dem primären, fest gebundenen Plastochinon Q<sub>A</sub> und dem sekundären Plastochinon Q<sub>B</sub> lokalisiert, an dem ein Bicarbonat-Anion gebunden ist. Zusätzlich befinden sich zwei Chlorophyll *a*-Moleküle, Chl<sub>ZD1</sub> und Chl<sub>ZD2</sub>, an der Peripherie des Reaktionszentrums (MÜH ET AL. 2012). Jedes PSII-Monomer enthält elf bzw. zwölf  $\beta$ -Carotine, die vermutlich als Lichtsammel-Pigmente und Singulett-Sauerstoff-Quencher dienen (SOZER ET AL. 2011; MÜH ET AL. 2012). Die Kristallstruktur-Analysen zeigen darüber hinaus eine Vielzahl von Wasser-Molekülen innerhalb jedes Monomers und einen hohen Anteil integraler Lipide (UMENA ET AL. 2011). Der Antennenkomplex des PSII wird von den äußeren Antennen (LHC-IIa bis LHC-IId) und dem „core“-Komplex (Antennenproteine CP43 und CP47) gebildet (GALETSKIY ET AL. 2008; MINAGAWA & Y. TAKAHASHI 2004).

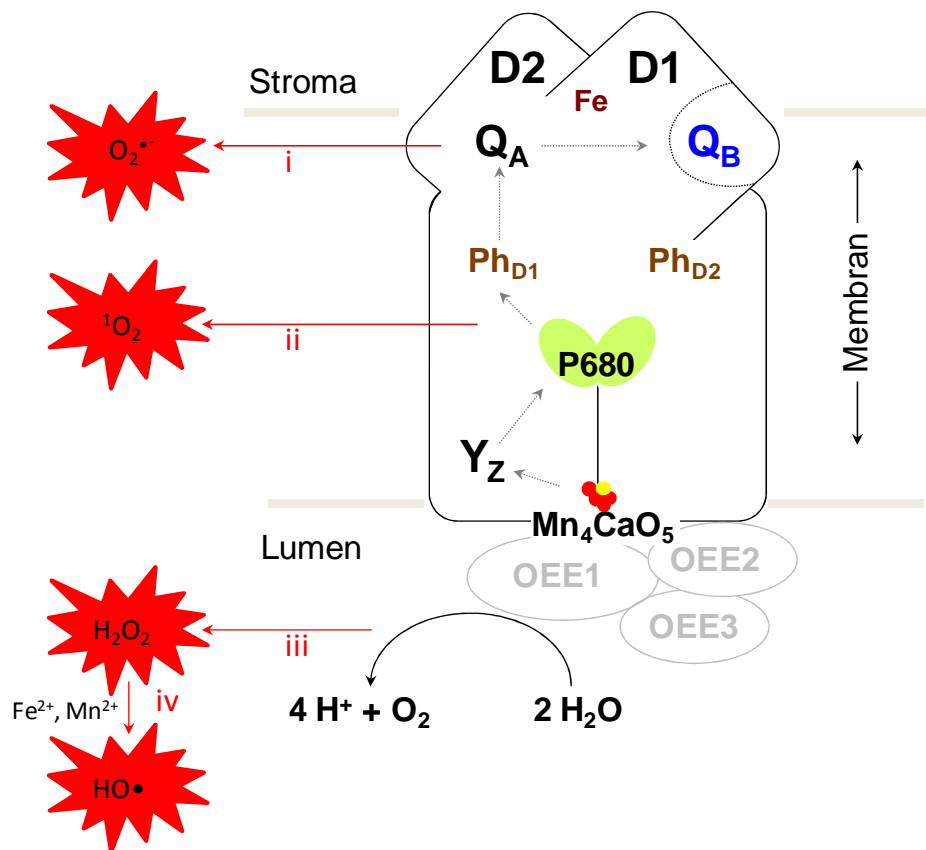
Der Elektronentransport über PSII beginnt mit der Absorption von Lichtenergie bei einer Wellenlänge von 680 nm durch den Antennenkomplex und der Weiterleitung der Anregungsenergie an die Pigmente des Reaktionszentrums. Im Gegensatz zu den Purpurbakterien finden im Reaktionszentrum von PSII mehrere Ladungstrennungen in den ersten Picosekunden nach der Anregung statt und keine einzelne Ladungstrennungs-Reaktion (CARDONA ET AL. 2012; G. RENGER & T. RENGER 2008). Als primärer Elektronendonator des PSII-Reaktionszentrums wird das Chlorophyll-Paar P<sub>D1</sub>/P<sub>D2</sub> (P680) angesehen. Nach neuesten Erkenntnissen könnte aber auch das Chlorophyll *a*-Molekül P<sub>D1</sub> bzw. Chl<sub>D1</sub> allein als primärer Elektronendonator dienen (CARDONA ET AL. 2012; RASZEWSKI ET AL. 2005). Der Anregungszustand ist vermutlich nicht, wie lange angenommen, an einem spezifischen Chlorophyll *a*- Paar (P680) lokalisiert, sondern verteilt sich auf Kombinationen benachbarter Chlorophylle des Reaktionszentrums (DEKKER & VAN GRONDELLE 2000). Der Prozess der initialen Ladungstrennung an PSII wird aktuell diskutiert und ist noch nicht bis ins Detail geklärt (G. RENGER & T. RENGER 2008; CARDONA ET AL. 2012; MÜH ET AL. 2012). Im Anschluss an diese Ladungstrennung wird ein angeregtes Elektron unter Bildung des Ladungspaars P<sub>D1</sub><sup>+</sup>Ph<sub>D1</sub><sup>-</sup> auf Phäophytin und weiter auf das primäre Plastochinon Q<sub>A</sub>

---

übertragen. Das oxidierte Chlorophyll  $P_{D1}^+$  ( $P680^+$ ) ist ein starkes Oxidationsmittel und in der Lage, Elektronen vom Tyrosin  $Y_Z$  abzuleiten. Das angeregte Elektron wird weiter vom  $Q_A$  auf das sekundäre Plastochinon  $Q_B$  übertragen, das im Gegensatz zum Ein-Elektronenakzeptor  $Q_A$  zwei Elektronen aufnehmen kann. Zur Stabilisierung werden zwei Protonen aus dem Stroma, möglicherweise über ein Bicarbonat-Anion, aufgenommen (VAN RENSEN 2002). Das gebildete Plastochinol  $Q_BH_2$  verlässt seine Bindestelle am D1-Protein, die wieder durch ein oxidiertes  $Q_B$  besetzt wird.  $Q_BH_2$  kann frei in der Thylakoidmembran diffundieren, seine Elektronen auf den Cytochrom-*b<sub>6</sub>/f*-Komplex übertragen und die Protonen ins Thylakoidlumen entlassen. Als zweiter mobiler Elektronenträger wird Plastocyanin reduziert, das die Elektronen auf PSI überträgt. PSI ist eine lichtgetriebene Plastocyanin-Ferredoxin-Oxidoreduktase. Die Elektronen werden schließlich von Ferredoxin über die Ferredoxin-NADP-Reduktase auf  $NADP^+$  transferiert. Für einen kontinuierlichen Elektronenfluss ist ein Ausgleich des Elektronendefizits am PSII-Reaktionszentrum ( $P680^+$ ) notwendig. Diese Elektronen werden vom Wasser geliefert. Die Funktion der Wasserspaltung übernehmen der Mangan-Cluster und ein redoxaktiver Tyrosin-Rest ( $Y_Z$ ) an Position 161 des D1-Proteins. Außerdem spielen bei der Wasserspaltung die drei Proteine OEE 1 (33 kDa), OEE 2 (23 kDa) und OEE 3 (16 kDa) eine Rolle, deren Struktur bekannt, aber deren genaue Funktion bislang unklar ist (FERREIRA ET AL. 2004; BONDARAVA ET AL. 2005). Möglicherweise spielt das OEE2-Protein als Mangan-Speicher-Protein eine wichtige Rolle bei der Assemblierung und beim *Turnover* von PSII (BONDARAVA ET AL. 2005). Der Cluster enthält neben den vier Mangan-Atomen ein Calcium-Atom und fünf Sauerstoff-Atome und wird als  $Mn_4CaO_5$ -Cluster bezeichnet (FERREIRA ET AL. 2004). Die Freisetzung eines Sauerstoffes aus Wasser erfordert die Abgabe von vier Elektronen und damit das Einfangen von vier Excitonen. Vom  $Mn_4CaO_5$ -Cluster werden dazu nacheinander vier Elektronen über das Tyrosin  $Y_Z$  an das Reaktionszentrum abgeleitet. Dabei durchläuft der Cluster nach dem Grundzustand  $S_0$  die vier Oxidationsstufen  $S_1$  bis  $S_4$  (DAU ET AL. 2012; NAJAFPOUR & GOVINDJEE 2011). Bei diesem als Kok-Zyklus (KOK ET AL. 1970) bekannten Mechanismus wird erst nach Erreichen des  $S_4$ -Zustandes Wasser oxidiert und Sauerstoff freigesetzt. Der Cluster kehrt anschließend in den  $S_0$ -Zustand zurück. Durch diese einmalige Wasser-Oxidation wird die Bildung reaktiver Sauerstoffderivate minimiert. Durch die Protonen, die bei der Wasseroxidation und bei der Oxidation des Plastohydrochinons ins Lumen abgegeben werden, entsteht ein Protonengradient über die Membran. Er treibt die Synthese von ATP aus ADP und Phosphat über die ATP-Synthase.

## 1.2 ROS Bildung am PSII

Photosystem II ist neben Photosystem I sowie den Peroxisomen und Mitochondrien die Hauptquelle für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in photosynthetisch aktiven Organismen (ASADA 2006; KRIEGER-LISZKAY ET AL. 2008) (Abbildung 1.1). Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species = ROS) sind radikalische sowie nichtradikalische hochreaktive Sauerstoffmetabolite. Sie werden durch die Übertragung von Energie bzw. die Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff gebildet. Vor allem unter Stressbedingungen, bei denen die Anregung des Reaktionszentrums von PSII den Bedarf der CO<sub>2</sub>-Assimilation an Redoxäquivalenten übersteigt, ist die ROS-Bildung verstärkt (ASADA 2006).



**Abbildung 1.1: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies am PSII.** Dargestellt ist das D1/D2-Heterodimer von PSII mit folgenden, am Elektronentransport beteiligten Komponenten: den beiden Chlorophyll-Molekülen PD1 und PD2 (P680), den Phäophytin-Molekülen Ph<sub>D1</sub> und Ph<sub>D2</sub>, dem primären, fest gebundenen Plastochinon Q<sub>A</sub> sowie dem sekundären, mobilen Plastochinon Q<sub>B</sub>. Zwischen beiden Plastochinonen ist ein Nicht-Häm-Eisen (Fe) lokalisiert. An der Donorseite von PSII sind der redox-aktive Tyrosin-Rest Y<sub>Z</sub>, der Mangan-Cluster (Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub>) sowie die drei Proteine OEE1, OEE2 und OEE3 gebunden, die für die Wasserspaltung essentiell sind. Die gepunkteten Pfeile kennzeichnen den Elektronentransport vom P680 zum Q<sub>B</sub> sowie den Transport der Elektronen vom Wasser zum oxidierten P680. (i) Superoxidradikal (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) wird durch nicht-enzymatische Reduktion von molekularem Sauerstoff mittels Plastochinon-Moleküle oder Phäophytin gebildet. (ii) Singulett-Sauerstoff (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) entsteht durch Energieübertragung von Triplett-Chlorophyll, der durch Ladungstrennungen im P680 gebildet werden kann, auf molekularen Sauerstoff. (iii) Die unvollständige Oxidation von Wasser führt zur Bildung von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). (iv) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann durch Metall-Ionen (z.B. Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>) zum hochtoxischen Hydroxylradikal (HO•) reduziert werden.



In Pflanzen und Algen wird Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) durch Energieübertragung von Triplet-Chlorophyll auf molekularen Sauerstoff gebildet (Abbildung 1.1). Triplet-Chlorophyll entsteht entweder innerhalb der Antennenchlorophylle durch *Intersystem Crossing*, bei dem der Spin eines Elektrons umgekehrt wird, oder während der Ladungstrennung im Reaktionszentrum von PSII. Obwohl das meiste Chlorophyll in den Antennen gebunden wird, ist der Anteil von durch *Intersystem Crossing* gebildeten Singulett-Sauerstoff gering. Als Hauptreaktion der Entstehung von Singulett-Sauerstoff in PSII wird die Ladungstrennung im P680 betrachtet (POSPÍŠIL 2012), die unter bestimmten physiologischen Bedingungen, wie hohe Lichtintensitäten oder Trockenheit, begünstigt ist. Der Plastochinon-Pool befindet sich in einem stark reduzierten Zustand, da die Dunkel-Reaktion inhibiert ist und nicht Redoxäquivalente verbrauchen kann, die durch die Licht-Reaktion geliefert wird. Es kommt zum Elektronenstau und zu Rekombinations-Reaktionen innerhalb von PSII, die zur Bildung von Singulett-Sauerstoff führen (KRIEGER-LISZKAY 2005; KRIEGER-LISZKAY ET AL. 2008). Singulett-Sauerstoff gilt als Hauptursache des Licht-induzierten Verlustes an PSII-Aktivität und des Abbaus von D1-Protein (ARO ET AL. 1993).

Durch enzymatische bzw. nicht-enzymatische Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff an der Akzeptorseite von PSII entstehen das Superoxidanion-Radikal ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oder das Hydroxyl-Radikal ( $\text{HO}\bullet$ ) (Abbildung 1.1). Die nicht-enzymatische Reduktion von molekularem Sauerstoff durch Phäophytin, fest gebundenes Plastosemichinon ( $\text{Q}_\text{A}$ ), schwach gebundenes Plastosemichinon ( $\text{Q}_\text{B}$ ) bzw. freies Plastosemichinon (PQ) resultiert in der Bildung von  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , das durch ein weiteres  $\text{O}_2^{\bullet-}$  oder Plastochinol zu Wasserstoffperoxid reduziert wird. Die Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Metallionen ( $\text{Fe}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$ ) führt letztendlich zur Bildung des hoch toxischen Hydroxyl-Radikals ( $\text{HO}\bullet$ ). Diese Reaktion wird als Fenton-Mechanismus bezeichnet. Die enzymatische Reduktion von molekularem Sauerstoff zu  $\text{O}_2^{\bullet-}$  erfolgt vermutlich über das Häm-Eisen des Cytochrom- $b_{559}$  Komplexes (POSPÍŠIL ET AL. 2006). An der Donorseite von PSII entsteht durch eine unvollständige Wasser-Oxidation Wasserstoffperoxid. Dieses wird anschließend durch beispielsweise Tyrosin Z zu  $\text{O}_2^{\bullet-}$  oxidiert oder durch Mangan, das vom Mangan-Komplex freigesetzt wird, zu  $\text{HO}\bullet$  reduziert (POSPÍŠIL 2012).

### 1.3 Schutzmechanismen

Um die Zelle vor der schädlichen Wirkung von ROS zu schützen, erfolgt die Abwehr dieser Substanzen durch enzymatische bzw. nicht-enzymatische Antioxidantien.

ROS werden effektiv durch enzymatische Antioxidantien eliminiert. Dazu zählen Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase, Ascorbat-Peroxidase (APX) sowie Glutathion-Peroxidase (GPX). Im ersten Abwehrschritt wird zunächst  $O_2^{\bullet-}$  durch SOD zu  $H_2O_2$  umgesetzt. Katalase, APX sowie GPX detoxifizieren anschließend  $H_2O_2$ . Während die Katalase ohne den Verbrauch von Redoxäquivalenten  $H_2O_2$  zu Wasser umsetzt, erfordert die Entgiftung von  $H_2O_2$  mit Hilfe der APX ein Ascorbat / Glutathion-regenerierendes System (Ascorbat-Glutathion-Zyklus). Die GPX kann Glutathion direkt als Reduktionsmittel zur Entgiftung von  $H_2O_2$  nutzen. Es existieren in Pflanzen mehrere SOD-, APX bzw. GPX-Gene. Verschiedene Isoformen dieser Enzyme sind in den Chloroplasten, den Mitochondrien, den Peroxisomen sowie im Cytosol und im Apoplasten lokalisiert (APEL & HIRT 2004; DAYER ET AL. 2008). Katalasen sind in höheren Pflanzen nur in Peroxisomen, in der Grünalge *Chlamydomonas* wahrscheinlich in den Mitochondrien lokalisiert (SHAO ET AL. 2008).

Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien zählen neben den zentralen Redoxpuffern Ascorbat und Glutathion vor allem Carotinoide (z.B. Zeaxantin,  $\beta$ -Carotin) und Prenylquinole (z.B.  $\alpha$ -Tocopherol, Plastoquinol), die vorwiegend schädlichen Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) eliminieren. Man bezeichnet diese Substanzen als *Quencher*, die Anregungsenergie benachbarter Moleküle aufnehmen können, so dass diese in einen Grundzustand übergehen können. Der *Quencher* kann seinerseits durch Energieabgabe, z.B. in Form von Wärme, in einen Grundzustand zurückkehren. Man unterscheidet physikalisches und chemisches Eliminieren (*Scavenging*) von  $^1O_2$  (KAISER ET AL. 1990). Das physikalische Eliminieren erfolgt durch die Übertragung der Anregungsenergie auf Carotinoide unter Bildung eines angeregten Triplet-Zustandes des *Quenchers* und Abgabe der Energie in Form von Wärme. Dabei kann ein Carotinoid-Molekül mehrere  $^1O_2$ -Moleküle inaktivieren. In den Antennenkomplexen von PSII kann  $\beta$ -Carotin bereits Triplet-Chlorophyll als  $^1O_2$ -Quelle aufgrund der geringen Distanz zwischen den Molekülen eliminieren. Obwohl im Reaktionszentrum von PSII zwei  $\beta$ -Carotin-Moleküle lokalisiert sind, ist hier der Abstand zu den Chlorophyll-Molekülen zu groß, um Triplet-Chlorophyll direkt zu eliminieren. Im Reaktionszentrum von PSII wird deshalb erst durch Triplet-Chlorophyll gebildetes  $^1O_2$  mit Hilfe von  $\beta$ -Carotin inaktiviert (TELFER 2002; KRIEGER-LISZKAY 2005).

Die chemische Inaktivierung von  $^1\text{O}_2$  erfolgt überwiegend durch Prenylquinole, indem Elektronen vom *Quencher* auf  $^1\text{O}_2$  übertragen werden. Ein wichtiger Vertreter dieser Antioxidantien in der Thylakoidmembran ist  $\alpha$ -Tocopherol, das durch  $^1\text{O}_2$  oxidiert wird und ihn auf diese Weise eliminiert. Tocopherol erfüllt seine Hauptfunktion vor allem im Starklicht, wenn andere *Quencher* oder andere *Scavenging*-Mechanismen die Menge an gebildeten  $^1\text{O}_2$  nicht eliminieren können (KRIEGER-LISZKAY & TREBST 2006). Neben  $\alpha$ -Tocopherol wird auch Plastoquinol als  $^1\text{O}_2$ -Scavenger diskutiert (KRUK & TREBST 2008).

## 1.4 Oxidativer Stress in Pflanzen

ROS werden unter optimalen Bedingungen kontrolliert gebildet und besitzen wichtige Funktionen wie z.B. die Regulation der Zellwand-Biosynthese oder die Beteiligung an der Signaltransduktion. Darüber hinaus nutzen Pflanzen ROS zur Pathogen-Abwehr, bekannt als *Oxidative Burst* (BOLWELL ET AL. 2002). Wird jedoch unter bestimmten Umweltbedingungen trotz Abwehrmechanismen das normale physiologische Ausmaß an ROS überschritten, spricht man von oxidativem Stress. Verschiedene abiotische Faktoren wie hohe Lichtintensitäten, hohe Temperaturen oder Trockenheit verursachen oxidativen Stress in der Zelle (DAT ET AL. 2000; APEL & HIRT 2004). Folgen können ROS-induzierte Schäden an Nukleinsäuren, Lipiden oder Proteinen sein (APEL & HIRT 2004). Außerdem wird oxidativer Stress in photosynthetisch aktiven Organismen als eine Ursache des Prozesses der Photoinhibition diskutiert (PERL-TREVES R. AND PERL A. 2002).

### 1.4.1 Photoinhibition

Als Photoinhibition wird der Abfall der photosynthetischen Aktivität als Folge der Photoinaktivierung des Elektronentransportes und der irreversiblen Schädigung des Reaktionszentrums bezeichnet. Dabei wird vor allem das D1-Protein von PSII oxidativ geschädigt (ARO ET AL. 1993; KRIEGER-LISZKAY ET AL. 2008). Das D1-Protein ist durch einen schnellen *Turnover* charakterisiert, d.h. geschädigtes Protein wird proteolytisch abgebaut und durch eine neu synthetisierte Untereinheit ersetzt (MATTOO ET AL. 1989). Der hohe *Turnover* des D1-Proteins stellt dabei einen Reparaturmechanismus des geschädigten PSII dar (ARO ET AL. 1993). Unter Stressbedingungen übersteigen jedoch die Schädigung und der Abbau des D1-Proteins dessen Neusynthese. Es kommt zu einem Netto-Verlust von D1-Protein und zur Photoinhibition. Der zugrunde liegende Mechanismus ist nicht vollständig geklärt. Als Hauptursachen sind aber die Bildung von ROS sowie die Bildung oxidierter

---

Radikale (Tyrosin  $Z^{+}$ ,  $P680^{+}$ ) bekannt. Verschiedene Hypothesen wie die *Akzeptorseiten-induzierte* und die *Donorseiten-induzierte* Photoinhibition wurden entwickelt, um den Prozess der Photoinhibition zu erklären (ARO ET AL. 1993; VASS 2012).

Zur *Akzeptorseiten-induzierten* Photoinhibition kommt es, wenn durch die Primärprozesse der Photosynthese mehr Redoxäquivalente gebildet werden als durch die Licht-unabhängigen Prozesse verbraucht werden (VASS 2012). Der Plastochinon-Pool liegt in einem reduzierten Zustand vor und es kommt zum Elektronenstau. Als Folge entsteht durch Ladungstrennung am P680 Triplet-Chlorophyll und nach Reaktion mit molekularem Sauerstoff hoch reaktiver Singulett-Sauerstoff (s. 1.2). Singulett-Sauerstoff schädigt die Proteinumgebung, v.a. das D1-Protein (KRIEGER-LISZKAY 2005; ASADA 2006). Neben diesem weithin akzeptierten Mechanismus wurde jüngst vorgeschlagen, dass Singulett-Sauerstoff die D1-Synthese während dessen *Turnover*, d.h. der Reparatur geschädigter PSII-Komplexe, inhibiert. Nishiyama et al. postulieren diese Inhibition der Proteinsynthese als Ursache der Lichtschäden an PSII und nicht die direkte Schädigung photosynthetischer Proteine durch Singulett-Sauerstoff (NISHIYAMA ET AL. 2011).

Die *Donorseiten-induzierte* Photoinhibition findet statt, wenn der Elektronentransport vom Mangan-Cluster den Elektronenabzug am P680 nicht ausgleichen kann. Die langlebigen Radikale  $P680^{+}$  und Tyrosin  $Z^{+}$  akkumulieren in der Zelle, was zur Inaktivierung des Elektronentransportes und zur Schädigung von Proteinen führen kann (ARO ET AL. 1993). *In vitro* konnte die *Donorseiten-induzierte* Photoinhibition an isolierten Thylakoidmembranen bzw. isolierten PSII-Komplexen mit inhibiertem oder fehlendem Mangan-Cluster beobachtet werden (JEGERSCHÖLD ET AL. 1990). Aber auch Veränderungen der Proteinstruktur innerhalb der Donorseite von PSII können zu einer erhöhten Lichtsensitivität führen (VASS 2012). Darüber hinaus wird die Frage diskutiert, ob Licht initiale Schäden am Mangan-Cluster verursachen kann. Unter UV-B und UV-A Bestrahlung ist eine Licht-abhängige Beeinträchtigung des Mangan-Clusters seit langem bekannt (VASS ET AL. 2002; VASS ET AL. 1996). Die Licht-induzierte Inaktivierung wurde nun auch für sichtbares Licht vorgeschlagen. In einem 2-Stufen-Modell soll dabei initial der Mangankomplex durch sichtbares Licht geschädigt werden, wodurch der Elektronentransport vom Wasser zum oxidierten P680 reduziert bzw. unterbrochen wird (NISHIYAMA ET AL. 2011). Studien zeigten, dass die Entlassung von Mangan-Ionen der früheste detektierbare Schritt der Photoinhibition durch UV- sowie durch sichtbares Licht ist. Das entstandene starke Oxidationsmittel  $P680^{+}$  kann,

wie bereits dargestellt, in einem zweiten Schritt über längere Zeit Aminosäuren des D1-Proteins in seiner unmittelbaren Nähe schädigen, da es nicht ausreichend durch Elektronen vom Wasser reduziert wird (OHNISHI ET AL. 2005; HAKALA ET AL. 2005; NISHIYAMA ET AL. 2011). Es ist allerdings umstritten, dass die als Mangan-Hypothese diskutierte Inaktivierung des Mangan-Clusters im sichtbaren Licht die ausschließliche Ursache für die Inhibierung des Elektronentransportes über PSII darstellt. Verschiedene Studien zeigen, dass die Lichtschädigung von PSII ein komplexer Prozess ist, dem verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Dass diese verschiedenen Mechanismen parallel auftreten können, ist mittlerweile allgemein akzeptiert (VASS 2012).

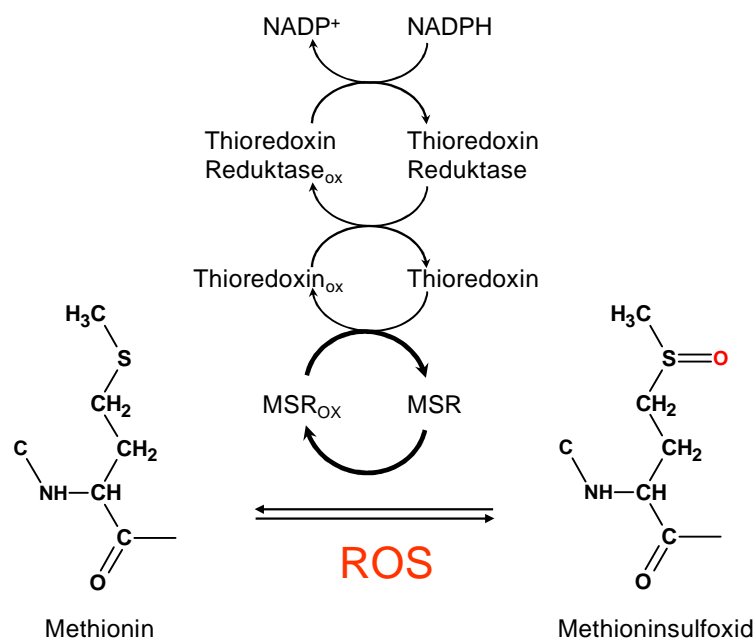
#### **1.4.2 Oxidative Proteinschäden – Methioninoxidation durch ROS**

Unter oxidativen Stressbedingungen sind Proteine aufgrund ihrer hohen intrazellulären Konzentration der Hauptangriffspunkt reaktiver Sauerstoffderivate. Die oxidative Modifikation dieser Proteine kann zum Verlust der katalytischen Aktivität und der strukturellen Integrität führen und damit die Funktion stören (STADTMAN & LEVINE 2000). Die Oxidation kann dabei sowohl am Protein-Rückgrat als auch an den Aminosäure-Seitenketten erfolgen. Durch die leichte Oxidierbarkeit von Schwefelzentren sind Cystein- und Methionin-Seitenketten bevorzugte Ziele der Proteinoxidation (DAVIES 2005). Aufgrund seines niedrigen Oxidationspotentials wird Methionin besonders leicht oxidiert. Das Hauptprodukt der Methioninoxidation ist Methioninsulfoxid (MetO). Dabei werden zwei verschiedene Stereoisomere, Methionin-S-sulfoxid (Met-S-O) und Methionin-L-sulfoxid (Met-L-O), gebildet (SHAROV & SCHÖNEICH 2000). Das Verhältnis der beiden Isomere *in vitro* ist abhängig von den jeweiligen Oxidationsmitteln und von der Lokalisation der Methionine im Protein. Ob diese Abhängigkeit ebenfalls *in vivo* gilt, ist unklar (SHAROV & SCHÖNEICH 2000). Die Methionin-Seitenkette ist hydrophob, aber, verglichen mit anderen hydrophoben Aminosäuren, flexibel. Dadurch kann sie sich nichtpolaren Strukturen anderer Proteine leicht anpassen. Vermutlich deshalb sind Methionine oft an der Ausbildung aktiver Zentren von Enzymen beteiligt (VOGT 1995). Durch die Oxidation zu MetO wird eine hydrophilere und weniger flexible Seitenkette gebildet, was die Konformation des Proteins und damit dessen biologische Funktion stark beeinflusst (VOGT 1995; DAVIES 2005). So zeigte beispielsweise oxidiertes Calmodulin (Konzentration an MetO erhöht) eine reduzierte Fähigkeit die Ca-ATPase der Plasmamembran zu aktivieren (GAO ET AL. 1998; SUN ET AL. 1999). Auch die Oxidation von Methioninen einer Glutamin-Synthetase aus *E. coli* führte zu

einem Verlust der katalytischen Aktivität sowie zu einem erhöhten Abbau (LEVINE ET AL. 1996). Das oxidierte Hitzeschockprotein Hsp21 aus *A. thaliana* zeigte den Verlust der Chaperon-ähnlichen Funktion sowie einen Verlust der  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur (GUSTAVSSON ET AL. 1999; HÄRNDAHL ET AL. 2001).

## 1.5 Methioninsulfoxid-Reduktasen

Im Vergleich zu anderen Aminosäuren ist neben der Oxidation von Cystein nur die Oxidation von Methionin reversibel. Durch die Aktivität der Methioninsulfoxid-Reduktase (MSR) kann Methioninsulfoxid wieder zu Methionin reduziert werden. Diese Reduktion ist Thioredoxin-abhängig und verbraucht Redoxäquivalente in Form von NADPH (Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.2: Die Reduktion von Methioninsulfoxid.** ROS oxidieren Methionin zu Methioninsulfoxid, das durch die Aktivität von Methioninsulfoxid-Reduktasen wieder zu Methionin reduziert werden kann. Die oxidierte MSR wird durch Thioredoxin in den reduzierten Zustand überführt. Oxidiertes Thioredoxin wird durch Elektronenübertragung vom NADPH mit Hilfe einer Thioredoxin-Reduktase zu Thioredoxin reduziert.

Methioninsulfoxid-Reduktasen wurden in nahezu allen Organismen gefunden und gehören zur minimalen Ausstattung, die zelluläres Leben ermöglicht (MUSHEGIAN & KOONIN 1996). Die Familie pflanzlicher MSR ist sehr komplex. Sowohl in höheren Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* oder *Populus trichocarpa* als auch in Algen werden MSR von einer Vielzahl von Genen codiert (ROUHIER ET AL. 2006; TARRAGO, LAUGIER & REY 2009).

### 1.5.1 Stereospezifität von MSR

Es existieren zwei Typen von Methioninsulfoxid-Reduktasen. MSR vom Typ A (MSRA) reduzieren spezifisch das *S*-Isomer und MSRs vom Typ B (MSRB) spezifisch das *R*-Isomer. Die Zelle benötigt beide Enzyme, da Methioninsulfoxid immer als racemisches Gemisch beider Stereoisomere vorliegt. Die ersten Ergebnissen zu MSRA lagen bereits Anfang der 1980er Jahre vor (BROT ET AL. 1981), Untersuchungen an MSRB erfolgten wesentlich später. Dabei wurde gezeigt, dass zwischen MSRA und MSRB weder Sequenz- noch Strukturhomologien bestehen (GRIMAUD ET AL. 2001). Obwohl beide MSR-Typen wichtig für die Zelle sind, scheint MSRA eine wichtigere Rolle für die Zellvitalität zu spielen. So wurde beispielsweise in MSRB *Knock-out* Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt, dass das Fehlen von MSRB im Gegensatz zu MSRA keine signifikanten Effekte auf die Vitalität der Hefezellen hat (KOC ET AL. 2004).

### 1.5.2 Katalytischer Reaktionsmechanismus von MSRA

Die Aminosäuresequenz von MSRA Proteinen enthält das hochkonservierte GCFWG-Motiv, mit dem für die Katalyse essentiellen Cystein. Für die Reduktase-Aktivität benötigt die MSRA keine Metalle oder Cofaktoren, lediglich Reduktionsäquivalente über ein Thioredoxin-regenerierendes System (MOSKOVITZ ET AL. 2000; LOWTHER ET AL. 2000A).

Neben dem katalytischen Cystein (CysA) im N-terminalen Bereich des Proteins sind ein bzw. mehrere regenerierende Cysteine (CysB bzw. CysC) im C-terminalen Bereich des Proteins an der Katalyse beteiligt. Während der vollständigen Reaktion werden zwei Protonen und zwei Elektronen transferiert. Es erfolgt zunächst ein nukleophiler Angriff des CysA auf das Schwefelatom des Methioninsulfoxids unter Ausbildung einer Disulfidbrücke. Am CysA wird eine Sulfensäure gebildet und gleichzeitig Methionin entlassen. Anschließend erfolgen die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen dem CysA des Sulfensäure-Intermediates und CysB sowie die Entlassung eines Moleküls Wasser. Um in den vollständig reduzierten Grundzustand zurückzukehren, erfolgen zwei weitere Thiol-Disulfid-Austausche über CysC und abschließend Thioredoxin (LOWTHER ET AL. 2000A; LOWTHER ET AL. 2000B). Bei MSRA Enzymen ohne CysC erfolgt die Reduktion der Disulfidbindung zwischen CysA und CysB direkt durch Thioredoxin (BOSCHI-MULLER ET AL. 2005).

Je nach Anzahl der beteiligten regenerierenden Cysteine kann man verschiedene Gruppen von MSRA Enzymen unterscheiden. Zur ersten Untergruppe von MSRA mit CysA sowie CysB

im C-terminalen Bereich des Proteins zählen *Neisseria meningitidis*- und *Mycobacterium tuberculosis*-MSRA. Eine zweite Untergruppe von MSRA wird durch die Enzyme von *E. coli* und *Bos taurus* repräsentiert, die neben dem katalytischen Cystein (CysA) zwei regenerierende Cysteine (CysB, CysC) enthalten. Das Enzym von *Bacillus subtilis*, bei der sich CysB im Abstand von nur drei Aminosäuren neben CysA befindet, bildet eine dritte Untergruppe von MSRA (BOSCHI-MULLER ET AL. 2005). Als Vertreter pflanzlicher MSRA wurde der Reaktionsmechanismus der *Populus trichocarpa*-MSRA untersucht (ROUHIER ET AL. 2007). Da hier neben CysA zwei regenerierende Cysteine, CysB und CysC, an der Reduktion von Methioninsulfoxid beteiligt sind, zählen diese Enzyme zur zweiten Untergruppe von MSRA. Dabei ist CysC im für pflanzliche MSRA typischen, konservierten CYG-Motiv lokalisiert, dessen Tyrosin, ähnlich den bakteriellen oder *Bos taurus*-MSRA, an der Substratbindung beteiligt ist (ROUHIER ET AL. 2007).

### 1.5.3 Physiologische Bedeutung von MSRA

Neben den klassischen Abwehrmechanismen (s. 1.3) werden Methionine als endogene Antioxidantien oder auch ROS-Scavenger angesehen (STADTMAN ET AL. 2003). Damit Methionine diese Funktion ausüben können, benötigt die Zelle die Aktivität einer Methioninsulfoxid-Reduktase. Methionine sind besonders anfällig für eine Oxidation und können durch ihre räumliche Nähe und hohe intrazelluläre Konzentration effektiv ROS, die dem Abwehrsystem der Zelle unter oxidativen Stressbedingungen entweichen, eliminieren. Ohne dieses Abfangen von ROS könnten diese andere strukturell oder funktionell wichtige Reste oxidieren. Für ein kontinuierliches Eliminieren von ROS ist die Regeneration des Methionins durch eine MSRA erforderlich. Vor allem Oberflächen-exponierte Methionine werden daher in Interaktion mit einer MSRA als *last chance defense* bezeichnet (LEVINE ET AL. 1996; LUO & LEVINE 2009). Diese Hypothese basiert vor allem auf Untersuchungen der bereits erwähnten Glutamin-Synthetase aus *E. coli*. Acht der 16 Methionine dieses Proteins sind Oberflächen-exponiert und umgeben den Eingang zum aktiven Zentrum des Enzyms. Die Oxidation dieser acht Methionine *in vitro* hat nur einen geringen Einfluss auf die katalytische Aktivität. Erfolgt jedoch eine Oxidation weiterer Methionine, wird das Protein verstärkt proteolytisch abgebaut (LEVINE ET AL. 1996) und es kommt zur Inaktivierung der Glutamin-Synthetase (FARBER & LEVINE 1986). Oberflächen-exponierte Methionine innerhalb der Glutamin-Synthetase können durch ihre kontinuierliche Regeneration durch MSRA-Aktivität als endogene Antioxidantien wirken, indem sie ROS eliminieren, bevor diese wichtige Reste



des katalytischen Zentrums oxidativ schädigen. Untersuchungen an *E. coli*, bei denen 40 % der Methionin-Reste gegen Norleucin, ein Kohlenstoff statt Schwefel enthaltendes Analogon, ausgetauscht wurden, unterstützen diese Hypothese. Hier verursacht die Verringerung des Methionin-Gehaltes eine erhöhte Sensitivität der Zellen gegenüber oxidativem Stress (LUO & LEVINE 2009). Es existieren somit starke Hinweise, dass die zyklische Oxidation und Reduktion von Methioninen durch die Aktivität einer MSRA einen Teil der antioxidativen Abwehr der Zelle darstellt.

Neben der Funktion als Radikalfänger können MSR oxidative Proteinschäden in der Zelle reparieren. Die Reduktion von Methioninsulfoxid zu Methionin stellt den physiologischen Grundzustand des Proteins wieder her (SUN ET AL. 1999; SUNDBY ET AL. 2005; DAVIES 2005). So konnte beispielsweise oxidativ modifiziertes Calmodulin, das aus seneszentem Gehirngewebe isoliert bzw. *in vitro* oxidiert wurde, durch die Inkubation mit einer MSRA repariert werden. Dadurch wurde die Calmodulin-Funktion, d.h. die Aktivierung der Ca<sup>2+</sup>-ATPase in der Plasmamembran, wieder hergestellt (SUN ET AL. 1999). Ein weiteres Beispiel für eine Proteinreparatur durch MSRA ist das Hsp21 aus *A. thaliana*, dessen Chaperon-ähnliche Funktion durch Oxidation bestimmter stark konservierter Methionine zerstört wird (HÄRND AHL ET AL. 2001). Erfolgt die Reduktion von Methioninsulfoxid zu Methionin durch die Aktivität einer MSRA, wird das Hsp21 auf diese Weise repariert und dessen Funktion wiederhergestellt (GUSTAVSSON ET AL. 2002)

Methioninoxidation sowie reduzierte MSR-Aktivität wird darüber hinaus im Zusammenhang mit biologischem Altern und bestimmten neurodegenerativen Krankheiten gesehen. Während des Alterungsprozesses akkumulieren Schäden an zellulären Makromolekülen, die letztendlich zum Zelltod führen. Als Ursache dieser Zellschäden werden ROS, die während des normalen aeroben Metabolismus entstehen, diskutiert. Verschiedene Experimente belegen, dass der Gehalt an oxidierten Proteinen mit dem Alter steigt. Beispiele sind humanes Hirngewebe, Augenlinsen oder Erythrozyten (Review: HOSHI & HEINEMANN 2001). Die Akkumulation von oxidativen Zellschäden wird ebenfalls als Ursache verschiedener altersbedingter neurodegenerativer Krankheiten angesehen (STADTMAN & BERLETT 1998; MOSKOVITZ 2005). Außerdem wurde eine reduzierte MSRA-Expression und -Aktivität in Zellen seneszenter Ratten und in Hirnzellen von Alzheimer-Patienten gezeigt (PETROPOULOS ET AL. 2001; GABBITA ET AL. 1999). Verschiedene Studien bestätigen den Zusammenhang zwischen MSRA und Alterung. So zeigten Mäuse, denen das *msrA*-Gen fehlt, eine um 40 %

reduzierte Lebensspanne (MOSKOVITZ ET AL. 2001). Die Überexpression des *msrA*-Gens führte in Hefezellen zu einer Erhöhung der Lebensdauer um 25 % (KOC ET AL. 2004) und bei *Drosophila melanogaster* sogar um 70 % (RUAN ET AL. 2002).

## 1.6 Arbeitshypothese

Anhand verschiedener Beispiele aus der Literatur wurde erläutert, dass Methionine in Interaktion mit einer Methioninsulfoxid-Reduktase einen effektiven antioxidativen Schutz zellulärer Komponenten darstellen können. In Pflanzen wird bislang nur das Hitzeschockprotein Hsp21 aus *A. thaliana* als Substrat einer MSRA diskutiert. Da vor allem Proteine des photosynthetischen Elektronentransportes verstärkt einer oxidativen Schädigung durch ROS unterliegen, stellen diese Proteine weitere potentielle Substrate von Methioninsulfoxid-Reduktasen dar. Hier ist vor allem das D1-Protein des PSII-Komplexes hervorzuheben, da dieses Protein unter oxidativen Stressbedingungen einer erhöhten Schädigung durch ROS unterliegt und verstärkt abgebaut wird (ARO ET AL. 1993). Um den photosynthetischen Elektronentransport über die Thylakoidmembran aufrechtzuerhalten, sind die Neusynthese des D1-Proteins sowie die Assemblierung des gesamten PSII-Komplexes notwendig. Das D1-Protein wird vom *psbA*-Gen codiert, das in zweifacher Kopie in den *inverted repeat* Regionen des zirkulären Plastidengenoms lokalisiert ist. Eine Besonderheit des *psbA*-Gens der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ist die Unterbrechung des Gens durch vier Introns. Die Aminosäuresequenz des Genprodukts ist stark konserviert (ERICKSON ET AL. 1984). Das D1-Protein enthält eine Vielzahl von Methioninen. Da die Chlorophylle als Hauptquelle der ROS-Bildung gelten (s. 1.2), könnten Methionine in räumlicher Nähe zu den Chlorophyllen potentielle ROS-Scavenger darstellen. Ein Scavenging von ROS durch endogene Reste sowie deren Regeneration oder auch eine Reparatur von oxidativ geschädigtem D1-Protein durch eine MSR würde einen zusätzlichen Schutz der photosynthetischen Transportkette unter Stressbedingungen darstellen.

