

**DIE FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG  
DES AUGENFLECKPROTEINS SOUL3 IN  
*CHLAMYDOMONAS REINHARDTII***



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN

„DOCTOR RERUM NATURALIUM“ (DR. RER. NAT.)

VORGELEGT DEM RAT DER BIOLOGISCH-PHARMAZEUTISCHEN FAKULTÄT  
DER FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA

VON

DIPLOM BIOCHEM. THOMAS NOLTE (GEB. SCHULZE)

GEBOREN AM 15.02.1980 IN ALTENBURG

WEIMAR, DEN 19.08.2013

„Alles, was im Weltall existiert, ist die Frucht von Zufall und Notwendigkeit.“

Demokrit (460-370 v. Chr.), griechischer Naturphilosoph

Promotionsgesuch eingereicht am 09.09.2013

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2008 bis Dezember 2012 am Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie der Friedrich-Schiller-Universität in Jena unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Maria Mittag angefertigt. Die öffentliche Verteidigung fand am 06.01.2014 im Institut für Allgemeine Botanik, Am Planetarium 1 in Jena statt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Maria Mittag, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie, Am Planetarium 1, 07743 Jena
2. Gutachter: Prof. Dr. Ralph Oelmüller, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie, Dornburger Str. 159, 07743 Jena
3. Gutachter: Prof. Michael Schroda, Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Biologie - Molekulare Biotechnologie und Systembiologie, Paul-Ehrlich Strasse 23, 67663 Kaiserslautern

<b>1.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>DIE <i>C. REINHARDTII</i>-ZELLE .....</b>	<b>3</b>
2.1.1	<i>C. REINHARDTII</i> ALS EUKARYOTISCHER MODELLORGANISMUS .....	5
<b>2.2</b>	<b>DER AUGENFLECK UND DIE PHOTOTAXIS VON <i>C. REINHARDTII</i> .....</b>	<b>6</b>
2.2.1	POSITION DES AUGENFLECKS IN DER ZELLE .....	6
2.2.2	ULTRASTRUKTUR UND FUNKTIONSWEISE DES AUGENFLECKS .....	7
2.2.3	PHOTOMOTILITÄT VON <i>C. REINHARDTII</i> .....	9
2.2.4	BEKANNTE KOMPONENTEN DES AUGENFLECKS .....	10
2.2.5	DAS AUGENFLECKPROTEOM UND -PHOSPHOPROTEOM VON <i>C. REINHARDTII</i> .....	11
2.2.6	DIE SOUL/HBP FAMILIE .....	13
2.2.7	TETRAPYRROLE ALS KOFAKTOREN IN PFLANZLICHEN ZELLEN .....	14
<b>2.3</b>	<b>BIOLOGISCHE RHYTHMEN UND DIE CIRCADIANE UHR .....</b>	<b>17</b>
2.3.1	DAS CIRCADIANE SYSTEM IN <i>C. REINHARDTII</i> .....	18
<b>2.4</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG.....</b>	<b>20</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>UNTERSUCHUNGEN DER SOUL/HBP-DOMÄNE DES AUGENFLECK-PROTEINS SOUL3.....</b>	<b>21</b>
3.1.1	VERGLEICH DER AMINOSÄURESEQUENZEN VERSCHIEDENER SOUL/HBPs AUS UNTERSCHIEDLICHEN SPEZIES .....	21
3.1.2	HERSTELLUNG EINES VEKTORS ZUR ÜBEREXPRESSION VON SOUL3 .....	22
3.1.3	ÜBEREXPRESSION UND AUFREINIGUNG VON SOUL3 IN <i>E. COLI</i> .....	23
3.1.4	KOFAKTOR BINDUNGSVERSUCHE MIT HÄMIN-AGAROSE .....	24
3.1.5	SPEZIFITÄT DER HÄMINBINDUNG AN SOUL3 .....	25
3.1.6	DAS ABSORPTIONSSPEKTRUM VON SOUL3 .....	27
<b>3.2</b>	<b>IDENTIFIZIERUNG POTENTIELLER INTERAKTIONSPARTNER VON SOUL3 .....</b>	<b>29</b>
3.2.1	KOMPLEXBILDUNGSVERHALTEN VON SOUL3 .....	29
3.2.2	IDENTIFIZIERUNG POTENTIELLER INTERAKTIONSPARTNER VON SOUL3 .....	30
<b>3.3</b>	<b>LOKALISIERUNGSSTUDIEN VON SOUL3 IN <i>C. REINHARDTII</i> .....</b>	<b>33</b>
3.3.1	MEMBRANAUFREINIGUNG/„NA <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -STRIPPING“ .....	33
3.3.2	SUBZELLULÄRE LOKALISIERUNG VON SOUL3 MITTELS INDIREKTER IMMUNFLUORESCENZ.....	34
3.3.2.1	Lokalisierung von SOUL3 in der Mutante <i>eye3-2</i> sowie ChR1 .....	36
<b>3.4</b>	<b>SOUL3 <i>KNOCK DOWN</i> DURCH ERZEUGUNG VON <i>SOUL3</i> AMIRNS LINIEN.....</b>	<b>39</b>
3.4.1	HERSTELLUNG EINES AMI <sub>SOUL3</sub> RNS VEKTORS .....	39
3.4.2	CHARAKTERISIERUNG DER AMI <sub>SOUL3</sub> ZELLINIEN .....	41
3.4.2.1	Lichtmikroskopische Charakterisierung der ami <sub>SOUL3</sub> -Zelllinien .....	43
3.4.2.2	Ermittlung der Augenfleckfläche.....	46
3.4.2.3	Analyse der Phototaxisfähigkeit der ami <sub>SOUL3</sub> -Zelllinien .....	47

<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>SOUL3 BINDET HÄMIN .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2</b>	<b>SOUL3 BILDET PROTEINKOMPLEXE MIT UNTERSCHIEDLICHEM MOLEKULARGEWICHT ....</b>	<b>51</b>
<b>4.3</b>	<b>DIE IDENTIFIZIERUNG POTENTIELLER INTERAKTIONSPARTNER VON SOUL3 .....</b>	<b>53</b>
<b>4.4</b>	<b>SOUL3 IST SPEZIFISCH IM AUGENFLECK LOKALISIERT .....</b>	<b>56</b>
<b>4.5</b>	<b>SOUL3 IST ALS PERIPHER ASSOZIIERTES MEMBRANPROTEIN AN DEN LIPID-GLOBULI DES AUGENFLECKS LOKALISIERT .....</b>	<b>57</b>
<b>4.6</b>	<b>VERSUCHE ZUR FUNKTIONELLEN CHARAKTERISIERUNG DES SOUL3 PROTEINS IN C. REINHARDTII .....</b>	<b>59</b>
4.6.1	DIE AMI <sub>SOUL3</sub> ZELLINIEN WEISEN EIN REDUZIERTES SOUL3 PROTEINNIVEAU AUF .....	60
4.6.2	EINE REDUZIERUNG DES SOUL3 PROTEINNIVEAUS WIRKT SICH AUF DIE KORREKTE POSITIONIERUNG DES AUGENFLECKS AUS .....	62
4.6.3	AUCH DIE GRÖÖBE DER AUGENFLECKFLÄCHE IST IN DEN AMI <sub>SOUL3</sub> -ZELLINIEN VERÄNDERT.....	64
4.6.4	DIE AMI <sub>SOUL3</sub> ZELLINIEN ZEIGTEN EIN GESTÖRTES PHOTOTAKTISCHES VERHALTEN.....	66
<b>5.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>68</b>
<b>5.1</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>68</b>
5.1.1	GERÄTE.....	68
5.1.2	CHEMIKALIEN .....	69
5.1.3	KITS UND VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	69
5.1.4	ENZYME .....	70
5.1.5	ORGANISMEN .....	70
5.1.5.1	<i>Escherichia coli</i> .....	70
5.1.5.2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	71
5.1.6	KOMMERZIELLE VEKTOREN .....	71
5.1.7	REKOMBINANTE PLASMIDE .....	71
5.1.7.1	pDI8 .....	71
5.1.7.2	AV638730.....	72
5.1.7.3	pMS539.....	73
5.1.8	OLIGONUKLEOTIDE.....	74
5.1.9	MOLEKULARGEWICHTSTANDARDS.....	75
5.1.10	ANTISEREN.....	76
5.1.10.1	Primäre Antiseren gegen die C-terminale SOUL-Domäne .....	76
5.1.10.2	Primäre Antiseren gegen Kanalrhodopsin-1 (engl. <i>Channelrhodopsin: ChR1</i> ) .....	76
5.1.10.3	Kommerzielle Primäre Antiseren .....	76
5.1.10.4	Sekundäre Antiseren.....	77
<b>5.2</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>77</b>
5.2.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	77
5.2.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen zur Klonierung von Genkonstrukten .....	77
5.2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i> .....	78

5.2.1.3	DNS-Gelelektrophorese.....	79
5.2.1.4	Die Aufreinigung von DNS Fragmenten aus Agarosegelen.....	79
5.2.1.5	Die Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> - PCR) .....	79
5.2.1.6	<i>Annealing</i> einzelsträngiger DNS-Oligonukleotide .....	80
5.2.1.7	Phosphorylierung von freien 5'-Hydroxylgruppen in DNS-Fragmenten .....	81
5.2.1.8	Enzymatischer Restriktionsverdau von DNS.....	82
5.2.1.9	Ligation von DNS-Fragmenten .....	82
5.2.1.10	Transformation von <i>E. coli</i> .....	83
5.2.1.11	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	83
5.2.1.12	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	84
5.2.1.13	Quantifizierung von Nukleinsäuren durch den „dot test“ .....	84
5.2.2	KULTIVIERUNG VON <i>C. REINHARDTII</i> -KULTUREN (HARRIS 1989).....	85
5.2.2.1	Anzucht von <i>C. reinhardtii</i> .....	85
5.2.2.2	Ernte von <i>C. reinhardtii</i> -Kulturen (nach Zhao et al., 2004) .....	86
5.2.2.3	Zellzahlbestimmung von <i>C. reinhardtii</i> .....	86
5.2.2.4	Gewinnung von Autolysin (modifiziert nach Harris, 1989) .....	86
5.2.2.5	Transformation von <i>C. reinhardtii</i> mit Glasperlen (Kindle, 1990; Davies et al., 1992; Kiaulehn Diplomarbeit, 2006).....	87
5.2.2.6	Vorbereitung der Glasperlen für die Transformation von <i>C. reinhardtii</i> .....	88
5.2.2.7	Aufbewahrung von <i>C. reinhardtii</i> -Kulturen in flüssigem Stickstoff (Crutchfield et al., 1999) ...	89
5.2.3	BIOCHEMISCHE METHODEN.....	89
5.2.3.1	Herstellung eines Protein-Rohextraktes aus <i>C. reinhardtii</i> (Zhao et al., 2004).....	89
5.2.3.2	Herstellung eines Gesamtproteinextraktes (modifiziert nach Kleiner et al. 1999).....	90
5.2.3.3	Saccharose Dichtegradient (Zhao et al., 2004) .....	90
5.2.3.4	Anreicherung von membranassoziierten Proteinen mittels „Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -Stripping“ (nach Fujiki et al. 1982) .....	91
5.2.3.5	Augenfleckaufreinigung .....	92
5.2.3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration nach der „Neuhoff-Methode“ (Neuhoff et al., 1979).....	92
5.2.3.7	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteingemischen (nach Laemmli, 1970) .....	93
5.2.3.8	Färbung der Proteine nach Polyacrylamid-Gelelektrophorese mittels Coomassie (modifiziert nach Merril, 1990) .....	93
5.2.3.9	Western-Transfer .....	94
5.2.3.10	Ponceau-Färbung nach Western-Transfer.....	94
5.2.3.11	Immunodetektion von Proteinen (Schulze Diplomarbeit, 2008) .....	95
5.2.3.12	Nachweis der Antikörper-Bindung mit Meerrettich-Peroxidase .....	95
5.2.3.13	Koimmunopräzipitation.....	96
5.2.3.14	<i>In situ</i> -Detektion von Proteinen mittels indirekter Immunofluoreszenz in <i>C. reinhardtii</i> (modifiziert nach Mittelmeier et al., 2008 und Georg Kreimer, persönliche Kommunikation) ...	98

---

5.2.3.15	Doppel-Immunfluoreszenzmarkierung von Proteinen mit Speziesgleichen Antikörpern (nach Ino 2004).....	99
5.2.3.16	Überexpression und native Aufreinigung von Histidin-markierten Proteinen in <i>E. coli</i> .....	99
5.2.3.17	Entfernung der Histidin-Markierung bei nativ aufgereinigten Proteinen .....	101
5.2.3.18	Kofaktor-Bindungsversuch mit Hämin-Agarose.....	101
5.2.3.19	Messung der spektroskopischen Eigenschaften von SOUL3 im Lichtspektrum.....	103
5.2.3.20	Manuelle Messung der Photoaxis bei <i>C. reinhardtii</i> .....	103
5.2.3.21	Hellfeldmikroskopie und Messung der Augenfleckgröße bei <i>C. reinhardtii</i> .....	104
5.2.4	MASSENSPEKTROMETRISCHE (MS) PROTEINANALYSE .....	104
5.2.4.1	MS-kompatible SDS-PAGE .....	104
5.2.4.2	Tryptischer In-Gel-Verdau .....	105
5.2.4.3	Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie .....	106
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>107</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>118</b>
<b>7.1</b>	<b>SEQUENZEN UND VEKTOREN.....</b>	<b>118</b>
7.1.1	SOUL/HBP SEQUENZANALYSEN .....	118
7.1.2	LISTE DER IDENTIFIKATIONSNUMMERN (NCBI) UND AMINOSÄURE-SEQUENZEN .....	119
7.1.3	VEKTORKARTEN UND SEQUENZEN .....	122
7.1.3.1	pTS27.....	122
7.1.3.2	pTS29.....	123
	<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>124</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>127</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>129</b>
	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>131</b>
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>132</b>
	<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....</b>	<b>133</b>

# 1. Zusammenfassung/Summary

Die Familie der SOUL/HBPs sind Häm-bindende Proteine, über deren biologische Funktion relativ wenig bekannt ist. Sie kommen z. Bsp. in Cyanobakterien, Pflanzen und Wirbeltieren vor. In der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* war im Proteom des Augenflecks, einem primitiven visuellen System, das Protein SOUL3 gefunden worden. SOUL3 besitzt, wie für diese Proteinfamilie namensgebend, eine SOUL/HBP-Domäne am C-terminalen Ende. In dieser Arbeit gelang es, für heterolog exprimiertes SOUL3 die spezifische Bindung von Hämin nachzuweisen. Außerdem zeigte SOUL3 ein für Häm-bindende Proteine charakteristisches Absorptionsverhalten, mit einem Maximum bei 408 nm nach Bindung von Hämin. In Lokalisierungsstudien konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass SOUL3 primär im Augenfleck und nicht im Chloroplasten lokalisiert ist, der den Augenfleck umgibt. Weitere Untersuchungen mit Immunofluoreszenz ergaben, dass SOUL3 in der Lipid-Globuli-Schicht im plastidären Teil des Augenflecks vorkommt. SOUL3 lag in unterschiedlichen Komplexen vor und diese Komplexbildung stand unter dem Einfluss der circadianen Uhr. Mittels Koimmunopräzipitation konnte unter anderem Alpha Tubulin 2 als potentieller Interaktionspartner identifiziert werden, was für die Augenfleckpositionierung von Bedeutung sein könnte. Unter Verwendung der *artificial micro RNA*-Technik wurden transgene *C. reinhardtii*-Zelllinien erzeugt, die ein reduziertes SOUL3 Proteinniveau aufwiesen und für die funktionelle Charakterisierung verwendet wurden. Interessanterweise zeigten lichtmikroskopische Analysen von diesen Zelllinien einen verkleinerten Augenfleck im Vergleich zum Wildtyp. Weiterhin konnte in diesen Zelllinien eine Misslokalisierung des Augenflecks beobachtet werden. SOUL3 spielt daher eine Rolle bei der Positionierung und Größe des Augenflecks. Diese Veränderungen im Augenfleck spiegelten sich auch in einer veränderten circadianen Phototaxis der *knock down*-Zelllinien im Vergleich zum Wildtyp wieder.

The SOUL/HBP family are heme-binding proteins. Relatively little is known about their biological functions. They occur, for example, in cyanobacteria, plants and vertebrates. In the proteome of the eyespot, a primitive visual system of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, the SOUL3 protein was found. SOUL3 possesses a SOUL/HBP domain at its C-terminus, which is typical for this protein family. In this work, we were able to show the specific binding of hemin for heterologously expressed SOUL3. Additionally, SOUL3 showed characteristic absorption properties for heme-binding proteins with an absorption maximum at 408 nm upon binding of hemin. Localization studies revealed that SOUL3 is primarily localized in the eyespot and not in the chloroplast, which surrounds the eyespot. Further studies with immunofluorescence revealed that SOUL3 is present in the lipid globule layers of the plastidial part of the eyespot. SOUL3 was found in different complexes, and this complex formation was under the influence of the circadian clock. By coimmunoprecipitation, Alpha Tubulin 2 was identified amongst others as potential interaction partner. It could be relevant for eyespot positioning. Using the artificial micro RNA technique, we were able to produce transgenic *C. reinhardtii* lines that showed reduced SOUL3 protein levels. They were used for the functional characterization of SOUL3. Interestingly, light microscopic analysis of these cell lines revealed a reduced eyespot size compared to the wild type. Furthermore, a mislocalization of the eyespot could be observed in these cell lines. Therefore, SOUL3 plays an important role in positioning and in the size of the eyespot. These alterations in the eyespot also reflected in a disturbed circadian phototaxis of the knockdown cell lines compared to the wild type.

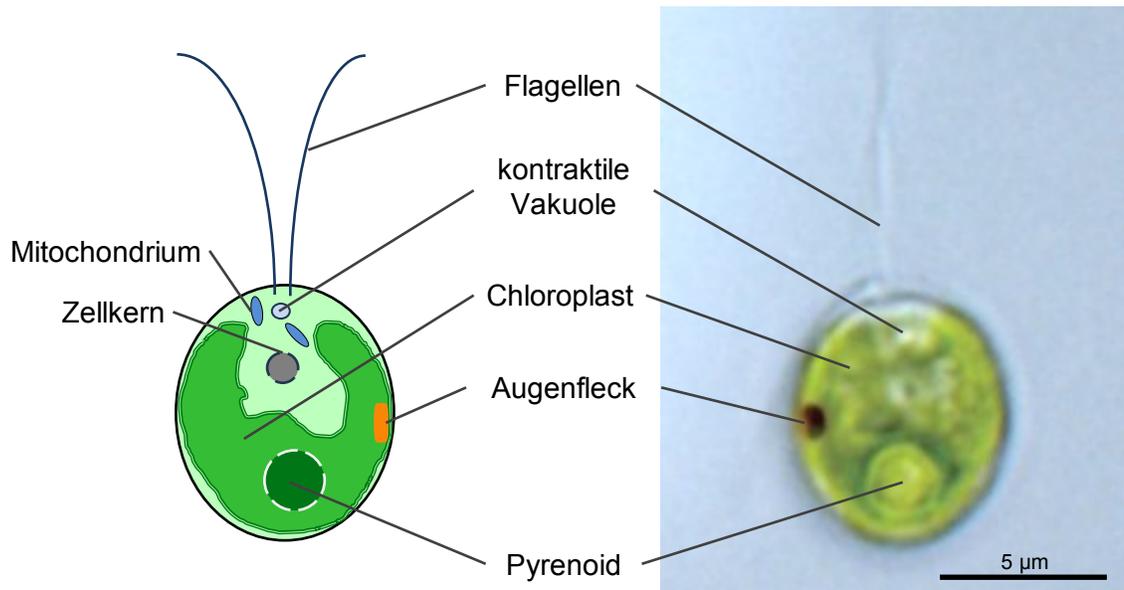
## 2. Einleitung

Sehr viele biologische Prozesse werden von dem von der Sonne ausgesandtem Licht beeinflusst. Im Laufe der Evolution haben daher die auf der Erde lebenden Organismen verschiedene Photorezeptoren entwickelt, um sich veränderten Lichtbedingungen im Hinblick auf ein optimales Wachstum anpassen zu können. Dies führte nach Darwin durch zufällige Variation und natürlicher Selektion zur Entwicklung des Auges (Darwin, 1859). Er postulierte ferner, dass die Entwicklung des Auges von einem Prototyp ausging, der aus zwei Zellen bestand, einer Photorezeptor- und einer Pigmentzelle, die das Licht von einer Seite her reflektiert. Dadurch wird es dem Organismus erst ermöglicht, die Richtung des einfallenden Lichtes zu bestimmen und einen selektiven Vorteil zu erhalten. Später erkannte Walter J. Gehring, dass bei der Evolution von Photoperzeption und Augen den Algen eine besondere Rolle zukommt (Gehring, 2004; Gehring, 2005). Die begeißelte Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* besitzt, wie viele phototile Organismen, eine spezialisierte licht-sensitive Organelle, den Augenfleck. Obwohl *C. reinhardtii* ein einzelliger Organismus ist und somit nicht den Kriterien eines prototypischen Auges von Darwin entspricht, erfüllt es doch die von ihm aufgestellten Anforderungen. Der Aufbau und die Position des Augenflecks ermöglicht es *C. reinhardtii*, die Richtung und Intensität des einfallenden Lichtes zu bestimmen. *C. reinhardtii* besitzt indes kein „Gehirn“, um empfangene Reize zu prozessieren, und somit wird das empfangene Signal direkt an die Geißel weitergeleitet und in eine Reaktion umgesetzt. Dies unterstützt Gehrings Theorie, dass die Evolution des Auges entweder durch zelluläre Differenzierung oder Endosymbiose, gekoppelt mit Gentransfer, lange vor der Entwicklung eines Nervensystems begann (Gehring, 2005; Kreimer, 2009).

### 2.1 Die *C. reinhardtii*-Zelle

*C. reinhardtii* ist eine einzellige Grünalge (Chlorophyta) mit zwei anterior angeordneten Flagellen und einem basal gelegenen Chloroplasten, der fast 2/3 des Gesamtvolumens der Zelle einnimmt (s. Abbildung 1). Eine aus Hydroxyprolinen bestehende Zellwand, die den Extensinen bei Landpflanzen ähnelt, umschließt die ca. 10 µm im Durchmesser große Zelle (Showalter, 1993). Der Kern beherbergt ein 121 Mbp großes haploides, GC-reiches (ca. 64%) Genom, das sich auf 17 Chromosomen verteilt (Merchant et al., 2007). Am anterioren Pol der *C. reinhardtii*-Zelle sind die kontraktile Vakuolen lokalisiert, die der osmotischen Regulation der Süßwasser-alge dienen. Ferner liegen mehrere Mitochondrien am Geißelansatz im Zytoplasma verteilt. Der Chloroplast in *C. reinhardtii* besitzt die Form einer Tasse. Er umschließt dabei den Nukleus und im Chloroplasten ist in der Regel ein Pyrenoid erkennbar

(s. Abbildung 1), in dem Reservestoffe gespeichert werden und das Enzym RubisCO zu finden ist. *C. reinhardtii* hat die Fähigkeit, auch mit organischen Kohlenstoffquellen wie Acetat im Dunkeln zu überleben und dabei einen funktionellen Photosyntheseapparat aufrechtzuerhalten. So sind Mutanten mit schweren Schäden am photosynthetischen Apparat lebensfähig. Damit besitzt *C. reinhardtii* gute Möglichkeiten für die Erforschung der Biogenese und Funktion der Chloroplasten und der Photosynthese-Maschinerie (Rochaix, 2004).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung einer *C. reinhardtii*-Zelle (links) und mikroskopische Hellfeldaufnahme vom *C. reinhardtii*-Stamm SAG73.72 (rechts).** Links: Schematischer Querschnitt einer *C. reinhardtii*-Zelle. Rechts: Hellfeldaufnahme bei 1000 facher Vergrößerung ohne Fixierungsmittel.

Die Flagellen entstehen aus einem Paar Basalkörperchen am anterioren Pol der *C. reinhardtii* Zelle (s. Abbildung 1). *Chlamydomonas* und Säuger sind evolutionsgeschichtlich eine Milliarde Jahre voneinander getrennt, dennoch besitzen die Flagellen in *C. reinhardtii* noch eine ähnliche Struktur und Funktion wie die der Flagellen und Cilien in Säugern (Silflow and Lefebvre, 2001; Boesger et al., 2009). Zum Beispiel wurden im Flagellen Proteom zahlreiche Proteine gefunden deren Homologe mit Krankheiten, wie die zystische Nierenerkrankungen, männliche Sterilität oder Hydrozephalus bei Mensch und Wirbeltieren, assoziiert werden (Pazour et al., 2005). Besondere Bedeutung haben die Flagellen auch für die Paarung im sexuellen Fortpflanzungszyklus von *C. reinhardtii* und für die Fortbewegung in seinem natürlichen Habitat, dem feuchten Erdreich und oberflächennahem Süßwasser. Licht ist dabei von sehr großer Bedeutung. *C. reinhardtii*-Zellen schwimmen auf für die Photosynthese optimale Lichtbedingungen zu, indem sie den Flagellenschlag während der Phototaxis regulieren. Mit dem Augenfleck kann *C. reinhardtii* die Intensität und Richtung einer Lichtquelle in Signale umsetzen, die den Flagellenschlag regulieren, und somit wird die Bewegung der Zelle vom Licht beeinflusst. Der Augenfleck liegt etwa in Höhe des Zelläquators

am äußersten Rand des Chloroplasts. Er ist zusätzlich mit Bereichen der Plasmamembran verbunden, in denen sich die Kanalrhodopsinphotorezeptoren ChR1 und ChR2 befinden (s. Abbildung 1). In Kapitel 2.2 wird im Detail auf die Struktur und Funktion des Augenflecks sowie die Phototaxis eingegangen.

### 2.1.1 *C. reinhardtii* als eukaryotischer Modellorganismus

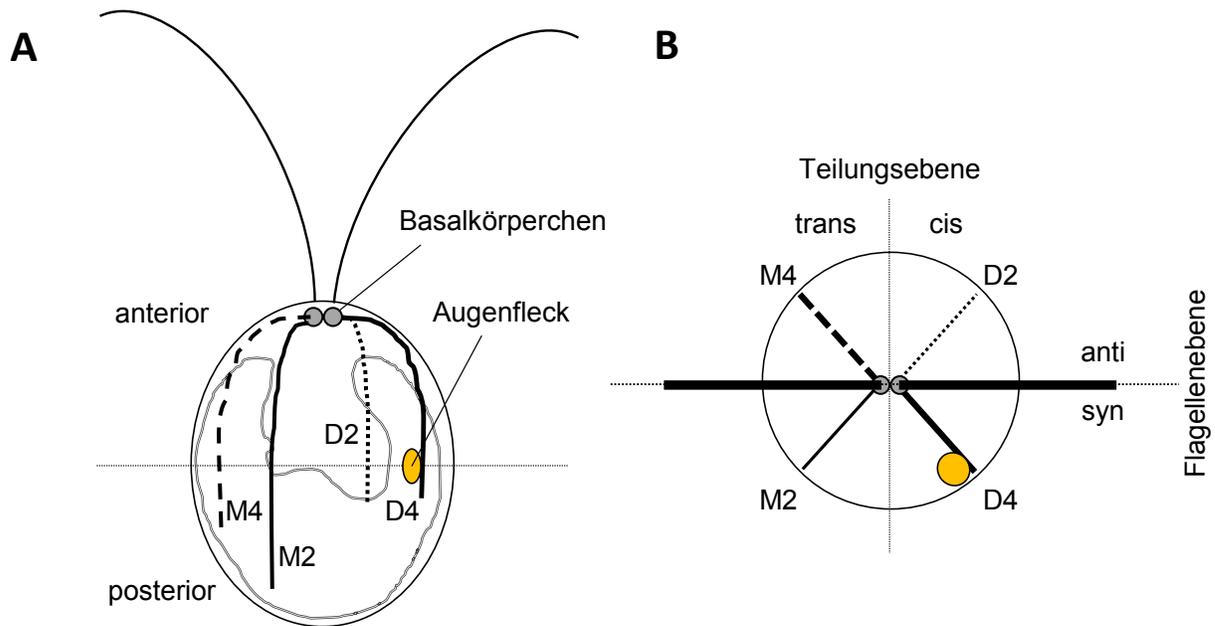
Die einzellige Grünalge *C. reinhardtii* hat sich in den letzten beiden Jahrzehnten zu einem eukaryotischen Modellorganismus für verschiedenste wissenschaftliche Fragestellungen entwickelt. *C. reinhardtii*-Zellen sind unter einfachen und gut kontrollierbaren Bedingungen im Labor kultivierbar. Als Haplont ist zudem sofort ein Phänotyp in Mutanten sichtbar und es sind eine breit gefächerte Anzahl von Techniken zur molekularbiologischen Manipulation der Grünalge verfügbar (Harris, 2001). Zudem sind das vollständig sequenzierte Kerngenom (Merchant et al., 2007) und das vollständige Plastom (Maul et al., 2002) verfügbar. Für die molekular- und biotechnologischen Arbeiten kann auf eine Mutanten Datenbank (*Chlamydomonas Resource Center*), eine cDNS-Datenbank mit 12842 cDNS's aus über 50000 EST's (Asamizu et al., 1999; Asamizu et al., 2004) zugegriffen werden. Für alle drei Genome von *C. reinhardtii* (Kern, Chloroplast und Mitochondrium) ist die Transformation mit exogener DNS möglich (Boynton et al., 1988; Kindle, 1990; Randolph-Anderson et al., 1991). Mit *ble*, dem Resistenzgen für Phleomycin aus *Streptoalloteichus hindustans* (Stevens et al., 1996), *aphVIII*, der Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase, die die Resistenz gegen Paromomycin vermittelt und dem *arg7* (Argininosuccinat-Lyase) stehen gute Selektionsmöglichkeiten für transformante Stämme zur Verfügung. Als Promotoren zur Expression von Selektionsmarkern oder exogener Genkonstrukte kommen der konstitutive *Hsp70a/Rbcs2in1*-Tandempromotor (Schroda et al., 2000; Schroda et al., 2002), der *Psad*-Promotor (Fischer and Rochaix, 2001) sowie der durch Nitrat induzierbare Promotor *Nit1* (Schmollinger et al., 2010) zum Einsatz. Für eine Reduktion des Expressionsniveaus eines bestimmten Proteins (*knock down*) wird die RNS-Interferenz (*small interfering RNA*, *artificial micro RNA*) verwendet. Ein vollständiges Ausschalten eines Gens ist in erster Linie durch Insertionsmutagenese möglich. Hierbei finden vor allem die Selektionsmarker *nit1* (Fernández et al., 1989) und *aphVIII* (Pootakham et al., 2010) Anwendung. Ein Nachteil ist hierbei allerdings, dass die Insertion nicht zielgerichtet in ein bestimmtes Gen erfolgen kann und der gewünschte Phänotyp erst danach selektiert werden muss. Dies geschieht durch Erzeugung einer Datenbank mit Mutanten (~25000), die mittels PCR auf eine Insertion in ein bestimmtes Gen durchsucht werden (Pootakham et al., 2010). Die gezielte Ausschaltung eines Gens durch homologe Rekombination ist dagegen in *Chlamydomonas* nur in gewissem Maße möglich (Nelson and Lefebvre, 1995). Mit einer neuen

Methode, basierend auf speziell modifizierten Zink-Finger-Nuklease, können Mutationen am Kerngenom gerichtet vorgenommen werden (Sizova et al., 2013). Jedoch ist diese Methode auf einen bestimmten *Chlamydomonas*-Stamm beschränkt, welcher keine Flagellen besitzt, und ist somit noch nicht für alle Fragestellungen geeignet. Dies macht *Chlamydomonas* zu einem System, an dem die Struktur und Funktion der Flagellen, der Basalkörperchen, die Chloroplastenentwicklung, die Photosynthese und die Lichtwahrnehmung, die Zell-Zell-Interaktionen sowie die Zellzykluskontrolle erforscht werden können. Durch seine sehr gut ausgeprägte und charakteristische Zellgeometrie ist *C. reinhardtii* auch ein Modellsystem für die Erforschung von Mechanismen der Organellpositionierung in der Zelle (Boyd et al., 2011a).

## 2.2 Der Augenfleck und die Phototaxis von *C. reinhardtii*

### 2.2.1 Position des Augenflecks in der Zelle

*C. reinhardtii* besitzt einen asymmetrischen Zellaufbau (Holmes and Dutcher, 1989) und kann in einen anterioren und einen posterioren Pol unterteilt werden (s. Abbildung 2A). Der anteriore Pol umfasst den Bereich der Basalkörperchen, von dem die Flagellen ausgehen, bis hin zum Augenfleck, der die Grenze zum posterioren Pol der Zelle bildet. Die beiden Basalkörperchen werden in Mutter- und Tochterbasalkörperchen eingeteilt und unterscheiden sich in Struktur und Proteinzusammensetzung (Dutcher, 2003; Geimer and Melkonian, 2004). Vom maternalen und Tochterbasalkörperchen gehen je zwei Mikrotubulifasern in die Zelle hinein. Jedes Basalkörperchen ist dabei mit je einem Zweierbündel Mikrotubuli (s. Abbildung 2A) und je einem Viererbündel Mikrotubuli (s. Abbildung 2A) verbunden (LeDizet and Piperno, 1986; Harris, 2001). Die M- und D-Mikrotubuli sind vom anterioren Pol her um  $45^\circ$  zur Flagellen- und Teilungsebene gedreht. Dabei sind jeweils die Zweierbündel und die Viererbündel direkt gegenüber positioniert. Der Augenfleck ist immer am D4-Mikrotubuli zu finden und entsteht bei jeder Zellteilung neu (Holmes and Dutcher, 1989). Mit dieser asymmetrischen Einteilung der Zelle wird sichergestellt, dass der Augenfleck immer an der gleichen Stelle entsteht. Dem sogenannten *cis*-Flagellum ist der Augenfleck dabei am nächsten (s. Abbildung 2B). Der Augenfleck muss immer an einer spezifischen Position relativ zur Flagellenebene lokalisiert sein, da nur so gewährleistet werden kann, dass Photorezeptorsignale in der richtigen Art und Weise zu einer korrekten Orientierung (Flagellenschlag) der Zelle in Bezug zum Lichtreiz umgesetzt werden. Dies wird durch die Tatsache deutlich, dass Algen kein „Gehirn“ besitzen und somit darauf angewiesen sind, dass das Photorezeptorsystem direkt an das Ausgangssystem, die Flagellen, angebunden ist, um die Schwimmrichtung ändern zu können (Hegemann, 2008).

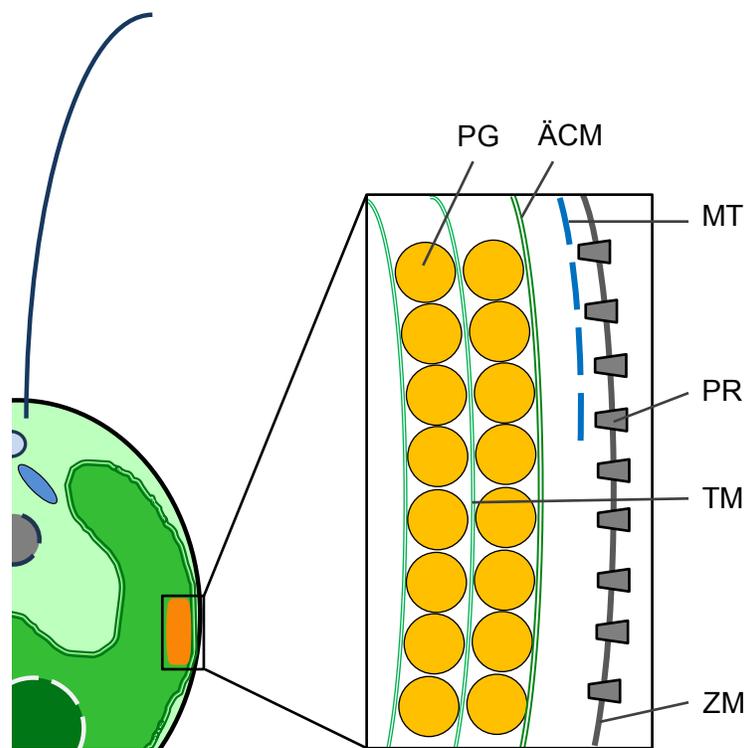


**Abbildung 2: Darstellung der Augenfleckposition relativ zum Cytoskelett in *C. reinhardtii* (modifiziert nach Holmes & Dutcher, 1989 und Boyd et al., 2011a).** **A:** Seitenansicht einer *C. reinhardtii*-Zelle durch die Flagellenebene. Der Augenfleck (orange) befindet sich in etwa auf äquatorialer Position in Bezug zur Gesamtzelle und teilt diese in anterior und posterior. Der posteriore Teil beinhaltet hauptsächlich den Chloroplasten mit Pyrenoid. Im anterioren Teil befinden sich direkt am Zellpol die Basalkörperchen, von welchen die Flagellen aus der Zelle heraus ausgehen. Von den Basalkörperchen ragen die maternalen (M) und Tochter (D) Mikrotubuli als Zweierbündel (2) und Viererbündel (4) in die Zelle hinein. Das D4-Mikrotubulibündel hat dabei Kontakt zum Augenfleck. **B:** Aufsicht auf eine *C. reinhardtii*-Zelle auf den anterioren Pol. Die Flagellen teilen den Zellkörper in eine *anti* und *syn* Hälfte (Flagellenebene) und die Basalkörperchen teilen die Zelle nochmals senkrecht zur Flagellenebene in *trans* und *cis*. Die Mikrotubuli ragen immer in einem Winkel von  $45^\circ$  zur Flagellenebene in den Zellkörper hinein. Da der Augenfleck nach jeder Zellteilung immer am D4-Mikrotubuli neu gebildet wird, ergibt sich für ihn immer die *syn-cis*-Position relativ zur Flagellen- und Teilungsebene.

## 2.2.2 Ultrastruktur und Funktionsweise des Augenflecks

Der Augenfleck von *C. reinhardtii* ist im Lichtmikroskop als deutlich erkennbarer orange-roter Fleck am Rande des Chloroplasten, in Höhe des Zelläquators sichtbar (s. Abbildung 1). Er besteht aus zwei bis vier Schichten von mit Karotinoiden gefüllten Lipid-Globuli. Diese Schichten sind jeweils durch eine Thylakoidmembranschicht voneinander getrennt und liegen eng an spezialisierten Bereichen der äußeren Chloroplastenmembran (Melkonian and Robeneck, 1984). Der Augenfleck kann als ein spezialisierter Bereich des Chloroplasten angesehen werden und ist eng mit einem Bereich der Zellmembran assoziiert, in dem die Photorezeptoren ChR1 und ChR2 lokalisiert sind (Foster et al., 1984; Hegemann, 2008). Diese gesamte Einheit, bestehend aus Schichten von Lipid-Globuli, Thylakoidmembranen und den aufliegenden Membranen von Chloroplast und Zellmembran, ist sehr stabil und kann isoliert untersucht werden (Kreimer et al., 1991; Schmidt et al., 2006). Die Granula-Schichten üben eine duale Funktion als Reflektor aus. Erstens wird Licht, das rückwärtig durch den Chloroplasten auf den Augenfleck trifft, blockiert. Diese Funktion wird zudem von Pigmenten im Chloroplasten unterstützt, die Licht im Wellenlängenbereich des blau-grünen Spektrums absorbieren (Kreimer,

2009). Zweitens wird das von vorn auf den Augenfleck treffende Licht, das nicht von Photorezeptoren absorbiert wurde, zurück auf die darüber liegende Zellmembran reflektiert. Dies hat eine Verstärkung des Lichtsignals an den Photorezeptoren zur Folge und erhöht außerdem auch ihre Anregungs-Wahrscheinlichkeit (Foster and Smyth, 1980; Kreimer and Melkonian, 1990; Kreimer et al., 1992; Witman, 1993). Zusätzlich wird damit der Kontrast an den Photorezeptoren verstärkt (Harz et al., 1992). Die Pigmentgranula sind hexagonal mit einem konstanten Abstand von 7-8 nm zueinander angeordnet und weisen einen konstanten Durchmesser von 80-130 nm auf. Auch ist die Anordnung in mehreren Schichten im Abstand von 125 nm sehr regelmäßig und weist nur eine geringe Variabilität auf (Melkonian and Robenek, 1984; Kreimer, 2009).



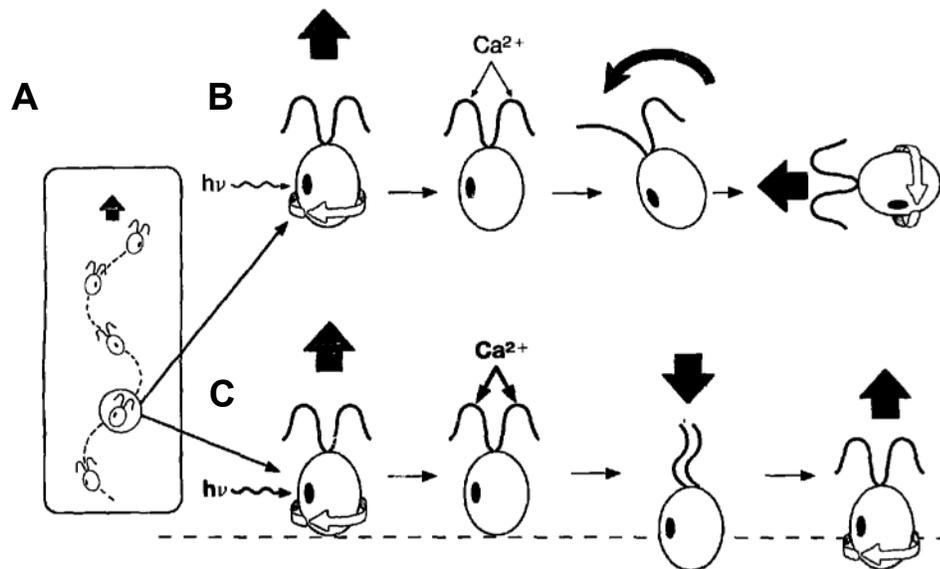
**Abbildung 3: Detailliertes Schema der Augenfleckultrastruktur (nach Boyd et al., 2011c).** PG: Pigmentgranula, ÄCM: äußere Chloroplastenmembran, MT: D4-Mikrotubuli, PR: Photorezeptoren ChR1 und ChR2, TM: Thylakoidmembran, ZM: Zellmembran.

Diese regelmäßige Anordnung der optischen Schichten trägt zu deren Funktion als *quarter-wave interference reflector* bei (Kreimer and Melkonian, 1990). Das maximale Lichtsignal wird erreicht, wenn das Licht fast senkrecht auf den Augenfleck trifft. Nur Lichtstrahlen, die dem 4-fachen des Abstandes der optischen Schichten entsprechen, werden so reflektiert, dass sie eine positive Interferenz erzeugen. Bei *C. reinhardtii* sind dies Wellenlängen von ca. 500 nm, dem Absorptionsmaximum des Photorezeptors ChR1 (Kreimer and Melkonian, 1990; Schaller et al., 1997; Kateriya et al., 2004). Auch wurde kürzlich gezeigt, dass die Größe des Augenflecks durch Licht im blauen Wellenlängenbereich reguliert wird, und Phototropin als ein verantwortlicher

Photorezeptor identifiziert (Trippens et al., 2012). Der Augenfleck in *C. reinhardtii* erfüllt somit viele Voraussetzungen, um als primitives visuelles Organ angesehen zu werden.

### 2.2.3 Photomotilität von *C. reinhardtii*

Wie viele photosynthetisch aktive Mikroorganismen zeigt *C. reinhardtii* eine Motilität in Abhängigkeit eines Lichtreizes. Dabei wird die Phototaxis (s. Abbildung 4B), eine gerichtete Bewegung, und die photophobische Reaktion unterschieden. Die Phototaxis wird nochmals unterteilt in positive, eine gerichtete Bewegung auf einen Lichtreiz zu, und in die negative Phototaxis, eine gerichtete Bewegung vom Lichtreiz weg (s. Abbildung 4C). Eine positive Phototaxis tritt bei niedrigen Lichtintensitäten auf. Dagegen führen hohe Lichtintensitäten zu einer negativen Phototaxis (Häder and Melkonian, 1983). Dies stellt wahrscheinlich einen Schutzmechanismus für den photosynthetischen Apparat dar. Ob die Phototaxis nun positiv oder negativ ist, hängt von einer Reihe von Faktoren ab, wie die Konzentration von Kalzium- und Magnesium-Ionen (Halldal, 1957), Lichtadaptation (Mayer, 1968) und der Photosyntheserate (Takahashi and Watanabe, 1993).



**Abbildung 4: Phototaktische Bewegung und photophobische Reaktion von *C. reinhardtii* (verändert nach Witman, 1993).** A: Helikale Bewegungsrichtung einer *C. reinhardtii*-Zelle. Die Zelle dreht sich dabei um ihre Longitudinalachse und der Augenfleck ist stets nach außen gerichtet. B: Reaktion der Zelle auf einen geänderten Lichtreiz und daraus folgende Anpassung der Schwimmrichtung. C: Photophobische Reaktion auf starke Lichtstimuli. (hv: Energie eines Lichtquants mit bestimmter Frequenz  $\nu$ ; große Pfeile: Schwimmrichtung der Zelle).

Während sich die Zelle vorwärts bewegt, führt sie eine dem Brustschwimmstil ähnliche Bewegung mit ihren Flagellen aus und dreht sich dabei um ihre Longitudinalachse. Dies führt zu einer helikalen Bewegung, wobei der Augenfleck stets nach außen gerichtet ist. Wenn die Vorwärtsbewegung nun mit der Richtung übereinstimmt, aus der das Licht kommt, empfangen

die Photorezeptoren ein schwaches und immer gleichmäßiges Signal (s. Abbildung 4A) (Witman, 1993). Ändert sich nun die Schwimmrichtung bzw. die Richtung des Lichtreizes, dann führt dies zu einer Änderung des Lichteinfalls und zu einer Aktivierung der Photorezeptoren. ChR1 ist hierbei als lichtaktivierter Kationenkanal für die Phototaxis und photophobische Reaktion gleichermaßen verantwortlich (Berthold et al., 2008; Hegemann, 2008). Das lichtinduzierte Öffnen des Kationenkanals ChR1 führt zu einer Depolarisierung der Zellmembran (Hegemann, 2008). Dieses Signal löst dann eine Änderung des Flagellenschlags aus, die sich in positiver oder negativer Phototaxis äußert. Die Phototaxis von *C. reinhardtii* ist zudem unter Kontrolle einer endogenen Rhythmik, die von der circadianen Uhr der Grünalge gesteuert wird (Johnson et al., 1991; Mittag et al., 2005). Für die photophobische Reaktion ist ein stärkerer Lichtreiz nötig als bei einer phototaktischen Reaktion. Die Zelle stoppt hierbei kurz, ändert dann den Flagellenschlag und schwimmt in die entgegengesetzte Richtung. Daraufhin setzt sie ihren Weg in eine andere Richtung mit normalen Schwimmbewegungen fort (s. Abbildung 4C) (Witman, 1993).

#### **2.2.4 Bekannte Komponenten des Augenflecks**

Um Komponenten des Augenflecks zu identifizieren, die an der Biogenese und Morphologie des Augenflecks beteiligt sind, wurden Phototaxis-defiziente Mutanten von *C. reinhardtii* auf abnormal veränderte Augenflecke untersucht (Pazour et al., 1995; Lamb et al., 1999). Dabei konnten verschiedene Genloci identifiziert werden, die an der korrekten Ausbildung und Position der Pigmentgranula beteiligt sind. Die Genloci *min1* und *min2* sind zum Beispiel für die Größe des Augenflecks verantwortlich. Mutationen in *min1* und *min2* führen zu einem Phänotyp mit stark reduzierter Größe des pigmentierten Anteils des Augenflecks (Lamb et al., 1999). Der Locus *mt1* wurde als eine Komponente identifiziert, die zur Ausbildung von multiplen Augenflecken führt (Lamb et al., 1999). Zusätzlich konnte mit *pey1* ein Locus identifiziert werden, der zu einem posterior delokalisierten Augenfleck führte. PEY1 wurde dabei als ein neuartiger Regulator der Länge der acetylierten Mikrotubuli angesehen (Boyd et al., 2011a). Auch wurden Mutanten gefunden, die keinen pigmentierten Augenfleck ausbilden (*eye2*, *eye3*) (Lamb et al., 1999). Das EYE2 Protein ist in der Chloroplastenhülle lokalisiert und unterstützt wahrscheinlich als Chaperon die Formierung der Pigmentgranulaschichten (Roberts et al., 2001; Boyd et al., 2011c). Der Stamm *eye3-2*, der zu den Ergebnissen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen hat, bildet kein funktionelles EYE3 Protein. *eye3-2* zeigt keinen sichtbaren Augenfleck im Lichtmikroskop, da die korrekte Ausbildung der Globulischichten gestört ist (Boyd et al., 2011c). In Immunfluoreszenzversuchen konnte bei *eye3-2* gezeigt werden, dass ChR1 noch mit dem D4-Mikrotubuli assoziiert ist. Allerdings wurden auch Signale ausgemacht,

die nicht mit dem D4-Mikrotubuli assoziiert sind (Boyd et al., 2011c). In vergleichenden Sequenzanalysen konnte EYE3 als eine Serin/Threonin-Kinase identifiziert werden, die hohe Homologien zur ABC1 Kinase Familie in *A. thaliana* aufweist (Boyd et al., 2011c). Die größte Homologie zeigt EYE3 dabei zu At3g24190, das zusammen mit anderen Proteinen der ABC1 Kinase Familie (At1g71810 und At1g79600) im Proteom der thylakoidassoziierten Plastoglobuli gefunden wurde (Lundquist et al., 2012). Dies unterstützt auch die Theorie, dass die Pigmentgranula des Augenflecks in *C. reinhardtii* aus den thylakoidassoziierten Globuli aufgebaut werden. Hierzu wurde ein Modell zur Biogenese der Pigmentgranulaschichten entwickelt, in dem das D4-Mikrotubuli und die Photorezeptoren EYE2 zur korrekten Position in der Chloroplastenhülle dirigieren. EYE2 wiederum unterstützt die Ausbildung der Granulaschichten und EYE3 ist an der Biogenese der Pigmentgranula beteiligt (Boyd et al., 2011c). Dadurch wird die genaue Position, an der sich der Augenfleck formieren soll, bestimmt.

### **2.2.5 Das Augenfleckproteom und -phosphoproteom von *C. reinhardtii***

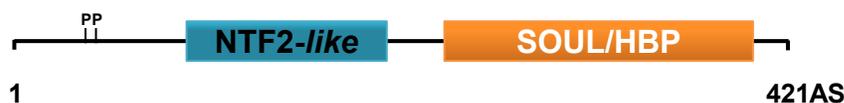
Zusätzlich zu genetischen Analysen der Augenfleckkomponenten an Mutanten wurden Proteomanalysen mit Proteinen aus aufgereinigten Augenfleckfraktionen durchgeführt. Diese umfasste die Lipid-Globuli mit spezialisierten Bereichen der Plasmamembran, die Chloroplastenhüllenmembranen sowie die an den Globuli assoziierten Thylakoidmembranen. Dabei konnten 202 verschiedene Proteine identifiziert werden (Schmidt et al., 2006). Unter diesen waren Proteine der Augenfleckentwicklung EYE2 und Min1 sowie die Photorezeptoren Phototropin (PHOT) und die Kanalrhodopsine ChR1 und ChR2. Weiterhin wurden Bestandteile der Retinal-, Karotenoid- und Chlorophyllbiosynthese, Proteine aus Signalwegen der Photo- und Chemotaxis und Proteine aus metabolischen Stoffwechselwegen identifiziert. Das Phosphoproteom des Augenflecks führte auch zu interessanten Ergebnissen. Unter den identifizierten Phosphoproteinen waren zum Beispiel Enzyme des Karotinoid- und Fettsäure-Metabolismus, ein SOUL-Häm-Bindeprotein (SOUL/HBP), auf das im Folgenden näher eingegangen wird, ein Kalzium-Bindeprotein, eine Protein-Kinase sowie weitere Proteine mit bislang unbekannter Funktion (Wagner et al., 2008). Auch konnten in den Analysen des Phosphoproteoms die Photorezeptoren ChR1 und ChR2 mit drei bzw. einer Phosphorylierungsstelle nachgewiesen werden. Interessanterweise befinden sich diese Phosphorylierungsstellen auf der cytosolischen Seite dieser Transmembranproteine (Schmidt et al., 2006; Wagner et al., 2008). Ein SOUL-Häm-Bindeprotein wurde mit 14 unterschiedlichen Peptiden identifiziert. Es kann der SOUL/HBP-Familie zugeordnet werden und wurde als SOUL3 (Protein-ID: 185703) annotiert (s. Tabelle 1). Für *C. reinhardtii* sind mehrere

Genmodelle, die für SOUL-Proteine kodieren, bekannt (<http://genome.jgi-psf.org/Chlre4/Chlre4.home.html>). Diese wurden SOUL1, SOUL2, SOUL3, SOUL4 und SOUL5 benannt (s. Tabelle 1).

