

**Charakterisierung des für zentrische Diatomeen
spezifischen Lichtsammelproteins Lhcx6_1 aus
*Cyclotella meneghiniana***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt am Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von Nicolas Herrmann
aus Heidelberg

Frankfurt am Main (2022)

(D30)

Vom Fachbereich Biowissenschaften der

Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Sven Klimpel

Gutachter: Prof. Dr. Claudia Büchel

Prof. Dr. Maik Böhmer

Datum der Disputation:



“We will really approach the understanding of life when all structures and functions, all levels, from the electronic to the supramolecular, will merge into one single unit. Until then our distinguishing between structure and function, classic chemical reactions and quantum mechanics, or the sub- and supramolecular, only shows the limited nature of our approach and understanding.”

Albert Szent-Györgyi, Nobelpreisträger; 1960

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Die Biomembran.....	1
1.2 Autotrophe Lebensformen: Chemotrophie	2
1.3 Autotrophe Lebensformen: Anoxygene Photosynthese	4
1.3.1 Bacteriorhodopsin	5
1.3.2 Q-Typ Reaktionszentrum (RCII)	5
1.3.3 Fe-S-Typ Reaktionszentrum (RCI)	6
1.4 Autotrophe Lebensformen: Oxygene Photosynthese	7
1.5 Endosymbiontischer Ursprung von Plastiden.....	11
1.6 Lichtsammelantennen phototropher Organismen	13
1.7 Diatomeen	15
1.7.1 Lichtsammelkomplexe der Diatomeen.....	17
1.7.2 Lhcx-Proteine der Diatomeen	18
1.8 Molekulare Mechanismen der Photoprotektion.....	20
1.9 Regulation der Photosynthese-Maschinerie durch Polypeptid-Phosphorylierung.....	22
1.10 Zielsetzung	23
2. Material und Methoden	25
2.1 Verwendete Organismen	25
2.2 Verwendete Oligonukleotide	25
2.3 Verwendete Lichtspektren.....	26
2.4 Verwendete Anzuchtmedien.....	28
2.5 Thylakoid Isolation aus <i>C. meneghiniana</i> (Büchel, 2003).....	30
2.6 Thylakoid Isolation aus <i>A. thaliana</i> (Slovacek und Hind, 1977)	31
2.7 Solubilisierung der Thylakoidmembranen	31
2.8 Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation.....	32
2.9 Gesamtprotein Isolation	32
2.10 Chlorophyll-Bestimmung.....	33

Inhaltsverzeichnis

2.11 Aufkonzentrieren von Proben mittels Centricons.....	33
2.12 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	34
2.12.1 SDS-PAGE (Lämmli, 1970)	34
2.12.2 Phos-tag™-PAGE (Kinoshita <i>et al.</i> , 2009; Longoni <i>et al.</i> , 2015).....	35
2.12.3 IpBN-PAGE (Schägger und Jagow, 1991; Järvi <i>et al.</i> , 2011).....	36
2.12.4 2D-PAGE	38
2.13 Western-Blot (Towbin <i>et al.</i> , 1979)	38
2.14 Immunologische Analysen	39
2.15 Harsh-Stripping von Western-Blot Membranen	41
2.16 Herstellung des Lhcx6_1 spezifischen Antikörpers	42
2.17 Molekularbiologische Verfahren zur Nukleinsäure-Analytik	42
2.17.1 DNA-Isolation	42
2.17.2 RNA-Isolation.....	44
2.17.3 cDNA-Synthese.....	44
2.17.4 Quantitative Echtzeit PCR (qRT-PCR).....	45
2.17.5 Taq-PCR.....	46
2.17.6 Pfu-PCR	47
2.17.7 Phusion-PCR	48
2.17.8 Hot-Fusion (HF) (Fu <i>et al.</i> , 2014)	49
2.17.9 Restriktionsverdau	50
2.17.10 Aufreinigung von DNA aus PCR und Restriktionsverdau	51
2.17.11 Sequenzierung (nach Sanger <i>et al.</i> , 1977)	51
2.17.12 Agarose-Gelelektrophorese	51
2.18 Transformation von Organismen.....	52
2.18.1 Herstellung Chemokompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	52
2.18.2 Transformation von <i>E. coli</i>	53
2.18.3 Transformation <i>C. meneghiniana</i>	54
2.18.4 Biolistische Transformation (Sanford <i>et al.</i> , 1987)	54
2.18.5 Elektroporation (Neumann <i>et al.</i> , 1982).....	55
2.18.6 Bakterielle Konjugation (Diner <i>et al.</i> , 2016).....	55
2.18.7 Verwendete Antibiotika.....	56
2.19 Bioinformatische Analysen.....	56

Inhaltsverzeichnis

2.19.1 Genom-Analyse mittels BLAST (Altschul <i>et al.</i> , 1990)	56
2.19.2 Sequenzvergleich mittels Clustal-Alignment (Higgins und Sharp 1988).....	57
2.19.3 <i>In Silico</i> Phosphorylierungs-Vorhersage (Blom <i>et al.</i> , 1999).....	57
2.19.4 Protein-Modellierung mittels SWISS-MODEL (Guex <i>et al.</i> , 2009).....	57
2.19.5 Protein-Modellierung mittels I-TASSER (Yang und Zhang, 2015)	57
3. Ergebnisse.....	58
3.1 Lhcx6_1 aus <i>Cyclotella meneghiniana</i>	58
3.1.1 Lhcx6_1 Transkript.....	61
3.1.2 Lhcx6_1 Strukturmodell.....	63
3.1.3 Lhcx6_1: Starklichtschutz-Charakter anhand des Strukturmodells.....	64
3.1.4 Lhcx6_1: Phosphorylierungsstellen anhand des Strukturmodells	65
3.1.5 Lhcx6_1: Entwicklung eines Protein-spezifischen Antikörpers	66
3.2 Genexpression von Lhcx6_1	70
3.3 Proteinkomplexe der Thylakoidmembran von <i>C. meneghiniana</i>	73
3.3.1 Native Aufreinigung der <i>C. meneghiniana</i> Thylakoidkomplexe.....	75
3.3.2 Lichtabhängige Thylakoid-Zusammensetzung und Lokalisation von Lhcx6_1 in <i>C. meneghiniana</i>	76
3.4 <i>In vivo</i> Phosphorylierung der Thylakoidmembran Proteine in <i>C. meneghiniana</i>	78
3.5 <i>In vivo</i> Phosphorylierung von Lhcx6_1	81
3.6 Genetische Manipulation von <i>C. meneghiniana</i>	83
3.6.1 Lhcx6_1 Knockdown in <i>C. meneghiniana</i>	85
3.6.2 Adaption eines induzierbaren Expressionssystems für <i>C. meneghiniana</i>	87
3.6.3 β -Estradiol induzierter Lhcx6_1 Knockdown.....	88
4. Diskussion	92
4.1 Sequenz des Lhcx6_1 aus <i>C. meneghiniana</i>	92
4.2 Lhcx6_1 als minore Antenne der zentralen Diatomeen	94
4.3 Antikörper gestützte Lokalisation des Lhcx6_1	96
4.4 Lichtschutz-Charakter des Lhcx6_1	98
4.5 Phosphorylierung von Thylakoidmembran Proteinen in <i>C. meneghiniana</i>	101
4.6 Phosphorylierung von Lhcx6_1	103
4.7 Genetische Manipulation von <i>C. meneghiniana</i>	106
4.8 Phänotyp des Lhcx6_1 Knockdowns	108

Inhaltsverzeichnis

4.9 Modell: Lhcx6_1 als minore Antenne des Photosystem II und Photosystem I mit essenzieller Quenching-Funktion	109
5. Zusammenfassung	112
6. Literaturverzeichnis.....	115
Anhang.....	130

Abkürzungsverzeichnis

μE	μmol Photonen
Abb	Abbildung
ACA	ε-Aminocapronsäure
Ad	addiere = auffüllen
APS	Ammoniumpersulfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BN	Blue Native
Bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
CT	C-Terminus
CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
FCP	Fucoxanthin-Chlorophyll-Protein
FR	Fernrotlicht
gDNA	genomische DNA
HL	Starklicht
HRP	Meerrettichperoxidase
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LHC	Lichtsammelprotein
LhcSR	Stress verwandtes Lichtsammelprotein (≅ LI818)
LL	Schwachlicht
lpBN	large pore Blue Native
Lx1	Lhcx1
Lx61	Lhcx6_1

Abkürzungsverzeichnis

MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
NT	N-Terminus
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	Photosynthetisch aktives Licht
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
RotiGel	Acrylamid ROTH
ROX	Carboxyrhodamine
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
UTR	Untranslatierte Region
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
α -DDM	n-Dodecyl- α -Maltosid

1. Einleitung

1.1 Die Biomembran

Den Grundpfeiler allen organischen Lebens stellen an Biomembranen ablaufende Redox-Reaktionen dar. Diese Biomembranen beherbergen hierbei Reaktionsräume und stellen Permeabilitätsschranken dar, indem die Membran eine geschlossene Lipiddoppelschicht bildet, was Gorter und Grendel bereits im Jahre 1925 erstmalig anhand von Blutzellen untersuchten und mit den Worten: „*We therefore suppose that every chromocyte is surrounded by a layer of lipoids, of which the polar groups are directed to the inside and to the outside, in much the same way as Bragg [...] supposes the molecules to be oriented in a crystal of fatty acid, and as the molecules of a soap bubble are according to Perrin [...]*” beschreiben (Gorter und Grendel, 1925). Diese Selbstassemblierung von Biomembranen in wässriger Umgebung ist auf die amphiphilen Eigenschaften von hauptsächlich Phospho- und Glykolipiden zurückzuführen (Stryer Biochemie, 2018) und mögliche Konformationen der Assemblierung in Abb. 1 beispielhaft dargestellt.

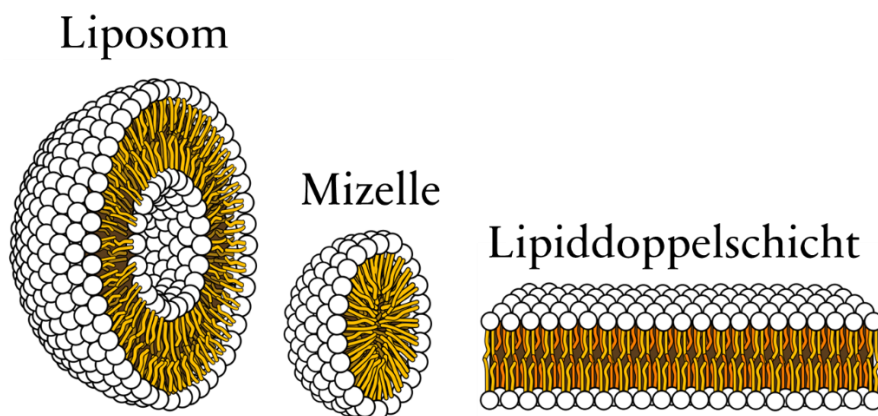


Abbildung 1.0: Selbstassemblierung von amphiphilen Lipiden (modifiziert nach Ruiz Villarreal, 2007).

Die verschiedenen Möglichkeiten einer Selbstassemblierung von amphiphilen Lipiden anhand eines Liposoms, einer Mizelle und der Lipiddoppelschicht. Weiße Kugel = Hydrophile Kopfgruppe; Gelber Strang = Hydrophober Schwanz.

Einleitung

Die geschlossene Lipiddoppelschicht bildet die großen Reaktionsräume einer Zelle und ist mit diversen Proteinen assoziiert, von denen etliche Membran-integral vorliegen. *De facto* sind ca. 20 – 30 % aller Gene im biologischen Reich Membranprotein codierend (Krogh *et al.*, 2001).

1.2 Autotrophe Lebensformen: Chemotrophie

Die heterotrophe Natur des Menschen und etlicher anderer Lebewesen, setzt eine autotrophe Lebensform voraus, welche die auf dem Planeten verfügbaren, anorganischen Substanzen verstoffwechselt und mit dem Aufbau organischer Substanz die Basis der biologischen Welt bildet. An frühester Stelle der Autotrophie-Vertreter steht vermutlich ein chemotropher Organismus, der mittels chemiosmotischer Biomembran und dort ablaufender Redoxreaktion die Fähigkeit zur elektrochemischen ATP-Gewinnung erlangte. Die theoretischen Grundlagen solcher Organismen kann den bahnbrechenden Überlegungen von Russel (Russel *et al.*, 1988; Russel *et al.*, 1997; Martin und Russel, 2003; Russel, 2006) sowie Wächtershäuser (Wächtershäuser 1988; Wächtershäuser 1992; Wächtershäuser 2006) entnommen werden (Abb. 2), wobei die Energiegewinnung früher biochemischer Systeme vermutlich auf die Redox-Eigenschaften von Eisen-Schwefel-Mineralien und ähnlichen Metallverbindungen zurückzuführen ist. Diese Hypothese kann an den exergonischen Reaktionseigenschaften der Oxidation von Eisensulfid und Hydrogensulfid zu Pyrit nachvollzogen werden (Wächtershäuser, 1988), wobei eine gekoppelte Reduktion von Kohlenstoffdioxid zu Methan jüngst beschrieben wurde (Thiel *et al.*, 2019). Diese Redoxreaktion und die damit verbundene Fixierung anorganischen Kohlenstoffs könnte somit die Basis der biochemischen Lebensformen darstellen und die Selbstassemblierung von Membran-Räumen mit initiiert haben (Abb. 2). Überreste dieser, am Grunde der biologischen Evolution stehender, Innovation stellen beispielhaft die

Einleitung

essenziellen Eisen-Schwefel-Membranproteine des chloroplastidären und mitochondrialen Energiestoffwechsels dar.

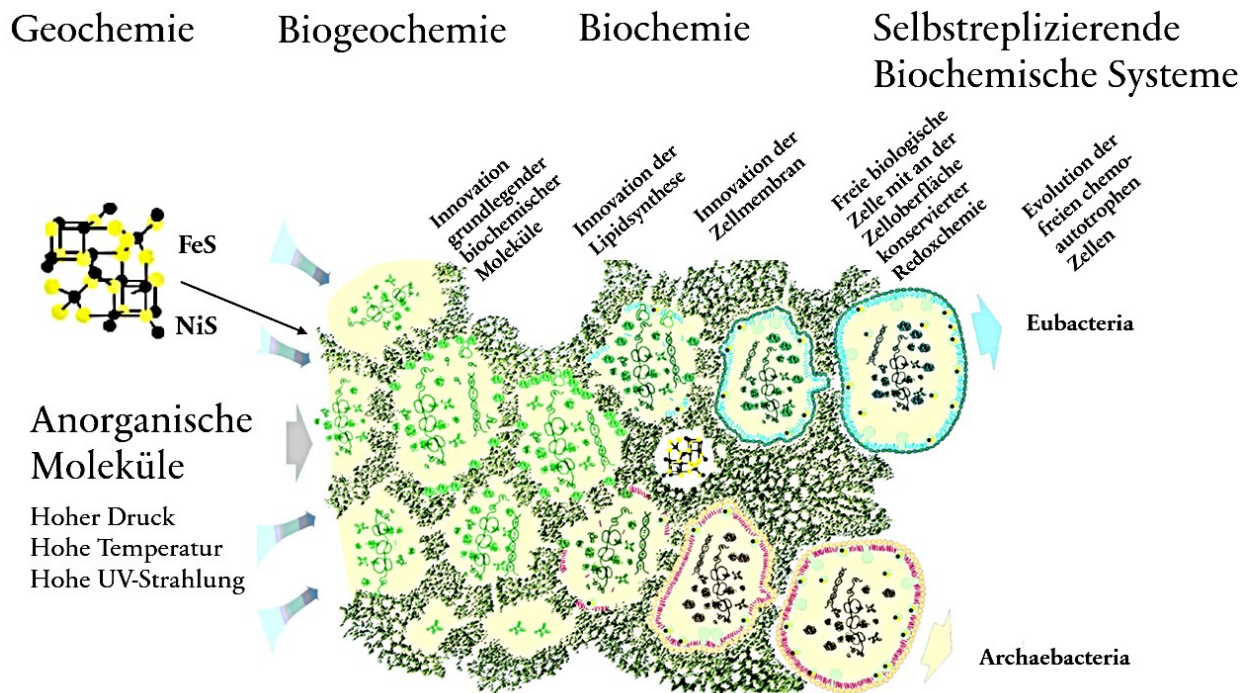


Abbildung 2.0: Mögliche, frühgeschichtliche Entstehung biologischen Lebens an strukturbildenden Eisen- und Nickelsulfid Ablagerungen hydrothermaler Quellen im Ozean; nach Martin und Russel (2006), modifiziert.

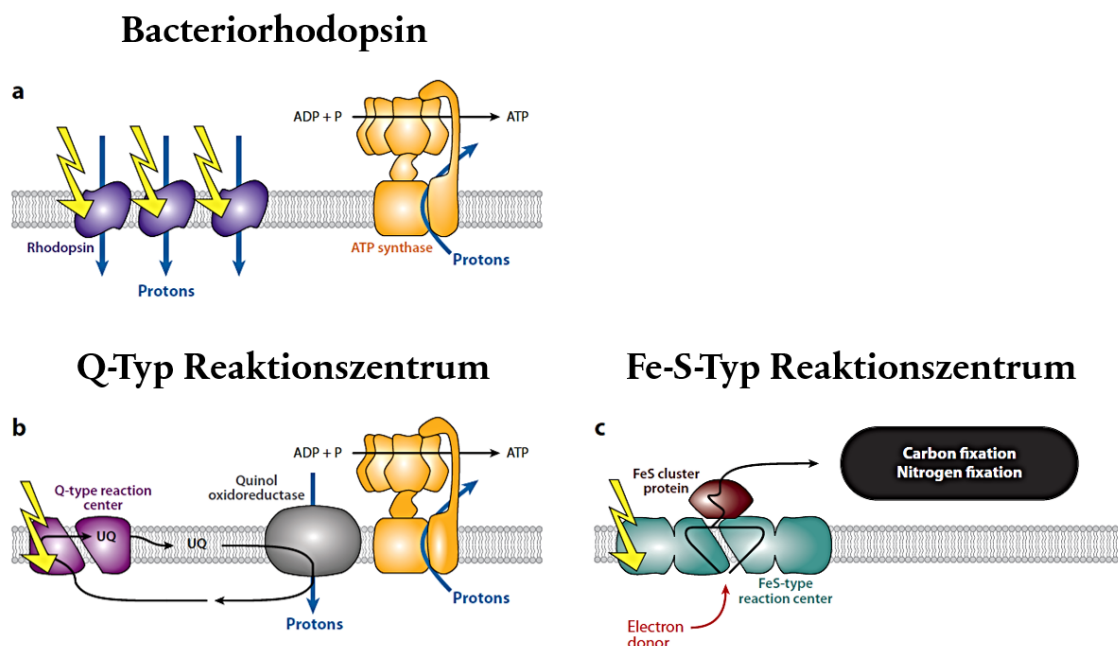
Die unter hohem Druck, hoher Temperatur und hoher UV-Strahlung ablaufenden geochemischen Prozesse etablierten Reaktionsräume aus Eisen- und Nickelsulfid, die immer komplexere Makromoleküle hervorbrachten. Dadurch konnte eine Evolution zu biogeochemischen und schlussendlich biochemischen Prozessen durchlaufen werden. Letztere sind durch die Innovation der Lipidsynthese und Assemblierung einer Lipidmembran ermöglicht und könnten schlussendlich freie biologische Systeme hervorgebracht haben, die sich womöglich in Eubakterien und Archaeobakterien aufspalteten. FeS = Eisensulfid, NiS = Nickelsulfid.

Die Komplexifizierung der anfänglich geochemischen Prozesse könnte somit die ersten freien Zellen, mit allen grundlegenden biochemischen Stoffwechselvorgängen, hervorgebracht haben, die sich in chemotrophe Eubakterien und Archaeobakterien aufspalteten. Jene frühgeschichtliche, unabhängige Entwicklung und Aufspaltung in diese zwei Domänen kann anhand diverser Divergenzen in grundlegenden biochemischen Reaktionen postuliert werden. Anhaltspunkte dafür sind zum Beispiel die Unterschiede in Membranlipid-Biosynthese, Purin-Synthese, RNA-Polymerasen und vieler anderer essenzieller Vorgänge (Martin und Russel, 2003).

Einleitung

1.3 Autotrophe Lebensformen: Anoxygene Photosynthese

Diese Form der chemo-autotrophen Energiegewinnung konnte jedoch erdgeschichtlich bald durch die revolutionäre Entwicklung photo-autotropher Redoxreaktionen und damit verbundener Bereitstellung biochemischer Energie verdrängt werden. Durch diese Art der Autotrophie waren die Organismen, im Gegensatz zur Chemoautotrophie, nicht mehr auf ein vorgegebenes Redoxgefälle angewiesen, sondern konnten die Redox-Kraft durch gezielte, Photon-getriebene Aktivierung eines reduzierenden Stoffes bewerkstelligen (vgl. Abb. 3 b und c). Die Absorption elektromagnetischer Strahlung ist in allen heutigen Phototrophen auf Chromophore mit konjugierten π -Elektronensystemen zurückzuführen. Diese Moleküle besitzen durch ihre delokalisierten Elektronen breite Absorptionsbanden und damit die Möglichkeit elektromagnetische Strahlung verschiedener Wellenlängen zu absorbieren. In den hier beschriebenen biologischen Systemen sind diese Chromophore dabei an Proteine assoziiert, welche membranintegral vorliegen. Frühe phototrophe Organismen griffen wahrscheinlich, wie auch einige anoxygene phototrophe heute noch, zu photon-aktivierten Wasserstoff- Eisen-, Stickstoff-, oder Schwefelverbindungen als Elektronendonoren für Redoxreaktionen (Fischer *et al.*, 2016) zurück. Die Grundlagen des anoxygenen, phototrophen Stoffwechsels sind in Abbildung 3 und 4 dargestellt.



Einleitung

Abbildung 3.0: Beispielhafte Wege des phototrophen, chemiosmotischen Energieflusses an einer Biomembran aus Hohmann-Marriott und Blankenship (2011); modifiziert.

Die verschiedenen Wege des phototrophen Energieflusses an Biomembranen sind anhand von drei Beispielen aufgezeigt. a: Biomembran mit photosensitiven Rhodopsinen zur Protonen-Translokation, Aufbau eines Protonengradienten und ATP-Synthese. b: Biomembran mit Quinon-Typ Reaktionszentrum, zyklischem Elektronentransport und Quinol-Oxireductase als Protonenpumpe zum Aufbau eines Protonengradienten sowie ATP-Synthese. c: Photon-stimulierter, linearer Elektronentransport zur Generierung von Reduktionsmitteln zur Kohlenstoff- und Stickstoff-Fixierung über Eisen-Schwefel-Proteine.

1.3.1 Bacteriorhodopsin

Als einfachstes Beispiel eines phototrophen Mechanismus, im Zusammenhang der biochemischen Energieerzeugung, soll hier das Bacteriorhodopsin dienen, welches sich von der sonstigen phototrophen Funktionsweise durch das direkte Pumpen von Protonen unterscheidet (Abb. 3 a). Vertreter der extremophilen Archaeen der Halobakterien nutzen diesen simplifizierten, phototrophen Mechanismus, um unter anaeroben Bedingungen Energie zu gewinnen. Hierbei wird elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich zwischen 470 und 650 nm von dem Chromoprotein absorbiert. Eine damit herbeigeführte Konformationsänderung des Proteins wird zum Pumpen von Protonen und dem Aufbau eines chemiosmotischen Potentials verwendet (Oesterhelt und Stoeckenius, 1971; Oesterhelt und Stoeckenius, 1973; Grote und O'Malley, 2011).

1.3.2 Q-Typ Reaktionszentrum (RCII)

Als Q-Typ Reaktionszentrum wird der Typ Proteinkomplex bezeichnet, der mittels Photo-Exzitation eine Ladungstrennung vollzieht und damit Chinon-Verbindungen (Chinon, englisch Quinon = Q) reduzieren kann. Ein Chinon-Oxireduktase Proteinkomplex (Cytochrom-bc₁, Abb. 4.0) kann nachfolgend die Elektronenenergie zum Pumpen von Protonen nutzen. Dieser Typ Reaktionszentrum kann einen zyklischen Elektronentransport durchführen, wobei das Elektronendefizit der Ladungstrennung im Reaktionszentrum wieder durch dieses Elektron geschlossen und der Mechanismus von

Einleitung

neuem beginnen kann. Ein Beispielorganismus der phototrophen Vertreter dieses einfachen Photosystems sind die Purpurbakterien, welche solch ein, mit Bakteriochlorophyllen zur Absorption elektromagnetischer Strahlung versehenes, System nutzen, um ein chemiosmotisches Potential aufzubauen und ATP zu generieren. Das Reduktionspotential dieses anoxygenen Systems reicht aus, um beispielsweise Schwefelverbindungen als Elektronendonoren zu verwenden (Abb. 4.0) (Hohmann-Marriott und Blankenship, 2011).

1.3.3 Fe-S-Typ Reaktionszentrum (RCI)

Das Fe-S-Typ Reaktionszentrum beschreibt einen Chromoprotein-Komplex, welcher mit Hilfe der Energie der Photo-Exzitation und Ladungstrennung letztendlich ein Protein mit Eisen-Schwefel-Cluster (Fe-S) reduziert. Analog zum Q-Typ wird auch hier die Elektronentransportkette zur Translokation von Protonen mit Hilfe eines Cytochrom-bc₁-Komplexes (Abb. 4.0, rechts) verwendet. Der große Vorteil des Fe-S-Reaktionszentrums ist jedoch die Möglichkeit das Fe-S-Cluster Protein zur Reduktion von NAD⁺ zu NADH zu verwenden und damit nachfolgend beispielsweise Kohlenstoffdioxid oder Stickstoff zu fixieren. Dieser Typ Reaktionszentrum ist unter anderem in den anoxygen phototrophen Grünen Schwefelbakterien zu finden, wobei auch diese Organismen hauptsächlich Schwefelverbindungen als Elektronendonatoren verwenden (Hohmann-Marriott und Blankenship, 2011).

Einleitung

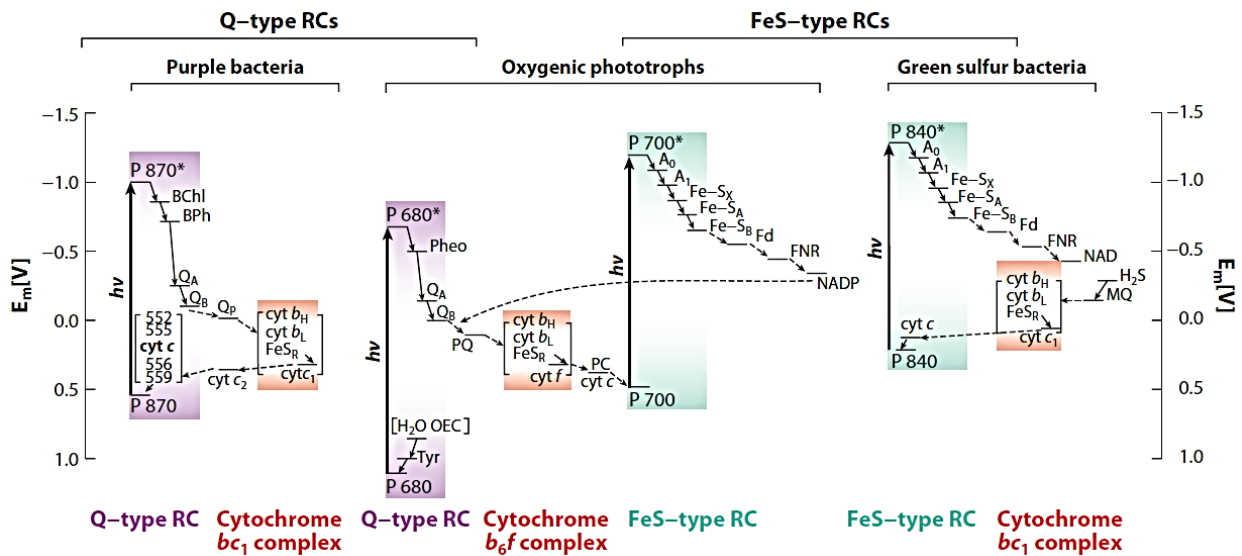


Abbildung 4.0: Schematische Darstellung der anoxygenen und oxygenen Photosynthese mitsamt Redoxpotential anhand der verschiedenen Reaktionszentrums (RC)-Typen; nach Hohmann-Marriott und Blankenship, (2011).

Zwei Wege des phototrophen Energieflusses an Biomembranen sind anhand des Q-Typ Reaktionszentrums (z. B. Purpurbakterien) und Fe-S-Typs (z.B. Grüne Schwefelbakterien) dargestellt. Das Redoxpotential steht dabei für die Fähigkeit Elektronen abzugeben bzw. aufzunehmen. Der Elektronenfluss geht dabei vom negativsten zum positivsten Potential (E_m [V]) freiwillig von statten und kann biochemisch genutzt werden. Die Großen Pfeile illustrieren die Photoexzitation ($h\nu$) des integralen Reaktionszentrum-Chromoproteins vom Grundzustand P zum angeregten Zustand P*. Das Absorptionsmaximum des jeweiligen RC-Proteins ist mit einer Zahl darüber angegeben. Das angeregte Reaktionszentrum kann eine Ladungstrennung durchführen und somit ein Elektron über nachgeschaltete Protein-Komplexe weiterleiten. Der Cytochrom-Komplex dient dabei als, mit dieser Elektronenenergie getriebene, Protonenpumpe zur ATP-Generierung.

1.4 Autotrophe Lebensformen: Oxygene Photosynthese

Die Innovation einer oxygenen Photosynthese bildet die Basis allen makroskopischen Lebens der heutigen Erde. Diese revolutionäre, biochemische Neuheit ist auf die Reihenschaltung des Q-Typ und Fe-S-Typ Reaktionszentrums und die Änderung von Bakteriochlorophyll zu Chlorophyll zurückzuführen, wodurch das nötige Redoxpotential aufgebracht werden konnte, um das in großen Mengen verfügbare Wasser zu spalten und als Elektronendonator der phototrophen Energieerzeugung zu nutzen sowie nachfolgend NADPH herzustellen (Abb. 4.0). Der hierbei freiwerdende Sauerstoff kann erdgeschichtlich gut datiert werden und gibt einen Einblick in die Evolution der frühen oxygenen Photosynthese (Abb 5.0).

Einleitung

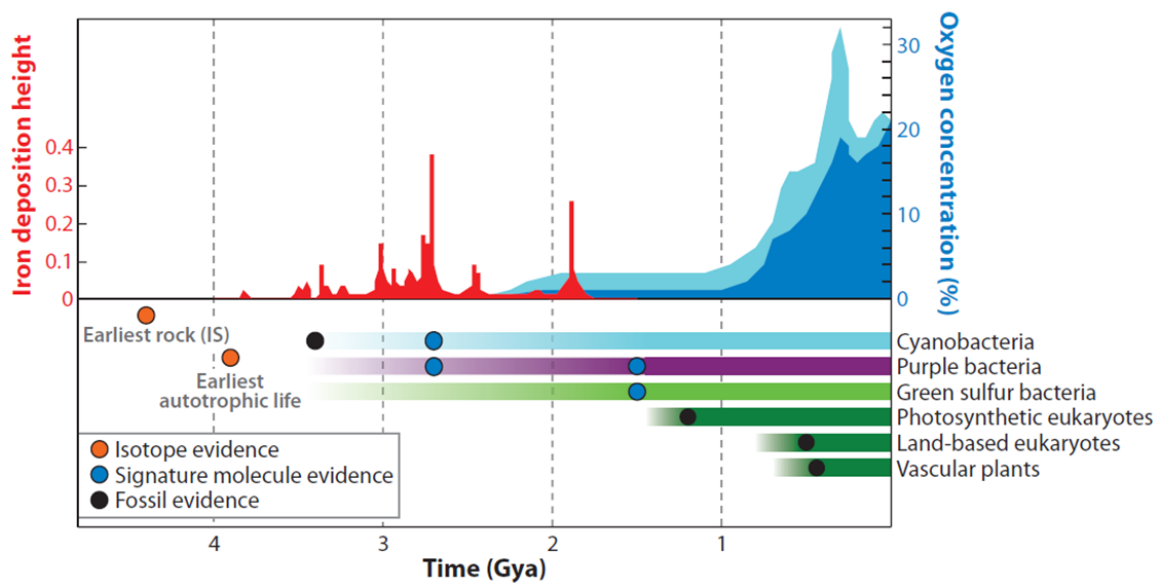


Abbildung 5.0: Evolution des Lebens im Laufe der frühen Erdgeschichte; nach Hohmann-Marriott und Blankenship (2011).

Die Bildung von Eisenablagerungen und Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre, bestimmt anhand geologischer Merkmale, im Laufe der letzten 4,5 Mrd. Jahre (Gya = Giga years ago) und deren Zusammenhang mit dem Auftreten phototropher Organismen sind graphisch dargestellt. Eisenablagerungen gelten als Indiz für die Bildung von Sauerstoff im Urozean, aufgrund der Reaktion von Eisen mit Sauerstoff zu Eisenoxiden. Alternativ könnten diese Ablagerungen durch anoxygene Phototrophie entstanden sein. Die Zunahme der Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre wird in zwei Phasen eingeteilt, wobei zunächst ein atmosphärischer Anstieg auf 2 % für ~1,5 Gya zu verzeichnen ist. Mit Entwicklung von photosynthetischen Eukaryoten steigt dieser innerhalb eines Gya auf ca. 20 %.

Neben des Aufkommens von Eisenablagerungen in Gesteinsschichten vor 2 bis 4 Mrd. Jahren, welche vermutlich Zeugen früher Autotrophae sind, kann eine Zunahme des Sauerstoffgehalts in der Erdatmosphäre verzeichnet werden. Dieser Anstieg ist zunächst über einen längeren Zeitraum auf ein Minimum beschränkt. Ein vor ca. 1 Mrd. Jahren verzeichneter, rascher Anstieg des Sauerstoffgehalts der Atmosphäre auf ca. 20 % kann mit vermehrtem Aufkommen phototropher Eukaryoten in Relation gesetzt werden. Als Innovator dieser revolutionären Art der Autotrophie ist ein Cyanobakterien ähnlicher Organismus anzusehen, dem der anfängliche Anstieg der Sauerstoffkonzentration zugeschrieben wird (Fischer *et al.*, 2016). Die konservierte, photosynthetische Membranprotein-Architektur der oxygenen Photosynthese betreibenden Organismen, ähnlich wie ihn vermutlich schon dieser erste Innovator nutzte, ist in Abb. 6.0 dargestellt.

Einleitung

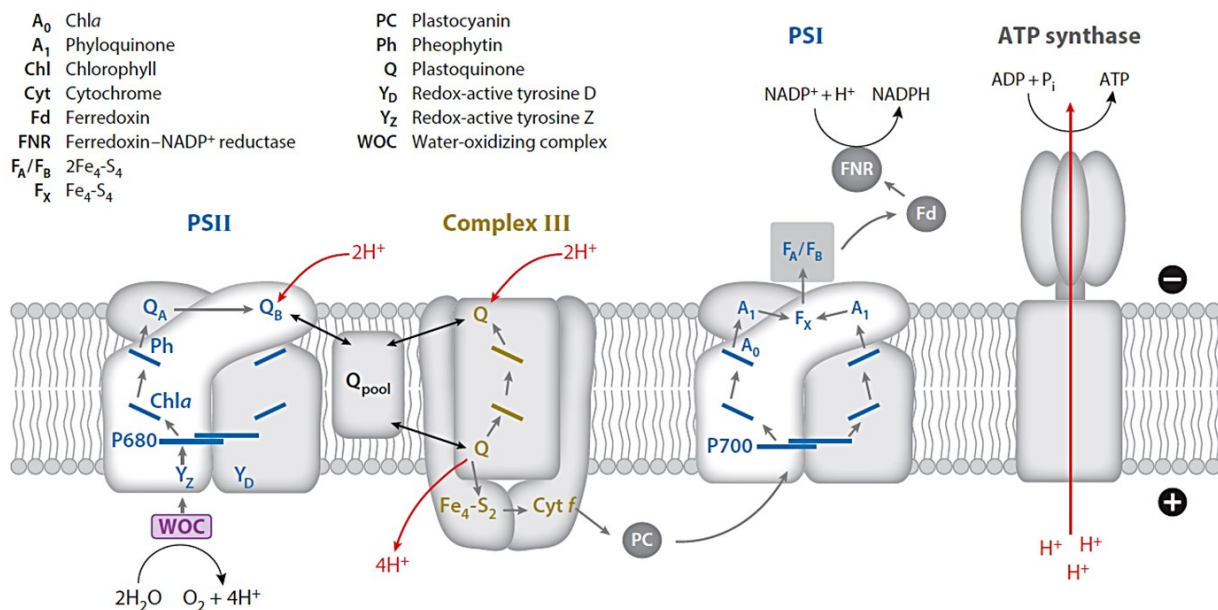


Abbildung 6.0: Querschnitt einer Biomembran mit integralen, in Reihe geschalteten Proteinkomplexen der oxygenen Photosynthese aus Fischer *et al.* (2016).

Die Grauen Pfeile stellen die Richtung des Elektronenflusses zwischen den Proteinkomplexen dar. Elektronendonator ist Wasser. Rote Pfeile markieren die Translokation von Protonen entlang der Biomembran. Photosystem II (PSII) ist vergleichbar mit dem zuvor beschriebenen Q-Typ Reaktionszentrum, Photosystem I (PSI) mit dem des Fe-S-Typs. Komplex III ist der Protonen pumpende Chinon-Elektron Akzeptor mit Oxireduktase Funktion. Plus an der Membran steht für eine höhere Protonenkonzentration an dieser Membranseite, vergleichend mit Minus. Der Weg des Elektrons beginnt durch die Photoexzitation des PSII, Spaltung von Wasser in Sauerstoff und Protonen am Wasserspaltungs-Apparat (WOC) und Übertragung zweier Elektronen auf den membranlöslichen Plastochinonpool (Q-pool). Es folgt ein Fluss des Elektrons durch Komplex III (Cytochrom-*b*₆f) und damit Translokation von Protonen. Für zusätzliche Protonentranslokation kann das Elektron hier einen zyklischen Transport durch den Q-pool durchlaufen. Komplex III überträgt das Elektron auf das wasserlösliche Plastocyanin und anschließend auf PSI. Durch weitere Photoexzitation überträgt PSI das Elektron auf Ferredoxin, wodurch schlussendlich NADP⁺ reduziert werden kann und für weiteren Metabolismus verwendet wird. Der chemiosmotische Protonengradient wird durch die ATP-Synthase zur Generierung von ATP verwendet.

Die Redoxkraft dieses Systems macht es möglich Wasser zu spalten und mittels Elektronentransportkette ein chemiosmotisches Potential entlang der Biomembran aufzubauen.

Die membraninternen Proteinkomplexe gewährleisten den nötigen Elektronentransport zur ATP und Redoxäquivalent Generierung. Diese photosynthetischen Membranen werden Thylakoidmembranen genannt. Die Begrifflichkeit geht auf die Assoziation dieser, Protein bespickten Membraneinstülpungen, mit einem „Sack“ griechisch „*thylakos*“ zurück. Der Innenraum dieser Membraneinstülpungen ist als Thylakoid-Lumen definiert, während der nach außen gerichtete Teil das Stroma bildet. Der Aufbau des

Einleitung

Protonengradienten läuft über eine Akkumulation der Protonen im Lumen mit schlussendlich zielgerichtetem Rückstrom ins Stroma. Die Absorption elektromagnetischer Strahlung von Chromophoren und Energietransfer auf das Reaktionszentrum (RZ) des PSII starten die Elektronentransportkette. Dieses Reaktionszentrum, bestehend aus dem Heterodimer D1 und D2 (PsbA/D) (Marder *et al.*, 1987), beinhaltet Chlorophyll-Moleküle, die ein Absorptionsmaximum bei 680 nm aufweisen (P680). Dieser historisch bedingt „*special pair*“ genannte Cluster kann nach Anregung mit ausreichender Energie (P680*) eine Ladungstrennung durchführen und ein Elektron auf das naheliegende Pheophytin a-Molekül (Chlorophyll a ohne zentrales Magnesiumatom) übertragen, welches das Elektron wiederum an das an D2 gebundene Plastochinon (Q_A) überträgt. Die Weitergabe des Ladungsträgers erfolgt anschließend auf das periphere Plastochinon (Q_B) am D1. Die Elektronenlücke des oxidierten P680⁺, welches mit 1,25 V das stärkste Oxidationsmittel des biologischen Reichs darstellt (Rappaport und Diner, 2008), wird zunächst durch ein naheliegendes Tyrosin-Molekül (Y_Z) gefüllt. Dieses wiederum deckt das Elektronendefizit über die Spaltung von Wasser am PSII assoziierten Wasserspaltungsapparat (WOC). Nach Übertragen zweier Elektronen auf Q_B und zusätzlicher Bindung zweier Protonen aus dem Stroma, dissoziiert dieses Plastohydrochinon in den membranintegralen PQ-pool und weiter zum Cytochrom-b₆f-Komplex (Komplex III). In diesem Komplex läuft die Weiterleitung eines Elektrons über das Eisen-Schwefel Rieske Protein (Rieske *et al.*, 1964) hin zu einem Cytochrom und dient anschließend der Reduktion des wasserlöslichen, lumenalen ein Elektronen-Überträgers Plastocyanin. Während der Oxidation des Plastochinols diffundieren Protonen in das Lumen. Das zweite Elektron des oxidierten Semichinon-Radikals wird infolgedessen über weitere Cytochrome auf ein Plastochinon des Cytochrom-b₆f-Komplex übertragen. Nach weiterer Bindung eines Plastohydrochinons an jenem Komplex und Übertragung eines Elektrons auf Plastocyanin, kann das in diesem Komplex liegende Semichinon-Radikal weiter zu Plastochinol reduziert werden und unter Aufnahme von zwei Protonen aus dem

Einleitung

Stroma als Plastohydrochinon in den PQ-pool entlassen werden. Dieses Phänomen wird als Q-Zyklus bezeichnet und ermöglicht netto pro Plastohydrochinon, ausgehend vom PSII, die Reduktion zweier Plastocyanine und Translokation von vier Protonen ins Lumen der Thylakoidmembran. Plastocyanin dient Folge dessen dazu, eine Elektronenlücke im Photosystem I (PSI) zu schließen. Analog zum PSII führt dieses, Chromophor tragende Heterodimer, eine Photon-aktivierte Ladungstrennung durch, wobei die integralen Ladungstrennungs-Chlorophylle aufgrund ihres Absorptionsmaximum P700 genannt werden (Rutherford und Heathcote, 1985). Das Elektron wird zunächst auf weiteres Chlorophyll a (A_0) weitergereicht und nachfolgend an das festgebundene Phyllochinon (Vitamin K1) übertragen. Es folgt eine Reduktion zweier Eisen-Schwefel-Cluster (F_x , F_A/F_B) und schlussendlich Ferredoxins, welches an stromaler Seite des PSI lokalisiert ist. Eine anschließende Reduktion von $NADP^+$ zu $NADPH$ kann durch die Ferredoxin- $NADP^+$ -Reduktase katalysiert werden und ermöglicht den Einsatz dieses Stoffes in weiteren Stoffwechselfvorgängen. Die in das Lumen translozierten Protonen dienen der ATP-Synthase als chemiosmotischer Motor der ATP-Produktion.