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragen untersucht:

- i. Üben Methionine des D1-Proteins der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* in räumlicher Nähe zu den Chlorophyllen eine antioxidative Schutzfunktion aus?
- ii. Existieren Methioninsulfoxid-Reduktasen im Chloroplasten von *Chlamydomonas reinhardtii*, die potentiell mit dem D1-Protein interagieren könnten?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammten hauptsächlich von den Firmen Roth (Karlsruhe, Deutschland), Diagonal (Münster, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland) und Merck (Darmstadt, Deutschland).

Das verwendete  $^{35}\text{S}$ -Cystein wurde von der Firma GE Healthcare (Freiburg, Deutschland) bezogen.

#### 2.1.2 Enzyme

Enzym	Hersteller
DNase I, RNase-frei	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
GoTaq <sup>®</sup> DNA Polymerase	Promega (Mannheim, Deutschland)
Lysozym	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Pronase	Roche (Mannheim, Deutschland)
Restriktionsendonukleasen	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland); Roche (Mannheim, Deutschland)
RiboLock <sup>™</sup> RNase Inhibitor	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
RNaseOUT <sup>™</sup> Ribonuklease Inhibitor	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
SuperScript <sup>™</sup> III Reverse Transkriptase	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
T4 DNA Ligase	Roche (Mannheim, Deutschland)
T3 RNA Polymerase	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
Thermolysin	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Thioredoxin-Reduktase (aus <i>E. coli</i> )	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

### 2.1.3 Reaktionskits

Kit	Hersteller
„Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System“	Promega (Mannheim, Deutschland)
„Wizard® SV Gel and PCR Clean up System“	Promega (Mannheim, Deutschland)
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
pGEM®-T Vector System	Promega (Mannheim, Deutschland)
QIAexpressionist	Qiagen (Hilden, Deutschland)

### 2.1.4 Größenstandards

Bezeichnung	Anwendung	Herkunft
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	DNA-Größenmarker	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
GeneRuler™ Low Range DNA Ladder	DNA-Größenmarker	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
SDS-7	Protein-Größenmarker	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Novex® Sharp Protein Standard	Protein-Größenmarker	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
PageRuler™ Prestained	Protein-Größenmarker	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

### 2.1.5 Algenstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Algenstämme von *C. reinhardtii* verwendet:

#### IL:

eine im *psbA*-Gen intronlose Mutante, die durch Komplementation der Deletionsmutante Fud7 mit der cDNA des *psbA*-Gens entstanden ist (JOHANNINGMEIER & HEISS 1993). Die IL-Mutante synthetisiert ein funktionsfähiges D1-Protein und ist zum photoautotrophen Wachstum befähigt. Sie diente in den physiologischen Experimenten als Referenzstamm.

#### WT 11/32-b:

ist ein Wildtypstamm mit wt<sup>-</sup>-Zellen (Sammlungen von Algenkulturen, Göttingen, Deutschland).

#### Del:

ist eine Deletionsmutante, der die codierende Sequenz für die Aminosäuren Alanin 152 bis Alanin 294 im *psbA*-Gen fehlt. Sie synthetisiert ein verstümmeltes und funktionsunfähiges

D1-Protein und ist nicht fähig photoautotroph zu wachsen, sondern auf Acetat als Kohlenstoffquelle angewiesen. Dieser Spectinomycin-resistente Stamm wurde durch eine Transformation der IL-Mutante erzeugt (PREISS ET AL. 2001).

### 2.1.6 Bakterienstämme und Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

Stamm	Beschreibung	Herkunft
NovaBlue	<i>endA1 hsdR17(rK12- mK12+) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F' [proA+B+ lacIqZAM15 ::Tn10(TetR)]</i>	Novagen (Darmstadt, Deutschland)
DH5 $\alpha$	F- $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> $\lambda$ -	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
TG1	<i>supE hsd_5 thi -(lac-proAB)F' [traD36 proAB+ lacIq lacZ_M15]</i>	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
Rosetta	F- <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm pRARE (Cam<sup>R</sup>)</i>	Merck (Darmstadt, Deutschland)
BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal</i> $\lambda$ (DE3) <i>endA Hte</i>	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
M15 [pREP4]	<i>nal<sup>s</sup> str<sup>s</sup> rif<sup>s</sup> thi- lac- ara+ gal+ mtl- f recA+ uvr+ lon+</i> [pREP4 Kan <sup>R</sup> ]	Qiagen (Hilden, Deutschland)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Plasmide verwendet:

Bezeichnung	Resistenz	Herkunft
pGEM	Amp	Promega (Mannheim, Deutschland)
pJet1	Amp	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
pQE-30	Amp	Qiagen (Hilden, Deutschland)
pBAT	Amp	(ANNWEILER ET AL. 1991)

### 2.1.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Primer wurden von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) bezogen.

Name	Nukleotidsequenz	Verwendung
Dau2	5` - GCT AGA GTT AGT TGA AGC TAA GTC TAG AGG GA - 3`	<i>psbA</i> -Mutagenese-PCR
Dau4	5` - GGG TCG TGA GTG GGA ATT ATC TTT CCG - 3`	<i>psbA</i> -Mutagenese-PCR
M172A	5' - CAGAGATACCTAAAGGAGCACCGTCAGAG - 3'	<i>psbA</i> -Mutagenese-PCR
M172L	5' - CAGAGATACCTAAAGGTAAACCGTCAGAG - 3'	<i>psbA</i> -Mutagenese-PCR
M183A	5' - GCTTGAATACGATAGCGAAGTTGAAAG - 3'	<i>psbA</i> -Mutagenese-PCR
M183L	5' - GCTTGAATACGATTAAGAAGTTGAAAG - 3'	<i>psbA</i> -Mutagenese-PCR
M194A	5' - GTGGAATGGGTGAGCAAGGATGTTG - 3'	<i>psbA</i> -Mutagenese-PCR
M194L	5' - GTGGAATGGGTGTAAAAGGATGTTGTG - 3'	<i>psbA</i> -Mutagenese-PCR
psbAX1	5 - GCT TCT CTA GAC GAG TGG - 3`	Homoplasmietest der <i>psbA</i> -Mutanten
psbAX2	5` - AAG TCT AGA GGG AAG TTG - 3`	Homoplasmietest der <i>psbA</i> -Mutanten
opsbA412	5` - GGTATGCGTCCATGGATCGC - 3`	Sequenzierung der <i>psbA</i> -Mutanten
psbA-133	5` - GTG CTA GGT AAC TAA CGT TTG - 3`	Sequenzierung der <i>psbA</i> -Mutanten
psbAJS2	5` - CGT CCT GCC AAC TGC CTA TGG - 3`	Sequenzierung der <i>psbA</i> -Mutanten
msrA1.BamHI for	5` - CGC GGA TCC CAC CCG GAG GCT TCG TTC - 3`	Amplifizierung <i>msrA</i> + Klonierung
msrA1.HindIII rev	5` - CCC AAG CTT TCA CCA CCA GCC CGC AGA - 3`	Amplifizierung <i>msrA</i> + Klonierung
msrA2.BamHI for	5` - GGA TCC ATG CTT GTT GCT CGC TAT AGC - 3`	Amplifizierung <i>msrA</i> + Klonierung
msrA2.HindIII rev	5` - AAG CTT CTG CCT CAT CAT CAC GCC TTG ATC - 3`	Amplifizierung <i>msrA</i> + Klonierung
msrA3.SacI for	5` - GAG CTC ATG CAG ACC CTA AAG CC - 3`	Amplifizierung <i>msrA</i> + Klonierung
msrA3.HindIII rev	5` - AAG CTT TCA GCC GTA GCA GCG GAT GGG - 3`	Amplifizierung <i>msrA</i> + Klonierung
msrA4.BamHI for	5` - GGA TCC ATG AAG GTC CAG CTG TCC AAC - 3`	Amplifizierung <i>msrA</i> + Klonierung
msrA4.HindIII rev	5` - AAG CTT TTA GCC GTA GCA GCG GAT GG - 3`	Amplifizierung <i>msrA</i> + Klonierung
msrA2.487f	5` - CAT GAC CCC ACC ACC AAG - 3`	Semiquantitative RT PCR
msrA2.STOP	5` - CAT CAC GCC TTG ATC AGC TTG - 3`	Semiquantitative RT PCR
msrA3.5 f	5` - CAA TTA TGC AGA CCC TAA AGC - 3`	Semiquantitative RT PCR
msrA3.543r	5` - GAC GGC GCC TTG CCC TCC GCG - 3`	Semiquantitative RT PCR
msrA4.ex2f	5` - GTC CAG CTG TCC AAC GGC ATG - 3`	Semiquantitative RT PCR
msrA4.300r	5` - GTT GCT GTA GCC CAC CTC GGT - 3`	Semiquantitative RT PCR
Aktin1	5` - ATC ACC ATC GGC AAC GAG CGT TT - 3`	Semiquantitative RT PCR
Aktin2	5` - TTG CGG ATG TCC ACA TCG CAC TT - 3`	Semiquantitative RT PCR
pQE forw	5` - CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG - 3`	Überprüfung Klonierung in pQE-30
pQE rev	5` - GTT CTG AGG TCA TTA CTG G - 3`	Überprüfung Klonierung in pQE-30
pGlac F	5` - GCT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC - 3`	Überprüfung Klonierung in pGEM
pGlac R	5` - GGG CGA ATT GGG CCC GAC GTC - 3`	Überprüfung Klonierung in pGEM
pJET1 Forward	5` - GCC TGA ACA CCA TAT CCA TCC - 3`	Überprüfung Klonierung in pJET1
pJET1 Reverse	5` - GCA GCT GAG AAT ATT GTA GGA GAT C - 3`	Überprüfung Klonierung in pJET1

## 2.2 Physiologische Methoden

### 2.2.1 Algenanzucht

#### 2.2.1.1 Anzucht unter Normalbedingungen

Die Anzucht der unter 2.1.5 genannten Algen sowie der erstellten *C. reinhardtii*-Mutanten erfolgte in Erlenmeyerkolben auf Schüttlern (GFL 3019) bei 21°C und 60-80  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  (OSRAM L58W/31-830 Lumilux Plus; warm white). Die Messung der Lichtintensitäten erfolgte mit dem Quantitherm Light Meter Thermometer der Firma Hansatech. Die Algenzellen wuchsen entweder photoautotroph in acetatfreiem HS-Medium (SUEOKA 1960) oder heterotroph in acetathaltigem TAP-Medium (GORMAN & R. P. LEVINE 1965). Die Stammhaltung der Algen erfolgte entweder auf TAP- oder HS-Platten, bei denen dem Medium 1,5% Agar zugegeben wurde.

#### TAP-Medium (Tris-Acetat-Phosphat)

2,42 g Tris  
 25 ml Salzlösung  
 375  $\mu\text{l}$  Kalium-Phosphat-Lösung  
 1 ml Hutner-Spurenelemente  
 5 ml Natriumchloridlösung  
 ad 1 Liter Aqua bidest.  
 pH 7 mit 96 % Essigsäure einstellen

#### Salzlösung:

15 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
 4 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
 in 800 ml lösen  
 2 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
 ad 1 Liter Aqua bidest.

#### Natriumchloridlösung:

5 g  $\text{NaCl}$   
 ad 1 Liter Aqua bidest.

#### HS (high-salt)-Medium

5 ml Beijernick-Lösung  
 5 ml Kalium-Phosphat-Lösung  
 1 ml Hutner-Spurenelemente

#### Beijernick-Lösung:

100 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
 4 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
 2 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
 ad 1 Liter Aqua bidest.

#### Kaliumphosphatlösung:

288 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
 144 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
 ad 1 Liter Aqua bidest.

#### 2.2.1.2 Anzucht unter oxidativen Stressbedingungen

Für Versuche unter Stressbedingungen erfolgte die Algenanzucht von WT-Zellen bis zur späten logarithmischen Phase ( $\text{OD}_{750}$  0,7-0,9) in HS-Medium bei 60  $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-2}$  Licht,  $\text{CO}_2$

Begasung (3,5 %) und 24°C. Zellen entsprechend einer Chlorophyllmenge von 3.000 µg wurden entnommen, abzentrifugiert (RT, 3 min, 3.000 rpm, Hettich, Rotor 1424A) und in 200 ml HS resuspendiert. Die Algensuspension (15 µg Chl/ml) wurde während des gesamten Versuchszeitraums mit einem CO<sub>2</sub>-Luftgemisch (3,5 % CO<sub>2</sub>) begast und bei folgenden Stressbedingungen inkubiert:

	Temperatur	Lichtintensität	Dauer
Starklicht	24°C	700 µmol s <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup>	30 min
UV-Bestrahlung	24°C	0,5 mW s <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	20 min
Dunkelheit	24°C	0 µmol s <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup>	300 min
Kälte	10°C	60 µmol s <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup>	60 min
Hitze	42°C	60 µmol s <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup>	30 min
Kontrolle	24°C	60 µmol s <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup>	20 min

### 2.2.2 Starklichtexperiment

Die Algen wurden in TAP-Medium wie unter 2.2.1.1 beschrieben angezogen. Für die Starklichtexposition wurden *C. reinhardtii* Mutanten sowie der Referenzstamm IL entsprechend 1.500 µg Chlorophyll abzentrifugiert (RT, 4 min, 4.000 rpm, Hettich, Rotor 1424A), in 100 ml TAP-Medium resuspendiert und für 45 min bei 24°C und moderaten Lichtintensitäten (50 µmol m<sup>-1</sup> s<sup>-2</sup>) inkubiert. Die Inkubation erfolgte unter ständigem Rühren in 24°C-temperierten Glaskulturgefäßen. Nach dieser Erholungsphase wurde Starklicht zugeschaltet (Lichtintensität ca. 1.800 bis 2.000 µmol m<sup>-1</sup> s<sup>-2</sup>; Halogenstrahler, Hedler H25). Zur Hemmung der chloroplastidären Proteinbiosynthese wurde bei Bedarf Chloramphenicol (CAP; 200 µg/ml) nach der Erholungsphase zugegeben und für 20 min inkubiert. Zur Isolierung von Gesamtzell-Protein wurden 4 ml Algensuspension abgenommen und zentrifugiert (4°C, 5 min, 5.000 rpm, Hettich Rotor 1424A). Nach Entfernen des Überstandes wurden die Pellets bei -80°C durchgefroren. Die Probenentnahme erfolgte zu Beginn der Starklichtexposition (0 min-Wert) und zu definierten Zeitpunkten.

### 2.2.3 Dark recovery Versuch

Die Algen wurden wie unter 2.2.1.1 beschrieben vorbereitet. Nach der Erholungsphase wurde Chloramphenicol (CAP; 200 µg/ml) zugegeben, für 20 Minuten inkubiert und anschließend Starklicht mit einer Lichtintensität von 1.300 µmol m<sup>-1</sup> s<sup>-2</sup> zugeschaltet. Mit Beginn der Starklichtbestrahlung erfolgte die Probenentnahme. Dazu wurden jeweils 2 x 300 µl



Algensuspension mit einer Chlorophyllkonzentration von 15 µg/ml in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben. Die  $F_V/F_M$ -Messung der Doppelproben erfolgte im Abstand von fünf Minuten über einen Zeitraum von 20 Minuten. Nach der Starklichtexposition wurden die Algenkulturen bei sehr geringen Lichtintensitäten ( $< 10 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-2}$ ) inkubiert. Die  $F_V/F_M$ -Messung erfolgte im Abstand von zehn Minuten über einen Zeitraum von 60 Minuten.

## 2.2.4 Messmethoden

### 2.2.4.1 Messung des Algenwachstums

Zur Messung des Algenwachstums wurden die Mutanten in 300 ml HS-Medium in einem temperierten Wasserbad bei 25°C, einer Lichtintensität von 60-70  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  und permanenter CO<sub>2</sub>-Begasung (3,5 %) kultiviert. Angeimpft wurde mit  $5 \times 10^4$  Zellen/ml. Für die Messung wurden Aliquots (1 ml) entnommen und die optische Dichte bei 750 nm bestimmt (SAGER & GRANICK 1953).

### 2.2.4.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl von Algensuspensionen wurde die Zählkammer nach Thoma verwendet. Die Zählkammer besteht aus 4 x 4 Großquadraten, wobei jedes Großquadrat aus 16 Kleinquadraten besteht.

*Volumen über einem Kleinquadrat (KQ) = 0,00025 mm<sup>3</sup>*

*Volumen über einem Großquadrat (GQ) = 0,004 mm<sup>3</sup>*

Um bei der Berechnung auf die übliche Bezugsgröße von 1 ml (= 1.000 mm<sup>3</sup>) zu kommen, müssen die Volumina von Groß- bzw. Kleinquadraten mit einem sogenannten Kammerfaktor multipliziert werden.

***Kammerfaktor eines Kleinquadrates:***  $4 \times 10^6$  ( $\times 0,00025 \text{ mm}^3 = 1.000 \text{ mm}^3$ )

***Kammerfaktor eines Großquadrates:***  $2,5 \times 10^5$  ( $\times 0,004 \text{ mm}^3 = 1.000 \text{ mm}^3$ )

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde von der jeweiligen Algensuspension 1ml abgenommen und mit 10 µl Jodlösung (einige Jodkristalle in Aqua bidest. gelöst) versetzt. Davon wurden ca. 15 µl Suspension auf die Zählkammer aufgetragen. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurden die Algenzellen gezählt. Dabei wurden in der Regel 4 Großquadrate ausgezählt (abhängig von der Zelldichte). Für jede Probe wurde die Zellzahl doppelt bestimmt und der Mittelwert gebildet.

**Zellzahl = Kammerfaktor x Mittelwert der gezählten Zellen**

### 2.2.4.3 Chlorophyllmessung

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes erfolgte nach der Methode von Arnon (ARNON 1949). Dazu wurden den Algenkulturen jeweils 1 ml Probe entnommen und diese kurz anzentrifugiert (RT, 30 s, 13.000 rpm, Biofuge, Heraeus). 800 µl des Überstandes wurden verworfen und das Pellet in den restlichen 200 µl resuspendiert. Nach Zugabe von 800 µl 100% Aceton folgte ein kräftiges Schütteln (mind. 2 min, Vortex), um das gesamte Chlorophyll zu extrahieren. Ein anschließender Zentrifugationsschritt (4 min, 13.000 rpm, Biofuge, Heraeus) sedimentierte die bei der photometrischen Bestimmung störenden, nicht löslichen Bestandteile. Die Messung der optischen Dichte (OD) des grünen, chlorophyllhaltigen Überstandes erfolgte bei 652 nm (Ultraspec 2000, Pharmacia/Biotech). Die Chlorophyllmenge pro Volumeneinheit wird nach folgender Formel berechnet:

$$OD_{652} \times \text{Verdünnungsfaktor}/34,5 = \text{mg Chlorophyll}(a + b)/\text{ml}$$

OD<sub>652</sub>            optische Dichte bei 652 nm

34,5                molarer Extinktionkoeffizient

### 2.2.4.4 Fluoreszenzmessung

Die Fluoreszenzmessung der Mutanten erfolgte mit der FluorCam 800 MF (Photon Systems Instruments; Brno, Tschechische Republik). Sie ist ein Hilfsmittel, um schnell Unterschiede in der photosynthetischen Aktivität von Organismen zu untersuchen, egal ob diese Unterschiede durch biotischen oder abiotischen Stress, durch Speziesunterschiede oder durch Mutationen hervorgerufen wurden.

Die Messung erfolgte entsprechend des Hersteller-Protokolls, das den Zeitpunkt, die Dauer und die Intensität des Plastochinon (PQ) reduzierenden Super-Pulses und der aktinischen Licht-Exposition festlegt. Der PQ reduzierende Super-Puls dauerte 960 ms und konnte eine Lichtintensität von bis zu 3.000 µmol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> besitzen. Nach Abschluss der Messungen wurden die Parameter F<sub>V</sub>, F<sub>M</sub>, F<sub>0</sub>, F<sub>M</sub>/F<sub>0</sub> und F<sub>V</sub>/F<sub>M</sub> der ausgewählten Fluoreszenz-emittierenden Objekte ausgegeben, wobei F<sub>V</sub> die variable Fluoreszenz, F<sub>0</sub> die minimale Fluoreszenz und F<sub>M</sub> die maximale Fluoreszenz ist.

Für die Fluoreszenzmessung wurden 300 µl Algensuspension mit einer Chlorophyllkonzentration von 15 µg/ml in Mikrotiterplatten pipettiert. Vor der Messung wurden die

Algen fünf Minuten im Dunkeln inkubiert. Dann erfolgten jeweils Doppelmessungen einer Probe.

## 2.2.5 Bakterienkulturen

### 2.2.5.1 Bakterienkultivierung

Die Kultivierung der *Escherichia coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl; pH 7,0). Für LB-Platten wurden dem Medium 1,5 % Agar zugegeben. Da die eingebrachten Plasmide (s. 2.1.6) spezielle Resistenzen vermitteln, wurden folgende Antibiotika zur Kultivierung der Bakterien eingesetzt:

Antibiotikum	Stammkonzentration	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	25 µg/ml
Chloramphenicol	40 mg/ml	200 µg/ml
Tetracyclin	12,5 mg/ml	12,5 µg/ml

### 2.2.5.2 Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli*

Kompetente Zellen wurden mit Hilfe einer chemischen Methode hergestellt (CHUNG ET AL. 1989).

50 ml LB-Medium wurden mit 0,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert bis die Bakterien eine OD<sub>600</sub> von 0,4 erreicht hatten. Die Kultur wurde in Zentrifugationsröhrchen überführt, auf Eis abgekühlt und anschließend zentrifugiert (4°C, 10 min, 5.000 rpm, Hettich, Rotor 1424A). Danach erfolgte die Aufnahme des Pellets in 5 ml eiskaltem TSS-Puffer und eine Inkubation auf Eis für 15 Minuten. Je 100 µl dieser Lösung wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

**TSS-Puffer** 10 % (w/v) PEG (Mr 3350 oder 8000), 20-50 mM Mg<sup>2+</sup>, 5 % (v/v) DMSO in LB-Medium; pH 6,5-6,8 (Puffer vor DMSO-Zugabe sterilfiltrieren)

**Mg<sup>2+</sup> stock solution (2M)** 1 M MgCl<sub>2</sub> + 1 M MgSO<sub>4</sub> (sterilfiltrieren)

Die Herstellung kompetenter M15[pREP4]-Zellen (Qiagen, Hilden Deutschland) erfolgte nach der Rubidium-Chlorid-Methode gemäß Herstellerangaben.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Isolierung von Gesamtzell-DNA

Die Extraktion der Gesamt DNA erfolgte in Anlehnung an Newman et al. (NEWMAN ET AL. 1990).

Es wurden Zellen entsprechend 150 µg Chlorophyll (s. 2.2.4.3) zentrifugiert (5 min, 5.000rpm, Hettich, Rotor 1424A), das Pellet in 1 ml TEN-Puffer gewaschen, kurz anzentrifugiert (30 sek, 13.000 rpm, Biofuge, Heraeus) und in 400 µl TEN-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 40 µl 20 % SDS, 40 µl 20 % Sarcosyl und 30 µl Pronase, einer Protease aus *Streptomyces griseus*, erfolgte die Zellyse unter leichtem Invertieren (10 min, RT). Zur Trennung der Nukleinsäure von anderen Zellbestandteilen wurden 650 µl PCI [Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol; 25/24/1] zugegeben und vorsichtig bei Raumtemperatur geschüttelt (5 min). Nach der Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm, Biofuge, Heraeus) war eine deutliche Phasentrennung sichtbar. Die klare obere Phase, welche die Nukleinsäure enthält, wurde vorsichtig abgenommen und erneut mit PCI ausgeschüttelt. Die erste Fällung der DNA erfolgte nach Zugabe von 2 Volumina 100 % Ethanol (auf -20°C gekühlt) über Nacht bei -20°C. Die Ethanol-fällung wurde zentrifugiert (RT, 10 min, 15.000 rpm, Sigma, Rotor 12154-H), zweimal mit 800 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (RT, 5 min, 15.000 rpm, Sigma-Zentrifuge, Rotor 12154-H). Das Pellet wurde getrocknet und in 300 µl TE-Puffer vollständig gelöst. Durch Zugabe von 30 µl 3 M Ammonium-Acetat und 30 µl 0,5 M MgCl<sub>2</sub> folgte die zweite Fällung. Die Proben wurden gemischt (Vortex), mit 2 Volumina 100 %igem Ethanol (-20°C) versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Der Fällungsansatz wurde zentrifugiert, zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend getrocknet (siehe oben). Die Aufnahme und vollständige Lösung des Pellets (5 min, 37°C im Heizblock) erfolgte in 50 µl TE-Puffer. Um die RNA abzubauen wurden dem Ansatz 1-2 µl RNase (Stammlösung 10 µg/µl) zugegeben.

### 2.3.2 Präparation von Plasmiden

Plasmide wurden laut Herstellerangaben mit Hilfe des „Wizard<sup>®</sup> Plus Minipreps DNA Purification System“-Kits (Promega, Mannheim, Deutschland) isoliert.

### 2.3.3 RNA Isolierung

Algenzellen entsprechend einer Chlorophyllmenge von 300 µg wurden abgenommen, zentrifugiert (4°C, 5 min, 5.000 rpm, Hettich) und in 1 ml TRIzol resuspendiert. Nach einem

Inkubationsschritt bei Raumtemperatur (5 min) erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform. Dieser Ansatz wurde geschüttelt (3-5 min) und bei Raumtemperatur inkubiert (2-3 min). Nach einem Zentrifugationsschritt (4°C, 15 min, 13.000 rpm, Biofuge, Heraeus) wurde die obere, wässrige Phase vorsichtig abgenommen und ein gleiches Volumen Isopropanol zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt, die RNA gefällt (-20°C, 30 min) und zentrifugiert (4°C, 10 min, 13.000 rpm, Biofuge, Heraeus). Danach erfolgten drei Waschschrte (750 µl Ethanol 75 %, Zentrifugation bei 4°C, 10 min, 13.000 rpm, Biofuge, Heraeus). Das Pellet wurde kurz getrocknet und in 50 µl DEPC-Wasser bei 60°C gelöst.

**TRIzol Reagenz (Endkonzentration):**

Phenol in gesättigtem Puffer (38 %)	9,5 ml
Guanidin Thiocyanat (0,8 M)	2,4 g
Ammonium Thiocyanat (0,4 M)	0,76 g
Natrium Acetat, pH5 (0,1 M)	2,5 ml
Glycerin (5 %)	1,25 ml
DEPC-behandeltes Wasser	ad 25ml

### 2.3.4 cDNA Synthese

Mit einer RNase-freien DNase I der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) erfolgte zunächst der Abbau genomischer DNA in der RNA-Präparation nach folgendem Ansatz:

RNA	2 µg
10 x Reaktionspuffer mit MgCl	1 µl
RiboLock™ RNase Inhibitor (1 U/µl)	1 µl
DNase I, RNase-frei (1 U/µl)	2 µl
DEPC-behandeltes Wasser	ad 10 µl

Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C in einem Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der DNase durch Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA und Hitze (10 min, 65°C). Die Proben wurden sofort auf Eis überführt. Nach dem DNase-Verdau wurde mit Hilfe der SuperScript® III Reversen Transkriptase (Invitrogen, Groningen, Niederlande) die cDNA synthetisiert. Dazu wurde folgender Ansatz pipettiert:

---

Reverse-Primer (10 pmol/μl)	1 μl
dNTPs (10 mM)	1 μl
RNA (DNase-verdaut)	10 μl
DEPC-behandeltes Wasser	1 μl
Denaturierung der RNA (70°C, 10 min); sofortiges Abkühlen der Proben auf Eis (mind. 5 min);	
Zugabe von:	
5 x First-Strand Buffer	4 μl
DTT (0,1 M)	1 μl
RNaseOUT™ Ribonuklease Inhibitor (40 U/μl)	1 μl
SuperScript™ III Reverse Transkriptase (200 U/μl)	1 μl

Die Synthese der cDNA erfolgte bei 55°C für 90 Minuten. Anschließend wurden die Enzyme bei 70°C fünfzehn Minuten inaktiviert. Die Proben wurden direkt in einer PCR eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

### 2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der PCR (polymerase chain reaction) wurden DNA-Abschnitte in einem TRIO-Thermoblock™ der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) vervielfältigt. Die Größe dieser Abschnitte wird dabei von entsprechenden Oligonukleotiden definiert, die unter 2.1.7 aufgelistet sind. Ein Standardansatz beinhaltete 1 x Green reaction buffer (Promega, Mannheim, Deutschland), 0,2 mM Desoxyribonukleotide (dNTPs), jeweils 20 pmol Oligonukleotide und 1 U GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Mannheim, Deutschland) in einem 50 μl Gesamtvolumen. Für die jeweiligen Anwendungen wurden verschiedene Templates verwendet:

Anwendung	Template
Amplifikation des <i>psbA</i> -Gens	genomische Algen-DNA (bis zu 250 ng)
Amplifikation vollständiger <i>msrA</i> -„open-reading frames“	2 bzw. 4 μl cDNA-Ansatz
Identifizierung positiver Klone	<i>E. coli</i> Zellen

Für die Amplifikation von *msrA*-„open-reading frames“ wurden dem Reaktionsansatz 2 % DMSO zugegeben, um mögliche DNA-Sekundärstrukturen zu minimieren.

Folgendes Programm lag einer Standard-PCR zugrunde:

Temperatur	Zeit	
94°C	1 min	} 25 bis 35 Zyklen
94°C	30 s	
X°C	45 s	
72°C	1 min/kb	
72°C	10 min	
4°C	unendlich	

X°C = Oligonukleotid-spezifische Hybridisierungstemperatur

Bei Verwendung von *E. coli*-Zellen als Template wurde der erste Denaturierungsschritt auf fünf Minuten erhöht, um einen besseren Aufschluss der Zellen zu gewährleisten.

### 2.3.6 Auftrennung und Aufreinigung von DNA

Die horizontale Flachbett-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Als Elektrophorese-Puffer wurde 1 x TBE [89 mM Borsäure, 89 mM Tris, 2 mM EDTA (pH 8,0)] verwendet. Der in TBE-Puffer vollständig gelösten Agarose wurden 3 µl/100 ml Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml) zugegeben, um so die DNA sichtbar zu machen. Vor dem Auftragen wurden 6 Volumina der aufzutrennenden DNA-Proben mit 1 Volumen 6 x Ladepuffer [0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 15 % (w/v) Ficoll] gemischt. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde bei jedem Gellauf ein Längenmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-100 V, je nach Gelgröße (Netzgerät: Standard Power Pack P25, Biometra). Anschließend wurden die Gele mit Hilfe von UV-Licht dokumentiert (Herolab UVT-28 MP; Herolab JCU-1; Mitsubishi P91).

Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des „Wizard® SV Gel and PCR Clean up System“-Kits (Promega, Mannheim, Deutschland) laut Herstellerangaben aus dem Agarosegel gereinigt.

### 2.3.7 Gerichtete Mutagenese

Die in dieser Arbeit verwendeten Mutanten wurden im Rahmen einer Diplomarbeit (KREBS, 2006), wie nachfolgend beschrieben, erstellt. In einer ersten PCR wurden Fragmente mit mutagenen Primern, d.h. Primern mit mind. einem Basenaustausch, und dem Primer Dau4 (s. 2.1.7) erzeugt. Die in der ersten PCR erhaltenen Fragmente wurden anschließend als Primer zusammen mit dem Primer Dau2 in einer zweiten PCR eingesetzt. Diese PCR-Fragmente wurden gereinigt, sequenziert und mit Hilfe der Partikelkanone (KLEIN ET AL.

1992) in die Del1-Mutante geschossen. Die Anzucht der transformierten Zellen erfolgte bei 20 °C und einer Lichtintensität von 10- 40  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  auf HS-Medium. Es war somit nur ein Wachstum von Transformanten möglich, die durch Komplementation des *psba*-Gens ein vollständiges D1-Protein synthetisieren und dadurch photoautotroph wachsen konnten. Für jede Mutante wurden etwa vier Filter mit jeweils  $5 \times 10^7$  Zellen beschossen.

### 2.3.8 Semiquantitative RT-PCR

Wie unter 2.2.1.2 beschrieben, wurden WT-Algen verschiedenen oxidativen Stressbedingungen ausgesetzt. Von jeder „Stresskultur“ sowie vom Kontroll-Ansatz (ungestresst) wurde Gesamtzell-RNA isoliert (vgl. 2.3.3). Einem DNase-Verdau folgte das Umschreiben der kompletten mRNA in cDNA mit Hilfe zufälliger Hexamere nach dem Prinzip des *Random Priming* unter Verwendung der SuperScript™ III Reversen Transkriptase der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande). Für den DNase-Verdau wurde folgender Ansatz pipettiert:

RNA	3,67 $\mu\text{g}$
10 x Reaktionspuffer mit MgCl	3 $\mu\text{l}$
RiboLock™ RNase Inhibitor (1 U/ $\mu\text{l}$ )	0,75 $\mu\text{l}$
DNase I, RNase-frei (1 U/ $\mu\text{l}$ )	3 $\mu\text{l}$
DEPC-behandeltes Wasser	ad 30 $\mu\text{l}$

Der Ansatz wurde 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Inaktivierung der DNase durch Zugabe von 3  $\mu\text{l}$  EDTA (25 mM) und Hitzeinkubation (10 min, 65°C) wurden die Proben sofort auf Eis überführt. DNA-freie RNA (9  $\mu\text{l}$ ) wurde mit 1  $\mu\text{l}$  Hexanucleotide Mix (10 x konzentriert; Roche, Mannheim, Deutschland) gemischt, denaturiert (70°C, 5 min) und danach auf Eis inkubiert (mind. 1 min). Nach Zugabe folgender Komponenten:

5 x First-Strand Buffer	4 $\mu\text{l}$
dNTPs (10 mM)	1 $\mu\text{l}$
DTT (0,1 M)	1 $\mu\text{l}$
RNaseOUT™ Ribonuklease Inhibitor (40 U/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
SuperScript™ III Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
DEPC-behandeltes Wasser	2 $\mu\text{l}$

folgten das *Annealing* (25°C, 5 min), die Synthese (55°C, 90 min) und die Inaktivierung der Enzyme (85°C, 10 min). Dadurch wurde sowohl für jede einzelne Stress-Kultur als auch für



die Kontrolle jeweils ein spezifischer cDNA-Pool synthetisiert, der in einer anschließenden PCR zusammen mit genspezifischen Primern als Template eingesetzt wurde. In einer Negativkontrolle („No RT“) diente ein cDNA-Ansatz, der ohne Zugabe von Reverser Transkriptase inkubiert wurde, als Template für die Amplifikation. Für jedes *msrA*-Gen sowie das *Aktin*-Gen wurde ein einzelner Mastermix pipettiert. Ein 50µl-PCR-Ansatz enthielt:

5 x Green Reaktionspuffer	10 µl
DMSO	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Forward-Primer (10 pmol/µl)	2 µl
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	2 µl
GoTaq® DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
Wasser	ad 48 µl

Von jedem Mastermix wurden 48 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße vorgelegt, denen 2 µl cDNA bzw. „no RT“-cDNA (Negativkontrolle) anschließend zugegeben wurden. Nach Ablauf des PCR-Programmes (s. 2.3.5) folgte die Visualisierung durch Auftrennung der PCR-Produkte mit Hilfe eines Agarosegels und anschließender Ethidiumbromidfärbung (vgl. 2.3.6).

### 2.3.9 Klonierung von DNA

PCR-amplifizierte DNA-Fragmente wurden zunächst in den pJET1-Vektor (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) bzw. in den pGEM-T Vektor (Promega, Mannheim, Deutschland) integriert. Die Klonierung erfolgte gemäß Herstellerangaben. Nach dem Transfer in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden die erhaltenen Transformanten mittels Kolonie-PCR (s. 2.3.5) getestet. Die Plasmid-DNA positiver Klone wurde präpariert und mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen, dem Herstellerprotokoll folgend, verdaut. Auf diese Weise erhielten die DNA-Fragmente für die anschließende Klonierung in die Zielvektoren pQE-30 (Qiagen, Hilden, Deutschland) bzw. pBAT (s. 2.1.6) entsprechend modifizierte Enden. Die verdauten DNA-Fragmente sowie der mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen linearisierte Zielvektor wurden über ein Agarosegel aufgetrennt und gereinigt. Für die Ligation wurden Vektor und Insert in einem Verhältnis 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Ein Ligationsansatz enthielt 1 U T4-DNA-Ligase und 1 x Ligasepuffer in einem Gesamtvolumen von 30 µl. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16°C. Anschließend wurde die Ligase

inaktiviert (65°C, 10 min). Nach Transformation in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden positive Klone mittels PCR und Sequenzierung getestet.

### 2.3.10 Transfer von DNA

Ein 100 µl Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen wurde mit maximal 10 µl Ligationsansatz versetzt, sanft gemischt und für 20 bis 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 1 Minute wurden die Zellen auf Eis abgekühlt, mit 900 µl SOC-Medium versetzt und für 60 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Selektion entsprechend der eingebrachten Resistenz erfolgte auf Antibiotika-haltigen LB-Platten bei 37°C über Nacht.

**SOC-Medium:** 2 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM Glucose; pH 7,0

### 2.3.11 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma SEQLAB (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der frei zugänglichen ClustalW2-Software.

## 2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.4.1 Proteinextraktion aus Algenkulturen

#### 2.4.1.1 Isolierung von Gesamt-Protein

Zellen entsprechend 60 µg Chlorophyll wurden den Algenkulturen entnommen, zentrifugiert (4°C, 5 min, 5.000 rpm, Hettich, Rotor 1424A) und bei -80°C eingefroren. Anschließend wurde das Pellet in 120 µl Lösung A aufgetaut und mit 80 µl Lösung B und 11 µl Mercaptoethanol versetzt. Nach einer Inkubation unter leichtem Schütteln (RT, 20 min) folgte ein Zentrifugationsschritt (RT, 5 min, 13.000 rpm, Biofuge, Heraeus). Der Überstand wurde abgenommen und entspricht dem Gesamtproteinextrakt.

**Lösung A:** 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ad 200 ml Aqua bidest.

**Lösung B:** 5 % SDS, 30 % Saccharose, ad 200 ml Aqua bidest.

### 2.4.1.2 Isolierung von Membranprotein- und Löslicher Protein-Fraktion

Zellen entsprechend 600 µg Chlorophyll wurden den Algenkulturen entnommen und zentrifugiert (4°C, 5 min, 5.000 rpm, Hettich, Rotor 1424A). Nach Aufnahme des Pellets in 1 ml NaHCO<sub>3</sub> (1 M) erfolgte der Zellaufschluss mit Hilfe der Yeda-Pressen. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Durch Anlegen eines definierten Druckes (70 bar, 5 min) mit anschließendem vorsichtigem Öffnen des Ventils wurden die Zellen aufgebrochen. Das Zelllysate wurde aufgefangen und erneut in die Yeda-Pressen gefüllt. Um möglichst alle Zellen aufzuschließen, wurde der Yeda-Aufschluss wiederholt. Der anschließende Zentrifugationsschritt (4°C, 60 min, 20.000 rpm, Sorvall, Rotor SE-12) trennte die Membranfraktion von den löslichen Proteinen. Das erhaltene Pellet (Membranfraktion) wurde in 1 ml NaHCO<sub>3</sub> (1 M) resuspendiert und auf Eis bzw. bei -80°C gelagert. Der Überstand enthielt die löslichen Proteine. Um die Konzentration der löslichen Proteine zu erhöhen, wurde die Lösung in Amicon-Filtereinheiten (Amicon Ultra-15, Millipore, Billerica, MA, USA) entsprechend dem Herstellerprotokoll zentrifugiert. Für die SDS-PAGE wurde ein Volumen Membranprotein entsprechend einer definierten Chlorophyllmenge (3 µg; Chlorophyllbestimmung s. 2.2.4.3) aufgetragen sowie ein dazu äquivalentes Volumen an löslichem Protein. Vor dem Auftragen wurden die löslichen Protein-Proben mit 2 x SDS Ladebuffer versetzt und denaturiert (94°C, 5 min). Die chlorophyllhaltigen Membranprotein-Proben wurden kurz bei Raumtemperatur solubilisiert.

**2 x SDS-Ladebuffer:** 100 mM Tris/HCl pH 6,8; 200 mM Dithiothreitol (DTT); 4 % SDS; 0,2 % Bromphenolblau; 20 % Glycerin

### 2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (BRADFORD 1976). Für das Bradford-Reagenz wurden 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50 ml 95 % (v/v) Ethanol gelöst, mit 100 ml 85 % (w/v) Phosphorsäure versetzt und mit Aqua dest. auf 1.000 ml aufgefüllt. Zur Erstellung der Eichgeraden wurde Rinderserumalbumin als Standard verwendet. Die entsprechenden Verdünnungen wurden mit Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) hergestellt. Nach dem Mischen von 100 µl Probe bzw. Standard mit Bradford-Reagenz (1 ml) und einer Inkubationszeit (5 min) erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 595 nm.

### 2.4.3 SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe erfolgte mit Hilfe von SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) mit einer Acrylamidkonzentration von 15 %. Zur Herstellung der Gele wurde konzentrierte Acrylamidlösung Rotiphorese® Gel 40 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die Zusammensetzung der Gele basierte auf Protokollen von SCHÄGGER & JAGOW (1987).