**Tabelle 1: Übersicht der in der JGI vs4-Datenbank (<http://genome.jgi-psf.org/Chlre4/Chlre4.home.html>) annotierten SOUL/HBP-Proteine (Merchant et al., 2007).**

Name	Protein-ID (JGI vs4)	Molekulargewicht (kDa)	Anzahl Aminosäuren	SOUL/HBP-Domäne	NTF2-like-Domäne
SOUL1	145011	18,9	171	+	
SOUL2	205736	24,6	235	+	
SOUL3	185703	47,7	421	+	+
SOUL4	188875	45,3	408	+	+
SOUL5	21100	34,5	323		

Das im Augenfleck identifizierte SOUL3-Protein hat eine Länge von 421 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 47,7 kDa (Protein ID: 185703). Es zeigt sich, dass dieses Protein an seinem C-Terminus einen hoch konservierten Bereich, die SOUL-Domäne, besitzt (s. Abbildung 5). Auch in *C. reinhardtii* könnte diese für die Häm-Bindung verantwortlich sein. Zusätzlich besitzen SOUL3 und SOUL4 noch eine sogenannte *nuclear transcription factor2-like* (NTF2-like)-Domäne (s. Tabelle 1). Das Protein NTF2 ist ein kleines Protein das den Import von *Ras-related nuclear protein* (RAN)-GDP vermittelt (Quimby et al., 2000; Dóczy et al., 2007). Die Rolle dieser Domäne in SOUL/HBPs ist allerdings noch unbekannt (Dóczy et al., 2007). Bekannt ist allerdings schon länger, dass NTF2 ein kleines Protein ist, das nur aus dieser NTF2-like-Domäne besteht und Homodimere bilden kann, wobei wahrscheinlich über die NTF2-like-Domäne die Protein-Protein-Interaktion vermittelt wird (Ribbeck et al., 1998; Smith et al., 1998). Über das Augenfleck-Phosphoproteom konnte auch nachgewiesen werden, dass SOUL3 am N-terminalen Ende zwei Phosphorylierungsstellen besitzt (Wagner et al., 2008).



**Abbildung 5: Domänenstruktur von SOUL3 aus *C. reinhardtii* (NCBI).** SOUL3 besteht aus 412 Aminosäuren (AS) und ist hier schematisch dargestellt. Die SOUL-Domäne ist als oranger Balken zwischen AS 234 und AS 402 zu sehen und die *nuclear transcription factor2-like* (NTF2-like) Domäne ist als blauer Balken zwischen der AS 92 und AS 201 dargestellt. Außerdem sind die Phosphorylierungsstellen (P) am Thr 42 (Threonin 42) und Ser 44 (Serin 44) gezeigt (Wagner et al., 2008).

Erstmals wurde die SOUL/HBP-Familie mittels subtraktiver Hybridisierungsexperimente mit Geweben der Retina und Zirbeldrüse aus dem Huhn (*Gallus gallus*) gefunden (Zylka and Reppert, 1999). Ursprünglich sollten mit diesem Experiment neue Komponenten im

Lichteingangsweg circadianer Uhren gefunden werden. Die Benennung mit *soul* (eng. Seele) erfolgte in Anlehnung an den französischen Philosophen René Descartes, der in seiner Schrift „Les Passions de l'âme“ („Die Leidenschaften der Seele“) die Zirbeldrüse als den Sitz der menschlichen Seele betrachtete (Descartes, 1649; Zylka and Reppert, 1999). Daher stammt auch die Bezeichnung für dieses zuerst gefundene SOUL-Protein ckSOUL (ck: *chicken*, engl. Huhn).

## 2.2.6 Die SOUL/HBP Familie

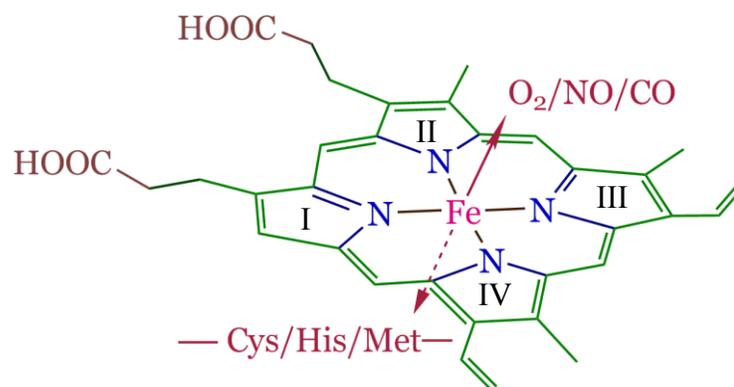
Neben ckSOUL wurde bereits ein anderes hämbindendes Protein namens p22HBP identifiziert (Taketani et al., 1998). p22HBP wurde in Leberzellen von Mäusen gefunden und zeigte große Ähnlichkeiten zu ckSOUL und es wurde vermutet, dass beide einer neuen Klasse von hämbindenden Protein angehören (Zylka and Reppert, 1999). Später konnte auch ein mSOUL Protein in der Maus identifiziert und charakterisiert werden, das wie ckSOUL in der Retina exprimiert wird (Taketani et al., 1998; Zylka and Reppert, 1999; Dias et al., 2006). Sowohl für mSOUL als auch für p22HBP wurde gezeigt, dass beide mit hoher Spezifität Häm als Kofaktor binden. Jedoch sind dabei die Bindungsmodi von Häm zwischen mSOUL und p22HBP sehr unterschiedlich. p22HBP bindet ein Hämmolekül pro Untereinheit, allerdings ohne Beteiligung eines spezifischen axialen Liganden, der an das Eisen (+III) koordinativ bindet. Vielmehr scheint die Ausbildung einer hydrophoben Tasche die Anlagerung des ebenso hydrophoben Häms zu ermöglichen (Dias et al., 2006). Dies stellt sich bei mSOUL völlig anders dar. Raman-Spektralanalysen und Austausch eines Histidin mit Alanin durch insertionelle Mutagenese, zeigten, dass ein Histidinrest für die koordinative Bindung von Eisen (+III)-Häm bei mSOUL verantwortlich ist (Sato et al., 2004). Ein weiterer Unterschied ist, dass p22HBP ein Monomer ist, und mSOUL als Dimer vorliegt, solange kein Häm als Kofaktor gebunden ist, und durch Bindung von Eisen (+III)-Häm in einen homohexameren Komplex übergeht (Sato et al., 2004). Zusätzlich unterscheidet sich p22HBP von mSOUL dadurch, dass es in vielen verschiedenen Geweben exprimiert wird (Taketani et al., 1998). Im Gegensatz dazu wird ckSOUL spezifisch in der Retina und der Zirbeldrüse exprimiert (Zylka and Reppert, 1999). Daher wurde bereits vermutet, dass beide Klassen innerhalb dieser Proteinfamilie unterschiedliche biologische Funktionen ausüben, obwohl für beide eine Beteiligung am Häm-Transport vermutet wurde (Takahashi et al., 2008). Da SOUL spezifisch in der Retina und Zirbeldrüse exprimiert wird und diese beiden Gewebe Hauptkomponenten der circadianen Uhr enthalten, wurde auch eine Beteiligung am circadianen System angenommen (Zylka and Reppert, 1999). Studien an Zebrafischembryonen zeigten aber auch, dass *soul* Gene bei der Entwicklung bestimmter Regionen, wie einem Frühstadium der Nieren und lichtsensitiven Organe, des Embryos eine Rolle spielen (Fortunato et al., 2011). Neben der Fähigkeit, Häm als Kofaktor zu binden, wurde

für hSOUL gezeigt, dass es an der Permeabilisierung der Mitochondrienmembran induziert und somit den nekrotischen Zelltod auslöst (Szigeti et al., 2006; Szigeti et al., 2010). Es konnten auch Mitglieder der SOUL/HBP-Familie in *A. thaliana* und *Oryza sativa* identifiziert werden (Marmagne et al., 2004). Sequenzvergleiche des *Arabidopsis*-Genomes enthüllten sechs Proteine, die Homologien gegenüber den SOUL/HBPs aus Vertebraten aufwiesen. Davon besitzen zwei (At3g10130 und At5g20140) N-terminale Erweiterungen, die als Signalpeptide dienen, um die beiden Proteine in den Chloroplasten zu transportieren (Takahashi et al., 2008; Lee et al., 2012). At3g10130 wurde zusätzlich im Proteom der Plastoglobuli in *A. thaliana* identifiziert (Lundquist et al., 2012). Plastoglobuli sind ca. 10-500 nm große Lipoproteinpartikel in den Plastiden photosynthetischer Organismen. Sie sind beteiligt an der Chloroplastenentwicklung, an Stressantworten, im Lipidmetabolismus und an der Seneszenz (Bréhélin et al., 2007). Des Weiteren sollten hier noch die Hämoxygenasen (HO) erwähnt werden, die den oxidativen Abbau von Häm zu Biliverdin-IX $\alpha$  (BV-IX $\alpha$ ) katalysieren und somit am Syntheseweg der Phytychromobile beteiligt sind (Maines, 1988). Diese sind keine Häm-bindenden Proteine im klassischen Sinne. Dennoch besitzen sie die Fähigkeit Häm zu binden und sowohl als Substrat als auch als prosthetische Gruppe zu verwenden (Chu et al., 1999). Bei At5g20140 wurde auch die Bindung von Häm gezeigt, und zusätzlich konnte noch eine Interaktion mit der Hämoxygenase HY1 nachgewiesen werden. Für At5g20140 wurde daher postuliert, dass es an antioxidativen Signalwegen während des Häm-Abbaus beteiligt ist (Lee et al., 2012). Auch für die SOUL/HBP in *Arabidopsis* wird eine Beteiligung am Abbau von Tetrapyrrolen, wie Chlorophyll, vermutet (Lundquist et al., 2012). Während für pflanzliche Systeme wenige funktionelle Informationen über HBPs zur Verfügung stehen, ist für bakterielle und tierische Systeme bekannt, dass sie in unterschiedlichen Prozessen involviert sind. Zum Beispiel übt in Säugern NPAS2 mit seinen beiden Häm-Bindestellen eine ähnliche Funktion aus wie CLOCK. Beide sind Transkriptionsfaktoren und essentielle Bestandteile des endogenen Schrittmachers der circadianen Uhr. Dabei ist anzumerken, dass NPAS2 die Funktionen von CLOCK in clock<sup>-/-</sup> Mutanten ersetzen kann (DeBruyne et al., 2007). In *E. coli* konnte ein Häm-regulierte Phosphodiesterase charakterisiert werden (Sasakura et al., 2005) und in Leberzellen von Ratten wurde gezeigt, dass HBP23 als Antioxidans in Reaktion auf viele Stresstimuli induziert wird (Immenschuh et al., 2002). Somit scheint diese Proteinfamilie wichtige und weitreichende Funktionen in vielen verschiedenen Organismen wahrzunehmen.

### 2.2.7 Tetrapyrrole als Kofaktoren in pflanzlichen Zellen

Tetrapyrrole treten sehr häufig als Kofaktor in Proteinen auf und weisen je nach gebundenem Zentralatom unterschiedliche Eigenschaften auf. In Pflanzen sind vier Hauptgruppen von

Tetrapyrrolen vertreten: Chlorophyll, Biline, Häm und Sirohäm. Sie stammen alle von einem gemeinsamen Syntheseweg ab, der ausgehend von 5-Aminolävulinsäure (ALA) in den Plastiden erfolgt (Beale, 1999; Tanaka and Tanaka, 2007). Im menschlichen Körper beginnt die Biosynthese aller Porphyrine mit Succinyl-CoA und der Aminosäure Glycin. Der erste Schritt führt zum  $\delta$ -Aminolävulinat. Pflanzen, Algen, Bakterien sowie Archaeobakterien können 5-Aminolävulinsäure auch ausgehend von Glutaminsäure herstellen. Dies wird als C5- bzw. Beale-Weg bezeichnet (Beale, 1999). Vier dieser Moleküle werden zu Hydroxymethylbilan umgesetzt. Weitere Umwandlungen erfolgen schrittweise über Uroporphyrinogen III und Coproporphyrinogen III zu Protoporphyrinogen  $\alpha$  und Protoporphyrin IX. Protoporphyrin IX wird dann zu Chlorophyll bzw. Häm mit dem Einbau von Eisen (+II) oder Magnesium (+II) durch eine Magnesiumchelatase bzw. Ferrochelatase umgewandelt. Die am häufigsten in Pflanzen vorkommenden Tetrapyrrole sind die Chlorophylle. Chlorophylle bestehen aus je vier Pyrrolringen. Die vier Stickstoffatome bilden einen Chelatkomplex mit dem Zentralmetallion, das im Fall der Chlorophylle Magnesium (+II) ist. Sie finden sich in Lichtsammelkomplexen sowie Elektronentransferkomplexen des Photosyntheseapparates in den Chloroplasten. Biline sind lineare Tetrapyrrole ohne Zentralmetallion. Phytochromobilin ist als ein Chromophor im Photorezeptor Phytochrom vorhanden. Phytochrome spielen eine wichtige Rolle bei der lichtabhängigen Regulation von Photosynthese-assoziierten nukleären Genen. Im Gegensatz zu Pflanzen besitzt *C. reinhardtii* jedoch keine Phytochrome bzw. andere bilinabhängige Photorezeptoren. Jedoch wurde kürzlich in *C. reinhardtii* ein lichtunabhängiger Signalweg entdeckt, in dem Biline die Expression von Kerngenen kontrollieren (Duanmu et al., 2013). Wahrscheinlich beeinflussen sie die Regulation von Genen, welche an der Abschwächung von oxidativen Stress während der Photosynthese beteiligt sind.



**Abbildung 6: Grundstruktur des Häm (modifiziert nach Zhang 2011).** Häm ist ein Tetrapyrrolring mit einem Eisen (+II) Zentralion, das jeweils von den freien Valenzen der Stickstoffatome der Pyrrolringe (I, II, III und IV) koordinativ gebunden wird. Die zwei zusätzlich freien Valenzen am Eisenion können von den Aminosäuren Cystein (Cys), Histidin (His), bzw. Methionin (Met) abgesättigt werden. Auch kleinere Moleküle wie Sauerstoff (O<sub>2</sub>), Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenstoffmonoxid (CO) können an das Eisenion koordinativ binden.

Häm ist ähnlich wie Chlorophyll aufgebaut, unterscheidet sich aber dadurch, dass als Zentralmetallion Eisen inkorporiert ist. Die Bezeichnung Häm für alle Gruppen von Eisen tragenden Tetrapyrrolen ist irreführend, da nur das Tetrapyrrol mit Eisen (+II) als Häm bezeichnet wird und mit Eisen (+III) als Hämin. Häm ist an vielen biologischen Prozessen beteiligt, wie Elektronentransfer, Sauerstoffmetabolismus und -transport. Häm weist hierfür einige Eigenschaften auf, die seine vielfältigen biologischen Funktionen ausmachen. Eisen kann von sechs Liganden koordiniert werden. Die Stickstoffatome der Tetrapyrrolringe stellen allerdings nur vier zur Verfügung (s. Abbildung 6). Dadurch wird es möglich, dass das Eisenatom durch zwei zusätzliche Liganden gebunden werden kann. Dies kann durch Aminosäuren wie Histidin, Methionin oder Cystein geschehen, aber auch Tyrosin und Lysin kommen dafür, wenn auch weniger häufig, in Frage (Li et al., 2011). Beispiele hierfür sind Globine, Cytochrome und andere Oxidoreduktasen. Das Eisenatom kann aber auch von kleineren Molekülen wie Sauerstoff, Stickstoffmonoxid und Kohlenstoffmonoxid gebunden bzw. koordiniert werden und Häm vermittelt dadurch eine Funktion als Transporter oder Sensor dieser kleinen Moleküle (Li et al., 2011). Zusätzlich verändert die koordinative Bindung eines axialen Liganden, wie Aminosäurereste und kleinere Moleküle an das Zentralatom, die Absorption von Licht im visuellen Spektrum des Lichts (Berry and Trumpower, 1987). Sirohäme besitzen auch Eisen als zentrales Metallion, unterscheiden sich aber vom Häm durch die Art und Anzahl der Seitenketten. Sie treten als Kofaktoren von Nitrit- und Sulfit-Reduktasen auf, die an der Stickstoff- und Schwefelassimilation beteiligt sind (Tanaka and Tanaka, 2007). Zusätzlich zu ihrer Rolle als Kofaktoren in Proteinen wurde vermutet, dass Tetrapyrrole als Faktoren auftreten, die die Expression von Kerngenen beeinflussen und so die Organell- und Zellentwicklung, die Differenzierung, den Metabolismus und die Stressantworten regulieren können (Beck and Grimm, 2006). Kürzlich konnte durch eine genomweite Studie gezeigt werden, dass die externe Zugabe von Magnesium (+II) Protoporphyrin und Häm die Expression von mehr als 1000 Genen beeinflusst. Darunter befanden sich Gene, die für Enzyme des Citratzyklus, Hämbindeproteine, Stressregulatoren und auch Proteine, die an der Proteinfaltung und dem -abbau beteiligt sind kodieren (Voss et al., 2011). Bei der Untersuchungen der Promotoren dieser Gene wurden sogenannte *plastid response elements* (PRE's) entdeckt, die zuerst bei Promotoren aufgefallen sind, deren Gene durch Magnesium (+II) Protoporphyrin reguliert werden (von Gromoff et al., 2006; von Gromoff et al., 2008). Somit besitzen die Tetrapyrrole Hämin und Magnesium (+II) Protoporphyrin eine wichtige Funktion als *second messenger* bei adaptiven Prozessen, die die ganze Zelle beeinflussen und nicht nur Proteine in einzelnen Organellen (Voss et al., 2011).

## 2.3 Biologische Rhythmen und die circadiane Uhr

In nahezu allen Lebensvorgängen spielen biologische Rhythmen eine wichtige Rolle. Sie ermöglichen es, dass sich die Organismen auf periodisch ändernde Lebensbedingungen gezielt einstellen können. Dazu zählen die Tag- und Nachtphasen, Jahreszyklen, Jahreszeiten und auch der Umlauf des Mondes um die Erde. Durch diese rhythmischen Schwankungen in Bezug auf Licht, Temperatur und damit auch auf Nahrungsangebot ist es für einen Organismus möglich, seine Lebensvorgänge zu koordinieren. Es können je nach Periodenlänge verschiedene biologische Rhythmen auftreten. Ein Rhythmus, der in fast allen lebenden Organismen vorkommt, ist die Tagesrhythmik, die als diurnal bezeichnet wird und die eine Periode von 24 h zeigt. Sie besteht unter experimentellen Bedingungen von Dauerschwachlicht oder Dauerdunkelheit fort, wenn sie von einer inneren Uhr kontrolliert wird. Dabei kann die Länge der Periode unter diesen konstanten Bedingungen etwas von 24 h abweichen. Hierfür wurde der Begriff circadiane Rhythmik eingeführt (Halberg et al., 1959) (*circadianus, a, um* lat.: ungefähr ein Tag). Circadiane Uhren sind autonome interne Zeiterhaltungsmechanismen, die es einem Organismus erlauben, sich an die tägliche Rhythmik von Licht, Temperatur und anderen Faktoren anzupassen. Diese Mechanismen sind in der Natur in sehr großer Mannigfaltigkeit vertreten. Die Vorteile für einen Organismus, seine zellulären Prozesse, Reproduktion, Stoffwechselaktivitäten und biochemische Leistungen in bestimmte Zeiten des Tages zu verlegen, sind vielfältig. Zum Beispiel findet bei *Euglena*, *Chlamydomonas* und Zebrafischembryonen die Zellteilung in der Dunkelphase statt, um möglichst wenig schädlicher UV-Strahlung ausgesetzt zu sein (Tamai et al., 2005). Circadiane Uhren besitzen bestimmte Charakteristika, die sie als solche definieren. Erstens wird die circadiane Uhr von äußeren Umweltfaktoren, den sog. Zeitgebern, täglich neu synchronisiert. Diese sehr wichtige Eigenschaft circadianer Uhren wird als „entrainment“ bezeichnet. Zeitgeber sind Licht-Dunkel Zyklen, Temperaturzyklen (Gooch et al., 1994) oder das Nahrungsangebot (Roenneberg and Rehman, 1996) zu bestimmten Zeiten. Eine weitere Eigenschaft circadianer Systeme ist, dass die Rhythmik nach Synchronisation mit einem externen Zeitgeber unter freilaufenden Bedingungen mit einer Periode von ~24 h weiterhin bestehen bleibt. Hier wird zwischen subjektiver Tagphase und subjektiver Nachtphase unterschieden. Die Phasen der circadianen Rhythmik können auch durch externe Stimuli (Licht, Temperatur) in Abhängigkeit von Stärke, Dauer und Tageszeit verschoben werden. Bei einem nachtaktiven Tier zum Beispiel, das zu Beginn der Nachtphase einen Lichtimpuls erhält, wird die Phase des circadianen Rhythmus in die Tagphase verschoben. Es reagiert mit einer vorübergehenden Periodenverlängerung (Daan and Pittendrigh, 1976). Die Größe der Verschiebung der Phase kann in so genannten Phase-Antwort-Kurven festgehalten werden. Des Weiteren besitzen circadiane Rhythmen die Eigenschaft der

Temperaturkompensation (Pittendrigh, 1954). Nach der van't Hoff'schen Regel bringt bei biochemischen Reaktionen eine Temperaturerhöhung von 10°C eine Verdopplung der Reaktionsgeschwindigkeit mit sich. Der  $Q_{10}$ -Wert bei solchen Reaktionen ist somit annähernd 2. Bei circadianen Rhythmen liegt der  $Q_{10}$ -Wert zwischen 0,8 und 1,4 (Pittendrigh and Caldarola, 1973). Die Periode circadianer Uhren ist temperaturkompensiert. Das circadiane System kann vereinfacht in drei Hauptkomponenten eingeteilt werden, den Eingang, Oszillator und Ausgang. Photo- bzw. Temperaturrezeptoren des Eingangs leiten Informationen aus der Umgebung an den Oszillator oder an Komponenten des Ausgangs weiter (Harmer et al., 2000; Devlin and Kay, 2001). Der autoregulierte, molekulare Oszillator besteht bei einigen Modellorganismen wie *Arabidopsis* und *Neurospora* aus miteinander verzahnten, sich positiv und negativ beeinflussenden Transkriptions- und Translations-Rückkopplungsschleifen, worüber eine Reihe von Uhrengenen periodisch aktiviert und inhibiert werden (Shearman et al., 2000; Reppert and Weaver, 2001).

### 2.3.1 Das circadiane System in *C. reinhardtii*

Auch das circadiane System in *C. reinhardtii* kann man in die drei Hauptkomponenten Eingang, Oszillator und Ausgang vereinfachen (Schulze et al., 2010). Für *C. reinhardtii* sind mehrere Rhythmen bekannt, die den circadianen Ausgang repräsentieren, wie die Phototaxis, Chemotaxis, Zellteilung, UV-Empfindlichkeit und das Anhaften der Grünalge auf Glasoberflächen. Die Fähigkeit, bestimmte physiologische und biochemische Prozesse gezielt in bestimmte Tag- bzw. Nachtphasen zu verlegen, stellt einen nicht zu unterschätzenden Vorteil für einen Organismus dar. Einige der Rhythmen zeigen ihr Maximum in der Tagphase, andere in der Nachtphase. *C. reinhardtii* zeigt zum Beispiel in der Mitte des subjektiven Tages eine Bewegung in Richtung Lichtquelle, nicht aber in der subjektiven Nacht (Bruce, 1970). Dieser bereits erwähnte Vorgang der Phototaxis wird auch als Photoakkumulation bezeichnet und kann mittels automatisierter Messung (Mergenhagen, 1984) oder eines einfachen Versuches in einer Zellpopulation beobachtet werden (Schulze et al., 2013). Auch die Aufnahme von Nährstoffen erfolgt in der Tagphase. So nimmt *C. reinhardtii* zu Beginn des subjektiven Tages Ammonium auf (Byrne et al., 1992) und zeigt ein Maximum an Aktivität der Nitritreduktase (Pajuelo et al., 1995; Iliev et al., 2006). Im Gegensatz dazu erfolgt die gezielte Bewegung zur Stickstoffquelle (Chemotaxis) nur in der Mitte der Nacht. Dies ist ein sehr gutes Beispiel wie das circadiane System biologische Vorgänge regelt, um einen maximalen Nutzen für die Zelle zu erreichen. Weitere untersuchte Rhythmen wie die Adhärenz an Glasoberflächen (Straley and Bruce, 1979) und die Zellteilung (Goto and Johnson, 1995), weisen ebenso ihr Maximum in der Nachtphase auf. Am circadianen Eingang sind vor allem Photorezeptoren für das *entrainment* verantwortlich.

Es konnte gezeigt werden, dass Licht aus dem blauen, grünen und roten Wellenlängenbereich die Phase der circadianen Uhr beeinflusst (Johnson et al., 1991; Kondo et al., 1991). Am Lichteingang sind Photosynthesekomponenten beteiligt und Blaulicht wird durch die Photorezeptoren Phototropin (Huang and Beck, 2003) und die Cryptochrome aCRY und pCRY (Beel et al., 2012) wahrgenommen. Auch die beiden Kanalrhodopsine ChR1 und ChR2 (Hegemann, 2008), die vor allem im grünen Wellenlängenbereich absorbieren, könnten am Lichteingangsweg von *C. reinhardtii* beteiligt sein (Schulze et al., 2010). Der oben bereits erwähnte Rotlichteinfluss konnte bisher keinem bekannten Photorezeptor zugeschrieben werden. Allerdings wurde am tierischen aCRY gezeigt, dass es Rotlicht absorbiert und wahrscheinlich am circadianen Eingang eine Rolle spielt (Beel et al., 2012; nicht veröffentlichte Ergebnisse, Beel and Mittag). Im zentralen Oszillator sind verschiedene molekulare Komponenten bekannt, die über Rückkopplungsschleifen positiv bzw. negativ reguliert werden. Außerdem spielen rhythmische Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen über Serin-Threonin-Kinasen und Phosphatasen eine wichtige Rolle. Da gibt es zum einen die Casein-Kinase 1 (CK1). Eine Herunterregulierung des CK1-Proteinniveaus führte zu einer Verkürzung der Periodenlänge und schließlich kam der circadiane Rhythmus der Phototaxis vollständig zum Erliegen (Schmidt et al., 2006). Auch das aus den beiden Untereinheiten C1 und C3 bestehende RNS-Bindeprotein CHLAMY1 ist an der Kontrolle der circadianen Uhr beteiligt (Iliev et al., 2006). In Analysen von *C. reinhardtii* Stämmen, in denen das Proteinniveau von C1 oder C3 entweder herauf- bzw. herunterreguliert wurde, konnte ein Einfluss auf die Phase und Periode der circadianen Phototaxis gezeigt werden. CHLAMY1 beeinflusst direkt die circadiane Translation von mRNAs, die in ihrem 3'-NTR eine (UG)<sub>≥7</sub> Wiederholung aufweisen (Kiaulehn et al., 2007). Zu weiteren Komponenten des zentralen Oszillators zählen die ROC (*Rhythm of Chloroplast*) Proteine (Matsuo et al., 2008) und CONSTANS (Serrano et al., 2009). Die als *Rhythm of Chloroplast* identifizierten Gene sind an der Regulation von sehr vielen biologischen Prozessen beteiligt (Schulze et al., 2010). Zu den ROC-Proteinen konnten solche mit Funktion in den Flagellen, mit Beteiligung am Ubiquitin-Proteasome Signalweg, Transkriptionsfaktoren, Membrantransport sowie Proteine, die an den Signalwegen bei DNS Schäden und Apoptose beteiligt sind, identifiziert werden (Schulze et al., 2010).

## 2.4 Aufgabenstellung

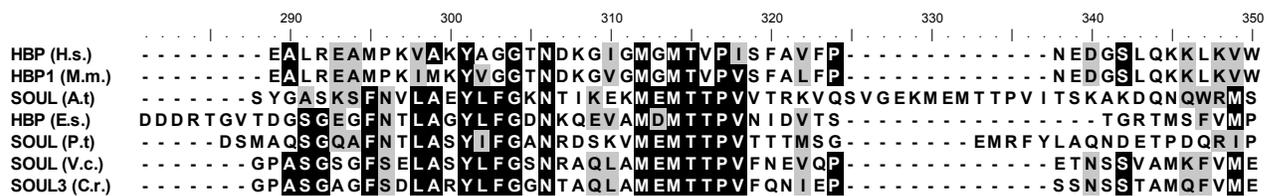
In dieser Arbeit sollte das Augenfleckprotein SOUL3 aus *C. reinhardtii* funktionell charakterisiert werden. SOUL3 sollte heterolog in *E. coli* exprimiert und die Häm-bindenden Eigenschaften untersucht werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob SOUL3 Komplexe (homo- oder heteromere) bilden kann und, falls sich dies bestätigt, sollten die potentiellen Interaktionspartner gesucht werden. Auch sollte die Lokalisation von SOUL3 sowohl innerhalb der Zelle als auch innerhalb des Augenflecks untersucht werden. Für die funktionelle Charakterisierung von SOUL3 sollten mittels amiRNS-Technik transgene Zelllinien erzeugt werden, die ein herabgesetztes SOUL3 Proteinniveau aufweisen. Die funktionelle Analyse dieser Zelllinien sollte erste Einblicke in die Bedeutung von SOUL3 für *C. reinhardtii* liefern.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen der SOUL/HBP-Domäne des Augenfleck-Proteins SOUL3

##### 3.1.1 Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener SOUL/HBPs aus unterschiedlichen Spezies

Häm-bindende Proteine wurden bereits in vielen Bakterien, Pflanzen und Wirbeltieren gefunden, die zur SOUL/HBP-Familie gehören (s. Einleitung). Einige wurden näher charakterisiert, wie zum Beispiel ein SOUL-Protein in *A. thaliana* (Takahashi et al., 2008) oder das p22/HBP aus der Maus (Taketani et al., 1998). Um das im Augenfleck von *C. reinhardtii* gefundene SOUL3 zu charakterisieren, wurde zuerst ein Sequenzvergleich auf Aminosäuren-Ebene mit bereits bekannten Häm-bindenden Proteinen durchgeführt (s. Abbildung 7).

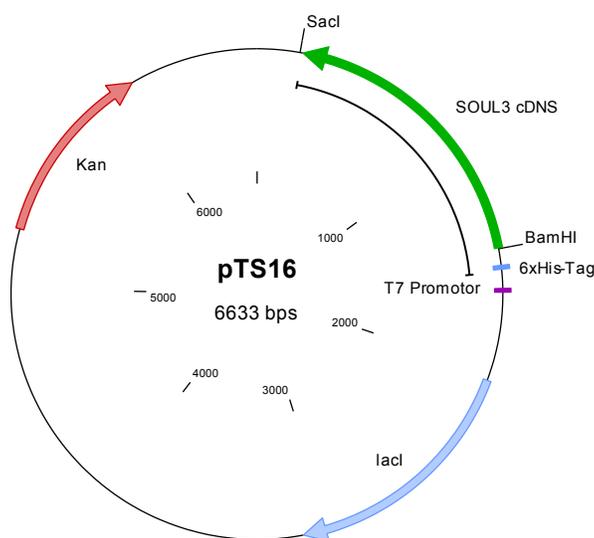


**Abbildung 7: Analyse der Homologien verschiedener Proteine der SOUL/HBP-Familie.** Vergleich der Aminosäuresequenzen von SOUL3 aus *C. reinhardtii* (C.r.) mit homologen Proteinen aus *Volvox carteri* SOUL (V.c.), *Phaeodactylum tricorutum* SOUL (P.t.), *Ectocarpus silicosis* HBP (E.s.), *A. thaliana* SOUL (A.t.), *Mus musculus* HBP1 (M.m.) und *Homo sapiens* HBP (H.s.). Gezeigt ist hier nur der Bereich, der die vorhergesagte Häm-Bindestelle (grauer Balken) aufweist (Taketani et al., 1998). Schwarzer Hintergrund: identische Aminosäuren; grauer Hintergrund: ähnliche Aminosäuren. Der Vergleich wurde mit dem „BioEdit Sequence Aligment Editor“ v7.1.9 und dem ClustalW „Global Alignment“ Algorithmus (Thompson et al., 1994) durchgeführt.

Bei dem Häm-bindenden Protein p22/HBP (Taketani et al., 1998) wurde eine zehn Aminosäuren umfassende Sequenz als Ort der Häm-Bindung vorhergesagt (s. Abbildung 7, graue Linie). Im Vergleich mit SOUL3 aus *C. reinhardtii* und der nahen Verwandten vielzelligen Alge *V. carteri* zeigte sich, dass diese Domäne hoch konserviert ist (s. Abbildung 7). Auch das SOUL verwandte Protein der Diatomee *Phaeodactylum tricorutum* zeigt eine hohe Identität (70%) gegenüber SOUL3 (C.r.), ebenso wie die Domäne in der Braunalge *Ectocarpus siliculosus* (60% Identität) und *A. thaliana* (60% Identität), wo die Häm-Bindung bereits nachgewiesen worden war (Takahashi et al., 2008). Bei *Mus musculus* (50% Identität) und *Homo sapiens* (40% Identität) zeigten sich die geringsten Homologien zu SOUL3 (C.r.) in diesem Bereich.

### 3.1.2 Herstellung eines Vektors zur Überexpression von SOUL3

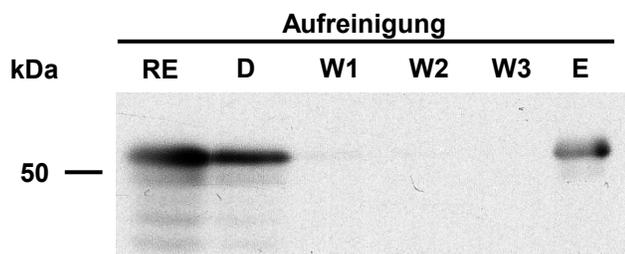
Für die Antikörperherstellung war bereits ein Überexpressionsvektor hergestellt worden. Mit diesem konnte jedoch nur der C-terminale Teil der *soul3* cDNS exprimiert werden (Schulze Diplomarbeit, 2008). Um die Häm-Bindeeigenschaften von SOUL3 aus *C. reinhardtii* zu untersuchen, musste zuerst ein geeigneter Überexpressionsvektor kloniert werden, um die gesamte cDNS von SOUL3 in geeigneter Weise in *E. coli*-Zellen zu exprimieren und so das heterolog exprimierte SOUL3 Protein aufzureinigen zu können. Hierzu wurde die *soul3* cDNS aus dem Plasmid AV638730 (s. 5.1.7.2) mittels der Oligonukleotide OMM437 und OMM679 (s. 5.1.8) herausamplifiziert. An diese beiden Oligonukleotide wurden an die 5'Enden zusätzliche Basen angehängt. Das Oligonukleotid OMM437 führte damit die Restriktionsschnittstelle *SacI* und OMM679 die Restriktionsschnittstelle *BamHI* ein. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde mit dem „QIAquick® PCR Purification Kit“ (s. 5.1.3) aufgereinigt und mit *SalI* und *XbaI* geschnitten. Nach nochmaliger Aufreinigung über ein Agarosegel wurde das PCR-Produkt dann in den mit *SacI* und *BamHI* geöffneten Vektor pET28a(+) (s. 5.1.6) ligiert (s. 5.2.1.9). Der resultierende Vektor pTS16 enthielt nun die 1259 bp der *soul3* cDNS plus 105 bp am 5'-Ende, die von der 6× Histidin-Markierung sowie einem endogenen Startkodon des Vektors pet28a(+) gebildet wurde (s. Abbildung 8). Damit ergibt sich für den kodierenden Teil des Transkriptes eine Länge von 1364 bp, das für ein 454 AS Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 51,1 kDa kodiert.



**Abbildung 8: Zirkuläre Darstellung des SOUL3 Überexpressionsvektors für *E. coli*.** Die Abbildung zeigt nur die für diese Arbeit relevanten Schnittstellen. *lacI*: Lac Inhibitor; *Kan*: Kanamycinresistenzgen; T7 Promotor: Promotorregion für T7 RNA Polymerase; Blauer Balken: 6× Histag; *soul3* cDNS: 1259 bp der *soul3* cDNS aus AV638730; schwarze Linie: Gesamt-Leserahmen aus *soul3* cDNS, pET28a(+) 6× Histidin-Markierung sowie dem pET28a(+) eigenem Startkodon.

### 3.1.3 Überexpression und Aufreinigung von SOUL3 in *E. coli*

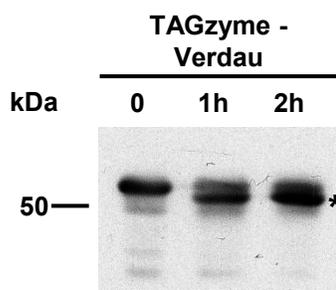
Um das komplette SOUL3-Protein aus *C. reinhardtii* für weitere biochemische Versuche in ausreichenden Mengen nativ aufzureinigen zu können, wurde pTS16 (s. 3.1.2) in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3)RIPL (s. 5.1.5.1) transformiert. Nach Induktion der Expression mit IPTG, wurde das heterolog exprimierte SOUL3-Protein nativ aufgereinigt (s. 5.2.3.16). Mit den erhaltenen Fraktionen wurde eine Immunodetektion des SOUL3 Proteins mit dem Anti-SOUL3-Antikörper durchgeführt (s. Abbildung 9).



**Abbildung 9: Heterologe Expression und Aufreinigung von SOUL3 (Schulze et al., 2013).** Mit pTS16 transformierte *E. coli* Zellen wurden 6 h nach Induzierung mit 1mM IPTG geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nachdem die Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1× *E. coli* Lysepuffer sowie Ultraschallbehandlung aufgeschlossen worden waren, erfolgte die Aufreinigung mittels Kobalt-Säulen (s. 5.2.3.16). Dabei wurde von jeder Fraktion Proben genommen und mit 4× SDS-Probenpuffer versetzt und denaturiert. Die enthaltenen Proteine wurden jeweils elektrophoretisch in einer 10%-igen SDS-PAGE aufgetrennt (s. 5.2.3.7) und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (s. 5.2.3.9). Anschließend erfolgte eine Immunodetektion mit Anti-SOUL3 Antikörpern (s. 5.2.3.11). RE: *E. coli* Rohextrakt nach Ernte; D: Durchfluss; W1, W2, W3: Waschschritte; E: Eluat. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Proteinstandard geladen (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Leiter).

Das mit pTS16 exprimierte 6× His-SOUL3 Protein weist ein theoretisches Molekulargewicht von 51,1 kDa auf (s. 3.1.2). Im Eluat zeigte sich primär ein Signal, das durch die Laufhöhe einem Molekulargewicht von 53 kDa zugeordnet werden konnte (Schulze et al., 2013). Nach Aufreinigung des Histidin-markierten SOUL3 Proteins wurden die Eluate mittels 10 kDa-Größenausschlussfilter (Millipore) auf 500 µl aufkonzentriert. Durch zwei Dialyseschritte gegen 1× TAGzyme Puffer (s. 5.2.3.17) wurde restliches Imidazol entfernt, das beim nachfolgenden Dipeptidase-Verdau sowie den späteren Hämminbindeversuchen störenden Einfluss haben könnte. Eine anschließende Bestimmung der Proteinkonzentration mittels der Neuhoff-Methode (s. 5.2.3.6) ergab 0,69 µg/µl. Um die 6× Histidin-Markierung nach der Aufreinigung wieder zu entfernen, wurde das „TAGzyme“ System von Qiagen eingesetzt (s. 5.2.3.17). Dabei wurde eine Dipeptidase verwendet, welche immer zwei Aminosäuren vom N-Terminus her abspaltet und bei bestimmten Sequenzen stoppt. Solch eine Stopp-Sequenz ist auch in dem über pTS16 exprimierten 6× His-SOUL3-Protein mit -XX↓RX- vorhanden und damit konnte die 6× Histidin-Markierung mit insgesamt 1,7 kDa Molekulargewicht abgespalten werden. Daraus ergibt sich für Δ6× His-SOUL3 ein theoretisches Molekulargewicht von 49,4 kDa. Vor dem

Start der Reaktion, dann stündlich wurden Proben entnommen und eine Immunodetektion des SOUL3 Proteins mittels Anti-SOUL3 Antikörper durchgeführt (s. Abbildung 10).



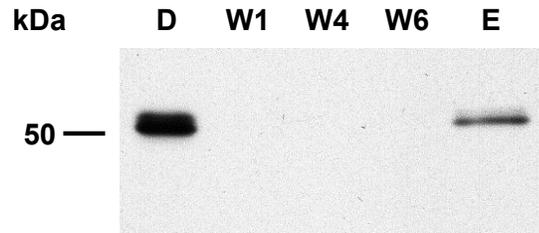
**Abbildung 10: Kontrolle des Dipeptidase-Verdaus der Histidinmarkierung an 6xHis-SOUL3 (Schulze et al., 2013).** Nachdem die Dipeptidase nach Herstellerprotokoll (Qiagen) mit Cysteamin-HCl (20 mM) aktiviert worden war, wurden insgesamt 345 µg aufgereinigtem 6× His-SOUL3 2 h bei 37°C mit 17,25 mU TAGzyme (Qiagen) inkubiert (s. 5.2.3.17). Vor dem Verdau (0) und jeweils stündlich (1 h, 2 h) wurden Proben genommen, mit 4× SDS-Probenpuffer (s. 5.2.3.7) versetzt und die enthaltenen Proteine denaturiert. Zur Kontrolle des Dipeptidase-Verdaus wurden von diesen Proben je 10 µl über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt (s. 5.2.3.7), auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (s. 5.2.3.9) und eine Immunodetektion (s. 5.2.3.11) mit Anti-SOUL3 Antikörper durchgeführt. \*: Δ6× His-SOUL3. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Proteinstandard geladen (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Leiter).

Das Signal für das detektierte 6× His-SOUL3 wanderte im Verlauf des Dipeptidase-Verdaus in Richtung 50 kDa Marker (s. Abbildung 10, \*). Für das Signal \* wurde ein Molekulargewicht von 51 kDa berechnet, das mit den theoretischen Vorhersagen des Abbaus von 1,7 kDa durch die Dipeptidase konform geht. Zusätzlich ist erkennbar, dass bereits nach 2 h vom größten Teil des 6× His-SOUL3 Proteins der die Histidin Markierung enthaltene Teil verdaut worden war. Etwaige Reste des 6× His-SOUL3 Proteins, das noch die 6× Histidin-Markierung enthielt, wurde mittels einer subtraktiven Ionenmetallaffinitätschromatographie (IMAC) entfernt (s. 5.2.3.17). Das von der 6× Histidin-Markierung befreite Δ6× His-SOUL3 befand sich dabei im Durchlauf und der nicht verdaute Teil wurde zurückgehalten. Δ6× His-SOUL3 bezeichnet ab hier das heterolog exprimierte und aufgereinigte SOUL3-Protein, von dem die 6× Markierung entfernt wurde. Das theoretische Molekulargewicht für Δ6× His-SOUL3 wurde auf 49 kDa berechnet und geht somit mit dem gefundenen Signal bei ca. 50 kDa konform (s. Abbildung 10). Da die verwendete Dipeptidase auch C-Terminal mit einer 6× Histidin-Markierung versehen war, wurde diese ebenso an der Säule gebunden. Das erhaltene Eluat enthielt nun nur das Δ6× His-SOUL3.

### 3.1.4 Kofaktor Bindungsversuche mit Hämin-Agarose

Um zu testen ob SOUL3 den Kofaktor Häm bindet zu testen, wurde ein Versuch mit Hämin-Agarose durchgeführt (s. 5.2.3.18). Hämin-Agarose besteht aus Agarose-Kügelchen, an die kovalent Chloroeisen (+III)-Porphyrin-Koordinationskomplexe gekoppelt sind. Da diese in der Oxidationsstufe +III vorliegen, ist eine weitere Reaktion mit dem Sauerstoff der Luft nicht möglich. Diese Methode wurde daher bereits in vielen wissenschaftlichen Veröffentlichungen

zum Nachweis der Häminbindung herangezogen (Han et al., 2007; Asuthkar et al., 2007; Guo et al., 2008). Der Hämin-Agarose Versuch wurde mit dem aufgereinigten und von der 6× Histidin-Markierung befreiten  $\Delta 6\times$  His-SOUL3 durchgeführt (s. 5.2.3.18).

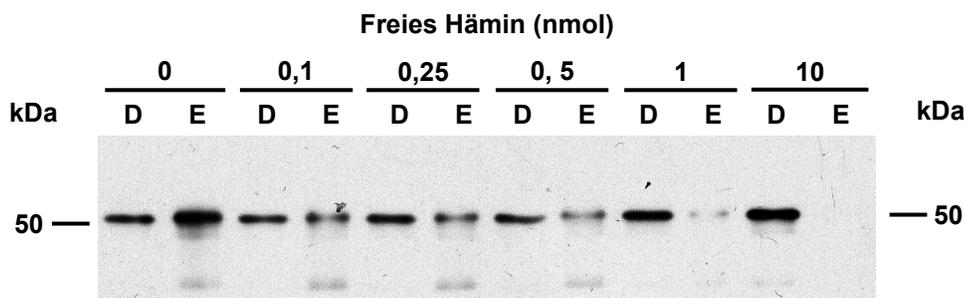


**Abbildung 11: Nachweis der Häminbindung an SOUL3 (Schulze et al., 2013).** Zuerst wurde das aufgereinigte  $\Delta 6\times$  His-SOUL3 (s. 3.1.3) nochmals einer Dialyse gegen Puffer II (s. 5.2.3.18) unterzogen. Für den Hämin-Agarose-Versuch wurde dann 60  $\mu\text{g}$   $\Delta 6\times$  His-SOUL3-Protein zu 100  $\mu\text{l}$  Hämin-Agarose Suspension gegeben und 1 h bei 4°C inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit je 1 ml Puffer I und drei Waschschrte mit je 1 ml Puffer II (s. 5.2.3.18). Danach wurde die Hämin-Agarose mit 100  $\mu\text{l}$  2× SDS-Probenpuffer (s. 5.2.3.7) bei 100°C für 5 Min. inkubiert, bei 16 000 g für 5 Min. zentrifugiert und der Überstand als Eluat in ein neues Tube überführt. Von allen Zwischenschritten wurden ebenfalls Proben genommen und die enthaltenen Proteine mit gleicher Menge an 2× SDS-Probenpuffer bei 100°C für 5 Min. denaturiert. Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden mittels 10%-iger SDS-PAGE (s. 5.2.3.7) aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (s. 5.2.3.9). Anschließend erfolgte eine Immunodetektion mit Anti-SOUL3 Antikörpern (s. 5.2.3.11). D: Durchflussfraktion; W1-W6: Waschschrte; E: Eluat. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Proteinstandard geladen (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Leiter).

Der Anti-SOUL3 Antikörper zeigte ein Signal im erwarteten Molekulargewichtsbereich bei ca. 51 kDa sowohl im Eluat als auch in der Durchflussfraktion (s. Abbildung 11). Somit konnte gezeigt werden, dass  $\Delta 6\times$  His-SOUL3-Protein an die Hämin-Agarose bindet, und es konnte nach sechs Waschschrten mit dem 10× Hämin-Agarose Volumen an Puffer I und II (s. 5.2.3.18) wieder von der Hämin-Agarose eluiert werden (Schulze et al., 2013). Folglich hat das  $\Delta 6\times$  His-SOUL3 in diesem *in vitro*-Test an die Hämin-Agarose gebunden.

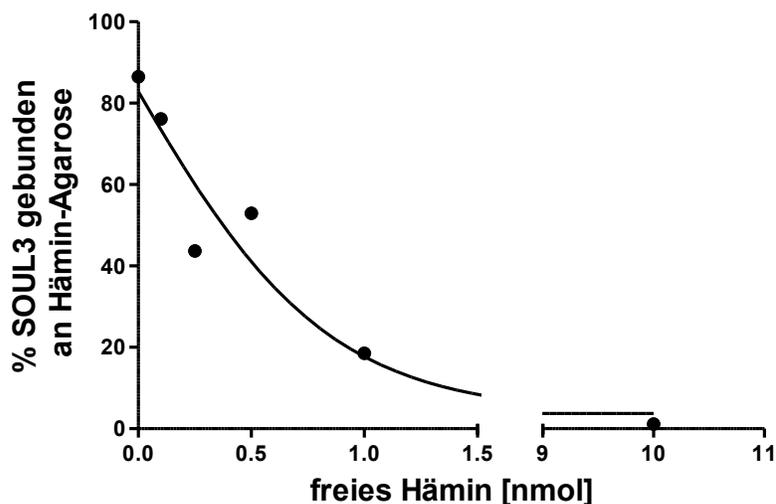
### 3.1.5 Spezifität der Häminbindung an SOUL3

Um die Spezifität der Bindung von  $\Delta 6\times$  His-SOUL3 an die Hämin-Agarose zu untersuchen, wurde ein Sättigungsexperiment durchgeführt. Hierfür wurde  $\Delta 6\times$  His-SOUL3 mit verschiedenen Konzentrationen an freiem Hämin inkubiert (s. 5.2.3.18). Die verschiedenen Reaktionsansätze wurden dann dem Kofaktor-Bindungsversuch mit Hämin-Agarose und einer anschließenden immunologischen Analyse mit Anti-SOUL3-Antikörper unterzogen (s. Abbildung 12).



**Abbildung 12: Sättigungsexperiment mit freiem Hämin (Schulze et al., 2013).** Je sechs Aliquots des vorher aufgereinigten (s. 3.1.3) und Histidintag freien  $\Delta 6 \times$  His-SOUL3 (s. 3.1.4) wurden mit steigenden Konzentrationen von 0 bis 10 nmol freiem Hämin inkubiert (s. Tabelle 6) und danach mit je 50  $\mu$ l Hämin-Agarose inkubiert. Alle Schritte wurden hier analog zu 3.1.4. jeweils für jede Häminkonzentration durchgeführt. Die enthaltenen Proteine wurden denaturiert, über eine 10%ige SDS-PAGE (s. 5.2.3.7) aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet (s. 5.2.3.9). Anschließend erfolgte eine Immunodetektion (s. 5.2.3.11) mit Anti-SOUL3-Antikörper. D: Durchflussfraktion; E: Eluat. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Proteinstandard geladen (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Leiter).

Das Signal des Anti-SOUL3 Antikörpers ist ohne freies Hämin im Eluat stärker als in der Durchflussfraktion (s. Abbildung 12). Der größte Teil des aufgereinigten  $\Delta 6 \times$  His-SOUL3 Proteins hat an die Hämin-Agarose gebunden und wurde somit im Eluat wieder aufgefunden. Mit steigender Menge an freiem Hämin zeigte sich, dass der Anteil des Signals des Anti-SOUL3 Antikörpers im Eluat schrittweise abnahm bis es bei 10 nmol Hämin abwesend ist. Bei dieser Häminkonzentration war auch bei höheren Expositionszeiten des Röntgenfilms kein Signal des Anti-SOUL3 Antikörpers erkennbar.



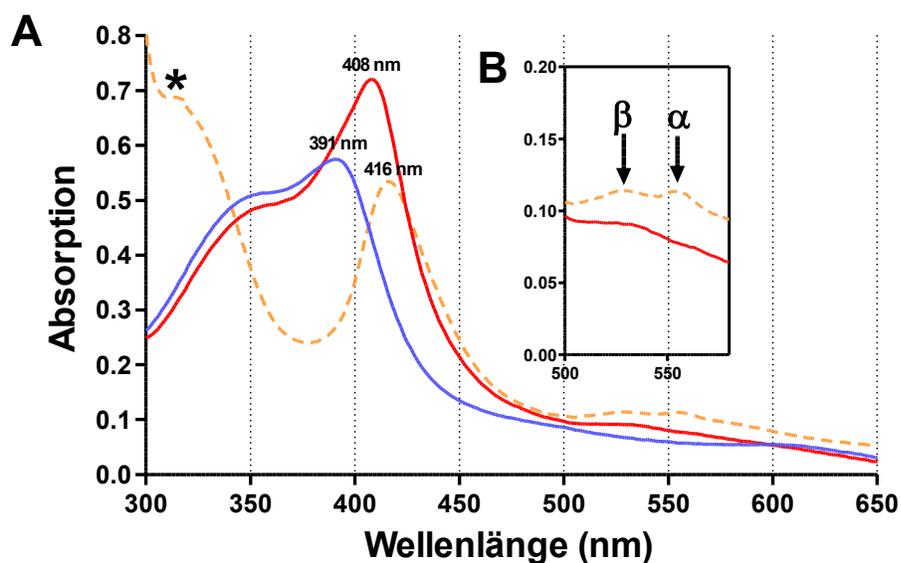
**Abbildung 13: Graphische Darstellung des Sättigungsexperiments mit freiem Hämin (Schulze et al., 2013).** Die Intensitäten der SOUL3-Proteinbanden wurden mit ImageMaster 2D Elite version 4.01 (GE Healthcare) aus Abbildung 12 ermittelt. Für jedes Aliquot mit einer bestimmten Menge an freien Hämin wurde dabei die Summe der Signalstärken von Durchfluss und Eluat auf 100% normiert, der prozentuale  $\Delta 6 \times$  His-SOUL3 im Eluat errechnet und als Funktion gegen steigende Mengen an freiem Hämin aufgetragen.