1.5 Endosymbiontischer Ursprung von Plastiden

Die oxygene Photosynthese der Eukaryoten findet an den Thylakoidmembranen der Plastiden statt. Die Thylakoidmembranen der oxygen phototrophen Pioniere: Cyanobakterien, stellen parallel zur Plasmamembran laufende Membranen dar, deren Stroma das Cytoplasma des Organismus bildet. Das Entstehen der Plastiden heutiger Photosynthese betreibender Eukaryoten, sowie auch der Mitochondrien dieser Organismen, ist höchstwahrscheinlich auf eine Endosymbiose zweier altertümlicher Einzeller zurückzuführen (Abb. 7.0), die sich von den ursprünglichen Archaeobacteria und Eubacteria (vgl. 1.2) ableiten. Diese Idee wurde bereits, anhand von Chloroplasten, 1883 das erste Mal beschrieben (Schimper, 1883) und gilt bis heute als wahrscheinlichste

Einleitung

Grundlage des Entstehens dieser Zellorganellen (Mereschkowsky, 1905; McFadden, 2001; Archibald, 2015).

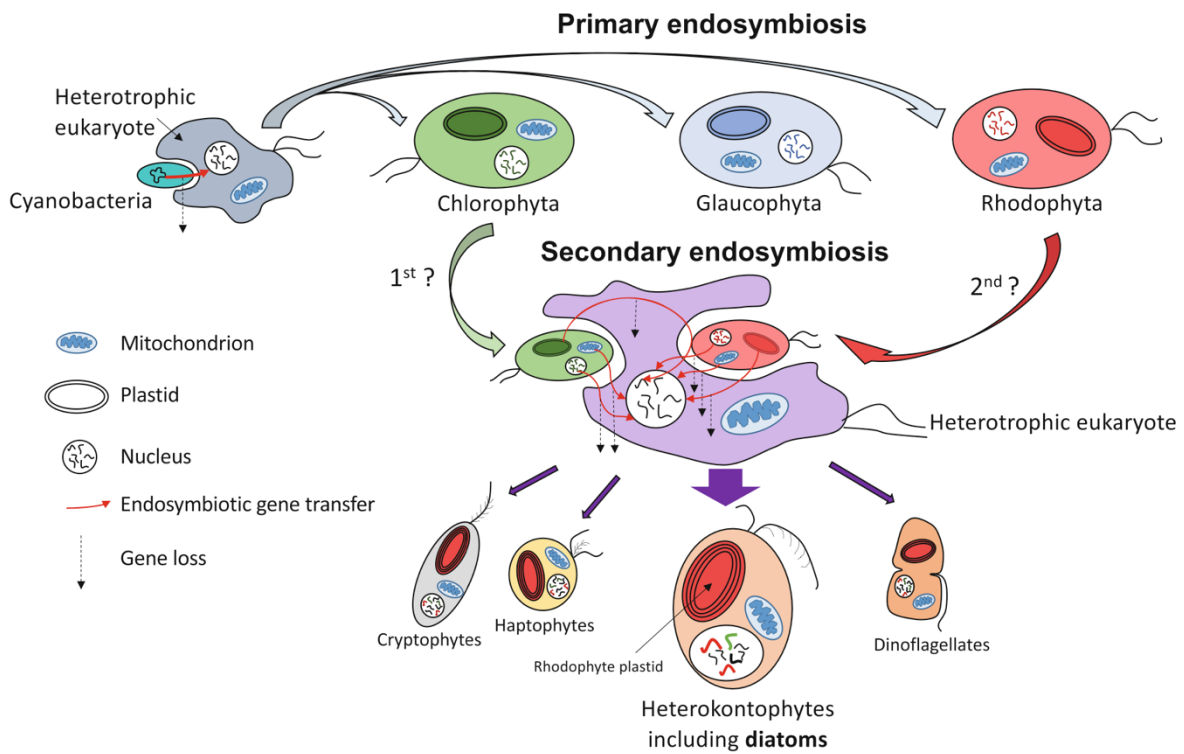


Abbildung 7.0: Theoretische Entstehung der Plastiden primärer und sekundärer Endosymbionten aus Mock *et al.*, in Falciatore und Mock (2022).

Die primäre Endosymbiose brachte Chloroplasten tragende Organismen aus einer Aufnahme eines oxygene Photosynthese treibenden Cyanobakteriums in einen heterotrophen Eukaryoten hervor. Aus den Primärsymbionten der Chlorophyta und Rhodophyta kamen zweite Endosymbiosen zustande, woraus einerseits Euglenophyta und Chlorarachniophyta (nicht gezeigt) sowie die Organismen der Cryptophyten, Haptophyten, Dinoflagellaten und Diatomeen hervorgingen. Während Eugleno- und Chlorarachniophyta aus sekundärer Endosymbiose mit einer Grünalge hervorgingen, ist der endosymbiontische Ursprung der Crypto-, Hapto, Heterokontophyten und Dinoflagellaten umstritten. In diesen Organismen sind sowohl „grüne“ als auch „rote“ Gene zu finden, die womöglich aus sequenzieller, sekundärer Endosymbiose eines Chlorophyten, Reduktion dessen und nachfolgend eines Rhodophyten entstanden. Denkbar ist auch die sekundär endosymbiontische Aufnahme eines Rhodophyten und anschließendem lateralen Gentransfer der „grünen Gene“.

Dieser Theorie zufolge ist der heutige Chloroplast somit als ehemals freilebendes Cyanobakterium zu sehen, welches von einem heterotrophen Eukaryoten aufgenommen wurde. Dieser heterotrophe Eukaryot geht dabei ebenfalls einem vorigen Endosymbiose-Ereignis hervor, wobei eine Archaeae ein α -Proteobakterium integrierte und die Struktur des Zellkerns sowie des Mitochondriums etabliert wurden (Archibald, 2015). Das von

Einleitung

dieser heterotrophen Lebensform phagozytierte, aber nicht in der Vakuole verdaute, Cyanobakterium wurde nachfolgend nicht mehr autonom lebensfähig und durch endosymbiontischen Gentransfer vollständig in den Stoffwechsel und Lebenszyklus des Wirts integriert. Der daraus entstandene Plastid trägt auch heute noch eine Doppelmembran um das Organell, welche vermutlich auf die ursprünglichen Plasmamembranen des Cyanobakteriums zurückzuführen sind. Diese Art der Phagozytose brachte drei Arten der phototrophen Eukaryoten hervor, die alle einen gemeinsamen Vorfahren teilen: Die Chlorophyta, Glaucophyta und Rhodophyta (Reyes-Prieto *et al.*, 2007), welche sich in einigen Details ihrer Photosynthesemaschinerie unterscheiden. Vertreter der Chlorophyta und Rhodophyta brachten zudem sekundäre Endosymbionten zum Vorschein. Hierbei wurden diese in einer weiteren Phagozytose von einem heterotrophen Eukaryoten aufgenommen und integriert, woraus Organismen mit drei oder vier Hüllmembranen tragende Plastiden hervorgingen. Die Aufnahme eines Rhodophyten führte zu den heutigen Vertretern der Cryptophyten, Haptophyten, Dinoflagellaten sowie Diatomeen. Phylogenetische Analysen legen die Aufnahme eines Chlorophyten, endosymbiontischen Gentransfer, eine folgende Reduktion des Chloroplasten und weitere sekundäre Endosymbiose eines Rhodophyten nahe, welches zur Entstehung der beschriebenen Gruppen der sekundären Endosymbionten führte (Moustafa *et al.*, 2009).

1.6 Lichtsammelantennen phototropher Organismen

Zur besseren Nutzung des verfügbaren Lichtangebots besitzen die heutigen phototrophen Vertreter Lichtsammelproteine. Diese Lichtsammelantennen (LHC = light harvesting complex) tragen die Chromophore zur Absorption elektromagnetischer Strahlung und sind mit den Photosystemen assoziiert. Bis auf die Phycobilisomen der Cyanobakterien, sowie der Rhodophyta, die Phycobiline der Cryptophyceen und den Peridinin-Chl-

Einleitung

Proteinen der Dinophyta sind diese Licht- absorbierenden Proteine membranintegral vorliegend und aus drei α -Helices zusammengesetzt. Zwei der Helices kreuzen sich, während die Verbleibende die Membran senkrecht durchspannt. Die Polypeptide besitzen zudem konservierte Bindestellen für Carotinoide und Chlorophylle und sind in Analogie zu den am besten untersuchten LHC Proteinen des PSII höherer Pflanzen beschrieben (Kühlbrandt *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2004; Standfuss *et al.*, 2005) (Abb. 8.0).

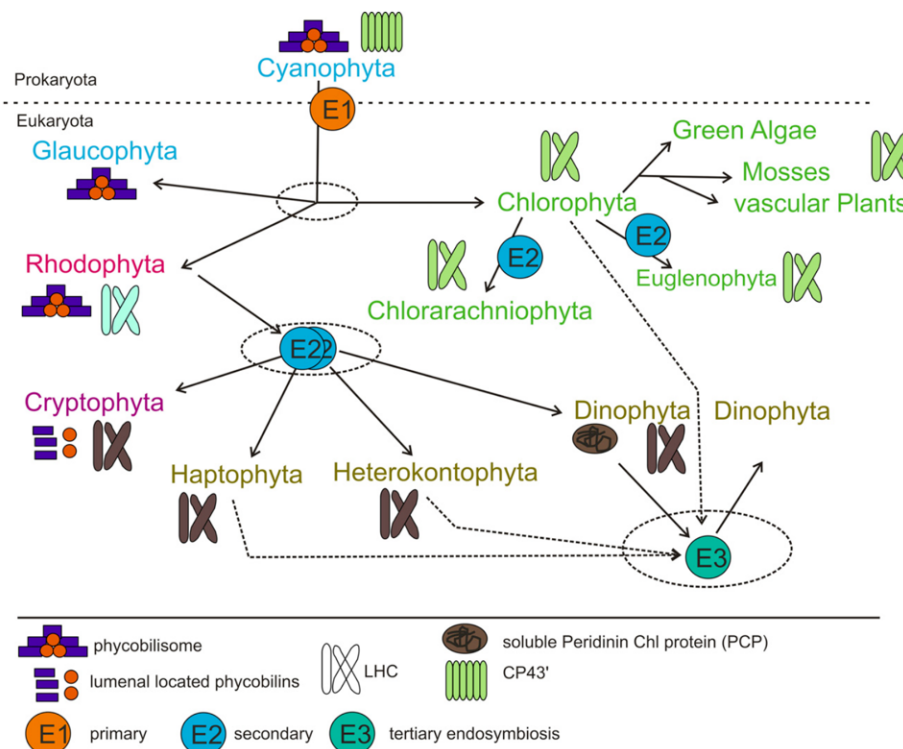


Abbildung 8.0: Unterschiede der LHC-Struktur phototropher Eukaryoten aus Büchel (2015).

Die Lichtsammelproteine der verschiedenen phototrophen Eukaryoten unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Pigmentierung und haben größtenteils eine aus drei α -Helices bestehende Tertiärstruktur gemein. Während die Lichtsammelkomplexe der Cyanobakterien und der primären Endosymbionten Glaucophyta noch aus membranaufliegenden Phycobilisomen, mit kovalenter Pigmentbindung, bestehen, besitzen alle anderen Vertreter hauptsächlich Lichtsammelkomplexe analog zu pflanzlichen LHCs. Diese zeichnen sich durch die nicht kovalente Bindung von Chlorophyllen und Xanthophyllen aus, welche als akzessorische Pigmente fungieren. Während alle Chlorophyta in ihren LHCs Chlorophyll b (Chl b) und Lutein tragen sind diese bei den sekundären Symbionten durch Chlorophyll c (Chl c) und oftmals Fucoxanthin ersetzt. Ausnahmen stellen hier die Cryptophyta mit Alloxanthin oder auch die Xanthophytes mit Violaxanthin und Heteroxanthin dar. Auch die aus einer tertiären Endosymbiose entstandenen Dinophyta enthalten Chl c, manche aber Peridinin anstelle Fucoxanthins. Die LHCs der Rhodophyta enthalten das Xanthophyll Zeaxanthin, die der Cryptophyta Alloxanthin. Alle LHC Analoga binden zudem Chlorophyll a.

Einleitung

Je nach ökologischer Nische etablierten sich unterschiedliche akzessorische Pigmente dieser phototrophen Organismen. Während die am besten untersuchten Lichtsammelproteine der höheren Pflanzen Chlorophyll a, b und als Haupt-Xanthophyll Lutein tragen, sind diese, in den zur Abteilung der Heterokontophyta zählenden Diatomeen, durch Chlorophyll a, c und Fucoxanthin ersetzt. Diese, in der Polypeptidstruktur eingebetteten, Pigmente sind für die Lichtabsorption zuständig und transferieren die absorbierte Photonen-Energie hin zum Reaktionszentrum der Photosysteme. Jener Excitonentransfer erfolgt strahlungslos im gekoppelten Pigment-Protein Netzwerk und ist mit über 95% Effizienz der effizienteste, beobachtete Energietransfer-Mechanismus, was vermutlich auf einen delokalisierten, kohärenten Status dieses Quanten-Systems zurückzuführen ist und in Lichtsammelkomplexen diverser Organismen theoretisch sowie experimentell überprüft wurde (Engel *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Ishizaki *et al.*, 2010; Collini *et al.*, 2010). Neben den variablen Lichtsammelantennen besitzen alle eukaryotische, phototrophe Organismen die inneren, aus sechs Transmembran-Helices zusammengesetzten Antennen CP43 und CP47, welche das PSII direkt umgeben und als direkter Translokator der Excitonenergie hin zum PSII dienen (Bricker und Frankel, 2002), während die Untereinheiten des Reaktionszentrums des PSI selbst eine hohe Anzahl von Chl a Molekülen zum selben Zweck binden.

1.7 Diatomeen

Diatomeen, von altgriechisch „*diatemnein*“ = „in zwei spaltbar“, bilden eine Gruppe einzelliger Mikroalgen innerhalb des Phylums der Heterokontophyta und tragen im Deutschen den Trivialnamen „Kieselalgen“, welcher auf das Vorhandensein einer aus zwei Teilen bestehenden Silikatschale zurückzuführen ist. Als Schlüsselfigur des marinen Planktons stehen diese Organismen an Basis der Primärproduktion dieses Planeten und sind für ca. 20 % der jährlichen, weltweiten CO₂-Fixierung verantwortlich (Field *et al.*,

Einleitung

1998). Die schätzungsweise 100.000 Spezies der Diatomeen sind in nahezu allen Gewässern, limnisch, marin, Brackwasser oder auch terrestrisch zu finden (Round *et al.*, 1990; Malviya *et al.* 2016) und lassen sich grob in die Gruppen der zentrischen und pennaten Kieselalgen unterteilen. Diese Unterteilung ist auf die zentrische bzw. bilaterale Zell-Symmetrie der Untergruppen zurückzuführen, spiegelt sich aber auch in physiologischen und molekularen Aspekten wider (Abb. 9.0).

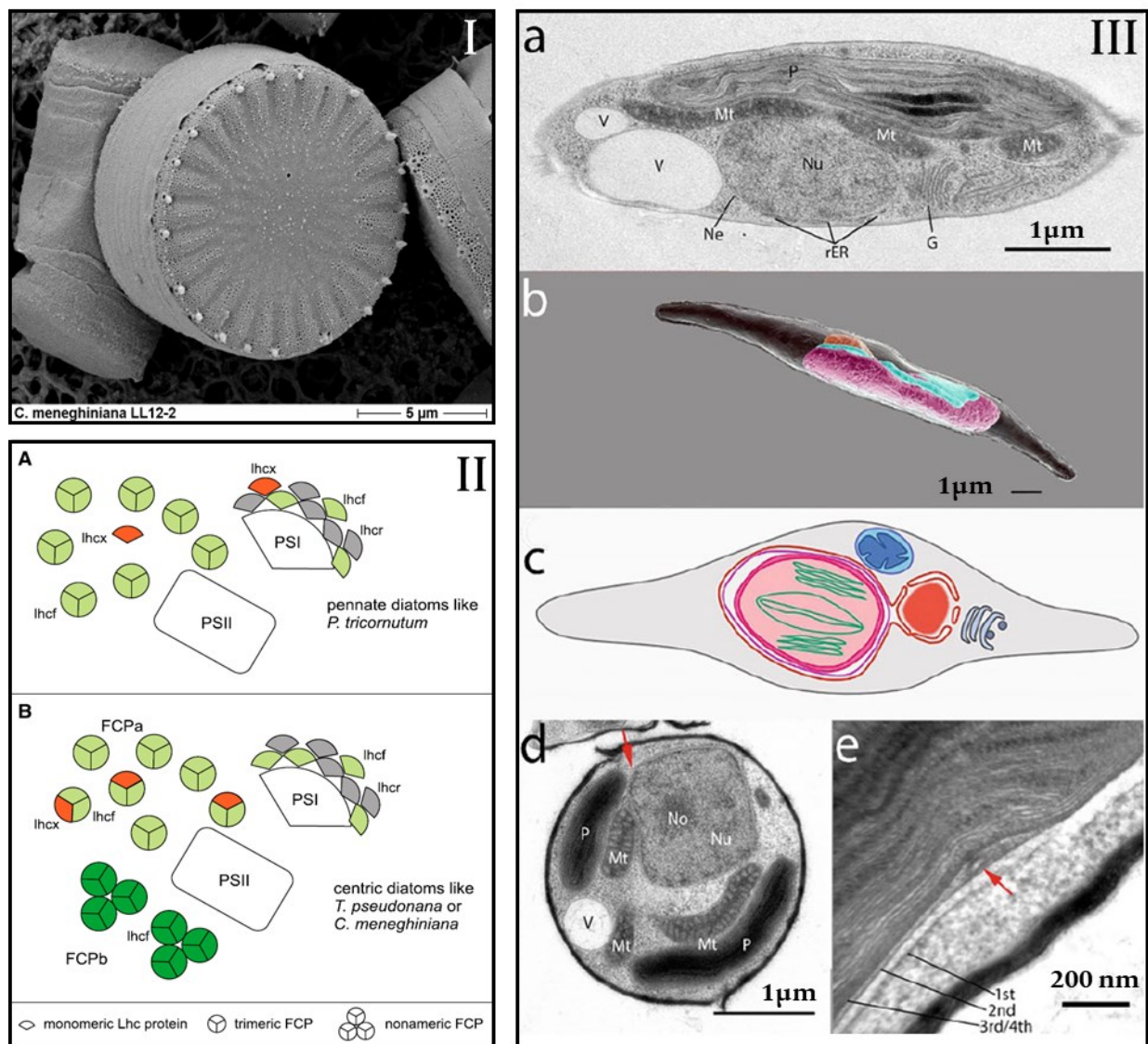


Abbildung 9.0: Diatomeen am Beispiel der zentrischen Alge *Cyclotella meneghiniana*, der pennaten *Phaeodactylum tricornutum*, deren Zellmorphologie sowie Anordnung der Lichtsammelkomplexe.

I: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer *Cyclotella meneghiniana* Zelle (M. Ruppel, Goethe-Universität Frankfurt). II: Anordnung der Lichtsammelkomplexe der Diatomeen (FCPs) um die Photosysteme (PS) in pennaten und zentrischen Diatomeen aus Gundermann *et al.* (2019). Beide Untergruppierungen der Kieselalgen besitzen trimere Lichtsammelproteine an PSII, sowie monomere an PSI. In zentrischen Diatomeen wurden höhere, PSII assoziierte FCP-Oligomere nachgewiesen. Die FCPs bestehen aus Lichtsammelproteinen der lhcf, lhcr, und lhcx Klassen. III Zell- und

Einleitung

Organellstruktur von *P. tricornutum* aus Maier *et al.* in Falciatore und Mock (2022); modifiziert. A: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Schnitts einer *P. tricornutum* Zelle. 3D-Topologie dieser Zelle mittels Elektronenmikroskopie. C: Schematische Darstellung der Zelle. D: Ausschnitt einer elektronenmikroskopischen Aufnahme zur Veranschaulichung der Membranen der Organellen. E: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Membranen des Plastiden. V = Vakuole, P = Plastid, Mt = Mitochondrium, No = Nucleolus, Nu = Nucleus, Ne = Nucleus Membran, G = Golgi-Apparat, rER = raues endoplasmatisches Retikulum. Längenskala der Aufnahmen in nm und μm .

Während beide Untergruppen Plastiden mit mehr als zwei Hüllmembranen aufweisen, die Thylakoide in Dreierstapeln zu finden sind und ein mit dem Plastiden verschmolzenes Endoplasmatisches Retikulum, sowie Vakuolen, Zellkern und Mitochondrien besitzen, ist die Anordnung der Lichtsammelkomplexe um die Photosysteme variabel. In beiden Untergruppen konnten trimere FCPs um PSII nachgewiesen werden und monomere um PSI. Zentrische Diatomeen tragen zudem nonamere FCPs, die in pennaten nicht zu finden sind. Dennoch ist die konservierte Architektur der oxygenen Photosynthese (vgl. Abb. 6.0) in den beiden Gruppen identisch und die hauptsächlichen Differenzen in der Zusammensetzung der Lichtsammelkomplexe und deren Anordnung um die PS begründet.

1.7.1 Lichtsammelkomplexe der Diatomeen

Die Diatomeen besitzen als sekundäre Endosymbionten eine Vielzahl an, oftmals redundanten, *lhc*-Genen. Diese Gene sind nukleär lokalisiert und bilden die Basis der Lichtsammelkomplexe der Kieselalgen, die aufgrund ihres speziellen Xanthophylls Fucoxanthin, Fucoxanthin-Chlorophyll *a/c*-Proteine (FCP) genannt werden (Fawley *et al.*, 1987; Bhaya und Grossmann, 1993). Die FCPs der Kieselalgen sind aus Monomeren der *lhcf*, *lhcr* und *lhcx* Typen zusammengesetzt, wobei die *lhcx* Kandidaten in pennaten ausschließlich monomer und in zentrischen Diatomeen in trimeren FCPs assoziiert vorliegen (Büchel 2003; Lepetit *et al.*, 2007; Grouneva *et al.*, 2011; Gundermann *et al.*, 2013; Gundermann *et al.*, 2019) (vgl. Abb. 9.0). Diese Klassen der *lhc*-Typen sind auf ihre Homologie zu bekannten *Lhc*-Proteinen zurückzuführen und begründen sich in der

Einleitung

Zugehörigkeit zu diesen Vertretern. So weisen die lhcx-Gene Ähnlichkeit zu den Stressantwort LhcSR-Kandidaten der Grünalgen auf, während die lhcr-Gene zu den PSI assoziierten Lhcs aus Rotalgen Homologie zeigen. Die lhcf-Gene codieren hingegen für die Hauptgruppe der FCP-bildenden Proteine (Büchel, 2020).

Anhand der Sequenzierung der klassischen Modellorganismen der zentrischen Diatomeen *T. pseudonana* und *C. cryptica* sowie der pennaten Diatomee *P. tricornutum* besteht mittlerweile ein detailliertes Bild der Lhc-Typen der Kieselalgen (Armbrust *et al.*, 2004; Traller *et al.*, 2016; Bowler *et al.*, 2008). Für *C. cryptica* konnten sechs verschiedene Lhcf, neun Lhcr sowie vier Lhcx Kandidaten ausgemacht werden (Gundermann *et al.*, 2019).

1.7.2 Lhcx-Proteine der Diatomeen

Die Lhcx Proteine der Kieselalgen stellen Verwandte der LhcSR-Proteine (LI818) der Grünalge *C. reinhardtii* dar. Diese Klasse der Lhcs wurde 1996 das erste Mal beschrieben und als eigene Gruppe innerhalb der Lhcs gewertet, da die Homologie zu sonstigen Vertretern der Chlorophyll a/b tragenden Lichtsammelkomplexe gering und die Expression der Gene anderweitig reguliert ist (Savard *et al.*, 1996; Richard *et al.*, 2000). Auch die Pionierarbeit von Eppard und Rhiel (1998) identifizierte mehrere FCP codierende Gene und bestätigte das Vorhandensein von LhcSR-Homologen in *C. meneghiniana*. Sowohl in Grünalgen als auch Diatomeen konnte eine Akkumulation der LhcSR/ Lhcx-Transkripte sowie ein steigendes Proteinlevel unter Stress ausgemacht werden. Hierbei ist der hauptsächliche Regulator des Stresses eine erhöhte Lichtstärke (Yamano *et al.*, 2008; Zhu und Green in Allen, 2008; Zhu und Green 2010; Pinnola, 2019). Im Genom der zentrischen Diatomee *C. cryptica* konnten vier Lhcx-Kandidaten ausgemacht werden, die sich in Details ihrer Polypeptidstruktur unterscheiden, während in *T. pseudonana* ein weiterer Lhcx Kandidat gefunden werden kann (Gundermann *et al.*, 2019). Auch die pennate Diatomee *P. tricornutum* weist ebenso vier verschiedene Lhcx-Kandidaten auf, wobei jedoch lediglich

Einleitung

das Lhcx1 dieser mit dem Lhcx1 der zentrischen homolog ist. Die meisten dieser Gene sind Starklicht-induziert, sowohl in pennaten (Nymark *et al.*, 2009; Nymark *et al.*, 2013), als auch zentrischen Diatomeen (Zhu und Green in Allen, 2008; Zhu und Green 2010). Hierbei konnten Nymark *et al.* in der pennaten Kieselalge *P. tricornutum* einen Starklicht-bedingten Anstieg der lhcx1, lhcx2 und auch lhcx3 Transkripte beobachten, während das lhcx4 Gen eine maximale Expression im Dunkeln zeigt. Für die zentrische Diatomee *T. pseudonana* ermittelten Zhu und Green eine Starklicht vermittelte Zunahme des lhcx1, lhcx4 und lhcx6 Transkripts. Für lhcx5 konnte keine zunehmende Expression beobachtet werden. Die Expression des lhcx6_1-Gens wurde nicht ermittelt.

Dass den Lhcx-Proteinen der Diatomeen und auch den LhcSR Homologen der Grünalgen eine protektive Funktion in der Photosynthese zugesprochen werden kann, wurde durch zahlreiche Veröffentlichungen der letzten Jahre bestätigt (Peers *et al.*, 2009; Bailleul *et al.*, 2010, Zhu und Green, 2010; Ghazaryan *et al.*, 2016). Hierbei scheinen diese Lhc-Kandidaten eine ähnliche Funktion wie das PsbS der höheren Pflanzen (Li *et al.*, 2000) zu erfüllen und für die Abgabe überschüssiger Anregungsenergie, im Falle eines Starklichtstresses, verantwortlich zu sein. Bislang konnte keine Pigmentierung der Lhcx-Proteine in Diatomeen direkt nachgewiesen werden. Der photoprotektive Mechanismus der Lhcx-Proteine scheint ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren zu sein die den Energiefluss in das Photosystem II und damit die Photochemie reduzieren. Dabei ist ein direkter Zusammenhang der Lhcx-Proteine mit dem Diadinoxanthin-Zyklus (s. 1.7), sowie der Aggregation der FCPs und Loslösen vom PSII zu beobachten.

Das zentrische Diatomeen spezifische Lhcx6_1 konnte bislang massenspektrometrisch an PSI sowie PSII nachgewiesen und eine Zunahme des Proteins unter Starklicht beobachtet werden (Grouneva *et al.*, 2011; Gundermann *et al.*, 2019; Calvaruso *et al.*, 2020).

1.8 Molekulare Mechanismen der Photoprotektion

Photosynthetische Organismen sind einer ständigen Fluktuation des, für die Photosynthese notwendigen, Umgebungslicht ausgesetzt. Dabei kann das verfügbare Licht in seiner Intensität binnen Sekunden starke Änderungen erfahren. Hierfür ist eine molekulare Maschinerie nötig, welche eine Anpassung von geringer Lichtverfügbarkeit hin zu voller Auslastung in sehr kurzer Zeit regeln kann. Während bei niedriger Lichtintensität jedes eintreffende Photon zur Ladungstrennung verwendet werden muss, ist der Organismus darauf angewiesen diese Effizienz bei zu hoher Lichtbelastung zu unterbinden, um Schädigungen der Proteinmaschinerie zu vermeiden (Barber und Andersson, 1992; Aro *et al.*, 1993). Die Abgabe überschüssiger Anregungsenergie, die nicht zur Photochemie verwendet werden kann, kann als Fluoreszenz der Chlorophylle selbst erfolgen, aber auch als Wärmeabstrahlung. Diese Abgabe der überschüssigen Anregungsenergie in Form von Wärme führt zu einer Reduktion der Chlorophyllfluoreszenz und wurde NPQ = non photochemical quenching benannt. Für diese NPQ-Phänomene entwickelten sich im Laufe der Evolution einige Mechanismen, von denen der Xanthophyllzyklus eine zentrale Rolle spielt. Der Xanthophyllzyklus der Diatomeen läuft unter der reversiblen Deepoxidierung des Pigments Diadinoxanthin (Dd) zu Diatoxanthin (Dt) ab, was unter Starklicht zu beobachten ist (Stransky und Hager, 1970). Diese Pigmente sind dabei, wie Fucoxanthin und auch die Chlorophylle a und c, in den Lichtsammelkomplexen eingebettet (Wang *et al.*, 2019; Nagao *et al.*, 2020) (Abb. 10). Diese Deepoxidierung steht in direktem Zusammenhang mit der Abgabe überschüssiger Anregungsenergie in Diatomeen (Lavaud *et al.*, 2002, Goss *et al.*, 2006). Der entscheidende Regulator der NPQ-Phänomene ist der Ansäuerung des Thylakoidlumens bei starkem Lichteinfall geschuldet, da der pH-Gradient nicht so schnell genutzt werden kann, wie er aufgebaut wird. Darin begründen sich auch die pH-Optima der Xanthophyllzyklus-Enzyme, die bei Diatomeen für die Deepoxidase bei pH 5,5 und für die reverse Epoxidierung bei pH > 7,0 liegen (Jakob *et al.*, 2001, Goss und Jakob, 2010). Des Weiteren ist eine NPQ-Komponente in der direkten Starklichtantwort

Einleitung

spezifischer Lhc-Proteine um die Photosysteme zu finden. So konnten Ghazaryan *et al.* (2016) oder auch Buck *et al.* (2019) bei Diatomeen eine Korrelation des Fehlens von Lhcx-Proteinen und der somit verminderten Abgabe überschüssiger Anregungsenergie aufzeigen. Bailleul *et al.* (2010) ermittelten zudem, dass die Reduktion eines Lhcx-Kandidaten zu vermindertem NPQ führt, jedoch ohne direkte Auswirkung auf den Xanthophyllzyklus zu haben. Dass Lhcs direkt in den NPQ-Mechanismus involviert sind, ist anhand des PsbS-Proteins der höheren Pflanzen gut untersucht und in einer, bei Starklicht ablaufenden, pH-induzierten Konformationsänderung dieses Thylakoid-Proteins zu begründen, welche über die Protonierung einer lumenalen Glutaminsäure vermittelt wird (Li *et al.*, 2000; 2002). Dabei kommt es vermutlich zu einer Dissoziation der Lichtsammelantennen vom Photosystem. Zusammenfassend ist der wahrscheinlichste Mechanismus der Photoprotektion in Diatomeen ein Zusammenspiel aus dem pH-induzierten Xanthophyllzyklus und Lhcx-Proteinen, die eine Verlagerung der Lichtsammelkomplexe weg vom Photosystem induzieren und somit eine weitere, exzessive Anregung des Reaktionszentrums verhindern.

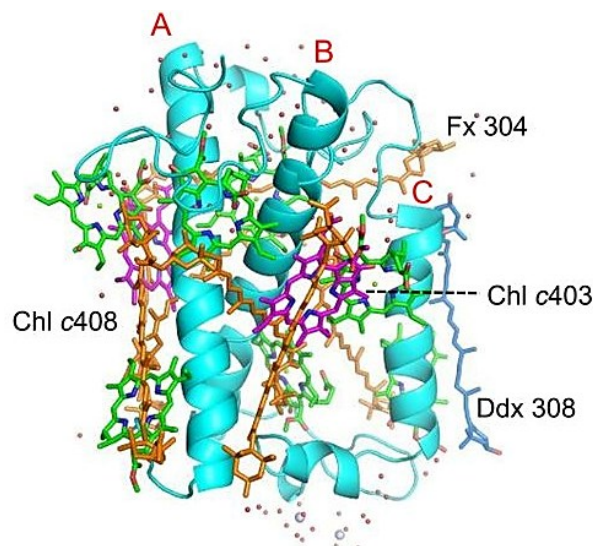


Abbildung 10: Proteinstruktur eines monomeren FCP aus *P. tricornutum* inklusive Pigmente (Wang *et al.*, 2019). In cyan ist die aus drei α -Helices zusammengesetzte Polypeptidstruktur dargestellt, welche aus den Transmembran-Helices A, B und C besteht. Das Protein-gebundene Pigment Fucoxanthin (Fx) ist orange unterlegt, während Diadinoxanthin (Ddx) blau, Chlorophyll a grün und Chlorophyll c (Chl c) magenta gefärbt sind. Wassermoleküle sind als rosa Kugeln abgebildet.

1.9 Regulation der Photosynthese-Maschinerie durch Polypeptid-Phosphorylierung

Die Regulation der photosynthetischen Protein-Maschinerie ist aus einem komplexen Netzwerk zusammengesetzt, an dem zu großen Teilen die Elektronentransportkette selbst, als auch nachgeschaltete enzymatische Stoffwechselfvorgänge, Einfluss nehmen. Als biochemisches Redox-System ist der Zustand der Komponenten des Elektronentransports ein essenzieller Schalterpunkt und nimmt Einfluss auf Genexpression der Photosynthese-Komponenten, Anpassung der Lichtsammelproteine sowie Feinjustierung diverser Faktoren (Allen *et al.*, 1995; Eberhard *et al.*, 2008; Lepetit und Dietzel, 2015). Ein wichtiger Bestandteil dieses Systems ist die Redox-Zustand gesteuerte, reversible Phosphorylierung von Thylakoidmembran Proteinen (Allen *et al.*, 1981; Vener *et al.*, 1998). Die Kinase vermittelte Phosphorylierung von Serin-, Threonin-, Tyrosin- und vereinzelt auch Histidin-Resten von Proteinen ist ein entscheidender Regulator, der in allen Zelltypen vorkommt (Allen, 1992) und dem schon früh metabolische Kontrolle zugeschrieben wurde (Krebs und Fischer, 1956). Seit dem ersten Nachweis der Phosphorylierung von Thylakoidmembran Proteinen im Jahre 1977 (Bennett, 1977) konnte in den Folgejahren ein umfassenderes Bild dieser Phospho-Modifikationen ermittelt werden. Hierbei sind diese Modifikationen an Thylakoidmembran Proteinen zuständig für Energieregulation der Photosysteme, Biogenese der photosynthetischen Proteinkomplexe sowie deren Austausch und Feinjustierung der Photochemischen Maschinerie (Vener *et al.*, 1998), wobei die Phosphorylierung hauptsächlich an Serin- und Threonin-Resten stattfindet (Vener *et al.*, 2001). Die dafür notwendigen Kinasen sind vom Redox-Zustand der photosynthetischen Komponenten gesteuert und sorgen in höheren Pflanzen unter anderem für eine Umverteilung der Lhc-Proteine zwischen den Photosystemen sowie eine einhergehende Veränderung der Thylakoidstruktur, was der reversiblen Phospho-Modifikation von hauptsächlich CP43, Teilen der trimeren Lhcs, sowie den PSII-Kernproteinen D1 und D2 geschuldet ist (Bonardi *et al.*, 2005; Bellafiore *et al.*, 2005; Dietzel *et al.*, 2011). Dieser Mechanismus der Umverteilung der Lhcs kann durch ungleichmäßige Anregung der

Einleitung

Photosysteme herbeigeführt werden und wird als *state-transition* (STR) bezeichnet. Bei präferentieller Anregung des kurzwelliger absorbierenden PSII Reaktionszentrums (P680) und der damit einhergehenden Reduktion des PQ-pools, migrieren trimere Lhcs von diesem PS hin zum langwelliger absorbierenden PSI (P700), was unter Phosphorylierung der Lhc-Proteine vonstattengeht. Hiermit kann das Ungleichgewicht der Anregung beider Photosysteme ausgeglichen und die Effizienz der Elektronentransportkette aufrechterhalten werden. *Vice versa* sorgt die Dephosphorylierung durch eine Phosphatase für die Rück-Migration zum PSII (Pribil *et al.*, 2010). Dieser Effekt ist somit durch Veränderung der Rotlicht-Zusammensetzung steuerbar, wobei fernrotes Licht eher PSI und rotes präferentiell PSII anregt. Auch wenn dieser Mechanismus in Diatomeen bislang nicht nachgewiesen werden konnte, kann in mehreren Genomen der Kieselalgen ein STR-Kinase-Homolog gefunden werden.

1.10 Zielsetzung

Diatomeen sind essenzielle Primärproduzenten des Ökosystems, die Organismen-Gruppe allein für etwa 20 % der jährlichen CO₂-Fixierung verantwortlich und bilden neben wichtigen Kohlenstoff- ebenso Silikat-Senken (Falkowski *et al.*, 1998). Die Organismen sind in allerlei Gewässern, limnisch, marin, aber auch Brackwasser zu finden (Malviya *et al.*, 2016), die zu Grunde liegenden Charakteristika ihres ökologischen Erfolgs aber bislang unzureichend untersucht. Die zentrische Kieselalge *Cyclotella meneghiniana*, erstmals im Jahre 1844 beschrieben (Kützing, 1844), gilt als Pionier-Organismus der biochemischen Diatomeen Forschung in Bezug auf deren besondere Photosynthese (Eppard und Rhiel, 1998; Eppard und Rhiel, 2000; Büchel, 2003), ist jedoch molekularbiologisch schwer zugänglich. Die kürzlich erfolgte Aufklärung des Genoms dieser wichtigen Diatomeen-Spezies bildet neue Ansätze für weitergehende Forschung und identifiziert das Vorhandensein diverser Kieselalgen-spezifischer Lichtsammelproteine (Traller *et al.*, 2016).

Einleitung

Unter diesen befindet sich das LhcSR-ähnliche Lhcx6_1, welches bereits massenspektrometrisch in den zentralen Diatomeen *T. pseudonana* und *C. meneghiniana* nachgewiesen werden konnte (Grouneva *et al.*, 2011; Gundermann *et al.*, 2019; Calvaruso *et al.*, 2020). Die Einordnung des Proteins erfolgte ausschließlich aufgrund der Sequenz, Funktion und Charakteristika dieses Lhc-Proteins sind bislang jedoch unklar.

Ziel dieser Arbeit war die weiterführende Charakterisierung des Lhcx6_1 aus *C. meneghiniana*. Dafür mussten zunächst Methodiken etabliert werden den Organismus molekularbiologisch besser zugänglich zu machen, um letztendlich Aussagen über die Funktion des Lhc-Kandidaten durch eine Manipulation des zu Grunde liegenden Gens zu treffen. Die Expressionsmuster des *lhcx6_1*-Gens und deren Vergleich mit anderen Lhc-Genen der Mikroalge, sollten die Regulation des Lhcs genauer evaluieren. Für weiterführende biochemische Studien sollte ein Antikörper gegen das zentrale Diatomeen spezifische Lhcx-Protein entworfen und ausgetestet werden. Der immunologisch gestützte Protein-Nachweis sollte eine Lokalisation des Proteins in der Thylakoidmembran, abseits der Massenspektrometrie, erlauben. Des Weiteren stand die Modifikation des Proteins im Fokus, wobei die posttranslationale Phosphorylierung des Lhcx6_1, vergleichend zu den anderen Thylakoidmembran-Proteinen, untersucht werden sollte. Diese Methodiken sollten ein umfassenderes Bild des Lhcx-Kandidaten erlauben.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Organismen

Tabelle 2.1: Verwendete Organismen, Anzuchtbedingungen und Referenzgenom.

Art	Stammnummer	Medium	Anzucht	Referenzgenom
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	SAG-1020-1a	ASP-Sil	20 μmol Photonen/ m^2/s 16h, 16° C	NCBI:txid29204
<i>Escherichia coli</i>	Dh5 α , Dh10b, Dh10b-pTA-MOB	LB	37° C	-
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Col-0	HAWITA Fruhstorfer Spezialsubstrat	120 μmol Photonen/ m^2/s 8h, 22° C	NCBI:txid3702
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CW-15	TAP	150 μmol Photonen/ m^2/s 8h, 25° C	NCBI:txid3055
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	UTEX 646	ASP	20 μmol Photonen/ m^2/s 16h, 18° C	NCBI:txid2850
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	CCMP 1335	F/2	50 μmol Photonen/ m^2/s 16h, 16° C	NCBI:txid296543

2.2 Verwendete Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei Biomers bestellt und die lyophilisierten Nukleinsäuren mit ddH₂O auf 100 μM verdünnt.

Tabelle 2.2: Verwendete Oligonukleotide für PCRs.

