

Kurzzusammenfassung

Viele Süßwasserprotisten besitzen kontraktile Vakuolen zur Osmoregulation. So weist die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta) zwei kontraktile Vakuolen in ihrem apikalen Teil der Zelle auf. In dieser Arbeit wurde versucht die Funktionsweise der kontraktilen Vakuolen von *Chlamydomonas reinhardtii* aufzuklären.

Zu Beginn wurden die Struktur und die Physiologie der kontraktilen Vakuolen untersucht. Die Größe der kontraktilen Vakuolen korreliert mit der Zellgröße, wohingegen ihre Periode von der Zellgröße unabhängig ist. Mit Änderung der Periode reagiert *Chlamydomonas reinhardtii* auf osmotische Veränderungen in ihrer Umgebung. Die kontraktile Vakuole nimmt während eines Zyklus ständig an Größe zu (Diastole) um anschließend ihren Inhalt aus der Zelle auszustoßen (Systole). In der Systole fragmentiert die kontraktile Vakuole in viele kleine Vesikel, welche während der Diastole wieder anschwellen, miteinander fusionieren und schließlich wieder eine große kontraktile Vakuole bilden. Im Elektronenmikroskop ist eine Kontaktzone zwischen kontraktiler Vakuole und Plasmamembran sichtbar. Diese ist im Elektronenmikroskop durch elektronendichte Stäbchen-artigen Strukturen gekennzeichnet, welche beide Membranen miteinander verbinden. Höchstwahrscheinlich bestehen diese Stäbchen-artigen Strukturen aus dem Exocyst-Komplex und assoziierten SNAREs und kennzeichnen das Ende der Diastole sowie die Systole. Die Kultivierungsbedingung wies einen starken Effekt auf die Zellphysiologie auf. Zellen, die permanent in der exponentiellen Wachstumsphase (Log-Phase) kultiviert wurden, hatten ein geringeres zytosolisches osmotisches Potential (ca. 170 mosM) als Zellen aus einer stationären Wachstumsphase (ca. 190 mosM). Der osmotische Wasser-Permeabilitäts-Koeffizient P_f der Plasmamembran von *Chlamydomonas reinhardtii* variierte nur gering bei Veränderungen der osmotischen Bedingungen. Darüber hinaus wurde ein theoretisches Modells bezüglich der osmotischen Situation der kontraktilen Vakuole entwickelt (basierend auf den Messdaten der kontraktilen Vakuolen) – der osmotische Gradient an der Membran der kontraktilen Vakuole muss lediglich 15-30 mosM betragen um den Wasserfluss in die kontraktilen Vakuolen effizient anzutreiben.

Aquaporine sind Membran-Kanäle die den Durchtritt von Wasser erleichtern. Es ist bekannt, dass Aquaporine in der kontraktilen Vakuole Membran von mehreren Protisten vorkommen, wie *Trypanosoma*, *Dictyostelium* und *Amoeba proteus*. Im Genom von *Chlamydomonas reinhardtii* sind drei verschiedene Aquaporine zu finden, wovon nur zwei exprimiert werden, CreMIP1 und CreMIP3. Es konnten vier Zelllinien generiert werden, die das Fusionskonstrukt CreMIP1-GFP exprimieren, UVM4-MIP1GFP-1 bis -4. In allen Zelllinien ist das Fusionsprotein CreMIP1-GFP in der kontraktilen Vakuolen Membran lokalisiert. Mit Hilfe dieser Zelllinien konnte eindeutig festgestellt werden, dass während der Systole die kontraktilen Vakuolen asymmetrisch zusammenfallen. Während bzw. nach der Systole konnte keine Vermischung der kontraktilen Vakuolen Membran mit der Plasmamembran beobachtet werden. Dies deutet auf einen „Kiss-and-Run“ Mechanismus hin. Nach der Systole wird die neue kontraktile Vakuole aus dem „Membranhäufen“ der akkumuliert hinter der Plasmamembran liegt neu gebildet. Um

Veränderungen der kontraktilen Vakuolen Physiologie durch die Expression des Fusionsproteins auszuschließen, wurden die Zelllinien näher untersucht. Zwei Zelllinien wiesen keinen Unterschied im Expressionsniveau von CreMIP1 auf, wohingegen zwei Zelllinien eine starke Überexpression zeigten. Allerdings zeigten alle Zelllinien keine physiologischen Unterschiede zum parentalen Stamm UVM4 auf. Dies weist auf das Vorhandensein von weiteren Regulationsmechanismen der kontraktilen Vakuolen hin. Daher kann das Aquaporin CreMIP1 als Marker für die Membran der kontraktilen Vakuolen genutzt werden.