Im Gegensatz dazu nimmt der Anteil des Signales im Durchfluss mit steigender Menge an freiem Hämin zu, bis es sein Maximum bei 10 nmol erreicht. Diese Fähigkeit der Interaktion mit Hämin-Agarose nimmt proportional zur steigenden Hämin Konzentration ab (s. Abbildung 13). Die Interaktion des  $\Delta 6 \times$  His-SOUL3-Proteins mit Hämin-Agarose beruhte daher auf der

Verfügbarkeit freier Hämin-Bindungsstellen (Schulze et al., 2013). Für eine graphische Darstellung wurde der Anteil des Signales von  $\Delta 6\times$  His-SOUL3 im Eluat bestimmt (s. Abbildung 13). Deutlich erkennbar ist, dass mit Erhöhung der Menge an freiem Hämin der Anteil an SOUL3, der an die Hämin-Agarose bindet, abnimmt. Dieser Teil ging schon im Durchfluss, mangels freier Valenzen, verloren. Bei circa 5-facher Konzentration an freiem Hämin (0,5 nmol) gegenüber SOUL3 (0,1 nmol) kann nur noch ~50 % des vorhandenen SOUL3 Proteins an die Hämin-Agarose binden.

### 3.1.6 Das Absorptionsspektrum von SOUL3

Des Weiteren wurde das Absorptionsspektrum von Hämin in Anwesenheit von SOUL3 aufgezeichnet. Hierbei wurde auf die Eigenschaften von Porphyrinen geachtet, dass nämlich die maximale Absorption von Hämin bei Interaktion mit einem Protein von ~390 nm zu >400 nm verschoben wird. Dieses Maximum wurde nach seinem Entdecker Jacques-Louis Soret „Soret-Bande“ genannt. Zuerst wurde das Absorptionsspektrum von 220 bis 650 nm einer 20  $\mu$ M Hämin-Lösung aufgenommen. Für das reine Hämin wurde ein Absorptionsmaximum von 391 nm ermittelt (blaue Linie, s. Abbildung 14A). Eine 20  $\mu$ M Verdünnung des aufgereinigten SOUL3 Proteins mit Hämin bei einer Endkonzentration von 20  $\mu$ M zeigte eine Verschiebung des Maximums von 391 nm (nur Hämin) hin zu 408 nm (SOUL3+Hämin) (rote Linie, s. Abbildung 14A). Diese Verschiebung des Maximums in Richtung des roten Bereichs des Wellenspektrums ist typisch für ein von einem Protein gebundenes Hämin. Durch die Zugabe von Dithionit, bei einer Endkonzentration von 10  $\mu$ M, wurde das Eisen (+III) des Hämins zu Eisen (+II) reduziert. Dies wurde in derselben Probe vorgenommen und sofort das Spektrum aufgezeichnet, da Eisen (+II) an Luftsauerstoff rasch zu Eisen (+III) oxidiert. Das Absorptionsmaximum wurde durch die Zugabe von Dithionit auf 416 nm verschoben (orange gestrichelte Linie, s. Abbildung 14A). Die weitere Verschiebung des Maximums durch Zugabe von Dithionit, könnte ein Hinweis sein, dass das SOUL3 gebundene Hämin Redox-aktive Eigenschaften besitzt, was später diskutiert wird. Im Wellenlängenbereich von 500 bis 580 nm konnte auch ein schwacher Anstieg der Absorption nach Zugabe von SOUL3 beobachtet werden (rote Linie, s. Abbildung 14B). Die Zugabe von Dithionit führte zu zwei Maxima bei 530 nm ( $\beta$ -Banden) und 553 nm ( $\alpha$ -Banden) (orange gestrichelte Linie, s. Abbildung 14B).



**Abbildung 14: Absorptionsspektren von Häm in mit aufgereinigtem SOUL3 Protein.** **A:** Heterolog exprimiertes SOUL3-Protein wurde über Kobalt-Säulen (Takara) aufgereinigt (s. 5.2.3.16) und das Volumen mittels 30 kDa-Größenausschlussfilter (Millipore) auf 250  $\mu$ l eingengt. Dieses Volumen wurde nun noch zweimal mit 3,5 ml eiskaltem  $1\times$  PBS (s. 5.2.3.14) gewaschen und jeweils wieder auf 250  $\mu$ l eingengt. Die Absorptionsspektren wurden mit 20  $\mu$ M freiem Häm in (—), 20  $\mu$ M SOUL3 und 20  $\mu$ M Häm in (—) gemessen. Bei freiem Häm in wurde Verdünnungspuffer (s. 5.2.3.19) als Referenz verwendet. Die Spektren wurden in einem Specord40 (Analytik Jena) bei einer Auflösung von 1 nm in Quarzküvetten aufgezeichnet. Nach der Messung von 20  $\mu$ M SOUL3 mit 20  $\mu$ M Häm in wurde Dithionit (Endkonzentration: 10  $\mu$ M) direkt in die Quarzküvette gegeben und das Spektrum sofort aufgezeichnet (---). **B:** Das Spektrum zeigt die Absorptionsspektren von A im Bereich von 500 bis 580 nm. \* - Dithionitabsorptionsmaximum.

Die Absorption bei 416 nm sowie die beiden kleineren Absorptionsspitzen bei 530 und 553 nm sind typisch für Hämochrome und zeigen, dass SOUL3 Häm in als Kofaktor gebunden hat (Berry and Trumpower, 1987; Han et al., 2007). Nach Zugabe von SOUL3 steigt die Absorption im blauen Bereich des sichtbaren Lichtspektrums insgesamt an (s. Abbildung 14).



**Abbildung 15: Visueller Vergleich von SOUL3 mit (+) und ohne (-) Häm in.** Aufgereinigtes SOUL3 wurde in gleicher Konzentration (je 20  $\mu$ M) einmal ohne Häm in (-) und einmal mit Häm in (+) für 15 Min. inkubiert und die Farbveränderung photographisch festgehalten. Die Häm in-Endkonzentration betrug in beiden Fällen 20  $\mu$ M.

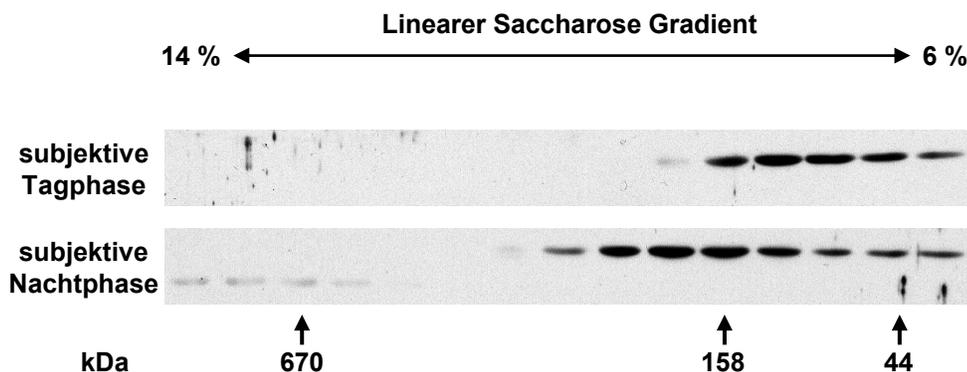
Um dies zu dokumentieren, wurde ein Teil der 20  $\mu$ M SOUL3 Proteinlösung unbehandelt belassen und photographisch dokumentiert. Hier war zu erkennen, dass durch die Zugabe von Häm in eine Farbveränderung eintrat (s. Abbildung 15).

## 3.2 Identifizierung potentieller Interaktionspartner von SOUL3

Im weiteren Verlauf sollte das Komplexbildungsverhalten sowie mögliche Interaktionspartner von SOUL3 untersucht werden. Dies ermöglicht, einen besseren Einblick in die Funktionen der SOUL/HBP-Familie und speziell auch für das SOUL3 Protein im Augenfleck zu erhalten.

### 3.2.1 Komplexbildungsverhalten von SOUL3

Um zu untersuchen, ob SOUL3 in homo- oder heteromeren Komplexen zu verschiedenen Tageszeiten vorliegt, wurde ein Saccharose Dichtegradient durchgeführt. Hierzu wurden *C. reinhardtii*-Zellen vom Stamm SAG73.72 fünf Tage in LD 12:12 kultiviert (s. 5.2.2.1). Danach erfolgte die Umsetzung der Kultur in Dauerlichtbedingungen, um circadiane Bedingungen zu erzeugen. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt LL28 (subjektive Tagphase) und LL38 (subjektive Dunkelphase) geerntet (s. 5.2.2.2), wobei LL0 dem letztmaligen Wechsel von der Dunkel- zur Lichtphase entsprach. Aus beiden Zellernten wurden Proteinrohextrakte (s. 5.2.3.1) hergestellt und je 300 µg Proteine auf die vorher präparierten Saccharosegradienten gegeben und diese aufgetrennt (s. 5.2.3.3). Ebenso wurde ein Standard (s. 5.1.9) mit Kontrollproteinen unterschiedlicher Größe behandelt. Im Saccharosegradienten konnte für SOUL3 ein Signal zu beiden LL28 und LL38 im Bereich von 44 kDa gefunden werden (s. Abbildung 16). SOUL3, das ein Molekulargewicht von 47 kDa hat, lag somit bei beiden Zeitpunkten partiell als Monomer vor. Während der subjektiven Tagphase konnte die höchste Intensität des SOUL3-Signals bei ca. 100 kDa festgestellt werden und während der subjektiven Nachtphase lag diese bei ca. 270 kDa. SOUL3 liegt also zu unterschiedlichen Zeiten des circadianen Rhythmus in Komplexen mit unterschiedlichen Molekulargewichten von 100 kDa bis 270 kDa vor. Dies entspricht ungefähr dem doppelten Molekulargewicht des Monomers von 47 kDa. Während der subjektiven Nachtphase liegt SOUL3 in Komplexen bis 270 kDa vor, was ungefähr dem sechsfachen des einzelnen SOUL3 Proteins entspricht.



**Abbildung 16: Komplexbildung von SOUL3 zu unterschiedlichen Tageszeiten (Schulze et al., 2013).** *C. reinhardtii* Zellen wurden unter LD-Bedingungen kultiviert und dann konstantem Licht ausgesetzt. Die Zellen wurden zu subjektiver Tagphase und subjektiver Nachtphase geerntet. Von beiden Zeitpunkten wurden je 300 µg Proteine aus einem nativen Rohextrakt im linearen 6-14% Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt (s. 5.2.3.3). Gleichzeitig wurde auch ein Gelfiltrationsproteinstandard (BioRad) aufgetrennt und fraktioniert. Die Fraktionen wurden beginnend mit der höchsten Saccharosekonzentration abgenommen und mit 4× SDS-Probenpuffer versetzt (s. 5.2.3.7). Die enthaltenen Proteine wurden denaturiert und je 80 µl von jeder Fraktion über eine 10%-ige SDS-PAGE aufgetrennt (s. 5.2.3.7). Die so aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet (s. 5.2.3.9). Anschließend erfolgte eine Immunodetektion (s.5.2.3.11) mit Anti-SOUL3 Antikörpern. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Proteinstandard geladen (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Leiter).

### 3.2.2 Identifizierung potentieller Interaktionspartner von SOUL3

Um die potentiellen Interaktionspartner von SOUL3 identifizieren zu können, wurde eine Koimmunopräzipitation (s. 5.2.3.13) durchgeführt. Hierbei wurde der polyklonale Anti-SOUL3 Antikörper gegen die C-terminale SOUL-Domäne (s. 5.1.10.1) verwendet, welche an SepharoseA-Kügelchen gekoppelt wurden. Die Koimmunopräzipitation wurde mit einem Proteinrohextrakt von Zellen des *C. reinhardtii* Stammes SAG73.72 durchgeführt. Die in den Eluat enthaltenen Proteine wurden über eine MS-kompatible SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden ausgeschnitten (s. 5.2.4.1). Danach wurden die in den Gelstücken enthaltenen Proteine mittels tryptischem In-Gel-Verdau in Peptide aufgespalten (s. 5.2.4.2). Die Analyse der Peptide wurde von Wolfram Weisheit mit einem LTQ-Massenspektrometer mit einer nano-Elektrospray-Ionisierungsapparatur und einer vorgeschalteten nano-HPLC (nLC-ESI-MS/MS) durchgeführt. Die zugehörigen Proteine wurden identifiziert und als signifikant eingestuft, wenn sie mit mindestens zwei unterschiedlichen Peptiden, mit den unter Punkt 5.2.4.3 genannten Kriterien, im Eluat des SOUL3-Antiserums und mit keinem Peptid im Eluat des Präimmunserums gefunden worden waren.

**Tabelle 2: Mit MS identifizierte potentielle Interaktionspartner von SOUL3 aus Proteinrohextrakt.**

Genmodell (JGI ID vs3 ID vs4)	Name und Funktion	Anzahl unterschied- licher Peptide	Bereits im Augenfleckproteom identifiziert (Schmidt et al., 2006)
153728 185703	<b>SOUL3:</b> SOUL Häm-Bindeprotein	10	×
129557 129557	<b>DPA1:</b> LL-Diaminopimelat Aminotransferase	7	
190363 196727	<b>Adenylosuccinat-Synthase:</b> <i>De novo</i> - Synthese von AMP	6	
192647 380258	<b>Aminoacyl-tRNA Synthase, Klasse Ib</b>	5	
139381 139831	<b>RPL9:</b> ribosomales Protein L9	5	
122311 .....	<b>PRPL3:</b> ribosomales Protein L3 (Plastid)	3	
186023 186023	<b>TUA2:</b> Alpha Tubulin 2, GTPase Aktivität	3	×
154307 154307	<b>METE:</b> Methionin-Synthase, Vitamin B12 unabhängig	3	
103135 195584	<b>RPL10:</b> ribosomales Protein L10	2	
..... 146567	<b>GBP1:</b> bindet an einzelsträngige DNS (G-Strang) an Telomeren	2	
77517  77517	<b>RPL17:</b> ribosomales Protein L17	2	
183518 183518	<b>RPL6:</b> ribosomales Protein L6	2	
56455 195602	<b>RPS2:</b> ribosomales Protein S2	2	
..... 126960	<b>PRPL10:</b> ribosomales Protein L10 (Plastid)	2	
122980 195593	<b>RPS9:</b> ribosomales Protein S9	2	

Im Proteinrohextrakt konnten für SOUL3 einige potentielle Interaktionspartner identifiziert werden. In Tabelle 2 sind die Proteine aufgeführt, die mit mindestens zwei unterschiedlichen Peptiden identifiziert wurden. Das SOUL3 Protein wurde mit zehn unterschiedlichen Peptiden identifiziert (s. Tabelle 2). Des Weiteren wurde DPA1 (LL-Diaminopimelat Synthase), eine Komponente des Diaminopimelat/Lysin Stoffwechsels und eine Adenylosuccinat-Synthase, die in der *de novo* Synthese von Purinen eine große Rolle spielt, mit sieben bzw. sechs verschiedenen Peptiden nachgewiesen. Die Aminoacyl-tRNA Synthase katalysiert die Übertragung einer Aminosäure auf ihre zugehörige tRNA und konnte mit fünf Peptiden identifiziert werden. Ebenso wurde mit fünf Peptiden das ribosomale Protein L9 identifiziert. Das Alpha Tubulin 2 (TUA2), eine Komponente des Zytoskellets wurde mit drei unterschiedlichen Peptiden gefunden, ebenso wie METE, eine VitaminB12 unabhängige Methionin-Synthase und das plastidäre ribosomale Protein PRPL3. Mit je zwei unterschiedlichen Peptiden wurden die ribosomalen Proteine RPS2, RPS9, RPL6, RPL10, RPL17, PRPL10 und das den G-Strang der Telomere bindende Protein GBP1 identifiziert. Die Proteine SOUL3 und TUA2 waren bereits vorher zusammen mit RPL17 und

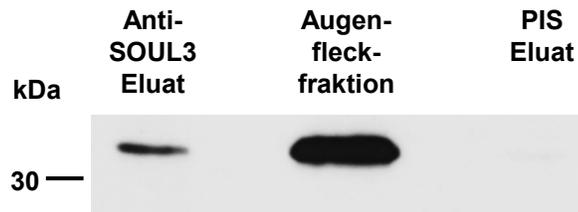
RPS9 im Augenfleckproteom gefunden worden (Schmidt et al., 2006; Wagner et al., 2008). Da SOUL3 und etwaige Interaktionspartner im Augenfleck zu finden sein sollten und diese nicht notwendigerweise auch abundant im Proteinrohextrakt zu finden sein müssen, wurde die Koimmunopräzipitation nochmals mit einem Proteinextrakt aus einer Aufreinigung des Augenflecks von *C. reinhardtii* durchgeführt. Dies wurde zu Teilen im Labor von Prof. Dr. Georg Kreimer in Erlangen durchgeführt. Nachdem die Augenflecke aufgereinigt (Schmidt et al., 2006) worden waren, wurden diese aufgrund des hohen Lipidanteils im Augenfleck solubilisiert (s. 5.2.3.5). Die Kopplung der Antikörper an die SepharoseA-Kügelchen erfolgte in Jena und die Koimmunopräzipitation wurde in Erlangen durchgeführt. Die in den Eluaten enthaltenen Proteine wurden über eine MS-kompatible SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden ausgeschnitten (s. 5.2.4.1). Danach wurden die in den Gelstücken enthaltenen Proteine mittels tryptischem In-Gel Verdau in Peptide aufgespalten (s. 5.2.4.2) und die Peptide mittels Massenspektrometrie in Jena von Wolfram Weisheit analysiert (s. 5.2.4.3). Das SOUL3 Protein wurde mit 13 unterschiedlichen Peptiden identifiziert (s. Tabelle 3). Als potentieller Interaktionspartner wurde mit zwei unterschiedlichen Peptiden die DXS1 (1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphat Synthase), ein Enzym der Isoprenoidbiosynthese gefunden (s. Tabelle 3). DXS1 katalysiert dabei den ersten Schritt einer enzymatischen Kette zur Biosynthese von Isoprenoiden, unter Umgehung des Mevalonatweges in Bakterien, Grünalgen und Chloroplasten von höheren Pflanzen (Eisenreich et al., 2001). Des Weiteren konnte mit zwei unterschiedlichen Peptiden PETA (Cytochrom f, CYTf) identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um die im Plastiden kodierte Untereinheit des Cytochrom-b<sub>6</sub>f-Komplexes.

**Tabelle 3: Mit MS identifizierte potentielle Interaktionspartner von SOUL3 aus Augenfleckaufreinigung.**

Genmodell (JGI ID vs4)	Name und Funktion	Anzahl unterschied- licher Peptide	Auch in Augenfleckproteom vorhanden (Schmidt et al., 2006)
185703	<b>SOUL3:</b> SOUL Häm-Bindeprotein	13	×
196568	<b>DXS1:</b> 1-deoxy-D-Xylulose 5-Phosphat-Synthase	2	×
D01036 <sup>a</sup>	<b>PETA:</b> Cytochrom f Untereinheit	2	×

<sup>a</sup> *C. reinhardtii*-Plastiden-Genom (Maul et al., 2002)

Da für CYTf ein kommerzieller Antikörper verfügbar war, wurden die aus der Koimmunopräzipitation erhaltenen Eluate auch immunologisch auf die Präsenz von CYTf getestet (s. Abbildung 17). Das CYTf Protein konnte sowohl im Eluat aus der Anti-SOUL3 Koimmunopräzipitation als auch in der Augenfleckfraktion nachgewiesen werden. Im Eluat aus der Koimmunopräzipitation, die mit dem Präimmenserum durchgeführt wurde, war das CYTf-Protein bei einer Belichtung des Films von 5 Min. nicht erkennbar.

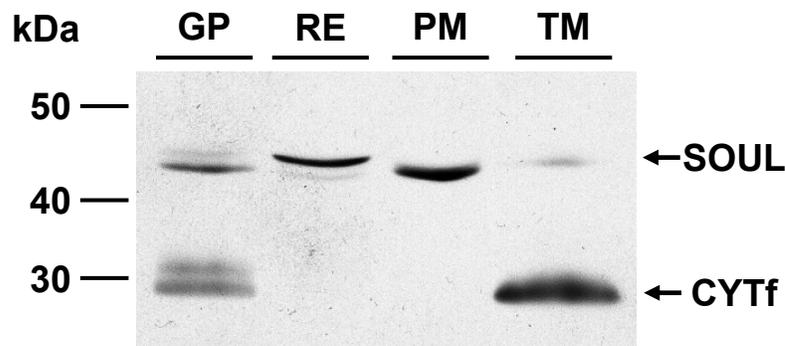


**Abbildung 17: Immunologischer Nachweis von CYTf in Eluaten einer Koimmunopräzipitation mit einer aufgereinigten Augenfleckfraktion.** Aus dem *C. reinhardtii*-Stamm cw15 wurde die Augenfleckfraktion aufgereinigt (s. 2.2.3.5) und eine Koimmunopräzipitation mit Anti-SOUL3-Antikörper durchgeführt (s. 5.2.3.13). Die erhaltenen Eluate und ein Teil der Augenfleckfraktion wurden mit 4× SDS-Probenpuffer versetzt (s. 5.2.3.7). Die Proteine von Anti-SOUL3-Eluat, des Präimmunserum-Eluates und als Kontrolle Proteine der Augenfleckfraktion wurden über eine 10%-ige SDS-PAGE aufgetrennt (s. 5.2.3.7) und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (s. 5.2.3.9). Anschließend erfolgte eine Immunodetektion (s. 5.2.3.11) mit Anti-CYTf-Antikörpern und einer Belichtungszeit von 5 Min. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Proteinstandard geladen (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Leiter).

### 3.3 Lokalisierungsstudien von SOUL3 in *C. reinhardtii*

#### 3.3.1 Membranaufreinigung/„Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Stripping“

Da der Augenfleck in *C. reinhardtii* fast nur aus Membranstrukturen besteht, war es auch von großem Interesse, die Lokalisierung von SOUL3 an oder in Membranen zu analysieren. Dafür wurden verschiedene Proteinfraktionen von *C. reinhardtii*-Wildtypzellen SAG73.72 aufgereinigt und analysiert. Aus einem Teil der Zellen wurde ein Gesamtproteinextrakt isoliert (s. 5.2.3.2). Ein anderer Teil der Zellen wurde für die Herstellung eines Proteinrohextraktes verwendet (s. 5.2.3.1). Aus der bei dieser Methode zurückgebliebenen Membranfraktion wurden die membranassoziierten Proteine (s. 5.2.3.4) angereichert. Die Analyse der verschiedenen Proteinfraktionen erfolgte über eine Immunodetektion mit Anti-SOUL3-Antikörper und Anti-CYTf-Antikörper als Kontrolle.

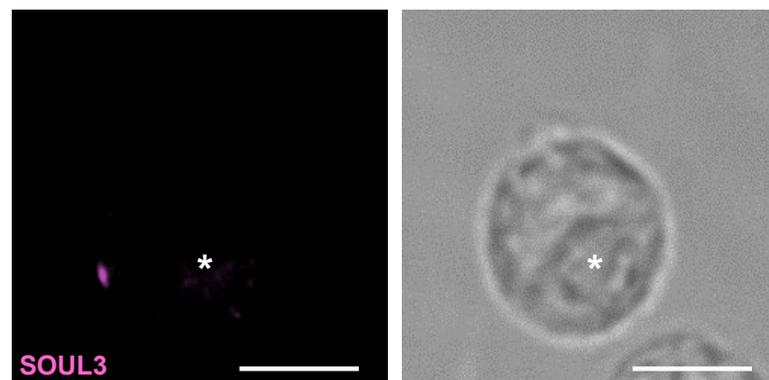


**Abbildung 18: Immunoblot verschiedener Proteinfraktionen zur Analyse der Lokalisierung von SOUL3 im Augenfleck (Schulze et al., 2013).** Aus *C. reinhardtii*-Wildtypzellen (SAG73.72) wurden Gesamtproteine (GP), ein Proteinrohextrakt (RE), die peripher assoziierten Membranproteine (PM) und die Transmembranproteine (TM) aufgereinigt (s. 5.2.3.4) und je 100 µg denaturierte Proteine über eine 10%-ige SDS-PAGE aufgetrennt (s. 5.2.3.7) und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (s. 5.2.3.9). Anschließend erfolgte eine Immunodetektion (s. 5.2.3.11) mit Anti-SOUL3-Antikörpern, sowie Anti-CYTf-Antikörpern. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Proteinstandard geladen (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Leiter; Fermentas).

CYTf war stark in der Transmembranprotein-Fraktion angereichert (s. Abbildung 18), zeigte jedoch kein Signal in den Fraktionen mit peripher assoziierten Membranproteinen und dem löslichen Rohextraktproteinen. Zur Kontrolle wurde der Gesamtproteinextrakt aufgetragen. Auch im Gesamtproteinextrakt war eine Anreicherung von CYTf zu erkennen. SOUL3 war in der Fraktion mit den peripher assoziierten Membranproteinen angereichert und zeigte auch ein deutliches Signal in der Fraktion mit dem löslichen Rohextrakt. SOUL3 verhält sich also wie ein lösliches Protein, das an Membranstrukturen peripher assoziiert, und kein Transmembranprotein ist (Schulze et al., 2013). Auffällig ist auch der Unterschied in der Laufgeschwindigkeit bei SOUL3 zwischen Rohextrakt und der peripher assoziierten Membranprotein-Fraktion. In der peripher assoziierten Membranprotein-Fraktion läuft die SOUL3-Bande niedriger als in der Spur, in welcher der Proteinrohextrakt aufgetrennt wurde. Die SOUL3-Bande in Rohextrakt wurde mit einem Molekulargewicht von 47 kDa berechnet und entspricht damit nahezu dem theoretischen Molekulargewicht von 47,8 kDa. In der peripher assoziierten Membranprotein-Fraktion zeigt SOUL3 ein Molekulargewicht von 45 kDa und weicht somit 2 kDa vom berechneten Wert ab.

### 3.3.2 Subzelluläre Lokalisierung von SOUL3 mittels indirekter Immunfluoreszenz

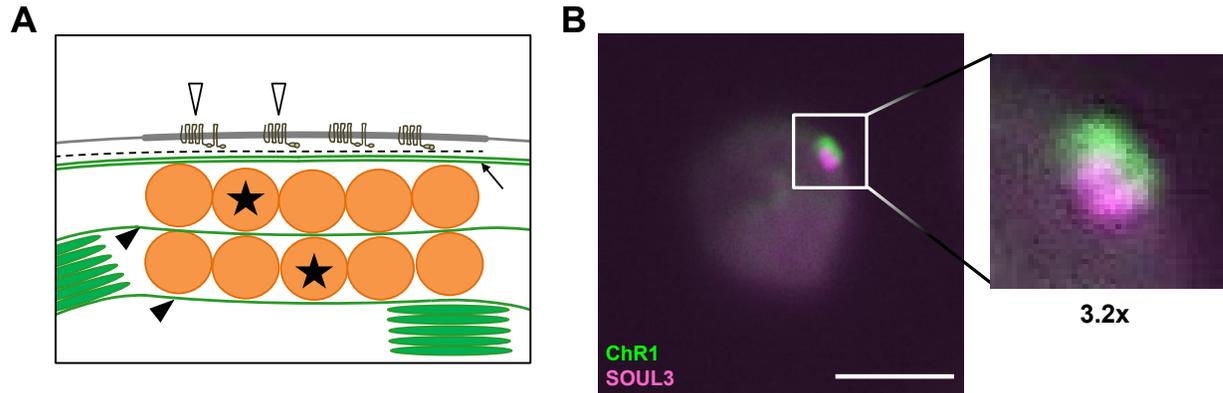
SOUL3 wurde bereits im Augenfleckproteom identifiziert (Schmidt et al., 2006). Hierbei konnte aber keine Aussage getroffen werden, ob SOUL3 nur spezifisch im Augenfleck lokalisiert oder auch in anderen Zellorganellen, wie Flagellen, Chloroplasten und im Zellkern zu finden ist. Um die Lokalisierung des SOUL3 Proteins sichtbar zu machen, wurde eine Immunlokalisation mit Anti-SOUL3-Antikörpern durchgeführt.



**Abbildung 19: Subzelluläre Lokalisierung von SOUL3 in *C. reinhardtii*-SAG73.72-Zellen (Schulze et al., 2013).** Wildtypzellen wurden mit Autolysin behandelt, in Methanol fixiert und permeabilisiert (s. 5.2.3.14). Links: SOUL3 (magenta) wurde mit Anti-SOUL3-Antikörper und Anti-Hase/Alexa488 (Life Technologies) markiert. Rechts: Hellfeld Aufnahme derselben *C. reinhardtii*-Zelle. (\*-Pyrenoid, Balken: 5 µm).



Auch biochemisch konnte bereits in verschiedenen Proteinfractionen gezeigt werden, dass SOUL3 in einer Augenfleckproteinfraction angereichert ist, aber nicht in den Flagellen, Stroma oder Chloroplastenmembranen (Schulze et al., 2013). Der Augenfleck besteht aus Strukturen des Chloroplasten und der äußeren Plasmamembran (s. Abbildung 21A). Deshalb war eine genauere subzelluläre Lokalisation des SOUL3-Proteins innerhalb des Augenflecks von großem Interesse. Daher wurde eine weitere Doppelfärbung mit SOUL3 und ChR1 durchgeführt. Dabei sollte die Lokalisierung von SOUL3 gegenüber ChR1, das sich in der Plasmamembran befindet, überprüft werden (Sineshchekov et al., 2002; Nagel et al., 2002; Nagel et al., 2003). Problematisch war jedoch, dass die Antikörper gegen SOUL3 und ChR1 aus der gleichen Wirtsspezies stammten, so dass die sekundären mit Fluorochrom konjugierten Antikörper nicht mehr spezifisch den einen oder den anderen primären Antikörper markieren konnten. Um diesem Problem Rechnung tragen zu können, wurde ein modifiziertes Protokoll nach Ino H. (2004) verwendet (s. 5.2.3.15).



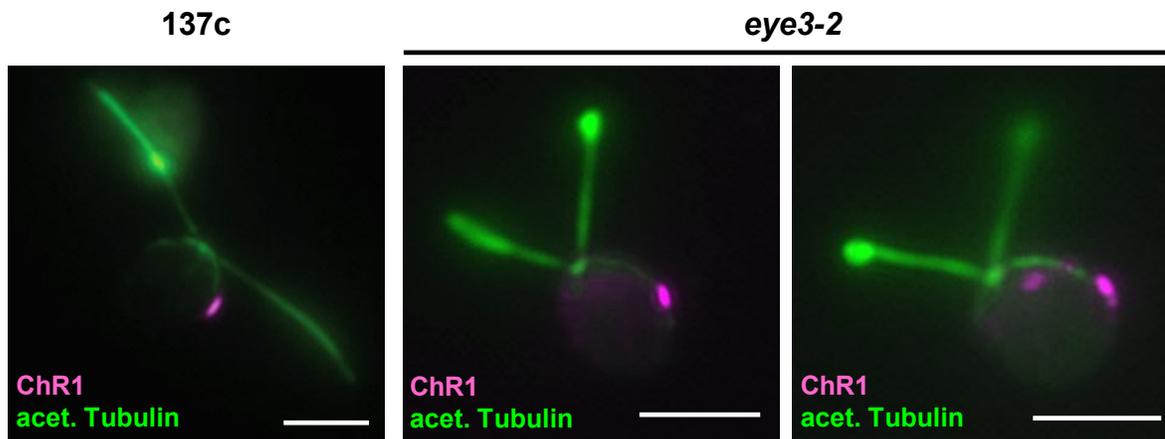
**Abbildung 21: Doppelfärbung von SOUL3 und ChR1 in *C. reinhardtii*-SAG73.72-Zellen (Schulze et al., 2013).**  
**A:** Schematische Darstellung der Augenfleckstruktur (Querschnitt nach Schmidt et al., 2006). Stern: Lipid-Globuli, schwarzer Pfeilkopf: Thylakoide, schwarzer Pfeil: äußere Chloroplastenmembranen, weißer Pfeilkopf: Channelrhodopsin-Photorezeptoren ChR1 und ChR2 in Plasmamembran, gestrichelte Linie: Flagellenwurzel. **B:** SAG73.72 Zellen wurden mit Autolysin angedaut, in Methanol fixiert und permeabilisiert. Die Färbung von SOUL3 und ChR1 erfolgte nacheinander mit löslichen Immunkomplexen von Anti-SOUL3 markiert mit Anti-Hase/Alexa555 und Anti-ChR1 markiert mit Anti-Hase/Alexa488 (s. 5.2.3.15). Balken: 5 µm. **B, rechts:** Ausschnittsvergrößerung 3,2-fach.

Das SOUL3-Signal (magenta) befindet sich unterhalb des ChR1-Signals (grün) (s. Abbildung 21B). SOUL3 scheint daher deutlich im plastidären Bereich mit den Lipid-Globuli lokalisiert und nicht an der Plasmamembran über den Lipid-Globuli assoziiert zu sein.

### 3.3.2.1 Lokalisierung von SOUL3 in der Mutante *eye3-2* sowie ChR1

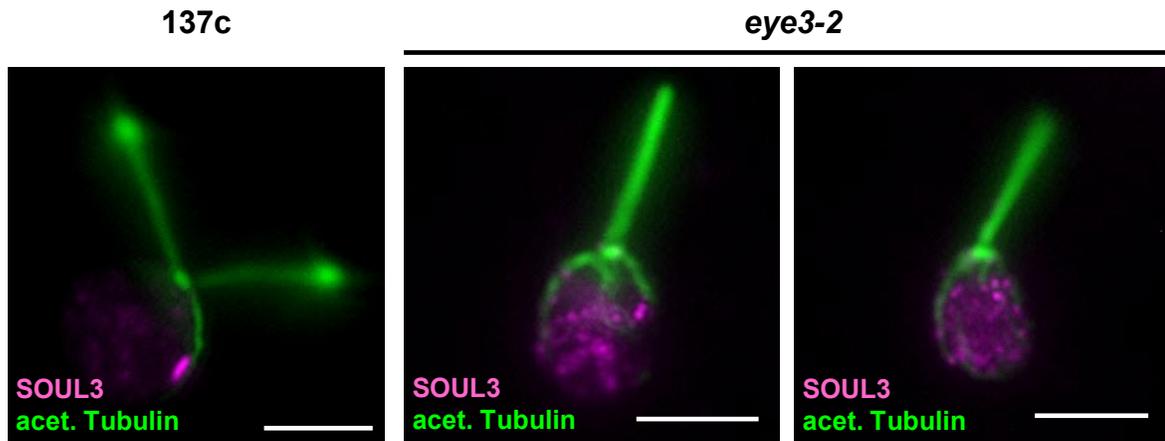
Um die Lokalisierung von SOUL3 an den plastidären Teil des Augenflecks und auch eine mögliche Assoziation mit den Lipid-Globuli näher zu untersuchen, wurden weitere Immundetektionen mit der *C. reinhardtii*-Mutante *eye3-2* durchgeführt. Die Mutante wurde im Labor von C.L. Dieckman generiert und ist durch eine Insertion im *eye3-2* Locus nicht in der Lage, funktionell zusammenhängende Lipid-Globuli zu bilden (Pazour et al., 1995; Lamb et al.,

1999). *Eye3-2* kodiert für ein Protein der ABC1-Kinase-Familie, dem eine große Rolle in beidem der Bildung und Aufrechterhaltung der Lipid-Globuli Felder zukommt (Boyd et al., 2011c). Der Defekt betrifft nur die Lipid-Globuli im plastidären Teil des Augenflecks. Der spezialisierte Bereich mit den Photorezeptoren ChR1 und ChR2, der sich normalerweise oberhalb des Lipid-Globuli-Flecks in der Plasmamembran befindet, ist von diesem Defekt nicht betroffen. *Eye3-2* wurde aus dem Wildtypstamm 137c generiert. Aufgrund dessen wurde 137c in den folgenden Experimenten als Kontrolle verwendet. Mit diesen beiden Stämmen wurde zunächst eine Doppelfärbung von ChR1 und acetyliertem Tubulin durchgeführt (s. 5.2.3.14). Für ChR1 zeigte sich in beiden Stämmen, 137c und *eye3-2*, ein ähnliches Lokalisationsmuster. ChR1 zeigte ein elliptisches Signal in der Äquatorialebene der Zelle (s. Abbildung 22), wie es bereits vorher lokalisiert worden war (Boyd et al., 2011c). Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen, die belegen, dass der Defekt in der Mutante *eye3-2* sich nicht auf das Photorezeptorfeld in der Plasmamembran auswirkt, sondern ausschließlich die Formierung der Lipid-Globulischichten im Chloroplasten betrifft (Boyd et al., 2011c).



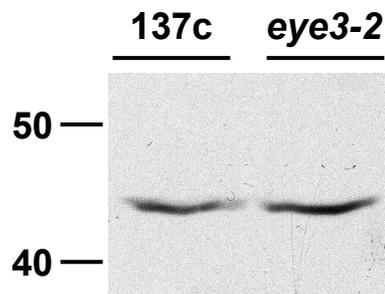
**Abbildung 22: Immunfluoreszenzfärbung von ChR1 und acetyliertem Tubulin in 137c und *eye3-2* (Schulze et al., 2013).** Wildtyp und *eye3-2* Zellen wurden mit Autolysin angedaut, in Methanol fixiert und permeabilisiert (s. 5.2.3.14). ChR1 (magenta) wurde mit Anti-ChR1-Antikörper und Anti-Hase/Alexa488 (Life Technologies) markiert. Acetyliertes Tubulin wurde mit Anti-acet. Tubulin-Antikörper (Sigma Aldrich) und Anti-Hase/Alexa555 (Life Technologies) markiert. Balken: 5 µm.

SOUL3 dagegen zeigte nur beim Stamm 137c eine gleiche Lokalisierung wie in SAG73.72. In 137c ist das SOUL3-Signal als elliptischer Fleck auch in der äquatorialen Ebene der Zelle lokalisiert. Gleichzeitig ist auch das D4-Mikrotubuli vom Flagellenpol kommend am SOUL3 Signal assoziiert (s. Abbildung 23).



**Abbildung 23: Immunofluoreszenzfärbung von SOUL3 und acetyliertem Tubulin in 137c und *eye3-2* (Schulze et al., 2013).** Wildtypzellen wurden mit Autolysin angedaut, in Methanol fixiert und permeabilisiert. SOUL3 (magenta) wurde mit Anti-SOUL3-Antikörper und Anti-Hase/Alexa488 (Life Technologies) markiert. Acetyliertes Tubulin wurde mit Anti-acet. Tubulin-Antikörper (Sigma Aldrich) und Anti-Hase/Alexa555 (Life Technologies) markiert. Balken: 5 µm.

SOUL3 zeigt in 137c ein gleiches Lokalisierungsmuster wie ChR1. In der *eye3-2* Mutante, welche einen Defekt in der Bildung des Lipid-Globuli-Feldes im Chloroplasten aufweist, zeigte sich ein anderes Lokalisierungsmuster für SOUL3. Bei *eye3-2* konnte das SOUL3-Signal nicht in der Äquatorialebene beobachtet werden. SOUL3 schien eher punktuell in kleineren Bereichen innerhalb des Chloroplasten verteilt zu sein (s. Abbildung 23). Daraus wird deutlich, dass SOUL3 innerhalb des Augenflecks im plastidären Teil an den Lipid-Globuli-Membranen assoziiert ist. Um auszuschließen, dass das SOUL3 Protein in der *eye3-2* Mutante ein anderes Expressionsniveau aufweist als in im Wildtypstamm 137c, wurde zusätzlich von beiden Zelllinien ein Proteinrohextrakt hergestellt. Im Stamm *eye3-2* zeigte sich ein vergleichbares Expressionsniveau des SOUL3-Proteins zum Wildtyp 137c (s. Abbildung 24).



**Abbildung 24: Vergleich des Expressionsniveaus von SOUL3 in 137c und *eye3-2* (Schulze et al., 2013).** *C. reinhardtii* Zellen der Stämme 137c und *eye3-2* wurden unter LD 12:12-Bedingungen kultiviert und beide zu LD6 geerntet. Je 100 µg Protein aus den Proteinrohextrakten von Zellen der *C. reinhardtii* Stämme 137c und *eye3-2* wurden über eine 10%ige SDS-PAGE (s. 5.2.3.7) aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet (s. 5.2.3.9). Anschließend erfolgte eine Immunodetektion (s. 5.2.3.11) mit Anti-SOUL3 Antikörper. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Proteinstandard geladen (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Leiter).

### 3.4 SOUL3 *knock down* durch Erzeugung von *soul3* amiRNS

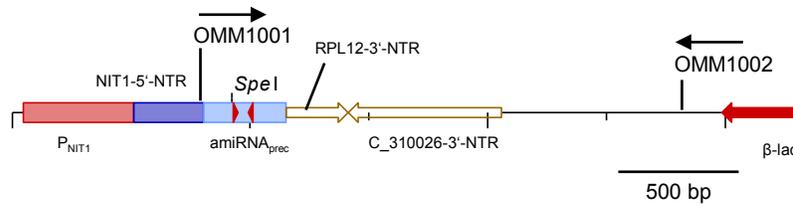
#### Linien

Um die funktionelle Rolle von SOUL3 in *C. reinhardtii* aufklären zu können, sollte das Expressionsniveau von SOUL3 in *C. reinhardtii* gezielt herabgesetzt werden. Im Vorfeld zu dem in dieser Arbeit gezeigten Ansatz wurde auch versucht, eine Insertionsmutante zu isolieren. Die Identifizierung der Mutante CRMS103 wurde von Severin Sasso im Labor von Arthur R. Grossmann durchgeführt (Sasso, Mittag, Grossman; unveröffentlichtes Material). Die Insertion wurde jedoch in einem Intron zwischen dem 11. und 12. Exon gefunden und hatte daher kaum Einfluss auf die SOUL3 Expression. Das SOUL3-Proteinniveau wies bei dieser SOUL3 Mutante keine signifikante Veränderung im Vergleich zum Wildtypstamm auf (Schulze and Mittag; unveröffentlichtes Material). Daher wurde die amiRNS-Technik (artifizielle mikro RNS) ausgewählt, die bereits erfolgreich für *C. reinhardtii* eingesetzt werden konnte (Molnar et al., 2009; Schmollinger et al., 2010). Dabei wird über einen geeigneten Vektor eine RNS in *C. reinhardtii* exprimiert, die über 21-24 bp lange komplementäre Nukleotide dsRNS (mikro RNS) bilden kann. Diese dsRNS wird dann über endogene Mechanismen von RNS-bindenden und modifizierenden Enzymen Dicer und Argonaut prozessiert. Die Sequenz der mikro RNS wurde so gewählt, dass diese komplementär zu Bereichen auf der Ziel-mRNS ist. Nach Prozessierung durch die Enzyme Dicer und Argonaut kann die mikro-RNS die Translation der Ziel-mRNS stoppen oder einen gerichteten mRNS-Abbau einleiten. Die amiRNS-Technik bedient sich hierbei endogener Mechanismen, welche in Algen, höheren Pflanzen und Tieren bereits vorhanden sind. Daher war die amiRNS Technik die Methode der Wahl, um die Translation eines Zielproteins spezifisch zu unterdrücken bzw. dessen mRNS abzubauen (Molnar et al., 2009).

#### 3.4.1 Herstellung eines ami<sub>SOUL3</sub> RNS Vektors

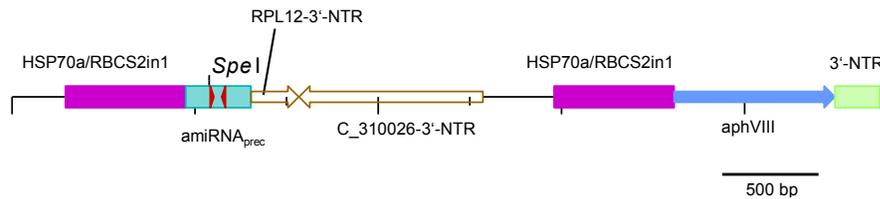
Als Grundlage für solch einen amiRNS Vektor, der eine miRNS exprimiert, die spezifisch gegen SOUL3 gerichtet ist, wurden pMS539 (s. 5.1.7.3) sowie pDI8 (s. 5.1.7.1) verwendet. pMS539 beinhaltet, unter der Kontrolle eines mit Nitrat induzierbaren Promotors, die Vorläufer-amiRNS-Sequenz mit einer *SpeI*-Restriktionsschnittstelle (Schmollinger et al., 2010). In diese Schnittstellen kann nun ein Oligonukleotid eingefügt werden, welches eine spezifische *soul3*-miRNS-Sequenz enthält. Diese Oligonukleotide wurden mithilfe des Programmes WMD3.0 (<http://wmd3.weigelworld.org>) erstellt und berechnet (Ossowski et al., 2008; Molnar et al., 2009; Schmollinger et al., 2010). Die Oligonukleotide OMM900 und OMM901 (s. 5.1.8) beinhalten eine amiRNS-Sequenz, die gegen eine Zielsequenz 30 bp abwärts des Start Kodons in der *soul3*-

mRNS gerichtet ist. An beide Oligonukleotide werden an ihrem 5'- und 3'-Ende zusätzliche Nukleotide angehängt, die, wenn die Oligonukleotide zueinander einen Doppelstrang bilden, sowohl die Überhänge einer *SpeI*-Restriktionsschnittstelle an einem Ende als auch einer *NheI*-Restriktionsschnittstelle am anderen Ende bilden. Beide Überhänge sind kompatibel mit den Überhängen aus dem *SpeI* geöffneten Vektor pMS539, jedoch kann sich nur an einer Seite des eingefügten Oligonukleotids im resultierenden Plasmid wieder die *SpeI*-Restriktionsschnittstelle bilden, da die andere *SpeI*-Erkennungssequenz durch die Überhänge mit *NheI* zerstört wird.



**Abbildung 25: Lineare Darstellung des Plasmids pTS27 (linearisierter Ausschnitt 3334 bp von gesamt 13025 bp).** Die Abbildung zeigt nur die für die Arbeit relevanten Restriktions- und Oligonukleotidbindungsstellen.  $\beta$ -lac: Ampicillinresistenzgen;  $P_{NIT1}$ : NIT1 Promotor; NIT1-5'-NTR: NIT1 5'-nichttranslatierte Region;  $amiRNA_{prec}$ : artifizielle mikro-RNS-Vorläufer cre-MIR1157; RPL12-3'-NTR: 3'-nichttranslatierte Region des ribosomalen Proteins L12; C\_310026-3'-NTR: 3'-nichttranslatierte Region von *estExt\_fgenes2\_pg.C\_310026*; rote Pfeilköpfe: spezifische *soul3*-amiRNS Sequenzen. Die vollständigen Vektorkarten sind im Abschnitt 7.1.3.1 dargestellt.

Die beiden einzelsträngigen Oligonukleotide OMM900 und OMM901 wurden zu einem Doppelstrang vereinigt (s. 5.2.1.6) und die freien 5'-Hydroxylgruppen der Basen phosphoryliert (s. 5.2.1.7). Das so hergestellte doppelsträngige DNS-Fragment wurde daraufhin in den mit *SpeI* geöffneten Vektor pMS539 ligiert (s. 5.2.1.9). Das resultierende Plasmid pTS27 enthielt nun 347 bp der *amiRNS* Vorläufer Sequenz, in welche die spezifische *soul3*-*amiRNS*-Sequenz integriert worden war (s. Abbildung 25, rote Pfeilköpfe). In pTS27 steht die *amiRNS*-Vorläufer-Sequenz, in welche die spezifische *soul3* *amiRNS* Sequenz eingebaut wurde, unter der Kontrolle des induzierbaren Promotors von NIT1 ( $P_{NIT1}$ , s. Abbildung 25). Dieser wird über Nitrat als Stickstoffquelle im Kulturmedium induziert. In einigen Arbeiten ist allerdings berichtet worden, dass die Ausprägung der Phänotypen in transgenen Zellen mit dem NIT1-Promotor schwächer ist als die, die mit dem starken konstitutiven Tandempromotors *HSP70a/RBCS2in1* exprimiert werden (Koblenz and Lechtreck, 2005; Molnar et al., 2009; Zhao et al., 2009). Des Weiteren trägt der Vektor pMS539, als Resistenzmarker das *arg7* (Argininosuccinatlyase) Gen (s. 7.1.3.1) und kann daher nicht im *C. reinhardtii*-Stamm SAG73.72 als Selektionsmarker verwendet werden. Auch ist es für spätere Untersuchungen notwendig, einen Stamm mit effizienter circadianer Phototaxis, wie den SAG73.72, zu verwenden. Dies machte die Umklonierung der *soul3*-*amiRNS*-Sequenz in den Vektor pDI8 (s. 2.1.7.1) notwendig, der sowohl den konstitutiven Tandempromotor *HSP70a/RBCS2in1* als auch das *aphVII* (Paromomycinresistenz) Gen enthielt (s. 7.1.3.2).

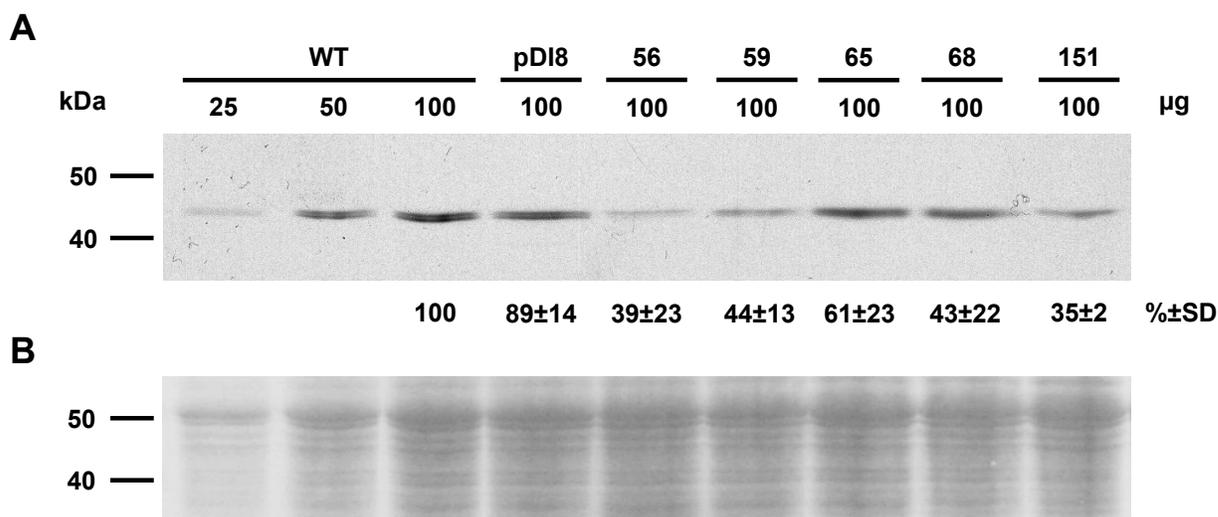


**Abbildung 26: Linearisierte Darstellung (Ausschnitt) von pTS29 (Schulze et al., 2013).** 4768 bp Ausschnitt von pTS29. Die Abbildung zeigt nur die für die Arbeit relevanten Restriktionsschnittstellen. *Hsp70/Rbcs2in1*: Tandempromotor; *aphVIII*: Paromomycinresistenzgen; 3'-NTR: nichttranslatierte Region des Paromomycinresistenzgens; *amiRNA<sub>prec</sub>*: artifizielle mikro-RNS-Vorläufer cre-MIR1157; RPL12-3'-NTR: 3'-nichttranslatierte Region des ribosomalen Proteins L12; C\_310026-3'-NTR: 3'-nichttranslatierte Region von *estExt\_fgenesh2\_pg.C\_310026*; rote Pfeilköpfe: spezifische *soul3*-amiRNS-Sequenzen. Die vollständigen Vektorkarten sind im Abschnitt 7.1.3.1 dargestellt.

Die *soul3*-amiRNS-Sequenz wurde zusammen mit den beiden 3'-NTR Sequenzen mittels der Oligonukleotide OMM1001 sowie OMM1002 (s. 5.1.8) aus pTS27 (s. Abbildung 25) amplifiziert (s. 5.2.1.5). Die Oligonukleotide OMM1001 und OMM1002 führten hierbei die Restriktionsschnittstellen *SalI* respektive *XbaI* ein. Der Vektor pDI8 wurde mit *XhoI* und *XbaI* geöffnet und über ein Agarosegel aufgereinigt (s. 5.2.1.4). Das PCR-Produkt wurde mit dem „QIAquick® PCR Purification Kit“ (s. 5.1.3) aufgereinigt und mit *SalI* und *XbaI* geschnitten. Nach nochmaliger Aufreinigung über ein Agarosegel wurde das PCR-Produkt in den bereits geöffneten Vektor pDI8 ligiert (s. 5.2.1.9). Das resultierende Plasmid pTS29 (s. Abbildung 26) enthielt nun die *soul3*-amiRNS-Sequenz unter der Kontrolle des konstitutiven Tandempromotors *HSP70a/RBCS2in1*. Durch Einbringen der *soul3*-ami RNS-Sequenz in den Vektor pDI8 wird die Selektion auf TAP-Paromomycin (s. 5.2.2.1) und eine Transformation des *C. reinhardtii* Stammes SAG73.72, der für Phototaxistests bereits etabliert ist, ermöglicht.

### 3.4.2 Charakterisierung der *ami<sub>Soul3</sub>* Zelllinien

Das *soul3*-amiRNS-Vektorkonstrukt pTS29 wurde mit dem Restriktionsenzym *AhdI* linearisiert. *AhdI* schneidet im Ampicillin-Resistenzgen von pTS29 (s. Abbildung 26). Mit diesem linearisierten Plasmid wurden dann *C. reinhardtii*-Zellen vom Stamm SAG73.72 transformiert (s. 5.2.2.5). Als zusätzliche Kontrolle wurde parallel eine Transformation von SAG73.72-Zellen mit dem leeren Vektorkonstrukt pDI8 durchgeführt, das vorher ebenso mit *AhdI* linearisiert wurde. Die Kultivierung erfolgte auf TAP-Paromomycin-Selektionsplatten (s. 5.2.2.1). Von diesen wurde je eine 10 ml TAP-Flüssigmedium-Vorkultur beimpft und sechs Tage unter LD-12:12-Bedingungen kultiviert. Davon wurde eine 50 ml Kultur inokuliert und nach Erreichen der erforderlichen Zelldichte von ca.  $6 \times 10^6$  Zellen/ml bei LD6 geerntet (s. 5.2.2.2). Parallel zu den transformierten Kulturen wurde eine Kultur *C. reinhardtii* des Wildtypstammes SAG73.72 kultiviert und auch zu LD6 geerntet (s. 5.2.2.2) und daraus Proteinrohextrakte hergestellt (s. 5.2.3.1).



