

**Strategien zur Isolierung und Charakterisierung  
des D1-Proteins aus *Chlamydomonas reinhardtii***

**Dissertation**

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

vorgelegt der

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

von

Frau Diplom-Biologin Ilka Hänßgen  
geboren am 27.10.1978 in Leipzig

Gutachter:

1. Prof. Dr. U. Johanningmeier
2. Prof. Dr. K. Humbeck
3. Prof. Dr. C. Wilhelm

Halle (Saale), 04.10.2011

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.03.2012

*Für meine Eltern*  
*Ingeborg und Klaus Hänßgen*

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	IV
1 Einleitung .....	1
1.1 Struktur und Funktion von Photosystem II .....	2
1.2 Struktur des D1-Proteins .....	4
1.3 Schädigung des PSII und des D1-Proteins .....	6
1.4 Abbau des D1-Proteins .....	7
1.5 D1-Protein-Synthese und Assemblierung des PSII-Komplexes .....	9
1.6 Photosystem II-Präparationen .....	10
1.7 Zielstellung der Arbeit .....	12
2 Material und Methoden .....	13
2.1 Chemikalien, Enzyme und Antikörper .....	13
2.2 Kultivierung der <i>E.coli</i> -Zellen .....	14
2.3 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	15
2.4 Gelelektrophorese der Nukleinsäuren .....	15
2.5 Modifikation der DNA .....	15
2.6 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA .....	16
2.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	16
2.8 Erstellen von DIG-markierten Sonden .....	16
2.9 Kapillartransfer der RNA .....	17
2.10 Northern Blot .....	17
2.11 Reinigung der Deg2-Protease .....	18
2.12 Computerprogramme und Datenbanken .....	18
2.13 Verwendete Algenstämme .....	19
2.14 Anzucht der Algenstämme .....	19
2.15 Konstruktion einer <i>C. reinhardtii</i> -Mutante mit 10fachem His-Tag im D1-Protein .....	19
2.15.1 Erstellen des <i>His-psbA</i> -Konstruktes .....	19
2.15.2 Transformation der <i>C. reinhardtii</i> .....	20
2.16 Chlorophyll- und Proteinkonzentrationsbestimmungen .....	20
2.16.1 Chlorophyllbestimmung .....	20
2.16.2 Proteinextraktion und Proteinkonzentrationsbestimmung .....	20
2.17 Physiologische Untersuchungen .....	21
2.17.1 Zellzahlbestimmung .....	21
2.17.2 Wachstumskurve .....	21
2.17.3 Sauerstoffmessung .....	21
2.17.4 Starklichtuntersuchung .....	21
2.18 Probenaufbereitung .....	22
2.18.1 Zellaufschluss .....	22

## Inhaltsverzeichnis

2.18.2 PSII-Präparation nach Schiller und Dau .....	23
2.19 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	23
2.19.1 2D IEF/SDS-PAGE .....	23
2.19.2 2D BN/SDS-PAGE.....	24
2.19.3 Probenvorbereitung für die SDS-PAGE nach Schägger <i>et al.</i> .....	26
2.19.4 SDS-PAGE nach Schägger <i>et al.</i> .....	26
2.20 Proteinnachweismethoden.....	27
2.20.1 Coomassiefärbung .....	27
2.20.2 Colloidal-Coomassie Färbung .....	27
2.20.3 Silberfärbung nach Berkelman und Stenstedt.....	27
2.20.4 Färbung der PVDF-Membran.....	28
2.21 Proteintransfer.....	28
2.21.1 Proteintransfer auf PVDF-Membran .....	28
2.21.2 Proteintransfer auf NC-Membran .....	29
2.22 Immunreaktion .....	29
2.23 Säulenchromatographie.....	30
2.23.1 Isolierung des PSII-Komplexes und des D1-Proteins unter Verwendung der IMAC .....	30
2.23.2 Reinigung des PSII-Komplexes unter Verwendung einer Anti-HA Affinity-Matrix.....	31
2.24 Nachweis von Carbonylgruppen im PSII.....	32
3 Ergebnisse .....	33
3.1 Isolierung und Nachweis des D1-Proteins .....	33
3.1.1 Optimierung der Zell-Aufschlussmethode.....	33
3.1.2 Darstellung des D1-Proteins in der 2D IEF/SDS-PAGE.....	36
3.1.3 Darstellung des D1-Proteins in der 2D BN/SDS-PAGE .....	39
3.2 Erzeugung eines funktionsfähigen D1-Proteins mit 10fachem His-Tag.....	42
3.3 Reinigung des PSII-Komplexes und des D1-Proteins unter Verwendung von Ni-NTA Agarose .....	47
3.3.1 Isolierung des D1-Proteins im „Batch“-Verfahren .....	47
3.3.2 Säulenchromatographische Reinigung des PSII-Komplexes.....	49
3.3.3 Säulenchromatographische Reinigung des D1-Proteins.....	51
3.4 Modifikations- und Spaltungsanalysen unter Verwendung des gereinigten D1-Proteins.....	55
3.4.1 D1-Abbau .....	55
3.4.2 Nachweis von carbonylierten Proteinen im PSII-Komplex.....	65
3.5 Untersuchung des D1-Vorläuferproteins pD1.....	69
3.5.1 Reinigung des pD1-Proteins unter Verwendung der IMAC.....	70
3.5.2 Reinigung des pD1-Proteins unter Verwendung einer Anti-HA Affinity-Matrix .....	72
3.5.3 Lokalisierung des pD1-Proteins in Thylakoidmembranfraktionen.....	76
4 Diskussion .....	78

## Inhaltsverzeichnis

4.1 Strategien zur Isolierung des D1-Proteins.....	79
4.1.1 Optimierung des Zellaufschlusses .....	79
4.1.2 Darstellung des D1-Proteins in der 2D-Gelelektrophorese .....	80
4.2 Konstruktion einer Mutante mit 10fachem His-Tag im D1-Protein .....	81
4.3 Reinigung des PSII-Komplexes und des D1-Proteins unter Verwendung von Ni-NTA Agarose .....	83
4.4 Spaltung des D1-Proteins durch Proteasen .....	85
4.5 Spaltung des D1-Proteins durch ROS .....	86
4.5.1 Modifizierung und Spaltung des D1-Proteins durch Wasserstoffperoxid .....	86
4.5.2 Oxidation von Methioninen im D1-Protein .....	87
4.6 Nachweis der Carbonylierung von PSII-Proteinen .....	88
4.7 Reinigung des pD1-Proteins und daran assemblierender Proteine .....	89
5 Zusammenfassung .....	93
6 Literaturverzeichnis.....	94
7 Anhang .....	109

## Abkürzungsverzeichnis

AIC	Affinity Interaction Chromatography
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BCIP	5-Brom-4-chloro-3-indoxylphosphat
BSA	Bovine serum albumin
CAPS	3-(Cyclohexylamin)-1-propansulfat
CHAPS	3 [(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propan-sulfonat
Chl	Chlorophyll
CMC	Kritische Mizellenkonzentration
CP43	PsbC Protein; integrales Polypeptid des Kernkomplexes von PSII
CP47	PsbB Protein; integrales Polypeptid des Kernkomplexes von PSII
2D	zweidimensional
D1	PsbA Protein; 32 kDa Protein des Kernkomplexes von PSII
D2	PsbD Protein; 33 kDa Protein des Kernkomplexes von PSII
DEAE	Diethylaminoethyl
dest	destilliert
DFP	Diisopropylfluorophosphat
Dig	Digitonin
DM	n-Decyl beta-D-Maltopyranosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
dNTP	Desoxyribonukleotid
DoDM	n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray Ionisierung
EST	Expressed Sequence Tags
GE	Gelelektrophorese
GEPC	Global Photonic Energy Cooperation
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HPLC	High performance liquid chromatography
HS	High salt
HSP	Hitzeschockprotein
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
IUPAC-IUB	Joint Commission on Biochemical Nomenclature
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
LB	Luria Bertani
LHC	Light harvesting complex
MALDI	matrix-assisted-laser-desorption ionization
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure

## Abkürzungsverzeichnis

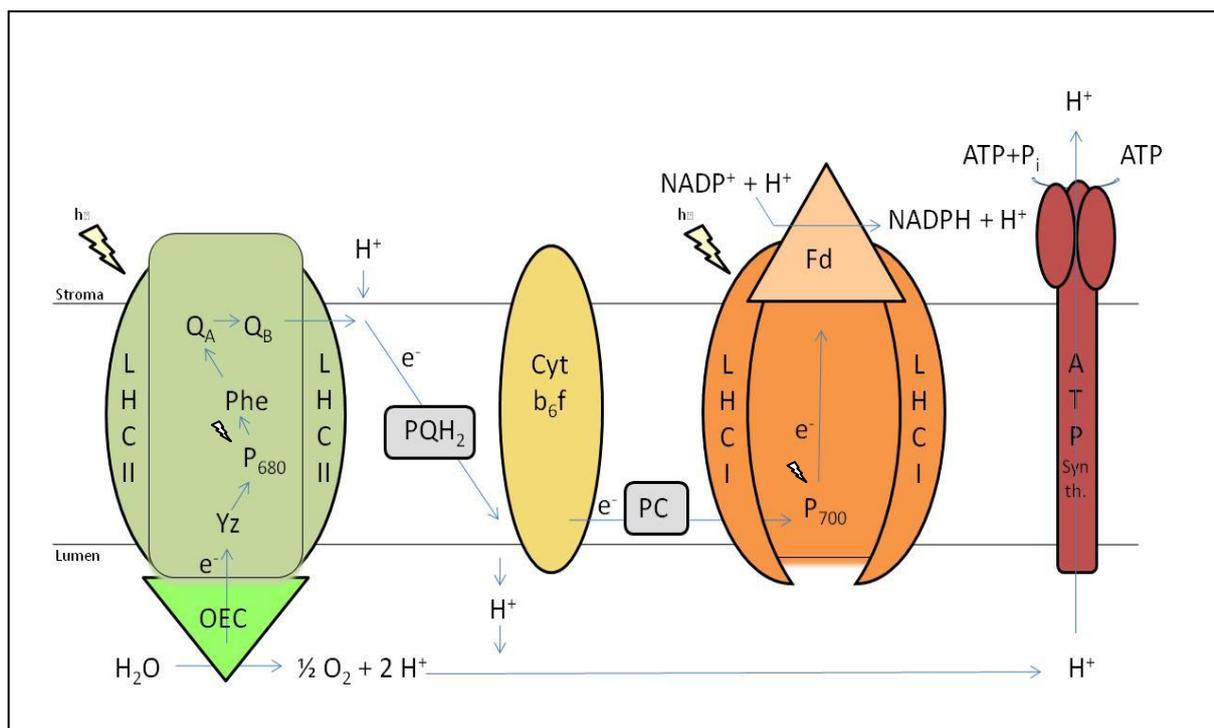
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometer
MSH	Mercaptoethanol
NBT	3,3'-(3,3'-Dimethoxy-4,4'-biphenylylen)-bis-[2-(4-nitro-phenyl)-5-phenyl-2 <i>H</i> -tetrazoliumchlorid
NC	Nitrocellulose
NCBI	National Coalition Building Institute
Neb	Nebulizer
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetic acid
NP40	Nonidet P-40
OEC	Oxygen evolving complex
OGS	Octyl $\beta$ -D-Thioglucopyranoside
P680	Pigment 680, spezielle Form von Chlorophyll a
P700	Pigment 700, spezielle Form von Chlorophyll a
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pD1	Vorläufer D1
PDZ	Postsynaptic density protein
pI	Isoelektrischer Punkt
pmf	proton motive force
PMF	Peptide Mass Fingerprinting
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
PVDF	Polyvinyliden Difluorid Membran
Q <sub>A</sub>	Plastochinonmolekül mit fester Bindung an D2
Q <sub>B</sub>	Plastochinonmolekül mit reversibler Bindung an D1
RT	Raumtemperatur
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Sodium-Sodiumcitrat
TAP	TRIS-Acetat-Phosphat
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBST	Tween 20-Trispuffer-Saline
TC	Tetracystein
TM	Transmembran
tD1	truncated D1
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TOF	Time of flight
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitan-Monolaurat
UE	Untereinheit
ÜK	Übernachtkulturen

Aminosäuren wurden nach dem Ein- bzw. Dreibuchstaben-Code entsprechend den IUPAC-IUB Vereinbarungen von 1969 abgekürzt.

## 1 Einleitung

Gut entwickelte Wasserstofftechnologien wie Wasserstoffmotoren könnten eine unbegrenzte Energiequelle schaffen, indem sie sich das Prinzip der grünen Pflanzen zu Nutze machen und Wasserstoff durch Zufuhr der Energie des Sonnenlichtes gewinnen. Die „Global Photonic energy cooperation“ (GEPC) entwickelt eine Solar getriebene Reaktortechnologie, welche das Prinzip des photosynthetischen Prozesses, im Speziellen das des Photosystem II (PSII), imitiert. Photonische Energie wird absorbiert und in elektrische Energie konvertiert. Durch die Kombination von Photoelektrolyse und Hydridspeicherung der Brennstoffzelle wird die elektrische Energie genutzt, um Wasserstoff freizusetzen.

Photosynthetisch aktive Organismen wie höhere Pflanzen, Algen und Cyanobakterien greifen seit Millionen Jahren auf ein ähnliches Prinzip zurück, bei dem durch Licht gewonnene Energie über einen als Photoassimilation bezeichneten Prozess Wasser und Kohlendioxid zu Sauerstoff und Kohlenhydraten umgewandelt werden [Barber, 2006]. In einer lichtgetriebenen Reaktion werden Elektronen über zwei Photosysteme gegen das thermodynamische Gefälle vom Wasser auf  $\text{NADP}^+$  übertragen. Als Folge dieser multienzymatischen, in grünen Pflanzen an das Thylakoidsystem gekoppelten Redoxreaktion wird zudem ein elektrochemischer Gradient erzeugt. Das Protonenpotential wird durch die ATP-Synthase zu Bildung von ATP ausgenutzt (Abb. 1.1). ATP und reduziertes Pyridinnukleotid werden in einer anschließenden Dunkelreaktion für die  $\text{CO}_2$  Fixierung benötigt.



### **Abbildung 1.1: Schematische Übersicht über den offenkettigen Elektronentransport in der Thylakoidmembran grüner Pflanzen**

Die Wasserspaltung erfolgt auf der Innenseite der Thylakoidmembran (Lumen) am Wasserspaltungsapparat (OEC). Der OEC ist peripher an PSII assoziiert. Die bei der Wasserspaltung freigesetzten Elektronen werden an Tyr161 (Yz) des D1-Proteins weitergeleitet. Yz reduziert P680<sup>+</sup>. P680<sup>+</sup> entsteht bei der Abgabe eines Elektrons an den primären Akzeptor Phäophytin (Phe) nach Licht-induzierter Anregung ( $h\nu$ ). Von Phäophytin aus wird das Elektron an Q<sub>A</sub>, ein gebundenes Plastochinon, und danach an Q<sub>B</sub>, ein dissoziierbares Plastochinon, übertragen. Ausgehend vom PSII wird das Elektron über den Plastochinonpool (PQH<sub>2</sub>) an den Cytochrom b<sub>6</sub>/f-Komplex (Cyt b<sub>6</sub>f) transferiert. Plastochinon (PC) vermittelt die Elektronenweiterleitung an PSI. Von dort aus wird das Elektron über P700 an Ferredoxin (Fd) geleitet. Ferredoxin überträgt das Elektron auf den Endakzeptor NADP<sup>+</sup>, der daraufhin zu NADPH + H<sup>+</sup> reduziert wird. Durch diesen Prozess wird ein Protonengradient im Inneren des Lumens aufgebaut. Das Protonenpotential liefert die energetische Grundlage für die ATP-Bildung durch die ATP-Synthase (ATP Synth.) [Merchant und Sawaya, 2005]. Die Lichtsammelkomplexe LHCII und LHCI leiten die aufgenommene Lichtenergie an P680 von PSII, bzw. an P700 von PSI weiter. Die stöchiometrische Verteilung der Ladungen wurde in dieser schematischen Übersicht nicht berücksichtigt. (modifiziert nach Häder, 1999)

Beide Photosysteme sind aus zahlreichen Untereinheiten bestehende Pigment-Protein Komplexe, deren dreidimensionale Strukturen insbesondere in Cyanobakterien schon recht gut bekannt sind. Durch Röntgenstrukturanalysen ist es möglich, die Molekülstruktur des PSII-Komplexes in einer Auflösung von 1.9 Å zu ermitteln [Umena *et al.* 2011].

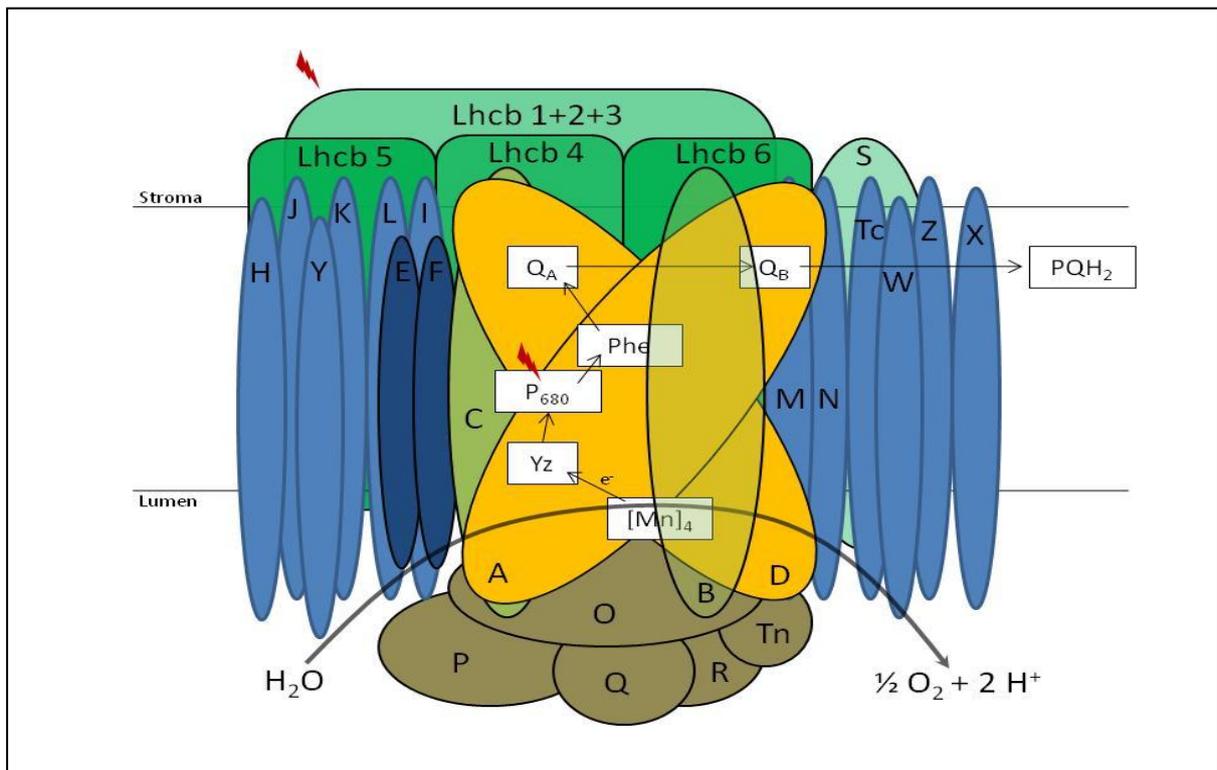
Diese Arbeit befasst sich mit einem Protein, das eine zentrale Untereinheit von PSII darstellt, aber trotz intensiver Bearbeitung noch nicht in allen seinen Eigenschaften verstanden ist. Dieses sogenannte D1-Protein bildet zusammen mit der D2-Untereinheit und verschiedenen Kofaktoren die Kernstruktur von PSII, in der nicht nur die primäre Ladungstrennung stattfindet, sondern auch unvermeidliche Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen. Einmal geschädigt, wird das D1-Protein proteolytisch abgebaut und durch eine neu synthetisierte Kopie ersetzt. Weder die exakte Natur der Schäden noch der genaue Mechanismus von Abbau und Neuassemblierung des Komplexes sind in allen Einzelheiten bekannt [Chi *et al.* 2011].

### **1.1 Struktur und Funktion von Photosystem II**

Das Photosystem II von Pflanzen und Cyanobakterien bildet ein Dimer. Jedes Monomer setzt sich aus 25 Untereinheiten [Lucinski und Jackowski, 2006] und 57 verschiedenen Kofaktoren zusammen (Abb. 1.2). Bei Pflanzen besteht der Kernkomplex eines Monomers aus den Proteinen D1 und D2. Sie ähneln den Untereinheiten L und M der Cyanobakterien in Struktur und Funktion. An D1 und D2 assoziieren die Chlorophyll-bindenden Proteine 43 (CP43) und 47 (CP47). Im Lumen der Thylakoide ist der Wasserspaltungskomplex (OEC) peripher an das PSII assembliert. Seine Proteinzusammensetzung unterscheidet sich zwischen den

## Einleitung

photosynthetisch aktiven Organismen. Allein das PsbO-Protein (33 kDa) ist ubiquitär vertreten. In Pflanzen assoziieren PsbP (23 kDa) und PsbQ (16 kDa) an PsbO. Bei *Chlamydomonas* und *Euglena* werden die OEC-Proteine, im Gegensatz zu anderen Pflanzen, unabhängig voneinander an PSII assembliert [Suzuki *et al.* 2004]. In Cyanobakterien und Rotalgen werden PsbU (10 kDa) und PsbV (12 kDa) an PsbO gebunden. Allen Organismen gemeinsam ist, dass die extrinsischen Proteine den Mn-Cluster stabilisieren, indem sie ein Kalziumatom und x-Chloridatomen binden, und dass im OEC die photolytische Wasserspaltung stattfindet. An PSII ist der Lichtsammelkomplex II (LHCII) gebunden. In den meisten Pflanzen bildet er ein intrinsisches Antennensystem, das aus Lhcb-Proteinen besteht. Diese binden Chlorophyll a und b. In Cyanobakterien und Rotalgen hingegen übernehmen Phycobiline, die an die extrinsischen Phycobilisomen gebunden sind, die Antennenfunktion.



**Abbildung 1.2: Schematische Übersicht über das PSII grüner Pflanzen**

Die Polypeptide D1 (A) und D2 (D) sind gelb und die Chlorophyll a-haltigen Proteine CP43 (C) und CP 47 (B) gelbgrün markiert. PsbE (E) und PsbF (F) sind dunkelblau und die Lhcb-Proteine 1 bis 6, sowie PsbS (S), grün hervorgehoben. Die Untereinheiten H, I, J, K, L, M, N, Tc, W, X, Y und Z wurden hellblau unterlegt. Die extrinsischen, regulatorischen Untereinheiten PsbO (O), PsbP (P) und PsbQ (Q), sowie PsbR (R) und Tn sind grau markiert. Die schwarzen Pfeile beschreiben den Elektronenfluss im PSII. P680 wird durch Lichtenergie (roter Pfeil) angeregt. Es leitet ein Elektron an den primären Akzeptor Phäophytin (Phe) weiter. Von Phäophytin aus wird das Elektron an  $Q_A$  und dann an  $Q_B$  abgegeben.  $Q_B$  liefert Elektronen an den mobilen Plastochinon-Pool ( $PQH_2$ ). Nach erfolgter Wasserspaltung, an der ein tetra-Mangancluster ( $[Mn]_4$ ) beteiligt ist, werden die Elektronen über  $Tyr_{161}$  (Yz) des D1-Proteins an  $P680^+$  weitergeleitet. Dadurch wird  $P680^+$  zu P680 reduziert. (modifiziert nach Lucinski und Jackowski, 2006)

## Einleitung

LHCII absorbiert das eingestrahle Licht und leitet es an den D1 und D2 gebundenen primären Elektronenakzeptor P680 weiter. Dieser überträgt nach erfolgter Anregung Elektronen an das D1-gebundene Phäophytin. Nach der Elektronenabgabe entsteht ein positiv geladenes Chlorophyll<sub>680</sub><sup>+</sup>, das als starkes Oxidationsmittel fungiert. Es wird von Tyr<sub>Z</sub>, dem Tyr161 des D1-Proteins, reduziert [Babcock *et al.* 1989]. So wird ein Tyrosinradikal erzeugt [Pujols-Ayala und Barry, 2004], das seinerseits den tetra-Mangankomplex oxidiert. In einem fünfstufigen Prozess werden Wassermoleküle unter Einbeziehung des Manganclusters zu Sauerstoff oxidiert.

Die Ladungstrennung wird durch den Elektronentransfer auf das mit dem D2-Protein assoziierte Plastochinon Q<sub>A</sub> und das mit dem D1-Protein assoziierte Q<sub>B</sub> stabilisiert [Nelson und Yocum, 2006]. Nach der Reduktion von Q<sub>B</sub> zu Plastohydrochinon werden die Elektronen über den Plastochinonpool auf den Cytochrom<sub>b</sub>/f-Komplex übertragen. Dabei werden Protonen vom Stroma ins Lumen transportiert. Vom Cytochrom<sub>b</sub>/f-Komplex aus werden die Elektronen über Plastochinon auf P700 des Photosystems I (PSI) übertragen. Nach der Weiterleitung der Elektronen an NADP<sup>+</sup> wird dieses zu NADPH + H<sup>+</sup> reduziert. Der im Lumen erzeugte Protonengradient wird von der ATP-Synthase zur Bildung von ATP genutzt (Abb. 1.1).

### 1.2 Struktur des D1-Proteins

Abbildung 1.3 stellt das D1-Protein schematisch dar. Das Protein enthält fünf transmembrane (TM)  $\alpha$ Helices. Verschiedene Kofaktoren, die am photosynthetischen Prozess beteiligt sind, werden durch das D1-Protein gebunden. Dazu gehören: P680, Q<sub>B</sub>, Phäophytin, ChlD1 und ChlZD1, ein Eisen-Ion und der tetra-Mangancluster.

Der N-Terminus des D1-Proteins ist Stroma exponiert, während der C-Terminus ins Lumen der Thylakoide ragt. N- und C-Terminus spielen eine bedeutende Rolle bei der Integration in die Thylakoidmembran, der Reifung des D1-Proteins und dem Abbau durch Proteasen [Nixon *et al.* 1992; Takahashi *et al.* 1996; Sugiura *et al.* 1998].

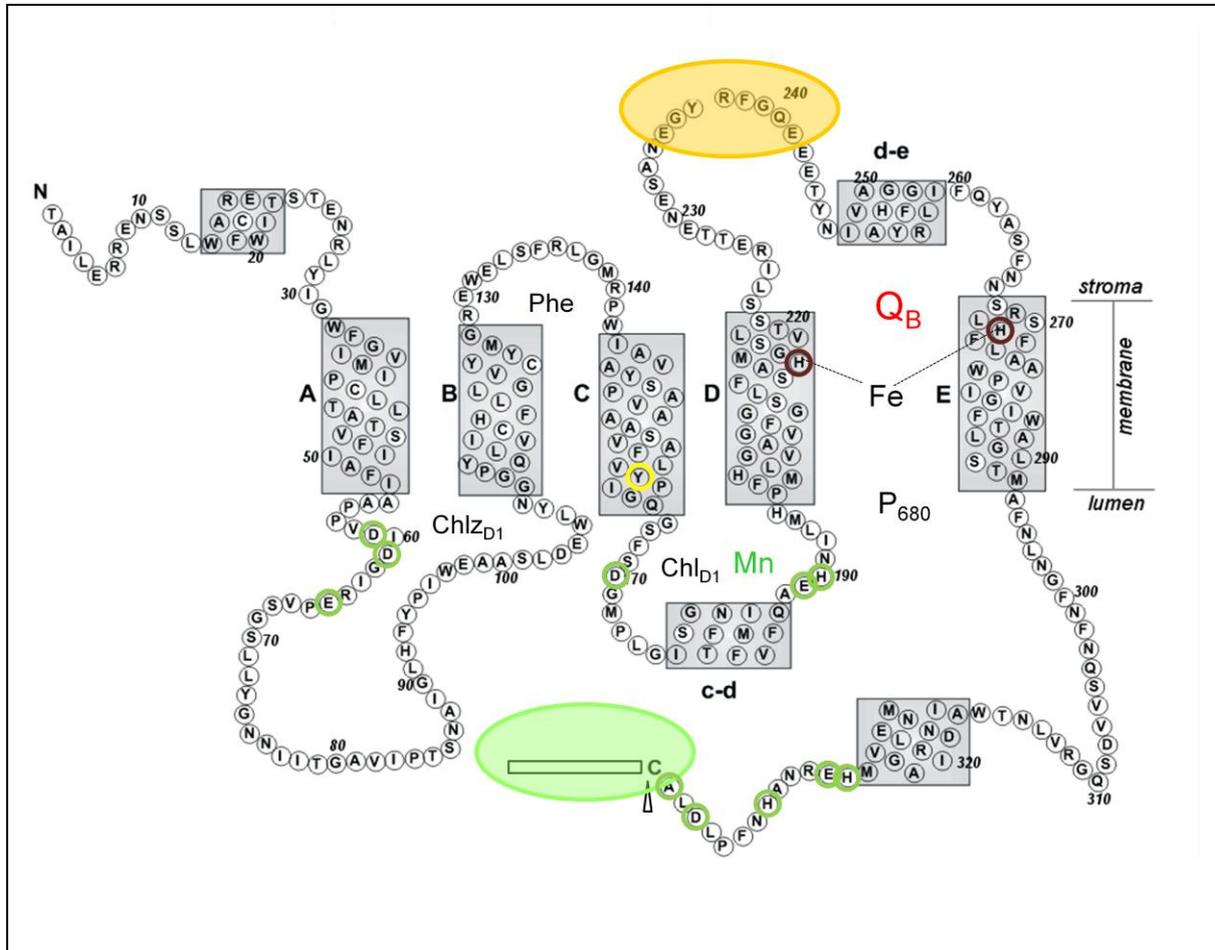
Das D1-Protein erfährt dabei verschiedene Modifikationen:

Bei der Umwandlung des D1-Vorläuferproteins in das reife D1-Protein werden C-terminal neun Aminosäuren abgespalten [Yamamoto *et al.* 2001]. Bei höheren Pflanzen wird zusätzlich das N-terminale Methionin prozessiert. Das daraufhin am N-Terminus liegende Threonin wird N-acetyliert und durch eine lichtabhängige, redoxregulierte Kinase O-phosphoryliert [Mattoo und Edelman, 1987, Michel *et al.* 1988, Elich *et al.* 1992, Mattoo *et*

## Einleitung

al. 1993]. Bei *Chlamydomonas* und Cyanobakterien findet jedoch keine Phosphorylierung des D1-Proteins statt.

Des Weiteren wurden die Oxidation spezifischer Aminosäuren [Sharma *et al.* 1997] und eine Palmitoylierung des D1-Proteins [Mattoo und Edelman, 1987] beschrieben.



### Abbildung 1.3: Schematische Übersicht über das D1-Protein grüner Pflanzen

Das D1-Protein besteht aus neun  $\alpha$ -Helices (grau unterlegt). Fünf davon sind transmembran (A - E). Die Helices C und D werden durch den C-cd Loop und die Helices D und E durch den D-de Loop verbunden. Der N-Terminus ist Stoma-exponiert, während der C-Terminus ins Lumen ragt. Der Vorläufer des D1-Proteins wird C-terminal durch die Protease CtpA gespalten (Dreieck). An das reife Protein sind mehrere Kofaktoren gebunden. Zu diesen zählen: P680,  $Q_B$ , ein Eisen-Ion (Fe) (gebunden durch H251 und H272), der tetra-Mangancluster (Mn) (gebunden durch D59, D61, E65, D170, E189, H190, H331, E332, H336, D342, A344; durch grüne Kreise markiert), Phäophytin (Phe),  $Chl_{D1}$  und  $Chl_{ZD1}$ . Das redoxaktive  $Tyr_z$  wurde gelb markiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *C. reinhardtii*-Stämme verwendet, die Mutationen im D-de Loop (orangene Ellipse) bzw. in der C-terminalen Extension (grüne Ellipse) trugen. (modifiziert nach Wilski, 2004)

### 1.3 Schädigung des PSII und des D1-Proteins

Das D1-Protein bildet zusammen mit dem D2-Protein den Kern des PSII. Beide Proteine zeigen eine primäre Sequenzübereinstimmung von 27 %. Doch im Gegensatz zum D2-Protein weist das D1-Protein bei Belichtung einen stark erhöhten „turnover“ auf.

Nach Aro *et al.* kommt es während der Lichtreaktion zur Photoinhibierung, wenn die Menge des geschädigten PSII die Menge des reaktivierten PSII übersteigt [Aro *et al.* 1993]. Dabei wird zwischen zwei Arten der Photoinhibierung unterschieden: der Akzeptor- und der Donor-Seiten-Photoinhibierung. Bei der Akzeptor-Seiten-Photoinhibierung wird  $Q_A$  unter Starklichtstress *in vitro* reduziert, protoniert und entlassen. Bei anhaltendem Lichteinfall kommt es zur Ladungs-Rekombination des primären Radikalpaars  $P680^+$ - $Pheo^-$ . Dadurch wird die Ausbildung von Triplettchlorophyll ( $^3P680$ ) begünstigt. Reagiert  $^3P680$  mit Sauerstoff, wird Singulett-Sauerstoff produziert [Setlik *et al.* 1990, Vass *et al.* 1992]. Singulett-Sauerstoff schädigt z.B. das D1-Protein, indem es oxidiert und damit funktionsunfähig gemacht wird.

Donor-Seiten-Photoinhibierung wird durch einen nicht-funktionstüchtigen OEC ausgelöst. Bei Belichtung des PSII kommt es zur Blockade des zum primären Elektronendonator  $P680^+$  gerichteten Elektronentransportes [Theg *et al.* 1986, Jegerschöld *et al.* 1990]. Die daraufhin aus der Umgebung frei werdenden Elektronen schädigen benachbarte Chlorophylle, Carotinoide und Aminosäurereste [Aro *et al.* 1993, Sharma *et al.* 1997].

Lange wurde davon ausgegangen, dass die Licht-induzierte Schädigung des PSII in einem einzigen Prozess erfolgt: Durch Starklicht-Exposition entstehen ROS, die das D1-Protein schädigen und dadurch den D1-Abbau durch Proteasen initiieren [Aro *et al.* 1993, Yamamoto 2001]. Diese Hypothese wurde von Takahashi und Murata durch neue Erkenntnisse ergänzt: Zuerst wird der Mangancluster durch Absorption von UV-Licht und starkem Blaulicht aus dem OEC entlassen. Ausgehend vom Chlorophyll, das sichtbares Licht absorbiert, wird das PSII-Reaktionszentrum inaktiviert. Daraufhin liegt  $P680$  länger in seiner oxidierten Form vor [Takahashi und Murata, 2008]. Die bei diesen Prozessen entstehenden ROS inhibieren den Reparaturprozess und die D1-Synthese [Murata *et al.* 2007, Mohanty *et al.* 2007].

Das defekte D1-Protein wird durch Proteasen abgebaut. Anschließend wird CP43 aus dem PSII entlassen [Komenda *et al.* 2004]. Die CP43 freien PSII-Monomere befinden sich in der Stroma-Region. Da sie keinen Mangancluster und keinen OEC mehr besitzen, sind sie nicht in der Lage Sauerstoff zu entwickeln [Danielsson *et al.* 2006].

### 1.4 Abbau des D1-Proteins

Die Spaltung, bzw. der Abbau des D1-Proteins kann durch ROS und durch Proteasen erfolgen.

Eine durch oxydativen Stress induzierte D1-Spaltung kann *in vitro* zum Beispiel durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid simuliert werden [Miyao, 1994, Miyao *et al.* 1995, Okada *et al.* 1996, Lupinkova und Komenda, 2004]. Entsprechende Spaltprodukte treten auch *in vivo* bei unkontrolliertem Entstehen von ROS auf. Das oxydativ geschädigte D1-Protein zeichnet sich durch eine Mobilitätsveränderung im SDS-Acrylamidgel und die Formation von Vernetzungsprodukten aus [Davies, 1987].

Weitere Studien belegen, dass Proteasen der DegP/HtrA-Familie am D1-Abbau beteiligt sind [Virgin *et al.* 1991, Lindahl *et al.* 2000, Spetea *et al.* 2000, Haußühl *et al.* 2001]. Haußühl *et al.* zeigen, dass die Spaltung des D1-Proteins in ein 23 kDa und ein 10 kDa-Fragment durch die Deg2-Protease initiiert wird. Demnach findet die initiale Spaltung im D-de Loop des D1-Proteins statt. Entsprechende Fragmente wurden bereits nach Überreduktion des primären Akzeptors beobachtet [Greenberg *et al.* 1987, Salter *et al.* 1992, Canovas und Barber, 1993, Kanervo *et al.* 1998, Spetea *et al.* 1999].

Kapri-Pardes *et al.* untersuchten den Einfluss der Deg1-Protease auf die D1-Spaltung in *A. thaliana*. Deg1-Mutanten zeigten eine Anhäufung des D1-Proteins. Ein C-terminales D1-Spaltprodukt trat hier nur in geringen Mengen auf [Kapri-Pardes *et al.* 2007]. Zusätzlich spielt Deg1 bei dem Abbau des OEE1 und des Plastocyanins eine wichtige Rolle [Chassin *et al.* 2002].

Sun *et al.* beschreiben, dass Deg5 und Deg8 an der initialen Spaltung des D1-Proteins *in vivo* unter photoinhibierenden Konditionen beteiligt sind [Sun *et al.* 2007]. Eine weitere Arbeit von Sun *et al.* belegt, dass die im Chloroplasten-Stroma vorkommende Protease Deg7 am proteolytischen Abbau der Proteine D1, D2, CP43 und CP47 beteiligt ist [Sun *et al.* 2010].

Im Gegensatz zu diesen Arbeiten stehen Publikationen, die zeigen, dass die D1-Menge in *deg*-Mutanten unverändert bleibt [Nixon *et al.* 2005, Barker *et al.* 2006, Huesgen *et al.* 2006].

Komenda *et al.* erarbeiteten am Beispiel von *Synechocystis* ein Modell, das die D1-Proteolyse durch die Endoproteinase FtsH erklärt [Komenda *et al.* 2007]: Durch die Licht-induzierte Inaktivierung des PSII dissoziiert der Reaktionskomplex 47 (RC47). In Folge dessen wird das D1-Protein strukturell instabil. Es wird N-terminal von der FtsH-Protease erkannt. Ausgehend vom N-Terminus erfolgt ein ATP-getriebener D1-Abbau, bei dem kurze Oligopeptide freigesetzt werden.

Für die Theorie von Komenda *et al.* spricht, dass auch bei Mutation der putativen Deg2-Erkennungsstelle eine D1-Spaltung stattfindet [Nixon *et al.* 1995, Mulo *et al.* 1997]. Zudem

## Einleitung

beobachteten Yoshioka *et al.* die Entstehung eines 23 kDa Fragmentes auch in Membranen, die mit Salzen gewaschen wurden, um peripher assoziierte Deg-Proteasen zu entfernen [Yoshioka *et al.* 2006].

Bisher sind der genaue Ablauf des D1-Abbaus und die Identität der daran beteiligten Proteasen nicht vollständig geklärt [Komenda *et al.* 2010]. So stellt zum Beispiel die Tatsache, dass OEE1 GTP binden kann und damit vermutlich an der Regulation des D1-Abbaus beteiligt ist, einen weiteren interessanten Aspekt dar [Roose *et al.* 2007].

Unabhängig von diesem System könnte ein fehlerhaft exprimiertes D1-Protein auch über einen tm-RNA-Anhang für den Abbau markiert werden.

Von Preiss *et al.* wurde die Mutante Del1 konstruiert, die ein verkürztes D1-Protein (tD1) exprimiert; sie besitzt kein PSII und kann daher nicht photoautotroph wachsen. Die Helices A und B, sowie ein Teil der Helix C des tD1-Proteins enthalten die Aminosäuresequenz des Wildtyps. Weitere 30 Aminosäuren codieren auf Grund eines „frameshifts“ für einen „non-sense“ C-Terminus. Dieser führt zum vorzeitigen Translationsstopp [Preiß *et al.* 2001].

Preiß *et al.* wiesen nach, dass neben dem tD1-Protein ein etwa 1 kDa größeres Protein in der Mutante Del1 auftritt, das im Wildtyp nicht nachgewiesen wird. Diese Beobachtung gibt Anlass zu der Vermutung, dass tD1 vor seinem Abbau durch eine tm-RNA markiert wird: Noch während der Expression wird carboxyterminal ein spezifischer Tag an das Protein angehängen, der den Abbau des Proteins initiiert.

Die tm-RNA ist offensichtlich in allen Bakterien vorhanden und wurde bisher in einigen Plastiden (z.B. bei *Porphyra purpurea*, *Odontella sinensis*, *Cyanophora paradoxa*) und den Mitochondrien von *Reclinomonas americana* identifiziert [Schönhuber *et al.* 2001]. Sie initialisiert den Abbau von unvollständig translatierten Proteinen [Hanawa-Suetsugu *et al.* 2001]. Wenn das Ribosom bei der Translation des Proteins pausiert, assoziiert eine aminoacetylierte tm-RNA in der A-Stelle des Ribosoms [Hayes *et al.* 2002]. Die naszierende Polypeptidkette wird auf die tRNA der tm-RNA übertragen und mit dem Alanin der tm-RNA verknüpft. Nachdem die, das fehlerhafte Protein codierende, mRNA aus dem Ribosomen entlassen wurde, wird die Translation des fehlerhaften Proteins fortgesetzt. Dabei wird ein von der tm-RNA codiertes Peptid C-terminal an die naszierende Polypeptidkette angehängen [Keiler *et al.* 1996]. Das markierte Protein wird von verschiedenen Proteasen wie zum Beispiel ClpXP und ClpAP erkannt und abgebaut [Flynn *et al.* 2001, Burton, 2001].

### 1.5 D1-Protein-Synthese und Assemblierung des PSII-Komplexes

Nach dem Abbau des D1-Proteins muss eine neue Kopie in den PSII-Komplex reintegriert, bzw. der PSII-Komplex neu assembliert werden.

Uniacke und Zerges stellten die Theorie auf, dass Synthese und Assemblierung der PSII-Untereinheiten in *C. reinhardtii* in der Nähe der Pyrenoid-Region stattfinden. Dort sind auch die entsprechenden mRNAs und die Translationsmaschinerie lokalisiert. Neu assemblierte PSII-Komplexe werden innerhalb des Chloroplasten zu den Thylakoiden transportiert [Uniacke und Zerges, 2007].

In einem ersten Schritt binden nucleär kodierte regulatorische Komplexe an das 5'-Ende der *psbA*-mRNA [Somanchi und Mayfield, 2001]. Danach wird die mRNA von Ribosomen gebunden. Der *psbA*-mRNA-Ribosomen-Komplex wird durch Bindung von cpSRP54 zur Thylakoidmembran transportiert und über RB47, sowie RB60 an die Membran gebunden. RB47 und RB60 sind Translations-Initiations-Regulatoren, die an die UTR der *psbA*-mRNA assoziieren [Nilsson *et al.* 1999, Trebitsh *et al.* 2001, Kim und Mayfield, 2002, Alergand *et al.* 2006]. An der kotranslationalen Insertion des D1-Proteins sind der Translokationskanal cpSecY, Slr1471p und REP27-HSP70 beteiligt [Zhang *et al.* 1999, Zhang *et al.* 2001, Ossenbühl *et al.* 2006, Park *et al.* 2007, Dewez *et al.* 2009]. Während der Elongation und Translation interagieren die TM-Segmente des naszierenden D1-Proteins mit anderen PSII-Komponenten. Nachdem zwei TM-Helices translatiert wurden und sich die dritte TM-Helix noch im Ribosomentunnel befindet, öffnet sich der Translokationskanal lateral. Das D1-Protein interagiert mit einem Rezeptorkomplex, der aus D2, Cytb559, PsbI und eventuell CP47 besteht [Aro *et al.* 2005]. Komenda *et al.* beschreiben, dass der D1 Vorläufer (pD1) in einen Rezeptorkomplex, bestehend aus D2, Cyt b559 und PsbI integriert wird. CP47 ist dabei nicht anwesend. Bei dem Vorgang wird pD1 durch HCF136 (YCF48) stabilisiert [Komenda *et al.* 2008].

Wenn pD1 aus vier TM-Segmenten besteht, wird der Komplex durch Bindung von weiteren Kofaktoren und die Ausbildung von transienten Disulfidbrücken zwischen den Proteinen D1 und D2 stabilisiert [Kim *et al.* 1991, Zhang *et al.* 2000]. Erst wenn pD1 von den Ribosomen entlassen wird, kommt es zur Insertion der fünften TM-Helix. Gleichzeitig wird der C-Terminus ins Thylakoidlumen transvertiert [Baena-Gonzales und Aro, 2002].

An der Prozessierung des pD1 ist eine Serin-Protease, die CtpA, beteiligt [Yamamoto *et al.* 2001]. Für die Reifung ist die Interaktion mit dem Tetratricopeptid PratA erforderlich [Kuvinovka *et al.* 2005] und, wie Untersuchungen von Wei *et al.* zeigen, vermutlich auch das Protein LPA19 [Wei *et al.* 2010]. Komenda *et al.* diskutieren, dass außerdem eine CtpB-

Protease und eine weitere, unbekannte Protease in diesen Prozess involviert sind [Komenda *et al.* 2007].

Es bleibt ungeklärt, ob der CP43-Subkomplex vor oder nach der pD1 Reifung mit RC47 assoziiert [Zhang *et al.* 2000, Minagawa und Takahashi, 2004]. Nach der Assemblierung von CP43 werden luminale Aminosäuren von D1 und CP43 für die Ligation des Mangan-Clusters genutzt [Suorsa und Aro, 2007]. Die OEC-Proteine akkumulieren schon vor der Synthese des PSII-Komplexes im Lumen [Mayfield *et al.* 1987]. Sie sind nicht für die direkte Ligation des Clusters notwendig, doch sie wirken durch die Bindung von Calcium- und Chlorid-Ionen stabilisierend [Ferreira *et al.* 2004].

Es wird spekuliert, dass jeder Schritt der PSII-Assemblierung von spezifischen Assemblierungsfaktoren begleitet wird. Viele davon wurden noch nicht identifiziert. Cai *et al.* beschreiben, dass LPA2 und LPA3 für eine korrekte PSII-Assemblierung anwesend sein müssen [Cai *et al.* 2010]. Armbruster *et al.* zeigen, dass PAM68 in einem frühen Intermediat-Komplex der aus dem D1-Protein und LPA1 besteht, assoziiert [Armbruster *et al.* 2010]. Die genaue Funktion dieser Faktoren ist noch nicht im Detail geklärt.

### 1.6 Photosystem II-Präparationen

Um die im PSII stattfindenden Reaktionen aufzuklären und die daran beteiligten Komponenten zu identifizieren, wurden verschiedene PSII-Isolierungsmethoden entwickelt.

Die in Tabelle 1.1 aufgeführten Präparationen eignen sich, um das gesamte PSII und PSII-Subkomplexe aus verschiedenen Spezies, an die jeweilige Problematik angepasst, zu isolieren. Die dort beschriebenen Präparationen eignen sich jedoch nur bedingt, um Modifikationen eines einzelnen PSII-Proteins zu untersuchen. Denn entweder werden die einzelnen Untereinheiten nur unzureichend voneinander separiert oder sie werden während der oft aufwendigen Präparation artifiziell modifiziert.

## Einleitung

**Tabelle 1.1: Geschichte der PSII-Präparation**

Aufgelistet sind die wichtigsten PSII-Präparationen und die jeweils dazugehörige Quellenangabe.