Pipettierschema für ein Midi-Gel (17,5 cm x 16 cm x 1 mm):

	Trenngel (13 %)	Sammelgel (4 %)
Acrylamid (29 : 1)	10 ml	1 ml
Gelpuffer	10 ml	3,3 ml
Aqua dest.	10 ml	6 ml
APS (10 % (w/v))	150 µl	100 µl
TEMED	15 µl	10 µl
Gesamtvolumen	30,165 ml	10,41 ml

### 2.4.4 Proteinfärbung

Zur Visualisierung der Proteine wurden die SDS-Gele in einer Coomassiefärbelösung unter leichtem Schütteln bis zur Sättigung inkubiert. Nach Abgießen der Coomassielösung erfolgte das Entfärben der Gele bis die Proteinbanden deutlich erkennbar waren (Entfärbe-Lösung: 9 % (v/v) Essigsäure, 45 % (v/v) Methanol).

### 2.4.5 Western-Analyse

Nach der Auftrennung wurden die Proteine mit Hilfe einer Transferapparatur (SemiDry Trans-Blot, Bio-Rad, München, Deutschland) auf eine Nitrocellulosemembran (BA-S 85; 0,45 µm Optitran, Whatman® Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland) übertragen. Der Transfer erfolgte zwei Stunden bei 15 Volt. Zur Überprüfung der Transfereffizienz wurde die Membran in einer Ponceaurot-Lösung (0,1 % (w/v) Ponceau S, 5 % (v/v) Essigsäure) gefärbt und anschließend in 1 x TBST gespült (0,05 % (w/v) Tween 20, 20 mM Tris (pH 7,5), 500 mM NaCl). Zur Reduktion unspezifischer Bindungen des Antikörpers wurde die Membran für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Blockinglösung (3 % BSA [Roth, Kassel, Deutschland] in 1 x TBST) unter leichtem Schütteln inkubiert. Einem Waschschrift (3 x 10 min) in 1 x TBST folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C. Folgende primäre Antikörper wurden in dieser Arbeit verwendet: Huhn-

anti-psbA C-terminal (Agriserä, Schweden) 1:10.000; Kaninchen-anti-msrA (diese Arbeit) 1:1.000; Maus-anti-polyHistidine (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) 1:3.000. Verdünnt wurden die Antikörper in 1 % BSA in 1 x TBST. Anschließend wurde die Membran in 1 x TBST gewaschen (3 x 10 Minuten) und eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Folgende sekundäre Antikörper kamen zur Anwendung: anti-Kaninchen IgG (Shp x Rb, Chemicon, Temecula, CA, USA) 1:2.500; anti-Huhn IgY (IgG) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) 1:10.000, anti-Maus IgG (Gt x Ms, Chemicon, Temecula, CA, USA) 1:3.000. Alle sekundären Antikörper waren mit einer Alkalischen Phosphatase gekoppelt. Nach dem Waschen der Membran (3 x 10 Minuten) in 1 x TBST wurden die Substrate NBT und BCPIP (Roche, Mannheim, Deutschland) gemäß Herstellerprotokoll direkt auf die Membran gegeben. So konnten die entsprechenden Antigene durch die Reaktion der Alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden.

Die D1-Proteinmenge wurde anschließend densitometrisch mit Hilfe der AIDA v4.03 Software ausgewertet und graphisch dargestellt. Bestimmt wurde dabei das Integral der Peakfläche der einzelnen Banden.

### **2.5 Heterologe Expression und Aufreinigung der HIS-Fusionsproteine**

Für die heterologe Expression von MSRA2, 3 und 4 erfolgte die Klonierung der Gene in den pQE-30 Vektor (Qiagen, Hilden, Deutschland). Durch diese Integration entstanden Fusionsproteine, die einen N-terminalen 6 x HIS-Tag enthielten und dadurch mittels Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt werden konnten.

Ein Volumen von 100 ml LB-Medium wurde mit 5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* angeimpft und bei 37°C und ständigem Schütteln inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,7 erreicht war. Anschließend wurde die Expression der HIS-MSRA-Fusionsproteine durch die Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, Endkonzentration 1 mM) induziert. Die Induktion erfolgte über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator. Zur Zellernte wurde die Bakterienkultur in Zentrifugationsröhrchen überführt, auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (4°C, 20 min, 5.000 rpm, Hettich, Rotor 1424A). Das Pellet wurde in 4 ml Lysispuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) resuspendiert und mit Lysozym (Endkonzentration 1 mg/ml) 30 Minuten auf Eis inkubiert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis ausgeführt. Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe der Yeda-Press. Durch wiederholtes Anlegen eines definierten Druckes (70 bar, 5 min) mit anschließender Entspannung wurden die Bakterienzellen aufgebrochen. Ein Zentrifugationsschritt (4°C, 45

min, 10.000 rpm, Sigma, Rotor 19777-H) trennte anschließend die löslichen Proteine ab. Das entstandene Pellet enthielt nicht-aufgebrochene Zellen sowie unlösliche Proteine.

Für die Nickel-Affinitätschromatographie wurde Ni-NTA-Agarose der Firma Qiagen (QIAexpressionist™, Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Säule wurde entsprechend des Herstellerprotokolls vorbereitet. Der lösliche Proteinanteil wurde auf die Ni-NTA-Agarosesäule geladen. Nach dem Waschen der Matrix mit dem 3- bis 4-fachen Säulenvolumen Waschpuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0) wurden durch Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 250mM die HIS-Fusionsproteine eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden auf Eis aufgefangen und nach der Proteinbestimmung nach Bradford (vgl. 2.4.2) im Enzymaktivitätstest eingesetzt.

## 2.6 Messung der Enzymaktivität von MSRA2 und MSRA4

Zum Nachweis der Enzymaktivität wurde ein Enzymtest angewendet, der das entzündungshemmende Medikament Sulindac als Substrat für eine MSRA einsetzt (ETIENNE ET AL. 2003). Als Elektronendonator diente Thioredoxin zusammen mit einem Thioredoxin-regenerierenden System. Die HIS-MSRA2- und HIS-MSRA4-Eluate wurden auf eine Proteinkonzentration von 100 ng/µl eingestellt. Ein Standard-Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 30 µl enthielt:

Tris/HCl pH 7,4	100 mM
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase	50 ng
Glucose-6-Phosphat 0,2 M	0,6 µmol
NADPH	30 nmol
Thioredoxin	2,5 µg
Thioredoxin-Reduktase	1 µg
Sulindac	50 nmol
gereinigtes Protein	0,5 bzw. 1 µg

Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert, sanft gemischt und bei 37°C eine Stunde inkubiert. Nach Zugabe von 370 µl Tris/HCl (pH 8,0), 100 µl Acetonitril und 1 ml Benzol wurde der Ansatz eine Minute bei Raumtemperatur invertiert und anschließend zentrifugiert (RT, 1 min, 13.000 rpm, Biofuge, Heraeus). Nach erfolgter Phasentrennung wurde die optische Dichte der Benzolphase bei einer Wellenlänge von 350 nm in Quarzküvetten gemessen.

## 2.7 Antikörperproduktion

In Zusammenarbeit mit der Firma Agrisera, Vännäs, Schweden, wurde ein Antikörper generiert, der MSRA-Proteine sowohl in *C. reinhardtii* als auch in *A. thaliana* erkennt. Zur Immunisierung von zwei Kaninchen wurde das Peptid (NH<sub>2</sub>-) CHDPTTLNRQG (-CONH<sub>2</sub>) verwendet, das zuvor über das terminale Cystein und einen Maleimid Crosslinker an KLH (*key limpet hemocyanin*) gekoppelt wurde. Vor der Injektion wurde Präimmenserum entnommen. Die Ausblutung der Tiere und die Gewinnung des Serums erfolgten 98 Tage nach der Immunisierung.

## 2.8 Methoden zum Proteinimport

Alle Methoden zum Protein-Import wurden anhand von Versuchsprotokollen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klösgen des Institutsbereiches Pflanzenphysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt, die auf Arbeiten von Rudhe et al. (RUDHE ET AL. 2002) basieren.

### 2.8.1 *In vitro* Transkription

Um eine effizientere Transkription zu erreichen, wurde die Plasmid-DNA (pBATmsrA2 und pBATmsrA3) am 3'-Ende der cDNA mit Hilfe von Endonukleasen linearisiert (BamHI bzw. SacI, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Ein Transkriptionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl enthielt:

5 x T3 Puffer	5 µl
5 x NTPs (reduziertes GTP)	5 µl
100 mM DTT	7,5 µl
CAP-Struktur analogon (10 mM m <sup>7</sup> G(5')ppp(5')G)	1,2 µl
RNase-Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)	25 U
T3 RNA Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA)	25 U
linearisierte Plasmid-DNA (1 µg/µl)	2 µl

Der Ansatz wurde für 60 Minuten bei 37°C in einem Thermoblock inkubiert und nach Zugabe von 1 µl GTP (11,25 mM) für weitere 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit DEPC-behandeltem Wasser auf 100 µl aufgefüllt, von denen 4 µl auf ein MOPS-Agarosegel (1% Agarose in 1 x MOPS Laufpuffer [10 x MOPS pH 7,0: 200 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 20 mM EDTA]) aufgetragen wurde. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 10 µl Natrium-Acetat (3 M, pH 5,2) und 250 µl 100% Ethanol bei -20°C.

### 2.8.2 *In vitro* Translation

Für einen *in vitro* Translationsansatz wurde die gefällte RNA zentrifugiert (4°C, 30 min, 13.000 rpm, Biofuge, Heraeus) und das Pellet getrocknet. Das Pellet wurde mit 35 µl Translationsansatz versetzt, kurz gemischt und 90 Minuten bei 30°C in einem Wasserbad inkubiert. Ein Translationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 37,5 µl enthielt:

DEPC-behandeltes Wasser	13,05 µl
Retikulocytenlysate (Promega, Mannheim, Deutschland)	18,75 µl
100 mM Amminosäuremix ohne Cystein	0,75 µl
1 M KCl	2,7 µl
100 mM DTT	0,75 µl
<sup>35</sup> S-Cystein	1,5 µl

Nach der Inkubation wurden 2 µl des Ansatzes mit 2 x SDS-Ladepuffer versetzt, 5 Minuten bei 95°C unter Schütteln inkubiert (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und zur Kontrolle auf ein SDS-Gel aufgetragen. Der verbliebene Translationsansatz wurde bei -80°C gelagert.

### 2.8.3 Präparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus *Pisum sativum*

Es erfolgte eine Parallelpräparation der Organellen aus 8 bis 12 Tage alten Erbsenkeimlingen. Alle Arbeitsschritte wurden im Kühlraum bzw. auf Eis durchgeführt. Alle verwendeten Puffer und Geräte waren auf 4°C vorgekühlt. Um Scherkräften entgegenzuwirken, wurde mit abgeschnittenen Pipettenspitzen gearbeitet.

#### Lösungen:

---

##### EB-Puffer (Extraktionspuffer - Mitochondrien):

Saccharose	450 mM
MOPS	15 mM
EGTA	1,5 mM
pH 7,4 mit KOH einstellen, autoklavieren, bei 4°C lagern; frisch zuzugeben sind:	
PVP	0,6 %
BSA	0,2 %
DTT	10 mM
PMSF	0,2 mM

---

##### WB-Puffer (Waschpuffer – Mitochondrien):

Saccharose	300 mM
MOPS	10 mM



---

EGTA	1 mM
pH 7,2 mit KOH einstellen, autoklavieren, bei 4°C lagern	
PMSF (frisch zugeben)	0,2 mM

---

**RB-Puffer (Resuspensionspuffer – Mitochondrien):**

Mannitol	400 mM
Tricine	10 mM
EGTA	1 mM
pH 7,2 mit KOH einstellen, autoklavieren, bei 4°C lagern	
PMSF (frisch zugeben)	0,2 mM

---

**5 x GP-Puffer (Gradientenpuffer – Mitochondrien):**

Saccharose	1,5 mM
MOPS	50 mM
pH 7,2 mit KOH einstellen, autoklavieren, bei 4°C lagern	

---

**5 x SRM-Puffer (Sorbitolresuspensionspuffer – Chloroplasten):**

Sorbitol	1,65 M
HEPES/KOH 8,0	250 mM
bei 4°C oder -20°C lagern	

---

**Percollstufen:****Mitochondrienpräparation**


---

Stufe (je 50 ml)	18 %	23 %	40 %
Percoll	9 ml	11,5 ml	20 ml
5 x GP-Puffer	10 ml	10 ml	10 ml
Aqua dest.	31 ml	28,5 ml	20 ml

---

**Chloroplastenpräparation**

Stufe (je 50 ml)	35 %	80 %
Percoll	17,5 ml	40 ml
5 x SRM-Puffer	10 ml	10 ml
Aqua dest.	22,5 ml	-

---

**2.8.3.1 Zellaufschluss und differentielle Zentrifugation**

Es wurden ca. 80 g Erbsen geerntet und in 500 ml eiskalten EB-Puffer im Waring Blender 8011E (Waring Products, New Hartford, USA) homogenisiert (5 x 2 s) und anschließend über zwei Lagen *Mira cloth*<sup>®</sup> (Porengröße 100 µm; Calbiochem, La Jolla, USA) und eine Schicht Nylongewebe (Porengröße 31 µm) filtriert. Das Filtrat wurde zentrifugiert (4°C, 5 min, 2.000 x g, Sorvall Super T21, Rotor: Sorvall SLC-250T). Das Pellet wurde vorsichtig mit einem

Pinsel in 10 ml 1 x SRM-Puffer resuspendiert und für die Chloroplastenpräparation auf Eis dunkel gestellt. Der Überstand wurde 5 Minuten bei 6.000 x g und anschließend 10 Minuten bei 16.000 x g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde für die Mitochondrienpräparation vorsichtig mit einem weichen Pinsel in 10 ml WB-Puffer resuspendiert.

### ***2.8.3.2 Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation***

#### **Mitochondrienpräparation:**

Die Mitochondriensuspension wurde direkt auf den vorgelegten Percollgradienten geladen und zentrifugiert (4°C, 45 min, 12.000 x g, Sorvall Super T21; Rotor: Sorvall SL-50T; Bremse ab 5.000 x g abgestellt). Die intakten Mitochondrien aus der Interphase zwischen der 23 %- und 40 %-Percollschicht wurden abgenommen, in 100 ml RB-Puffer aufgenommen und zentrifugiert (4°C, 15 min, 12.000 x g, Sorvall Super T21; Rotor: Sorvall SL-50T). Nach vorsichtiger Entfernung des Überstandes wurde das Sediment in RB-Puffer gelöst, in 30 ml-Corex-Zentrifugationsröhrchen überführt und zentrifugiert (4°C, 15 min, 12.000 x g, Sorvall Super T21; Rotor: Sorvall SL-50T). Dieser Waschschrift erfolgte mindestens zweimal. Abschließend wurde das Pellet in einem maximalen Volumen von 1 ml RB-Puffer aufgenommen, zentrifugiert (4°C, 10 min, 13.000 rpm, Biofuge, Heraeus), das Sediment anschließend in 150 µl RB-Puffer resuspendiert und dunkel auf Eis aufbewahrt. Für die Proteinbestimmung nach Bradford wurde von dieser Mitochondriensuspension 1 µl abgenommen und mit 99 µl Harnstoff (1 M) und 700 µl Aqua dest. versetzt. Nach Zentrifugation dieses Ansatzes (1 min, 13.000 rpm, Biofuge, Heraeus) wurde der Überstand mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt und fünf Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm (Shimadzu UV-1602). Mit Hilfe einer BSA-Eichgeraden konnte die Proteinkonzentration der Mitochondrienpräparation bestimmt werden.

#### **Chloroplastenpräparation:**

Die Chloroplastensuspension wurde auf zwei vorgelegte Percollgradienten geladen und zentrifugiert (4°C, 7 min, 2.000 x g, Sorvall Super T21; Rotor: Sorvall SL-50T). Die untere Bande, die die freigelegten intakten Chloroplasten enthielt, wurde abgenommen und zweimal mit 1 x SRM-Puffer gewaschen. Abschließend erfolgte die Resuspension der Chloroplasten in ca. 2 ml 1 x SRM-Puffer. Die Chloroplasten wurden dunkel auf Eis aufbewahrt. Für eine Chlorophyllbestimmung wurden 10 µl Chloroplastensuspension mit 990 µl 80 % Aceton versetzt, gemischt und zentrifugiert (RT, 2 min, 13.000 rpm, Biofuge, Heraeus). Die

Extinktion des Überstandes wurde bei 645 nm und 663 nm gemessen (Shimadzu UV-1602). Die Bestimmung der Chlorophyllkonzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$c[\mu\text{g Chlorophyll/ml}] = (20,2 \times A_{645} + 8,02 \times A_{663}) \times 100$$

### 2.8.4 Einzelorganell-Import

#### Lösungen:

RB-Puffer (Resuspensionspuffer – Mitochondrien) vgl. 2.8.3

1 x SRM-Puffer (Sorbitolresuspensionspuffer – Chloroplasten) vgl. 2.8.3

#### 2 x Dual-Importpuffer:

Saccharose	600 mM
HEPES/KOH	30 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
BSA	0,1 %

pH 7,4 mit KOH einstellen, bei -20°C lagern

#### Dual-Mastermix:

2 x Dual-Importpuffer	1 x
MgCl <sub>2</sub>	4 mM
Methionin	4 mM
ATP	4 mM
GTP	4 mM
ADP	0,2 mM
Malat	5 mM
DTT	4,5 mM
Kaliumacetat	10 mM
NaHCO <sub>3</sub>	10 mM

Für den Import in die einzelnen Organelle wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation und Aufnahme in RB-Puffer auf eine Konzentration von 10 µg Protein/µl eingestellt. Die Chloroplasten wurden nach der Zentrifugation in 1 x SRM-Puffer aufgenommen, so dass die Konzentration 1 µg Chlorophyll/µl betrug. Folgender Importansatz wurde auf Eis und erneut mit abgeschnittenen Pipettenspitzen pipettiert:

	Mitochondrien-Import (M)	Chloroplasten-Import (C)
Mitochondrien (10 µg Protein/µl)	10 µl	-
Chloroplasten (1 µg Chlorophyll/µl)	-	25 µl
<i>in vitro</i> Translation	10 µl	10 µl
Dual-Mastermix	90 µl	75 µl
Gesamtvolumen	110 µl	110 µl

Dieser Ansatz wurde in einem beleuchteten Wasserbad inkubiert (25°C, 20 min) und im Anschluss dunkel auf Eis gestellt um die Reaktion abzustoppen. Im folgenden Zentrifugationsschritt wurden die Mitochondrien (4°C, 5 min, 13.000 rpm Biofuge, Heraeus) bzw. die Chloroplasten (4°C, 3 min, 6.000 rpm, Biofuge, Heraeus) sedimentiert. Das erhaltene Pellet wurde in 200 µl 1 x Dual-Importpuffer resuspendiert und der Ansatz halbiert (2 x 100 µl).

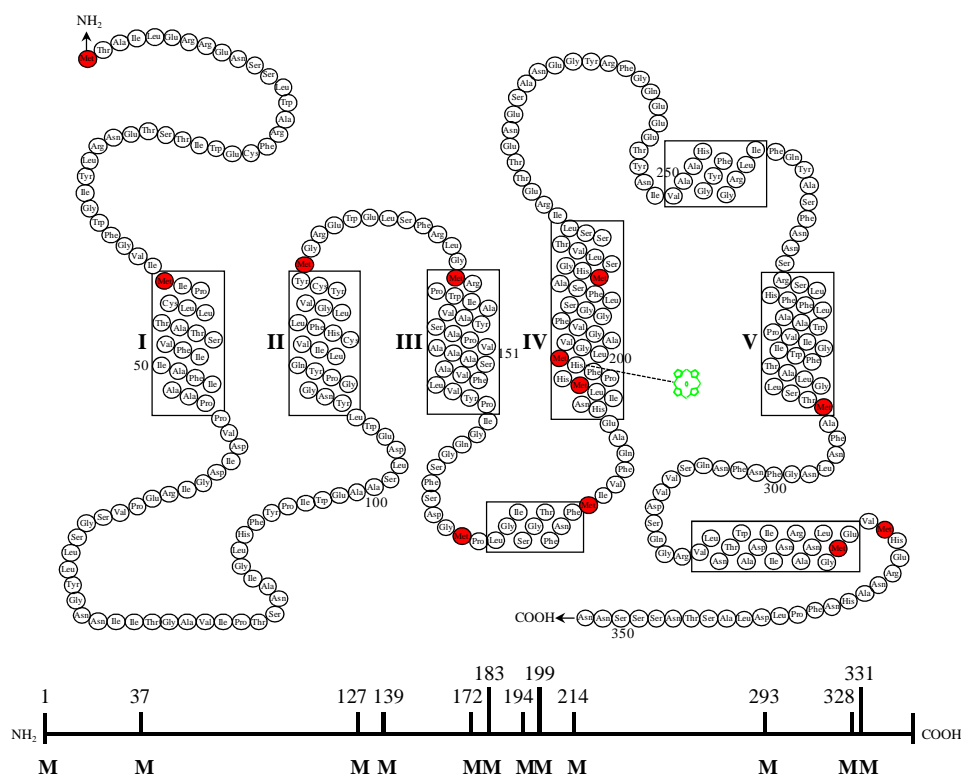
Einer der beiden Ansätze wurde mit 10 µl Thermolysin (2 mg/ml) und 1,25 µl CaCl<sub>2</sub> (25 mM) versetzt und auf Eis 30 Minuten inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 4 µl EDTA (0,5 M) abgestoppt. Die Thermolysin-behandelten Fraktionen (M+, C+) sowie die unbehandelten Fraktionen (M-, C-) wurden durch Zentrifugation und Resuspension in 400 µl RB-Puffer bzw. 1 x SRM-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Aufnahme des Pellets in 20 µl 2 x SDS-Ladepuffer. Die Proben wurden denaturiert (5 min, 95°C) und zusammen mit 5 µl des Translationsansatzes auf ein SDS-Gel aufgetragen. Dabei entsprach das aufgetragene Volumen 50 µg Protein für die Mitochondrienfraktion und 12,5 µg Chlorophyll für die Chloroplastenfraktion.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Methionin-Reste im D1-Protein von *C. reinhardtii*

Um zu überprüfen, ob Methionine des D1-Proteins eine antioxidative Schutzfunktion ausüben, wurden Mutanten von *C. reinhardtii* erzeugt, die Substitutionen spezifischer Methionine enthielten. Die Untersuchung der Mutanten sollte Hinweise zum Einfluss dieser Reste auf eine mögliche antioxidative Funktion und damit auf die Stabilität des D1-Proteins liefern.

Das D1-Protein besteht aus fünf transmembranen  $\alpha$ -Helices und drei weiteren, parallel zur Membran gelegenen Helices. Die transmembranen  $\alpha$ -Helices werden durch sogenannte *loop*-Regionen verbunden. Das D1-Protein aus *C. reinhardtii* enthält eine Vielzahl von Methioninen, die zum Teil gehäuft als Cluster vorliegen (Abbildung 3.1).



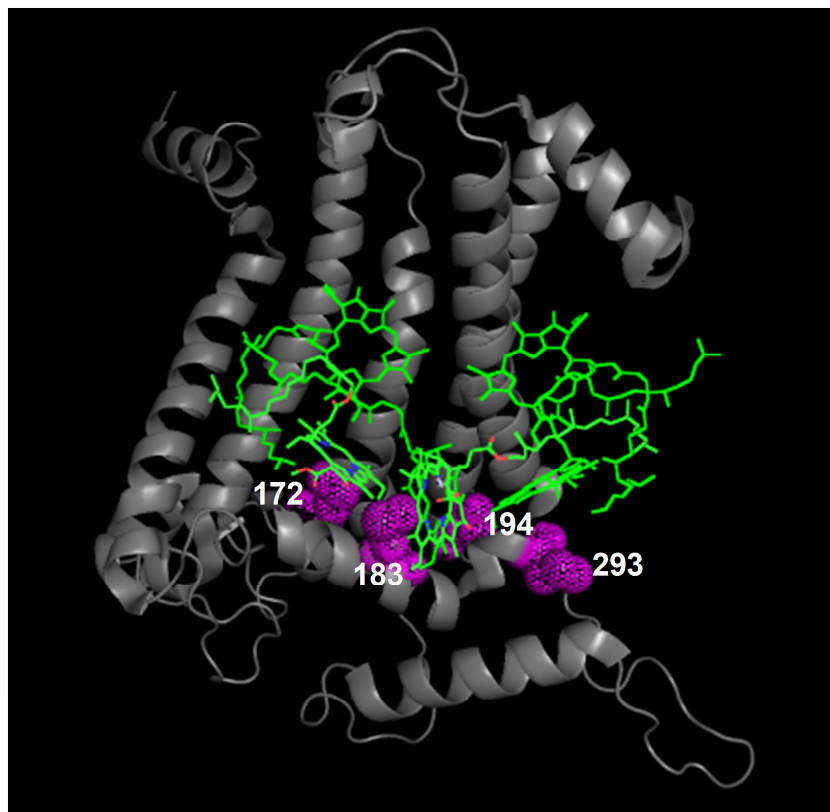
**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz des D1-Proteins aus *C. reinhardtii*. Die transmembranen  $\alpha$ -Helices (I-V) sowie die parallelen  $\alpha$ -Helices sind umrahmt. Dargestellt ist das Chlorophyllmolekül des P680, das am Histidin 198 gebunden ist. Die Methionine sind rot hervorgehoben und unter Angabe ihrer Position zusätzlich linear dargestellt.

Der Vergleich verschiedener D1-Proteine von höheren Pflanzen bis zu Cyanobakterien zeigte neben dem Start-Methionin elf weitere, meist hoch konservierte Methionine vor allem im mittleren sowie im C-terminalen Bereich des Proteins (Abbildung 3.2).

	<b>M1</b>	<b>M38</b>	
<i>C. reinhardtii</i>	MTAILERRENSSLWARFCEWITSTENRLYIGWFGVMIIPCLLTATSVFIIAFIAAPPVDI		60
<i>Volvox</i>	MTAILERRENSSLWARFCEWITSTENRLYIGWFGVMIIPCLLTATSVFIIAFIAAPPVDI		60
<i>A. thaliana</i>	MTAILERRESESLWGRFCNWIWITSTENRLYIGWFGVLMIPITLLTATSVFIIAFIAAPPVDI		60
<i>Zea</i>	MTAILERRESTSLWGRFCNWIWITSTENRLYIGWFGVLMIPITLLTATSVFIIAFIAAPPVDI		60
<i>Porphyra</i>	MTATLQRRESASLWERFCSWITSTENRLYIGWFGVLMIPITLLTATSVFIIAFIAAPPVDI		60
<i>Synechococcus</i>	MTSILREQRRDNVDRFCEWVWTDNRIYVWFGVLMIPITLLTATCFIVAFIAAPPVDI		60
<i>Synechocystis</i>	MTTTLQQRRESASLWEQFCQVWTSTNNRIYVWFGVLMIPITLLTATCFI IAFIAAPPVDI		60
<i>T. elongatus</i>	MTTVLQRRQTANLWERFCWITSTENRLYIGWFGVMIIPITLLAATCFVIAFIAAPPVDI		60
	** * *	* *	
<i>C. reinhardtii</i>	DGIREPVSGSLLYGNNIIITGAVIPTSAI GLHFYPIWEAASLDEWLYNGGPYQLIVCHFL		120
<i>Volvox</i>	DGIREPVSGSLLYGNNIIITGAVVPTSNAI GLHFYPIWEAASLDEWLYNGGPYQLIVCHFL		120
<i>A. thaliana</i>	DGIREPVSGSLLYGNNIISGAI IPTSAAI GLHFYPIWEAASVDEWLYNGGPYELIVLHFL		120
<i>Zea</i>	DGIREPVSGSLLYGNNIISGAI IPTSAAI GLHFYPIWEAASVDEWLYNGGPYELIVLHFL		120
<i>Porphyra</i>	DGIREPVAGSLLYGNNIISGAVIPSSAAI GIHFYPIWEAASLDEWLYNGGPYQLVVLHFL		120
<i>Synechococcus</i>	DGIREPVAGSLLYGNNIISGAVVPSNAI GLHFYPIWEAASLDEWLYNGGPYQLVVFHFL		120
<i>Synechocystis</i>	DGIREPVAGSLLYGNNIISGAVVPSNAI GLHFYPIWEAASLDEWLYNGGPYQLVVFHFL		120
<i>T. elongatus</i>	DGIREPVSGSLLYGNNIITAAVVPSSNAI GLHLYPIWDAASLDEWLYNGGPYQLIFHFL		120
	***** *		
	<b>M127</b>	<b>M139</b>	<b>M172</b>
<i>C. reinhardtii</i>	LGVCYMGREWELSFRLGMRPWIAVAYSAPVAAA SAVFLVYPIGQGSFSDGMPLGISGTF		180
<i>Volvox</i>	LGVCYMGREWELSFRLGMRPWIAVAYSAPVAAA SAVFLVYPIGQGSFSDGMPLGISGTF		180
<i>A. thaliana</i>	LGVCYMGREWELSFRLGMRPWIAVAYSAPVAAA SAVFLVYPIGQGSFSDGMPLGISGTF		180
<i>Zea</i>	LGVCYMGREWELSFRLGMRPWIAVAYSAPVAAA SAVFLVYPIGQGSFSDGMPLGISGTF		180
<i>Porphyra</i>	TGVACYIGREWELSYRLGMRPWISVAF TAPVAAA SAVFLVYPIGQGSFSDGMPLGISGTF		180
<i>Synechococcus</i>	LGISCYMGRQWELSYRLGMRPWICVAYSAPLSAAFAVFLYPIGQGSFSDGMPLGISGTF		180
<i>Synechocystis</i>	IGIFCYMGRQWELSYRLGMRPWICVAYSAPLSAAFAVFLYPIGQGSFSDGMPLGISGTF		180
<i>T. elongatus</i>	IGIFCYMGRQWELSYRLGMRPWIPVAFSAPVAAA SAVLFLYPIGQGSFSDGMLLGISGTF		180
	* *		
	<b>M183</b>	<b>M199</b>	<b>M214</b>
<i>C. reinhardtii</i>	NFMI VFQAEHNILMHPFHMLGVAGVFGGSLFSAMHGSLVTSSLIRETTENESANEGYRF		240
<i>Volvox</i>	NFMI VFQAEHNILMHPFHMLGVAGVFGGSLFSAMHGSLVTSSLIRETTENESANEGYRF		240
<i>A. thaliana</i>	NFMI VFQAEHNILMHPFHMLGVAGVFGGSLFSAMHGSLVTSSLIRETTENESANEGYRF		240
<i>Zea</i>	NFMI VFQAEHNILMHPFHMLGVAGVFGGSLFSAMHGSLVTSSLIRETTENESANEGYRF		240
<i>Porphyra</i>	NFMI VFQAEHNILMHPFHMLGVAGVFGGSLFSAMHGSLVTSSLIRETSENESANYAYKFG		240
<i>Synechococcus</i>	NFMI VFQAEHNILMHPFHMLGVAGVFGGSLFSAMHGSLVTSSLVRETTETESQNYGKFG		240
<i>Synechocystis</i>	NFMI VFQAEHNILMHPFHMLGVAGVFGGSLFSAMHGSLVTSSLVRETTETESQNYGKFG		240
<i>T. elongatus</i>	NFMI VFQAEHNILMHPFHMLGVAGVFGGSLFSAMHGSLVTSSLIRETTETESTNYGKFG		240
	** *		
	<b>M293</b>		
<i>C. reinhardtii</i>	QEEETYNI VAAHG YFGRLIFQYASFNNRSLHFFLA AWPVIGIWF TALGLSTMAFN LNGF		300
<i>Volvox</i>	QEEETYNI VAAHG YFGRLIFQYASFNNRSLHFFLA AWPVIGIWF TALGLSTMAFN LNGF		300
<i>A. thaliana</i>	QEEETYNI VAAHG YFGRLIFQYASFNNRSLHFFLA AWPVVG IWF TALGLSTMAFN LNGF		300
<i>Zea</i>	QEEETYNI VAAHG YFGRLIFQYASFNNRSLHFFLA AWPVVG IWF TALGLSTMAFN LNGF		300
<i>Porphyra</i>	QEEETYNI VAAHG YFGRLIFQYASFNNRSLHFFLGLWPVVG IWF TALGTSVSTMAFN LNGF		300
<i>Synechococcus</i>	QEEETYNI VAAHG YFGRLIFQYASFNNRSLHFFLGA WPVVG IWF TMSGISTMAFN LNGF		300
<i>Synechocystis</i>	QEEETYNI VAAHG YFGRLIFQYASFNNRSLHFFLGA WPVVG IWF TAMGISTMAFN LNGF		300
<i>T. elongatus</i>	QEEETYNI VAAHG YFGRLIFQYASFNNRSLHFFLA AWPVVG IWF AALGISTMAFN LNGF		300
	***** *		
	<b>M328</b>	<b>M331</b>	
<i>C. reinhardtii</i>	NFNQSVVDSQGRV LNTWADI INRANLGMEVMH ERNAHNF PLDLAS -----TNSSSNN-		352
<i>Volvox</i>	NFNQSVVDSQGRV LNTWADI INRANLGMEVMH ERNAHNF PLDLAS -----NNNSSMN-		352
<i>A. thaliana</i>	NFNQSVVDSQGRV INTWADI INRANLGMEVMH ERNAHNF PLDLAA -----VEAPSTNG		353
<i>Zea</i>	NFNQSVVDSQGRV INTWADI INRANLGMEVMH ERNAHNF PLDLAA -----LEVPY LNG		353
<i>Porphyra</i>	NFNQSVVDSQGRV INTWADI INRANLGMEVMH ERNAHNF PLDLASGESLPVALTAPAVNG		360
<i>Synechococcus</i>	NFNQSVVDSQGRV INTWADVLN RANLGMEVMH ERNAHNF PLDLAAGEATPVALTAPAVNG		360
<i>Synechocystis</i>	NFNQSILDSQGRV IGTWADVLN RANIGFVEMH ERNAHNF PLDLASGEQAPVALTAPAVNG		360
<i>T. elongatus</i>	NFNHSSVDAQGNV INTWADI INRANIGIEVMH ERNAHNF PLDLASGELAPVAMIAPSIEA		360
	*** *		

**Abbildung 3.2: Konservierte Methionine im D1-Protein.** Dargestellt sind die Sequenzen der D1-Proteine aus *C. reinhardtii*, *Volvox carteri f. nagariensis*, *Synechococcus elongatus (psbA1)*, *Synechocystis sp. PCC 6803 (psbA2)*, *Thermosynechococcus elongatus*, *Porphyra purpurea*, *Zea mays* und *Arabidopsis thaliana*. Die Sequenzen wurden der NCBI-Protein-Datenbank entnommen ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein)) und mit Hilfe der ClustalW Software verglichen. Streng konservierte Methionine wurden schwarz, weniger stark konservierte wurden grau hervorgehoben. Sterne (\*) symbolisieren vollständig übereinstimmende Aminosäuren. Der schwarze Pfeil kennzeichnet den Histidin-Rest des D1-Proteins, der an der Bindung des Chlorophylldimers P680 beteiligt ist.

Kristallographische Untersuchungen des PSII aus Cyanobakterien liefern wichtige Hinweise zur Struktur des Proteinkomplexes in Eukaryoten wie *C. reinhardtii* (FERREIRA ET AL. 2004; LOLL ET AL. 2005). Die Kristallstruktur aus *Thermosynechococcus vulcanus* liegt in einer Auflösung von 1,9 Angström vor (UMENA ET AL. 2011). Deshalb wurde die dreidimensionale Struktur des D1-Proteins von *C. reinhardtii* analog zur Proteinstruktur der Cyanobakterien modelliert. Im Zusammenhang mit einer möglichen Schutz- bzw. Regulationsfunktion wurden so Methionine im D1-Protein lokalisiert, die sich in unmittelbarer Nähe zu den Chlorophyllmolekülen, einer Hauptquelle der Singulett Sauerstoffbildung, befinden (Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3: Drei-dimensionale Struktur des Photosystems II.** Dargestellt sind die  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter des D1-Proteins (grau). Die Methionine sind als violette Kugelmodelle zu sehen. Die Nummerierung entspricht dabei dem D1-Protein von *C. reinhardtii*. Das Chlorophyllidimer P680 und die akzessorischen Chlorophylle sind als grüne Strukturen erkennbar (erstellt mit der freien Grafiksoftware PyMOL).

Die Untersuchung der Methioninverteilung in der D1-Untereinheit zeigte, dass sich die Methionine 172, 183 und 194 in unmittelbarer räumlicher Nähe zu den beiden Chlorophyllen des Reaktionszentrums P680 befinden. Methionin 293 ist ebenfalls nah an den Chlorophyllen lokalisiert, aber mit größerem Abstand als Methionin 172, 183 und 194. Singulett Sauerstoff besitzt eine kurze Lebensdauer und kann in der Thylakoidmembran ca. 5,5 nm vom Entstehungsort aus diffundieren (Asada 2006). Die Methionine 172, 183, 194 und 293 liegen

innerhalb dieser Diffusionsdistanz. Alle anderen Methionine des D1-Proteins wurden aufgrund der großen Distanz zu benachbarten Chlorophyllen nicht in die Untersuchung einbezogen. Um die potentiell antioxidative Funktion der Methionine 172, 183, 194 und 293 zu testen, wurden Mutanten in *C. reinhardtii* erzeugt, die an diesen Positionen entweder einen Austausch zu Alanin oder zu Leucin enthielten.

### 3.1.1 Erzeugung und molekularbiologische Charakterisierung der Alanin-und Leucin-Mutanten

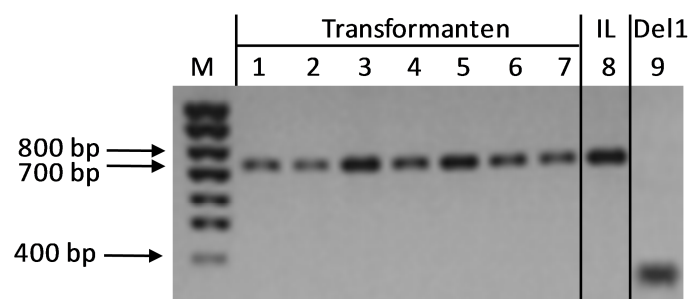
In einem ersten Schritt wurden die Methionine an den Positionen 172, 183, 194 und 293 des D1-Proteins gegen Alanin ausgetauscht (s. 2.3.7). Alanin ist eine kleine neutrale Aminosäure und wird häufig für derartige Substitutionen verwendet. Da sich Methionin und Alanin jedoch deutlich in Größe und Eigenschaften unterscheiden, könnten physiologische Veränderungen durch eine Konformationsänderung, verursacht durch die Aminosäuresubstitution, hervorgerufen werden. Um solche Struktureffekte zu minimieren, wurden in einem zweiten Schritt die Aminosäurereste M172, M183 und M194 gegen Leucin substituiert. Methionin und Leucin sind hydrophobe Aminosäuren mit dem gleichen van der Waals Volumen (DARBY & CREIGHTON 1993). Im Gegensatz zum Methionin enthält Leucin kein Schwefelatom und ist nicht oxidierbar. Auf eine Substitution von Methionin 293 gegen Leucin wurde verzichtet, weil die nachfolgenden Ergebnisse zeigten, dass sich bereits die Mutante mit einem Austausch von Methionin gegen Alanin weder im photoautotrophen Wachstum noch in der D1-Stabilität unter Starklicht vom Referenzstamm unterschied. Für Position 293 existiert daher nur die Alanin-Mutante.

Mit Hilfe mutagener Primer wurde während einer PCR das jeweilige Codon im *psbA*-Gen verändert. Dabei wurden Codons mit ähnlichem Codon-Gebrauch verwendet. Das veränderte *psbA*-Fragment wurde direkt auf Wolframpartikel präzipitiert und mit Hilfe der „Particle Gun“ (KLEIN ET AL. 1992) in die Dell1-Mutante (PREISS ET AL. 2001) geschossen. Aufgrund einer 425 bp großen Deletion im *psbA*-Gen besitzt die Dell1-Mutante nicht die Fähigkeit zum photoautotrophen Wachstum. Durch homologe Rekombination kann das deletierte *psbA*-Gen durch das mutierte Genfragment ersetzt werden. Entsteht durch die Komplementation ein funktionsfähiges D1-Protein, kann die Transformante photoautotroph, d.h. auf Acetat-freiem Minimal-Medium, wachsen und auf diese Weise selektiert werden. Zur Überprüfung der Punktmutationen wurde jeweils das komplette *psbA*-Gen sequenziert (2.3.11). Die Sequenzierung bestätigte die entsprechenden Sequenzveränderungen im Chloroplastengenom



der Mutanten (s. Anhang A). Die Mutanten wurden wie folgt bezeichnet: M172A, M183A, M194A und M293A sowie M172L, M183L und M194L (KREBS, 2005; MAX, 2004).

Vor den physiologischen Untersuchungen musste geklärt werden, ob in den Transformanten ein einheitlicher genetischer Zustand vorlag. Da das Chloroplasten-Genom in mehrfacher Kopie vorliegt, sind die Zellen kurz nach der Integration zunächst heteroplasmisch. In Folge der raschen Zellteilung und der Wahl von hoch selektiven Bedingungen erhalten nach und nach alle Kopien des Genoms die eingebrachte Donor-DNA. Diese Transformanten werden als homoplasmisch bezeichnet (GOLDSCHMIDT-CLERMONT 1998). Um den homoplasmischen Zustand nachzuweisen, wurde eine Kolonie-PCR (2.3.5) des *psbA*-Gens mit zwei, den Bereich der 425 bp-Deletion flankierenden, Primern durchgeführt und elektrophoretisch analysiert (Abbildung 3.4). In den PCR-Reaktionen konnte bei allen Transformanten (Abbildung 3.4; Spur 1-7) eine Bande im Bereich von ca. 800 bp detektiert werden. Diese Bande entspricht dem erwarteten Fragment. Ein Vergleich mit der IL-Mutante belegt, dass dabei ein Fragment des vollständigen *psbA*-Gens (ohne Introns) amplifiziert wurde (Spur 8). Die IL-Mutante enthält ein intronloses *psbA*-Gen und wurde durch Komplementation der Deletionsmutante Fud7 mit der cDNA des *psbA*-Gens erzeugt (JOHANNINGMEIER & HEISS 1993). IL synthetisiert ein funktionsfähiges D1-Protein und ist in der Lage photoautotroph zu wachsen. In Spur 9 wurde ein 350 bp großes PCR-Fragment detektiert, das dem PCR-Fragment der Del1-Mutante mit der 425 bp-Deletion entspricht. Es ist erkennbar, dass in keiner der anderen PCR-Reaktionen dieses Fragment amplifiziert wurde. Damit konnte gezeigt werden, dass alle Kopien des Chloroplasten-Genoms nach der Transformation wieder ein vollständiges *psbA*-Gen enthielten und somit ein homoplasmischer Zustand vorlag.