**Abbildung 27: Immunodetektion von SOUL3-Protein in *C. reinhardtii*-Wildtypzellen SAG73.72, Vektorkontrolle pDI8 und den transgenen Stämmen  $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-59}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-65}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-68}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$  (Schulze et al., 2013). *C. reinhardtii*-Zellen vom Wildtypstamm SAG73.72, pDI8 und mit dem *soul3* *ami*RNS-Konstrukt transformierte *C. reinhardtii*-Kulturen ( $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-59}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-65}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-68}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$ ) wurden unter LD-12:12-Bedingungen kultiviert und beide zu LD6 geerntet (s. 5.2.2.2). Je 25, 50 und 100 µg Protein aus den Proteinrohextrakten (s. 5.2.3.1) von Zellen des Wildtypstammes und zum Vergleich je 100 µg Protein aus den Proteinrohextrakten von pDI8 und den transformierten Kulturen ( $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$ ) wurden über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt (s. 5.2.3.7), auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (s. 5.2.3.9) und mit PonceauS gefärbt (s. 5.2.3.10) (**B**). Anschließend erfolgte eine Immunodetektion (s. 5.2.3.11) mit Anti-SOUL3-Antikörper (**A**). Die Quantifizierung des Expressionsniveaus von SOUL3 erfolgte mit dem „Image Master-2D Elite“ Programm. Dabei wurde das Expressionsniveau von SOUL3 in den Wildtypzellen SAG73.72 eines jeden biologischen Replikates gleich 100% gesetzt. Die errechneten Expressionsniveaus für SOUL3 in den transgenen *C. reinhardtii*-Stämmen ist unter dem Immunoblot in %±SD (n=3) angegeben. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Proteinstandard geladen (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Leiter: Fermentas).**

Bei der Transformation von *C. reinhardtii*-SAG73.72-Zellen mit pTS29 konnten 156 Transformanten erhalten werden. Fünf repräsentative transgene Stämme ( $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-59}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-65}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-68}}$  und  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$ ), zusammen mit dem Wildtypstamm SAG73.72 und der Vektorkontrolle pDI8, wurden ausgewählt und das Expressionsniveau vom SOUL3-Protein überprüft (s. Abbildung 27). Die Auswertung der Intensität der Banden erfolgte über die Software „ImageMaster-2D v4.01“ (Amersham Biosciences). Diese Bestimmung wurde mit je drei biologischen Replikaten durchgeführt. Von den insgesamt 156 transgenen Stämmen zeigten vier verschiedene mit dem *soul3* *ami*RNS Konstrukt pTS29 transformierte *C. reinhardtii*-Stämme ein signifikant verringertes Expressionsniveau von SOUL3 unter 50% des Wildtypstammes SAG73.72 (Schulze et al., 2013). Das niedrigste SOUL3 Expressionsniveau wiesen die Stämme  $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$  und  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$  mit jeweils 39% bzw. 35% gegenüber dem Wildtypstamm auf. Die Stämme  $\text{ami}_{\text{SOUL3-59}}$  und  $\text{ami}_{\text{SOUL3-68}}$  hatten noch ein SOUL3-Expressionsniveau von 44% respektive 43%. Der transgene Stamm  $\text{ami}_{\text{SOUL3-65}}$  besaß ein SOUL3-Expressionsniveau von 61%. Alle fünf Stämme ( $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-59}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-65}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-68}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$ ) wurden für weitere Charakterisierungen *via* Mikroskopie verwendet und zusätzlich mit je zwei Aliquots in einer Kryokultur gelagert (s. 5.2.2.7).

### 3.4.2.1 Lichtmikroskopische Charakterisierung der ami<sub>SOUL3</sub>-Zelllinien

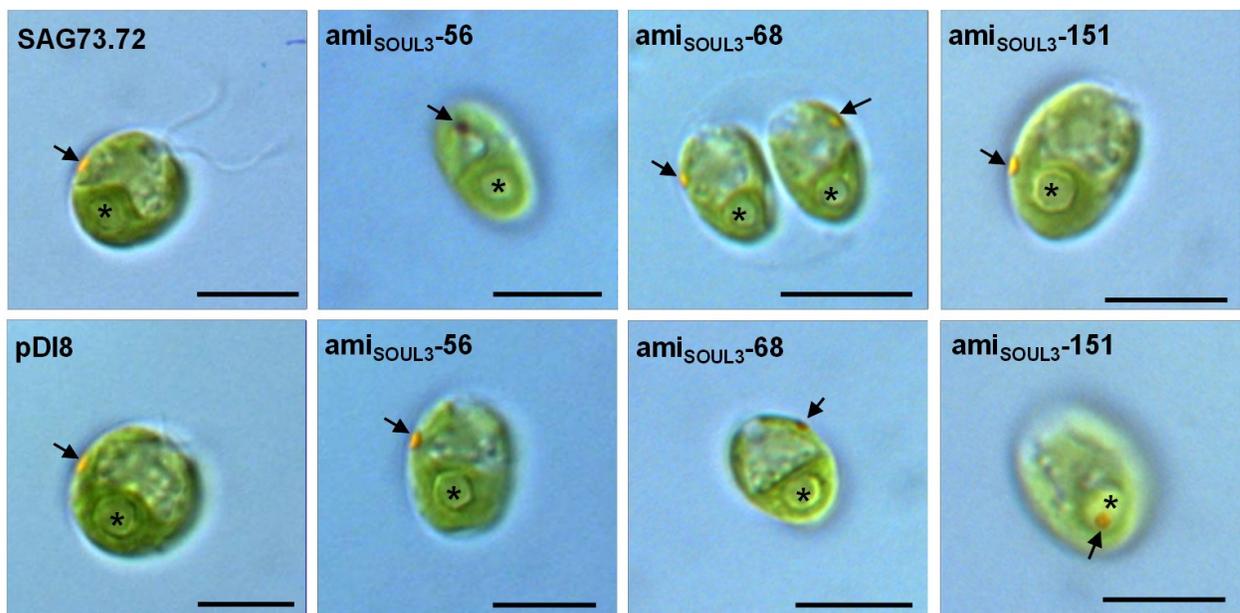
Zur phänotypischen Untersuchung der ami<sub>SOUL3</sub>-Zelllinien wurden diese lichtmikroskopisch im Vergleich zum Wildtypstamm SAG73.72 und der Vektorkontrolle SAG73.72::pDI8 analysiert. Diese Analyse erfolgte zusammen mit Sandra Schreiber. Hierzu wurden der Wildtypstamm SAG73.72, der Vektorkontrollstamm pDI8, sowie die transformanten ami<sub>SOUL3</sub>-Zelllinien, ami<sub>SOUL3</sub>-56, ami<sub>SOUL3</sub>-59, ami<sub>SOUL3</sub>-65, ami<sub>SOUL3</sub>-68 und ami<sub>SOUL3</sub>-151, vier Tage unter LD-12:12-Bedingungen im Minimalmedium (s. 5.2.2.1) kultiviert. Je 4 µl Zellkultur wurden auf einen Glasobjektträger gegeben und mit einem kleinen Deckglas abgedeckt. Die mikroskopische Begutachtung der Zelllinien erfolgte ohne Fixierungsmittel und sonstige Zusätze (s. 5.2.3.21). Die Vektorkontrolle pDI8 zeigte im Vergleich zum Wildtypstamm SAG73.72 keine phänotypischen Auffälligkeiten (s. Abbildung 28). Die äußere Morphologie, Augenfleckposition und -größe sowie die Flagellen waren in beiden Zelllinien nahezu gleich. Bei den ami<sub>SOUL3</sub>-Zelllinien wurden jedoch Auffälligkeiten in Bezug auf die Augenfleckposition festgestellt und die Augenfleckgröße abgeschätzt. Um dies näher zu charakterisieren, wurden vom Wildtypstamm SAG73.72, dem Vektorkontrollstamm pDI8 sowie den transformanten ami<sub>SOUL3</sub>-Zelllinien, ami<sub>SOUL3</sub>-56, ami<sub>SOUL3</sub>-59, ami<sub>SOUL3</sub>-65, ami<sub>SOUL3</sub>-68 und ami<sub>SOUL3</sub>-151, je 300 Zellen in Bezug auf die Positionierung des Augenflecks untersucht. Dabei wurde die Lage des Augenflecks im Vergleich zum Flagellenpol (anterior) bzw. zum gegenüberliegenden Pol (posterior) visuell beurteilt.

**Tabelle 4: Lokalisierung des Augenflecks in Wildtyp- und ami<sub>SOUL3</sub>-*C. reinhardtii*-Zelllinien (Schulze et al., 2013). n: Anzahl gemessener Zellen**

% Lokalisierung des Augenflecks, n=300					
	SOUL3 Protein Expressionsniveau (% ± SD, n=3)	Delokalisierung	Anterior	Posterior	Multiple Augenflecke
SAG73.72	100	7	3	3	1
pDI8	89 (± 14)	7	3	2	2
ami <sub>SOUL3</sub> -65	61 (± 23)	17	6	10	1
ami <sub>SOUL3</sub> -59	44 (± 13)	24	2	21	1
ami <sub>SOUL3</sub> -68	43 (± 22)	73	71	1	1
ami <sub>SOUL3</sub> -56	39 (± 23)	36	31	4	1
ami <sub>SOUL3</sub> -151	35 (± 2)	82	2	75	5

Im Wildtypstamm SAG73.72 und im Vektorkontrollstamm ist der Augenfleck am Rande des Chloroplasts in Höhe des Zelläquators gelegen. Bei nur 7% der Zellen in diesen Zelllinien wurde eine Delokalisierung des Augenflecks festgestellt. Bei den ami<sub>SOUL3</sub>-Zelllinien wurde ein höherer

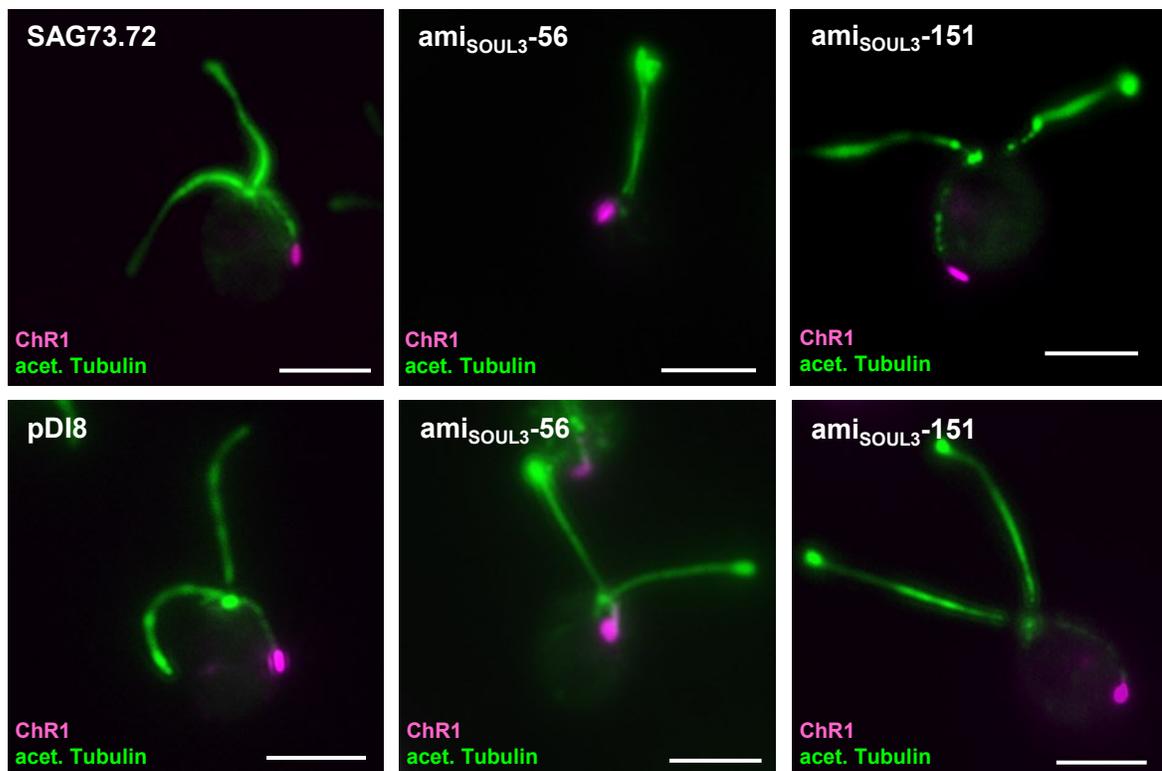
Anteil an Zellen ermittelt, die eine Delokalisierung des Augenflecks aufwiesen (s. Tabelle 4). Bei  $\text{ami}_{\text{SOUL3-65}}$  wurden 17% der Zellen mit delokalisierten Augenflecken gezählt.  $\text{Ami}_{\text{SOUL3-59}}$  zeigte bereits eine Augenfleck-Delokalisierung von 24% der ausgewerteten Zellen. Den größten Anteil an Zellen mit delokalisierten Augenflecken wiesen die Zelllinien  $\text{ami}_{\text{SOUL3-68}}$  und  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$  mit 73% bzw. 82% auf. Dabei konnte in den  $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$ -Zelllinien aber keine Präferenz für eine posteriore bzw. anteriore Delokalisierung des Augenflecks festgestellt werden. Die Zelllinien  $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$  und  $\text{ami}_{\text{SOUL3-68}}$  besaßen anterior verschobene Augenflecke, wogegen  $\text{ami}_{\text{SOUL3-59}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-65}}$  und  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$  hauptsächlich posterior delokalisierte Augenflecke hatten. In Tabelle 4 sind die Werte für alle beurteilten  $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$ -Zelllinien mit ihrem dazugehörigen SOUL3-Expressionsniveau aufgelistet.



**Abbildung 28: Augenflecklokalisierungsstudien im Hellfeldmikroskop in *C. reinhardtii*-Wildtypzellen SAG73.72, Vektorkontrolle pDI8 und den transgenen Stämmen  $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-68}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$  (Schulze et al. 2013, Sandra Schreiber). *C. reinhardtii*-Zellen vom Wildtypstamm SAG73.72, pDI8 und mit dem *soul3*-amiRNS-Konstrukt transformierte *C. reinhardtii*-Kulturen ( $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-68}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$ ) wurden vier Tage unter LD-12:12-Bedingungen kultiviert und die Position des Augenflecks im Lichtmikroskop ohne Fixierungsmittel visuell bestimmt. Vergrößerung 1000 fach. Der Pfeil zeigt auf die Position des Augenflecks der jeweiligen Zelllinie. Das Sternchen markiert den Pyrenoid. Balken: 5 $\mu\text{m}$ .**

Durch Sandra Schreiber wurde die Delokalisierung des Augenflecks in den  $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$  transgenen Linien im Bild festgehalten (s. Abbildung 28). Es ist deutlich zu erkennen, dass der Augenfleck im Wildtypstamm SAG73.72 und in der Vektorkontrolle pDI8 sich in der Äquatorialebene oberhalb des Pyrenoids befindet. Dagegen war der Augenfleck in den mit dem *soul3*-amiRNS-Konstrukt pTS29 transformierten Zelllinien,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$  und  $\text{ami}_{\text{SOUL3-68}}$  anterior in Richtung des Flagellenpols verschoben. In der mit dem *soul3*-amiRNS-Konstrukt pTS29 transformierten Zelllinie  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$  war der Augenfleck in Richtung des posterioren Zellendes verschoben. Die visuelle Bestimmung der Augenfleck-Delokalisierung im Hellfeldmikroskop erfasste nur den durch seine orange-rote Färbung der Globuli sichtbaren Teil des Augenflecks. In welchem

Maße die an den plastidären Teil des Augenflecks angehafteten Teile, wie Bestandteile des Zytoskeletts oder Photorezeptoren, an dieser Delokalisierung mit beteiligt bzw. mitbetroffen sind, wurde im nächsten Schritt untersucht. Eine Immunfärbung mit einem Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (s. 5.1.10.3) zusammen mit einem Antikörper gegen den Photorezeptor ChR1 (s. 5.1.10.2), der im Zellmembrananteil über den Globuli lokalisiert ist (s. Abbildung 21A), gab darüber Aufschluss. Hierzu wurden der Wildtypstamm SAG73.72, der Vektorkontrollstamm SAG73.72::pDI8 sowie die transformanten *ami*<sub>SOUL3</sub>-Zelllinien *ami*<sub>SOUL3</sub>-56 und *ami*<sub>SOUL3</sub>-151 vier Tage unter LD-12:12-Bedingungen im Minimalmedium (s. 5.2.2.1) kultiviert. Nach Ernte der Zellen zum Zeitpunkt LD6 wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Markierung von acetyliertem Tubulin sowie ChR1 erfolgte, wie unter Punkt 3.3.2 beschrieben. Repräsentativ sind in Abbildung 29 je eine Zelle von Wildtypstamm SAG73.72 und Vektorkontrolle pDI8, sowie je zwei der transformanten *ami*<sub>SOUL3</sub>-Zelllinien *ami*<sub>SOUL3</sub>-56 und *ami*<sub>SOUL3</sub>-151 gezeigt.



**Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung von *C. reinhardtii*-Wildtypzellen SAG73.72, Vektorkontrolle pDI8 und den transgenen Stämmen *ami*<sub>SOUL3</sub>-56 und *ami*<sub>SOUL3</sub>-151 (Schulze et al., 2013).** *C. reinhardtii*-Zellen vom Wildtypstamm SAG73.72, pDI8 und mit dem *soul3*-*ami*RNS-Konstrukt transformierte *C. reinhardtii*-Kulturen (*ami*<sub>SOUL3</sub>-56, *ami*<sub>SOUL3</sub>-68, *ami*<sub>SOUL3</sub>-151) wurden vier Tage unter LD-12:12-Bedingungen kultiviert und mit Autolysin angedaut, in Methanol fixiert und permeabilisiert (s. 5.2.3.14). ChR1 (magenta) wurde mit Anti-ChR1-Antikörper und Anti-Hase/Alexa488 (Life Technologies) markiert. Acetyliertes Tubulin wurde mit Anti-acet. Tubulin-Antikörper (Sigma Aldrich) und Anti-Hase/Alexa555 (Life Technologies) markiert. Balken: 5 µm.

Im Wildtyp SAG73.72 und in der Vektorkontrolle SAG73.72::pDI8 war das ChR1-Signal in der Äquatorialebene des Zellkörpers erkennbar. Wie auch schon in Abbildung 20 gezeigt standen die mit Anti-acetyliertem Tubulin-Antikörper dargestellten D4-Mikrotubuli vom Flagellenpol

kommend mit dem ChR1 in Verbindung. Im transgenen Stamm  $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$  war der ChR1-Patch ebenso wie die sichtbaren Lipid-Globuli anterior, in Richtung des Flagellenpoles verschoben. Zusätzlich war auch erkennbar, dass das D4-Mikrotubuli nur bis zum ChR1 Signal reichte und nicht darüber hinaus (s. Abbildung 29). Im transgenen Stamm  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$  war das ChR1-Signal, ebenso wie im Hellfeld der sichtbare Teil des Augenflecks, posterior verschoben und auch die D4-Mikrotubuli reichten noch bis zum ChR1-Signal heran (s. Abbildung 29). Die Länge der D4-Mikrotubuli war somit auch vom *SOUL3 knock down* betroffen (Schulze et al., 2013). Dies bestätigt die bereits gemachten Beobachtungen, dass die D4-Mikrotubuli die Position des Augenflecks bestimmen (Boyd et al., 2011a).

### 3.4.2.2 Ermittlung der Augenfleckfläche

Während der Ermittlung der Position des Augenflecks fiel auf, dass bei den *soul3*-amiRNS-Zelllinien,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-68}}$  und  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$ , die Größe des orange-roten Globuli-Anteils des Augenflecks geringer zu sein schien als im Wildtyp SAG73.72 und der Vektorkontrolle. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die transformanten Zelllinien  $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$ ,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-68}}$  und  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$  zusammen mit dem Wildtypstamm SAG73.72 und der Vektorkontrolle pDI8 fünf Tage im Minimalmedium bei 15°C kultiviert. Je 4 µl Zellkultur wurde dann auf einen Glasobjektträger gegeben und mit einem kleinen Deckglas abgedeckt.

**Tabelle 5: Augenfleckfläche im Wildtypstamm SAG73.72, der Vektorkontrolle pDI8 und den  $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$  *C. reinhardtii*-Zelllinien (Schulze et al., 2013). n: Anzahl gemessener Zellen.**

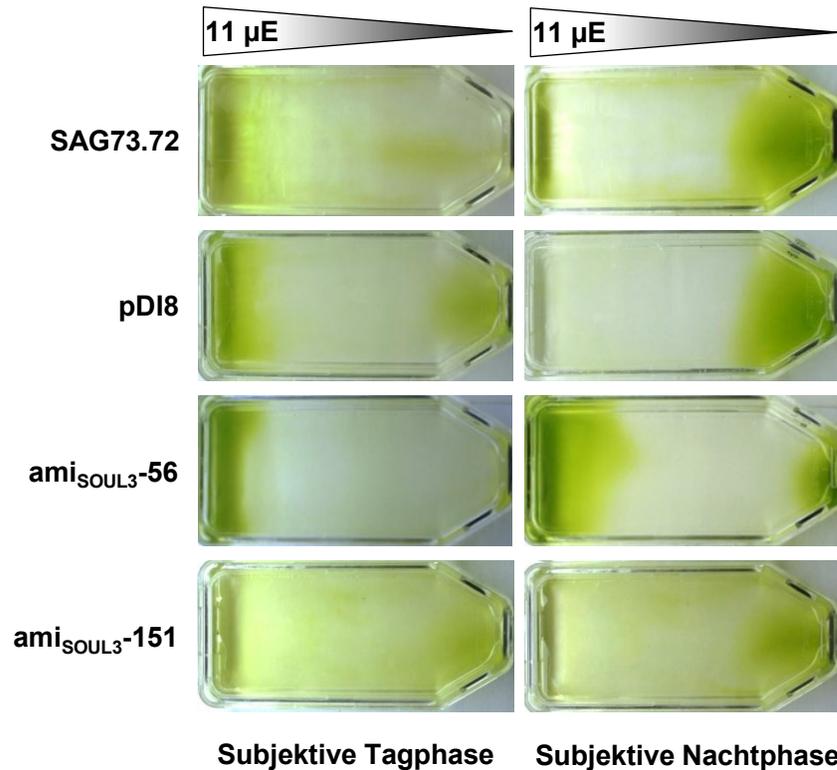
Stamm	Augenfleckfläche (µm <sup>2</sup> ± SD)	n
SAG73.72	1,69 ± 0,35	107
pDI8	1,71 ± 0,29	97
$\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$	1,15 ± 0,35	94
$\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$	1,10 ± 0,39	30
$\text{ami}_{\text{SOUL3-68}}$	0,42 ± 0,07	96

Die mikroskopische Begutachtung der Zelllinien erfolgte ohne Fixierungsmittel und sonstige Zusätze. Von einer bestimmten Anzahl Zellen wurden Aufnahmen gemacht und die Augenfleckfläche gemessen (s. 5.2.3.21). Diese Arbeit wurde im Labor von Prof. Dr. Georg Kreimer in Erlangen durchgeführt. Die erhaltenen Augenfleckgrößen für die untersuchten Zelllinien sind in Tabelle 5 angegeben. Zellen aus dem Wildtypstamm SAG73.72 und Vektorkontrolle pDI8 zeigten eine ähnliche Augenfleckfläche von 1,69 respektive 1,71 µm<sup>2</sup>. Bei

den transgenen Zelllinien  $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$  und  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$  konnte eine Augenfleckfläche von 1,15 bzw. 1,10  $\mu\text{m}^2$  ermittelt werden. Die stärkste Abweichung vom Wildtyp und Vektorkontrollwert zeigte der transformante Stamm  $\text{ami}_{\text{SOUL3-68}}$  mit 0,42  $\mu\text{m}^2$ . Allerdings revertierte dieser Stamm kurze Zeit später zum SOUL3-Expressionsniveau des Wildtyps.

### 3.4.2.3 Analyse der Phototaxisfähigkeit der $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$ -Zelllinien

In den beiden vorangegangenen Abschnitten wurde festgestellt, dass eine Reduzierung des SOUL3 Expressionsniveaus sich auf die Position und die Größe des Augenflecks auswirkt. Der Augenfleck in *C. reinhardtii* ermöglicht die gerichtete Bewegung zu einer Lichtquelle hin (Phototaxis) und dabei ist die Position des Augenflecks von höchster Bedeutung. Daher wurde als nächster Schritt in der funktionellen Charakterisierung des SOUL3-Proteins die Phototaxisfähigkeit der transformanten Stämme  $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$  und  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$  zusammen mit dem Wildtypstamm SAG73.72 und der Vektorkontrolle pDI8 im Dauerschwachlichtgradienten untersucht (s. 2.2.3.20). Die Phototaxis wurde optisch über photographischen Nachweis jeweils zur Mitte der Tag- bzw. Nachtphase dokumentiert. Kurz nachdem die Zellkulturen dem Lichtgradienten ausgesetzt wurden, zeigte sich beim Wildtypstamm SAG73.72 und der Vektorkontrolle pDi8 eine Bewegung auf die Seite der Zellkulturküvette, an der die höchste Lichtintensität angelegt war (s. Abbildung 30, linke Bildreihe). Während der Nachtphase bewegten sich beide auf die dunklere Seite der Zellkulturküvette. Anders verhielten sich die mit dem *soul3*-amiRNS-Konstrukt pTS29 transformierten Zelllinien  $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$  und  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$ . Der Stamm  $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$  zeigte eine Bewegung zum Licht während der Tagphase. Der Großteil der Zellen dieses transformanten Stammes jedoch akkumulierte, im Gegensatz zu Wildtypstamm und Vektorkontrolle, dort auch während der Nachtphase (s. Abbildung 30).



**Abbildung 30: Phototaxistest unter Dauerschwachlichtbedingungen (Schulze et al., 2013).** Für die Messung der Phototaxis wurden der *C. reinhardtii*-Wildtypstamm SAG73.72, der Vektorkontrollstamm pDI8 und die transformanten Zelllinien  $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$  und  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$  in TAP-Flüssigmedium bis zu einer von  $3\text{-}6 \times 10^6$  Zellen/ml unter LD-12:12-Bedingungen kultiviert und diese Zellen bei 1000 g und 22°C für 3 Min. zentrifugiert und vorsichtig mit 50 ml Minimalmedium (s. 5.2.2.1) resuspendiert. Diese wurden dann in sterile 100 ml Kulturgefäße überführt, an eine Begasungsanlage angeschlossen und mindestens 24 h unter LD-Bedingungen (LD 12:12) kultiviert. Von diesen Kulturen wurden dann 10 ml in Zellkulturküvetten überführt und in Dauerschwachlicht gebracht. Dabei wurde an die Zellkulturküvetten ein Schwachlichtgradient (s. 5.2.3.20) angelegt. 10 ml dieser Kulturen wurden dann in Zellkulturküvetten überführt und in den Dauerschwachlichtgradienten überführt. Die Dokumentation erfolgte während der Tag- bzw. Nachtphase.

Der transformante Stamm  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$  zeigte kaum eine Reaktion und war während der Tagphase über die Zellkulturküvette nahezu gleich verteilt. Während der Nachtphase akkumulierte  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$  nur eine leicht an der dunkleren Seite der Zellkulturküvette. Die transformanten Zelllinien  $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$  und  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$  weisen somit ein unterschiedliches phototaktisches Verhalten im Vergleich zum Wildtypstamm und der Vektorkontrolle auf (Schulze et al., 2013).

## 4. Diskussion

Die Familie der SOUL/HBPs ist ubiquitär in Organismen von Bakterien, Algen, höheren Pflanzen und Wirbeltieren vertreten (Schulze et al., 2013). Auch wurden sie eingehend in Bezug auf Häm-Bindung und Struktur charakterisiert. Allerdings liegt deren physiologische Bedeutung noch weitgehend im Dunkeln (Taketani et al., 1998; Jacob et al., 2002; Sato et al., 2004; Takahashi et al., 2008). Für die SOUL/HBPs wird vermutet, dass sie eine Rolle beim Schutz vor Sauerstoffradikalen spielen (Sato et al., 2004). Auch eine Funktion als Häm-Transporter wurde bereits für diese Proteinfamilie diskutiert (Merchant et al., 2007). In dieser Arbeit sollte ein Vertreter der SOUL/HBP Familie aus *C. reinhardtii*, SOUL3, funktionell charakterisiert werden.

### 4.1 SOUL3 bindet Hämin

Für viele Proteine der SOUL/HBP Familie konnte bereits die Interaktion mit Häm als Kofaktor erfolgreich nachgewiesen werden (Taketani et al., 1998; Sato et al., 2004; Takahashi et al., 2008). Eine Sequenz von zehn Aminosäuren in der SOUL/HBP Domäne wurde als Ort der Häm-Bindung vermutet (Taketani et al., 1998). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von SOUL3 aus *C. reinhardtii* mit SOUL/HBP's aus anderen Spezies zeigte, dass diese Sequenz sehr hoch konserviert ist. In einem einfachen Bindungsversuch mit heterolog exprimiertem SOUL3-Protein konnte eine Interaktion mit Hämin-Agarose nachgewiesen werden. Auch wurde gezeigt, dass die Zugabe von freiem Hämin in diesem Versuch diese Bindung an Hämin-Agarose verhindert. Die Untersuchung des Absorptionsspektrums ergab zusätzlich, dass nach Inkubation von SOUL3 mit freiem Hämin die breite Soret-Bande intensiviert und das Maximum nach 408 nm verschoben wurde. Diese Verschiebung des Maximums der Soret-Bande ist typisch für proteingebundenes Häm (Berry and Trumpower, 1987; Han et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass SOUL3 auch *in-vivo* die Fähigkeit besitzt, Häm zu binden. Dadurch wurde deutlich, dass sich SOUL3 spezifisch an die Hämin-Agarose gebunden hatte und diese Interaktion auf die Verfügbarkeit freier Häm-Bindungsstellen beruht. Diese Interaktion von Proteinen der SOUL/HBP-Familie mit dem Kofaktor Häm wird durch zwei unterschiedlichen Mechanismen ermöglicht. Für p22HBP konnte gezeigt werden, dass die Häm-Bindung durch eine hydrophobe Tasche ohne koordinative Bindung an einen spezifischen axialen Liganden realisiert wird (Sato et al., 2004). In einem anderen Mutagenese-Ansatz wurde das mSOUL untersucht. Ein Austausch der Aminosäure Histidin mit Alanin zeigte nicht mehr die typische Verschiebung der Soret-Bande über 400 nm hinweg (Sato et al., 2004). Dadurch konnte für mSOUL gezeigt werden, dass die Bindung von Häm an mSOUL auf ein Histidin als spezifischen axialen Liganden des Eisen-Zentralions zurückzuführen ist (Sato et al., 2004). Ähnliche Untersuchungen mittels Aminosäureaustausch

sollten in Zukunft auch an SOUL3 durchgeführt werden. Auch die Raman-Spektroskopie wäre ein geeignetes Werkzeug, um die Eigenschaften der SOUL3-Häm Interaktion genauer zu erforschen, wie bereits für mSOUL und p22HBP geschehen (Sato et al., 2004). In SOUL3 von *C. reinhardtii* sind am N-terminalen Ende sechs Histidine und zwei Cysteine zu finden, die eine mögliche Rolle als axialer Ligand für das Eisen-Zentralion einnehmen können. Im Gegensatz dazu finden sich in Häm-bindenden Proteinen von höheren Pflanzen und Wirbeltieren meist nur ein bis zwei Histidine, die innerhalb ihrer Spezies auch hoch konserviert sind (Zylka and Reppert, 1999; Davis et al., 2001; Sato et al., 2004). Es gilt daher heraus zu finden, welcher axiale Ligand an der Häm-Bindung beteiligt ist, da dies einen Rückschluss auf dessen Funktion zulässt wie bereits bei anderen Häm-bindenden Proteinen gezeigt wurde (Sato et al., 2004; Yin et al., 2012). In phylogenetischen Analysen wurden die Aminosäuresequenzen von 62 SOUL/HBPs von höheren Pflanzen untersucht. Es wurde eine Einteilung in fünf verschiedene Gruppen aufgrund von hoch konservierten Aminosäuren in der SOUL/HBP-Domäne vorgenommen, von denen Gruppe 1 und Gruppe 2 in Chloroplasten lokalisiert sind (Lee et al., 2012). Die Gruppe 1 dieser Proteinklasse besitzt eine C-terminale Domäne, die zur *nuclear transcription factor2-like* (NTF2-like)-Familie gehört und bereits in vielen Proteinen mit weit verzweigten zellulären Funktionen gefunden wurde (Lee et al., 2012). Allerdings ist die Funktion dieser Domäne in SOUL/HBP's noch nicht bekannt (Dóczi et al., 2007). Das Häm-bindende Protein At5g20140 aus *A. thaliana*, das zur Gruppe 1 der SOUL/HBP's gehört (Ytterberg et al., 2006; Lee et al., 2012), ist im Chloroplast lokalisiert. Weiterhin wurde herausgefunden, dass es Proteinkomplexe mit der Hämoxygenase1 (HY1) bildet (Lee et al., 2012). Auch wurde bei At5g20140 nachgewiesen, dass es ähnlich p22HBP Häm über eine hydrophobe Tasche „bindet“ und dass es als Häm-Transporter an die HY1 fungiert (Lee et al., 2012). Die Hämoxygenasen sind eine Gruppe von Enzymen, die in höheren Pflanzen den oxidativen Abbau von Häm zu Biliverdin-IX $\alpha$ , Eisen (+II) und Kohlenmonoxid (CO) katalysieren (Maines, 1988). Das lineare Tetrapyrrol-Biliverdin-IX $\alpha$  wird dann zu Phytychromobilin abgebaut, das als Chromophor in den Phytychromen (PHY) dient. Bei höheren Pflanzen übt PHY die Funktion eines Rotlichtphotorezeptors aus, der an der Expressionregulation von photosyntheseassoziierten nukleären Genen beteiligt ist (Rockwell et al., 2006; Duanmu et al., 2013). Diese photosyntheseassoziierten nukleären Gene sind besonders wichtig, um oxidativen Stress abzumildern, nachdem der Photosyntheseapparat nach Sonnenaufgang wieder die Arbeit aufnimmt (Duanmu et al., 2013). Phytyochrome oder auch andere bilinabhängige Photosensoren sind dagegen in *C. reinhardtii* unbekannt. Kürzlich wurde entdeckt, dass Biline, ähnlich wie bereits bei Häm gezeigt, am retrograden Signalweg vom Chloroplast zum Kern beteiligt sind. Des Weiteren beeinflussen sie die Expression von Kerngenen, die an der Abmilderung von

oxidativem Stress im Chloroplast, während der Photosynthese, Teil haben (Beck and Grimm, 2006; Duanmu et al., 2013). Auch konnte gezeigt werden, dass eine Mutante der Hämoxygenase1 in *C. reinhardtii* schwere Wachstumsstörungen unter photoautotrophen Bedingungen aufwies, was auf eine Nichtverfügbarkeit von Bilin zurückgeführt werden konnte (Duanmu et al., 2013). Interessanterweise zeigt Hämin bei der Bindung mit Hämoxygenasen ebenfalls ein Absorptionsmaximum bei 408 nm (Chu et al., 1999; Davis et al., 2001; Suits et al., 2005), wie es für SOUL3 in dieser Arbeit gefunden wurde. Eine Hämoxygenaseaktivität wurde in dieser Arbeit bei SOUL3 nicht untersucht und könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Allerdings könnte die Verschiebung des Maximums von 408 auf 416 nm bei Dithionitzugabe ein Hinweis darauf sein, dass das an SOUL3 gebundene Hämin noch redoxaktive Eigenschaften besitzt. Bisher wurde nur gezeigt, dass SOUL3 *in-vivo* Häm binden könnte. Allerdings ist auch die Interaktion mit anderen Tetrapyrrolen, wie Protoporphyrin IX oder Biliverdin-IX $\alpha$ , möglich. Dies könnte sehr gut mittels eines Bindungsversuches ähnlich dem mit Hämin-Agarose bewerkstelligt werden (Takahashi et al., 2008). Auch das Absorptionsverhalten sollte dabei, vor allem mit den linearen Tetrapyrrolen, analysiert werden. Dies könnte Rückschlüsse darauf zulassen, ob SOUL3 am retrograden Bilin-Signalweg beteiligt ist. SOUL3 zeigt Gemeinsamkeiten in der SOUL/HBP-Domäne von Gruppe 1 und Gruppe 2 aus höheren Pflanzen auf (s. 3.1). Zusätzlich besitzt SOUL3 noch eine NTF2-like-Domäne. Dass SOUL3 aus *C. reinhardtii* in seiner Domänenstruktur zur Gruppe 1 der SOUL/HBP's aus höheren Pflanzen eingeordnet werden kann, lässt somit auch den Schluss zu, dass SOUL3 eine ähnliche Funktion als Häm-carrier-Protein haben kann.

## **4.2 SOUL3 bildet Proteinkomplexe mit unterschiedlichem Molekulargewicht**

Für eine weitere funktionelle Charakterisierung war es wichtig, mögliche Interaktionspartner von SOUL3 zu identifizieren. Hierfür musste allerdings zuerst untersucht werden, ob SOUL3 auch Proteinkomplexe bildet. Es zeigte sich, dass SOUL3 in *C. reinhardtii* Proteinkomplexe bildet und dass sich diese Komplexe im Tagesverlauf in ihrem Molekulargewicht unterscheiden. Die Analyse des stöchiometrischen Verhältnisses der SOUL3-Proteinkomplexe von beiden Zeitpunkten ergab, dass der Proteinkomplex während des subjektiven Tages ungefähr dem zweifachen des SOUL3-Molekulargewichts und während der subjektiven Nacht ungefähr dem sechsfachen entsprach. Zusätzlich lag SOUL3 zu beiden Zeitpunkten als Monomer vor. Für das mSOUL-Protein wurde die Komplexbildung bereits mit in *E. coli* heterolog exprimiertem mSOUL untersucht (Sato et al., 2004). Dabei wurde herausgefunden, dass mSOUL durch Zugabe von Häm hexamere Komplexe bildet. Ohne Häm bildet mSOUL nur Dimere (Sato et al.,

2004). Somit könnte auch SOUL3 während der Tagphase hauptsächlich in Komplexen als Dimer vorliegen und während der Nachtphase als Hexamer. In zukünftigen Versuchen, mittels chemischer Vernetzung der Komplexe und Auftrennung der Proteine über eine SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen, könnte dies genauer untersucht werden (Pantakani et al., 2008). Außerdem könnte das heterolog exprimierte SOUL3 in einem Saccharose-Dichtegradienten bzw. in einem nativen Polyacrylamidgelsystem (*blue-native gel*) auf die Komplexbildung in Gegenwart von Hämin untersucht werden. Auch die Anwesenheit von anderen Tetrapyrrolen könnte diese Komplexbildung beeinflussen. Häm könnte bei dieser Formierung verschiedener Komplexe auch in *C. reinhardtii* eine entscheidende Rolle zukommen. Es ist bekannt, dass die Hämkonzentration bei dunkeladaptierten Zellen hoch ist und durch Umsetzung ins Licht stark abnimmt. Dieses rasche Absinken der Hämkonzentration im Plastiden liegt daran, dass Protoporphyrin verstärkt für die Chlorophyllsynthese verwendet wird, um möglichst rasch die Photosynthese zu starten. Da sowohl Chlorophyll als auch Häm aus Protoporphyrin IX synthetisiert werden, steht somit weniger Protoporphyrin IX für den Häm-Syntheseweg zur Verfügung (Tanaka and Tanaka, 2007; von Gromoff et al., 2008). Diese Kanalisierung des Protoporphyrin IX, als Ausgangssubstrat in dem Chlorophyllsyntheseweg, könnte die Ursache für eine Abnahme der Hämkonzentration in den Plastiden sein (von Gromoff et al., 2008). Das bei dieser Arbeit untersuchte Protein SOUL3 bildet allerdings Komplexe mit verschiedenen Molekulargewichten, unabhängig von einem äußeren Lichtreiz und somit auch unabhängig von der Photosyntheseaktivität. Die *C. reinhardtii*-Zellen, aus denen die SOUL3-Proteinkomplexe aufgetrennt wurden, wurden unter circadianen Bedingungen, bei Dauerschwachlicht, geerntet. Somit wird die Bildung dieser unterschiedlichen Komplexe von Mechanismen der circadianen Uhr in *Chlamydomonas* beeinflusst. Hierbei muss angemerkt werden, dass das SOUL3-Proteinniveau im Tagesverlauf sowohl im Licht-/Dunkelrhythmus als auch unter circadianen Bedingungen konstant bleibt (Schulze Diplomarbeit, 2008; Schulze et al., 2013). SOUL3 liegt in einem ähnlichen stöchiometrischen Verhältnis in Komplexen vor wie es bereits bei mSOUL (Sato et al., 2004) gezeigt werden konnte. SOUL3 könnte daher als Homomer vorliegen, ähnlich wie mSOUL. Allerdings schließt dies jedoch nicht aus, dass SOUL3 auch andere Interaktionspartner als sich selbst hat. Diese anderen potentiellen Interaktionspartner sollten mittels Koimmunopräzipitation identifiziert werden, was im folgenden Kapitel diskutiert wird. SOUL3 besitzt zusätzlich eine NTF2-like Domäne (s. Abbildung 5). Das NTF2-Protein ist ein Bestandteil des Kern-Import Apparates und kann über die NTF2-like Domäne Homodimere ausbilden (Merkle, 2010). Diese Domäne ist auch in vielen anderen Proteinen gefunden worden, die nicht am Kern-Import beteiligt sind. Es konnte aber bereits dargelegt werden, dass diese Domäne für die Protein-Protein Interaktion von

Bedeutung ist (Suyama et al., 2000). Daher ist es möglich, dass diese Domäne für die Interaktion mehrerer SOUL3-Untereinheiten verantwortlich ist und von der Häm-Bindung beeinflusst werden kann.

### 4.3 Die Identifizierung potentieller Interaktionspartner von SOUL3

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel beschrieben wurde, bildet SOUL3 Komplexe mit unterschiedlichen Molekulargewichten. Jedoch ist noch unklar, ob SOUL3 generell als Homomer vorliegt oder ob noch andere Proteine an der Komplexbildung beteiligt sind. Für das plastidäre AtHBP5 wurde eine Interaktion mit einer Hämoxygenase in *Arabidopsis* in einem *yeast two hybrid* Ansatz nachgewiesen (Lee et al., 2012). Diese Interaktion von einer Hämoxygenase mit einem SOUL Protein könnte auch in *C. reinhardtii* von großer Bedeutung sein und sollte Ziel künftiger Untersuchungen werden. In dieser Arbeit sollte mittels einer Koimmunopräzipitation analysiert werden, ob und welche anderen Proteine Interaktionen mit SOUL3 in *C. reinhardtii* eingehen. Bei dieser Arbeit kam der polyklonale Antikörper, welcher gegen die C-terminale SOUL/HBP Domäne des SOUL3 Proteins gerichtet ist, zum Einsatz (Schulze Diplomarbeit, 2008; Schulze et al., 2013). Für *Chlamydomonas* wurde die Koimmunopräzipitation bereits mehrfach für die Analyse von Gesamtzellextrakten (Liu et al., 2005; Willmund and Schroda, 2005; Dathe et al., 2012) und Flagellenextrakten (Qin et al., 2004; Ahmed et al., 2008) erfolgreich angewandt. Hierbei kann, im Gegensatz zum *yeast two hybrid* System oder der Analyse der Komplexbildung von heterolog exprimierten Proteinen, die Interaktion von Proteinen in ihrer nativen und physiologischen Umgebung untersucht werden. In dieser Arbeit wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurden ein Gesamtzellextrakt und zum anderen eine aufgereinigte Augenfleckfraktion eingesetzt. Als Kontrolle wurde parallel eine Koimmunopräzipitation mit einem Präimmunserum des gleichen Tieres, in dem die Antikörperproduktion induziert wurde, durchgeführt. Proteine, die in beiden Koimmunopräzipitationen mit anti-SOUL3-Antikörper und Präimmunserum identifiziert worden waren, wurden bereits bei der Auswertung von Wolfram Weisheit als unspezifische eliminiert. Bei der Koimmunopräzipitation des Gesamtzellextraktes waren acht von 15 identifizierten Proteinen ribosomalen Ursprungs. Die hohe Abundanz ribosomaler Proteine im Gesamtzellextrakt könnte ein Grund dafür sein, dass diese mit-präzipitierten. Auch kann es durch Zerstörung der Zellen bei der Herstellung des Gesamtzellextraktes dazu kommen, dass zytosolische Proteine, die sonst nicht mit SOUL3 interagieren, mit anderen aus dem Augenfleck oder Chloroplasten zusammenkommen. Daher könnte es sich bei den ribosomalen Proteinen um eher unspezifische Interaktionspartner handeln, sie stehen allerdings nicht in einem funktionellen

Zusammenhang zu SOUL3. Des Weiteren wurden noch fünf andere Proteine, eine LL-Diaminopimelat-Aminotransferase (DPA1), Adenylosuccinat-Synthase, Aminoacyl-rRNS Synthase, Vitamin B12-unabhängige Methionin Synthase (METE) und das G-Strang bindende Protein (GBP1), identifiziert. Um mögliche falsch positive von Interaktionspartnern weiter zu minimieren und die Bedeutung einer Interaktion beurteilen zu können, ist es wichtig, die Funktion und zelluläre Lokalisation der Proteine zu betrachten. Die Adenylosuccinat-Synthase ist ein Enzym, das die Verknüpfungen von Inosinmonophosphat und Aspartat zu Adenylosuccinat, den ersten Schritt in der *de novo* Synthese von Adenosinmonophosphat (Prade et al., 2000), katalysiert. Dieses Enzym des Purinstoffwechsels ist im Zytosol lokalisiert. Aminoacyl-tRNS Synthasen katalysieren die Kopplung einer bestimmten Aminosäure an seine tRNA und sind somit an der Proteinbiosynthese im Zytosol beteiligt. Ebenso ist die Vitamin B12-unabhängige Methionin Synthase im Zytosol lokalisiert (Hesse and Hoefgen, 2003). GBP1 ist, als ein die Einzelstrang-DNS der Telomere bindendes Protein, im Kern lokalisiert. Die DPA1 ist an einem speziellen Syntheseweg der Lysinbiosynthese in Pflanzen beteiligt und auch in Plastiden lokalisiert (Hudson et al., 2006). In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass SOUL3 im Augenfleck spezifisch angereichert ist und nur in insignifikanter Menge in anderen Teilen des Chloroplasten. Demzufolge sind SOUL3 und DPA1, Adenylosuccinat-Synthase, Aminoacyl-rRNS-Synthase, METE und GBP1 in einer intakten Zelle in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert. Die Interaktion von SOUL3 mit diesen Proteinen könnte eine Konsequenz des Zellaufschlusses sein und findet möglicherweise in einer intakten Zelle als solche nicht statt. Somit können sie nicht „tatsächliche“ Interaktionspartner sein. Es ist daher anzunehmen, dass die Interaktion von SOUL3 mit den oben genannten Proteinen eher unspezifisch ist. SOUL3 wurde zuerst im Augenfleckproteom von *C. reinhardtii* gefunden und es wird angenommen, dass es auch dort seine biologische Funktion erfüllt (Schmidt et al., 2006). Somit sollte auch ein potentieller Interaktionspartner, der Einfluss auf die biologische Funktion hat, bereits im Augenfleckproteom zu finden sein. Ein Vergleich mit den Daten des Augenfleckproteoms zeigte, dass keines der zuvor erwähnten Proteine bereits im Augenfleck identifiziert worden ist. Es wurde aber dennoch im Rohzelleextrakt ein Protein, das Alpha Tubulin 2, neben SOUL3 selbst identifiziert, das früher im Augenfleckproteom gefunden worden war. Es ist Teil des Zytoskeletts, das an der korrekten Positionierung des Augenflecks beteiligt ist. Untersuchungen von *Chlamydomonas* Mutanten verdeutlichen, dass das D4-Mikrotubuli für die äquatoriale Positionierung des Augenflecks bedeutsam ist (Boyd et al., 2011a; Mittelmeier et al., 2011; Boyd et al., 2011b). Dabei spielt die Acetylierung des Tubulin eine wichtige Rolle (Boyd et al., 2011b). Eine Interaktion von SOUL3 mit dem Zytoskelett könnte also Einfluss auf die Positionierung des Augenflecks haben. Die Interaktion von SOUL3 könnte aber noch auf

eine andere Weise mit Alpha Tubulin 2 erklärt werden. In *C. reinhardtii* wird der Hauptteil des intrazellulären Transportes durch Mikrotubuli des Zytoskellets abgewickelt. Bekannt ist bereits, dass die Mikrotubuli am intraflagellären Transport (IFT) beteiligt sind (Kozminski et al., 1993). Auch für den Photorezeptor ChR1 wird vermutet, dass er vom Golgiapparat an den anterioren Pol der Zelle und von da aus am D4-Mikrotubuli entlang zu seiner endgültigen äquatorialen Position transportiert wird. Ähnliches könnte auch für SOUL3 gelten. Für SOUL3 konnte in dieser Arbeit Alpha Tubulin 2 als potentieller Interaktionspartner bestimmt werden. Es ist möglich, dass SOUL3 über das D4-Mikrotubuli zum Augenfleck transportiert und dort auf klassischem Wege mittels Erkennung und Abspaltung einer Lokalisierungssequenz durch die Chloroplastenmembran direkt am Augenfleck importiert wird. Dies hätte den Vorteil, dass SOUL3 sofort richtig innerhalb des Chloroplasten lokalisiert ist und nicht innerhalb des Chloroplasten an den Ort seiner biologischen Funktion transportiert werden muss. Aufgrund der geringen Abundanz von Augenfleckproteinen im Gesamtzellextrakt und der hohen Menge an unspezifischen Interaktionspartnern wurde auch eine Koimmunopräzipitation mit Proteinen aus einer aufgereinigten Augenfleckfraktion durchgeführt. Neben SOUL3 wurde die 1-deoxy-D-Xylulose 5-Phosphat-Synthase (DXS), ein Enzym des Karotenoidstoffwechsels, identifiziert. DXS katalysiert die Synthese von Isopentenyl-PP durch einen Mevalonat unabhängigen Reaktionsweg in Bakterien, Grünalgen und den Chloroplasten von höheren Pflanzen. Am Ende dieses Synthesewegs steht das Retinal, Chromophor im Photorezeptor ChR1. Da dieser geschwindigkeitsbestimmende Schritt in unmittelbarer Nähe zu den ChRs stattfindet, erlaubt eine bessere Kontrolle der benötigten Retinal-Menge (Kreimer, 2009). Da DXS bereits im Augenfleckproteom gefunden wurde (Schmidt et al., 2006), ist es möglich, dass es sich um einen „wirklichen“ Interaktionspartner handelt. Das plastidenkodierte CYTf, auch ein Häm-bindendes Protein im Photosyntheseapparat, wurde ebenso als potentieller Interaktionspartner identifiziert. Auch CYTf wurde schon im Augenfleckproteom gefunden (Schmidt et al., 2006). CYTf ist als Hauptbestandteil des transmembranalen Cytochrom-b<sub>6</sub>f-Komplexes an der Weiterleitung von Elektronen aus dem Plastoquinonpool an Plastocyanin während der Lichtreaktion der Photosynthese beteiligt (Martinez et al., 1996). Bereits bei der Analyse des Augenfleckproteoms fiel auf, dass ca. 36% der identifizierten Proteine Teil der Thylakoiden- bzw. Chloroplastenhüllmembran waren, die Bestandteile des Augenflecks ausmachen (Schmidt et al., 2006). Für eine Interaktion von SOUL3 mit CYTf spricht auch, dass CYTf kovalent ein Häm bindet. Die vorher bereits erwähnte Funktion von SOUL3 als Häm-Transporter-Protein könnte hier eine große Rolle spielen. Es ist denkbar, dass SOUL3 Häm in gebundener nicht-toxischer Form für CYTf bereitstellt. Dagegen spricht allerdings, dass CYTf im gesamten Chloroplast vorkommt und SOUL3 nur im Augenfleck lokalisiert ist und nicht in einem anderen Teil des

Chloroplast. Es ist auch möglich, dass die Interaktionen mit DXS und CYTf auf die Bedingungen während der Augenfleckaufreinigung zurückzuführen sind. Zum einen ist die benötigte Zeit sehr groß, so dass manche Proteine bereits abgebaut werden könnten. Zum anderen werden die Augenflecke mit mehreren Zentrifugationsschritten bei sehr hohen Beschleunigungswerten aufgereinigt. Dadurch könnten die spezifischen Interaktionen schon während der Aufreinigung verloren gehen. Da der Augenfleck zu großen Teilen aus den Lipid-Globuli und Membranen besteht, musste die Augenfleckproteinfraktion mit Detergenzien behandelt werden. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass Alpha Tubulin 2 nicht bestätigt werden konnte und auch die DXS1 und CYTf nur mit zwei unterschiedlichen Peptiden gefunden wurden. Weitere funktionelle Untersuchungen an SOUL3 sind somit notwendig, um die bisher gefundenen Proteine als potentielle Interaktionspartner zu bestätigen. Sowohl für CYTf als auch für Tubulin sind kommerziell Antikörper verfügbar. Es ist denkbar, mit diesen eine Koimmunopräzipitation durchzuführen, um die Interaktion von SOUL3 bestätigen zu können. Auch wäre es möglich heterolog exprimiertes SOUL3 an Agarosekügelchen zu koppeln und damit einen *pull down assay* durchzuführen. Damit könnte die geringe Abundanz von potentiellen Interaktionspartnern umgangen werden, da sehr viel mehr an Gesamtzellextrakt eingesetzt werden kann. Darüber hinaus könnte auch der Einfluss von Tetrapyrrolen, wie Hämin oder Bilinen auf die Interaktion untersucht werden.