Autoren (Jahr)	PSII-Präparation
Diner und Wollman (1980)	Isolierung von aktiven PSII-Partikeln aus <i>C. reinhardtii</i> , ohne PSI-Verunreinigung
Berthold <i>et al.</i> (1981)	Isolierung von PSII-Komplexen aus höheren Pflanzen, ohne PSI-Verunreinigung; Grundlage bildete die Membranpräparation nach Robinson <i>et al.</i> (1980)
Nanba und Satoh (1987)	Isolierung eines D1/D2/Cytochrom b559-Komplexes aus Grana-Thylakoiden; Grundlage bildete die Präparation nach Kuwabara und Murata (1982)
Tang <i>et al.</i> (1990)	Isolierung eines D1/D2-Komplexes aus <i>Spinacea oleracea</i> ; nur Heterodimere und keine Monomere gereinigt; Grundlage bildete die Präparation nach Nanba und Satoh (1987)
Shim <i>et al.</i> (1990)	Isolierung von aktiven PSII-Komplexen aus <i>C. reinhardtii</i> ; Grundlage bildete die Präparation nach Berthold <i>et al.</i> (1981)
Shipton und Barber (1991)	Isolierung von PSII-Komplexen aus <i>Pisum sativum</i> , Grundlage bildete die Präparation nach Nanba und Satoh (1987)
Miyao (1994)	Isolierung von PSII-Komplexen aus <i>Oryza sativa</i> , Grundlage bildete die Präparation nach Nanba und Satoh (1987)
Schiller und Dau (2000)	Verbesserte PSII-Präparationsmethoden für <i>Spinacea oleracea</i> , <i>Hordeum vulgare</i> , <i>Scenedesmus</i> und <i>Chlamydomonas</i> etabliert
Sugiura <i>et al.</i> (1998)	Fusion des C-Terminus des D2-Proteins mit einem 6fachen His-Tag; Isolierung des PSII-Komplexes aus <i>C. reinhardtii</i> unter Nutzung der IMAC; bei dem Versuch, das D1-Protein N-terminal mit einem 6fachen His-Tag zu fusionieren, wurden keine photoautotrophen Transformanten erhalten
Sugiura und Inoue (1999)	Markierung des CP43 mit einem 6fachen His-Tag; Isolierung des PSII-Komplexes aus <i>Synechococcus elongatus</i> unter Nutzung der IMAC
Suzuki <i>et al.</i> (2003)	Markierung des CP47 mit einem 6fachen His-Tag; Isolierung des PSII-Komplexes aus <i>C. reinhardtii</i> unter Nutzung der IMAC
Cullen <i>et al.</i> (2007)	Markierung des PsbH-Proteins mit einem 6fachen His-Tag; Isolierung des PSII-Komplexes aus <i>C. reinhardtii</i> unter Nutzung der IMAC

### 1.7 Zielstellung der Arbeit

Der PSII-Komplex der *Chlamydomonas reinhardtii* ähnelt in seiner Protein- und Pigment-Zusammensetzung dem höherer Pflanzen [de Vitry *et al.* 1991]. Doch im Gegensatz zu höheren Pflanzen ist die Chlorophycee leicht zu kultivieren. Plastom, Chondrom und Kerngenom der biflagellaten Grünalge sind vollständig sequenziert [Grossman *et al.* 2003, Merchant *et al.* 2007]. Die breite Mutantenkollektion und die einfache Transformierbarkeit des Genoms machen diesen Einzeller zu einem attraktiven Modellorganismus [Harris, 2001]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Vorteile, die *C. reinhardtii* gegenüber höheren Pflanzen bietet, genutzt um das D1-Protein und seinen Vorläufer, pD1, zu untersuchen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine schnelle und leicht reproduzierbare Methode zu etablieren um das D1-Protein von anderen Thylakoidmembranproteinen zu trennen. Nach dem Bereitstellen des D1-Proteins in Coomassie-färbbaren Mengen, wurde es für Modifikations-Analysen und Spaltungsstudien eingesetzt.

Um die Funktionalität des isolierten Proteins zu überprüfen, war es erforderlich, *in vitro* Spaltungsstudien unter Verwendung des gereinigten D1-Proteins durchzuführen. Dadurch wurden Voraussetzungen geschaffen, um künftig Schnittstellen von Deg- und FtsH-Proteasen zu identifizieren.

Unter Nutzung zweier pD1-Mutanten war es das Ziel, mit pD1 assemblierte Faktoren zu isolieren, um den momentanen Stand der Forschung durch neue Untersuchungsergebnisse zu ergänzen.

## 2 Material und Methoden

Die unter dem Kapitel 2 zusammen gefassten Methoden dienen als Grundlage dieser Arbeit. Aufgeführt wurden experimentelle Durchführungen und die Zusammensetzung der dafür benötigten Medien, bzw. Lösungen. Auf die Kombination der Methoden untereinander und die daraus gewonnenen Erkenntnisse wird in den Kapiteln 3 und 4 näher eingegangen.

### 2.1 Chemikalien, Enzyme und Antikörper

Alle Chemikalien wurden von den Firmen GE-Healthcare, Quiagen, Fermentas, Fisher Scientific, Merck, Roche, Roth und Sigma Aldrich bezogen. Die Detergentien wurden von den Firmen Sigma Aldrich und Plus-one erhalten. Die Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs, die Oligonukleotide von Biomers, die T4-Polynukleotidkinase von Fermentas und die GoTaq-Polymerase mit entsprechendem Puffer von Promega bezogen.

Für den immunologischen Nachweis der Proteine D1, D2, CP43, CP47, Rubisco, OEE33 und LHCII kamen die in Tabelle 2.1 aufgelisteten ersten und zweiten Antikörper zum Einsatz. Des Weiteren wird in Tabelle 2.1 aufgeführt, woher der jeweilige Antikörper bezogen wurde. Auf Spezifität der Antikörper wird in Tabelle 2.3 näher eingegangen.

**Tabelle 2.1: Antikörper und deren Bezugsquelle**

Aufgeführt sind die ersten und die den entsprechenden ersten Antikörper detektierenden zweiten Antikörper sowie die jeweilige Bezugsquelle.

1. Antikörper	Bezugsquelle des 1. Antikörpers	2. Antikörper	Bezugsquelle des 2. Antikörpers
P25K	Hippler, Jena		
897t22	Johanningmeier, Bochum	Anti-Kaninchen	Firma Chemicon international
282t			
322t			
345t			
320t			
OEE1			
D1-N-terminal	Firma Agrisera	Anti-Kaninchen	Firma Sigma
D1-global		Anti-Huhn	
12CA5	Berkeley Antibody Company, Richmond (USA)	Anti-Maus1 sowie	Firma Chemicon international
Anti-His	Firma Roche	Anti-Maus2	

## 2.2 Kultivierung der *E.coli*-Zellen

### A) Anzucht

Das zur Kultivierung der *E.coli*-Zellen benötigte Medium setzte sich wie folgt zusammen:

**LB-Medium:** 1 % Trypton (w/v), 1 % NaCl (w/v), 0,5 % Hefeextrakt (w/v)

Um Kontaminationen der *E.coli*-Kulturen zu vermeiden wurden alle Nährmedien für 20 min bei 121°C und 200 kPa sterilisiert (Varioklav<sup>®</sup> Dampfsterilisator, H+P Labortechnik GmbH). Hitzelabile Komponenten wurden steril filtriert (Millipore-Membranfilter, Porendurchmesser 0,25 µm) und dem Medium (< 60°C) nachträglich zugesetzt.

Die Anzucht der *E.coli*-Zellen erfolgte in LB-Medium (Luria-Bertani-Medium, [Sambrook *et al.* 1989]). Zur Herstellung von Festmedium wurde dem LB-Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

Kulturen der *E.coli*-Zellen wurden auf LB-Agar angelegt und bei 37°C (Inkubator: Heraeus Typ B5028) bebrütet. Flüssigkulturen mit einem Volumen von 5 ml wurden auf einem Reagenzglas-Rotator (*Environmental incubator shaker*, New Brunswick scientific G<sub>24</sub>), größere Volumina im Erlenmeyerkolben auf einem Inkubationsschüttler (Thermoshake, Gerhardt) bei 200-240 x g angezogen. Als Übernachtskulturen (ÜK) wurden Kulturen bezeichnet, die mindestens 18 h bebrütet wurden.

### B) Genexpression und Selektion

Zur Expression heterologer Gene wurde 1 l Flüssigmedium mit 5 ml einer ÜK angeimpft, bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> = 0,6-0,8 bei 37°C inkubiert, anschließend mit IPTG (Endkonzentration 0,1 mM) versetzt und unter kontinuierlichem Schütteln für 24 h bei 19°C bzw. 30°C belassen.

Die transformierten *E.coli*-Stämme wurden unter Selektionsdruck durch Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) kultiviert.

### C) Lagerung

Zur Lagerung der *E.coli*-Stämme wurden die Flüssigkulturen auf Festmedium ausgestrichen und nach erfolgter Bebrütung bei 4°C verwahrt. Zur dauerhaften Lagerung wurden Flüssigkulturen anteilig mit 7,5 % (v/v) DMSO versetzt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.3 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E.-coli* erfolgte unter Nutzung der von Birnboim und Doly beschriebenen Methode der alkalischen Lyse [Birnboim und Doly, 1979] und des „*Quiagen Plasmid Midi Kit*“ (Quiagen) nach Angaben des Herstellers. Gesamtzell-DNA aus *C. reinhardtii* wurde mit Hilfe des „*ChargeSwitch<sup>®</sup> gDNA Plant Kit*“ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers gewonnen. Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der „*QIAquick<sup>®</sup> Gel extraction Kit*“ (Quiagen) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die RNA-Isolierung erfolgte gemäß des TRIZol<sup>®</sup>-Protokolls (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers.

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde photometrisch bei OD<sub>260</sub> (Ultrospec2000, Pharmacia Biotech) bestimmt.

### 2.4 Gelelektrophorese der Nukleinsäuren

Die zur Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese nach Sambrook *et al.* benötigten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen [Sambrook *et al.* 1989]:

**1x TBE:** 45 mM Borat, 1,25 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 8,3

**1x MOPS:** 40 mM MOPS, 10 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,2

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse der DNA sowie zur gezielten Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 V (mA<sub>max</sub>) in Agarosegelen (1 % Agarose (w/v), 1x TBE). Als Elektrophoresepuffer diente 1x TBE. Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde die „*1 kb ladder*“ (Invitrogen) eingesetzt. Die Geldokumentation wurde durch eine mit dem UV-Tisch gekoppelte Kamera (Gel Imaging System, raytest) durchgeführt.

RNA wurde durch denaturierende Agarosegele (1,2 % Agarose (w/v), 1,1 % Formaldehyd (v/v), 1x MOPS) separiert. Vor der Auftragung auf das Gel wurde die RNA mit RNA-Ladepuffer (Fermentas) nach Angaben des Herstellers versetzt. Als Elektrophoresepuffer diente 1x MOPS. Nach Beladen des Gels wurden die Proben bei 80 V (mA<sub>max</sub>) für 6 h elektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.5 Modifikation der DNA

Die Restriktion der DNA, die Phosphorylierung des 5' DNA-Endes, sowie die Ligation der DNA-Fragmente wurde nach Sambrook und Russel [Sambrook und Russel 2001] sowie den Angaben der Hersteller der jeweiligen Enzyme in den mitgelieferten Puffern durchgeführt.

## 2.6 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

Die Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Zellen sowie die Transformation der Zellen mit Plasmid-DNA wurde nach Hanahan durchgeführt [Hanahan, 1983].

## 2.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde nach Saiki *et al.* durchgeführt [Saiki *et al.* 1988]. Es wurden Standard-PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 µl angesetzt, die sich, wie folgt, zusammensetzten: 100 ng Plasmid-DNA bzw. 200 ng genomische DNA als Matritze, 10 pmol jedes Oligonukleotides, 10 mM dNTPs und 2 U Go-Taq-Polymerase (Promega) im mitgelieferten Reaktionspuffer des Herstellers. Die PCR wurde in dem PCR-Automaten T<sub>3000</sub> Thermocycler der Firma Biometra<sup>®</sup> mit dem folgenden Programm durchgeführt: 1x (5 min 95°C), 25x (1 min 95°C; 45 sec 48°C-65°C je nach Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide; 1 min 72°C), 1x (10 min 72°C). Die Bezeichnungen und die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst. Unerwünschte Modifikationen der Amplifikate während der PCR wurden durch Sequenzierung der PCR-Produkte ausgeschlossen. Die Sequenzierung der DNA wurde als Auftragsarbeit von der Firma SeqLab durchgeführt.

**Tabelle 2.2: Oligonukleotide und deren Bezeichnung**

Aufgeführt sind die jeweiligen Oligonukleotide, die zur Amplifikation definierter DNA-Abschnitte eingesetzt wurden und deren Nukleotidsequenz.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5' → 3'
570fwd	ATC GTA TTC CAA GCA GAA CAC
P1fwd	AGT AGC TGC AGC TTC AGC
x2rev	AAG TCT AGA GGG AAG TTG

## 2.8 Erstellen von DIG-markierten Sonden

Durch die Primer P1fwd und x2rev wurde in einer Standard-PCR ein Teil des *psbA*-Fragmentes amplifiziert. Das Amplifikat wurde in eine zweite PCR eingesetzt, in der unter Verwendung der gleichen Primer eine erneute Amplifikation stattfand. Dabei wurden jedoch die dNTPs gegen DIG-Nucleotide (Roche) ausgetauscht, was zu einem Einbau von DIG-markierten dUTPs führte.

## 2.9 Kapillartransfer der RNA

Der zur Durchführung des Kapillartransfers benötigte Puffer setzte sich wie folgt zusammen:

**30x SSC:** 0,45 M Natriumcitrat, 4,5 M NaCl, pH 7,0

Die Northern Blot Analyse wurde in Anlehnung an das Protokoll von Kroczek durchgeführt [Kroczek, 1993].

Das RNA-Gel wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben für 10 min in H<sub>2</sub>O dest gewaschen und anschließend 45 min in 20x SSC äquiliibriert. Der Transfer der Nukleinsäuren auf NC-Membran erfolgte für mindestens 12 h via Kapillar-Blot [Thomas, 1980]. Die RNA wurde durch UV-Vernetzung (UV Stratalinker<sup>®</sup> 1800, Stratagene) auf der Membran fixiert.

## 2.10 Northern Blot

Die zur Durchführung der Northern Blot Hybridisierung und der folgenden Detektion des Transkriptes benötigten Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

**Prähybridisierungspuffer:** 62 % deionisiertes Formamid (v/v), 0,25 M NaCl, 0,12 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,0; 7 % SDS (w/v), 0,01 % N-Laurylsarcosin (w/v), 2,5 % Blocking-Lösung (w/v) (Roche, nach Angabe des Herstellers)

**Maleinsäurepuffer:** 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5

**Waschlösung 1:** 2x SSC, 0,1 % SDS (w/v)

**Waschlösung 2:** 0,1x SSC, 0,1 % SDS (w/v)

**Waschlösung 3:** 10 mM Maleinsäurepuffer, 0,3 % Tween20 (v/v)

**Blockingpuffer:** 10 mM Maleinsäurepuffer, 10 % Blocking-Lösung (w/v)

**Detektionspuffer:** 100 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 9,5

**TE-Puffer:** 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8,0

Die auf der Membran fixierte RNA wurde 2 h bei 50°C in Prähybridisierungspuffer unter ständigem Rotieren inkubiert (PersonalHyb<sup>®</sup>, Stratagene). Zur Herstellung des Hybridisierungspuffers wurden 25 ng DIG-markierte *psbA*-Sonde in 30 ml Prähybridisierungspuffer gegeben, 10 min bei 68°C denaturiert und auf 4°C gekühlt. Der Hybridisierungspuffer wurde luftblasenfrei zur Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte im Hybridisierungsofen bei 50°C für mindestens 12 h. Vor der Zugabe des anti-DIG-Fab-Konjugates (Roche) wurden folgende Waschschrirte durchgeführt: mit Waschlösung 1 wurde 2x 15 min bei RT, mit Waschlösung 2 für 2x 15 min bei 50°C und mit Waschlösung 3 1x 3 min inkubiert.

Anschließend wurden freie Stellen auf der Membran mit Blockingpuffer für 45 min bei RT unter kontinuierlichem Schütteln abgesättigt. Danach wurde 30 ml Blockingpuffer, der 1:10000 verdünntes anti-DIG-Fab-Konjugat enthielt, für 30 min bei RT und unter leichtem Schütteln mit der Membran inkubiert. Vor der Detektion wurde die Membran 2x 15 min mit Waschpuffer 3 gewaschen. Anschließend erfolgte für 2 min bei RT die Äquilibrierung mit Detektionspuffer. Zur Detektion der Signale wurde 2 % NBT/BCIP (Roche) in Detektionspuffer gelöst und die Membran damit benetzt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde TE-Puffer hinzugegeben.

### 2.11 Reinigung der Deg2-Protease

Die zur Reinigung der Deg2-Protease benötigten Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

**Puffer A:** 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 8,0

**Puffer B:** 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 15 mM Imidazol, pH 8,0

**Puffer C:** 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 200 mM Imidazol, pH 8,0

Die Reinigung der Deg2-Protease (codiert auf dem Plasmid pPH35) wurde nach einem Laborprotokoll der AG Adamska (Konstanz) mit geringfügigen Abweichungen durchgeführt.

Die mit 0,1 mM IPTG für mindestens 12 h bei 19°C induzierten *E.coli*-Zellen des Stammes Nova Blue DE3, die das Plasmid pPH35 trugen, wurden bei 4000 x g und 4°C pelletiert und in Puffer B resuspendiert. Die Zellen wurden durch die „Yeda-Press“ [Shneyour und Avron, 1970] aufgeschlossen (70 bar, 5 min, 4°C). Zelltrümmer und nicht aufgebrochene Zellen wurden durch Zentrifugation für 2 h bei 20000 x g und 4°C entfernt. Der Überstand wurde steril filtriert (Millipore-Membranfilter, Porendurchmesser 0,25 µm) und auf eine mit Puffer A äquilibrierte Ni-NTA Agarose (Quiagen)-Säule geladen. Das Waschen der Säule erfolgte mit Puffer B, bis kein Protein mehr im Durchfluss detektierbar war. Anschließend wurde die Deg2-Protease durch Zugabe des Puffers C eluiert und bei 4°C verwahrt.

### 2.12 Computerprogramme und Datenbanken

Die Erstellung der Klonierungsstrategien erfolgte unter Verwendung des Programmes „Clone Manager 5N“. Die Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide wurde unter Nutzung des Programmes „*oligonucleotide calculator*“ berechnet. Die Sequenz des *psbA*-Gens wurde aus der NCBI-Datenbank bezogen.

## 2.13 Verwendete Algenstämme

Folgende Stämme der Chlorophyceae *Chlamydomonas reinhardtii* wurden eingesetzt:

- IL: besitzt ein Intron-loses *psbA*-Gen (aus dem Fud7-Stamm [Bennoun *et al.* 1986] hervorgegangen), synthetisiert ein funktionsfähiges D1-Protein [Johanningmeier und Heiss, 1993]; Referenzstamm für Del1 und His10
- Del1: besitzt eine 425 bp-Deletion im *psbA*-Gen [Preiß *et al.* 2001], synthetisiert ein stark verkürztes D1-Protein (tD1)
- His10: besitzt zwischen den Aminosäuren 237 und 238 des D1-Proteins einen inserierten 10fachen His-Tag
- MCS4: besitzt eine 4 kDa große Extension am C-Terminus des D1-Proteins, die ein 6fachen His- und ein Hämagglutinin-Tag integriert
- MCS8: besitzt eine 8 kDa große Extension am C-Terminus des D1-Proteins, die ein 6fachen His-, ein Hämagglutinin- und ein TC-Tag integriert

## 2.14 Anzucht der Algenstämme

Für die Anzucht der Algenstämme wurde das von Gorman und Levine beschriebene TAP-Medium eingesetzt [Gorman und Levine, 1965]. Bei 22°C und kontinuierlicher Durchmischung auf einem Schüttler (3019 GFL, Burgwedel) wurden die Flüssigkulturen bei einer Lichtintensität von 150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  inkubiert (Warmtonlampen Tungsralux, 38 W1MF 83). Zur Erhaltung der Kulturen wurden die Algenzellen auf HS-Medium [Sueoka, 1960], das mit 3 % Agar-Agar versetzt wurde, bei 60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  angezogen.

Die nur zu heterotrophem Wachstum befähigte Mutante Del1 wurde auf TAP-Medium, das 3 % Agar-Agar enthielt, kultiviert.

Die in die Wachstumskurve eingesetzten Stämme wurden in HS-Medium angezogen.

Für den „Yeda-Press“ Aufschluss [Shneyour und Avron, 1970] wurden Algenzellen bis zu einer Dichte von etwa  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml Lösung in 1 l TAP herangezogen.

## 2.15 Konstruktion einer *C. reinhardtii*-Mutante mit 10fachem His-Tag im D1-Protein

### 2.15.1 Erstellen des *His-psbA*-Konstruktes

Um eine Sequenz, die einen 10fachen His-Tag codiert, via Oligonukleotidlinker in den Plasmiden pSH8 zu inserieren, wurde die Restriktionsstelle *BstEII* genutzt (Kapitel 3.2).

Der synthetische Oligonukleotidlinker (Abbildung 3.2.1) wurde durch Einsatz der T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert. 1  $\mu\text{l}$  des Ansatzes wurde zusammen mit 5  $\mu\text{g}$  *BstEII*-

geschnittenem Plasmid pSH8 im T4 Polynukleotidkinase-Puffer bei 4°C für mindestens 12 h inkubiert. Die kohäsiven Enden wurden durch die GoTaq-Polymerase (Promega) in empfohlenem Puffer nach Zugabe der dNTPs aufgefüllt. Die Transformation des *E.-coli* Stammes DH5alpha mit dem erstellten Plasmiden pSH8-His10 erfolgte wie unter Kapitel 2.6 beschrieben.

### 2.15.2 Transformation der *C. reinhardtii*

Die *C. reinhardtii* Mutante His10 wurde durch Verwendung des Plasmiden pSH8-His10 und des Einsatzes der Partikelkanone [Klein *et al.* 1987] erzeugt, wie bei Dauvillee *et al.* beschrieben [Dauvillee *et al.* 2004]. Nach der Transformation wurden die Algenzellen für 24 h auf TAP-Medium haltigen Agar-Platten belassen und anschließend auf HS-Platten überführt, um auf Photoautotrophie zu selektieren.

## 2.16 Chlorophyll- und Proteinkonzentrationsbestimmungen

### 2.16.1 Chlorophyllbestimmung

Ein Volumen x der Zellsuspension einer in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Kultur wurde zur Bestimmung der optischen Dichte entnommen, pelletiert und in 1 ml 100 % Aceton resuspendiert. Nach 3 min wurden die gefällten Proteine abzentrifugiert (20000 x g, 5 min). Die Messung der optischen Dichte des Überstandes erfolgte bei 652 nm (Photometer: UV-1602, Shimadzu). Zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an Chlorophyll a und b pro ml Lösung wurde folgende Gleichung [Arnon, 1949] zugrunde gelegt:

$$\text{mg Chlorophyll}_{(a+b)}/\text{ml Lösung} = E_{652} * (1 \text{ ml}/x \text{ ml})/34,5_{(\text{molarer Extinktionskoeffizient})}$$

### 2.16.2 Proteinextraktion und Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Proteinextraktion wurden mit 80 % Aceton (v/v) versetzte Proben bei -20°C für mindestens 2 h gefällt und abzentrifugiert (5 min, 20000 x g, 4°C). Die Proben wurden mindestens 2x mit 80 % Aceton gewaschen, bis das im Pellet verbliebene Chlorophyll unterhalb der photometrischen Nachweisgrenze lag.

Vor der Konzentrationsbestimmung wurden die Proteine gefällt und anschließend in 1 ml des entsprechenden Puffers resuspendiert. Die Ermittlung des Proteingehaltes erfolgte unter Nutzung des „MicoBCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit“ (Pierce).

## 2.17 Physiologische Untersuchungen

### 2.17.1 Zellzahlbestimmung

Für das Animpfen der Wachstumskurve wurde die Zellzahl einer Kultur nach Bürker mittels Thoma-Zählkammer ermittelt:

$$\begin{aligned} V_{\text{Großquadrat}} &= 0,1 \text{ mm}^3 \\ \Downarrow \\ V_{\text{Großquadrat in ml}} &= V_{\text{mm}^3} / 1000 = 0,0001 \text{ ml} \\ \Downarrow \\ \text{Faktor für die Umrechnung auf Zellzahl pro ml: } 1/V &= 10000 \\ \Downarrow \\ \text{mittlere Zellzahl in einem Großquadrat berechnet: } z \text{ Zellen auf } 1 \text{ mm}^2 & \\ \Downarrow \\ \text{Zellzahl pro ml Lösung: } 10000 \times z & \end{aligned}$$

### 2.17.2 Wachstumskurve

Nach Bestimmung der Zellzahl einer in HS-Medium angezogenen, in der halblogarithmischen Wachstumsphase befindlichen *C. reinhardtii*-Kultur mittels Thoma-Zählkammer, wurden 300 ml HS-Medium mit  $1,5 \times 10^7$  Zellen beimpft und in sterile Kulturröhren überführt. Bei einer Lichtintensität von  $60 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ ,  $25^\circ\text{C}$  und kontinuierlicher Begasung (Gasmischanlage: KM60-2ME, Witt; Kompressoreinheit: 393602, BWB) wurden die Zellen bis zum Überschreiten der halblogarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Die Probenahmen erfolgten in regelmäßigen Abständen. Die Zellzahl wurde durch Messung der optischen Dichte bei 750 nm ermittelt [Sanger und Granick, 1953].

### 2.17.3 Sauerstoffmessung

Der zur Durchführung der Sauerstoffmessung benötigte Puffer setzte sich wie folgt zusammen:

**Bicarbonatpuffer:** 0,1 %  $\text{NaHCO}_3$  (w/v)

Die Messung der Sauerstoffentwicklung erfolgte in Bicarbonatpuffer bei  $240 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$  (Fiber Illuminator FL-400, Walz) durch eine Clark-Elektrode (Oxygraph, Hansatech) nach Walker und Walker [Walker und Walker, 1987].

### 2.17.4 Starklichtuntersuchung

Algenzellen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden abzentrifugiert ( $1300 \times g$ , 5 min) und in 800 ml TAP entsprechend einer Dichte von  $15 \mu\text{g}$  Chlorophyll pro ml Lösung resuspendiert. Dieser Ansatz wurde in ein Thermostiergefäß ( $25^\circ\text{C}$ ) überführt und unter

ständigem Rühren 45 min bei Raumlicht belassen. Anschließend wurde die Algenkultur für 90 min unter Starklicht ( $2000 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , Halogenlampe: 230 V, 1000 W; Primalux, Hedler) bei  $25^\circ\text{C}$  (Kühlung: RM6, Lauda) inkubiert. Danach wurden die Algenzellen bei  $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  belassen, um die Nachsynthese des pD1 der MCS4 anzuregen (D. Fischer, unveröffentlicht). Das so behandelte Zellmaterial wurde durch die „Yeda-Press“ aufgearbeitet.

## 2.18 Probenaufbereitung

### 2.18.1 Zellaufschluss

Der zur Durchführung des Zellaufschlusses benötigte Puffer setzte sich wie folgt zusammen:

**Aufschlusspuffer:** 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8.0

#### A) Ultraschallaufschluss

Mit Hilfe von Ultraschall aufzuschließende Algenzellen, wurden abzentrifugiert ( $4000 \times g$ , 5 min), in 5 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und bei  $4^\circ\text{C}$  vier 15 sec Pulsen ausgesetzt (60 W, Amplitude 40 %, Branson Sonifier B-12 Cell Disruptor, G. Heinemann, Ultraschall und Labortechnik). Bei  $400 \times g$  wurden nicht aufgebrochene Algen und Zellwandreste entfernt. Nach nochmaliger Zentrifugation des Überstandes ( $20000 \times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ) wurde das Membranmaterial in 1 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und nach Bestimmung der Chlorophyllkonzentration (Kapitel 2.16.1) bei  $-20^\circ\text{C}$  verwahrt.

#### B) „Yeda-Press“ Aufschluss

400 ml *C. reinhardtii* Kultur mit einer Zelldichte von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml wurden abzentrifugiert (10 min,  $4000 \times g$ ). Alle weiteren Schritte wurden bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt, um den Abbau der Proteine durch Proteasen zu minimieren. Das nach der Zentrifugation erhaltene Pellet wurde mit 20 ml Aufschlusspuffer gewaschen und wiederholt zentrifugiert (10 min,  $400 \times g$ ). Anschließend wurden die Zellen in 20 ml Aufschlusspuffer aufgenommen und in die auf  $4^\circ\text{C}$  gekühlte „Yeda-Press“ überführt [Shneyour und Avron, 1970]. Es wurde zweimal ein Überdruck von 70 bar angelegt und nach 5 min auf atmosphärischen Druck reduziert. Durch den plötzlichen Druckabfall wurden die Algenzellen aufgebrochen (sie „platzen“ auf). Zellwandpartikel und nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch niedertourige Zentrifugation bei  $1000 \times g$  entfernt. Der Überstand wurde bei  $20000 \times g$  zentrifugiert um die Thylakoidmembranen zu pelletieren. Das Pellet wurde vorsichtig in 4 ml Aufschlusspuffer ( $4^\circ\text{C}$ ) aufgenommen und bei  $-20^\circ\text{C}$  verwahrt. Beim Resuspendieren war darauf zu achten, dass die sedimentierte Stärke nicht gelöst wurde. Chua und Bennoun empfehlen für Zellaufschluss der *C. reinhardtii* und Thylakoidmembranisolierung einen

HEPES/ Saccharose-Puffer [Chua und Bennoun, 1975]. Dieser Puffer wurde nicht genutzt, da das gewonnene Thylakoidmembranmaterial auch für die 2D IEF/SDS-PAGE und die 2D BN/SDS-PAGE eingesetzt wurde. Diese Methoden basieren auf einem anderen Puffersystem. Stattdessen wurde ein Bicarbonatpuffer (Aufschlusspuffer) ohne Saccharosezusatz verwendet. Die Chlorophyllkonzentration der Probe wurde nach der Methode von Arnon bestimmt [Arnon, 1949].

### 2.18.2 PSII-Präparation nach Schiller und Dau

Die zur Durchführung der PSII-Präparation benötigten Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

**Solubilisierungspuffer:** 1 M Glycin-Betain, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl, 25 mM MES (pH 6.9), TritonX-100 langsam hinzugeben, um eine Endkonzentration von 10 mg/ml Chlorophyll zu erreichen

**Saccharosepuffer:** 400 mM Saccharose, 30 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MES (pH 6.0)

Die PSII-Präparation wurde in Anlehnung an das Protokoll nach Schiller und Dau durchgeführt [Schiller und Dau, 2000]. Thylakoidmembranmaterial entsprechend 450 µg Chlorophyll wurde pelletiert und für 10 min bei 4°C in 250 µl Solubilisierungspuffer gelöst. Nicht solubilisierte Partikel wurden bei 1000 x g (5 min, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde bei 20000 x g (20 min, 4°C) zentrifugiert und das Pellet abermals in Solubilisierungspuffer resuspendiert, ohne die Stärke mitzuführen. Die Zentrifugationsschritte bei 1000 x g (5 min, 4°C) - zum Pelletieren der Stärke und bei 20000 x g (10 min, 4°C) - zum Pelletieren der Thylakoidmembran wurden wiederholt, bis keine Stärke mehr im Pellet enthalten war. Danach wurden die Membranen in 500 µl Saccharosepuffer gelöst, bei 20000 x g (30 min, 4°C) zentrifugiert und in 1 ml Aufschlusspuffer resuspendiert. Das erhaltene Membranmaterial wurde nach der Chlorophyllbestimmung bei -20°C verwahrt.

## 2.19 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

### 2.19.1 2D IEF/SDS-PAGE

Die 2D IEF/SDS-PAGE gliedert sich in zwei unterschiedliche methodische Teile. Zuerst werden die durch den Lysispuffer solubilisierten Proteine in der isoelektrischen Fokussierung (erste Dimension) nach dem isoelektrischen Punkt getrennt. Anschließend erfolgt die Separation der Proteine nach dem Molekulargewicht durch die SDS-PAGE (zweite Dimension).

Die zur Durchführung der 2D IEF/SDS-PAGE benötigten Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

**CHAPS/ Urea/ Thiourea-Puffer:** 7 M Urea, 2 M Thiourea, 2 % Pharmolyten (pH 3-10) (v/v), 60 mM DTT (w/v), 20 mM Tris-NaOH und 4 % CHAPS (w/v) (Hippler *et al.* 2001, modifiziert)

**Äquilibrierungspuffer:** 6 M Harnstoff, 30 % Glycerin (v/v), 2 % SDS (w/v), 50 mM Tris

### A) Erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung)

Nach der Proteinfällung wurde das abzentrifugierte (5 min, 20000 x g, 4°C), Chlorophyllfreie Pellet bei RT getrocknet, in 330 µl Lysispuffer aufgenommen und 1 h bei 25°C inkubiert. Nach 3minütiger Zentrifugation bei 20000 x g wurden die solubilisierten Proben gleichmäßig verteilt in den in den IPGphor-Streifenhalter pipettiert und ein 18 cm langer Gelstreifen (diskontinuierlicher pH-Gradient pH 3-10) luftblasenfrei daraufgelegt. Der Gelstreifen wurde anschließend mit Mineralöl überschichtet.

Folgendes Fokussierungsprogramm wurde erstellt:

Rehydratisierung:	12-18 h
200 V:	1 h, Gradient
500 V:	1 h, Gradient
500-8000 V:	1 h, Gradient
8000 V:	3 h, „Step`n hold“

Im Anschluss an die Isoelektrische Fokussierung (IPGphor, Pharmacia Biotech) wurde der Gelstreifen 20 min in Äquilibrierungspuffer inkubiert [Posch *et al.* 1994].

### B) Zweite Dimension (SDS-PAGE)

Nach Trennung der Proteine in der ersten Dimension entsprechend ihres isoelektrischen Punktes wurde der Gelstreifen horizontal auf das Sammelgel eines 15 %igen Schägger-Gels aufgelegt (Kapitel 2.19.4). Als Ladepuffer für die zweite Dimension diente der mit einer Spatelspitze Bromphenolblau versetzte Äquilibrierungspuffer.

## 2.19.2 2D BN/SDS-PAGE

Die zur Durchführung der Blue native Gelelektrophorese benötigten Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

**Solubilisierungspuffer B:** 400 mM ε-Aminocaprinsäure, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 20 % Glycerol, 10 mM DTT, 40 mM Tricin pH 8,0

**Bicarbonatpuffer:** 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

## Material und Methoden

**Lysispuffer:** 100 µl Solubilisierungspuffer B, 40 µl Digitonin-Lösung, 32 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

**Kathodenpuffer I:** 50 mM TRIS, 15 mM Bis-Tris, 0,01 % Coomassie Brilliant Blue

**Kathodenpuffer II:** 50 mM TRIS, 15 mM Bis-Tris

**Anodenpuffer:** 50 mM Bis-Tris, pH 7,0

**APS-Lösung:** 10 % APS (w/v)

**Digitonin-Lösung:** 5 % Digitonin (w/v)

**Coomassie-Lösung:** 5 % Coomassie Brilliant Blue R250, 0,5 M ε-Aminocaprinsäure

Die Blue native Gelelektrophorese wurde in Anlehnung an das Protokoll von Rexroth *et al.* durchgeführt [Rexroth *et al.* 2003]. Thylakoidmembranmaterial entsprechend 50,4 µg Chlorophyll wurde in 28 µl Bicarbonatpuffer resuspendiert und mit 172 µl auf 4°C gekühlten Lysispuffer versetzt. Nach 30minütiger Solubilisierung bei 4°C in Solubilisierungspuffer B wurde das nicht gelöste Material durch Zentrifugation (20000 x g, 1 h, 4°C) entfernt. Anschließend wurde der mit 6 µl Coomassie-Lösung versehene Überstand für 10 min bei 4°C inkubiert. Vor der Applikation der Proben auf das Gradientengel wurde der Ansatz 1 min bei 20000 x g und 4°C zentrifugiert.

Ein Standardansatz für ein SDS-Acrylamidgel mit einem Gradienten von 5 % bis 13 % setzte sich wie folgt zusammen (Glasplatten 17,5x 16 cm, Abstandhalter 0,75 mm Dicke):

Stammlösung	Sammelgel	5 % Gel	13 % Gel
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	2,5 ml	3,7 ml	0,73 ml
30:0,8 Acrylamidlösung	0,65 ml	1,5 ml	4,05 ml
0,5 M Bis-Tris pH 7,0	0,5 ml	0,9 ml	0,9 ml
2 M ε -Aminocaprinsäure	1,25 ml	2,35 ml	2,35 ml
87 % Glycerin	-	0,55 ml	0,96 ml
Digitonin-Lösung	30 µl	54,5 µl	54,5 µl
APS-Lösung	45 µl	39,4 µl	39,4 µl
TEMED	4,5 µl	3,9 µl	3,9 µl

Pro Spur wurden 200 µl solubiliertes Material geladen. Die Trennung erfolgte für mindestens 15 h bei 150 V bei 4°C. Die Stromstärke durfte dabei 15 mA nicht übersteigen. Als Puffersystem dienten Kathodenpuffer I und Anodenpuffer. Nach 15 h wurde Kathodenpuffer I gegen Kathodenpuffer II ausgetauscht und die Spannung für 4 h bei 4°C auf 300 V erhöht.

Im Anschluss an die Blue native Gelelektrophorese wurde das SDS-Acrylamidgel entweder Colloidal-Coomassie gefärbt oder auf ein SDS-Acrylamidgel nach Schägger *et al.* geladen [Schägger *et al.* 1985].

### 2.19.3 Probenvorbereitung für die SDS-PAGE nach Schägger *et al.*

Die zur Probenvorbereitung für die SDS-PAGE benötigten Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

**Bicarbonatpuffer:** 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

**Lösung B:** 5 % SDS (w/v), 30 % Saccharose (w/v)

**4x Probenpuffer:** 4 % SDS (w/v), 80 % Glycerin (v/v), 0,5 % Bromphenolblau (w/v), 5 % 2-Mercaptoethanol (v/v), 0,8 M TRIS, pH 6,8

Ganze Zellen der *C. reinhardtii* entsprechend 100 µg Chlorophyll wurde pelletiert und in 300 µl Bicarbonatpuffer resuspendiert. Danach wurden 200 µl Lösung B und 25 µl 2-Mercaptoethanol hinzugegeben und der Ansatz für 20 min bei RT gemischt. Nicht gelöstes Material wurde anschließend bei 20000 x g für 10 min sedimentiert. Nach der Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wurden die Proben auf ein SDS-Acrylamidgel appliziert.

Isolierte Proteine bzw. ganze Zellen *E.colis* wurden mit 4x Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Das Solubilisat wurde für 10 min bei 20000 x g zentrifugiert, um nicht gelöste Bestandteile zu entfernen, und anschließend für die SDS-PAGE eingesetzt.

### 2.19.4 SDS-PAGE nach Schägger *et al.*

Die zur Durchführung der SDS-PAGE nach Schägger *et al.* [Schägger *et al.* 1985] benötigten Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

**Acrylamid (45:1,5):** 45 % Acrylamid (w/v), 1,5 % N,N'-Methylen-Bisacrylamid (w/v)

**3x Gelpuffer:** 3 M TRIS, 0,3 % SDS (w/v), 11 N HCl

**10x Anodenpuffer:** 2 M TRIS, HCl pH 8,9

**10x Kathodenpuffer:** 1 M TRIS, 1 M Tricin, 1 % SDS (w/v)

**APS-Lösung:** 10 % APS (w/v)

Ein Standardansatz für Plattengele nach Schägger *et al.* mit 15 %igem Trenngel setzte sich wie folgt zusammen (Glasplatten 17,5x 16 cm, Abstandhalter 0,75 mm bzw. 1 mm Dicke):

Stammlösung	Sammelgel	Trenngel 15%
Acrylamid (45:1,5)	1 ml	10 ml
3x Gelpuffer	3,3 ml	10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	6 ml	10 ml
APS-Lösung	100 µl	150 µl
TEMED	10 µl	15 µl

Als Laufpuffer kamen 1x Anodenpuffer und 1x Kathodenpuffer zum Einsatz. Die Proteinseparation erfolgte bei 45 V und mA<sub>max</sub> für mindestens 12 h.

## 2.20 Proteinnachweismethoden

### 2.20.1 Coomassiefärbung

Die zur Coomassiefärbung benötigten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

**Färbelösung:** 45 % Methanol (v/v), 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R250 (w/v), 10 % Essigsäure (v/v)

**Entfärber:** 9 % Essigsäure (v/v); 45 % Methanol (v/v)

Um elektrophoretisch separierte Proteine durch Coomassie Brillant Blue R250 zu färben, wurde das Protokoll nach Merrill verwendet [Merrill, 1990].

Das anzufärbende SDS-Acrylamidgel wurde unter ständigem Schwenken für 1 h in Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel bis zum gewünschten Entfärbungsgrad in Entfärber gewaschen. Der Entfärber wurde mehrmals gewechselt.

### 2.20.2 Colloidal-Coomassie Färbung

Die zur Colloidal-Coomassie Färbung benötigten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

**Fixierlösung:** 10 % Essigsäure (v/v), 40 % Methanol (v/v)

**Lösung A:** 2 % o-Phosphorsäure (v/v), 10 % Ammoniumsulfat (w/v)

**Lösung B:** 5 % Coomassie Brillant Blue R250 (w/v)

**Färbelösung:** 98 % Lösung A + 2 % Lösung B für 24 h unter kontinuierlichem Rühren bei RT durchmischen

Das SDS-Acrylamidgel wurde für 1 h in Fixierlösung inkubiert und danach für mindestens 4 h in 80 % Färbelösung, die vor der Verwendung mit 20 % Methanol versetzt wurde, belassen [Rehm, 2006]. Die Entfärbung erfolgte bis zum gewünschten Entfärbegrad in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ .

### 2.20.3 Silberfärbung nach Berkelman und Stenstedt

Die zur Silberfärbung nach Berkelman und Stenstedt [Berkelman und Stenstedt, 1998] benötigten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

**Essigsäure/Ethanol-Lösung:** 10 % Essigsäure (v/v), 40 % Ethanol (v/v)

**Sensitizer-Lösung:** 30 % Ethanol (v/v), 0,2 % Na-Thiosulfat (w/v), 6,8 % Na-Acetat (w/v)

**Silbernitrat-Lösung:** 0,1 % Silbernitrat (w/v)

**Entwickler:** 2,5 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (w/v), 0,04 % Formaldehyd (v/v)

**EDTA-Lösung:** 1,46 % EDTA (w/v)

Die Silberfärbung wurde nach einem Protokoll von Berkelman und Stenstedt durchgeführt [Berkelman und Stenstedt 1998]. Zur Herstellung der Lösungen wurde Wasser mit einer Leitfähigkeit von 0,055  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Purelab Plus, USF Elga) verwendet.

Die Fixierung des SDS-Acrylamidgels erfolgte 2x 15 min in Essigsäure/Ethanol-Lösung. Nach der 30minütigen Inkubation in Sensitizer-Lösung wurde das Gel 3x 5 min mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen und für 20 min in Silbernitrat-Lösung belassen. Nach nochmaligem Waschen mit doppelt destilliertem Wasser (2x 1 min) erfolgte die Detektion der reduzierten Silber/Protein-Komplexe durch Zugabe des Entwicklers. Die mindestens 10minütige Inkubation des SDS-Acrylamidgels in EDTA-Lösung stoppte die Reaktion.

### 2.20.4 Färbung der PVDF-Membran

Die zur Färbung der PVDF-Membran benötigten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

**Coomassie-Lösung:** 1 % Coomassie Brilliant Blue (w/v), 45 % Methanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v)

**Methanollösung:** 50 % Methanol (v/v)

Die auf PVDF-Membran transferierten Proteine wurden entweder unter Nutzung des „*MemCode<sup>TM</sup> Reversible Protein Stain Kit*“ (Pierce) sichtbar gemacht oder durch 1minütiges Inkubieren in Coomassie-Lösung und anschließendes Schwenken in Methanol-Lösung bis zum gewünschten Entfärbegrad detektiert.

## 2.21 Proteintransfer

### 2.21.1 Proteintransfer auf PVDF-Membran

Der zur Durchführung des Proteintransfers auf PVDF-Membran benötigte Puffer setzte sich wie folgt zusammen:

**CAPS-Puffer:** 10 mM CAPS, pH 11,0

Das SDS-Acrylamidgel und 4 Lagen Filterpapier wurden in CAPS-Puffer für 10 min äquilibriert. Die PVDF-Membran (0,2  $\mu\text{m}$  Porengröße, Schleicher und Schüll) wurde mit Methanol benetzt und anschließend 5 min in CAPS-Puffer inkubiert. Für den Transfer der Proteine von der Kathode zur Anode wurden ein Schwamm, 2 Lagen Filterpapier in der Größe des Schwammes, die PVDF-Membran in der Größe des Gels, das SDS-Acrylamidgel, 2 Lagen Filterpapier in der Größe des Schwammes und ein Schwamm übereinander geschichtet [Gooderham, 1984]. Der Proteintransfer vollzog sich bei 500 mA und maximaler Spannung innerhalb von 45 min (Trans-Blot<sup>TM</sup> cell, Bio-Rad).

### 2.21.2 Proteintransfer auf NC-Membran

Der zur Durchführung des Proteintransfers auf NC-Membran benötigte Puffer setzte sich wie folgt zusammen:

**Blotpuffer:** 25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 20 % Methanol (v/v), 0,1 % SDS (w/v), pH 8.2 - 8.4

Der Proteintransfer via Semidry-Blot erfolgte nach einem Protokoll von Towbin *et al.* [Towbin *et al.* 1979]. SDS-Acrylamidgel, NC-Membran (BA-S85, 0,45 µm Porengröße, Schleicher und Schüll) und 10 Lagen Filterpapier wurden in Blotpuffer äquilibriert (5 min). Für den Transfer wurden auf die Blotapparatur (Trans-Blot<sup>®</sup>SD, Semi-Dry transfer cell, Bio-Rad) nacheinander 5 Lagen Filterpapier, NC-Membran, das SDS-Acrylamidgel und nochmals 5 Lagen Filterpapier aufgeschichtet. Der Proteintransfer erfolgte für 2 h bei 15 V.

### 2.22 Immunreaktion

Die zur Durchführung der Immunreaktion benötigten Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

**5x TBST:** 750 mM NaCl, 0,5 % Tween20<sup>®</sup> (w/v), 500 mM TRIS, pH 7.5

**Blocklösung:** 1 x TBST, 3 % BSA (w/v)

**Antikörperlösung 1:** 1x TBST, 1% BSA (w/v), 1. Antikörper in entsprechender Verdünnung

**Antikörperlösung 2:** 1x TBST, 1% BSA (w/v), 2. Antikörper in entsprechender Verdünnung

**Detektionspuffer:** 50 mM NaCl, 50 mM Mg<sub>2</sub>Cl, pH 9,5

Nachdem die Proteine auf die NC-Membran transferiert wurden, erfolgte eine 1stündige Inkubation der Membran bei RT in Blocklösung, um die freien Stellen auf der Membran abzusättigen. Danach wurde die NC-Membran mit Antikörperlösung 1 bei 4°C für mindestens 12 h unter hochfrequentem Schütteln (220 Hz) inkubiert. Nach 3x 10 min Waschen in 1x TBST wurde die Membran für 1 h bei RT unter Schütteln in Antikörperlösung 2 belassen. Diesem Schritt schloss sich ein nochmaliges Waschen für 3x 10 min der Membran in 1x TBST an. Anschließend wurde die Membran in Detektionspuffer äquilibriert.

Der Umsatz des Substrates durch die Alkalische Phosphatase erfolgte nach Zugabe von 2 % NBT/BCIP (Roche) in Detektionspuffer.

Erfolgte der Antikörpernachweis unter Nutzung der POD, wurde die Membran nach dreimaligen Waschen in 1x TBST nicht in Detektionspuffer äquilibriert, sondern unter Lichtausschluss mit einer 1:1 Mischung aus Substrat 1 (1,5 ml; Amersham Pharmacia, RPN 2209) und Substrat 2 (1,5 ml; Amersham Pharmacia, RPN 2209) inkubiert (1 min). Nach vollständiger Entfernung des Substrates wurde der Substratumsatz durch Auflegen eines

ECL™-Films und anschließender Entwicklung des ECL-Films (Hyperfilm™ ECL™, Amersham Pharmacia) detektiert (Exposition maximal 20 sec).

Tabelle 2.3 gibt eine Übersicht über die verwendeten Antikörper, deren Konzentration in der Lösung und die jeweilige Charakterisierung.