Zur Identifizierung von Proteinen, die in der Funktion der kontraktilen Vakuolen involviert sind, wurde eine Insertionsmutagenese durchgeführt. Aus mehr als 2100 Insertionsmutanten wurden 75 Mutanten isoliert, welche vermutlich einen Defekt in der Osmoregulation haben. Sieben der 75 Mutanten wiesen einen starken osmoregulatorischen Defekt auf, d.h. sie zeigten in hypotonem Medium (64 mosM) kein Wachstum. Durch die Identifizierung der Insertionsstellen im Genom der Mutanten stellte sich heraus, dass die sieben Mutanten mit starkem osmoregulatorischem Defekt nur drei unterschiedliche Insertionen aufwiesen: Osmo28, Osmo32 und Osmo75. In Osmo75 konnte die vollständige Insertionsstelle des Markers identifiziert werden. Der Hauptphänotyp von Osmo75 weist viele kleine Vakuolen auf. Weitere Phänotypen von Osmo75 sind vergrößerte kontraktile Vakuolen, ein Mischphänotyp mit einer vergrößerten und vielen kleinen Vakuolen, aber auch Zellen ohne erkennbare Vakuolen. Dieses weist darauf hin, dass in Osmo75 sowohl homotypische vakuoläre Membranfusionen, als auch Membranfusionen zwischen der kontraktilen Vakuole und der Plasmamembran gestört sind. Interessanterweise weist Osmo75 einen weiteren Phänotyp auf: verlängerte Geißeln. Bei näherer Betrachtung der betroffenen Genregion von Osmo75 war ein Gen sehr augenfällig: SEC6, eine Untereinheit des Exocyst-Komplexes. Der Exocyst ist ein konservierter Proteinkomplex aus acht Untereinheiten. Er hat eine wichtige Funktion bei der Fusion von sekretorischen Vesikeln mit der Plasmamembran. Die Transformation von Osmo75 mit einem CreSEC6-GFP Fusionskonstrukt stellte den ursprünglichen Phänotyp des parentalen Stammes CC3395 wieder her, sowohl hinsichtlich der kontraktilen Vakuolen als auch der Geißellänge. Allerdings wiesen die transformierten Zelllinien von Osmo75 (Osmo75-SEC6GFP) ein mindestens 3,7fach geringeres Expressionsniveau von CreSEC6 im Vergleich mit dem Ur-Stamm CC3395 auf. Ein weiterer Hinweis auf eine wichtige Rolle von SEC6 in der Funktion der kontraktilen Vakuolen ist die geringere Abundanz der Stäbchen-artigen Strukturen in den Kontaktzonen der kontraktilen Vakuole mit der Plasmamembran, die in den Zelllinien von Osmo75-SEC6GFP wieder vergleichbar zum Ur-Stamm ist. Somit stelle ich die Hypothese auf, dass der Exocyst die Membranfusion zwischen den kontraktilen Vakuolen und der Plasmamembran vermittelt. Des Weiteren schlage ich vor, dass der Exocyst die Membran der kontraktilen Vakuole davor bewahrt komplett in die Plasmamembran überzugehen, sowie dass der Exocyst Komplex auch eine Rolle bei der homotypischen vakuolären Membranfusion hat.

Zusätzlich zu den identifizierten Proteinen sind Hinweise auf zwei weitere interessante Proteine gefunden worden, die wahrscheinlich eine wichtige Funktion in den kontraktilen Vakuolen

haben. Durch eine zweite Insertionsmutagenese von Osmo75 wurden Suppressions-Mutanten generiert und ein Protein identifiziert das eine Kelch-Domäne (Calmodulin-binde-Motiv) aufweist. Durch eine qPCR-Analyse der verschiedenen Stämme dieser Arbeit und des parentalen Stammes CC3395 unter verschiedenen osmotischen Bedingungen wurde ein weiteres Gen identifiziert, welches womöglich ebenfalls eine wichtige Funktion im Zyklus der kontraktile Vakuolen hat – ein Gen, das für ein Protein aus der Dynamin-Familie kodiert.

Abstract

Contractile vacuoles (CVs) are essential for osmoregulation in many protists. To investigate the mechanism of CV function in *Chlamydomonas reinhardtii*, various approaches covering different aspects were used.