#### 4.4 SOUL3 ist spezifisch im Augenfleck lokalisiert

Da der Augenfleck aber aus verschiedenen Strukturen, den Lipid-Globuli, den Thylakoidmembranen und der äußeren Plasmamembran besteht, war es unumgänglich, die genaue Lokalisierung von SOUL3 zu untersuchen. Dies ist unter dem Gesichtspunkt wichtig, dass der Augenfleck nicht nur aus Strukturen des Plastiden (Lipid-Globuli, Thylakoidmembranen und äußere Chloroplastenmembran) besteht, sondern auch noch zytoplasmatische Anteile (D4-Mikrotubuli) und Bereiche der Zellmembran (Photorezeptorfeld) zum funktionellen Augenfleck gehören. Zur Lokalisierung von SOUL3 in *C. reinhardtii* wurde die Immunofluoreszenz als Methode der Wahl eingesetzt. Für SOUL3 war ein guter polyklonaler Antikörper verfügbar (Schulze Diplomarbeit, 2008; Schulze et al., 2013) und in *C. reinhardtii* ist die Immunofluoreszenz als Methode zur Markierung Augenfleckproteinen bereits etabliert (Mittelmeier et al., 2008). Mittels Immunofluoreszenz konnte gezeigt werden, dass SOUL3 spezifisch im Augenfleck und nicht in signifikanten Mengen in einem anderen Teil des Chloroplasten angereichert ist (s. Abbildung 19). Dies konnte auch immunologisch an aufgereinigten Proteinfraktionen aus Flagellen, Stroma, Chloroplastenmembranen, Augenfleck und Proteinrohextrakt gezeigt werden, die im Labor von Prof. Dr. Georg Kreimer durchgeführt

worden waren (Schulze et al., 2013). Zur Markierung von SOUL3 wurde der in dieser Arbeit angewandte anti-SOUL3-Antikörper verwendet. SOUL3 zeigte, zusammen mit ChR1, das als Kontrolle für die Augenfleckfraktion verwendet wurde nur in der Augenfleckfraktion ein Signal. Überdies wurden Lokalisationsstudien an *C. reinhardtii*-Mutanten (*eye3-2*) durchgeführt, die einen Defekt bei der Bildung der Lipid-Globuli-Schichten besitzen. Die *eye3-2* Mutante kann somit keinen sichtbaren Augenfleck ausbilden (Pazour et al., 1995; Lamb et al., 1999). Im *C. reinhardtii* Stamm 137c zeigten ChR1 und SOUL3 ein Signal im äquatorialen Bereich der Zelle. Dies war für ChR1 auch in der *eye3-2* Mutante der Fall, jedoch nicht für SOUL3. In der *eye3-2* Mutante war das SOUL3-Signal punktuell über den Chloroplast verteilt (s. Abbildung 23). Diese punktuellen Signale von SOUL3, die in der *eye3-2* Mutante zu sehen sind, könnten Plastoglobuli darstellen, die nicht zu Lipid-Globuli des Augenflecks gereift sind und somit in dieser Mutante keinen intakten Augenfleck bilden. Dieses Ergebnis stärkt die Vermutung, dass SOUL3 zunächst an den Lipid-Globuli Schichten innerhalb des Chloroplasts assoziiert ist. Auch zeigt dies, dass SOUL3 im Chloroplast lokalisiert ist. Allerdings ist die Art des Imports in den Chloroplast für SOUL3 noch nicht vollends geklärt, da SOUL3 nicht die typische plastidäre Signalsequenz besitzt (s. 4.5). Der in dieser Arbeit verwendeten Mutante *eye3-2* fehlt das Protein EYE3, eine Ser/Thr-Kinase der ABC-Familie, die an der Biogenese der Lipid-Globuli und ihrer regelmäßigen Anordnung beteiligt ist (Lamb et al., 1999; Boyd et al., 2011c). Interessanterweise wurde auch ein EYE3-homologes Protein (At3g24190) sowie ein SOUL-Protein (At3g10130), zusammen mit anderen auch im Augenfleckproteom gefundenen Proteinen, im Proteom der thylakoidassoziierten Plastoglobuli gefunden (Ytterberg et al., 2006; Lundquist et al., 2012). Seit längerem wird auch die Hypothese, dass die Lipid-Globuli des Augenflecks wahrscheinlich aus diesen Plastoglobuli heranreifen, diskutiert (Kreimer, 2009; Boyd et al., 2011c). Dass die SOUL3-Markierung in der Mutante *eye3-2* als punktuelles Signal wahrscheinlich in den thylakoidassoziierten Plastoglobuli zu erkennen war, trägt maßgeblich zur Bestätigung dieser Theorie bei.

#### **4.5 SOUL3 ist als peripher assoziiertes Membranprotein an den Lipid-Globuli des Augenflecks lokalisiert**

Bei SOUL3 in *C. reinhardtii* konnte im Gegensatz zu den SOUL-Proteinen aus *Arabidopsis* keine Lokalisierung mit dem webbasierten Programm TargetP (Emanuelsson et al., 2000) vorhergesagt werden. Mit dem Programm BioEdit v7.1.9, unter Verwendung des ClustalW-Algorithmus, wurden Sequenzvergleiche mit homologen Proteinen der SOUL/HBP-Familie durchgeführt. Für SOUL3 wurde zuvor eine plastidäre Lokalisation vermutet, da es eine ähnlich lange N-terminale Erweiterung in der Aminosäuresequenz aufweist, wie das in Plastiden

lokalisierte *Arabidopsis* SOUL Protein At3g10130 (Lee et al., 2012; Schulze et al., 2013). Die Aminosäuresequenz von SOUL3 wurde auch mit den webbasierten Programmen TMHMM (Krogh et al., 2001), Tmpred (Hofmann and Stoffel, 1993) sowie TopPred (von Heijne, 1992) analysiert, wobei berechnet werden konnte, dass es keine Transmembrandomänen besitzt und wahrscheinlich als lösliches Protein vorliegt (Schmidt et al., 2006). SOUL3 ist im Chloroplast und genauer im Augenfleck, der Teil des Chloroplasts ist, lokalisiert, besitzt aber keine typische N-terminale Transitsequenz. Das webbasierte Programm TargetP (Emanuelsson et al., 2000) zeigte, dass SOUL3 in den Mitochondrien lokalisiert ist. Doch für die Programme, die zur Lokalisierung von Proteinen verwendet werden, ist bekannt, dass sie bei Proteinen von *C. reinhardtii* nicht genau zwischen plastidärem, mitochondrialem und Kernlokalisierungssignal unterscheiden können. Bei *C. reinhardtii* besitzen plastidäre Transitsequenzen Eigenschaften von beiden, sowohl mitochondrialen als auch plastidären Signalsequenzen (Franzén et al., 1990; Lohr et al., 2005). Es konnte aber durch Anreicherung von peripher assoziierten Membranproteinen und Transmembranproteinen gezeigt werden, dass SOUL3 eine solche Lokalisierungssequenz besitzt und abgespalten wird (s. Abbildung 18). SOUL3 liegt als lösliches Protein im Proteinrohextrakt vor, aber auch als peripher assoziiertes Membranprotein. Das SOUL3-Signal zeigte jedoch zwischen dem Proteinrohextrakt und der peripher assoziierten Membranprotein-Fraktion eine Differenz von 2 kDa. Durch die Aufreinigungsmethode mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Puffer werden die Membranen geglättet und stoßen ihre assoziierten, nicht kovalent gebundenen oder als Transmembranproteine vorkommenden Proteine ab (Fujiki et al., 1982). Die Ursache der Massendifferenz könnte darin liegen, dass im Rohextrakt hauptsächlich das Volllänge SOUL3 mit 47 kDa zugegen ist. Nach Einschleusung in den Plastiden und Abspaltung der Signalsequenz könnte SOUL3 dann nur noch als 45 kDa-Protein vorliegen. Dies lässt den Schluss zu, dass SOUL3 in *C. reinhardtii* zwar eine Signalsequenz für den Chloroplasten besitzt, diese aber von den gängigen Algorithmen wie TargetP nicht erkannt wird. Zur Kontrolle wurden die Proteinfractionen immunologisch auf CYTf, ein typisches transmembranales Protein, getestet. CYTf zeigt nur ein Signal in der Transmembranprotein-Fraktion und im Gesamtproteinextrakt. Dies bestätigte auch die Reinheit der angereicherten Proteinfractionen. Ähnlich den Plastoglobuli in höheren Pflanzen besitzen auch die Lipid-Globuli von *C. reinhardtii* auf ihrer Oberfläche spezialisierte Proteine und Lipide (zusammengefasst in Kreimer, 2009). Es konnten bereits mehrere Komponenten mit Beteiligung an Biogenese und Assemblierung der Lipid-Globuli Schichten identifiziert werden (Boyd et al., 2011c). Bereits bei Plastoglobuli in höheren Pflanzen wurde gezeigt, dass die Zusammensetzung der Proteine und Lipide auf ihrer Oberfläche entscheidend ist, um zu größeren Aggregaten zu koagulieren (Rey et al., 2000; Simkin et al., 2007). Eine Absenkung des SOUL3-Proteinniveaus,

fürte zu einer Verringerung der Augenfleckgröße, was in einem späteren Kapitel noch diskutiert wird. SOUL3 könnte daher direkt oder indirekt an Mechanismen, welche die Biogenese und Assemblierung der Lipid-Globuli Schichten betreffen, beteiligt sein. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit eine suborganelläre Lokalisationsstudie zu SOUL3 durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass SOUL3 in dem Teil des Augenflecks lokalisiert ist, der die Lipid-Globuli Schichten enthält und nicht im Plasmamembrananteil, in dem die ChRs zu finden sind. Dies macht deutlich, dass SOUL3 in der vom Chloroplasten gebildeten Region des Augenflecks lokalisiert ist. Eine Immuno-Gold-Markierung und eine Analyse mittels Elektronenmikroskopie von SOUL3 könnte Aufschluss darüber geben, ob SOUL3 tatsächlich an den Rändern der Lipid-Globuli des Augenflecks lokalisiert ist.

#### **4.6 Versuche zur funktionellen Charakterisierung des SOUL3 Proteins in *C. reinhardtii***

Für die funktionelle Charakterisierung von SOUL3 wurde ein *reverse genetics*-Ansatz gewählt. Dabei sollte die Konzentration von SOUL3 so weit gesenkt werden, bis sich phänotypische Eigenschaften erkennen lassen, die dann eine Schlussfolgerung auf eine funktionelle Bedeutung des SOUL3-Proteins für *C. reinhardtii* erlauben. Für *C. reinhardtii* existieren mehrere Möglichkeiten die Expression eines Proteins in der Zelle zu beeinflussen. Als erstes sei hier die insertionelle Mutagenese genannt (Pootakham et al., 2010). Sie bietet die Möglichkeit eines *knock outs*, also des vollständigen Stopps der Expression eines Proteins. Im Idealfall können so *loss of function*-Mutanten erzeugt werden, die sich auf ihre phänotypischen Eigenschaften untersuchen lassen. Allerdings werden bei dieser Methode viele Insertionsmutanten erzeugt, die aufwendig darauf getestet werden müssen, in welchem Gen die Insertion, z. Bsp. eines Markers, erfolgte. Es sind aber bereits Methoden entwickelt worden, um diese Menge an Mutanten zeitnah zu testen (Pootakham et al., 2010). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass es zu letalen *knock outs* kommen kann. In vorangegangenen Versuchen SOUL3 funktionell zu charakterisieren wurde eine Insertionsbibliothek nach einer *soul3* Insertionsmutante durchsucht, die durch die ungerichtete Transformation des Kerngenoms mit dem Antibiotika Selektionsgen *aphVIII* geschaffen wurde und mittels PCR mit Selektionsgen- und Zielgen-spezifischen Oligonukleotiden durchsucht wurde (Pootakham et al., 2010). Bei diesen Versuchen wurde genau eine *soul3*-Insertionsmutante gefunden, die jedoch kein signifikant reduziertes SOUL3-Proteinniveau aufwies. Die Insertion des Selektionsmarkers war zwar vorhanden und der isolierte *C. reinhardtii*-Stamm, der diese Insertion trug, wies auch eine Resistenz gegen Paromomycin auf, allerdings zeigte sich keine Auswirkung auf die SOUL3-Protein-Expression. Da die Insertion im letzten Intron der *soul3* gDNS gefunden wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Insertion von *aphVIII* kaum Einfluss auf die Expression von

SOUL3 hat. Die Insertion wird bei der posttranslationalen Prozessierung (Spleißen) mit dem Intron aus der *soul3* mRNA herausgeschnitten und somit liegt wieder eine vollständige *soul3* mRNA vor, die für ein korrektes SOUL3 Protein kodiert. Da dieser Versuch der Erzeugung einer Insertionsmutante nicht erfolgreich war, wurde mittels *gene silencing* versucht, die *soul3* Expression zu beeinflussen. Ein Vorteil dieser Methode ist es, die Expression eines bestimmten Gens nur teilweise herunter zu regulieren (Ossowski et al., 2008). Hierfür wurde die amiRNS-Technik ausgewählt, welche bereits erfolgreich für *C. reinhardtii* eingesetzt werden konnte (Molnar et al., 2009; Schmollinger et al., 2010). Dabei wird über einen geeigneten Vektor eine RNS in *C. reinhardtii* exprimiert, die über 21-24 bp lange komplementäre Nukleotide dsRNS (mikro RNS) bilden kann. Diese dsRNS wird dann über endogene Mechanismen von RNS-bindenden und RNS-modifizierenden Enzymen Dicer und Argonaut prozessiert. Die Sequenz der mikro-RNS wurde so gewählt, dass diese komplementär zu Bereichen auf der Ziel-mRNA sind. Nach Prozessierung durch die Dicer und Argonaut kann die mikro-RNS die Translation der Ziel-mRNA stoppen oder einen gerichteten mRNA-Abbau einleiten. Bei dieser Methode entsteht nur eine einzige sehr kurze mikro RNS Spezies, die nur ein spezifisches Ziel hat. Dagegen trat bei den siRNS (*small interfering RNA*) stets das Problem auf, dass aus den langen dsRNS Vorläufern immer mehrere verschiedene siRNS-Spezies entstanden, die auch unspezifisch wirken konnten. Da die siRNS-Vorläufer sehr lange Transgene sind, unterliegen diese zusätzlich noch dem transkriptionellen *silencing* und ihre eigene Expression wird in *C. reinhardtii* sehr schnell selbst unterdrückt (Fuhrmann et al., 2001; Rohr et al., 2004; Schroda, 2006). In dieser Arbeit wurden *knock down* Zelllinien mittels artifizieller miRNS erzeugt, da diese Technik kaum *off target* RNS Moleküle und somit andere Proteine angreift. Ein weiterer Vorteil der miRNS Strategie ist, dass diese sich endogener Mechanismen bedient, die in Algen, höheren Pflanzen und Tieren bereits vorhanden sind (Molnar et al., 2009). In vorrangegangenen Arbeiten wurden bereits mit siRNS-SOUL3 *knock down*-Linien erzeugt. Diese waren jedoch nicht lang genug stabil geblieben, um ihren Phänotyp genauer analysieren zu können und revertierten schnell wieder auf Wildtypniveau (Schulze and Mittag, unveröffentlichtes Material). Daher sollte in dieser Arbeit mit der amiRNS-Technik ein neuer Versuch unternommen werden, Zelllinien zu erzeugen, die dauerhaft ein geringes SOUL3-Proteinniveau aufweisen.

#### **4.6.1 Die ami<sub>SOUL3</sub> Zelllinien weisen ein reduziertes SOUL3 Proteinniveau auf**

Für die Erzeugung der ami<sub>SOUL3</sub>-Zelllinien wurde der Vektor pTS29 (s. Abbildung 26) verwendet. Dieser exprimiert eine miRNS, die nach Prozessierung durch Dicer und Argonaut den gerichteten Abbau der *soul3*-mRNA einleiten sollte. Der Einsatz von *soul3* miRNS führte zu

einer signifikanten Reduktion (*knock down*) der SOUL3-Proteinexpression in fünf von 156 getesteten  $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$  Zelllinien (s. Abbildung 27). Die Expressionsniveaus dieser Zelllinien zeigten zudem keine hohe Kongruenz untereinander. Dies könnte auf positionelle Effekte bei der zufälligen Integration des Vektors pTS29 in das Genom von *C. reinhardtii* zurückzuführen sein. Die eingeführten Transgene könnten an ektopischen Stellen des Genoms inserieren und deren Promotoren dort für Transkriptionsfaktoren schwerer oder gar nicht zugänglich sein. Ein Grund hierfür können repressive Chromatinstrukturen am Ort der Integration in das Genom sein (Cryderman et al., 1999). Zudem äußerte sich bei der  $\text{ami}_{\text{SOUL3-68}}$  Zelllinie eine Revertierung zu Wildtyp-SOUL3-Expressionsniveau. Dies könnte durch den Einfluss von anderen Proteinfaktoren ausgelöst worden sein, die z. Bsp. spezifisch Histone modifizieren und so zur Chromatinkondensation führen (Casas-Mollano et al., 2008; Strenkert et al., 2013). Um Effekte dieses epigenetischen *silencing* von Transgenen in Zukunft zu vermindern und um eine höhere Transformationseffizienz zu erreichen, könnten Mutanten verwendet werden, bei denen Komponenten des epigenetischen *silencing* ausgeschaltet sind. Auch konnte keine Zelllinie mit einem SOUL3-Expressionsniveau von unter 30% erzeugt werden. Für HSF1 wurde die amiRNS Technik bereits eingesetzt und es konnten sehr stark herunterregulierte Zelllinien erzeugt werden (Schmollinger et al., 2010). Ferner war die siRNS-Methode bei CK1 sehr erfolgreich und die Zelllinien sind bereits über Jahre stabil (Schmidt et al., 2006). Das Expressionsniveau von CK1 konnte dabei im Vergleich zum Wildtyp sogar unter 25% gesenkt werden. Dass sich das Expressionsniveau von SOUL3 nicht unter 30% senken lässt bzw. mit anderen Techniken transformante Zelllinien sehr schnell revertieren, könnte ein Hinweis darauf sein, dass die biologische Funktion von SOUL3 essentiell für *C. reinhardtii* ist. Die Senkung der Expression von SOUL3 unter ein bestimmtes Niveau könnte die Überlebensfähigkeit der *C. reinhardtii* Zellen beeinflussen. Wie in einem vorangegangenen Kapitel bereits diskutiert wurde, ist an einem kürzlich entdeckten retrograden Netzwerk der Einfluss von Biliverdin und/oder Phytochromobilin auf die Expression von photosyntheseassoziierten nukleären Genen beschrieben worden (Duanmu et al., 2013). Die Regulation dieser Gene übt großen Einfluss auf die Bewältigung von oxidativen Stress bei der Dunkel-zu-Licht Transition aus (Duanmu et al., 2013). Auch ist bekannt, dass Biliverdin/Phytochromobilin von Hämoxxygenasen durch den oxidativen Abbau von Häm entstehen (Maines, 1988). Ein in *A. thaliana* aufgestelltes Modell postuliert, dass SOUL/HBP's als Häm-Transporter-Proteine zu den Hämoxxygenasen oder auch als eine Art Pufferspeicher für Häm fungieren (Lee et al., 2012). Eine Beteiligung von SOUL3 in *C. reinhardtii* an diesen Prozessen könnte eine Erklärung für die geringe Ausbeute an Transformanten mit signifikant geringem SOUL3-Proteinniveau sein. Wenn SOUL3 als eine Art Häm-Pufferspeicher dient, könnte eine Absenkung des SOUL3 Proteinniveaus zu verstärktem

oxidativen Stress in der Zelle bei der Dunkel zu Licht Transition führen, da den Hämoxygenasen weniger Häm zur Verfügung steht um genügend Biliverdin/Phytochromobilin zu synthetisieren. Dieser Einfluss von Biliverdin/Phytochromobilin konnte bereits in einem *feeding*-Experiment nachgewiesen werden. *C. reinhardtii*-Zellen, die keine funktionelle Hämoxygenase (HMOX1) exprimieren, wiesen eine geringere Überlebensrate sowie eine geringere Chlorophyllmenge unter photoautotrophen Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp auf. Der potentielle Einfluss von SOUL3 auf dieses Signalnetzwerk sollte in Zukunft genauer untersucht werden. Dabei könnte die Analyse des Biliverdin- bzw. Phytochromobilingehalts in den ami<sub>SOUL3</sub>-Zelllinien einen ersten Anhaltspunkt geben.

#### **4.6.2 Eine Reduzierung des SOUL3 Proteinniveaus wirkt sich auf die korrekte Positionierung des Augenflecks aus**

Die erhaltenen ami<sub>SOUL3</sub>-Zelllinien wurden von Sandra Schreiber im Lichtmikroskop auf Besonderheiten in der Zellmorphologie überprüft und von mir mittels Immunolokalisation untersucht. Dabei fiel bei der Mehrheit der Zellen auf, dass diese hinsichtlich der Positionierung des Augenflecks verändert waren. Die Zelllinien, deren SOUL3 unter 45% gesenkt werden konnten, zeigten eine signifikante Delokalisierung des Augenflecks in der Mehrheit der Zellen (s. Tabelle 4). Die Delokalisierung korrelierte hierbei auch mit dem Niveau der Reduktion von SOUL3. Eine hohe Reduktion des SOUL3-Proteinniveaus, wie bei ami<sub>SOUL3</sub>-151, spiegelte sich auch in einem hohen Grad an Delokalisierung des Augenflecks wieder. Ein Muster bzw. eine Korrelation gegenüber der Richtung der Augenfleckverschiebung mit dem Grad der SOUL3-Reduktion konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Der Augenfleck, der sich nach jeder Zellteilung neu bildet, wird normalerweise durch das D4-Mikrotubuli in etwa äquatorialer Position in der Zelle lokalisiert (Boyd et al., 2011a; Mittelmeier et al., 2011). Dieser Mechanismus der Augenfleckpositionierung durch das D4-Mikrotubuli scheint in den ami<sub>SOUL3</sub> Zelllinien gestört zu sein. Es sind bereits Mutanten bekannt, bei denen die Positionierung durch das D4-Mikrotubuli gestört ist. *Pey1* (*posterior eyespot 1*) besitzt unterschiedlich lange Mikrotubuli, die mit der Position des Augenflecks korrelieren. *Cmul* (*cytoplasmic microtubules unorganized*) weist überzählige Mikrotubuli mit größerer Länge auf und *mlt1* (*multiple eyespot 1*) mit mehreren Augenflecken wies kürzere Mikrotubulifasern als der Wildtyp auf (Lamb et al., 1999; Boyd et al., 2011a). Bei *pey1* und *cmul* konnte nachgewiesen werden, dass die Position mit der Länge des acetylierten Anteils des D4-Mikrotubulis in Zusammenhang stand (Boyd et al., 2011a). Diese Korrelation ist mit der Funktion des D4-Mikrotubulis vereinbar, für die anteriore-posteriore Positionierung des Augenflecks verantwortlich zu sein (Boyd et al., 2011a). Demnach könnte auch die Länge des acetylierten Anteils des D4-Mikrotubuli in den ami<sub>SOUL3</sub>-

Zelllinien betroffen sein. Daher wurden weitere Untersuchungen mittels Immunofluoreszenz an den  $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$ -Zelllinien  $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$  und  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$  von mir durchgeführt. Ein Antikörper gegen den Photorezeptor ChR1 wurde bereits in vorhergehenden Untersuchungen als Marker für den Augenfleck in Zelllinien verwendet, die einen Defekt in der Augenfleckpositionierung aufwiesen (Mittelmeier et al., 2008; Boyd et al., 2011a; Mittelmeier et al., 2011). In diesen Arbeiten war der Augenfleck, der sichtbare Lipid-Globuli-Anteil mit dem darüber liegenden Photorezeptorfeld, als gesamte Einheit verschoben. Zusätzlich wurde auch ein Antikörper gegen acetyliertes Tubulin verwendet, um den Anteil der Acetylierung des D4-Mikrotubuli zu markieren (Boyd et al., 2011a). Eine Doppelmarkierung von ChR1 und acetyliertem Tubulin in den Zelllinien  $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$  und  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$  verdeutlichte, dass das ChR1 Signal mit der Verschiebung des sichtbaren Teils der Augenflecke korrelierte. Auch reichte die Acetylierung des D4-Mikrotubuli nur bis zur Position des Augenflecks und nicht darüber hinaus. Dies bedeutet, dass der Augenfleck als gesamte Einheit und nicht nur Teile von ihm falsch positioniert werden. Das D4-Mikrotubuli ist noch mit dem Augenfleck verbunden. Die Acetylierung trägt zur Stabilisierung der Mikrotubuli bei, wie das bereits in Versuchen mit Mikrotubuli depolymerisierenden Agenzien nachgewiesen wurde (LeDizet and Piperno, 1986). Es wird davon ausgegangen, dass der Acetylierungsstatus des D4-Mikrotubuli deren Länge und somit auch die Position des Augenflecks beeinflusst. Dass SOUL3 auf diesen Mechanismus der Positionierung des Augenflecks einen Einfluss hat, konnte mit den  $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$ -Zelllinien demonstriert werden. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass als potentieller Interaktionspartner das Alpha Tubulin 2, ein Bestandteil der Mikrotubuli, identifiziert werden konnte. Dabei könnten verschiedene Mechanismen für die abnormale Positionierung des Augenflecks in Frage kommen (Boyd et al., 2011a). (1) Die Zeit, die benötigt wird, bis der Augenfleck eine ausreichend stabile Struktur annehmen kann, ist verlängert, während das D4-Mikrotubuli dem posterioren Pol entgegenstrebt. Dazu könnten ein verzögerter Transport von Augenfleckkomponenten oder Faktoren, die für den Augenfleckzusammenbau verantwortlich sind, beitragen. Damit würden die Augenfleckkomponenten sich eher posterior anordnen, wie es bei *peyl* beobachtet wurde (Boyd et al., 2011a). (2) Die Acetylierung und dadurch die Stabilisierung des D4-Mikrotubulis ist gestört, sodass der Augenfleck näher am posterioren Pol der Zelle positioniert wird (Boyd et al., 2011a). Für die erste Möglichkeit würde man nur posterior verschobene Augenflecke erwarten. Der Einfluss auf die Positionierung des Augenflecks durch die Acetylierung des D4-Mikrotubuli und damit auf dessen Stabilität, könnte auch zu einem anterior verschobenen Augenfleck führen. Eine Störung der Acetylierung des D4-Mikrotubuli könnte eine ständige Depolymerisierung zur Folge haben. Somit könnte das D4-Mikrotubuli nicht dem posterioren Pol entgegenstreben. Allerdings erklärt dies nicht die

Beobachtung warum bei den  $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$ -Zelllinien sowohl eine anteriore wie auch posteriore Delokalisierung, relativ unabhängig vom Grad der SOUL3-Reduktion, beobachtet werden konnte. In weiteren Studien wurde mittels Immunofluoreszenz bereits gezeigt, dass das D4-Mikrotubuli nicht auf der ganzen Länge acetyliert ist und daher das Ausmaß der Acetylierung von weiteren Faktoren abhängig sein muss (Mittelmeier et al., 2011). Deshalb sollte in den  $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$  Zelllinien mittels Immunfluoreszenztest noch das Verhältnis acetyliertes Tubulin gegenüber nichtacetyliertem Tubulin bestimmt werden. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob SOUL3 die Acetylierung beeinflusst oder ob die Länge des D4-Mikrotubuli generell beeinflusst wird. Vor allem der Einfluss eines Häm-bindenden Proteins, wie in dieser Arbeit für SOUL3 erörtert, ist hierbei nicht eindeutig feststellbar. Für SOUL3, wie für andere Proteine der SOUL/HBP-Familie, wird vermutet, dass es sich um Häm-Transport- oder Speicherproteine handelt (Merchant et al., 2007). Weiterhin ist auch bekannt, dass Tetrapyrrole, wie Häm, Biliverdin-IX $\alpha$  und Phytochromobilin, am retrograden Signalweg des Chloroplasten beteiligt sind und als *second messenger* die Expression von Kerngenen steuern können (Voss et al., 2011; Duanmu et al., 2013). SOUL3 könnte als „Hämspeicher“ fungieren, der die Positionierung indirekt zeitlich koordiniert. Allerdings wurden bisher keine Augenfleckkomponenten gefunden, die eine veränderte Expression in Reaktion auf *feeding* mit Tetrapyrrolen aufwiesen (Voss et al., 2011). In diesem Versuch wurde ein *microarray*-Ansatz verwendet, der 87% des *Chlamydomonas* Transkriptom abdeckte. Komponenten, die für die Biogenese des Augenflecks verantwortlich sind, und auch Proteine, welche die Acetylierung beeinflussen, sollten in einem ähnlichen Ansatz auf ihre Regulierung durch Tetrapyrrole hin analysiert werden. Dies könnte zur Klärung beitragen, welche spezielle Rolle ein Häm-bindendes Protein bei der Positionierung des Augenflecks innehat. Auch könnte der Einfluss von SOUL3 auf das Biliverdin-IX $\alpha$  und Phytochromobilin kontrollierte Netzwerk in Zukunft genauer betrachtet werden. Ein erster möglicher Ansatz wäre hier die  $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$ -Zelllinien auf den Biliverdin-IX $\alpha$  und Phytochromobilin sowie Chlorophyllgehalt im Vergleich zum Wildtyp zu testen. Bei Beteiligung dieses Netzwerkes an der Positionierung des Augenflecks könnte die exogene Gabe von Häm, Biliverdin-IX $\alpha$  oder Phytochromobilin die Delokalisierung in den  $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$ -Zelllinien wieder komplementieren.

#### **4.6.3 Auch die Größe der Augenfleckfläche ist in den $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$ -Zelllinien verändert**

Zusätzlich zur abnormalen Positionierung des Augenflecks fiel in drei von fünf der  $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$ -Zelllinien ( $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$ -56,  $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$ -68 und  $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$ -151) auf, dass diese auch einen kleineren Augenfleck aufwiesen als im Vergleich zum Wildtyp. Dies wurde durch Messung der

Augenfleckfläche näher analysiert. Die stärkste Verringerung der Augenfleckfläche zeigte der Stamm *ami<sub>SOUL3</sub>-68*. Dieser revertierte jedoch kurze Zeit später wieder zum Wildtyp *SOUL3*-Expressionsniveau. Auch bewegte sich dieser Stamm nicht und hatte zudem ein Problem beim *hatching* nach der Zellteilung. Flagellen waren zu erkennen, jedoch umgaben nach der Zellteilung zwei oder mehr Zellen noch die alte Zellhülle. Diese Zellen akkumulierten in Zellkultur zu größeren Konglomeraten. In *C. reinhardtii* wird die in den Zellkern mittels Transformation eingebrachte DNA über nicht-homologe Rekombination in eine beliebige Stelle im Genom integriert (Gumpel et al., 1994). Findet diese Integration in ein kodierendes Gen statt, so wird der offene Leserahmen des betreffenden Gens zerstört, was zu einem Ausfall der Expression des entsprechenden Proteins führt. Diese zufällige Integration in ein kodierendes Gen könnte zu den beobachteten Effekten geführt haben. Außerdem ist es möglich, dass dies zu der sehr starken Abweichung der Augenfleckfläche des *ami<sub>SOUL3</sub>-68* von der des Wildtypstammes führte. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich neben der *SOUL3*-Reduktion auch noch weitere nicht beeinflussbare Effekte im Stamm *ami<sub>SOUL3</sub>-68* auf die Morphologie des Augenflecks ausgewirkt haben. Dieser Stamm wurde auch aufgrund seiner Revertierung zum Wildtyp-*SOUL3*-Expressionsniveau nicht für einen Test der Photomotilität herangezogen. Die anderen beiden *ami<sub>SOUL3</sub>* Zelllinien, *ami<sub>SOUL3</sub>-56* und *ami<sub>SOUL3</sub>-151*, zeigten eine ähnliche Augenfleckfläche, die auch mit dem Grad der Reduktion des *SOUL3*-Niveaus korrelierte. Die Reduktion des *SOUL3*-Expressionsniveau scheint die Biogenese bzw. die Assemblierung der Lipid-Globuli-Schichten zu beeinflussen. Ob dies indirekt oder direkt geschieht, konnte in dieser Arbeit nicht untersucht werden. Nach vorherrschender Theorie reifen aus den thylakoidassoziierten Plastoglobuli, unter Beteiligung von anderen bereits identifizierten Faktoren (*EYE2*, *EYE3*, Fibriline), die funktionellen Globulischichten des Augenflecks (Kreimer, 2009; Boyd et al., 2011c). Dass kürzlich im Plastoglobuliproteom ein *SOUL*-Homolog und *EYE3*-Homolog in *Arabidopsis* gefunden wurden (Lundquist et al., 2012), untermauert diese These. Zusätzlich ergibt dies, zusammen mit den hier gesammelten Daten, dass *SOUL3* an der Biogenese und Assemblierung der Lipid-Globuli-Schichten beteiligt ist. Die bereits charakterisierte *C. reinhardtii*-Mutante *min1* (*minature eyespot 1*) besitzt kleinere Augenflecke im Vergleich zum Wildtyp, die am Äquator der Zelle lokalisiert ist (Mittelmeier et al., 2008). Allerdings konnte hierbei in *min1* darüber hinaus ein Einfluss auf die *ChR1* Expression nachgewiesen werden (Mittelmeier et al., 2011). Dies sollte bei den *ami<sub>SOUL3</sub>*-Zelllinien noch untersucht werden. In Immunofluoreszenztests ist aber zu erkennen, dass *ChR1* in den *ami<sub>SOUL3</sub>*-Zelllinien im Vergleich zum Wildtyp als kompaktes Signal mit vergleichbarer Stärke zu sehen ist. Daher scheint *SOUL3* nur Einfluss auf den Lipid-Globuli-Anteil des Augenflecks im Chloroplast zu haben, nicht aber auf das Photorezeptorfeld darüber. Dass die Reduktion des

SOUL3-Proteinniveaus die Augenfleckposition sowie die Augenfleckgröße beeinflusst, deutet darauf hin, dass SOUL3 an übergeordneten Regulationsmechanismen beteiligt ist. Die Kontrolle der Biogenese und Lokalisierung des Augenflecks könnten daher ebenfalls von diesem Kontrollmechanismus beeinflusst sein. Wie bereits im vorherigen Kapitel dargelegt, könnte das retrograde Signalnetzwerk mit Beteiligung von Häm und/oder Biliverdin-IX $\alpha$ /Phytochromobilin an dieser Regulation beteiligt sein und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

#### **4.6.4 Die $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$ Zelllinien zeigten ein gestörtes phototaktisches Verhalten**

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist die richtige Positionierung und der Aufbau des Augenflecks essentiell für die korrekte phototaktische Orientierung der Zelle. Daher war bei den  $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$ -Zelllinien mit abnormaler Augenfleckposition auch eine gestörte phototaktische Orientierung von *C. reinhardtii* zu erwarten. Bei diesem Versuch zeigten der Wildtypstamm und die Vektorkontrolle ein normales Verhalten, indem sie sich während des subjektiven Tages auf die Seite der Zellkulturküvette mit der höchsten Lichtintensität bewegten. Diese Stämme zeigten auch keine Auffälligkeiten in Bezug auf Augenfleckposition und -größe und wurden als eine Positivkontrolle mitgeführt. Die beiden  $\text{ami}_{\text{SOUL3}}$ -Zelllinien,  $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$  und  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$ , zeigten ein anderes Verhalten im Vergleich zu Wildtyp und Vektorkontrolle. Während der subjektiven Tagphase wies der Stamm  $\text{ami}_{\text{SOUL3-56}}$  eine aktive Bewegung zum Licht auf und ein Großteil der Zellen verblieb dort auch während der subjektiven Nachtphase (s. Abbildung 30).  $\text{ami}_{\text{SOUL3-151}}$  orientierte sich während der subjektiven Tagphase kaum zum Licht. Allerdings war in der Nacht eine leichte Akkumulation in der dunkleren Hälfte der Zellkulturküvette erkennbar (s. Abbildung 30). Dieses abnorme Bewegungsverhalten könnte verschiedene Ursachen haben. Erstens scheint die anteriore Positionierung dafür verantwortlich zu sein und zweitens kann auch die verringerte Größe des Augenflecks eine Rolle spielen. Drittens wurden diese Versuche unter circadianen Bedingungen durchgeführt und es ist bekannt, dass die Phototaxis von der circadianen Uhr gesteuert wird (Johnson et al., 1991; Mittag et al., 2005). Daher könnte SOUL3 auch an der Regulation der circadianen Uhr beteiligt sein. Das Photorezeptorfeld ist, wie gezeigt, zwar verschoben, aber die Signaltransduktionswege scheinen dennoch intakt zu sein. Ähnliches wurde auch schon bei den Mutanten *eye2* und *eye3* beobachtet, die zwar keinen sichtbaren Augenfleck mehr besitzen, aber dennoch auf hohe Lichtintensitäten reagieren (Lamb et al., 1999; Roberts et al., 2001). Die immer wieder korrekte Positionierung des Augenflecks in der Äquatorialebene der Zelle bringt es mit sich, dass eine durch die ChRs ausgelöste Depolarisierung immer in gleicher Weise über die Zellmembran in Richtung *cis*-Flagellum wandert. Trifft durch Änderung der Lichtverhältnisse das Licht nun

senkrecht auf den Augenfleck, löst dies eine Änderung des Flagellenschlags aus. Das hat zur Folge, dass sich die Zelle mit ihrem Flagellenpol in Richtung Lichtquelle ausrichtet und das Signal am Augenfleck minimal wird. Durch eine abnorme Augenfleckposition kann sich die Zelle nicht korrekt ausrichten. Darüber hinaus kommt hier die geringere Augenfleckfläche zusätzlich zum Tragen. Der kleinere Durchmesser der Lipid-Globuli Schichten verringert auch dessen Effektivität als Reflektor (Kreimer and Melkonian, 1990). Somit summieren sich bei den  $ami_{SOUL3}$  Zelllinien mehrere Effekte, welche die phototaktische Orientierung der Zelle beeinflussen. Beide Stämme,  $ami_{SOUL3-56}$  und  $ami_{SOUL3-151}$ , zeigten auch untereinander ein unterschiedliches Bewegungsmuster während des subjektiven Tages. Diese Unterschiede in der phototaktischen Orientierung korrelierten auch mit der beobachteten Position des Augenflecks. Somit konnte gezeigt werden, dass eine durch die Reduktion des SOUL3-Expressionsniveaus ausgelöste Delokalisierung des Augenflecks die phototaktische Orientierung stark beeinflusst. Bei diesem Versuch waren auch Unterschiede in der circadianen Phototaxis zu erkennen. Weiterhin wurde unter circadianen Bedingungen eine Bildung unterschiedlicher SOUL3-Proteinkomplexe beobachtet. SOUL3 könnte daher, abhängig von der Komplexbildung während der subjektiven Tag- bzw. Nachtphase, eine Rolle im circadianen Signalweg spielen. Bei der Analyse der phototaktischen Bewegung während der subjektiven Tag- und Nachtphase konnte auch beobachtet werden, dass nicht alle Zellen von einem Stamm ein verändertes phototaktisches Verhalten aufwiesen. Dies korreliert auch damit, dass nur ein gewisser Prozentsatz der Zellen einer  $ami_{SOUL3}$ -Zelllinie eine Delokalisierung des Augenflecks, bzw. eine geringere Augenfleckfläche aufweist. Ein vollständiger SOUL3-*knock out* würde die weiterführenden Studien an SOUL3 in Zukunft erheblich vereinfachen. Bereits in Kapitel 4.6.1 wurde erwähnt, dass bei den  $ami_{SOUL3}$ -Zelllinien keine Reduzierung des SOUL3-Proteinniveaus unter 30% erreicht werden konnte. Ein vollständiger SOUL3-*knock out* könnte deshalb nicht erreicht werden, weil eine zu große Reduzierung des SOUL3-Proteinniveaus letal zu sein scheint.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Autoklav Varioklav®	Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, München
Autoklav HMC HV-85L	Dampfsterilisator	Hirayama Manufacturing Corporation, Japan
Brutschrank/Inkubator	KB-53	WTB Binder, Tuttlingen
Elektroblot PerfectBlue™	Semi-Dry-Electroblotter SEDEC M	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophoreseapparatur horizontal (klein)	Hoefler HE 33 (Mini horizontal submarine unit)	Amersham Pharmacia Biotech., Freiburg
Elektrophoreseapparatur horizontal (mittel)	OWL Buffer Puffer™	OWL Scientific Woburn, MA USA/ Angew. Gentech. Systeme GmbH
Elektrophoreseapparatur vertikal (groß)	Maxi-Gel-System (010- 400) 17x18 cm	Biometra, Göttingen
Gefrierbehälter	„Mr. Frosty-Box“ Cryo 1C Freezing Container	Nalgene
Geldokumentationssystem	E-Box-1000/20M	Vilber LOURMAT
Gradientenmischer		Eigenbau
Kühlzentrifuge	Hermle Z323K mit Rotoren 220.72V04 (bis 5000 Upm) und 220.87V01 (bis 16000 Upm)	Hermle, Wehingen
Minischüttler	Vibrofix VF 1 Vortex-Genie®2	Scientific Industries, Inc., USA
PCR-Gerät / Thermocycler	peqSTAR 96 Universal Gradient	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Peristaltik Pumpe	Pump P1	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Photometer	Photometer Helios beta	Thermo Elektron Corporation
Photometer	Specord40	Analytik Jena
Rotationsschüttler	Roto-Shake Genie™	Scientific Industries, Inc., USA
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415R mit Rotor GE 009	Eppendorf, München
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415D mit Rotor IL 024	Eppendorf, München
Ultrazentrifuge	Avanti™ J-30 I mit Rotor JA-25-50, JA-10 und Ausschwenkrotor JS34.38	Beckmann Instruments Inc., Palo Alto, CA USA
Vakuumkonzentrator	Savant Speed vac® Plus SC 110	Savant, Holbrook, NY

### 5.1.2 Chemikalien

Die bei dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren von p.A. Qualität und wurden von Carl Roth (Karlsruhe), Sigma (Steinheim), Merck (Darmstadt) und AppliChem (Darmstadt) bezogen.

### 5.1.3 Kits und Verbrauchsmaterialien

GenJet™ Gel Extraction Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad (München)
Colloidal Blue Staining Kit	Invitrogen life technologies (USA)
Fuji Medical X-Ray Film 100 NiF Super RX (13x18 cm)	Fujifilm
Gel Blotting-Papiere (460 x 570 mm)	Roth (Karlsruhe)
Glasperlen für die Herstellung von Proteinrohextrakt (Ø 0,25–0,3 mm)	Sartorius AG (Göttingen)
Glasperlen für die Transformation von <i>C. reinhardtii</i> (Ø 0,45–0,5 mm)	Braun (Melsungen)
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche (Penzberg)

Phusion High-Fidelity PCR Kit	New England Biolabs (Frankfurt)
ProteinA Sepharose	Sigma Aldrich
Protran® BA 85 Nitrocellulose	Schleicher & Schüll Bioscience GmbH (Dassel)
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
TAGZyme® His-Tag removal Kit	Qiagen (Hilden)
Zelluloseacetat-Membran	Sartorius AG (Göttingen)

### 5.1.4 Enzyme

**Restriktionsenzyme** stammten von den Firmen New England Biolabs GmbH (Frankfurt) und Jena Bioscience (Jena). Hierbei wurden die von den jeweiligen Firmen empfohlenen Puffersysteme verwendet.

**RNase A (0,9 U/μl; Roth, Karlsruhe):** Davon wurden 100 mg in 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 4,8) gelöst. Zur Inaktivierung der DNase-Aktivität wurde die Lösung für 15 Min. aufgekocht und dann auf Eis gestellt.

**Protease Inhibitor** (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche, Mannheim): Eine Tablette wurde in 2 ml Aufschlusspuffer für *C. reinhardtii* (s. 2.1.13.3.) gelöst. Diese Stammlösung war 25x konzentriert.

**T4 DNA-Ligase** (1 U/μl und 5 U/μl; Roche, Mannheim)

**Trypsin** (Sequencing Grade Modified Trypsin; Promega, Madison, USA)

### 5.1.5 Organismen

#### 5.1.5.1 *Escherichia coli*

Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-blue	recA1,endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F'proAB lacI <sub>q</sub> Z ΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]	Bullock et al., 1987
BL21(DE3)RIPL	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> ompT hsdS(rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) dcm <sup>+</sup> Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU proLCamr] [argU ileY leuW Strep/Specc]	Studier and Moffatt, 1986

### 5.1.5.2 *Chlamydomonas reinhardtii*

Stamm	Genotyp	Referenz
SAG73.72	wt, mt <sup>+</sup>	Sammlung von Algenkulturen an der Universität Göttingen
CC-620	nit1 <sup>-</sup> , nit2 <sup>-</sup> , mt <sup>+</sup>	Goodenough et al., 1978 Chlamydomonas Resource Center
CC-621	nit1 <sup>-</sup> , nit2 <sup>-</sup> , mt <sup>-</sup>	Goodenough et al., 1978 Chlamydomonas Resource Center
CC-125 [137c]	nit1 <sup>-</sup> , nit2 <sup>-</sup> , agg1 <sup>+</sup> , mt <sup>+</sup>	Pröschold et al., 2005 Chlamydomonas Resource Center
CC-4316 [F35]	nit1 <sup>-</sup> , nit2 <sup>-</sup> , agg1 <sup>+</sup> , mt <sup>+</sup> , eye3-2::NIT1	Pazour and Witman, 1995; Lamb et al., 1999; Boyd et al., 2011b

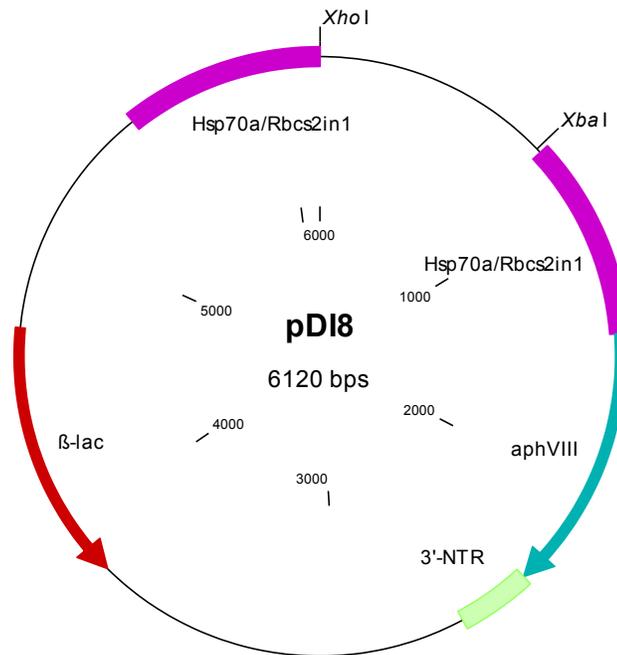
### 5.1.6 Kommerzielle Vektoren

Vektorbezeichnung	Hersteller
pET28a(+)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
pBlueskriptII KS <sup>+</sup>	Stratagene (La Jolla, USA)

### 5.1.7 Rekombinante Plasmide

#### 5.1.7.1 pDI8

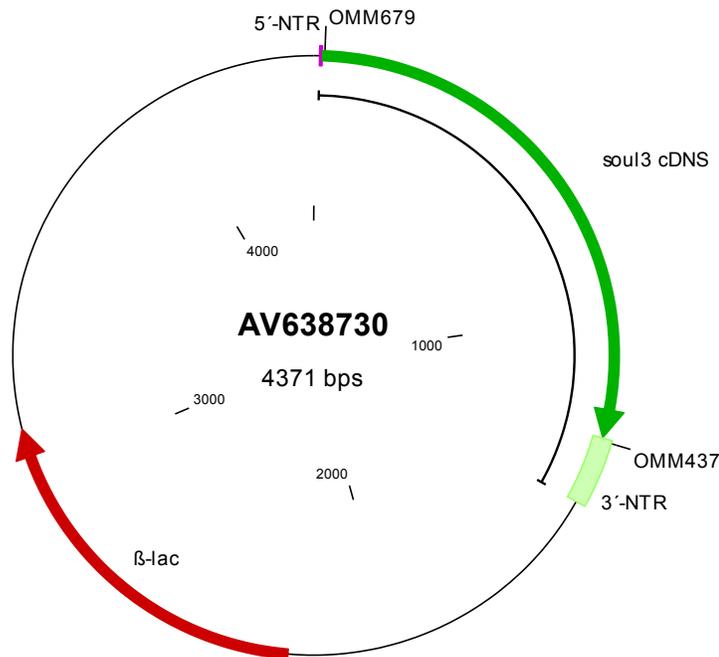
Das Plasmid pDI8 (Schulze et al., 2013) besitzt den Tandempromotor *Hsp70a/Rbcs2in1* für die Überexpression eines gewünschten Gens in *C. reinhardtii*. Ein weiterer *Hsp70a/Rbcs2in1*-Promotor kontrolliert das Paromomycinresistenzgen (Sizova et al., 2001).



**Abbildung 31: Zirkuläre Darstellung des Plasmids pDI8.** Die Abbildung zeigt nur die für die Arbeit relevanten Restriktionsschnittstellen. *Hsp70a/Rbcs2in1*: Tandempromotor; *aphVIII*: Paromomycinresistenzgen; 3'-NTR: nicht translatierte Region des Paromomycinresistenzgens; *beta-lac*: Ampicillinresistenzgen.

### 5.1.7.2 AV638730

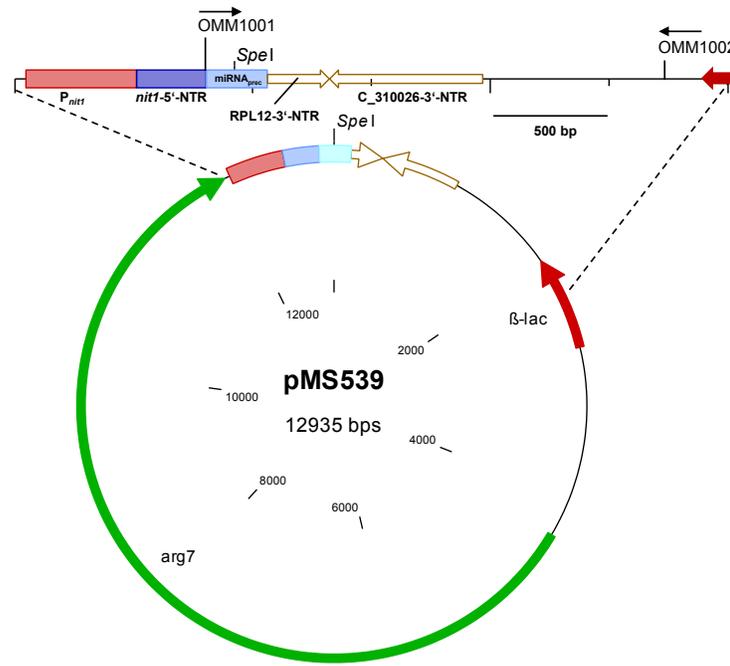
AV638730 ist ein Plasmid aus der EST Klonedatenbank des „Kazusa DNA Research Institute“ in Chiba, Japan. Die Sequenzierung des Plasmids wurde von Dobromir Iliev durchgeführt. Das Plasmid AV638730 enthält mit 1266 bp den kompletten Leserahmen der *soul3*-cDNS sowie 6 bp des 5'-NTR und 160 bp des 3'-NTR von *soul3*.



**Abbildung 32: Zirkuläre Darstellung des Plasmids AV638730.** Die Abbildung zeigt nur die für die Arbeit relevanten Oligonukleotidbindungsstellen. *soul3* cDNS: Leserahmen der *soul3*-cDNS; 5'-NTR: 5'-nichttranslatierte Region; 3'-NTR: 3'-nichttranslatierte Region;  $\beta$ -lac: Ampicillinresistenzgen; schwarze Linie *soul3*-cDNS-EST-Klon (sequenzierter Bereich).

### 5.1.7.3 pMS539

Das Plasmid pMS539 (Schmollinger et al., 2010, persönliche Kommunikation) basiert auf pChlamyRNA2 (Molnar et al., 2009). Als Selektionsmarker enthält es das *ARG7* Gen. 465 nt der *NIT1* Promotorsequenz und zusätzlich 294 nt der *nit1* 5'-NTR an die der Vorläufer natürlicher miRNS cre-MIR1157 anschließt sowie den 3'-NTR RPL12 und die C\_31002 3'-NTR als reverser Terminator. Die *SpeI*-Schnittstelle fungiert als Aufnahme für die mit WMD3 (Web microRNS designer; <http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>) generierten artifiziellen mikroRNS.