**Abbildung 3.4: Test auf Homoplasmie der Transformanten.** Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Reaktionen (Spur 1: M172A, Spur 2: M183A, Spur 3: M194A, Spur 4: M293A, Spur 5: M172L, Spur 6: M183L, Spur 7: 194L) sowie der als Kontrollen mitgeführten IL- und Del1-Mutante (Spur: 8 bzw. 9). Spur M: GeneRuler™ 100 bp Leiter (Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland).

### 3.1.2 Physiologische Charakterisierung der Alanin- und Leucin-Mutanten

#### 3.1.2.1 Photoautotrophes Wachstum

Um die Auswirkungen der Mutationen auf die Funktionsfähigkeit des D1-Proteins zu untersuchen, wurde zunächst die photoautotrophe Wachstumsfähigkeit bestimmt. Zur Aufnahme der Wachstumskurve erfolgte die Algenanzucht bei 25°C und Licht von  $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in acetatfreiem Minimalmedium (HS-Medium). Es wurden drei unabhängige Wachstumsversuche durchgeführt. Für die Messung wurden zu definierten Zeitpunkten Doppelproben entnommen und eine Zelldichtebestimmung bei 750 nm durchgeführt (vgl. 2.2.4.1). Als Referenz diente der IL-Stamm. In Anhang B sind exemplarisch Wachstumskurven der Mutanten sowie des IL-Stammes dargestellt. Die Wachstumsraten der Mutanten wurden während der logarithmischen Phase bestimmt und auf den Referenzstamm IL bezogen (Wachstumsrate von IL = 100 %).

Die Mutanten M194A und M293A sind im photoautotrophen Wachstum kaum eingeschränkt. Die Wachstumsrate von Mutante M194A betrug 87 %, von Mutante M293A 91 % (Tabelle 3.1). Die Mutanten M172A und M183A zeigten dagegen signifikante Veränderungen im Wachstum. Mutante M183A wuchs mit einer Wachstumsrate von 61 % deutlich schlechter als die Referenz. Die stärksten Einschränkungen im photoautotrophen Wachstum zeigte M172A. Die logarithmische Phase dieser Mutante begann im Vergleich zur IL ca. 100 h verzögert (s. Anhang B), die Wachstumsrate betrug lediglich 26 % (Tabelle 3.1).

Untersuchungen zum photoautotrophen Wachstum der Leucin-Mutanten zeigten, dass bei M194L und M172L kaum Wachstumseinschränkungen vorlagen. M194L wuchs mit einer Rate von 81 % und M172L mit einer Rate von 84 %. Starke Einschränkungen zeigte dagegen M183L. Die Wachstumsrate betrug lediglich 37 % (Tabelle 3.1). Ebenfalls auffällig war der stark verzögerte Eintritt in die logarithmische Phase (vgl. Anhang B). Wie die Standardabweichung der Wachstumsraten zeigt, unterliegen die ermittelten Werte einer starken Schwankung, v.a. bei den Mutanten mit einer sehr niedrigen Wachstumsrate. Aufgrund der geringen Raten resultieren die zahlenmäßig kleinen Unterschiede in einer sich stärker auswirkenden Standardabweichung.

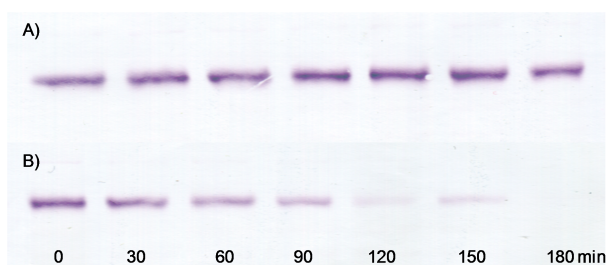
**Tabelle 3.1: Photoautotrophe Wachstumsraten der Alanin- und der Leucin-Mutanten. Angegeben wird jeweils der Mittelwert ( $n=3$ ) in % bezogen auf den Referenzstamm IL sowie die Standardabweichung.**

Mutante	Wachstumsrate in % (bezogen auf IL)
M172A	26 ( $\pm$ 12)
M183A	61 ( $\pm$ 7)
M194A	87 ( $\pm$ 9)
M293A	91 ( $\pm$ 8)
M172L	84 ( $\pm$ 7)
M183L	37 ( $\pm$ 17)
M194L	81 ( $\pm$ 7)

### 3.1.2.2 Abbau des D1-Proteins im Starklicht

Unter Starklichtbedingungen kommt es zur verstärkten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die Schäden am D1-Protein hervorrufen und dessen proteolytischen Abbau einleiten (KYLE ET AL. 1984). Dem Abbau des geschädigten D1-Proteins folgt der Einbau einer neu synthetisierten Untereinheit in den PSII-Komplex. Dieser Reparaturmechanismus gewährleistet einen kontinuierlichen Elektronenfluss über die Thylakoidmembran. Mit Hilfe der Mutanten erfolgte eine erste Untersuchung hinsichtlich des Einflusses der Methionine 172, 183, 194 und 293 auf die Stabilität des D1-Proteins unter Starklichtbedingungen. Dazu wurden die Algen Lichtintensitäten von  $1.800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ausgesetzt und die D1-Proteinmenge über eine Western-Blot Analyse bestimmt.

Das Ergebnis eines solchen Starklichtexperiments ist in Abbildung 3.5 zunächst am Beispiel des Referenzstammes IL gezeigt (180 min, Lichtintensität  $1.800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Alle 30 Minuten wurde Gesamtzell-Protein isoliert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit einem anti-PsbA Antikörper detektiert.



**Abbildung 3.5: D1-Stabilität des Referenzstammes IL unter Starklichtbedingungen ( $1.800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Abhängigkeit der Zeit.** Dargestellt ist eine Western-Blot Analyse mit chicken anti-PsbA (Verdünnung 1:10.000). Gesamtzell-Protein wurde aus starklichtexponierten Algen isoliert, die zur *de novo* Synthese des D1-Proteins befähigt waren (A) bzw. deren plastidäre Proteinbiosynthese mit  $200 \mu\text{g/ml}$  CAP (B) inhibiert wurde.

---

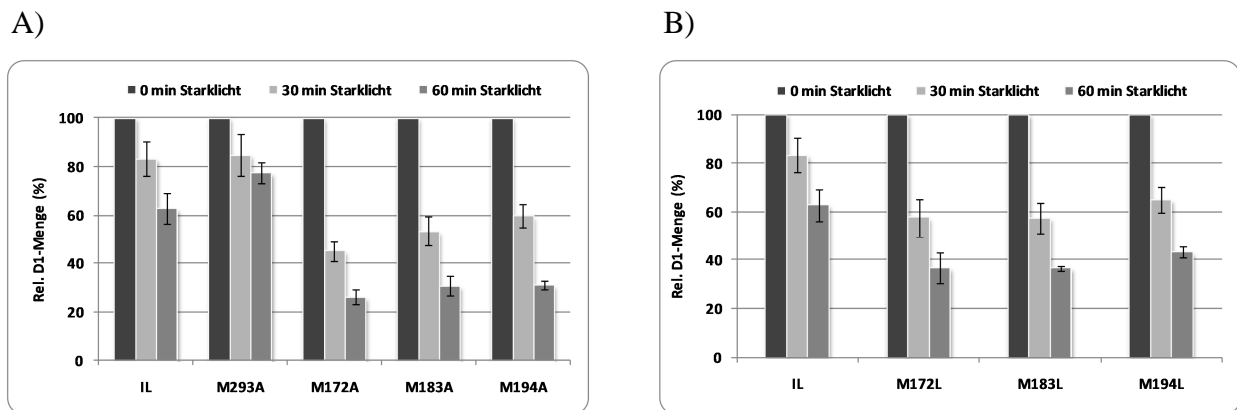
Während der gesamten Starklichtexposition konnten bei IL nahezu konstante Mengen an D1-Protein nachgewiesen werden (Abbildung 3.5, **A**). Die Algenzelle ist in der Lage unter den gewählten Versuchsbedingungen das geschädigte, proteolytisch abgebaute D1-Protein durch eine *de novo*-Synthese in vollem Umfang zu ersetzen. Inkubiert man die Algen 20 Minuten vor Versuchsbeginn dagegen mit Chloramphenicol, einem Inhibitor der plastidären Proteinbiosynthese (CAP, 200 µg/ml), kann man den zeitabhängigen Abbau des D1-Proteins verfolgen (Abbildung 3.5, **B**). Chloramphenicol hemmt die Translation durch Bindung an die 50S-Untereinheit der 70S-Ribosomen der Chloroplasten. Das geschädigte D1-Protein wird abgebaut, kann aber nicht ersetzt werden. Nach 180 Minuten war mit der gewählten Nachweismethode kein D1-Protein mehr detektierbar.

Um den Einfluss der Methionin-Substitutionen auf das D1-Protein unter photooxidativen Stressbedingungen zu untersuchen, wurden die Mutanten ebenfalls Starklicht (Lichtintensität 1.800 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) ausgesetzt. Der Versuchszeitraum wurde auf 60 Minuten begrenzt. Alle Mutanten sowie der Referenzstamm IL befanden sich zu Versuchsbeginn in der spätlogarithmischen Wachstumsphase. Um den Abbau des D1-Proteins sichtbar zu machen, wurde die plastidäre Proteinbiosynthese mit Chloramphenicol (CAP, 200 µg/ml) gehemmt. Gesamtzell-Protein wurde isoliert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Das D1-Protein wurde mit einem anti-PsbA Antikörper (Agrisera, Vännäs, Schweden) detektiert. Die D1-Proteinmenge wurde anschließend densitometrisch mit Hilfe der AIDA v4.03 Software ausgewertet und graphisch dargestellt (vgl. 2.4.1.1).

Für den Referenzstamm IL und die Mutante M293A konnte ein ähnliches Muster des D1-Abbaus gezeigt werden (Abbildung 3.6, **A**). Nach 30 Minuten verfügten beide über nahezu gleiche Proteinmengen (83 % bzw. 85 %). Nach 60 Minuten wurden bei M293A 78 % und bei IL 63 % der Ausgangsmenge an D1-Protein detektiert. Deutliche Unterschiede lieferte dagegen der Vergleich der Ergebnisse von M172A, M183A und M194A mit dem Referenzstamm. Diese Mutanten zeigten im Gegensatz zu IL und zu M293A einen deutlich verstärkten D1-Abbau. Nach 30 Minuten Starklicht waren jeweils noch 45 %, 53 % bzw. 60 % an D1-Protein nachweisbar, nach 60 Minuten Starklicht lediglich etwa 30 % der Ausgangsmenge (Abbildung 3.6, **A**).

Die Auswertung der D1-Blots der Leucin-Mutanten zeigte ein den Alanin-Mutanten ähnliches Abbauverhalten (Abbildung 3.6, **B**). Der D1-Abbau unter Starklichtbedingungen war im Vergleich zum Referenzstamm verstärkt. Bereits nach 30 Minuten Starklicht wurde ein deutlicher D1-Abbau festgestellt. Bei M172L, M183L und M194L wurden ca. 60 % der

ursprünglichen D1-Menge detektiert (Abbildung 3.6, **B**). Im Vergleich dazu verlor der IL-Stamm deutlich weniger an D1-Protein durch Degradationsprozesse. Es konnten noch 80 % vom Ausgangswert nachgewiesen werden. Nach 60 Minuten Starklichtexposition war bei den Mutanten M172L, M183L und M194L bereits mehr als die Hälfte des D1-Proteins abgebaut. Es wurden ca. 40 % der ursprünglichen D1-Menge detektiert. Der IL-Stamm verfügte nach dieser Stressbehandlung dagegen noch über ca. 60 % D1-Protein (Abbildung 3.6, **B**).



**Abbildung 3.6:** Abbau des D1-Proteins der Mutanten M172A, M183A, M194A, M293A (A) und M172L, M183L, M194L (B) im Vergleich zum Referenzstamm IL unter Starklichtbedingungen ( $1.800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Gegenwart von CAP ( $200 \mu\text{g/ml}$ ). Dargestellt ist die relative Menge an D1-Protein nach 0, 30 bzw. 60 min Starklicht bezogen auf die Ausgangsmenge an D1-Protein vor der Starklichtinkubation. CAP wurde 20 min vor Starklichtbestrahlung zugegeben. Gesamtzell-Protein wurde aus den Mutanten und der IL isoliert, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet (Rohdaten siehe Anhang C). Berechnet wurde das Integral der Peakfläche der D1-Banden. Die Ausgangsmenge an D1-Protein vor Starklicht (0 min Starklicht) gilt dabei als 100 %. Angegeben wird der Mittelwert ( $n=3$ ) sowie die Standardabweichung.

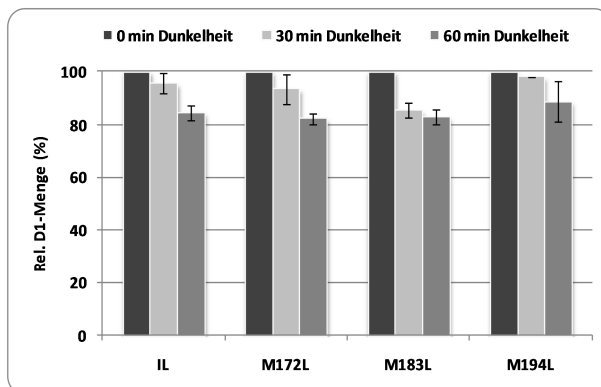
Während der Abbau des D1-Proteins der Mutante M293A im Starklicht vergleichbar war mit dem des Referenzstammes IL, zeigten die Mutanten mit Veränderungen an den Positionen 172, 183 und 194 des D1-Proteins Unterschiede zur IL. Der Austausch dieser Methionine führte zu einem stärkeren Abbau des D1-Proteins unter Starklichtbedingungen. Dabei war kein tendenzieller Unterschied zwischen den Alanin- und Leucin-Mutanten erkennbar. Alle weiterführenden Experimente wurden ausschließlich mit den Leucin-Mutanten durchgeführt.

### 3.1.2.3 D1-Stabilität der Leucin-Mutanten im Dunkeln

Jede Veränderung der Aminosäuresequenz eines Proteins kann strukturelle Veränderungen im Protein verursachen. Um auszuschließen, dass der verstärkte D1-Abbau der Mutanten im Starklicht allein auf eine mögliche Strukturänderung im D1-Protein zurückzuführen ist, wurden die Algen im Dunkeln mit CAP inkubiert. Da in der Zelle ohne Belichtung nur geringe Konzentrationen an ROS gebildet werden, wird das D1-Protein im Dunkeln kaum geschädigt und somit auch nur geringfügig abgebaut. Würde der D1-Gehalt der Mutanten auch im Dunkeln stärker abnehmen, wäre das ein Hinweis auf eine Strukturänderung als

initiales Ereignis für den verstärkten D1-Abbau. Der Versuchsaufbau war identisch zur Starklichtexposition. Sowohl die Mutanten als auch der IL-Stamm befanden sich in der spätlogarithmischen Wachstumsphase. Die plastidäre Proteinbiosynthese wurde durch Chloramphenicol gehemmt. Die Zugabe von CAP erfolgte 20 Minuten vor Versuchsbeginn. Die Algen wurden 60 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Die Probenahme erfolgte vor Versuchsbeginn (0 min) und nach 30 bzw. 60 Minuten Dunkelheit. Dem bisherigen Versuchsaufbau folgend wurde Gesamtzell-Protein isoliert, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine NC-Membran transferiert. Die D1-Menge wurde anschließend densitometrisch bestimmt (Rohdaten siehe Anhang C).

Eine Inkubation ohne Belichtung führte bei allen Algen zu einem geringfügigen D1-Abbau (Abbildung 3.7). Die Quantifizierung ergab nach 60 Minuten Dunkelheit einen Rückgang des D1-Proteins auf ca. 85 % der Ausgangsmenge. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Mutanten und Referenzstamm erkennbar. Da alle Algen im Dunkeln, d.h. ohne photosynthetisch erzeugte ROS, ein ähnlich stabiles D1-Protein zeigten, ist eine Strukturänderung im mutierten Protein als Ursache für die Veränderungen der D1-Stabilität im Starklicht unwahrscheinlich. Dieser Versuch zeigte ebenfalls, dass während der einstündigen Inkubation ein möglicher toxischer Effekt von CAP vernachlässigt werden kann.



**Abbildung 3.7: Stabilität des D1-Proteins der Mutanten M172L, M183L und M194L sowie des Referenzstammes IL ohne Belichtung in Gegenwart von CAP.** Dargestellt ist die relative Menge an D1-Protein nach 0, 30 und 60 min Inkubation ohne Belichtung + CAP. Der D1-Gehalt bezieht sich dabei auf die jeweilige Ausgangsmenge an D1-Protein vor Versuchsbeginn. Gesamtzell-Protein wurde aus den Mutanten und der IL isoliert, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet (Rohdaten siehe Anhang C). Berechnet wurde das Integral der Peakfläche der D1-Banden. Die Ausgangsmenge an D1-Protein zu Versuchsbeginn gilt dabei als 100 %. Angegeben wird der Mittelwert (n=3) sowie die Standardabweichung.

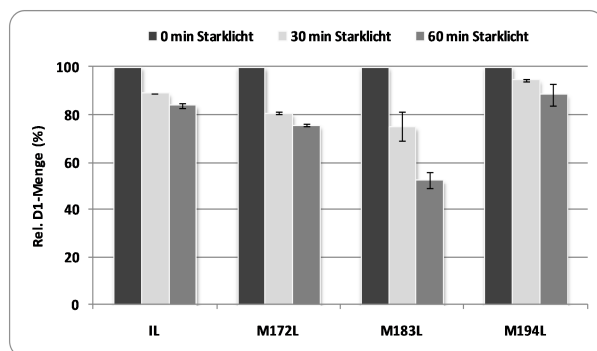
#### 3.1.2.4 D1-Turnover der Leucin-Mutanten im Starklicht

Um den D1-Turnover zu zeigen, wurde für die Leucin-Mutanten die Menge an D1-Protein während Starklichtinkubation (Lichtintensität  $1.800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ohne Hemmung der plastidären Protein-Biosynthese bestimmt. Die Zellen waren damit potentiell in der Lage, das photooxidativ geschädigte und proteolytisch abgebaute D1-Protein durch eine *de novo*-Synthese zu ersetzen. Um mögliche Veränderungen dieses D1-Turnover zu verfolgen, wurden

die Algen 60 Minuten bei Starklicht ohne Zugabe von CAP inkubiert. Dem bisherigen Versuchsaufbau folgend wurde Gesamtzell-Protein isoliert, aufgetrennt und die D1-Menge quantitativ bestimmt.

Ohne Hemmung der plastidären Proteinbiosynthese im Starklicht wurde das D1-Protein der Mutanten M172L und M194L sowie des Referenzstammes IL nur geringfügig abgebaut. Der Anteil an photooxidativ geschädigtem und proteolytisch abgebautem D1-Protein konnte durch Neusynthese offenbar weitgehend ersetzt werden. Nach 60 Minuten Starklicht ohne CAP verlor M194L lediglich 12 %, M172L 25 % und der IL-Stamm 16 % an D1-Protein bezogen auf die Ausgangsmenge vor Starklicht (Abbildung 3.8). Signifikante Veränderungen waren dagegen bei M183L erkennbar. Diese Mutante verlor trotz Möglichkeit zur Resynthese 48 % an D1-Protein nach 60 Minuten Starklicht (Abbildung 3.8).

Da die Stämme M194L und M172L unter physiologischen Bedingungen, d.h. ohne Hemmung der plastidären Proteinbiosynthese, keine oder nur geringfügige Veränderungen zeigten, konnte für den Versuchszeitraum eine Beeinträchtigung der Translation des D1-Proteins durch die jeweilige Mutation ausgeschlossen werden. Der Austausch von Methionin 183 gegen Leucin hatte dagegen signifikante Auswirkungen auf den D1-Turnover im Starklicht, die durch Beeinträchtigungen der *de novo*-Synthese des D1-Proteins, aber auch Beeinträchtigungen bei der Assemblierung bzw. De-Assemblierung des Proteinkomplexes verursacht werden können.



**Abbildung 3.8: Turnover des D1-Proteins der Mutanten im Starklicht ohne CAP.** Dargestellt ist die relative Menge an D1-Protein nach 0, 30 und 60 min Inkubation im Starklicht **ohne** CAP. Der D1-Gehalt bezieht sich dabei auf die jeweilige Ausgangsmenge an D1-Protein vor Versuchsbeginn. Gesamtzell-Protein wurde aus den Mutanten und der IL isoliert, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet (Rohdaten siehe Anhang C). Berechnet wurde das Integral der Peakfläche der D1-Banden. Die Ausgangsmenge an D1-Protein zu Versuchsbeginn gilt dabei als 100 %. Angegeben wird der Mittelwert (n=3) sowie die Standardabweichung.

### 3.1.2.5 Recovery-Vermögen der Leucin-Mutanten

Neben dem Abbau von photooxidativ geschädigtem D1-Protein und der darauffolgenden Neusynthese wird ein weiterer Reparaturmechanismus beschrieben, der zu einer Erholung der PSII-Aktivität in *Synechocystis* nach Photoinhibition führt (ALLAKHVERDIEV ET AL. 2003). Diese Reaktivierung findet bei Dunkelheit statt, auch wenn die Proteinbiosynthese durch

einen Translationshemmer inhibiert wird. Diese sogenannte *Dark recovery* basiert somit nicht auf einer Neusynthese des D1-Proteins. Um diesen Prozess zu erklären, wurde die Hypothese aufgestellt, dass vor der geschädigten PSII-Form zunächst eine inaktive Intermediat-Form gebildet wird. Aus dieser Intermediat-Form könnte durch den *Dark recovery* -Prozess die aktive Form teilweise wiederhergestellt werden (ALLAKHVERDIEV ET AL. 2003).

Mit Hilfe der Mutanten war eine Untersuchung zur Bedeutung der Methionin-Reste im D1-Protein während der *Dark recovery* möglich. Dazu wurden die Mutanten sowie der Referenzstamm IL 20 Minuten unter Starklichtbedingungen ( $1.300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und während der sich anschließenden Erholungsphase unter Schwachlichtbedingungen (max.  $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) inkubiert. Die plastidäre Proteinbiosynthese wurde durch Zugabe von Chloramphenicol gehemmt. Um die PSII-Effizienz während und nach der Photoinhibition zu dokumentieren, wurde der  $F_V/F_M$  Wert bestimmt. Er ist ein Hilfsmittel, um schnell und reproduzierbar Unterschiede in der photosynthetischen Aktivität der Mutanten zu untersuchen. Der Ausgangswert vor Versuchsbeginn entsprach 100 %.

Die photosynthetische Aktivität der Mutanten unterschied sich zu Beginn des Experimentes, d.h. unter Standard-Wachstumsbedingungen, nicht vom Referenzstamm (Tabelle 3.2). Lediglich M183L zeigte mit einem  $F_V/F_M$ -Wert von 0,7 eine geringfügig schlechtere PSII-Effizienz.

**Tabelle 3.2: PSII-Effizienz der Mutanten M172L, M183L, M194L sowie des Referenzstammes IL. Dargestellt ist der Mittelwert der  $F_V/F_M$ -Werte ( $n=3$ ) sowie die Standardabweichung in Klammern.**

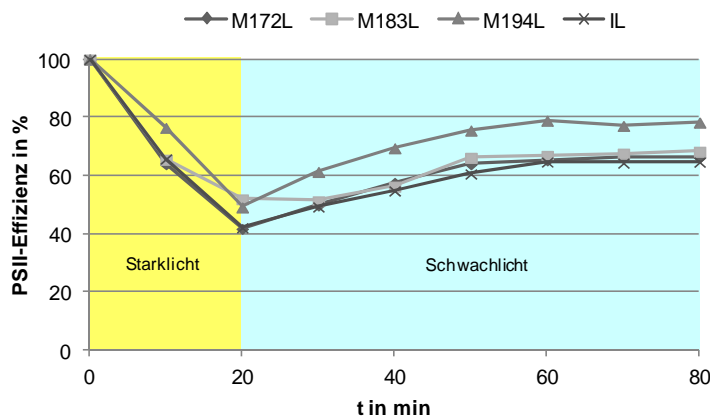
	$F_V/F_M$ – Wert
IL	0,73 ( $\pm 0,01$ )
M172L	0,74 ( $\pm 0,01$ )
M183L	0,70 ( $\pm 0,02$ )
M194L	0,74 ( $\pm 0$ )

Während der Starklichtexposition nahm die photosynthetische Aktivität der Algen stark ab (Abbildung 3.9, A). Nach 20 Minuten sank der  $F_V/F_M$ -Wert der Mutanten und des Referenzstammes um ca. 50 %. Während der folgenden Erholungsphase unter Schwachlichtbedingungen konnte ein rascher Anstieg der PSII-Aktivität sowohl bei den Mutanten als auch beim IL-Stamm verzeichnet werden. Nach ca. 40 Minuten Schwachlicht hatten M172L 66 %, M183L 67 % und der IL-Stamm 65 % ihrer Ausgangsaktivität wiedererlangt. M194L konnte sogar 78 % der PSII-Aktivität wiederherstellen. Eine weitere

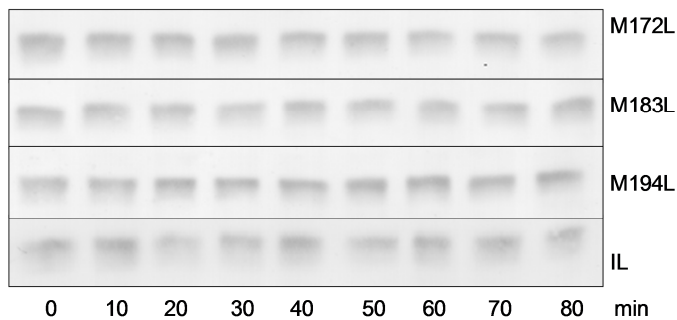


Erholung folgte nicht. Das *Recovery*-Vermögen der Mutanten entsprach somit dem *Recovery*-Vermögen des Referenzstammes IL.

A)



B)



**Abbildung 3.9: Recovery-Vermögen der Mutanten M172L, M183L und M194L sowie des Referenzstammes IL.** Die chloroplastidäre Proteinbiosynthese wurde durch Zugabe von Chloramphenicol 20 min vor Versuchsbeginn gehemmt. Nach 20 min Starklicht ( $1.300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) wurden die Algen weitere 60 min bei geringen Lichtintensitäten ( $\text{max. } 10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) inkubiert. **A)** Gemessen wurde der  $F_v/F_M$ -Wert alle 10 Minuten. Die prozentuale PSII-Effizienz bezieht sich auf den Ausgangswert vor Starklicht. Angegeben wird der Mittelwert ( $n = 3$ ; Standardabweichung  $< 3,5$ ). **B)** Western-Blots entwickelt mit chicken anti-PsbA. Aliquots wurden alle 10 min entnommen. Gesamtzell-Protein wurde isoliert, aufgetrennt und geblottet.

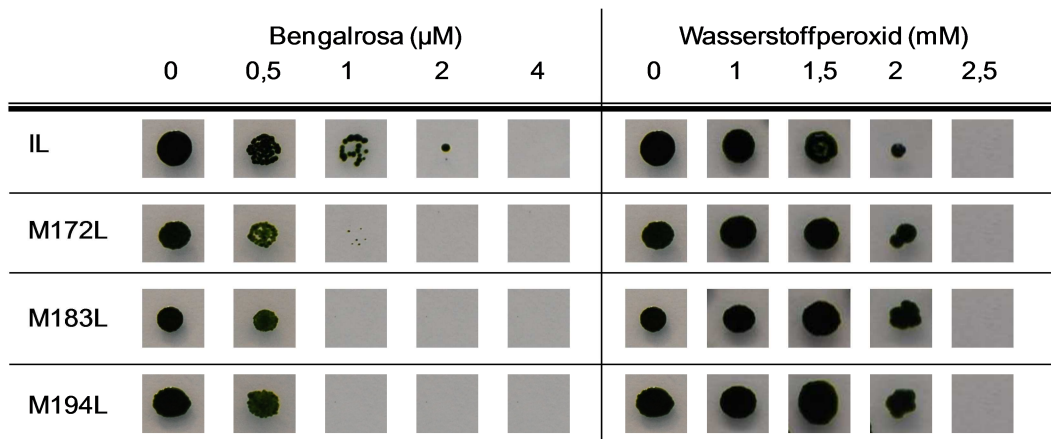
Um Änderungen im D1-Gehalt während des Versuchszeitraumes auszuschließen, wurde zu jedem Messpunkt Gesamtzell-Protein isoliert, aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis des D1-Proteins erfolgte mit einem entsprechenden Antikörper (vgl. 2.4.5). Abbildung 3.9 (B) zeigt, dass bei allen Algen im Verlauf des Experimentes die Menge an D1-Protein nahezu konstant blieb. Während der 20 Minuten Inkubation bei Lichtintensitäten von  $1.300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  erfolgte keine Degradation des D1-Proteins, obwohl eine deutliche Abnahme der PS II-Effizienz zu verzeichnen war. Durch die Zugabe von Chloramphenicol wurde die chloroplastidäre Proteinbiosynthese gehemmt und damit eine Resynthese des D1-Proteins ausgeschlossen. Trotz dieser Hemmung stieg die PS II-Effizienz während der Erholungsphase unter Schwachlicht an. Die gezeigte Wiederherstellung beruhte somit nicht auf einer *de novo*-Synthese des proteolytisch abgebauten D1-Proteins. Ein Einfluss der Methionine des D1-

Proteins auf das *Recovery*-Vermögen der Algen konnte mit diesem Versuch nicht gezeigt werden.

### 3.1.2.6 Einfluss phototoxischer Substanzen auf das Wachstum der Leucin-Mutanten

Mit Hilfe von Photosensibilisatoren können in der Zelle photooxidative Stressbedingungen bei normaler Beleuchtung erzeugt werden. Diese phototoxischen Substanzen werden durch Lichtabsorption angeregt und produzieren ROS. Ein solcher Photosensibilisator ist Bengalrosa, der Singulett-Sauerstoff erzeugt. Um den Einfluss von Singulett-Sauerstoff auf das Wachstum der *C. reinhardtii*-Mutanten zu untersuchen, wurde dem Nährmedium Bengalrosa zugegeben. Unter normalen Wachstumsbedingungen (Lichtintensität  $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $24^\circ\text{C}$ ) wurden die Algen mit verschiedenen Konzentrationen des Photosensibilisators inkubiert. Es wurden jeweils  $2 \times 10^4$  Zellen auf TAP-Platten in Gegenwart von Bengalrosa gebracht. Nach sieben Tagen wurde das Wachstum ausgewertet.

Im Wachstum unter Kontrollbedingungen, d.h. ohne Photosensibilisatoren auf acetathaltigem TAP-Medium, sowie im Wachstum mit  $0,5 \mu\text{M}$  Bengalrosa im Medium unterschieden sich die Methionin-Mutanten nicht vom Referenzstamm IL. Die Zugabe von  $0,5 \mu\text{M}$  Bengalrosa führte bei allen Algen zu einer leichten Reduktion des Wachstums (Abbildung 3.10). Das Wachstum bei einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  zeigte Unterschiede zwischen Referenz und Mutanten. Während bei Mutante M172L noch vereinzelt Kolonien wachsen konnten, war diese Konzentration an Bengalrosa für die Mutanten M183L und M194L bereits letal. Der Referenzstamm war dagegen auch bei einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  Bengalrosa noch lebensfähig. Eine Wachstumsbeeinträchtigung war aber auch hier erkennbar (Abbildung 3.10). Konzentrationen von  $2 \mu\text{M}$  Bengalrosa waren bei allen Mutanten letal. Lediglich beim IL-Stamm war noch ein geringes Wachstum erkennbar. Eine Konzentration von  $4 \mu\text{M}$  Bengalrosa konnte keine der getesteten Algen tolerieren. Der durch Bengalrosa erzeugte Singulett-Sauerstoff führte offensichtlich zu einer starken oxidativen Schädigung zellulärer Komponenten und damit zu einem verschlechterten Wachstum. Verglichen mit dem Referenzstamm IL führten bei den Mutanten bereits geringere Bengalrosa-Konzentrationen zu einer Wachstumshemmung.



**Abbildung 3.10:** Einfluss von Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) bzw. Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) auf das Wachstum der Mutanten M172L, M183L und M194L sowie des Referenzstammes IL. Die Konzentration an Singulett-Sauerstoff wurde indirekt durch Zugabe von Bengalrosa erhöht. Wasserstoffperoxid wurde direkt dem Medium zugegeben.  $10\mu\text{l}$  Zellsuspension ( $2 \times 10^4$  Zellen) wurden auf mit Bengalrosa bzw. Wasserstoffperoxid versetzten TAP-Platten gespottet und für sieben Tage bei einer Lichtintensität von  $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  inkubiert.

Neben Singulett-Sauerstoff wurde der Einfluß von Wasserstoffperoxid auf die Mutanten getestet. In photosynthetisch aktiven Zellen entsteht Wasserstoffperoxid vorwiegend am PSI. Während der sogenannten Mehler-Reaktion werden Elektronen auf Sauerstoff anstelle von  $\text{NADP}^+$  übertragen, wenn der Calvin-Zyklus nicht genügend NADPH verbraucht. Das erzeugte Superoxidradikal wird durch die Superoxid-Dismutase (SOD) in Wasserstoffperoxid umgewandelt (ASADA 2006). Die Hauptgefährdung durch Wasserstoffperoxid liegt in der Fähigkeit, zusammen mit Metallionen das hoch reaktive Hydroxylradikal zu erzeugen, das unkontrolliert organische Moleküle schädigt. Die Inkubation mit Wasserstoffperoxid im Medium sollte zeigen, ob das Wachstum der Methionin-Mutanten, neben Singulett-Sauerstoff, durch weitere ROS beeinflusst wird (Abbildung 3.10). Der Versuchsaufbau war identisch zum Wachstumsversuch auf Bengalrosa (vgl. oben). Das Wasserstoffperoxid wurde in verschiedenen Konzentrationen dem acetathaltigen TAP-Medium zugegeben.

Bei keiner der Mutanten konnten Unterschiede in der Wasserstoffperoxid-Sensibilität im Vergleich zum IL-Stamm festgestellt werden. Konzentrationen von 1 bzw. 1,5 mM Wasserstoffperoxid zeigten bei keiner getesteten Alge Veränderungen im Wachstumsverhalten verglichen mit Kontrollbedingungen ohne Zusatz der Chemikalie. Ein verschlechtertes Algenwachstum war ab einer Konzentration von 2 mM Wasserstoffperoxid erkennbar. Die Zugabe von 2,5 mM Wasserstoffperoxid führte bei allen Algen zur Inhibierung des Wachstums.

### 3.1.3 Zusammenfassung der physiologischen Untersuchungen

Um zu klären, ob bestimmte Methionin-Reste im D1-Protein als endogene Antioxidanzien fungieren, wurden die Methionine 172, 183, 194 und 293 ausgetauscht. Diese Reste befinden sich in räumlicher Nähe zum Chlorophyll P680, einer Hauptquelle reaktiver Sauerstoffspezies in Pflanzen. Während der Austausch von Methionin 293 keine physiologischen Veränderungen bewirkte, beeinflusste der Austausch von Methionin 172, 183 und 194 die physiologischen Eigenschaften der Mutanten deutlich. Das photoautotrophe Wachstum der Mutanten war mit Ausnahme von M172L, M194A sowie M194L eingeschränkt. Der Abbau des D1-Proteins im Starklicht war bei allen Mutanten, außer M293A, verstärkt. Da die D1-Stabilität der Mutanten im Dunkeln unverändert blieb, könnten erhöhte ROS-Konzentrationen im Starklicht die Ursache für diesen verstärkten Abbau sein. Das verschlechterte Wachstum der Mutanten in Gegenwart von Bengalrosa, d.h. bei erhöhten Singulett-Sauerstoff-Konzentrationen, könnte diese Hypothese weiter untermauern. Hervorzuheben ist Methionin 183, das die geringste Distanz zu den Chlorophyllen aufweist. Der Austausch dieses Methionins zeigte neben dem verstärkten D1-Abbau im Starklicht und einer Verschlechterung des photoautotrophen Wachstums auch Einschränkungen des *D1-Turnovers* im Starklicht. Die Ergebnisse der physiologischen Untersuchungen belegen somit den Einfluss der Methionine 172, 183 und 194 auf die Stabilität des D1-Proteins unter oxidativen Bedingungen. Damit liefern diese Versuche erste Hinweise darauf, dass Methionine im D1-Protein eine Schutzfunktion ausüben. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte darüber hinaus geklärt werden, ob in *C. reinhardtii* entsprechende Methioninsulfoxid-Reduktasen als theoretische Grundlage für diese Arbeitshypothese existieren.

## 3.2 Methioninsulfoxid-Reduktasen in *C. reinhardtii*

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bestimmte Methionin-Reste die Stabilität des D1-Proteins von *C. reinhardtii* unter oxidativen Bedingungen beeinflussen. Wie eingangs erwähnt, sind Methionine besonders leicht oxidierbare Aminosäuren und erster Angriffspunkt für ROS. Die Oxidation von Methionin zu Methioninsulfoxid ist verbunden mit der Änderung von physikalischen und chemischen Eigenschaften der jeweiligen Proteine und kann zu Veränderungen der Protein-Funktion und Zellphysiologie führen. Das entstandene Methioninsulfoxid kann physiologisch wieder zu Methionin reduziert werden. Diese Reaktion wird durch das Enzym Methioninsulfoxid-Reduktase (MSR) katalysiert, das über Thioredoxin an den Redoxpool der Zelle gekoppelt ist (HOSHI & HEINEMANN 2001). Diese Reaktion geht in den meisten Fällen mit der Wiederherstellung der Protein-Funktion einher.

Eine mögliche Regulation des D1-Turnovers durch die Oxidation von Methioninen sowie die Beteiligung einer MSR wurde im Zusammenhang mit der Untersuchung einer plastidären MSRA aus *A. thaliana* diskutiert, konnte bislang aber nicht nachgewiesen werden (ROMERO ET AL. 2004). Parallel zur Untersuchung bestimmter Methionin-Reste im D1-Protein wurden daher im Wildtyp von *C. reinhardtii* MSR-Proteine analysiert, welche die Grundlage für eine *Scavenging*-Funktion von Methioninen bilden würden. Der Focus lag dabei auf Methioninsulfoxid-Reduktasen vom Typ A (MSRA), die im Vergleich zu MSRBs physiologisch von größerer Bedeutung sind (ROUHIER ET AL. 2006).

### 3.2.1 *C. reinhardtii* Wildtyp besitzt vier *msrA*-Gene

Im Genom des *C. reinhardtii* Wildtypes 11/32-b wurden durch Sequenzvergleiche die vier im Zellkern lokalisierten *msrA1* bis *4* Gene identifiziert, die für Methioninsulfoxid-Reduktasen A (MSRA) codieren. Aus der DNA-Sequenz der Datenbank (<http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3.home.html>) wurden spezifische DNA-Primer abgeleitet, mit deren Hilfe dann die kompletten cDNA-Sequenzen dieser Gene synthetisiert und anschließend sequenziert wurden (vgl. 2.3.4, 2.3.5). Die Sequenzen der *msrA*-Gene zeigten zum Teil Unterschiede zur veröffentlichten Sequenz und sind in Anhang C dargestellt.

Alle vier *msrA*-Gene werden auf DNA-Ebene von mehreren Introns unterbrochen, unterscheiden sich jedoch in der Anzahl der Introns. Ebenso unterschiedlich ist die Größe der Proteine (vgl. Tabelle 3.3).