**Tabelle 2.3: Übersicht über die Antikörper, die jeweils eingesetzte Verdünnung und die Antikörpercharakterisierung**

Antikörper	Verdünnung	Antikörpercharakterisierung
897t22	1:500	Polyklonaler Peptidantikörper, erkennt N-TAILERRENSSLWARFC-C, gegen D1
12CA5	1:800	Monoklonaler Antikörper, erkennt Hämagglutinin-Tag
282t	1:500	Erkennt D2
322t	1:500	Erkennt CP43
345t	1:500	Erkennt CP47
P25K	1:3000	Erkennt LHCII
320t	1:1000	Erkennt LSU der Rubisco
D1-global	1:10000	Erkennt den C-Terminus des D1
D1-N-term.	1:500	Erkennt den N-Terminus des D1
Anti-His	1:1000	Erkennt His-Tag
Anti-Maus1	1:5000	Konjugiert mit Alkalischer Phosphatase
Anti-Maus2	1:1000	Konjugiert mit POD
Anti-Kaninchen	1:5000	Konjugiert mit Alkalischer Phosphatase
Anti-Huhn	1:10000	Konjugiert mit Alkalischer Phosphatase

## 2.23 Säulenchromatographie

### 2.23.1 Isolierung des PSII-Komplexes und des D1-Proteins unter Verwendung der IMAC

Die Puffer, die zur nativen Isolierung des PSII-Komplexes und des D1-Proteins durch die Ni-NTA Agarose benötigt wurden, setzten sich wie folgt zusammen:

**DoDM-Puffer:** 100 mM NaCl, 10 % Glycerol, 2 % Dodecylmaltosid, 25 mM HEPES, pH 7,5

**Äquilibrierungspuffer:** 100 mM NaCl, 10 % Glycerol, 0,03 % Dodecylmaltosid, 25 mM HEPES, pH 7.5

**Waschpuffer:** 100 mM NaCl, 10 % Glycerol, 0,03 % Dodecylmaltosid, 15 mM Imidazol, 25 mM HEPES, pH 7.5

**Urea-Waschpuffer:** 100 mM NaCl, 10 % Glycerol, 0,03 % Dodecylmaltosid, 15 mM Imidazol, 8 M Urea, 25 mM HEPES, pH 7.5

**SDS-Waschpuffer:** 100 mM NaCl, 10 % Glycerol, 0,03 % Dodecylmaltosid, 15 mM Imidazol, 0,3 % SDS, 25 mM HEPES, pH 7.5

**Elutionspuffer:** 100 mM NaCl, 0,03 % DoDM, 10 % Glycerol, 200 mM Imidazol, 40 mM MES, pH 6.0

Thylakoidmembranmaterial des His10-Stammes entsprechend 450 µg Chlorophyll wurde eingesetzt, um ein Volumen von 2 ml Ni-NTA Agarose (Quiagen) zu sättigen. Die Membranen wurden in Anlehnung an das von Sugiura *et al.* etablierte Protokoll in 250 µl DoDM-Puffer resuspendiert und für 1 h bei 4°C unter ständigem Durchmischen inkubiert [Sugiura *et al.* 1998]. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 20000 x g und 4°C wurde der Überstand mit Imidazol versetzt, so dass 15 mM Imidazol im Endvolumen enthalten war. Anschließend wurde das Solubilisat auf die mit zwei Säulenvolumen Äquilibrationpuffer gewaschene Ni-NTA Agarose-Säule geladen. Durch das Spülen mit sechs Säulenvolumen Waschpuffer wurde Protein, das nicht an PSII assoziiert vorlag, entfernt. Danach konnte durch Zugabe von ½ Säulenvolumen Elutionspuffer natives PSII eluiert werden. Erfolgte stattdessen die Zugabe von einem Säulenvolumen Urea-Waschpuffer und zehn Säulenvolumen SDS-Waschpuffer, wurden die peripher an das D1-Protein assoziierten Proteine des PSII entfernt. Nach nochmaligem Spülen mit sechs Säulenvolumen Waschpuffer wurde das mit dem 10fachen His-Tag markierte D1-Protein durch Zugabe von ½ Säulenvolumen Elutionspuffer von den Nickelresinen herunter gewaschen. Amiconsäulen mit 5 kDa Ausschlussvolumen dienen zur Konzentrierung des gewonnenen Proteins.

### 2.23.2 Reinigung des PSII-Komplexes unter Verwendung einer Anti-HA Affinity-Matrix

Die Puffer, die zur Isolierung des PSII-Komplexes unter Nutzung der Anti-HA Affinity-Matrix benötigt wurden, setzten sich wie folgt zusammen:

**HEPES-Puffer:** 100 mM NaCl, 10 % Glycerol, 25 mM HEPES, pH 7,5

**Waschpuffer:** 100 mM NaCl, 10 % Glycerol, 0,03 % Dodecylmaltosid, 25 mM HEPES, pH 7.5

**HA-Puffer:** 5 mg HA-Peptid, 25 mM HEPES, pH 7,5

**Glycinpuffer:** 0,1 M Glycin, pH 2.0

**Lagerpuffer:** 0,1 M NaCl, 0,1 M EDTA, 0,09 % Natriumazid, 20 mM TRIS, pH 7.5

Thylakoidmembranmaterial der Mutanten MCS4 und MCS8 entsprechend 450 µg Chlorophyll wurde in DoDM-Puffer gelöst (Kapitel 2.23.1) und genutzt, um 1 ml Anti-HA Affinity-Matrix (Roche) zu sättigen. Während der, an die Solubilisierung anschließenden, 10minütigen Zentrifugation bei 20000 x g und 4°C wurde die Anti-HA Affinity-Matrix durch

10 Säulenvolumen HEPES-Puffer äquilibriert. Nach dem Beladen der Matrix mit gelöstem Thylakoidmembranmaterial wurde die Säule mit 40 Säulenvolumen Waschpuffer gespült. Der native PSII-Komplex wurde durch ½ Säulenvolumen HA-Puffer eluiert. Dazu wurde die Matrix für 30 min bei 37°C mit HA-Puffer inkubiert. Das Eluat wurde anschließend aufgefangen und bei -20°C verwahrt. Die Anti-HA Affinity-Matrix wurde nach dem Protokoll von Roche mit Glycin-Puffer regeneriert und nach Zusatz von 4 Säulenvolumen Lagerpuffer bei 4°C verwahrt.

### 2.24 Nachweis von Carbonylgruppen im PSII

Die zur Durchführung des Carbonylgruppen-Nachweises benötigten Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

**Biotin-Hydrazid-Lösung:** 1,29 % Biotin-Hydrazid (w/v), 100 % wasserfreies DMSO (v/v); vor Verwendung frisch herstellen

**PBS:** 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 8.3

**Avidin-Fluoreszein-Lösung:** 25 µg Avidin-Fluoreszein-Konjugat pro ml PBS

Thylakoidmembranmaterial der His10-Mutante entsprechend 450 µg Chlorophyll wurde in 500 µl DoDM-Puffer (Kapitel 2.23.1) resuspendiert. Nach Zugabe von 17 µl Biotin-Hydrazid-Lösung wurde der Ansatz gut gemischt. Anschließend erfolgte die Solubilisierung und gleichzeitig Biotinylierung der Proben unter kontinuierlichem Mischen für mindestens 6 h bei 4°C. Nicht gelöstes Material wurde bei 20000 x g und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die markierten Thylakoide in die PSII-Präparation eingesetzt (Kapitel 2.23.1). Die zu analysierenden Proben wurden auf ein SDS-Acrylamidgel geladen und aufgetrennt.

Das, die aufgetrennten Proteine enthaltende, SDS-Acrylamidgel wurde in Anlehnung an das Protokoll von Nakamura *et al.* 3x 5 min in PBS gewaschen [Nakamura *et al.* 2002]. Biotin-Hydrazid wurde während einer 1stündigen Inkubation des Gels in Avidin-Fluoreszein-Lösung durch das fluoreszierende Konjugat gebunden. Daran schloss sich 6x 30minütiges Waschen in PBS, der 0,1 % Tween20® enthielt, an. Die Detektion der gebundenen Carbonylgruppen erfolgte unter Verwendung des Programms „*basread*“ durch den Phosphoimager (FLA-3000, Fujifilm) durch die Anregung bei 473 nm und die Emission bei 520 nm.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Isolierung und Nachweis des D1-Proteins

Das D1-Protein zeigt unter Lichteinfluss den höchsten „turnover“ in den Chloroplasten. Während der Belichtung werden ROS gebildet, die das D1-Protein kontinuierlich schädigen. Dabei treten verschiedene Modifikationen wie Oxidationen, Carbonylierungen und Proteininterne Vernetzungen auf. Diese Modifikationen initiieren die Spaltung und damit letztendlich den vollständigen Abbau des integralen Membranproteins. Dieser Mechanismus, an dem Deg- und FtsH-Proteasen beteiligt sind, ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

Andere Modifikationen des D1-Proteins treten unabhängig von der Lichtschädigung auf. Dazu gehören zum Beispiel Palmitoylierung [Mattoo und Edelman, 1987] und Deformylierung [Hou *et al.* 2004]. In grünen Pflanzen, nicht aber in *C. reinhardtii* und Cyanobakterien, wird das D1-Protein außerdem lichtabhängig phosphoryliert [Andronis *et al.* 1998].

Um die Art der Modifikation zu untersuchen und um die modifizierte(n) Aminosäure(n) zu identifizieren, ist es notwendig, eine D1-Präparation zu entwickeln, durch die das Protein in wenigen Schritten und nicht artifiziell modifiziert extrahiert wird.

#### 3.1.1 Optimierung der Zell-Aufschlussmethode

Unter diesen Gesichtspunkten wurde in einem ersten Schritt der Algenzell-Aufschluss optimiert. Dazu wurden Zellen der Stämme IL und Del1 verwendet. Der Stamm IL diente in der vorliegenden Arbeit als Referenzstamm. Er besitzt ein Intron-loses *psbA*-Gen und exprimiert ein intaktes, funktionsfähiges D1-Protein [Heiss, 1992]. Die Mutante Del1 wurde u.a. eingesetzt, um Antikörper-Kreuzreaktionen zu identifizieren. Sie exprimiert ein verkürztes, instabiles D1-Protein (tD1), das durch den gegen den C-Terminus des D1-Proteins gerichteten Antikörper 897t2 nicht nachgewiesen werden kann [Preiß *et al.* 2001].

Um Zellen der *C. reinhardtii* aufzuschließen und anschließend Thylakoidmembranen zu isolieren bieten sich verschiedene Methoden an.

Der Nebulizer („BioNeb™ Cell & DNA Disruptor“) [Zerges und Rochaix, 1998] und die „French-Press“ [Milner *et al.* 1950] standen nicht zur Verfügung. Bei der Verwendung einer Schwingmühle bzw. des Glashomogenizers wurden die Algenzellen nicht vollständig

## Ergebnisse

aufgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Daher wurden diese beiden Methoden nicht zur Isolierung von Thylakoidmembranen eingesetzt.

Stattdessen wurde die „Yeda-Press“, die in ihrer Funktion der „French-Press“ entspricht, verwendet [Shneyour und Avron, 1970]. Bei dieser Methode wird eine Algenzellsuspension einem Druck von 70 bar ausgesetzt. Die Zellen zerplatzen, indem der Überdruck plötzlich auf Atmosphärendruck zurück gesetzt wird.

Zum Vergleich wurde der Ultraschallaufschluss eingesetzt, bei dem die Zellen durch das Entstehen von Cavitationsbläschen aufgebrochen werden.

Sowohl der „Yeda-Press“- als auch der Ultraschallaufschluss erfolgten bei 4°C. Dadurch wurde die Aktivität der zelleigenen Proteasen herabgesetzt. Um die restliche Proteaseaktivität zusätzlich zu inhibieren, werden oft Proteaseinhibitoren hinzugefügt. Proteaseinhibitoren wie z.B. der Serin/Threonin-Protease-Inhibitor PMSF wurden jedoch nicht eingesetzt, da sie zu kovalenten Proteinmodifikationen führen.

Um „Yeda-Press“- und Ultraschallaufschluss zu vergleichen wurden Algenzellen des Stammes IL durch die beiden Methoden aufgeschlossen. Zellen des Stammes Del1 wurden nur durch Ultraschall aufgebrochen (Abb. 3.1.1). Nach dem Aufschluss wurden die Membranen mehrfach mit 0,1 M Natriumhydrogencarbonat gewaschen, um lösliche Proteine zu entfernen [Reichardt, 1990]. Anschließend wurde das Material durch die SDS-PAGE aufgetrennt und mit Colloidal-Coomassie gefärbt (Abb. 3.1.1 (A)). Parallel dazu wurde nach der SDS-PAGE eine Western-Blot Analyse durchgeführt. Der immunologische Nachweis des D1-Protein erfolgte durch den 897t2 Antikörper (Abb. 3.1.1 (B)). Wie erwartet wurde für Del1 in der Immunreaktion mit dem 897t2 Antikörper kein spezifisches D1-Signal detektiert, jedoch eine Reihe unspezifischer Kreuzreaktionen (Abb. 3.1.1 (B) Spur 2).

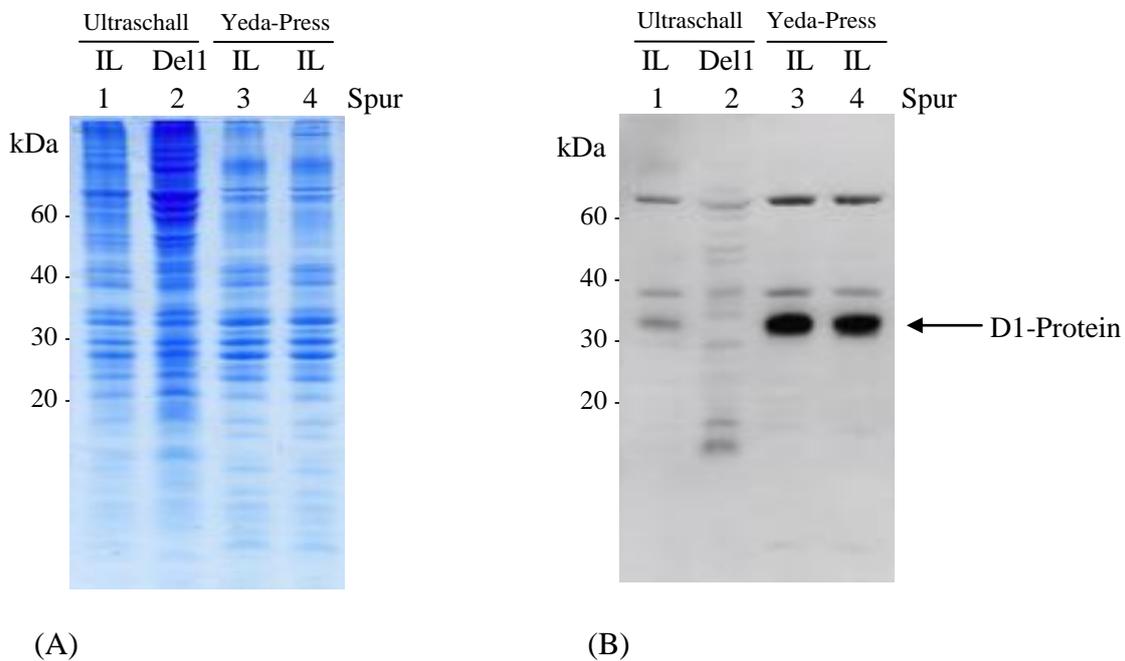
Nach dem „Yeda-Press“-Aufschluss des Stammes IL wurde ein Teil des erhaltenen Materials mit 80 % Aceton (v/v) gefällt und ebenfalls in der SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgt die Färbung durch Colloidal-Coomassie und der D1-Nachweis durch den 897t2 Antikörper. Dadurch wurde überprüft, ob es während der Proteinfällung zum Verlust von Proteinmaterial und/ oder zur verstärkten Bildung nicht-solubilisierbarer Aggregate kommt.

Bei dem Vergleich zwischen „Yeda-Press“- und Ultraschallaufschluss von Zellen des Referenzstammes IL ist zu beobachten, dass trotz gleicher Gesamtproteinmenge der D1-Proteinanteil in der durch die „Yeda-Press“ aufgeschlossenen Probe deutlich höher ist (Abb. 3.1.1 (A) Spur 1 & 3, (B) Spur 1 & 3). Außerdem wurde gezeigt, dass nicht durch Aceton

## Ergebnisse

gefälltes Material denselben Gesamtprotein- und D1-Protein-Gehalt aufweist wie Aceton gefälltes Material (Abb. 3.1.1 (A) Spur 3 & 4, (B) Spur 3 & 4). Dadurch wurde ausgeschlossen, dass es während der Fällung zum Verlust des D1-Proteins z.B. zur Bildung nicht-solubilisierbarer Aggregate kommt.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde der Zellaufschluss im Folgenden unter Nutzung der „Yeda-Press“ durchgeführt. Das Membranmaterial wurde zum einen mit Aceton gefällt, um das Volumen zu reduzieren und die Proteine anschließend in dem jeweils geeigneten Puffer zu lösen (Kapitel 3.1.2); zum anderen wurde es nativ für die jeweiligen Untersuchungen eingesetzt (Kapitel 3.1.3).



**Abbildung 3.1.1: Vergleich zwischen Ultraschall- und „Yeda-Press“-Aufschluss**

Zellen der Mutante IL wurden durch Ultraschall (Spur 1) und „Yeda-Press“ (Spur 3 & 4) aufgeschlossenen. Zusätzlich wurde Thylakoidmembranmaterial der Mutante IL nach dem „Yeda-Press“-Aufschluss durch Aceton gefällt (Spur 4). Zellen der Mutante Del1 wurden durch Ultraschall aufgeschlossenen (Spur 2). Die Proben wurden jeweils parallel auf zwei SDS-Acrylamidgelen geladen. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine durch Colloidal-Coomassie gefärbt (A) und parallel dazu auf NC-Membran transferiert (B). Für die Immunreaktion wurde der D1-Antikörper 897t2 eingesetzt. Für jede Probe wurde Protein entsprechend 5 µg Chlorophyll auf das SDS-Acrylamidgel aufgetragen.

**Zur Präparation von Thylakoidmembranen erwies sich der Zellaufschluss durch die „Yeda-Press“ als geeignete Methode und war dem Ultraschallaufschluss überlegen. Eine Fällung der Thylakoidmembranproteine mit Aceton zur Konzentrierung der Membranproteine führte weder zu Verlusten an D1-Protein noch zur Bildung nicht-solubilisierbarer Aggregate dieses stark hydrophoben Proteins.**

### 3.1.2 Darstellung des D1-Proteins in der 2D IEF/SDS-PAGE

Um Modifikationen eines einzelnen Proteins zu untersuchen, muss dieses von den übrigen Zellproteinen getrennt werden. Dafür stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Für lösliche Proteine werden zu diesem Zweck z.B. Proteinfällungsmethoden, Anionen- oder Kationenaustauscher, sowie die Gelfiltration eingesetzt. Für die Reinigung eines einzelnen integralen Membranproteins sind diese Techniken oft ungeeignet, besonders wenn das Protein mehrere Membran-durchspannende Regionen aufweist. Das D1-Protein besitzt fünf transmembrane  $\alpha$ -Helices, die sich aus unpolaren Aminosäuren zusammensetzen. Sie erschweren die Isolierung des Proteins aus seiner hydrophoben Lipid-Umgebung und die Solubilisierung im wässrigen Milieu. Während des gesamten Extraktionszeitraums muss die Aggregation der Komponenten verhindert werden. Dies wird erreicht, indem die isolierten Proteine in Detergenzmizellen integriert werden [Braun *et al.* 2007].

Um das D1-Protein möglichst vollständig von allen anderen Membranproteinen zu trennen wurde in einem ersten Schritt die 2D IEF/SDS-PAGE durchgeführt (Kapitel 2.19.1). Dazu wurde das nach dem „Yeda-Press“-Aufschluss erhaltene Thylakoidmembranmaterial durch Aceton gefällt. Nach der Solubilisierung des Präzipitates durch verschiedene Puffer wurden die Proteine zuerst nach dem isoelektrischen Punkt (IEP) in einer IEF und anschließend nach ihrem Molekulargewicht durch die SDS-PAGE nach Schägger *et al.* [Schägger *et al.* 1985] aufgetrennt. Das D1-Protein wurde dann durch Immunreaktion mit dem 897t2 Antikörper nachgewiesen (Abb. 3.1.2 (B)). Parallel dazu wurde ein SDS-Acrylamidgel Silber gefärbt (Abb. 3.1.2 (A)). Das als D1 identifizierte Protein wurde aus dem SDS-Acrylamidgel ausgeschnitten und durch ESI-MS analysiert.

Für diese Untersuchungen wurden Thylakoidmembranproteine des Stammes IL verwendet, um das in der 2D IEF/SDS-PAGE aufgetrennte D1-Protein anschließend auf Modifikationen zu untersuchen. Thylakoidmembranproteine des Stammes Del1 wurden eingesetzt, um das tD1-Protein zu identifizieren und ggf. seine exakte Sequenz zu ermitteln (Abb. 3.1.2 (C); Kapitel 1.4).

Nach Fällung der Thylakoidmembranproteine durch 80 % Aceton (v/v) wurde zunächst die Solubilisierung durch Variation der Detergentien und Chaotropen optimiert. Dieser Schritt war entscheidend für das Gelingen der IEF. Wird die Zusammensetzung des Solubilisierungspuffers nicht auf die Proteinkomposition abgestimmt, wird nur eine unvollständige Fokussierung erreicht. Folgende Solubilisierungspuffer bewirkten eine unvollständige Fokussierung (Daten nicht gezeigt):

## Ergebnisse

- 1) 9 M Urea, 20 mM Tris-NaOH, 2 % Ampholyte (pH 3-10) (v/v), 2 % Mercaptoethanol (v/v), 4 % DoDM (w/v)
- 2) 7 M Urea, 2 M Thiourea, 20 mM Tris-NaOH, 0,8 % Ampholyte (pH 3-10) (v/v), 2,5 % DTT (w/v), 2 % NP40 (v/v)
- 3) 7 M Urea, 2 M Thiourea, 20 mM Tris-NaOH, 2 % Pharmolyte (pH 3-10) (v/v), 60 mM DTT, 2 % DoDM (w/v)
- 4) 7 M Urea, 2 M Thiourea, 20 mM Tris-NaOH, 2 % Pharmolyte (pH 3-10) (v/v), 60 mM DTT, 4 % NP40 (v/v).

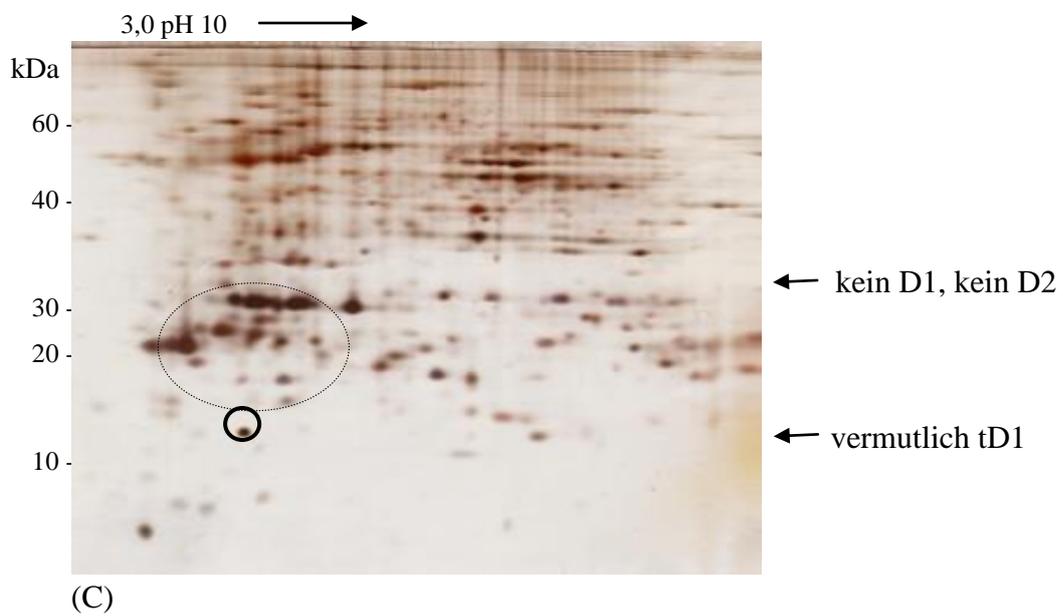
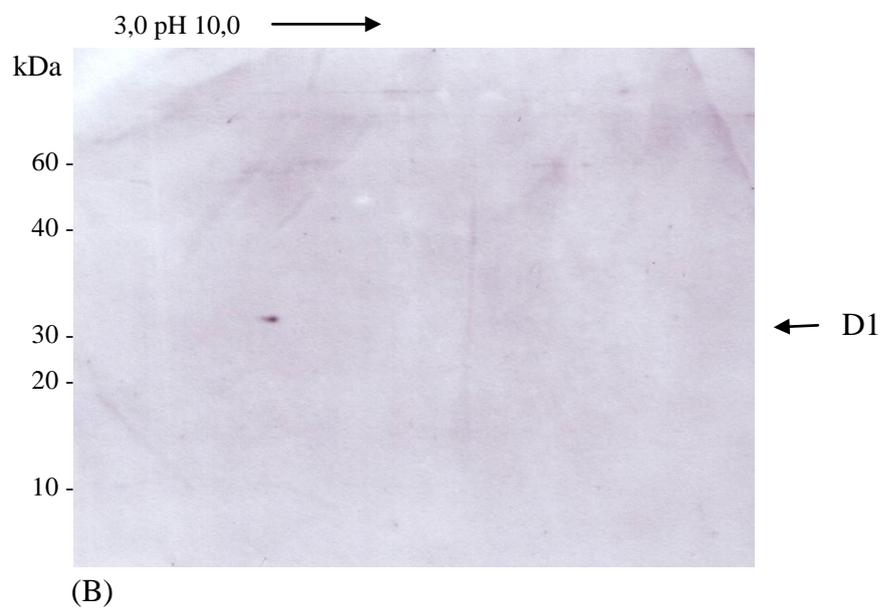
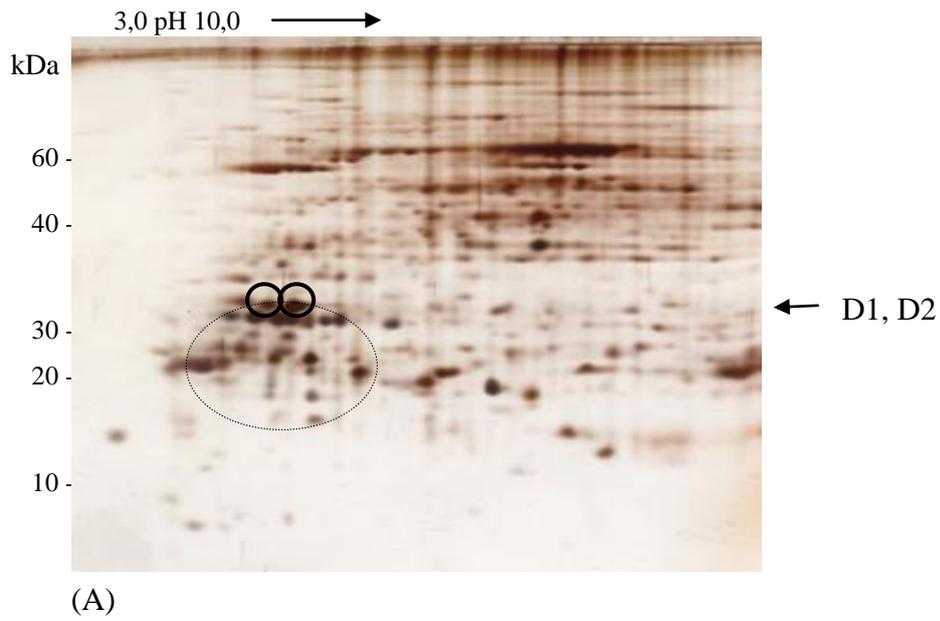
Die beste Fokussierung wurde durch einen Puffer bestehend aus 7 M Urea, 2 M Thiourea, 20 mM Tris-NaOH, 2 % Pharmolyte (pH 3-10) (v/v), 60 mM DTT und 4 % CHAPS (w/v) (CHAPS/ Urea/ Thiourea-Puffer; Hippler *et al.* 2001, modifiziert) erzielt.

Nach der IEF wurden die Proteine in der 2. Dimension durch ein 15 %iges SDS-Acrylamidgel nach Schägger *et al.* separiert [Schägger *et al.* 1985] und anschließend durch eine Massekompatible Silberfärbung sichtbar gemacht. Abbildung 3.1.2 zeigt, dass sich die Proteinmuster der Mutanten IL (A) und Del1 (C) in vielen Bereichen ähneln. Für jede Mutante wurden parallel drei 2D-GE durchgeführt. Wurden in Abbildung 3.1.2 (A)/(C) Unterschiede nicht hervorgehoben, so wurde das jeweilige Protein in einem der anderen Gele nachgewiesen.

Bei der Mutante IL wurden das D1- und das D2-Protein durch Silber angefärbt. D1- und D2-Nachweis erfolgten parallel durch Immunreaktionen (D1-Nachweis: Abb. 3.1.2 (B); D2-Nachweis: nicht gezeigt). Bei der Mutante Del1 wurden die Proteine D1 und D2 erwartungsgemäß nicht detektiert. Stattdessen trat ein Protein im 16 kDa-Bereich deutlich hervor. Dieses wurde in der 2D-GE der Mutante IL nicht nachgewiesen, da es sich vermutlich um das von Preiß *et al.* beschriebene tD1-Protein handelt [Preiß *et al.* 2001].

Weder das D1-Protein noch das tD1-Proteins konnten nach Auftrennung in der 2D IEF/SDS-PAGE durch MALDI MS/MS bzw. ESI-MS analysiert werden. Für die massenspektrometrische Analyse reichte die Menge der vorliegenden hydrophilen Peptidfragmente nicht aus. Die hydrophoben Peptidfragmente wurden bei der massenspektrometrischen Messung nicht wiedergefunden, da sie durch sogenannte Wandeffekte verloren gingen.

# Ergebnisse



**Abbildung 3.1.2: Vergleich der 2D IEF/SDS-PAGE von Thylakoidmembranproteinen der Mutanten IL und Del1**

Thylakoidmembranproteine der Mutanten IL (A, B) und Del1 (C) entsprechend 30 µg Chlorophyll wurden durch 80 % Aceton (v/v) gefällt und durch CHAPS/ Urea/ Thiourea-Puffer solubilisiert. Anschließend erfolgte eine Separation der Proteine nach dem IEP in der ersten Dimension und nach dem Molekulargewicht in der zweiten Dimension. Die Proteine wurden entweder durch Silber gefärbt (A, C) oder auf NC-Membran transferiert. Für die Immunreaktion wurde der D1-Antikörper 897t2 eingesetzt (B). Nach der Silberfärbung wurden folgende Bereiche mit Kreisen hervorgehoben: D1- und D2-Protein der IL-Mutante und das tD1-Protein der Del1-Mutante. Der Bereich, in dem die LHC-Proteine auftreten, ist als gestrichelte Ellipse gekennzeichnet.

Da die in der 2D IEF/SDS-PAGE separierten Mengen der Proteine D1 und tD1 für massenspektrometrische Analysen nicht ausreichten, wurde mit Thylakoidmembranmaterial der Mutante IL eine PSII-Präparation in Anlehnung an die Präparation nach Schiller und Dau durchgeführt (Kapitel 2.18.2), um den D1-Anteil in der Probe zu erhöhen [Schiller und Dau, 2000]. Trotz Reduktion des Proteinmusters war es nicht möglich, das D1-Protein in Colloidal Coomassie-färbbaren Mengen anzureichern und damit für massenspektrometrische Analysen verfügbar zu machen (Daten nicht gezeigt).

**Durch Einsatz der 2D IEF/SDS-PAGE wurde das D1-Protein aus isolierten Thylakoidmembranen als Proteinspot identifiziert. Die Menge an D1 bzw. tD1 reichte jedoch auch nach Vereinigung von vier Proteinspots nicht aus, um das Protein massenspektrometrisch nachzuweisen.**

**3.1.3 Darstellung des D1-Proteins in der 2D BN/SDS-PAGE**

In eine 2D BN/SDS-PAGE kann mehr Proteinmaterial eingesetzt werden als in eine 2D IEF/SDS-PAGE. Daher wurde die 2D BN/SDS-PAGE nach Rexroth *et al.* angewendet, um das D1-Protein in Colloidal-Coomassie färbbaren Mengen aufzutrennen [Rexroth *et al.* 2003]. Bei Verwendung dieser Methode wurde pro Ansatz Protein entsprechend 54 µg Chlorophyll eingesetzt. Bei der 2D IEF/SDS-PAGE konnte lediglich eine Proteinmenge entsprechend 30 µg Chlorophyll verwendet werden.

Zellen der Stämme IL und Del1 wurden durch die „Yeda-Press“ aufgeschlossen und Thylakoidmembranen durch Digitonin-haltigen Puffer solubilisiert. Das milde ionische Detergenz integriert die Proteinkomplexe in Mizellen und wirkt stabilisierend auf Protein-Superkomplexe. Statt Digitonin kann auch DoDM verwendet werden [Kügler *et al.* 1997]. DoDM wirkt jedoch destabilisierend auf einige dieser Komplexinteraktionen.

## Ergebnisse

Die solubilisierten Proteine wurden für die 2D BN/SDS-PAGE eingesetzt (Kapitel 2.19.2). In der ersten Dimension, der Blue native-PAGE (BN-PAGE), wurden native Proteinkomplexe entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Damit die Proteinkomplexe im elektrischen Feld zur Anode wanderten, wurde die Probe zuvor mit Coomassie Brilliant Blue G250 versetzt. Dieser Farbstoff ist negativ geladen und maskiert die Eigenladung der Proteine. Aus den Komplexen dissoziierender Farbstoff wird während der BN-PAGE durch Coomassie Brilliant Blue G250 des Kathodenpuffers substituiert [Eubel *et al.* 2005].

In der zweiten Dimension erfolgte die denaturierende Auftrennung der Proteinkomplexe in ihre Untereinheiten in einer SDS-PAGE nach Schägger *et al.* [Schägger *et al.* 1985]. Die Proteine wurden durch die Colloidal-Coomassie Färbung im SDS-Acrylamidgel detektiert.

Auch durch die 2D BN/SDS-PAGE wurden Unterschiede zwischen den Proteinmustern der Mutanten IL und Del1 deutlich (Abb. 3.1.3).

Solubilierte Thylakoidmembranen des Stammes IL enthielten PSII-Fraktionen (Abb. 3.1.3 (AI), (AII)). In den PSII-Fraktionen wurden D1 (Abb. A1, siehe Anhang), D2 (Abb. A2, siehe Anhang) und Lhcb1 sowie Cytf (Abb. A3, siehe Anhang) durch MALDI-MS/MS identifiziert. In Tabelle 3.1 sind die jeweils nachgewiesenen Peptide aufgeführt. Die im 40 kDa Bereich der PSII-Fraktionen separierten Proteine CP43 und CP47 sowie die LHCII-Fraktion wurden durch Immunreaktion identifiziert (Daten nicht gezeigt).

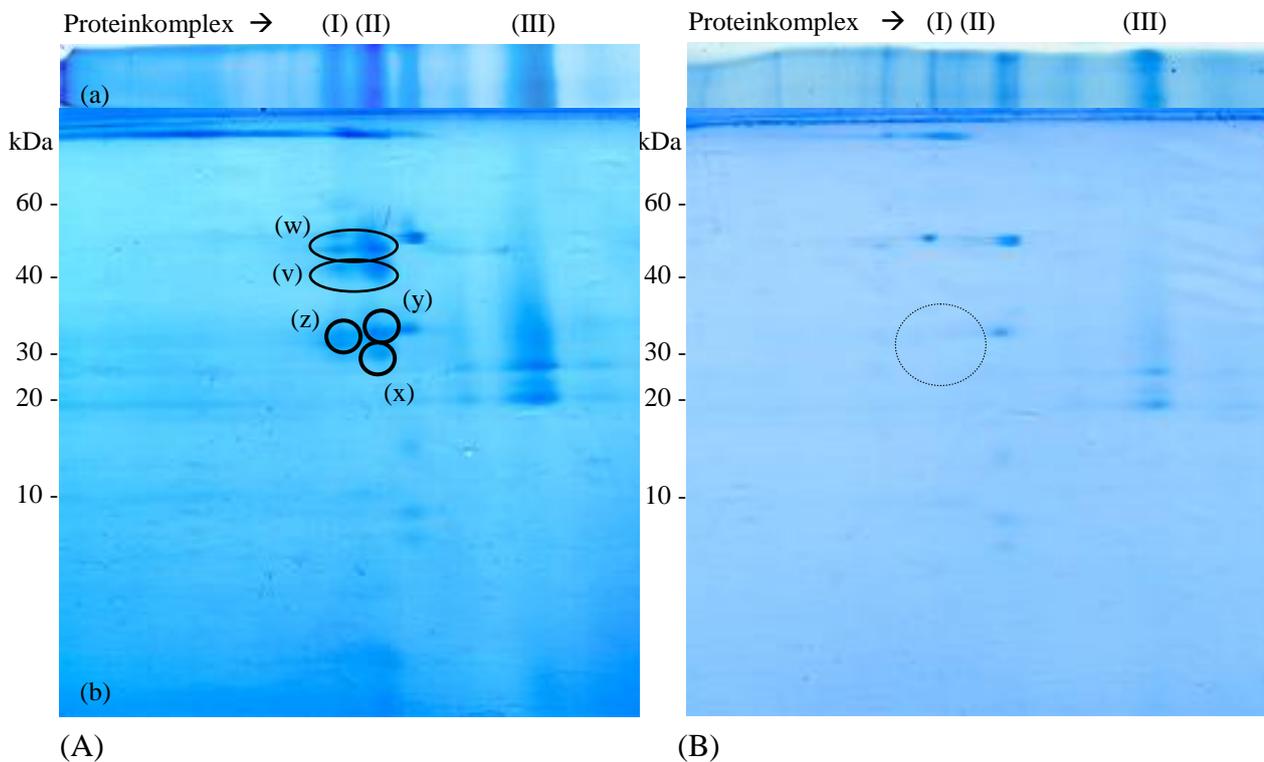
Bei Separation der Thylakoidmembranproteine der Mutante Del1 wurden im PSII-Bereich keine Proteine detektiert (Abb. 3.1.3 (B)) - auch tD1 wurde nicht angefärbt. Die LHCII-Fraktion wurde durch Immunreaktion nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 3.1: Massenspektrometrisch untersuchte Proteine aus Abbildung 3.1.3 und die jeweils identifizierten, vollständig oxydierten Peptide**

Nach der 2D BN/SDS-PAGE wurden drei Colloidal-Coomassie gefärbte Protein-Spots massenspektrometrisch analysiert. Aufgeführt sind die identifizierten Proteine und die jeweils erhaltenen Peptidsequenzen. LhcbI und Cytf wurden in demselben Protein-Spot nachgewiesen. (\*: oxidiertes Methionin)

Protein	nachgewiesene Peptide
D1	VLNTWADIINR, ANLGM*EVM*HER, ETTENESANEGYR
D2	LVFPEEVLPR, AFNPTQAEETYSM*VTANR
LhcbI	FPTPPGTQK, LAPYSEVFLAR, LAM*VSFFGYGVQALSTGEGALGSLAK
Cytf	IPAGPDLIVK, NILVVGVPVPGK, SNNTIYNASAAGK, YSEM*VVPILSPDPAK, AVEIEVPQAVLPDTVFEAVIELPYDK

## Ergebnisse



**Abbildung 3.1.3: Vergleich der 2D BN/SDS-PAGE von Thylakoidmembranproteinen der Mutanten IL (A) und Del1 (B)**

Thylakoidmembranen der Mutanten IL (A) und Del1 (B) entsprechend 54 µg Chlorophyll wurden durch Digitonin-haltigen Puffer solubilisiert und auf ein 5-13 % Gradientengel geladen. In der BN-PAGE wurden die Membrankomplexe nativ aufgetrennt (a). Anschließend wurden die Untereinheiten der Komplexe durch die SDS-PAGE separiert und durch Colloidal-Coomassie gefärbt (b).

Durch Kreise markiert wurden die durch MALDI-MS/MS identifizierte Proteine D1 (x), D2 (y), Lhcb1 und Cyt f (z) der Mutante IL. Durch Ellipsen wurden die Proteine CP43 (v) und CP47 (w) hervorgehoben, die durch Immunreaktion nachgewiesen wurden. Mit einem gestrichelten Kreis wurde der Bereich der 2D BN/SDS-PAGE der Mutante Del1 gekennzeichnet, in dem die Proteine D1, D2, Lhcb1 und Cyt f bei Vorhandensein lokalisiert worden wären. Die Banden I-III der BN-PAGE entsprechen folgenden Superkomplexen: ATPase Untereinheit, PSII Kernkomplex, Cyt b6/f Dimer (I); PSII Kernkomplex (II); trimeres LHCII (III).

**Durch die 2D BN/SDS-PAGE gelang es, Colloidal-Coomassie-färbbare Mengen des D1-Proteins aufzutrennen. Das entspricht einer Konzentration von mindestens 20-50 ng Protein pro 5 x 1 x 1 mm Bande [Rehm, 2006]. Diese Mengen genügten für die massenspektrometrische Analyse des Proteins. Um D1-Modifikationen zu untersuchen und Proteaseschnittstellen zu identifizieren wird jedoch Proteinmaterial im µg-Bereich benötigt, dass möglichst wenig modifiziert wurde.**

### 3.2 Erzeugung eines funktionsfähigen D1-Proteins mit 10fachem His-Tag

Durch die 2D IEF/SDS-PAGE und die 2D BN/SDS-PAGE wurde das D1-Protein von *C. reinhardtii* als einzelner Proteinspot dargestellt. Für Modifikations- und Spaltungsanalysen wurde jedoch nicht ausreichend Material zur Verfügung gestellt. Daher wurde im Folgenden die Voraussetzung für die Reinigung des D1-Proteins durch die IMAC geschaffen: in das *psbA*-Gen wurde die genetische Information für einen 10fachen His-Tag in einen Bereich kloniert, der Insertionen toleriert und keinen oder nur wenig Einfluss auf die Funktion des Proteins hat.

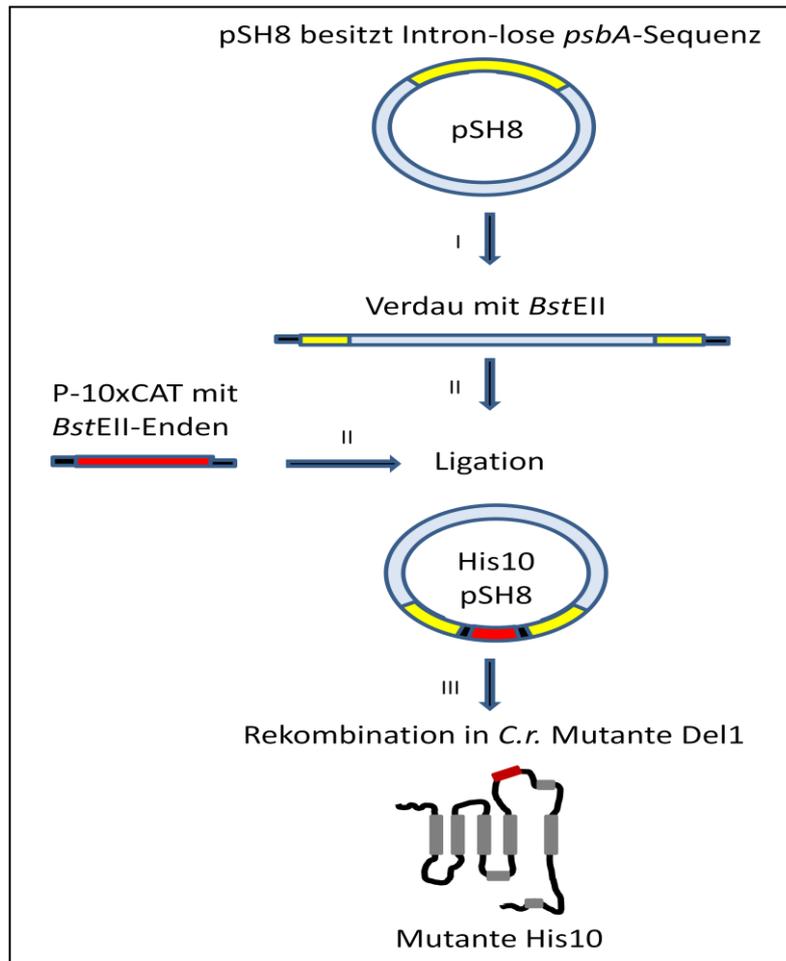
Die Insertion des 10fachen His-Tags erfolgte auf DNA-Ebene in die einzige *BstEII*-Schnittstelle des *psbA*-Gens. Auf Proteinebene befindet sie sich zwischen den Aminosäuren Y237 und R238 des D1-Proteins (Abb. 3.2.1). In diese Stelle im D-de Loop des Proteins wurde bereits von Huch ein HA-Tag [Huch, 1993] und von Wilski ein 6facher His-Tag [Wilski, 2004] kloniert. Die Mutanten zeigten eine Photosynthese- und eine Wachstumsrate ähnlich denen des Wildtyps. Daher und aus Untersuchungen von Kless und Vermaas ist bekannt, dass der D-de Loop Insertionen von mehreren Aminosäuren toleriert [Kless und Vermaas, 1995].

#### Abbildung 3.2.1: Erzeugung der Mutante His10

Das Plasmid pSH8 enthält ein Intron-loses *psbA*-Gen mit flankierenden Sequenzen (gelb unterlegt). Es wurde mit *BstEII* geschnitten (I) und mit einem Oligonukleotidlinker ligiert. Dieser Linker (rot unterlegt) besaß ein phosphoryliertes 5'-Ende, die genetische Information für einen 10fachen His-Tag (10x CAT), sowie *BstEII*-kompatible Enden (schwarz unterlegt) (II). Das Ligationsprodukt wurde durch die Partikelkanone in die *C. reinhardtii* (*C.r.*) - Mutante De11 eingebracht. Durch homologe Rekombination entstand die Mutante His10. Sie exprimiert ein D1-Protein mit 10fachem His-Tag zwischen die Aminosäuren Y237 und R238 (rote Box). Die  $\alpha$ Helices des D1-Proteins wurden grau unterlegt (III) (A).

Der Oligonukleotidlinker His10 codiert für zehn Histidine, ein Glycin und ein Tyrosin. Er wurde in die *BstEII*-Restriktionsstelle der *psbA*-Sequenz integriert. Durch die Insertion dieses Tags wurden die Aminosäuren Glycin und Tyrosin verdoppelt (B).

## Ergebnisse



(A)

Linker His10:

5' - GT TAC CAT G -3'  
3' - GTA CCA ATG -5'

Mutante His10:

5' - (691) GAA TCA GCT AAC GAA GGT TAC CGT TTC GGT CAA GAA -3'  
E S A N E G Y | R F G Q E

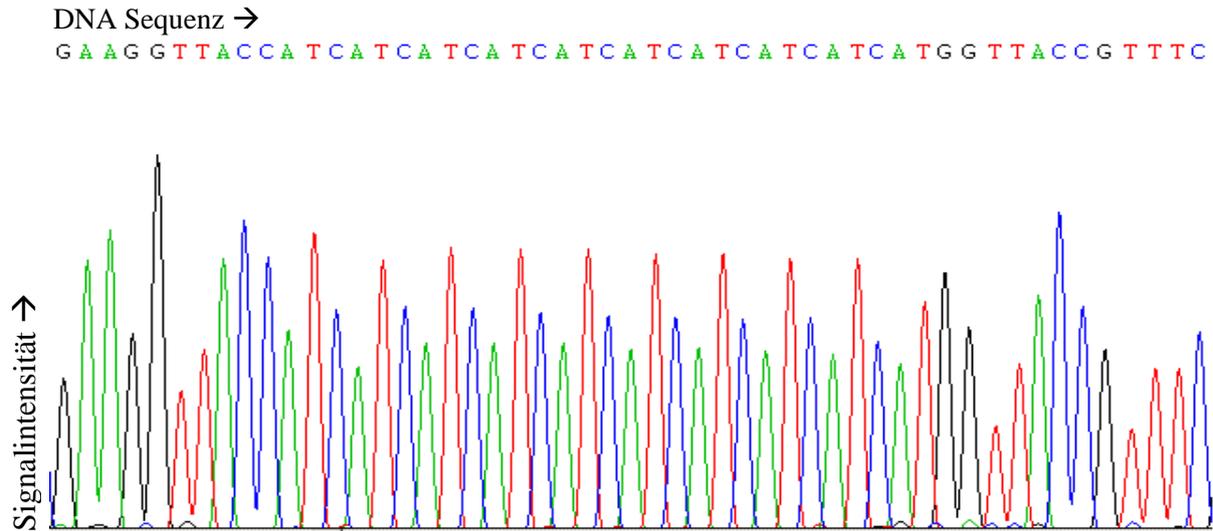
CAT GGT TAC  
H H H H H H H H H H H G Y

(B)

Für die Konstruktion einer Mutante mit einem 10fachen His-Tag im D1-Protein wurde das Plasmid pSH8 eingesetzt (Abb. 3.2.1 (A)). Es enthält ein Intron-loses *psbA*-Gen mit flankierenden Sequenzen. pSH8 wurde mit *BstEII* verdaut und mit einem Oligonukleotidlinker, der die genetische Information für einen 10fachen His-Tag trägt, ligiert (Abb. 3.2.1 (B)). Der resultierende Vektor His10pSH8 wurde mit der Partikelkanone in die

## Ergebnisse

Mutante Del1 transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf photoautotrophes Wachstum auf HS-Medium. Einzelne Kolonien wurden über PCR-Analysen auf die Insertion und auf Homoplasmizität untersucht (Daten nicht gezeigt) - positive Transformanten wurden vereinzelt. Eine Transformante, bei der die gewünschte Insertion nach Sequenzierung des gesamten *psbA*-Gen bestätigt wurde (Abb. 3.2.2), wurde His10 genannt.