**Abbildung 33: Zirkuläre Darstellung des Plasmids pMS539.** Die Abbildung zeigt nur die für die Arbeit relevanten Schnitt- und Oligonukleotidbindungsstellen. *arg7*: Argininosuccinate lyase; *β-lac*: Ampicillinresistenzgen; *P<sub>mit</sub>*: *nit1* Promotor; *nit1-5'-NTR*: *nit1* 5'-nichttranslatierte Region; *miRNA<sub>prec</sub>*: mikro RNS Vorläufer cre-MIR1157; *RPL12-3'-NTR*: 3'-nichttranslatierte Region des ribosomalen Proteins L12; *C\_310026-3'-NTR*: 3'-nichttranslatierte Region von estExt\_fgenes2\_pg.C\_310026.

### 5.1.8 Oligonukleotide

Die nachfolgende Tabelle enthält alle bei dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Unterstreichungen zeigen Modifikationen für eine Restriktionsschnittstelle an, Großbuchstaben kennzeichnen amiRNS-Sequenzen. Wenn nicht anders angezeigt, wurden diese von der Firma biomers.net (Ulm, Deutschland) ohne Modifikationen synthetisiert.

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung
OMM679	atattaggattcatgctgaacgcgaggcttcata	<i>sense-primer</i> zur Amplifizierung der <i>soul3</i> cDNA aus pDE2; <i>Bam</i> HI-Restriktionsschnittstelle eingeführt.
OMM437	gttaatgagctcgctacatctagggcagcttg	<i>antisense-primer</i> zur Amplifizierung der <i>soul3</i> cDNA aus pDE2; <i>Sac</i> I-Restriktionsschnittstelle eingeführt.
OMM900	ctagtAAGGTTTCATACGCAGCAAAGAtctc gctgatcggcaccatgggggtggtggtgatcagcgctaTC TTAGCTGCGTATGAACCTTg	<i>sense</i> -Oligonukleotid zur Generierung der amiRNS für pTS27.
OMM901	ctagcAAGGTTTCATACGCAGCTAAGAtag cgctgatcaccaccacccatgggtgccgatcagcgagaT	<i>antisense</i> -Oligonukleotid zur Generierung der amiRNS für

	CTTTGCTGCGTATGAACCTT <sub>a</sub>	pTS27.
OMM1001	tataatg <u>tcgacgtccgctagaggtgttg</u>	<i>sense-primer</i> zur Amplifizierung des <i>soul3</i> amiRNS Konstruktes; <i>SalI</i> -Restriktionsschnittstelle eingeführt.
OMM1002	ttaattt <u>ctagaccacctgacgtctaagaaacc</u>	<i>antisense-primer</i> zur Amplifizierung des <i>soul3</i> amiRNS; <i>XbaI</i> -Restriktionsschnittstelle eingeführt.

## 5.1.9 Molekulargewichtstandards

### DNS-Standards

#### **1000 Bp DNS-Leiter: NEB (Frankfurt)**

Fragmente: 10000 Bp, 8000 Bp, 6000 Bp, 5000 Bp, 4000 Bp, 3000 Bp, 2000 Bp, 1500 Bp, 1000 Bp, 500 Bp.

#### **100 Bp DNS-Leiter: NEB (Frankfurt)**

Fragmente: 1517 Bp, 1200 Bp, 1000 Bp, 900 Bp, 800 Bp, 700 Bp, 600 Bp, 500/517 Bp, 400 Bp, 300 Bp, 200 Bp, 100 Bp.

### Protein-Standards

#### **Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Leiter: Fermentas (St. Leon-Rot)**

Fragmente: 260 kDa, 140 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa.

#### **SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Broad Range (Bio-Rad, München)**

Proteine: 200 kDa (Myosin), 116,25 kDa ( $\beta$ -Galactosidase), 97,4 kDa (Phosphorylase B), 66,2 kDa (Serumalbumin), 45 kDa (Ovalbumin), 31 kDa (Carbonicanhydrase), 21,5 kDa (Trypsininhibitor), 14,4 kDa (Lysozyme) und 6,5 kDa (Aprotinin).

#### **Gel-Filtrations-Standard (Bio-Rad, München)**

Proteine: 670 kDa (Thyroglobulin), 158 kDa ( $\gamma$ -Globulin), 44 kDa (Ovalbumin), 17 kDa (Myoglobulin), 1,35 kDa (Vitamin B<sub>12</sub>).

## 5.1.10 Antiseren

### 5.1.10.1 Primäre Antiseren gegen die C-terminale SOUL-Domäne

Bei dieser Arbeit wurden Antiseren benutzt, die nach Klonierung, Überexpression und Aufreinigung der C-terminalen Domäne aus der *soul3*-cDNS der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt wurden (Schulze et al., 2013).

### 5.1.10.2 Primäre Antiseren gegen Kanalrhodopsin-1 (engl. *Channelrhodopsin: ChR1*)

Antiseren gegen den Photorezeptor ChR1 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Peter Hegemann (Berlin) zur Verfügung gestellt.

### 5.1.10.3 Kommerzielle Primäre Antiseren

Name	Beschreibung	Hersteller
Anti-acet. Tubulin	Antiserum gegen acetyliertes Tubulin; hergestellt in Maus, Klon 6-11B-1	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Anti-CYTf	Antiserum gegen das Cytochrom f Protein (PetA) des Cytochrom- $b_6f$ -Komplexes, hergestellt in Hase, AS06 119	Agrisera (Vännas, Schweden)
Anti-RbcL	Antiserum gegen die Rubisco große Untereinheit I und II, hergestellt in Hase, AS03 037-10	Agrisera (Vännas, Schweden)

### 5.1.10.4 Sekundäre Antiseren

Name; Beschreibung	Gekopplter Co-Faktor	Hersteller
Anti-Hase/Peroxidase; Monoklonaler Anti-Hase-IgG, Peroxidase-Konjugat	Meerrettich-Peroxidase	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Anti-Hase/Alexa488; Monoklonaler Anti-Hase-IgG gekoppelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor488	AlexaFluor488	Life Technologies (Darmstadt)
Anti-Maus/Alexa555; Monoklonaler Anti-Maus-IgG gekoppelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor555	AlexaFluor555	Life Technologies (Darmstadt)
Anti-Hase/Alexa555; Monoklonaler Anti-Hase-IgG gekoppelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor555	AlexaFluor555	Life Technologies (Darmstadt)

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Molekularbiologische Methoden

Alle Medien wurden mit voll deionisiertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt, das eine Leitfähigkeit von < 0,05 µS/cm hatte. Zur Sterilisation wurden die Medien für 30 Min. bei 121°C und 1 bar autoklaviert und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Die hier beschriebenen Methoden wurden größtenteils aus „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“ (Sambrook et al., 1989) mit Veränderungen entnommen.

#### 5.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*-Zellen zur Klonierung von Genkonstrukten

Zur Klonierung von Genkonstrukten wurden ausschließlich *E. coli*-Zellen des Stammes XL1-blue (s. 5.1.5.1) verwendet. Die Kultivierung erfolgte in LB-Medium bei 37°C auf einem Schüttler (ca. 150-200 Upm) oder auf LB-Agar (1,8%) Platten, die mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/ml Kanamycin versetzt worden waren.

Luria Brooth (LB) - Medium	25 g LB (Carl-Roth, Karlsruhe)
ddH <sub>2</sub> O	auf 1 l auffüllen
Agar-Agar (Carl-Roth, Karlsruhe)	18 g

### 5.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli* im kleinen Maßstab wurde das „High Pure Plasmid Isolation Kit“ von Roche (s. 5.1.3) nach den Protokollen des Herstellers verwendet. Für die Isolierung von Plasmid-DNS im großen Maßstab wurden zur Aufarbeitung der plasmidhaltigen *E. coli*-Zellen eine 100 ml Kultur in zwei 50 ml-Zentrifugengefäße überführt und für 5 Min. bei 4000-12000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Zelleniederschlag in 5 ml 50/10 TE-Puffer pH 8 unter starkem Mischen vollständig in Suspension gebracht. Durch Zugabe von 10 ml Lysepuffer erfolgte die Lyse der Zellen. Danach wurden zum klaren Lysat 5 ml 3 M Kalium-Acetat pH 4,8 gegeben, um alle Proteine und die genomische DNS auszufällen. Nach Zentrifugation für 30 Min. bei 30000 g und 4°C wurde der plasmidhaltige Überstand in ein neues Zentrifugengefäß überführt. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass kein obenauf schwimmendes Protein in das neue Zentrifugengefäß mit überführt wird. Durch Zugabe von 20 ml Isopropanol erfolgte bei -20°C für mindestens 1 h die Fällung der Plasmid-DNS. Danach wurde für 30 Min. bei 30000 g und 4°C abzentrifugiert und der Niederschlag im Vakuumkonzentrierer 10-20 Min. getrocknet. Der getrocknete Niederschlag wurde in 1 ml 50/10 TE-Puffer pH 8,0 wieder in Lösung gebracht, in ein 2 ml-Zentrifugengefäß überführt und RNS-Kontaminationen mit 15 µl RNase A für mindestens 1 h bei 37°C im Wasserbad entfernt. Im Anschluss wurde die DNS extrahiert. Dabei wurde zur Plasmid-Lösung ein Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis: 25:24:1) gegeben, 1 Min. stark geschüttelt und dann 5 Min. bei 15000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, welche die Plasmid-DNS enthielt, wurde in ein neues 2 ml Zentrifugengefäß überführt und der Extraktionsvorgang mit ein Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis: 25:24:1) wiederholt. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml-Zentrifugengefäß überführt und Phenolreste mit ein Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis: 24:1) entfernt und analog zu den ersten beiden Schritten behandelt. Die wässrige Plasmidlösung wurde mit 1/10 Vol. 3 M Natrium-Acetat pH 7 und 2 Vol. Ethanol (96%) nacheinander versetzt, stark geschüttelt und die Plasmid-DNS 10-16 h bei -20°C gefällt. Die Plasmid-DNS wurde dann 30 Min. bei 13000 g und 4°C zentrifugiert, der Niederschlag mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und der Niederschlag im Vakuumkonzentrierer für 10-15 Min. getrocknet. Nach Lösung des getrockneten

Niederschlag in 100-200 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O bzw. 10 mM Tris pH 8,0 erfolgte die photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration (s. 5.2.1.12).

50/10 TE-Puffer	50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA
Lysepuffer zur Isolierung von Plasmid-DNS	0,2 M NaOH; 1% SDS (w/v)
Kaliumacetat-Puffer	3 M Kaliumacetat, pH 4,8

### 5.2.1.3 DNS-Gelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNS-Fragmenten wurden 0,8 bis 1,2% Agarosegele in 1× TAE Puffer mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 5µg/ml) hergestellt. Die DNS wurde mit entsprechendem Volumen an 6× DNS-Probenpuffer versetzt und bei 5 – 8 V/cm Elektrodenabstand getrennt. Es wurde immer ein DNS-Größenstandard mitgeführt (s. 5.1.9). Die Visualisierung der DNS-Fragmente erfolgte über UV-Licht induzierte Fluoreszenz bei 256 nm und die Auftrennung wurde im Gel-Dokumentationssystem (s. 5.1.1) dokumentiert und analysiert.

40× TAE	48,4 g Tris; 11,4 ml konzentrierte Essigsäure; 0,18 g Na-EDTA (oder 40 ml 0,5 M EDTA-Lösung, pH 8,0) in 250 ml ddH <sub>2</sub> O lösen und auf pH 8,1 einstellen
DNS-Probenpuffer	0,03% (w/v) Bromphenolblau, 50% (w/v) Glycerin, auf pH 8, einstellen

### 5.2.1.4 Die Aufreinigung von DNS Fragmenten aus Agarosegelen

Zur präparativen Aufreinigung von DNS-Fragmenten wurden diese im Agarosegel aufgetrennt und mit einer UV-Handlampe ( $\lambda$  ~320 nm) sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Nach Überführung des Gelstückes in ein 2 ml-Reaktionsgefäß wurde die DNS mit dem „GeneJet<sup>®</sup> Gel Extraction Kit“ von Fermentas (s. 5.1.3) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

### 5.2.1.5 Die Polymerase Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction* - PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion wurde im Thermocycler PeqSTAR-Gradient (s. 5.1.1) durchgeführt. Dabei wurden die PCR-Reaktionsansätze nach folgendem Schema hergestellt:

	20 µl Reaktion	Endkonzentration
GC buffer (5x)	4 µl	1x
10 mM dNTP	1 µl	500 µM
Oligonukleotid 1 ( <i>sense</i> ) 10 pmol/µl	1 µl	0,5 pmol/µl
Oligonukleotid 2 ( <i>antisense</i> ) 10 pmol/µl	1 µl	0,5 pmol/µl
DNS	x µl	~100 ng (total)
DMSO (100%)	0,6 µl	0,30%
Phusion <sup>®</sup> -Polymerase (NEB)	0,2 µl	0,02 U/µl
Mit Nuklease freiem Wasser auffüllen bis	20 µl	

Die PCR wurde mit der Phusion<sup>®</sup> Polymerase der Firma NEB (Frankfurt) durchgeführt. Hierbei wurden alle Ansätze auf Eis ohne das Enzym vorbereitet und dann der Thermoblock sowie der Deckel des Thermocyclers auf 98°C vorgeheizt. Währenddessen wurde die Polymerase zugegeben und erst dann in den geheizten Themoblock gesetzt (*hot start*). Die PCR erfolgte dann mit folgendem zyklischen Programm:

Schritt	Temperatur		
1.	98°C	5 Min.	
2.	98°C	30 Sek.	← 25-35 x
3.	55-69°C	30 Sek.	
4.	72°C	15-60 Sek.	
5.	72°C	10 Min.	
6.	8°C	∞	

Nach Herstellerangaben beträgt die Elongationszeit der Phusion Polymerase für 1000 bp 15-30 Sek. Die Elongation (4. Schritt) wurde je nach zu erwartender Produktgröße angepasst. Gestoppt wurde die PCR durch Zugabe von 1 µl einer 0,5 M EDTA-Lösung. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte entweder durch das „QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification“ Kit (s. 5.1.3) nach dem Protokoll des Herstellers oder über Auftrennung im Agarosegel (s. 5.2.1.4).

### 5.2.1.6 *Annealing* einzelsträngiger DNS-Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden bei biomers.net als einsträngige DNS-Moleküle (ssDNS) synthetisiert. Um sie zu doppelsträngigen DNS-Molekülen (dsDNS) zusammenzubringen (*annealing*) wurden diese erhitzt und unter kontrollierten Bedingungen langsam abgekühlt. Hierfür wurden die Reaktionsansätze nach folgendem Schema hergestellt:

ssDNS (200 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
komplementäre ssDNS (200 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
10 $\times$ <i>annealing</i> -Puffer	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O (steril)	7 $\mu$ l
gesamt	10 $\mu$ l

Die eigentliche Anlagerung der komplementären ssDNS-Abschnitte erfolgte im Thermocycler nach folgendem Programm:

Schritt	Temperatur	
1.	98°C	5 Min.
2.	98°C $\rightarrow$ 80°C	0,3°C/Sek.
3.	80°C	2 Min.
4.	80°C $\rightarrow$ 70°C	0,3°C/Sek.
5.	70°C	2 Min.
6.	70°C $\rightarrow$ 60°C	0,3°C/Sek.
7.	60°C	2 Min.
8.	60°C $\rightarrow$ 50°C	0,3°C/Sek.
9.	50°C	2 Min.
10.	50°C $\rightarrow$ 40°C	0,3°C/Sek.
11.	40°C	2 Min.
12.	40°C $\rightarrow$ 20°C	0,3°C/Sek.
13.	20°C	10 Min.
14.	8°C	$\infty$

Nachdem die Reaktionsansätze abgekühlt waren, wurden die so hergestellten dsDNS Fragmente durch das „QIAquick® PCR Purification“ Kit (s. 5.1.3) aufgereinigt und in 20  $\mu$ l Eluierungspuffer aufgenommen.

10 $\times$ <i>annealing</i> -Puffer	100 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 M NaCl, 10 mM EDTA
--------------------------------------	----------------------------------------------

### 5.2.1.7 Phosphorylierung von freien 5'-Hydroxylgruppen in DNS-Fragmenten

Die in Abschnitt 5.2.1.6 verwendeten Oligonukleotide wurden ohne Modifikationen bei biomers.net erworben und besitzen somit keine Phosphorylierung an den 5'-Hydroxylgruppen. Die freien 5'-Hydroxylgruppen des DNS Fragments müssen phosphoryliert werden, da sonst die

Ligationsreaktion (s. 5.2.1.9) nicht stattfinden kann. Zur Phosphorylierung der DNS-Fragmente wurde ein Reaktionsansatz nach folgendem Schema hergestellt:

dsDNS	19 µl
10× Ligase Puffer (NEB)	3 µl
T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl)	1 µl
ddH <sub>2</sub> O (steril)	7 µl
gesamt	30 µl

Dieser Ansatz wurde für 45 Min. bei 37°C inkubiert und dann bei 65°C für 15 Min. inaktiviert. Die so phosphorylierten DNS-Fragmente wurden dann mit dem „QIAquick® PCR Purification“ Kit (s. 5.1.3) aufgereinigt.

### 5.2.1.8 Enzymatischer Restriktionsverdau von DNS

Für den analytischen Restriktionsverdau wurden 0,1-1 µg und für den präparativen Restriktionsverdau 1-10 µg Plasmid-DNS mit entsprechenden Einheiten Restriktionsenzym, die aus einer Aktivitätstabelle des Herstellers entnommen wurden und 1 fach konzentrierten Reaktionspuffer in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und das Volumen auf 20-50 µl mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der Restriktionsansatz wurde beim jeweiligen Temperaturoptimum des Enzyms für 2 h im Wasserbad inkubiert. Die Analyse der DNS-Fragmente erfolgte über Agarose-Gel-Elektrophorese (s. 5.2.1.3). Bei einem präparativen Verdau erfolgte nach Auftrennung im Agarosegel noch eine Aufreinigung der DNS-Fragmente (s. 5.2.1.4).

### 5.2.1.9 Ligation von DNS-Fragmenten

Für eine Ligation eines geöffneten Vektors mit einem DNS-Fragment wurde ein molares Verhältnis von 1:3 für überhängende Enden und 1:5 für glatte Enden gewählt. Die Menge an eingesetzter DNS von Vektor und DNS-Fragment wurde nach *Formel 1* berechnet, wobei  $m_I$  für die Menge des DNS-Fragmentes,  $m_V$  für die eingesetzte Menge Vektor,  $G_I$  für die Größe des DNS-Fragmentes in Kilobasenpaaren und  $G_V$  für die Größe des Vektors in Kilobasenpaaren steht.

$$\text{Formel 1: } m_I [ng] = \frac{m_V [ng] \times G_I [Kb]}{G_V [Kb]}$$

Dabei wurden generell für den Vektor 10 bis 20 ng eingesetzt und die Menge an benötigten DNS-Fragment ergab sich aus *Formel 4*. Der Ligationsansatz enthielt dann die entsprechenden Volumina an Vektor und DNS-Fragment, 1 fach konzentriertem Ligationspuffer, 0,5 Einheiten T<sub>4</sub>-DNA Ligase (Roche, Penzberg) und steriles ddH<sub>2</sub>O, um auf ein Endvolumen von 10 µl aufzufüllen. Dieser Ligationsansatz wurde dann 10-16 h bei 16°C inkubiert und dafür verwendet, um kompetente *E. coli* Zellen direkt über Hitzeschock zu transformieren (s. 5.2.1.10).

### 5.2.1.10 Transformation von *E. coli*

100 µl kompetente *E. coli*-Zellen (s. 5.1.5.1 und 5.2.1.11) wurden auf Eis 15 Min. aufgetaut und mit 10 Ligationsansatz (s. 5.2.1.9) bzw. 100 ng aufgereinigtem Plasmid DNS vereinigt. Nach Inkubation für 45 Min. auf Eis folgte der Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für exakt 90 Sek. Danach wurden die Zellen wieder kurz auf Eis gestellt und dann mit 500 µl SOC-Medium im Wasserbad bei 37°C für 45 Min. inkubiert. Auf drei LB-Ampicillin-Selektionsplatten (s. 5.2.1.1) wurden 50 µl, 150 µl und die restlichen 400 µl mit einem Trigalski-Spatel ausplattiert. Nachdem die LB-Ampicillin-Selektionsplatten getrocknet waren, wurden diese 10-16 h bei 37°C inkubiert. Nach diesem Protokoll wurden auch alle anderen Transformationen von *E. coli* durchgeführt, die eine Überexpression von Fremdproteinen zum Ziel hatten.

SOC-Medium	2% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 8,6 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; nach dem Autoklavieren zusätzlich 20 mM sterilfiltrierte Glukose hinzugeben und bei 20°C aufbewahren
------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 5.2.1.11 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen wurden 2,5 ml LB-Medium mit einem *E. coli*-Klon von einer LB-Agarplatte (s. 5.2.1.1) für eine Vorkultur angeimpft und 14-16 h bei 37°C und 250 U/Min. Schüttlergeschwindigkeit inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 0,5 ml dieser Vorkultur in 100 ml LB-Medium überimpft und ca. 3-4 h bis zu einer optischen Dichte bei  $\lambda = 600$  von 0,4 bis 0,6 im Brutschrank bei 37°C und 280 U/Min. inkubiert. Diese Kultur befindet sich dann in der mittleren log-Phase. Ab dem Erntezeitpunkt sollte stringent darauf geachtet werden auf Eis zu arbeiten, bzw. alle Reaktionsgefäße, Zentrifugen und Lösungen auf 4°C vor zu kühlen. Die 100 ml Kultur wurde in je zwei 50 ml-Zentrifugationsgefäße überführt und bei 3000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag in je 5 ml eisgekühltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> vorsichtig gelöst. Beide Zelllösungen

aus den Zentrifugengefäßen wurden vereint und 30 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurde erneut abzentrifugiert und der Niederschlag in insgesamt 2 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>/10% (w/v) Glycerin vorsichtig gelöst. Diese Zellsuspension ist dann in 100 µl Aliquots auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt, und in flüssigen Stickstoff schockgefroren worden. Bis zur Verwendung wurden die kompetenten Zellen bei -80°C gelagert. Um den Titer der kompetenten *E. coli*-Zellen zu bestimmen, wurden diese mit einer pUC18 Kontroll-DNS (0,1 ng/µl) über Hitzeschock transformiert. (s. 2.2.1.10.) Auf vier LB-Ampicillin-Selektionsplatten (s. 2.2.1.1.) wurden jeweils 20 µl, 40 µl, 80 µl und die restlichen 260 µl ausgestrichen. Nach Inkubation über 10-16 h bei 37°C wurden auf allen LB-Ampicillin-Selektionsplatten die Kolonien gezählt, addiert und nach *Formel 2* der Titer berechnet. Dabei ist  $x$  der Titer, die Koloniezahl pro 1 µg eingesetzte DNS, und  $n$  die Gesamtzahl der Kolonien.

$$\text{Formel 2: } x/\mu\text{g} = n \times 10^4$$

Der Titer konnte in der Regel bei 10<sup>5</sup> bis 10<sup>6</sup> erwartet werden.

### 5.2.1.12 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die photometrische Bestimmung erfolgte bei  $\lambda=260$  nm und  $\lambda=280$  nm. Dazu wurden 499 µl steriles H<sub>2</sub>O und 1 µl der zu bestimmenden DNS gemischt und sehr stark auf einem Vortexer geschüttelt. Gemessen wurde gegen ddH<sub>2</sub>O in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Das Verhältnis OD<sub>260nm</sub> : OD<sub>280nm</sub> gab dabei Aufschluß über etwaige Proteinkontaminationen, wobei ein Verhältnis von 1,7-2,0 angestrebt wurde. Berechnet wurde die Nukleinsäure-Konzentration nach:

$$\mu\text{g}/\mu\text{l DNS} = \frac{\lambda_{260} \times 50 (\text{Faktor DNS}) \times 500 (\text{Verdünnung})}{1000}$$

Dabei entsprach der Faktor DNS einem OD<sub>260nm</sub> von 1, der mit 50 µg/µl DNS festgelegt war. Die photometrische Quantifizierung von DNS eignete sich besonders für DNS-Konzentrationen im Bereich von 5-50 µg/µl.

### 5.2.1.13 Quantifizierung von Nukleinsäuren durch den „dot test“

Der „dot test“ wurde angewendet um kleine Mengen an Nukleinsäuren im Bereich von 10-100 ng/µl zu quantifizieren. Dazu wurde eine Standardreihe, mit definierten Konzentrationen an Nukleinsäuren, verwendet. 18 µl einer Ethidiumbromidlösung (5 ng/ml) wurden in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und dazu wurden noch 2 µl jeweils von der DNS-Standardlösung

gegeben. Die DNS-Standardreihe hatte die Konzentrationen 0 ng/ $\mu$ l, 10 ng/ $\mu$ l, 20 ng/ $\mu$ l, 40 ng/ $\mu$ l und 60 ng/ $\mu$ l. Mit den zu quantifizierenden DNS-Proben wurde analog verfahren, nur das an Stelle der Standard-DNS 2  $\mu$ l der zu quantifizierenden DNS eingesetzt wurde. Die Ansätze wurden gut durchgemischt, 10  $\mu$ l des Ansatzes auf eine beschriftete Petrischale aufgebracht und die Konzentration, durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der DNS-Probe mit der Standardreihe im UV-Licht, bestimmt.

## 5.2.2 Kultivierung von *C. reinhardtii*-Kulturen (Harris 1989)

### 5.2.2.1 Anzucht von *C. reinhardtii*

Die einzellige Grünalge *C. reinhardtii* wurde bei 23°C in einem LD-12:12-Rhythmus (12 h Licht/12 h Dunkel) kultiviert, wobei LD0 als Beginn der Lichtphase und LD12 als Beginn der Dunkelphase definiert ist. Die Lichtstärke betrug etwa 75  $\mu$ E/m<sup>2</sup>  $\times$  s. Die Kultivierung erfolgte unter kontinuierlichem Rühren in Glaskolben. Als Kulturmedium diente TAP-Medium bzw. Minimal-Medium für spezielle Anwendungen. Stammkulturen wurden auf TAP-Agarplatten mit Selektionsmedium gehalten.

1 $\times$ TAP-Medium	2,42 g Tris ultra pure; 25 ml Beijerinck'sche Salze; 1 ml 1 M (K)(PO <sub>4</sub> )-Puffer pH 7; 1 ml Trace; mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen und pH 7,0 mit Essigsäure einstellen
Minimal-Medium	50 ml Phosphatpuffer für Vollmedium; 50 ml Salzlösung für Vollmedium; 1 ml Trace, mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen,
für Selektionsmedien	50 mg/ml Paromomycin je 1 l Medium (nach Abkühlen auf ca. 40°C) zugeben
für TAP-Agarplatten	1 $\times$ TAP-Medium; 2% (w/v) Agar
für TAP-Regenerations-Topagar	1 $\times$ TAP-Puffer; 0,5% (w/v) Agar
Phosphatpuffer	14,34 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> und 7,26 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 1 l ddH <sub>2</sub> O lösen
Beijerinck'sche Salze für TAP-Medium	3,2 g NH <sub>4</sub> Cl; 0,4 g CaCl <sub>2</sub> $\times$ 2 H <sub>2</sub> O und 0,2 g MgSO <sub>4</sub> $\times$ 7 H <sub>2</sub> O in 200 ml ddH <sub>2</sub> O lösen
Salzlösung für Voll- und Minimalmedien	8 g NH <sub>4</sub> Cl; 1 g CaCl <sub>2</sub> $\times$ 2 H <sub>2</sub> O und 2 g MgSO <sub>4</sub> $\times$ 7 H <sub>2</sub> O in 1 l ddH <sub>2</sub> O lösen

### 5.2.2.2 Ernte von *C. reinhardtii*-Kulturen (nach Zhao et al., 2004)

Die Ernte erfolgte nach vier bis fünf Tagen, wenn die gewünschte Zelldichte von  $3\text{-}6 \times 10^6$  Zellen/ml erreicht war. Die *C. reinhardtii*-Kultur wurde in ein 50 ml-Zentrifugengefäß überführt und für 3 Min. bei 1500 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag im Rest-Überstand wieder gelöst und in ein 2 ml-Zentrifugengefäß überführt. Nach nochmaliger Zentrifugation für 1 Min. bei 15000 g wurde auch der Rest-Überstand mit einer Pipette abgenommen und der Zelleniederschlag im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung der gefrorenen Zellen erfolgte dann bis zur Aufarbeitung bei -80°C. Für die Ernte eines LD-Zyklus aus 1 l Kulturen wurden 500 ml Zentrifugengefäße verwendet und für 5 Min. bei 2000 g und 4°C zentrifugiert. Dabei erfolgte die Ernte alle 4 h beginnend bei LD2. Die Bearbeitung der Zellen erfolgte analog zu den 50 ml-Kulturen.

### 5.2.2.3 Zellzahlbestimmung von *C. reinhardtii*

Um die Zellzahl von *C. reinhardtii* zu bestimmen, wurden 90 µl einer Kultur mit 10 µl Formaldehyd (37%) vermischt und davon 10 µl auf eine Thoma-Zählkammer (Höhe der Kammer: 0,1 mm; Gruppenquadrat in 4×4 Kleinstquadrate mit je 0,05 mm Kantenlänge und je 0,0025 mm<sup>2</sup> Fläche) gegeben. Anschließend wurden zweimal fünf Großquadrate ausgezählt und davon der Mittelwert gebildet.

*Formel 3:*  $A = Z \times 0,5 \times 10^5 \times VF$

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte dann mit *Formel 3*, wobei *A* die Zellzahl pro ml, *Z* der Mittelwert aller gezählten Großquadrate und *VF* der Verdünnungsfaktor mit Formaldehyd ist, der hier 1:10 betrug.

### 5.2.2.4 Gewinnung von Autolysin (modifiziert nach Harris, 1989)

Die gesamte Isolierung wurde unter sterilen Bedingungen vollzogen. Zur Gewinnung von Autolysin für die Transformation von *C. reinhardtii* wurden die arginindefizienten Stämme CC-620 (mt<sup>+</sup>) und CC-621 (mt<sup>-</sup>) (s. 5.1.5.2) in jeweils 100 ml TAP<sup>+</sup> mit NH<sub>4</sub>Cl-Puffer bis zu einer Zelldichte von  $4\text{-}5 \times 10^6$  Zellen/ml angezogen. Die Kulturen wurden getrennt in jeweils 50 ml Zentrifugengefäße bei 4°C und 2000 g für 5 Min. zentrifugiert. Der Niederschlag wurde getrennt in je 5 ml TAP<sup>+</sup> ohne NH<sub>4</sub>Cl-Puffer resuspendiert und in 80 ml TAP<sup>+</sup> ohne NH<sub>4</sub>Cl-Puffer überführt. Die Kulturen beider Stämme wurde 19 h unter Dauerlicht und Rühren im stickstofffreien Medium auf die Paarung vorbereitet. Die Paarung setzte nach 16-20 h ein. Dies

wurde mikroskopisch überprüft, in dem 10 µl beider Stämme unter dem Mikroskop vereinigt wurden. Nach Bestimmung der Zellzahl (s. 5.2.2.3) wurden die Kulturen der beiden Stämme durch Zentrifugation für 5 Min. bei 2500 g und 4°C abzentrifugiert. Je  $1 \times 10^9$  Zellen wurden in 10 ml TAP<sup>+</sup> ohne NH<sub>4</sub>Cl-Puffer resuspendiert. Zur Paarung wurden die beiden Stämme in einem autoklavierten Erlenmeyerkolben vereinigt und unter Dauerlicht für 2 h geschüttelt. Dabei wurde ab dem Zeitpunkt der Vereinigung jeweils nach 15 Min. 10 µl Zellen entnommen und auf einem Objektträger mit 10 µl 1% Triton X 100 gemischt. Wenn nach maximal 5 Min. der Exitus durch Platzen der Zellen eingetreten war, wurde genügend Autolysin produziert. War dies der Fall, wurden die Zellen in einem 50 ml Zentrifugengefäß überführt und 10 Min. bei 30000 g und 4°C zentrifugiert. Der autolysininhaltige Überstand konnte direkt für eine Transformation in *C. reinhardtii* (s. 5.2.2.5) verwendet werden oder wurde bei -80°C aufbewahrt.

Salzlösung für TAP <sup>+</sup> ohne NH <sub>4</sub> Cl	0,4 g MgCl <sub>2</sub> × 7 H <sub>2</sub> O (oder 0,37 g MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O) und 0,26 g CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O in 100 ml ddH <sub>2</sub> O lösen
Salzlösung für TAP <sup>+</sup> mit NH <sub>4</sub> Cl	1,6 g NH <sub>4</sub> Cl; 0,4 g MgCl <sub>2</sub> × 7 H <sub>2</sub> O und 0,26 g CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O in 100 ml ddH <sub>2</sub> O lösen

### 5.2.2.5 Transformation von *C. reinhardtii* mit Glasperlen (Kindle, 1990; Davies et al., 1992; Kiaulehn Diplomarbeit, 2006)

Zur Transformation von *C. reinhardtii* mit Glasperlen wurde ein Wildtypstamm (SAG73.72) von einer TAP-Agar-Platte (s. 5.2.2.1) in einem Nunc<sup>®</sup>-Kulturfläschchen mit 10 ml frisch sterilisiertem TAP-Medium (s. 5.2.2.1) inokuliert und vier bis fünf Tage auf einem Schüttler bei 185 U/Min. wachsen gelassen. Dies entsprach einer Zelldichte von  $1-3 \times 10^6$  Zellen/ml. Von dieser Vorkultur wurden 0,5-5 ml (je nach Zelldichte) in 50-100 ml frisch autoklaviertes TAP-Flüssigmedium, die Hauptkultur, transferiert und weitere vier Tage wachsen gelassen, bis die Kultur dunkelgrün wurde. Dies entsprach ungefähr einer Zelldichte von  $1-5 \times 10^6$  Zellen/ml. Eine 50 ml-Kultur war genug für neun Transformationen. Bei der gesamten Prozedur wurde darauf geachtet, unter sterilen Bedingungen zu arbeiten. Nachdem die Hauptkultur die entsprechende Zelldichte erreicht hatte, erfolgte die Ernte der Zellen in 50 ml Zentrifugengefäßen für 3 Min. bei 1500 g. Der Überstand wurde verworfen und der Zelniederschlag in 5 ml frischem TAP-Flüssigmedium resuspendiert. Alternativ konnte auch direkt im Autolysin resuspendiert werden, um Verdünnungseffekte zu vermeiden. 1-1,5 ml der Zellsuspension wurden in einen sterilen Erlenmeyerkolben mit Magnetrührer gegeben und zusätzlich, wenn nicht schon in Autolysin resuspendiert wurde, 6 ml Autolysin hinzugegeben.

Zuerst wurden nach 15 Min. und dann nach je weiteren 15 Min. 10 µl-Proben entnommen, die auf die Wirkung des Autolysins getestet wurden. Dazu wurden die 10 µl mit 10 µl 1% (w/v) Triton X-100 vermischt und die Zellen unter dem Mikroskop begutachtet. Die Zellen waren für die Transformation bereit, wenn nach 5 Min. nach Zugabe des Detergenz Triton X-100 mehr als 80 % der Zellen zerplatzt waren. Dies bedeutete, dass die Zellwand durch die enzymatische Aktivität des Autolysins abgebaut worden war. Sichtbar wurde dies als Auseinanderfallen der Zellen in kleine schwarze Punkte. Bei frischem Autolysin war dies bereits nach 20 Min. der Fall. Diese so von der Zellwand befreiten Zellen wurden dann in ein 50 ml-Zentrifugengefäß überführt und für 3 Min. bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand, der dann noch Autolysin enthält, wurde abgenommen, später nochmals für 3 Min. bei 40000 g abzentrifugiert und für spätere nochmaligere Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Der Niederschlag wurde dann in 1,2 ml frischem TAP-Flüssigmedium (reicht für vier Transformationen) durch leichtes Schwenken vorsichtig resuspendiert. Pro Transformationsansatz wurden dann 300 µl Zellen und 1 bzw. 2 µg linearisierte DNS auf sterile 0,3 g Glasperlen (s. 5.2.2.6) gegeben. Zusätzlich wurden noch 100 µl PEG8000 [Endkonzentration: 5% (v/v)] zugegeben. Diese wurden dann auf dem „Fisher Vortex Genie2“ bei maximaler Geschwindigkeit genau 15 Sek. geschüttelt. Die Zellen wurden dann in ein 50 ml-Zentrifugengefäß mit 10 ml frisch autoklaviertem TAP-Flüssigmedium überführt und mindestens 18 h unter Dauerlicht schräg rotieren gelassen. Die Zellen wurden am nächsten Tag für 3 Min. bei 1000 g und 18°C zentrifugiert und durch vorsichtiges Schwenken in 0,5 ml frisch autoklaviertem TAP-Flüssigmedium resuspendiert. Der TAP-Regenerations-Topagar (s. 5.2.2.1) wurde im Wasserbad aufgekocht und auf 40°C temperiert. Danach folgte die Zugabe der Zellsuspension zu 3,5 ml 0,5 (w/v) TAP-Regenerations-Topagar und sofortiges Ausplattieren auf TAP-Paromomycin-Selektionsagar (s. 5.2.2.1). Nachdem die TAP-Paromomycin-Selektionsagarplatten zehn Tage unter LD-12:12-Bedingungen inkubiert worden waren, waren in der Regel *C. reinhardtii*-Kolonien sichtbar.

### **5.2.2.6 Vorbereitung der Glasperlen für die Transformation von *C. reinhardtii***

Die Glasperlen (s. 5.1.3) wurden mit konzentrierter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gewaschen und solange mit ddH<sub>2</sub>O gespült, bis ein neutraler pH-Wert erreicht war. Diese wurden über Nacht bei 50°C im Trockenschrank getrocknet und in 0,5 ml Mikrozentrifugengefäße zu je 0,3 g verteilt. Nach Sterilisation, in einem geschlossenen Behälter, im Autoklaven und nochmaliger Trocknung im Trockenschrank bei 50°C waren die Glasperlen nun bereit für die Transformation von *C. reinhardtii*.

### **5.2.2.7 Aufbewahrung von *C. reinhardtii*-Kulturen in flüssigem Stickstoff (Crutchfield et al., 1999)**

Die zur Aufbewahrung im flüssigen Stickstoff bestimmte *C. reinhardtii*-Kultur wurde in TAP-Medium bis zu einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml kultiviert (s. 5.2.2.1). 25 ml dieser Kultur wurde 5 Min. bei 4000 g und 18°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 2,5 ml TAP-Medium resuspendiert. In vorbereitete 1,8 ml-Tiefkühlgefäße (CryoTubes, Nalgene) wurde 250 µl TAP-Medium mit 6% (v/v) Methanol gegeben und jeweils die gleiche Menge an Zellsuspension. Diese war zehnfach konzentriert. Somit betrug die Endkonzentration an Methanol 3% (v/v). Die Tiefkühlgefäße wurden in einem Isopropanol-Bad bei -80°C für 65 bis 72 Min. in der „Mr. Frosty-Box“ (Cryo 1C Freezing Container, Nalgene) (s. 5.1.1) eingefroren. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen der Tiefkühlgefäße wurden diese für etwa 2 Min. im 35°C warmen Wasserbad leicht geschüttelt und die Zellen in 10 ml TAP-Medium resuspendiert. In einem 50 ml Erlenmeyerkolben wurden die Zellen 6 - 18 h unter Dauerlicht gerührt. Nach einer Zentrifugation von 5 Min. bei 1000 g und 4°C wurde das Sediment erneut in 0,5 ml TAP-Medium resuspendiert und auf einer TAP-Agarplatte bzw. TAP-Agar-Selektionsplatte mit Paromomycin ausplattiert und unter LD-Bedingungen wachsen gelassen.

## **5.2.3 Biochemische Methoden**

### **5.2.3.1 Herstellung eines Protein-Rohextraktes aus *C. reinhardtii* (Zhao et al., 2004)**

Die geernteten und bei -80°C gelagerten *C. reinhardtii*-Zellen wurden zuerst auf Eis aufgetaut und mit 150-200 µl Aufschlusspuffer inklusive DTT und PIC auf Eis langsam suspendiert. Für die Herstellung eines Proteinrohextraktes aus *C. reinhardtii* zur Verwendung in einer Koimmunopräzipitation (s. 5.2.3.12) wurden zum Aufschlusspuffer mit DTT und PIC zusätzlich Phosphatase-Inhibitor I und II mit einer Endkonzentration von 1:100 hinzugegeben. Alle Arbeiten für den Protein-Rohextrakt aus *C. reinhardtii* wurden strikt auf Eis durchgeführt. In der Zwischenzeit wurden Glasperlen für den Rohextrakt (s. 5.1.3) zu 2/3 in 1,5 ml Zentrifugengefäße gefüllt und zweimal mit Aufschlusspuffer ohne Zusätze gewaschen und auf Eis vorgekühlt. Die Zellsuspension wurde dann auf die Glasperlen gegeben. Auf vollständige Füllung der Zentrifugengefäße war zu achten. Dann wurde die Zellsuspension zweimal 1 Min. auf dem „Vortex Mixer VM-300“ (NeoLab, Heidelberg) (s. 5.1.1) stark geschüttelt und dazwischen erfolgte eine Inkubation für 2 Min. auf Eis. Nach kurzem Abzentrifugieren der Glasperlen für 10 Sek. bei maximal 3000 g, wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml-

Zentrifugengefäß überführt und nochmals für 15 Min. bei 15000 g und 4°C zentrifugiert. Der nun von den Zelltrümmern befreite Proteinextrakt, der sich im Überstand befand, wurde in ein neues 1,5 ml Zentrifugengefäß überführt.

Aufschlusspuffer	10 mM Tris mit HCl auf pH 7,5 einstellen; 80 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Glycerin
Aufschlusspuffer + PIC und DTT	10 mM Tris mit HCl auf pH 7,5 einstellen; 80 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Glycerin; 0,2 mM DTT; 2% (v/v) PIC
Aufschlusspuffer + PIC und DTT sowie Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 + 2	10 mM Tris mit HCl auf pH 7,5 einstellen; 80 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Glycerin; 0,2 mM DTT; 2% (v/v) PIC; 1% (v/v) Phosphatase-Inhibitor-Cocktail I; 1% (v/v) Phosphatase-Inhibitor-Cocktail II

### 5.2.3.2 Herstellung eines Gesamtproteinextraktes (modifiziert nach Kleiner et al. 1999)

Zur Herstellung eines Gesamtproteinrohextraktes wurden geerntete *C. reinhardtii*-Zellen (s. 5.2.2.2) mit 400 µl 2× SDS-Probenpuffer (s. 5.2.3.7) je 100 mg Zelltrockengewicht bei 80°C für 5 Min. im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension auf einem Vortex-Genie®2 stark geschüttelt, bis sich eine homogene Suspension gebildet hatte, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nochmals bei 80°C für 5 Min. inkubiert. Diese Auftau- und Einfrierzyklen wurden insgesamt dreimal wiederholt. Durch anschließende Zentrifugation bei 16000 g für 5 Min. und Raumtemperatur wurden noch verbliebene Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile entfernt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der „Neuhoff“-Methode (s. 5.2.3.6).

### 5.2.3.3 Saccharose Dichtegradient (Zhao et al., 2004)

Lineare Saccharose-Dichtegradienten wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers und einer Peristaltikpumpe (s. 5.1.1) aus 6 und 14-%igen Saccharose-Lösung hergestellt. Die Flussrate wurde hierbei auf 1 ml/min eingestellt. Für die native Auftrennung von Proteinkomplexen im linearen Saccharose-Dichtegradienten wurden 300 mg Proteinrohextrakt (s. 5.2.3.1) von *C. reinhardtii*-Zellen auf den Saccharose Gradienten aufgetragen. Zusätzlich wurde auch ein Saccharose-Gradient mit einer Standardprotein Lösung (s. 5.1.9) mitgeführt. Die Zentrifugation erfolgte bei 74100 g für 16 h und 4°C mit Ausschwenkrotor JS34.38 (s. 5.1.1). Nach Beendigung des Laufes wurde der Rotor nicht aktiv gebremst, um Verwirbelungen zu vermeiden.

Anschließend wurden für jede Probe einzeln die Saccharose-Gradienten in Fraktionen abgenommen, beginnend mit der höchsten Dichte. Dabei wurde eine dünne Kanüle vorsichtig von oben in den Gradienten eingetaucht, bis sie den Boden des Gradientengefäßes erreichte. An die Kanüle war über einen Schlauch eine Peristaltikpumpe angeschlossen, mit welcher der Gradient von unten (größte Dichte) her abgesaugt wurde. Aufgefangen wurden die Fraktionen zu je 1 ml in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen. Nach Denaturierung mit 4× SDS-Probenpuffer (s. 5.2.3.7) wurden die verschiedenen Fraktionen mittels SDS-PAGE (s. 5.2.3.7) und Immunodetektion (s. 5.2.3.11) analysiert.

Gradientenpuffer	10 mM Tris-Cl, pH7,5; 1 mM EDTA; 80 mM NaCl
Saccharoselösungen	Jeweils 6 und 14 % (w/v) in Gradientenpuffer

#### **5.2.3.4 Anreicherung von membranassoziierten Proteinen mittels „Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Stripping“ (nach Fujiki et al. 1982)**

Die geernteten und bei -80°C gelagerten *C. reinhardtii*-Zellen wurden zuerst auf Eis aufgetaut und die löslichen Proteine aufgearbeitet (s. 5.2.3.1). Die Membranbestandteile und Zelltrümmer wurden bei 16000 g für 15 Min. bei 4°C abzentrifugiert und dann zweimal mit 1 ml eiskaltem 1× PBS (s. 5.2.3.14) gewaschen. Der Niederschlag wurde für 1 h bei 4°C mit 30 ml 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Puffer vorsichtig geschüttelt und dabei resuspendiert. Dabei nehmen die membranassoziierten Proteine, die nicht kovalent an Membranen gekoppelt sind, negative Ladung an und stoßen sich von diesen ab. Nach Ultrazentrifugation bei 93000 g für 1 h und 4°C wurde der Überstand abgenommen und aufbewahrt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Der Niederschlag enthielt danach nur die Membranproteinfraktion und wurde direkt in 2× SDS-Probenpuffer (s. 5.2.3.7) gelöst. Die Überstände enthielten die abgelösten membranassoziierten Proteine, die mittels Trichloressigsäure (TCA) gefällt wurden. Dafür wurde der Überstand (ca. 30 ml) mit einem Volumen 100% (w/v) TCA auf vier Volumen Probe versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 5000 g für 10 Min. und 4°C wurden die präzipitierten Proteine dreimal mit 6 ml eiskaltem Aceton gewaschen. Der Niederschlag wurde unter einem Abzug getrocknet und in 2× SDS-Probenpuffer (s. 5.2.3.7) gelöst. Die Fraktionen wurden dann mittels SDS-PAGE (s. 5.2.3.7) und Immunodetektion (s. 5.2.3.11) analysiert.

### 5.2.3.5 Augenfleckaufreinigung

Für die Präparation einer Augenfleckfraktion wurde der *C. reinhardtii*-Stamm cw15 verwendet. Die Zellen wurden wie in Schmidt et al., 2006 kultiviert, aufgeschlossen und die Augenflecke über mehrere diskontinuierliche Saccharose-Gradienten isoliert. Diese Arbeiten wurden in Erlangen von Prof. Dr. Georg Kreimer, Tobias Reissenweber und Anne Mollwo durchgeführt. Die erhaltene Augenfleckfraktion wurde dann im Verhältnis 1:3 mit 4× Lysepuffer versetzt und für 1 h bei 4°C über Kopf rotierend solubilisiert. Nach Zentrifugation der Lösung für 15 Min. bei 4°C und 16000 g wurde der Überstand abgenommen, die Proteinkonzentration bestimmt (s. 5.2.3.6) und der Überstand konnte für weitere Analysen, wie die Koimmunopräzipitation (s. 5.2.3.13) verwendet werden.

4× Lysepuffer	40 mM Tris-Cl, pH7,5; 10 mM NaCl; 4% (w/v) $\beta$ -Dodecylmaltosid; 2% (v/v) NP-40
---------------	-------------------------------------------------------------------------------------

### 5.2.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach der „Neuhoff-Methode“ (Neuhoff et al., 1979)

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden auf einer Zelluloseacetatmembran (s. 5.1.3) 1 × 1 cm große Quadrate markiert und in diese 2  $\mu$ l der zu bestimmenden Probe pipettiert. Ein Quadrat wurde für den Nullwert freigelassen und bei allen folgenden Schritte analog den Proben behandelt. Nachdem die Proben auf der Membran getrocknet worden waren, wurden diese 2 Min. in 0,5% (w/v) Amidoschwarzlösung gefärbt. Danach folgte eine dreimalige Entfärbung in Neuhoff-Entfärbelösung. Während die Zelluloseacetatmembranen trockneten, wurden 1 ml wasserfreies DMSO in 2 ml-Zentrifugengefäße pipettiert und die getrockneten Membranquadrate jeweils in eins der Zentrifugengefäße gegeben. Nach sofortigem starken Mischen auf einem „Vortex Mixer VM-300“ (NeoLab, Heidelberg) bis zur vollständigen Auflösung der Membran, konnte gegen den Nullwert bei  $\lambda=630$  nm die Extinktion gemessen werden. Die Proteinkonzentration wurde dann aus einer vorher ermittelten Eichkurve abgelesen.

Entfärbe-Lösung für Neuhoff-Test	10% Essigsäure (v/v); 90% Methanol (w/v)
Färbelösung für Neuhoff-Test	0,5% (w/v) Amidoschwarz in Entfärbelösung für Neuhoff-Test; Vor Verwendung wurde die Färbelösung gefiltert und bei 630nm auf einen OD von ca. 10 eingestellt

### 5.2.3.7 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteingemischen (nach Laemmli, 1970)

Für die SDS-PAGE wurde ein vertikales Gel-System verwendet, das aus einem 9 bis 14-%igen Trenngel besteht, das wiederum von einem 5-%igen Sammelgel überschichtet wurde. Als Laufpuffer wurde ein 1× konzentrierter Elektrophoresepuffer verwendet. Vor dem Aufladen in die Geltaschen wurden die Proteinproben mit 4× SDS-Probenpuffer und durch anschließendes Kochen für 5 Min. bei 100°C denaturiert. Die Proteine wurden mit 150 V durch das Sammelgel laufen gelassen und an der Grenze zum Trenngel wurde die Spannung auf 250 V erhöht. Die gesamte elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit einer an der Elektrophoreseapparatur vorinstallierten Wasserkühlung.

4× SDS-Probenpuffer für PAGE (nach Sambrook et al., 1989)	200 mM Tris-HCl (pH 7,5); 400 mM DTT; 10% (w/v) SDS; 0,5% (w/v) Bromphenol Blau; 50% (w/v) Glycerol
2× SDS-Probenpuffer für PAGE	1 ml 4× SDS-Probenpuffer für PAGE in 1 ml ddH <sub>2</sub> O
1× SDS-Probenpuffer für PAGE	1 ml 4× SDS-Probenpuffer für PAGE in 3 ml ddH <sub>2</sub> O
Trenngel 10%:	9,9 ml ddH <sub>2</sub> O; 8,3 ml 30% (w/v) Acrylamid / 0,8% (w/v) Bis-Acrylamid; 6,35 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 250 µl 10% (w/v) SDS; 16 µl TEMED; 200 µl 10% (w/v) Ammoniumperoxidisulfat
Trenngel 12%:	8,2 ml ddH <sub>2</sub> O; 10 ml 30% (w/v) Acrylamid / 0,8% (w/v) Bis-Acrylamid; 6,35 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 250 µl 10% (w/v) SDS; 16 µl TEMED; 200 µl 10% (w/v) Ammoniumperoxidisulfat
Sammelgel (5%):	6,8 ml ddH <sub>2</sub> O; 1,7 ml 30% (w/v) Acrylamid / 0,8 (w/v) Bis-Acrylamid; 1,25 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 100 µl 10% (w/v) SDS; 16 µl TEMED; 100 µl 10% (w/v) Ammoniumperoxidisulfat
5× Elektrophorese-Puffer:	125 mM Tris; 1250 mM Glycin; 0,5% SDS

### 5.2.3.8 Färbung der Proteine nach Polyacrylamid-Gelelektrophorese mittels Coomassie (modifiziert nach Merril, 1990)

Nach der Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE (s. 5.2.3.7) wurde das Trenngel für 20 Min. in Coomassie-Farblösung geschwenkt und danach wieder 2-4 h in Entfärbe-Lösung entfärbt, bis der Hintergrund völlig entfärbt war. Die Entfärbe-Lösung wurde dabei mehrmals gewechselt.

Die so gefärbten Gele wurden dann photographisch dokumentiert. Mit dieser Färbemethode können Proteine in Konzentrationen von 200-400 ng (untere Grenze) pro Bande sichtbar gemacht werden.