First the physiology of the CVs was analyzed. The size of the CVs is dependent on the cell size, but the period of the CV cycle is independent of the cell size. With alteration of the CV period the cells react to changes in the osmotic environment. The CV cycle is as follows in *Chlamydomonas reinhardtii*: During diastole the CV increases continuously in size followed by a rapid decrease in systole, where the CV fragments into numerous vesicles which fuse with each other and swell to again form the large CV. Strikingly, I found close contact zones of the CV membrane with the plasma membrane (PM), filled with cytosolic electron dense material in between which represents most likely the exocyst complex and SNAREs. Most likely, contact zones persist from the end of diastole till systole. Another surprising finding regards culture maintenance; the physiology of the cells was dramatically altered depending on the inoculation rhythm into fresh medium. Cells constantly kept in exponential log-phase growth showed a lower cytosolic osmotic potential (about 170 mosM) than cells of stationary cultures (about 190 mosM). The osmotic water permeability coefficient P_f of the PM is very low in *Chlamydomonas reinhardtii* and did not change much when different osmotic strengths and different culture strategies were applied to the cells. Interestingly, using a theoretical model for the osmotic situation of the CV, based on the measured CV parameters, the osmotic gradient across the CV membrane does not need to be large. A gradient of only 15-30 mosM is enough to drive water transport into the CV.

Second, the aquaporins in *Chlamydomonas reinhardtii* were analyzed. Aquaporins are known to be involved in CVs in various organisms such as *Trypanosoma*, *Dictyostelium* and *Amoeba proteus*. Three aquaporins are present in the genome of *Chlamydomonas reinhardtii*, but only two of them are expressed (CreMIP1 and CreMIP3). I was able to generate four different cell lines expressing a CreMIP1-GFP fusion construct, named UVM4-MIP1GFP. The CreMIP1-GFP fusion protein localized to the CV membranes. Two strains expressing the CreMIP1-GFP fusion protein showed no altered expression of CreMIP1 in a qPCR analysis, whereas the other two strains of UVM4-MIP1GFP showed a strong overexpression of the fusion construct. Strikingly, the expression of the fusion protein in the cells did not alter the physiology of the CVs, indicating probably additional regulation mechanisms. By in vivo observations of the GFP-labeled

CVs it was possible to elucidate the spatial movement of the CV membranes. The CVs shrink asymmetrically during the systole phase without intermixing of the CV membrane and the PM, indicating a kiss-and-run event. The new CV is formed from the membrane bulk present after systole, located close to the PM. Thus, the aquaporin CreMIP1 can be used as a marker for the CVs in *Chlamydomonas reinhardtii*.

Third, new proteins involved in CV function were sought using an insertional mutagenesis approach. I isolated 75 putative osmoregulatory mutants out of more than 2,100 insertional mutants from which seven mutants were not able to grow at hypotonic conditions below 64 mosM. After identification of the insertion locus of the mutants it turned out that some strains were identical. Thus, these seven strong osmoregulatory mutants represented only three different insertion events, namely Osmo28, Osmo32 and Osmo75. The complete genomic region affected by the inserted marker cassette was only identified for Osmo75. The mutant Osmo75 had a defect in homotypic vacuolar membrane fusion as well as in membrane fusion of the CV with the PM as the main phenotype was multiple smaller CVs, with other phenotypes showing enlarged CVs, a mixed phenotype with one enlarged CV and multiple smaller CVs, or no CVs. Interestingly, Osmo75 has a second phenotype of longer flagella. One of the affected genes in Osmo75 was the most likely candidate to be involved in CV function and thus considered to be the molecular cause for the strong osmoregulatory phenotype of the mutant – SEC6, a subunit of the exocyst complex. The exocyst, an evolutionarily conserved octameric protein complex, plays a crucial role in the targeting of secretory vesicles to the plasma membrane during exocytosis. Indeed, rescue of Osmo75 with a CreSEC6-GFP fusion construct completely recovered the phenotype of the CVs and the flagella length, although the expression of SEC6 in the rescued cell lines is at least 3.7 times less compared to that of the grandparental strain CC3395. A further hint for the involvement of SEC6 in membrane fusion between the CV and the PM is the lower abundance of rod-like structures in contact zones of the CV membrane and the PM. I propose, that the exocyst is not only important in membrane fusion of CV membrane and PM, also in homotypic vacuolar membrane fusion and, moreover, the exocyst prevents the CV membrane to get incorporated into the PM.

In addition, I generated suppressor mutants of Osmo75 and identified a protein with a Kelch domain (a calmodulin binding motif) to be involved in the regulation of CV function. Moreover, using a qPCR analysis of the strains used in this study and the parental strain *Chlamydomonas reinhardtii* CC3395 under various osmotic conditions a new gene can now be considered to be related to CV function – a gene coding for a dynamin-like protein.