**Abbildung 3.2.2: Ausschnitt des Elektropherogramms des *psbA*-Gens der Mutante His10**

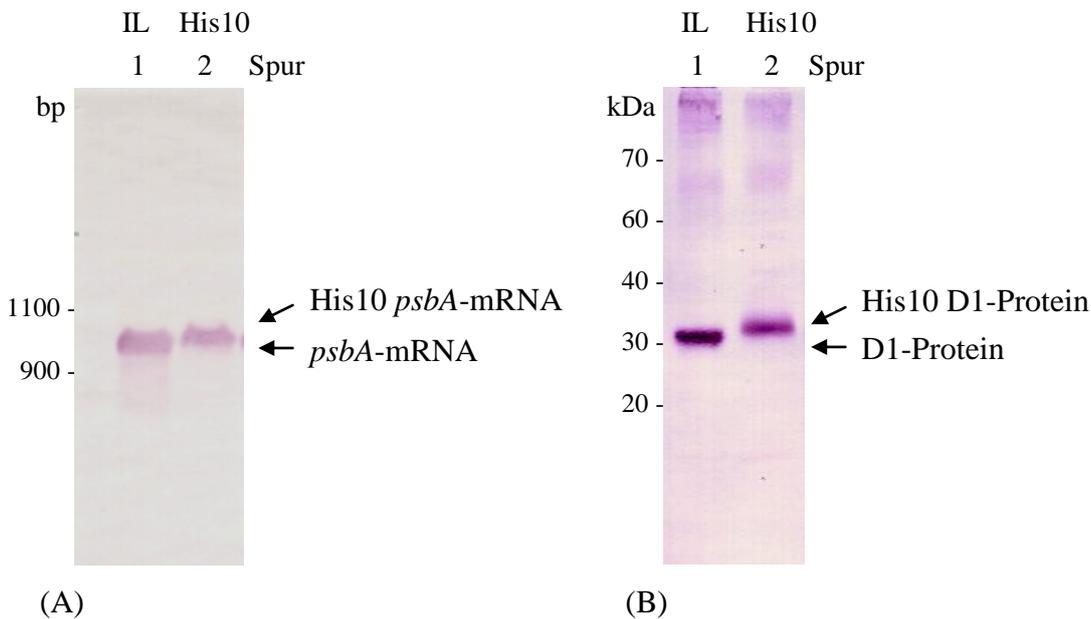
Dargestellt ist ein Ausschnitt des Elektropherogramms der *psbA*-Sequenz der Mutante His10 von Position 703 bis Position 717. Der Bereich umfasst die 10x CAT Insertion (10x His). Die Sequenzierung des Genabschnittes erfolgte unter Verwendung des Primers 570fwd.

Zur Untersuchung von Translation und Expression wurden Northern- und Western-Blot Analysen durchgeführt (Abb. 3.2.3): Zellen der Stämme IL und His10 wurden unter Standardbedingungen angezogen. Um die *psbA*-mRNA zu untersuchen, wurde die isolierte Gesamt-RNA der Stämme IL und His10 in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf NC-Membran transferiert. Die Detektion der *psbA*-mRNA erfolgte durch Hybridisierung mit einer Dig-markierten *psbA*-Sonde und anschließendem Farbnachweis. Abbildung 3.2.3 (A) zeigt, dass die *psbA*-mRNA der His10 Mutante durch die Insertion des His-Tags ein höheres Molekulargewicht besitzt als die mRNA des Referenzstammes. Der Gehalt der *psbA*-mRNA der Mutante His10 ist im Vergleich zu dem der Mutante IL leicht reduziert.

Um den Gehalt des D1-Proteins der Stämme IL und His10 zu vergleichen, wurde Gesamtprotein der Mutante solubilisiert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine NC-Membran transferiert. Das D1-Protein wurde durch den D1-global Antikörper detektiert (Abb. 3.2.3 (B)). Das His10-D1-Protein ist circa 1 kDa größer als das D1-Protein des

## Ergebnisse

Referenzstammes. Auch der Gehalt des D1-Proteins der Mutante His10 ist im Vergleich zu dem der Mutante IL leicht reduziert.



**Abbildung 3.2.3: Nachweis von *psbA*-mRNA (A) und D1-Protein (B) der Stämme IL und His10**

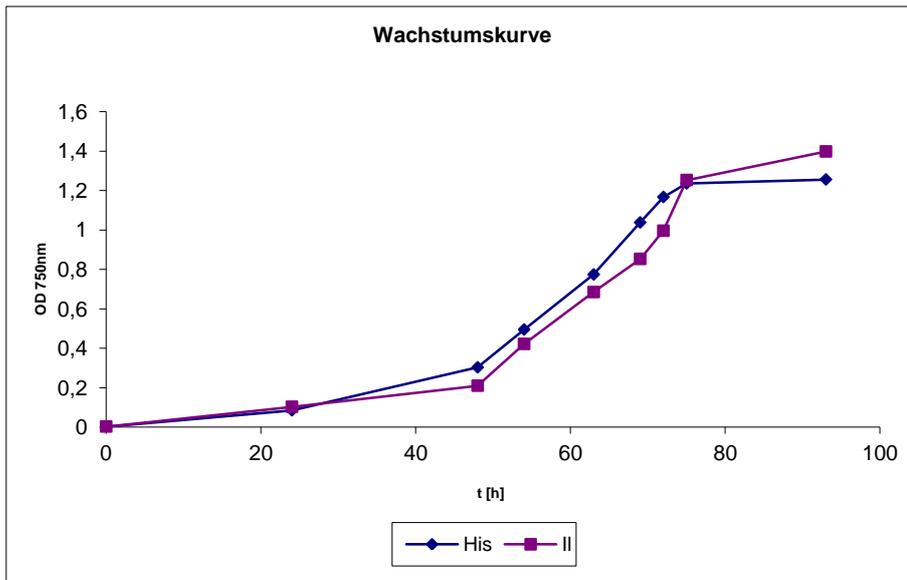
Die Isolierung der Gesamt-RNA und des Gesamtproteins der Stämme His10 und IL erfolgte nach Anzucht der Algen unter Standardbedingungen. 10 µg Gesamt-RNA der Stämme IL (Spur 1 A) und His10 (Spur 2 A) wurde in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf NC-Membran transferiert. Die *psbA*-mRNA wurde durch eine Dig-markierte *psbA*-Sonde detektiert (A). Gesamtprotein der Stämme IL (Spur 1 B) und His10 (Spur 2 B) entsprechend 7 µg Chlorophyll wurde in einem SDS-Acrylamidgel aufgetrennt und auf NC-Membran transferiert. Das D1-Protein wurde durch den D1-global Antikörper detektiert (B).

Anschließend wurde untersucht, ob die Integration des His-Tags Auswirkungen auf die Funktionalität des D1-Proteins hat. Dazu wurden Wachstumsrate und Netto-Photosyntheserate der Mutante His10 und des Referenzstammes IL bestimmt.

Jeweils  $1,5 \times 10^7$  Zellen der Stämme IL und His10 wurden in HS-haltige Knieseröhrchen angeimpft. Die Zellen wurden bei  $70 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  und  $25^\circ\text{C}$  kontinuierlich mit einem 5 %  $\text{CO}_2/95$  % Luft-Gemisch begast. Die Zelldichte wurde in regelmäßigen Abständen bei  $\text{OD}_{750}$  bestimmt (Kapitel 2.17.2).

Das Wachstum der Zellen wurde von 0 bis 90 h dokumentiert und als Wachstumskurve abgebildet (Abb. 3.2.4). Dargestellt wurde die Abhängigkeit der  $\text{OD}_{750}$  von der Zeit [h]. Verglichen mit der Wachstumsrate der Mutante IL (100 %) zeigt die Mutante His10 eine Wachstumsrate von 93 %. Durch Insertion des His-Tags in das D1-Protein wurde das Wachstum der Zellen des Stammes His10 unter Standardbedingungen nicht wesentlich beeinträchtigt.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.2.4: Wachstumskurve des Referenzstammes IL und der Mutante His10**

Dargestellt ist Abhängigkeit der OD<sub>750</sub> der jeweiligen Algenkultur von der Zeit [h]. Die Zellen wurden in HS-Medium bei 70  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  und 25°C angezogen und mit einem 5 % CO<sub>2</sub>/95 % Luft-Gemisch begast.

Für die Ermittlung der Netto-Photosyntheserate wurden Zellen der Mutanten IL und His10 in TAP-Medium angezogen. Die Messung der Sauerstoffentwicklung erfolgte in der Clark-Elektrode (Kapitel 2.17.3). Unter Standardbedingungen wurde für die Mutante His10 eine Netto-Photosyntheserate von 161  $\mu\text{mol O}_2/\text{h}\cdot\text{mg Chl}$  gemessen, während die der Mutante IL 197  $\mu\text{mol O}_2/\text{h}\cdot\text{mg Chl}$  betrug. Die Netto-Photosyntheserate des His10-Stammes entspricht damit 82 % der Netto-Photosyntheserate des Referenzstammes IL (100 %). Daraus geht hervor, dass die Integration des His-Tags die photosynthetische Sauerstoffentwicklung nicht wesentlich beeinträchtigt.

**Durch Insertion eines 10fachen His-Tags in den D-de Loop des D1-Proteins wurde die Mutante His10 erzeugt. Sie exprimiert ein funktionstüchtiges D1-Protein und ist zu photoautotrophem Wachstum befähigt. Verglichen mit den Referenzwerten des Stammes IL sind *psbA*-mRNA-Gehalt, D1-Protein-Menge, sowie Wachstumsrate und Netto-Photosyntheserate der Mutante His10 nur leicht reduziert. Damit ist zum ersten Mal eine Mutante erzeugt worden, bei der ein 10facher His-Tag in das D1-Protein ohne Funktionsverlust inseriert wurde.**

### 3.3 Reinigung des PSII-Komplexes und des D1-Proteins unter Verwendung von Ni-NTA Agarose

Die Mutante His10 wurde eingesetzt, um sowohl den PSII Komplex als auch das D1-Protein zu isolieren. Die Reinigung erfolgte über die IMAC, bei der das D1-Protein über den 10fachen His-Tag spezifisch an Nickel-Ionen-Chelat-Säulen gebunden wird.

Unspezifisch adsorbierte Proteine wurden durch das Waschen mit Detergentien- und Imidazol-haltigen Puffern entfernt. Anschließend wurde das D1-Protein bzw. der PSII-Komplex von der Säule eluiert. Das geschah entweder durch einen pH-„shift“ (Kapitel 3.3.1) oder durch einen steigenden Imidazol-Gehalt (Kapitel 3.3.2 & 3.3.3).

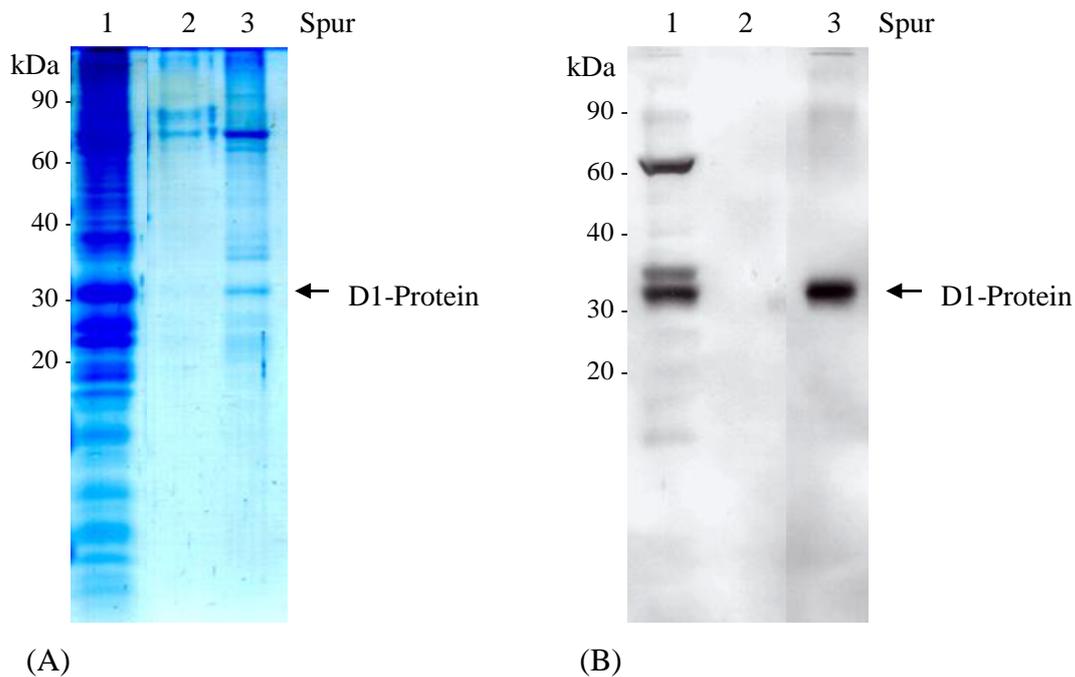
Nach der Isolierung stand das D1-Protein für Modifikations- und Spaltungsanalysen zur Verfügung.

#### 3.3.1 Isolierung des D1-Proteins im „Batch“-Verfahren

In einem ersten Schritt wurde das D1-Protein unter Verwendung von Ni-NTA Agarose (Quiagen) im „Batch“-Verfahren nach einem Quiagen Protokoll isoliert.

60 µg Thylakoidmembranprotein wurden mit 80 % Aceton (v/v) gefällt und die denaturierten Proteine in einem Puffer bestehend aus 6,3 M Harnstoff, 1,7 M Thioharnstoff, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris und 1 % CHAPS (w/v) (pH 8,0) gelöst. Die solubilisierten Proteine wurden mit Nickel-NTA-Agarose versetzt und 5x mit 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea (pH 6,3) gewaschen. Danach wurde das D1-Protein durch einen pH-Shift von pH 6,3 auf pH 4,5 eluiert (Abb. 3.3.1).

Folgende Proben wurden auf zwei SDS-Acrylamidgele aufgetragen: jeweils 5 µg Aceton-gefälltes Thylakoidmembranprotein, 30 µl des letzten Waschschrilles und 30 µl Eluat. Ein SDS-Acrylamidgel wurde durch Colloidal-Coomassie gefärbt (Abb. 3.3.1 (A)), das zweite wurde für den Western-Blot eingesetzt. Die Immunreaktion erfolgte durch den Anti-His Antikörper (Abb. 3.3.1 (B)). Dieser zeigte einige unspezifische Nebenreaktionen mit anderen Thylakoidmembranproteinen (Abb. 3.3.1 (B) Spur 1).



**Abbildung 3.3.1: Reinigung des D1-Proteins im „Batch“-Verfahren**

Aceton-gefällte Thylakoidmembranproteine des Stammes His10 wurden solubilisiert und mit Ni-NTA Agarose (Quiagen) versetzt. Der Ansatz wurde mehrfach mit Tris/Natriumphosphat-Puffer (pH 6,3) gewaschen. Das D1-Protein wurde durch einen pH-Shift von pH 6,3 auf pH 4,5 eluiert. Aufgetragen wurden: 5 µg Aceton-gefälltes Thylakoidmembranprotein (Spur 1), 30 µl des letzten Waschschruttes (Spur 2) und 30 µl des Eluates (Spur 3). Die Proteine wurden in der SDS-PAGE separiert und mit Colloidal-Coomassie gefärbt (A) bzw. auf NC-Membran transferiert. Die Immunreaktion erfolgte durch den Anti-His Antikörper (B).

Abbildung 3.3.1 (B) zeigt, dass das D1-Protein in der Thylakoidmembranfraktion und im Eluat nachgewiesen wurde. Im letzten Waschschrut vor der Elution wurde es nicht detektiert. Das D1-Protein wurde in Colloidal-Coomassie färbbaren Mengen isoliert; es war jedoch deutlich durch andere Proteine verunreinigt (Abb. 3.3.1 (A) Spur 3). Ein Großteil der Verunreinigungen wurde im letzten Waschschrut nicht detektiert. Daher wird erwartet, dass es sich um Metalloproteasen und Histidin-reiche Proteine handelt. Diese Proteine binden ebenfalls an Nickel-Matrizes und können nur durch stringenteres Waschen entfernt werden. Zu diesem Zweck wurden 5, 10 und 20 mM Imidazol, bzw. Histidin, zu Solubilisierungs- und Waschpuffer hinzugegeben. Beide Substanzen konkurrieren mit der Proteinprobe um die freien Bindestellen der Ni-NTA Agarose. Proteine mit geringer Affinität zur Ni-NTA Agarose wurden dadurch entfernt. Das denaturierte D1-Protein wurde unter den beschriebenen stringenten Bedingungen jedoch nicht an Ni-NTA Agarose gebunden (Daten nicht gezeigt).

**Unter Verwendung von Ni-NTA Agarose wurde denaturiertes D1-Protein des His10-Stammes im „Batch“-Verfahren gereinigt. Dabei wurden jedoch auch Proteine eluiert, die unspezifisch an die Nickel-Matrix banden.**

### 3.3.2 Säulenchromatographische Reinigung des PSII-Komplexes

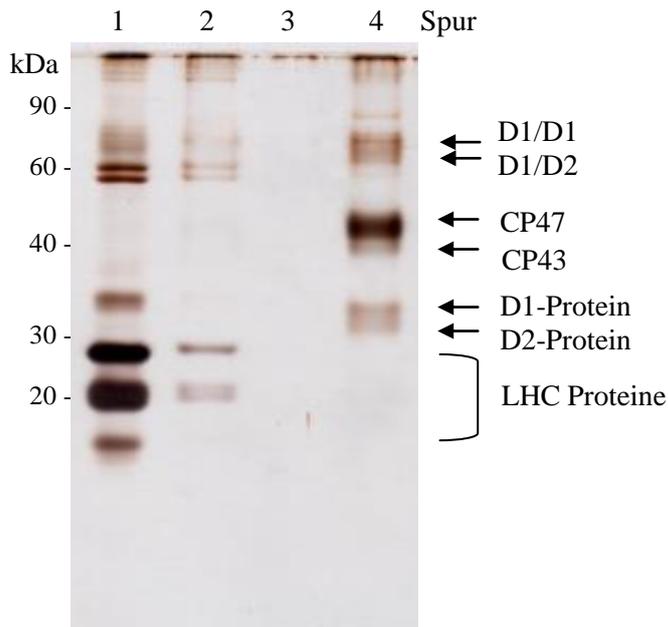
Im Folgenden wurde eine Methode entwickelt, um das His10 markierte D1-Protein nativ mit Hilfe der IMAC zu reinigen. Zunächst wurde das gesamte PSII in Anlehnung an ein Protokoll von Sugiura *et al.* isoliert, denn Sugiura *et al.* detektierten keine Verunreinigungen durch PSII-fremde Proteine [Sugiura *et al.* 1998].

Um den PSII-Komplex zu isolieren wurden in einem ersten Schritt Thylakoidmembranproteine des His10-Stammes solubilisiert. Dazu wurde Protein entsprechend 450 µg Chlorophyll in 250 µl DoDM-Puffer resuspendiert und für 1 h auf Eis unter ständigem Durchmischen inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 13000 x g und 4°C wurde der Überstand auf eine Ni-NTA Agarose-Säule geladen. Die Säule wurde mit Imidazol-haltigem Waschpuffer gewaschen, bis keine Proteine mehr im Durchfluss nachweisbar waren (Kapitel 2.23.1). Die an die Ni-NTA Agarose gebundenen PSII-Komplexe färbten die Nickel-Matrix grün. Der PSII-Komplex wurde durch einen 200 mM Imidazol-haltigen Puffer eluiert. Folgende Proben wurden für die SDS-PAGE eingesetzt: 2 µg Protein des Durchflusses (in 8 µl), je 20 µl der Waschschritte, 2 µg Protein des Eluates (in 20 µl) (Abb. 3.3.2). Anschließend wurden die Proteine durch die Silberfärbung sichtbar gemacht.

Im Durchfluss waren LHC-Proteine dominant (Abb. 3.3.2, Spur 1). Sie wurden durch die Waschschritte vollständig von der Säule entfernt (Abb. 3.3.2, Spur 2 & 3). Im Eluat wurden folgende PSII-Proteine detektiert: D1, D2, CP43, CP47, D1/D1 Homodimer, sowie das D1/D2 Heterodimer (Abb. 3.3.2, Spur 4).

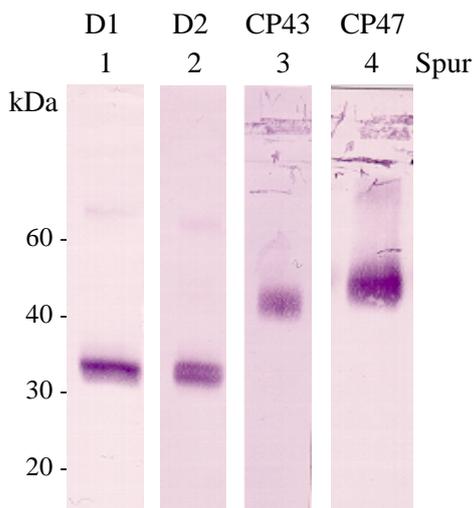
Um die zentralen Proteine D1, D2, CP43 und CP47 des PSII-Komplexes nachzuweisen, wurden 2 µg Protein des Eluates gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf NC-Membran transferiert und für die Immunreaktion eingesetzt (Abb. 3.3.3, Tabelle 2.1 & 2.3).

## Ergebnisse



### Abbildung 3.3.2: Native Reinigung des PSII-Komplexes

Thylakoidmembranen des Stammes His10 wurden solubilisiert und auf die Ni-NTA Agarose-Säule geladen. Anschließend wurde die Säule mit Waschpuffer gespült, bis keine Proteine mehr detektiert worden. Das gesamte PSII wurde durch einen 200 mM Imidazol-haltigen Puffer eluiert. Folgende Proben wurden auf das SDS-Acrylamidgel geladen: 2 µg Protein des Durchflusses (8 µl) (Spur 1), je 20 µl der Waschschrte (Spur 2 & 3) und 2 µg Protein des Eluates (20 µl) (Spur 4). Durch Silberfärbung wurden u.a. D1, D2, CP43, CP47 und LHC-Proteine sichtbar gemacht. Das D1-Protein bildete Homodimere (D1/D1) und zusammen mit dem D2-Protein Heterodimere (D1/D2).



### Abbildung 3.3.3: Nachweis der zentralen PSII-Proteine im Westernblot

Für die SDS-PAGE wurden jeweils 2 µg Protein des Eluates der PSII-Präparation eingesetzt. Anschließend wurden die Proteine auf NC-Membran transferiert. Die PSII-Proteine D1 (Spur 1), D2 (Spur 2), CP43 (Spur 3) und CP47 (Spur 4) wurden mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen (siehe Tabelle 2.1 & 2.3).

**Mit Hilfe einer Ni-NTA Agarose-Säule wurde der PSII-Komplex des His10 Stammes in einem Schritt nativ isoliert. Dabei wurde unter Verwendung von Thylakoidmembranen entsprechend 450 µg Chlorophyll<sub>a+b</sub> durchschnittlich 20 µg PSII-Protein isoliert.**

### 3.3.3 Säulenchromatographische Reinigung des D1-Proteins

Nach der Reinigung des nativen PSII-Komplexes unter Verwendung der IMAC wurden in der Silberfärbung keine Verunreinigungen durch andere Thylakoidmembranproteine (wie z.B. LHCII) detektiert (Abb. 3.3.2, Spur 4). Damit war dies ein geeigneter Ausgangspunkt, um eine saubere D1-Präparation zu etablieren.

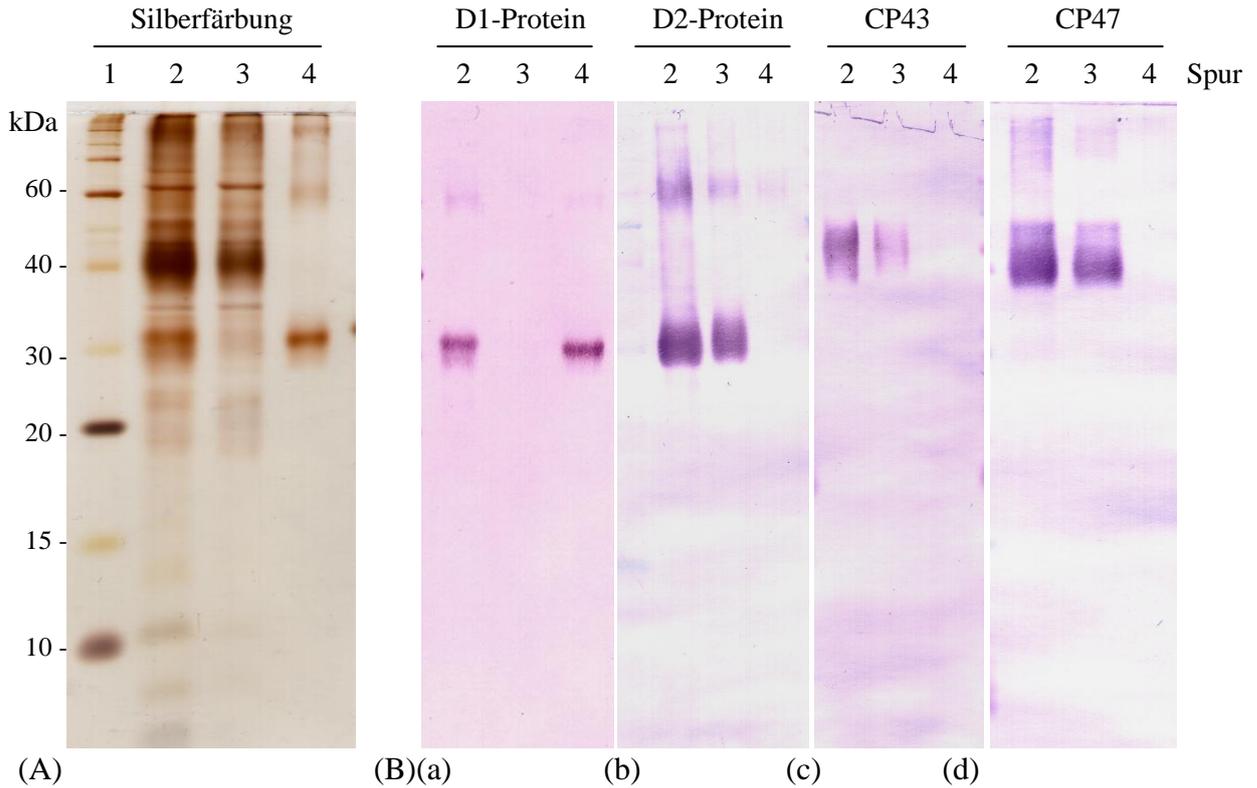
Thylakoidmembranproteine wurden durch DoDM-Puffer solubilisiert und auf die Ni-NTA Agarose-Säule geladen. In diesem Schritt wurde der PSII-Komplex, der unter anderem die Proteine D1, D2, CP43 und CP47 enthielt, an die Nickel-Matrix gebunden (Abb. 3.3.4, Spur 2). Die Säule wurde mit einem Imidazol-haltigem Waschpuffer gespült, bis im Durchfluss kein Protein mehr nachgewiesen wurde (Kapitel 2.23.1). Anschließend wurde die Säule mit einem Säulenvolumen 8 M Urea-haltigem Waschpuffer gespült. Dann wurden die an das D1-Protein gebundenen Proteine durch Waschen mit einem 0,3 % SDS (w/v)-haltigen Waschpuffer entfernt, ohne das D1-Protein zu eluieren. Die Proteine D2, CP43 und CP47 wurden durch den Einsatz verschiedener Antikörper detektiert; das D1-Protein wurde jedoch nicht nachgewiesen (Abb. 3.3.4, Spur 3).

Waschpuffer, die entweder 2 M, 4 M oder 6 M Urea, 1 M oder 2 M NaCl, 20 % EtOH (v/v) oder 40 % Glycerol (v/v) enthielten, eigneten sich nicht, um D1-assoziierte PSII-Proteine zu entfernen (Daten nicht gezeigt).

Nach den Waschschrritten wurde das D1-Protein durch einen 200 mM Imidazol-haltigen Puffer eluiert. In diesem Eluat wurden das D1-Protein, das im SDS-Acrylamidgel bei etwa 30 kDa zu finden ist, und Homo- bzw. Heterodimer D1/D1 bzw. D1/D2, die im SDS-Acrylamidgel bei etwa 60 kDa eine Proteinbande bilden, durch Immunreaktion nachgewiesen (Abb. 3.3.4, Spur 4).

Durch Immunreaktionen wurde zudem nachgewiesen, dass weder das D1-Eluat noch die PSII-Präparation durch Lhcb und Rubisco-LSU verunreinigt waren (Daten nicht gezeigt).

## Ergebnisse



### Abbildung 3.3.4: Vergleich von D1-Präparation und PSII-Präparation

Auf ein SDS-Acrylamidgel wurden jeweils 2  $\mu\text{g}$  Protein der PSII-Präparation (Spur 2), 20  $\mu\text{l}$  des Waschschrittes mit 0,3 % SDS (w/v) haltigem Waschlösungspuffer (Spur 3) und 20  $\mu\text{l}$  des D1-Eluates (Spur 4) aufgetragen. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine entweder durch Silberfärbung sichtbar gemacht (A) oder auf NC-Membran transferiert (B). Durch Immunreaktionen wurden die Proteine D1 (a), D2 (b), CP43 (c) und CP47 (d) nachgewiesen. Zur Größenbestimmung wurde ein Proteinstandard (Invitrogen) aufgetragen (Spur 1).

Für weitere Untersuchungen wurde das Volumen des D1-Eluates über eine 5 kDa Amicon-Ausschlussäule verringert. Das konzentrierte D1-Eluat wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und das D1-Protein durch Silberfärbung und Coomassiefärbung nachgewiesen.

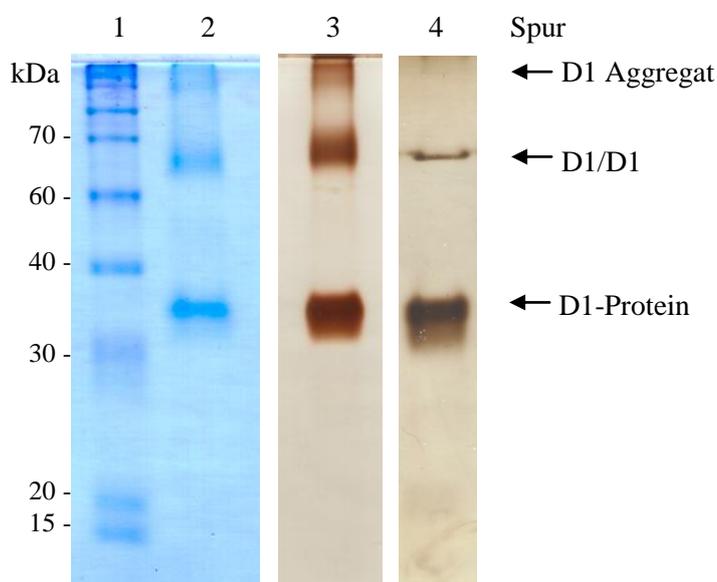
Abbildung 3.3.5 zeigt, dass sowohl im 30 kDa-Bereich als auch im 60 kDa-Bereich des SDS-Acrylamidgels eine Proteinbande detektiert wurde (siehe auch Abb. 3.3.4 (A) (Ba) (Bb) Spur 4).

Zur Überprüfung der Reinheit und Identität wurden die beiden Proteinbanden (Abb. 3.3.5, Spur 2) massenspektrometrisch analysiert. In der Proteinbande, die im 30 kDa-Bereich separiert wurde, wurden nur Peptide identifiziert, die dem D1-Protein zugeordnet werden können: ENSSLWAR, ANLGMEVMHER, VLNTWADIINR, FCEWITSTENR, LIFQYASFNNR, FGQEEETYNIVA AHGYFGR (alle Methionine waren vollständig oxidiert; Abb. A4, siehe Anhang). In der Proteinbande, die im 60 kDa-Bereich separiert

## Ergebnisse

wurde, wurden sowohl Peptide des D1-Proteins (Abb. A5, siehe Anhang) als auch Peptide des D2-Proteins (Abb. A6, siehe Anhang) identifiziert.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Protein-Bande im 60 kDa Bereich um ein Gelartefakt handelt, wurde Coomassie-gefärbtes D1-Monomer aus dem SDS-Acrylamidgel eluiert, dann erneut in die SDS-PAGE eingesetzt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Das D1-Protein wurde im 30 kDa-Bereich des SDS-Acrylamidgels, im 60 kDa-Bereich, sowie zwischen Trenn- und Sammelgel nachgewiesen (Abb. 3.3.5, Spur 4). Die hydrophoben Bereiche der transmembranen-Helices interagieren trotz Solubilisierung durch SDS-Probenpuffer miteinander. Daher tritt das D1-Protein nach der SDS-PAGE als Monomer, Homodimer und in Aggregaten auf.



**Abbildung 3.3.5: SDS-PAGE des isolierten D1-Proteins des Stammes His10**

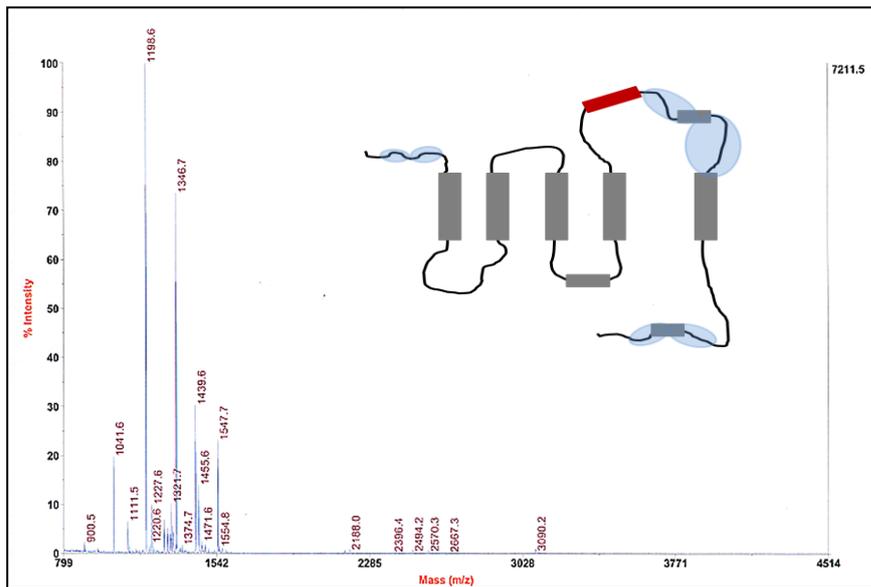
Das Volumen, in dem sich das isolierte D1-Protein des Stammes His10 befand, wurde über eine 5 kDa Amicon-Ausschluss säule eingengt. Jeweils 4  $\mu\text{g}$  Protein (10  $\mu\text{l}$ ) wurden für die SDS-PAGE eingesetzt. Das Protein wurde durch Coomassie- (Spur 2), bzw. Silberfärbung (Spur 3) sichtbar gemacht. Nach der Elution des Coomassie gefärbten D1-Monomers aus dem SDS-Acrylamidgel und nochmaligem Auftragen auf ein SDS-Acrylamidgel wurde das Protein durch Silberfärbung sichtbar gemacht (Spur 4). Zur Größenbestimmung wurde ein Proteinstandard (Invitrogen) aufgetragen (Spur 1).

In Abbildung 3.3.6 ist das MS/MS-Spektrum des D1-Proteins dargestellt. Die in der Massenanalyse erhaltene Signalintensität [%] und das detektierte Masse/Ladungsverhältnis der identifizierten Peptide wurden in Abhängigkeit voneinander aufgetragen.

Durch die massenspektrometrische Analyse des D1-Proteins wurden lediglich Peptidsequenzen der hydrophilen Loops identifiziert. Die Peptide der hydrophoben Bereiche

## Ergebnisse

waren durch hydrophobe Interaktionen miteinander vernetzt und wurden daher nicht in den Analysator eingespeist (persönliche Mitteilung Dr. Kiess, Toplab).



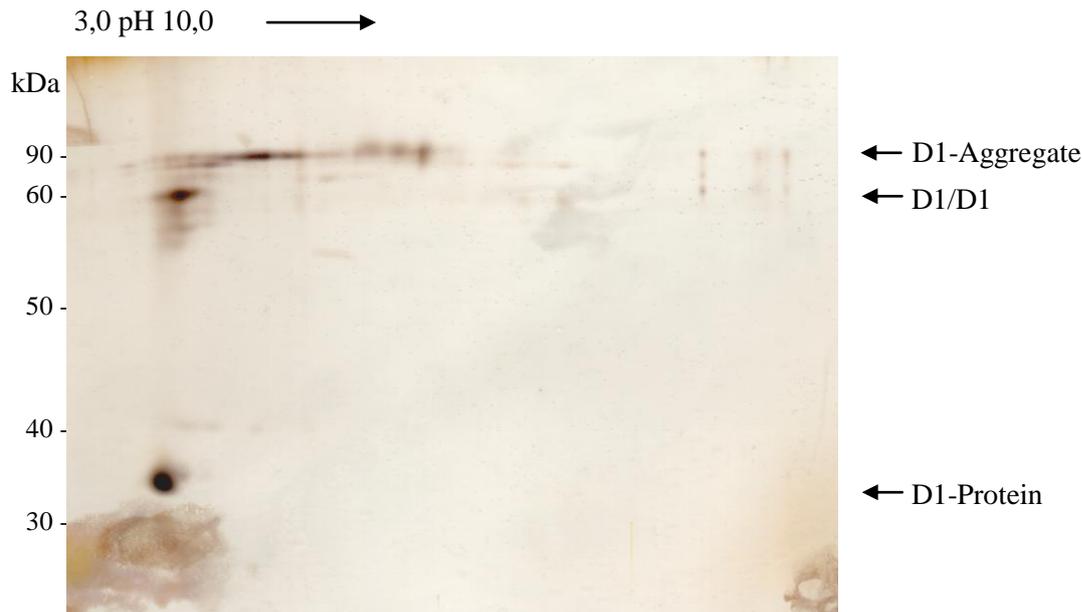
### Abbildung 3.3.6: MS/MS Spektrum des Trypsin gespaltenen, vollständig oxidierten D1-Proteins

Die Intensität des Signals [%] wurde in Abhängigkeit vom Masse/Ladungsverhältnis [m/z] dargestellt. Durch die MALDI-TOF-Analyse des Coomassie gefärbten D1-Monomers wurden folgende Peptide identifiziert: ENSSLWAR, ANLGMEVMHER, VLNTWADIINR, FCEWITSTENR, LIFQYASFNNSR, FGQEEETYNIVA AHGYFGR.

Die identifizierten Peptide wurden schematisch in einer Übersichtsabbildung des D1-Proteins, mit 10fachem His-Tag, dargestellt (blau unterlegte Bereiche). Die  $\alpha$ Helices des D1-Proteins wurden grau unterlegt und der His10-Tag wurde rot hervor gehoben.

Zur weiteren Charakterisierung des gereinigten D1-Proteins wurde das D1-Eluat mit 80 % Aceton (v/v) gefällt, 4  $\mu$ g Protein wurde in CHAPS/ Urea/ Thiourea-Puffer solubilisiert und in der 2D IEF/SDS-PAGE aufgetrennt (Kapitel 2.19.1).

Im 30 kDa-Bereich des SDS-Acrylamidgels wurde nur das D1-Protein durch die Silberfärbung detektiert (Abb. 3.3.7). Im 60 kDa-Bereich des SDS-Acrylamidgels trat das D1-Protein als Homodimer auf und im 90 kDa-Bereich wurden unvollständig fokussierte Aggregate des D1-Proteins aufgetrennt.



**Abbildung 3.3.7: 2D IEF/SDS-PAGE des D1-Proteins des Stammes His10**

4 µg des isolierten D1-Proteins wurden durch Aceton gefällt und in CHAPS/ Urea/ Thiourea-Puffer solubilisiert. Anschließend wurde das Protein durch die 2D IEF/SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

**Mit Hilfe des Stammes His10 ist es gelungen, in wenigen Schritten (Zellaufschluss, Solubilisierung und IMAC) ein D1-Protein zu isolieren, das nur durch geringste Mengen an D2-Protein verunreinigt ist.**

**Für die D1-Präparation wurden durchschnittlich 400 ml Algenzellen des Stammes His10 in der halblogarithmischen Wachstumsphase eingesetzt. Daraus wurde Thylakoidmembranprotein entsprechend 13040 µg Chlorophyll<sub>a+b</sub> gewonnen. Aus dieser Probe wurden 88 µg D1-Protein isoliert.**

### **3.4 Modifikations- und Spaltungsanalysen unter Verwendung des gereinigten D1-Proteins**

Nachdem das D1-Protein des Stammes His10 erfolgreich isoliert wurde, stand es für Spaltungsanalysen und die Analyse posttranslationaler Modifikationen zu Verfügung.

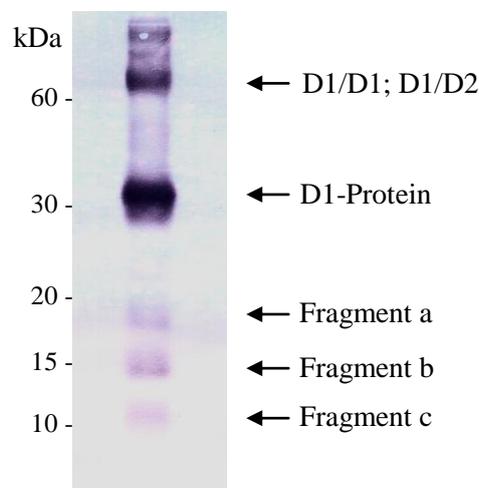
#### **3.4.1 D1-Abbau**

##### **3.4.1.1 Nachweis von D1-Fragmenten nach dem Zellaufschluss**

Um den Abbau des D1-Proteins zu verhindern, wurde der „Yeda-Press“-Aufschluss bei 4°C durchgeführt. Nach der Aufarbeitung wurden die Thylakoidmembranen sofort bei -20°C verwahrt.

## Ergebnisse

Um nachzuweisen, dass durch längere Inkubation im Aufschlusspuffer bereits ein Abbau des D1-Proteins stattfindet, wurden die Thylakoidmembranen nach dem Aufschluss für 3 h bei 4°C inkubiert. Das D1-Protein wurde, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, präpariert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Danach erfolgte die Immunreaktion unter Verwendung des D1-global Antikörpers. Neben dem D1-Protein und dem Homodimer, bzw. Heterodimer wurden drei Fragmente mit einer Größe von 11, 14 und 18 kDa detektiert (Abb. 3.4.1). Es war nicht bekannt, ob die beobachteten Spaltfragmente durch Proteasen oder oxydative Bedingungen generiert wurden.



**Abbildung 3.4.1: Western-Blot Analyse von Spaltfragmenten des D1-Proteins**

Isolierte Thylakoidmembranen wurden für 3 h bei 4°C belassen. Danach wurde die D1-Präparation angeschlossen. 2 µg Protein (10 µl) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf NC-Membran transferiert. Unter Verwendung des D1-global Antikörpers wurden in der Immunreaktion drei Spaltfragmente des D1-Proteins (Fragment a, b, c) nachgewiesen.

Für eine N-terminale Sequenzierung der Spaltfragmente wurden Coomassie-färbbare Mengen benötigt. Daher wurden Untersuchungen durchgeführt, um die Fragmente von dem D1-Protein abzutrennen und ihre Konzentration zu erhöhen.

Das D1-Protein wurde durch eine 20 kDa Amicon-Ausschlussäule von den Spaltfragmenten getrennt. Anschließend wurde das Volumen (200 µl Lösung mit 0.1 µg Protein/µl), in dem sich die Spaltfragmente befanden, über eine 3 kDa Amicon-Ausschlussäule auf 50 µl reduziert. Die Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert und angefärbt: Es wurden keine Spaltfragmente nachgewiesen. Durch die 20 kDa Amicon-Ausschlussäule wurden neben dem D1-Protein auch die Fragmente zurückgehalten (Daten nicht gezeigt).

**Während der Inkubation von Thylakoidmembranen bei 4°C wurden distinkte Spaltfragmente des D1-Proteins generiert. Es gelang jedoch nicht, diese Fragmente anzureichern und die Spaltstellen zu identifizieren.**

#### ***3.4.1.2 D1-Protein-Spaltung durch Proteinase K***

Vor dem Einsatz des D1-Proteins in Spaltungsanalysen wurde überprüft, ob das isolierte D1-Protein in einer Konformation vorlag, die es Proteasen ermöglicht, reproduzierbar spezifische Fragmente zu erzeugen.

Dafür wurde die gut charakterisierte Proteinase K [Kraus und Femfert, 1976] eingesetzt. Proteinase K spaltet nach hydrophoben, aliphatischen und aromatischen Aminosäuren. Wenn das D1-Protein aggregiert ist, sind die bevorzugten Spaltstellen nicht für die Proteinase K zugänglich und es werden keine reproduzierbaren Spaltpmuster erhalten.

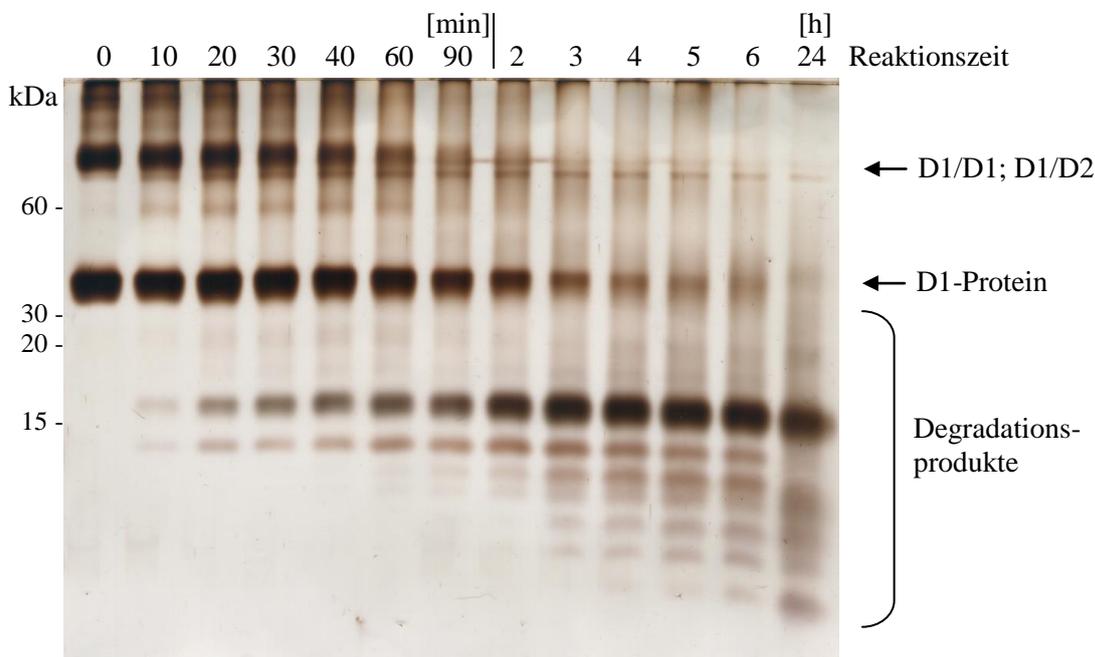
Unter Verwendung des isolierten D1-Proteins (Kapitel 2.23.1) wurden pH- und Temperaturoptimum der Proteinase K für dieses Substrat genau bestimmt. Die erhaltenen Spaltfragmente des D1-Proteins wurden massenspektrometrisch analysiert bzw. N-terminal sequenziert.