Name	Sequenz 5' – 3'	Funktion
Cm H4 fw.	ATCACCAAGCCCGCCATC	qRT-PCR
Cm H4 rev.	CTCGAGGAACACCTTGAG	qRT-PCR
Lx61 RT fw.	ACTCACTCTTGCCGTTATCTC	qRT-PCR
Lx61 RT rev.	GCTTGTCATTCACCAATTCTT	qRT-PCR
Lx61 RT Mid fw.	CCTCAAGAGCTCGCTCGCTA	qRT-PCR Antisense
Lx1 RT fw.	GATCCTGCTGATGCTTCGTA	qRT-PCR
Lx1 RT rev.	GATCCCTTTCCATCAACGG	qRT-PCR
Lf1 RT fw.	TGAAGTCTGCCATCATCGCC	qRT-PCR
Lf1 RT rev.	TCAGCACCATCCAACAAACC	qRT-PCR
Lx61 seq fw.	ATGAAGCTCGCTATCCTTTCCACCC	Amplifikation Lx61
Lx61 seq rev.	TTACCACGAGACGAAGCCAGAGTCT	Amplifikation Lx61
Lx61 pET30 NT fw.	ATCATCACGTGAATTCATGAAGCTCGCTATCCTTTCC	Hot-Fusion Lx61 aus C.m. gDNA
Lx61 pET30 NT rev.	GATCTCGAGCGAATTTACCACGAGACGAAGCC	
Lx61 pET30 CT fw.	TAGAATGCATCTCGAATGAAGCTCGCTATCCTTTCC	
Lx61 pET30 CT rev.	GGTGGTGGTGCTCGAACCACGAGACGAAGCC	Expressionsvektor
Lx61_AS UTR fw.	ACCAACAGATAAGCTCGAGGGCGGTGATAGATGGG	

Lx61_AS UTR rev.	CGTCTGGCCAGTCGATGCCCTCAGAGCCTTAAAGG	Hot-Fusion Lx61 Antisense Konstrukte in pTp- NR-fcp-NAT
Lx61_AS MID fw.	ACCAACAGATAAGCTTTGGCGGCGAATCCGGCG	
Lx61_AS MID rev.	CGTCTGGCCAGTCGATTCCACCCTCCTCGCCACC	
HF BKTs1 pPhac fw.	CCGGGGATCCTCTAGATGAAGCTCGCTATCCTTTCCACC	Hot-Fusion Beta- Carotin-Ketolase in pPhac-NAT
HF BKTs1 pPhac rev.	GCAGGTCGACTCTAGTCACGCCAGGGCTGCGCC	
HF-βEstr pPhacN fwI	TGTA CTGAGAGTGCACCATAGGACTTGACCTCTAGAATA TGCGG	Hot-Fusion der β- Estradiol Kassetten in pPhac-NAT zur Herstellung des pPhaEst-NAT YFP
HF-βEstr pPhacN revI	TGGCCAGGGAGCTTGATCAAGATCTTCAGACGG	
HF-βEstr pPhacN fwII	TTGATCAAGCTCCCTGGCCAATTCCCAG	
HF-βEstr pPhacN revII	TGAATTTGAATCTCTCCGGTAATGTGAGTTAGCTCACT ATTAG	
HF-Lx61UTR pPhaEst fw.	TCTAGCCAAACCTAGCGAGGGCGGTGATAGATGGG	Hot-Fusion Lx61 Antisense Konstrukte in pPhaEst-NAT YFP
HF-Lx61UTR pPhaEst rev.	ATGTTTGAACGATCGTGCCCTCAGAGCCTTAAAGG	
HF-Lx61Mid pPhaEst fw.	TCTAGCCAAACCTAGTTGGCGGCGAATCCGGCG	
HF-Lx61Mid pPhaEst rev.	ATGTTTGAACGATCGTTCCACCCTCCTCGCCACC	Hot-Fusion Lx61 Überexpressions- Konstrukte in pPhaEst-NAT YFP
HF Lx61oH pPhaEst fw.	TCTAGCCAAACCTAGATGAAGCTCGCTATCCTTTCC	
HF Lx61oH pPhaEst rev.	ATGTTTGAACGATCGTTAACCACGAGACGAAGCC	Hot-Fusion Lx61-His pPhac-NAT
pPhac-L6-1 fw.	CCGGGGATCCTCTAGATGAAGCTCGCTATCCTTTCC	
pPhac-L6-1HisC rev.	GCAGGTCGACTCTAGTCAGTGGTGGTGGTGGTGG	Hot-Fusion eGFP in pPhac-NAT (bereitgestellt von Liv Krämer)
eGFP_a01p_pPHAC	TCGGTACCCGGGGATCCTTCTAGAATGGTGAGCAAGGG CGAG	
eGFP_e01m_pPHAC	TTGCATGCCTGCAGGTCGATTACTTGTACAGCTCGTCCA TG	

2.3 Verwendete Lichtspektren

Die Beleuchtung der Organismen (vgl. Tab. 2.1) in der Klimakammer erfolgte mittels LUMitronics EVO LED-Beleuchtungssystem von FUTURELED. Besagte LED-Beleuchtungsanlage enthält vier individuell einstellbare LEDs der Emissionswellenlängen 455 nm, 660 nm, 740 nm, sowie einer Weißlicht-LED der Farbtemperatur 3500 K. Wenn nicht anders beschrieben, wurde für die Anzucht der Organismen ausschließlich die Weißlicht-LED mit gewünschter Lichtstärke [$\mu\text{mol Photonen}/\text{m}^2/\text{s}$] verwendet. Die verwendeten Spektren sind in Abbildung 2.3 dargestellt. Schwachlicht (Low Light, LL) und Starklicht (High Light, HL) Spektren wurden mittels Weißlicht-LED simuliert, wobei das

LL-Spektrum auf 20 $\mu\text{mol Photonen/m}^2/\text{s}$ und das HL-Spektrum auf 150 $\mu\text{mol Photonen/m}^2/\text{s}$ eingestellt wurde (Abb. 2.3 A/B). Die Fernrot (Far Red, FR) Beleuchtung setzt sich aus dem LL-Spektrum und einer zusätzlichen fernrot-Emission bei 740 nm zusammen (Abb. 2.3 C). Dabei wurde der Wert der 740 nm LED software-intern auf 150 Einheiten eingestellt. Die Spektren wurden mittels PG200N von URPtek im Wellenlängenbereich von 380-800 nm und einer Sekunde Belichtung aufgenommen. Abbildung 2.3. D zeigt die verwendeten Spektren im Vergleich.

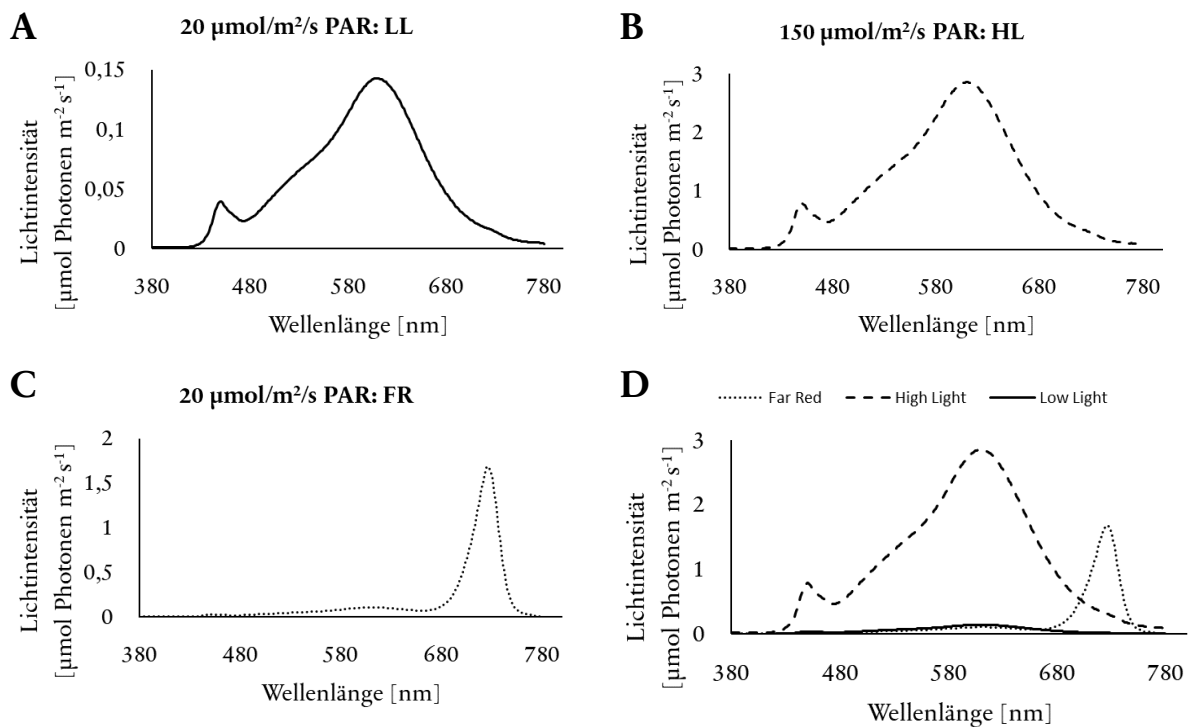


Abbildung 2.3: Verwendete Lichtspektren.

Die verwendeten Lichtspektren wurden FUTURELED software-intern eingestellt und mittels PG200N Spektrometer von URPtek im Wellenlängenbereich zwischen 380-800 nm vermessen. Die Belichtungszeit des Messgeräts belief sich auf eine Sekunde. LL und HL Spektren wurden ausschließlich mittels Weißlicht-LED (3500 K) erzeugt, wobei HL die 7,5-fache Stärke des LL-Spektrums aufweist. Die FR Beleuchtung erfolgte mittels LL-Spektrum und zusätzlicher 740 nm fernrot-LED, welche software-intern auf 150 relative Einheiten justiert wurde. A: LL-Spektrum, B: HL-Spektrum, C: FR-Spektrum, D: Vergleich der Spektren. LL = Low Light/Schwachlicht. HL = High Light/Starklicht. FR = Far Red/Fernrot. PAR = Photosynthetically Active Radiation im Bereich zwischen 400 und 700 nm.

2.4 Verwendete Anzuchtmedien

Die Anzucht der zentrischen Diatomee *C. meneghiniana*, schüttelnd in Erlenmeyerkolben, erfolgte in ASP-Sil Medium nach Provasoli *et al.* (1957). Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tabelle 2.4 dargestellt. Einige Komponenten wurden vor dem Autoklavieren für 20 Minuten bei 120 °C hinzugefügt, während thermo-sensible, steril-filtrierte Chemikalien nach Autoklavieren und Abkühlen des Mediums supplementiert wurden. Der pH-Wert des Anzuchtmediums wurde mittels konzentrierter Schwefelsäure auf pH 7,7 eingestellt. Für die Selektion von *C. meneghiniana* auf Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,3 % (w/v) Agar-Agar hinzugegeben.

Tabelle 2.4.: ASP-Sil-Medium nach Provasoli *et al.* (1957).

Chemikalie Prä-Autoklav	Endkonzentration [mM]	Chemikalie Post-Autoklav	Endkonzentration [µM]
NaCl	86	CaCl ₂	2720
Tris	4	Na ₂ EDTA	93
KCl	21	FeCl ₃	12
MgSO ₄	8,1	MnCl ₂	20
NaNO ₃	11,8	ZnCl ₂	2
K ₂ HPO ₄	0,58	CoCl ₂	2
H ₃ BO ₃	0,16	Na ₂ MoO ₄	0,56
H ₂ SiO ₃	2	CuCl ₂	0,7

Das ebenfalls zur Anzucht von Mikroalgen verwendete F/2-Medium wurde aufgrund seines hohen Salzgehalts und der damit verbundenen elektrischen Leitfähigkeit zum Einstellen des benötigten Widerstands bei der Elektroporation verwendet. Zunächst wurde eine wässrige Lösung bestehend aus 3,33 % (w/v) Tropic Marin® Salz und den Prä-Autoklav Komponenten angesetzt und der pH-Wert auf 7,7 eingestellt. Nach Autoklavieren und Abkühlen erfolgte die Zugabe der steril-filtrierten Post-Autoklav Chemikalien und eine Nachjustierung des pH-Werts auf 7,7.

Tabelle 2.5: F/2-Medium nach Guillard (1975).

Chemikalie Prä-Autoklav	Endkonzentration [mM]	Chemikalie Post-Autoklav	Endkonzentration [µM]
NaNO ₃	0,88	CuSO ₄	0,039
NaH ₂ PO ₄	0,036	ZnSO ₄	0,076
H ₂ SiO ₃	1	FeCl ₃	11,7
		MnCl ₂	0,91
Chemikalie	Menge	Na ₂ EDTA	11,7
Tropic Marin	33,3 g auf 1 L	CoCl ₂	0,042
		Na ₂ MoO ₄	0,026
		Cyanocobalamin	0,00074
		Biotin	0,0041
		Thiamin	0,59

Die Anzucht von *Escherichia coli* (*E. coli*) erfolgte in autoklaviertem Lysogeny Broth (LB) Medium. Für die Präparation von LB-Platten erfolgte eine Zugabe von 1,3 % Agar-Agar vor dem Autoklavieren.

Tabelle 2.6: Komponenten für LB-Medium.

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

Die Mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii* wurde, in Erlenmeyer Kolben schüttelnd, in TAP-Medium bei 150 µmol Photonen/m²/s kultiviert. Das Medium wurde vor Verwendung autoklaviert, Zellen und Medium bereitgestellt von Dr. M. Angstenberger. TAP-Medium nach Hutner *et al.* (1950).

2.5 Thylakoid Isolation aus *C. meneghiniana* (Büchel, 2003)

Die Isolation der Thylakoidmembranen aus *C. meneghiniana* erfolgte nach Büchel (2003) bzw. Gundermann und Büchel (2012). Dafür wurden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase (ermittelt mittels Zählung in Neubauer Zählkammer) nach 7-10 Tagen Wachstum und vier Stunden Belichtung am Isolationstag geerntet. Die Ernte erfolgte mittels Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C für 15 Minuten. Darauf folgte ein Zellaufschluss in Homogenisationspuffer mittels Glasmühle und anschließende Abtrennung von Zelltrümmern und intakten Zellen durch Zentrifugation bei 1000 rpm und 4°C für 15 Minuten. Nach Sedimentieren der Thylakoidmembranen mittels Ultrazentrifugation bei 45.000 rpm und 4°C für eine Stunde, wurde das Membran-Sediment mit Pinsel in Waschpuffer resuspendiert und die gewaschenen Membranbruchstücke erneut bei 40.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Thylakoidmembranen wurden danach erneut schonend in B1-Puffer rückgelöst und spektroskopisch auf ihren Chlorophyll-Gehalt hin untersucht (s. 2.10). Nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff, erfolgte die Lagerung der empfindlichen Thylakoidmembranen bei -80° C.

Tabelle 2.7: Für die *C. meneghiniana* Thylakoid Isolation verwendete Puffer.

Homogenisationspuffer	Waschpuffer	B1-Puffer
10 mM MES	10 mM MES	25 mM Tris
2 mM KCl	2 mM KCl	2 mM KCl
5 mM EDTA	5 mM EDTA	
1M Sorbit		
pH 6,5 mit KOH	pH 6,5 mit KOH	pH 7,4 mit HCl

2.6 Thylakoid Isolation aus *A. thaliana* (Slovacek und Hind, 1977)

Die Isolation von Thylakoidmembranen aus *A. thaliana* fand als bekannte Referenz spezifischer Fragestellungen Verwendung. Dafür wurden zunächst 5 g Blattmaterial drei Wochen alter Pflanzen geerntet. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels Waring Blender in Homogenisationspuffer. Die erhaltene Suspension wurde im Anschluss mittels Gaze und Miracloth gefiltert, worauf eine Zentrifugation der somit erhaltenen Chloroplasten bei 2.000 xg 4° C für fünf Minuten folgte. Der Aufschluss der Chloroplasten wurde mittels osmotischem Schock in Hypotonem Puffer für fünf Minuten bei 4° C herbeigeführt. Die Thylakoidmembranen wurden folglich erneut bei 2.000 x g und 4° C für fünf Minuten sedimentiert und in Homogenisationspuffer aufgenommen. Nach Schockfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff, wurden diese bei -80° C gelagert.

Tabelle 2.8: Verwendete Puffer zur Thylakoid-Isolation aus *A. thaliana*.

Chemikalie	Homogenisationspuffer	Hypotoner Puffer
Sorbit	330 mM	-
HEPES	50 mM	50 mM
MgCl ₂	5 mM	5 mM
KCl	10 mM	10 mM
	pH 7,6 mit KOH	pH 7,6 mit KOH

2.7 Solubilisierung der Thylakoidmembranen

Das Herauslösen der photosynthetischen Proteinkomplexe aus der nativen Thylakoidmembran erfolgte mittels Dodecyl- α -D-maltosid (α -DDM). Dabei wurde dieses schonende, nichtionische Detergens in einer finalen Konzentration von 0,75 % (w/v) verwendet. Die Solubilisierung der Proteinkomplexe fand für 20 Minuten bei 4° C und leichtem Schwenken der Proben statt. Dabei wurden die Proben so dunkel wie möglich gehalten, um ungewollte Anregung der photosensitiven Proteinmaschinerie zu vermeiden.

Die solubilisierten Proben wurden anschließend durch Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4° C für drei Minuten von nicht löslichen Bestandteilen getrennt.

2.8 Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation

Zur Auftrennung der solubilisierten Thylakoidmembran-Proteine wurden diese auf Saccharosedichtegradienten geladen. Dabei kamen 19 % (w/v) Saccharose-Lösungen in B1-Puffer zum Einsatz, welche mit 0,03 % (w/v) α -DDM supplementiert wurden. Die Bildung des Saccharosegradienten der bereiteten Lösung erfolgte durch mehrmaliges Einfrieren und schonendes Auftauen. Pro Gradient wurden solubilierte Thylakoide entsprechend einer Menge von 125 μ g Chla verwendet. Die Auftrennung der Proteinkomplexe geschah bei 27.000 rpm und 4° C für 18 Stunden in Ausschwingrotoren.

2.9 Gesamtprotein Isolation

Für die Isolation von Gesamtprotein aus Zellmaterial wurde dieses zunächst sedimentiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde das gefrorene Zellsediment mit 500 μ l 90 % (v/v) Aceton für Diatomeen oder 80 % (v/v) Aceton für *A. thaliana*/ *C. reinhardtii* versetzt und mittels rotierendem Bohrkopf mechanisch aufgeschlossen. Die gefällten Proteine wurden im Anschluss durch Zentrifugation vom Pigment enthaltenden, acetonischen Überstand getrennt. Der acetonische Pigmentextrakt diente zur Chlorophyll-Konzentrations-Bestimmung (s. 2.10). Nach erfolgter Bestimmung des Chlorophyll-Gehalts wurde das getrocknete Zellsediment in einer errechneten Menge Proteinprobenpuffer rückgelöst, um einen Chlorophyllgehalt von 0,5 μ g Chla in 1 μ l zu gewährleisten.

Tabelle 2.9: Probenpuffer für Gesamtprotein

2x Proteinprobenpuffer
120 mM Tris
4 % (w/v) SDS
30 % (w/v) Saccharose
40 mM DTT
pH 6,8 mit HCl

2.10 Chlorophyll-Bestimmung

Die spektroskopische Bestimmung des Chlorophyll-Gehalts erfolgte nach Jeffrey und Humphrey (1975) für *C. meneghiniana*, sowie nach Porra *et al.* (1989) für *A. thaliana*. Die Extraktion der Pigmente erfolgte mittels 90 % (v/v) Aceton im Falle von Diatomeen und 80 % (v/v) für *A. thaliana* / *C. reinhardtii*. Der Chlorophyll-Gehalt diente folglich als Approximation und Vergleich des photosynthetischen Protein-Gehalts der untersuchten Proben. Somit konnten äquivalente Mengen spezifischer Proteinkomplexe aus unterschiedlichen Proben adäquat miteinander verglichen werden. Zur Absorptionsmessung kam ein Jasco V-650 Spektro-Photometer und eine Quartz-Küvette mit 1 cm Spalt zum Einsatz.

2.11 Aufkonzentrieren von Proben mittels Centricons

Zur Erhöhung der Konzentration wurden gesammelte Fraktionen der Saccharosedichtegradienten in 30K- bzw. 50K-Centricons aufkonzentriert. Dafür wurden die Proben in entsprechenden Centricons bei 6.000 x g und 4° C zentrifugiert, bis das Probenvolumen 50-100 µl entsprach. Anschließend erfolgte eine Chlorophyllbestimmung der eingengten Proben.

2.12 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Für die Auftrennung von Proteingemischen kamen verschiedene Protein-Gelelektrophorese-Systeme zum Einsatz. So wurde sowohl auf denaturierende als auch native Systeme zur Auftrennung zurückgegriffen.

2.12.1 SDS-PAGE (Lämmli, 1970)

Die standardmäßige Auftrennung von Proteinextrakten erfolgte mittels 12 % (PAA v/v) SDS-Gel nach Lämmli (1970) im Tris-Glycin-System. Dabei erfolgte die Auftrennung zunächst bei 15 mA pro Gel, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten. Im Anschluss wurden die Proteinproben bei 150 V aufgetrennt, bis die sich Bromphenolblau-Front am Ende des Trenngels befand. Die Auftrennung in der Elektrophorese-Apparatur erfolgte unter Zuhilfenahme des beschriebenen SDS-Laufpuffers.

Tabelle 2.10: Komponenten für zweimal 12 % SDS-Gel nach Lämmli (1970).

Chemikalie	Menge für 2x 12 % (v/v) Trenngel	Menge für 2x 4 % (v/v) Sammelgel
1,5 M Tris pH 8,5	5ml	-
0,5 M Tris pH 6,8	-	2,5 ml
Acrylamid (RotiGel 40/29:1)	4,5 ml	0,75 ml
10 % (w/v) SDS	150 µl	75 µl
TEMED	20 µl	20µl
10 % APS	75 µl	30 µl
ddH ₂ O	ad. 15 ml	ad. 7,5 ml

Tabelle 2.11: Komponenten für SDS-Laufpuffer nach Lämmli (1970).

Chemikalie	SDS-Laufpuffer
Tris	25 mM
Glycin	190 mM
SDS	0,1 % (w/v)

2.12.2 Phos-tag™-PAGE (Kinoshita *et al.*, 2009; Longoni *et al.*, 2015)

Zur quantitativen Analyse der Phosphorylierung spezifischer Proteine kam ein Drei-Lagen Phos-tag™ Gelsystem nach Longoni *et al.* (2015) zum Einsatz. Dabei wurden zunächst die unteren beiden Schichten, bestehend aus schwerem Gel (5 ml) zur regulären Auftrennung sowie leichtem Gel (3 ml) inklusive Phos-tag™, für die Phospho-Separation, aufeinandergeschichtet. Es folgte ein Mischen der beiden Gellösungen an der Phasengrenze mittels beschichtetem Papier. Nach Auspolymerisieren der beiden Lösungen, unter Luftausschluss durch Isopropanol, wurde das Sammelgel (2 ml) eingegossen. Alle Gellösungen dieses Systems wurden vor Einfüllen in die Gelplatten in einer Vakuummantel entgast. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte bei maximal 30 mA pro Gel für 3 - 4 Stunden. Als Elektrophorese-Puffer kam der Phos-tag-Laufpuffer zum Einsatz. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Proteinextrakte vor Gellauf in 2x Phos-tag™ Probenpuffer aufgenommen.

Tabelle 2.12: Komponenten für ein Phos-tag™ Gel nach Longoni *et al.* (2015).

Chemikalie	Schweres Trenngel	Leichtes Trenngel	Sammelgel
Bis-Tris pH 6,8	357 mM	357 mM	357 mM
Acrylamid (RotiGel40/37,5:1)	9 % (v/v)	8 % (v/v)	4 % (v/v)
TEMED	0,05 % (v/v)	0,05 % (v/v)	0,1 % (v/v)
APS	0,025 % (v/v)	0,05 % (v/v)	0,05 % (v/v)
Glycerin	30 % (w/v)	-	-
Phos-tag™	-	58 µM	-
ZnCl₂	-	10 mM	-
Coomassie G-250	-	0,01 % (w/v)	-

Tabelle 2.13: Komponenten für Phos-tag™ Laufpuffer.

Phos-tag™ Laufpuffer
100 mM Tris
100 mM MOPS
0,1 % (w/v) SDS
5 mM NaHSO ₃

Tabelle 2.14: Probenpuffer für Phos-tag™ Proben.

2x Phos-tag™ Probenpuffer
244 mM Tris
2 % (w/v) LDS
10 % (w/v) Glycerin
100 mM DTT
0,33 mM Coomassie G-250
pH 8,5 mit HCl

2.12.3 IpBN-PAGE (Schägger und Jagow, 1991; Järvi *et al.*, 2011)

Im Gegensatz zu den SDS beinhaltenden, denaturierenden Elektrophorese-Verfahren, diente die IpBN-PAGE nach Järvi *et al.* (2011) der Auftrennung von Protein-Gemischen in nahezu nativem Zustand. Hierzu wurden drei Lösungen vorbereitet, wobei die schwere und leichte Trenngel-Lösung in einem Gradientenmischer graduell vermischt wurden. Dieses Verfahren ermöglicht die native Auftrennung in einem PAA-Gradienten; in dieser Arbeit 3,5-12 % (v/v) PAA. Dem Gießen des Gelgemischs folgte eine direkte Überschichtung mit Sammelgel und Auspolymerisieren der Lösungen für ca. eine Stunde. Die zu untersuchenden Proben wurden vor dem Aufladen 1:10 mit BN-Ladepuffer versetzt. Ebenso wurden leere Taschen der IpBN-Gele mit selbigem Puffer beladen, um eine ungestörte elektrophoretische Auftrennung der Proteinkomplexe zu gewährleisten. Das

Einlaufen der Proben durch das Sammelgel erfolgte bei 80 V in BN-Kathodenpuffer mit 0,02 % (w/v) Coomassie G-250. Daraufhin wurde der Puffer mit seinem ungefärbten Pendant substituiert und die Auftrennung erfolgte bis Auslaufen der Coomassie-Front bei 160 V. Der BN-Anodenpuffer fand durchgängig Verwendung. Die maximale Stromstärke des IpBN-Laufs wurde auf 5 mA begrenzt.

Tabelle 2.15: Komponenten für ein IpBN-Gel 3,5 – 12 % PAA nach Järvi *et al.* (2011).

Chemikalie	Schweres Trenngel	Leichtes Trenngel	Sammelgel
Acrylamid (RotiGel40/37,5:1)	0,97 ml	0,272 ml	0,288 ml
3x Gel-Puffer BN	1 ml	1 ml	1,5 ml
75 % (v/v) Glycerin	0,74 ml	0,18 ml	-
TEMED	6 µl	6 µl	20 µl
10 % (w/v) APS	20 µl	20 µl	50 µl
2 % (v/v) Bisacrylamid	77,5 µl	21,7 µl	1,206 ml
ddH₂O	ad. 3 ml	ad. 3 ml	ad. 4,5 ml

Tabelle 2.16: Komponenten für BN Gel- und Ladepuffer nach Schägger und Jagow (1991).

2x Bis-Tris ACA	BN-Ladepuffer	3x Gelpuffer
0,2 M Bis-Tris	50 mg Coomassie G-250	1,5 M 6-Aminocapronsäure
1 M 6-Aminocapronsäure	500 µl 2x Bis-Tris ACA	0,15 M Bis-Tris
pH 7,0 mit HCl	400 µl 75 % (w/v) Saccharose	pH 7,0 mit HCl
	ad. 1 ml ddH ₂ O	

Tabelle 2.17: Komponenten für BN-Elektrophoresepuffer nach Schägger und Jagow (1991).

Chemikalie	BN-Anodenpuffer	BN-Kathodenpuffer
Bis-Tris	50 mM	15 mM
Tricin	-	50 mM
	pH 7,0 mit HCl	pH 7,0 mit HCl

2.12.4 2D-PAGE

Nach erfolgreicher Auftrennung von Proteinkomplexen in nativem Zustand mittels IpBN-PAGE fand zudem mit ausgewählten Proben eine weitere elektrophoretische Auftrennung in zweiter Dimension statt (2D-PAGE). Hierfür wurden entweder ganze Streifen der IpBN-Gele oder auch einzelne gefärbte Komplexe aus dem Gel ausgeschnitten. Diese wurden daraufhin mittels spezieller Puffer denaturiert, abhängig von der Art des zweiten Gelsystems. Die Denaturierung für anschließende Lämmli SDS-Gele erfolgte für wenige Minuten bei Raumtemperatur, wohingegen jene für 2D-Phos-tag™ PAGE bei 70° C für mindestens 30 Minuten inkubiert wurde. Die 2D-Elektrophorese erfolgte nach den im Gelsystem beschriebenen Parametern.

Tabelle 2.18: Komponenten der 2D-Äquilibriumspuffer für SDS-Gele (Ll; angelehnt an Schägger und Jagow (1991)) sowie für Phos-tag™ Gele (Pt; nach Longoni *et al.* (2015)).

	2D-Puffer Ll	2D-Puffer Pt
Glycerin	2 % (w/v)	22,2 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	3 % (v/v)	5 % (v/v)
SDS	2,5 % (w/v)	4,3 % (w/v)
Tris-HCl pH 6,8	75 mM	138 mM
Urea	-	6 M

2.13 Western-Blot (Towbin *et al.*, 1979)

Der Transfer von Proteinen aus PAA-Gelen erfolgte mittels Western-Blot auf Nitrocellulose nach Towbin *et al.* (1979). Dabei wurde die Nitrocellulose-Membran (0,45 µm Porengröße) auf drei Lagen Whatman-Papier geschichtet. Darauf folgte das entsprechende PAA-Gel und drei weitere Lagen Whatman-Papier. Alle Komponenten wurden zuvor im jeweiligen Transferpuffer, abhängig vom verwendeten Gelsystem, getränkt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte im Gelsystem spezifischen Puffer bei 1,5 mA/cm². Im Semi-Dry

Blotting Verfahren lief der Transfer für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur, wohingegen der Transfer im Tank-Blot bei 4° C für 16 Stunden durchgeführt wurde.

Für den Transfer von Proteinen aus Pho-tag™ Gelen wurden diese vor dem Western-Blot mit Puffern gewaschen, um überschüssige Ionen aus dem PAA-Gel zu entfernen. Dazu wurde das Gel sechs Mal für je 10 Minuten in Waschpuffer I und anschließend drei Mal 10 Minuten in Waschpuffer II inkubiert. Darauf folgte der Western-Blot wie beschrieben.

Tabelle 2.19: Für Western Blot verwendete Transferpuffer.

Chemikalie	Transferpuffer Towbin	Phos-tag™ Transferpuffer
Tris	25 mM	25 mM
Glycin	190 mM	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)	-
Methanol	10 % (v/v)	10 % (v/v)
EDTA		1 mM

Tabelle 2.20: Komponenten für Waschpuffer zum Proteintransfer aus Phos-tag™ Gelen.

Chemikalie	Waschpuffer I	Waschpuffer II
Tris	25 mM	25 mM
Glycin	192 mM	192 mM
EDTA	10 mM	1 mM
	pH 7,4 mit HCl	pH 7,4 mit HCl

2.14 Immunologische Analysen

Der immunologische Nachweis spezifischer Proteine erfolgte nach Transfer von Proteingemischen auf Nitrocellulose Membranen. Der Inkubation der Membranen in Antikörper-Lösungen ging ein Blockieren der freien Bindestellen der Membranen voraus. Dazu wurden entweder Milchpulver gesättigte Lösungen, oder ROTI®ImmunoBlock gesättigte Lösungen verwendet. Die jeweilige Blockier-Lösung wurde Primär-Antikörper spezifisch angepasst und ist 2.22 zu entnehmen. Blockier-Lösungen wurden als 5 %ige

Lösungen in 1x TBS-T angesetzt. Zwischen Antikörper-Inkubation wurden die Membranen je drei Mal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen.

Tabelle 2.21: Komponenten für TBS-T Puffer

TBS-T Puffer
150 mM NaCl
7,7 mM Tris
0,1 % (v/v) Polysorbat 20
pH 7,5 mit HCl

Tabelle 2.22: Verwendete Antikörper

Name	Verdünnung	Blockier Agens	Herkunft
α-Lhcx6_1	1:5.000 / 1:10.000	Milchpulver	Diese Arbeit s. 2.16
α-Phospho-Threonin	1:3.000	ImmunoBlock	NovusBio
α-Phospho-Serin	1:3.000	ImmunoBlock	NovusBio
α-PsbA/D	1:3.000	Milchpulver	Agrisera
α-Cm-FCP	1:3.000	Milchpulver	AK Büchel
α-Cc-FCP	1:3.000	Milchpulver	Eppard und Rhiel
α-FCP6 (Lx1)	1:3000	Milchpulver	Eppard und Rhiel
Goat-anti-rabbit-HRP	1:10.000	Milchpulver	Calbiochem

Die Detektion der spezifischen, Primär-Antikörper gesättigten Proteine erfolgte durch den Einsatz eines sekundären Antikörpers, gekoppelt mit einer Meerrettichperoxidase (Goat-anti-rabbit-HRP). Die HRP-Reaktion wurde mittels ECL-Lösung verstärkt und die Chemilumineszenz entweder mit Hilfe des INTAS ChemoStar Imagers oder mittels Röntgenfilm detektiert. Dabei wurden 50 ml der ECL-Lösung 20 μ l 30 % (v/v)

Wasserstoffperoxid hinzugefügt. Die Lösungen für die Röntgenfilm-Detektion sind in 2.23 zu finden.

Tabelle 2.23: Lösungen für immunologischen Protein-Nachweis.

ECL-Lösung	Entwickler	Fixierer	Stopp
100 mM Tris-HCl pH 8,5	1:5 Tetemal Röntgen Konzentrat	1:4 ADEFOFIX	2 % (v/v) Essigsäure
400 µM <i>p</i> -Cumarsäure	ddH ₂ O	ddH ₂ O	ddH ₂ O
2,5 mM Luminol			

2.15 Harsh-Stripping von Western-Blot Membranen

Für eine erneute Beprobung einer Western-Blot Membran mit anderem Primär-Antikörper wurde die Membran einem Strip unterzogen. Dafür wurde diese zunächst von ECL-Resten, durch 3-maliges Waschen in TBS-T Puffer, befreit. Daraufhin folgte eine Inkubation der Membran in Harsh-Stripping Puffer für 30 Minuten. Diese Inkubation wurde im Hybridisierungs-Ofen bei 50° C unter konstantem Rotieren durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran sechsmal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, worauf ein erneutes Blockieren der Membran erfolgte. Schlussendlich wurde die gewaschene Membran erneut mit Primär-Antikörper inkubiert und die Immunodetektion wie beschrieben fortgeführt.

Tabelle 2.24: Komponenten des Harsh-Stripping Puffers

Harsh-Stripping Puffer
125 mM Tris-HCl pH 6,8
4 % (w/v) SDS
1,6 % (v/v) β-Mercaptoethanol

für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 12.000 x g und ein Überführen der oberen, wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß. Diese Phase wurde daraufhin erneut mit einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) wie zuvor extrahiert. Anschließend folgte eine finale Extraktion der wässrigen Phase mit einem Volumen Chloroform wie beschrieben. Die in dieser Phase befindlichen Nukleinsäuren wurden darauf, unter Zuhilfenahme eines Volumens Isopropanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,8, bei -20° C für mindestens eine Stunde gefällt. Die ausgefallenen Nukleinsäuren wurden daraufhin bei 12.000 x g und 4° C für 30 Minuten sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Sediment zwei Mal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, um Salzreste zu entfernen. Es folgte eine Trocknung des Nukleinsäure-Sediments bei 37° C im Heizblock. RNA-Bestandteile wurden anschließend, unter Zugabe von 100 µl ddH₂O mit 5 % (v/v) 10 mg/ml RNase A (Thermo Scientific), für eine Stunde bei 37° C verdaut. Die abschließende Aufreinigung der DNA erfolgte mittels PCI wie beschrieben. Es folgte eine weitere Aufreinigung der wässrigen DNA-Phase mit einem Volumen Chloroform. Die Präzipitation der DNA, sowie das Waschen, wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die DNA wurde in 10 – 20 µl ddH₂O rückgelöst und die Nukleinsäure-Konzentration mittels NanoDrop spektroskopisch bestimmt.

Tabelle 2.25: Komponenten für 2x CTAB-Puffer.

2x CTAB-Puffer
2 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid
20 mM Na₂EDTA
1,4 M NaCl
10 µg/µl Proteinase K (Thermo Scientific)

2.17.2 RNA-Isolation

Um eine gleichbleibende Qualität der RNA-Proben zu gewährleisten, wurden die RNAs mittels Analytik Jena innuPREP Plant RNA Kit isoliert. Die Isolation von 20 – 200 mg, in flüssigem Stickstoff gemörsertem Zellmaterial erfolgte nach Herstellerangaben. Für die Lyse der Zellen wurde Lysis Buffer RL für 10 Minuten unter konstantem Schwenken verwendet. Die Elution der RNAs erfolgte mit 20 µl RNase freiem Wasser. Die Konzentration der eluierten RNA wurde mittels NanoDrop bestimmt. Der Isolation von RNAs folgte ein Beseitigen möglicher DNA-Kontamination mit DNase. Dafür wurden je 1,5 µg RNA mit 1 U DNase I (Thermo Scientific) bei 37° C für eine Stunde verdaut. Die DNase Reaktion wurde unter Zugabe von 1 mM EDTA (Endkonzentration) und Aufheizen bei 65° C für 10 Minuten gestoppt.

2.17.3 cDNA-Synthese

Die isolierte, instabile RNA wurde für weitere Analysen in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden je 1 µg der DNase verdauten RNAs für die cDNA-Synthese verwendet. Die Reaktion erfolgte unter Zuhilfenahme des Oligo(dT)₁₈-Primers und M-MuLV Reverser Transkriptase (New England Biolabs) in 20 µl Reaktionen im PCR-cycler.

Tabelle 2.26: Ansatz für eine cDNA-Synthese mit M-MuLV Reverser Transkriptase

I. Denaturieren der Primer und der RNA

1 µg DNase verdaute RNA
2 µl 50 µM dT ₍₁₈₎ -Primer
2 µl 5 mM dNTPs
ad. 10 µl ddH ₂ O
→ Fünf Minuten 65° C und Abkühlen aus Eis

II. cDNA-Synthese

2 µl 10x M-MuLV Puffer
2 µl M-MuLV Reverse Transcriptase (10 U/µl)
0,2 µl RNase Inhibitor (40 U/µl)
ad. 20 µl ddH ₂ O
→ 42° C für eine Stunde
→ 65° C für 10 Minuten

2.17.4 Quantitative Echtzeit PCR (qRT-PCR)

Die Bestimmung der Transkriptmenge ausgesuchter Gene von in cDNA umgeschriebener RNA-Isolate erfolgte mittels qRT-PCR. Für diese PCR fand der 2x qPCR S'Green Blue Mix von Biozym Verwendung, welcher vor dem Einsatz mit ROX (Biozym) versetzt wurde, um eine Endkonzentration des Stoffes von 100 nM im Reaktionsansatz zu gewährleisten. Die Primer wurden in einer Endkonzentration von jeweils 400 nM verwendet. Die cDNAs kamen in 1:5 oder 1:10 Verdünnungen mit ddH₂O zum Einsatz. Tabelle 2.27 und 2.28 zeigen den qRT-PCR Ansatz sowie die Cycling Instruktionen. Die qRT-Primer wurden so gewählt, dass alle Amplifikate eine Größe von 150 - 250 bp besitzen.

Tabelle 2.27: Ansatz für qRT-PCR

Komponente	Menge
2x qPCR S'Green BlueMix + ROX	10 µl
10 µM Primer forward	0,8 µl
10 µM Primer reverse	0,8 µl
Template	1 µl verdünnte cDNA
ddH ₂ O	Ad. 20 µl

Tabelle 2.28: Programm für qRT-PCRs

Initiale Denaturierung	95° C	10 Minuten
	95° C	5 Sekunden
40 Zyklen	52° C	15 Sekunden
	72° C	15 Sekunden
Schmelzanalyse	95° C	1 Minute
	55° C	30 Sekunden
Aufheizen mit 0,1° C/s auf	95° C	30 Sekunden

Die qRT-PCRs wurden in einer Rotor-Gene Q (QiaGen) oder einer MxPro 3000P (Agilent) Maschine durchgeführt. Die Analyse erfolgte in der entsprechenden Software. Alle Proben wurden in technischen Triplikaten vermessen, von denen vereinzelt Ausreißer mit einem CT-Unterschied von >1 CT zu den anderen Replikaten ausgesondert wurden. Die Auswertung erfolgte immer als Mittelwert der Replikate und der Berechnung der relativen Expression mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode nach Livak und Schmittgen (2001) unter Verwendung einer Housekeeping-Gen Kontrolle (Histon 4). Als Negativkontrolle kam zu jedem qRT-Ansatz ein Triplikat ohne cDNA zum Einsatz. qRT-PCRs wurden nur als aussagekräftig mit einem einzigen, sauberen Maximum in der Schmelzkurve pro untersuchten Transkript behandelt.

2.17.5 Taq-PCR

Die Vervielfältigung von DNA zu diagnostischen Zwecken wurde mit Hilfe des Red *Taq* DNA Polymerase Master Mix von VWR durchgeführt. Ein Standardansatz ist Tabelle 2.29 zu entnehmen. Die Amplifikation wurde im PCR-cycler nach dem in Tabelle 2.30 dargestellten Programm durchgeführt. Dabei wurde die Annealing-Temperatur der Primer so gewählt, dass diese 5° C unter der niedrigsten Schmelztemperatur des Primerpaars liegt.

Die Vervielfältigung der DNA erfolgte bei 72° C und 60 Sekunden Amplifikationszeit für 1.000 bp.

Tabelle 2.29: Ansatz für Taq-PCR

Komponente	Menge
2x Red Taq Master Mix	7,5 µl
10 µM Primer forward	0,75 µl
10 µM Primer reverse	0,75 µl
Template	gDNA: 50 ng plasmid DNA: 5 ng
ddH ₂ O	ad. 15 µl

Tabelle 2.30: Programm für Taq-PCRs

Initiale Denaturierung	95° C	3 Minuten
	95° C	15 Sekunden
28 – 35 Zyklen	50 – 65° C	20 Sekunden
	72° C	60 Sekunden pro 1.000 bp
Finale Elongation	72° C	3 Minuten

2.17.6 Pfu-PCR

Um eine fehlerfreie Amplifikation von DNA-Fragmenten zu erreichen, wurde für die Vervielfältigung zu klonierender DNA-Stücke die Pfu-Polymerase (Thermo Scientific) verwendet. Die Pfu-Polymerase kam für Amplifikate bis 2000 Basenpaare zum Einsatz. Tabelle 2.31 sind die Komponenten des Pfu-PCR Ansatzes zu entnehmen. Das Standardprotokoll ist in Tabelle 2.32 dargestellt. Die Annealing-Temperatur wurde hier ebenso 5° C unter minimaler Schmelztemperatur des Primer Paares gewählt.