MSRA3	-----MQTLKPGAARPNILRRASRTHSVAAM	26
MSRA4	-----MKVQLSNGMVAAVAKVDKESVTLDLNH	27
MSRA1	-----	
MSRA2	MLVARYSTHIIAQVRNGRNAVFGAKPAFKGPIAASSARAPATPLGASPADPAAVPHATRP	60
MSRA3	GFFNFGSLFSKEQCKLAPAQAPEGLKLAIFAGGCFWGIELAYQRPVGVVATTVGYTGGAD	86
MSRA4	ELAGQALTFDVELMMLVPS---ERLQKATFAAGCFWGPPELAFQRPVGVLSDEVGYSNGEA	84
MSRA1	-----MATNGNGASGAELATFALGUFWHPPEASFANVPGVVKTRVGYTGGSR	45
MSRA2	DVSLRAVNENSASGVSAAGSSSKMEVATLGGGCFWCVVEACYNMLRGVQSAISGYANGDV	120
MSRA3	KNPNYDSVCSGRSGHAEAIQCTYDPKQCSYDSLLDTFFARVDPTTLNRQGNDRGTQYRSA	146
MSRA4	KDPTYEEVCEGTTGHAEVVQVLYDPADVSYDRLLLEEFWGRHNPTQLNRQGNVDGTQYRSA	144
MSRA1	PNPTYESVCAG-DGHTeamRVWFDPAIISYEDLLKQFFREHDPTQKSK-----CQYKSA	98
MSRA2	KDPTYKAVCSGTTGHAEVVQITYDPTVISYKEILEIFFTVHDPTTKDRQGNVDGTQYRSI	180
MSRA3	IYYHDEQQRAAAAARIAAANNAIAEGKAPSRWAGSRVVAQLEPAGDYIIAEDYHQQYLSK	206
MSRA4	IFTHTPEQLEAANKSKAAFQ---AKFKDP-----IVTVVEPINNYHSAEPYHQQYLAR	194
MSRA1	VWYHSEAHGTALAAVMKELEG---KYRVR-----LATTVDPAGDWDAAEYHQKYIEK	148
MSRA2	ICTHNDARAIQAEVIADISAQ-GLWPAP-----IVTQVEPLDVFYPAEDYHQDYVYVQ	232
MSRA3	GGRFGQAQSAAGKGCNDPIRCYG-----	228
MSRA4	GGRFGRPQSANKGCDDPIRCYG-----	216
MSRA1	S--MMRRGSAQGW-----	159
MSRA2	NPGQGYCRAVVGPKVAKFRQKFAKLIKA	260

**Abbildung 3.11: Vergleich der Aminosäuresequenzen von MSRA1, 2, 3 und 4 aus *C. reinhardtii*.** Die cDNA wurde mit spezifischen Primern synthetisiert (s. 2.1.7). Der Sequenzvergleich erfolgte mit Hilfe der ClustalW Software. Streng konservierte Aminosäuren wurden rot, weniger stark konservierte Bereiche wurden gelb hervorgehoben. Der Sequenzbereich GCFW bzw. GUFW bildet das katalytische Zentrum (schwarz eingerahmt). U steht dabei für Selenocystein.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der *C. reinhardtii* MSRAs mit Hilfe der ClustalW multiple Sequence Alignment-Software zeigte, dass alle MSRA-Proteine, mit Ausnahme von MSRA1, das konservierte Motiv GCFW enthalten. Diese Aminosäuren bilden das katalytische Zentrum. Dem Motiv folgt üblicherweise ein Glyzin wie in MSRA3 und 4, in MSRA1 folgt dagegen ein Histidin und in MSRA2 ein Cystein (Abbildung 3.11).

MSRA1 enthält eine Besonderheit innerhalb des katalytischen Zentrums. Anstelle des Cysteins findet man die Aminosäure Selenocystein (U), die von einem Selenocystein-Insertions-Sequenz (SECIS)-Element umgeben wird. Das SECIS-Element aus *C. reinhardtii* ist dem tierischen ähnlich (NOVOSELOV ET AL. 2002). Selenocystein wird durch das Codon UGA codiert. Die spezielle Sequenzumgebung ermöglicht während der Translation eine Erkennung dieses Codons als Aminosäure Selenocystein und nicht wie üblicherweise als Stopp-Signal. Selenocystein-enthaltende MSRAs sind in Bakterien, weiteren Algen und Wirbellosen bekannt (KIM ET AL. 2006).

Die meisten MSRAs enthalten neben dem Cystein des katalytischen Zentrums (Cystein 60) drei weitere konservierte Cysteine. Der Nummerierung von MSRA3 aus *C. reinhardtii*

entsprechend sind die Cysteine 60, 95, 220 und 226 innerhalb der MSRA-Familie stark konserviert. MSRA3 und 4 entsprechen diesem Muster und enthalten in dem für Pflanzen typischen KGC[N/D]DPIRCYG-Motiv im C-terminalen, glyzinreichen Ende des Proteins die zwei Cysteine 220 und 226. Diese beiden Reste sind am Thioredoxin-abhängigen Recycling-Prozess beteiligt und werden daher als „Recycling“- bzw. als regenerierende Cysteine bezeichnet. Die Katalyse der Methioninsulfoxid-Reduktion durch MSRA3 und 4 folgt somit dem für MSRAs typischen Mechanismus. Dabei wird Methionin in drei Schritten unter Beteiligung des katalytischen Cysteins 60 sowie der beiden „Recycling-Cysteine“ und Thioredoxin als Produkt entlassen (RANAIVOSON ET AL. 2008; LOWTHER ET AL. 2000A). MSRA2 enthält am C-terminalen Ende des Proteins ein Cystein, in der Mitte der Proteinsequenz weitere Cysteine. Diese Cysteine entsprechen nicht dem für MSRAs typischen Konservierungsmuster. Ob diese Reste neben Cystein 60 an der katalytischen Reaktion beteiligt sind, ist nicht bekannt. In MSRA1 findet man zwei Cysteine im mittleren Bereich der Aminosäuresequenz, das C-terminalen Ende enthält keine Cysteine. Durch Mutation der beiden mittleren Cysteine konnte eine „Recycling-Funktion“ ausgeschlossen werden (KIM ET AL. 2006). Das in allen vier Proteinen konservierte Cystein an Position 95 (Nummerierung entsprechend MSRA3) ist vermutlich nicht an der katalytischen Reaktion beteiligt (ROUHIER ET AL. 2006).

**Tabelle 3.3: Methioninsulfoxid-Reduktasen in *C. reinhardtii*: Sequenzcharakteristika**

Name	JGI v4.0 Protein ID <sup>a</sup>	Locus <sup>b</sup>	Anzahl der Exons	Anzahl EST <sup>c</sup>	Anzahl der Aminosäuren
MSRA1	196104	Chromosom 13: 1260194:1262249	6	10	160
MSRA2	-	Chromosom 10: 6258380:6261367	9	18	260
MSRA3	184206	Chromosom 8: 3355745:3358374	5	14	228
MSRA4	-	Chromosom 1: 2032349:2034985	8	22	216

<sup>a</sup> v4.0 Protein Identifikationsnummer (ID) basierend auf *C. reinhardtii* Kerngenom-Sequenz Version 4.0 des Joint Genome Institutes (JGI)

<sup>b</sup> basierend auf BLAST Analyse der JGI v4.0 Kerngenom-Sequenz von *C. reinhardtii*

<sup>c</sup> basierend auf BLAST Analyse des *C. reinhardtii* EST Index (Kazusa DNA Research Institute, Datenbank: chlamyALL)

### 3.2.2 Expressionsanalyse der vier *msrA*-Gene in *C. reinhardtii*

Die Analyse der EST-Datenbank zeigte eine Vielzahl von Sequenzen der vier identifizierten *msrA*-Gene in *C. reinhardtii* (Tabelle 3.3). Untersuchungen in *A. thaliana* haben gezeigt, dass Umweltbedingungen, die oxidative Schäden in der Pflanzenzelle verursachen, zu einer verstärkten Expression der *msrA*-Gene führen (ROUHIER ET AL. 2006). Dabei schützen die einzelnen MSRs bei unterschiedlichen Stressbedingungen spezifische Kompartimente der Zelle. In *A. thaliana* wurde eine verstärkte *msrA*-Expression unter Starklichtbedingungen, Hitzeinkubation, erhöhten Salzkonzentrationen oder Ozonstress festgestellt (ROMERO ET AL. 2004; ROUHIER ET AL. 2006). Eine Beteiligung von MSRs an der Interaktion zwischen Pflanze und viralen Pflanzenpathogenen konnte ebenfalls durch eine Induktion der *msr* Expression nachgewiesen werden (SADANANDOM ET AL. 2000).

Die *in vivo* Analyse der *msrA*-Expression im Wildtyp von *C. reinhardtii* sollte klären, ob die *msrA*-Gene der einzelligen Grünalge ebenfalls mit einer differentiellen Expression auf verschiedene Stressbedingungen reagieren. Dazu wurden die Algen zunächst Bedingungen ausgesetzt, die oxidativen Stress verursachen. Die Inkubation von *C. reinhardtii* Wildtyp-Zellen erfolgte bei hohen Lichtintensitäten, bei erhöhter UV-Strahlung, bei niedrigen Temperaturen und bei Hitze. Unter diesen Wachstumsbedingungen werden verstärkt ROS produziert. Zum Vergleich wurden die Algen unter nicht-oxidativen Bedingungen (Kontrollbedingungen sowie Dunkelheit) inkubiert (vgl. Tabelle 3.4).

**Tabelle 3.4: Übersicht der Wachstumsbedingungen unter denen *C. reinhardtii* Wildtyp inkubiert wurde. Die Zellen wurden in HS-Medium unter Begasung mit einem CO<sub>2</sub>-Luftgemisch (3,5 % CO<sub>2</sub>), bei 24°C und Lichtintensitäten von 60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> angezogen. Anschließend wurden die Kulturen den angegebenen Bedingungen ausgesetzt. Die Begasung erfolgte während des gesamten Versuchszeitraums.**

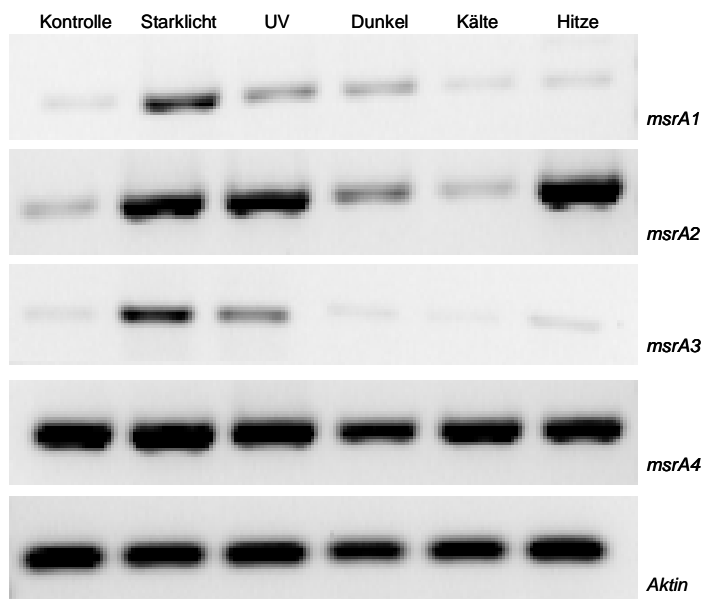
	Temperatur	Lichtintensität	Dauer
Starklicht	24°C	700 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	30 min
UV-Bestrahlung	24°C	0,5 mW cm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	20 min
Kälte	10°C	60 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	60 min
Hitze	42°C	60 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	30 min
Dunkelheit	24°C	0 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	300 min
Kontrolle	24°C	60 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	

Von jeder einzelnen Stress- bzw. Kontroll-Kultur wurde jeweils ein Gesamt-cDNA-Pool mit Hilfe zufälliger Hexamere synthetisiert, der in den anschließenden PCR-Reaktionen mit



spezifischen Primern als Template diente. Anhand der Menge an PCR-Produkt konnte man so auf die Transkriptmenge der einzelnen Gene schließen.

Nach Inkubation der Algen unter Kontrollbedingungen konnten trotz sensitiver PCR-Technik nur geringe Mengen an *msrA1*-, *msrA2*- und *msrA3*-Transkripten nachgewiesen werden. Auf die Inkubation unter oxidativen Stress-Bedingungen reagierten die Algen mit einer Erhöhung der Transkription einiger *msrA*-Gene. So führten hohe Lichtintensitäten bei *msrA1*, *msrA2* und *msrA3* zu einem starken Anstieg der Transkriptmengen (Abbildung 3.12). Nach UV-Bestrahlung wurde für *msrA2* ein starker Anstieg und für *msrA3* ein leichter Anstieg der Transkriptmenge nachgewiesen. Nach Hitzeinkubation konnte für *msrA2* ebenfalls ein starker Anstieg der Transkriptmenge gezeigt werden. Unverändert blieb dagegen die *msrA1*- bzw. *msrA3*-Transkriptmenge nach Hitzeinkubation. Kälte-Inkubation hatte keine Auswirkung auf die *msrA*-Transkriptmenge. Dunkelinkubierte Algen zeigten wie erwartet keine Erhöhungen der Transkriptmengen.



**Abbildung 3.12: Transkriptmengen der *msrA*-Gene sowie des *Aktin*-Gens in *C. reinhardtii* unter verschiedenen Stressbedingungen.** Dargestellt sind die PCR-Produkte der einzelnen Gene als Maß für die jeweilige Transkriptmenge. Die Inkubation von Wildtyp-Zellen erfolgte in HS-Medium unter ständiger Begasung mit einem CO<sub>2</sub>-Luftgemisch (3,5 % CO<sub>2</sub>) und hohen Lichtintensitäten, UV-Bestrahlung, Kälte bzw. Hitze. Als Kontrolle wuchsen die Algen unter normalen Bedingungen sowie bei Dunkelheit. Von jeder Stresskultur bzw. von den Kontrollen wurde jeweils ein Gesamt-cDNA-Pool von isolierter Gesamt Zell-RNA mit Hilfe zufälliger Hexamere synthetisiert. In den anschließenden PCRs wurden unter Zugabe genspezifischer Primer und 2 µl „Stress“- bzw. Kontroll-cDNA die entsprechenden Genabschnitte amplifiziert. Als interner Standard diente das *Aktin*-Gen.

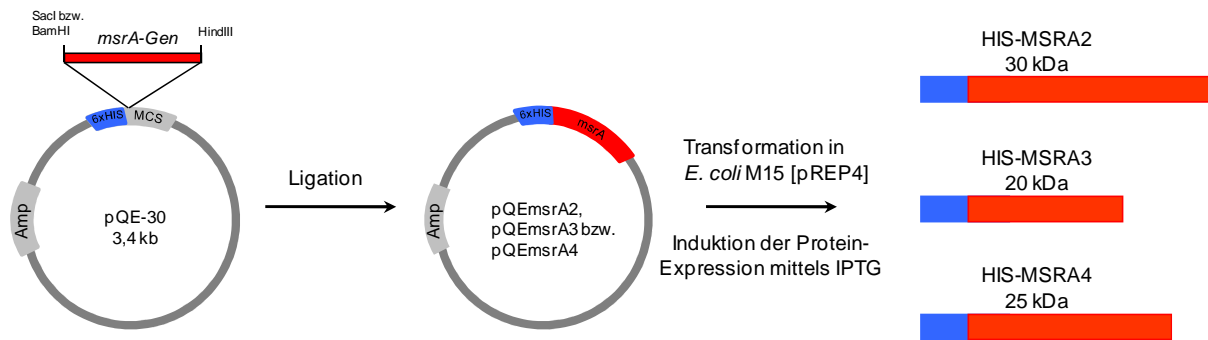
Im Gegensatz zu diesem differentiellen Expressionsmuster von *msrA1*, 2 und 3 wurden bei *msrA4* bei allen Versuchsbedingungen konstante Mengen an PCR-Produkt gebildet (Abbildung 3.12). Das *msrA4*-Gen wird offensichtlich konstitutiv exprimiert. Das als interner Standard amplifizierte *Aktin*-Gen zeigte wie erwartet ebenfalls konstante Mengen an PCR-

Produkt (Abbildung 3.12), da *Aktin* ein *Housekeeping*-Gen ist. Durch den Nachweis von äquivalenten mRNA-Mengen des Aktin-Standards bei allen gewählten Wachstumsbedingungen konnten Fehler oder Ungenauigkeiten während der cDNA-Synthese ausgeschlossen werden. Die Amplifikationsmuster von *msrA1*, 2 und 3 waren somit auf eine differentielle Expression dieser Gene unter den gewählten Bedingungen zurückzuführen.

### 3.2.3 Heterologe Expression von MSRA2, 3 und 4 aus *C. reinhardtii* in *E. coli*

Um die Aktivität von MSRA2, 3 und 4 zu untersuchen und Antikörper zu erzeugen, erfolgte die heterologe Expression der Proteine in *E. coli*. Eine Expression des MSRA1-Proteins in *E. coli* war aufgrund des Selenocysteins innerhalb des katalytischen Zentrums nicht ohne weiteres möglich. Das vom *Chlamydomonas*-spezifischen SECIS-Element umgebene UGA Codon würde in *E. coli* nicht von einer Selenocystenyl-tRNA erkannt werden, sondern zum Abbruch der Translation führen.

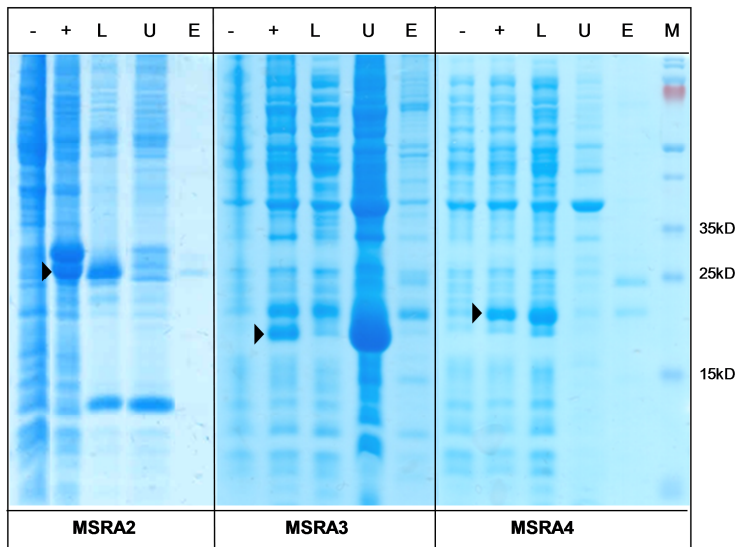
Im ersten Schritt wurden ausgehend von der cDNA in einer PCR die *msrA2*, 3 und 4-Sequenzen von *C. reinhardtii* amplifiziert und mit Hilfe der verwendeten Primer am 5` und 3`-Ende mit entsprechenden Schnittstellen versehen. Zunächst erfolgte die Klonierung der PCR-Produkte in den pJET1 Vektor bzw. in den pGEM-T Vektor. Als Expressionsvektor wurde anschließend das pQE-30 System der Fa. Qiagen genutzt (s. 2.3.9). Nach dem Verdau der Plasmide pGEM-*msrA2*, pGEM-*msrA4* und pJet-*msrA3* sowie des pQE-30 Plasmides mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wurden die PCR-Produkte gerichtet in den pQE-30 integriert (s. Abbildung 3.13). Durch diese Integration erhielten die *msrA*-Konstrukte ein N-terminales 6 x HIS-Tag. Die entstandenen Plasmide pQE*msrA2*, pQE*msrA3* und pQE*msrA4* wurden anschließend in den Expressionsstamm *E. coli* M15[pREP4] transformiert, der eine Kanamycinresistenz auf dem Repressor-Plasmid pREP4 trägt. Die erfolgreiche Transformation von pQE*msrA2*, pQE*msrA3* und pQE*msrA4* vermittelt den *E. coli*-Zellen zusätzlich eine Ampicillinresistenz.



**Abbildung 3.13: Klonierung von *msrA2*, *msrA3* und *msrA4*.** Die *msrA2*- und *4*-Konstrukte wurden am 5' sowie 3' Ende mit BamHI- bzw. HindIII-Schnittstellen, das *msrA3*-Konstrukt mit einer SacI- bzw. einer HindIII-Schnittstelle versehen. Durch Integration der *msrA*-Konstrukte (rot) in den pQE-30 Plasmid erhielten die rekombinanten Proteine nach Transformation und Expression in *E. coli* M15 [pREP4] ein N-terminales 6xHIS-Tag (blau).

Die Sequenzierung der Plasmide pQEmsrA2 und 4 bestätigte die Vollständigkeit der Sequenz sowie die korrekte Einpassung der *msrA*-Gene *in frame* mit der Sequenz der *Multiple Cloning Site* (MCS) des Plasmides. Die Sequenzierung des pQEmsrA3-Plasmids zeigte jedoch eine Punktmutation innerhalb des codierenden Bereiches von *msrA3* mit einem resultierenden Stopp-Signal (s. Anhang E). Ein Vergleich mit der Sequenz des Plasmids pJETmsrA3 und der sequenzierten *msrA3*-cDNA vor der Klonierung ergab, dass sich der Basenaustausch während der ersten Klonierung bzw. des ersten Transfers ereignet hatte. Bereits der pJETmsrA3 trug den Basenaustausch von Cytosin zu Thymin. Dieses vorzeitige Stopp-Codon führt zum Verlust von 74 Aminosäuren und somit zu einem ca. 8 kD kleineren Protein. Im *down stream*-Bereich dieser Mutation befand sich weiterhin eine 21 Basenpaar große Deletion. Diese Region war vor allem durch einen sehr hohen G/C-Gehalt charakterisiert (s. Anhang E). Wiederholte Versuche, das *msrA3*-Gen in den pQE-30 Vektor zu integrieren und in *E. coli* zu transformieren, ergaben immer die gleiche Punktmutation. Auch ein Wechsel des *E. coli* Stammes konnte diese Punktmutation nicht verhindern (Ergebnisse nicht gezeigt). Für erste Expressionsversuche wurde mit der verkürzten *msrA3*-Sequenz gearbeitet.

Die Expression der Fusionsproteine HIS-MSRA2, HIS-MSRA3 und HIS-MSRA4 wurde durch Zugabe von IPTG induziert (vgl. 2.5). Die *E. coli*-Proteine wurden unter nativen Bedingungen gemäß Qiagen-Protokoll präpariert und über eine Nickelagarose-Säule gereinigt. Es wurde jeweils nichtinduzierte, induzierte, lösliche und unlösliche Fraktion sowie das Nickelsäulen-Eluat mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.4.3) und verglichen. Die berechneten Molekulargewichte der Fusionsproteine betragen für HIS-MSRA2 ca. 30 kD und für HIS-MSRA4 ca. 25 kD. Durch das vorzeitige Stopp-Codon in der klonierten *msrA3*-Sequenz ergibt sich für HIS-MSRA3 ein Molekulargewicht von ca. 20 kD.



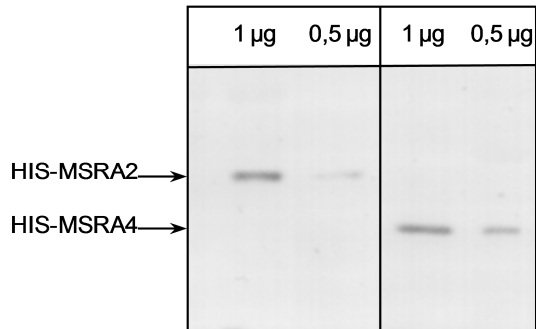
**Abbildung 3.14: Expressionsanalyse der rekombinanten Fusionsproteine HIS-MSRA2, HIS-MSRA3 und HIS-MSRA4 in *E.coli*.** Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Expression der rekombinanten Fusionsproteine HIS-MSRA2, 3 und 4 nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden äquivalente Mengen an Zellen vor (-) und nach Induktion über Nacht (+) sowie lösliche (L) und unlösliche (U) Proteinfraktion und Nickelsäuleneluat (E). Die schwarzen Pfeilspitzen markieren die putativen Fusionsproteine in den induzierten Zellen mit folgenden berechneten Größen: HIS-MSRA2 ca. 30 kD, HIS-MSRA3 ca. 20 kD und HIS-MSRA4 ca. 25 kD. (M = PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fa. Fermentas)

In Abbildung 3.14 ist das Ergebnis der Expressionsanalyse dargestellt. Die Proteine HIS-MSRA2 und 4 wurden heterolog von *E. coli* exprimiert und befanden sich fast ausschließlich in der löslichen Fraktion. Ein Vergleich mit den Markerproteinen zeigt, dass die Molekulargewichte der Expressionsprodukte leicht unter den berechneten Molekulargewichten liegen. Beide Proteine konnten erfolgreich über eine Nickelaffinitätschromatographie aufgereinigt werden (Abbildung 3.14, E). HIS-MSRA2 konnte dabei als einzelnes Protein ohne Verunreinigungen eluiert werden. Im Eluat von HIS-MSRA4 wurden zwei Proteine detektiert.

Für HIS-MSRA3 konnte ebenfalls eine Expression gezeigt werden. In Abbildung 3.14 wurde ein Expressionsprodukt markiert (schwarzer Pfeil), das HIS-MSRA3 entsprechen könnte. Da dieses Produkt in Form von *Inclusion Bodies* exprimiert wurde, konnte mit der gewählten Aufarbeitungsmethode (s. 2.5) keine spezifische Aufreinigung gezeigt werden. Im Eluat wurde eine Vielzahl von Proteinen unterschiedlicher Größe detektiert. Da HIS-MSRA nur als verkürztes, vermutlich nicht funktionelles und unlösliches Protein exprimiert werden konnte, wurde auf die weitere Analyse von MSRA3 verzichtet.

Zur Überprüfung von eluiertem HIS-MSRA2 bzw. HIS-MSRA4 erfolgte ein Antikörpernachweis. Es wurden jeweils 0,5 µg und 1 µg gereinigtes Protein über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte mittels α-HIS Antikörper und bestätigte somit, dass es sich bei den eluierten

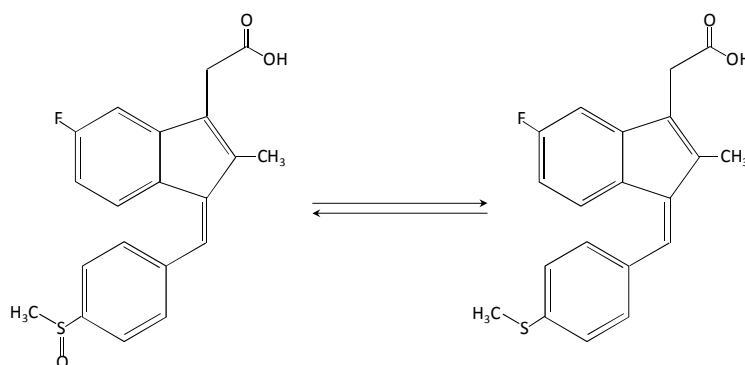
Expressionsprodukten um die Fusionsproteine HIS-MSRA2 und HIS-MSRA4 handelt (Abbildung 3.15). Die so nachgewiesenen, affinitätsgereinigten MSRA2 und MSRA4 Proteine wurden im nachfolgend beschriebenen Enzymassay eingesetzt.



**Abbildung 3.15: Ergebnis der Ni-Affinitätschromatographie der Fusionsproteine HIS-MSRA2 und HIS-MSRA4.** Dargestellt sind Ni-affinitätsgereinigtes HIS-MSRA2 und 4 nach SDS-PAGE, Transfer und Inkubation mit einem  $\alpha$ -HIS Antikörper (1:3.000). Aufgetragen wurden jeweils 0,5  $\mu$ g und 1  $\mu$ g Protein (Proteinbestimmung nach Bradford 2.4.2).

### 3.2.4 Nachweis der Reduktaseaktivität von MSRA-Proteinen aus *C. reinhardtii*

Für den Nachweis einer Reduktaseaktivität der MSRA-Proteine aus *C. reinhardtii* wurde ein Enzymassay genutzt, in dem Sulindac als Substrat für Methionisulfoxid-Reduktasen (MSR) eingesetzt wird (ETIENNE ET AL. 2003). Sulindac ist ein entzündungshemmendes Medikament, dessen Wirkung auf der Inhibierung der Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX) beruht. Sulindac ist eine inaktive Vorstufe und enthält eine Methylsulfoxid-Gruppe (Abbildung 3.16). Durch die Reduktion zu Sulindac-Sulfid entsteht der aktive COX Inhibitor.



**Abbildung 3.16: Sulindac als Substrat für MSRA.** Dargestellt sind die Strukturformeln von Sulindac und Sulindac-Sulfid. Sulindac enthält eine Methylsulfoxid-Gruppe, deren Reduktion eine Überführung in die aktive Form Sulindac-Sulfid bewirkt.

Die Inkubation von MSRAs mit Sulindac in Anwesenheit von Elektronendonoren führt zur Bildung von Sulindac-Sulfid. Als Elektronendonator dient das physiologische Thioredoxin zusammen mit einer Thioredoxin-Reduktase und NADPH.

Eine spezielle Extraktionsprozedur am Ende der Inkubation nutzt Unterschiede in den hydrophoben Eigenschaften von Sulindac und Sulindac-Sulfid. Unter Zugabe von Acetonitril wird Sulindac-Sulfid, im Gegensatz zu Sulindac, effizient in eine Benzolphase überführt und kann bei einer Wellenlänge von 340 nm detektiert werden. Die Bildung von Sulindac-Sulfid führt zu einer Erhöhung der Extinktion bei 340nm. Dabei entsprechen 50 nmol / ml Sulindac-Sulfid einer optischen Dichte von 0,910 und 50 nmol / ml Sulindac einer optischen Dichte von 0,030 (ETIENNE ET AL. 2003).

### 3.2.4.1 Reduktaseaktivität im MSRA-Lysat

Zur Etablierung eines Enzymassays wurden zunächst die ungereinigten MSRA2- und MSRA4-Lysate verwendet (vgl. Abbildung 3.14, **L**). Als Positivkontrolle wurde eine bereits charakterisierte und von Prof. S. Heinemann (Jena) zur Verfügung gestellte humane MSRA (hMSRA) genutzt (KUSCHEL ET AL. 1999). Diese lag durch Klonierung in den pQE-30 Vektor ebenfalls als HIS-Fusionsprotein vor. Als Negativkontrolle diente ein *E. coli*-Stamm, der einen pQE-30 Vektor ohne *msrA* enthielt (-MSRA). Durch Zugabe von IPTG wurde die Expression der HIS-Fusionsproteine induziert. Anschließend erfolgte die Isolierung der löslichen Proteinfractionen, welche jeweils die heterologe hMSRA bzw. MSRA2 oder MSRA4 aus *C. reinhardtii* enthielten. Von diesen *E. coli*-Lysaten wurde ein Volumen entsprechend 10 µg Protein dem Reaktionsmix zugegeben. Zur Bestimmung des Nullwertes wurde dem Reaktionsmix anstelle der Proteinlösung gleiche Mengen an Puffer zugesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 30 Minuten. Nach Extraktion wurde die optische Dichte der Benzolphase bei 340 nm bestimmt (s. 2.6).

**Tabelle 3.5: Reduktase-Aktivität der verschiedenen *E. coli*-Lysate. Angegeben wird die Menge an gebildetem Sulindac-Sulfid (SulS) in nmol (Mittelwert  $n=6$ ) mit Standardabweichung sowie die Aktivität. Eingesetzt wurde nicht gereinigtes *E. coli*-Lysat entsprechend 10 µg löslichem Protein.**

<i>E. coli</i> -Lysat:	nmol SulS <sup>1</sup>	Aktivität <sup>2</sup>
MSRA2	16,7 (±1,2)	22
MSRA4	5,95 (±0,66)	0,44
hMSRA (+)	17 (±1,5)	23
-MSRA (-)	5,73 (±0,14)	

<sup>1)</sup> Menge an gebildetem Sulindac-Sulfid (nmol) während 30 min Inkubation

<sup>2)</sup> Aktivität ist definiert als Menge an gebildetem Sulindac-Sulfid (nmol) pro Stunde (vgl. Etienne et al., 2003) abzüglich der *E. coli* spezifischen Reduktase-Aktivität (-MSRA)

Sowohl die Zugabe von MSRA2-, MSRA4- bzw. hMSRA-Lysat als auch die Zugabe von *E. coli*-Lysat ohne heterologe MSRA (-MSRA) zum Reaktionsansatz führte zur Bildung von Sulindac-Sulfid (vgl. Tabelle 3.5: nmol SulS). Da in *E. coli* verschiedene MSRs existieren, die Sulindac reduzieren können (ETIENNE ET AL. 2003), beruht die Bildung von Sulindac-Sulfid in der Negativkontrolle (-MSRA) vermutlich auf *E. coli*-eigenen Reduktasen und wurde deshalb zur Bestimmung der Aktivität der heterologen hMSRA bzw. MSRA2 und 4 jeweils abgezogen (Tabelle 3.5).

Das *E. coli*-Lysat mit heterolog exprimierter *C. reinhardtii* MSRA2 war in der Lage Sulindac zu reduzieren. Im Gegensatz dazu konnte nach Abzug der Negativkontrolle für das MSRA4 enthaltende Lysat kaum Aktivität nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle hMSRA war wie erwartet ebenfalls in der Lage Sulindac zu Sulindac-Sulfid zu reduzieren. Dabei wurden für hMSRA und *C. reinhardtii*-MSRA2 ähnliche Aktivitäten gemessen.

#### 3.2.4.2 Reduktaseaktivität der gereinigten Proteine

Nachdem für das ungereinigte MSRA2-Lysat eine Sulindac-Reduktion gezeigt werden konnte, erfolgte die Messung der über Ni-Affinitätschromatographie aufgereinigten heterologen Proteine. Dabei wurde jeweils gereinigte MSRA2 bzw. MSRA4 (1 µg) dem Reaktionsmix zugesetzt. Die Inkubation und Extraktion erfolgte wie unter 2.6 beschrieben.

**Tabelle 3.6: Aktivität von *C. reinhardtii* MSRA2 und MSRA4. Angegeben wird die Aktivität bezogen auf die Nutzung von Sulindac als Substrat.**

	Aktivität <sup>1</sup>
MSRA2	11,21
MSRA4	4,1

<sup>1)</sup> Aktivität ist definiert als Menge an gebildetem Sulindac Sulfid (nmol) pro µg Protein und Stunde (vgl. Etienne et al. 2003)

Mit Hilfe des Enzymassays mit Sulindac als Substrat und einem Thioredoxin-regenerierendem System als Elektronendonator konnte für *C. reinhardtii*-MSRA2 eine Reduktase-Aktivität gezeigt werden. Die Aktivität der *C. reinhardtii*-MSRA2 entspricht etwa 25 % der von Etienne et al. angegebenen Aktivität der *E. coli* MSRA. Für MSRA4 wurde unter diesen Bedingungen lediglich eine schwache Reduktase-Aktivität nachgewiesen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die *C. reinhardtii*-MSRA2 Sulindac als Substrat nutzen kann. Die Umsetzung von Sulindac zu Sulindac-Sulfid durch MSRA4 erfordert dagegen vermutlich höhere Enzymkonzentrationen. Auch bei Etienne et al. variierten die eingesetzten Konzentrationen sowie die ermittelten Aktivitäten der verschiedenen *E. coli*-MSRAs stark.

### 3.2.5 Analyse der MSRAs aus *C. reinhardtii* mit Hilfe eines Antikörpers

Auf Transkriptebene konnte eine Regulation der *msrA1*-, 2- und 3-Gene nachgewiesen werden. *MsrA4* wird auf RNA-Ebene kontinuierlich von der Zelle exprimiert (vgl. 3.2.2). Eine weitere Regulation ist auf Translationsebene möglich. Ein Antikörper, der MSRAs aus *C. reinhardtii* erkennt, stellt die Grundlage dieser Protein-Analyse dar. Zunächst wurde die Herstellung eines Antiserums gegen MSRA2 bzw. MSRA4 in Auftrag gegeben. Die Gewinnung der polyklonalen Antikörper erfolgte nach Injektion der rekombinanten Fusionsproteine gemäß einem standardisierten Immunisierungsprotokoll. Die Spezifität der Antiseren wurde mittels Western Blot-Analyse getestet (Ergebnisse nicht gezeigt). Die MALDI-TOFF Analyse der gebundenen Antigene zeigte jedoch, dass der polyklonale Antikörper statt mit den MSRA-Proteinen mit Proteinen des LHCII-Komplexes interagiert.

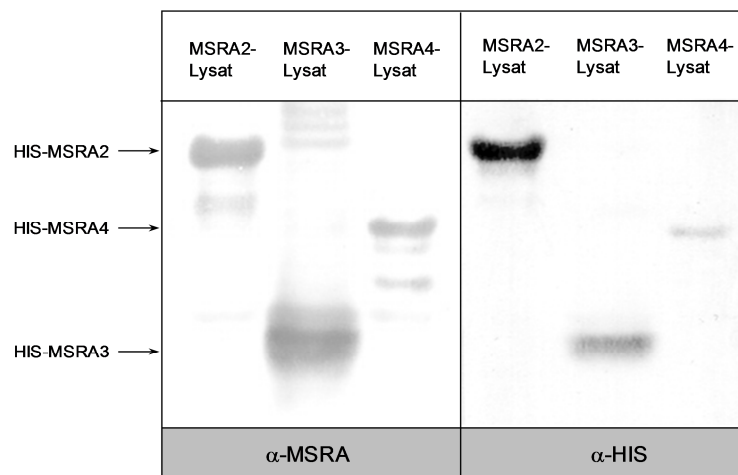
Zur Vermeidung solcher Kreuzreaktionen bei der Antikörperreaktion, wurde in einer zweiten Immunisierung ein synthetisches Peptid verwendet. Dazu wurde in Kooperation mit der Firma Agrisera (Vännäs, Schweden) ein Peptidantikörper in Kaninchen entwickelt, der sowohl MSRAs in *A. thaliana* als auch in *C. reinhardtii* erkennen soll. Basierend auf einem Vergleich der Aminosäuresequenz von MSRA-Proteinen aus *A. thaliana* und *C. reinhardtii* wurde das zehn Aminosäure große Peptid HDPTTLNRQG ausgewählt.

Dieses Peptid entspricht der Sequenz von AtMSRA1, 3 und 4. Das Protein AtMSRA2 zeigt 90 % Homologie zur Peptidsequenz, die MSRA2-, 3- und 4-Proteine aus *C. reinhardtii* zeigen 80 % Homologie zur Peptidsequenz. AtMSRA5 und CrMSRA1 besitzen nur geringe Homologien mit der Peptidsequenz (vgl. Abbildung 3.17).





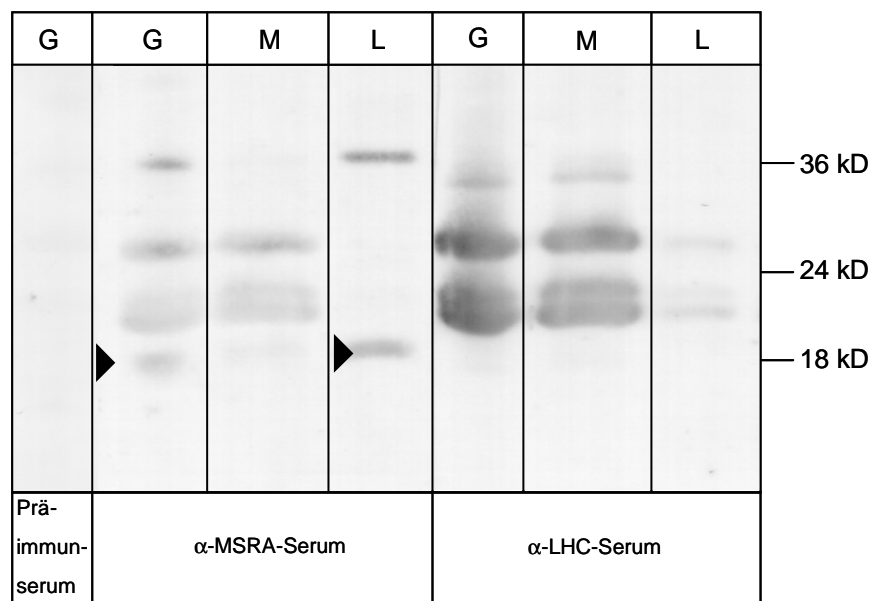
Die Spezifität des gewonnenen Antiserums wurde zunächst mit Hilfe der rekombinanten HIS-MSRA2, 3 und 4 Proteine überprüft (vgl. 3.2.3). Der gegen MSRA gerichtete Antikörper erkennt sowohl HIS-MSRA2 (30 kDa), als auch HIS-MSRA3 (20 kDa) und HIS-MSRA4 (25 kDa) (Abbildung 3.18,  $\alpha$ -MSRA). Zusätzlich erfolgte der Nachweis der rekombinanten Fusionsproteine mit einem gegen den 6xHIS-Tag gerichteten Antikörper (Abbildung 3.18,  $\alpha$ -HIS). Die drei rekombinanten HIS-MSRA-Proteine werden sowohl vom  $\alpha$ -MSRA als auch vom  $\alpha$ -HIS erkannt. Das MSRA-Antiserum detektiert im Lysat von HIS-MSRA2 und HIS-MSRA4 zwei weitere, weniger prominente Proteine, die ein geringeres Molekulargewicht aufweisen und nicht vom  $\alpha$ -HIS erkannt werden. Hier handelt es sich vermutlich um Abbauprodukte ohne HIS-Tag.



**Abbildung 3.18: Erkennung der rekombinanten MSRA-Proteine.** Gezeigt werden die Spezifität des MSRA-Antikörpers anhand der Erkennung der rekombinanten Fusionsproteine HIS-MSRA2, 3 und 4 sowie die Erkennung dieser Fusionsproteine durch einen  $\alpha$ -HIS Antikörper. Es wurden jeweils MSRA2, MSRA3 sowie MSRA4- Bakterienlysat über eine SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und anschließend mit  $\alpha$ -MSRA (1:1000) bzw.  $\alpha$ -HIS (1:3000) als primären Antikörper und einem mit einer Alkalischen Phosphatase gekoppelten  $\alpha$ -rabbit (1:3000) als sekundären Antikörper inkubiert.

Im Anschluss erfolgte der Nachweis der MSRAs im Proteinextrakt von *C. reinhardtii*. Auf Transkriptebene war unter Normalbedingungen lediglich *msrA4* nachweisbar, *msrA1*, 2 und 3 konnten nur bei Starklicht-, UV- und Hitze-Stress detektiert werden. Um die MSRA-Proteine zu akkumulieren, wurden deshalb Wildtyp-Zellen 45 Minuten bei Starklicht ( $1.800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) inkubiert (vgl. 2.2.2). Anschließend wurde Gesamt-Zellprotein isoliert (vgl. 2.4.1.1). Wie bereits erwähnt, hatten vorangegangene Versuche gezeigt, dass Antikörper, die gegen *Chlamydomonas*-MSRA gerichtet sind, häufig mit Proteinen aus den LHC-Komplexen kreuzreagieren. Proteine des LHC-Komplexes kommen in großen Mengen in photosynthetisch aktiven Organismen vor und sind für Kreuzreaktionen mit diversen

Antikörpern bekannt. Um Kreuzreaktionen zu vermeiden, erfolgte die Abtrennung dieser Proteine. Dazu wurde Gesamtproteinextrakt durch Zentrifugation in Membranfraktion und lösliche Proteinfraction getrennt. Die lösliche Proteinfraction sollte nun möglichst keine bzw. nur geringe Mengen an LHC-Proteinen enthalten. Alle Proteinfractionen wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (s. 2.4.1.2, 2.4.3, 2.4.5). Eine gleichmäßige Beladung wurde mit Hilfe einer Ponceaurot-Färbung der Membran überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt).