In einem ersten Schritt wurde das pH-Optimum der Protease bestimmt. Jeweils 2 µg D1-Protein wurden durch 80 % Aceton (v/v) gefällt und die Proben in verschiedenen Puffern mit pH-Werten von pH 2 bis pH 11 resuspendiert. Nach Zugabe von 2 ng Proteinase K wurde der Ansatz (20 µl) für 2 h bei 37°C inkubiert (Abb. A7, siehe Anhang). Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Wie erwartet, zeigte Proteinase K ein pH-Optimum von pH 6 in 40 mM MES-Puffer. Unter diesen Bedingungen wurde das D1-Protein in zwei prominente und zwei schwächere Fragmente gespalten. Das Ergebnis ist weitgehend mit den Angaben des Herstellers der Proteinase K (Roche) identisch. Nach Herstellerangaben ist Proteinase K in 10 mM Tris bei pH 4 bis pH 11 stabil und entfaltet bei pH 6,5 bis pH 9,5 ihre volle Aktivität.

Anschließend wurde das Temperaturoptimum der Protease bestimmt. Dazu wurden jeweils 2 µg des D1-Proteins mit 2 ng Proteinase K (Ansatz: 20 µl) versetzt und bei Temperaturen von 4°C bis 75°C inkubiert (Abb. A8, siehe Anhang). Die Spaltung des D1-Proteins fand zwischen 4°C und 62°C statt. Der optimale Arbeitsbereich der Protease lag zwischen 35°C und 57°C. Unter diesen Bedingungen wurden sowohl das D1-Monomer als auch das Homodimer am stärksten degradiert. Die ermittelten Daten stimmen mit den Angaben des Herstellers der Proteinase K (Roche) überein.

## Ergebnisse

Abbildung 3.4.2 veranschaulicht die Spaltung des D1-Proteins innerhalb von 0 bis 24 h. Dazu wurden jeweils 2 µg D1-Protein mit 2 ng Proteinase K (Ansatz: 20 µl) versetzt und in einer Zeitreihe, bestehend aus 13 Zeitpunkten von 0 bis 24 h, bei 37°C inkubiert.



**Abbildung 3.4.2: Abbau des D1-Proteins durch Proteinase K innerhalb von 24h**

Jeweils 2 µg isoliertes D1-Protein wurden in einem Ansatz von 20 µl mit 2 ng Proteinase K versetzt und bei 37°C inkubiert. Die Probenahmen erfolgten innerhalb einer Zeitreihe von 10 min bis 24 h. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

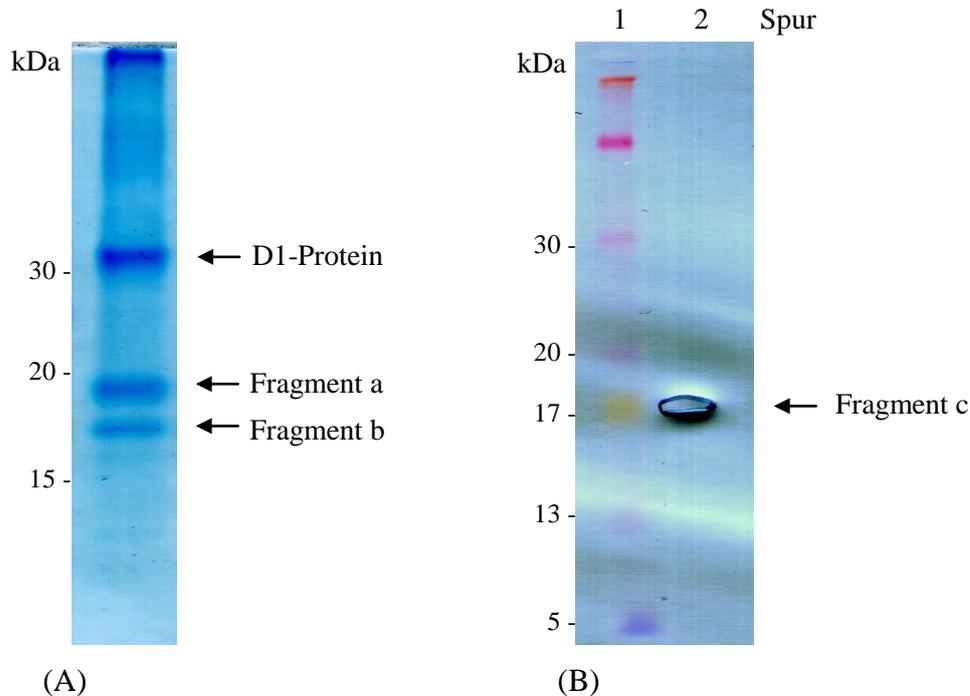
Um Degradationsprodukte, die nach zweistündiger Inkubation mit Proteinase K auftraten (Abb. 3.4.2, Reaktionszeit 2 h), näher zu charakterisieren, wurden die C-terminale Leitersequenzierung und der Edman-Abbau durchgeführt.

10 µg des D1-Proteins wurden für 2 h bei 37°C mit 10 ng Proteinase K inkubiert (Ansatz: 70 µl). Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine entweder auf PVDF-Membran transferiert (Abb. 3.4.3 (B) Spur 2) oder durch Coomassie gefärbt (Abb. 3.4.3 (A)). Nach Anfärben der PVDF-Membran unter Verwendung des „*MemCode<sup>TM</sup> Reversible Protein Stain Kit*“ wurde ein etwa 18 kDa großes Spaltfragment detektiert (Abb. 3.4.3 (B) Fragment c). Die N-terminale Sequenz des Fragmentes wurde durch den Edman-Abbau ermittelt. Dabei wurde das Sequenzmotiv (S)LIRETTENE(S) identifiziert (Abb. A9, siehe Anhang), das sich nach der Helix D im D-de Loop des D1-Proteins befindet.

Nach der Coomassiefärbung des SDS-Acrylamidgels wurden Spaltfragmente mit einer Größe von 19 kDa und 17 kDa detektiert. Der C-Terminus der Fragmente wurde durch die C-

## Ergebnisse

terminale Leitersequenzierung analysiert. Für beide Fragmente (Abb. 3.4.3 (A) Fragment a & b) wurde die Sequenz NAHNFLPLDLA ermittelt (Abb. A10, siehe Anhang), die dem C-Terminus des D1-Proteins entspricht.



**Abbildung 3.4.3: Analyse von Fragmenten des D1-Proteins, die durch Proteinase K-Spaltung generiert wurden**

10  $\mu$ g des isolierten D1-Proteins (Ansatz: 70  $\mu$ l) wurden mit 10 ng Proteinase K versetzt und für 2 h bei 37°C gespalten. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine entweder durch Coomassie gefärbt (A) oder auf PVDF-Membran transferiert (B). Die Coomassie gefärbten Fragmente a und b wurden durch die C-terminale Leitersequenzierung analysiert. Auf PVDF-Membran transferierte Proteine wurden mit dem „MemCode™ Reversible Protein Stain Kit“ gefärbt. Das Fragment c wurde markiert (Spur 2). Anschließend wurde die Membran entfärbt und Fragment c durch den Edman-Abbau analysiert. Zur Größenbestimmung wurde ein Proteinstandard (Invitrogen) aufgetragen (Spur 1).

**Durch die Verwendung der Modellprotease Proteinase K wurde gezeigt, dass das isolierte D1-Protein für Spaltungsstudien geeignet ist: Durch Proteinase K generierte D1-Spaltmuster waren unter verschiedenen Temperatur- und pH-Bedingungen identisch.**

### **3.4.1.3 Inkubation des D1-Proteins mit der Deg2-Protease**

In *Arabidopsis thaliana*-Chloroplasten wurden bisher fünf Deg-homologe Proteasen nachgewiesen. Deg1, 5 und 8 sind im Lumen der Thylakoidmembran peripher an die Membran assoziiert, während Deg2 und Deg7 im Stroma lokalisiert ist [Sakamoto, 2006, Sun *et al.* 2010].

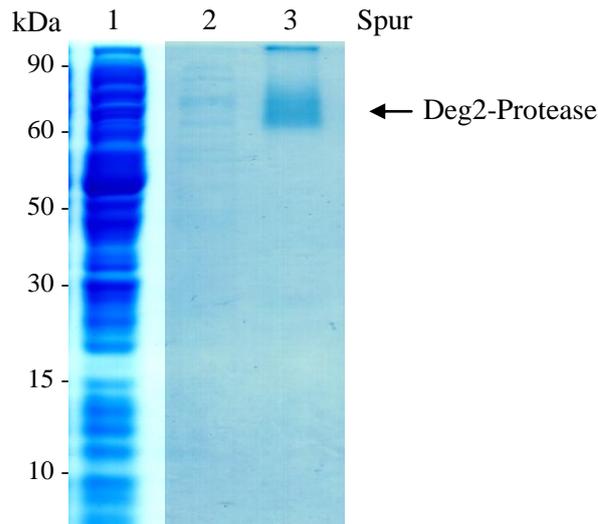
Haußühl *et al.* beschrieben die heterologe Expression einer 66.8 kDa großen Deg2-Protease in *E.coli*. Nach der Inkubation von isolierten Thylakoidmembranen mit der Protease wurde gezeigt, dass Deg2 die Spaltung des D1-Proteins im D-de-Loop initiiert [Haußühl *et al.* 2001].

Um zu identifizieren zwischen welchen Aminosäuren des D1-Proteins die Deg2-Protease spaltet, wurde das Membranprotein mit der Deg2 Protease inkubiert. Die generierten Fragmente sollten massenspektrometrisch analysiert werden.

Das Plasmid pPH35 wurde von Prof. Adamska (Konstanz) zur Verfügung gestellt. Es enthält die Sequenz einer Deg2-Protease mit einem 6fachen His-Tag.

pPH35 wurde in den *E.coli*-Stamm Nova blue (DE3) transformiert. Nach der Expression der Deg2-Protease wurden die Bakterienzellen durch die „Yeda-Press“ aufgeschlossen und die löslichen Proteine für die native Reinigung der Protease eingesetzt (Kapitel 2.11). Die löslichen Proteine wurden auf eine Ni-NTA Agarose-Säule geladen und zelleigene *E. coli*-Proteine durch intensives Waschen von der Säule entfernt. Anschließend wurde die Deg2-Protease durch Erhöhung der Imidazol-Konzentration eluiert und bei 4°C gelagert. Um die Reinheit der Protease zu untersuchen, wurde das isolierte Protein gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie gefärbt. Abbildung 3.4.4 veranschaulicht, dass die *E. coli* eigenen Proteine (Abb. 3.4.4, Spur 1) durch den Waschschrift (Abb. 3.4.4, Spur 2) von der Ni-NTA Agarose-Säule entfernt wurden. Die eluierte, 66.8 kDa große Deg2-Protease wies in der Coomassiefärbung keine Verunreinigungen durch *E. coli*-Proteine auf (Abb. 3.4.4, Spur 3).

## Ergebnisse



### Abbildung 3.4.4: Reinigung der heterolog exprimierten Deg2-Protease durch die IMAC

Die Deg2-Protease wurde heterolog in *E.coli* exprimiert. Danach wurde sie unter Verwendung einer Ni-NTA Agarose-Säule gereinigt. Folgende Proben wurden auf das SDS-Acrylamidgel aufgetragen: 10  $\mu$ l *E.coli*-Gesamtprotein nach der IPTG-Induktion (Spur 1), 30  $\mu$ l des letzten Waschschrittes (Spur 2) und 30  $\mu$ l des Säuleneluates (Spur 3). Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine durch Coomassie gefärbt.

Um die Spaltung des D1-Proteins zu initiieren wurden sowohl 2  $\mu$ g des isolierten D1-Proteins als auch 2  $\mu$ g des PSII-Komplexes des Stammes His10 mit 2  $\mu$ g der Deg2-Protease für 2 h bei 37°C in folgendem Reaktionspuffer inkubiert (Ansatz 20  $\mu$ l): 50 mM Tris pH 9,5; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM GTP; 0,03 % DoDM (w/v). Dabei diente GTP der Deg2-Protease als Kofaktor und DoDM verhinderte das Aggregieren der Membranproteine.

Unter den gewählten Bedingungen fand keine D1-Spaltung statt. Daher wurden verschiedene Parameter modifiziert:

- 1) das Redoxverhältnis (Zugabe von 0,1 mM GSH und 1 mM GSSG)
- 2) die Temperatur (Temperaturen von 4°C bis 37°C untersucht)
- 3) der pH-Wert (pH-Werte von pH 2 bis pH 11 untersucht).

Trotz Änderung dieser Parameter wurde keine Spaltung des D1-Proteins beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Untersuchungen von Huesgen *et al.* und Barker *et al.* beschreiben, dass der D1-Abbau in *Arabidopsis thaliana*, bzw. *Synechocystis* sp. PCC 6803 auch ohne Deg-Anwesenheit stattfindet [Huesgen *et al.* 2006, Barker *et al.* 2006].

**Isoliertes D1-Protein und isolierter PSII-Komplex wurden jeweils mit einer heterolog exprimierten Deg2-Protease versetzt: es wurde keine D1-Spaltung beobachtet.**

#### **3.4.1.4 Untersuchung der D1-Protein-Spaltung im Algen-Zell-Lysat**

In Algenzellen befinden sich zahlreiche Membran-integrale und lösliche Proteasen. Diese sind potentiell in der Lage, das D1-Protein zu spalten. Um die Spaltung des D1-Proteins in Gegenwart dieser Proteasen zu untersuchen, wurde das D1-Protein des Stammes His10 mit löslichem Protein und mit Thylakoidmembranen des Stammes IL inkubiert. Das ermöglichte die ausschließliche Untersuchung der Spaltung des D1-Proteins des Stammes His10, da ein Teil dieser D1-Spaltfragmente durch den anti-His Antikörper erkannt wird. D1-Spaltprodukte der Mutante IL werden dabei nicht nachgewiesen.

Zellen des IL-Stammes wurden durch die „Yeda-Press“ aufgeschlossen. Thylakoidmembranen und lösliche Proteinfraction wurden durch Zentrifugation bei 20000 x g voneinander getrennt. 2 µg des D1-Proteins des Stammes His10 wurden mit Thylakoidmembranen (0,05 µg - 1 µg Protein) bzw. löslicher Proteinfraction (0,05 µg – 1 µg Protein) versetzt und bei 37°C für 2 h inkubiert (Reaktionsvolumen: 20 µl, Puffer: 50 mM Tris pH 8,0; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM; 0,03 % DoDM (w/v)). Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine durch Silberfärbung sichtbar gemacht, bzw. auf NC-Membran transferiert. In der Immunreaktion mit dem anti-His Antikörper wurde keine Spaltung des D1-Proteins nachgewiesen. Auch nachdem dem Reaktionsansatz GTP, bzw. ATP (jeweils 2 mM) als Kofaktor zugesetzt wurde, wurde keine D1-Spaltung beobachtet (Daten nicht gezeigt).

**Nach Zugabe von Algen-Zell-Lysat (lösliche Fraktion und Membranfraktionen) wurde das isolierte D1-Protein nicht gespalten.**

#### **3.4.1.5 Spaltung des D1-Proteins in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

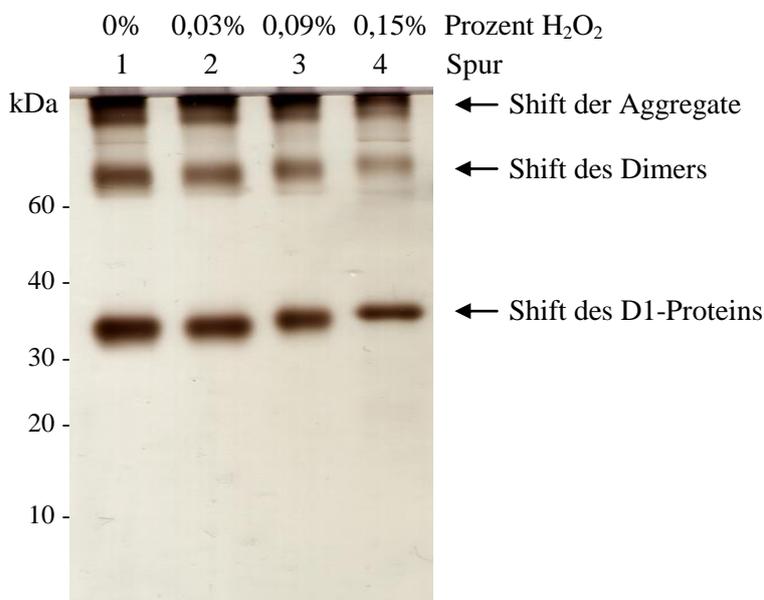
Die während der photochemischen Energiekonversion gebildeten Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sind in der Lage Proteine zu modifizieren. Dabei treten u.a. Protein-interne Vernetzungen, Adduktbildungen und Vernetzung zweier- bzw. mehrerer Proteine auf. Auch die Bildung diskreter Proteinfragmente kann durch ROS induziert werden.

Verschiedene reaktive Spezies besitzen eine unterschiedliche Substratspezifität. <sup>1</sup>O<sub>2</sub> richtet sich spezifisch gegen die Aminosäuren Trp, Met, His und Cys. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert vor allem Aminosäuren an Metallbindestellen, wie zum Beispiel His, Arg und Pro. Superoxide sind oft in Reaktionen mit anderen Radikalen integriert und an der Oxidation von Eisen-Schwefel-Proteinen sowie der Entstehung von Phenoxylradikalen beteiligt. Hydroxylradikale stellen auf Grund ihres hohen positiven Redoxpotentials die reaktivsten Sauerstoffradikale dar [Møller *et al.* 2007].

## Ergebnisse

Um den Einfluss von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf das isolierte D1-Protein zu untersuchen, wurde das D1-Protein mit steigenden Mengen  $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert.

2  $\mu\text{g}$  isoliertes D1-Protein wurde in Gegenwart von 2 mM EDTA mit 0,03 - 0,15 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  (v/v) versetzt (Ansatz: 20  $\mu\text{l}$ ) und 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine durch Silberfärbung sichtbar gemacht (Abb. 3.4.5). Der Einsatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  bewirkte eine Mobilitätsveränderung des D1-Proteins in der SDS-PAGE. Mit steigender  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration verschoben sich D1-Protein-, Homodimer-, bzw. Heterodimer- und D1-Aggregat-Bande in den höher molekularen Bereich. Grund dafür ist die Bildung interner Vernetzungen. D1 Fragmente traten unter diesen Bedingungen nicht auf.



**Abbildung 3.4.5:  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Inkubation des isolierten D1-Proteins**

2  $\mu\text{g}$  isoliertes D1-Protein (Ansatz: 20  $\mu\text{l}$ ) wurde in Gegenwart von 2 mM EDTA mit 0,03 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  (v/v) (Spur 2), 0,09 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  (v/v) (Spur 3) und 0,15 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  (v/v) (Spur 4) für 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Als Kontrolle diente isoliertes D1-Protein, das in Gegenwart von 2 mM EDTA für 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert wurde (Spur 1). Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

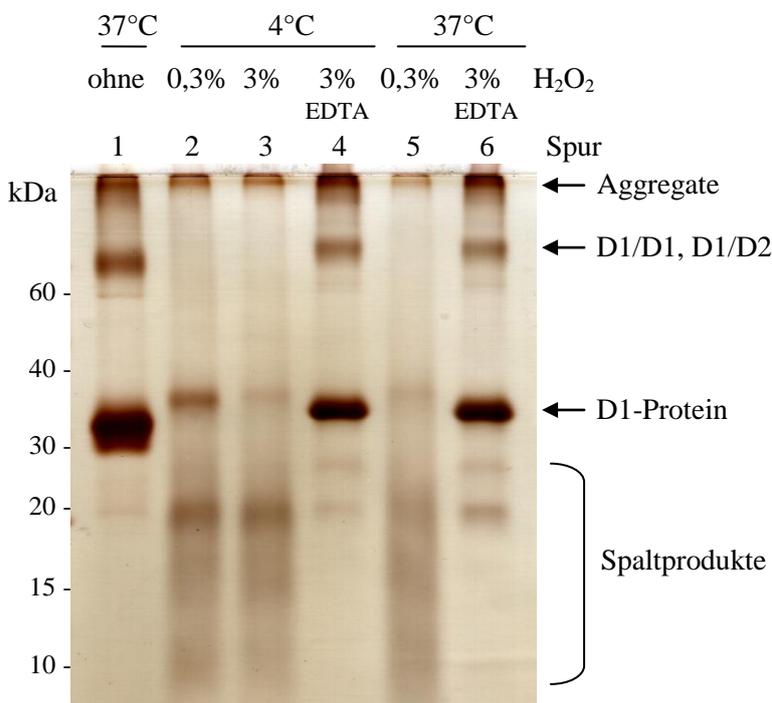
Nach 24stündiger Inkubation des D1-Proteins mit 0,3 bzw. 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  (v/v) wurde die Bildung von D1-Spaltprodukten beobachtet (Abb. 3.4.6). Eine Erhöhung der Temperatur von  $4^\circ\text{C}$  auf  $37^\circ\text{C}$  führte zu einer geringfügigen Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit.

In Abwesenheit von EDTA wurde das D1-Protein auch bei geringen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen (0,03 % (v/v)) fast vollständig gespalten. Spaltfragmente unterschiedlichster Größe bildeten ein diffuses Bandenmuster. Außerdem wurde in Abwesenheit von EDTA eine stärkere

## Ergebnisse

Verschiebung der D1-Protein-Bande in den höher molekularen Bereich beobachtet (Abb. 3.4.6, Spur 2 & 3 & 5). Bei Zugabe von 2 mM EDTA zu dem Reaktionsansatz wurden Spaltprodukte definierter Größe erhalten. Diese Fragmente zeigten ein Molekulargewicht von 21 kDa und 27 kDa (Abb. 3.4.6, Spur 4 & 6).

In der Kontrollprobe trat ebenfalls ein ca. 20 kDa großes D1-Fragment auf (Abb. 3.4.6, Spur 1). Das wurde auf einen leichten Abbau des Proteins während des „Yeda-Press“-Aufschlusses zurückgeführt (siehe Abb. 3.4.1). Dieses Fragment besaß das gleiche Molekulargewicht wie ein Fragment, das nach 24stündiger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inkubation detektiert wurde.



**Abbildung 3.4.6: Spaltung des D1-Proteins durch Einsatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

2 µg isoliertes D1-Protein wurden innerhalb von 24 h nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter verschiedenen Bedingungen hydrolysiert. D1-Protein wurde mit 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) bei 4°C (Spur 2); 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) bei 4°C (Spur 3); 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) und 2 mM EDTA bei 4°C (Spur 4); 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) bei 37°C (Spur 5); 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) und 2 mM EDTA bei 37°C (Spur 6) versetzt. Als Kontrolle diente 2 µg isoliertes D1-Protein, das in Gegenwart von 2 mM EDTA für 24 h bei 37°C inkubiert wurde (Spur 1). Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

Anschließend sollte die N-terminale Sequenz der Spaltprodukte durch den Edman-Abbau bestimmt werden. Dazu wurden 20 µg D1-Protein in Gegenwart von 2 mM EDTA mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) versetzt und für 24 h bei 37°C inkubiert. Das Probenvolumen (200 µl) wurde durch eine 5 kDa Amicon-Ausschluss säule auf 50 µl reduziert. Die Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert und unter Verwendung des

„MemCode<sup>TM</sup> reversible protein stain Kit“ angefärbt (Daten nicht gezeigt). Die Konzentration der nur schwach angefärbten Spaltfragmente reichte für den Edman-Abbau nicht aus.

Um die Konzentration der Spaltfragmente zu erhöhen, wurde:

- 1) die Probe für 30 h (statt 24 h) bei 37°C inkubiert
- 2) die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration im Probenansatz auf 4-6 % (v/v) erhöht
- 3) eine geringere Konzentration an EDTA (0,5-1,8 mM) eingesetzt.

Unter den gewählten Bedingungen nahm die Konzentration der Fragmente nicht zu. Stattdessen wurden die Fragmente in kleinere Bruchstücke gespalten, so dass keine distinkten Proteinbanden mehr detektierbar waren (Daten nicht gezeigt).

Nach Stadtman ist die Spaltung eines Proteins in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nur möglich, wenn Metallionen an das Protein gebunden sind [Stadtman, 1993]. Folglich wurde die beobachtete Fenton-Reaktion durch Nickel-Ionen induziert, die nach der D1-Präparation weiterhin an das Protein chelatiert vorlagen.

**Nachdem das D1-Protein des Stammes His10 mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert wurde, traten spezifische Spaltfragmente auf.**

### 3.4.2 Nachweis von carbonylierten Proteinen im PSII-Komplex

Zu den irreversiblen Proteinmodifikationen, die ROS induzieren, zählt die Carbonylierung von Seitenketten der Aminosäuren Pro, Arg, Lys, His, Trp und Thr [Møller *et al.* 2007]. Wenn Proteasen das carbonylierte Protein nicht abbauen, wird die Bildung von Proteinaggregaten forciert [Nyström, 2005]. Bisher gibt es verschiedene Nachweise für diese Form der Proteinmodifikation:

- Anfänglich wurden Carbonylgruppen durch Tritium markiertes Natrium Borohydrid detektiert [Lenz *et al.* 1989, Winter und Liehr, 1991].
- Eine weitere Nachweismöglichkeit stellt die Reaktion der Carbonyle mit 2,4-Dinitrophenyl-Hydrazin (DNPH) dar. Das gebildete Hydrazone wurde spektrometrisch nachgewiesen [Levine *et al.* 1990, Levine *et al.* 1994].
- Nakamura und Goto publizierten eine Methode, durch die das Hydrazone mit einem monospezifischen Antikörper detektiert wurde [Nakamura und Goto, 1996].
- Yoo und Regnier wiesen Carbonyle über Biotin-Hydrazid und Avidin-FITC-Färbung nach. Biotin-Hydrazid reagiert mit Aldehyden und Ketonen unter Ausbildung einer

## Ergebnisse

kovalenten Bindung. Biotin-markierte Gruppen werden anschließend durch ein Avidin-Fluoreszein-Konjugat nachgewiesen [Yoo und Regnier, 2004].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das von Yoo und Regnier vorgestellte Konzept für den Nachweis carbonylierter PSII-Proteine angepasst. Dadurch sollte es in Zukunft möglich sein, den exakten Ort der Carbonylierung von PSII-Proteinen durch eine Massenanalyse zu ermitteln.

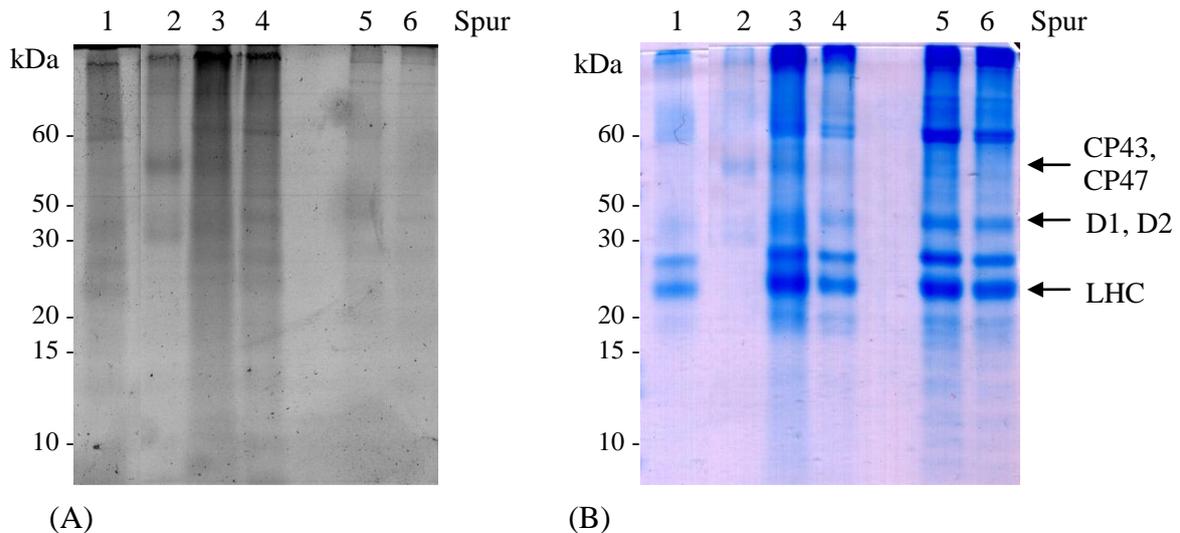
Thylakoidmembranen von unter Standardbedingungen angezogenen Zellen des Stammes His10 wurden in DoDM-Puffer resuspendiert (Kapitel 2.23.1). Nach Zugabe von Biotin-Hydrazid-Lösung wurde die Probe für 6 h bei 4°C solubilisiert (Kapitel 2.24). Anschließend wurde der PSII-Komplex isoliert (Kapitel 2.23.1). Nach der IMAC wurden jeweils 10 µl des Durchflusses und 20 µl des Eluates gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Parallel dazu wurde Gesamtzellextrakt des Stammes His10 mit 80 % Aceton (v/v) gefällt und mit Biotin-Hydrazid-Lösung inkubiert. Als Kontrolle diente Aceton gefälltes Gesamtzellextrakt, das nicht mit Biotin markiert wurde. Die Proben wurden ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Nach der Elektrophorese wurde das SDS-Acrylamidgel in Avidin-Fluoreszein-Lösung inkubiert. Dies ermöglichte die Detektion biotinylierter Proteine durch den Phosphoimager (Abb. 3.4.7 (A)). Anschließend wurde das SDS-Acrylamidgel für die Coomassiefärbung eingesetzt (Abb. 3.4.7 (B)).

Sowohl im Durchfluss der IMAC (Abb. 3.4.7 (A) Spur 1) als auch in der PSII-Präparation (Abb. 3.4.7 (A) Spur 2) wurde eine Fluoreszenz nachgewiesen. Dadurch wurde belegt, dass unter normalen Anzuchtbedingungen eine Protein-Carbonylierung in der gesamten Thylakoidmembran erfolgte. Nicht durch Biotin-Hydrazid markierte Proteine des Gesamtzellextraktes zeigten eine geringe Grundfluoreszenz, da Biotin (Vitamin H) als Kofaktor *in vivo* vorhanden ist (Abb. 3.4.7 (A) Spur 5 & 6). Die Aceton-Fällung biotinylierter Proteine hatte keinen Einfluss auf die Markierung (Abb. 3.4.7 (A) Spur 4).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.4.7: Nachweis carbonylierter PSII-Proteine durch Einsatz von Biotin-Hydrazid und Avidin-Fluoreszein**

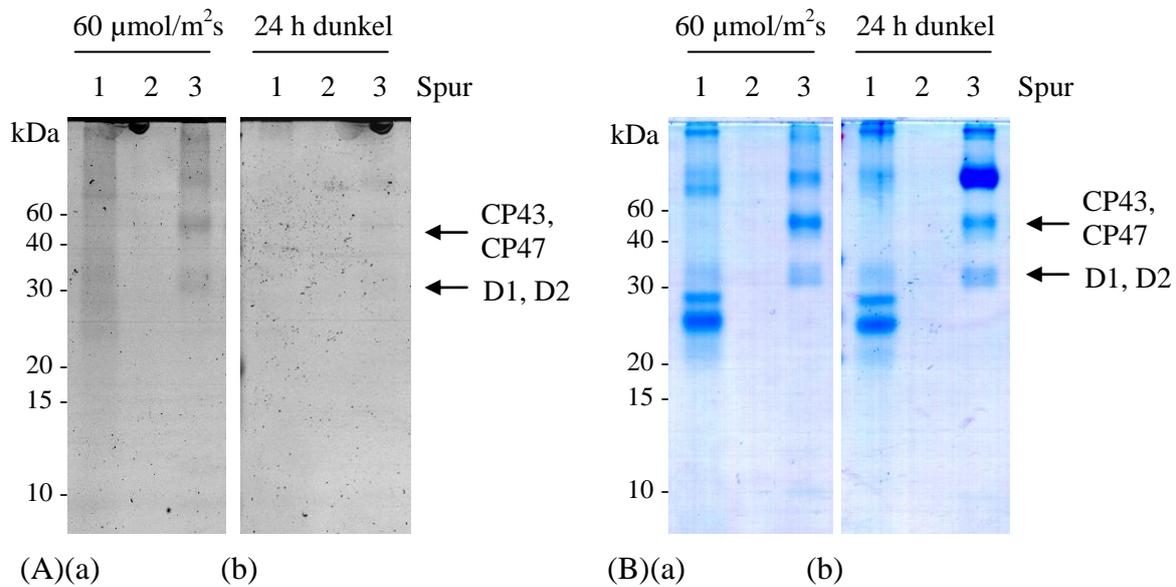
4 µg Protein des Gesamtzellextraktes (Spur 3) und der Thylakoidmembranen des Stammes His10 wurden in Solubilisierungspuffer gelöst und mit Biotin-Hydrazid-Lösung markiert. Die Membranen wurden in die PSII-Präparation eingesetzt. 10 µl Durchfluss (Spur 1) der IMAC und 20 µl isoliertes PSII (Spur 2) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Eine Probe des Gesamtzellextraktes wurde nach der Biotinylierung durch Aceton gefällt (Spur 4). Als Kontrolle dienen Aceton gefällte Proteine des Gesamtzellextraktes (4 µg) (Spur 6) und natives Gesamtzellextrakt (4 µg) (Spur 5) ohne Biotin-Hydrazid Markierung. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die biotinylierten Proteine durch Avidin-FITC gefärbt und die entstandenen Konjugate durch den Phosphorimager detektiert (A). Anschließend wurde das SDS-Acrylamidgel für die Coomassiefärbung eingesetzt (B).

In weiteren Untersuchungen wurden Zellen des Stammes His10 zum einen unter normalen Lichtbedingungen ( $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) angezogen und zum anderen 24 h unter Lichtausschluss kultiviert. Anschließend wurden die isolierten Thylakoidmembranen mit Biotin-Hydrazid-Lösung behandelt. Nach der PSII-Isolierung wurden jeweils 10 µl des Durchflusses, 20 µl des letzten Waschschröttes und 20 µl des Eluates der IMAC gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Die Detektion der biotinylierten Gruppen erfolgte nach der Avidin-FITC-Färbung durch den Phosphorimager (Abb. 3.4.8 (A)). Im Anschluss daran wurde das SDS-Acrylamidgel für die Coomassiefärbung eingesetzt (Abb. 3.4.8 (B)).

Wurden die Algenzellen während der Anzucht bei  $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  belichtet, erfolgte eine Carbonylierung der Thylakoidmembranproteine (Abb. 3.4.8 (Aa)). Wenn die Algenzellen stattdessen für 24 h unter Lichtausschluss kultiviert wurden, war fast keine Carbonylierung der Thylakoidmembranproteine zu beobachten (Abb. 3.4.8 (Ab)). Unter Lichtausschluss fand keine photochemische Energiekonversion statt, so dass die Bildung von ROS und damit die Schädigung der PSII-Proteine weitgehend ausblieb.

## Ergebnisse



### Abbildung 3.4.8: Nachweis carbonylierter PSII-Proteine unter verschiedenen physiologischen Bedingungen

Zellen des Stammes His10 wurden unter normaler Belichtung ( $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) (a), bzw. für 24 h unter Lichtausschluss (b) angezogenen. Nach Biotinylierung und anschließender PSII-Präparation wurden jeweils  $10 \mu\text{l}$  des Durchflusses (Spur 1),  $20 \mu\text{l}$  des letzten Waschschrittes (Spur 2) und  $20 \mu\text{l}$  Eluat (Spur 3) der IMAC gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Avidin-FITC-Färbung wurden die biotinylierten Proteine durch den Phosphoimager detektiert (A). Anschließend wurde das SDS-Acrylamidgel für die Coomassiefärbung eingesetzt (B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Carbonylierung der PSII-Proteine und anderer Thylakoidmembranproteine durch die Anzuchtbedingungen der Alge beeinflusst wird (Abb. 3.4.8). In folgenden Untersuchungen muss die Carbonylierung unter UV-Licht, Starklichteinfluss und anderen Stressbedingungen, wie zum Beispiel Nährstoffmangel, untersucht werden. Außerdem müssen die carbonylierten Proteine massenspektrometrisch untersucht werden, um den exakten Ort der Carbonylierung aufzuklären. Durch den zeitlich begrenzten Rahmen war das innerhalb dieser Arbeit nicht mehr möglich.

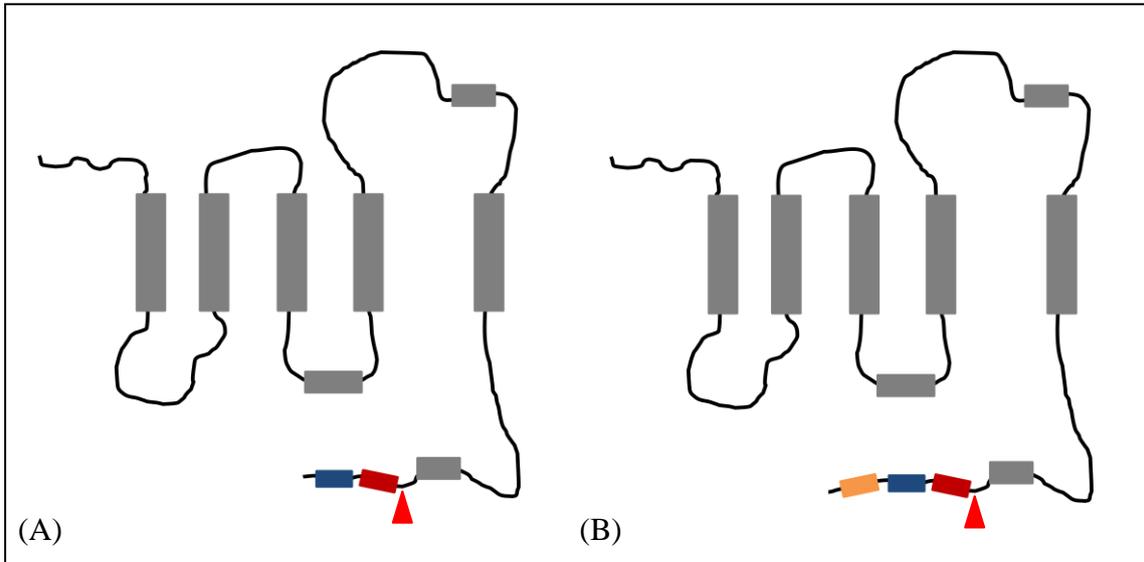
**Für Thylakoidmembranproteine, im Speziellen für PSII Proteine, wurde ein Assay entwickelt, der unter Verwendung der Biotin-Hydrazid Markierung und der Avidin-FITC-Färbung den Nachweis von Carbonylierungen dieser Proteine ermöglicht.**

### 3.5 Untersuchung des D1-Vorläuferproteins pD1

Eine Modifikation, die das D1-Protein unmittelbar nach der Translation erfährt, ist die Abspaltung der C-terminalen Extension durch die Protease CtpA. Dabei wird das Vorläuferprotein (pD1) in das reife D1-Protein umgewandelt. Erst dann nimmt der PSII-Komplex seine Funktion auf. An dem Prozess der Translation und der Insertion des D1-Proteins in die Thylakoidmembran, sowie an der Assemblierung des PSII-Komplexes sind verschiedene Faktoren beteiligt (Kapitel 1.5). Der Prozess der Assemblierung ist noch nicht vollständig verstanden. So war z.B. bislang nicht abschließend geklärt, ob pD1 prozessiert werden muss, bevor CP43 an den PSII-Komplex assembliert.

Im Laufe dieser Arbeit wurden in einem anderen Projekt (D. Fischer, unveröffentlicht) Mutanten erzeugt, die am C-terminalen Ende des D1-Proteins spezielle, für die Expression von Fremdproteinen fusionierte Sequenzen enthalten. Während das D1-Vorläuferprotein im Wildtyp sehr schnell prozessiert wird und nur in radioaktiven „Pulse-Chase“ Experimenten sichtbar gemacht werden kann, akkumuliert der pD1 in diesen Mutanten in größeren Mengen. Unter Verwendung der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Techniken ergab sich die Möglichkeit festzustellen, welche Komponenten des PSII bereits mit pD1 assembliert vorliegen.

Die Mutanten MCS4 und MCS8 besitzen ein D1-Protein mit einer 4 kDa bzw. 8 kDa großen C-terminalen Extension: Die Mutante MCS4 enthält einen 6fachen His- und einen HA-Tag (Abb. 3.5.1 (A)). Die Mutante MCS8 besitzt einen 6fachen His-, einen HA-Tag, sowie einen TC-Tag (Abb. 3.5.1 (B)). Beide Stämme zeigen eine verzögerte Reifung des pD1-Proteins. Das hat zur Folge, dass sowohl pD1- als auch D1-Protein in den Stämmen MCS4 und MCS8 nach zweistündiger Starklichtinkubation ( $2000 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) immunchemisch detektiert werden können (D. Fischer, unveröffentlicht). Werden die Algen anschließend für 30 min bei Schwachlicht ( $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) inkubiert, nimmt die Menge an pD1-Protein weiter zu.



**Abbildung 3.5.1: pD1-Protein der Stämme MCS4 und MCS8**

Schematisch dargestellt ist das pD1-Protein der Stämme MCS4 (A) und MCS8 (B). MCS4 exprimiert ein D1-Protein mit einer 4 kDa langen C-terminalen Extension, die einen 6fachen His-Tag (rote Box) und einen HA-Tag (blaue Box) beinhaltet. MCS8 exprimiert ein D1-Protein mit einer 8 kDa langen C-terminalen Extension, die neben einem 6fachen His-Tag (rote Box) und einem HA-Tag (blaue Box) einen TC-Tag (orange Box) beinhaltet. Die  $\alpha$ Helices des D1-Proteins wurden grau unterlegt. Die Spaltstelle der Protease CtpA wurde durch einen roten Pfeil markiert.

### 3.5.1 Reinigung des pD1-Proteins unter Verwendung der IMAC

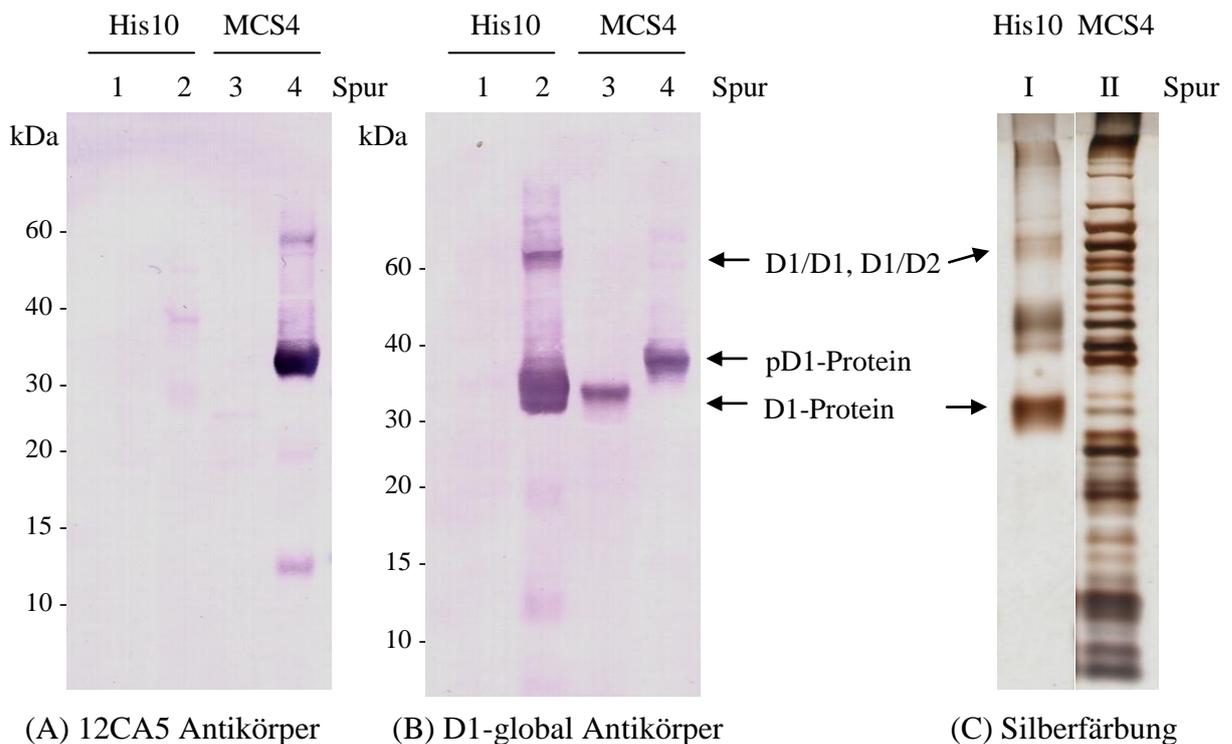
Im Folgenden wurde untersucht, ob das pD1-Protein und die daran assoziierten Proteine durch die in Kapitel 3.3.2 beschriebene PSII-Präparation isoliert werden können. Zellen des Stammes MCS4 wurden für 90 min mit Starklicht ( $2000 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) bestrahlt und anschließend bei Schwachlicht ( $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) inkubiert (Kapitel 3.5). Danach wurden die Thylakoidmembranproteine solubilisiert und für die IMAC eingesetzt (Kapitel 2.23.1). Anschließend wurden Eluat und Durchlauf der IMAC auf Vorhandensein des Proteins pD1 untersucht. Zum Vergleich wurden die entsprechenden Fraktionen der PSII-Präparation des Stammes His10 mitgeführt (Kapitel 2.23.1). Jeweils  $20 \mu\text{l}$  des Durchflusses und des Eluates der MCS4 Mutanten sowie des Stammes His10 wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine durch die Silberfärbung sichtbar gemacht. Parallel dazu wurden die Proteine auf NC-Membran transferiert und mit den Antikörpern D1-global und 12CA5 inkubiert. D1-global erkennt den C-terminalen Bereich des reifen D1-Proteins und 12CA5 den HA-Tag der 4 kDa großen Extension (Abb. 3.5.2).

Im Durchfluss der IMAC des Stammes His10 wurde erwartungsgemäß mit keinem der Antikörper eine Reaktion erhalten (Abb. 3.5.2 (A) Spur 1, (B) Spur 1). Das D1-Protein im

## Ergebnisse

IMAC-Eluat des Stammes His10 und das reife D1-Protein im IMAC-Durchfluss der MCS4 Mutanten reagierten mit dem D1-global Antikörper (Abb. 3.5.2 (B) Spur 2 & 3). Im IMAC-Eluat der Mutante MCS4 wurde das pD1-Protein sowohl durch den 12CA5 als auch den D1-global Antikörper nachgewiesen (Abb. 3.5.2 (A) Spur 4, (B) Spur 4).

In der Silberfärbung wurde der PSII-Komplex im Eluat des Stammes His10 nachgewiesen (Abb. 3.5.2 (C) Spur I). Im Eluat des Stammes MCS4 wurde eine Vielzahl von Proteinbanden detektiert (Abb. 3.5.2 (C) Spur II). Ein ähnliches Proteinmuster wurde erhalten, wenn Thylakoidmembranen des Stammes IL zur Kontrolle in diese PSII-Präparation eingesetzt wurden (Daten nicht gezeigt). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass es sich bei vielen der eluierten Proteine um Histidin-reiche Proteine handelt, die unspezifisch an die Nickel-Matrix binden.