Tabelle 2.31: Pfu-PCR Ansatz

10x Pfu Puffer	1x Pfu-PCR Ansatz
100 mM Tris	2 µl 10x Pfu Puffer
250 mM KCl	1,7 µl 3 M Betain
50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	1,6 µl 5 mM dNTPs
20 mM MgSO ₄	1,5 µl Pfu-Polymerase
	1 µl je Primer
	1 µl Template
	ad. 20 µl dd H ₂ O

Tabelle 2.32: Programm für Pfu-PCRs

Initiale Denaturierung	95° C	3 Minuten
	95° C	15 Sekunden
28 – 35 Zyklen	50 – 65° C	20 Sekunden
	68° C	60 Sekunden pro 1.000 bp
Finale Elongation	68° C	3 Minuten

2.17.7 Phusion-PCR

Eine Amplifikation von DNA mittels Phusion-Polymerase (Thermo Scientific) wurde für große oder schwierig zu vervielfältigende Fragmente eingesetzt. Zudem wurde bei schwierigen Amplifikationen der GC-Puffer zu Hilfe genommen sowie DMSO. DMSO-Zugabe erfolgte zwischen 1 und 3 % (v/v) Endkonzentration. Die Annealing-Temperaturen der Primer wurden mittels NEB Tm Calculator bestimmt. Mengen für einen PCR-Ansatz sowie das verwendete Standardprogramm sind Tabelle 2.33 und 2.34 zu entnehmen.

Tabelle 2.33: Phusion-PCR Ansatz

Komponente	Menge
5x Phusion HF/GC Puffer	4 µl
10 µM Primer forward	1 µl
10 µM Primer reverse	1 µl
5 mM dNTPs	0,8 µl
Phusion-Polymerase	0,2 µl
Template	gDNA: 50 ng plasmid DNA: 5 ng
ddH ₂ O	ad. 20 µl

Tabelle 2.34: Programm für Phusion-PCRs

Initiale Denaturierung	98° C	3 Minuten
	98° C	15 Sekunden
28 – 35 Zyklen	50 – 65° C	20 Sekunden
	72° C	20 Sekunden pro 1.000 bp
Finale Elongation	72° C	3 Minuten

2.17.8 Hot-Fusion (HF) (Fu *et al.*, 2014)

Die Klonierung spezifischer DNA-Fragmente in linearisierte Vektoren erfolgte mittels Hot-Fusion (HF) nach Fu *et al.* (2014). Dafür wurden ausgewählte Plasmide zunächst mit Fast-Digest Restriktionsenzymen 1 – 3 Stunden bei 37° C verdaut. Es folgte eine Inaktivierung des Verdauers bei 80° C für 10 Minuten. Die in diesen Vektor einzubringenden DNA-Fragmente wurden mittels Hot-Fusion Primer (vgl. 2.2), mit 15 - 20 bp Überhang zum Vektor an 5' sowie 3' Ende und Pfu- oder Phusion-Polymerase amplifiziert.

Es folgte eine Inkubation des geschnittenen Vektors und der PCR-Produkte, mit Vektorspezifischen Überhängen, bei 50° C für 15 Minuten oder eine Stunde, abhängig von der Größe des einzubringenden Fragments. Die Komponenten solch eines Hot-Fusion Ansatzes sind Tabelle 2.35 zu entnehmen. Bei mehreren Inserts wurde die Menge der einzelnen PCR-Produkte des HF-Ansatzes gleichmäßig auf die Anzahl aufgeteilt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend bei 0,1° C/s auf 20° C abgekühlt und *E. coli* direkt im Anschluss mit diesem transformiert (s. 2.18.2).

Tabelle 2.35: Komponenten für die Hot-Fusion-Reaktion.

5x Isothermer Puffer	2x Reaktionspuffer	HF-Ansatz
25 % (v/v) PEG-8000	100 µl 5x Isothermer Puffer	1 µl Plasmid
500 mM Tris	6,25 µl 2 U/µl Phusion-Polymerase (Thermo Scientific)	1,5 µl PCR-Produkt
50 mM MgCl ₂	0,2 µl 10 U/µl T5-Exonuclease (Thermo Scientific)	2,5 µl 2x Reaktionspuffer
50 mM DTT	ad. 250 µl ddH ₂ O	
1 mM dNTPs		
5 mM NAD		
pH 7,5 mit HCl		

2.17.9 Restriktionsverdau

Der Verdau von Plasmiden wurde mittels Fast-Digest Restriktionsenzymen von Thermo Scientific oder New England Biolabs. Dabei wurden 1 µg DNA mit 1 µl Enzym und entsprechender Menge 10x CutSmart-Puffer (New England Biolabs) oder 10x Fast-Digest Puffer (Thermo Scientific) bei 37° C für 1 – 3 Stunden geschnitten. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte daraufhin bei 80° C für 10 Minuten.

2.17.10 Aufreinigung von DNA aus PCR und Restriktionsverdau

Zum Aufreinigen von Amplifikaten aus PCR-Reaktionen oder geschnittenen Plasmiden aus Restriktionsverdau kam eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) (PCI) Extraktion der Nukleinsäuren zum Einsatz. Dafür wurden die aufzureinigenden Proben zunächst mit ddH₂O auf 200 µl aufgefüllt. Es folgte die Zugabe eines Volumens PCI und mehrfaches Invertieren der Probe. Nach fünfminütiger Inkubation des Gemischs bei Raumtemperatur wurde dieses bei 12.000 x g für fünf Minuten abzentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform versetzt. Nach mehrfachem Invertieren und Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch bei 12.000 x g abzentrifugiert und die obere Phase erneut in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt. Die Nukleinsäuren wurden daraufhin mit zwei Volumen Ethanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,8 bei -20° C für mindestens eine Stunde gefällt. Die ausgefallene DNA wurde bei 12.000 x g für 30 Minuten und 4° C sedimentiert. Anschließend wurde das Sediment zwei Mal mit je 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach Trocknen der DNA bei 37° C wurde diese in 10 – 20 µl ddH₂O rückgelöst.

2.17.11 Sequenzierung (nach Sanger *et al.*, 1977)

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mittels Sanger Sequenzierung bei Eurofinsgenomics oder MircoSynth Seqlab unter Verwendung von ausgewählten Oligonukleotid-Startern. Für die Sequenzierung kamen 500 ng Plasmid und 2,5 µl 10 µM Primer zum Einsatz.

2.17.12 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dafür kamen 1 % (w/v) oder 2 % (w/v) Agarosegele, je nach aufzutrennenden Fragmenten zum Einsatz. Sowohl für die Bereitung der Gelmatrix, als auch als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 – 100 V. Als Größenstandard diente der

GeneRuler™ Ladder Mix (Thermo Scientific), als Ladepuffer der 6x TriTrack DNA Loading Dye (Thermo Scientific).

Tabelle 2.36: Komponenten für 1x TAE-Puffer.

TAE-Puffer
40 mM Tris
1mM EDTA
20 mM Essigsäure

Das Färben der Agarosegele, zur Detektion der aufgetrennten Nukleinsäuren, erfolgte mit 20 mM Ehtidumbromid-Lösungen für 5 – 10 Minuten unter konstantem Schütteln. Die DNA-Ethidumbromid Interkalation wurde mittels UV-Transilluminator detektiert und ein invertiertes Lichtbild aufgenommen.

2.18 Transformation von Organismen

2.18.1 Herstellung Chemokompetenter *E. coli* Zellen

Die verwendeten *E. coli* Zellen wurden mit Hilfe von Chemikalien zur Hitzeschock-vermittelten Aufnahme von Fremd-DNA befähigt. Dazu wurden 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37° C mit dem gewünschten *E. coli* Stamm schüttelnd inokuliert. Mit 2 ml der Übernachtskultur wurden anschließend 200 ml LB angeimpft und die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37° C wachsen lassen. Es folgte eine Ernte der Zellen bei 3500 xg und 4° C für 10 Minuten. Nach Entfernen des Überstands wurden die sedimentierten Zellen in 40 ml TFB₁ rückgelöst und darin 90 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden diese erneut bei diesmal 650 xg und 4° C für fünf Minuten geerntet und in 8 ml TFB₂ rückgelöst. Die TFB-Puffer sind Tabelle 2.37 zu entnehmen, es kamen Kaliumchlorid (KCl)- sowie Rubidiumchlorid (RbCl)-Puffer zum Einsatz. Die Puffer wurden durch 0,2 µm Filter

sterilfiltriert. Die Zellen wurden zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert.

Tabelle 2.37: Komponenten für die Chemokompetenz-Puffer.

TFB₁ CaCl₂	TFB₂ CaCl₂	TFB₁ RbCl	TFB₂ RbCl
30 mM K-Acetat	10 mM MOPS	30 mM K-Acetat	10 mM MOPS
50 mM MnCl ₂	10 mM KCl	50 mM MnCl ₂	10 mM RbCl
400 mM KCl	75 mM CaCl ₂	100 mM RbCl	75 mM CaCl ₂
10 mM CaCl ₂	15 % (v/v) Glycerin	10 mM CaCl ₂	15 % (v/v) Glycerin
15 % (v/v) Glycerin		15 % (v/v) Glycerin	
pH 5,8	pH 7,0	pH 5,8	pH 7,0

2.18.2 Transformation von *E. coli*

Zur biologischen Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurde *E. coli* mit diesen transformiert. Dafür wurden die chemokompetenten Zellen über Hitzeschock transformiert. Die kompetenten Zellen wurden schonend auf Eis aufgetaut und mit wenigen ng des zu vervielfältigenden Plasmids versetzt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Darauf wurde das Zell-Plasmid Gemisch einem Hitzeschock bei 42° C für 45 Sekunden ausgesetzt und darauf drei Minuten auf Eis abgekühlt. Das Gemisch wurde mit 200 µl LB-Medium versetzt und bei 37° C schüttelnd für 30 Minuten inkubiert. Darauf folgte ein Ausplattieren der Zellen auf LB-Platten mit dem nötigen Selektions-Antibiotikum (s. 2.18.7) und Inkubation bei 37° C über Nacht zum Erhalt vereinzelter Kolonien.

2.18.3 Transformation *C. meneghiniana*

Für *C. meneghiniana* wurden verschiedene Methoden der Transformation ausgetestet. Dabei kamen Elektroporation und bakterielle Konjugation als neue Methodiken zum Einsatz, welche zunächst etabliert wurden. Die methodische Auflistung bezieht sich auf die etablierten Optimalprotokolle. Für alle Transformationsmethodiken wurden 5 – 7 Tage alte Zellkulturen verwendet, da diese die besten Ergebnisse erzielten. Die Zellen wurden vor jeder Methode mittels Neubauer Zählkammer in Triplikaten gezählt und bei 1500 – 2500 xg für wenige Minuten schonend sedimentiert. Daraufhin wurden diese im für die nötige Zellmenge ermittelten Volumen Medium resuspendiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf 100 µg/ml Nourseothricin ASP-Sil Platten bei 10 – 20 µmol Photonen/m²/s für 16 h pro Tag und 16° C.

2.18.4 Biolistische Transformation (Sanford *et al.*, 1987)

Für die Biolistische Transformation wurden fünf Mal 1×10^8 *C. meneghiniana* Zellen in ASP-Sil auf Größe eines zwei Euro Stücks auf ASP-Sil Platte ausgestrichen. Für fünf Schüsse mit je 1 µg Plasmid wurden 3 mg Wolfram-Partikel M10 mit einem Durchmesser von 0,7 µm (Biorad) in einem Volumen von 50 µl mit ddH₂O mit 5 µg Plasmid-DNA, 50 µl 2,5 M CaCl₂ und 20 µl 0,1 M Spermidin gemischt. Nach Mischen des Ansatzes auf dem Vortex-Schüttler für eine Minute wurde dieser für 10 Minuten ruhen gelassen. Darauf folgte eine kurze Zentrifugation bei 13.000 rpm und Abnahme des Überstands. Das Partikel-Gemisch wurde folgend in 250 µl Ethanol rückgelöst und gut vermischt. Nach 5-minütiger Inkubation wurde erneut wie beschrieben zentrifugiert und die Partikel in 50 µl Ethanol rückgelöst. Pro Transformation wurde die ausgestrichene Zellmenge mit 10 µl Partikellösung aus einer Entfernung von ca. 20 cm, im Vakuum bei 140 mBar und 90 Bar Druck beschossen. Als druckgebender Beschleuniger diente Stickstoff, wobei das Ventil für jeden Schuss 10 ms geöffnet wurde. Dem Beschuss der Zellen folgte eine Dunkelinkubation bei 20° C über

Nacht. Am nächsten Tag wurden diese in ASP-Sil rückgelöst und auf Selektionsplatten ausgestrichen.

2.18.5 Elektroporation (Neumann *et al.*, 1982)

Diese Methodik konnte aufgrund des Einsatzes eines Super Electroporator NEPA21 TYPE II (NEPA GENE) etabliert werden. Für die Elektroporation wurde die nötige Menge *C. meneghiniana* Zellen zunächst mit 0,77 M Mannitol + ASP (97,5 % v/v 0,77 M Mannitol, 2,5 % ASP) gewaschen. Dies erfolgte zwei Mal, wobei die Zellen jedes Mal bei 1500 xg geerntet wurden. Die Zellen wurden letztendlich in 0,77 M Mannitol + ASP (97,5 % v/v 0,77 M Mannitol, 2,5 % ASP) rückgelöst um eine Konzentration der Zellen von $2,5 \times 10^7$ in 35 μ l zu erzielen. Dieses Volumen Zellen wurde in einer Küvette mit 2mm Spalt mit 1 μ g des linearisierten, aufgereinigten Plasmids (s. 2.17.10) vermengt und der Widerstand mit dem salzreichen F/2 Medium auf 0,5 – 0,6 k Ω justiert. Die Elektroporation erfolgte unter dem Einsatz von 3 – 6 Poring Pulsen, je nach Widerstand. Diese Pulse wurden auf eine Spannung von 300 V, 5 ms Länge, 50 ms Intervall zwischen den Pulsen und 10 % Abklingrate eingestellt. Auf die Poring Pulse folgten 5 Transfer Pulse zu je 20 V, 50 ms Länge, 50 ms Intervall, einer 40 %igen Abklingrate und Polaritätswechsel von Puls zu Puls. Die transformierten Zellen wurden unverzüglich in je 5 ml ASP-Sil aufgenommen und 1,5 Stunden bei RT dunkel inkubiert. Danach folgte eine Inkubation über Nacht bei 20° C in ca. 5 μ mol Photonen/m²/s Licht und schlussendlich Ausplattieren auf Selektionsplatte.

2.18.6 Bakterielle Konjugation (Diner *et al.*, 2016)

Das Austesten und die gezeigten Daten der Konjugation von *C. meneghiniana* sind auf M. Eudenbach (2020) zurückzuführen. Hierfür wurden die gewünschten Transfektions-Plasmide in *E. coli* Stamm Dh10b-pTA-MOB über Hitzeschock-Transformation

eingbracht. Eine vereinzelte Kolonie wurde daraufhin in 5 ml LB mit Gentamycin (25 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) über Nacht bei 37° C inkubiert und am nächsten Tag 50 ml LB mit einer kleinen Menge der Prä-Kultur inokuliert. Diese Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von knapp über 1,0 bei 37° C wachsen gelassen, bei 2500 xg 5 Minuten geerntet und in 1 ml LB resuspendiert. 100 µl dieser Zellsuspension wurden mit 2*10⁷ *C. meneghiniana* Zellen auf Konjugationsmedium (66 % v/v ASP-Sil, 5 % (v/v) LB, 1,3 % (w/v) Agar Agar) vermischt und für 1,5 h bei RT dunkel inkubiert. Es folgte eine Inkubation der Platten bei 16° C für wenige Tage und anschließendes Rücklösen und Ausplattieren der Zellen auf Selektionsplatten.

2.18.7 Verwendete Antibiotika

Die verwendeten Selektions-Antibiotika und deren Endkonzentration im Medium sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2.38: Verwendete Antibiotika zur Selektion.

Antibiotikum	Organismus	Endkonzentration
Ampicillin	<i>E. coli</i>	100 µg/ml
Kanamycin	<i>E. coli</i>	50 µg/ml
Gentamycin	<i>E. coli</i>	25 µg/ml
Nourseothricin	<i>C. meneghiniana</i>	100 µg/ml

2.19 Bioinformatische Analysen

2.19.1 Genom-Analyse mittels BLAST (Altschul *et al.*, 1990)

Gene oder Proteine wurden mittels NCBI BLAST auf ihre Homologe untersucht. Die untersuchten Referenzgenome sind in Tabelle 2.1 zu finden.

2.19.2 Sequenzvergleich mittels Clustal-Alignment (Higgins und Sharp 1988)

Ähnlichkeitsvergleiche und Stammbäume wurden mittels Clusal ermittelt. Hierfür wurden die über NCBI BLAST ermittelten Sequenzen der Referenzgenome verwendet.

2.19.3 *In Silico* Phosphorylierungs-Vorhersage (Blom *et al.*, 1999)

Mögliche Phosphorylierungsstellen des Lhcx6_1 Proteins aus *C. meneghiniana* wurden über eine NetPhos Analyse vorhergesagt.

2.19.4 Protein-Modellierung mittels SWISS-MODEL (Guex *et al.*, 2009)

Die Lhcx6_1 Proteinstruktur aus *C. meneghiniana* wurde mittels SWISS-MODEL modelliert, wobei die Sequenz des angegebenen Referenzgenoms zum Einsatz kam. Die Sequenz wurde im SWISS-Pdb-Viewer begutachtet.

2.19.5 Protein-Modellierung mittels I-TASSER (Yang und Zhang, 2015)

Die Lhcx6_1 Struktur wurde vergleichend mittels I-TASSER modelliert, womit zusätzlich eine Solvent Accessibility Prediction der Aminosäuren des Proteins durchgeführt wurde.

3. Ergebnisse

3.1 Lhcx6_1 aus *Cyclotella meneghiniana*

Trotz der ökologischen und Signifikanz und des nicht zu unterschätzenden Forschungsmehrwerts der Kieselalgen, sind bis dato nur wenige Spezies dieses Taxon sequenziert. Der hier untersuchte Organismus *Cyclotella meneghiniana* SAG-1020-1a (ehemals *Cyclotella cryptica*) gilt als eine der am besten untersuchten zentrischen Diatomeen in Belangen der Photosynthese-Forschung, ohne jedoch eine vollständige Sequenzierung des Genoms aufweisen zu können. Dennoch wurde das Genom der eng verwandten, zentrischen Diatomee *Cyclotella cryptica* im Jahre 2016 erstmalig sequenziert (Traller *et al.*, 2016). Jenes diente als Referenzgenom dieser Arbeit. Um genauere Aussagen über das hier untersuchte Lhcx6_1 Protein aus *C. meneghiniana* tätigen zu können und das zugrundeliegende Gen molekularbiologisch zugänglich zu machen, wurde zunächst eine Sequenzierung des lhcx6_1-Gens des untersuchten *Cyclotella* Stamms vorgenommen. Die Sequenzierung erfolgte in zwei separaten PCR-Amplifikationen des Gens aus gDNA, anschließender Klonierung in einen Expressionsvektor und Sequenzierung dessen. Im Folgenden ist die in beiden Fällen erhaltene, identische DNA-Sequenz sowie deren Abweichung vom *C. cryptica* Genom dargestellt.

<i>C. cryptica</i>	ATGAAGCTCGCTATCCTTTCCACCTCCTCGCCACTGCCTCCGCTTCGCCCCGGCTCAA	60
<i>C. meneghiniana</i>	ATGAAGCTCGCTATCCTTTCCACCTCCTCGCCACCGCCTCCGCTTCGCCCCGGCTCAA *****	60
<i>C. cryptica</i>	CAAGGCCCATCTATCACCGCCTCGCTGCCACCCGCGCCGTNNNNNNNNNNNNNNNNNN	120
<i>C. meneghiniana</i>	CAGGGCCCATCTATCACCGCCTCGCTGCCACCCGCGCCGTGCGCAAGGCCGCCCTAAG ** *****	120
<i>C. cryptica</i>	NN	180
<i>C. meneghiniana</i>	AAGGAAGCCGCACCAAAGAAGG-----CCGCCGCCGCCCAAAGAAA	162
<i>C. cryptica</i>	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGCCGCCAAGCTCCCCCTGGACTCGTCGGTGCCTCCCC	240
<i>C. meneghiniana</i>	GCCGCAGCAGTGAAGAAGCCCGCTGCCAAGCTCCCCCTGGACTCGTCGGCGCCTCCCC ** *****	222
<i>C. cryptica</i>	CCAGTAGGCTTCTTCGACCCCGCCGATTGCGCGCAAGGCCTCCCCGAAGAACTCTCT	300
<i>C. meneghiniana</i>	CCAGTAGGCTTCTTCGACCCCGCCGATTGCGCGCAAGGCCTCCCCCAAGAGCTCGCT ***** **	282
<i>C. cryptica</i>	CGCTACCGTGAAGTCGAAATCATGCACGGACGTTTCGCCCAATTGGCCGTCTCGGCTTC	360
<i>C. meneghiniana</i>	CGCTACCGTGAAGTCGAAATCATGCACGGACGTTTCGCCCAATTGGCCGTCTCGGCTTC *****	342

Ergebnisse

<i>C. cryptica</i>	ATCATCCCCGAGAAGTGTGCCTACGACGGCAGCTTCGGAGATGATTTCCCTTGCCCCACC	420
<i>C. meneghiniana</i>	ATCATCCCCGAGAAGTGTGCCTACGATGGCAGCTTCGGAGATGACTTCCTTGCCCCACC *****	402
<i>C. cryptica</i>	GGACGTGCCCTTGAGGTCTTCAACACCGACCCCTCTGGCTCGGACTCACTCTCGCAGTT	480
<i>C. meneghiniana</i>	GGACGTGCCCTTGAGGTCTTCAACACCGACCCCTCTGGCTCGGACTCACTCTTGCCTT ***** **	462
<i>C. cryptica</i>	ATCTCGGCCTCGAGACCGTTCGTCTCATTGAGACCGAGCCGGAACTCGTACCGATGCC	540
<i>C. meneghiniana</i>	ATCTCTGCTCTCGAGACCGTTCGTCTCATTGAGACCGAGCCGGAACTCGTACCGATGCC *****	522
<i>C. cryptica</i>	AAGATCGAGAGTCTCGGTTGGCGACCCAAGACCGAGTTCGGAGTACATCAACTACCAGGTT	600
<i>C. meneghiniana</i>	AAGATCGAGGTTCTCGGCTGGCGACCCAAGACCGAGTTCGGAGTACATCAACTACCAGGTT *****	582
<i>C. cryptica</i>	CGTGAGCTTCAGCAGGGACGTCTTGCCATGCTTGCCCTTGGCCGAGAAGTTGCGCAAGAA	660
<i>C. meneghiniana</i>	CGTGAGCTTCAGCAGGGACGTCTTGCCATGCTTGCCCTTGGCTGGAGAAGTTGCGCAAGAA *****	642
<i>C. cryptica</i>	TTGGTCAATGACAAGCCTCTTTTGGTGAACCTCCAAGACTCTGGCTTCGTCTCGTGGTAA	720
<i>C. meneghiniana</i>	TTGGTGAATGACAAGCCTCTTTTGGTGAACCTCCAAGACTCTGGCTTCGTCTCGTGGTAA *****	702

Abbildung 3.1: Sequenzvergleich der DNA-Sequenz des lhcx6_1 Gens aus *C. cryptica* und *C. meneghiniana* mittels Clustal Omega.

Der Vergleich der lhcx6_1 DNA-Sequenzen erfolgte mittels der *C. cryptica* Sequenz nach Traller et al. (2016) und der hier sequenzierten *C. meneghiniana* Sequenz. Identische Nukleotide sind mit * dargestellt, während fehlende Basen mit – markiert sind. Nicht identische Nukleotide sind mit Leerzeichen versehen. Die Nummerierung des letzten Nukleotids einer Reihe der dargestellten Sequenz befindet sich auf der rechten Seite der Abbildung. Unsicherheiten der Sequenzierung des *C. cryptica* Genoms sind mit N versehen.

Des Weiteren ist die Translation der untersuchten Sequenzen aufgelistet, um die daraus resultierenden Proteine beurteilen zu können.

<i>C. cryptica</i>	MKLAILSTLLATASAFAPAQQGPSITALAATRAXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	60
<i>C. meneghiniana</i>	MKLAILSTLLATASAFAPAQQGPSITALAATRAVAKAAPKKE <u>A</u> APKK-----AAAAPKK *****	54
<i>C. cryptica</i>	XXXXXXXXAAQAPPGLVGLPVPVGFDPAGFAAKASPEELSRYPEVEIMHGRFAQLAVLGF	120
<i>C. meneghiniana</i>	AAAVKKPAAQAPPGLVGLPVPVGFDPAGFAAKASPEELARYPEVEIMHGRFAQLAVLGF *****: *: *****	114
<i>C. cryptica</i>	I IPEKCAVDGSFGDDFLAPTGRALEVNTDPLWLGLTLAVISALETVRLIETEPGTRTDA	180
<i>C. meneghiniana</i>	I IPEKCAVDGSFGDDFLAPTGRALEVNTDPLWLGLTLAVISALETVRLIETEPGTRTDA *****	174
<i>C. cryptica</i>	KIESLGWRPKTESEYINYQVRELQQRLAMLAFAGEVAQELVNDKPLLVLNQLQDSGFVSW	239
<i>C. meneghiniana</i>	KIEGLGWRPKTESEYINYQVRELQQRLAMLAFAGEVAQELVNDKPLLVLNQLQDSGFVSW ***. *****	233

Abbildung 3.2: Sequenzvergleich der Protein-Sequenz des translatierten lhcx6_1 Gens aus *C. cryptica* und *C. meneghiniana* mittels Clustal Omega.

Der Vergleich der lhcx6_1 Protein-Sequenzen erfolgte mittels der translatierten *C. cryptica* Sequenz nach Traller et al. (2016) und der hier sequenzierten *C. meneghiniana* Sequenz. Identische Aminosäuren sind mit * dargestellt, während fehlende Aminosäuren mit – markiert sind. Nicht identische Sequenzen sind mit Leerzeichen versehen. Ein konservativer Austausch von Aminosäuren, mit ähnlicher biochemischer Eigenschaft, ist mit : gekennzeichnet, während semi-konservative Veränderungen mit . aufgelistet sind. Die Nummerierung der letzten Aminosäure einer Reihe der dargestellten Polypeptidkette befindet sich auf der rechten Seite der Abbildung. Fehlende Information aufgrund der Unsicherheiten der Sequenzierung des *C. cryptica* Genoms sind mit X versehen. Eine Vorhersage des ER-Signal Peptids ist rot unterlegt, das Plastiden-Transit Peptid grün nach Huesgen et al. (2013) sowie Kilian und Kroth (2005). Die erste, N-terminale Aminosäure der modellierten Struktur (s. 3.4) ist fett dargestellt und unterstrichen.

Ergebnisse

Die dargestellten Vergleiche der Sequenzen des *lhcx6_1*-Gens sowie dessen Protein-Translation zeigen minimale Unterschiede. So konnten die Unsicherheiten der Sequenzierung nach Traller *et al.* (2016) aufgelöst werden. Bis auf drei Aminosäure-Veränderungen, mit putativ wenig Effekt auf die Proteinstruktur /-Funktion, ist die Polypeptidstruktur des Proteins beider Arten konserviert. Hierbei ist unter anderem ein Aminosäure-Austausch von Glutaminsäure (E) zu Glutamin (Q) zu beobachten, welcher aufgrund geringer physiochemischer Distanz der beiden Aminosäuren zu vernachlässigen ist (Grantham, 1974; Miyata *et al.*, 1979). Auch eine mögliche Pigmentbindung ist durch diesen Austausch noch gewährleistet (Kühlbrandt *et al.*, 1994; Remelli *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2019). Der beobachtete Austausch von Serin (S) zu Alanin (A) ist ebenso ein Austausch mit geringer physiochemischer Distanz. Lediglich der letzte Austausch von Serin (S) zu Glycin (G) birgt eine Veränderung der biochemischen Eigenschaften an dieser Stelle.

Des Weiteren ist ein Vergleich der ermittelten *Lhcx6_1* Proteinsequenz aus *C. meneghiniana* mit der ebenfalls zentrischen Diatomee *T. pseudonana* aufgelistet.

<i>C. meneghiniana</i>	MKLAILSTLLATASAFAPAQQGPSITALAATRAVAKAAPKKEAAPKAAAAAPKAAAVKK	60
<i>T. pseudonana</i>	MKLAIISTLIAGAAAFAPQTVGPSTSALSAT-----	31
	*****:*:*:* *:*:***** ***:**:*:**	
<i>C. meneghiniana</i>	PAAQAPPGLV GALPPVGFDPAGFAAKAS PQELARYREVEIMHGRFAQLAVLGFIIPEKC	120
<i>T. pseudonana</i>	-----RAGLVGALPPVGFDPAGFAAKASPEELARYREVEIMHGRFAQMAVLGFIIPEKC	86
	*****:*****:*****:*****:*****:*****	
<i>C. meneghiniana</i>	AYDGSFGDDFLAPTGRALEVNTDPLWLGLTLAVISALETVRLIETEPGTRTRDAKIEGLG	180
<i>T. pseudonana</i>	AYDGAFGDDFLAPTGRALEAINTDPVWLALTLGVISALET LRLQLQTEPGTRTRDAKIEGLG	146
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
<i>C. meneghiniana</i>	WRPKTESEYIN YQVRELQQGRLAMLAFAGEVAQELVNDKPLL VNLQDSGFVSW	233
<i>T. pseudonana</i>	WRPKSEAEFVNYQVRELQQGRLAMLAFAGEIAQELVNEKPLL VNLQDSGFVSW	199
	*****:*:*:*:*****:*****:*****:*****	

Abbildung 3.3: Sequenzvergleich der Protein-Sequenz des translatierten *lhcx6_1* Gens aus *C. meneghiniana* und *T. pseudonana* mittels Clustal Omega.

Der Vergleich der *lhcx6_1* Protein-Sequenzen erfolgte mittels der translatierten *C. meneghiniana* Sequenz und der *T. pseudonana* *Lhcx6_1* Sequenz (Armbrust *et al.*, 2004). Identische Aminosäuren sind mit * dargestellt, während fehlende Aminosäuren mit – markiert sind. Nicht identische Sequenzen sind mit Leerzeichen versehen. Ein konservativer Austausch von Aminosäuren, mit ähnlicher biochemischer Eigenschaft, ist mit : gekennzeichnet, während semi-konservative Veränderungen mit . aufgelistet sind. Die Nummerierung der letzten Aminosäure einer Reihe der dargestellten Polypeptidkette befindet sich auf der rechten Seite der Abbildung.

Ergebnisse

Der Abgleich der Proteinsequenzen des Lhcx6_1 der beiden zentralen Diatomeen zeigt ein Fehlen der 34 Aminosäuren langen N-terminalen Sequenz in *T. pseudonana*. Im Bereich des Transit- bzw. Signalpeptids sind die größten Unterschiede der Polypeptidsequenzen zu beobachten. Dabei gibt es einige konservative AS-Austausche, aber auch nicht konservative, die mit Leerzeichen versehen sind und eine Veränderung der physiochemischen Eigenschaften der AS mit sich bringen. Im Bereich der maturen Proteinsequenz sind hauptsächlich konservative Austausche von Aminosäuren zwischen den zwei Spezies zu beobachten. Zudem können drei semi-konservative Änderungen ausgemacht werden. Für die entstandenen Diskrepanzen kann keine schwerwiegende Veränderung der Proteinstruktur- /Funktion ausgemacht werden.

3.1.1 Lhcx6_1 Transkript

Als erster Anhaltspunkt für weitere Analysen der Funktion des Lhcx6_1 Proteins wurde die Prozessierung des Gens nach erfolgter Transkription betrachtet. Dafür wurden gDNA aus *C. meneghiniana* sowie der eng verwandten, sequenzierten, zentralen Diatomee *Thalassiosira pseudonana* isoliert. Zudem kamen RNA-Isolation und cDNA-Synthese beider Organismen zum Einsatz, wobei für *C. meneghiniana* RNA einer Schwachlicht- sowie Starklicht-Kultur prozessiert wurde. Nachfolgend wurde das lhcx6_1 Gen mittels Gen-spezifischer Oligonukleotide aus den bereiteten Nukleinsäureproben mittels PCR amplifiziert und elektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung 3.4 zeigt die erhaltenen Größen der Amplifikate.

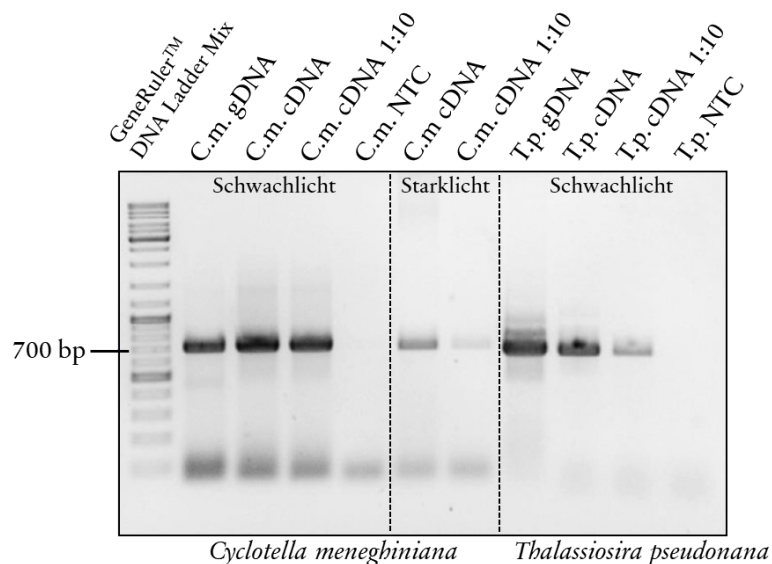


Abbildung 3.4: Agarosegelelektrophorese der PCR-Amplifikate des lhcx6_1 Gens aus unterschiedlichen Proben.

Die mittels lhcx6_1 spezifischer Oligonukleotide amplifizierte DNA aus genomischer DNA (gDNA) sowie revers transkribierter mRNA (cDNA) von *C. meneghiniana* und *T. pseudonana* wurde in einem 1%igen Agarosegel bei 100V aufgetrennt. Die Nucleinsäuren wurden mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht detektiert. Es kamen *C. meneghiniana* cDNA Proben aus Schwachlicht- und Starklichtkulturen zum Einsatz. Die cDNA wurde unverdünnt und 1:10 mit Wasser verdünnt verwendet. Die Negativkontrolle (No Template Control = NTC) enthielt alle PCR Reagenzien, bis auf das DNA-Template. Als DNA-Größenstandard diente der GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Die untersuchten Gen-Amplifikate zeigen innerhalb einer Spezies keinerlei Unterschiede. So lassen sich sowohl für gDNA als auch cDNA Amplifikate aus Schwach- und Starklicht eine Größe von ca. 700 bp erkennen. Dennoch konnten Unterschiede zwischen den Spezies festgestellt werden. Hierbei scheint die Größe des lhcx6_1 Gens aus *T. pseudonana* etwas kleiner zu sein als die der untersuchten *C. meneghiniana* Proben. In Übereinstimmung mit den *C. meneghiniana* Proben konnten auch in *T. pseudonana* cDNA- und gDNA-Amplifikaten keine Größenunterschiede festgestellt werden. Somit ist eine Intron-Exon Struktur und damit auch eine splice-Variante des lhcx6_1-Gens unwahrscheinlich.

3.1.2 Lhcx6_1 Strukturmodell

Die LHC-typische Struktur des Lhcx6_1 Proteins wurde folglich aus den erhaltenen Sequenzdaten modelliert. Das Modellieren erfolgte mittels SWISS-MODEL auf Basis des monomeren FCPb5 (Lhcr17) aus der zentralen Diatomee *Chaetoceros gracilis*.

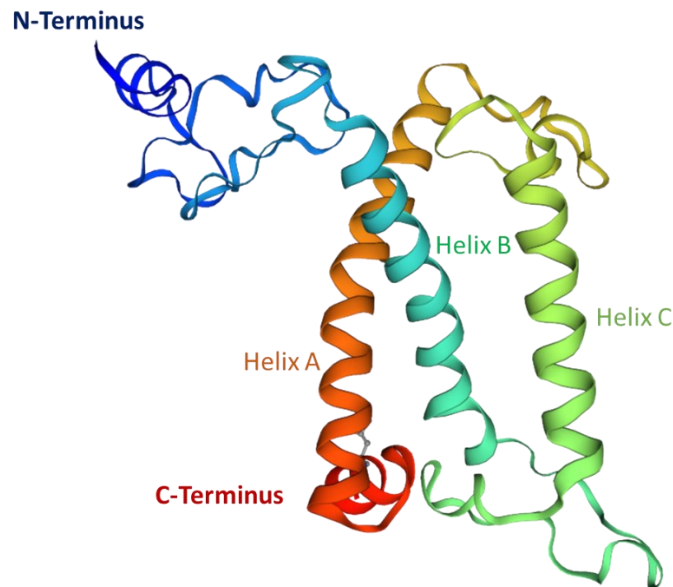


Abbildung 3.4: Strukturmodell des Lhcx6_1 Proteins aus *C. meneghiniana* mittels SWISS-MODEL.

Die Tertiärstruktur des *C. meneghiniana* Lhcx6_1 Proteins wurde anhand des monomeren FCPb5 (Lhcr17) Templates (Nagao *et al.*, 2022) modelliert. Die dargestellte Struktur ist farblich analog zum sichtbaren Lichtspektrum codiert, wobei der N-Terminus des Proteins (vgl. 3.2) blau und der C-Terminus rot eingefärbt ist. Die klassische 3-helikale Struktur der membranintrinsic LHCs geht aus den Modellierungsdaten des Lhcx6_1 hervor, wobei die Helices nummeriert sind.

Die errechnete Tertiärstruktur des Lhcx6_1 aus *C. meneghiniana* spiegelt die typische räumliche Anordnung eines LHC-Vertreterers wider. Diese zeichnet sich durch eine aus drei großen Transmembran-Helices verbundene Struktur aus. Dabei kreuzen sich Helix A und B. Analog zu bekannten Vertretern der LHC-Proteine sollte der N-Terminus des betrachteten Proteins dem Thylakoid-Stroma zugeordnet sein, während der C-Terminus im Lumen der Thylakoidmembran ausgerichtet ist.

3.1.3 Lhcx6_1: Starklichtschutz-Charakter anhand des Strukturmodells

Diese Anordnung und die vermutete protektive Funktion des Lhcx6_1 Proteins brachte die Frage auf, ob dieses Polypeptid einer Lichtschutz-Funktion nachgehen kann. Um eine, bei LHC-Vertretern beschriebene, Möglichkeit eines solchen Mechanismus zu beurteilen wurde das Strukturmodell *in silico* einer Analyse auf protonierbare Aminosäuren an geeigneten Stellen hin untersucht (Abb. 3.5).

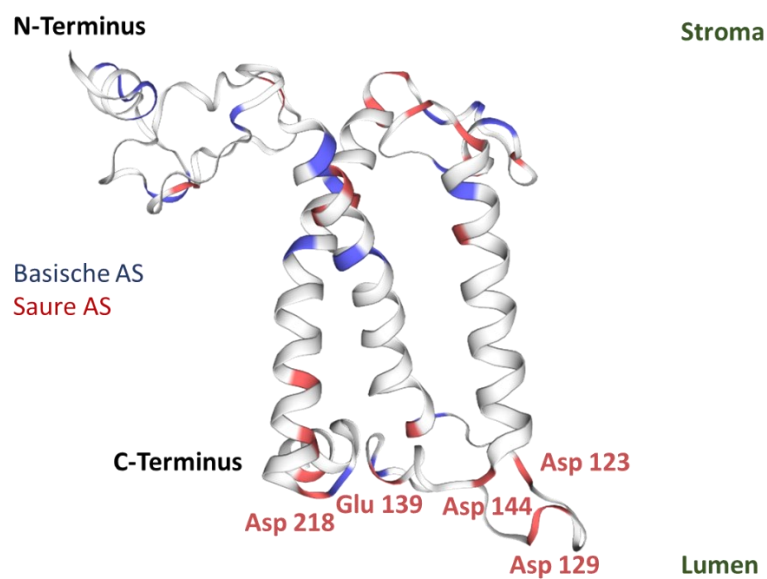


Abbildung 3.5: Strukturmodell des Lhcx6_1 Proteins aus *C. meneghiniana* mittels SWISS-MODEL.

Die Tertiärstruktur des *C. meneghiniana* Lhcx6_1 Proteins wurde anhand des monomeren FCPb5 (Lhcr17) Templates (Nagao *et al.*, 2022) modelliert. Die wahrscheinliche Ausrichtung des membranintrinsic Lhcx6_1 Proteins in der Thylakoidmembran ist mit Stroma und Lumen markiert. Dabei ist der N-Terminus dem Stroma und der C-Terminus dem Lumen zugewandt. In blau sind basische Aminosäuren und in rot saure Aminosäuren hinterlegt. Die putativ protonierbaren, pH-sensitiven, sauren Aminosäuren Asparaginsäure (Asp) und Glutaminsäure (Glu) mit endständiger Carboxylgruppe sind rot dargestellt und ihre Position in der Polypeptidkette nummeriert.

Das nach geladenen Aminosäuren untersuchte Strukturmodell des Lhcx6_1 Proteins aus *C. meneghiniana* brachte einige Auffälligkeiten mit sich. In der Darstellung des in die Thylakoidmembran modellierten Proteins ist eine Anhäufung der sauren, bei sinkendem pH protonierbaren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure zu beobachten. Diese Anhäufung befindet sich auf der vermutlich lumenalen Seite des Proteins. Die wahrscheinlichsten Kandidaten, aufgrund ihrer Thylakoidlumen Exposition, sind dabei die Aminosäuren: Asparaginsäure 123, 129, 144 und 218, sowie das Glutaminsäure Molekül 139.