**Abbildung 3.19: Erkennung von Antigenen in verschiedenen Proteinfractionen von *C. reinhardtii* durch α-MSRA bzw. α-LHC.** Die Abbildung zeigt die Erkennung verschiedener Antigene im Gesamtproteinextrakt (G), der Membranfraktion (M) und der löslichen Proteinfraction (L) durch α-MSRA bzw. α-LHC. Für den Gesamtproteinextrakt und die Membranfraktion wurden jeweils Proteinmengen entsprechend 3 µg Chlorophyll aufgetragen. Von der löslichen Proteinfraction wurde ein zur Membranfraktion äquivalentes Volumen aufgetragen. Die Proteinfractionen wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Als primäre Antikörper wurden verwendet: Präimmunserum (1:1.000), α-MSRA (1:1.000) bzw. α-LHC (1:10.000). Als sekundärer Antikörper diente ein mit einer Alkalischen Phosphatase gekoppelter α-rabbit (1:3.000). Der schwarze Pfeil markiert ein 18 kD großes Protein, das derprozessierten MSRA2 aus *C. reinhardtii* entsprechen würde.

Abbildung 3.19 zeigt die Erkennung verschiedener Proteine durch das α-MSRA Antiserum im Gesamtproteinextrakt (G). Inkubiert man Gesamtproteinextrakt mit vor der Immunisierung entnommenem Präimmunserum, werden keine Proteine detektiert. Somit sind die vom Antiserum erkannten Proteine auf eine Antikörperbildung durch die Immunisierung der Kaninchen mit dem synthetisch hergestellten Peptid zurückzuführen. Durch die Immunisierung kam es zur Bildung eines Antikörpergemisches, das neben MSRA noch weitere Proteine erkennt.

Bei den größeren Proteinen im 20 bis 30 kD-Bereich des Gesamtproteinextrakts und der Membranfraktion handelt es sich vermutlich um Proteine des LHC-Komplexes, da diese sowohl vom  $\alpha$ -MSRA Serum als auch vom  $\alpha$ -LHC Antikörper detektiert werden. Das  $\alpha$ -MSRA Serum erkennt zusätzlich ein Protein von 18 bis 20 kD, das ungefähr einer prozessierten MSRA2 entsprechen würde, sowie ein ca. 40 kD großes Protein.

In der durch Abtrennung der Membranproteine (Abbildung 3.19, M) erhaltenen löslichen Proteinfraction (L) erkannte  $\alpha$ -MSRA nur noch ein ca. 20 kD und ein ca. 40 kD großes Protein. Diese beiden Proteine wurden nicht vom  $\alpha$ -LHC Antikörper detektiert. Das Molekulargewicht dieser Proteine entspricht ungefähr einer prozessierten MSRA2 und einem MSRA2-MSRA2 Dimer.

### 3.2.6 Lokalisierung der MSRA-Proteine in der Algenzelle

#### 3.2.6.1 Vorhersagen zur subzellulären Lokalisierung

Bei den vier in *C. reinhardtii* identifizierten MSRA handelt es sich um kerncodierte Proteine. Wie aus der Literatur bekannt, sind MSRA in verschiedenen Organellen lokalisiert. Werden Proteine nach der Translation in Organelle importiert, tragen sie spezifische Transportsignale in Form von Transitpeptiden. Durch die Analyse dieser Transitpeptide mit verschiedenen Vorhersageprogrammen kann man überprüfen, ob die einzelnen MSRA aus *C. reinhardtii* in verschiedene Kompartimente der Zelle dirigiert werden. Zur Vorhersage der Lokalisierung wurden die Programme PREDATOR, TARGETP, CHLOROP und MITOPROT verwendet. PREDATOR und TARGETP geben Aussagen zur möglichen Mitochondrien- oder Chloroplastenlokalisierung. CHLOROP ist dagegen auf die Lokalisierung in Chloroplasten und MITOPROT auf Lokalisierungen in Mitochondrien beschränkt. Die Ergebnisse einer solchen Vorhersage sind in Tabelle 3.7 dargestellt. Für MSRA1 wird keine Chloroplasten- bzw. Mitochondrienlokalisierung vorhergesagt. Keines der Programme liefert entsprechende Hinweise. MSRA2 wird dagegen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit in eines der beiden Organelle importiert. Sowohl die PREDATOR- als auch die MITOPROT-Analyse liefern eindeutige Hinweise für eine Mitochondrienlokalisierung. Die Werte der TARGETP-Vorhersage für MSRA2 prognostizieren dagegen mit gleicher Wahrscheinlichkeit den Import sowohl in Chloroplasten als auch in Mitochondrien. Betrachtet man die TARGETP-Analyse für MSRA3, zeigt diese eine deutliche Tendenz in Richtung Mitochondrienimport. Auch die PREDATOR- und die MITOPROT-Daten unterstützen diese Prognose. Den Vorhersagen der Programme zufolge wird MSRA4 in keines der beiden Organelle importiert. Die

Wahrscheinlichkeit einer Mitochondrien- bzw. Chloroplastenlokalisierung sind gering. Die CHLOROP-Analyse liefert für keines der Proteine aussagekräftige Daten. Fasst man die Analyse zusammen, sind MSRA2 und MSRA3 potentielle Kandidaten für einen Import in Chloroplasten oder Mitochondrien bzw. in beide Organelle. Da solche Vorhersageprogramme nur erste Hinweise über eine mögliche subzelluläre Lokalisierung liefern, müssen die Ergebnisse experimentell überprüft werden.

**Tabelle 3.7: Vorhersagen zur subzellulären Lokalisierung der MSRA Proteine aus *C. reinhardtii*. Angegeben werden die Wahrscheinlichkeiten mit denen die Programme PREDATOR, TARGETP, CHLOROP und MITOPROT den Import von MSRA1, 2, 3 und 4 in Chloroplasten bzw. Mitochondrien vorhersagen (je höher der Zahlenwert, desto höher die Import-Wahrscheinlichkeit).**

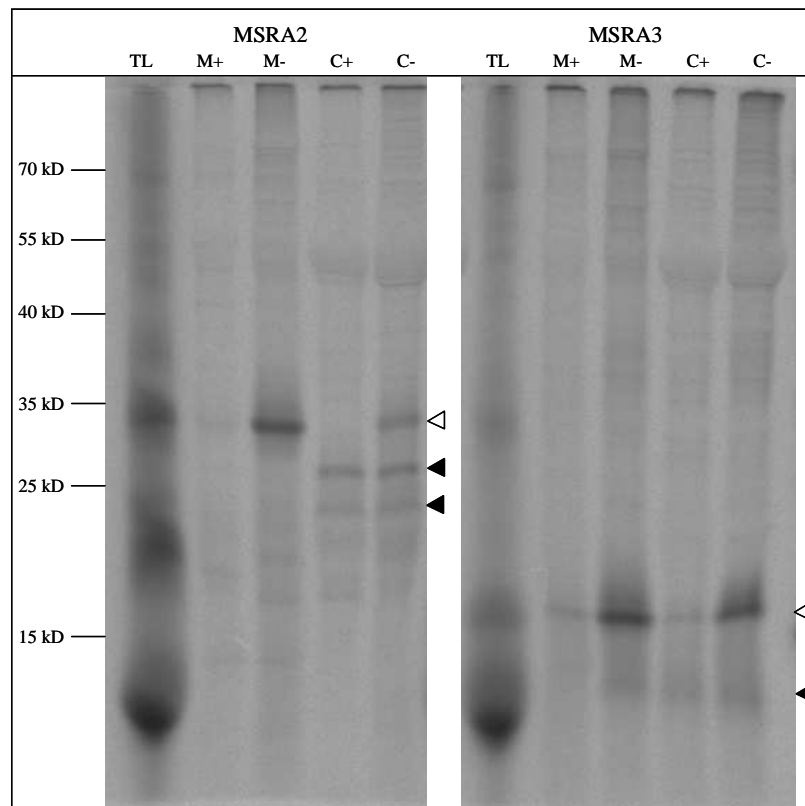
	Organell	TARGETP	PREDATOR	MITOPROT	CHLOROP
MSRA1	Chloroplast	0,169	0,01	-	0,47
	Mitochondrium	0,082	0,00	0,093	-
MSRA2	Chloroplast	0,479	0,1	-	0,527
	Mitochondrium	0,434	0,46	0,95	-
MSRA3	Chloroplast	0,187	0,03	-	0,507
	Mitochondrium	0,718	0,33	0,994	-
MSRA4	Chloroplast	0,075	0,00	-	0,44
	Mitochondrium	0,037	0,01	0,13	-

### 3.2.6.2 In Organello-Import von *in vitro* translatierten MSRA-Proteinen

Die *in silico*-Analyse ergab eine mögliche Mitochondrienlokalisierung für MSRA3 und eine mögliche Mitochondrien- und/oder Chloroplastenlokalisierung für MSRA2. Diese Vorhersagen sollten durch *in organello*-Importe überprüft werden. Dazu wurden *in vitro* Importsysteme genutzt, die von der Arbeitsgruppe Klösgen (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institutsbereich Pflanzenphysiologie) bereits etabliert wurden und auf Arbeiten von Rudhe et al. basieren (RUDHE ET AL. 2002).

Zunächst erfolgte eine *in vitro* Translation der MSRA2- und MSRA3-Vorläuferproteine. Dabei wurde radioaktiv markiertes  $^{35}\text{S}$ -Cystein in die Proteine eingebaut. Anschließend erfolgte eine Inkubation dieser Vorläuferproteine bei 25°C im Licht mit isolierten Chloroplasten bzw. isolierten Mitochondrien aus Erbse (*Pisum sativum*). Durch eine schnelle Absenkung der Temperaturen (0-4°C) wurde der Import nach 20 Minuten abgestoppt. Nach dem Import wurde ein Teil des Ansatzes mit der Protease Thermolysin behandelt, um nicht importierte Proteine abzubauen. Der andere Teil blieb unbehandelt. Nach mehreren Wasch-

und Zentrifugationsschritten wurden die Proben über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Eine Autoradiographie sollte die radioaktiv markierten Proteine nachweisen.



**Abbildung 3.20: In organello Import der Proteine MSRA2 und MSRA3 in Chloroplasten und Mitochondrien.** Dargestellt ist das Ergebnis der Autoradiographie nach Auftrennung über eine SDS-PAGE. Aufgetragen wurden neben dem *in vitro* Translationsansatz (TL), die Proben des Mitochondrienimports (M) bzw. des Chloroplastenimports (C) von MSRA2 und MSRA3. Nach dem Import wurde ein Teil des Importansatzes mit der Protease Thermolysin behandelt (+), der andere Teil wurde ohne Proteasebehandlung weitergeführt (-). Vorläuferproteine werden durch weiße Pfeile und mögliche importierte, prozessierte Proteine werden durch schwarze Pfeile markiert.

Das Ergebnis der Autoradiographie ist in Abbildung 3.20 dargestellt. Für MSRA2 konnte der Import in den Chloroplasten gezeigt werden. Neben dem Vorläuferprotein (weißer Pfeil) mit einem Molekulargewicht von ca. 32 kD wurden zwei Importprodukte (schwarze Pfeile) nachgewiesen, bei denen es sich um prozessierte reife MSRA2-Proteine mit einer Masse von ca. 23 bzw. 26 kD handeln könnte. Ein Vergleich der Thermolysin-behandelten und der Thermolysin-unbehandelten Probe zeigt, dass lediglich das Vorläuferprotein von der Protease abgebaut wurde. Die beiden kleineren Proteine finden sich in der mit Thermolysin und in der ohne Thermolysin behandelten Probe. Offensichtlich wurden diese Proteine durch den Import in den Chloroplasten vor einem Abbau durch Thermolysin geschützt und konnten so nachgewiesen werden. Beim Mitochondrienimport findet man für MSRA2, außer dem Signal des Vorläuferproteins, keine vergleichbaren Importsignale mit einem geringeren Molekulargewicht.

---

Für MSRA3 kann kein eindeutiges Importergebnis gezeigt werden (Abbildung 3.20). Neben dem vermutlichen Vorläuferprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 15 kD (weißer Pfeil) wurde sowohl beim Mitochondrien- als auch beim Chloroplastenimport ein zweites Protein detektiert, das als diffuse, schwache Bande erkennbar ist (schwarzer Pfeil). Durch die geringe Intensität dieses Signals kann in diesem Fall nicht von spezifischen Importsignalen gesprochen werden. Ein Import von MSRA3 in den Chloroplasten bzw. in die Mitochondrien kann durch dieses Ergebnis allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, insbesondere, da ein heterologes Importsystem verwendet wurde.

### 3.2.7 Zusammenfassung – MSRAs in *C. reinhardtii*

Im Kerngenom der Grünalge *C. reinhardtii* wurden vier *msrA*-Gene identifiziert. Alle vier Gene werden exprimiert und sind auf Transkriptebene nachweisbar. Die Gene *msrA1* bis 3 werden unter bestimmten Umweltbedingungen, die oxidativen Stress in der Zelle verursachen, verstärkt akkumuliert. Das *msrA4*-Gen wird dagegen konstitutiv exprimiert. Ein spezifischer Nachweis der MSRA-Proteine konnte nicht gezeigt werden. Mit Hilfe des gegen MSRA gerichteten Antikörpers konnte lediglich ein lösliches Protein nach Starklichtbehandlung detektiert werden, das dem Molekulargewicht von MSRA2 entspricht. Für MSRA2 konnten neben einer *in vitro* Reduktase-Aktivität auch Hinweise zur Lokalisation im Chloroplasten, einer Hauptquelle von ROS in Pflanzen, gezeigt werden. Damit liefern die Untersuchungen Hinweise, dass *C. reinhardtii* über aktive MSRA-Enzyme verfügt, die zusammen mit Methionin-Resten spezifischer Substrate einen effektiven Schutz der Zelle vor ROS darstellen könnten.

## 4 Diskussion

### 4.1 Methionine in Proteinen

Methionine sind Aminosäuren mit einer hydrophoben, aber flexiblen Seitenkette, die leicht oxidiert werden kann. Für die Proteinfunktion hat diese Oxidation unterschiedliche Konsequenzen. Sie kann die Bindungskraft zu anderen Protein-Untereinheiten schwächen, die Enzymaktivität reduzieren oder sogar Enzyme inaktivieren. In Verbindung mit einem reduzierenden Enzym, der Methioninsulfoxid-Reduktase, wird neben der Proteinregulation durch einen Methionin-Oxidations-/ Reduktions-Zyklus auch eine endogene, antioxidative Funktion der Methionine diskutiert (VOGT 1995; STADTMAN & LEVINE 2003; LUO & LEVINE 2009).

Wie in verschiedenen Studien gezeigt wurde, agieren vor allem Oberflächen-exponierte Methionine in Proteinen als endogene Antioxidanzien. Aufgrund ihrer Oxidationsanfälligkeit werden sie bevorzugt von ROS, u.a. Singulett-Sauerstoff, oxidiert und schützen damit funktionell wichtige Reste innerhalb des Proteins vor Oxidation (LEVINE ET AL. 1996; GUSTAVSSON ET AL. 2001). Man bezeichnet diesen Mechanismus auch als ROS-*Scavenging*. In vielen dieser Proteine, z.B. dem Hsp21 aus *A. thaliana* oder einer Glutamin-Synthetase aus *E. coli*, kann eine bestimmte Anzahl an Methioninen oxidiert werden, ohne den proteolytischen Abbau dieser Proteine zu beeinflussen oder die katalytische Aktivität zu senken. Erst wenn eine bestimmte Anzahl dieser Methionine oxidiert vorliegt, kommt es zu einem Aktivitätsverlust. Innerhalb dieses „Methionin-Fensters“ können Proteine durch die Aktivität einer Methioninsulfoxid-Reduktase repariert werden, indem Methioninsulfoxid zu Methionin reduziert wird. Dieser zyklische Oxidation/Reduktion-Mechanismus bietet ein enormes antioxidatives Potential unter oxidativen Stressbedingungen.

Innerhalb der Thylakoidmembran der Chloroplasten ist in besonderem Maße das Membran-integrale D1-Protein einer oxidativen Schädigung ausgesetzt. Das D1-Protein ist von einem schnellen *Turnover* gekennzeichnet. Durch diesen schnellen Abbau und die Neusynthese des D1-Proteins wird die Zelle vor oxidativen Schäden geschützt (ARO ET AL. 1993). Im Rahmen der *Akzeptorseiten-induzierten* Photoinhibition wird Singulett-Sauerstoff, der u.a. durch Ladungstrennung innerhalb von PSII entsteht, als Ursache für die Schäden am D1-Protein



---

diskutiert (OKADA ET AL. 1996; KRIEGER-LISZKAY 2005; VASS 2012). Im Fall des D1-Proteins wären deshalb nicht nur Oberflächen-exponierte Methionine sondern vor allem Methionine in räumlicher Nähe zum P680, einem Entstehungsort von ROS, als potentielle Antioxidanzien von Bedeutung.

Durch eine *in silico*-Analyse des D1-Proteins (s. 3.1) wurden die Methionine 172, 183 und 194 als Reste mit räumlicher Nähe zum P680 identifiziert. Mit etwas größerem Abstand zum Reaktionszentrum ist Methionin 293 lokalisiert. Über die Bedeutung der Methionine bezüglich Struktur und Stabilität des D1-Proteins bzw. deren Funktion im Protein ist bislang nichts bekannt. Um dies zu untersuchen, wurden die Methionine 172, 183 und 194, die sich in unmittelbarer Nähe zum Reaktionszentrum P680 befinden, sowohl gegen Alanin als auch gegen Leucin ausgetauscht. Zur physiologischen Charakterisierung der Mutanten erfolgten Untersuchungen des photoautotrophen Wachstums sowie des D1-Abbaus. Alanin ist eine kleine neutrale Aminosäure und wird häufig für derartige Substitutionen verwendet. Um Struktureffekte der Mutanten zu minimieren, wurden diese Methionine zusätzlich gegen Leucin substituiert. Methionin und Leucin sind hydrophobe Aminosäuren mit dem gleichen van der Waals-Volumen (DARBY & CREIGHTON 1993). Für Methionin 293, das eine größere Entfernung zum P680 aufweist, wurde dagegen lediglich eine Alanin-Mutante erstellt.

## **4.2 Bedeutung der Methionine des D1-Proteins von *C. reinhardtii***

### **4.2.1 Die Methioninmutanten**

Der Austausch der verschiedenen Methionine beeinflusste das photoautotrophe Wachstum sowie den D1-Abbau im Starklicht unterschiedlich (vgl. Tabelle 4.1). Dabei zeigten die Ergebnisse der einzelnen Mutanten, dass ein Einfluss von Position bzw. eingebrachter Aminosäure für die einzelnen Methionine differenziert betrachtet werden muss.

**Tabelle 4.1: Charakterisierung der Mutanten. Angegeben sind folgende physiologische Parameter: photoautotrophes Wachstum, PSII-Effizienz,  $^1\text{O}_2$ - bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Toleranz (Wachstum in Gegenwart von Bengalrosa bzw. Wasserstoffperoxid), D1-Abbau im Starklicht und in Dunkelheit in Gegenwart von CAP, D1-Synthese im Starklicht ohne CAP sowie Recovery-Vermögen im Vergleich zum Referenzstamm IL.**

	Photoauto. Wachstum (Standardwachstumsbedingungen)	PSII- Effizienz	$^1\text{O}_2$ - Toleranz	$\text{H}_2\text{O}_2$ - Toleranz	D1-Abbau Starklicht (+ CAP)	D1-Abbau Dunkelheit (+ CAP)	D1-Synthese Starklicht (- CAP)	Recovery (+ CAP)
<b>M172A</b>	--	n. b.	n. b.	n. b.	+	n. b.	n. b.	n. b.
<b>M172L</b>	O	O	-	O	+	O	O	O
<b>M183A</b>	-	n. b.	n. b.	n. b.	+	n. b.	n. b.	n. b.
<b>M183L</b>	--	O	-	O	+	O	-	O
<b>M194A</b>	O	n. b.	n. b.	n. b.	+	n. b.	n. b.	n. b.
<b>M194L</b>	O	O	-	O	+	O	O	O
<b>M293A</b>	O	n. b.	n. b.	n. b.	O	n. b.	n. b.	n. b.

(O keine Veränderung, - reduziert, -- stark reduziert, + verstärkt im Vergleich zum Referenzstamm IL; n. b. = nicht bestimmt)

Methionin 293 befindet sich entsprechend des PSII-Modells von *T. elongatus* (FERREIRA ET AL. 2004) in Helix V und ist am weitesten von P680 und den akzessorischen Chlorophyllen entfernt (Abbildung 3.3). Mutante M293A war im photoautotrophen Wachstum kaum eingeschränkt und zeigte darüber hinaus einen im Vergleich zum Referenzstamm IL unveränderten D1-Abbau im Starklicht. Der Austausch des Methionins 293 in Helix V gegen Alanin veränderte offensichtlich diesen Bereich des Proteins strukturell kaum. Ein Zusammenhang zwischen Methionin 293 und einem potentiellen *Scavenging* von ROS ist somit nicht unmittelbar ersichtlich. Vermutlich ist Methionin 293 aufgrund der größeren Entfernung zum P680 für ROS physiologisch nicht relevant. Da für Methionin 293 bereits die Alanin-Mutante keine Veränderungen zeigte, wurde auf die Erstellung der Leucin-Mutante als Kontrolle bezüglich potentieller Struktureffekte verzichtet.

Wie der Austausch von Methionin 293 zeigte auch der Austausch von Methionin 194 in Helix IV des D1-Proteins keinen Einfluss auf das photoautotrophe Wachstum der entsprechenden Mutanten. Sowohl die Alanin- als auch die Leucin-Mutante wuchs im Vergleich zur Referenz unverändert. Dass Veränderungen in diesem Bereich des D1-Proteins kaum Einfluss auf das photoautotrophe Wachstum haben, zeigten bereits frühere Arbeiten. Dabei wurde für eine Mutante mit einem Austausch von Isoleucin gegen Valin an Position

---

192 ebenfalls ein unverändertes photoautotrophes Wachstum festgestellt (SCHULZE 2002). Der D1-Abbau im Starklicht war dagegen im Vergleich zur Referenz deutlich verstärkt und lieferte damit einen ersten Hinweis zum Einfluss dieses Restes auf die Stabilität des Proteins. In den physiologischen Eigenschaften unterschieden sich Alanin- und Leucin-Mutante nicht. Für diese Position war offensichtlich das Ausmaß der strukturellen Veränderungen nicht entscheidend für den Phänotyp der entsprechenden Mutante.

Methionin 172 und 183 befinden sich im *loop*-Bereich zwischen Helix III und IV des D1-Proteins. Diese *loop*-Region ist für die Wasserspaltung, speziell für die Bindung des Mangan-Clusters, von Bedeutung. Mutanten mit einem Austausch an dieser Position waren, mit Ausnahme von M172L, in ihrem Wachstum stark eingeschränkt. Der D1-Abbau war im Vergleich zur Referenz verstärkt. Auch die Methionine 172 und 183 scheinen somit für die Stabilität des Proteins von Bedeutung zu sein. Wie erwartet, verursacht die Substitution der beiden Methionine mit der geringsten Entfernung zu den Chlorophyllen die stärksten physiologischen Veränderungen der Mutanten. Bei Methionin 183 spielte es dabei keine Rolle, ob der Austausch gegen Alanin oder Leucin erfolgte. Lediglich das Ausmaß der Wachstumsreduktion unterschied sich zwischen M183A und M183L. Hier führte nicht nur der Einbau des in Größe und Struktur unterschiedlichen Alanins, sondern auch der Einbau des strukturell ähnlichen Leucins offensichtlich zu weitreichenden strukturellen und funktionellen Veränderungen des D1-Proteins.

Im Gegensatz zu den anderen Methioninen unterschieden sich bei Methionin 172 die Alanin- und Leucin-Mutante deutlich im photoautotrophen Wachstum. Während M172A deutlich schlechter wuchs als der Referenzstamm IL, zeigte M172L keine Unterschiede im Wachstum. Vermutlich führte der Einbau eines Alanins zu größeren strukturellen Veränderung des D1-Proteins als der Einbau eines Leucins. An Position 172 erhielt ein eingebautes Leucin offensichtlich aufgrund seiner Ähnlichkeit mit Methionin die strukturellen und funktionellen Eigenschaften des D1-Proteins und ermöglichte so ein unverändertes photoautotrophes Wachstum. Dieser Unterschied zwischen den beiden Substitutionen wurde nur bei Methionin 172 festgestellt. Der Abbau des D1-Proteins war dagegen unabhängig von der Art der Substitution verstärkt.

#### 4.2.2 Einfluss der Methionin-Substitution auf das photoautotrophe Wachstum

Die Ergebnisse zeigen, dass die Lokalisation der ausgetauschten Methionine innerhalb des D1-Proteins das photoautotrophe Wachstum der jeweiligen Mutante maßgeblich beeinflusst. Während der Austausch eines weit vom Reaktionszentrum P680, d.h. vom Entstehungsort reaktiver Sauerstoffspezies, entfernten Methionins keine Veränderungen der physiologischen Eigenschaften der entsprechenden Mutante bewirkte, hatte der Austausch von nah zum P680 lokalisierten Methioninen, v.a. bei Methionin 183, Auswirkungen auf das Algenwachstum. Außerdem könnte neben der räumlichen Entfernung zum P680 auch die Lokalisation der Methionine innerhalb spezieller Strukturen des D1-Proteins das photoautotrophe Wachstum der Mutanten beeinflussen. Methionin 194 und 293 sind in einer Helixstruktur lokalisiert. Beide Reste waren austauschbar, ohne das Wachstum der Algen zu stören oder zu beeinflussen. Die für die Wasserspaltung wichtige *loop*-Region zwischen Helix III und IV spielte dagegen für das photoautotrophe Wachstum eine bedeutende Rolle. Der Austausch von Methioninen in diesem Bereich führte, außer bei M172L, zu einer Wachstumsreduktion unter Standardbedingungen. Diese *loop*-Region des D1-Proteins ist an der Bindung des Mangan-Clusters beteiligt. Strukturelle Veränderungen in diesem Bereich können die Bindung zwischen der Donor-Seite des PSII und dem Mangan-Cluster schwächen. Das kann einen reduzierten Elektronentransport vom Wasser zum oxidierten P680 verursachen und damit die für das photoautotrophe Wachstum essentielle Photosynthese-Leistung herabsetzen. Dabei scheint Position 183 weniger flexibel für strukturelle Veränderungen zu sein als Position 172. Sowohl die Substitution von Methionin 183 gegen Alanin, als auch gegen das strukturell ähnliche Leucin, erhält die D1-Struktur offensichtlich nicht, da beide Mutanten ein verschlechtertes photoautotrophes Wachstum zeigten. Abhängig vom Grad der Strukturänderung des D1-Proteins in den Mutanten, könnte somit die Bindung zum Mangan-Cluster unterschiedlich stark verändert und somit auch das Wachstum in der jeweiligen Mutante unterschiedlich stark beeinflusst werden. Da bei geringen Lichtintensitäten auch die Konzentration an ROS geringer ist, wäre die Untersuchung des photoautotrophen Wachstums der Mutanten bei Lichtintensitäten unter  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  eine weitere wichtige Größe, um die Mutanten detaillierter zu charakterisieren. Möglicherweise ist das photoautotrophe Wachstum der Mutanten bei geringen Lichtintensitäten kaum oder nicht eingeschränkt. Leider konnte dieses Experiment aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

### 4.2.3 Einfluss der Methionin-Substitution auf den D1-Abbau

Im PSII wird unter oxidativen Bedingungen vor allem das D1-Protein geschädigt und verstärkt abgebaut (ARO ET AL. 1993). Als Auslöser für den Abbau von geschädigtem D1-Protein durch diverse Proteasen wird u.a. die allgemeine Destabilisierung infolge geschädigter Pigmente bzw. oxidiertes Proteinseitenketten diskutiert (NIXON ET AL. 2005). Durch die Aminosäuresubstitution im D1-Protein der Mutanten könnte eine solche Destabilisierung ebenfalls verursacht werden. Der verstärkte D1-Abbau der Methionin-Mutanten könnte somit durch eine erhöhte Starklichtschädigung, aber auch allein durch die strukturelle Veränderung des D1-Proteins der Mutanten initiiert werden. Um das zu klären, erfolgte das Monitoring des D1-Abbaus in Dunkelheit, das heißt ohne photooxidative Schädigung. Wie die Ergebnisse zeigten, wurden im Dunkeln jedoch keine unterschiedlichen Abbauraten zwischen Mutanten und Referenzstamm IL festgestellt (s. 3.1.2.3). Da der D1-Abbau der Mutanten damit nur im Starklicht deutlich verstärkt, aber im Dunkeln unverändert war, schädigten vermutlich im Starklicht gebildete ROS das mutierte D1-Protein und verursachten damit den schnelleren Abbau. Die unveränderte Stabilität des D1-Proteins der Mutanten ohne photosynthetisch erzeugte ROS zeigte, dass eine potentielle Destabilisierung infolge der Aminosäuresubstitution allein als initiales Ereignis für den verstärkten D1-Abbau unwahrscheinlich ist. Darüber hinaus zeigten auch Mutanten aus *A. thaliana* mit einem Austausch von konservierten Methioninen gegen Leucin im Hitzeschockprotein Hsp21 keine Konformationsänderungen nach Oxidation (GUSTAVSSON ET AL. 2001). Die Leucin-Mutanten bildeten vielmehr eine stabilere Oligomer-Struktur, während im *Arabidopsis*-Wildtyp eine Auflösung der Sekundärstruktur nach Oxidation der Methionin-Reste gezeigt wurde. Durch die Oxidation der Methionine wird aufgrund einer sinkenden Hydrophobie bzw. reduzierten strukturellen Flexibilität innerhalb des Proteins eine Konformationsänderung verursacht (VOGT 1995; GUSTAVSSON ET AL. 2001). Vermutlich wirkt ein dem Methionin in Struktur und Größe ähnliches Leucin in den Mutanten somit weniger destabilisierend als ein Methioninsulfoxid. Die Ergebnisse der *Arabidopsis*-Mutanten unterstützen damit die Aussage, dass der verstärkte D1-Abbau der *Chlamydomonas*-Mutanten nicht allein durch eine Destabilisierung des veränderten Proteins, sondern durch Starklicht initiiert wurde.

Eine weitere potentielle Ursache des verstärkten D1-Abbaus könnte die fehlende *Scavenging*-Funktion im D1-Protein der Mutanten sein. Entsprechend der Arbeitshypothese, wonach ROS

---

durch Methionine des D1-Proteins eliminiert werden (*ROS-Scavenging*), könnte der Austausch von nah am P680 lokalisierten Methioninen einen Verlust dieser *Scavenging*-Funktion bedeuten und dadurch eine erhöhte Sensitivität der Mutanten gegenüber ROS bewirken. Wie gezeigt werden konnte, führte das Fehlen von Methionin 172, 183 bzw. 194 zu einem verstärkten D1-Abbau unter oxidativen Bedingungen sowie zu einer erhöhten Sensitivität der Mutanten gegenüber Singulett-Sauerstoff (vgl. 3.1.2.6). Besitzen die Methionine 172, 183 und 194 tatsächlich eine *Scavenging*-Funktion, werden in den Mutanten ROS nicht wie im Referenzstamm durch die Methionine eliminiert. Dadurch würden ROS vermehrt andere Reste des D1-Proteins schädigen, was den verstärkten D1-Abbau bzw. die erhöhte Sensitivität der Mutanten gegenüber Singulett-Sauerstoff verursachen könnte.

Wie bereits unter 4.2.2 für das photoautotrophe Wachstum diskutiert, könnten veränderte Bindungsverhältnisse zum Mangan-Cluster auch den verstärkten D1-Abbau der Mutanten erklären. Die Methionine 172 und 183 befinden sich in der für die Bindung des Mangan-Clusters wichtigen *loop*-Region des D1-Proteins. Der Austausch dieser Reste könnte die Bindung zum Mangan-Cluster schwächen. So zeigten Untersuchungen des Cyanobakteriums *Synechocystis* 6803, dass der Mangan-Cluster sensitiv auf strukturelle Veränderungen an der Donorseite von PSII reagiert (DEBUS 2001; VASS 2012). Aminosäuresubstitutionen im C-terminalen Bereich des D1-Proteins führten dabei zur Inhibierung der Sauerstoffentwicklung und darüber hinaus zu einer erhöhten Lichtsensitivität von PSII. Außerdem zeigten Mutanten von *Synechocystis* PCC 6803, die einen weniger stabilen Mangan-Cluster ausbildeten, im Starklicht einen erhöhten D1-Abbau (KOMENDA ET AL. 2010). Im Fall der M172- und M183-Mutanten könnte eine geschwächte Bindung zum Mangan-Cluster, ähnlich wie eine in der Literatur diskutierte Photoschädigung des Mangan-Clusters als Ursache der *Donorseiten-induzierten* Photoinhibition (OHNISHI ET AL. 2005; HAKALA ET AL. 2005), den Elektronentransport vom Wasser zum oxidierten Reaktionszentrum reduzieren. Dadurch kann in beiden Fällen die Anwesenheit des P680<sup>+</sup> Radikals sowie des Tyrosin Z<sup>+</sup> Radikals begünstigt sein, da diese nicht ausreichend reduziert werden (JEGERSCHÖLD ET AL. 1990; VASS 2012). Die Folgen wären eine starke Schädigung des D1-Proteins sowie ein verstärkter D1-Abbau, wie auch für die Methionin-Mutanten gezeigt. Folgt man dieser Theorie, könnte neben dem fehlenden *ROS-Scavenging* auch eine geschwächte Bindung der M172- und M183-Mutanten gegenüber dem Mangan-Cluster die Ursache für den verstärkten D1-Abbau sein. Aufgrund der räumlichen Nähe des Methionins 194 zur *loop*-Region könnte auch diese

---

Aminosäuresubstitution über einen *long range*-Effekt die Bindung zum Mangan-Cluster beeinflussen und somit ebenfalls zu einem verstärkten D1-Abbau im Starklicht führen.

#### 4.2.4 Einfluss der Methionin-Substitution auf die Synthese des D1-Proteins

Die Reparatur von photooxidativen Schäden am PSII setzt einen schnellen *Turnover* des D1-Proteins voraus, der mit dem Entfernen des geschädigten D1-Proteins beginnt und mit dessen *de novo*-Synthese sowie der Assemblierung des PSII vollendet wird. Um zu klären, ob der Austausch der Methionine 172, 183 und 194 neben dem Abbau auch die Synthese des D1-Proteins beeinflusst, erfolgte das Monitoring des D1-Proteins im Starklicht ohne Hemmung der Proteinsynthese. Dabei wurden für M172L, M194L sowie für den Referenzstamm IL eine leichte Abnahme an D1-Protein, aber keine Unterschiede zwischen Mutanten und Referenz gezeigt (vgl. 3.1.2.4). Während des Versuchszeitraumes konnten die Algen somit einen Großteil des geschädigten D1-Proteins ersetzen. Da in den Mutanten jedoch deutlich mehr D1-Protein abgebaut wurde, musste eine größere Menge an Protein resynthetisiert werden. Damit sind diese Mutanten in der Lage, den verstärkten D1-Abbau durch die *de novo*-Synthese zu kompensieren, was eine erhöhte Translationsrate des D1-Proteins voraussetzt. Vermutlich hat der Austausch der Methionine 172 und 194 keinen direkten Einfluss auf die D1-Synthese. Die erhöhte D1-Abbaurrate bewirkt aber eine verstärkte *de novo*-Synthese des D1-Proteins.

Im Gegensatz dazu wurde bei M183L, verglichen mit den beiden anderen Mutanten sowie der Referenz, trotz Möglichkeit zur Resynthese ein stärkerer Rückgang an D1-Protein festgestellt (vgl. 3.1.2.4). Die *de novo*-Synthese konnte D1-Protein nicht in dem Umfang nachliefern wie geschädigtes D1-Protein abgebaut wurde. Der Codon-Austausch in der Mutante könnte zur Ausbildung von Sekundärstrukturen innerhalb des mRNA-Moleküls führen und so die Bindung der mRNA an den Ribosomen oder die Elongation der Aminosäurekette behindern. Eine verminderte Translation des D1-Proteins wäre die Folge. Mit Hilfe der frei verfügbaren GeneBee-Software ([http://www.genebee.msu.su/services/rna2\\_reduced.html](http://www.genebee.msu.su/services/rna2_reduced.html)) können sowohl Nukleotid- als auch Aminosäure-Sequenzen auf solche Sekundärstrukturen untersucht werden. Für die Nukleotid-Sequenz des veränderten *psbA*-Genes, mit einem ATG zu TAA-Austausch in M183L, sagt die Software im entsprechenden Bereich jedoch keine Sekundärstrukturen voraus. Der Bereich um das ausgetauschte Codon (ATG zu TAA) ist laut Vorhersage-Software nicht Struktur-relevant.

Verschiedene Studien zeigen außerdem die Inaktivierung der PSII-Reparatur durch ROS, aufgrund einer Unterdrückung der Synthese des D1-Proteins und vieler anderer Proteine (NISHIYAMA ET AL. 2001; NISHIYAMA ET AL. 2004; ALLAKHVERDIEV & MURATA 2004). Als möglicher Angriffspunkt wird dabei ein Elongationsfaktor (EFG) diskutiert, der durch ROS inaktiviert wird. Dabei werden zwei spezifische Cysteine unter Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke oxidiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Inaktivierung des EFG durch eine Thioredoxin-vermittelte Reduktion reversibel ist (KOJIMA ET AL. 2009). Somit könnte die Aktivierung des oxidierten EFG an die Bereitstellung von Redoxäquivalenten aus der Photosynthese gekoppelt sein. Eine beeinträchtigte Bereitstellung von Redoxäquivalenten könnte wiederum die Aktivierung des EFG behindern und zu einer verschlechterten D1-Synthese im Starklicht führen. Ob dies die Ursache für den reduzierten *Turnover* bei M183L ist, kann mit den gezeigten Ergebnissen jedoch nicht eindeutig belegt werden, da die  $F_V/F_M$ -Werte der Mutanten im Vergleich zur Referenz unverändert sind und damit deren photosynthetische Leistung vergleichbar ist (vgl. Tabelle 3.2). Da entsprechend der *in silico*-Analyse eine Behinderung der Translation durch Sekundärstrukturen ebenfalls unwahrscheinlich ist, konnten die Ursachen der reduzierten Translation von M183L nicht eindeutig identifiziert werden. Darüber hinaus kann das veränderte D1-Protein die Assemblierung des PSII-Komplexes behindern, was eine weitere mögliche Ursache des reduzierten *Turnovers* wäre. Da lediglich das *psbA*-Gen der Mutanten sequenziert wurde, können auch Mutationen an anderen Stellen im Genom als Ursache für die physiologischen Veränderungen der Mutanten nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.2.5 Einfluss der Methionin-Substitution auf die *Dark recovery*

Studien an *Synechocystis* sp. PCC 6803 zeigten, dass nach einer Starklichtinkubation eine Erholung der PSII-Aktivität in Dunkelheit stattfindet, die nicht auf einer *de novo*-Synthese des D1-Proteins beruht. Dabei wird eine Zwischenstufe von „vorgeschädigtem“ D1-Protein vorgeschlagen, die bei Wegfall der oxidativen Stressbedingungen wieder in eine funktionelle Form überführt werden kann (ALLAKHVERDIEV ET AL. 2003). Der genaue Mechanismus der sogenannten *Dark Recovery* ist unklar. Vorversuche hatten eine Erholung der photosynthetischen Aktivität in Dunkelheit bzw. im Schwachlicht beim *C. reinhardtii* IL-Stamm gezeigt (KNABE 2007). Würden die Methionine des D1-Proteins entsprechend der Arbeitshypothese als endogene Antioxidanzien wirken bzw. durch die Aktivität einer



Methioninsulfoxid-Reduktase repariert werden, könnte das eine Erholung der PSII-Aktivität ohne *de novo*-Synthese des D1-Proteins bewirken. Mutanten, denen Methionine und damit eine potentielle *Scavenging*-Funktion bzw. Reparaturmöglichkeit fehlt, könnten entsprechend dieser Theorie eine reduzierte Erholung der PSII-Aktivität zeigen.

Der Referenzstamm IL sowie alle Methionin-Mutanten zeigten eine Erholung der PSII-Aktivität im Schwachlicht nach Starklichtinkubation. Der Umfang der PSII-Erholung der Mutanten unterschied sich dabei nicht vom Referenzstamm IL. Der Austausch eines einzelnen Methionins hatte somit keinen Einfluss auf die *Dark Recovery*. In mehreren Studien konnte für verschiedene Proteine gezeigt werden, dass erst die Oxidation einer größeren Anzahl an Methioninen spezifische Auswirkungen auf die Aktivität bzw. Funktionalität des jeweiligen Proteins hatte (LEVINE ET AL. 1996; GUSTAVSSON ET AL. 2001). Eine Beteiligung der Methionine am *Recovery*-Mechanismus kann somit nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Erstellung von Mutanten mit mehreren Methionin-Substitutionen im D1-Protein könnte weitere Hinweise zu einer möglichen Beteiligung der Methionine an der nicht-translationellen Erholung der PSII-Aktivität liefern. Die Ursachen des *Recovery*-Mechanismus bleiben damit weiter unklar.

### 4.3 Methioninsulfoxid-Reduktasen in *C. reinhardtii*

#### 4.3.1 MSRA1 ist ein Selenoprotein

In den vorangegangenen Kapiteln wurden als Ursachen für den verstärkten D1-Abbau der Methionin-Mutanten eine reduzierte Bindung des veränderten D1-Proteins zum Mangan-Cluster oder eine fehlende *Scavenging*-Funktion der Mutanten diskutiert. Damit Methionine jedoch eine *Scavenging*-Funktion ausüben können, ist die Aktivität einer Methioninsulfoxid-Reduktase (MSRA bzw. MSRB) notwendig. Nur ein Oxidations-/Reduktions-Zyklus der Methionine stellt einen antioxidativen Schutz zellulärer Kompartimente dar (LEVINE ET AL. 1996; WEISSBACH ET AL. 2005).