### Abbildung 3.5.2: Nachweis des pD1-Proteins der Mutante MCS4

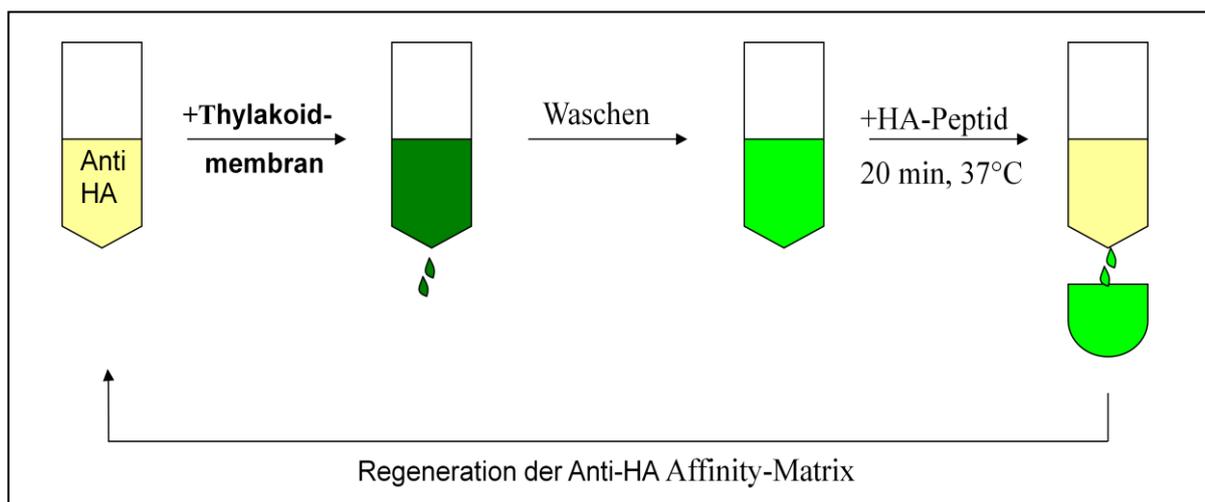
Solubilisiertes Thylakoidmembranmaterial der Mutanten His10 und MCS4 wurde für die IMAC eingesetzt. Beide Proben wurden nach dem Protokoll der PSII-Präparation (Kapitel 2.23.1) behandelt. Folgende, durch die IMAC erhaltene Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt: je 20  $\mu$ l des Durchflusses (Spur 1) und des Eluates (Spur 2) der Mutante His10, sowie je 20  $\mu$ l des Durchflusses (Spur 3) und des Eluates (Spur 4) der Mutante MCS4. Nach der Auftrennung wurden die Proteine auf NC-Membran transferiert. Die Immunreaktionen wurden unter Verwendung der Antikörper 12CA5 (A) und D1-global (B) durchgeführt. Zusätzlich wurden 20  $\mu$ l des Eluates der Mutanten His10 (Spur I) und MCS4 (Spur II) gelelektrophoretisch aufgetrennt und in die Silberfärbung eingesetzt (C).

Über eine Ni-NTA Agarose-Säule wurde pD1 des Stammes isoliert. Neben dem Precursor wurden jedoch auch viele unspezifisch an die Nickel-Matrix gebundene Proteine isoliert, so dass es unter Verwendung dieser Präparation nicht möglich war, spezifisch an pD1 assoziierte Proteine zu identifizieren.

### 3.5.2 Reinigung des pD1-Proteins unter Verwendung einer Anti-HA Affinity-Matrix

Unter Verwendung einer Anti-HA Affinity-Matrix wurde im Folgenden ein Protokoll etabliert, um pD1 über seinen HA-Tag nativ zu reinigen. Die Anti-HA Affinitäts-Matrix nutzt die sehr spezifische Bindung des HA-Tags an das entsprechende IgG1. Dadurch wurden das pD1-Protein und daran assemblierte Proteine ohne Verunreinigung durch unspezifisch an die Matrix gebundene Proteine isoliert.

Zellen der Stämme MCS4 und MCS8 wurden für 90 min mit Starklicht ( $2000 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) und für 30 min mit Schwachlicht ( $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) bestrahlt (Kapitel 3.5). Anschließend wurde das Thylakoidmembranmaterial in DoDM-Puffer gelöst und jeweils auf eine Anti-HA Affinity-Matrix geladen. Nicht an pD1 assoziierte Proteine wurden durch 0,03 % DoDM (w/v)-haltigen Waschpuffer entfernt. Nach den Waschschritten zeigte die Matrix eine hellgrüne Färbung. Die Elution des pD1 erfolgte durch Zugabe des HA-Peptides. Anschließend wurde die Anti-HA Affinity-Matrix regeneriert und erneut für die Chromatographie eingesetzt (Kapitel 2.23.2; Abb. 3.5.3).



**Abbildung 3.5.3: Schematische Darstellung der nativen Reinigung von pD1 und der daran assemblierten Proteine**

Solubilisierete Thylakoidmembranproteine der Stämme MCS4 und MCS8 wurden jeweils auf eine Anti-HA Affinity-Matrix geladen. Danach wurde mit 0,03 % DoDM (w/v)-haltigem Waschpuffer gespült, bis keine Proteine mehr im Durchfluss detektiert wurden. Die Elution von pD1 und der daran assoziierenden Proteine erfolgte durch das HA-Peptid. Danach wurde die Matrix regeneriert und erneut für die Chromatographie eingesetzt.

## Ergebnisse

20 µl der AIC-Eluate der Stämme MCS4 und MCS8 wurden jeweils zusammen mit 20 µl der PSII-Präparation des Stammes His10 gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine durch Silberfärbung sichtbar gemacht, bzw. auf NC-Membran transferiert.

Für den Stamm MCS4 erfolgte der immunologische Nachweis ausgewählter PSII-Proteine durch die Antikörper D1-global, anti-HA, anti-D2, anti-CP43 und anti-CP47 (Abb. 3.5.4 (AII)). Für den Stamm MCS8 wurden die Antikörper D1-global, anti-D2, anti-CP43 und anti-CP47 für den immunologischen Nachweis ausgewählter PSII-Proteine eingesetzt (Abb. 3.5.4 (B)).

Das pD1-Protein der Mutanten MCS4 und MCS8 wurde im Westernblot durch den Antikörper D1-global detektiert (Abb. 3.5.4 (AIIa) Spur 2, (Ba) Spur 2). Im Eluat des Stammes MCS4 wurde es zusätzlich durch den anti-HA Antikörper nachgewiesen (Abb. 3.5.4 (AIIb) Spur 2). Die PSII-Präparation des Stammes His10 enthielt das reife D1-Protein, das durch den D1-global Antikörper erkannt wurde (Abb. 3.5.4 (AIIa) Spur 1, (Ba) Spur 1). Außerdem wurden die Proteine D2, CP43 und CP47 im Eluat der Mutante His10 und auch im Eluat der Mutanten MCS4 und MCS8 durch Immunreaktionen nachgewiesen (Abb. 3.5.4 (AIIc, AIId, AIIe); (Bb, Bc, Bd)).

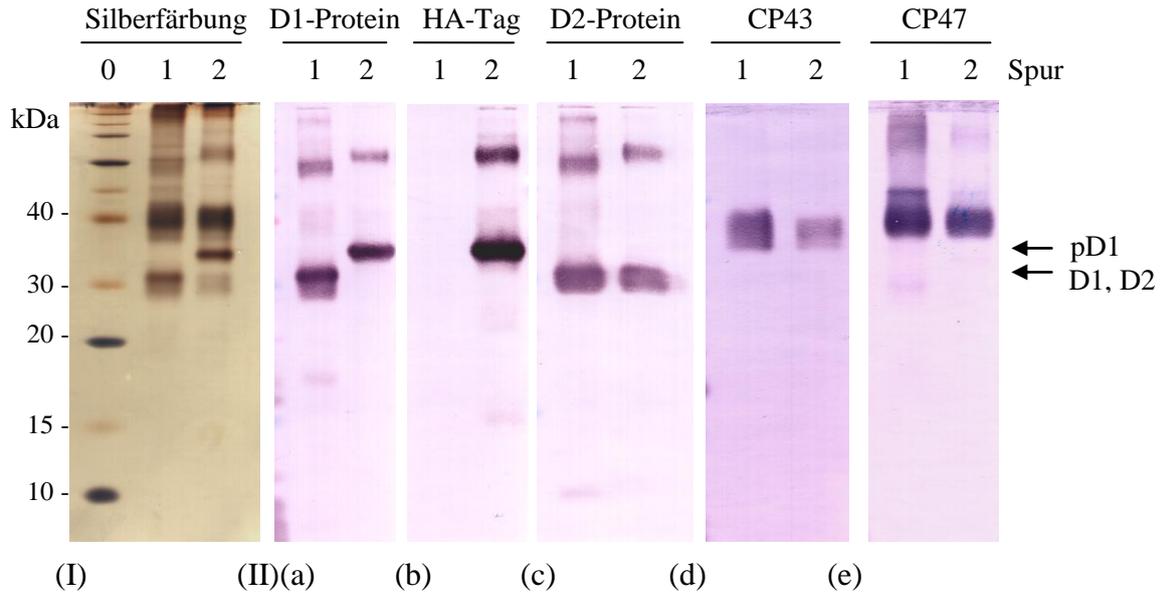
Bei den Stämmen His10 und MCS4 wurde ein Homo-, bzw. Heterodimer mit einer Größe von ca. 60 kDa durch die Antikörper D1-global, anti-HA und anti-D2 detektiert (Abb. 3.5.4 (AIIa), (AIIb), (AIIc)). Dieses setzte sich bei der Mutante His10 aus D1/D1, bzw. D1/D2 zusammen. Bei der Mutante MCS4 bestand es aus pD1/pD1 bzw. pD1/D2. Eine Dimerbildung aus D1 und pD1 wird ausgeschlossen, da im Eluat kein reifes D1-Protein nachgewiesen wurde (Abb. 3.5.4 (AIIa) Spur 2).

Bei der Mutante MCS8 wurde sehr wenig Protein eluiert. Daher wurde lediglich eine schwache Immunreaktion für Homo-, bzw. Heterodimer bestehend aus pD1/pD1 bzw. pD1/D2 nachgewiesen (Abb. 3.5.4 (Ba) Spur 2, (Bb) Spur 2).

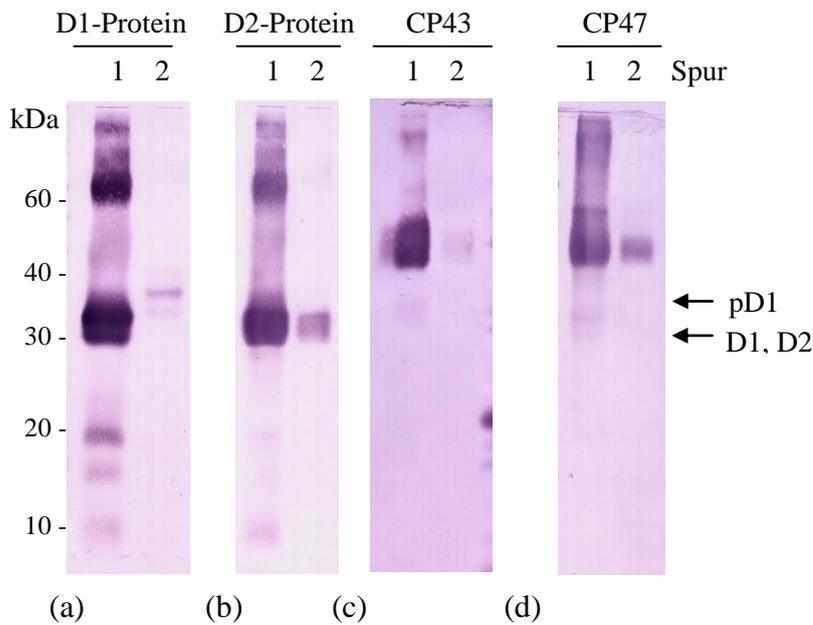
In der Silberfärbung wurden bei der Mutante His10 die Proteine des PSII-Komplexes sichtbar gemacht (Abb. 3.5.4 (AI) Spur 1). Das Eluat des Stammes MCS4 zeigte ein sehr ähnliches Proteinmuster (Abb. 3.5.4 (AI) Spur 2). Statt des D1-Proteins wurde jedoch das 4 kDa größere pD1-Protein (Proteinbande bei ca. 35 kDa) detektiert. Die Dimerbande, bei dem Stamm MCS4 bestehend aus pD1/pD1 sowie pD1/D2, war ebenfalls in den höher molekularen Bereich verschoben. Die Silberfärbung des AIC-Eluates der Mutante MCS8 ähnelt der des AIC-Eluates der Mutante MCS4 (Daten nicht gezeigt).

Durch diese Untersuchungen wurde belegt, dass pD1 mit D2 und CP47 assoziiert vorliegt. Außerdem wurde bewiesen, dass auch CP43 in diesem Komplex gebunden wird.

## Ergebnisse



### (A) His10 vs MCS4



### (B) His10 vs MCS8

#### Abbildung 3.5.4: Identifizierung von zentralen Proteinen des PSII-Komplexes, die an pD1 assoziieren

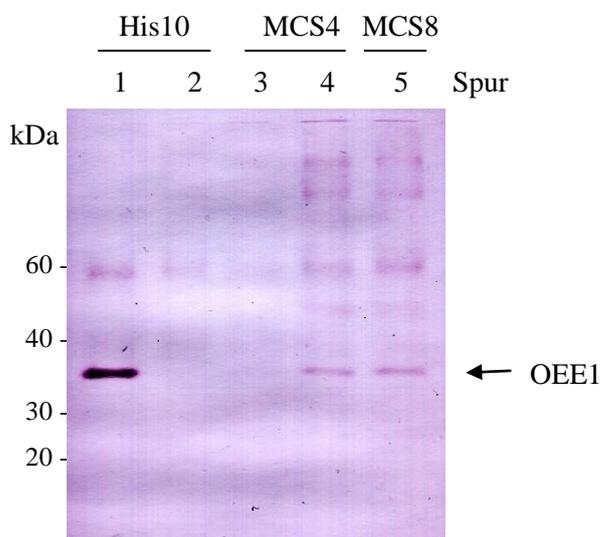
Natives PSII des Stammes His10 wurde durch die IMAC gewonnen. Diese PSII-Präparation wurde mit der nativen pD1-Elution der Mutanten MCS4 (A) und MCS8 (B) verglichen. Dazu wurde der pD1-PSII-Komplex der Stämme MCS4 und MCS8 über die Anti-HA Affinity-Matrix isoliert. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine der Mutanten His10 und MCS4 entweder durch Silberfärbung nachgewiesen (His10: (AI) Spur 1, MCS4: (AI) Spur 2) oder auf NC-Membran transferiert und für Immunreaktionen eingesetzt (His10: (AII) Spur 1 & (B) Spur 1, MCS4: (AII) Spur 2). Die Proteine der Mutante MCS8 wurden immunchemisch nachgewiesen (MCS8: (B) Spur 2). Die Detektion der PSII-Proteine erfolgte durch die Antikörper D1-global (AIIa; Ba), anti-HA (AIIb), anti-D2 (AIIc; Bb), anti-CP43 (AIIe; Bc) und anti-CP47 (AIIe; Bd). Für die PAGE wurden 20  $\mu$ l des jeweiligen Eluates eingesetzt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts wurde ein Proteinstandard (Invitrogen) aufgetragen ((AI) Spur 0).

## Ergebnisse

Anschließend wurde OEE1 in den PSII-Präparationen der Mutanten MCS4, MCS8 und His10 immunologisch nachgewiesen.

Thylakoidmembranen der Mutante His10 wurden in 2 %, bzw. 4 % DoDM-Puffer (w/v) und Thylakoidmembranen der Mutanten MCS4 bzw. MCS8 in 2 % DoDM-Puffer (w/v) gelöst. Danach wurde der PSII-Komplex über die IMAC (His10), bzw. die Anti-HA Affinity-Matrix (MCS4, MCS8) gereinigt. Jeweils 300 µl des AIC-Eluates der Stämme MCS4 und MCS8 wurden über eine 5 kDa Amicon-Ausschlussssäule auf 20 µl reduziert. An die gelelektrophoretische Auftrennung der Eluate, bzw. der eingengten Eluate schloss sich der Transfer der Proteine auf NC-Membran an. Der immunologische Nachweis erfolgte durch den Antikörper anti-OEE1 (Abb. 3.5.5).

Eine Solubilisierung der Thylakoidmembranen in 4 % DoDM-Puffer (w/v) führte zum Verlust des OEE1-Proteins (Abb. 3.5.5, Spur 2). Wurde 2 % DoDM-Puffer (w/v) für die Solubilisierung eingesetzt, enthielt die jeweilige PSII-Präparation OEE1: Im Eluat der Mutante His10 wurde eine starke Antikörperreaktion detektiert (Abb. 3.5.5, Spur 1). Im Eluat der Mutanten MCS4 (Abb. 3.5.5, Spur 3) und MCS8 (Daten nicht gezeigt) wurde nur eine sehr schwache OEE1-Reaktion nachgewiesen. Doch nach dem Einengen der Eluate wurde OEE1 für die Mutanten MCS4 und MCS8 deutlich detektiert (Abb. 3.5.5, Spur 4 & 5).



**Abbildung 3.5.5: Nachweis des OEE1-Proteins in der PSII-Präparation der Stämme MCS4, MCS8 und His10**

Thylakoidmembranproteine des Stammes His10 wurden entweder durch 2 % DoDM (Spur 1) oder durch 4 % DoDM (Spur 2) solubilisiert und in die PSII-Präparation eingesetzt. Thylakoidmembranen der Mutanten MCS4 und MCS8 wurden durch 2 % DoDM solubilisiert und in die PSII-Präparation eingesetzt. Folgende Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt: je 20 µl der Eluate der Mutante His10; 20 µl Eluat der Mutante MCS4 (Spur 3); 300 µl Eluat der Mutanten MCS4 (Spur 4) und MCS8 (Spur 5), das jeweils auf 20 µl eingengt wurde. Anschließend wurden die Proteine auf NC-Membran transferiert. Die Immunreaktion erfolgte durch den Antikörper anti-OEE1.

## Ergebnisse

Bei den hier unter Verwendung der Anti-HA Affinity-Matrix durchgeführten PSII-Präparationen, wurden 500 µl Eluat erhalten. Die darin vorliegende Proteinkonzentration konnte nicht ermittelt werden, da sie unter der Nachweisgrenze des Protein-Assays lag.

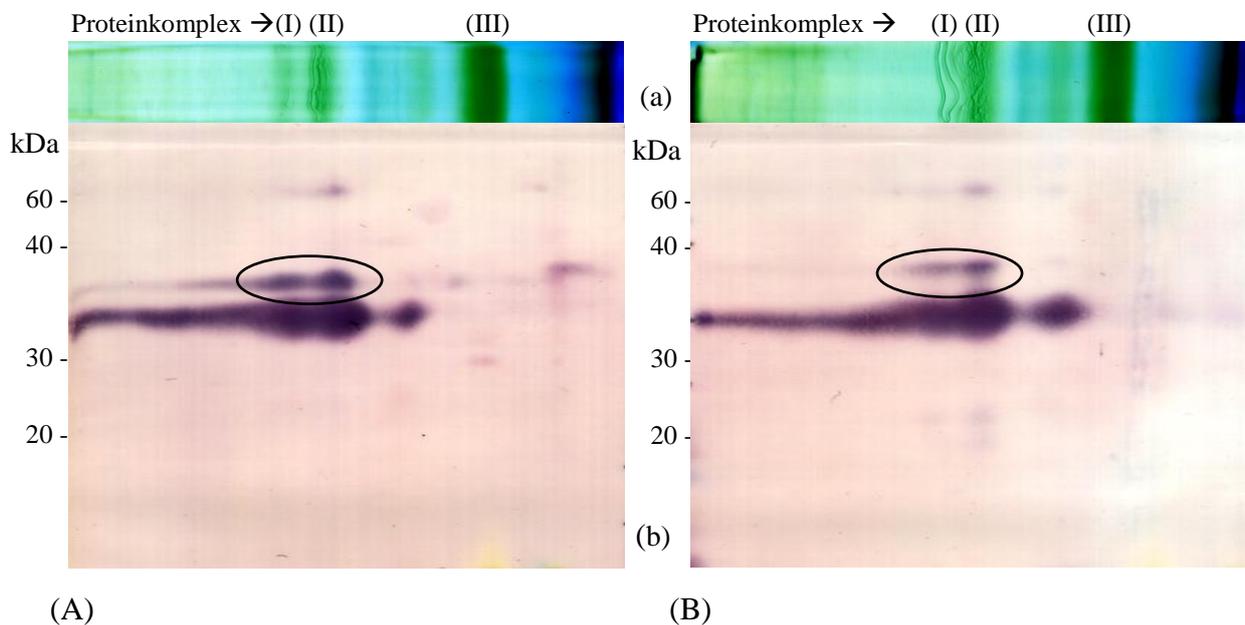
**Unter Verwendung der Anti-HA Affinity-Matrix wurde ein PSII-Komplex präpariert, in dem das D1-Protein noch als Precursor vorlag. Bei diesen Untersuchungen wurde erstmals gezeigt, dass pD1 bereits an CP43 sowie OEE1 assoziiert vorliegt.**

### 3.5.3 Lokalisierung des pD1-Proteins in Thylakoidmembranfraktionen

In weiteren Untersuchungen wurde die 2D BN/SDS-PAGE eingesetzt, um zu verifizieren, ob pD1 und das reife D1-Protein in denselben Superkomplexen assoziiert vorliegen.

Zellen der Stämme MCS4 und MCS8 in der halblogarithmischen Wachstumsphase wurden für 90 min bei 2000 µmol/m<sup>2</sup>s inkubiert und anschließend für 30 min bei 40 µmol/m<sup>2</sup>s bestrahlt (Kapitel 3.5). Die isolierten Thylakoidmembranproteine beider Stämme wurden jeweils in der 2D BN/SDS-PAGE aufgetrennt (Kapitel 2.19.2), auf NC-Membran transferiert und mit dem D1-global Antikörper inkubiert (Abb. 3.5.6).

In Superkomplexen, in die der PSII-Komplex integriert war, wurde eine deutliche Antikörperreaktion mit pD1- und dem reifen D1-Protein nachgewiesen (Abb. 3.5.6 (A) (B)). Dadurch wurde deutlich, dass pD1 in denselben Superkomplexen vorliegt, in denen auch das reife D1-Protein vorkommt. Da das pD1-Protein kontinuierliche prozessiert wird, wurde quantitativ mehr D1-Protein als pD1-Protein detektiert.



**Abbildung 3.5.6: Immunologischer Nachweis des pD1- und des D1-Proteins der Stämme MCS4 und MCS8 im Anschluss an die 2D BN/SDS-PAGE**

Thylakoidmembranproteine der Stämme MCS4 (A) und MCS8 (B) entsprechend 54 µg Chlorophyll wurden in die 2D BN/SDS-PAGE eingesetzt. Das Gradientengel der ersten Dimension (5-16 %) wurde Colloidal-Coomassie gefärbt (a). Nach der Separation in der zweiten Dimension wurden die Proteine auf NC-Membran transferiert und mit dem D1-global Antikörper inkubiert (b). Die Antikörperreaktion des pD1-Proteins wurde durch eine Ellipse gekennzeichnet. Die Banden I-III der BN-PAGE entsprechen folgenden Superkomplexen: ATPase Untereinheit, PSII Kernkomplex, Cyt b6/f Dimer (I), PSII Kernkomplex (II), trimeres LHCII (III).

**In der Immunreaktion nach der 2D BN/SDS-PAGE wurde gezeigt, dass das pD1-Protein und das reife D1-Protein in denselben Thylakoidmembran-Komplexen assembliert vorliegen.**

## 4 Diskussion

Der photosynthetische Elektronentransport stellt bei grünen Pflanzen Redox- und Energieäquivalente für die Assimilation von Kohlenstoff zur Verfügung. Er findet in der Thylakoidmembran der Chloroplasten statt. Die an dem Prozess beteiligten Multiproteinkomplexe übertragen die bei der Wasserspaltung frei werdenden Elektronen über eine Redoxkette auf  $\text{NADP}^+$ , generieren einen Protonengradienten und mit dessen Hilfe ATP (Abb. 1.1).

Diese Arbeit befasst sich mit der D1-Untereinheit von PSII, die zusammen mit der D2-Untereinheit und verschiedenen Kofaktoren die Kernstruktur dieses Multiproteinkomplexes bildet. Während der primären Ladungstrennung im P680 Reaktionszentrum werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet, die mit unmittelbar in ihrer Umgebung liegenden Targets reagieren. Dabei werden auch Aminosäuren des D1-Proteins modifiziert: Methionin wird reversibel zu Methioninsulfoxid oxidiert und Aminosäureseitenketten von Pro, Arg, Lys, His, Trp und Thr werden irreversibel carbonyliert [Møller, 2007].

Das dadurch inaktivierte Protein muss aus dem PSII-Komplex entfernt und durch eine funktionelle Kopie ersetzt werden. An dem proteolytischen Abbau nehmen Proteasen der FtsH- und der Deg-Familie teil. Der genaue Mechanismus des D1-Abbaus und der Neuassemblierung des PSII-Komplexes ist jedoch nicht in allen Einzelheiten bekannt.

Andere D1-Modifikationen treten unabhängig von der Schädigung durch ROS auf. Dazu gehören zum Beispiel Palmitoylierung [Mattoo und Edelman, 1987] und Deformylierung [Hou *et al.* 2004]. Um D1-Modifikationen zu charakterisieren, also z.B. Protease-Schnittstellen zu identifizieren bzw. modifizierte Aminosäuren zu charakterisieren, muss das D1-Protein aus der Thylakoidmembran möglichst schonend isoliert werden und in ausreichenden Mengen für anschließende Untersuchungen zur Verfügung stehen. Bisherige Methoden können dies nur unzureichend leisten.

Um geeignete schnelle und schonende Präparationsmethoden zu finden, wurde in dieser Arbeit die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* als Modellorganismus genutzt. Zahlreiche anfängliche Versuche, das D1-Protein über verschiedene 2D-Gelelektrophoresetechniken zu reinigen und massenspektrometrischen Analysen zugänglich zu machen, waren nur in Teilen erfolgreich. Erst die Markierung des D1-Proteins mit einem 10fachen His-Tag im D-de Loop war erfolgreich und bildete die Grundlage für die Isolierung sowohl des nativen PSII als auch des D1-Proteins durch die IMAC. Das gereinigte D1-Protein wurde als Substrat in

Spaltungsanalysen eingesetzt. Dabei wurde der experimentelle Nachweis erbracht, dass die Protease Deg2 die Spaltung des D1-Proteins unter den hier gewählten Bedingungen nicht initiiert.

Um den D1-Vorläufer (pD1) zu untersuchen, wurden Mutanten verwendet, die ein HA-Tag in der C-terminalen Extension trugen. Es wurde ein Protokoll etabliert, das die native Reinigung des pD1-Proteins über eine Anti-HA Affinity-Matrix ermöglicht. Die Analyse der an pD1 assemblierten Proteine ergab, dass CP43 und auch OEE1 bereits an den pD1-PSII-Komplex gebunden vorliegen. Bei Untersuchung des Assemblierungsstadiums des pD1-Proteins wurde nachgewiesen, dass D1 und pD1 in denselben Superkomplexen innerhalb der Thylakoidmembran vorkommen.

### 4.1 Strategien zur Isolierung des D1-Proteins

#### 4.1.1 Optimierung des Zellaufschlusses

Grundlage und ein besonders kritischer Schritt jeder Proteinreinigung ist der Zellaufschluss, bei dem das zu reinigende Protein chemischen und enzymatischen Prozessen ausgesetzt wird. In einem ersten Schritt wurden die *Chlamydomonas* Zellen entweder durch Ultraschall oder mit Hilfe der „Yeda-Press“ aufgeschlossen und Ausbeute sowie Qualität des D1-Proteins mit Hilfe einer Western-Blot Analyse untersucht (Abb. 3.1.1).

Durch Ultraschall wurde lediglich von einem Teil der Algenzellen die Zellwand aufgebrochen. Obwohl der Aufschluss bei 4°C durchgeführt wurde, kam es während der Ultraschallpulse zu einer beträchtlichen Temperaturerhöhung, und es bestand so die Gefahr, dass Proteasen das D1-Protein während des Zellaufschlusses abbauen. Durch die „Yeda-Press“ Behandlung dagegen wurde Thylakoidmembranmaterial gewonnen, das einen hohen D1-Anteil aufwies. Die Kühlkette ließ sich bei diesem Aufschluss ständig aufrecht erhalten.

Als Aufschlusspuffer wurden ein Natriumhydrogencarbonat-Puffer eingesetzt. Das bot den Vorteil, dass nachfolgende Solubilisierungsvorgänge nicht beeinflusst und die Verwendung Amin-reaktiver Substanzen (wie z.B. NHS-Ester) nicht behindert wurden. Nach Reichardt verhindert Natriumhydrogencarbonat außerdem den Einschluss von Proteinen, die nicht mit der Membran assoziiert sind, in die bei der Solubilisierung gebildeten Mizellen. Diese Proteine wurden durch die solvatische Interaktion der Fraktion der gelösten Moleküle mit den Ionen des Elektrolyten ausgesalzen [Reichardt, 1990].

### 4.1.2 Darstellung des D1-Proteins in der 2D-Gelelektrophorese

Zunächst wurde das D1-Protein mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese (2D-GE) analysiert. Die Schwierigkeiten bestanden vor allem darin, einen geeigneten Solubilisierungspuffer für die Thylakoidmembran-Proteine zu finden. Es gelang, das D1-Protein in der zweiten Dimension als einzelnen Proteinspot darzustellen und massenspektrometrisch nachzuweisen.

In die 2D-GE wurde Thylakoidmembranmaterial der Mutanten IL und Del1 eingesetzt. Der Stamm IL transkribiert ein Intron-loses *psbA*-Gen [Heiß, 1992], die translatierte Aminosäuresequenz ist mit der des Wildtyps identisch. Die Mutante Del1 besitzt eine 425bp umfassende Deletion im *psbA*-Gen und translatiert ein verkürztes D1-Protein (tD1) mit einem C-Terminus, der auf Grund einer Leserasterverschiebung aus 30 Aminosäureresten besteht, die die D1-Struktur unterbrechen. Außerdem enthält tD1 so genannte „rare“ Kodons, so dass die Möglichkeit besteht, dass das Protein von einer tm-RNA markiert wird [Preiß *et al.*, 2001].

Zunächst wurde die 2D IEF/SDS-PAGE eingesetzt, um das D1- und das pD1-Protein als einzelnen Proteinspot darzustellen. Nach der Optimierung der Solubilisierung wurde durch die Verwendung eines CHAPS/Thiourea/Urea-haltigen Puffers in der IEF eine sehr gute Proteinfokussierung erreicht. Das elektrisch neutrale Detergenz CHAPS (CMC: 6-10 mM) solubilisierete die Proteine besser als die nicht ionischen Detergentien NP40 (CMC: 0,05-0,3 mM) und DoDM (CMC: 0,15 mM) [Black, 1998], obwohl diese durch ihre niedrigere CMC eine höhere Affinität zu den Membranproteinen besitzen [Neugebauer, 1990]. Milde Detergentien wie NP40 und DoDM waren nicht in der Lage, die unspezifische Assoziation stark hydrophober Membranproteine untereinander zu lösen. Das zwitterionische Detergenz CHAPS beeinflusste Protein/Protein-Interaktionen ähnlich gut wie ionische Detergentien, wirkte sich aber nicht negativ auf die Fokussierung während der IEF aus. Für die Solubilisierung spielt die Länge der Alkylkette ebenfalls eine wichtige Rolle. Detergentien mit längeren Alkylketten, *i.e.* stärkerem hydrophoben Effekt, solubilisieren Proteine besser als Detergentien mit kurzen Alkylketten. Grund dafür ist, dass der Protein/Detergenz-Komplex durch Imitation der Lipiddoppelschicht stabilisiert wird. Bei zu langer Alkylkette beeinflusst das Detergenz jedoch die Helix-Helix-Interaktion [Columbus *et al.* 2006].

Urea entfaltet die Proteine, wodurch es zur Änderung der Hydroxygruppen-Bindungsstruktur kommt. Durch diese provozierte Exposition der hydrophoben Gruppen zur Lösung hin kann es jedoch zur Adsorption der Proteine an die Matrix des IEF-Gelstreifens kommen [Herbert, 1999]. Um das zu umgehen wurde Thiourea eingesetzt. Dieses Chaotrop erhöht die

Löslichkeit der Membranproteine und reduziert die Bildung von Gauss-Schwänzen [Lanne, 2001].

Nach Auftrennung der Thylakoidmembranproteine in der 2D IEF/SDS-PAGE wurden bei der Mutante IL (Abb. 3.1.2 (A)) zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa detektiert, die bei der Mutante Del1 (Abb. 3.1.2 (C)) fehlten. Durch Immunreaktion wurden diese Proteine als D1 (Abb. 3.1.2 (B)) und D2 (Daten nicht gezeigt) identifiziert. In der Silberfärbung wurde bei Del1 ein ca. 16 kDa großes Protein sichtbar gemacht, das bei IL nicht auftrat. Dabei handelt es sich vermutlich um das Protein tD1. Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Mengen von D1, D2 und tD1 reichten jedoch für einen massenspektrometrischen Nachweis nicht aus. Bei Verwendung der doppelten Probemengen wurde die erste Dimension der 2D IEF/SDS-PAGE überladen und die Proteinprobe unvollständig fokussiert.

Erst nach Verwendung der 2D BN/SDS-PAGE gelang es, Colloidal-Coomassie färbare Mengen der Proteine D1 und D2 aufzutrennen (Abb. 3.1.3 (A)). Die Proteine D1 und D2 sowie LhcbI und Cytf wurden durch einen PMF identifiziert (Tab. 3.1). Da jedoch nur nanomolare Mengen des D1-Proteins isoliert wurden, war auch diese Methode für präparative Zwecke ungeeignet.

Bei der Mutante Del1 wurden die PSII-Proteine D2, CP43 und CP47 in der 2D-GE nicht nachgewiesen (Abb. 3.1.2 (C), Abb. 3.1.3 (B)). Preiß *et al.* zeigten, dass tD1 unmittelbar nach seiner Synthese durch Proteasen abgebaut wird. Die PSII-Proteine werden in Abwesenheit des D1-Proteins nicht zu einem Komplex assembliert und in Folge dessen in geringeren Mengen translatiert und ebenfalls abgebaut.

Das tD1-Protein wurde in der 2D BN/SDS-PAGE auch in keinem anderen Thylakoidmembrankomplex detektiert (Abb. 3.1.3 (B)). Entweder wurde das Protein während der Solubilisierung durch Proteasen abgebaut oder die tD1-Mengen waren zu gering, um sie durch Colloidal-Coomassie zu färben.

### **4.2 Konstruktion einer Mutante mit 10fachem His-Tag im D1-Protein**

Das D1-Protein des Stammes IL wurde nach Auftrennung in der 2D BN/SDS-PAGE durch Colloidal-Coomassie gefärbt und durch massenspektrometrische Analysen nachgewiesen. Präparative Mengen des Proteins wurden dabei jedoch nicht gewonnen.

Daher wurde in einem neuen Ansatz die Grundlage für die Reinigung des D1-Proteins durch die IMAC geschaffen und das D1-Protein mit einem His-Tag versehen. Als Ausgangspunkt dienten Publikationen, die die Integration eines 6fachen His-Tags in das D1-Protein [Wilski, 2004], in das D2-Protein [Sugiura *et al.* 1998], in CP43 [Sugiura und Inoue, 1999], in CP47 [Suzuki *et al.* 2003] und in das PsbH-Protein [Cullen *et al.* 2007] beschreiben. Statt eines 6fachen His-Tags, der sich in Vorexperimenten als ungeeignet erwies (Daten nicht gezeigt), wurde ein 10facher His-Tag in das D1-Protein integriert, um die Bindungsstärke des Proteins an die IMAC zu erhöhen.

Der 10fache His-Tag wurde weder an den N- noch an den C-Terminus des D1-Proteins platziert, da diese Bereiche essentiell für die Insertion des D1-Proteins in die Thylakoidmembran, den Abbau durch FtsH-Proteasen und die D1-Reifung sind [Nixon *et al.* 1992; Takahashi *et al.* 1996; Sugiura *et al.* 1998, Komenda *et al.* 2007]. Bei dem Versuch von Sugiura *et al.* einen 6fachen His-Tag mit dem N-Terminus des D1-Proteins der *C. reinhardtii* zu fusionieren, wurden keine photoautotroph wachsenden Transformanten erhalten.

In der Literatur gibt es Hinweise auf einen vergleichsweise wenig konservierten Bereich im D1-Protein in *Synechocystis*, der offenbar Peptidinsertionen bis zu 15 Aminosäuren ohne Funktionsverlust zulässt [Kless und Vermaas, 1995]. Dieser Bereich zwischen der Helix D und der Helix D-de (Abb. 1.3) wird als mögliche Erkennungs- und Spaltungsregion für die Deg2-Protease diskutiert, die mit einem primären Schnitt den D1 Abbau einleitet [Greenberg *et al.* 1989]. Eine Reihe von Arbeiten, in denen u.a. Teile dieser Loop-Region ohne Beeinträchtigung des Abbaus deletiert wurden, unterstützen diese Hypothese jedoch nicht [Aro *et al.* 2005].

Dessen unberücksichtigt, wurden Zellen des Stammes Del1 mit einem *psbA*-Konstrukt, das die Sequenz für einen 10fachen His-Tag in der *BstEII*-Schnittstelle enthielt, transformiert. Die Transformanten wurden auf Photoautotrophie selektiert. Eine homoplasmische Mutante wurde His10 genannt (Abb. 3.2.1) und die korrekte Insertion durch DNA-Sequenzierung verifiziert (Abb. 3.2.2).

Wachstums- (Abb. 3.2.4) und Photosyntheserate der Mutante His10 wurde mit den entsprechenden Werten des Referenzstammes IL verglichen. Durch die Insertion des His-Tags wurden diese Parameter nur geringfügig reduziert. Auch *psbA*-mRNA- und D1-Protein-Menge der Mutante His10 waren nur leicht reduziert und ähnelte denen des Referenzstammes (Abb. 3.2.3).

Ein Grund für die verringerte D1-Protein-Menge ist vermutlich eine schlechtere Zugänglichkeit von Protease-Schnittstellen durch die Integration des His-Tags in den D-de Loop. Daraufhin wird geschädigtes D1-Protein langsamer aus dem PSII ausgebaut. Folglich kann eine neue, funktionelle D1-Kopie erst verzögert in den PSII-Komplex reintegriert werden. Dadurch verringern sich Netto-Photosynthese- und Wachstumsrate. Vermutlich werden dadurch auch die Transkription der *psbA*-mRNA und die D1-Translation reduziert. Außerdem kann die Bindung von Kofaktoren (Abb. 1.3) an das D1-Protein durch den His-Tag beeinträchtigt werden und somit die genannten Parameter negativ beeinflussen.

### 4.3 Reinigung des PSII-Komplexes und des D1-Proteins unter Verwendung von Ni-NTA Agarose

Für die Reinigung des His-markierten D1-Proteins wurde Nickel-Nitrilotriaceticacid (NTA) Agarose verwendet. NTA besitzt gegenüber anderen Materialien den Vorteil, dass sie vier der sechs Ligandenbindestellen des Nickelions besetzt [Hochuli, 1989]. Nur zwei der Bindestellen interagieren mit den Histidinen des Proteins. Dadurch wird ausgeschlossen, dass die Nickelionen beim Chelatieren des 10fachen His-Tags von der Matrix gewaschen werden [Sulkowski, 1985].

In einem ersten Ansatz wurde ein Batch-Protokoll nach Quiagen verwendet (Kapitel 3.3.1). Aceton-gefällte, solubilisierte Thylakoidmembranproteine wurden mit Ni-NTA Agarose inkubiert. Im Elutionsschritt wurde das D1-Protein des Stammes His10 durch einen pH-Shift eluiert und in Colloidal-Coomassie färbbaren Mengen erhalten. Es wurde jedoch auch unspezifisch an die Ni-NTA Agarose assoziiertes Protein eluiert (Abb. 3.3.1). Durch Einsatz verschiedener Konzentrationen an Imidazol und Histidin wurden die unspezifischen Wechselwirkungen reduziert. Dabei wurde jedoch auch das D1-Protein von der Ni-NTA Agarose entfernt. Da das D1-Protein im denaturierten Zustand nicht ohne Verunreinigungen aus der Thylakoidmembran isoliert werden konnte, wurde das D1-Protein in folgenden Untersuchungen zunächst im PSII-Komplex im nativen Zustand belassen und dann eluiert.

Mit Dodecylmaltosid solubilisierte Thylakoidmembranproteine wurden dazu in Anlehnung an das von Sugiura *et al.* etablierte Protokoll nativ auf eine Ni-NTA Agarose-Säule geladen [Sugiura *et al.* 1998]. Nach dem Waschen mit Imidazol-haltigem Puffer wurden das D1-Protein, sowie die an das D1-Protein assoziierten PSII-Proteine eluiert. Durch die Sättigung der Matrix mit nativen PSII-Partikeln wurden unspezifisch an die Matrix assoziierte Proteine verdrängt (Abb. 3.3.2). Im PSII-Komplex wurden die Proteine D1, D2, CP43 und CP47 (Abb. 3.3.3), nicht aber LHCII-Proteine (Daten nicht gezeigt) immunologisch nachgewiesen.

## Diskussion

Damit wurde eine schnelle und saubere PSII-Präparation unter Verwendung des His-markierten D1-Proteins erhalten (Kapitel 3.3.2).

Anschließend wurden die an die Säule gebundenen PSII-Komplexe unter verschiedenen Bedingungen gewaschen, um an das D1-Protein assoziierte Proteine zu entfernen (Kapitel 3.3.3). Nach dem Austesten verschiedener Pufferzusätze gelang es, unter Verwendung eines 8 M Urea-haltigen Puffers in Kombination mit einem 0,3 % SDS (w/v)-haltigen Puffer, die an das D1-Protein assoziierten Proteine zu entfernen. Das Chaotrop Urea entfaltet die Proteine, die dadurch die hydrophoben Bereiche zur Lösung hin exponieren [Herbert, 1999]; durch das Detergenz SDS wurden sie anschließend in Mizellen integriert und gewaschen. Danach wurde das D1-Protein mit einem 200 mM Imidazol-haltigen Waschlösungspuffer eluiert.

Nach dem Einengen des D1-Eluates mit Hilfe einer 5 kDa Amicon-Ausschluss säule wurden Coomassie-färbbare Mengen eines von Proteinverunreinigungen weitgehend befreiten D1-Proteins erhalten (Abb. 3.3.5). Diese D1-Präparation weist nach dem Auftrennen im SDS-Acrylamidgel drei Proteinbanden auf. Im 30 kDa-Bereich wurde durch Immunreaktionen und Massenanalyse nur das 38 kDa große D1-Protein nachgewiesen (Abb. 3.3.4, Abb. 3.3.6). Im 60 kDa-Bereich wurde durch Immunreaktionen und Massenanalyse neben dem D1-Protein auch noch das D2-Protein nachgewiesen (Abb. 3.3.4). Zwischen Trenn- und Sammelgel tritt eine Aggregatbande auf, die ebenfalls D1- und D2-Protein enthält.

Die Kontamination mit dem D2-Protein könnte sich darauf zurückführen lassen, dass der Stamm His10 vor der D1-Präparation unter normalen Lichtbedingungen ( $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) angezogen wurde. Denn schon bei schwacher Belichtung kommt es nach Ishikawa *et al.* zur Bildung kovalenter Vernetzungsprodukte zwischen D1 und D2, sowie zwischen anderen PSII Komponenten [Ishikawa *et al.* 1999].

Nach Abschluss des experimentellen Teils dieser Arbeit wurde von Muktiono *et al.* die chromatographische Reinigung eines D1-Proteins aus *Pisum sativum*, *Vicia faba* und *Lactuca sativa* beschrieben. In dem dort verwendeten Protokoll schließen sich an die Solubilisierung der Thylakoidmembranproteine mehrere Chromatographieschritte an [Muktiono *et al.* 2008]. Das in der vorliegenden Arbeit etablierte Protokoll hingegen gewährleistet die Isolierung des D1-Proteins in einem einzigen, an die Solubilisierung angeschlossenen Chromatographieschritt. Dadurch werden für Solubilisierung und D1-Präparation lediglich 4 h benötigt. Ein weiterer Vorteil der hier beschriebenen Methode ist, dass das D1-Protein während der Reinigung nicht artifiziell modifiziert wird.

#### 4.4 Spaltung des D1-Proteins durch Proteasen

Am Abbau des D1-Proteins sind Deg- [Haußühl *et al.* 2001, Sun *et al.* 2007, Kapri-Pardes *et al.* 2007] und FtsH-Proteasen [Lindahl *et al.* 2000, Komenda *et al.* 2006, Cheregi *et al.* 2007; Yoshioka *et al.* 2006, Komenda 2007] beteiligt. Der exakte Mechanismus des proteolytischen Abbaus und die Identität der dabei entstehenden Fragmente sind noch nicht geklärt.

Um zu überprüfen, ob das D1-Protein in seiner isolierten Form reproduzierbar durch Proteasen gespalten werden kann, wurde Proteinase K als Modell-Protease eingesetzt (Kapitel 3.4.1.2).

Mit dem D1-Protein als Substrat wurden pH- und Temperaturoptimum der Protease ermittelt. Die Daten wurden mit denen von Kraus und Femfert verglichen [Kraus und Femfert 1976] und stimmen mit diesen überein. Zusätzlich wurde in einer Zeitreihe ermittelt, welche D1-Fragmente innerhalb von 24 h auftraten (Abb. 3.4.2). Ein Fragment wurde durch den Edman-Abbau sequenziert (Abb. 3.4.3, Abb. A9)): die Spaltstelle befand sich exakt nach der vierten transmembranen Domäne und könnte darauf hinweisen, dass die initiale Spaltung des D1-Proteins bevorzugt nach hydrophoben Bereichen erfolgte.

Das durch die Proteinase K generierte Spaltmuster des D1-Proteins war unter verschiedenen pH- und Temperaturbedingungen identisch, damit wurde gezeigt, dass das isolierte D1-Protein für Spaltungsstudien geeignet ist.

Die erfolgreiche Spaltung des D1-Proteins mit der Modellprotease führte zu Versuchen, bei denen die heterolog exprimierte Deg2-Protease [Haußühl *et al.* 2001] mit dem isolierten D1-Protein inkubiert wurde. Die nativ aus *E.coli* isolierte Protease (Abb. 3.4.4) erzeugte jedoch auch nach Veränderung der Reaktionsbedingungen, der Redoxverhältnisse und nach der Zugabe von GTP (Kapitel 3.4.1.3) keine D1-Fragmente. Eine spätere Arbeit von Huesgen *et al.* zeigte, dass die D1-Spaltung auch in Abwesenheit der Deg2-Protease stattfinden kann [Huesgen *et al.* 2007]. Damit ist diese Protease möglicherweise doch nicht an der D1-Spaltung *in vivo* beteiligt [Nixon *et al.* 2010]. Weitere Versuche, bei denen entweder Thylakoide oder der nach der Membranpräparation erhaltene Überstand mit dem gereinigten D1-Protein unter verschiedenen Bedingungen inkubiert wurden, zeigten ebenfalls keinen Abbau des D1-Proteins (Kapitel 3.4.1.4). Lediglich bei einer Untersuchung, in der Thylakoidmembranmaterial nach dem „Yeda-Press“ Aufschluss für 3 h bei 4°C inkubiert wurde, enthielt die sich anschließende D1-Präparation Fragmente dieses Proteins (Abb. 3.4.1). Es war aber nicht möglich, sequenzierbare Mengen dieser Fragmente zu generieren (Kapitel 3.4.1.1).

Ein Grund für die ausbleibende Spaltung des D1-Proteins *in vitro* könnte die Anwesenheit des Detergenzes DoDM in den Reaktionsansätzen sein. Es gibt Hinweise darauf, dass die Aktivität der D1-abbauenden Proteasen in Anwesenheit solubilisierender Agentien beeinträchtigt wird [Spetea *et al.* 2007]. Versuche, das Detergenz aus der Präparation zu entfernen, führten zur Bildung unlöslicher D1-Aggregate (Daten nicht gezeigt).

### 4.5 Spaltung des D1-Proteins durch ROS

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können Proteine, Lipide und DNA schädigen. Um die Schäden zu minimieren, reagiert der Organismus mit drei verschiedenen Arten der Abwehr:

- 1) Vermeidung der Entstehung reaktiver Spezies (z.B. indem die Überreduktion während des Elektronentransportes verhindert wird)
- 2) Detoxifikation
- 3) Reparatur oder Abbau geschädigter Komponenten [Møller und Kristensen, 2004].

Während der Belichtung stellen Chloroplasten und Peroxisomen in grünen Pflanzen die Hauptquelle der ROS-Produktion dar. Im Chloroplasten wird in den Photosystemen I und II Superoxid als Nebenprodukt gebildet. Außerdem entsteht im PSII während des Elektronentransportes Singulett-Sauerstoff. Dieser verursacht reversible Proteinoxidationen und kovalente Modifikationen. ROS führen speziell im D1-Protein zur Bildung von intra- und intermolekulare Disulfidbrücken. Durch ROS werden Methionine zu Methioninsulfoxid oxidiert, Arginin und Prolin zu Glu- $\gamma$ -semialdehyd, Histidin zu 2-Oxohistidin, Lysin zu Amino-adipic semialdehyd, Tryptophan zu Kynurenin [Møller *et al.* 2007], Threonin zu Amino-ketobutyrat und Tyrosin wird zu Dityrosin tautomerisiert [Shacter, 2000].

Um oxydativen Schäden enzymatisch entgegen zu wirken, werden in *C. reinhardtii* Katalasen, Glutathion-Peroxidasen, Ascorbat-Peroxidasen und Superoxid-Dismutasen exprimiert [Mendez-Alvarez *et al.* 1999].