3.1.4 Lhcx6_1: Phosphorylierungsstellen anhand des Strukturmodells

Für eine weitere Beurteilung der möglichen Funktionen eines LHC-Proteins wurde das *C. meneghiniana* Lhcx6_1 *in silico* auf putativ phosphorylierbare Peptid-Strukturen hin untersucht. Die Analyse erfolgte, wie zuvor anhand des errechneten Strukturmodells, wobei der Fokus auf die in photosynthetischen Organismen konservierten Phosphorylierungs-targets: Serin und Threonin gelegt wurde. Die Analyse der Primärstruktur des Lhcx6_1 auf Phosphorylierungsstellen erfolgte mittels NetPhos 3.1. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Strukturmodell des Proteins verglichen und graphisch dargestellt (Abb. 3.6).

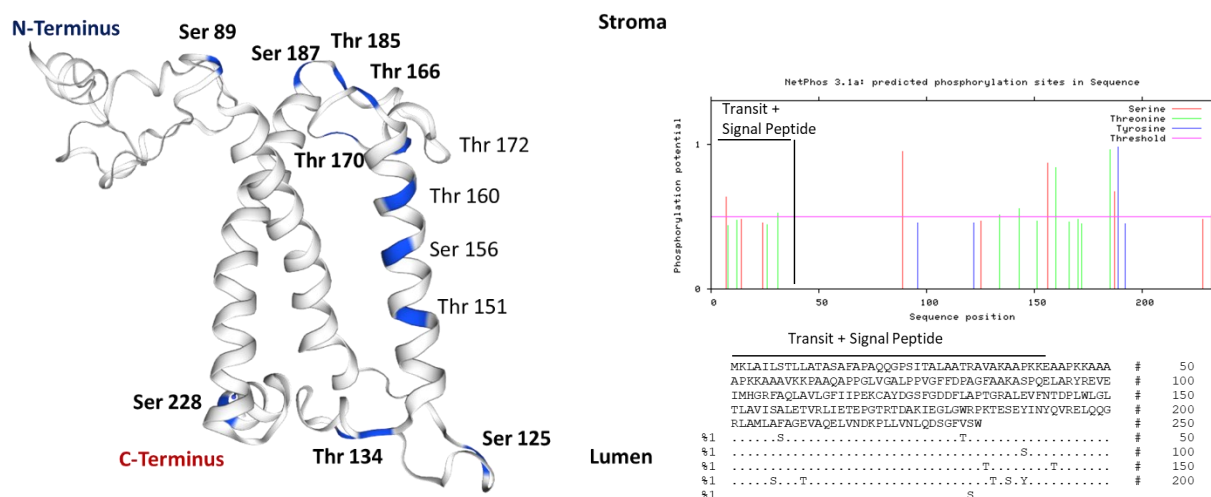


Abbildung 3.6: Strukturmodell des Lhcx6_1 Proteins aus *C. meneghiniana* mittels SWISS-MODEL und *in silico* Analyse der Phospho-modifizierbaren Aminosäuren mittels NetPhos 3.1.

Die Tertiärstruktur des *C. meneghiniana* Lhcx6_1 Proteins wurde anhand des monomeren FCPb5 (Lhcr17) Templates (Nagao *et al.*, 2022) modelliert. Die wahrscheinliche Ausrichtung des membranintrinsic Lhcx6_1 Proteins in der Thylakoidmembran ist mit Stroma und Lumen markiert. Dabei ist der N-Terminus dem Stroma und der C-Terminus dem Lumen zugewandt. Die rechte Seite der Abbildung zeigt die NetPhos-Analyse der Phospho-modifizierbaren Aminosäuren des Lhcx6_1 Proteins. Dabei sind in der unteren Polypeptidsequenz nur Kinasen-Targets dargestellt, die über dem Grenzwert (magenta Balken) eines Phosphorylierungs-Potentials von 0,5 sind, wobei die Höhe des Werts eine steigende Wahrscheinlichkeit der Phosphorylierung angibt. Die phosphorylierbaren Aminosäuren sind in ihrer Position in der Polypeptidkette von links N-terminal nach rechts C-terminal aufgestellt. Die ersten 50 Aminosäuren sind vermutlich Transit- und Signalpeptid, somit posttranslational abgespalten und werden nicht berücksichtigt (vgl. 3.2). Serin ist in rot, Threonin in grün und Tyrosin in blau unterlegt. Die ermittelten Serin (Ser) und Threonin (Thr) Stellen sind aufgrund ihrer hohen Wahrscheinlichkeit der Modifikation in pflanzlichen Organismen in das Strukturmodell integriert. Dabei sind die Aminosäuren mit einer einfachen Zugänglichkeit an stromaler und lumenaler Seite fett hinterlegt und ihre Position in der Polypeptidkette nummeriert.

Ergebnisse

Die Analyse der Phosphorylierungsstellen erbrachte einige Aminosäuren, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit phosphoryliert werden können. Diese sind sowohl luminal als auch stromal exponiert. Zusätzlich beinhaltet Helix C membranintrinsische Aminosäuren Threonin 151, 160 und 172 sowie Serin 156 mit hypothetischer Phosphorylierung. Auf Seite des Thylakoidlumens sind die möglichen Kinase-Targets das Serin 125 und 228 sowie Threonin 134. Jedoch wurden die meisten putativ phosphorylierbaren Aminosäuren auf der wahrscheinlich stromal exponierten Seite des Proteins gefunden. Diese sind Serin 89 und 187 sowie Threonin 166, 170, 172 und 185. Zusammenfassend sind die wahrscheinlichsten Aminosäuren einer Phospho-Modifikation des Lhcx6_1 Proteins aus *C. meneghiniana* das stromale Serin 89 und 187 und zudem Threonin 166 sowie 185, was auf die NetPhos-Vorhersage und die Lokalisation in der Polypeptidstruktur zurückzuführen ist.

3.1.5 Lhcx6_1: Entwicklung eines Protein-spezifischen Antikörpers

Für den biochemischen Nachweis des *C. meneghiniana* Lhcx6_1 Proteins sollte ein Antikörper entwickelt werden. Hierfür wurden die letzten 16 Aminosäuren der übersetzten Lhcx6_1-Sequenz ausgesucht (vgl. Abb. 3.2) und das Peptid zur Synthese durch Eurogentec in Auftrag gegeben. Als Wirt der polyklonalen Antikörper wurden Kaninchen gewählt, von denen fünf Prä-Immunsereen möglicher Kandidaten von Eurogentec zur Verfügung gestellt wurden. Diese Blutungen wurden auf ihre Antikörperreaktion gegen *C. meneghiniana* Gesamtprotein hin untersucht. Die Prä-Immunsierungs Antikörperreaktion der fünf Kaninchen auf Gesamtproteinextrakte der Diatomee *C. meneghiniana* ist in Abb. 3.7 dargestellt.

Ergebnisse

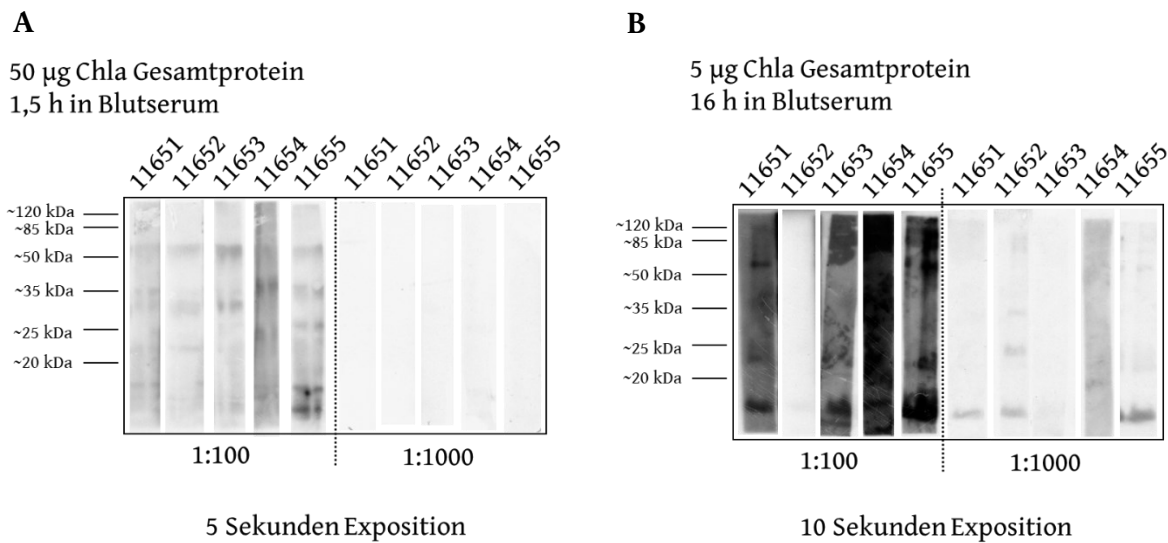


Abbildung 3.7: Immunologische Analyse von *C. meneghiniana* Gesamtprotein mittels ausgewählter Prä-Immunsereen.

Gesamtprotein aus *C. meneghiniana* wurde in einer 12% PAA SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Diese Membran wurde nach Blockieren freier Bindestellen in Teile geschnitten und mit den Prä-Immunsereen inkubiert. Die Detektion der gebundenen Prä-Immunsierungs Antikörper erfolgte durch eine weitere Inkubation in HRP-gekoppeltem sekundärem Antikörper. Die verschiedenen Immunsereen der Kaninchen sind von 11651 bis 11655 nummeriert. Diese Seren kamen in einer Verdünnung von 1:100 und 1:1000 in 2 % (w/v) Milchpulver TBS-T zum Einsatz. Größenstandard: Pierce™ Prestained MW Marker. kDa = Kilodalton. **A:** 50 µg Chla Gesamtprotein in jeder Spur, 1,5 h Inkubation in den Prä-Immunsereen und 5 Sekunden Exposition des Röntgenfilms zur Detektion der Antikörper. **B:** 5 µg Chla Gesamtprotein in jeder Spur, 16 h Inkubation in den Prä-Immunsereen und 10 Sekunden Exposition des Röntgenfilms zur Detektion der Antikörper.

Das Austesten der Prä-Immunsereen der verschiedenen Wirte wurde in zwei Konzepten durchgeführt. Zum einen kam eine große Menge *C. meneghiniana* Proteinextrakt zum Einsatz, wobei die Inkubation in den Prä-Immunsereen bei Raumtemperatur für 1,5 h erfolgte (Abb. 3.7 A). Für den zweiten Test wurde eine geringere Menge Proteinextrakt und dafür längere Inkubation in den Prä-Immunsereen bei 4° C für 16 h gewählt (Abb. 3.7 B). Die Immunodetektion der höheren Menge Gesamtproteine verdeutlicht in allen verwendeten Blutseren schwache Antikörperreaktionen gegen wenige Epitope. In allen 1:100 Verdünnungen der Seren kann ein gebundenes Epitop zwischen 50 kDa und 85 kDa ausgemacht werden. Auch um 35 kDa ist in allen betrachteten Seren eine Antikörperreaktion zu sehen, zudem sind verschiedene Epitope unter 25 kDa detektiert. In den 1:1000 Verdünnungen der Prä-Immunsereen ist hierbei keine Antikörperreaktion

Ergebnisse

sichtbar. Die längere Behandlung der geringer konzentrierten Proteinextrakte mit den 1:100 verdünnten Blutseren brachte in allen Proben, bis auf 11652, starke Bindung der Antikörper an die Membran zu Tage (Abb. 3.7 B). Die detektierten Kreuzreaktionen ähneln dabei den zuvor beschriebenen bei höherer Menge Protein. Die 16-stündige Inkubation mit 1:1000 verdünnten Prä-Immunsereen auf 5 µg Gesamtproteinextrakt veranschaulicht in drei Blutseren Antikörper gegen Epitope unter 20 kDa. Diese können nicht in den Seren 11653 und 11654 detektiert werden. Für die Seren 11652, 11654 und 11655 können Antikörperreaktionen im Bereich um ca. 20 bis 25 kDa ausgemacht werden. Schlussendlich wurden die Wirte 11651 und 11653, aufgrund ihrer vermeintlich geringeren Immunreaktion zwischen 20 und 25 kDa, als Kandidaten der Immunisierung gewählt.

Die finalen Immunsereen der ausgesuchten Wirte wurden nach viermaliger Peptid-Immunisierung als Antikörper gegen Lhcx6_1 verwendet. Abb. 3.8 zeigt die Reaktion der 1:10.000 verdünnten Immunsereen auf Proteinisolate ausgewählter phototropher Modellorganismen.

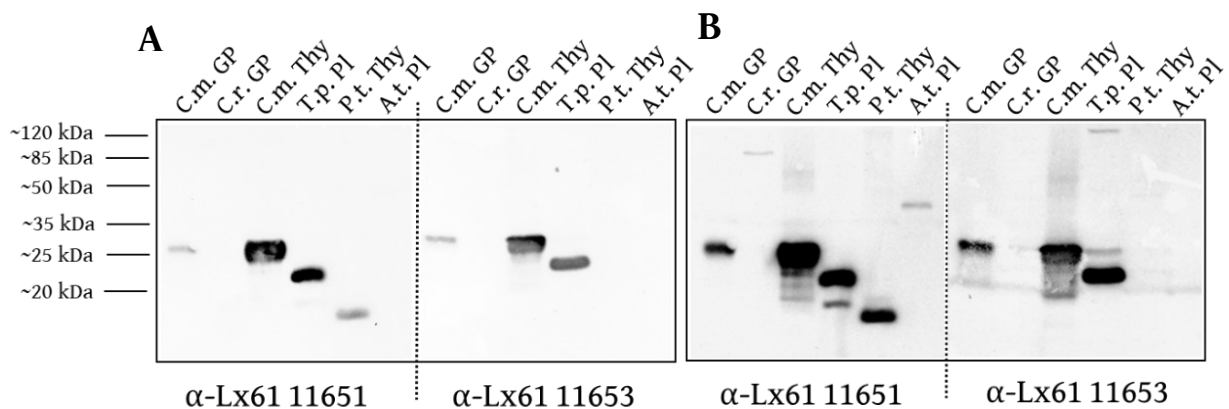


Abbildung 3.8: Immunologische Analyse verschiedener photosynthetischer Proteinisolate mit den finalen Blutseren.

Proteinisolate diverser phototropher Modellorganismen wurden in einer 12% PAA SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Diese Membran wurde nach Blockieren freier Bindestellen mit den finalen Immunsereen 11651 (SA0160) und 11653 (SA0161) inkubiert. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte durch eine weitere Inkubation in HRP-gekoppeltem, sekundärem Antikörper. Die finalen Immunsereen wurden in einer Verdünnung von 1:10.000 in 2% (w/v) Milchpulver TBS-T verwendet. Größenstandard: Pierce™ Prestained MW Marker. kDa = Kilodalton. In jeder Spur wurde eine Proteinmenge entsprechend 1,5 µg Chla aufgeladen. C.m. GP = Gesamtprotein *C. meneghiniana*; C.r. GP = Gesamtprotein *C. reinhardtii*; C.m. Thy = Thylakoidmembranen aus *C. meneghiniana*; T.p. Pl = Plastiden aus *T. pseudonana* (bereitgestellt durch I. Blagunova); P.t. Thy = Thylakoidmembranen aus *P. tricornutum* (bereitgestellt durch T. Bulatovic); A.t. Pl = Plastiden aus *A. thaliana*. **A:** 1,5 h Inkubation in den Immunsereen und 5 Sekunden Exposition des Röntgenfilms zur Detektion der Immunreaktion. **B:** 1,5 h Inkubation in den Immunsereen und 30 Sekunden Exposition des Röntgenfilms zur Detektion der Immunreaktion.

Ergebnisse

Dargestellt sind Proteinisolate von fünf eukaryotischen, photosynthetischen Modellorganismen. Von diesen sind vier Vertreter der Algen und eine höhere Pflanze. Die Antikörperreaktionen der beiden Immunsereen sind in kurzer Exposition des Röntgenfilms (Abb. 3.8 A) und in längerer Expositionszeit (Abb. 3.8 B), zur Veranschaulichung der Kreuzreaktionen, dargestellt. Für die Proteinproben aus *C. meneghiniana* und *T. pseudonana* können mit beiden Immunsereen Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 20 kDa und 25 kDa nachgewiesen werden. Das Gesamtproteinextrakt von *C. meneghiniana* weist eine Immunodetektion desselben Molekulargewichts wie die Thylakoidprotein-Isolate auf. Im Thylakoidprotein-Extrakt der pennaten Diatomee *P. tricornutum* bindet das Serum 11651 ein Epitop unter 20 kDa, wohingegen das finale Blutserum 11653 hier keine Immunreaktion aufweist. Die Immunodetektion der beiden Seren auf Gesamtprotein der Grünalge *C. reinhardtii* zeigt keine gebundenen Epitope. Ebenso ist kein Nachweis einer Epitopbindung der Seren in Plastiden der höheren Pflanze *A. thaliana* zu beobachten. Die mittels längerer Exposition der Western Blot Membran veranschaulichten Kreuzreaktionen fallen gering aus. In mit Serum 11651 beprobtem *C. reinhardtii* Gesamtprotein und Plastiden von *A. thaliana* ist eine leichte Kreuzreaktion im höher molekularen Größenbereich > 35 kDa sichtbar. Beide Antikörper-Seren weisen eine, schon während der Prä-Immunsierungs Beprobung sichtbare, Kreuzreaktion bei ca. 50 kDa in *C. meneghiniana* Proben auf. Längere Exposition der Membranen bringt in *C. meneghiniana* kleinere Fragmente unter 25 kDa zum Vorschein. Diese konnten mit beiden Immunsereen detektiert werden. Post-Immunsierungsserum 11651 zeigt in *T. pseudonana* eine geringe Kreuzreaktion unter dem detektierten 20 kDa Protein und in Serum 11653. Die getätigten Analysen bestätigen die Immunodetektion des Lhcx6_1 Proteins und erlauben weitere Verwendung der erhaltenen Antikörperlösungen zum spezifischen Proteinnachweis.

3.2 Genexpression von Lhcx6_1

Um die Funktion von Lhcx6_1 zu verstehen wurde die Expression des Gens untersucht. Hierbei wurde der Fokus auf die Lichtregime-spezifische Expression, sowie die Abhängigkeit der vorherrschenden Lichtstärke gelegt. Als Anhaltspunkt für die mögliche Aufgabe des Lhcx6_1 wurde die Expression dessen mit dem Transkript des Starklichtschutz-Proteins Lhcx1 und auch mit dem des Lichtsammel-Proteins Lhcf1 aus *C. meneghiniana* verglichen. Hierfür wurde eine 10 Tage alte Zellkultur aus Schwachlicht-Anzucht 16 Stunden dunkel gestellt und daraufhin in Schwach- oder Starklicht inkubiert. Die Inkubation im jeweiligen Licht erfolgte für vier Stunden, wobei unmittelbar vor Lichtinkubation, in Dunkeladaption, und darauf nach 0,5 h, 1 h, 2 h und 4 h eine Probe entnommen wurde. Die erhaltenen Expressionsdaten sind in Abbildung 3.9 dargestellt.

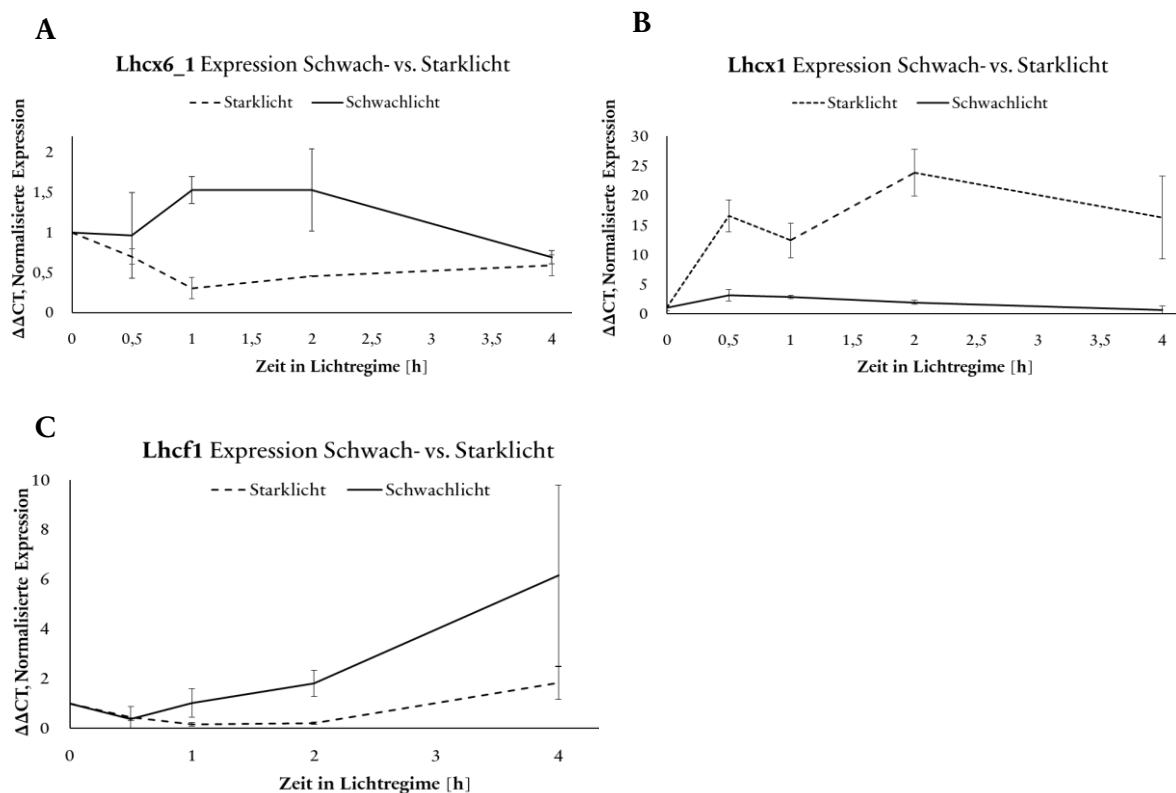


Abbildung 3.9: Analyse der zeitabhängigen Genexpression des *lhcx6_1*, *lhcx1* und *lhcf1* Gens aus *C. meneghiniana* mittels qRT-PCR einer Zellkultur in Schwach- sowie Starklichtregime.

Eine 10 Tage alte *C. meneghiniana* Kultur wurde über Nacht 16 Stunden dunkel inkubiert worauf eine Inkubation der Zellen in Schwachlicht ($20 \mu\text{mol Photonen}/\text{m}^2/\text{s}$) und Starklicht ($150 \mu\text{mol Photonen}/\text{m}^2/\text{s}$) folgte. Kurz vor Inkubation im jeweiligen Licht wurde die Referenzprobe T_0 genommen, welche den Zustand im Dunkeln nach 16 Stunden

Ergebnisse

widerspiegelt. Es folgte eine Probenentnahme nach 0,5 h, 1 h, 2 h, und 4 h. Die gesammelten Proben wurden einer RNA-Extraktion mit anschließender reverser Transkription aller mRNAs unterzogen. Die Analyse der cDNA-Mengen erfolgte in einer qRT-PCR mit Normalisierung auf das Histon4-Gen. Die $\Delta\Delta CT$ -Werte, als Darstellung der Änderung der Genexpression, beziehen sich auf die jeweilige Menge des Transkripts zum Zeitpunkt T_0 . Die Daten sind aus Mittelwerten zweier biologischer Replikate in jeweils technischen Triplikaten zusammengesetzt. **A:** Expression von *lhcx6_1*. **B:** Expression von *Lhcx1*. **C:** Expression von *Lhcf1*.

Die Betrachtung der Expressionsmuster der untersuchten *lhcx*-Gene bringt spezifische Eigenschaften der einzelnen Transkripte auf. So ist der augenscheinlichste Punkt der Expression des *Lhcx6_1* Gens der, dass die Menge des Transkripts im Schwachlicht mit zunehmender Zeit zunächst zu steigen scheint, während die Genexpression dessen im Starklicht reduziert wird. Infolgedessen ist ein gegenläufiger Trend nach zwei Stunden zu beobachten, wobei die Transkriptmenge im Schwachlicht ab- und im Starklicht zunimmt. Nach vierstündiger Inkubation konnte sowohl im Schwach- als auch Starklicht eine ähnliche Menge des Transkripts bestimmt werden. Der Vergleich mit der Genexpression des *Lhcx1*-Proteins zeigt hier einen gegenteiligen Verlauf. So ist die Expression des *lhcx1*-Gens im Starklicht konstant steigend, während sie im Schwachlicht auf einem basalen Level bleibt. Das ebenso untersuchte *lhcf1*-Gen weist eine anfängliche Reduktion des Transkripts im Schwachlicht und Starklicht auf. Im Schwachlicht ist daraufhin eine Zunahme der mRNA des Lichtsammelproteins zu beobachten. Die Expression des Gens im Starklicht normalisiert sich nach anfänglicher Reduktion im Verlauf von vier Stunden auf das Anfangslevel.

Für einen besseren Vergleich der Expressionsmuster des *lhcx6_1*-Gens wurden die beobachteten Änderungen mit denen ähnlicher Expression der *lhcx1*- und *lhcf1*-Gene verglichen (Abb. 3.10).

Ergebnisse

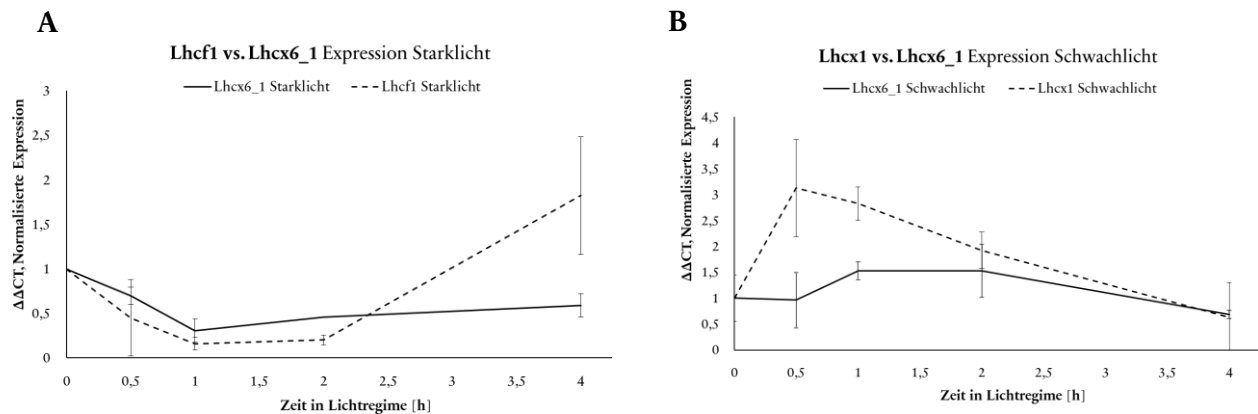


Abbildung 3.10: Analyse der zeitabhängigen Genexpression des lhcx6_1, lhcx1 und lhcf1 Gens aus *C. meneghiniana* mittels qRT-PCR einer Zellkultur in Schwach- sowie Starklichtregime im Vergleich.

Eine 10 Tage alte *C. meneghiniana* Kultur wurde über Nacht 16 Stunden dunkel inkubiert worauf eine Inkubation der Zellen in Schwachlicht ($20 \mu\text{mol Photonen}/\text{m}^2/\text{s}$) und Starklicht ($150 \mu\text{mol Photonen}/\text{m}^2/\text{s}$) folgte. Kurz vor Inkubation im jeweiligen Licht wurde die Referenzprobe T_0 genommen, welche den Zustand im Dunkeln nach 16 Stunden widerspiegelt. Es folgte eine Probenentnahme nach 0,5 h, 1 h, 2 h, und 4 h. Die gesammelten Proben wurden einer RNA-Extraktion mit anschließender reverser Transkription aller mRNAs unterzogen. Die Analyse der cDNA-Mengen erfolgte in einer qRT-PCR mit Normalisierung auf das Histon4-Gen. Die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte, als Darstellung der Änderung der Genexpression, beziehen sich auf die jeweilige Menge des Transkripts zum Zeitpunkt T_0 . Die Daten sind aus Mittelwerten zweier biologischer Replikate in jeweils technischen Triplikaten zusammengesetzt. **A:** Expression von lhcf1 und lhcx6_1 im Starklicht. **B:** Expression von lhcx1 und lhcx6_1 im Schwachlicht.

Der Vergleich macht die Expressionsmuster des *C. meneghiniana* lhcx6_1 deutlich. Hierbei ist die Expression dieses putativen Lichtschutz-Proteins abnehmend im Starklicht und mit der Expression des lhcf1-Gens vergleichbar. Bei Vergleich der Transkriptmenge im Schwachlicht kann eine Ähnlichkeit zur Expression des lhcx1-Gens beobachtet werden, wobei die lhcx1-Expression direkt nach 30-minütiger Inkubation im Schwachlicht auf ein ca. dreifach höheres Level steigt. Im Gegensatz dazu bleibt die Expression des lhcx6_1 in dieser Zeitspanne nahezu konstant. Nach vierstündiger Schwachlicht-Inkubation kann sowohl für lhcx6_1 als auch lhcx1 eine ähnliche Transkriptmenge in Referenz zur Dunkelprobe beobachtet werden.

3.3 Proteinkomplexe der Thylakoidmembran von *C. meneghiniana*

Für eine detaillierte Evaluation der Lokalisation und möglicher Funktionen des Lhcx6₁ Proteins wurde die Zusammensetzung der *C. meneghiniana* Thylakoidmembran eingehend untersucht. Hierfür wurden Thylakoidmembranen aus sieben bis zehn Tage alten Zellen isoliert. Durch Behandeln mit Dodecyl-D-Maltosid wurden die Membranproteinkomplexe nativ aus der Thylakoidmembran gelöst und durch Saccharosedichte-Zentrifugation, IpBN-PAGE, oder einer Kombination der beiden Methoden aufgetrennt. Abbildung 3.11 zeigt die Auftrennung der Gesamt-Thylakoide mittels Dichtezentrifugation und IpBN-PAGE, sowie eine 2D-PAGE der separierten BN-Thylakoidproteine.

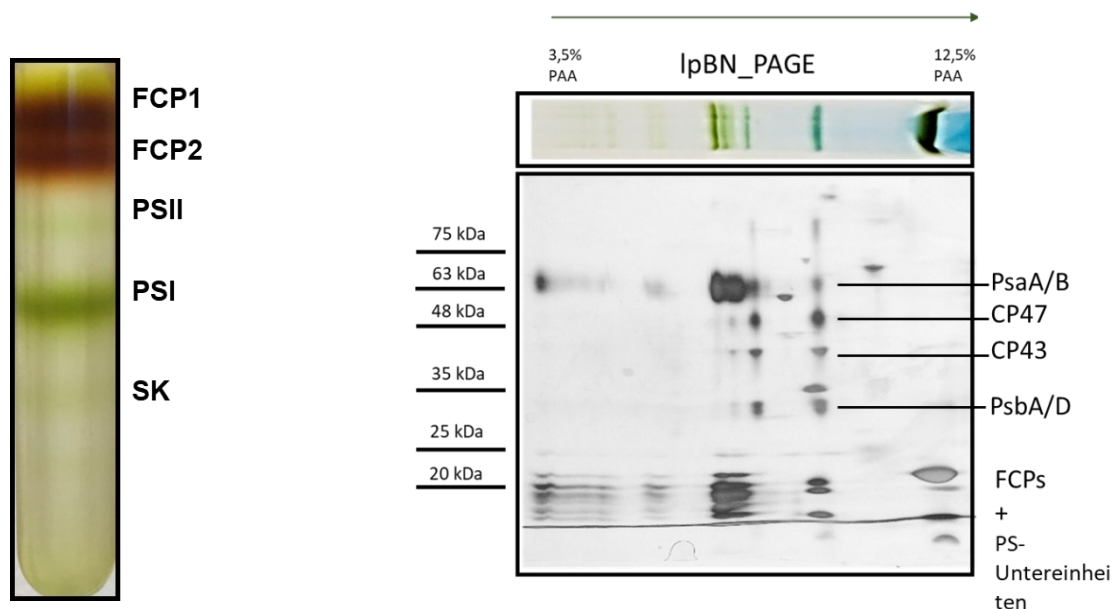


Abbildung 3.11: Separation solubilisierter Thylakoidmembran-Proteinkomplexe aus *C. meneghiniana*.

Thylakoide einer 10-Tage alten *C. meneghiniana* Schwachlichtkultur wurden isoliert, mit 0,75 % (w/v) alpha-DDM solubilisiert und mittels Saccharosedichtezentrifugation (125 µg Chl a) oder IpBN-PAGE (3,5 % zu 12,5 % PAA) (10 µg Chl a) aufgetrennt. Der IpBN-Streifen diente, nach Denaturieren der Proteinkomplexe in 2D-Äquilibriumspuffer, der weiteren Auftrennung in einer 2D-PAGE (12% PAA SDS-Gel) mit anschließender Silberfärbung. Der Nachweis der annotierten Proteine in der 2D-PAGE erfolgte auf Basis der Daten von J. Sattler (2021) durch Immunodetektion mittels spezifischer Antikörper. Größenstandard: BlueStar Plus Prestained Protein Marker (NIPPON Genetics). FCP1 = LHC-Fraktion niedrigerer Oligomerisierung. FCP2 = LHC-Fraktion höhere Oligomerisierung. PSII = Photosystem II. PSI = Photosystem I. SK = Superkomplexe.

Die Auftrennung der solubilisierten Thylakoidmembran-Proteinkomplexe bringt sowohl durch Saccharosedichtezentrifugation als auch Separation mittels IpBN-PAGE

Ergebnisse

vergleichbare Ergebnisse (Zuordnung s. 3.3). Hierbei ist Verteilung der nativen Proteinkomplexe in der IpBN-PAGE als umgekehrte Auftrennung des abgebildeten Saccharosegradienten zu betrachten, wobei die dichtesten Thylakoidkomplexe des Saccharosegradienten die oberen, größten Banden der IpBN-PAGE bilden und *vice versa*. Die durch 2D-PAGE ermittelte Protein-Zusammensetzung der Thylakoidmembran aus *C. meneghiniana* birgt einige Besonderheiten. So sind die größten untersuchten Proteinkomplexe, die Superkomplexe, nahezu ausschließlich aus Photosystem I Reaktionszentrum PsaA/B zusammengesetzt, welches in der silbergefärbten 2D-PAGE knapp über dem 63 kDa Größenstandard zu sehen ist. Auch die weiteren Untereinheiten des PSI sowie FCPs können dort unter 20 kDa nachgewiesen werden. In allen PSI beinhaltenden Komplexen kann das ca. 25 kDa große Lhcx6_1 nachgewiesen werden. Auffällig sind die zwei, hauptsächlich Photosystem II Untereinheiten beinhaltenden Fraktionen der IpBN-PAGE, welche im Vergleich zu den PSI-Banden beide bläulich erscheinen. Beide nativ separierten Proteinkomplexe beinhalten die inneren Antennen CP47 und CP43. Außerdem sind in beiden aufgetrennten Komplexen geringe Spuren des PSI Reaktionszentrums PsaA/B zu finden. Erstaunlicherweise enthält der nativ kleinere, auf der IpBN-PAGE weiter unten befindliche, PSII-Komplex gebundene FCPs, sichtbar in der Silberfärbung unter 20 kDa. Zudem sind in diesem das PSII Reaktionszentrum PsaA/D sowie Spuren des Lhcx6_1 Proteins zu finden. Diese drei Komponenten können im nativ größeren PSII-Komplex nicht nachgewiesen werden. Die in der denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennte FCP-Bande des IpBN-Gels beinhaltet hauptsächlich zwei Proteinbestandteile, die beide im Bereich von 20 kDa liegen. Das größere der Beiden macht hierbei den Großteil der FCP-Fraktion aus.

3.3.1 Native Aufreinigung der *C. meneghiniana* Thylakoidkomplexe

Für weitergehende Analysen, höhere Ausbeute und besserer Sauberkeit wurden die mittels Saccharosedichtezentrifugation aufgetrennten Thylakoidprotein-Komplexe anschließend durch IpBN-PAGE getrennt, ausgeschnitten und für Folge-Untersuchungen verwendet. Abb 3.13. zeigt die zweifach nativ aufgereinigten und anschließend durch 2D-PAGE aufgetrennten Proteinkomplexe in deren Zusammensetzung.

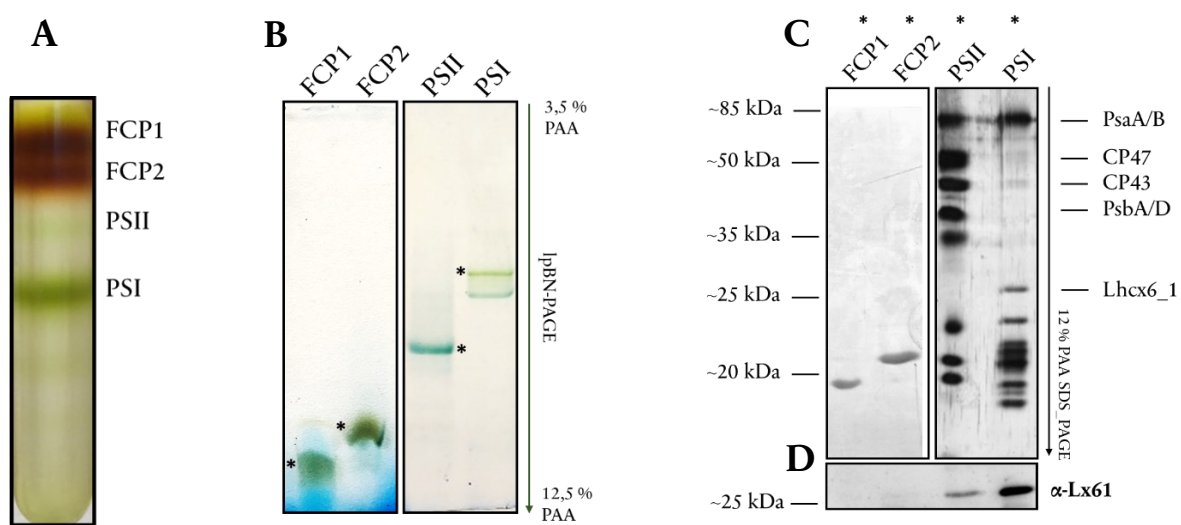


Abbildung 3.12: Separation solubilisierter Thylakoidmembran-Proteinkomplexe aus *C. meneghiniana* und weitere Aufreinigung der erhaltenen Proteinkomplexe.

Thylakoide entsprechend 125 µg Chla einer 10-Tage alten *C. meneghiniana* Schwachlichtkultur wurden isoliert, mit 0,75 % (w/v) alpha-DDM solubilisiert und durch Zentrifugation auf Saccharosedichtegradienten getrennt. 1,25 µg Chla der aufkonzentrierten Fraktionen des Gradienten wurden daraufhin mittels IpBN-PAGE weiter aufgereinigt. Die mit Sternchen markierten Banden wurden ausgeschnitten, in 2D-Äquilierungspuffer inkubiert und in einer 12 % PAA SDS-PAGE denaturierend aufgetrennt. Die aufgetrennten Bestandteile der Proteinkomplexe wurden mittels Silberfärbung detektiert. Die Zuordnung der Proteinuntereinheiten erfolgte anhand der Daten von J. Sattler (2021). Als Größenstandard kam der Pierce™ Prestained MW Marker zum Einsatz. **A:** Auftrennung der Thylakoide in 19% Saccharosedichtegradient. **B:** Auftrennung der abgenommenen Banden des Saccharosedichtegradienten in einer IpBN-PAGE (3,5 % zu 12,5 % PAA). **C:** Auftrennung der mit Sternchen versehenen, ausgeschnittenen Banden der IpBN-PAGE in einer 12 % PAA SDS-PAGE und Silberfärbung der Proteine. **D:** Western Blot Immunodetektion des LhcX6_1 Proteins in den untersuchten Fraktionen aus J. Sattler (2021).

Analog zum Saccharosegradienten kann in der IpBN-PAGE eine Auftrennung der FCPs in einen kleineren FCP-Komplex sowie einen größeren beobachtet werden. Der nativ leichtere FCP1-Komplex zeigt auch in der denaturierenden PAGE eine Zusammensetzung

Ergebnisse

aus Proteinen niedrigeren Molekulargewichts. Der FCP2-Komplex *vice versa*. Die Auftrennung der Photosystem-Fractionen aus dem Gradienten ist analog zu der mit IpBN-PAGE solubilisierter Thylakoide erhaltenen (vgl. Abb. 3.12). Hierbei bestehen die nativ aufgereinigten Photosysteme aus den beschriebenen Proteinuntereinheiten, wobei die PSII-Fraktion PSI-Reaktionszentrum Verunreinigung enthält. In der Silberfärbung kann Lhcx6_1 nur in PSI-Fractionen nachgewiesen werden. Auch die Immunodetektion des Lhcx6_1 Proteins in den untersuchten Fractionen weist dieses hauptsächlich in der PSI Bande nach. Die PSII Probe zeigt niedrigere Mengen des Proteins.

3.3.2 Lichtabhängige Thylakoid-Zusammensetzung und Lokalisation von Lhcx6_1 in *C. meneghiniana*

Nach Etablieren des Protokolls zur Analyse der Thylakoidprotein-Komplexe in *C. meneghiniana* wurde dieses Verfahren verwendet um Aussagen über die eventuelle Variabilität der Membrankomplexe, über die Kurzzeit-Dynamik unter verschiedenen Lichtbedingungen und vor allem die Lokalisation von Lhcx6_1 zu tätigen. Für die Folgeexperimente kamen Thylakoid-Isolate aus *C. meneghiniana* Zellen zum Einsatz, welche nach 10 tätiger Schwachlicht Kultivierung für 16 h dunkel adaptiert und daraufhin für sechs Stunden Schwachlicht, Starklicht oder Fernrotlicht ausgesetzt wurden, worauf die Isolation der Thylakoidmembranen folgte. Starklicht kam als Kontrolle eines möglichen Starklichtschutz-Charakters des Lhcx6_1 Proteins zum Einsatz, wohingegen das präferenziell PSI anregende Fernrotlicht dazu diente, die Auswirkung einer ungleichmäßigen Energieverteilung auf die Thylakoidzusammensetzung und die womögliche Aufgabe von Lhcx6_1 zu beurteilen (Abb. 3.13).