In *C. reinhardtii* wurden vier MSRA-codierende Gene identifiziert. Alle Gene sind Kern-codiert und besitzen eine Exon-Intron-Struktur. Darüber hinaus verfügt die Grünalge über drei MSRB-codierende Gene (ROUHIER ET AL. 2006) und ist damit wie viele photosynthetisch aktive Organismen durch eine Vielzahl an MSR gekennzeichnet (vgl. Tabelle 4.2).

**Tabelle 4.2: Charakterisierung der Methioninsulfoxid-Reduktasen aus *C. reinhardtii*. Angegeben wird die Genexpression unter verschiedenen Wachstumsbedingungen, die vorhergesagte sowie die experimentell bestätigte subzelluläre Lokalisation und die *in vitro* Reduktase-Aktivität. n. b.: nicht bestimmt**

	Genexpression					Lokalisation		Aktivität
	Nicht-oxidativ	Starklicht	UV- Bestrahlung	Hitze	Kälte	<i>In silico</i> Vorhersage	<i>In organello</i> Transport	
MSRA1	-	+	-	-	-	Cytosol	n. b.	n. b.
MSRA2	-	+	+	+	-	Chloroplast / Mitochondrium	Chloroplast	+
MSRA3	-	+	+	-	-	Mitochondrium	-	-
MSRA4	+	+	+	+	+	Cytosol	n. b.	n. b.

MSRA und MSRB katalysieren ähnliche Reaktionen, unterscheiden sich jedoch in der Sequenz sowie der Dreidimensionalen Struktur (KAUFFMANN ET AL. 2005). Beide Enzyme sind für die Zell-Vitalität wichtig, aber MSRA wird eine größere Bedeutung zugerechnet (ROUHIER ET AL. 2006). Gegenstand dieser Arbeit waren daher nur MSRA-Enzyme aus *C. reinhardtii*. Eine Besonderheit der Grünalge stellt dabei MSRA1 dar, dessen katalytisches Zentrum ein Selenocystein anstelle eines Cysteins enthält. Mehrere Cystein-enthaltende Homologe zu MSRA1 wurden in Pflanzen gefunden, was auf einen frühen Selenocystein/Cystein-Austausch während der Evolution deutet (NOVOSELOV ET AL. 2002). Studien belegen, dass Seleno-Formen verschiedener MSR eine höhere enzymatische Aktivität als entsprechende Cystein-enthaltende Mutanten bzw. andere Cystein-enthaltende MSR aufweisen. Selenocystein bietet MSR und wahrscheinlich auch anderen Thiol-abhängigen Oxidoreduktasen einen katalytischen Vorteil indem es Methioninsulfoxid effizienter reduziert (KIM ET AL. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass für MSRA1 kein „Recycling“-Cystein für den katalytischen Mechanismus erforderlich ist. Das Zwischenprodukt der Reaktion kann vermutlich direkt durch Thioredoxin reduziert werden (TARRAGO ET AL. 2009). Die Untersuchung von Selenoproteinen in *C. reinhardtii* zeigte eine Vielzahl weiterer Selenoproteine. Die Grünalge unterscheidet sich damit von Landpflanzen, denen Selenoproteine sowie das entsprechende *Sec-Insertions*-System fehlen (NOVOSELOV ET AL. 2002; LOBANOV ET AL. 2009).

### 4.3.2 Expression der *msrA*-Gene aus *C. reinhardtii*

In höheren Pflanzen existieren wenige Studien zur Expression von *msr*-Genen. Für *A. thaliana* konnte ein differentielles Expressionsmuster abhängig vom Pflanzenorgan und von Stressbedingungen gezeigt werden (SADANANDOM ET AL. 2000; ROMERO ET AL. 2004; VIEIRA DOS SANTOS ET AL. 2005; ROUHIER ET AL. 2006). Keine Daten existieren dagegen bislang zur *msr*-Expression in Algen.

Für die *msrA1*, 2 und 3-Gene von *C. reinhardtii* konnte in dieser Arbeit ebenfalls eine differentielle Expression nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 4.2). Hohe Lichtintensitäten führten bei diesen Genen zu einem starken Anstieg der Expression. UV-Licht verursachte v.a. bei *msrA2* eine erhöhte Expression. Für *msrA2* konnte außerdem eine Erhöhung der Expression bei Hitzeinkubation nachgewiesen werden. Hohe Lichtintensitäten und UV-Licht führen hauptsächlich in den Chloroplasten zu einer gesteigerten Bildung von ROS, die Proteine und somit potentielle *Targets* von MSRs oxidativ schädigen (DAT ET AL. 2000; KRIEGER-LISZKAY 2005; ASADA 2006). Auch die Inkubation bei hohen Temperaturen ist von der erhöhten Akkumulation von ROS gekennzeichnet. Dabei werden auch hier ROS vorrangig in den Chloroplasten gebildet, da durch einen Rückgang der CO<sub>2</sub>-Fixierung vermehrt Elektronen auf Sauerstoff übertragen werden (DAT ET AL. 2000). Keine Expression wurde dagegen bei einem Wachstum bei tiefen Temperaturen gezeigt, obwohl ROS auch bei niedrigen Temperaturen hauptsächlich in den Chloroplasten, aber auch in den Mitochondrien akkumulieren. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigten Microarray-Daten von *A. thaliana* ebenfalls eine Unterdrückung der *msrA*-Genexpression bei niedrigen Temperaturen (ROUHIER ET AL. 2006).

Die Ergebnisse belegen, dass die Expression von *msrA1*, 2 und 3 aus *C. reinhardtii* durch verschiedene Umweltbedingungen, die durch eine verstärkte Bildung von ROS gekennzeichnet sind, modifiziert wird. Vermutlich führen erhöhte intrazelluläre ROS-Konzentrationen zu einer verstärkten Expression, da unter nicht-oxidativen Bedingungen, wie moderate Lichtintensitäten sowie Dunkelheit, keine bzw. nur eine geringe Expression dieser Gene gezeigt wurde. Ob dabei ROS direkt als Signal für die Genexpression wirken, ist bislang nicht bekannt. Vermutlich fungieren ROS aber nicht allein als Signal für eine erhöhte *msrA*-Expression, da nicht alle Stressbedingungen, bei denen vermehrt ROS gebildet werden, die Genexpression induzieren. Da ROS an verschiedenen Orten in der Zelle entstehen, wird

potentiell eine Vielzahl von Proteinen geschädigt. So wird beispielsweise Singulett-Sauerstoff bei hohen Lichtintensitäten am PSII gebildet, während Wasserstoffperoxid vorrangig am PSI bzw. in den Peroxisomen entsteht (KRIEGER-LISZKAY 2005; APEL & HIRT 2004). Mit der unterschiedlichen Regulation der *msrA*-Gene unter ROS-bildenden Bedingungen könnte die Zelle somit auf die Vielzahl von Schäden reagieren und diese reparieren. Denkbar ist auch eine kaskadenartige Induktion der verschiedenen *msrA*-Gene je nach Ausmaß der Schäden. Mit Zunahme der oxidativen Schäden bzw. mit Erhöhung der intrazellulären ROS-Konzentration könnte nacheinander die Expression der verschiedenen *msrA*-Gene induziert werden, um die erhöhten Proteinschäden in den einzelnen Kompartimenten zu reparieren.

Im Gegensatz zur differentiellen Expression von *msrA1*, 2 und 3 wird *msrA4* konstitutiv exprimiert. Das *msrA4*-Gen unterliegt unter den getesteten Bedingungen keiner Regulation und bietet der Zelle somit unabhängig von abiotischen Stressfaktoren einen Schutz vor oxidativen Schäden, da auch unter nicht-oxidativen Bedingungen ROS, z.B. in Mitochondrien, gebildet werden (KRIEGER-LISZKAY 2005).

#### 4.3.3 Reduktaseaktivität der *Chlamydomonas*-MSRA

Um die Aktivität der MSRA aus *C. reinhardtii* zu zeigen, erfolgte die *in vitro* Bestimmung der Reduktaseaktivität anhand des Umsatzes von Sulindac, das bereits als künstliches Substrat für MSRA aus *E. coli* charakterisiert wurde (ETIENNE ET AL. 2003). Es wurde *E. coli*-Lysat eingesetzt, das jeweils heterolog überexprimierte MSRA2, MSRA4, humane MSRA (hMSRA) sowie als Negativkontrolle keine MSRA enthielt. Die Positivkontrolle hMSRA sowie MSRA2 zeigten eine signifikante Reduktaseaktivität. Für die Negativkontrolle, ohne heterologe MSRA, wurde eine geringe Aktivität detektiert. Das zeigte erwartungsgemäß, dass auch *E. coli*-eigene MSRA das Substrat umsetzen konnten. Alle Messungen wurden deshalb entsprechend dieses Wertes korrigiert (vgl. auch KIM ET AL. 2006).

Das *E. coli*-Lysat mit überexprimierter hMSRA und das Lysat mit *C. reinhardtii*-MSRA2 zeigten vergleichbare Aktivitäten (s. Tabelle 3.5). Die ermittelte Aktivität der gereinigten *C. reinhardtii*-MSRA2 aus *E. coli* war jedoch deutlich geringer als die Aktivität der verschiedenen, von Etienne et al. charakterisierten *E. coli*-MSRA. Zur Regeneration der *C. reinhardtii*-MSRA wurden im *in vitro*-Reaktionsansatz sowohl Thioredoxin als auch eine Thioredoxin-Reduktase aus *E. coli* verwendet. Möglicherweise kann MSRA2 dieses

Thioredoxin sowie die Thioredoxin-Reduktase nicht effektiv nutzen, da die Gruppe der Thioredoxine in photosynthetisch aktiven Organismen eine sehr heterogene Stoffklasse darstellt und sich von bakteriellen Thioredoxinen unterscheidet (MEYER ET AL. 2005; VIEIRA DOS SANTOS & REY 2006). Deshalb ist eine höhere Reduktaseaktivität bei Nutzung *C. reinhardtii*-eigener Elektronendonoren bzw. eine höhere *in vivo*-Aktivität von MSRA2 denkbar. Da sich die Aktivität aller bislang charakterisierten MSRA auf die Umsetzung spezifischer Substrate bezieht, ist ein Vergleich mit weiteren MSRA aus der Literatur nicht möglich.

Im Gegensatz zu MSRA2 zeigte in *E. coli* exprimierte MSRA4 kaum Reduktaseaktivität. Sowohl im Lysat als auch mit gereinigter MSRA4 im Reaktionsansatz wurden nur geringe Reduktaseaktivitäten gemessen. Entsprechend der Sequenzanalyse gehören MSRA2 und MSRA4 in Bezug auf den katalytischen Mechanismus zu verschiedenen MSRA-Untergruppen (KIM ET AL. 2006; ROUHIER ET AL. 2007; TARRAGO, LAUGIER & REY 2009). Während bei MSRA2 Cystein 94 als katalytisches Cystein und Cystein 239 als regenerierendes Cystein an der Katalyse beteiligt sind, katalysieren bei MSRA4 Cystein 58 und die regenerierenden Cysteine 208 und 214 die Reduktion des Substrates. Aufgrund dieser Unterschiede in der Katalyse könnten beide MSRA aus *C. reinhardtii* verschiedene Elektronendonoren sowie Substrate unterschiedlich effizient nutzen bzw. umsetzen. Dabei konnte nicht geklärt werden, ob MSRA4 Sulindac als Substrat nicht umsetzen kann oder das eingesetzte Thioredoxin nicht als Reduktionsmittel dient. Eine Studie lieferte jedoch Hinweise, dass Thioredoxin und MSRA4 in der Zelle interagieren können, da MSRA4 als Target für pflanzliche Thioredoxine identifiziert wurde (LEMAIRE ET AL. 2004). Die *in vitro* Inaktivität von MSRA4 könnte daher, wie bereits diskutiert, auf den Einsatz von bakteriellen Thioredoxin sowie Thioredoxin-Reduktase im Reaktionsansatz zurückzuführen sein. MSRA3 gehört bezüglich des Cysteinmusters sowie des Katalysemechanismus der gleichen Untergruppe wie MSRA4 an und die Bestimmung der Reduktaseaktivität von MSRA3 wäre von großem Interesse. Da MSRA3 jedoch nur als verkürztes, unlösliches Protein heterolog exprimiert wurde, erfolgte keine Aktivitätsmessung von MSRA3, da für den Reduktase-Assay ein natives Protein erforderlich ist.

Die heterologe Expression von MSRA1 in *E. coli* war aufgrund der Inkompatibilität des *Sec-Insertions*-Systems zum bakteriellen System nicht möglich. In anderen Studien, die zur

Expression von MSRA1-Säugerzellen (HEK 293-Zellen) nutzen, konnte für MSRA1 eine Reduktaseaktivität nachgewiesen werden (KIM ET AL. 2006). Dieses Selenoprotein zeigte der Studie zufolge eine 10- bis 50-fach höhere Aktivität als eine Cystein-enthaltende MSRA1-Mutante bzw. als andere natürliche Cystein-enthaltende MSRAs. Im Gegensatz zu anderen getesteten Selenocystein-enthaltenden MSRA und MSRB kann MSRA1 jedoch kein Thioredoxin als Reduktionsmittel nutzen. Wahrscheinlich regeneriert ein bislang unbekanntes Reduktionsmittel den aktiven Zustand des Enzyms (KIM ET AL. 2006).

Die gewonnenen Ergebnisse liefern somit Hinweise, dass in *C. reinhardtii* aktive MSRA existieren, die gemeinsam mit Methionin-Resten von Proteinen einen potentiellen endogenen, antioxidativen Schutz unter Stressbedingungen darstellen könnten.

#### 4.3.4 *In vivo*-Nachweis der MSRA-Proteine

Neben der Analyse der *msrA*-Transkripte sollte der Nachweis der MSRA-Proteine *in vivo* erfolgen, um eine weitere Regulation bzw. die subzelluläre Lokalisation der MSRAs in *C. reinhardtii* zu untersuchen. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Agrisera (Vännäs, Schweden) ein Peptidantikörper hergestellt, der neben MSRA2, 3 und 4 auch MSRA aus *A. thaliana* erkennen sollte. Mit Hilfe dieses Peptidantisersums konnten heterolog exprimierte *Chlamydomonas*-MSRA2, 3 und 4 spezifisch nachgewiesen werden. Beim *in vivo*-Nachweis im Proteinextrakt von *C. reinhardtii* kreuzreagierte der Antikörper jedoch stark mit Proteinen des LHC-Komplexes. LHC-Proteine kommen in großen Mengen in der Zelle vor und sind für Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen bekannt. Nach Abtrennung des Großteiles der LHC-Proteine konnte dennoch ein Protein detektiert werden, das dem Molekulargewicht einer prozessierten MSRA2 entspricht. Dieses Protein sowie ein potentielles Dimer wurden nach Starklichtinkubation in der löslichen Proteinfraction nachgewiesen. Es konnte jedoch kein Nachweis zur Spezifität erbracht werden. Das könnte durch Erstellung und Analyse von *msrA-knock out* Mutanten sowie einer MALDI TOF MS-Analyse des detektierten Antigens erfolgen. Weitere Analysen mit Hilfe dieses Antikörpers könnten Hinweise über die Verteilung der MSRA in der Zelle sowie eine eventuelle Regulation auf Proteinebene liefern.

Der Antikörper wurde ebenfalls zur Detektion von MSRA aus *A. thaliana* durch den Kooperationspartner Agrisera eingesetzt. Auch hier konnte *in vivo* keine Spezifität des

Antikörpers nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). In anderen Studien konnte jedoch mit Hilfe von Antikörpern gegen MSRA die Verteilung der Proteine Pflanzen gezeigt werden (SADANANDOM ET AL. 2000; ROMERO ET AL. 2004; VIEIRA DOS SANTOS ET AL. 2005).

#### 4.3.5 Subzelluläre Lokalisation der MSRA

Die *in silico*-Analyse der vier MSRA-Proteine aus *C. reinhardtii* lieferte erste Hinweise, dass MSRA3 in den Mitochondrien und MSRA2 sowohl in den Chloroplasten als auch in den Mitochondrien lokalisiert sein könnten. Um diese Vorhersagen zu überprüfen, erfolgte ein *in organello*-Transport von *in vitro* transkribierter und translaterter, <sup>35</sup>S-Cystein-markierter MSRA2 und 3 (vgl. 3.2.6.2).

Die Ergebnisse zeigten einen Chloroplastenimport für MSRA2, da neben dem Vorläuferprotein mit einer Größe von ca. 32 kDa eindeutige Banden detektiert wurden (vgl. Abbildung 3.20). Sowohl in der mit Thermolysin als auch in der ohne Thermolysin versetzten Probe konnten jeweils zwei prozessierte Proteine mit einem geringeren Molekulargewicht von ca. 23 bzw. 26 kDa nachgewiesen werden. Diese Proteine wurden offensichtlich in den Chloroplasten importiert und waren dadurch vor dem Thermolysinabbau geschützt. Da zwei Banden detektiert wurden, ist eine weitere Prozessierung des Proteins im Chloroplasten und ein Transport in das Thylakoidlumen möglich. Eine Subfraktionierung des Chloroplastenimport-Ansatzes könnte weitere Hinweise über eine mögliche Lokalisation in der Thylakoidmembran bzw. im Thylakoidlumen liefern. In *E. coli* konnte bereits eine Membran-assoziierte MSR gezeigt werden. Dabei wurde in Membran-Vesikeln MSR-Aktivität und damit die Existenz eines Membran-integralen Enzyms bzw. eines mit der Membran assoziierten Enzyms nachgewiesen (ETIENNE ET AL. 2003; SPECTOR ET AL. 2003).

Für MSRA3 hatte die *in silico*-Analyse keine Chloroplasten-Lokalisation vorhergesagt. Es existieren allerdings verschiedene pflanzliche Proteine, deren Signalpeptid den Transport sowohl in den Chloroplasten als auch in die Mitochondrien vermittelt. Diese Proteine werden über das sogenannte *Dual Targeting* in beide Organelle transportiert (SMALL ET AL. 1998; RÖDIGER ET AL. 2011). Deshalb wurde der Chloroplastenimport von MSRA3 ebenfalls analysiert, konnte aber nicht eindeutig belegt werden. Neben dem Vorläuferprotein wurde zwar ein potentiell prozessiertes Protein nachgewiesen, aufgrund der geringen Signalstärke

und des gleichen Proteinmusters von Thermolysin-behandelter und Thermolysin-unbehandelter Probe liefern diese Ergebnisse keine eindeutigen Beweise für einen Import von MSRA3 in den Chloroplasten.

Neben den Chloroplasten sind vor allem Mitochondrien eine Hauptquelle von ROS, die auch hier zu oxidativen Schäden an Proteinen führen. Es überrascht daher nicht, dass verschiedene Mitochondrien-lokalisierte MSR beispielsweise in Säugern existieren. In Pflanzen wurden MSR bislang aber nur im Cytosol und in den Plastiden, aber nicht in Mitochondrien nachgewiesen (ROUHIER ET AL. 2006). Da die Vorhersageprogramme für MSRA2 und 3 aus *C. reinhardtii* mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Lokalisation in den Mitochondrien prognostizierten, galt den Ergebnissen zum Mitochondrienimport großes Interesse. Eindeutige Beweise für einen Mitochondrienimport von MSRA2 bzw. MSRA3 konnten jedoch nicht erbracht werden. MSRA2 zeigte keine spezifischen Importsignale und wird deshalb wahrscheinlich nicht in die Mitochondrien importiert. Für MSRA3 konnten potentiell prozessierte Proteine detektiert werden, aber aufgrund der geringen Signalstärke kann auch hier nicht von spezifischen Importprodukten gesprochen werden. Somit konnte bislang auch für den photosynthetisch aktiven Organismus *C. reinhardtii* kein Nachweis einer Mitochondrien-lokalierten MSRA und damit einer Methioninsulfoxid-Reduktion in diesem Organell erbracht werden. Um diesen Aspekt vollständig zu klären, müssten die in *C. reinhardtii* vorhandenen MSRB auf eine Mitochondrien-Lokalisation untersucht werden.

#### 4.4 Ist das D1-Protein ein Substrat einer MSRA?

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Hinweise, dass *C. reinhardtii* über eine Chloroplasten-lokalisierte Methioninsulfoxid-Reduktase (MSRA2) verfügt, für die *in vitro* eine Enzymaktivität gezeigt werden konnte. MSRA2 wird verstärkt exprimiert, wenn die Grünalge oxidativem Stress ausgesetzt ist. Bei Starklicht, UV-Bestrahlung und Hitze konnten erhöhte Transkriptmengen nachgewiesen werden. Diese Stressbedingungen führen vor allem in den Chloroplasten zu einer Erhöhung der ROS-Konzentration und schädigen unter anderem das D1-Protein von PSII. Entsprechend der Arbeitshypothese könnten Methionin-Reste des D1-Proteins ROS inaktivieren und würden durch die Aktivität einer MSR anschließend wieder regeneriert werden. Dieser Oxidations-/Reduktionszyklus würde einen Schutz des PSII-Komplexes darstellen und die Folgen der Photoinhibition mildern. In Mutanten, denen Methionine und damit potentielle ROS-Scavenger fehlen, könnten ROS verstärkt andere



---

Aminosäurereste im D1-Protein irreversibel schädigen. Es folgt ein schnellerer Abbau, wie für die Methionin-Mutanten nachgewiesen. Dieser verstärkte D1-Abbau der Methionin-Mutanten im Starklicht sowie die Aktivität einer Chloroplasten-lokalisierten MSRA könnten erste Hinweise auf eine Interaktion von D1-Protein und MSRA sein.

Ein weiteres Indiz für eine D1-MSRA-Interaktion könnte eine potentielle Thioredoxin-Aktivität des OEE1-Proteins von PSII sein. Für verschiedene MSR wurde Thioredoxin bereits als Elektronendonator identifiziert, der über eine Thioredoxinreduktase an den Redox-Pool der Zelle gekoppelt ist. In der einzelligen Grünalge *Scenedesmus obliquus* wurde ein 28 kDa großes Protein mit Thioredoxin-Aktivität identifiziert, dass in bestimmten Sequenzabschnitten eine große Homologie zum OEE1-Protein aufwies (HEIDE ET AL. 2004). Proteinextrakte von *Chlorella vulgaris* und *C. reinhardtii* enthielten nach dieser Studie ebenfalls hitzestabile Proteinfractionen im 23 bis 26 kDa Bereich mit Thioredoxin-Aktivität. Besitzt das OEE1-Protein tatsächlich eine solche duale Funktion, d.h. sowohl Beteiligung an der Wasserspaltung als auch Thioredoxin-Aktivität, könnte OEE1 als potentielles Reduktionsmittel einer MSRA mit dem D1-Protein als Substrat dienen.

#### 4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Methionine 172, 183 und 194 die Stabilität des D1-Proteins beeinflussen. Werden diese Reste substituiert, ist das photoautotrophe Wachstum der Mutanten zum Teil reduziert und der Abbau des Proteins der jeweiligen Mutante im Starklicht verstärkt. Den stärksten Effekt zeigten dabei die Mutanten, deren substituiertes Methionin nah am P680, einem Entstehungsort von Singulett-Sauerstoff, lokalisiert ist. Da das D1-Protein der Mutanten im Dunkeln unter nicht-oxidativen Bedingungen stabil war, wurde der verstärkte D1-Abbau durch Starklicht initiiert und vermutlich nicht durch eine Destabilisierung aufgrund des Aminosäureaustausches verursacht. Entsprechend der Arbeitshypothese könnten die untersuchten Methionine daher eine *Scavenging*-Funktion besitzen und als endogene Antioxidanzien fungieren. Fehlen diese Antioxidanzien, kann das D1-Protein verstärkt durch ROS geschädigt werden. Diese erhöhte Schädigung würde in einem verstärkten D1-Abbau resultieren, wie es für die Methionin 172-, 183- und 194-Mutanten gezeigt wurde (vgl. 3.1.2.2). Einen nachhaltigen antioxidativen Schutz bieten Methionine jedoch erst im Zusammenspiel mit einer MSR, welche die oxidierten Methionin-Reste wieder regeneriert und damit ein kontinuierliches *Scavenging*

---

bzw. einen Reparaturprozess des Proteins gewährleistet. Da in *C. reinhardtii* unter oxidativen Stressbedingungen eine Chloroplasten-lokalisierte MSRA mit *in vitro* Aktivität gezeigt werden konnte, wäre die Voraussetzung dafür prinzipiell gegeben. Daher könnten die Methionine des D1-Proteins tatsächlich endogene Antioxidanzien darstellen, die gemeinsam mit einer MSRA die Integrität des D1-Proteins unter Stressbedingungen verbessern. Ob das D1-Protein aber tatsächlich ein Substrat einer MSRA darstellt, konnten diese Ergebnisse nicht belegen. Die Untersuchungen zeigten jedoch erste Hinweise, die diese These unterstützen. Mögliche Beweise könnte eine Affinitätschromatographie-Methode liefern, mit der bereits mehrere Substrate einer MSRB aus *A. thaliana* identifiziert werden konnten (TARRAGO ET AL. 2012).

Alternativ werden als Ursache des verstärkten D1-Abbaus veränderte Bindungsverhältnisse des mutierten D1-Proteins zum Mangan-Cluster diskutiert. Methionin 172 und 183 sind im *loop*-Bereich zwischen Helix III und IV lokalisiert, der an der Bindung des Mangan-Clusters beteiligt ist. Es ist weiterhin nicht auszuschließen, dass Methionin 194 über einen *long range*-Effekt für diese Bindung von Bedeutung ist. Der Austausch dieser offensichtlich essentiellen Reste könnte eine schwächere Bindung zum Mangan-Cluster verursachen und damit die kontinuierliche Übertragung der Elektronen vom Wasser zum oxidierten P680 beeinträchtigen. Das daraus resultierende starke Oxidationsmittel P680<sup>+</sup> könnte letztendlich über längere Zeit das D1-Protein direkt schädigen und damit dessen Abbau verstärken, wie es für die Methioninmutanten gezeigt wurde (vgl. 3.1.2.2).

Die Bedeutung der Methionine 172, 183 und 194 des D1-Proteins konnte somit noch nicht eindeutig geklärt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern aber wichtige Hinweise, die eine Funktion der Methionine als endogene Antioxidanzien innerhalb des D1-Proteins unterstützen. Weitere Untersuchungen der Methionin-Mutanten, die Charakterisierung von Mutanten mit mehreren Methionin-Substitutionen sowie eine umfangreiche Charakterisierung sowohl von MSRA als auch von MSRB in *C. reinhardtii* sind daher notwendig, um die Bedeutung der Methionine des D1-Proteins genauer aufzuklären.

---

## 5 Literaturverzeichnis

- ALLAKHVERDIEV, S.I., MOHANTY, P. & MURATA, N., 2003. Dissection of photodamage at low temperature and repair in darkness suggests the existence of an intermediate form of photodamaged photosystem II. *Biochemistry*, 42(48), pp.14277–83.
- ALLAKHVERDIEV, S. I. & MURATA, N., 2004. Environmental stress inhibits the synthesis de novo of proteins involved in the photodamage-repair cycle of Photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochimica et biophysica acta*, 1657(1), pp.23–32.
- ANNWEILER, A., HIPSKIND, R.A. & WIRTH, T., 1991. A strategy for efficient in vitro translation of cDNAs using the rabbit beta-globin leader sequence. *Nucleic acids research*, 19(13), p.3750.
- APEL, K. & HIRT, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology*, 55, pp.373–99.
- ARNON, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology*, 24(1), pp.1–15.
- ARO, E.M., VIRGIN, I. & ANDERSSON, B., 1993. Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et biophysica acta*, 1143(2), pp.113–34.
- ASADA, K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant physiology*, 141(2), pp.391–6.
- BOLWELL, G.P. ET AL., 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of experimental botany*, 53(372), pp.1367–76.
- BONDARAVA, N., BEYER, P. & KRIEGER-LISZKAY, A., 2005. Function of the 23 kDa extrinsic protein of Photosystem II as a manganese binding protein and its role in photoactivation. *Biochimica et biophysica acta*, 1708(1), pp.63–70.
- BOSCHI-MULLER, S., OLRV, A., ANTOINE, M. & BRANLANT, G., 2005. The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases. *Biochimica et biophysica acta*, 1703(2), pp.231–8.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–54.
- BROT, N., WEISSBACH, L., WERTH, J. & WEISSBACH, H., 1981. Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(4), pp.2155–8.

- CARDONA, T., SEDOUD, A., COX, N. & RUTHERFORD, A.W., 2012. Charge separation in photosystem II: a comparative and evolutionary overview. *Biochimica et biophysica acta*, 1817(1), pp.26–43.
- CHUNG, C.T., NIEMELA, S.L. & MILLER, R.H., 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(7), pp.2172–5.
- DARBY, N.J. & CREIGHTON, T.E., 1993. Dissecting the disulphide-coupled folding pathway of bovine pancreatic trypsin inhibitor. Forming the first disulphide bonds in analogues of the reduced protein. *Journal of molecular biology*, 232(3), pp.873–96.
- DAT, J., VANDENABEELE, S., VRANOVA, E., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D. & VAN BREUSEGEM, F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 57(5), pp.779–95.
- DAU, H., ZAHARIEVA, I. & HAUMANN, M., 2012. Recent developments in research on water oxidation by photosystem II. *Current opinion in chemical biology*, 16(1-2), pp.3–10.
- DAVIES, M.J., 2005. The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et biophysica acta*, 1703(2), pp.93–109.
- DAYER, R., FISCHER, B.B., EGGEN, R.I.L. & LEMAIRE, S.D., 2008. The peroxiredoxin and glutathione peroxidase families in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 179(1), pp.41–57.
- DEBUS, R.J., 2001. Amino acid residues that modulate the properties of tyrosine Y(Z) and the manganese cluster in the water oxidizing complex of photosystem II. *Biochimica et biophysica acta*, 1503(1-2), pp.164–86.
- DEKKER, J.P. & VAN GRONDELLE, R., 2000. Primary charge separation in Photosystem II. *Photosynthesis research*, 63(3), pp.195–208.
- ERICKSON, J.M., RAHIRE, M. & ROCHAIX, J.D., 1984. *Chlamydomonas reinhardtii* gene for the 32 000 mol. wt. protein of photosystem II contains four large introns and is located entirely within the chloroplast inverted repeat. *The EMBO journal*, 3(12), pp.2753–62.
- ETIENNE, F., RESNICK, L., SAGHER, D., BROU, N. & WEISSBACH, H., 2003. Reduction of Sulindac to its active metabolite, sulindac sulfide: assay and role of the methionine sulfoxide reductase system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(4), pp.1005–1010.
- FARBER, J.M. & LEVINE, R.L., 1986. Sequence of a peptide susceptible to mixed-function oxidation. Probable cation binding site in glutamine synthetase. *The Journal of biological chemistry*, 261(10), pp.4574–8.

- 
- FERREIRA, K.N., IVERSON, T.M., MAGHLAOU, K., BARBER, J. & IWATA, S., 2004. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5665), pp.1831–8.
- GABBITA, S.P., AKSENOV, M.Y., LOVELL, M.A. & MARKESBERY, W.R., 1999. Decrease in peptide methionine sulfoxide reductase in Alzheimer's disease brain. *Journal of neurochemistry*, 73(4), pp.1660–6.
- GALETSKIY, D., SUSNEA, I., REISER, V., ADAMSKA, I. & PRZYBYLSKI, M., 2008. Structure and dynamics of photosystem II light-harvesting complex revealed by high-resolution FTICR mass spectrometric proteome analysis. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(7), pp.1004–13.
- GAO, J., YIN, D.H., YAO, Y., SUN, H., QIN, Z., SCHÖNEICH, C., WILLIAMS, T.D. & SQUIER, T.C., 1998. Loss of conformational stability in calmodulin upon methionine oxidation. *Biophysical journal*, 74(3), pp.1115–34.
- GORMAN, D.S. & LEVINE, R.P., 1965. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54(6), pp.1665–9.
- GRIMAUD, R., EZRATY, B., MITCHELL, J.K., LAFITTE, D., BRIAND, C., DERRICK, P.J. & BARRAS, F., 2001. Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase. *The Journal of biological chemistry*, 276(52), pp.48915–20.
- GUSTAVSSON, N., HÄRNDAHL, U., EMANUELSSON, A., ROEPSTORFF, P. & SUNDBY, C., 1999. Methionine sulfoxidation of the chloroplast small heat shock protein and conformational changes in the oligomer. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 8(11), pp.2506–12.
- GUSTAVSSON, N., KOKKE, B.P., ANZELIUS, B., BOELENS, W.C. & SUNDBY, C., 2001. Substitution of conserved methionines by leucines in chloroplast small heat shock protein results in loss of redox-response but retained chaperone-like activity. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 10(9), pp.1785–93.
- GUSTAVSSON, N., KOKKE, B.P., HÄRNDAHL, U., SILOW, M., BECHTOLD, U., POGHOSYAN, Z., MURPHY, D., BOELENS, W.C. & SUNDBY, C., 2002. A peptide methionine sulfoxide reductase highly expressed in photosynthetic tissue in *Arabidopsis thaliana* can protect the chaperone-like activity of a chloroplast-localized small heat shock protein. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 29(5), pp.545–53.
- HAKALA, M., TUOMINEN, I., KERÄNEN, M., TYYSTJÄRVI, T. & TYYSTJÄRVI, E., 2005. Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of Photosystem II. *Biochimica et biophysica acta*, 1706(1-2), pp.68–80.

- 
- HEIDE, H., KALISZ, H.M. & FOLLMANN, H., 2004. The oxygen evolving enhancer protein 1 (OEE) of photosystem II in green algae exhibits thioredoxin activity. *Journal of plant physiology*, 161(2), pp.139–49.
- HOSHI, T & HEINEMANN, S., 2001. Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *The Journal of physiology*, 531(Pt 1), pp.1–11.
- HÄRNDAHL, U., KOKKE, B.P., GUSTAVSSON, N., LINSE, S., BERGGREN, K., TJERNELD, F., BOELEN, W.C. & SUNDBY, C., 2001. The chaperone-like activity of a small heat shock protein is lost after sulfoxidation of conserved methionines in a surface-exposed amphipathic alpha-helix. *Biochimica et biophysica acta*, 1545(1-2), pp.227–37.
- JEGERSCHÖLD, C., VIRGIN, I. & STYRING, S., 1990. Light-dependent degradation of the D1 protein in photosystem II is accelerated after inhibition of the water splitting reaction. *Biochemistry*, 29(26), pp.6179–86.
- JOHANNINGMEIER, U. & HEISS, S., 1993. Construction of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant with an intronless psbA gene. *Plant molecular biology*, 22(1), pp.91–9.
- KAISER, S., DI MASCIO, P., MURPHY, M.E. & SIES, H., 1990. Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Archives of biochemistry and biophysics*, 277(1), pp.101–8.
- KAMIYA, N. & SHEN, J.-R., 2003. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(1), pp.98–103.
- KAUFFMANN, B., AUBRY, A. & FAVIER, F., 2005. The three-dimensional structures of peptide methionine sulfoxide reductases: current knowledge and open questions. *Biochimica et biophysica acta*, 1703(2), pp.249–60.
- KIM, C., MESKAUSKIENE, R., APEL, K. & LALOI, C., 2008. No single way to understand singlet oxygen signalling in plants. *EMBO reports*, 9(5), pp.435–9.
- KIM, H.-Y., FOMENKO, D.E., YOON, Y.-E. & GLADYSHEV, V.N., 2006. Catalytic advantages provided by selenocysteine in methionine-S-sulfoxide reductases. *Biochemistry*, 45(46), pp.13697–704.
- KLEIN, R.M., WOLF, E.D., WU, R. & SANFORD, J.C., 1992. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 24, pp.384–6.
- KNABE, S., 2007. Untersuchung zur Rolle von Methionin-Resten im D1-Protein des Photosystems II.

- 
- KOC, A., GASCH, A.P., RUTHERFORD, J.C., KIM, H.-Y. & GLADYSHEV, V.N., 2004. Methionine sulfoxide reductase regulation of yeast lifespan reveals reactive oxygen species-dependent and -independent components of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21), pp.7999–8004.
- KOJIMA, K., MOTOHASHI, K., MOROTA, T., OSHITA, M., HISABORI, T., HAYASHI, H. & NISHIYAMA, Y., 2009. Regulation of translation by the redox state of elongation factor G in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The Journal of biological chemistry*, 284(28), pp.18685–91.
- KOK, B., FORBUSH, B. & MCGLOIN, M., 1970. Cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution-I. A linear four step mechanism. *Photochemistry and photobiology*, 11(6), pp.457–75.
- KOMENDA, J., KNOPPOVÁ, J., KRYNICKÁ, V., NIXON, P.J. & TICHÝ, M., 2010. Role of FtsH2 in the repair of Photosystem II in mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 with impaired assembly or stability of the CaMn(4) cluster. *Biochimica et biophysica acta*, 1797(5), pp.566–75.
- KREBS, M., 2005. Gentechnische Modifikation von Photosystem II: Untersuchung zur Rolle von Methionin-Resten.
- KRIEGER-LISZKAY, A., 2005. Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of experimental botany*, 56(411), pp.337–46.
- KRIEGER-LISZKAY, A., FUFUZAN, C. & TREBST, A., 2008. Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis research*, 98(1-3), pp.551–64.
- KRIEGER-LISZKAY, A. & TREBST, A., 2006. Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *Journal of experimental botany*, 57(8), pp.1677–84.
- KRUK, J. & TREBST, A., 2008. Plastoquinol as a singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Biochimica et biophysica acta*, 1777(2), pp.154–62.
- KUSCHEL, L., HANSEL, A., SCHÖNHERR, R., WEISSBACH, H., BROTH, N., HOSHI, T. & HEINEMANN, S.H., 1999. Molecular cloning and functional expression of a human peptide methionine sulfoxide reductase (hMsrA). *FEBS letters*, 456(1), pp.17–21.
- KYLE, D.J., OHAD, I. & ARNTZEN, C.J., 1984. Membrane protein damage and repair: Selective loss of a quinone-protein function in chloroplast membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(13), pp.4070–4.
- LALOI, C., APEL, K. & DANON, A., 2004. Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current opinion in plant biology*, 7(3), pp.323–8.

- 
- LEMAIRE, S.D., GUILLON, B., LE MARÉCHAL, P., KERYER, E., MIGINIAC-MASLOW, M. & DECOTTIGNIES, P., 2004. New thioredoxin targets in the unicellular photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(19), pp.7475–80.
- LEVINE, R.L., MOSONI, L., BERLETT, B.S. & STADTMAN, E.R., 1996. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26), pp.15036–40.
- LOBANOV, A.V., HATFIELD, D.L. & GLADYSHEV, V.N., 2009. Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. *Biochimica et biophysica acta*, 1790(11), pp.1424–8.
- LOLL, B., KERN, J., SAENGER, W., ZOUNI, A. & BIESIADKA, J., 2005. Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature*, 438(7070), pp.1040–4.
- LOWTHER, W.T., BROTH, N., WEISSBACH, H. & MATTHEWS, B.W., 2000A. Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an “anti-oxidation” enzyme. *Biochemistry*, 39(44), pp.13307–12.
- LOWTHER, W.T., BROTH, N., WEISSBACH, H., HONEK, J.F. & MATTHEWS, B.W., 2000B. Thiol-disulfide exchange is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), pp.6463–8.
- LUO, S. & LEVINE, R.L., 2009. Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(2), pp.464–72.
- MATTOO, A.K., MARDER, J.B. & EDELMAN, M., 1989. Dynamics of the photosystem II reaction center. *Cell*, 56(2), pp.241–6.
- MAX, D., 2004. Mutagenese der lumenalen Seite der D1-Untereinheit von Photosystem II in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*.
- MEYER, Y., REICHHELD, J.P. & VIGNOLS, F., 2005. Thioredoxins in Arabidopsis and other plants. *Photosynthesis research*, 86(3), pp.419–33.
- MICHEL, H., 1982. Three-dimensional crystals of a membrane protein complex. The photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*. *Journal of molecular biology*, 158(3), pp.567–72.
- MICHEL, H. & DEISENHOFER, J., 1988. Relevance of the Photosynthetic Reaction Center from Purple Bacteria to the Structure of Photosystem II. *Biochemistry*, 27, pp.1–7.
- MINAGAWA, J. & TAKAHASHI, Y., 2004. Structure, function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins. *Photosynthesis research*, 82(3), pp.241–63.



- MOSKOVITZ, J., POSTON, J.M., BERLETT, B.S., NOSWORTHY, N.J., SZCZEPANOWSKI, R. & STADTMAN, E.R., 2000. Identification and characterization of a putative active site for peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) and its substrate stereospecificity. *The Journal of biological chemistry*, 275(19), pp.14167–72.
- MOSKOVITZ, J., BAR-NOY, S., WILLIAMS, W.M., REQUENA, J., BERLETT, B.S. & STADTMAN, E.R., 2001. Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), pp.12920–5.
- MOSKOVITZ, J., 2005. Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. *Biochimica et biophysica acta*, 1703(2), pp.213–9.
- MUSHEGIAN, A.R. & KOONIN, E.V., 1996. A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(19), pp.10268–73.
- MÜH, F., GLÖCKNER, C., HELLMICH, J. & ZOUNI, A., 2012. Light-induced quinone reduction in photosystem II. *Biochimica et biophysica acta*, 1817(1), pp.44–65.
- NAJAFPOUR, M.M. & GOVINDJEE, 2011. Oxygen evolving complex in photosystem II: better than excellent. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)*, 40(36), pp.9076–84.
- NEWMAN, S.M., BOYNTON, J.E., GILLHAM, N.W., RANDOLPH-ANDERSON, B.L., JOHNSON, A.M. & HARRIS, E.H., 1990. Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events. *Genetics*, 126(4), pp.875–88.
- NISHIYAMA, Y., YAMAMOTO, H., ALLAKHVERDIEV, S.I., INABA, M., YOKOTA, A. & MURATA, N., 2001. Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *The EMBO journal*, 20(20), pp.5587–94.
- NISHIYAMA, Y., ALLAKHVERDIEV, S.I., YAMAMOTO, H., HAYASHI, H. & MURATA, N., 2004. Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry*, 43(35), pp.11321–30.
- NISHIYAMA, Y., ALLAKHVERDIEV, S.I. & MURATA, N., 2011. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Physiologia plantarum*, 142(1), pp.35–46.
- NIXON, P.J., BARKER, M., BOEHM, M., DE VRIES, R. & KOMENDA, J., 2005. FtsH-mediated repair of the photosystem II complex in response to light stress. *Journal of experimental botany*, 56(411), pp.357–63.