#### 4.5.1 Modifizierung und Spaltung des D1-Proteins durch Wasserstoffperoxid

Durch Wasserstoffperoxid hervorgerufener Stress führt zur Schädigung des PSII-Komplexes [Allakhverdiev und Murata, 2004]. Lupinkova und Komenda eluierten das D1-Protein aus dem SDS-Acrylamidgel und inkubierten es mit Wasserstoffperoxid. Anschließend wiesen sie 24, 20, 5 und 9 kDa große D1-Fragmente in der Immunreaktion nach. Die dargestellten Spaltfragmente sind jedoch nur schlecht von der ungespaltenen Kontrolle zu unterscheiden [Lupinkova und Komenda, 2004]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das D1-Protein

ebenfalls mit Wasserstoffperoxid behandelt (Kapitel 3.4.1.5). Der Nachweis der Schädigung des D1-Proteins erfolgte sehr detailliert durch die Silberfärbung. Als Kontrolle diente D1-Protein, das ohne Zusatz von Wasserstoffperoxid bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Bei der Kontrolle traten keine D1-Modifikationen auf. In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid hingegen wurde das D1-Protein vollständig abgebaut (Abb. 3.4.6). Bei Zugabe des Chelators EDTA wurde die Bildung von intramolekularen Vernetzungen beobachtet. Das D1-Protein zeigte eine geringere elektrophoretische Mobilität im SDS-Acrylamidgel (Abb. 3.4.5) und es entstanden distinkte Spaltfragmente (Abb. 3.4.6). Diese Beobachtungen lassen sich mit der Anwesenheit von Metallionen erklären. In der Fenton-Reaktion reagieren Eisen und Wasserstoffperoxid zu Eisen(III), einem Hydroxylradikal und einem Hydroxylanion. Das Hydroxylradikal geht radikalische Reaktionen ein, die ohne Anwesenheit eines Chelators mit hoher Geschwindigkeit stattfinden. Dabei werden Peptidbindungen zwischen den Aminosäuren des D1-Proteins gespalten. Nach Zugabe von EDTA bzw. EGTA werden die Metallionen komplexiert. Nur wenige Eisen-Ionen liegen in Lösung vor und können die Fenton-Reaktion initiieren. Bei der initialen Spaltung werden voraussichtlich hydrophobe Bereiche diskriminiert und zuerst hydrophile, zur Lösung hin exponierte Areale gespalten. Auch andere niedervalente Metallkomplexe wie Cu(II), Ti(III), Cr(II), Co(II) und Ni(II) können als Fenton-Reagenz wirken [Torreilles *et al.* 1990]. Falls die D1-Präparation keine Eisen-Ionen mehr enthielt, wirkten vermutlich von der Säule gewaschene Nickelionen, die durch den His-Tag komplexiert vorlagen, als Fenton-Reagenz.

### 4.5.2 Oxidation von Methioninen im D1-Protein

Oberflächenexponierte Methionine und Tryptophane werden von Proteinen als „Antioxidantien“ genutzt [Møller und Kristensen, 2006]. In Gegenwart von ROS werden sie oxidiert. Dadurch werden aktive Stellen und sensitive Domänen eines Proteins geschützt und die biologische Funktion des Moleküls wird aufrecht erhalten [Maier *et al.* 1995]. In diesem regulatorischen Prozess spielen Methionin-Sulfoxid-Reduktasen eine wichtige Rolle [Sundby *et al.* 2005]. Sie katalysieren Thiothionin-abhängig die Reduktion von Methioninsulfoxid zu Methionin.

Vermutlich dienen auch oberflächenexponierte Methionine des D1-Proteins dazu, ROS unschädlich zu machen. Dabei könnte OEE1 als Thiothionin agieren [Heide *et al.* 2004].

Die Oxidation von Methionin zu Methioninsulfoxid kann durch Cyanogenbromid-Spaltung nachgewiesen werden [Morgan *et al.* 1993, Levine *et al.* 1996, van Montfort *et al.* 2002]. Wenn Methionin oxidiert vorliegt, findet keine Spaltung statt; ist es hingegen nicht oxidiert,

wird die carboxyterminale Peptidbindung gespalten und Methionin wird zu Homoserin umgewandelt. Diese Methode eignet sich nicht, um *in vivo* stattfindende Methioninoxidationen im D1-Protein nachzuweisen, denn eine Oxidation findet auch während der D1-Präparation (unter normalen atmosphärischen Bedingungen) statt.

Um *in vivo* stattfindende Methioninoxidationen des D1-Proteins zu untersuchen, muss der Chlorophyceen radioaktiv markierter Sauerstoff unter verschiedenen physiologischen Bedingungen zur Verfügung gestellt werden. Nach D1-Präparation und tryptischem Verdau des D1-Proteins können dann die Methionine ermittelt werden, die zu Methioninsulfoxid umgewandelt wurden.

### 4.6 Nachweis der Carbonylierung von PSII-Proteinen

Als Reaktion auf oxydativen Stress werden bei den unterschiedlichsten Spezies Carbonylierungen induziert. Carbonylierte Proteine können nicht regeneriert werden. Sie werden von Proteasen degradiert und anschließend durch intakte Kopien ersetzt. In Pflanzenzellen werden im Durchschnitt 4 nmol Carbonylgruppen pro mg Protein nachgewiesen. Während der reproduktiven Phase sinkt der Carbonylgruppenanteil, um den Transfer von oxydativ geschädigten Komponenten zu reduzieren [Møller *et al.* 2007].

Nakamura und Goto wiesen carbonylierte Proteine durch Immunreaktion nach: DNPH wurde an Carbonylgruppen gebunden und von einem Antikörper detektiert. Durch Einsatz dieser Methode wurden oxydativ geschädigte Proteine detektiert [Nakamura und Goto, 1996]. Es war jedoch nicht möglich, unmittelbar nach der Immunreaktion eine Massenanalyse durchzuführen. Anderson *et al.* isolierten carbonylierte, Hydrazin-gekoppelte Peptide von CP47 über eine Avidin-Säule. Anschließend wurden die Peptide massenspektrometrisch analysiert [Anderson *et al.* 2004]. Die verwendeten experimentellen Bedingungen (Inkubation der Probe bei Raumtemperatur und Raumlicht; Zusatz von SDS und Urea während der Markierung) machen es jedoch unmöglich, das Carbonylierungsmuster des PSII-Komplexes zu untersuchen.

Lushchak wies Carbonylgruppen von Proteinen durch das Girard P Reagenz nach [Lushchak, 2006]. Yoo und Regnier koppelten Biotin-Hydrazid an Carbonylgruppen von Proteinen. Anschließend wiesen sie Biotin-Hydrazid im SDS-Acrylamidgel durch einen Avidin-FITC Antikörper nach [Yoo und Regnier, 2004].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die von Yoo und Regnier etablierte Methode modifiziert, um carbonylierte PSII-Proteine nachzuweisen (Kapitel 3.4.2). In den Biotinylierungs-Assay wurden native Thylakoidmembranproteine eingesetzt (Yoo und Regnier: Fällung der Proteine

vor der Biotinylierung). Die Markierung erfolgte mit 1,25 mM Biotin-Hydrazid für 8 h bei 4°C (Yoo und Regnier: 5 mM Biotin-Hydrazid für 2 h bei RT). Freies Biotin-Hydrazid wurde nach der Markierung aus dem Reaktionsansatz entfernt, indem der PSII-Komplex an die Ni-NTA Agarose-Säule gebunden und mehrfach mit Waschpuffer gewaschen wurde (Yoo und Regnier: TCA-Fällung der markierten Proteine). Nach Konjugation des Avidin-FITC Antikörpers wurde das SDS-Acrylamidgel mindestens 2½ h in PBST belassen (Yoo und Regnier: 20 min), um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Wurden die Algenzellen bei 60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  angezogen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine deutliche Carbonylierung von D1, D2, CP43 und CP47 beobachtet (Abb. 3.4.7). Die LHC-Proteine hingegen wurden nur schwach carbonyliert. Diese Beobachtung ist damit zu erklären, dass auch bei physiologischer Belichtung eine ständige oxydative Schädigung der PSII-Proteine, die an den Wasserspaltungsapparat sowie an P680 angrenzen, stattfindet. Während der Ladungstrennung und der Wasserspaltung werden Radikale gebildet, die unter anderem Seitenketten von Arg, His, Lys, Pro, Thr und Trp carbonylieren.

Wurden die Algenzellen für 24 h unter Lichtausschluss angezogen, wurde keine Carbonylierung der Thylakoidmembranproteine beobachtet (Abb. 3.4.8). Im Dunklen fanden keine Ladungstrennung und keine Wasserspaltung statt. Radikale wurden nicht gebildet und die Carbonylierung von Proteinseitenketten blieb aus.

Unabhängig von den PSII-Proteinen wurden weitere Reaktionen des Avidin-FITC-Antikörpers mit Biotin beobachtet (Abb. 3.4.7). Biotin tritt *in vivo* als Kofaktor auf und wird von dem eingesetzten Antikörper ebenfalls erkannt. Außerdem wird am P700 des PSI während der Ladungstrennung ebenfalls Singulett-Sauerstoff gebildet, der zur Carbonylierung von Proteinseitenketten führen kann.

Durch den zeitlich begrenzten Rahmen der vorliegenden Arbeit, war es nicht möglich, weitere physiologischen Bedingungen zu untersuchen, unter denen eine Carbonylierung erfolgt, sowie die carbonylierten Aminosäurereste der PSII-Proteine zu identifizieren.

### 4.7 Reinigung des pD1-Proteins und daran assemblierender Proteine

Nach Schädigung und Abbau des D1-Proteins wird eine neusynthetisierte Kopie in den PSII Komplex inseriert. Dabei wird zuerst ein Vorläuferprotein (pD1) synthetisiert, das nach Abspalten der C-terminalen Extension (ein Telopeptid von x Aminosäuren) durch die CtpA in das reife, aktive Protein umgewandelt wird. An der Synthese und der Reifung von pD1 sind verschiedene Proteine beteiligt, von denen einige bereits identifiziert und charakterisiert

wurden. Dazu gehören zum Beispiel cpSRP54 [Aro *et al.* 2005], RB47 und RB60 [Trebitsh *et al.* 2001, Kim und Mayfield, 2002, Alergand *et al.* 2006], Hsp70B und REP27 [Park *et al.* 2007, Dewez *et al.* 2009], Slr1471p [Ossenbühl *et al.* 2006], sowie HCF136 [Plücken *et al.* 2002, Komenda *et al.* 2008].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die pD1-Mutanten MCS4 und MCS8 verwendet, um an das pD1 gebundene Proteine zu identifizieren (Kapitel 3.5). Die Mutanten MCS4 und MCS8 besitzen eine 4 kDa bzw. 8 kDa umfassende C-terminale Extension des D1-Proteins (D. Fischer, unveröffentlicht). Die Extensionen beinhalten einen His- und einen HA-Tag (Abb. 3.5.1). Wird die C-terminale Extension modifiziert, verlangsamt sich die Reifung von pD1 und die Effizienz des Reparaturzyklus wird verringert [Komenda *et al.* 2007]. Fischer beobachtete, dass das pD1 der Mutanten MCS4 und MCS8 im Starklicht ( $2000 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) akkumulierte. Erst nach einer Nachsynthesephase (bei  $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ), in der pD1 weiter akkumulierte, wurde pD1 in das reife D1-Protein umgewandelt.

Um Vorläufer-assoziierte Proteine zu identifizieren, wurden in einem ersten Versuch solubilisierte Thylakoidmembranen von MCS4 in die PSII-Präparation unter Verwendung der Ni-NTA Agarose-Säule eingesetzt. pD1 aus MCS4 und daran assemblierte Proteine sollten so nativ isoliert werden. Durch Immunreaktion wurde das pD1-Protein des Stammes MCS4 zwar im Eluat nachgewiesen (Abb. 3.5.2 (A), (B)), es wurden jedoch überwiegend auch unspezifisch gebundene Protein eluiert (Abb. 3.5.2 (C)). Vermutlich band der 6fache His-Tag des Stammes MCS4 nur schwach an die Nickel-Matrix, so dass andere Histidin-reiche Proteine mit dem pD1-Protein um die freien Bindestellen auf der Nickelmatrix konkurrierten. Daher wurde in folgenden Untersuchungen eine Anti-HA Affinity-Matrix verwendet, um das pD1-Protein und daran assoziierte Proteine nativ zu isolieren (Abb. 3.5.3). Bei der Bindung eines HA-Tags an die Antigen-Matrix wurden wesentlich weniger Proteine unspezifisch adsorbiert als bei der Verwendung eines His-Tags an die Nickel-Matrix.

Thylakoidmembranen der Mutanten MCS4 und MCS8 wurden nativ solubilisiert und mit der Anti-HA Affinity-Matrix inkubiert. Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Protokoll ermöglichte die native Elution des pD1 und daran assoziierter Proteine (Abb. 3.5.3). Das Eluat enthielt keine Verunreinigungen durch nicht in den PSII-Komplex integrierte Proteine.

Im Eluat der Mutanten MCS4 und MCS8 wurden jeweils pD1, D2, CP47 und CP43 (Abb. 3.5.4), sowie OEE1 (Abb. 3.5.5) durch mehrfach wiederholte Immunreaktionen

nachgewiesen. Der Nachweis von D2 und CP47 in einem pD1 haltigen Komplex wurde erwartet. Denn nach Komenda *et al.*, Minagawa und Takahashi, sowie Danielsson *et al.* bilden diese Proteine den stabilen RC47 [Komenda *et al.* 2004, Minagawa und Takahashi, 2004, Danielsson *et al.* 2006]. Der Nachweis von CP43 im Eluat klärt die offenstehende Frage, ob pD1 zuerst prozessiert wird oder ob CP43 zuerst an RC47 bindet [Zhang *et al.* 1999, Zhang *et al.* 2000, Komenda *et al.* 2004].

Dass OEE1 im Eluat nachgewiesen wurde, widerspricht dem aktuellen Wissensstand gänzlich. Nach Roose und Pakrasi ist die Prozessierung von pD1 essentiell für die Assemblierung eines funktionellen Mangan-Clusters und damit für die Bindung des OEC. Denn in einem CtpA defizienten *Synechocystis* Stamm wurden ausschließlich pD1, keine Mangan-Atome und die Abwesenheit der OEEs beobachtet [Roose und Pakrasi, 2004]. Eine unspezifische Matrix-Bindung von OEE1, das vor Bindung an den PSII-Komplex im Thylakoidlumen akkumuliert [Minagawa und Takahashi, 2004], ist ausgeschlossen. Es liegt eine saubere PSII-Präparation vor, da durch Immunreaktionen weder die Rubisco-LSU noch LHCII-Proteine nachgewiesen wurden (Daten nicht gezeigt).

Vermutlich wird bei Verringerung der Lichtintensität während der Starklichtexposition eine noch stärkere Immunreaktion für OEE1 beobachtet. Henmi *et al.* wiesen in isolierten, mit Starklicht ( $4000 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) behandelten PSII-Membranen von Spinat die Freisetzung der extrinsischen Proteine nach. Induziert wurde dieser Prozess durch die Bildung von Hydroxylradikalen und der daraufhin stattfindenden oxydativen Schädigung des Wasserspaltungsapparates [Henmi *et al.* 2004].

Um die Funktionalität des isolierten pD1-PSII Komplexes zu überprüfen, muss die Sauerstoffentwicklung gemessen werden - dafür war jedoch die Menge der isolierten Komplexe zu gering. Es wird vermutlich keine photochemische Hydrolyse des Wassers stattfinden, da pD1 durch die C-terminale Extension noch nicht in der funktionellen Konformation vorliegt. Außerdem ist denkbar, dass noch nicht alle, für die Wasserspaltung benötigten Mangan-Atome, an pD1 gebunden vorliegen. Publikationen von Diner *et al.*, Nixon *et al.* und Anbudurai *et al.* belegen, dass keine Sauerstoffentwicklung stattfindet, wenn der tetra-Mangancluster nicht vollständig assoziiert wurde [Diner *et al.* 1988, Nixon *et al.* 1992, Anbudurai *et al.* 1994].

Die 2D BN/SDS-PAGE eignet sich optimal für die Analyse von Assemblierungsprozessen [Reisinger und Eichacker, 2007]. Durch diese Methode wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass die Proteine pD1 und D1 im gleichen nativen Thylakoidmembran-

## Diskussion

komplex assoziiert vorlagen (Abb. 3.5.6). Vermutlich assemblierte ein pD1 tragendes PSII mit einem ein D1 tragenden PSII-Komplex.

Das widerspricht der Theorie, dass das pD1-Protein prozessiert werden muss, ehe ein Komplex-Dimer gebildet werden kann [Komenda *et al.* 2004; Aro *et al.* 2005].

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine D1-Präparation etabliert, die es möglich macht, das hydrophobe Thylakoidmembranprotein in zwei Schritten sauber von den übrigen PSII-Proteinen zu trennen: an das Solubilisieren des D1-Proteins wurde nur ein Chromatographieschritt angeschlossen. In dieser D1-Präparation wurden neben dem D1-Protein nur geringste Mengen eines Dimers – bestehend aus D1 und D2 – nachgewiesen.

Des Weiteren wurde der experimentelle Nachweis – basierend auf theoretischen Überlegungen von Nixon *et al.* 2005, Huesgen *et al.* 2006 und Barker *et al.* 2006 - erbracht, dass die Protease Deg2 die Spaltung eines isolierten D1-Proteins nicht initiiert (Nixon *et al.* 2005, Huesgen *et al.* 2006 und Barker *et al.* 2006 wiesen nach, dass die D1-Menge in verschiedenen *deg*-Mutanten unverändert bleibt und somit die Deg-Proteasen nicht an der initialen Spaltung des D1-Proteins beteiligt sind.).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Markierungs- und Nachweismethode von Carbonylgruppen in Thylakoidmembranproteinen, insbesondere in PSII-Proteinen entwickelt. Es wurde gezeigt, dass Carbonylierungen als Folge der Lichtschädigung nach kontinuierlicher Belichtung während der Algenkultivierung auftreten und dass nach 24stündigem Lichtausschluss keine Carbonylierungen mehr detektierbar sind.

Nach der Entwicklung einer Strategie, mit der das pD1-Protein und seine assoziierenden Proteine nativ unter Verwendung einer HA-Matrix gereinigt werden, wurden CP43 und OEE1 gemeinsam mit pD1 isoliert. Das D1-Protein wurde in diesem Komplex nicht detektiert. Dadurch wurde nachgewiesen, dass das pD1-Protein bereits mit CP43 und OEE1 assembliert vorliegt und somit die bis jetzt bestehende Frage geklärt, ob die C-terminale Extension des pD1-Proteins abgespalten werden muss, bevor diese Proteine mit dem PSII-Komplex assembliert werden. Bei Untersuchung des Assemblierungsstadiums des pD1-Proteins wurde nachgewiesen, dass die Proteine D1 und pD1 in *C. reinhardtii* in denselben Superkomplexen innerhalb der Thylakoidmembran vorkommen. Damit wurde die bisherige theoretische Erwägung von Komenda *et al.* 2004 und Aro *et al.* 2005 widerlegt, dass pD1 prozessiert werden müsse, ehe ein Komplex-Dimer gebildet werden kann.

Die gewonnenen Ergebnisse werden in weiterführenden Untersuchungen als innere Orientierungspunkte für D1-Modifikations- und Spaltungsanalysen und für die detaillierte Aufklärung des Ablaufs der pD1-Prozessierung dienen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alergand, T., Peled-Zehavi, Katz, Y. & Danon, A.** (2006). The chloroplast protein disulfide Isomerase RB60 reacts with a regulatory disulfide of the RNA-binding protein RB47. *Plant Cell Physiol* 47(4), 540-548.
- Allakhverdiev, S.I. & Murata, N.** (2004). Environmental stress inhibits the synthesis de novo of proteins involved in the photodamage-repair cycle of Photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim Biophys Acta* 1657, 23-32.
- Anbudurai, P.A., Mor, T.S., Ohad, I., Shestakov, S.V. & Pakrasi, H.B.** (1994). The *ctpA* gene encodes the C-terminal processing protease for the D1 of the photosystem II reaction center complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 8082-8086.
- Anderson, L.B., Ouellette, A.J., Eaton-Rye, J., Maderia, M., MacCoss, M.J., Yates, J.R., 3<sup>rd</sup> & Barry, B.A.** (2004). Evidence for a post-translational modification, aspartyl aldehyde, in a photosynthetic membrane protein. *J Am Chem Soc* 126, 8399-8405.
- Andronis, C., Kruse, O., Deák, Z., Vass, I., Diner, B.A. & Nixon, P.J.** (1998). Mutation of residue threonine-2 of the D2 polypeptide and its effect on photosystem II function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 117, 515-524.
- Armbruster, U., Zühlke, J., Rengstl, B., Kreller, R. Makarenko, E., Rühle, T., Schünemann, D., Jahns, P., Weisshaar, B., Nickelsen, J. & Leister, D.** (2010). The *Arabidopsis* thylakoid protein PAM68 is required for efficient D1 biogenesis and photosystem II assembly. *Plant Cell*, 22, 3439-3460.
- Arnon, D.I.** (1949). Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol* 24, 1-15.
- Aro, E.M., Virgin, I. & Andersson, B.** (1993). Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta* 1143, 113-134.
- Aro, E.M., Suorsa, M., Rokka, A., Allahverdiyeva, Y., Paakkarinen, V., Saleem, A., Battchikova, N. & Rintamaki, E.** (2005). Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *J Exp Bot* 56, 347-356.
- Baena-Gonzales, E. & Aro, E.M.** (2002). Biogenesis, assembly and turnover of photosystem II units. *The Royal Soc* 357, 1451-1460.
- Babcock, G.T., Barry, B.A., Debus, R.J., Hoganson, C.W., Atamian, M., McIntosh, L., Sithole, I. & Yocum, C.F.** (1989). Water oxydation in photosystem II: from radical chemistry to multielectron chemistry. *Biochem* 28, 9557-9565.
- Barber, J.** (2006). Photosystem II: an enzyme of global significance. *Biochem Soc Trans* 34, 619-631.

- Barker, M., de Vries, R., Nield, J., Komenda, J. & Nixon, P.J.** (2006). The DEG proteases protect *Synechocystis* sp. PCC 6803 during heat and light stresses but are not essential for removal of damaged D1-Protein during the photosystem two repair cycle. *J Biol Chem* 281, 30347-30355.
- Bennoun, P., Spierer-Herz, M., Erickson, J., Girard-Bascou, J., Pierre, Y., Delosme, M. & Rochaix, J.D.** (1986). Characterization of photosystem II mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking the *psbA* gene. *Plant Mol Biol* 6, 151-160.
- Berkelman, T. & Stenstedt, T.** (1998). 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients principles & methods. Amersham Pharmacia Biotech Inc.
- Berthold, D.A., Babcock, G.T. & Yocum, C.F.** (1981). A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS Lett* 134 (2), 231-234.
- Birnboim, H.C., & Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Black, S. D.** (1998). Properties of detergents (amphiphiles). <http://psyche.uthct.edu/shaun/SBlack/detergent.htm>
- Braun, R.J., Kinkl, N., Beer, M. & Ueffing, M.** (2007). Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Anal Bioanal Chem* 389, 1033-1045.
- Burton, R.E., Siddiqui, S.M., Kim, Y.I., Baker, T.A. & Sauer, R.T.** (2001). Effects of protein stability and structure on substrate processing by the ClpXP unfolding and degradation machine. *Embo J* 20, 3092-3100.
- Cai, W., Ma, J., Chi, W., Zou, M., Gou, J., Lu, C. & Zhang, L.** (2010). Cooperation of LPA3 and LPA2 Is Essential for Photosystem II Assembly in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 154(1), 109-120.
- Canovas, P.M. & Barber, J.** (1993). Detection of a 10 kDa breakdown product containing the C-terminus of the D1-protein in photoinhibited wheat leaves suggests an acceptor side mechanism. *FEBS Lett*, 324. 341-344.
- Chassin, Y., Kapri-Pardes, E., Sinvany, G., Arad, T. & Adam, Z.** (2002). Expression and characterization of the thylakoid lumen protease DegP1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130, 857-864.
- Cheregi, O., Sicora, C., Kos, P.B., Barker, M., Nixon, P.J. & Vass, I.** (2007). The role of the FtsH and Deg proteases in the repair of UV-B radiation-damaged Photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Biochim Biophys Acta* 1767, 820-828.
- Chi, W., Sun, X. & Zhang, L.** (2011). The roles of chloroplast proteases in the biogenesis and maintenance of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 05 24.
- Chua, N.H. & Bennoun, P.** (1975). Thylakoid membrane polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii*: wild-type and mutant strains deficient in photosystem II reaction center. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 2175-2179.

- Columbus, L., Lipfert, J., Klock, H., Millett, I., Doniach, S. & Lesley, S.A.** (2006). Expression, purification, and characterization of *Thermotoga maritima* membrane proteins for structure determination. *Protein Sci* 15, 961-975.
- Cullen, M., Ray, N., Husain, S., Nugent, J., Nield, J. & Purton, S.** (2007). A highly active histidine-tagged *Chlamydomonas reinhardtii* Photosystem II preparation for structural and biophysical analysis. *Photochem Photobiol Sci* 6, 1177-1183.
- Danielsson, R., Suorsa, M., Paakkarinen, V., Albertsson, P.A., Styring, S., Aro, E.M. & Mamedov, F.** (2006). Dimeric and monomeric organization of photosystem II. Distribution of five distinct complexes in the different domains of the thylakoid membrane. *J Biol Chem* 281, 14241-14249.
- Dauvillee, D., Hilbig, L., Preiss, S. & Johanningmeier, U.** (2004). Minimal Extent of Sequence Homology Required for Homologous Recombination at the *psbA* Locus in *Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplasts using PCR-generated DNA Fragments. *Photosynth Res* 79, 219-224.
- Davies, K.J.** (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* 262, 9895-9901.
- Depka, B., Jahns, P. & Trebst, A.** (1998). Beta-carotene to zeaxanthin conversion in the rapid turnover of the D1-Protein of photosystem II. *FEBS Lett* 424, 267-270.
- de Vitry, C., Olive, J., Drapier, D., Recouvreur, M. & Wollman, F.A.** (1989). Posttranslational events leading to the assembly of photosystem II protein complex: a study using photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* 109, 991-1006.
- de Vitry, C., Diner, B.A. & Popot, J.L.** (1991). Photosystem II particles from *Chlamydomonas reinhardtii*. Purification, molecular weight, small subunit composition, and protein phosphorylation. *J Biol Chem* 266 (25), 16614-16621.
- Dewez, D., Park, S., García-Cerdán, J.G., Lindberg, P. & Melis, A.** (2009). Mechanism of the REP27 protein action in the D1 protein turnover and photosystem-II repair from photodamage. *Plant Physiol.* 151, 88-99.
- Diner, B.A., Ries, D.F., Cohen, B.N. & Metz, J.G.** (1988). COOH-terminal processing of polypeptide D1 of the photosystem II reaction center of *Scenedesmus obliquus* is necessary for the assembly of the oxygen-evolving complex. *J. Biol. Chem.* 263, 8972-8980.
- Diner, B.A. & Wollman, F.A.** (1980). Isolation of highly active photosystem II particles from a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* 110, 521-526.
- Edelman, M. & Mattoo, A.K.** (2008). D1-protein dynamics in photosystem II: the lingering enigma. *Photosynth Res.*
- Elich, T.D., Edelman, M. & Mattoo, A.K.** (1992). Identification, characterization and resolution of the *in vivo* phosphorylated form of the D1 PSII reaction center protein. *J Biol Chem* 267:3523-3529.

- Eubel, H., Braun, H.P. & Millar, A.H.** (2005). Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions. *Plant Methods* 1, 11.
- Ferjani, A., Abe, S., Ishikawa, Y., Henmi, T., Yuka, T., Nishi, Y., Tamura, N. & Yamamoto, Y.** (2001). Characterization of the stromal protease(s) degrading the cross-linked products of the D1-Protein generated by photoinhibition of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1503, 385-395.
- Ferreira, K.N., Iverson, T.M., Maghlaoui, K., Barber, J. & Iwata, S.** (2004). Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* 303, 1831-1838.
- Flynn, J.M., Levchenko, I., Seidel, M., Wickner, S.H., Sauer, R.T. & Baker, T.A.** (2001). Overlapping recognition determinants within the *ssrA* degradation tag allow modulation of proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10584-10589.
- Greenberg, B.M., Gaba, V., Mattoo, A.K. & Edelman, M.** (1987). Identification of a primary in vivo degradation product of the rapidly-turning-over 32kDa protein of photosystem II. *EMBO J.* 6, 2865-2869.
- Greenberg, B.M., Gaba, V., Mattoo, A.K. & Edelman, M.** (1989). Degradation of the 32kDa photosystem II reaction center protein in UV, visible and far-red light occurs through a common 23.5 kDa intermediate. *Z. Naturforsch.* 44c, 450-452.
- Gorman, D.S. & Levine, R.P.** (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 54, 1665-1669.
- Gooderham, K.** (1984). Transfer Techniques in Protein Blotting. In *Methods in Molecular Biology-Proteins*. Walker, J.M., Ed. Humana Press: New York, Vol. 1, pp 165-177.
- Grossman, A.R., Harris, E.H., Hauser, C., Lefebvre, P.A., Martinez, D., Rokhsar, D., Shrager, J., Silflow, C.D., Stern, D., Vallon, O. & Zhang, Z.** (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* at the crossroad of genomics. *Eucaryotic Cell* 2 (6), 1137-1150.
- Häder, D.P.** (1999). *Photosynthese*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hanawa-Suetsugu, K., Bordeau, V., Himeno, H., Muto, A. & Felden, B.** (2001). Importance of the conserved nucleotides around the tRNA-like structure of *Escherichia coli* transfer-messenger RNA for protein tagging. *Nucleic Acids Res* 29, 4663-4673.
- Harris, E.H.** (2001). *Chlamydomonas* as a Model Organism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52, 363-406.
- Haußühl, K., Andersson, B. & Adamska, I.** (2001). A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1-Protein in plant photosystem II. *Embo J* 20, 713-722.

- Hayes, C.S., Bose, B. & Sauer, R.T.** (2002). Stop codons preceded by rare arginine codons are efficient determinants of SsrA tagging in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 3440-3445.
- Heide, H., Kalisz, H.M. & Follmann, H.** (2004). The oxygen evolving enhancer protein 1 (OEE) of photosystem II in green algae exhibits thioredoxin activity. J Plant Physiol, 161, 139-149.
- Heiss, S.** 1992. Untersuchung zur Transformation des Chloroplastens der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* am Beispiel des *psbA*-Gens. Dissertation. Ruhr-Universität Bochum
- Henmi, T., Miyao, M. & Yamamoto, Y.** (2004). Release and reactive-oxygen-mediated damage of the oxygen-evolving complex subunits of PSII during photoinhibition. Plant Cell Physiol 45, 243-250.
- Herbert, B.** (1999). Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. Electrophoresis 20, 660-663.
- Hippler, M., Klein, J., Fink, A., Allinger, T. & Hoerth, P.** (2001). Towards functional proteomics of membrane protein complexes: analysis of thylakoid membranes from *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant J 28, 595-606.
- Hochuli, E.** (1989). Genetically designed affinity chromatography using a novel metal chelate adsorbent. Biol. Act. Mol. 217-239.
- Hou, C.X., Dirk, L.M.A. & Willams, M.A.** (2004). Inhibition of peptide deformylase in *Nicotiana tabacum* leads to decreased D1-Protein accumulation, ultimately resulting in a reduction of photosystem II complexes. Am J Bot 91(9):1304-1311.
- Huch, G.** (1993). Untersuchung des D1-Proteins durch gezielte Veränderung des *psbA*-Gens in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum.
- Huesgen, P.F., Schuhmann, H. & Adamska, I.** (2006). Photodamaged D1-Protein is degraded in *Arabidopsis* mutants lacking the Deg2 protease. FEBS Lett 580, 6929-6932.
- Ishikawa, Y., Nakatani, E., Henmi, T., Ferjani, A., Harada, Y., Tamura, N. & Yamamoto, Y.** (1999). Turnover of the aggregates and cross-linked products of the D1-Protein generated by acceptor-side photoinhibition of photosystem II. Biochim Biophys Acta 1413, 147-158.
- Jegerschöld, C., Virgin, I. & Styring, S.** (1990). Light-dependent degradation of the D1 protein in photosystem II is accelerated after inhibition of the water splitting reaction. Biochemistry 29, 6179-6186.
- Johanningmeier, U. & Heiss, S.** (1993) Construction of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant with an intronless *psbA* gene. Plant Mol Biol 22, 91-99.
- Kanervo, E., Murata, N. & Aro, E.M.** (1998) Massive breakdown of the photosystem II polypeptides in a mutant of the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. Photosynth Res 57, 81-91.
- Kapri-Pardes, E., Naveh, L. & Adam, Z.** (2007). The thylakoid lumen protease Deg1 is involved in the repair of photosystem II from photoinhibition in *Arabidopsis*. Plant Cell 19, 1039-1047.

- Kuwabara, T. & Murata, N.** (1982). Inactivation of photosynthetic oxygen evolution and concomitant release of three polypeptides in the photosystem II particles of spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 23, 533-539.
- Keiler, K.C., Waller, P.R. & Sauer, R.T.** (1996). Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* 271, 990-993.
- Kim, J., Klein, P.G. & Mullet, J.E.** (1991). Ribosomes pause at specific sites during synthesis of membrane-bound chloroplast reaction center protein D1. *J Biol Chem* 266, 14931-14938.
- Kim, J. & Mayfield, S.P.** (2002). The active site of the thioredoxin-like domain of chloroplast protein disulfide isomerase, RB60, catalyzes the redox-regulated binding of chloroplast poly(A)-binding protein, RB47, to the 5' untranslated region of *psbA* mRNA. *Plant Cell Physiol* 43, 1238-1243.
- Kindle, K.L., Richards, K.L. & Stern, D.B.** (1991). Engineering the chloroplast genome: techniques and capabilities for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1721-1725.
- Kless, H. & Vermaas, W.** (1995) Many combinations of amino acid sequences in a conserved region of the D1 protein satisfy photosystem II function. *J Mol Biol* 246(1), 120-31.
- Klein, T.M., Wolf, E.D. & Sanford, J.C.** (1987). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327, 70-73.
- Komenda, J., Reisinger, V., Muller, B.C., Dobakova, M., Granvogl, B. & Eichacker, L.A.** (2004). Accumulation of the D2 protein is a key regulatory step for assembly of the photosystem II reaction center complex in *Synechocystis* PCC 6803. *J Biol Chem* 279, 48620-48629.
- Komenda, J., Barker, M., Kuvikova, S., de Vries, R., Mullineaux, C.W., Tichy, M. & Nixon, P.J.** (2006). The FtsH protease slr0228 is important for quality control of photosystem II in the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* 281, 1145-1151.
- Komenda, J., Tichy, M., Prasil, O., Knoppova, J., Kuvikova, S., de Vries, R. & Nixon, P.J.** (2007). The exposed N-terminal tail of the D1 subunit is required for rapid D1 degradation during photosystem II repair in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant Cell* 19, 2839-2854.
- Komenda, J., Kuvikova, S., Granvogl, B., Eichacker, L.A., Diner, B.A. & Nixon, P.J.** (2007). Cleavage after residue Ala352 in the C-terminal extension is an early step in the maturation of the D1 subunit of Photosystem II in *Synechocystis* PCC 6803. *Biochim Biophys Acta* 1767, 829-837.
- Komenda, J., Nickelsen, J., Tichy, M., Prasil, O., Eichacker, L.A. & Nixon, P.J.** (2008). The cyanobacterial homologue of HCF136/YCF48 is a component of an early photosystem II assembly complex and is important for both the efficient assembly and repair of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* 283, 22390-22399.
- Kraus, E. & Femfert, U.** (1976). Proteinase K from the Mold *Tritirachium album* Limber, Specificity and Mode of Action. *Z Physiol Chem* 357, 937.

- Kroczek, R.A.** (1993). Southern and northern analysis. *J Chromatogr* 618, 133-145.
- Kügler, M., Jänsch, L., Kruft, V., Schmitz, U.K. & Braun, H.P.** (1997). Analysis of the chloroplast protein complexes by blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE). *Photosynth Res* 53, 35-44.
- Kuvikova, S., Tichy, M. & Komenda, J.** (2005). A role of the C-terminal extension of the photosystem II D1 protein in sensitivity of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 to photoinhibition. *Photochem Photobiol Sci* 4, 1044-1048.
- Lanne, B., Potthast, F., Högglund, A., Brockenhuus von Lowenhielm, H., Nyström, A.C., Nilsson, F. & Dahllof, B.** (2001). Thiourea enhances mapping of the proteome from murine white adipose tissue. *Proteomics* 1, 819-828.
- Lenz, A.G., Costabel, U., Shaltiel, S. & Levine, R.L.** (1989). Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium borohydride. *Anal Biochem* 177, 419-425.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S. & Stadtman, E.R.** (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186, 464-478.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R. & Shacter, E.** (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233, 346-357.
- Levine, R.L., Mosoni, L., Berlett, B.S. & Stadtman, E.R.** (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15036-15040.
- Lindahl, M., Spetea, C., Hundal, T., Oppenheim, A.B., Adam, Z. & Andersson, B.** (2000). The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell* 12, 419-431.
- Lucinski, R. & Jackowski, G.** (2006). The structure, functions and degradation of pigment-binding proteins of photosystem II. *Acta Biochim Pol* 53, 693-708.
- Lupinkova, L. & Komenda, J.** (2004). Oxidative modifications of the Photosystem II D1 protein by reactive oxygen species: from isolated protein to cyanobacterial cells. *Photochem Photobiol* 79, 152-162.
- Lushchak, V.I.** (2006). Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. *Acta Biochim Pol* 53, 679-684.
- Maier, K.L., Lenz, A.G., Beck-Speier, I. & Costabel, U.** (1995). Analysis of methionine sulfoxide in proteins. *Methods Enzymol.*, 251. 455-461.
- Mattoo, A.K. & Edelman, M.** (1987). Intra-membrane translocation and post-translational palmitoylation of the chloroplast 32kDa herbicide binding protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84, 1497-1501.

- Mattoo, A.K., Elich, T., Ghirardi, M.L., Callahan, F.E. & Edelman, M.** (1993) Post-translational modification of chloroplast proteins and the regulation of protein turnover. In Post-Translational Modifications in Plants. Battey NH, Dickinson HG, Hetherington AM, Eds. SEB Seminar series 53, Cambridge U. Press. pp. 65-78.
- Mayfield, S.P., Bennoun, P. & Rochaix, J.D.** (1987). Expression of the nuclear encoded OEE1 protein is required for oxygen evolution and stability of photosystem II particles in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Embo J* 6, 313-318.
- Mendez-Alvarez, S., Leisinger, U. & Eggen, R.I.** (1999). Adaptive responses in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int Microbiol* 2, 15-22.
- Merchant, S. & Sawaya, M.R.** (2005). The light reactions: a guide to recent acquisitions for the picture gallery. *Plant Cell* 17, 648-663.
- Merchant, S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Grossman, A.R. et al.** (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318, 245-251.
- Merril, C.R.** (1990). Gel-staining techniques. *Methods Enzymol* 182, 477-488.
- Michel, H., Hunt, D.F., Shabanowitz, J. & Bennett, J.** (1988). Tandem mass spectrometry reveals that three photosystem II proteins of spinach chloroplasts contain N-acetyl-O-phosphothreonine at their N-termini. *J Biol Chem* 263:1123-1130.
- Milner, H.W., Lawrence, N.S. & French, C. S.** (1950). Colloidal dispersion of chloroplast material. *Science* 6: 633-634.
- Minagawa, J. & Takahashi, Y.** (2004). Structure, function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins. *Photosynth Res* 82, 241-263.
- Miyao, M.** (1994). Involvement of active oxygen species in degradation of the D1 protein under strong illumination in isolated subcomplexes of photosystem II. *Biochemistry* 33, 9722-9730.
- Miyao, M., Ikeuchi, M., Yamamoto, N. & Ono, T.** (1995). Specific degradation of the D1 protein of photosystem II by treatment with hydrogen peroxide in darkness: implications for the mechanism of degradation of the D1 protein under illumination. *Biochemistry* 34, 10019-10026.
- Mohanty, P., Allakhverdiev, S.I. & Murata, N.** (2007). Application of low temperatures during photoinhibition allows characterization of individual steps in photodamage and the repair of photosystem II. *Photosynth Res* 94, 217-224.
- MØller, I.M. & Kristensen, B.K.** (2004). Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochem Photobiol Sci* 3, 730-735.
- MØller, I.M. & Kristensen, B.K.** (2006). Protein oxidation in plant mitochondria detected as oxidized tryptophan. *Free Radic Biol Med* 40, 430-435.

- Møller, I.M., Jensen, P.E. & Hansson, A.** (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 58, 459-481.
- Molloy, M.P.** (2000). Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal Biochem* 280, 1-10.
- Morgan, T. E., Lockerbie, R. O., Minamide, L. S., Browning, M. D. & Bamburg, J. R.** (1993). Isolation and characterization of a regulated form of actin depolymerizing factor. *J. Cell Biol.* 122, 623-633.
- Muktiono, B., Schulten, C., Heemken, O., Gandrass, J., Prange, A., Schnabl, H. & Cerboncini C.** (2008). Isolation and purification assay of ex vivo photosystem II D1 protein toward integrated biointeraction analysis. *Anal Bioanal Chem* 390, 1195–1202.
- Mulo, P., Tyystjarvi, T., Tyystjarvi, E., Govindjee, Maenpaa, P. & Aro, E.M.** (1997). Mutagenesis of the D-E loop of photosystem II reaction centre protein D1. Function and assembly of photosystem II. *Plant Mol Biol* 33, 1059-1071.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y. & Allakhverdiev, S.I.** (2007). Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim Biophys Acta* 1767, 414-421.
- Nakamura, A. & Goto, S.** (1996). Analysis of protein carbonyls with 2,4-dinitrophenyl hydrazine and its antibodies by immunoblot in two-dimensional gel electrophoresis. *J Biochem* 119, 768-774.
- Nakamura, M., Tsumoto, K., Ishimura, K. & Kumagai, I.** (2002). Detection of biotinylated proteins in polyacrylamide gels using an avidin-fluorescein conjugate. *Anal Biochem* 304, 231-235.
- Nanba, O. & Satoh, K.** (1987). Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 109-112.
- Nelson, N. & Yocum, C.F.** (2006). Structure and function of photosystems I and II. *Annu Rev Plant Biol* 57, 521-565.
- Neugebauer, J. M.** (1990). Detergents: an overview. *Aus: Methods in Enzymologie* vol. 182 guide to protein purification. Academic Press, San Diego, 239-253.
- Nilsson, R., Brunner, J., Hoffman, N.E. & van Wijk, K.J.** (1999). Interactions of ribosome nascent chain complexes of the chloroplast-encoded D1 thylakoid membrane protein with cpSRP54. *Embo J* 18, 733-742.
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I. & Murata, N.** (2006). A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1757, 742-749.
- Nixon, P.J., Trost, J.T. & Diner, B.A.** (1992). Role of the carboxy terminus of polypeptide D1 in the assembly of a functional water-oxidizing manganese cluster in photosystem II of the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803: assembly requires a free carboxyl group at C-terminal position 344. *Biochem* 31 (44): 10859-71.

- Nixon, P.J., Komenda, J., Barber, J., Deak, Z., Vass, I. & Diner, B.A.** (1995). Deletion of the PEST-like region of photosystem two modifies the QB-binding pocket but does not prevent rapid turnover of D1. *J Biol Chem* 270, 14919-14927.
- Nixon, P.J., Barker, M., Boehm, M., de Vries, R. & Komenda, J.** (2005). FtsH-mediated repair of the photosystem II complex in response to light stress. *J Exp Bot* 56, 357-363.
- Nixon, P.J., Michoux, F., Yu, J., Boehm, M., & Komenda, J.** (2010). Recent advances in understanding the assembly and repair of Photosystem II. *Ann Bot*, 106 (1), 1-16.
- Nyström, T.** (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *Embo J* 24, 1311-1317.
- Ossenbühl, F., Inaba-Sulpice, M., Meurer, J., Soll, J. & Eichacker, L.A.** (2006). The *Synechocystis* sp PCC 6803 *oxa1* homolog is essential for membrane integration of reaction center precursor protein pD1. *Plant Cell* 18, 2236-2246.
- Okada, K., Ikeuchi, M., Yamamoto, N., Ono, T. & Miyao, M.** (1996). Selective and specific cleavage of the D1 and D2 proteins of Photosystem II by exposure to singlet oxygen: factors responsible for the susceptibility to cleavage of the protein. *Biochim Biophys Acta* 1274, 73-79.
- Park, S., Khamai, P., Garcia-Cerdan, J.G. & Melis, A.** (2007). REP27, a tetratricopeptide repeat nuclear-encoded and chloroplast-localized protein, functions in D1/32-kD reaction center protein turnover and photosystem II repair from photodamage. *Plant Physiol* 143, 1547-1560.
- Partis, M.D.** (1983). Cross-linking of protein by  $\omega$ -maleimido alkanoyl *N*-hydroxysuccinimido esters. *J Prot Chem* 2(3), 263-277.
- Pasquali, C., Fialka, I. & Huber, L.A.** (1997). Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Electrophoresis* 18, 2573-2581.
- Plücken H, Müller B, Grohmann D, Westhoff P, & Eichacker LA** (2002). The HCF136 protein is essential for assembly of the photosystem II reaction center in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 532, 85-90.
- Preiss, S., Schrader, S. & Johanningmeier, U.** (2001). Rapid, ATP-dependent degradation of a truncated D1 protein in the chloroplast. *Eur J Biochem* 268, 4562-4569.
- Pujols-Ayala, I. & Barry, B.A.** (2004). Tyrosyl radicals in photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1655, 205-216.
- Rehm, H.** (2006). *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Reichardt, C.** (1990). *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. 2<sup>nd</sup> edition, VCH Verlags GmbH, Weinheim.
- Reisinger, V. & Eichacker, L.A.** (2007). How to analyze protein complexes by 2D blue native SDS-PAGE. *Proteomics* 7 Suppl 1, 6-16.

- Rexroth, S., Meyer zu Tittingdorf, J.M., Krause, F., Dencher, N.A. & Seelert, H.** (2003). Thylakoid membrane at altered metabolic state: challenging the forgotten realms of the proteome. *Electrophoresis* 24, 2814-2823.
- Robinson, H.H., Sharp, R.R. & Yocum, C.F.** (1980). Effect of manganese on the nuclear magnetic relaxivity of water protons in chloroplast suspensions. *Biochem Biophys Res Commun* 93, 755-761.
- Roose, J.L. & Pakrasi, H.B.** (2004). Evidence that D1 processing is required for manganese binding and extrinsic protein assembly into photosystem II. *J Biol Chem* 279, 45417-45422.
- Roose, J.L., Wegener, K.M. & Pakrasi, H.B.** (2007). The extrinsic proteins of Photosystem II. *Photosynth Res* 92, 369-387.
- Posch, A., van den Berg, B.M., Duranton, C. & Görg, A.** (1994). Polymorphism of pepper (*Capsicum annuum* L.) seed proteins studied by two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: methodical and genetic aspects. *Electrophoresis*. Feb;15(2). 297-304.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sakamoto, W.** (2006). Protein degradation machineries in plastids. *Annu Rev Plant Biol* 57, 599-621.
- Salter, A.H., Virgin, I., Hagman, A. & Andersson, B.** (1992). On the molecular mechanism of light-induced D1 protein degradation in photosystem II core particles. *Biochemistry* 31, 3990-3998.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory press, New York.
- Sambrook & Russel** (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory press, New York.
- Sanger, R. & Granick, S.** (1953). Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ann N Y Acad Sci* 56, 831-838.
- Santoni, V., Molloy, M. & Rabilloud, T.** (2000). Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* 21, 1054-1070.
- Schägger, H., Borchart, U., Aquila, H., Link, T.A. & von Jagow, G.** (1985). Isolation and amino acid sequence of the smallest subunit of beef heart bc1 complex. *FEBS Lett* 190, 89-94.
- Schiller, H. & Dau, H.** (2000). Preparation protocols for high-activity photosystem II membrane particles of green algae and higher plants, pH dependence of oxygen evolution and comparison of the S2-state multiline signal by X-band EPR spectroscopy. *J Photochem Photobiol B* 55, 138-144.
- Schönhuber, W., Le Bourhis, G., Tremblay, J., Amann, R. & Kulakauskas, S.** (2001). Utilization of tmRNA sequences for bacterial identification. *BMC Microbiol* 1, 20.