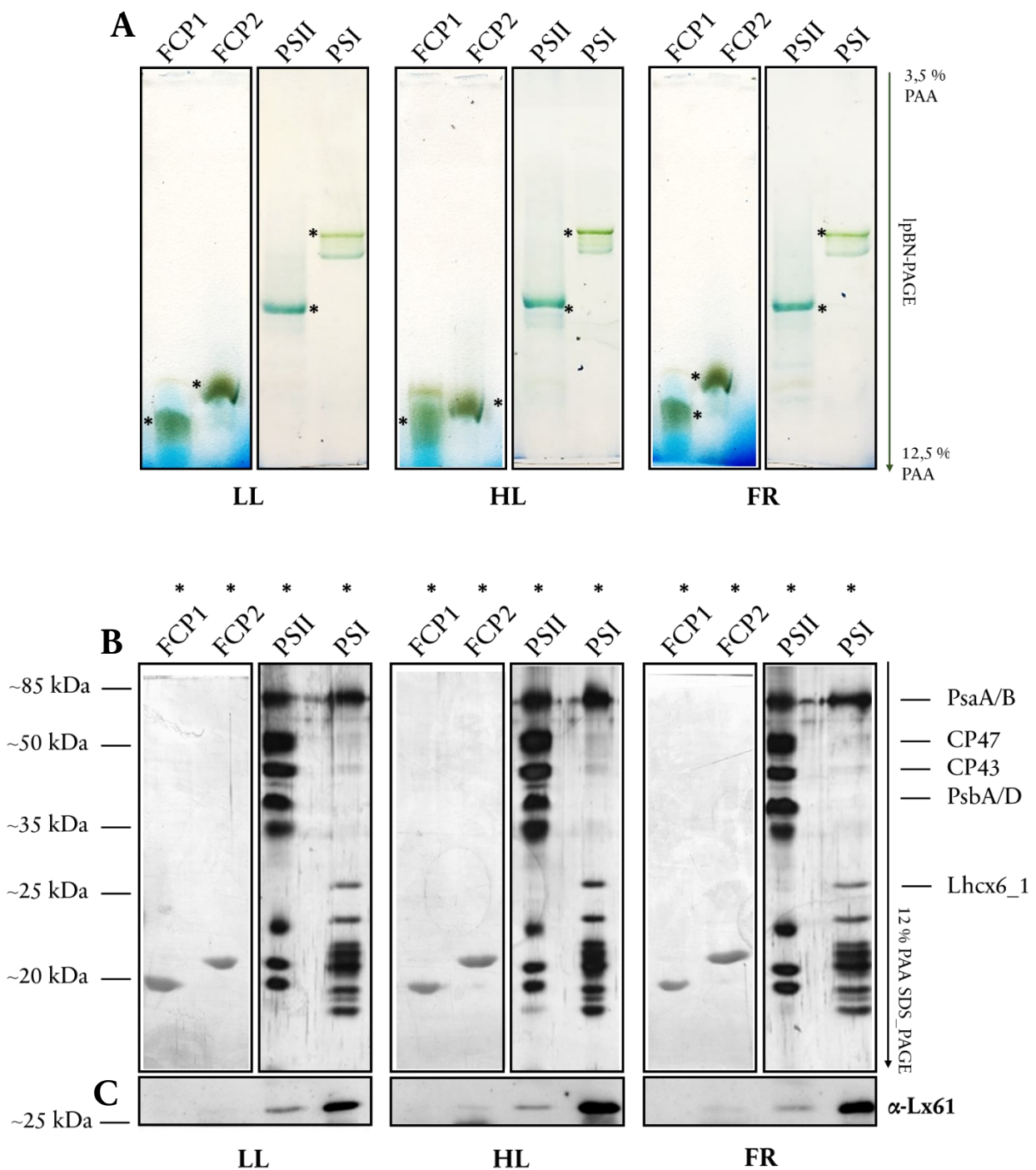


Abbildung 3.13: Zusammensetzung der Thylakoidmembran Komplexe aus *C. meneghiniana* unter verschiedenen Lichtbedingungen und Lokalisation von Lhcx6_1.

Thylakoide entsprechend 125 μ g Chl *a* einer 10-Tage alten *C. meneghiniana* Schwachlicht-, Starklicht- und Fernrotkultur wurden isoliert, mit 0,75 % (w/v) alpha-DDM solubilisiert und durch Zentrifugation auf Saccharosedichtegradienten getrennt (Anhang 1). 1,25 μ g Chl *a* der aufkonzentrierten Fraktionen des Gradienten wurden daraufhin mittels IspBN-PAGE weiter aufgereinigt. Die mit Sternchen markierten Banden wurden ausgeschnitten, in 2D-Äquilibriumspuffer inkubiert und in einer 12 % PAA SDS-PAGE denaturierend aufgetrennt. Die aufgetrennten Bestandteile der Proteinkomplexe wurden mittels Silberfärbung detektiert. Die Zuordnung der Proteinuntereinheiten erfolgte anhand der Daten von J. Sattler (2021). Als Größenstandard kam der Pierce™ Prestained MW Marker zum Einsatz. **A:** Auftrennung der abgenommenen Banden des Saccharosedichtegradienten in einer IspBN-PAGE (3,5 % zu 12,5 % PAA). **B:** Auftrennung der mit Sternchen versehenen, ausgeschnittenen Banden der IspBN-PAGE in einer 12 % PAA SDS-PAGE und Silberfärbung der Proteine. **C:** Western Blot Immunodetektion des Lhcx6_1 Proteins in den untersuchten Fraktionen aus J. Sattler (2021). **LL** = Schwachlicht; **HL** = Starklicht; **FR** = Fernrotlicht.

Ergebnisse

Die Inkubation der *C. meneghiniana* Zellen in den photosynthetisch anders verwertbaren Lichtregimen zeigt in allen untersuchten Proben deutliche Ähnlichkeit. Weder in der Auftrennung durch Saccharosedichte-zentrifugation noch in der IpBN-PAGE können Differenzen der betrachteten nativen Komplexe beobachtet werden. Die folgende Auftrennung der isolierten Thylakoidkomplexe und Silberfärbung der Proteinbestandteile weist ein ähnliches Bild zwischen den Lichtbehandlungen auf. Hierbei können in allen FCP und Photosystem Proben der variablen Lichtbehandlung die gleichen, zuvor beschriebenen Proteine in ähnlicher Menge gefunden werden. Der einzige beobachtete Unterschied ist die geringfügig steigende Menge des immunodetektierten Lhcx6_1 am PSI der Starklichtkultur, im Vergleich zum Schwachlicht. In der Schwachlichtprobe hingegen kann dieses Protein etwas mehr an PSII assoziiert als in Stark- oder Fernrotlicht nachgewiesen werden. Biologische Replikate belegen dies (s. Anhang 2).

3.4 *In vivo* Phosphorylierung der Thylakoidmembran Proteine in *C. meneghiniana*

Ein wichtiger Mechanismus der Regulation der Photosynthese-Maschinerie ist die reversible Phosphorylierung von Lichtsammelproteinen. Eine *in silico* Analyse der möglichen Phospho-Modifikationsstellen des Lhcx6_1 Proteins aus *C. meneghiniana* erbrachte putativ phosphorylierbare Aminosäuren in geeigneter Lokalisation (vgl. 3.1.3). Diese modellierten Daten wurden auf ihre biochemische Grundlage hin untersucht. Dafür wurde zunächst eine Beprobung der solubilisierten und mittels IpBN-PAGE nativ aufgetrennten Thylakoidproteine mit Phospho-Serin und -Threonin spezifischen Antikörpern vorgenommen, nachdem diese in einer 2D-PAGE in Einzelkomponenten zerlegt und auf Nitrocellulose übertragen wurden. Abb. 3.14 zeigt die detektierten Phospho-Threonin Signale des Western Blot sowie einen Vergleich zur Lhcx6_1-Detektion einer vergleichbaren Probe.

Ergebnisse

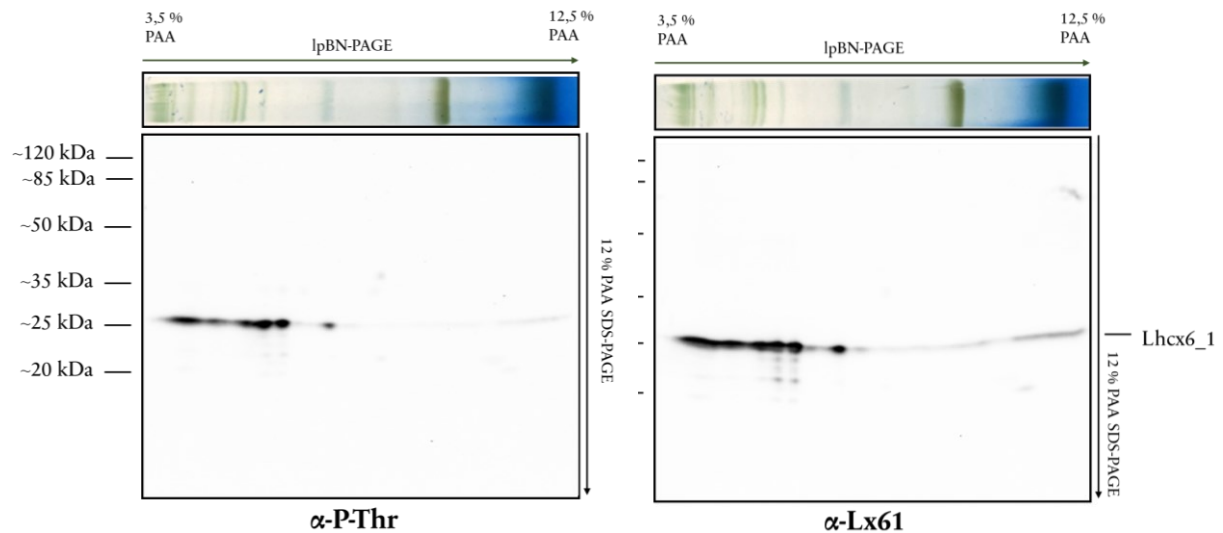


Abbildung 3.14: Western Blot der 2D-PAGE von IpBN-separierten Thylakoidmembranen aus *C. meneghiniana* und Immunodetektion mittels Phospho-Threonin sowie Lhc6_1 spezifischer Antikörper.

Thylakoide entsprechend 5 µg Chla einer 10-Tage alten *C. meneghiniana* Schwachlicht-Kultur wurden isoliert, mit 0,75 % (w/v) alpha-DDM solubilisiert und mittels IpBN-PAGE (3,5 % zu 12,5 % PAA) getrennt. Die IpBN-Streifen wurden ausgeschnitten, in 2D-Äquilibriumspuffer inkubiert und in einer 12 % PAA SDS-PAGE denaturierend aufgetrennt. Die separierten Proteine wurden auf Nitrocellulose übertragen. Nach Blockieren der Membran wurden diese mit Phospho-Threonin- oder Lhc6_1-spezifischem Antikörper beprobt. Nach Inkubation in sekundärem HRP-Antikörper erfolgte die Detektion der Immunreaktion mit ECL und INTAS-Imager. Als Größenstandard diente der Pierce™ Prestained MW Marker.

Die Phospho-Threonin Detektion der 2D-PAGE der untersuchten Thylakoidkomplexe zeigt hauptsächlich ein Signal knapp über 25 kDa, weshalb eine vergleichende Beprobung mit Lhc6_1-Antikörper vorgenommen wurde. Die Kontrolle mit Lhc6_1-Antikörper der aufgetrennten Thylakoidmembran Proteine bestätigt den Verdacht und zeigt selbiges Muster. Hierbei weisen alle PSI beinhaltenden Superkomplexe sowohl ein Phospho-Threonin als auch ein vergleichbares Lhc6_1 Signal auf. Ebenso sind diese Reaktionen im kleinsten PSI-Komplex und auch PSII-Komplex der IpBN-PAGE zu sehen. Auch im Bereich der FCPs kann ein leichtes Signal detektiert werden. Die erhaltenen Überlappungen der Phospho-Threonin und Lhc6_1 Signale des Western Blot konnten durch biologische Replikate bestätigt werden (Anhang 3). Der Ausschluss eines anderen FCP als Verursacher des ca. 25 kDa großen Phospho-Signals erfolgte durch Detektion der Gesamt-FCPs mit zwei verschiedenen FCP-Antikörpern (Anhang 4).

Ergebnisse

Zusätzlich zur Phospho-Threonin Modifikation wurde untersucht, ob die Thylakoidmembran Proteine eine posttranslationale Phosphorylierung der Aminosäure Serin aufweisen. Hierfür wurde nach gleichem Schema vorgegangen und die Western-Blot Membranen in Phospho-Serin spezifischem Antikörper inkubiert. Aufgrund der zahlreichen detektierten Proteine mit Serin-Phosphorylierung wurde zudem ein Vergleich der Auswirkung von Schwach- Stark- und Fernrotlicht auf die Phosphorylierung vorgenommen (Abb. 3.15).

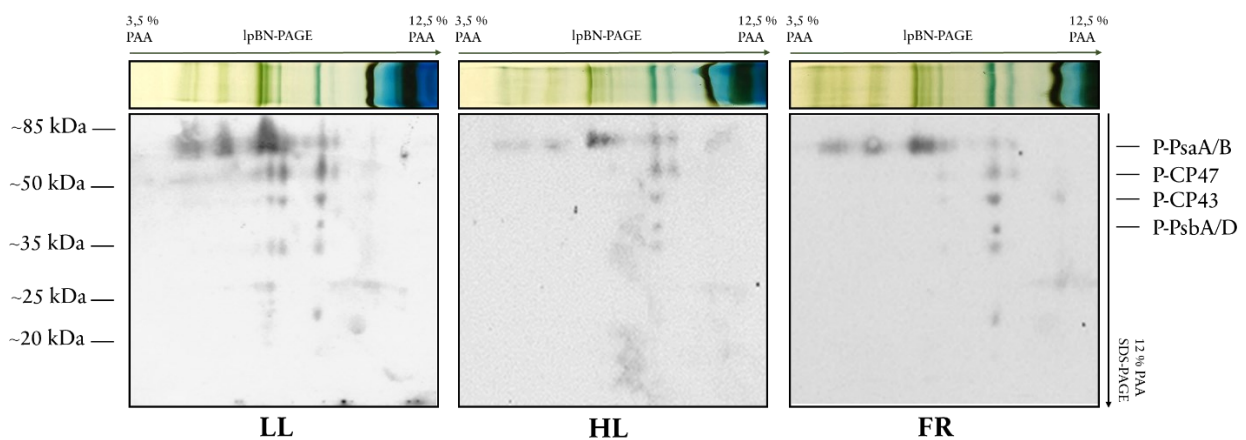


Abbildung 3.15: Western Blot der 2D-PAGE von IpBN-separierten Thylakoidmembranen aus *C. meneghiniana* aus Schwach- Stark- und Fernrot-Anzucht und Immunodetektion mittels Phospho-Serin spezifischem Antikörper
Thylakoide entsprechend 20 µg Chla einer 10-Tage alten *C. meneghiniana* Schwachlicht-, Starklicht- und Fernrotlicht-Kultur wurden isoliert, mit 0,75 % (w/v) alpha-DDM solubilisiert und mittels IpBN-PAGE (3,5 % zu 12,5 % PAA) getrennt. Die IpBN-Streifen wurden ausgeschnitten, in 2D-Äquilibriumspuffer inkubiert und in einer 12 % PAA SDS-PAGE denaturierend aufgetrennt. Die separierten Proteine wurden auf Nitrocellulose übertragen. Nach Blockieren der Membran wurden diese mit Phospho-Serin spezifischem Antikörper beprobt. Nach Inkubation in sekundärem HRP-Antikörper erfolgte die Detektion der Immunreaktion mit ECL und Röntgenfilm. Als Größenstandard diente der Pierce™ Prestained MW Marker. Die Zuordnung der Proteine wurde auf Basis der Daten von J. Sattler (2021) getätigt. P- vor dem Proteinnamen steht für die detektierte Phospho-Serin Modifikation. **LL** = Schwachlicht; **HL** = Starklicht; **FR** = Fernrotlicht.

Die Detektion der Serin-phosphorylierten Thylakoidmembran Proteine ergibt ein anderes Bild als jenes der Phospho-Threonin Modifikation. In der untersuchten Schwachlichtprobe kann neben dem Reaktionszentrum des PSII jeder zuvor beschriebene Bestandteil des PSII in Phospho-Serin modifizierter Version vorgefunden werden. So kann für das Reaktionszentrum des PSII PsbA/D und auch dessen minore Antennen CP47 und CP43 eine Phosphorylierung an Serin nachgewiesen werden. Ebenso ist in der PSII-Fraktion ein

Ergebnisse

Phospho-Serin Epitop in einem Protein mit dem Molekulargewicht etwas über 20 kDa vorzufinden. Dieses kann in keinem anderen Thylakoidmembran Komplex detektiert werden. Ein biologisches Replikat mit Phospho-Serin Beprobung, anschließendem Entfernen der Antikörper und erneuter Beprobung in Lhcx6_1-Antikörper konnte Lhcx6_1 als Verursacher dieses Signals ausschließen (Anhang 5). Zwischen den verschiedenen Lichtbedingungen kann in der Phospho-Serin Modifikation kaum unterschieden werden. In allen untersuchten Thylakoidisolaten ist eine Phospho-Modifikation des PSI Reaktionszentrums PsaA/B zu finden. Ebenso sind alle genannten Bestandteile der PSII-Fraktion in allen Proben Phospho-Serin modifiziert. Weitere Analysen mit Saccharosedichtegradienten und IpBN-PAGE aufgereinigter Thylakoidprotein Proben weisen bei langer Immunodetektion ein womöglich Phospho-Serin modifiziertes Lhcx6_1 nach, welches ausschließlich in PSI-Fraktionen gefunden werden kann. (Anhang 6). Zusammenfassend zeigt eine große Menge Proteine eine Serin-Phosphorylierung, während die Phospho-Threonin Modifikation hauptsächlich für Lhcx6_1 nachgewiesen werden konnte.

3.5 *In vivo* Phosphorylierung von Lhcx6_1

Die vorangehenden Untersuchungen bestätigten eine Phospho-Modifikation diverser Thylakoidmembran Proteine. Auch für das Lhcx6_1 Protein konnte dies bestätigt werden, wobei hier eine äußerst starke Phospho-Threonin Modifikation ausgemacht werden konnte. Aufgrund der überdurchschnittlich starken Threonin-Phosphorylierung dieses Lhc-Proteins und der beobachteten Lokalisation an PSII sowie PSI wurde die Phospho-Threonin Modifikation in Abhängigkeit der Lokalisation und dem Einfluss von photosynthetisch unterschiedlich nutzbarem Licht genauer betrachtet. Die durch Saccharosedichte-zentrifugation und IpBN-PAGE aufgereinigten PSII und PSI-Komplexe

Ergebnisse

wurden hierfür in zwei unterschiedlichen Gelsystem denaturierend aufgetrennt und auf ihre Phosphorylierung hin untersucht (Abb. 3.16).

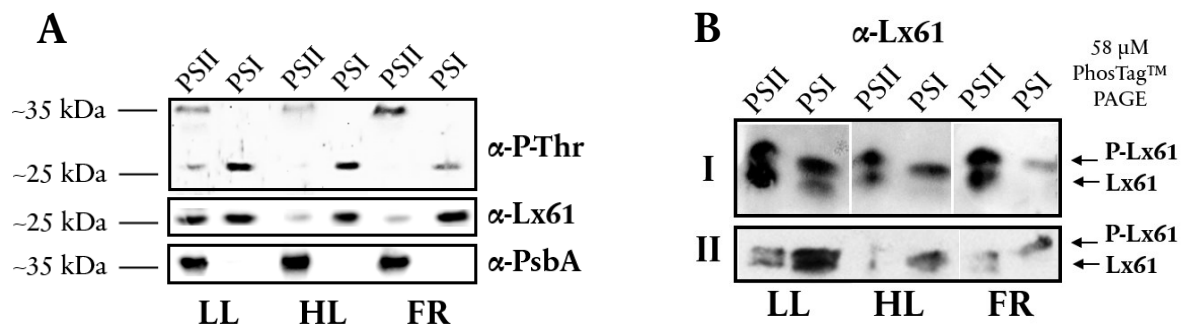


Abbildung 3.16: Western Blot der 2D-PAGE von aufgereinigten PSII- und PSI-Proben aus *C. meneghiniana* unter Schwach- Stark- und Fernrot-Anzucht und Immunodetektion mittels verschiedener Antikörper.

Thylakoide einer 10-Tage alten *C. meneghiniana* Schwachlicht-, Starklicht- und Fernrotlicht-Kultur wurden isoliert, mit 0,75 % (w/v) alpha-DDM solubilisiert und mittels Saccharosedichtegradienten getrennt. Im Anschluss erfolgte eine weitere Auftrennung von je 1,25 μ g Chla PSII und PSI-Fraktion des Gradienten mittels IpBN-PAGE (3,5 % zu 12,5 % PAA). Die IpBN-PAGE Proben des PSII und PSI wurden ausgeschnitten, in 2D-Äquilibriumspuffer inkubiert und in einer denaturierenden PAGE aufgetrennt. Die separierten Proteine wurden auf Nitrocellulose übertragen. Nach Blockieren der Membran wurden diese mit spezifischem Antikörper beprobt. Nach Inkubation in sekundärem HRP-Antikörper erfolgte die Detektion der Immunreaktion mit ECL und Röntgenfilm oder INTAS-Imager. Als Größenstandard diente der PierceTM Prestained MW Marker. P- vor dem Proteinnamen steht für die detektierte Phospho-Modifikation. LL = Schwachlicht; HL = Starklicht; FR = Fernrotlicht. **A:** Western Blot einer 12% PAA SDS-PAGE und Proteinnachweis mit Phospho-Threonin-, LhcX6_1- sowie PsbA-Antikörper. **B:** Western Blot einer 58 μ M PhosTagTM PAGE und Antikörperrnachweis des LhcX6_1 Proteins in zwei biologischen Replikaten (I und II).

In den PSII-Proben kann neben dem 25 kDa Signal des LhcX6_1 zudem eine Phospho-Threonin Bande bei ca. 35 kDa detektiert werden. Diese wurde durch Immunodetektion des PsbA-Antikörpers als phosphoryliertes PSII-Reaktionszentrum identifiziert. Auffällig ist die stärkere Phospho-Threonin Modifikation des LhcX6_1 in den PSI-Proben. Trotz der mit LhcX6_1 spezifischem Antikörper ähnlich detektierten Menge LhcX6_1 an PSII im Schwachlicht, vergleichend zur PSI-Probe dieses Lichtregimes, ist eine stärkere Phospho-Threonin Reaktion im PSI sichtbar. Dies kann durch biologische Replikate bestätigt werden (Anhang 7). Zwischen Starklicht und Fernrotlicht behandelten Thylakoidisolaten können keine großen Unterschiede in der Menge des LhcX6_1 an PSI ausgemacht werden. In beiden Bedingungen ist vergleichend mit Schwachlicht jedoch kaum LhcX6_1 an PSII

Ergebnisse

detektierbar. Die Untersuchung der Phosphorylierung des Lhcx6_1 mittels Phostag™ PAGE bestätigt zwei unterschiedliche Formen des Proteins in Abhängigkeit der Photosystem Lokalisation (Abb. 3.16 B). In diesem Gelsystem sollten detektierte Größenunterschiede, bei Beprobung mit Protein-spezifischem Antikörper, Isoformen des Proteins mit unterschiedlicher Phospho-Modifikation aufweisen. Nach Inkubation in Lhcx6_1 Antikörper können in allen betrachteten Proben zwei Signale des Lhcx6_1 beobachtet werden. Davon wurde das obere als Phospho-Version des Proteins deklariert, wobei die untere Variante das nicht Phospho-modifizierte darstellen sollte. Alle untersuchten Proteinisolate der verschiedenen Bedingungen zeigen dabei selbiges Verhalten. In den untersuchten PSII Proben können dabei beide Formen des Proteins detektiert werden, während die modifizierte, im Gelsystem weiter oben laufende Variante in den PSI Proben dominiert. Ausschließlich in der untersuchten PSI Probe der Schwachlicht-Inkubation ist die kleinere Variante in höherer Menge nachweisbar.

3.6 Genetische Manipulation von *C. meneghiniana*

Trotz seiner Wichtigkeit in der Mikroalgen Photosynthese Forschung, als Modellorganismus zentraler Kieselalgen, sind nur wenige Versuche unternommen worden *Cyclotella meneghiniana* genetisch zu manipulieren. Dabei stellt die den Organismus umgebende Schale aus Silica und Chitin ein großes Hindernis der gezielten Manipulation dar. Im Zuge dieser Arbeit wurden Transformationsprotokolle ausgetestet, um diese Diatomee genetisch besser zugänglich zu machen. Hierfür wurden drei Transformationsprotokolle etabliert und angepasst, welche jede für sich Vor- und Nachteile aufweisen. Abbildung 3.17 zeigt die letztendlich erhaltenen Transformationseffizienzen der einzelnen Methoden. Die Effizienz ist hierbei immer auf die nachweislich Nourseothricin resistenten *C. meneghiniana* Zellen als kolonienbildende Einheiten und der Verwendung eines Plasmids ähnlichen Grundgerüsts bezogen.

Ergebnisse

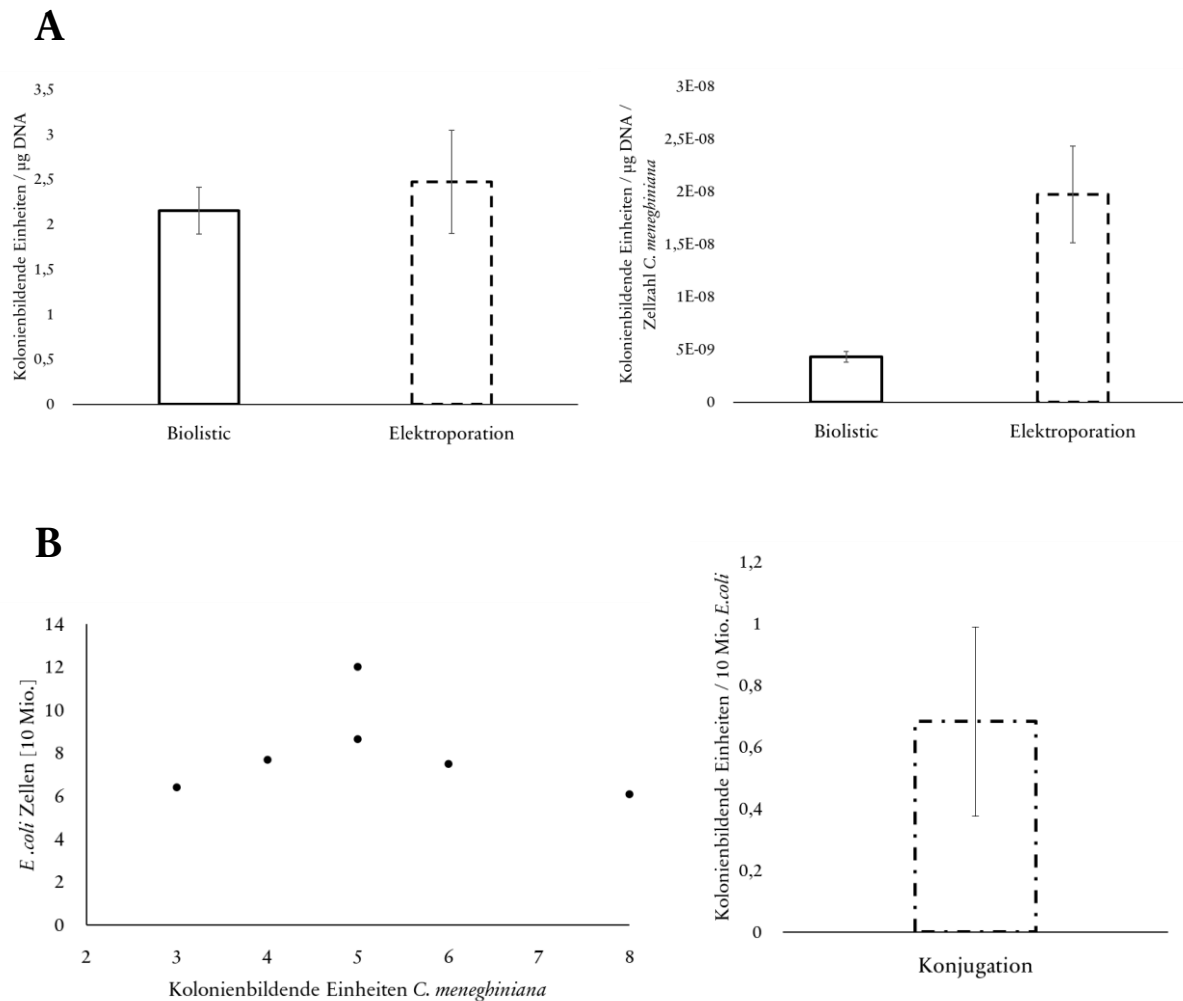


Abbildung 3.17: Transformationseffizienz von *C. meneghiniana* unter Verwendung verschiedener etablierter Methodiken.

5-7 Tage alte Zellen, am Ende ihrer exponentiellen Wachstumsphase, wurden geerntet und für die unterschiedlichen Transformations-Methoden verwendet. Für die Auswertung wurden Transformationen mit ähnlichem Plasmid und den schlussendlich optimierten Bedingungen gewählt. **A:** Transformationseffizienz von *C. meneghiniana* mittels Biolistischer Transformation sowie Elektroporation unter Verwendung von 1 µg Plasmid-DNA mit gleichem Grundgerüst pro Transformation. **Biolistic** n = 4, eingesetzte Zellmenge pro Transformation: $1 \cdot 10^8$ Zellen. Zirkuläre Plasmide: pPhac-NAT BKT, pPhaEst-NAT YFP, pPhaEst-NAT AS UTR, pPhaEst-NAT AS Mid. **Elektroporation** n = 3, eingesetzte Zellmenge pro Transformation: $2,5 \cdot 10^7$ Zellen. Linearisierte Plasmide: pPhac-NAT GFP, pPhac-NAT Lx61-His, pPhaEst-NAT Lx61 OE. **B:** Transformationseffizienz von *C. meneghiniana* mittels bakterieller Konjugation unter Verwendung eines *E. coli* Stamms mit Transformationsplasmid gleichen Grundgerüsts und einer Konjugationstemperatur von 25°C, n = 6, eingesetzte Zellmenge pro Transformation: $2 \cdot 10^7$ Zellen (Transformation M. Eudenbach 2020). Plasmide: ptPuc3-NAT sgRNA III, ptPuc3-NAT sgRNA IV. Die Zellmenge *E. Coli* wurde anhand der OD₆₀₀ berechnet mit der Annahme von OD₆₀₀ 1,0 = $8 \cdot 10^8$ Zellen.

Der Vergleich der Transformationseffizienzen weist zwischen der biolistischen Transformation und der Elektroporation eine ähnliche Effizienz auf, die sich bei Einbeziehen der eingesetzten Menge Zellen jedoch relativiert. So kann bei der

Ergebnisse

Elektroporation, aufgrund der methodischen Einschränkung, nur ein Viertel der Zellmenge pro μg DNA vergleichend zur Biolistischen Transformation eingesetzt werden. Letztendlich relativiert sich so die Effizienz der Methoden auf wie in Abbildung 3.17 A rechte Seite dargestellt auf das ca. 4,5-fache der Elektroporation im Vergleich zur Biolistischen Methode. Auch wurde die Elektroporation aufgrund der ca. 5-mal so geringen Regenerationszeit der Zellen (Biolistic: 10 - 16 Wochen; Elektroporation: 2 - 4 Wochen) bevorzugt eingesetzt. Die in Abbildung 3.17 B dargestellten Effizienzen der bakteriellen Konjugation beziehen sich auf eine ähnliche Zellzahl *C. meneghiniana* wie die der Elektroporation. Im Mittel wurden hierbei $0,68 \pm 0,30$ Transformanten pro 10 Millionen *E. coli* Zellen erzielt. Eine Korrelation der bei der bakteriellen Konjugation eingesetzten Zelldichte der Bakterien und der kolonienbildenden Einheiten *C. meneghiniana* kann nicht ausgemacht werden (Abb. 3.17 B linke Seite). Die Regenerationszeit der Kieselalgen nach der Konjugation war im Schnitt 4 - 6 Wochen. Aufgrund der äußerst nachteiligen Kontamination mit Konjugations-Bakterien, nach erfolgter Transformation mit dieser Methode, der niedrigen Effizienz und aufwendigen Vorbereitung, wurde die Elektroporation als schonendste und effizienteste Methode bevorzugt.

3.6.1 Lhcx6_1 Knockdown in *C. meneghiniana*

Zur Funktionsüberprüfung des Lhcx6_1 Proteins wurden Antisense-RNA Konstrukte zum Knockdown des Lhcs konstruiert. Dafür wurden zwei Antisense-RNA Varianten mittels PCR-Amplifikation erstellt, welche Teile des Antisense-Strang des Lhcx6_1 Transkripts darstellen. Eine der beiden Varianten bindet dabei an die ersten 85 Basen des Lhc Transkripts und mit weiteren 100 in der 5' UTR des Gens. Diese Variante wurde somit AS_UTR betitelt. Die AS_Mid Variante hingegen stellt die komplementäre Sequenz der 17ten Base nach Startcodon hin zur Base 260 dar (Abb. 3.18).

Ergebnisse

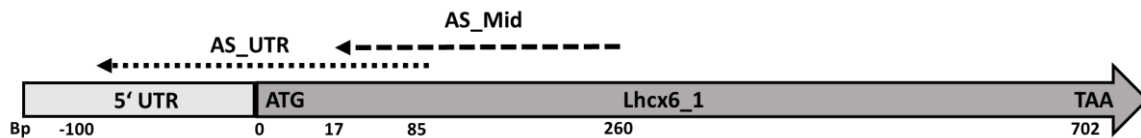


Abbildung 3.18: Schematische Darstellung des lhcx6_1 Gens und der verwendeten Antisense-Konstrukte.

Das 702 bp große lhcx6_1 Gen ist mitsamt eines kleinen nicht translatierten Bereichs zu Anfang des Gens dargestellt (5' UTR). Der Anfang des translatierten Bereichs ist mit dem Startcodon ATG gekennzeichnet, das Ende mit dem Stopcodon TAA. Die zum codierenden lhcx6_1 Strang komplementäre, mittels PCR amplifizierte, Antisense RNAs AS_UTR und AS_Mid sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die AS-Mid erstreckt sich dabei von Base 260 des codierenden Strangs hin zu Base 17, während die AS_UTR von Base 85 hin zu Base -100 in der 5' UTR reicht.

Die Knockdown-Konstrukte wurden unter Regulation des Nitratreduktase (NR) Promotors und Terminators kloniert und *C. meneghiniana* mit diesen transformiert. Die erhaltenen Klone zeigten anfänglich den erwünschten Knockdown auf mRNA-Level, welcher jedoch nur von kurzer Dauer war (Abb 3.19).

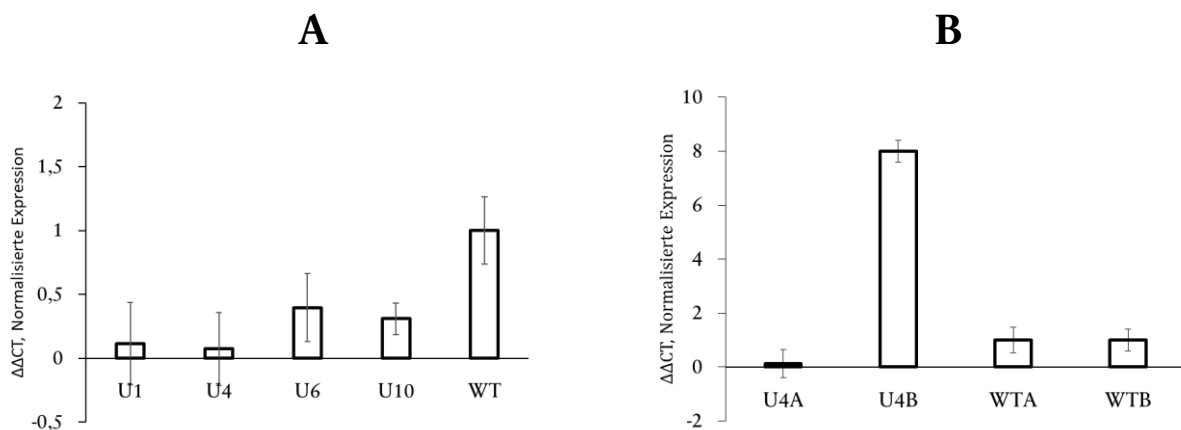


Abbildung 3.19: qRT-PCR der *C. meneghiniana* Knockdown-Klone zur Veranschaulichung der Restexpression nach wenigen Tagen in Kultur und zwei Wochen darauf.

Zellproben der frisch angewachsenen Knockdown-Klone und einer vergleichbaren Wildtyp Kultur wurden entnommen. Die gesammelten Proben wurden einer RNA-Extraktion mit anschließender reverser Transkription aller mRNAs unterzogen. Die Analyse der cDNA-Mengen erfolgte in einer qRT-PCR mit Normalisierung auf das Histon4-Gen. Die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte, als Darstellung der Änderung der Genexpression, beziehen sich auf die jeweilige Menge des Transkripts des Wildtypen. Die Daten sind aus Mittelwerten dreier technischer Replikate zusammengesetzt, wobei die Fehler nach Gauß'scher Fehlerfortpflanzung der verrechneten Werte für $\Delta\Delta\text{CT}$ bestimmt sind. **A:** Menge des lhcx6_1 Transkripts nach wenigen Tagen Zellkultur der verschiedenen AS_UTR Klone (U1, U4, U6 und U10) und des Wildtypen (WT). **B:** Menge des lhcx6_1 Transkripts des AS_UTR Klons 4 (U4) und des Wildtypen (WT) zum Zeitpunkt der ersten RNA-Extraktion zu Beginn (A) und nach zwei Wochen (B).

Ergebnisse

Die Analyse der Menge des lhcx6_1 Transkripts mittels qRT-PCR (Abb. 3.19 A) erbrachte in nahezu allen untersuchten Antisense Klonen eine Verringerung der lhcx6_1 mRNA. Die erneute Probenbereitung der angewachsenen Antisense Klone zwei Wochen später weist jedoch keine Verringerung des Transkripts mehr auf (Abb. 3.19 B). Der Vergleich einer qRT-PCR mit der anfänglich stärksten Knockdown Probe U4A und jener Kultur zwei Wochen später U4B macht die starke Gegenregulation der *C. meneghiniana* Kultur deutlich. Hierbei stieg die Menge des lhcx6_1 Transkripts von anfänglicher Verringerung auf das 0,12-fache vergleichend zum Wildtypen auf eine Vervielfachung um das Achtfache und endete letztendlich in der Stilllegung der gesamten Expressionskassette, wodurch die untersuchten Klone keine Antibiotikaresistenz mehr zeigten.

3.6.2 Adaption eines induzierbaren Expressionssystems für *C. meneghiniana*

Vorangegangene, fehlgeschlagene Versuche machten die genetische Stilllegung bzw. Gegenregulation von eingebrachten Expressionskonstrukten in *C. meneghiniana* Kulturen deutlich, weswegen eine Möglichkeit eines zeitlich variabel induzierbaren Expressionssystems verwendet werden musste. Dafür wurde ein für die pennate Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* ausgelegtes, β -Estradiol induzierbares Expressionssystem (Kassaw *et al.*, 2022) an *C. meneghiniana* adaptiert. Das Austesten des Systems erfolgte mittels induzierbarer eYFP-Expression (Abb 3.20).

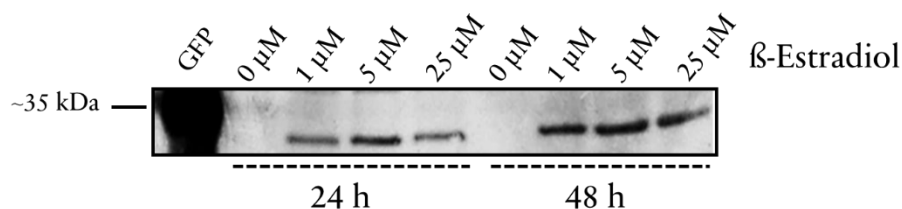


Abbildung 3.20: Western Blot einer mit β -Estradiol induzierten *C. meneghiniana* eYFP Kultur.

Die YFP Expression einer mit pPhaEst-Nat YFP transformierten *C. meneghiniana* Kultur wurde mit verschiedenen Mengen β -Estradiol induziert und nach 24 und 48 Stunden Induktion Proben entnommen. Nach Proteinisolierung folgte eine 12 % PAA SDS-PAGE von je 1,25 μ g Chla der Proben und Transfer auf Nitrocellulose. Als Referenz diente Protein eines *P. tricornutum* eGFP-Klon. Verwendeter Antikörper α -GFP-HRP Größenstandard: Pierce™ Prestained MW Marker.

Ergebnisse

Die Beprobung der induzierten Klone mit GFP-Antikörper macht eine Funktionalität des adaptierten β -Estradiol Induktionssystems in *C. meneghiniana* deutlich. Dabei ist die ausbleibende Basaltranskription, ohne Verwendung des induzierenden Agens (0 μ M) ersichtlich. Zudem steigt die Menge des YFPs leicht mit steigender Menge β -Estradiol, aber vor allem mit längerer Inkubationszeit.

Anschließend wurden die zuvor beschriebenen Lhc6_1 Knockdown-Konstrukte unter induzierbare Kontrolle gestellt und *C. meneghiniana* damit transformiert.