Coomassie-Farblösung:	0,05% (w/v) Brillant Blau R250; 50% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung:	7% (v/v) Essigsäure; 5% (v/v) Methanol

### 5.2.3.9 Western-Transfer

Nach erfolgter SDS-PAGE wurde das Trenngel in *semi dry*-Transfer-Puffer 10 Min. geschwenkt. Ebenso wurden auch die Nitrozellulosemembranen (s. 5.1.3) in *semi dry*-Transfer-Puffer für 5 Min. inkubiert und die für den Western-Transfer notwendigen *gel blotting*-Papiere (Roth, Karlsruhe) (s. 5.1.3) in diesem Puffer getränkt. Die Anordnung der Membran, der Papiere und des Gels war von der Kathode her immer wie folgt: drei Lagen *gel blotting*-Papiere die Nitrozellulosemembran, das Trenngel und abschließend wieder drei *gel blotting*-Papiere. Die Transferkammer wurde geschlossen und an die Stromversorgung angeschlossen. Die zum Transfer notwendige Stromstärke ergab sich aus *Formel 6*, wobei  $I$  die Stromstärke in mA,  $L$  die Länge des Gels in cm und  $B$  die Breite des Gels in cm ist.

$$\text{Formel 6: } I[\text{mA}] = L[\text{cm}] \times B[\text{cm}] \times 1,5 \frac{\text{mA}}{\text{cm}^2}$$

Der Transfer wurde 1,5 h vorgenommen und die Nitrozellulosemembran mit Ponceaurot (s. 5.2.3.10) gefärbt.

Transferpuffer (nach Bjerrum und Schafer-Nielsen, 1986)	48 mM Tris; 39 mM Glycine; 20% (v/v) Methanol; 0,0375% (w/v) SDS
---------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------

### 5.2.3.10 Ponceau-Färbung nach Western-Transfer

Die Nitrozellulosemembran wurde 5 Min. in Ponceau-S-Färbelösung geschwenkt und anschließend mit ddH<sub>2</sub>O entfärbt, bis der Hintergrund wieder weiß wurde. Nach photographischer Dokumentierung der Membran wurden die Banden des Proteinstandards (s. 5.1.9) sowie die Lauffront mit einem Kugelschreiber markiert.

Ponceau S	0,2% (w/v) Ponceau S; 3% (v/v) Trichloressigsäure
-----------	---------------------------------------------------

### 5.2.3.11 Immunodetektion von Proteinen (Schulze Diplomarbeit, 2008)

Für die Immunodetektion von Proteinen wurden die zuvor über eine SDS-PAGE (s. 5.2.3.7) aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (s. 5.2.3.9) und nach Färbung mit Ponceau S (s. 5.2.3.10) und Markierung der Standards bzw. Lauffronten mit Blockierungspuffer 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran mit den darauf gebundenen Proteinen in eine Hybridisierungsröhre gebracht und mit 25 ml Blockierungspuffer drehend auf einem „Roto-Shake Genie™“ (Scientific Industries, Inc., USA) (s.5.1.1) inkubiert. Nach dem „Blocken“ der Nitrozellulosemembran erfolgte die Inkubation mit dem primären Antiserum (s. 5.1.10.1 bzw. 5.1.10.3) in einer geeigneten Verdünnung mit Blockierungspuffer für 14 h bei 4°C drehend auf einem „Roto-Shake Genie™“ (Scientific Industries, Inc., USA).

Blockierungspuffer:	1× TBS-Tween, pH 7,5 mit 1% (w/v) Slim-Fast® Milchshake Pulver
10× TBS:	200 mM Tris, pH 7,5; 1,5 M NaCl
1× TBS-Tween:	10× TBS pH 7,5 auf 1× Konzentration verdünnt mit 0,05% (w/v) Tween 20
1× TBS:	10× TBS pH 7,5 auf 1× Konzentration verdünnt

Nach dreimaligem Waschen der Membran mit 1× TBS-Tween-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (s. 5.1.10.4) (Verdünnung 1:6666 in Blockierungspuffer) für 1 h bei Raumtemperatur. An diesen sekundären Antikörper war eine Meerrettich-Peroxidase gebunden, welche die Oxidation von Luminol katalysiert und so eine Chemilumineszenz auslöst (s. 5.2.3.11), die dann über einen Röntgenfilm sichtbar gemacht wird. Danach erfolgte dreimaliges Waschen mit 1x TBS-Tween-Puffer und Schwenken der Membran für ca. 5 Min. in 1× TBS-Puffer ohne Tween. Die Membran war nun bereit für den immunologischen Nachweis der Antikörperbindung (s. 5.2.3.11).

### 5.2.3.12 Nachweis der Antikörper-Bindung mit Meerrettich-Peroxidase

Zur Immunodetektion von Proteinen nach Western-Transfer (s. 5.2.3.9) wurde ein mit einer Peroxidase konjugierter Antikörper (s. 5.1.10.4) eingesetzt, der spezifisch gegen den primären

Antikörper gerichtet ist. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol mit Hilfe von Wasserstoffperoxid und löst damit eine Chemilumineszenz aus, die auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht wird. Nach der letzten Waschung der Membran mit  $1 \times$  TBS-Puffer ohne Tween wurde die Peroxidase-Reaktion gestartet. Die Durchführung geschah im Dunkelraum bei Rotlicht. Dazu wurden die Lösungen Luminol 1 und 2 im Verhältnis 1:1 vermischt und die Membran 5 Min. darin unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Membran wurde danach in Folie eingeschlagen und ein Röntgenfilm auf der Membran exponiert. Die Expositionsdauer war abhängig von der Signalstärke und betrug zwischen 1 Min. und 1 h.

Luminol 1:	100 mM Tris pH 8,5; 1% (v/v) Luminol (Stammlösung: 0,44 g in 10 ml DMSO); 2,2% (v/v) p-Cumarinsäure (Stammlösung: 0,15 g in 10 ml DMSO)
Luminol 2:	100 mM Tris pH 8,5; 0,02% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (37%ig)

### 5.2.3.13 Koimmunopräzipitation

Um die Interaktion zwischen Proteinen zu untersuchen bzw. um Interaktionspartner identifizieren zu können, wurde eine Koimmunopräzipitation durchgeführt. Dabei wird ein Antikörper verwendet, der spezifisch sein Zielprotein, das Antigen, aus einem Proteingemisch isoliert. Dabei können auch durch die natürliche Bindung im Proteingemisch potentielle Interaktionspartner mit dem Zielprotein aufgereinigt werden. Dies geschah nach dem Protokoll beschrieben in (Schroda et al., 2001). Dafür wurden 50 mg ProteinA-Sepharose (s. 5.1.3) in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß eingewogen und mit 1,3 ml 0,1 M Natrium-Phosphat Puffer für 30 Min. bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 Sek. bei 16000 g und 4°C wurde der Überstand verworfen und die ProteinA-Sepharose mit 1,3 ml 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer gewaschen. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal wiederholt und nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und 500 µl 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer zur ProteinA-Sepharose gegeben. Nun wurden in zwei 2 ml Reaktionsgefäße je 788 ml Millipore Wasser und 132 µl 1 M Natrium-Phosphat-Puffer vermischt und dann 200 µl der gequollenen ProteinA-Sepharose zugegeben. Dann wurden 200 µl SOUL3 Antiserum und in ein anderes Reaktionsgefäß 200 µl entsprechendes Preimmunserum gegeben. Die ProteinA-Sepharose fungiert hierbei als Matrix, um die Antikörper zu immobilisieren. Die Kopplung der Antikörper an die ProteinA-Sepharose erfolgte durch Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln, gefolgt von drei Waschschritten mit je 1,3 ml 0,1 M Natrium-Borsäure Puffer und jeweils einem Zentrifugationsschritt für 15 Sek. bei 16000 g und 4°C. Der Überstand wurde

jeweils verworfen. Zur kovalenten Fixierung der Antikörper an die ProteinA-Sepharose wurde frisch eingewogenes DMP zugegeben (Endkonzentration: 20 mM) und für 30 Min. leicht geschüttelt. Nach Zentrifugation für 15 Sek. bei 16000 g und 4°C wurde der Überstand abgenommen und 1 ml 1 M Tris-Cl (pH 7,5) zugegeben. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt und die Reaktionsgefäße unter leichtem Schütteln bei 4°C über Nacht oder 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgten zwei Waschschrte mit je 1,3 ml NETN2 mit Zentrifugation bei 200 g für 2 Min. und 4°C, bevor der frisch aufgearbeitete Proteinrohextrakt (s. 5.2.3.1) oder die solubilisierte Augenfleckfraktion zugegeben wurde. Dazu durfte maximal 1,5 ml eingesetzt werden. Die gekoppelten Antikörper und die Proteinlösung wurden so über Nacht bei 4°C durch Überkopfschütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand nach Zentrifugation bei 200 g für 2 Min. und 4°C vorsichtig entfernt und die ProteinA-Sepharose dreimal wie oben beschrieben mit je 1,3 ml NETN2 gewaschen. Die ProteinA-Sepharose wurde dann in 1 ml NETN1 resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dies sollte vermeiden, dass es durch hydrophobe Proteine, die sich an die Seitenwände des Reaktionsgefäßes angelagert haben könnten, zu falsch positiven Ergebnissen kommt. Die ProteinA-Sepharose wurde nochmals wie oben beschrieben abzentrifugiert und zweimal mit je 1 ml 10 mM Tris-Cl (pH 7,6) gewaschen. Nachdem der Überstand abgenommen worden war, wurde das Volumen der ProteinA-Sepharose abgeschätzt und ein Volumen 2× SDS-Probenpuffer (nicht reduzierend) zugeben, bei Raumtemperatur für 30 Min. unter leichtem Schütteln inkubiert. Die erhaltenen Eluate wurden dann mit DTT (Endkonzentration: 50 mM) versetzt und für die Analyse via LC-ESI-MS (*liquid chromatography-electron spray ionisation-mass spectrometry*) vorbereitet (s. 5.2.4)

1 M Natrium-Phosphat-Puffer	77,4 ml 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 22,6 ml 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,5
0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer	10 ml 1 M Natrium-Phosphat-Puffer mit 90 ml ddH <sub>2</sub> O auffüllen
0,1 M Natrium-Borsäure-Puffer	0,61 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> in 90 ml ddH <sub>2</sub> O lösen; pH mit NaOH auf 9,0 einstellen; mit ddH <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen
2× SDS-Probenpuffer (nicht reduzierend)	125 mM Tris-Cl pH 6,8; 20% (v/v) Glycerol; 4% (w/v) SDS; 0,005% (w/v) Bromphenolblau
NETN1	20 mM Tris-Cl pH 8,0; 1 mM EDTA
NETN2	20 mM Tris-Cl pH 8,0; 1 mM EDTA; 80 mM NaCl

### **5.2.3.14 *In situ*-Detektion von Proteinen mittels indirekter Immunfluoreszenz in *C. reinhardtii* (modifiziert nach Mittelmeier et al., 2008 und Georg Kreimer, persönliche Kommunikation)**

Zur Detektion von Proteinen *via* fluoreszent markierten Antikörpern wurden *C. reinhardtii*-Zellen der Stämme SAG73.72, CC-125[137c] und CC-4316[F35] (s. 5.1.5.2) verwendet. Diese wurden in Minimal-Medium (s. 5.2.2.1) für drei Tage kultiviert und davon 2 ml Zellkultur bei 500 g für 10 Min. geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen direkt in 1 ml frisch aufgetautem Autolysin (s. 5.2.2.4) resuspendiert und 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt diente dazu, die proteinhaltige Zellwand von *C. reinhardtii* anzudauen und somit das Zellinnere für die Antikörper zugänglicher zu machen. Nach nochmaligem Abzentrifugieren der Zellen bei 500 g für 10 Min. wurden diese in 1× PBS resuspendiert und auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger mit je acht Feldern aufgebracht. In einer feuchten Kammer wurden die Zellen auf den Objektträgern für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, damit diese sich absetzen können. Danach wurden die Objektträger kurz in 1× PBS gespült. Dann wurden diese für genau 20 Sek. in -20°C kaltes Methanol getaucht, kurz trocknen gelassen und dann mit Blockpuffer für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Ab diesem Schritt erfolgen alle Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Auf einen Waschschrift mit 1× PBS für 5 Min. folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (s. 5.1.10.1, 5.1.10.2 und 5.1.10.3) für 90 Min. bei 37°C. Daraufhin wurden die Objektträger je drei Mal mit 1× PBS für 5 Min. gewaschen und nochmals für 30 Min. bei 37°C mit Blockpuffer inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 1× PBS für 5 Min wurden die Objektträger mit dem sekundären Antikörper (s. 5.1.10.4), an dem ein Fluorochrom gekoppelt ist, inkubiert. Es erfolgten nochmals drei Waschschrte mit 1× PBS, bevor die Objektträger mit ProlongGOLD Reagenz (Life Technologies, Darmstadt) überschichtet und Deckgläser aufgebracht wurden. Nach 24 h Ruhen in Dunkelheit bei 4°C wurden die Deckgläser mit farblosen Nagellack fixiert und die Proben am Axio Scop1 A.1 (Carl Zeiss, Jena) mit angeschlossenem N-Achroplan 100×/1.25-Immersionsölobjektiv analysiert. Photographische Aufnahmen wurden über eine an das Mikroskop angeschlossene Kamera AxioCam MRm (Carl Zeiss, Jena) gemacht und die einzelnen Fluoreszenzkanäle in Photoshop® CS2 zusammengefügt. Für den Nachweis zweier Proteine nebeneinander wurden die Schritte für den Nachweis des ersten Proteins mit den primären und sekundären Antikörper mit Blockierung normal durchgeführt und danach alle Schritte für den Nachweis des zweiten Proteins wiederholt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die benutzten kommerziellen Antikörper keine Kreuzreaktionen zeigten bzw. primäre Antikörper aus verschiedenen Wirtsspezies benutzt wurden.

1× PBS (pH 7,4)	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O; 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Blockpuffer	1× PBS mit 3% (w/v) BSA; 0,1% (v/v) TWEEN20
Antikörperverdünnungspuffer	1× PBS mit 3% (w/v) BSA

### 5.2.3.15 Doppel-Immunfluoreszenzmarkierung von Proteinen mit Speziesgleichen Antikörpern (nach Ino 2004)

Sollten zwei Proteine mit primären Antikörpern markiert werden, die aus der gleichen Spezies stammen, wurde ein abgeändertes Protokoll zur Immunodetektion umgesetzt. Da beide Antikörper, gegen SOUL3 und ChR1, aus dem Hasen stammen, würde dies zu Kreuzreaktionen mit den sekundären Antiseren führen. Eine Unterscheidung der Markierung wäre so nicht zweifelsfrei möglich. Um dies zu vermeiden, wurden primäre und sekundäre Antiseren 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde Anti-SOUL3 mit Anti-Hase/Alexa555 markiert und Anti-ChR1 mit Anti-Hase/Alexa488. Die zu untersuchenden *C. reinhardtii*-Zellen wurden wie in 5.2.3.14 beschrieben kultiviert, geerntet und fixiert. Nach Inkubation der Objektträger in Blockpuffer (s. 5.2.3.14) für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer erfolgte die Inkubation mit dem löslichen Immunkomplex von Anti-SOUL3/Alexa555 für 90 Min. ebenfalls bei 37°C in einer feuchten Kammer. Nach drei Waschschrritten mit 1× PBS und nochmaliger Blockierung wurden die Objektträger mit dem löslichen Immunkomplex von Anti-ChR1/Alexa488 inkubiert. Diese wurden abermals für 90 Min. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nachdem die Objektträger dreimal in 1× PBS gewaschen wurden, wurden die Objektträger mit ProlongGOLD Reagenz (Life Technologies, Darmstadt) überschichtet und Deckgläser aufgebracht. Am nächsten Tag wurden Deckgläser mit Nagellack fixiert. Die Auswertung erfolgte wie in 5.2.3.14 beschrieben.

### 5.2.3.16 Überexpression und native Aufreinigung von Histidin-markierten Proteinen in *E. coli*

Histidin-markierte Proteine, die für weitere *in vitro*-Versuche verwendet wurden, sind unter nativen Bedingungen aufgereinigt worden. Dafür wurden kompetente *E. coli*-Zellen vom Stamm BL21 pDE3 RIPL (s. 5.1.5.1) mit 1 µl vom Plasmid pTS16 transformiert (s. 5.2.1.10). Nach Ausplattierung auf eine LB-Kanamycin-Selektionsplatte (s. 5.2.1.1) und Inkubierung für 16 h bei 37°C, erfolgte die Inokulierung in 10 ml LB-Flüssigmedium (Endkonzentration: 25 µg/ml Kanamycin). Diese Vorkultur wurde 16 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Davon wurde dann

eine Hauptkultur von zweimal 500 ml (Endkonzentration: 25 µg/ml Kanamycin) mit je 50 ml Vorkultur inokuliert und diese bei 37°C geschüttelt bis  $OD_{600}=0,5$  erreicht war. Dann wurde die Kultur unter Schütteln auf ca. 30°C temperiert und nochmals der  $OD_{600}$  photometrisch bestimmt, der nun bei  $OD_{600}\sim 0,6-0,7$  lag. Die Überexpression wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM) induziert. Es folgte eine Inkubation für weitere 6 h bei 30°C unter Schütteln und nach Bestimmung des  $OD_{600}$  die Ernte der Kulturen. Diese wurden auf vier 500 ml Zentrifugengefäße verteilt (je 250 ml) und 5 Min. bei 4000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 25 ml eisgekühltem 1× PBS gewaschen und in 50 ml-Zentrifugengefäße überführt. Nach nochmaliger Zentrifugation für 10 Min. bei 4000 g und 4°C erfolgte Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff und Lagerung bei -80°C. Zum Aufschluss der Zellen wurden diese wieder langsam auf Eis aufgetaut und mit 10 ml 1× *E. coli*-Lysepuffer versetzt, mit Lysozym (Endkonzentration: 1mg/ml) und 1/25 Volumen PIC resuspendiert und für 1-2 h auf Eis geschüttelt. Dann wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung über Eis aufgeschlossen. Die Einstellungen waren hierfür 10 Sek. Puls mit 10 Sek. Pause für 1 Min. Dieses Ultraschallpulsmuster wurde mit jeweils längeren Pausen auf Eis so fünfmal wiederholt. Die löslichen Proteine wurden dann von den Zelltrümmern und unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation bei 20000 g und 4°C für 20 Min. getrennt. Zur nativen Aufreinigung des SOUL3 Proteins wurden Kobalt-Metallionchromatographie-Säulen (Takara-Clonotech, Frankreich) verwendet. Diese wurden zuerst mit 600 µl Puffer A äquilibriert, für 2 Min. bei 700 g und 4°C abzentrifugiert, bevor 600 µl des Lysates auf die Säulen gegeben werden konnten. Nach Zentrifugation für 2 Min. bei 700 g und 4°C erhielt man die erste Durchlauf fraktion, die nochmals auf die Säule gegeben wurde, um die maximale Bindung der Histidin-markierten Proteine zu erreichen. Nach nochmaliger Zentrifugation (s. oben), folgten drei Waschschr itte mit je 600 µl Puffer A und jeweils Zentrifugationsschr itte für 2 Min. bei 700 g und 4°C. Alle bisher erhaltenen Fraktionen wurden auf Eis gelagert und zur späteren Überprüfung der Reinheit der Überexpression aufbewahrt. Die Eluierung der an der Kobalt-Säule gebundenen Histidin-markierten Proteine erfolgte durch Zugabe von 200 µl Puffer B und anschließender Zentrifugation für 2 Min. bei 700 g und 4°C. Dieser Eluierungsschr itt wurde nochmals unter den gleichen Bedingungen wiederholt (s. oben) und man erhielt die Eluierungsfractionen 1 und 2. Zur Überprüfung der Aufreinigung der überexprimierten, mit Histidin-markierten Proteinen wurden alle Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt (s. 5.2.3.7) und das Gel im Anschluss mit Coomassie gefärbt (s. 5.2.3.8). Auch wurden zum Nachweis der aufgereinigten Proteine Immunodetektionen mit spezifischen Antikörpern gegen SOUL3-Protein (s. 5.2.3.11) durchgeführt.

2× <i>E. coli</i> -Lysepuffer für die native Aufreinigung von mit Histidin markierten Proteinen	84 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O, 16 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O, ergibt Phosphatpuffer mit pH 7,5; 600 mM NaCl; 20% (v/v) Glycerin, 1% (v/v) Triton X-100; 20 mM Imidazol
Puffer A für die Aufreinigung von mit Histidin markierten Proteinen	42 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O, 8 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O, ergibt Phosphatpuffer mit pH 7,5; 200 mM NaCl; 10% (v/v) Glycerin; 20 mM Imidazol
Puffer B für die Aufreinigung von mit Histidin markierten Proteinen	42 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O, 8 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O, ergibt Phosphatpuffer mit pH 7,5; 200 mM NaCl; 10% (v/v) Glycerin; 300 mM Imidazol

### 5.2.3.17 Entfernung der Histidin-Markierung bei nativ aufgereinigten Proteinen

Um mit dem nativ aufgereinigtem SOUL3-Protein den Hämin-Agarose-Bindungsversuch durchzuführen, wurde in einem nächsten Schritt die Histidin-Markierung entfernt. Dazu wurde zuerst das Volumen des Gesamteluats mittels 10-kDa-Größenausschlußfilter Säulen (Millipore) nach Herstellerangaben auf 500 µl reduziert und dann gegen 1 Liter 1× TAGzyme-Puffer (Qiagen) über Nacht bei 4°C dialysiert. Dieser Dialyseschritt wurde am nächsten Morgen 2 h mit 500 ml 1× TAGzyme-Puffer wiederholt. Die Entfernung der Histidin-Markierung wurde mittels einer Dipeptidase von Qiagen durchgeführt. Dabei wurde nach dem Protokoll TAGZyme Kit von Qiagen vorgegangen. Nach nochmaliger Dialyse gegen Puffer I (s. 5.2.3.18) erfolgte eine subtraktive Ionenmetallaffinitätschromatographie (IMAC) mit Nickel-Nitrilotriessigsäure (Nickel-NTA)-Säulen von Qiagen, um Reste von Histidin-markiertem SOUL3 und das DAPase Enzym zu entfernen. Bei jedem Schritt wurden Proben gesichert, um sie später mittels SDS-Gelelektrophorese (s. 5.2.3.7) und Immunodetektion (s. 5.2.3.11) mit Anti-SOUL3-Antikörper (s. 2.1.11.1.) zu analysieren.

1× TAGzyme-Puffer	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 150 mM NaCl
-------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------

### 5.2.3.18 Kofaktor-Bindungsversuch mit Hämin-Agarose

Zur Vorbereitung des Bindungsversuches wurden 100 µl Hämin-Agarose-Suspension (Sigma-Aldrich) in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und mit Puffer I zweimal gewaschen und dabei jeweils bei 500 g, 4°C und 1 Min. im Ausschwingrotor zentrifugiert. Dann wurden 60 µg heterolog exprimiertes natives SOUL3-Protein (s. 5.2.3.16 und 5.2.3.17) zur gewaschenen

Hämin-Agarose gegeben und bei 4°C für 1 h inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit je 1 ml Puffer I und nochmals drei Waschschriffe mit je 1 ml Puffer II bei gleichen Zentrifugationsbedingungen. Nachdem die letzte Waschfraktion abgenommen wurde, wurde gebundenes Protein mit 100 µl 2× SDS-Probenpuffer bei 100°C für 5 Min. eluiert. Alle Fraktionen wurden für eine Analyse *via* SDS-Gelelektrophorese (s. 5.2.3.7) und Immunodetektion (s. 5.2.3.11) mit Anti-SOUL3-Antikörper (s. 5.1.10.1) und mit 2× SDS-Probenpuffer (s. 5.2.3.7) versetzt und denaturiert. Für eine Analyse der Bindungsspezifität wurden 0,1 nmol SOUL3-Protein vor Inkubation mit Hämin-Agarose mit steigenden Konzentrationen an freiem Hämin (Merck) versetzt (Tabelle 1). Hierbei wurde Hämin in 10 mM NaOH gelöst und eine Stammlösung von 1 mM hergestellt. Es wurden sechs Verdünnungen mit je gleicher Menge an aufgereinigtem Δ6×His-SOUL3-Protein in Puffer II vorgelegt (s. Tabelle 6). Nach Zugabe einer entsprechenden Menge an 1 mM Hämin-Stammlösung (Tabelle 6) wurden die sechs Reaktionsgefäße vorsichtig geschüttelt. Nach Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur wurden 50 µl Hämin-Agarose (~200 nmol) zugegeben und der Bindungsversuch mit Hämin-Agarose, wie bereits oben beschrieben, durchgeführt.

**Tabelle 6: Herstellung der Hämin Verdünnungsreihe für das Sättigungsexperiment.**

Hämin- Endkonzentration	0 nmol	0,1 nmol	0,25 nmol	0,5 nmol	1 nmol	10 nmol
<b>0,102 nmol Δ6× His-SOUL3</b>			38,5 µl (Konz.: 130 ng/µl)			
<b>1 mM Hämin Stammlösung</b>	0 µl	1 µl einer 1:10 verdünnten 1 mM Hämin Stammlösung	0,25 µl	0,5 µl	1 µl	10 µl
<b>Puffer II</b>	161,5 µl	160,5 µl	161,25 µl	161,0 µl	160,5 µl	151,5 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	200 µl					

Puffer I	18,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA
Puffer II	18,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 100 mM NaCl
Hämin-Stammlösung	1 mM Hämin gelöst in 10 mM NaOH

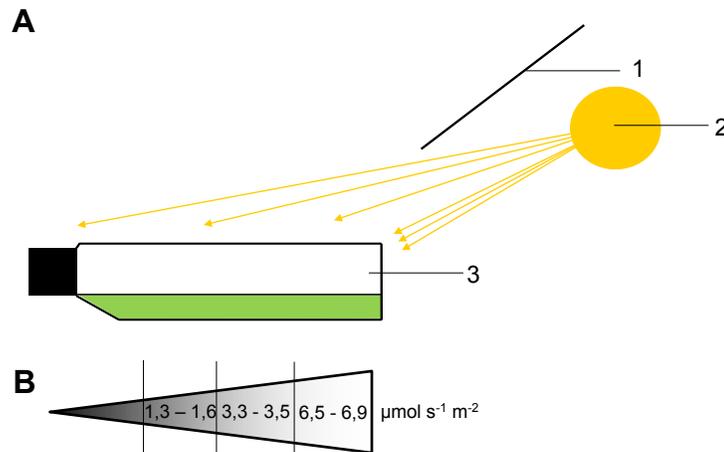
### 5.2.3.19 Messung der spektroskopischen Eigenschaften von SOUL3 im Lichtspektrum

Um das Absorptionsverhalten von SOUL3 mit und ohne Hämin als Kofaktor zu untersuchen, wurde SOUL3 in *E.coli* exprimiert und nativ aufgereinigt (s. 5.2.3.16). Die Eluate von sechs Kobalt-Säulen wurden vereinigt und das Volumen mittels 30-kDa-Größenausschlußfilter-Säulen (Millipore) nach Herstellerangaben auf 250 µl eingengt. Zur Entfernung des restlichen Imidazols wurden 4 ml 1× PBS (s. 5.2.3.14) zugegeben und nochmals auf 250 µl eingengt. Nach nochmaliger Zugabe von 4 ml 1× PBS wurde das Volumen wieder auf 250 µl eingengt. Das so aufgereinigte und konzentrierte SOUL3 Protein wurde dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt (s. 5.2.3.6). Die Proteinkonzentration wurde mit Verdünnungspuffer eingestellt, Hämin (Endkonzentration: 20 µM) zugegeben und für mindestens 20 Min. auf Eis inkubiert. Die Absorption wurde am Photometer (Specord 40, Analytik Jena) mit folgenden Einstellungen gemessen: Abtastung im Wellenlängenbereich von 220 nm bis 650 nm in 1 nm-Schritten, als Leerwert wurde entweder Hämin bzw. SOUL3-Protein in gleicher Konzentration verwendet.

Hämin-Stammlösung	1 mM Hämin gelöst in 10 mM NaOH
Verdünnungspuffer	100 mM Tris-Cl (pH 7,5); 100 mM NaCl

### 5.2.3.20 Manuelle Messung der Photoaxis bei *C. reinhardtii*

Bei der manuellen Messung der Phototaxis wurde ähnlich verfahren wie bei der automatisierten Methode. Nur wurden hier 50 ml TAP Kulturen mit entsprechenden *C. reinhardtii*-Stämmen direkt angeimpft und bis zu einer Zelldichte von  $3-6 \times 10^6$  Zellen/ml kultiviert, die Zellzahl bestimmt (s. 5.2.2.3) und mit Minimalmedium gewaschen. Die Zellzahl wurde dann auf  $1 \times 10^5$  Zellen/ml mit Minimalmedium im Volumen von 50 ml eingestellt. Jeder Kulturkolben wurde mit einem sterilen Zellstoffstopfen abgedichtet, der mit einem Belüftungsröhrchen versehen war. Die Kulturen wurden daraufhin in einem Lichtschrank für 18h bei 23°C mit steriler Luft belüftet. Nach 18 h wurden von jedem *C. reinhardtii*-Stamm 10 ml in Nunc®-Kulturfläschchen gegeben und unter einem Lichtgradienten gegenüber Schwachlicht exponiert (Abbildung 34). Die Dokumentation erfolgte durch Photographien, die zu bestimmten Tageszeiten gemacht wurden.



**Abbildung 34:** (A) Versuchsaufbau zur manuellen Messung der Phototaxis. (1) Abdeckung zur Einstellung des Lichtgradienten; (2) Lichtquelle; (3) Nunc®-Kulturfläschchen (3). (B) Verteilung der Lichtintensitäten im Lichtgradienten.

### 5.2.3.21 Hellfeldmikroskopie und Messung der Augenfleckgröße bei *C. reinhardtii*

Für Routineuntersuchungen von *C. reinhardtii*-Zellen unter dem Mikroskop wurden diese für drei bis fünf Tage im Minimalmedium (s. 5.2.2.1) kultiviert. 4  $\mu\text{l}$  der Zellkultur wurden direkt, ohne Fixierungsmittel, auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem kleinen Deckglas abgedeckt. Bilder der Zellen wurden am Mikroskop Axiophot 2 (Carl Zeiss, Jena) mit installierter ICC1 Kamera (Carl Zeiss, Jena) gemacht. Die Position des Augenflecks wurde unter dem Mikroskop visuell bestimmt und dokumentiert. Dabei wurde unterschieden, ob sich der Augenfleck nahe dem Flagellenpol der Zelle (anterior) oder in Richtung des Zellpols beim Pyrenoiden (posterior) verschob. Die Bestimmung der Augenfleckgröße wurde im Labor von Prof. Dr. Georg Kreimer in Erlangen durchgeführt. *C. reinhardtii*-Zellen wurden hierfür fünf Tage bei 15°C kultiviert und ohne Zusatz von Fixierungsmitteln wie oben bereits beschrieben an einem Nikon E800 Mikroskop mit Plan Apo 100 $\times$  Oil Ph3 DM-Objektiv untersucht. Von einer ausreichenden Menge Zellen wurden Bilder gemacht und die Größe des Augenflecks mit der Software NIS Elements BR3.2 bestimmt.

## 5.2.4 Massenspektrometrische (MS) Proteinanalyse

### 5.2.4.1 MS-kompatible SDS-PAGE

Die Probenvorbereitung für die Messung im Massenspektrometer erfolgte nach Schmidt et al., 2006. Um Kontamination der Proben durch Keratin aus Haaren, Wolle, Hautpartikeln etc. zu minimieren, wurde entsprechende Schutzkleidung getragen. Alle Puffer und Lösungen wurden

immer frisch in speziell für die Massenspektrometrie geeignetem Wasser angesetzt und über eine Nitrozellulosemembran (s. 5.1.3) mit einer Porengröße von 0,45  $\mu\text{m}$  sterilfiltriert. Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden nur aus frisch geöffneten Verpackungen verwendet. Die zu analysierenden Proteinproben wurden elektrophoretisch in einem speziell für die Massenspektrometrie geeigneten 10%-igen Acrylamid/Piperazindiacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden mit einer Stromstärke von 40 mA bei einer Spannung von maximal 250 V in einer Länge von 5 cm aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel unter Verwendung des „Colloidal Blue Staining“ Kits (s. 5.1.3) gemäß den Anweisungen des Herstellers für mindestens 1 h gefärbt. Die Färbung wurde durch zweimaliges Waschen mit extrareinem Wasser (s. oben) gestoppt. Jede Gellaufspur wurde nun mit einem in Ethanol gereinigten Skalpell in Stücke zu 0,5 cm zerteilt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Um die Gelstücke zu entfärben wurden diese abwechselnd mit Waschlösung A und Waschlösung B für je 10 Min. unter leichtem Schütteln gewaschen. Dabei war darauf zu achten, dass die Gelstücke vollkommen mit Flüssigkeit bedeckt waren. Dies wurde wiederholt, bis die Gelstücke vollständig entfärbt waren. Es wurde mit Lösung B geendet. Die Gelstücke wurden in der Vakuumentrifuge getrocknet und bis zur Weiterverwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Trenngel 10%:	9,9 ml ddH <sub>2</sub> O; 8,3 ml 30% (w/v) Acrylamid / 0,8% (w/v) Piperazindiacrylamid; 6,3 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 250 $\mu\text{l}$ 10% (w/v) SDS; 10 $\mu\text{l}$ TEMED; 250 $\mu\text{l}$ 10% (w/v) Ammoniumperoxidisulfat
Sammelgel (5%):	6,8 ml ddH <sub>2</sub> O; 1,7 ml 30% (w/v) Acrylamid / 0,8% (w/v) Piperazindiacrylamid; 1,25 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 100 $\mu\text{l}$ 10% (w/v) SDS; 10 $\mu\text{l}$ TEMED; 100 $\mu\text{l}$ 10% (w/v) Ammoniumperoxidisulfat
10 $\times$ Elektrophorese-Puffer:	250 mM Tris; 2500 mM Glycin; 1% (w/v) SDS
Waschlösung A:	50 mM NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub>
Waschlösung B:	25 mM NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> Acetonitril 1:1

#### 5.2.4.2 Tryptischer In-Gel-Verdau

Der tryptische In-Gel-Verdau wurde von Mark Kaminsky bzw. Wolfram Weisheit durchgeführt. Für den Verdau wurde die Serinprotease Trypsin (s. 5.1.4) verwendet, die substratspezifisch am C-terminalen Ende nach Lysin oder Arginin schneidet. Somit entstehen definierte Peptide. Die Hydrolyse der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine fand direkt im Gelstück statt (Im-Gel-Verdau). Die Gelstücke wurden in 50  $\mu\text{l}$  Trypsin-Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung für 20

Min. auf Eis quellen gelassen, die überflüssige Lösung abgenommen und die Gelstücke mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat überschichtet. Der Verdau fand bei 37°C über Nacht statt. Um die erhaltenen Peptide nach dem Verdau aus dem Gel herauszulösen, wurde die Inkubationslösung abgenommen und in einem Reaktionsgefäß aufbewahrt. Das Gelstück wurde mit Acetonitril/ddH<sub>2</sub>O (3:2) überschichtet und für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Extraktionslösung, in der sich die herausgelösten Peptide befanden, wurde mit der Inkubationslösung vereint. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt und die vereinigten Überstände anschließend in der Vakuumzentrifuge eingedampft. Die Proben waren nun bereit für die qualitative Analyse im Massenspektrometer.

### 5.2.4.3 Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie

Die Analyse der Proben mit dem Massenspektrometer wurde von Marc Kaminsky bzw. Wolfram Weisheit durchgeführt. Hierbei kam ein Finnigan LTQ (Thermo Electron), ein Massenspektrometer mit einer linearen Ionenfalle, einer Nano-Elektrospray-Ionisierungsapparatur und einer vorgeschalteten Nano-HPLC von Dionex (Ultimate 3000) zum Einsatz (nLC-ESI-Massenspektrometer). Als Software für die Identifizierung der Peptide und entsprechenden Proteine wurde der Thermo Proteome Discoverer 1.0 (Thermo Fisher Scientific) mit dem Sequest-Algorithmus (Link et al., 1999) verwendet. Es wurden Peptide mit bis zu zwei ausgelassenen Trypsin-Schnittstellen akzeptiert. Als Datenbank wurde sowohl die publizierte Version 4.0 des „Joint Genome Instituts“ (Merchant et al., 2007) als auch das „*Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplast Genome“ (Maul et al., 2002) verwendet. Für die signifikante Identifizierung von Peptiden waren zwei Faktoren maßgebend: einerseits musste der minimale Korrelationsfaktor Xcorr (Eng et al., 1994) von 2,0 für einfach; 2,5 für zweifach und 3,0 für dreifach positiv geladene Ionen erreicht werden. Mit diesem konnte eine Aussage über die Korrelation zwischen dem gemessenen MS/MS-Spektrum und dem *in situ* hergestellten, also theoretischen MS/MS-Spektrum des Peptides in der Datenbank gemacht werden. Andererseits musste die gesamte Probe eine *false discovery rate* (FDR)  $\leq 1\%$  aufweisen. Die FDR ergab sich aus der parallelen Analyse des Datensatzes gegen die inverse Datenbank. Durch Anheben des Grenzwertes für den minimalen Xcorr der einzelnen Ladungszustände der Peptide wurde das Verhältnis der in der regulären Datenbank identifizierten Peptide zu den in der inversen Datenbank identifizierten Peptiden angepasst, um den Grenzwert der FDR einzuhalten.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ahmed, N.T., Gao, C., Lucker, B.F., Cole, D.G., Mitchell, D.R. (2008). ODA16 aids axonemal outer row dynein assembly through an interaction with the intraflagellar transport machinery. *J Cell Biol* **183**, 313–322.
- Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S., Fukuzawa, H., Tabata, S. (1999). A large scale structural analysis of cDNAs in a unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Generation of 3433 non-redundant expressed sequence tags. *DNA Res* **6**, 369–373.
- Asamizu, E., Nakamura, Y., Miura, K., Fukuzawa, H., Fujiwara, S., Hirono, M., Iwamoto, K., Matsuda, Y., Minagawa, J., Shimogawara, K. (2004). Establishment of publicly available cDNA material and information resource of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta) to facilitate gene function analysis. *Phycologia* **43**, 722–726.
- Asuthkar, S., Velineni, S., Stadlmann, J., Altmann, F., Sritharan, M. (2007). Expression and characterization of an Iron-Regulated Hemin-Binding Protein, HbpA, from *Leptospira interrogans* Serovar Lai. *Infect Immun* **75**, 4582–4591.
- Beale, S.I. (1999). Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynth Res* **60**, 43–73.
- Beck, C.F., Grimm, B. (2006). Involvement of tetrapyrroles in cellular regulation. In: chlorophylls and bacteriochlorophylls **SE-16** Springer Netherlands, 223–235.
- Beel, B., Prager, K., Spexard, M., Sasso, S., Weiss, D., Müller, N., Heinnickel, M., Dewez, D., Ikoma, D., Grossman, A. R. (2012). A flavin binding Cryptochrome photoreceptor responds to both blue and red light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **24**, 2992–3008.
- Berry, E.A., Trumpower, B.L. (1987). Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra. *Analytical biochemistry* **161**, 1–15.
- Berthold, P., Tsunoda, S.P., Ernst, O.P., Mages, W., Gradmann, D., Hegemann, P. (2008). Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in *Chlamydomonas* by immediate light-induced depolarization. *Plant Cell* **20**, 1665–1677.
- Bjerrum, O.J. and Schafer-Nielsen, C. (1986). Buffer systems and transfer parameters for semidry electroblotting with a horizontal apparatus. *Dunn MJ (ed) Electrophoresis '86*, 315–327.
- Boesger, J., Wagner, V., Weisheit, W., Mittag, M. (2009). Analysis of flagellar phosphoproteins from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **8**, 922–32.
- Boyd, J.S., Gray, M.M., Thompson, M.D., Horst, C.J., Dieckmann, C.L. (2011a). The daughter four-membered microtubule rootlet determines anterior-posterior positioning of the eyespot in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cytoskeleton* **68**, 459–469.
- Boyd, J.S., Mittelmeier, T.M., Dieckmann, C.L. (2011b). New insights into eyespot placement and assembly in *Chlamydomonas*. *Bioarchitecture* **1**, 196–199.
- Boyd, J.S., Mittelmeier, T.M., Lamb, M.R., Dieckmann, C.L. (2011c). Thioredoxin-family protein EYE2 and Ser/Thr kinase EYE3 play interdependent roles in eyespot assembly. *Mol Biol Cell* **22**, 1421–1429.
- Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, J.P., Johnson, A.M., Jones, A.R., Randolph-Anderson, B.L., Robertson, D., Klein, T.M., Shark, K.B. (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* **240**, 1534–1538.
- Bréhélin, C., Kessler, F., van Wijk, K.J. (2007). Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends Plant Sci* **12**, 260–266.

- Bruce, V. G.** (1970). The biological clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **70**, 225-233.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M.** (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376–379.
- Byrne, T.E., Wells, M.R., Johnson, C.H.** (1992). Circadian rhythms of chemotaxis to ammonium and of methylammonium uptake in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* **98**, 879–886.
- Casas-Mollano, J.A., Jeong, B.-R., Xu, J., Moriyama, H., Cerutti, H.** (2008). The MUT9p kinase phosphorylates histone H3 threonine 3 and is necessary for heritable epigenetic silencing in *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 6486–6491.
- Chu, G.C., Katakura, K., Zhang, X., Yoshida, T., Ikeda-Saito, M.** (1999) Heme degradation as catalyzed by a recombinant bacterial heme oxygenase (Hmu O) from *Corynebacterium diphtheriae*. *J Biol Chem* **274**, 21319–21325.
- Crutchfield, A.L.M., Diller, K.R., Brand, J.J.** (1999). Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *Eur J Phycol* **34**, 43–52.
- Cryderman, D.E., Tang, H., Bell, C., Gilmour, D.S., Wallrath, L.L.** (1999). Heterochromatic silencing of *Drosophila* heat shock genes acts at the level of promoter potentiation. *Nucleic Acids Res* **27**, 3364–3370.
- Daan, S., Pittendrigh, C.S.** (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *J Comp Physiol* **106**, 253–266.
- Darwin, C.** (1859). *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life* (1st ed.). London: John Murray.
- Dathe, H., Prager, K., Mittag, M.** (2012). Novel interaction of two clock-relevant RNA-binding proteins C3 and XRN1 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* **586**, 3969–3973.
- Davies, J.P., Weeks, D.P., Grossman, A.R.** (1992). Expression of the arylsulfatase gene from the beta 2-tubulin promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Res* **20**, 2959–2965.
- Davis, S.J., Bhoo, S.H., Durski, A.M., Walker, J.M., Vierstra, R.D.** (2001). The heme-oxygenase family required for phytochrome chromophore biosynthesis is necessary for proper photomorphogenesis in higher plants. *Plant Physiol* **126**, 656–669.
- DeBruyne, J.P., Weaver, D.R., Reppert, S.M.** (2007). CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nature Neurosc* **10**, 543–545.
- Descartes, R.** (1649). *Les passions de l'âme* (Passions of the soul).
- Devlin, P.F., Kay, S.A.** (2001). Circadian photoperception. *Annu Rev Physiol* **63**, 677–694.
- Dias, J.S., Macedo, A.L., Ferreira, G.C., Peterson, F.C., Volkman, B.F., Goodfellow, B.J.** (2006). The first structure from the SOUL/HBP family of heme-binding proteins, murine P22HBP. *J Biol Chem* **281**, 31553–31561.
- Dóczy R., Brader, G., Pettkó-Szandtner, A., Rajh, I., Djamei, A., Pitzschke, A., Teige, M., Hirt, H.** (2007). The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *Plant Cell* **19**, 3266–3279.
- Duanmu, D., Casero, D., Dent, R.M., Gallaher, S., Yang, W., Rockwell, N.C., Martin, S.S., Pellegrini, M., Niyogi, K.K., Merchant, S.S.** (2013). Retrograde bilin signaling enables *Chlamydomonas* greening and phototrophic survival. *PNAS* **110**, 3621–3626.
- Dutcher, S.K.** (2003). Elucidation of basal body and centriole functions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Traffic* **4**, 443–451.

- Eisenreich, W., Rohdich, F., Bacher, A.** (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci* **6**, 78–84.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., Von Heijne, G.** (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**, 1005–1016.
- Eng, J.K., McCormack, A.L., Yates, J.R.** (1994). An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom* **5**, 976–989.
- Fernández, E., Schnell, R., Ranum, L.P., Hussey, S.C., Silflow, C.D., Lefebvre, P.A.** (1989). Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. *PNAS* **86**, 6449–6453.
- Fischer, N., Rochaix, J.D.** (2001). The flanking regions of *PsaD* drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *MGG* **265**, 888–894.
- Fortunato, A.E., Langellotto, F., Sordino, P.** (2011). Identification and expression of *soul/p22HBP* genes in zebrafish. *GEP* **11**, 360–369.
- Foster, K.W., Saranak, J., Patel, N., Zarilli, G., Okabe, M., Kline, T., Nakanishi, K.** (1984). A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*. *Nature* **311**, 756–759.
- Foster, K.W., Smyth, R.D.** (1980). Light antennas in phototactic algae. *Microbiol Rev* **44**, 572–630.
- Franzén, L.G., Rochaix, J.D., Von Heijne, G.** (1990). Chloroplast transit peptides from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* share features with both mitochondrial and higher plant chloroplast presequences. *FEBS Lett* **260**, 165–168.
- Fuhrmann, M., Stahlberg, A., Govorunova, E., Rank, S., Hegemann, P.** (2001). The abundant retinal protein of the *Chlamydomonas* eye is not the photoreceptor for phototaxis and photophobic responses. *J Cell Sci* **114**, 3857–3863.
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S., Lazarow, P.B.** (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **93**, 97–102.
- Gehring, W.J.** (2004). Historical perspective on the development and evolution of eyes and photoreceptors. *Int J Dev Biol* **48**, 707–717.
- Gehring, W.J.** (2005). New perspectives on eye development and the evolution of eyes and photoreceptors. *J Hered* **96**, 171–184.
- Geimer, S., Melkonian, M.** (2004). The ultrastructure of the *Chlamydomonas reinhardtii* basal apparatus: identification of an early marker of radial asymmetry inherent in the basal body. *J Cell Sci* **117**, 2663–2674.
- Gooch, V.D., Wehseler, R.A., Gross, C.G.** (1994). Temperature effects on the resetting of the phase of the *Neurospora* circadian rhythm. *J Biol Rhythms* **9**, 83–94.
- Goodenough, U.W., Hwang, C., Warren, A.J.** (1978). Sex-limited expression of gene Loci controlling flagellar membrane agglutination in the *Chlamydomonas* mating reaction. *Genetics* **89**, 235–243.
- Goto, K., Johnson, C.H.** (1995). Is the cell division cycle gated by a circadian clock? The case of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* **129**, 1061–1069.
- von Gromoff, E.D., Schroda, M., Oster, U., Beck, C.F.** (2006). Identification of a plastid response element that acts as an enhancer within the *Chlamydomonas* HSP70A promoter. *Nucleic Acids Res* **34**, 4767–4779.

- von Gromoff, E.D., Alawady, A., Meinecke, L., Grimm, B., Beck, C.F.** (2008). Heme, a plastid-derived regulator of nuclear gene expression in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **20**, 552–567.
- Gumpel, N., Rochaix, J.-D., Purton, S.** (1994). Studies on homologous recombination in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet* **26**, 438–442.
- Guo, Y., Guo, G., Mao, X., Zhang, W., Xiao, J., Tong, W., Liu, T., Xiao, B., Liu, X., Feng, Y.** (2008). Functional identification of HugZ, a heme oxygenase from *Helicobacter pylori*. *BMC Microbiol* **8**, 226.
- Häder, D.-P., Melkonian, M.** (1983). Phototaxis in the gliding flagellate, *Euglena mutabilis*. *Arch Microbiol* **135**, 25–29.
- Halberg, F., Halberg, E., Barnum, C.P., Bittner, J.J.** (1959). Physiologic 24-hour periodicity in human beings and mice, the lighting regimen and daily routine. In: Photoperiodism and related phenomena in plants and animals. *Publ. Amer. Ass. Advancement Sci.* **55**, 803–878.
- Haldall, P.** (1957). Importance of calcium and magnesium ions in phototaxis of motile green algae. *Nature* **26**, 215–216.
- Han, Y., Meyer, M.H.F., Keusgen, M., Klug, G.** (2007). A haem cofactor is required for redox and light signalling by the AppA protein of *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **64**, 1090–1104.
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., Kay, S.A.** (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* **290**, 2110–2113.
- Harris, E.H.** (1989). The *Chlamydomonas* Sourcebook. A comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic Press, San Diego, CA, 1989.
- Harris, E. H.** (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 363–406.
- Harz, H., Nonnengässer, C., and Hegemann, P.** (1992). The photoreceptor current of the green alga *Chlamydomonas*. *Phil. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.* **338**, 39–52.
- Hegemann, P.** (2008). Algal sensory photoreceptors. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 167–189.
- von Heijne, G.** (1992). Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* **225**, 487–494.
- Hesse, H. and Hoefgen, R.** (2003). Molecular aspects of methionine biosynthesis. *Trends Plant Sci* **8**, 259–262.
- Hofmann, K. and Stoffel, W.** (1993). TMBASE - a database of membrane spanning protein segments. *Biol Chem* **374**, 166.
- Holmes, J.A., Dutcher, S.K.** (1989). Cellular asymmetry in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Sci* **94** (Pt 2), 273–285.
- Huang, K., Beck, C.F.** (2003). Phototropin is the blue-light receptor that controls multiple steps in the sexual life cycle of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *PNAS* **100**, 6269–6274.
- Hudson, O., Singh, B.K., Leustek, T., Gilvarg, C.** (2006). An LL-diaminopimelate aminotransferase defines a novel variant of the lysine biosynthesis pathway in plants. *Plant Physiol* **140**, 292–301.
- Iliev, D., Voytsekh, O., Schmidt, E.-M., Fiedler, M., Nykytenko, A., Mittag, M.** (2006). A heteromeric RNA-binding protein is involved in maintaining acrophase and period of the circadian clock. *Plant Physiol* **142**, 797–806.

- Immenschuh, S., Iwahara, S.-I., Schwennen, B.** (2002). Induction of heme-binding protein 23/peroxiredoxin I gene expression by okadaic acid in cultured rat hepatocytes. *DNA Cell Biol* **21**, 347–354.
- Ino, H.** (2004). Application of antigen retrieval by heating for double-label fluorescent immunohistochemistry with identical species-derived primary antibodies. *J Histochem Cytochem* **52**, 1209–1217.
- Jacob, B.B., Dailey, T.A., Lianchun, X., Dailey, H.A.** (2002). Characterization of a human and mouse tetrapyrrole-binding protein. *Arch Biochem Biophys* **407**, 196–201.
- Johnson, C.H., Kondo, T., Hastings, J.W.** (1991). Action spectrum for resetting the circadian phototaxis rhythm in the CW15 strain of *Chlamydomonas*: II. Illuminated cells. *Plant Physiol* **97**, 1122–1129.
- Kateriya, S., Nagel, G., Bamberg, E., Hegemann, P.** (2004). “Vision” in single-celled algae. *News Physiol Sci* **19**, 133–137.
- Kiaulehn, S., Voytsekh, O., Fuhrmann, M., Mittag, M.** (2007). The presence of UG-Repeat sequences in the 3'-UTRs of reporter luciferase mRNAs mediates circadian expression and can determine acrophase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J of Biol Rhythms* **22**, 275–277.
- Kiaulehn, S.** (2006). Bioinformatische Analyse des circadianen Systems von *Chlamydomonas reinhardtii* und molekularbiologische Charakterisierung von circadian relevanten *cis*-Elementen. Diplomarbeit an der Biologischen-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich Schiller Universität, Jena.
- Kindle, K.L.** (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1228–1232.
- Kleiner, O., Kircher, S., Harter, K., Batschauer, A.** (1999). Nuclear localization of the *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2. *Plant J* **19**, 289–296.
- Koblenz, B., Lechtreck, K.** (2005). The NIT1 promoter allows inducible and reversible silencing of centrin in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **4**, 1959–1962.
- Kondo, T., Johnson, C.H., Hastings, J.W.** (1991). Action spectrum for resetting the circadian phototaxis rhythm in the CW15 strain of *Chlamydomonas*: I. Cells in darkness. *Plant Physiol* **95**, 197–205.
- Kozminski, K.G., Johnson, K. A., Forscher, P., Rosenbaum, J.L.** (1993). A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5519–23.
- Kreimer, G., Melkonian, M.** (1990). Reflection confocal laser scanning microscopy of eyespots in flagellated green algae. *Eur J Cell Biol* **53**, 101–111.
- Kreimer, G., Brohsonn, U., Melkonian, M.** (1991). Isolation and partial characterization of the photoreceptive organelle for phototaxis of a flagellate green alga. *Eur J Cell Biol* **55**, 318–327.
- Kreimer, G., Overländer C., Sineshchekov O. A., Stolzis H., Nultsch W. et al.,** (1992). Functional analysis of the eyespot in *Chlamydomonas reinhardtii* mutant *ey627 mf*. *Planta* **188**, 513–521.
- Kreimer, G.** (2009). The green algal eyespot apparatus: a primordial visual system and more? *Curr Genet* **55**, 19–43.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L.** (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**, 567–580.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.