- NOVOSELOV, S.V., RAO, M., ONOSHKO, N.V., ZHI, H., KRYUKOV, G.V., XIANG, Y., WEEKS, D.P., HATFIELD, D.L. & GLADYSHEV, V.N., 2002. Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. *The EMBO journal*, 21(14), pp.3681–93.
- OHNISHI, N., ALLAKHVERDIEV, S.I., TAKAHASHI, S., HIGASHI, S., WATANABE, M., NISHIYAMA, Y. & MURATA, N., 2005. Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. *Biochemistry*, 44(23), pp.8494–9.
- OKADA, K., IKEUCHI, M., YAMAMOTO, N., ONO, T., & MIYAO, M., 1996. Selective and specific cleavage of the D1 and D2 proteins of Photosystem II by exposure to singlet oxygen: factors responsible for the susceptibility to cleavage of the proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1274(1-2), pp.73–79.
- PERL-TREVES R. AND PERL A., 2002. Oxidative stress: an introduction. In *Oxidative Stress in Plants*. Van Montagu M., Inze D., Taylor and Francis Books Ltd, London and New York.
- PETROPOULOS, I., MARY, J., PERICHON, M. & FRIGUET, B., 2001. Rat peptide methionine sulphoxide reductase: cloning of the cDNA, and down-regulation of gene expression and enzyme activity during aging. *The Biochemical journal*, 355(Pt 3), pp.819–25.
- POSPÍŠIL, P., SNYRYCHOVÁ, I., KRUK, J., STRZAŁKA, K. & NAUS, J., 2006. Evidence that cytochrome b559 is involved in superoxide production in photosystem II: effect of synthetic short-chain plastoquinones in a cytochrome b559 tobacco mutant. *The Biochemical journal*, 397(2), pp.321–7.
- POSPÍŠIL, P., 2012. Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochimica et biophysica acta*, 1817(1), pp.218–31.
- PREISS, S., SCHRADER, S. & JOHANNINGMEIER, U., 2001. Rapid, ATP-dependent degradation of a truncated D1 protein in the chloroplast. *European journal of biochemistry / FEBS*, 268(16), pp.4562–9.
- RANAIVOSON, F.M., ANTOINE, M., KAUFFMANN, B., BOSCHI-MULLER, S., AUBRY, A., BRANLANT, G. & FAVIER, F., 2008. A structural analysis of the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase A from *Neisseria meningitidis*. *Journal of molecular biology*, 377(1), pp.268–80.
- RASZEWSKI, G., SAENGER, W. & RENGER, T., 2005. Theory of optical spectra of photosystem II reaction centers: location of the triplet state and the identity of the primary electron donor. *Biophysical journal*, 88(2), pp.986–98.
- RENGER, G. & RENGER, T., 2008. Photosystem II: The machinery of photosynthetic water splitting. *Photosynthesis research*, 98(1-3), pp.53–80.

- VAN RENSEN, J.J.S., 2002. Role of bicarbonate at the acceptor side of Photosystem II. *Photosynthesis research*, 73(1-3), pp.185–92.
- ROMERO, H.M. ET AL., 2004. Investigations into the role of the plastidial peptide methionine sulfoxide reductase in response to oxidative stress in Arabidopsis. *Plant physiology*, 136(3), pp.3784–94.
- ROUHIER, N., KAUFFMANN, B., TETE-FAVIER, F., PALLADINO, P., GANS, P., BRANLANT, G., JACQUOT, J.-P., & BOSCHI-MULLER, S., 2007. Functional and structural aspects of poplar cytosolic and plastidial type a methionine sulfoxide reductases. *The Journal of biological chemistry*, 282(5), pp.3367–78.
- ROUHIER, N., VIEIRA DOS SANTOS, C., TARRAGO, L. & REY, P., 2006. Plant methionine sulfoxide reductase A and B multigenic families. *Photosynthesis research*, 89(2-3), pp.247–62.
- RUAN, H., TANG, XIANG D., CHEN, M.-L., JOINER, M.A., SUN, G., BROTH, N., WEISSBACH, H., HEINEMANN, S.H., IVERSON, L., WU, C.-F., HOSHI, T., CHEN, M.-L., JOINER, M.A. & HEINEMANN, S.H., 2002. High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), pp.2748–53.
- RUDHE, C., CHEW, O., WHELAN, J. & GLASER, E., 2002. A novel in vitro system for simultaneous import of precursor proteins into mitochondria and chloroplasts. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 30(2), pp.213–20.
- RÖDIGER, A., BAUDISCH, B., LANGNER, U. & KLÖSGEN, R.B., 2011. Dual targeting of a mitochondrial protein: the case study of cytochrome c1. *Molecular plant.*, 4(4), pp.679–87.
- SADANANDOM, A., POGHOSYAN, Z., FAIRBAIRN, D.J. & MURPHY, D.J., 2000. Differential regulation of plastidial and cytosolic isoforms of peptide methionine sulfoxide reductase in Arabidopsis. *Plant physiology*, 123(1), pp.255–64.
- SAGER, R. & GRANICK, S., 1953. Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardi*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 56(5), pp.831–8.
- SCHÄGGER, H., & VON JAGOW, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166(2), 368–79.
- SCHULZE, J. (2002). Konstruktion und Analyse von *psbA*-Mutanten in *Chlamydomonas reinhardtii*.
- SHAO, N., BECK, C.F., LEMAIRE, S.D. & KRIEGER-LISZKAY, A., 2008. Photosynthetic electron flow affects H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling by inactivation of catalase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 228(6), pp.1055–66.

- 
- SHAROV, V.S. & SCHÖNEICH, C., 2000. Diastereoselective protein methionine oxidation by reactive oxygen species and diastereoselective repair by methionine sulfoxide reductase. *Free radical biology & medicine*, 29(10), pp.986–94.
- SMALL, I., WINTZ, H., AKASHI, K. & MIREAU, H., 1998. Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant molecular biology*, 38(1-2), pp.265–77.
- SOZER, O., KIS, M., GOMBOS, Z. & UGHY, B., 2011. Proteins, glycerolipids and carotenoids in the functional photosystem II architecture. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 16, pp.619–43.
- SPECTOR, D., ETIENNE, F., BROT, N. & WEISSBACH, H., 2003. New membrane-associated and soluble peptide methionine sulfoxide reductases in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 302(2), pp.284–289.
- STADTMAN, E.R. & BERLETT, B.S., 1998. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug metabolism reviews*, 30(2), pp.225–43.
- STADTMAN, E.R. & LEVINE, R.L., 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids*, 25(3-4), pp.207–18.
- STADTMAN, E.R. & LEVINE, R.L., 2000. Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, pp.191–208.
- STADTMAN, E.R., MOSKOVITZ, J. & LEVINE, R.L., 2003. Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. *Antioxidants & redox signaling*, 5(5), pp.577–82.
- SUEOKA, N., 1960. Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 46(1), pp.83–91.
- SUN, H., GAO, J., FERRINGTON, D.A., BIESIADA, H., WILLIAMS, T.D. & SQUIER, T.C., 1999. Repair of oxidized calmodulin by methionine sulfoxide reductase restores ability to activate the plasma membrane Ca-ATPase. *Biochemistry*, 38(1), pp.105–12.
- SUNDBY, C., HÄRNDAHL, U., GUSTAVSSON, N., AHRMAN, E. & MURPHY, D.J., 2005. Conserved methionines in chloroplasts. *Biochimica et biophysica acta*, 1703(2), pp.191–202.
- TARRAGO, L., KAYA, A., WEERAPANA, E., MARINO, S.M. & GLADYSHEV, V.N., 2012. Methionine sulfoxide reductases preferentially reduce unfolded oxidized proteins and protect cells from oxidative protein unfolding. *The Journal of biological chemistry*.

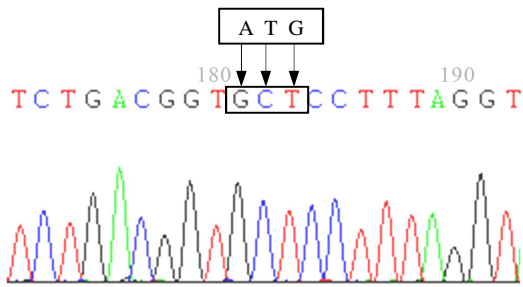
- TARRAGO, L., LAUGIER, E., ZAFFAGNINI, M., MARCHAND, C., LE MARÉCHAL, P., ROUHIER, N., LEMAIRE, S.D. & REY, P., 2009. Regeneration mechanisms of *Arabidopsis thaliana* methionine sulfoxide reductases B by glutaredoxins and thioredoxins. *The Journal of biological chemistry*, 284(28), pp.18963–71.
- TARRAGO, L., LAUGIER, E. & REY, P., 2009. Protein-repairing methionine sulfoxide reductases in photosynthetic organisms: gene organization, reduction mechanisms, and physiological roles. *Molecular plant*, 2(2), pp.202–17.
- TELFER, A., 2002. What is beta-carotene doing in the photosystem II reaction centre? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 357(1426), pp.1431–39; discussion 1439–40, 1469–70.
- UMENA, Y., KAWAKAMI, K., SHEN, J.-R. & KAMIYA, N., 2011. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, 473(7345), pp.55–60.
- VASS, I., SASS, L., SPETEA, C., BAKOU, A., GHANOTAKIS, D.F. & PETROULEAS, V., 1996. UV-B-induced inhibition of photosystem II electron transport studied by EPR and chlorophyll fluorescence. Impairment of donor and acceptor side components. *Biochemistry*, 35(27), pp.8964–73.
- VASS, IMRE, 2012. Molecular mechanisms of photodamage in the Photosystem II complex. *Biochimica et biophysica acta*, 1817(1), pp.209–17.
- VASS, I., TURCSÁNYI, E., TOULOUPAKIS, E., GHANOTAKIS, D. & PETROULEAS, V., 2002. The mechanism of UV-A radiation-induced inhibition of photosystem II electron transport studied by EPR and chlorophyll fluorescence. *Biochemistry*, 41(32), pp.10200–8.
- VIEIRA DOS SANTOS, C., CUINE, S., ROUHIER, N. & REY, P., 2005. The *Arabidopsis* plastidic methionine sulfoxide reductase B proteins. Sequence and activity characteristics, comparison of the expression with plastidic methionine sulfoxide reductase A, and induction by photooxidative stress. *Plant physiology*, 138(2), pp.909–22.
- VIEIRA DOS SANTOS, C. & REY, P., 2006. Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends in plant science*, 11(7), pp.329–34.
- VOGT, W., 1995. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free radical biology & medicine*, 18(1), pp.93–105.
- WEISSBACH, H., RESNICK, L. & BROTH, N., 2005. Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage. *Biochimica et biophysica acta*, 1703(2), pp.203–12.
- ZOUNI, A., WITT, H.T., KERN, J., FROMME, P., KRAUSS, N., SAENGER, W. & ORTH, P., 2001. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature*, 409(6821), pp.739–43.

## **Anhang A**

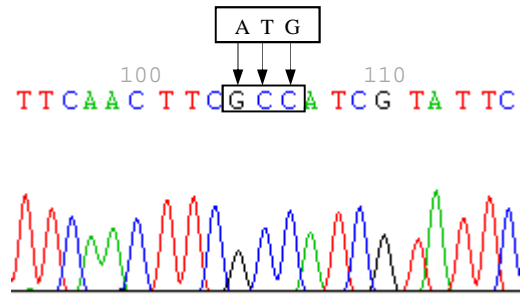
### **Sequenzrohdaten der Mutanten**

Dargestellt sind Ausschnitte der Elektropherogramme, der durch gerichtete Mutagenese erzeugten Mutanten M172A, M172L, M183A, M183L, M194A, M194L sowie M293A. Die Basenaustausche sind durch Pfeile markiert. Die eingerahmten Basen wurden im Rahmen der gerichteten Mutagenese eingeführt. Die Elektropherogramme wurden mit der Chromas-Software (<http://technelysium.com.au>) ausgewertet.

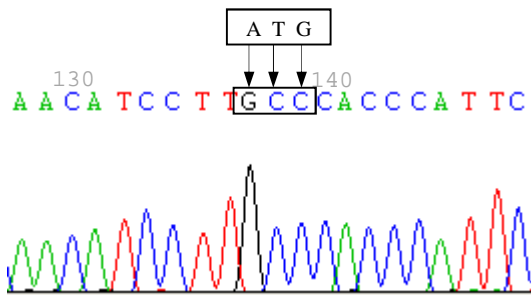
**M172A** Austausch von ATG gegen GCT



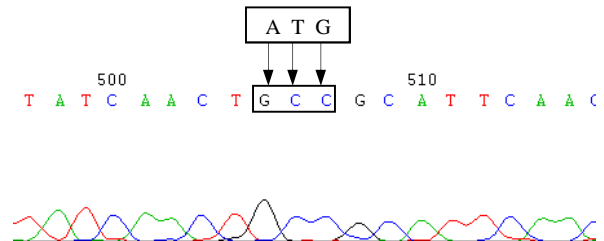
**M183A** Austausch von ATG gegen GCC



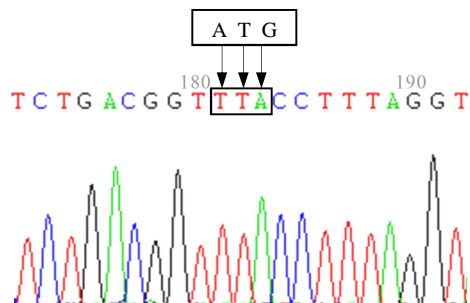
**M194A** Austausch von ATG gegen GCC



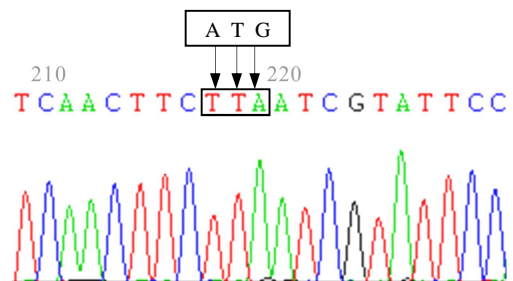
**M293A** Austausch von ATG gegen GCC



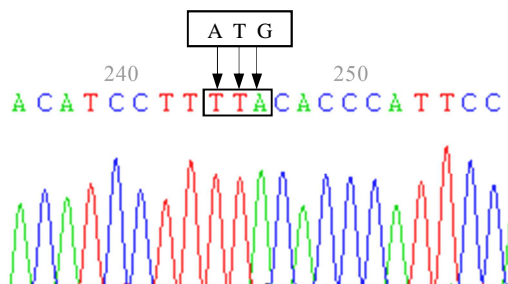
**M172L** Austausch von ATG gegen TTA



**M183L** Austausch von ATG gegen TTA



**M194L** Austausch von ATG gegen TTA

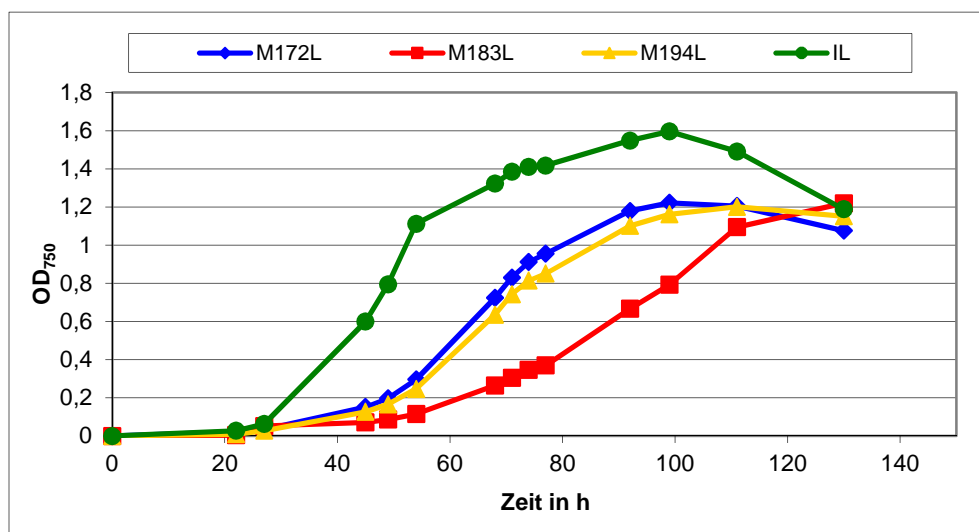
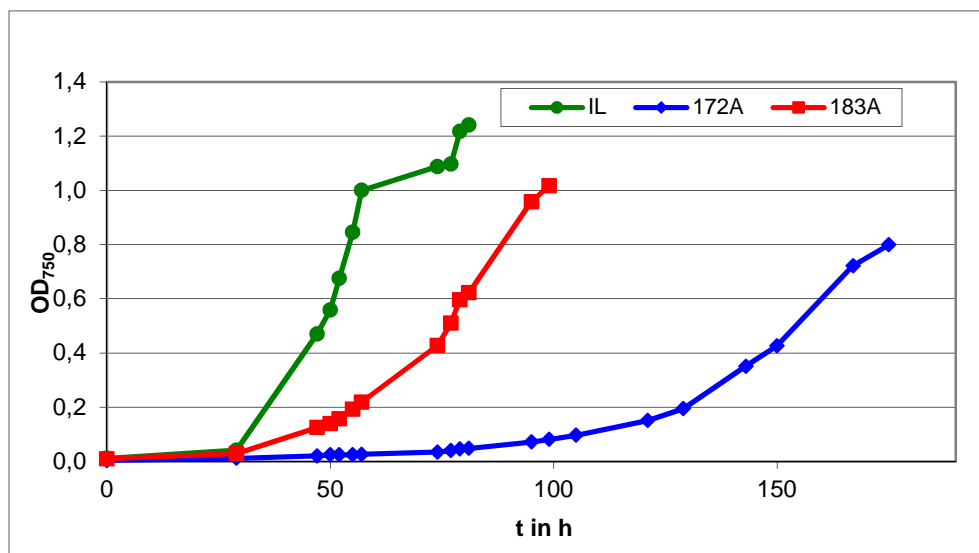
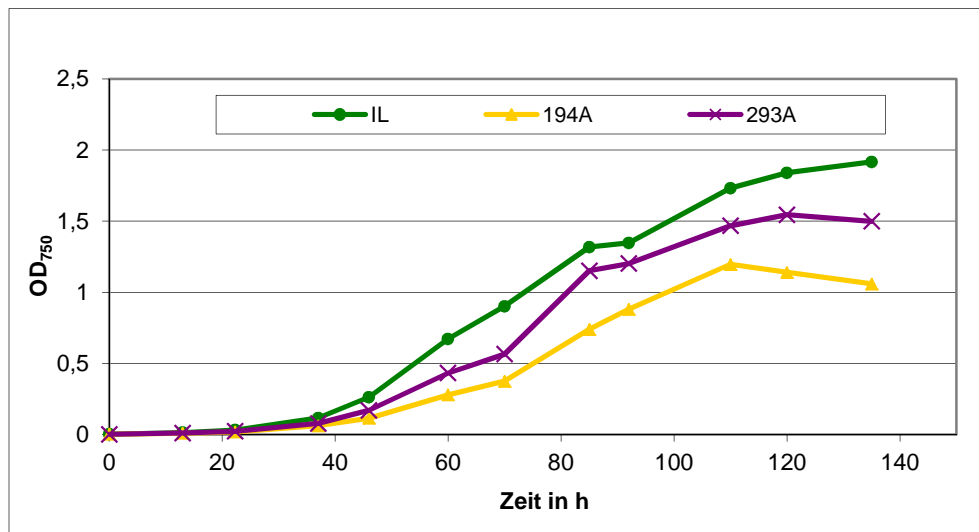


## Anhang B

### Wachstumskurven der Mutanten

Dargestellt ist das photoautotrophe Wachstum der Mutanten M172A, M183A, M194L und M293A sowie des Referenzstammes IL anhand einer exemplarischen Wachstumskurve jeder Mutante. Aufgetragen wurde die  $OD_{750}$  der Algenkulturen gegen die Zeit (h). Das Wachstum erfolgte bei 24°C, 3,5%  $CO_2$ -Begasung und normalen Lichtverhältnissen von  $60 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  in HS-Medium (vgl. 2.2.4.1).





## Anhang C

### Nukleinsäuresequenz der *msrA* - Gene aus *C. reinhardtii*

Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzierung der codierenden Bereiche der *msrA*-Gene. Jedes Gen wurde durch zwei Sequenzier-Reaktionen, unter Verwendung von Primern in 5`- 3`-Richtung bzw. in 3`- 5`-Richtung (s. 2.1.7), mit überlappenden Sequenz-Bereichen analysiert.

***msrA1-Gen:***

ATGGCGACTAACGGGAACGGAGCTTCTGGCGCGGAGCTCGCCACTTTCGCGCTTGGCTGATTCTGGCACCCGGAGGCTT  
CGTTCGCGAACGTTCCCGGTGTGGTGAAGACTCGCGTGGGCTACACGGGCGGCAGCCGCCCAACCCACCTACGAGTC  
TGTGTGCGCTGGCGACGGCCACACAGAGGCGATGCGGGTCTGGTTTGACCCTGCCATCATCTCGTACGAGGACCTGCTCA  
AGCAATTCTTCCGGGAGCACGACCCACCCAGAAGTCCAAATGCCAGTACAAGTCCGGCTGTGTGGTACCATAGCGAGGCG  
CACGGCACCGCCCTGGCCGCCGTGATGAAGGAGCTGGAGGGCAAGTACCGCGTGC GGCTGGCCACCCTGTGGACCC  
GCCGGGACTGGTGGGACGCGGAGGAGTACCACCAGAAATACATTGAGAAGTCCATGATGCGCCGTGGCTCTGCGGGCT  
GGTGGTGA

***msrA2-Gen:***

ATGCTTGTGCTCGCTATAGCACTCACATCATTGCGCAAGTCCGTAAACGGGCGCAACGCTGTATTGCGGTGCCAAGCCCGG  
TTCAAGGACCCATCGCTGCAAGCTCAGCGGTGCGCCCGGACCCCTAGGGGCCAGCCCGCCGACCCCGCCGCG  
GTGCCACGCCACGCTCCCGACGTACGCTCCGGGCCGTAAACGAAAACAGCGCCAGCGGCGTTAGCGCAGCTGCC  
GGCAGCTCCTCAAGATGGAGGTCGCGACTCTGGCGGTGGCTGCTTCTGGTGTGTTGAGGCTGTTACAACATGCTGAG  
GGGCGTGCAGTCCGCCATCAGCGGCTACGCCAACGGCGACGTCAAGGACCCACCTACAAGGCGGTCTGCTCCGGCACC  
ACCGGGCATGCCGAGGTGGTCCAGATCACGTACGACCCACCGTCATCTCTACAAGGAGATCCTGGAGATCTTCTTAC  
CGTGATGACCCACCAAGGACAGGCAAGGACGAGTGGGCAACGACGTGGGCACTCAGTACCGGTCCATCATCTGCACACAACG  
ACGCGCAGCGGCCATTGCGCAGGAGGTGATTGCCGACATCAGCGCCAGGGGCTGTGGCCGGCGCCCATCGTACTCA  
GGTGGAGCCGCTGGACGTCTTCTACCCCGGAGGACTACCACCAGGACTACTACGTACAGAACCCGGGCCAGGGTTAC  
TGCCGCGCCGTGGTGGGGCCCAAGTGCCTAAGTTCAGGCAGAAGTTCGCCAAGCTGATCAAGGCGTGA

***msrA3-Gen:***

ATGCAGACCCTAAAGCCGGGCGCTGCGCGTCCAAACATTCTCCGACGGGCTTCTCGCACTCACTCAGTCGCAGCGATGGG  
CTTCTTCACTTTGGCAGTCTATTTAGCAAGGAGCAATGTAAGCTCGCGCCTGCGCAGGCCCCAGAGGGACTGAAAGTTGGC  
GACGTTGCGGGGCGGCTGCTTCTGGGGCATTGAGCTGGCCTACCAGCGCGTGCCGGGCGTGGTGGCCACCACCGTGGG  
CTACACCGGAGGCGCCACAAGAACCCCAACTACGACTCTGTGTGCAGCGCCGTCGGGGCATGCTGAGGCCATCCAG  
TGCACCTACGACCCCAAGCAATGCAGCTACGACTCCCTACTGGACACGTTCTTGCACGTGTGGATCAACCACCTCAAC  
CGCCAGGGCAACGACCGCGGCACGCAGTACCGCTCCGCCATTTACTACCACGACGAGCAGCAGCGCGCGGGCGGGCG  
GCGCGCATCGCGGCGGCCAACACGCCATCGCGGAGGGCAAGGCGCCGTGCGGCTGGGCTGGCAGCCGCGTGGTGGC  
GCAGCTGGAGCCGGCGGGCGACTACTACATCGCGGAGGACTACCACCAGCAGTACCTGTCCAAGGGTGGGCGCTTCGGC  
CAGGCGCAATCAGCGGCCAAGGGCTGCAACGACCCCATCCGCTGCTACGGCTGA

***msrA4-Gen:***

ATGAAGGTCCAGCTGTCCAACGGCATGGTGGCTGCTGTGGCCAAGGTGGACAAGGAGTCCGTGACCCTGGACCTGAACC  
ACGAGCTGGCGGGGAGGCGCTCACCTTTGACGTTGAGCTCATGAAGCTGGTACCAGCGAGCGCCTGCAGAAGGCCAC  
CTTTGACGCCGCTGCTTACGGGGCCCGGAGCTGGCCTTCCAGCGTGTGCCGGCGTGCTGTCCACCGAGGTGGGCTAC  
AGCAACGGCGAGGCCAAGGACCCACCTACGAGGAGGTGTGCGAGGGCACCACTGGCCACGCGGAGGTCGTGCAGGTC  
CTGTACGACCCCGCTGACGTGTCTGACGACCGCTGCTTGAGGAGTTCTGGGGCCGCCACAACCCACGCAGCTCAACC  
GCCAAGGCAACGACGTGGGCACTCAGTACCGTAGCGCCATTTACGACACGCGCCGAGCAGCTGGAGGCAGCCAACAA  
GAGCAAGGCTGCCTTCCAGGCCAAGTTCAAGGACCCGATTGTGACGGTGGTTGAGCCATCAACAACCTACCATTCCGCCG  
AGCCCTACCACCAGCAGTACCTGGCGCGCGGGCGCCGCTTCGGCCGGCCGACAGCGCCAACAAGGGCTGCGACGACC  
CCATCCGCTGCTACGGCTAA

## Anhang D

### Rohdaten der Starklichtexperimente

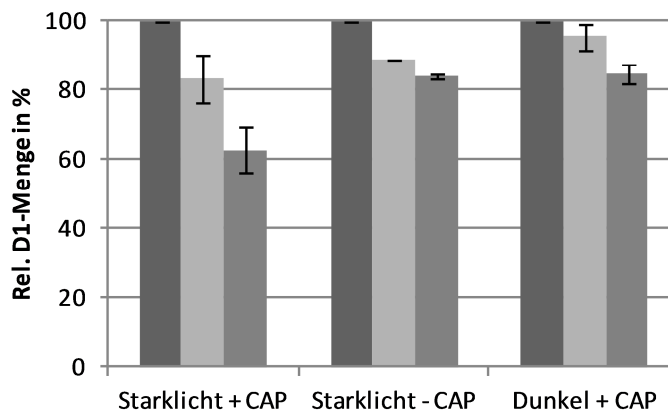
**Western-Blot:** Dargestellt sind die Western-Blot Analysen mit chicken anti-PsbA (Verdünnung 1:10.000) mit isolierten Gesamtzell-Protein aus starklichtexponierten Algen, die zur *de novo* Synthese des D1-Proteins befähigt waren bzw. deren plastidäre Proteinbiosynthese mit 200 µg/ml CAP inhibiert wurde sowie aus Algen, die bei Dunkelheit unter Zugabe von 200 µg/ml CAP inkubiert wurde. Der Pfeil kennzeichnet das D1-Protein.

**Densitometrische Berechnung:** Angegeben werden die mit Hilfe der AIDA v4.03 Software densitometrisch ausgewerteten D1-Proteinmengen. Dazu wurde das Integral der Peakfläche abzüglich der Hintergrund-Färbung berechnet. Angegeben werden der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen nach jeweils 0, 30 und 60 Minuten sowie die Standardabweichung. Die Menge an D1-Protein zu Beginn des jeweiligen Experimentes entspricht dabei 100 %.

**Graphische Darstellung:** Die relative D1-Menge wird für die beiden Starklichtinkubationen (Starklicht + CAP; Starklicht - CAP) sowie die Dunkel-Inkubation (Dunkel + CAP) in % angegeben.

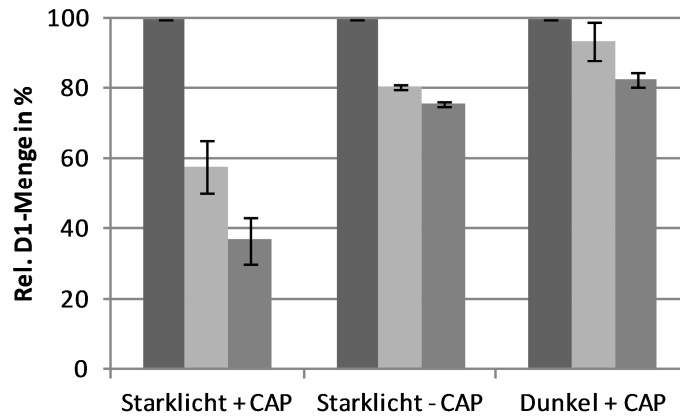
#### Referenzstamm IL

D1-Protein →	Starklicht + CAP			Starklicht - CAP			Dunkel + CAP		
	0	30	60	0	30	60	0	30	60
Zeit (min)	0	30	60	0	30	60	0	30	60
Rel. D1-Menge (%)	100	83	63	100	89	84	100	96	85
Std-Abweichung	0	7,1	6,5	0	0	1	0	3,7	2,7



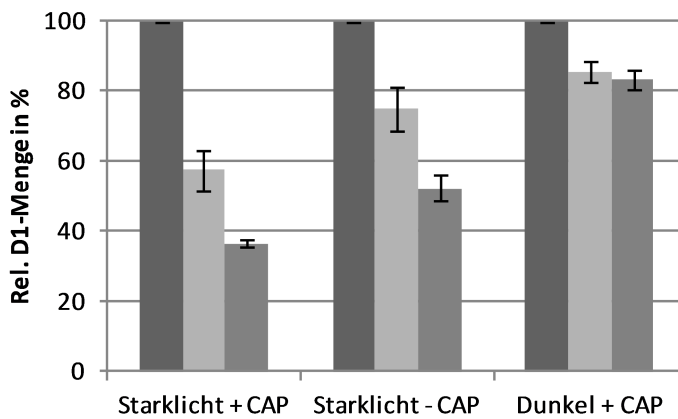
### Mutante M172L

D1-Protein →	Starklicht + CAP			Starklicht - CAP			Dunkel + CAP		
	0	30	60	0	30	60	0	30	60
Zeit (min)	0	30	60	0	30	60	0	30	60
Rel. D1-Menge (%)	100	58	37	100	81	76	100	94	82
Std-Abweichung	0	7,8	6,4	0	0,5	0,5	0	5,6	2,1



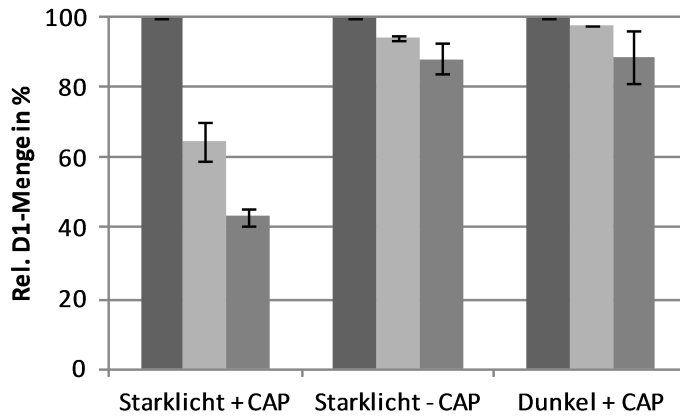
### Mutante M183L

D1-Protein →	Starklicht + CAP			Starklicht - CAP			Dunkel + CAP		
	0	30	60	0	30	60	0	30	60
Zeit (min)	0	30	60	0	30	60	0	30	60
Rel. D1-Menge (%)	100	57	37	100	75	53	100	86	83
Std-Abweichung	0	6,1	1	0	6	3,5	0	3	2,7



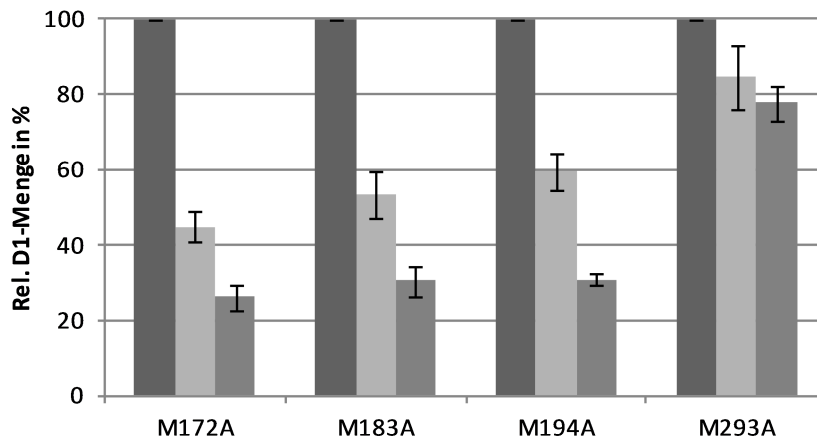
### Mutante M194L

D1-Protein →	Starklicht + CAP			Starklicht - CAP			Dunkel + CAP		
	0	30	60	0	30	60	0	30	60
Zeit (min)	0	30	60	0	30	60	0	30	60
Rel. D1-Menge (%)	100	65	43	100	95	89	100	98	89
Std-Abweichung	0	5,5	2,4	0	0,5	4,5	0	0	7,7



### Alanin-Mutanten – Starklicht + CAP

D1-Protein →	M172A			M183A			M194A			M293A		
	0	30	60	0	30	60	0	30	60	0	30	60
Zeit (min)	0	30	60	0	30	60	0	30	60	0	30	60
Rel. D1-Menge (%)	100	45	26	100	53	31	100	60	31	100	85	78
Std-Abweichung	0	4	3,3	0	6,1	3,9	0	4,8	1,7	0	8,7	4,4



## Anhang E

### Mutation im codierenden Bereich des *msrA3*-Gens von *C. reinhardtii*

Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzierung des pJETmsrA3-Plasmids im Vergleich zur sequenzierten *msrA3*-cDNA. Nach Klonierung der *msrA3*-Sequenz in den pJET-Vektor (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und anschließendem Transfer in den *E. coli*-Stamm NovaBlue (Novagen, Darmstadt, Deutschland) wurde ein Basenaustausch an Position 460 von Cytosin zu Thymin festgestellt (**A**, rot markiert). Das dadurch entstandene Triplet TAG (**A**, schwarz eingerahmt) codiert ein STOP-Signal während der Translation. Es kommt somit an der Aminosäureposition 154 (**B**, rot markiert) zum Abbruch der entstehenden Proteinkette. Im *down-stream* Bereich der Punktmutation findet man weiterhin eine 21 Basenpaar bzw. 7 Aminosäure große Deletion (grau hervorgehoben).

<b>A)</b>	
msrA3cDNA	GTTCCTTCGCACGTGTGGATCCAACCACCCTCAACCGCCAGGGCAACGACCGCGGCACGCA 425
pJETmsrA3	GTTCCTTCGCACGTGTGGATCCAACCACCCTCAACCGCCAGGGCAACGACCGCGGCACGCA 425 *****
msrA3cDNA	GTACCGCTCCGCCATTTACTACCACGACGAGCAG <b>CAG</b> CGCGCGGCGG <b>CGGCGGC</b> CGCGCAT 485
pJETmsrA3	GTACCGCTCCGCCATTTACTACCACGACGAGCAG <b>TAG</b> CGCGCGGCGG----- 485 *****
msrA3cDNA	CGCGGCGGCCAACCAACGCCATCGCGGAGGGCAAGGCGCCGTCGCGCTGGGCTGGCAGCCG 545
pJETmsrA3	-----CCAACAACGCCATCGCGGAGGGCAAGGCGCCGTCGCGCTGGGCTGGCAGCCG 545 *****
<b>B)</b>	
ASmsrA3cDNA	MQTLKPGAARPNILRRASRTHSVAAMGFFNFGSLFSKEQCKLAPAQAPEGLKLATFAGGC 60
ASpJETmsrA3	MQTLKPGAARPNILRRASRTHSVAAMGFFNFGSLFSKEQCKLAPAQAPEGLKLATFAGGC 60 *****
ASmsrA3cDNA	FWGIELAYQRVPGVVATTVGYTGGADKNPNYDVS <del>CSGRSGHAEAI</del> QCTYDPKQCSYDSL 120
ASpJETmsrA3	FWGIELAYQRVPGVVATTVGYTGGADKNPNYDVS <del>CSGRSGHAEAI</del> QCTYDPKQCSYDSL 120 *****
ASmsrA3cDNA	D <del>T</del> FFARVDPTTLNRQGNDRGTQYRS <del>AIYYHDEQ</del> <b>Q</b> RAAA <b>AA</b> RIAAANNAIAEGKAPSRWAG 180
ASpJETmsrA3	D <del>T</del> FFARVDPTTLNRQGNDRGTQYRS <del>AIYYHDEQ</del> <b>-</b> RAAA-----NNAIAEGKAPSRWAG 172 *****
ASmsrA3cDNA	SRVVAQLEPAGDYIIAEDYHQYLSKGRFGQAQSAAGCNDPIRCYG 228
ASpJETmsrA3	SRVVAQLEPAGDYIIAEDYHQYLSKGRFGQAQSAAGCNDPIRCYG 220 *****

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Weiterhin erkläre ich, dass ich andere als von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Mit der vorgelegten Arbeit bewerbe ich mich zum ersten Mal um die Erlangung des Doktorgrades.

Teuchern, September 2013

Jana Schulze



## **Danksagung**

Für die Überlassung des interessanten Themas, die ständig gewährte Betreuung und Diskussionsbereitschaft, gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. U. Johanningmeier.

Für das nette Arbeitsklima und die großartige Unterstützung während meiner Arbeit danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Zellphysiologie.

Ein großes Dankeschön gilt vor allem Ivo Bertalan für die Hilfe und Diskussionsbereitschaft während der letzten Jahre, Michaela für das Korrekturlesen meines Werkes und Ulrike für die Hilfe bei der D1-Grafik.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken, vor allem meinen Eltern. Ohne ihre Hilfe und Unterstützung wäre ich nicht da, wo ich heute angekommen bin. Meinem Mann danke ich für den Druck, den er aufrechterhalten hat und ohne den ich wahrscheinlich nie zu einem Ende gekommen wäre. Meinen Kindern danke ich für die nötige Abwechslung und Fröhlichkeit, ohne die ich die anstrengende Zeit nicht überstanden hätte.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Geburtsdatum und -ort 29.01.1977 in Hohenmölsen  
Nationalität deutsch  
Familienstand verheiratet, 3 Kinder

### Schulbildung und Studium

---

1983-1995 **Allgemeinbildende Oberschule Hohenmölsen**  
**Gymnasium Hohenmölsen/Teuchern**  
Abschluss: Abitur, Note: sehr gut

10/1995-09/1996 **Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden (FH)**  
Studium der Landespflege

10/1996-11/2002 **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**  
Biologiestudium

- Diplomarbeit in der Abteilung Zellphysiologie im Rahmen eines EU-Forschungsprogramms: „Konstruktion und Analyse von *psbA*-Mutanten in *Chlamydomonas reinhardtii*“
- Abschluss: Diplom – Biologin, Note: sehr gut

01/2003-07/2009 **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**  
Institut für Biologie / Arbeitsgruppe Zellphysiologie  
Doktorandin  
03/2008-03/2009 Elternzeit

08/2009-03/2010 arbeitssuchend

04/2010-07/2013 **InnovaStem GmbH, Leipzig**  
Leiter Qualitätsmanagement

seit 07/2013 **Northwest Biotherapeutics GmbH, Leipzig**  
Leiter Qualitätssicherung

## Publikationen

Johanningmeier U, Bertalan I, Hilbig L, Schulze J, Wilski S, Zeidler E and Oettmeier W (2006) Engineering the D1 Subunit of Photosystem II: Application to Biosensor Technology. In: Giardi MT & Piletska EV (eds), Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins: Biochips, Biosensors and Biodevices. Landes Biosciences , pp 46-56.

## Posterpräsentationen

“Extensive modifications of the D1 subunit of photosystem II in a *psba*-deletion mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*”

- Botanikertagung, Braunschweig, 05.-10.09.2004

“Methionines with potential antioxidant function in photosystem II”

- Chlamydomonas-Meeting, Jena, 14.-16.10.2005
- 3rd International Symposium "Signals, Sensing and Plant Primary Metabolism", Potsdam, 26.-29.04.2006

“Expression pattern of *msrA* genes under various stress conditions in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* “

- Botanikertagung, Hamburg, 03.-07.09.2007

## Vorträge

“Methionines in proteins and their protective role against oxidative stress“

- 2. Mitteldeutsches Pflanzenphysiologentreffen, Jena, 07.02.2004

“Methionine oxidation and Methionine sulfoxide reductase (MSR)“

- 5. Mitteldeutsches Pflanzenphysiologentreffen, Leipzig, 02.02.2007