3.6.3 β -Estradiol induzierter Lhc6_1 Knockdown

Die Funktionsüberprüfung der lhcx6_1-Transkript Reduktion durch die eingebrachte, induzierbare Antisense-Kassette, erfolgte in Zeitreihen und Probenentnahme vor Induktion (T0), nach 48 Stunden (T1) sowie 72 Stunden (T2). Die Transkriptmenge wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf einen Housekeeping-Standard normalisiert. Die beste Reduktion des Lhc6_1 Transkripts konnte in einer Mutante beobachtet werden, welche sowohl die UTR- als auch Mid-Antisense Kassette enthält (UM1) (Abb. 3.21). Der Vergleich der ermittelten Transkriptmenge der lhcx6_1 mRNA mit Mid-Antisense-Konstrukt zeigt nur minimal lhcx6_1-Reduktion. Dies konnte auch in anderen Klonen dieser Antisense-Variante beobachtet werden. Der Wildtyp weist eine Reduktion der lhcx6_1 mRNA mit steigender Zeit nach β -Estradiol-Zugabe auf, welche im M1-Klon jedoch nicht auszumachen ist. In der UM1-Mutante konnte eine Reduktion des Lhc6_1-Transkripts beobachtet werden, welche sich nach drei Tagen Inkubation mit 1 μ M β -Estradiol auf 46 % der ursprünglichen Transkriptmenge einstellt. Diese Reduktion zeigt einen signifikanten Unterschied zur im Wildtypen beobachteten Reduktion zum Zeitpunkt T2. Die Analyse der Proteinmenge der unterschiedlichen Proben konnte allerdings keine Reduktion des Lhc6_1-Proteins nachweisen (Abb. 3.21).

Ergebnisse

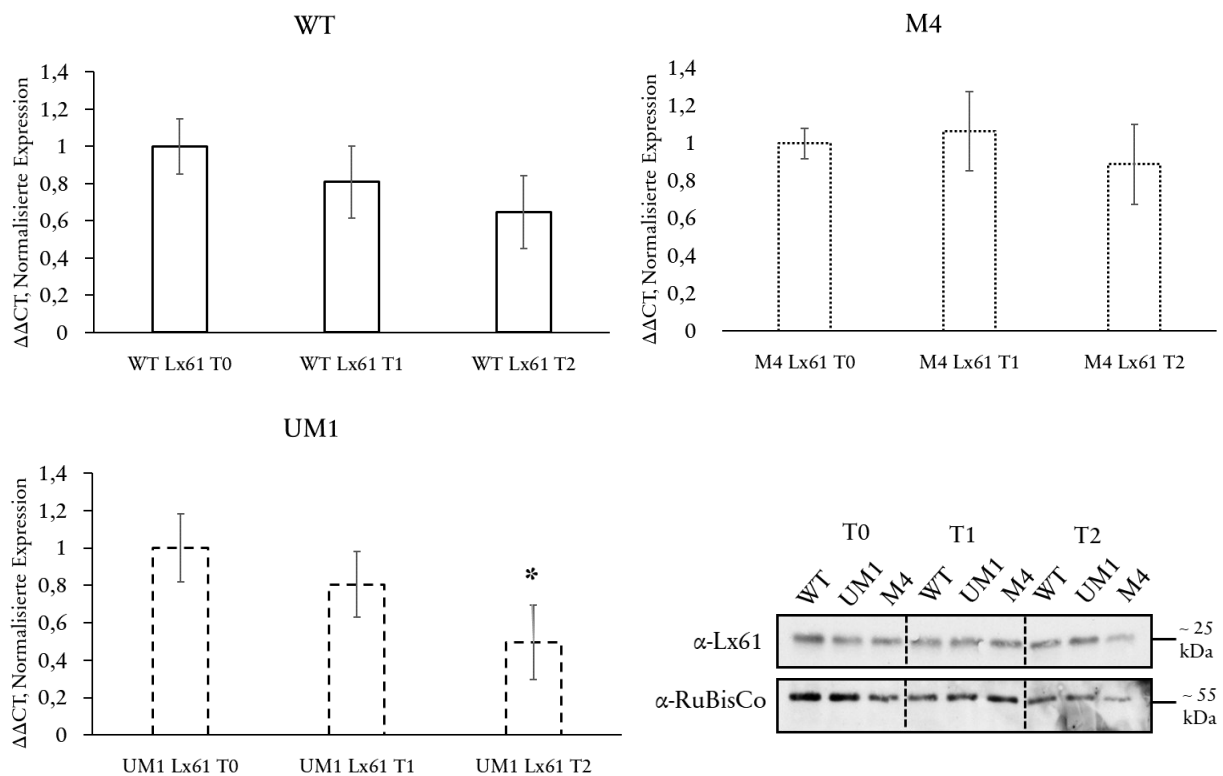


Abbildung 3.21: Lhcx6_1 Transkript- und Proteinbestimmung der *C. meneghiniana* Knockdown-Klone und des Wildtypen unmittelbar vor Induktion mit β -Estradiol, 48 Stunden und 72 Stunden nach Induktion.

Zellproben der Knockdown-Klone und einer vergleichbaren Wildtyp Kultur wurden entnommen. Ein Teil der gesammelten Proben wurde einer RNA-Extraktion mit anschließender reverser Transkription aller mRNAs unterzogen. Die Analyse der cDNA-Mengen erfolgte in einer qRT-PCR mit *lhcx6_1* spezifischen Primern und Normalisierung auf das Histone4-Gen. Die $\Delta\Delta CT$ -Werte, als Darstellung der Änderung der Genexpression, beziehen sich auf die jeweilige Menge des Transkripts zum Zeitpunkt T0. Die Daten sind aus Mittelwerten dreier technischer Replikate zusammengesetzt, wobei die Fehler nach Gauß'scher Fehlerfortpflanzung der verrechneten Werte für $\Delta\Delta CT$ bestimmt sind. Der mittels t-Test auf 0,05 Signifikanz-Niveau ermittelte Unterschied zwischen der T2-Transkriptmenge des Wildtypen und der UM1-Mutante ist mit * dargestellt. Aus dem Rest der Zellproben wurde Gesamtprotein isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit α -Lhx6-1 sowie als Ladekontrolle α -RuBisCo beprobt. Größenstandard Pierce™ Prestained MW Marker.

Um die Rolle des Lhx6_1 Proteins in der Thylakoidmembran von *C. meneghiniana* zu evaluieren, wurden Kulturen der UM1-Mutante mit β -Estradiol induziert und 9 Tage wachsen gelassen. Zudem fand eine mit β -Estradiol versetzte Wildtyp-Kontrolle und eine nicht behandelte UM1-Kultur Verwendung (s. Anhang 8). Anschließend wurden Thylakoidmembranen der Kulturen isoliert, die Proteinkomplexe solubilisiert und auf Saccharosedichtegradienten aufgetrennt (Abb. 3.22).

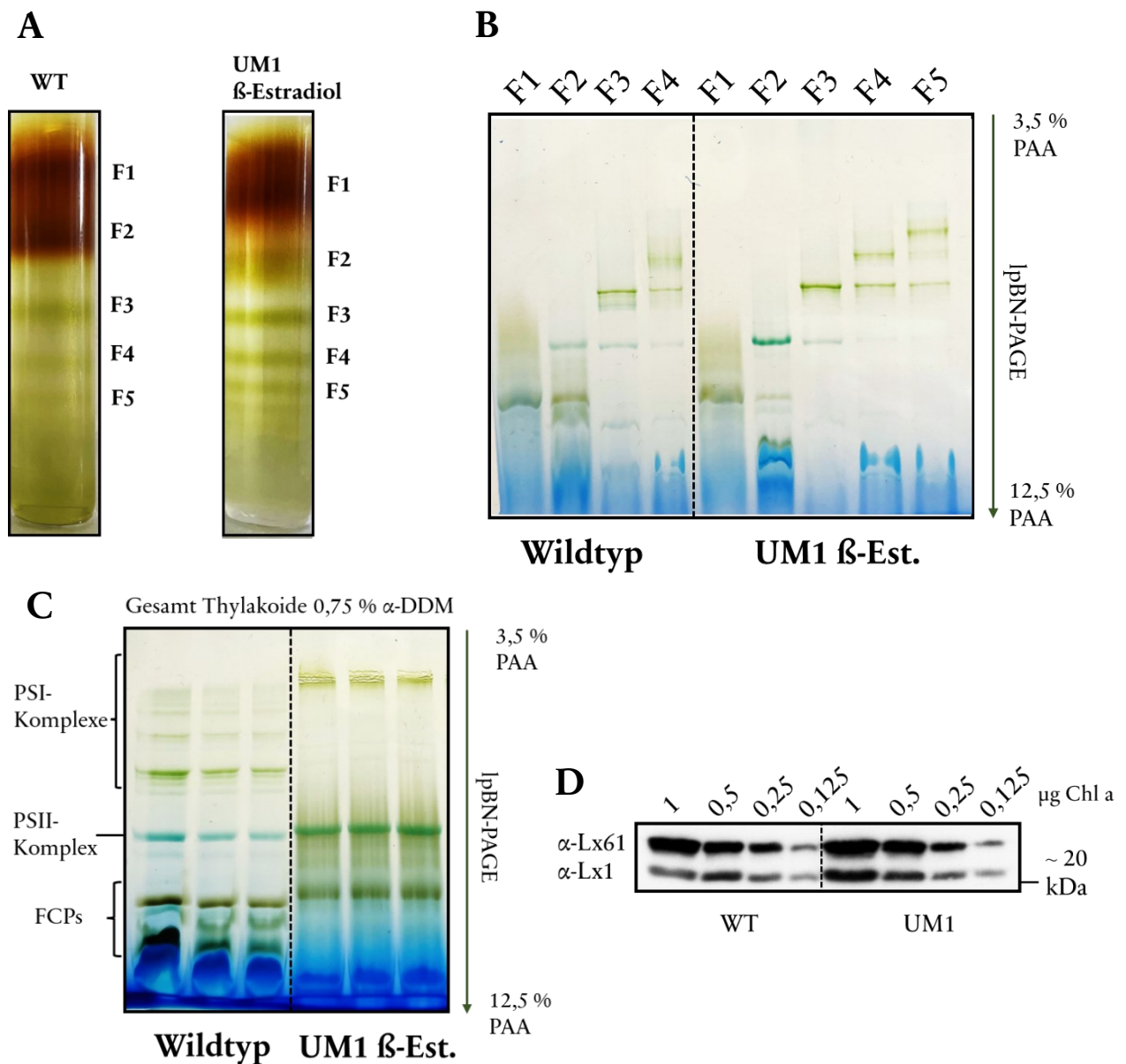


Abbildung 3.22: Untersuchung solubilisierter Thylakoidmembran-Proteinkomplexe des Wildtypen und der UM1-Mutante.

Thylakoide entsprechend 125 μg Chl a einer 10-Tage alten *C. meneghiniana* Wildtyp oder UM1-Kultur mit β-Estradiol wurden isoliert, mit 0,75 % (w/v) alpha-DDM solubilisiert und durch Zentrifugation auf Saccharosedichtegradienten getrennt. 1,25 μg Chl a der aufkonzentrierten Fraktionen des Gradienten wurden daraufhin mittels IpBN-PAGE weiter aufgereinigt. **A:** Auftrennung der Thylakoide in 19% Saccharosedichtegradient. **B:** Auftrennung der abgenommenen Banden des Saccharosedichtegradienten in einer IpBN-PAGE (3,5 % zu 12,5 % PAA). **C:** Auftrennung von 10 μg Chl a solubilisierter Thylakoidmembranen des Wildtypen und der induzierten UM1-Mutante. **D:** Auftrennung verschiedener Mengen Chl a solubilisierter Thylakoidmembranen des Wildtypen und der induzierten UM1-Mutante mittels SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot und Beprobung mit Lhcx6₁- und Lhcx1 (FCP6)-spezifischem Antikörper. Größenstandard Pierce™ Prestained MW Marker.

Schon die Auftrennung der UM1-Mutante im Vergleich zum Wildtypen birgt Besonderheiten. So kann in der Lhcx6₁-Antisense Mutante UM1 keine Unterscheidung in

Ergebnisse

zwei FCP-Fraktionen gemacht werden, die sonst immer sichtbar ist. Neben dieser Anomalie sind in der Mutante zudem sehr viele Komplexe hoher Dichte im Saccharosegradienten auszumachen, die im Wildtypen nicht existent sind (Abb. 3.12 A). Die Auftrennung der abgenommenen Fraktionen des Gradienten verdeutlicht dieses Verhalten und zeigt auf, dass dennoch die auch sonst beobachteten Photosystem-Banden in der UM1-Mutante zu finden sind. Bei der Akkumulation von Komplexen hoher Dichte im Saccharosegradienten scheint es sich um PSI beinhaltende Fraktionen zu handeln (Abb. 3.12 B). Auch die Auftrennung solubilisierter Thylakoide mittels IpBN-PAGE weist eine PSII-Bande ähnlich dem Wildtypen auf, aber gestörte FCP- sowie PSI-Komplexe (Abb. 3.12 C). Hierbei können in der Lhcx6_1 Knockdown Mutante PSI-Fraktionen sehr hohen Molekulargewichts ausgemacht werden, die kaum in die Gelmatrix einlaufen. Trotz des auffälligen Verhaltens der UM1-Mutante in der Thylakoid-Protein-Zusammensetzung, kann keine auffällige Veränderung im Lhcx6_1-Gehalt, vergleichend zum Wildtypen, beobachtet werden (Abb. 3.12 D). Ein Zusammenhang mit der Änderung des Lhcx1 (FCP6) Gehalts und den beobachteten Veränderungen der Mutante können mittels Beprobung mit spezifischem Antikörper ausgeschlossen werden. Eine UM1-Mutante ohne β -Estradiol Induktion zeigte ein solches Verhalten nicht, auch der Wildtyp mit selbiger Menge β -Estradiol weist nicht das Verhalten der induzierten UM1-Mutante auf (Anhang 8).

4. Diskussion

Die oxygene Photosynthese ist ein über Jahrmillionen evolvierter Prozess der biochemischen Energiegewinnung an dem dutzende Proteinkomplexe Beteiligung finden. Die effiziente Sammlung elektromagnetischer Strahlung ist auf die mit Chromophoren versehenen Lichtsammelkomplexe zurückzuführen, die sich zwischen Spezies in Anordnung, Pigmentierung und Zusammensetzung unterscheiden. Die aus sekundärer Endosymbiose entstandenen Diatomeen besitzen eine Vielzahl an Lichtsammelproteinen, von denen die Vertreter der Lhcx-Kandidaten eine putativ photoprotektive Funktion ausüben. Die zentrische Diatomee *C. meneghiniana* besitzt vier verschiedene lhcx-Gene: lhcx1, lhcx5, lhcx6 und lhcx6_1 (Traller *et al.*, 2016), von denen die Lhcx1- und Lhcx6_1-Proteine in Aufreinigungen von FCPs dieser Diatomee nachgewiesen wurden (Gundermann *et al.*, 2019). Während die Funktion des Lhcx1 dieser Spezies genauer evaluiert wurde (Ghazaryan *et al.*, 2016) konnte die des Lhcx6_1-Proteins bislang nicht genauer aufgeklärt werden. Diese Arbeit dient der näheren Betrachtung dieses Lhcx-Kandidaten zentrischer Diatomeen.

4.1 Sequenz des Lhcx6_1 aus *C. meneghiniana*

Die Sequenzierung des lhcx6_1-Gens aus *C. meneghiniana* konnte die bislang unbekannte Basenabfolge sowie die daraus resultierende Polypeptidsequenz des Proteins aufklären (Abb. 3.1 und 3.2). Diese unterscheidet sich, bis auf eine 34 Aminosäuren lange Sequenz am N-Terminus, kaum von der Primärstruktur des Lhcx6_1 der ebenfalls zentrischen Diatomee *T. pseudonana*. Dieser Unterschied der beiden Lhcx6_1 Sequenzen ist sowohl im geringfügig kleineren DNA-Amplifikat (Abb. 3.4) als auch der molekularen Masse des immunologisch detektierten Proteins zu beobachten (Abb. 3.8). Die errechneten Molekulargewichte der Proteine belaufen sich hierbei auf 24,7 kDa für *C. meneghiniana*

und 21,3 kDa für *T. pseudonana*. Der gegen die letzten 16 Aminosäuren des C-Terminus gerichtete, in dieser Arbeit entworfene, α -Lhcx6_1 Antikörper bestätigt die hypothetischen Molekulargewichts-Differenzen der Lhcx6_1 Proteine beider Spezies. Sowohl Untersuchung der cDNA-Amplifikate und deren Größenvergleich mit gDNA, als auch die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und immunologischer Beprobung mit α -Lhcx6_1 Antikörper konnten ein Intron in diesem lhcx-Kandidaten ausschließen. Das für *T. pseudonana* vorhergesagte Intron im lhcx6_1-Gen wird damit entkräftigt.

Der in *C. meneghiniana* beobachtete, verlängerte N-Terminus sollte dem Signal- und Transit-Peptid, für erfolgreiche Thylakoidmembran-Insertion, nachgeschaltet sein. Diese Annahme begründet sich in den vorhergesagten Transit- und Signalsequenzen (Kilian und Kroth, 2005; Huesgen *et al.*, 2013) für plastidäre Diatomeen Proteine. Zudem weist der beobachtete Protein-Größenunterschied der beiden Lhcx6_1 Immunodetektionen von *C. meneghiniana* und *T. pseudonana* ein größeres Protein in *C. meneghiniana* nach. Diese Beobachtungen legen nahe, dass das reife *C. meneghiniana* Lhcx6_1 Protein die zusätzliche Sequenz am N-Terminus trägt. Diese verlängerte N-terminale Sequenz kann in keinem anderen Diatomeen Lhc gefunden werden. Eine bioinformatische Suche nach eventuellen Homologien dieser 34 Peptid-Sequenz ergibt eine überraschend hohe Ähnlichkeit zum N-Terminus der minoren Antennen höherer Pflanzen CP24 (LHCB6), CP26 (LHCB5) sowie CP29 (LHCB4) am Beispiel von *A. thaliana* (s. Anhang 9). In den Proteinsequenzen der minoren Antennen der Grünalge *C. reinhardtii* können diese wiederum nicht ausgemacht werden. Den speziellen, N-terminalen Sequenzmotiven der minoren Antennen konnte bislang noch keine genaue Funktion nachgesagt werden, jedoch belegen neuste Strukturaufklärungen des PSII-Superkomplexes von *A. thaliana* sowie des Spinats eine essenzielle Rolle des N-Terminus der minoren Antennen in der strukturellen Verknüpfung zu anderen LHCs (Wei *et al.*, 2016; Van Bezouwen *et al.*, 2017).

Die minoren Antennen CP26 und -29 stellen evolutiv äußerst alte Komponenten der Photosynthese-Maschinerie dar, die an der Basis der Diversifizierung der Grünalgen stehen,

wobei CP24 ein Aufkommen bei Abspaltung der Landpflanzen zugeschrieben wird (Koziol *et al.*, 2007; Alboresi *et al.*, 2008). Lhcx6_1 könnte ein Ortholog der minoren Antennen in zentralen Diatomeen darstellen.

4.2 Lhcx6_1 als minore Antenne der zentralen Diatomeen

Jüngste Forschungsarbeiten konnten erstmals die Struktur von Photosystem-FCP-Superkomplexen in Diatomeen aufklären (Pi *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020; Nagao *et al.*, 2020; Arshad *et al.*, 2021; Nagao *et al.*, 2022). Die Struktur des PSII-Superkomplexes der Diatomee *Chaetoceros gracilis* belegt die konservierte Architektur des Photosystem-Kerns und identifiziert die umliegenden FCPs. Neben oligomeren FCPs konnten dabei ebenso monomere LHC-Proteine gefunden werden, welche das PSII umgeben. Dabei wurden monomere FCPs zugeordnet, die als FCP-D, -E und -F titulierte wurden (Pi *et al.*, 2019). Analog zum PSII-Superkomplex der höheren Pflanzen (Dekker und Boekema, 2005; Wei *et al.*, 2016) können die monomeren FCPs von *C. gracilis* den minoren Antennen höherer Pflanzen gleichgestellt werden, wobei ein Vergleich der Lokalisation eine Ähnlichkeit von FCP-E zu CP26 und FCP-D zu CP29 aufzeigt, ein zu CP24 analoges Protein kann jedoch nicht eindeutig identifiziert werden (Pi *et al.*, 2019; Büchel, 2019). Ebenso konnte eine Cryo-Elektronen Tomographie, von Photosystem-Komplexen der mit *C. meneghiniana* eng verwandten Diatomee *T. pseudonana*, monomere Lhcs am PSII identifizieren (Arshad *et al.*, 2021), während zudem trimere FCPs nachgewiesen werden konnte, wie sie auch bei *C. meneghiniana* existieren (Büchel, 2003). Ein monomeres Lhc der Studie von Arshad *et al.* (2021) wurde dabei in der Peripherie des PSII-Kerns gefunden, was eine außergewöhnliche und essenzielle Stellung der monomeren FCPs in zentralen Diatomeen untermauert. Die minoren Antennen der grünen Linie fungieren als monomeres Konnektor zwischen den Lichtsammelkomplexen und dem Photosystem (Boekema *et al.*, 1995). Den minoren Antennen wurde immer wieder eine Rolle in der Abgabe überschüssiger Anregungsenergie (NPQ) zugesprochen (Bassi *et al.*, 1997), welches in CP-Antennen knockouts (k.o.) der

Grünalge *C. reinhardtii* experimentell bestätigt wurde (Cazzaniga *et al.*, 2020), in k.o-Linien der höheren Pflanze *A. thaliana* jedoch nicht dieselben Eigenschaften aufweist (Dall'Osto *et al.*, 2014; Townsend *et al.*, 2018). Die Autoren gehen davon aus, dass der Mechanismus des NPQ in höheren Pflanzen eher auf ein Zusammenspiel der Ansäuerung des Thylakoidlumens, des PsbS-Proteins und des Xanthophyllzyklus' in den trimeren Lichtsammelkomplexen zurückzuführen ist. In der Grünalge *C. reinhardtii* ist PsbS zwar vorhanden, erfüllt aber nicht die essenzielle NPQ-Funktion, wie in höheren Pflanzen (Li *et al.*, 2000; Tibiletti *et al.*, 2016). Der NPQ-Mechanismus dieser Grünalge begründet sich dabei eher auf einen LhcSR-abhängigen Mechanismus (Peers *et al.*, 2009) im Zusammenspiel mit den genannten Funktionen der minoren Antennen und Xanthophyllzyklus-Komponenten. Somit sind vermutlich auch die PsbS-defizienten Diatomeen auf ein Zusammenspiel der minoren Antennen und LhcX-Proteine zum effizienten NPQ angewiesen. Die Ähnlichkeit des LhcX6_1 Proteins zu den minoren Antennen ist beispielhaft an der Expression des zugrundeliegenden Gens zu beobachten (Abb. 3.9; Anhang 10) (vgl. Teramoto *et al.*, 2002), was an der höchsten Expression unter Schwachlicht und einer Abnahme im Starklicht auszumachen ist. Die beschriebene N-terminale Sequenz des LhcX6_1 und deren Homologie zu den monomeren, minoren Antennen aus *A. thaliana* bekräftigen die Annahme. Zudem sind monomere Lhcs an PSII-Komplexen der Diatomeen strukturell nachgewiesen, die genauen Proteine aber nicht identifiziert. Aber auch die vorrangige Lokalisation an PSI (Abb. 3.13), welches mit monomeren Antennen assoziiert ist (Nagao *et al.*, 2020), könnte auf eine Funktion dessen als monomere Antenne der Photosysteme hinweisen, wobei diesem eine PS-SC strukturgebende Rolle und auch eine wichtige Funktion im NPQ inne liegen könnte. Eine Funktion der minoren Antennen an PSII und auch PSI kann im Zuge der *state transition* in *C. reinhardtii* beobachtet werden, wobei das Lhc an beiden Photosystemen eine Verknüpfung der umgebenden Lichtsammelkomplexe mit den Photosystemen darstellt (Takahashi *et al.*, 2014). Auch Vertreter der Bärlapppflanzen, welche evolutiv äußerst alte

Landpflanzen darstellen, weisen eine Funktion einer minoren Antenne an PSII und PSI auf (Ferroni *et al.*, 2014). Somit scheint die bifunktionelle Natur eines monomeren Lhcs an PSII sowie PSI ein beschriebenes Phänomen zu sein und die genauere Regulation dessen soll in 4.6 detailliert analysiert werden.

4.3 Antikörper gestützte Lokalisation des Lhcx6_1

Die detaillierte Untersuchung der LhcSR-Homologe der Diatomeen ist eine junge Entwicklung und deren Beginn auf die FCP-Pionierarbeit von Eppard und Rhiel (1998; 2000) und die Sequenzierung des *T. pseudonana* (Armbrust *et al.*, 2004) und *P. tricornutum* (Bowler *et al.*, 2008) Genoms zurückzuführen. Die erste Beschreibung des Lhcx6_1-Proteins basiert auf einer massenspektrometrischen Untersuchung von BN-PAGE aufgetrennten Thylakoiden der zentrischen Diatomee *T. pseudonana* (Grouneva *et al.*, 2011). In dieser Arbeit konnten mehrere exprimierte Lhcx-Kandidaten der zentrischen Diatomee nachgewiesen werden, wobei ebenso Lokalisation und Änderung Thylakoidkomplex-Zusammensetzung unter Starklichtbedingungen mit einbezogen wurden. Unter Schwachlichtbedingungen beobachteten die Autoren vier Lhcx-Proteine. Während Lhcx1 und Lhcx2 sowie Lhcx5 ausschließlich im freien Proteinpool nachgewiesen werden konnten, beschreibt die Arbeit ein Vorhandensein von Lhcx6_1 in der FCP- und ebenso PSI-Fraktion. Der Vergleich mit einer Starklichtkultur ergänzt die in FCP-Komplexen detektierten Lhcx-Kandidaten um Lhcx1/2 und auch Lhcx4. Im Starklicht PSI konnte zudem Lhcx4 nachgewiesen werden. Lhcx4, -5 und -6 wurden in dieser Bedingung im freien Proteinpool detektiert. Weitere Arbeiten mit *T. pseudonana* konnten einen ebenso massenspektrometrischen Nachweis des Lhcx6_1 Proteins an PSII erbringen (Calvaruso *et al.*, 2020), wobei keine Starklicht-abhängige Änderung dieses Proteinlevels an PSII zu beobachten war (Calvaruso *et al.*, 2022). Letztere Arbeit weist das Lhcx6_1 zudem an PSI nach und zeigt eine Starklicht-induzierte Abnahme des Proteins. Die

Diskussion

massenspektrometrischen Untersuchungen von Gundermann *et al.* (2019) in *C. meneghiniana* sowie Kansy *et al.* (2020) anhand von *T. pseudonana* weisen Lhcx6_1 in FCP-Komplexen nach. In dieser Arbeit konnten erstmalig Antikörper gestützte Lokalisations-Untersuchungen des Lhcx6_1 Proteins getätigt werden. Die hier getätigten Lokalisationsstudien weisen Lhcx6_1 in *C. meneghiniana* hauptsächlich an PSI-Komplexen nach, zudem in geringerer Menge an PSII, sowie in geringster Menge den FCPs (Abb 3.13). Diese Ergebnisse der allgemeinen Lokalisation decken sich mit denen der vorher genannten Untersuchungen auf Basis der Massenspektrometrie und bekräftigen die vorrangige Verknüpfung des Lhcx-Proteins mit den Photosystemen, vorrangig PSI. Der immunologische Nachweis des Lhcx6_1 dieser Arbeit bekräftigt eine Zunahme des Proteins an PSI unter Starklichtbedingungen, was im Gegensatz zur beobachteten Starklicht bedingten Reduktion des Proteinlevels am PSI steht (Calvaruso *et al.*, 2022). Nähere Betrachtung dieses Widerspruchs liegt jedoch vermutlich im gewählten experimentellen Aufbau, so sind die Untersuchungen von Calvaruso *et al.* (2022) auf eine mehrwöchig Starklicht-adaptierte Diatomeen Kultur zurückzuführen, während in dieser Arbeit die Adaption der Diatomeen im jeweiligen Lichtregime nur etwa eine Woche betrug. Eine Abnahme des Lhcx6_1 Proteinlevels unter längerer Starklichtexposition kann dennoch durch die verminderte Expression des lhcx6_1-Gens in höherer Lichtintensität bekräftigt werden (Abb. 3.9). Lhcx6_1 als Teil der trimeren FCPs, wie es von Gundermann *et al.* (2019) postuliert wurde, konnte im Zuge der Arbeit nicht bestätigt werden, dennoch wurden, neben der nahezu nicht vorhandenen immunodetektierten Menge an FCP1 und FCP2 (Abb. 3.13), keine direkten Gegenbeweise erbracht. Allerdings spricht gerade die PSI-favorisierte Lokalisation und die Ähnlichkeit zu den minoren Antennen aus *A. thaliana* für eine vorrangig monomere Struktur des Lhcx-Kandidaten.

4.4 Lichtschutz-Charakter des Lhcx6_1

Die Lichtsammelantennen heutiger photosynthetischer Eukaryoten weisen eine hohe Vielfalt auf, wobei Photosystem spezifische Lichtsammelkomplexe, verschiedene Subtypen oder auch funktional unterschiedliche Proteine dieser Klasse existieren (Neilson und Durnford, 2010). Die drei großen Gruppen der Diatomeen LHCs sind die des lhcf-, lhcr- und lhcx-Typs (Büchel, 2020). Den Lhcx-Proteinen wird aufgrund ihrer Homologie zu LhcSR-Kandidaten aus *C. reinhardtii* eine protektive Funktion zugeschrieben (Savard *et al.*, 1996; Eppard und Rhiel 1998; Richard *et al.*, 2000). Viele Veröffentlichungen der letzten Jahre bestätigten eine photoprotektive Funktion der LhcSR- (Peers *et al.*, 2009; Bonente *et al.*, 2011; Perozeni *et al.*, 2020) und auch einiger Lhcx-Proteine (Bailleul *et al.*, 2010; Ghazaryan *et al.*, 2016; Buck *et al.*, 2019). Dabei ist ein ausschlaggebender Mechanismus der Lhc-gesteuerten Photoprotektion eine Protonierung von lumenalen Glutamin- oder Asparaginsäure-Resten, was anhand des PsbS-Proteins der Pflanzen (Li *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2015) und dem LhcSR3 aus *C. reinhardtii* (Liguori *et al.*, 2013; Ballottari *et al.*, 2016) nachgewiesen und für Lhcx-Proteine der Diatomeen postuliert wurde (Taddei *et al.*, 2016). Jüngste Ergebnisse konnten jedoch bislang keinen Zusammenhang putativ protonierbarer Aminosäuren in Lhcx-Kandidaten von *P. tricornutum* und einer photoprotektiven Aufgabe ermitteln (Buck *et al.*, 2021). Dennoch heben die Autoren hervor, dass gerade in der zentralen Diatomee *C. meneghiniana* eine direkte, durch Protonierung eines Lhcx-Proteins ausgelöste, Stressantwort als sehr wahrscheinlich gilt, da dieser Organismus eine photoprotektive Komponente besitzt, welche Thylakoid pH induziert und nicht abhängig vom Xanthophyllzyklus ist (Grouneva *et al.*, 2008). Die Modellierung der Proteinstruktur des Lhcx6_1 aus *C. meneghiniana* bringt außergewöhnlich viele Glutamin- und Asparaginsäure-Reste an vermutlich lumenaler Seite des Proteins zu Tage (Abb. 3.5). Um die mögliche Protonierung dieser Aminosäuren genauer zu evaluieren wurde die Proteinstruktur zusätzlich mit I-TASSER (Yang und Zhang, 2015) modelliert und die erhaltenen Daten mit der vorliegenden Struktur verglichen. Die Strukturmodellierung

Diskussion

durch I-TASSER lieferte insgesamt eine nahezu identische mit der durch SWISS-Model erhaltenen Struktur (Anhang 11). Mittels der I-TASSER Modellierung konnte die Oberflächen-Zugänglichkeit (*Solvent-Accessibility*) der Aminosäuren ermittelt und mit den Strukturdaten verglichen werden. Die Berechnung der möglichen Zugänglichkeit wird dabei von 1 (nicht zugänglich) zu 9 (zugänglich) angegeben. Die vorhergesagte Zugänglichkeit (Anhang 11) der Glutamin- und Asparaginsäure-Reste wurde in die Entwicklung des folgenden Modells mit aufgenommen (Abb. 4.1).

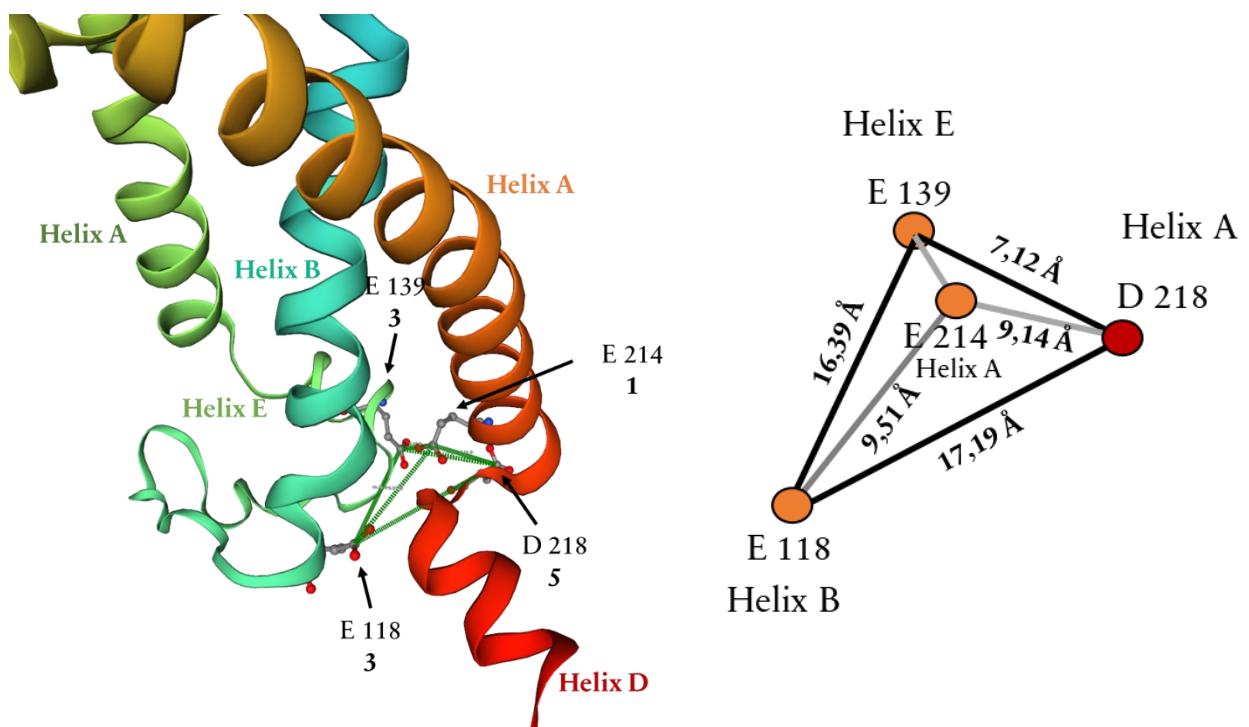


Abbildung 4.1: Modell der protonierbaren, lumenalen Aminosäuren des *C. meneghiniana* Lhc6_1 in Analogie zum *C. reinhardtii* LhcSR3 nach Ballottari *et al.* (2016).

Links: Die Struktur des Lhc6_1 Proteins wurde anhand der sequenzierten und translatierten Sequenz mit SWISS-Model und I-TASSER modelliert. Die dargestellte SWISS-Model Struktur wurde mit den I-TASSER Vorhersagen zur Zugänglichkeit einzelner lumenaler, protonierbarer Asparagin- (D) und Glutaminsäure- (E) Resten ergänzt, was als fett dargestellte Zahl unter der jeweiligen Nummer der Aminosäure in der Polypeptidkette dargestellt ist. Die verschiedenen Helices der Lhc6_1 Struktur sind mit Buchstaben dargestellt. Rechts: Lokalisation der putativ protonierbaren Aminosäuren und deren Abstand zum C-Atom der Carboxylgruppe [Å] zueinander, laut SWISS-Model Struktur des Proteins.

Die Anordnung der Glutamin- und Asparaginsäuren an lumenaler Seite des *C. meneghiniana* Lhc6_1 birgt sehr große Parallelen zu den nachweislich für die Photoprotektion des LhcSR3 aus *C. reinhardtii* notwendigen und pH-regulierten

Diskussion

Aminosäuren (Ballottari *et al.*, 2016; Anhang 12), weswegen eine ähnliche räumliche Modellierung gewählt wurde. Letztere Autoren erbrachten den Nachweis, dass drei räumlich nahe Aminosäuren: Asparaginsäure 117, Glutaminsäure 221 und Glutaminsäure 224 essenziell für die pH-abhängige Photoprotektion des LhcSR3 sind. Hierbei sind diese Aminosäuren in deren modellierter Proteinstruktur in Helix D (E 221 und E 224) und in der Schlaufe zwischen Helix B und E (D117) zu finden. Der in der Lhc6_1 beobachtete Verbund von protonierbaren Aminosäuren zeigt strukturelle Ähnlichkeit auf, wobei hier E 118 am Übergang zwischen Helix B und E; E 139 in Helix E; und D 218 am Übergang von Helix A zu D lokalisiert ist. Zudem wurde das in Helix A lokalisierte E 214 aufgrund seiner räumlichen Nähe mit in das Modell aufgenommen, die I-TASSER Zugänglichkeitsanalyse sagt dafür jedoch den schlechtesten Wert voraus. Für eine detailliertere Betrachtung der strukturell möglichen pH-Detektion ist jedoch eine bis dato nicht erfolgte strukturelle Aufklärung eines Diatomeen LhcX zwingend erforderlich. Dass die Lokalisation der hier diskutierten Aminosäuren im Lhc6_1 Modell womöglich essenzielle Bestandteile der pH-abhängigen Protonierung sein könnten, zeigt auch die Konservierung dieser Aminosäuren in den Sequenzen von *C. cryptica* sowie *T. pseudonana* (Abb. 3.2 / 3.3). Auffallend dabei ist auch der Austausch der luminal enorm günstig positionierten Asparaginsäure D 218, welche in *T. pseudonana* den Funktionskonservierenden Austausch durch Glutaminsäure (E 184) aufweist und somit die These der Wichtigkeit dieser Aminosäure in der pH-Detektion untermauert. Des Weiteren gelten die im *Physcomitrella patens* LhcSR1 an Helix A – D Übergang gelegenen, protonierbaren Aminosäuren als für die Photoprotektion unabdingbar, was womöglich an einer Konformationsänderung im Zusammenhang mit der benachbarten L1-Pigmentbindestelle des Proteins zu erklären ist (Guarnetti Prandi *et al.*, 2022). Auch diese Analogie unterstützt die mögliche Funktion des D 218 des *C. meneghiniana* Lhc6_1 als pH-Sensor und NPQ-Regulator. Im Falle einer Pigmentierung des Lhc6_1 und einer Ähnlichkeit zu strukturell aufgeklärten Lhcs aus *P. tricornutum* könnte die A – D Helix Konformationsänderung durch

Protonierung ein analoges Quenching in der naheliegenden Fucoxanthin-Bindestelle auslösen (Wang *et al.*, 2019; Büchel 2019). Zusätzlich sollte das D 227 Erwähnung finden, was am Ende der Helix D positioniert ist und eine zum D 218 identische Zugänglichkeit aufweist, für das diskutierte Modell jedoch in zu großer Distanz lokalisiert ist. Dennoch sind gerade die C-terminalen, protonierbaren Aminosäuren substantiell für eine NPQ-Induktion im LhcSR (Liguori *et al.*, 2013).

Die Untersuchungen von Buck *et al.* (2021) identifizierten in den Lhcx-Proteinen der pennaten Diatomee *P. tricornutum* ein Tryptophan, welches strukturell nahe der Epoxy-Gruppe des Diadinoxanthins liegen soll und nachweislich einen entscheidenden Einfluss auf die Photoprotektion dieser Diatomee besitzt (Anhang 13 A). Das von den Autoren beschriebene Motiv kann auch in den Lhcx1 und Lhcx6 Proteinen aus *C. meneghiniana* gefunden werden (Anhang 13 B), während das beschriebene Motiv in dieser Form im Lhcx6_1 der Diatomee nicht existiert. Dennoch ist in Helix C ein Tryptophan an geeigneter Stelle für die Diadinoxanthin Interaktion zu finden (Anhang 13 C). Dies könnte für eine strukturell andere Funktion des Lhcx6_1, vergleichend zu Lhcx1 und Lhcx6 und auch Lhcx5 sprechen, wobei die Tryptophan-Diadinoxanthin Interaktion dennoch durch jeden der drei Lhcx-Kandidaten ausgeführt werden kann.