- Lamb, M.R., Dutcher, S.K., Worley, C.K., Dieckmann, C.L.** (1999). Eyespot-assembly mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **153**, 721–729.
- LeDizet, M., Piperno, G.** (1986). Cytoplasmic microtubules containing acetylated alpha-tubulin in *Chlamydomonas reinhardtii*: spatial arrangement and properties. *J Cell Biol* **103**, 13–22.
- Lee, H., Mochizuki, N., Masuda, T., Buckhout, T.** (2012). Disrupting the bimolecular binding of the haem-binding protein 5 (AtHBP5) to haem oxygenase 1 (HY1) leads to oxidative stress in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **63**, 695–709.
- Li, T., Bonkovsky, H.L., Guo, J.** (2011). Structural analysis of heme proteins: implications for design and prediction. *BMC Struct Biol* **11**, 13.
- Link, A.J., Eng, J., Schieltz, D.M., Carmack, E., Mize, G.J., Morris, D.R., Garvik, B.M., Yates, J.R.** (1999). Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotech* **17**, 676–682.
- Liu, C., Willmund, F., Whitelegge, J.P., Hawat, S., Knapp, B., Lodha, M., Schroda, M.** (2005). J-domain protein CDJ2 and HSP70B are a plastidic chaperone pair that interacts with vesicle-inducing protein in plastids. *Mol Biol Cell* **16**, 1165–1177.
- Lohr, M., Im, C.-S., Grossman, A.R.** (2005). Genome-based examination of chlorophyll and carotenoid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **138**, 490–515.
- Lundquist, P.K., Poliakov, A., Bhuiyan, N.H., Zybaylov, B., Sun, Q., Van Wijk, K.J.** (2012). The functional network of the *Arabidopsis* plastoglobule proteome based on quantitative proteomics and genome-wide coexpression analysis. *Plant Physiol* **158**, 1172–1192.
- Maines, M.D.** (1988). Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB* **2**, 2557–2568.
- Marmagne, A., Rouet, M.-A., Ferro, M., Rolland, N., Alcon, C., Joyard, J., Garin, J., Barbier-Brygoo, H., Ephritikhine, G.** (2004). Identification of new intrinsic proteins in *Arabidopsis* plasma membrane proteome. *MCP* **3**, 675–691.
- Martinez, S., Huang, D., Ponomarev, M., Cramer, W., Smith, J.** (1996). The heme redox center of chloroplast cytochrome f is linked to a buried five-water chain. *Prot Sci* **5**, 1081–1092.
- Matsuo, T., Okamoto, K., Onai, K., Niwa, Y., Shimogawara, K., Ishiura, M.** (2008). A systematic forward genetic analysis identified components of the *Chlamydomonas* circadian system. *Genes Dev* **22**, 918–930.
- Maul, J.E., Lilly, J.W., Cui, L., dePamphilis, C.W., Miller, W., Harris, E.H., Stern, D.B.** (2002). The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *Plant Cell* **14**, 2659–2679.
- Mayer, A. M. (1968).** *Chlamydomonas*: Adaption phenomena in phototaxis. *Nature* **217**, 875-876.
- Melkonian, M., and H. Robenek,** (1984). The eyespot apparatus of flagellated green algae: a critical review. *Prog Phycol Res* **3**, 193–268.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Maréchal-Drouard, L., et al.** (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* **318**, 245–250.
- Mergenhagen, D.** (1984). Circadian clock: genetic characterization of a short period mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *European J Cell Biol* **33**, 13-18.
- Merkle, T.** (2010). Nucleo-cytoplasmic transport of proteins and RNA in plants. *Plant Cell Rep* **30**, 153–176.
- Merril, C.R.** (1990). Gel staining techniques. *Methods in Enzymology* **182**, 2943–2943.

- Mittag, M., Kiaulehn, S., Johnson, C.H.** (2005). The circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. What is it for? What is it similar to? *Plant Physiol* **137**, 399–409.
- Mittelmeier, T.M., Berthold, P., Danon, A., Lamb, M.R., Levitan, A., Rice, M.E., Dieckmann, C.L.** (2008). C2 domain protein MIN1 promotes eyespot organization in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **7**, 2100–2112.
- Mittelmeier, T.M., Boyd, J.S., Lamb, M.R., Dieckmann, C.L.** (2011). Asymmetric properties of the *Chlamydomonas reinhardtii* cytoskeleton direct rhodopsin photoreceptor localization. *J Cell Biol* **193**, 741–753.
- Molnar, A., Schwach, F., Studholme, D.J., Thuenemann, E.C., Baulcombe, D.C.** (2007). miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* **447**, 1126–1129.
- Molnar, A., Bassett, A., Thuenemann, E., Schwach, F., Karkare, S., Ossowski, S., Weigel, D., Baulcombe, D.** (2009). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **58**, 165–174.
- Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A.M., Bamberg, E., Hegemann, P.** (2002). Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* **296**, 2395–2398.
- Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., Bamberg, E.** (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13940–13945.
- Nelson, J.A., Lefebvre, P.A.** (1995). Targeted disruption of the NIT8 gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cell Biol* **15**, 5762–5769.
- Neuhoff, V., Phillip, K., Zimmer, H.G., and Mesecke, S.** (1979). A simple versatile sensitive and volumeindependent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **360**, 1657–1670.
- Ossowski, S., Schwab, R., Weigel, D.** (2008). Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant J* **53**, 674–690.
- Pajuelo, E., Pajuelo, P., Clemente, M.T., Márquez, A.J.** (1995). Regulation of the expression of ferredoxin-nitrite reductase in synchronous cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* **1249**, 72–78.
- Pantakani, D.V.K., Swapna, L.S., Srinivasan, N., Mannan, A.U.** (2008). Spastin oligomerizes into a hexamer and the mutant spastin (E442Q) redistribute the wild-type spastin into filamentous microtubule. *J Neurochem* **106**, 613–24.
- Pazour, G.J., Sineshchekov, O.A., Witman, G.B.** (1995). Mutational analysis of the phototransduction pathway of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* **131**, 427–440.
- Pazour, G.J., Agrin, N., Leszyk, J., Witman, G.B.** (2005). Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *J Cell Biol* **170**, 103–113.
- Pittendrigh, C.S.** (1954). On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **40**, 1018–1029.
- Pittendrigh, C.S. and Caldarola, P.C.** (1973). General homeostasis of the frequency of circadian oscillators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70** 2697–2701.
- Pootakham, W., Gonzalez-Ballester, D., Grossman, A.R.** (2010). Identification and regulation of plasma membrane sulfate transporters in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* **153**, 1653–1668.

- Prade, L., Cowan-Jacob, S.W., Chemla, P., Potter, S., Ward, E., Fonne-Pfister, R.** (2000). Structures of adenylosuccinate synthetase from *Triticum aestivum* and *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Biol* **296**, 569–577.
- Pröschold, T., Harris, E.H., Coleman, A.W.** (2005). Portrait of a species : *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **170**, 1601–1610.
- Qin, H., Diener, D.R., Geimer, S., Cole, D.G., Rosenbaum, J.L.** (2004). Intraflagellar transport (IFT) cargo: IFT transports flagellar precursors to the tip and turnover products to the cell body. *J Cell Biol* **164**, 255–266.
- Randolph-Anderson, B.L., Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Johnson, A.M., Dorthu, M.P., Matagne, R.F.** (1991). Further characterization of the respiratory deficient dum-1 mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. *MGG* **231**, 235–244.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R.** (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* **63**, 647–676.
- Rey, P., Gillet, B., Römer, S., Eymery, F., Massimino, J., Peltier, G., Kuntz, M.** (2000). Over-expression of a pepper plastid lipid-associated protein in tobacco leads to changes in plastid ultrastructure and plant development upon stress. *Plant J* **21**, 483–494.
- Roberts, D.G.W., Lamb, M.R., Dieckmann, C.L.** (2001). Characterization of the EYE2 gene required for eyespot assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **158**, 1037-1049.
- Rochaix, J.-D.** (2004). Genetics of the biogenesis and dynamics of the photosynthetic machinery in eukaryotes. *Plant Cell* **16**, 1650–1660.
- Rockwell, N.C., Su, Y.-S., Lagarias, J.C.** (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 837–858.
- Roenneberg, T. and Rehman, J.** (1996). Nitrate, a nonphotic signal for the circadian system. *FASEB* **10**, 1443–1447.
- Rohr, J., Sarkar, N., Balenger, S., Jeong, B., Cerutti, H.** (2004). Tandem inverted repeat system for selection of effective transgenic RNAi strains in *Chlamydomonas*. *Plant J* **40**, 611–621.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press **2**, 931–957.
- Sasakura, Y., Kanda, K., Yoshimura-Suzuki, T., Matsui, T., Fukuzono, S., Shimizu, T.** (2005). Investigation of the relationship between protein-protein interaction and catalytic activity of a heme-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli* (Ec DOS) by protein microarray. *Biochemistry* **44**, 9598–9605.
- Sato, E., Sagami, I., Uchida, T., Sato, A., Kitagawa, T., Igarashi, J., Shimizu, T.** (2004). SOUL in mouse eyes is a new hexameric heme-binding protein with characteristic optical absorption, resonance Raman spectral, and heme-binding properties. *Biochemistry* **43**, 14189–14198.
- Schaller, K., David, R., Uhl, R.** (1997). How *Chlamydomonas* keeps track of the light once it has reached the right phototactic orientation. *Biophys J* **73**, 1562–1572.
- Schmidt, M., Geßner, G., Luff, M.** (2006). Proteomic analysis of the eyespot of *Chlamydomonas reinhardtii* provides novel insights into its components and tactic movements. *Plant Cell* **18**, 1908–1930.
- Schmollinger, S., Strenkert, D., Schroda, M.** (2010). An inducible artificial microRNA system for *Chlamydomonas reinhardtii* confirms a key role for heat shock factor 1 in regulating thermotolerance. *Curr Genet* **56**, 383–389.

- Schroda, M., Vallon, O., Whitelegge, J.P., Beck, C.F., Wollman, F.** (2001). The chloroplastic GrpE homolog of *Chlamydomonas*: Two isoforms generated by differential splicing. *Plant Cell* **13**, 2823–2839.
- Schroda, M., Beck, C.F., Vallon, O.** (2002). Sequence elements within an HSP70 promoter counteract transcriptional transgene silencing in *Chlamydomonas*. *Plant J* **31**, 445–455.
- Schroda, M.** (2006). RNA silencing in *Chlamydomonas*: mechanisms and tools. *Curr Genet* **49**, 69–84.
- Schroda, M., Blöcker, D., Beck, C.F.** (2000). The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *Plant J* **21**, 121–131.
- Schulze, T.** (2008) Charakterisierung des Augenfleckproteins SOUL3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. Diplomarbeit an der Biologischen-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich Schiller Universität, Jena.
- Schulze, T., Prager, K., Dathe, H., Kelm, J., Kiebling, P., Mittag, M.** (2010). How the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* keeps time. *Protoplasma* **244**, 3–14.
- Schulze, T., Schreiber, S., Iliev, D., Boesger, J., Trippens, J., Kreimer, G., Mittag, M.** (2013). The heme-binding protein SOUL3 of *Chlamydomonas reinhardtii* influences size and position of the eyespot. *Mol Plant* **6**, 931-944.
- Serrano, G., Herrera-Palau, R., Romero, J.M., Serrano, A., Coupland, G., Valverde, F.** (2009). *Chlamydomonas* CONSTANS and the evolution of plant photoperiodic signaling. *Curr Biol* **19**, 359–368.
- Shearman, L.P., Sriram, S., Weaver, D.R., Maywood, E.S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C.C., van der Horst, G.T., Hastings, M.H.** (2000). Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* **288**, 1013–1019.
- Silflow, C., Lefebvre, P.** (2001). Assembly and motility of eukaryotic cilia and flagella. Lessons from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **127**, 1500–1507.
- Simkin, A.J., Gaffé, J., Alcaraz, J.-P., Carde, J.-P., Bramley, P.M., Fraser, P.D., Kuntz, M.** (2007). Fibrillin influence on plastid ultrastructure and pigment content in tomato fruit. *Phytochem* **68**, 1545–1556.
- Sineshchekov, O.A., Jung, K., Spudich, J.L.** (2002). Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8689–8694.
- Sizova, I., Greiner, A., Awasthi, M., Kateriya, S., Hegemann, P.** (2013). Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases. *Plant J* **73**, 873–882.
- Stevens, D.R., Rochaix, J.D., Purton, S.** (1996). The bacterial phleomycin resistance gene ble as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *MGG* **251**, 23–30.
- Straley, S.C., Bruce, V.G.** (1979). Stickiness to glass: circadian changes in the cell surface of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **63**, 1175–1181.
- Strenkert, D., Schmollinger, S., Schroda, M.** (2013). Heat shock factor 1 counteracts epigenetic silencing of nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Res.* **41**, 5273–5289.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113–130.
- Suits, M.D.L., Pal, G.P., Nakatsu, K., Matte, A., Cygler, M., Jia, Z.** (2005). Identification of an *Escherichia coli* O157:H7 heme oxygenase with tandem functional repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16955–16960.

- Suyama, M., Doerks, T., Braun, I.C., Sattler, M., Izaurralde, E., Bork, P.** (2000). Prediction of structural domains of TAP reveals details of its interaction with p15 and nucleoporins. *EMBO Reports* **1**, 53–58.
- Szigeti, A., Bellyei, S., Gasz, B., Boronkai, A., Hocsak, E., Minik, O., Bogнар, Z., Varbiro, G., Sumegi, B., Gallyas, F.** (2006). Induction of necrotic cell death and mitochondrial permeabilization by heme binding protein 2/SOUL. *FEBS Lett* **580**, 6447–6454.
- Szigeti, A., Hocsak, E., Rapolti, E., Racz, B., Boronkai, A., Pozsgai, E., Debreceni, B., Bogнар, Z., Bellyei, S., Sumegi, B.** (2010). Facilitation of mitochondrial outer and inner membrane permeabilization and cell death in oxidative stress by a novel Bcl-2 Homology 3 domain protein. *J Biol Chem* **285**, 2140–2151.
- Takahashi, S., Ogawa, T., Inoue, K., Masuda, T.** (2008). Characterization of cytosolic tetrapyrrole-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Photochem Photobiol* **7**, 1216–1224.
- Takahashi, T., Watanabe, M.** (1993). Photosynthesis modulates the sign of phototaxis of wild-type *Chlamydomonas reinhardtii*: Effects of red background illumination and 3-(3', 4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea. *FEBS Lett* **336**, 516–520.
- Taketani, S., Adachi, Y., Kohno, H., Ikehara, S., Tokunaga, R., Ishii, T.** (1998). Molecular characterization of a newly identified heme-binding protein induced during differentiation of urine erythroleukemia cells. *J Biol Chem* **273**, 31388–31394.
- Tamai, T.K., Carr, A.J., Whitmore, D.** (2005). Zebrafish circadian clocks: cells that see light. *Biochem Soc Trans* **33**, 962–966.
- Tanaka, R., Tanaka, A.** (2007). Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **58**, 321–346.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Trippens, J., Greiner, A., Schellwat, J., Neukam, M., Rottmann, T., Lu, Y., Kateriya, S., Hegemann, P., Kreimer, G.** (2012). Phototropin influence on eyespot development and regulation of phototactic behavior in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **24**, 4687–4702.
- Voss, B., Meinecke, L., Kurz, T., Al-Babili, S., Beck, C.F., Hess, W.R.** (2011). Hemin and Magnesium-Protoporphyrin IX induce global changes in gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **155**, 892–905.
- Wagner, V., Ullmann, K., Mollwo, A., Kaminski, M., Mittag, M., Kreimer, G.** (2008). The phosphoproteome of a *Chlamydomonas reinhardtii* eyespot fraction includes key proteins of the light signaling pathway. *Plant Physiol* **146**, 772–788.
- Willmund, F. and Schroda, M.** (2005). HEAT SHOCK PROTEIN 90C is a Bona Fide Hsp90 that interacts with Plastidic HSP70B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **138**, 2310–2322.
- Witman, G.B.** (1993). *Chlamydomonas* phototaxis. *Trends Cell Biol* **3**, 403–408.
- Yin, L., Dragnea, V., Bauer, C.E.** (2012). PpsR, a regulator of heme and bacteriochlorophyll biosynthesis, is a heme-sensing protein. *J Biol Chem* **287**, 13850–13858.
- Ytterberg, A.J., Peltier, J., van Wijk, K.J.** (2006). Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. *Plant Physiol* **140**, 984–997.
- Zhang, L.** (2011). Heme biology: The secret life of heme in regulating diverse biological processes. World Scientific Pub Co.

- 
- Zhao, B., Schneid, C., Iliev, D., Schmidt, E.-M., Wagner, V., Wollnik, F., Mittag, M.** (2004). The circadian RNA-binding protein CHLAMY 1 represents a novel type heteromer of RNA recognition motif and lysine homology domain-containing subunits. *Eukaryot Cell* **3**, 815–825.
- Zhao, T., Wang, W., Bai, X., Qi, Y.** (2009). Gene silencing by artificial microRNAs in *Chlamydomonas*. *Plant J* **58**, 157–164.
- Zylka, M.J., Reppert, S.M.** (1999). Discovery of a putative heme-binding protein family (SOUL/HBP) by two-tissue suppression subtractive hybridization and database searches. *Brain Res Mol Brain Res* **74**, 175–181.

## 7. Anhang

### 7.1 Sequenzen und Vektoren

#### 7.1.1 SOUL/HBP Sequenzanalysen

	10	20	30	40	50	60	70
HBP (H.s.)	.....						
HBP1 (M.m.)	.....						
SOUL (A.t.)	.....						
HBP (E.s.)	.....						
SOUL (P.t.)	-MKISSRGIFAGVVWSIASVQDSFAFSASLTVAPHRWTVLQSSSTSGDDFSSFAASLETPTPSPRTRNNNN						
SOUL (V.c.)	MFSLSGLTPRHSGVRPSAHRKAAQSFIITLPNARRIILKAAP-----APLNETR---AEELALPDG						
SOUL3 (C.r.)	-MQLN--ARLHTQLRVSAARRHAAHFSRARSVHASRAPFCPPKLTSSYDEAPAVEERVLVKLENDVEPAG						
	80	90	100	110	120	130	140
HBP (H.s.)	.....						
HBP1 (M.m.)	.....						
SOUL (A.t.)	SSSITSSLSLLSSSPEKLPLINPIQRCPITYSGFRITASVNRAIRRPQSPAVSATESR-----						
HBP (E.s.)	.....						
SOUL (P.t.)	NKPRTWKDDLDLDPATEMNRRAQLFTDVSANQDIREAVETALDRKIDPLLTPTGKQLQDGRVAVR						
SOUL (V.c.)	DVSIEADAVLLREAEARQAFIMQDTCSTFLASDLKMLFEKGEITESRYSKIVFEDPI TKYSREGYVFN						
SOUL3 (C.r.)	NLNADAQATNLQEAERQRQAFIMNDTCRFLATDLKMLFEKGEITEARYSPIITFEDPI TKYTNREGYIFN						
	150	160	170	180	190	200	210
HBP (H.s.)	.....						
HBP1 (M.m.)	.....						
SOUL (A.t.)	.....						
HBP (E.s.)	.....						
SOUL (P.t.)	QLSTDLIPLSLAANARNPPTQLFSVRPQDLQKNGRFLNAV TNQMQLNQLTQRDLDLPSRIPSRISQQT						
SOUL (V.c.)	IRLLRRLFNIITFDLHSISVITGPDVSTARWTMEMVMWLLPWRPNITFTGRTVYKVDPRGTIVLSHTDYWDA						
SOUL3 (C.r.)	IRLLRRLFNIITFDLHSISVITGPDVSTARWTMEMVMWLLPWRPNITFTGRTVYRVDPQSGLILSHTDYWDA						
	220	230	240	250	260	270	280
HBP (H.s.)	.....						
HBP1 (M.m.)	.....						
SOUL (A.t.)	.....						
HBP (E.s.)	.....						
SOUL (P.t.)	EFVQEAAN-----VLRETPVGLKEPPYTLVATTN EYEIRDYAGYKVVSTNMAPAGEVYR--						
SOUL (V.c.)	LQRNAFLSLEGVQHTLQMF IQQQLQLTPTGIEYVVLKLLK EYEIRRYEYLVVAEAPTGP GS						
SOUL3 (C.r.)	LQRNGFLSLEGLQHVLRQFLQ--LQVTPGIEYVYVTLKRFKDYEIRAYEYLVVAEAPTGP GS						
	290	300	310	320	330	340	350
HBP (H.s.)	.....						
HBP1 (M.m.)	.....						
SOUL (A.t.)	.....						
HBP (E.s.)	.....						
SOUL (P.t.)	DDDRGTGVDGSGEGFN TLAGYLF GDNKQEVADMTTPVNI DVIT S-----TGRTMSFVMP						
SOUL (V.c.)	GPASGSGFSELASYLFGSNRAQLAEMTTTPVFNEVQP-----ETNSSVAMK FVME						
SOUL3 (C.r.)	GPASGAGFSDLARYLFGNTAQLAEMTTTPVFQNI EP-----SSNSSSTAMQ FVME						
	360	370	380	390	400	410	420
HBP (H.s.)	.....						
HBP1 (M.m.)	.....						
SOUL (A.t.)	.....						
HBP (E.s.)	.....						
SOUL (P.t.)	EPLAQDE--SKSVYETGNILIQDIPPARLAVRRFPGFATAGEQARQKEILLAALS LDDVELD---VPH						
SOUL (V.c.)	SRYSVDS--ALPAPLDPRIGR-KREEGRYAAAIRFSGWPLDYEVVQNERLLRDL LLDL RD						
SOUL3 (C.r.)	KRYADLA--ALPAPLDPRIGR-KREEGRYAAAIRFAGWPLDYEVVSNERQLRDLMLIRD						
	430	440	450	460	470	480	
HBP (H.s.)	.....						
HBP1 (M.m.)	.....						
SOUL (A.t.)	.....						
HBP (E.s.)	.....						
SOUL (P.t.)	PVGRS YRLMQYNPPYTLPWQRINAIAVQVYRGP GDSADTENAKGNSEREQMSSTISQAVGSP						
SOUL (V.c.)	QGTVGHVLFQYNPPYTLVPLRRNEIAVPPVNPDAVDNDAENNSGESWASAA YDASSWDDGAPSD						
SOUL3 (C.r.)	KPAVGYQLARYNDPSTPPGIRRNEVILRLDGFVWP ESEATSPAKLP-----						

Analyse der Homologien verschiedener Proteine der SOUL/HBP-Familie. Vergleich der Aminosäuresequenzen von SOUL3 aus *C. reinhardtii* (C.r.) mit homologen Proteinen aus *Volvox carteri* SOUL (V.c.), *Phaeodactylum tricornutum* SOUL (P.t.), *Ectocarpus silicosus* HBP (E.s.), *A. thaliana* SOUL (A.t.), *Mus musculus* HBP1 (M.m.) und *Homo sapiens* HBP (H.s.). Der graue

Balken kennzeichnet die vorhergesagte Häm-Bindestelle (Taketani et al., 1998). Die gestrichelte schwarze Linie kennzeichnet die konservierten Aminosäurereste innerhalb fünf Gruppen der SOUL/HBP-Familie (Lee et al., 2012 supplementary Data) Schwarzer Hintergrund: identische Aminosäuren; grauer Hintergrund: ähnliche Aminosäuren. Der Vergleich wurde mit dem „BioEdit Sequence Alignment Editor“ v7.1.9 und dem ClustalW „Global Alignment“ Algorithmus (Thompson et al., 1994) durchgeführt.

## 7.1.2 Liste der Identifikationsnummern (NCBI) und Aminosäuresequenzen

### **HBP1 (H.s.) - Heme-binding protein *Homo sapiens*; AF117615**

MLGMIKNSLFGSVETWPWQVLSKGDKEEVAYEERACEGGKFATVEVTDKPVDEALRE  
AMPKVAKYAGGTNDKGIGMGMTVPISFAVFPNEDGSLQKCLKVWFRIPNQFQSDPPAP  
SDKSVKIEEREGITVYSMQFGGYAKEADYVAQATRLRAALEGPATYRGDIYFCTGYDPP  
MKPYGRRNEIWLLKT

### **HBP1 (M.m.) - Heme-binding protein *Mus musculus*; AF117613**

MLGMIRNSLFGSVETWPWQVLSTGGKEDVSYEERACEGGKFATVEVTDKPVDEALREA  
MPKIMKYVGGTNDKGVGMGMTVPVSFALFPNEDGSLQKCLKVWFRIPNQFQGSPPAPS  
DESVKIEEREGITVYSTQFGGYAKEADYVAHATQLRTTLEGTPATYQGDVYYCAGYDP  
PMKPYGRRNEVWLKKA

### **SOUL (A.t.) - SOUL heme-binding protein *Arabidopsis thaliana*; At3g10130**

MMMISSSSITSSLSLLSSSPEKLPINPIQRCPITYSGFRTASVNRAIRRQPQSPAVSATESR  
VSLVLALASQASSVSQRLLADLAMETAKYVFPKRFDSSSTNLEEAFMSVPDLETMNFRLV  
FRTDKYEIRQVEPYFVAETIMPGETGFDSYGASKSFNVLAEYLF GKNTIKEKMMTTPVV  
TRKVQSVGEKMEMTTPVITSKAKDQNQWRMSFVMPSKYGSNLPLPKDPSVKIQQVPRK  
IVAVVAFSGYVTDEEIERRERELRRALQNDKKFRVRDGVSEVAQYNPPFTLPMRNE  
VSLEVENKED

**SOUL (O.s.) – SOUL heme-binding protein *Oriza sativa* Japonica group; NP 001047029**

MALLCSASARPPLAAGARGRRPARGAARVIGGGGGAEARASLVLALAAQALAASQRR  
 AAGLAAEAVKYAFPPRRFEPRTLEEALMSVPDLETVPFRVLKREAEYEIREVESYYVAE  
 TTMPGRSGFDFNGSSQSFNVLASYLFGKNTTSEQMEMTTPVFTRKGEKMDMTTP  
 VITKKSANENKWKMSFVMPSKYGPDLPKDPSTIKEVPAKIVAVAAFSGLVTDDDIS  
 QRESRLRETLQKDSQFRVKDDSVVEIAQYNPPFTLPFTRRNEIALEVKRLDANF

**HBP (E.s.) – heme-binding family protein *Ectocarpus silicosis*; CBJ31984**

MEGIAENLYSIKKTARELTPQKLRQGLQATAAETENIFSRTPSGLYSPSYSLEDAREGFEI  
 RRYASYAVCSAQMDADAARESDQRDDRTGVTGSGEGFNTLAGYLFGDNKQEVAM  
 DMTTPVNIDVTSTGRTMSFVMPKDVPAEEAPTNRNPRVNVRDVAEGLAVREFPGFA  
 TDGEVGGQLDTLLWALQLEASTSASPWCARDPVGRSYRLMQYNPPYTLPWQRTNAIA  
 VQVYRGVPGDSADTENAKGNSEREQMSSTISQAVGSP

**SOUL (P.t.) – predicted protein *Phaeodactylum tricornutum*; XP002176349**

MKISSRGIFAGVVWSIASVQDSTAFSASLTVAPHRWTVLQSSTSGDDFSSFAASLETPTPS  
 PRTRNNNNNKPRTWKDDLDELDPATEMNRQALFTDVVSANQDIREAVETALRDRKI  
 DPLLTPGKKLQDGTRAVARQLSTDILPSLAANARNPPTQLFSVRPQDLQKNGNRFLNA  
 VTNMQQNLQTLQRDLLDPSRIPSRISQQTSEFVQEAANVLRETPVGLKEPPYTLVATTN  
 EYEIRDYAGYKVVSTNMAPAGEVYRDSMAQSGQAFNTLASIFGANRDSKVMEMTTP  
 VTTMSGEMRFYLAQNDETPDQRIPEPLAQDESKSVYETGNILIQDIPPARLAVRRFPGF  
 ATAGEQARQKEILLAALSDDVELDVPHGQTVGHVLFQYNPPYTVPVLRNEIAVPVVN  
 PDAVDNDAENNSGESWASAAVDASSWDDGAPSD

**SOUL (V.c.) - Hypothetisches Protein, SOUL-like; XM002958988**

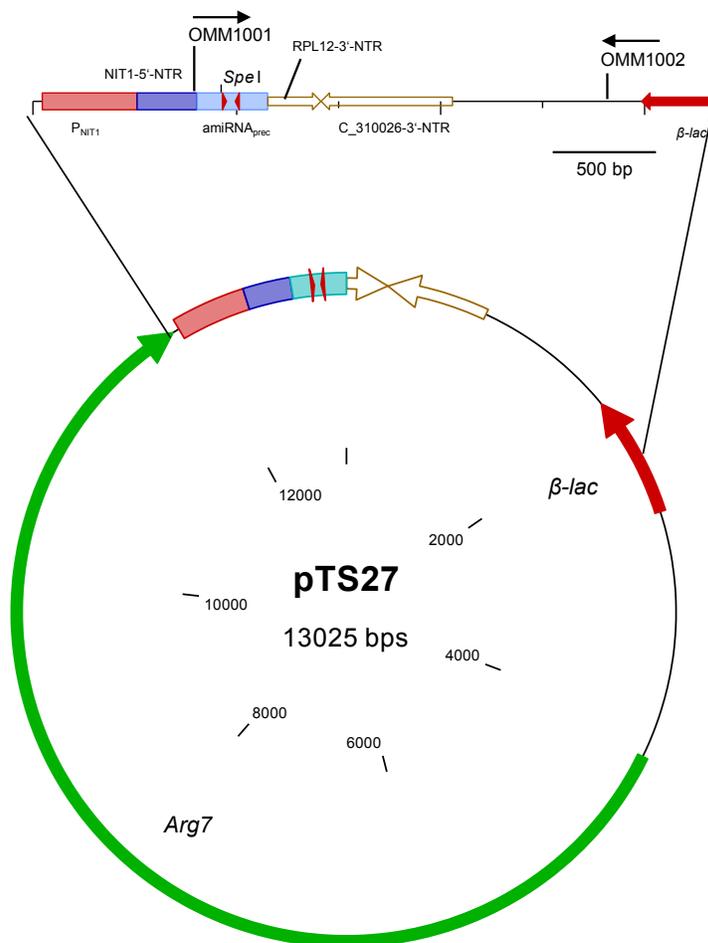
MFSLSGLTPRHSGVRPSAHRKAAQSFITLPNARRIILKAAPAPLNETRAEELALPDGDVSI  
 EADAVLLREAEAQRQAFIMQDTCFLASDLKMLFEKGEITESRYSPKIVFEDPITKYDSRE  
 GYVFNIRLLRNLTLFNITFDLHSISVTGPDSVTARWTMEMVMWLLPWRPNLFTTGRTVYKV  
 DPRTGIVLS HTDYWDALQR NAFLSLEGVQ HTLQMFIQQQ LQLTPGIETP  
 KYVVLKKLKEYEIRRYEPLYVAEAPTGP GSGPASGSGFSELASYLFGSNRAQLAMEMTT  
 PVFNEVQPETNSSVAMKFVMESRYSDVSALPAPLDPRIGRKREEGRYAAAIRFSGWPLD  
 YEVVQNERLLRDLLLRDGLRPAPGYQLARYNDPSTPPMLRRNEVLIRLDDFVWPPETEM  
 ST

**SOUL3 (C.r.) - SOUL heme-binding protein; XM001701380**

MQLNARLHTQLRVSAARRHAAHF SRARSVHASRAPFCPPLKTSSYDEAPAVEERVLVK  
LENDVEPAGNLNADAQATNLQEAERQRQAFIMNDTCRFLATDLKMLFEKGEITEARYS  
PDITFEDPITKYTNREGYIFNIRLLRTFFNIQFDLFNVAVSGPDTVTATWSMEMLFWLVP  
WKPTLTFTGRTVYRVDPQSGLILSHTDYWDALQRNGFLSLEGLQHVLQRQFLQLQVTPGI  
ETPKYTVLKRFDYEIRAYEPYTVAETSMGSGAGPASGAGFSDLARYLFGGNTAQLAM  
EMTTPVFQNIEPSSNSSTAMQFVMEKRYADLAALPAPSDPRIARKREEARYAAAIRFAG  
WPLDFEVVSNERQLRDMLIRDGYKPAVGYQLARYNDPSTPPGIRRNEVLIRLDGFVWPE  
SEATSPAKLP

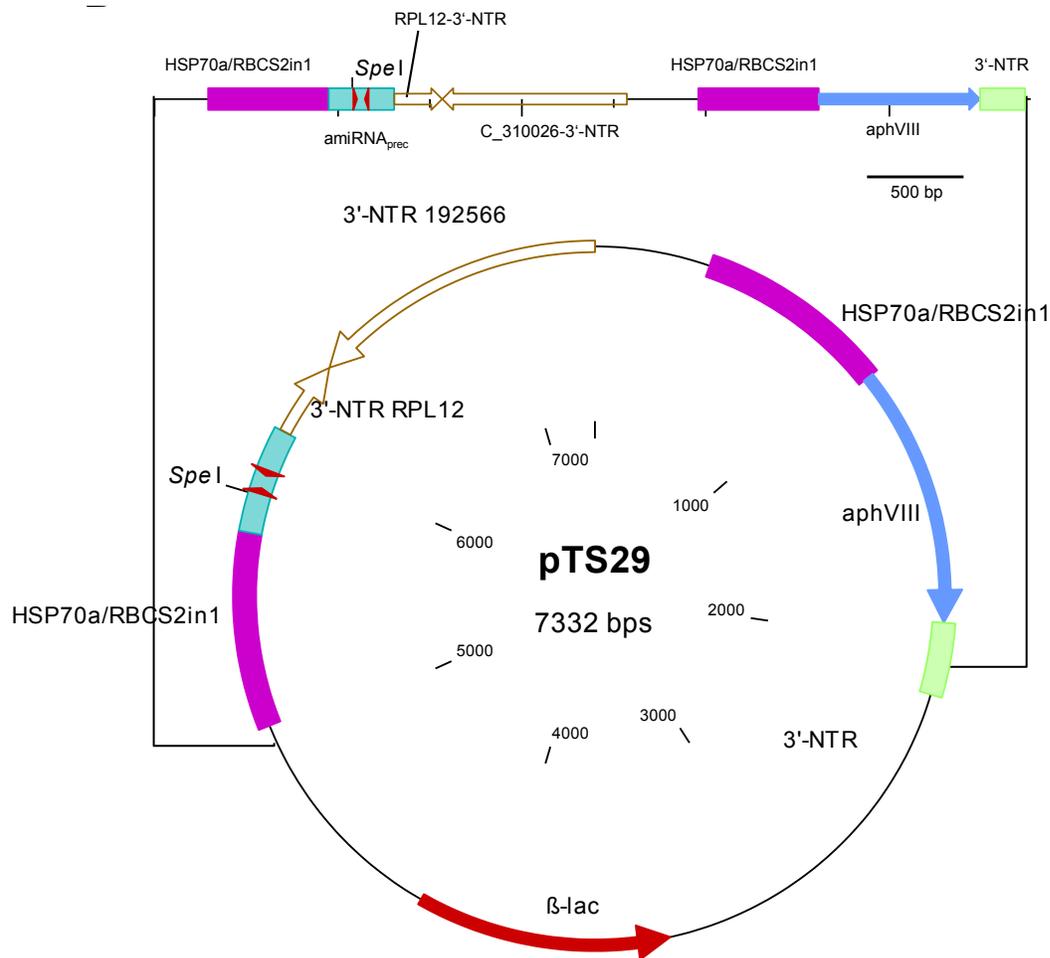
## 7.1.3 Vektorkarten und Sequenzen

### 7.1.3.1 pTS27



**Abbildung 35: Darstellung des Plasmids pTS27 (linearisierter Ausschnitt 3334 bp von gesamt 13025 bp).** Die Abbildung zeigt nur die für die Arbeit relevanten Restriktions- und Oligonukleotidbindungsstellen. Arg7: Argininosuccinate lyase;  $\beta$ -lac: Ampicillinresistenzgen;  $P_{NIT1}$ : NIT1 Promotor; NIT1-5'-NTR: NIT1 5'-nichttranslatierte Region;  $amiRNA_{prec}$ : artifizielle mikro-RNS-Vorläufer cre-MIR1157; RPL12-3'-NTR: 3'-nichttranslatierte Region des ribosomalen Proteins L12; C\_310026-3'-NTR: 3'-nichttranslatierte Region von estExt\_fgenesh2\_pg.C\_310026; rote Pfeilköpfe: spezifische *soul3*-amiRNS-Sequenzen.

## 7.1.3.2 pTS29



**Abbildung 36: Darstellung (Ausschnitt) von pTS29 (linearisierter Ausschnitt 4768 bp von gesamt 7332bp). (Schulze et al., 2013).** Die Abbildung zeigt nur die für die Arbeit relevanten Restriktionsschnittstellen. *Hsp70/RbcS2in1*: Tandempromotor; *aphVIII*: Paromomycinresistenzgen; 3'-NTR: nichttranslatierte Region des Paromomycinresistenzgens; amiRNA<sub>prec</sub>: artifizielle mikro-RNS-Vorläufer cre-MIR1157; RPL12-3'-NTR: 3'-nichttranslatierte Region des ribosomalen Proteins L12; C\_310026-3'-NTR: 3'-nichttranslatierte Region von estExt\_fgenesh2\_pg.C\_310026; rote Pfeilköpfe: spezifische *soul3*-amiRNS-Sequenzen.

## **Curriculum vitae**

### **Persönliche Daten**

Name	Thomas Nolte
Geburtsname	Schulze
Adresse	Steubenstrasse 46, 99423 Weimar
E-Mail	<a href="mailto:thomasnolte@outlook.com">thomasnolte@outlook.com</a>
Mobil	+491797807368
Familienstand	verheiratet, seit 06.10.2012
Kinder	Helene Anna Nolte, geb. 06.08.2013 Vincent Josef Nolte, geb. 06.08.2013
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdaten	15. Februar 1980 in Altenburg (Thür.)

### **Berufliche Tätigkeit**

03/2008 – 12/2012	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
06/2007 – 12/2007	Wissenschaftlicher Assistent in der AG Mittag, Bioinformatische vergleichende Analysen von circadianen Genen in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> und <i>Ostreococcus taurii</i>
04/2006 – 07/2006	Wissenschaftlicher Assistent in der AG Mittag, Konstruktion von Luziferase-Vektoren
07/2002 – 09/2002	Angestellter als medizinisch-technischer Laboratoriumsassistent in der Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin „Medizinisches Zentrallabor Altenburg“ in der Abteilung Klinische Chemie II (Proteinlabor und Infektionsserologie)
09/2001 – 06/2002	Zivildienst im Patientenheimfürsorge e. V. Dialyse in Altenburg

### **Promotionsstudium**

03/2008 – 12/2012	Promotion unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Maria Mittag am Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie der Friedrich-Schiller Universität Jena. Thema: Die funktionelle
-------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Charakterisierung des Augenfleckproteins SOUL3 in *Chlamydomonas reinhardtii*.

03/2008 – 02/2011 Mitglied im Stipendienprogramm der „Jena School for Microbial Communication“ (JSMC)

### Studium

10/2002 – 02/2008 Diplom Biochemiker/Molekularbiologie an der Friedrich-Schiller Universität Jena. Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie zum Thema: Charakterisierung des Augenfleckproteins SOUL3 in *Chlamydomonas reinhardtii*

### Berufsausbildung

09/1998 – 08/2001 Ausbildung zum medizinisch-technischen Laboratoriumsassistenten am IFBE Zwickau, Abschluss: staatliche Prüfung

### Schulbildung

06/1998 Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife am Friedrichgymnasium in Altenburg (Thür.)

### Veröffentlichungen

- I. **Schulze, T., Prager, K., Dathe, H., Kelm, J., Kiessling, P., und Mittag, M.** (2010). How the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* keeps time. *Protoplasma* **244**, 3-14.
- II. **Schulze, T., Schreiber, S., Iliev, D., Boesger, J., Trippens, J., Kreimer, G., und Mittag, M.** (2012). The heme-binding protein SOUL3 of *Chlamydomonas reinhardtii* influences size and position of the eyespot. *Mol. Plant* **6**, 931-944.

### Posterpräsentationen

- I. **Schulze, T. and Mittag, M.** Functional Characterization of the Eyespot Protein SOUL3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. Deutsche Botanikertragung 2009. Leipzig, 2009.
- II. **Schulze, T., Schreiber, S., Kreimer, G. and Mittag, M.:** Functional Characterization of the Eyespot Protein SOUL3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. Treffen der DFG Forschergruppe 1261: Specific light-driven reactions in unicellular model algae. Jena, März 2011.

- III. **Schulze, T., Schreiber, S., Kreimer, G. and Mittag, M.:** Functional Characterization of the Eyespot Protein SOUL3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. 15<sup>th</sup> international conference on the cell and molecular biology of *Chlamydomonas reinhardtii*. Berlin, Germany, Juni 2010.

#### wissenschaftliche Vorträge

- I. **Schulze, T.:** Functional Characterization of the Eyespot Protein SOUL3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. JSMC/JCB Workshop „Microbes, Models & Methods“. Jena, März, 2010.
- II. **Schulze, T., Kreimer, G. and Mittag, M.:** Functional Characterization of the Eyespot Protein SOUL3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. 14<sup>th</sup> international conference on the cell and molecular biology of *Chlamydomonas reinhardtii*. Norton, Massachusetts, USA, Juni 2010.
- III. **Schulze, T., Kreimer, G. and Mittag, M.:** Functional Characterization of the Eyespot Protein SOUL3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. 1<sup>st</sup> Conference MiCOM organized by the Jena School for Microbial Communication (JSMC). Jena, Oktober 2010.
- IV. **Schulze, T., Kreimer, G. and Mittag, M.:** Functional Characterization of the Eyespot Protein SOUL3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. Treffen der Doktoranden der DFG-Forschergruppe 1261: Specific-light driven reactions in unicellular model algae. Leipzig, Oktober 2010.

## Abkürzungsverzeichnis

$\lambda$	Wellenlänge, lambda
AS	Aminosäure(n)
Bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
cDNS	<i>Complementary</i> DNS, DNS-Kopie einer RNS
CK	CASEIN KINASE
aCRY	<i>Animal like</i> CRYPTOCHROME
pCRY	<i>Plant like</i> CRYPTOCHROME
ddH <sub>2</sub> O	zweifach über Ionenaustauscher entsalztes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
h	Stunde
HBP	<i>Heme-binding Protein</i> , Häm-bindeprotein
hHBP	humanes HBP
mHBP	Maus HBP
kDa	kilo-Dalton
LB	Luria Bertani-Medium
LD	Licht-Dunkel
LL	Dauerschwachlicht
Min.	Minute
mRNS	<i>Messenger</i> RNS, Boten-Ribonukleinsäure
mt	<i>Mating type</i> , Paarungstyp
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
NTR	nicht translatierte Region
OD	optische Dichte bei 1 cm Schichtdicke und spezifischer Wellenlänge
p.a.	<i>Pro analysi</i> (Reinstoff)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIC	„Proteinase Inhibitor Complete <sup>TM</sup> “-Lösung

---

RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Sek.	Sekunde
S	Siemens
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAP	„Tris-acetat“-Medium
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
U	Units, Enzymeinheiten
V	Volt
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
v/v	Volumen/Volumen

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Schematische Darstellung einer <i>C. reinhardtii</i> -Zelle (links) und mikroskopische Hellfeldaufnahme vom <i>C. reinhardtii</i> -Stamm SAG73.72 (rechts).....	4
<b>Abbildung 2:</b>	Darstellung der Augenfleckposition relativ zum Cytoskelett in <i>C. reinhardtii</i> (modifiziert nach Holmes and Dutcher 1989 und Boyd et al., 2011a)....	7
<b>Abbildung 3:</b>	Detailliertes Schema der Augenflekkultrastruktur (nach Boyd et al., 2011c).....	8
<b>Abbildung 4:</b>	Phototaktische Bewegung und photophobische Reaktion von <i>C. reinhardtii</i> (verändert nach Witman, 1993).....	9
<b>Abbildung 5:</b>	Domänenstruktur von SOUL3 aus <i>C. reinhardtii</i> (NCBI).....	12
<b>Abbildung 6:</b>	Grundstruktur des Häm (modifiziert nach Zhang 2011).....	15
<b>Abbildung 7:</b>	Analyse der Homologien verschiedener Proteine der SOUL/HBP Familie.....	21
<b>Abbildung 8:</b>	Zirkuläre Darstellung des SOUL3-Überexpressionsvektors für <i>E. coli</i> .....	22
<b>Abbildung 9:</b>	Heterologe Expression und Aufreinigung von SOUL3 (Schulze et al., 2013).....	23
<b>Abbildung 10:</b>	Kontrolle des Dipeptidase-Verdau der Histidinmarkierung an 6xHis-SOUL3 (Schulze et al., 2013).....	24
<b>Abbildung 11:</b>	Nachweis der Häminbindung an SOUL3 (Schulze et al., 2013).....	25
<b>Abbildung 12:</b>	Sättigungsexperiment mit freiem Hämin (Schulze et al., 2013).....	26
<b>Abbildung 13:</b>	Graphische Darstellung des Sättigungsexperiments mit freiem Hämin (Schulze et al., 2013).....	26
<b>Abbildung 37:</b>	Absorptionsspektren von Hämin mit aufgereinigtem SOUL3 Protein.....	28
<b>Abbildung 15:</b>	Visueller Vergleich von SOUL3 mit (+) und ohne (-) Hämin.....	28
<b>Abbildung 16:</b>	Komplexbildung von SOUL3 zu unterschiedlichen Tageszeiten (Schulze et al., 2013).....	30
<b>Abbildung 17:</b>	Immunologischer Nachweis von CYTf in Eluaten einer Koimmunopräzipitation mit einer aufgereinigten Augenfleckfraktion.....	33
<b>Abbildung 18:</b>	Immunoblot verschiedener Proteinfractionen zur Analyse der Lokalisierung von SOUL3 im Augenfleck (Schulze et al., 2013).....	33
<b>Abbildung 19:</b>	Subzelluläre Lokalisierung von SOUL3 in <i>C. reinhardtii</i> SAG73.72-Zellen (Schulze et al., 2013).....	34
<b>Abbildung 20:</b>	Subzelluläre Lokalisierung von SOUL3 und ChR1 zusammen mit acetylierten Alpha Tubulin in <i>C. reinhardtii</i> SAG73.72-Zellen (Schulze et al., 2013).....	35
<b>Abbildung 21:</b>	Doppelfärbung von SOUL3 und ChR1 in <i>C. reinhardtii</i> SAG73.72-Zellen (Schulze et al., 2013).....	36
<b>Abbildung 22:</b>	Immunofluoreszenzfärbung von ChR1 und acetyliertem Tubulin in 137c und <i>eye3-2</i> (Schulze et al., 2013).....	37
<b>Abbildung 23:</b>	Immunofluoreszenzfärbung von SOUL3 und acetyliertem Tubulin in 137c und <i>eye3-2</i> (Schulze et al., 2013).....	38
<b>Abbildung 24:</b>	Vergleich des Expressionsniveaus von SOUL3 in 137c und <i>eye3-2</i> (Schulze et al., 2013).....	38

<b>Abbildung 25:</b>	Lineare Darstellung des Plasmids pTS27 (linearisierter Ausschnitt 3334 bp von gesamt 13025 bp). .....	40
<b>Abbildung 26:</b>	Linearisierte Darstellung (Ausschnitt) von pTS29 (Schulze et al., 2013). 4768 bp Ausschnitt von pTS29. ....	41
<b>Abbildung 27:</b>	Immunodetektion von SOUL3-Protein in <i>C. reinhardtii</i> -Wildtypzellen SAG73.72, Vektorkontrolle pDI8 und den transgenen Stämmen ami <sub>SOUL3</sub> -56, ami <sub>SOUL3</sub> -59, ami <sub>SOUL3</sub> -65, ami <sub>SOUL3</sub> -68, ami <sub>SOUL3</sub> -151 (Schulze et al., 2013). .....	42
<b>Abbildung 28:</b>	Augenflecklokalisierungsstudien im Hellfeldmikroskop in <i>C. reinhardtii</i> - Wildtypzellen SAG73.72, Vektorkontrolle pDI8 und den transgenen Stämmen ami <sub>SOUL3</sub> -56, ami <sub>SOUL3</sub> -68, ami <sub>SOUL3</sub> -151 (Schulze et al. 2013, Sandra Schreiber). .....	44
<b>Abbildung 29:</b>	Immunofluoreszenzfärbung von <i>C. reinhardtii</i> Wildtypzellen SAG73.72, Vektorkontrolle pDI8 und den transgenen Stämmen ami <sub>SOUL3</sub> -56 und ami <sub>SOUL3</sub> -151 (Schulze et al., 2013). .....	45
<b>Abbildung 30:</b>	Phototaxistest unter Dauerschwachlichtbedingungen (Schulze et al., 2013). .....	48
<b>Abbildung 31:</b>	Zirkuläre Darstellung des Plasmids pDI8. ....	72
<b>Abbildung 32:</b>	Zirkuläre Darstellung des Plasmids AV638730. ....	73
<b>Abbildung 33:</b>	Zirkuläre Darstellung des Plasmids pMS539. ....	74
<b>Abbildung 34:</b>	Versuchsaufbau zur manuellen Messung der Phototaxis. ....	104
<b>Abbildung 35:</b>	Darstellung des Plasmids pTS27 (linearisierter Ausschnitt 3334 bp von gesamt 13025 bp). .....	122
<b>Abbildung 36:</b>	Darstellung (Ausschnitt) von pTS29 (linearisierter Ausschnitt 4768 bp von gesamt 7332bp). (Schulze et al., 2013). .....	123

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Übersicht der in der JGI vs4-Datenbank ( <a href="http://genome.jgipsf.org/Chlre4/Chlre4.home.html">http://genome.jgipsf.org/Chlre4/Chlre4.home.html</a> ) annotierten SOUL/HBP Proteine (Merchant et al., 2007).....	12
<b>Tabelle 2:</b>	Mit MS identifizierte potentielle Interaktionspartner von SOUL3 aus Proteinrohextrakt.....	31
<b>Tabelle 3:</b>	Mit MS identifizierte potentielle Interaktionspartner von SOUL3 aus Augenfleckaufreinigung.....	32
<b>Tabelle 4:</b>	Lokalisierung des Augenflecks in Wildtyp und amiSOUL3 <i>C. reinhardtii</i> -Zelllinien (Schulze et al., 2013).....	43
<b>Tabelle 5:</b>	Augenfleckfläche im Wildtypstamm SAG73.72, der Vektorkontrolle pDI8 und den amiSOUL3 <i>C. reinhardtii</i> -Zelllinien (Schulze et al., 2013).....	46
<b>Tabelle 6:</b>	Herstellung der Hämin-Verdünnungsreihe für das Sättigungsexperiment.....	102

## Danksagung

Mein erster Dank gilt Frau Prof. Maria Mittag für die Ermöglichung dieser Arbeit, die interessante Fragestellung und die fachliche Unterstützung. Weiterhin möchte ich mich bei der *Jena School for Microbial Communication* (JSMC) für die Gewährung des Stipendiums bedanken. Es ermöglichte mir die Teilnahme an verschiedenen Tagungen und gab mir die Chance, Forschungsaufenthalte in anderen Laboren wahrzunehmen. Ganz besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Georg Kreimer bedanken, der mir drei Forschungsaufenthalte in seinem Labor in Erlangen ermöglichte, und dafür, dass er viel Zeit für wissenschaftliche Diskussionen und ein offenes Ohr für meine Fragen hatte.

Des Weiteren gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe des Instituts für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie. Ich danke allen, mit denen ich über die Jahre zusammenarbeiten durfte und die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit ein Stück begleitet haben. Dobromir Iliev, der erste Klonierungsschritte an der cDNS des SOUL3 Proteins durchführte. Ich danke Sandra Schreiber für ihren maßgeblichen Anteil an der Charakterisierung der ami<sub>SOUL3</sub> Zelllinien. Weiterhin möchte ich mich bei Wolfram Weisheit für die Durchführung der MS-Analysen bedanken. Auch gehört mein Dank allen, mit denen ich im Labor E008 zusammenarbeiten durfte. Katja, die immer gute Laune verbreitete. Hannes für eine grandiose Bürogemeinschaft. Unsere Diskussionen waren immer eine Bereicherung für meine wissenschaftliche Arbeit. Mein Dank gilt auch unserer TA Eva, die immer ein offenes Ohr für Probleme hatte und tapfer mit uns gegen die Unordnung im Labor kämpfte. Auch geht mein Dank an Christin und Moni für die Unterstützung bei den phototaktischen Analysen.

All jenen, die mir bei meiner Arbeit technische und materielle Unterstützung zukommen ließen, gilt ebenso mein Dank. Vor allem seien hier Sarahi L. Garcia und Sandra Barchmann aus der JSMC-Nachwuchsforschungsgruppe Mikrobielle Ökologie genannt, für die Möglichkeit der Nutzung ihres Fluoreszenzmikroskops. Außerdem möchte ich mich bei Peter Hegemann für die Überlassung des Anti-ChR1-Antikörpers und bei Michael Schroda für den amiRNS-Vektor pMS539 bedanken.

Zuletzt möchte ich mich vor allem bei meiner Frau Regina bedanken, die mich durch alle Höhen und Tiefen begleitete und mich stets wieder aufgebaut hat. Ebenfalls möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Eltern, Großeltern, Verwandten und Freunden bedanken, die mich mit Geduld und Kraft bis hierher begleitet haben.

## Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist und ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbstständig angefertigt und keine Textabschnitte eines Dritten oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen habe. Weiterhin erkläre ich, dass keine anderen Hilfsmittel, Quellen oder Literatur verwendet wurden als die in dieser Arbeit genannten.

Ich erkläre, dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen vom mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder eine andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Weiterhin wurde weder die vorliegende Arbeit, noch eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts hat mich Frau Prof. Dr. Maria Mittag unterstützt.

Weimar, den

---

Thomas Nolte