- Setlik, I., Allakhverdiev, S. I., Nedbal, L., Setlikova, E. & Klimov, V. V.** (1990). Three types of photosystem II photoinactivation. I. Damaging processes on the acceptor side; *Photosynth. Res.* 23, 39-48.
- Shacter, E.** (2000). Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 32, 307-326.
- Sharma, J., Panico, M., Shipton, C.A., Nilsson, F., Morris, H.R. & Barber, J.** (1997). Primary structure characterization of the photosystem II D1 and D2 subunits. *J Biol Chem* 272, 33158-33166.
- Shim, H., Cao, J., Govindjee & Debrunner, P.G.** (1990) Purification of highly active oxygen-evolving photosystem II from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photos Res* 26, 223-228.
- Shipton, C.A. & Barber, J.** (1991). Photoinduced degradation of the D1 polypeptide in isolated reaction centers of photosystem II: evidence for an autoproteolytic process triggered by the oxidizing side of the photosystem. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6691-6695.
- Shneyour, A. & Avron, M.** (1970). High biological activity in chloroplasts from *Euglena gracilis* prepared with a new gas pressure device. *FEBS Lett* 8, 164-166.
- Silvia, P., Thompson, E., Bailey, S., Kruse, O. & Mullineaux, C.W.** (2003). FtsH is involved in the early stages of repair of photosystem II in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant Cell* 15: 2152-2164.
- Somanchi, A. & Mayfield, S.P.** (2001). Regulation of chloroplast translation. *Aus Regulation of photosynthesis* (e.d. Aro, E.M. & Andersson, B.), 137-151. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.
- Spetea, C., Hundal, T., Lohmann, F. & Andersson, B.** (1999). GTP bound to chloroplast thylakoid membranes is required for light-induced, multi-enzyme degradation of the photosystem II D1 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6547-6552.
- Spetea, C., Keren, N., Hundal, T., Doan, J.M., Ohad, I. & Andersson, B.** (2000). GTP enhances the degradation of the photosystem II D1 protein irrespective of its conformational heterogeneity at the Q(B) site. *J Biol Chem* 275, 7205-7211.
- Stadtman, E.R.** (1993). Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reaction. *Annu Rev Biochem* 62, 797-821.
- Sueoka, N.** (1960). Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 46, 83-91.
- Sugiura, M., Inoue, Y. & Minagawa, J.** (1998). Rapid and discrete isolation of oxygen-evolving His-tagged photosystem II core complex from *Chlamydomonas reinhardtii* by Ni<sup>2+</sup> affinity column chromatography. *FEBS Lett* 426, 140-144.
- Sugiura, M. & Inoue, Y.** (1999). Highly purified thermo-stable oxygen-evolving photosystem II core complex from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus* having His-tagged CP43. *Plant Cell Physiol* 40, 1219-1231.

- Sulkowski, E.** (1985). Purification of proteins by IMAC. *Trends Biotechnol* 3, 1-7.
- Sun, X., Peng, L., Guo, J., Chi, W., Ma, J., Lu, C. & Zhang, L.** (2007). Formation of DEG5 and DEG8 complexes and their involvement in the degradation of photodamaged photosystem II reaction center D1 protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 1347-1361.
- Sun, X., Fu, T., Chen, N., Guo, J., Ma, J., Zou, M., Lu, C. & Zhang, L.** (2010). The Stromal Chloroplast Deg7 Protease Participates in the Repair of Photosystem II after Photoinhibition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 152, 1263-1273.
- Sundby, C., Harndahl, U., Gustavsson, N., Ahrman, E. & Murphy, D.J.** (2005). Conserved methionines in chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1703, 191-202.
- Suorsa, M. & Aro, E.M.** (2007). Expression, assembly and auxiliary functions of photosystem II oxygen-evolving proteins in higher plants. *Photosynth Res* 93, 89-100.
- Suzuki, T., Minagawa, J., Tomo, T., Sonoike, K., Ohta, H. & Enami, I.** (2003). Binding and functional properties of the extrinsic proteins in oxygen-evolving photosystem II particle from a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii* having his-tagged CP47. *Plant Cell Physiol* 44, 76-84.
- Suzuki, T., Tada, O., Makimura, M., Tohri, A., Ohta, H., Yamamoto, Y. & Enami, I.** (2004). Isolation and characterization of oxygen-evolving photosystem II complexes retaining the PsbO, P and Q proteins from *Euglena gracilis*. *Plant Cell Physiol* 45, 1168-1175.
- Takahashi Y., Utsumi K., Yamamoto Y., Hatano A. & Satoh K.** (1996). Genetic engineering of the processing site of D1 precursor protein of photosystem II reaction center in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol* 37(2), 161-8.
- Takahashi, S. & Murata, N.** (2008). How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science* 13 (4), 178-182.
- Tang, X.S., Fushimi, K. & Satoh, K.** (1990). D1-D2 complex of the photosystem II reaction center from spinach. Isolation and partial characterization. *FEBS Lett* 273, 257-260.
- Theg, S.M., Filar, L.J. & Dilley, R.A.** (1986). Photoinactivation of chloroplasts already inhibited on the oxidizing side of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 849, 104-111.
- Thomas, P.S.** (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 5201-5205.
- Torreilles, J., Guerin, M.C. & Slaoui-Hasnaoui, A.** (1990). Nickel (II) complexes of histidyl-peptides as Fenton-reaction catalysts. *Free Radic Res Commun* 11, 159-166.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Trebitsh, T. & Danon, A.** (2001). Translation of chloroplast psbA mRNA is regulated by signals initiated by both photosystems II and I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12289-12294.

- Trebitsh, T., Meiri, E., Ostersetzer, O., Adam, Z. & Danon, A.** (2001). The protein disulfide isomerase-like RB60 is partitioned between stroma and thylakoids in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *J Biol Chem* 276, 4564-4569.
- Trebst, A. & Depka, B.** (1997). Role of carotene in the rapid turnover and assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* 400, 359-362.
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.R. & Kamiya, N.** (2011). Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* 473, 55.
- Uniacke, J. & Zerges, W.** (2007). Photosystem II assembly and repair are differentially localized in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 19, 3640-3654.
- van Montfort, B. A., Doeven, M. K., Canas, B., Veenhoff, L.M., Poolman, B. & Robillard, G.T.** (2002). Combined in-gel tryptic digestion and CNBr cleavage for the generation of peptide maps of an integral membrane protein with MALDI-TOF mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta* 1555, 111-115.
- Vass, I., Styring, S., Hundal, T., Koivuniemi, A., Aro, E. & Andersson, B.** (1992). Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced QA species promote chlorophyll triplet formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1408-1412.
- Virgin, I., Salter, A.H., Ghanotakis, D.F. & Andersson, B.** (1991). Light-induced D1 protein degradation is catalyzed by a serine-type protease. *FEBS Lett* 287, 125-128.
- Walker, D.A. & Walker, R.** (1987). The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. Published by Oxygraphics limited. Produced by University of Sheffield Print Unit.
- Wei, L., Guo, J., Ouyang, M., Sun, X., Ma, J., Chi, W., Lu, C. & Zhang, L.** (2010). LPA19, a Psb27 homolog in *Arabidopsis thaliana*, facilitates D1 protein precursor processing during PSII biogenesis. *J. Biol. Chem.* 285 , 21391-8 .
- Wilski, S.** (2004). Funktionelle Analyse des D1-Proteins im Photosystem II von *Chlamydomonas reinhardtii*. Ruhr-Universität Bochum, Universitätsbibliothek, Fakultät für Biologie. URN: urn:nbn:de:hbz:294-9857.
- Winter, M.L. & Liehr, J.G.** (1991). Free radical-induced carbonyl content in protein of estrogen-treated hamsters assayed by sodium boro [<sup>3</sup>H] hydride reduction. *J Biol Chem* 266, 14446-14450.
- Yamamoto, Y.** (2001). Quality control of photosystem II. *Plant Cell Physiol* 42, 121-128.
- Yamamoto, Y., Inagaki, N. & Satoh, K.** (2001). Overexpression and characterization of carboxyl-terminal processing protease for precursor D1 protein. *J Biol Chem* 276 (10), 7518-7525.
- Yano, J., Kern, J., Sauer, K., Latimer, M.J., Pushkar, Y., Biesiadka, J., Loll, B., Saenger, W., Messinger, J., Zouni, A. & Yachandra, V.K.** (2006). Where water is oxidized to dioxygen: structure of the photosynthetic Mn4Ca cluster. *Science* 314, 821-825.

**Yoo, B.S. & Regnier, F.E.** (2004). Proteomic analysis of carbonylated proteins in two-dimensional gel electrophoresis using avidin-fluorescein affinity staining. *Electrophoresis* 25, 1334-1341.

**Yoshioka, M., Uchida, S., Mori, H., Komayama, K., Ohira, S., Morita, N., Nakanishi, T. & Yamamoto, Y.** (2006). Quality control of photosystem II. Cleavage of reaction center D1 protein in spinach thylakoids by FtsH protease under moderate heat stress. *J Biol Chem* 281, 21660-21669.

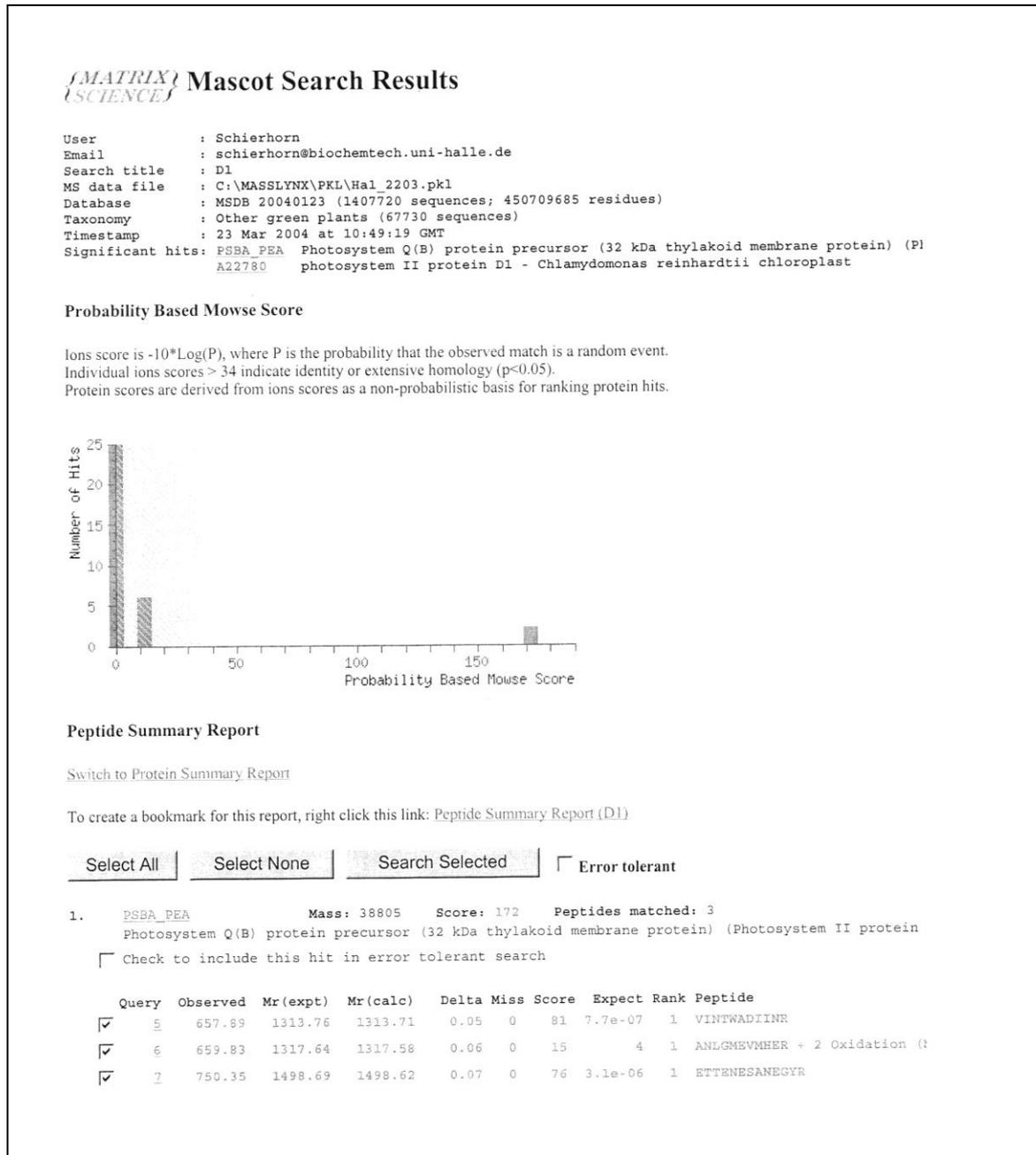
**Zerges, W. & Rochaix, J.D.** (1998). Low density membranes are associated with RNA-binding proteins and thylakoids in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* 140, 101-110.

**Zhang, L., Paakkarinen, V., van Wijk, K.J. & Aro, E.M.** (1999). Co-translational assembly of the D1 protein into photosystem II. *J Biol Chem* 274, 16062-16067.

**Zhang, L., Paakkarinen, V., van Wijk, K.J. & Aro, E.M.** (2000). Biogenesis of the chloroplast-encoded D1 protein: regulation of translation elongation, insertion, and assembly into photosystem II. *Plant Cell* 12, 1769-1782.

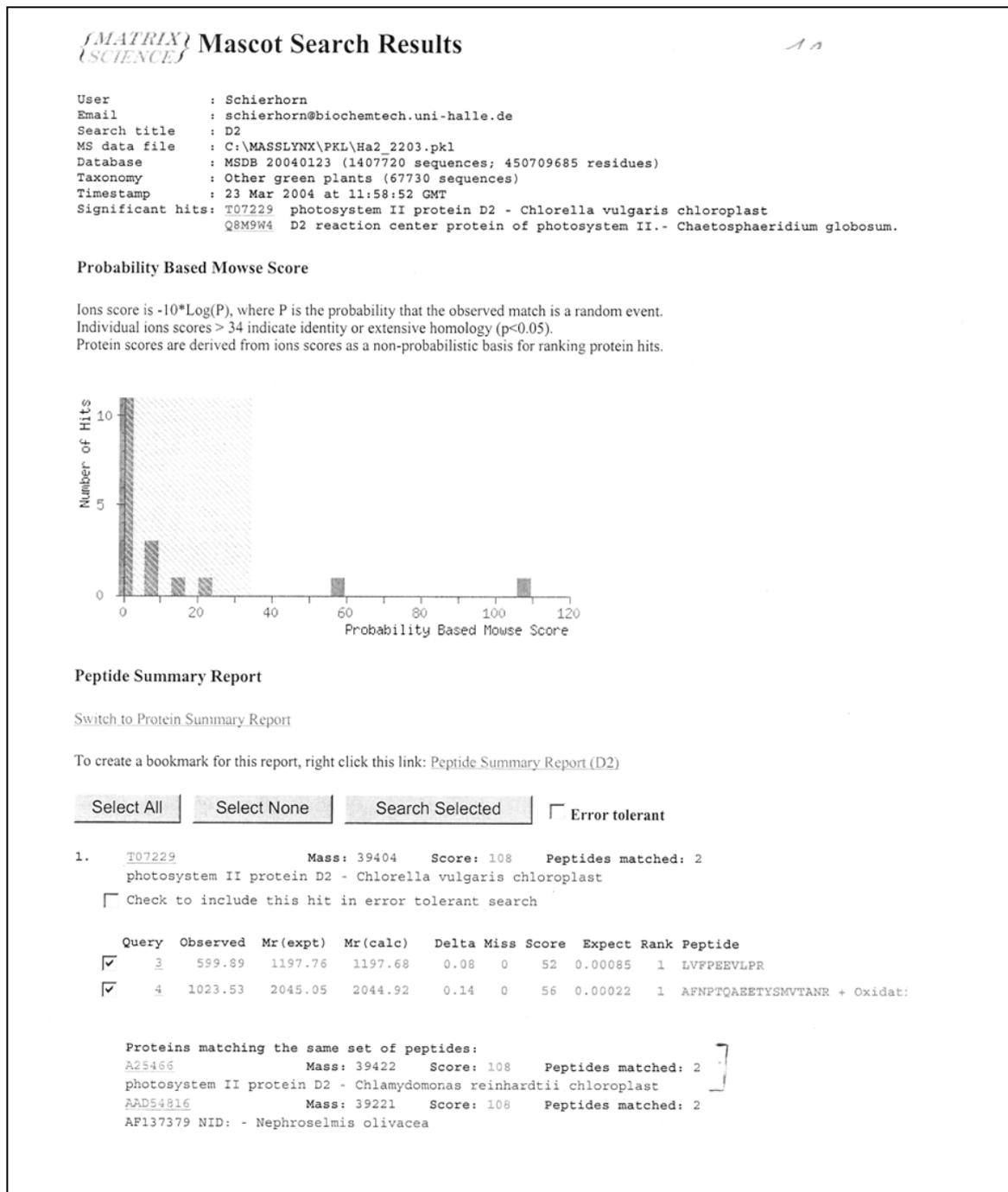
**Zhang, L., Paakkarinen, V., Suorsa, M. & Aro, E.M.** (2001). A SecY homologue is involved in chloroplast-encoded D1 protein biogenesis. *J Biol Chem* 276, 37809-37814.

## 7 Anhang

**Abbildung A1: MALDI MS/MS-Analyse des D1-Proteins nach der 2D BN/SDS-PAGE**

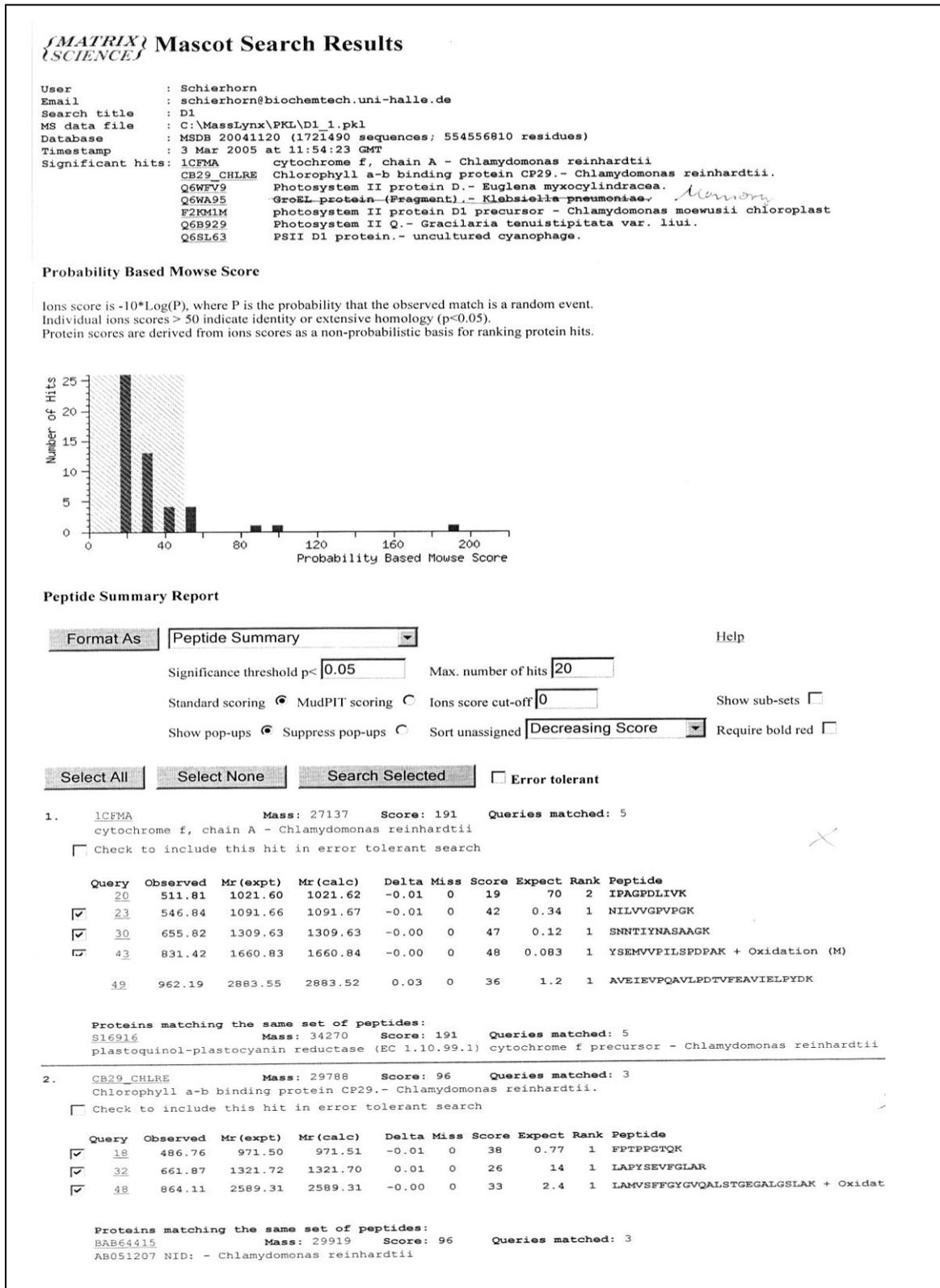
Dargestellt ist die Auswertung der MALDI MS/MS Analyse des D1-Proteins. Nach der Auftrennung der Proteinprobe durch die 2D BN/SDS-PAGE und anschließender Colloidal-Coomassie Färbung wurde der Proteinspot aus dem SDS-Acrylamidgel ausgeschnitten und durch Dr. Schierhorn (MLU Halle-Wittenberg) analysiert.

## Anhang



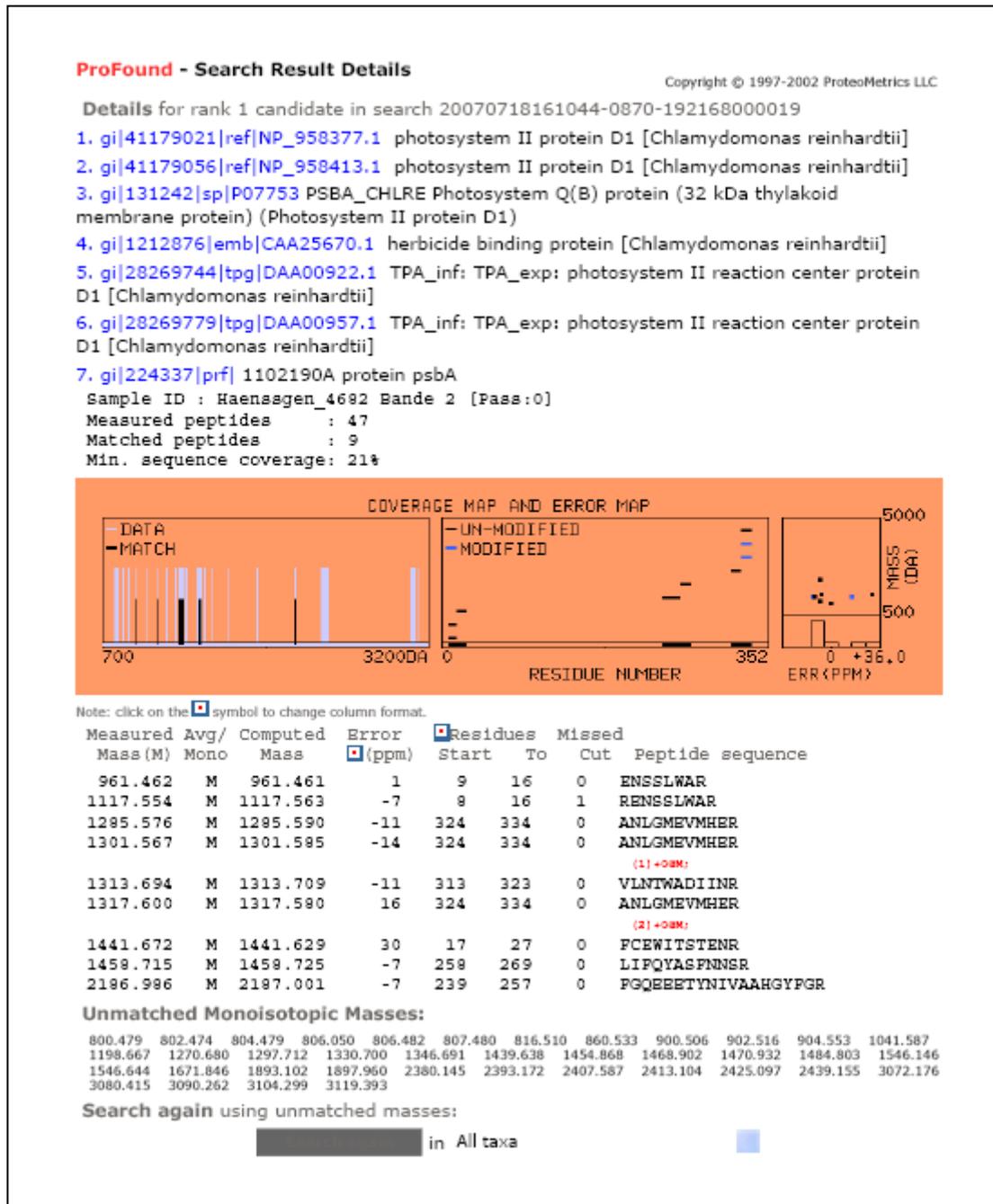
### Abbildung A2: MALDI MS/MS-Analyse des D2-Proteins nach der 2D BN/SDS-PAGE

Dargestellt ist die Auswertung der MALDI MS/MS Analyse des D2-Proteins. Nach der Auftrennung der Proteinprobe durch die 2D BN/SDS-PAGE und anschließender Colloidal-Coomassie Färbung wurde der Proteinspot aus dem SDS-Acrylamidgel ausgeschnitten und durch Dr. Schierhorn (MLU Halle-Wittenberg) analysiert.



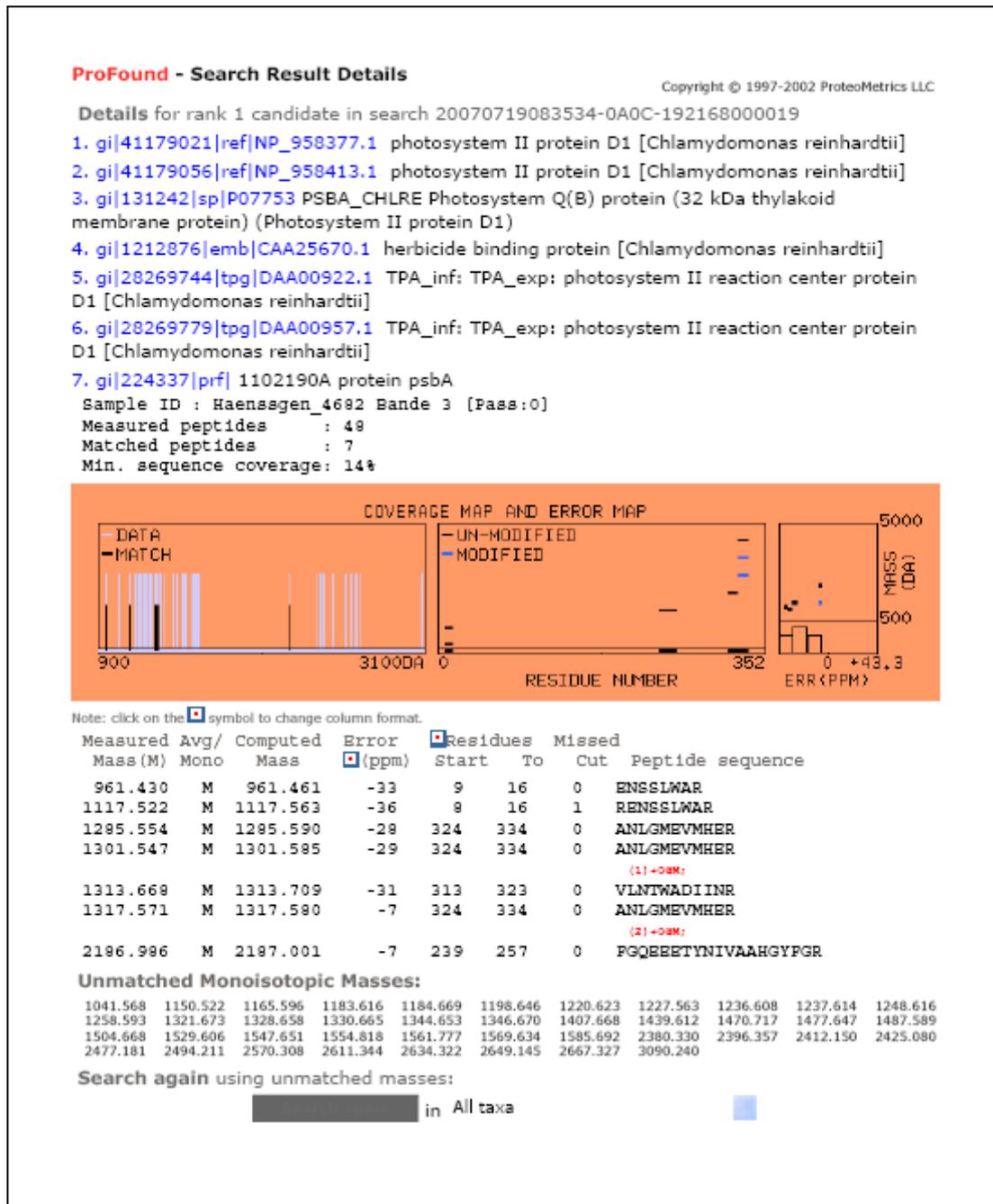
**Abbildung A3: MALDI MS/MS-Analyse des Cytf- und CP29-Proteins nach der 2D BN/SDS-PAGE**

Dargestellt ist die Auswertung der MALDI MS/MS Analyse des Cytf- und CP29-Proteins. Nach der Auftrennung der Proteinprobe durch die 2D BN/SDS-PAGE und anschließender Colloidal-Coomassie Färbung wurde der Proteinspot aus dem SDS-Acrylamidgel ausgeschnitten und durch Dr. Schierhorn (MLU Halle-Wittenberg) analysiert.



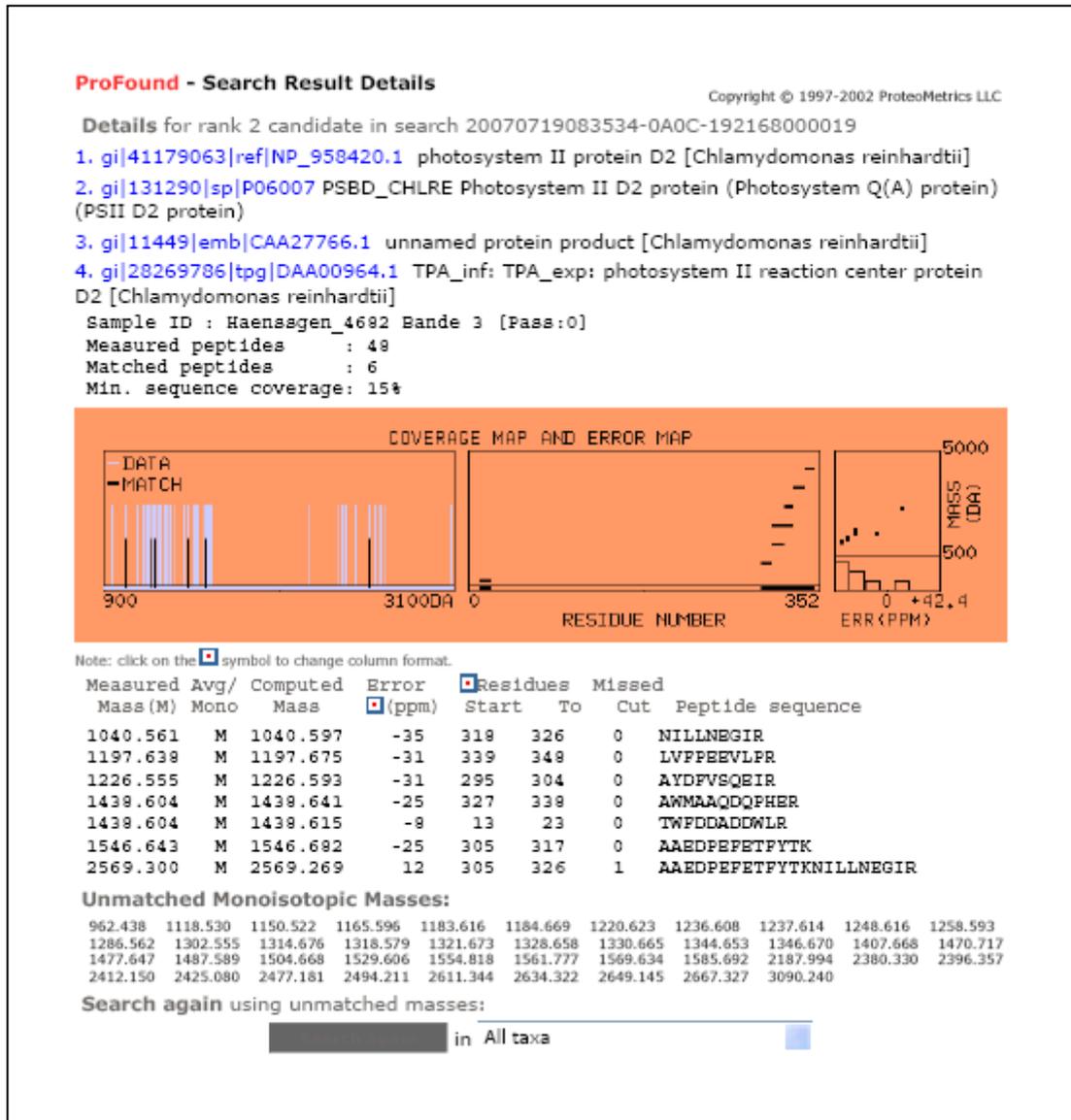
**Abbildung A4: MALDI MS/MS-Analyse des D1-Proteins im 30 kDa-Bereich**

Dargestellt ist die Auswertung der MALDI MS/MS Analyse des D1-Proteins. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteinprobe und anschließender Coomassiefärbung wurde die Proteinbande aus dem 30 kDa-Bereich des SDS-Acrylamidgels ausgeschnitten und durch die Firma Toplab analysiert.



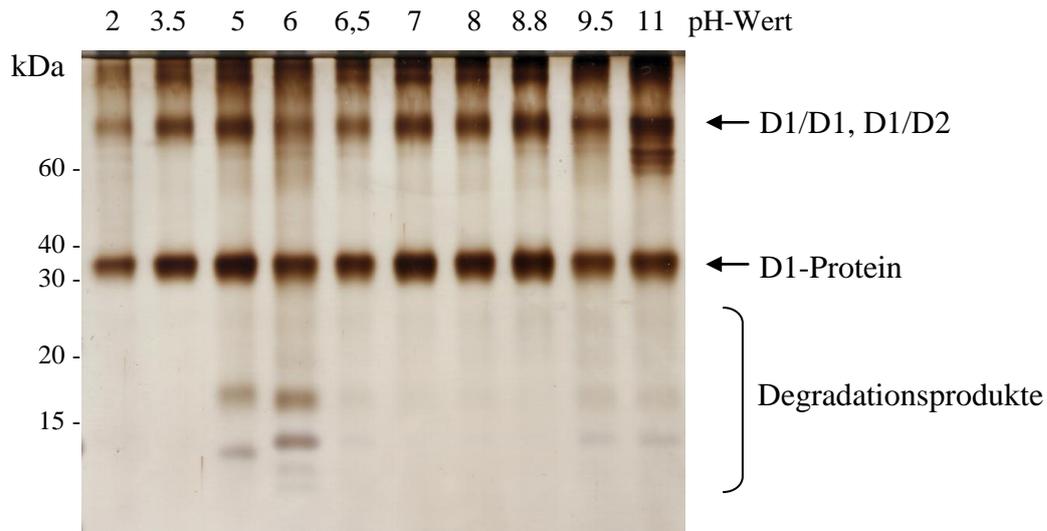
**Abbildung A5: MALDI MS/MS-Analyse des D1-Proteins im 60 kDa-Bereich**

Dargestellt ist die Auswertung der MALDI MS/MS Analyse des D1-Proteins. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteinprobe und anschließender Coomassiefärbung wurde die Proteinbande aus dem 60 kDa-Bereich des SDS-Acrylamidgels ausgeschnitten und durch die Firma Toplab analysiert.



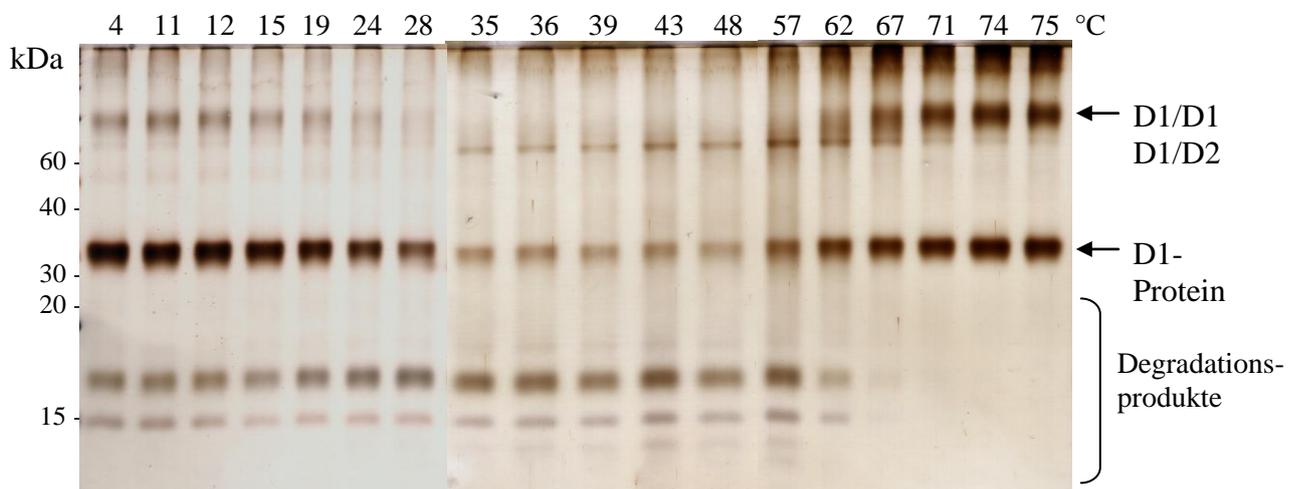
**Abbildung A6: MALDI MS/MS-Analyse des D2-Proteins im 60 kDa-Bereich**

Dargestellt ist die Auswertung der MALDI MS/MS Analyse des D1-Proteins. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteinprobe und anschließender Coomassiefärbung wurde die Proteinbande aus dem 60 kDa-Bereich des SDS-Acrylamidgels ausgeschnitten und durch die Firma Toplab analysiert.



**Abbildung A7: Abbau des D1-Proteins durch Proteinase K bei verschiedenen pH-Werten**

2 µg des eluierten D1-Proteins wurden Aceton gefällt und anschließend in Elutionspuffern mit verschiedenen pH-Werten resuspendiert (Ansatz jeweils 20 µl). Elutionspuffer mit pH 2 und pH 3,5 enthielten 100 mM Glycin, mit pH 5 und pH 6 enthielten 40 mM MES, mit pH 6,5 und pH 7 enthielten 100 mM Bis-Tris und mit pH 8 bis pH 11 enthielten 100 mM TRIS. Diese Ansätze wurden mit jeweils 2 ng Proteinase K versetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine durch die Silberfärbung sichtbar gemacht.



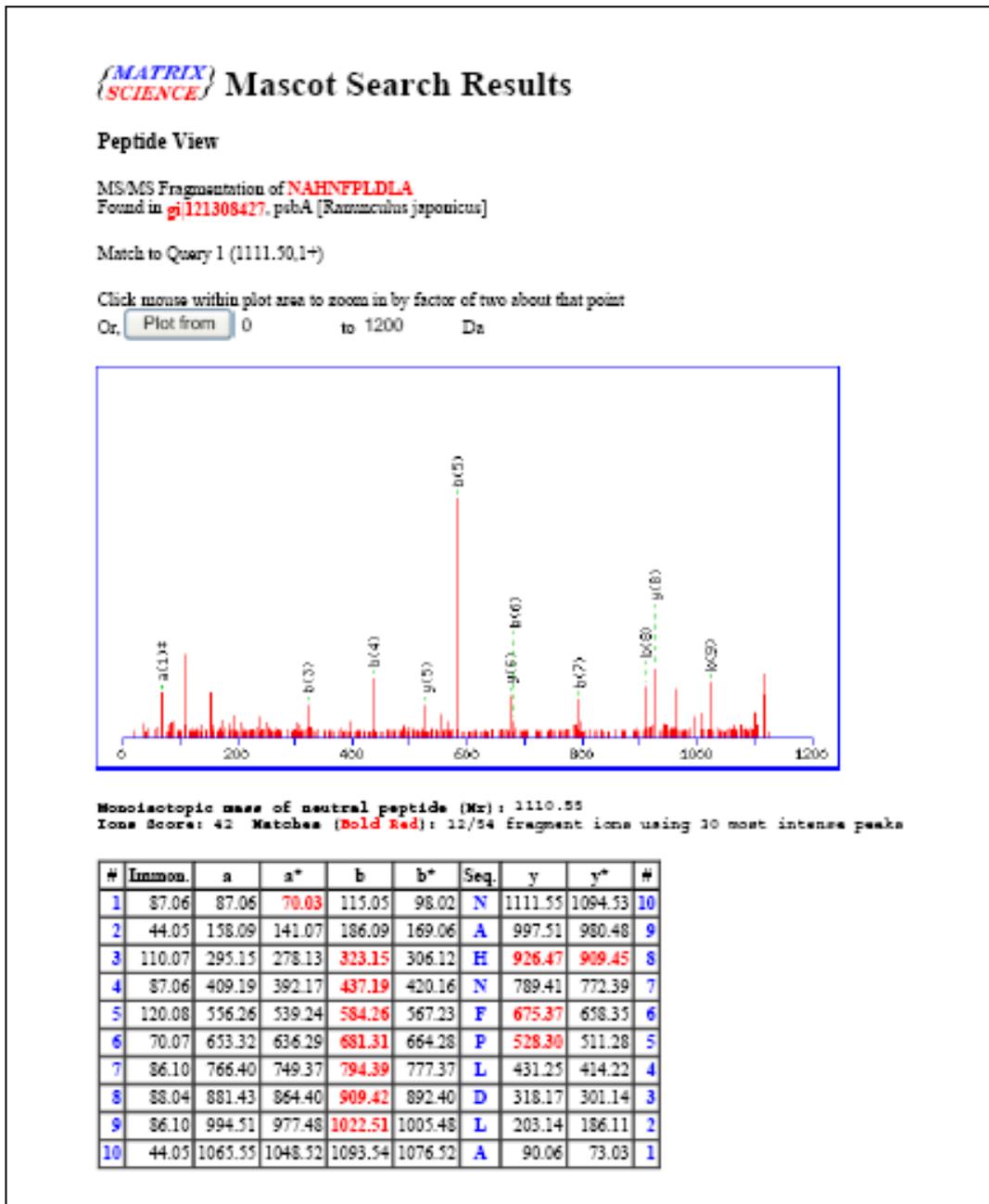
**Abbildung A8: Abbau des D1-Proteins durch Proteinase K bei verschiedenen Temperaturen**

2 µg D1-Protein wurden nach der Elution mit 2 ng Proteinase K versetzt und für 2 h bei Temperaturen von 4°C bis 75°C inkubiert (Ansatz jeweils 20 µl). Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

<b>TOPLAB</b> 		Fraunhoferstr. 18 a Tel. 089-8595 1277 E-Mail:		D-82152 Martinsried Fax: 089-8595 1288 info@toplab.de			
SEQUENCER: ABI 492						Run-Nr <b>188-3B (4664)</b>	
SAMPLE: <b>D1-Protein Fragment</b>						DATE 27.06.07	
						ID Hänssgen	
SUPPORT:	Peptid	Protein x	SELEX	PVDF x	Glasfaser	Polybren	Blot x
	Main sequence			Minor sequences			
1	L			S		21	
2	I			L		22	
3	R			I		23	
4	E			R		24	
5	T			E		25	
6	T			T		26	
7	E			T		27	
8	N			E		28	
9	E			N		29	
10	S			E		30	
11						31	
12						32	
13						33	
14						34	
15						35	
16						36	
17						37	
18						38	
19						39	
20						40	
KOMMENTAR							
Position 223 und 222 der Sequenz von PSBA_CHLRE, etwa 1:1							

**Abbildung A9: Sequenzierung des N-terminalen Endes eines D1-Spaltfragmentes via Edman-Abbau**

Dargestellt ist die von der Firma „Toplab“ dokumentierte Sequenzauswertung. Auf der zur Sequenzierung eingereichten PVDF-Membran wurden Proteinfragmente mit der Anfangssequenz LIRETTENES sequenziert. Dabei wurden auch Fragmente mit der Aminosäuresequenz SLIRETTENE identifiziert.



**Abbildung A10: Sequenzierung des C-terminalen Endes eines D1-Spaltfragmentes via C-terminaler Leitersequenzierung**

Dargestellt ist die von der Firma „Toplab“ dokumentierte Sequenzwertung. Auf der zur Sequenzierung eingereichten PVDF-Membran wurden Proteinfragmente mit der Sequenz NAHNFPLDLA sequenziert.

## **DANKSAGUNG**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Udo Johanningmeier für die Möglichkeit der Durchführung der Promotion und für die Betreuung und Unterstützung während der Arbeit.

Der AG Zellphysiologie danke ich für die vielen fröhlichen, kreativen Stunden während der praktischen Zeit meiner Arbeit.

Für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen bedanke ich mich besonders bei Herrn Dr. Michael Kiess (Toplab) und Frau Dr. Angelika Schierhorn.

Der AG Adamska danke ich für die Bereitstellung des Expressionsvektors der Deg2-Protease.

Mein allerherzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Mikola Glibovets, Herrn Prof. Dr. Oleksandr Meshchaninov und Frau Prof. Dr. Svetlana Lebed für die Möglichkeit, Kernpunkte meiner Dissertation an der Universität in Mykolaiv (Ukraine) zu präsentieren.

Ein lieber Dank geht an das ganze Affilin®-Team der Scil Proteins GmbH, das mir während der Zeit des Zusammenschreibens die Daumen gedrückt hat – vor allem an Heiko und Jörg. Ein besonderer Dank für die Unterstützung gilt dabei Frau Dr. Ulrike Fiedler, Herrn Dr. Erik Fiedler und Herrn Dr. Arnd Steuernagel!

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die immer und zu jeder Zeit für mich da waren und sind. Ich danke Euch!

Herzlicher Dank gilt meinem Bruder Mirko, der mir seine Ohren für abendfüllende Gespräche zu Themen der Promotion geliehen hat.

Ein lieber, unvergessener Dank gilt meinen Großeltern Rosa und Kurt Hänßgen, die stets und ständig an mich geglaubt haben.

Mein Sohn Jerome sei ganz lieb gedrückt für die vielen Stunden, in denen er freiwillig auf mich verzichtet hat, damit ich an der Promotionsarbeit schreiben konnte.

Meinem Freund Thomas danke ich für den kreativen Input während des Zusammenschreibens und für die unzähligen schönen Momente.

## **CURRICULUM VITAE**

Name: Ilka Hänßgen

Geburtsdatum: 27.10.1978

Geburtsort: Leipzig

Familienstand: ledig, 1 leibliches Kind

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Wohnort: Halle / Saale, Bundesrepublik Deutschland

## **Schulausbildung**

1985 – 1992 Grundschule in Markkleeberg

1992 – 1997 Gymnasium Rudolf-Hildebrand-Schule in Markkleeberg

1997 Abitur, Gymnasium Rudolf-Hildebrand-Schule in Markkleeberg

## **Studium**

1997 – 1999 Studium der Biologie an der Universität Leipzig - Grundstudium

1999 – 2002 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2002 Diplom, an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss mit dem Titel  
Diplom-Biologin, Thema der Diplomarbeit: „Proteomanalyse von Photosynthesemutanten der  
Chlorophycee *Chlamydomonas reinhardtii*“

## **Beruflicher Werdegang**

2002 – 2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,  
Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften, Institut für Biologie, Institutsbereich  
Pflanzenphysiologie, Abteilung Zellphysiologie

Seit 2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Scil Proteins GmbH, Bereich „Protein Analytics“

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, Ilka Hänßgen, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle (Saale), den 04.10.2011    Ilka Hänßgen