4.5 Phosphorylierung von Thylakoidmembran Proteinen in *C. meneghiniana*

Die Phospho-Modifikation von an der Photosynthese beteiligten Proteinen gilt als wichtiger Regulator und findet Beteiligung an Regulation der Lichtreaktion, Biogenese und Reparatur der Membranproteinkomplexe und strukturellen Veränderungen der Thylakoidmembran (Allen 1992; Vener *et al.*, 1998). In Organismen der grünen Linie sind diese Mechanismen gut untersucht, reversibel und durch Kinasen und Phosphatasen katalysiert (Bonardi *et al.*, 2005; Bellafiore *et al.*, 2005; Pribil *et al.*, 2010; Dietzel *et al.*, 2011). Trotz zweier großer Phosphoproteom-Studien in *P. tricornutum* (Chen *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2020) und der Identifikation von 1502 phosphorylierten Proteinen, gibt es in

Diatomeen bislang kaum Daten über Phospho-Modifikationen von Thylakoid Proteinen. Die vorliegenden Studien identifizierten dabei hauptsächlich Phospho-Modifikationen von Proteinen mit metabolischer Kontrolle im Eisen-, Stickstoff- und Lipid-Stoffwechsel. Dennoch konnte mindestens ein phosphorylierter FCP nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 2014). Die Arbeit von Brakemann *et al.* (2006) widmete sich der Untersuchung von FCPs der zentralen Diatomee *C. cryptica* und erbrachte den Nachweis eines Phospho-modifizierten FCPs mit der Größe von 22 kDa sowie 24 kDa. Diese FCP-Phosphorylierung konnte jedoch ausschließlich mit Inkubation in Phospho-Threonin Antikörper detektiert werden, während ein Phospho-Serin Antikörper keine Immunodetektion dieser aufwies. Auch ein *in vivo* Phosphorylierungs-Assay mittels Autoradiographie der Arbeit konnte die 22 kDa FCP-Phosphorylierung nachweisen. Diese Ergebnisse decken sich mit der hier getätigten Untersuchung aus *C. meneghiniana* (Abb. 3.14 / 3.15) und legen nahe, dass es sich bei dem von Brakemann *et al.* (2006) detektierten 22 kDa Phospho-FCP um das *C. cryptica* Lhcx6_1 (vgl. Abb. 3.2) handelt. Neben Lhcx6_1 konnten die Reaktionszentrum-Proteine des PSI und PSII Phospho-Serin modifiziert nachgewiesen werden. Die aus der grünen Linie bekannten chloroplastidären Kinasen der Thylakoidmembran Protein-Modifikation diskriminieren nicht zwischen Serin- und Threonin-Phosphorylierung (Depège *et al.*, 2003; Bonardi *et al.*, 2005; Bellafiore *et al.*, 2005; Schönberg *et al.*, 2017), dennoch können in *C. meneghiniana* hauptsächlich Phospho-Serin Modifikationen an PSII- und PSI-Komponenten detektiert werden, die in bekannten Modellorganismen vorrangig durch die STN8-Kinase katalysiert werden (Vainonen *et al.*, 2005; Grieco *et al.*, 2016). Die Phospho-Threonin Modifikation konnte nahezu ausschließlich an Lhcx6_1 nachgewiesen werden. Eine dynamische Regulation der Phosphorylierung der Thylakoidmembran Proteine konnte nicht nachgewiesen werden. Dabei ist die beobachtete Phosphorylierung unabhängig vom Umgebungslicht und nicht zu unterscheiden zwischen Schwach- Stark- und Fernrotlicht (Abb. 3.15). Auch eine, im Zuge dieser Arbeit angefertigte, weitere Untersuchung konnte keine dynamische Regulation der Phosphorylierung aufzeigen

(Wolf, 2021). So konnten in einer Zeitreihe einer dunkeladaptierten Kultur hin zu Umgebungslicht weder mittels Phospho-Serin, noch Phospho-Threonin Antikörper Phosphorylierungs-Unterschiede in *C. meneghiniana* Gesamtprotein ausgemacht werden. Zudem konnte auch hier keine nennenswerte Änderung der Phosphorylierung zwischen den Lichtbedingungen erfasst werden. Damit entzieht sich die Regulation der Protein-Phosphorylierung in Thylakoidmembranen der zentrischen Diatomee *C. meneghiniana* den bekannten Mechanismen der grünen Linie, welche eine dynamische Regulation der Kinasen in Abhängigkeit des Umgebungslicht aufweisen (Trotta *et al.*, 2016).

4.6 Phosphorylierung von Lhcx6_1

Die *in silico* Analyse des *C. meneghiniana* Lhcx6_1 Strukturmodells konnte einige putativ phosphorylierbare Aminosäuren in geeigneter Lokalisation ausmachen (vgl. Abb. 3.6). Dabei sollten die Phospho-modifizierbaren Threonin- oder Serin-Reste, in Analogie zu den bekannten phosphorylierten Lhcs, stromal aufzufinden sein. In Anbetracht der Lokalisation im errechneten Strukturmodell, sowie der Sequenz des reifen Proteins, wurden als wahrscheinlichste Kandidaten der Modifikation das Serin 89 und 187 sowie Threonin 166, 170, 172 und 185 in Erwägung gezogen. Die mittels Immunoblot und Phospho-Threonin-/Serin Antikörper gestützte *in vivo* Phosphorylierungsstudie konnte eine Phospho-Modifikation des Lhcx6_1 an Threonin-Resten ausmachen, was einerseits in Gesamt-Thylakoid-Isolaten (Abb. 3.14) als auch aufgereinigten PSI und PSII-Komplexen (Abb. 3.16 A) nachgewiesen wurde. Zusätzlich konnte eine Phos-tag PAGE als weitere Methodik eine Phosphorylierung des Proteins bestätigen (Abb. 3.16 B). Darüber hinaus gibt die durchgeführte Phos-tag Analyse Aussage über die Anzahl der Phosphorylierung und legt eine unphosphorylierte und eine einfach phosphorylierte Version des Lhcx6_1 nahe. Für die Bestimmung des phosphorylierten Threonin-Rests des *C. meneghiniana* Lhcx6_1 wurden einige Parameter für eine Eingrenzung herangezogen (4.2).

AS #	Sequenz	NetPhos Prediction Score
166	...RLIETEPGT...	0.460
170	...TEPGTTRTDA...	0.482
172	...PGTTRTDAKI...	0.450
185	...WRPKTESEY...	0.963

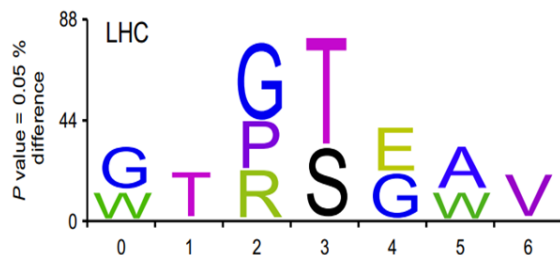


Abbildung 4.2: Putativ phosphorylierbare, stromale Threonine des *C. meneghiniana* Lhcx6_1 in Analogie zu konservierten, Phospho-modifizierten Threonin-/Serin-Resten der pflanzlichen Lhcs (Schönberg et al., 2017). Links: Im Lhcx6_1 Strukturmodell stromal lokalisierte Threonine mitsamt angrenzenden Aminosäuren und NetPhos 3.1 Prediction Score des Threonins. 0 = unwahrscheinlich, 1 = sehr wahrscheinlich phosphoryliert. Rechts: Konservierte Aminosäuren rund um phosphorylierte Threonin-/Serin-Reste pflanzlicher Lhcs nach Schönberg et al. (2017).

Während das auf Eukaryoten getrimmte, mittels neuronaler Netzwerk KI betriebene, NetPhos 3.1 Programm das Threonin 185 mit einem NetPhos Prediction Score von 0,963 als sehr wahrscheinlich phosphoryliert betitelt, ermittelt die KI für alle anderen aufgeführten Threonin-Kandidaten eine weitaus geringere Wahrscheinlichkeit der Phospho-Modifikation. Ein Abgleich der Threonin umgebenden Aminosäuren und Vergleich derer mit konservierten Aminosäuren um phosphorylierte Threonin-/Serin-Reste (Schönberg et al., 2017), bringt als wahrscheinlichstes Phospho-modifiziertes Threonin das T 172 zu Tage. Dieses ist in -3 Position von einem Glycin, -2 Position von dem stark konservierten Threonin, -1 Position von Arginin und +2 Position Alanin umgeben. Dabei erfüllt es von allen dargestellten Threonin-Kandidaten am besten die in Lhcs konservierten Aminosäuren, rund um die Stelle der Phosphorylierung. Zusätzlich sind das T 172 und auch die umgebenden, konservierten Aminosäuren sowohl in *C. cryptica* (vgl. Abb. 3.2) als auch *T. pseudonana* (vgl. Abb. 3.3) erhalten. Dennoch weist das T 185 auch eine konservierte Funktion auf, wobei es in *T. pseudonana* durch das ebenso phosphorylierbare Serin substituiert ist und in *C. cryptica* die zu *C. meneghiniana* identische Sequenz aufweist. Des Weiteren ist das T 185 sowohl in LhcSR1 sowie LhcSR3 aus *C. reinhardtii* konserviert (Anhang 14 A), zudem auch in *P. patens* LhcSR1 und *P. tricornutum* Lhcx3 und durch eine bislang unbekannte Kinase in *C. reinhardtii* modifiziert (Xue et al., 2015). Somit gelten

Diskussion

sowohl T 172 als auch T 185 als die wahrscheinlichsten Kandidaten einer Threonin-Phosphorylierung des Lhcx6_1-Proteins, wobei T 172 das Ziel einer STN-ähnlichen Kinase und T 185 einer bis dato unbekanntem Kinase darstellen könnte.

Die Untersuchung der Phosphorylierung des Lhcx6_1 mittels Phos-tag PAGE brachte, neben der Aussage der Anzahl der Phosphorylierungsstellen, einen Unterschied zwischen PSI- und PSII-assoziiertem Lhcx6_1 zu Tage. Dass Lhc-Proteine einen Phosphorylierungs-Unterschied in Abhängigkeit ihrer Photosystem Lokalisation aufweisen, ist in der grünen Linie bekannt und allgemein mit der als *state transition* (STR) betitelten Umverteilung der Lhcs rund um die Photosysteme assoziiert (Allen *et al.*, 1981; Allen, 1995; Dietzel *et al.*, 2011). Die in dieser Arbeit gesammelten Daten widersprechen jedoch den gängigen Vorstellungen eines *state transition* Mechanismus in *C. meneghiniana*, was vorrangig in der nicht detektierbaren Phosphorylierungs-Änderung zwischen den verwendeten Lichtbedingungen auszumachen ist. Zudem spricht die eher homogene Verteilung der photosynthetischen Membranprotein-Komplexe in Diatomeen und das Fehlen der Stroma-Grana-Struktur (Pyszniak und Gibbs, 1992) für eine Abwesenheit einer STR Umverteilung der FCPs. Dennoch könnte auch in Diatomeen eine Lhc-Phosphorylierung die Lokalisation bestimmen, ohne die Dynamik einer STR aufzuweisen. Die mittels Phos-tag PAGE detektierte Phosphorylierung des Lhcx6_1 birgt allgemein große Parallelen zu den Untersuchungen durch Longoni *et al.* (2015), welche mit dieser Methodik eine vollständige Phosphorylierung des Lhcb2, einem Bestandteil der trimeren Lhcs, in Assoziation mit PSI nachweisen, während das Protein in Assoziation mit PSII-Lhcs in leicht phosphorylierter sowie unphosphorylierter Form vorkommt. Selbiges Verhalten kann auch am Lhcx6_1 Protein nachgewiesen werden (Abb. 3.16), das PSI-assoziiert nahezu ausschließlich in phosphorylierter Form nachzuweisen ist. Auch für das monomere PSII Lhc CP29 konnte in der Alge *C. reinhardtii* eine Phosphorylierung und anschließende Migration zu PSI nachgewiesen werden, welche allerdings ebenso mit dem STR Mechanismus einhergeht (Takahashi *et al.*, 2014).

Weiterführende Studien identifizierten zudem die Phosphorylierung des Lhcx6_1-Verwandten LhcSR3 aus *C. reinhardtii* und eine damit verknüpfte Änderung der Lokalisation (Bergner *et al.*, 2015). Auch wenn letztere Autoren, im Gegensatz zu den Lhcx6_1 Untersuchungen, eine Phosphorylierung des LhcSR3 am PSII und eine unphosphorylierte Form im Zusammenhang mit PSI-Komplexen massenspektrometrisch nachweisen, führte eine jüngere Studie der Forscher zum Ergebnis, dass ein Fehlen der untersuchten LhcSR3 Phosphorylierung dennoch zur Assoziation mit beiden Photosystemen führt (Scholz *et al.*, 2019). Die Autoren nahmen jedoch nur die N-terminalen Serin- und Threonin-Reste in ihre Untersuchungen mit auf und vernachlässigen das T 185. So könnte das T 185 des LhcSR und auch des Lhcx6_1 der entscheidende Regulator sein, welcher unter Phosphorylierung die Assoziation des Proteins mit dem PSI initiiert. Analog zum Lhcx6_1 (Abb. 3.6) findet sich das Threonin 185 des LhcSR3 aus *C. reinhardtii* in vergleichbar günstiger, stromaler Position im Strukturmodell wieder (Anhang 14 B). Das LhcSR3 ist dabei als Bindeglied zwischen Photosystem und Lhcs zu sehen und womöglich für ein Quenching der Anregungsenergie durch Trennung der Lhcs von den Photosystemen verantwortlich (Semchonok *et al.*, 2017). Neuste Studien belegen die PSII und auch PSI assoziierte Quenching Aktivität durch LhcSR-Proteine (Girolomoni *et al.*, 2019). Auch die Lhcx Proteine der Diatomeen konnten sowohl in zentrischen Diatomeen (Grouneva *et al.*, 2011; Calvaruso *et al.*, 2020) als auch pennaten Kieselalgen (Taddei *et al.*, 2018) teilweise an PSII oder PSI gefunden werden. Die hier gesammelten Daten sprechen für eine Funktion des Lhcx6_1 an beiden Photosystemen, welche über eine Phosphorylierung vermittelt werden könnte.

4.7 Genetische Manipulation von *C. meneghiniana*

Trotz der Signifikanz der Diatomee *Cyclotella* in der biochemischen Charakterisierung der Mikroalgen-Photosynthese, ist deren molekularbiologische Zugänglichkeit bis heute äußerst beschränkt und die Berichte einer genetischen Modifikation spärlich. Der erste

Nachweis einer erfolgreichen Transformation der zentrischen Diatomee gelang durch eine Biolistische Transformation mittels DNA-bestückter Wolfram-Partikel (Dunahay *et al.*, 1995), während die unternommenen Versuche der Forscher die Kieselalge mittels Elektroporation zu transformieren erfolglos blieben (Dunahay *et al.*, 1992). Wenige weitere Veröffentlichungen beschreiben ebenso eine biolistische Transformation der zentrischen Diatomee (Ghazarayan *et al.*, 2016; Shrestha und Hilebrand, 2017). Im Zuge dieser Arbeit konnten mehrere Transformations-Methodiken für *C. meneghiniana* etabliert und optimiert werden (Abb. 3.17). Dabei konnten sowohl die Biolistische Transformation als auch Elektroporation und bakterielle Konjugation nachweislich Nourseothricin resistente Kolonien hervorbringen. Die Elektroporation konnte dabei die höchste Effizienz erzielen und deren Erfolg auf den Einsatz eines spezialisierten Geräts (NEPA21 Super Electroporator) zurückzuführen, mit welchem die Strompulse, zur Löcherung der Zellmembran und Transfer Pulse, die der Integration der linearisierten dsDNA in die Zellen dienen, an die Eigenschaften der Zellen angepasst wurden. Trotz der optimierten Transformation und teilweise exzellenten Ausbeute an Klonen, scheiterte der Erhalt eines dauerhaften Transformations-Phänotyps der Zellen oftmals an der genetischen Stilllegung der Expressionskassetten (vgl. Abb. 3.19). Die Stilllegung von Fremd-DNA-Kassetten gilt als grundlegendes Problem der genetischen Manipulation von Mikroalgen (Specht *et al.*, 2010; Fajardo *et al.*, 2020). Aufgrund der Problematik wurde ein mit β -Estradiol induzierbares Genexpressions-System herangezogen (Zuo *et al.*, 2000; Kassaw *et al.*, 2022), um die Expression einer Antisense-RNA gegen lhcx6_1 kontrolliert zu steuern. Das System konnte erfolgreich an *C. meneghiniana* angepasst sowie der Organismus erfolgreich damit transformiert werden und lieferte Dosis- und Inkubationszeit-abhängige Expression von eingebrachter Fremd-DNA (Abb. 3.20).

4.8 Phänotyp des Lhcx6_1 Knockdowns

Die genaue Funktion der Diatomeen Lhcx-Proteine ist bislang noch unklar. Gerade in zentrischen Diatomeen ist dies auf eine Limitierung der genetischen Manipulation der Organismen zurückzuführen, wobei sowohl Transformations-Methodiken als auch fehlende regulatorische Elemente die molekularbiologische Zugänglichkeit erschweren. Mit Hilfe des induzierbaren Expressionssystems konnte eine Reduktion des lhcx6_1-Transkripts in *C. meneghiniana* erzielt und Effekte auf die Thylakoidmembran-Protein Zusammensetzung beobachtet werden.

Die Induktion der lhcx6_1 Antisense-RNA führte zu einer Verminderung des lhcx6_1-Transkripts auf ca. 46 % in der UM1-Mutante (Abb. 3.21). Die Thylakoid-Isolation des Klons brachte bereits bei Auftrennung der Membranprotein-Komplexe mittels Saccharosedichtegradienten ein zum Wildtyp verändertes Muster zu Tage (Abb. 3.22). Dabei ist vor allem das Fehlen der zwei FCP-Fractionen, im Vergleich zum Wildtypen (vgl. Abb. 3.12), auffallend. Die PSII-Fraktion der Mutante und des Wildtypen sind kaum zu unterscheiden, während die UM1-Mutante PSI-Komplexe zunehmender Dichte aufweist. Die Auftrennung solubilisierter Thylakoide mittels lpBN-PAGE, ohne vorige Fraktionierung im Saccharosedichtegradienten, verdeutlicht das gestörte Verhalten der PSI-Komplexe der UM1-Mutante (Abb. 3.22 C). Dabei können PSI-Komplexe enormer Größe beobachtet werden, die kaum in die, für Auftrennung von Superkomplexen optimierte, lpBN-PAGE einlaufen. Die 2D-PAGE der lpBN-Streifen bestätigt, dass es sich bei diesen Komplexen hohen Molekulargewichts um vorrangig Photosystem I handelt und geringe Mengen PSII-Komponenten nachzuweisen sind (Anhang 15). Zudem belegt auch die 2D-Auftrennung ein gestörtes Laufverhalten der FCPs, welche einerseits als Schmier auf dem Gel verteilt zu finden sind (Anhang 15), während die kleineren FCP-Oligomere in der Mutante zu fehlen scheinen (Abb. 3.22 C). Diese Beobachtungen sprechen für eine Fehl-Assemblierung und gegebenenfalls Aggregation der FCP-Komplexe. Auch wenn die Antikörper gestützte Analyse keine Veränderung im Lhcx6_1-Proteinlevel der UM1-

Mutante nachweisen konnte (Abb. 3.22 D), so ist dennoch ein Phänotyp des Knockdowns zu beobachten. Der Grund für die Diskrepanz zwischen RNA- und Protein-Daten ist vermutlich vorrangig in der geringen Umsatzrate des Proteins und der Regulation der kern-codierten mRNA zu finden. Die Umsatzraten einzelner Lhcs sind bislang unzureichend untersucht (Dall'Osto *et al.*, 2015), bisherige Ergebnisse deuten allerdings auf eine sehr langsame turnover Rate, vor allem unter Schwachlicht, hin (Bennett, 1981). Da die gesammelten Daten einer Schwachlicht-Kultur mit 20 $\mu\text{mol Photonen}/\text{m}^2/\text{s}$ entnommen wurden, ist ein sehr langsamer turnover der Lhcx6_1 Proteine denkbar. Dabei kam es während der Wachstumsphase der *C. meneghiniana* Zellen in β -Estradiol haltigem Medium zu einer Verminderung des lhcx6_1-Transkripts und folglich einer Fehl-Assemblierung von Thylakoidmembran-Komplexen aufgrund des Lhcx6_1-Mangels. Die in später exponentieller Phase geernteten Zellen weisen folglich eine gestörte Thylakoid-Architektur auf, während die Level an Lhcx6_1 sich normalisiert hatten. Eine Veränderung des Lhcx1-Gehalts konnte nicht detektiert werden (Abb. 3.22 D) und somit der Phänotyp durch Fehlen oder Überexpression dieses Lhcx ausgeschlossen. Die beobachteten Veränderungen der Thylakoid-Struktur der Mutante, welche vorrangig zu Photosystem I Assemblierungs-Störungen führen, sind in Einklang mit der Lokalisation des Lhcx6_1, das hauptsächlich in Verbindung mit PSI nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.13, 3.14). Auch die gestörten FCP-Oligomere der UM1-Mutante geben Hinweise auf die essenzielle Funktion des Lhcx6_1 in der Verknüpfung von PSII und den umliegenden FCPs.

4.9 Modell: Lhcx6_1 als minore Antenne des Photosystem II und Photosystem I mit essenzieller Quenching-Funktion

Die erhaltenen und diskutierten Daten wurden in ein Modell überführt um die mögliche Funktionsweise des Lhcx6_1 aus *C. meneghiniana* zu veranschaulichen.

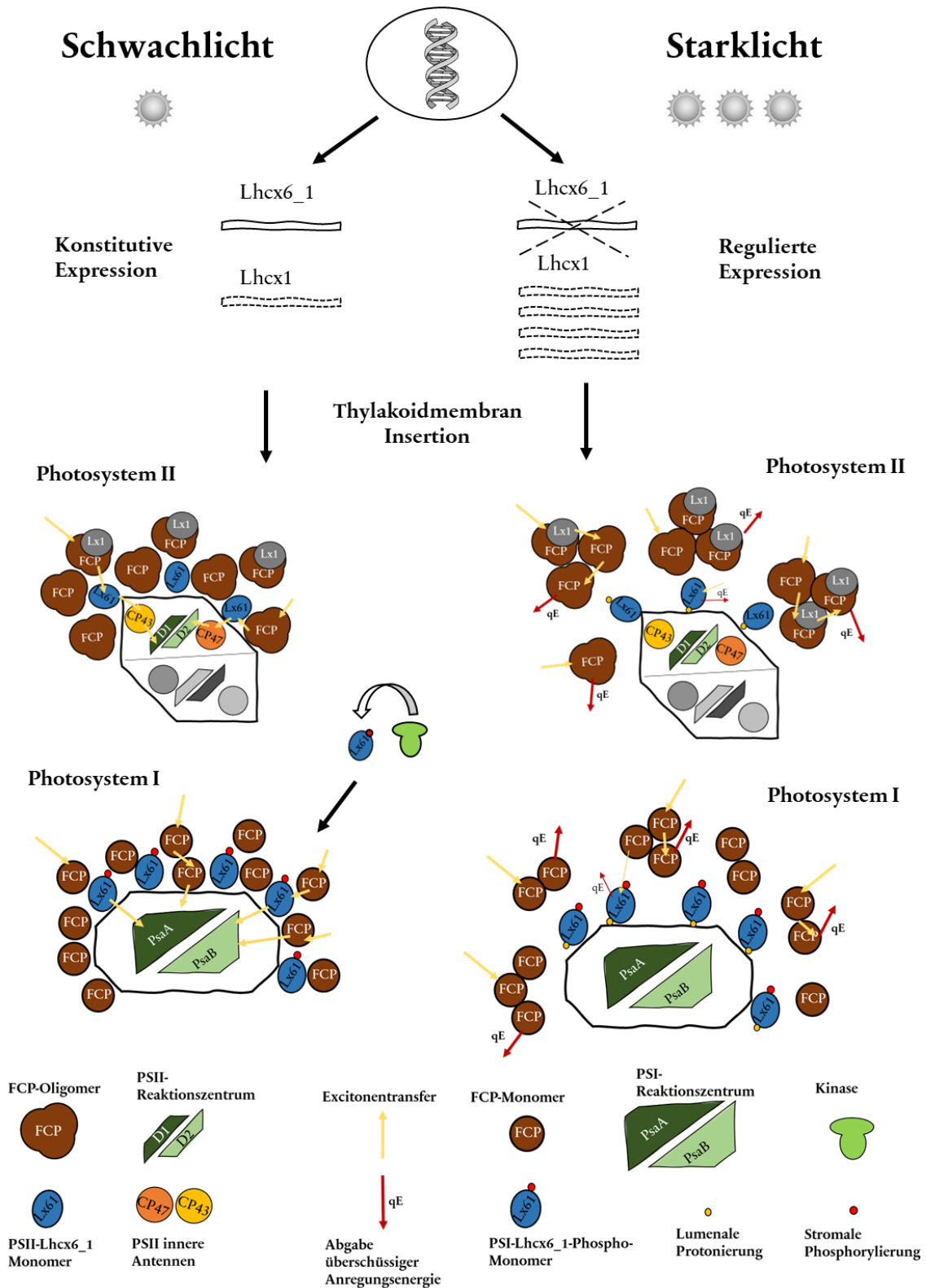


Abbildung 4.3: Mögliche Funktionsweise des Lhx6_1 aus *C. meneghiniana* an Photosystem I und -II.

Lhx6_1 ist in monomerer Form mit dem PSII und PSI als Verbindungsstück zwischen Photosystem und FCPs assoziiert. Die PSI-Assoziation geht mit einer stromalen Phosphorylierung des Proteins einher. Lhx6_1 ist für den direkten Energietransfer von FCPs hin zu den Reaktionszentren verantwortlich. Eine Starklicht getriebene Absenkung des lumenalen Thylakoid pHs führt zur Protonierung lumenaler Glutamin- und Asparaginsäure-Reste des Lhx6_1 und ein Wechsel von Lichtsammlung auf Quenching der Anregungsenergie am Photosystem. Es folgt eine Entlastung der Photosysteme und Quenching der Anregungsenergie durch Aggregation der FCPs unter Beteiligung von Lhx1.

Diskussion

Die Schwachlicht-Inkubation von *C. meneghiniana* führt zu einer konstitutiven Expression der *lhcx1* und *lhcx6_1* Gene, wobei die Genexpression wenige Stunden nach initialem Lichteinfall maximal ist und danach auf ein basales Level zurückkehrt. Die Kern-codierten Lhcs werden in die Thylakoidmembran translatiert, wobei das *Lhcx1* in die oligomeren FCP-Komplexe eingeht (Beer *et al.*, 2006; Gundermann und Büchel, 2012) und das *Lhcx6_1* Teil der monomeren Antennen des PSI bildet (vgl. Veith und Büchel, 2007; Veith *et al.*, 2009; Nagao *et al.*, 2020), aber auch eine minore Antennen Funktion an PSII einnimmt. Dabei ist das *Lhcx6_1* essenzieller strukturgebender Teil der Photosystem II - FCP Assoziation im Stile einer minoren Antenne und für einen Anregungsenergie-Fluss hin zu den Photosystemen unabdingbar. Die Kinase-vermittelte Phosphorylierung des *Lhcx6_1* führt zur Bindung an Photosystem I, wo es ebenso für eine ungestörte PSI - monomer FCP Assemblierung verantwortlich ist. Eine Starklicht-Inkubation der *C. meneghiniana* Kultur hat eine Regulation der beiden *lhcx* mRNAs zu Folge. Während die Expression des *lhcx1* unter Lichtstress gesteigert wird, sorgt das Starklicht für eine Unterdrückung der *lhcx6_1*-Expression. Dies begründet sich in der direkten, Stress-induzierten NPQ-Funktion des *Lhcx1* in aggregierten FCP-Komplexen (Ghazaryan *et al.*, 2016), während der *Lhcx6_1* bedingte Energietransfer umliegender FCPs auf das Photosystem unterbunden werden muss. So könnte das *Lhcx1* die hauptsächliche NPQ-Funktion der aggregierten FCP-Komplexe bestimmen, während das Photosystem assoziierte *Lhcx6_1*, als letzte NPQ-Instanz, ein Quenching direkt an den Photosystemen vermitteln könnte (vgl. Chukhutsina *et al.*, 2014), was womöglich auf eine lumenale Protonierung des *Lhcx6_1* und damit induziertem Wechsel von Lichtsammel- zu Lichtschutz-Protein zurückzuführen ist, in Analogie zum *LhcSR* (Liguori *et al.*, 2013). Dieser Funktionswechsel könnte dabei über die variable Konformation einer Xanthophyll-Bindestelle des Proteins vermittelt werden (Prandi *et al.*, 2022) und in Zusammenhang mit dem Tryptophan 188 des Proteins stehen (Buck *et al.*, 2021).

5. Zusammenfassung

Die oxygene Photosynthese bildet den Grundpfeiler des heutigen Ökosystems unseres Planeten. Neben den gut untersuchten Landpflanzen bilden Mikroalgen eine äußerst bedeutende Organismengruppe der phototrophen Lebewesen. Zu den Mikroalgen zählen die Diatomeen, welche sich beispielsweise durch eine Silikatschale und spezielle Lichtsammelkomplexe auszeichnen und für einen Großteil der marinen Primärproduktion verantwortlich sind. Die stoffwechselphysiologischen Grundlagen des ökologischen Erfolgs der Kieselalgen sind bislang noch unzureichend erforscht. Ein Vertreter der zentralen Diatomeen, *Cyclotella*, wurde bereits zur Jahrtausendwende zur biochemischen Charakterisierung der Diatomeen Photosynthese verwendet (Eppard und Rhiel, 1998; Eppard und Rhiel, 2000), das Genom des Organismus aber erst vor kurzem sequenziert (Traller *et al.*, 2016). Die Sequenzierung des Genoms konnte einige Gene für Lichtsammelproteine identifizieren, die Homologie zu den LhcSR-Proteinen aus *C. reinhardtii* aufweisen, welche nachweislich eine photoprotektive Funktion besitzen (Peers *et al.*, 2009). Diese sogenannten Lhcx-Proteine der Diatomeen sind in den zwei Gruppen der Kieselalgen, den zentralen und pennaten Diatomeen zu finden, unterscheiden sich aber in ihren jeweiligen Lhcx-Kandidaten. So können in der pennaten Diatomee *P. tricornutum* vier Lhcx-Gene ausgemacht werden, während die zentrale Kieselalge *T. pseudonana* sechs Lhcx-Gene besitzt und *C. cryptica* vier verschiedene Lhcx-Kandidaten genomisch aufweist (Armbrust *et al.*, 2004; Bowler *et al.*, 2008; Traller *et al.*, 2016). Die beschriebenen Diatomeen weisen alle eine Homologie im Lhcx1 auf, während sich die übrigen Lhcx-Kandidaten zwischen pennaten und zentralen Diatomeen unterscheiden. Ein zwischen *T. pseudonana* und *C. cryptica* konserviertes Lhcx ist das Lhcx6_1, welches 2011 das erste Mal massenspektrometrisch an Photosystemen von *T. pseudonana* nachgewiesen wurde (Grouneva *et al.*, 2011) und in weiteren Massenspektrometrie-gestützten Untersuchungen in beiden zentralen Diatomeen an Photosynthese-

Zusammenfassung

Komplexen gefunden werden konnte (Gundermann *et al.*, 2019; Calvaruso *et al.*, 2020). Die Funktion des Lhcx6_1 ist bislang unklar.

Diese Arbeit konnte das Lhcx6_1 aus *C. meneghiniana* charakterisieren und Antikörpergestützt genauer lokalisieren, eine nicht dynamische Phosphorylierung der Thylakoidmembran-Proteine der zentralen Diatomee nachweisen und die molekularbiologische Zugänglichkeit des Organismus optimieren. qRT-PCR gestützte Expressions-Analysen konnten eine unerwartete Expression des lhcx6_1-Gens aufdecken. Dieses weist, im Vergleich zum Lhcx1, keine Starklicht induzierte Expression auf. Die Expression des Gens konnte nach wenigen Stunden Schwachlicht als maximal bestimmt werden, während sie im Starklicht abnimmt. Das Muster der Genexpression glich im Schwachlicht eher der des lhcf1-Gens. Die Sequenzierung des lhcx6_1 aus *C. meneghiniana* identifizierte eine verlängerte N-terminale Sequenz des Proteins, welche Homologie zu den minoren Antennen aus *A. thaliana* besitzt und Teil des reifen Proteins ist. Mittels eines C-terminalen Epitops wurde ein Antikörper gegen das Lhcx6_1 entworfen, welcher das Protein in *C. meneghiniana* spezifisch nachweisen kann. Die Isolation von Thylakoidmembranen der zentralen Diatomee und weitergehende Aufreinigung mittels Saccharosedichtegradienten und IpBN-PAGE konnten die Lokalisation des Lhcx6_1 eingrenzen. Das Protein zeigt dabei keine Unterschiede in seiner Lokalisation nach Inkubation in Schwach-, Stark- und Fernrot-Licht und ist vorrangig mit Photosystem I assoziiert. In geringerer Menge konnte es zudem an Photosystem II nachgewiesen werden, während der immunologische Nachweis in Lichtsammelkomplexen (FCPs) minimale Mengen erbrachte. Ferner konnte eine Phosphorylierung des Lhcx6_1 an Threonin-Resten nachgewiesen werden, während die meisten anderen Thylakoidmembran-Proteine mittels Phospho-Serin Antikörper detektiert werden konnten. Weder die Phosphorylierung des Lhcx6_1, noch der anderen Thylakoidmembran-Proteine, zeigt eine dynamische Regulation, im Stile einer *state-transition* ähnlichen Kinase auf. Die Qualität des Umgebungslichts führte zu keinerlei Unterschieden in Phosphorylierungsmustern.

Weiterführende Untersuchungen der Lhcx6_1-Phosphorylierung mittels Phos-tag PAGE identifizieren eine unphosphorylierte und eine einfach phosphorylierte Form des Proteins. Dabei kann an PSI ausschließlich die phosphorylierte Version des Lhcx6_1 gefunden werden. Im Zuge der Arbeit konnte zudem erstmalig die Elektroporation und Konjugation für *C. meneghiniana* als Transformations-Methoden etabliert werden, während das Protokoll für die biolistische Transformation optimiert wurde. Die Elektroporation erbrachte die höchste Transformationseffizienz. Molekularbiologische Unterfangen eines Lhcx6_1-Knockdowns mittels Antisense-RNA erzielten zunächst, aufgrund der starken Gegenregulation der Diatomee, keinen Erfolg. Das Anpassen einer β -Estradiol induzierbaren Genexpression an *C. meneghiniana* und Transformation der Mikroalge mit diesem System, konnten die Funktionalität anhand induzierter YFP-Expression belegen. Mit Hilfe dieses Systems wurde ein Lhcx6_1-Knockdown herbeigeführt, welcher vorrangig zu einer Assemblierungsstörung des PSI führte. Ebenso waren FCP-Komplexe des PSII betroffen. *In silico* Analysen des Lhcx6_1 Strukturmodells konnten Thylakoid-Lumen exponierte Aminosäuren des Proteins identifizieren, die eine hohe Ähnlichkeit zu protonierbaren Aminosäuren des LhcSR3 aus *C. reinhardtii* aufweisen, welche nachweislich entscheidend für die Photoprotektion sind. Mit Hilfe aller erlangten Daten und deren Abgleich mit ähnlichen Studien konnte ein Modell der Lhcx6_1-Funktion gestaltet werden. Dabei ist das Lhcx6_1 ein monomeres Lichtsammelprotein und vorrangig mit PSI assoziiert, aber auch an PSII-Komplexen als minore Antenne zu finden. Die PSI-Lokalisation geht mit einer Phosphorylierung einher. Die bei Starklicht ablaufende Protonierung der lumenalen Asparagin- und Glutaminsäure-Reste könnte zu einer Konformationsänderung des Proteins und damit herbeigeführten Wechsel der Funktion von Lichtsammlung zu Quenching führen. Es folgt womöglich eine Abgabe der Anregungsenergie in Form von Wärme (NPQ) durch aggregierte FCPs, unter Beteiligung des Lhcx1 und mittels protoniertem Lhcx6_1 direkt an den Photosystemen.

6. Literaturverzeichnis

Alboresi A, Caffari S, Nogue F, Bassi R, Morosinotto T (2008) In Silico and Biochemical Analysis of *Physcomitrella patens* Photosynthetic Antenna: Identification of Subunits which Evolved upon Land Adaptation. *PLOS ONE* 3: e2033

Allen JF (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1098: 275–335

Allen JF (1995) Thylakoid protein phosphorylation, state 1-state 2 transitions, and photosystem stoichiometry adjustment: redox control at multiple levels of gene expression. *Physiologia Plantarum* 93: 196–205

Allen JF (2008) *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis*. Dordrecht: Springer Netherlands

Allen JF, Bennett J, Steinback KE, Arntzen CJ (1981) Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature* 291: 25–29

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410

Archibald JM (2015) Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. *Curr Biol* 25: R911-21

Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE, Bechner M et al (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* 306: 79–86

Aro EM, McCaffery S, Anderson JM (1993) Photoinhibition and D1 Protein Degradation in Peas Acclimated to Different Growth Irradiances. *Plant Physiol* 103: 835–843

Arshad R, Calvaruso C, Boekema EJ, Büchel C, Kouřil R (2021) Revealing the architecture of the photosynthetic apparatus in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Plant Physiol* 186: 2124–2136

Bailleul B, Rogato A, Martino A de, Coesel S, Cardol P, Bowler C, Falciatore A, Finazzi G (2010) An atypical member of the light-harvesting complex stress-related protein family modulates diatom responses to light. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 18214–18219

Ballottari M, Truong TB, Re E de, Erickson E, Stella GR, Fleming GR, Bassi R, Niyogi KK (2016) Identification of pH-sensing sites in the light harvesting complex stress-related 3 protein essential for triggering non-photochemical quenching in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry* 291: 7334–7346

- Barber J, Andersson B (1992) Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences* 17: 61–66
- Bassi R, Sandonà D, Croce R (1997) Novel aspects of chlorophyll a/b-binding proteins. *Physiologia Plantarum* 100: 769–779
- Beer A, Gundermann K, Beckmann J, Büchel C (2006) Subunit composition and pigmentation of fucoxanthin-chlorophyll proteins in diatoms: evidence for a subunit involved in diadinoxanthin and diatoxanthin binding. *Biochemistry* 45: 13046–13053
- Bellaïfiore S, Barneche F, Peltier G, Rochaix J-D (2005) State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature* 433: 892–895
- Bennet J (1977) Phosphorylation of chloroplast membrane polypeptides. *Nature* 269: 344–346
- Bennett J (1981) Biosynthesis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein: polypeptide turnover in darkness. *European Journal of Biochemistry* 118: 61–70
- Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L (2018) *Stryer Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- Bergner SV, Scholz M, Trompelt K, Barth J, Gäbelein P, Steinbeck J, Xue H, Clowez S, Fucile G, Goldschmidt-Clermont M et al (2015) STATE TRANSITION7-Dependent Phosphorylation Is Modulated by Changing Environmental Conditions, and Its Absence Triggers Remodeling of Photosynthetic Protein Complexes. *Plant Physiol* 168: 615–634
- Bhaya D, Grossman AR (1993) Characterization of gene clusters encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Nucl Acids Res* 21: 4458–4466
- Blom N, Gammeltoft S, Brunak S (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294: 1351–1362
- Boekema EJ, Hankamer B, Bald D, Kruij J, Nield J, Boonstra AF, Barber J, Rögner M (1995) Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 175–179
- Bonardi V, Pesaresi P, Becker T, Schleiff E, Wagner R, Pfannschmidt T, Jahns P, Leister D (2005) Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases. *Nature* 437: 1179–1182
- Bonente G, Ballottari M, Truong TB, Morosinotto T, Ahn TK, Fleming GR, Niyogi KK, Bassi R (2011) Analysis of LhcSR3, a protein essential for feedback de-excitation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLOS Biology* 9: e1000577

- Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, Maheswari U, Martens C, Maumus F, Otilar RP et al (2008) The Phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456: 239–244
- Brakemann T, Schlörmann W, Marquardt J, Nolte M, Rhiel E (2006) Association of Fucoxanthin Chlorophyll a/c-binding Polypeptides with Photosystems and Phosphorylation in the Centric Diatom *Cyclotella cryptica*. *Protist* 157: 463–475
- Bricker TM, Frankel LK (2002) The structure and function of CP47 and CP43 in Photosystem II. *Photosynth Res* 72: 131–146
- Büchel C (2003) Fucoxanthin-chlorophyll proteins in diatoms: 18 and 19 kDa subunits assemble into different oligomeric states. *Biochemistry* 42: 13027–13034
- Büchel C (2015) Evolution and function of light harvesting proteins. *Journal of plant physiology* 172: 62–75
- Büchel C (2019) How diatoms harvest light. *Science* 365: 447–448
- Büchel C (2020) Light harvesting complexes in chlorophyll c-containing algae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1861: 148027
- Buck JM, Kroth PG, Lepetit B (2021) Identification of sequence motifs in Lhc_x proteins that confer qE-based photoprotection in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *The Plant Journal* 108: 1721–1734
- Buck JM, Sherman J, Bártulos CR, Serif M, Halder M, Henkel J, Falciatore A, Lavaud J, Gorbunov MY, Kroth PG et al (2019) Lhc_x proteins provide photoprotection via thermal dissipation of absorbed light in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Nat Commun* 10: 4167
- Calvaruso C, Rokka A, Aro E-M, Büchel C (2020) Specific Lhc proteins are bound to PSI or PSII supercomplexes in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Plant Physiology* 183: 67–79
- Calvaruso C, Stefanidis K, Büchel C (2022) Photoacclimation impacts the molecular features of photosystem supercomplexes in the centric diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1863: 148589
- Cazzaniga S, Kim M, Bellamoli F, Jeong J, Lee S, Perozeni F, Pompa A, Jin E, Ballottari M (2020) Photosystem II antenna complexes CP26 and CP29 are essential for nonphotochemical quenching in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant, Cell & Environment* 43: 496–509

- Chen Z, Yang M, Li C, Wang Y, Zhang J, Wang D, Zhang X, Ge F (2014) Phosphoproteomic analysis provides novel insights into stress responses in *Phaeodactylum tricornutum*, a model diatom. *J Proteome Res* 13: 2511–2523
- Chukhutsina VU, Büchel C, van Amerongen H (2014) Disentangling two non-photochemical quenching processes in *Cyclotella meneghiniana* by spectrally-resolved picosecond fluorescence at 77K. *Biochim Biophys Acta* 1837: 899–907
- Collini E, Wong CY, Wilk KE, Curmi PMG, Brumer P, Scholes GD (2010) Coherently wired light-harvesting in photosynthetic marine algae at ambient temperature. *Nature* 463: 644–647
- Dall'Osto L, Bressan M, Bassi R (2015) Biogenesis of light harvesting proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1847: 861–871
- Dall'Osto L, Ünlü C, Cazzaniga S, van Amerongen H (2014) Disturbed excitation energy transfer in *Arabidopsis thaliana* mutants lacking minor antenna complexes of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837: 1981–1988
- Dekker JP, Boekema EJ (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1706: 12–39
- Depège N, Bellafiore S, Rochaix J-D (2003) Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHCII phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science* 299: 1572–1575
- Dietzel L, Bräutigam K, Steiner S, Schöffler K, Lepetit B, Grimm B, Schöttler MA, Pfannschmidt T (2011) Photosystem II supercomplex remodeling serves as an entry mechanism for state transitions in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 23: 2964–2977
- Diner RE, Bielinski VA, Dupont CL, Allen AE, Weyman PD (2016) Refinement of the Diatom Episome Maintenance Sequence and Improvement of Conjugation-Based DNA Delivery Methods. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 4: 65
- Dunahay TG, Jarvis EE, Roessler PG (1995) Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila*. *J Phycol* 31: 1004–1012
- Dunahay TG, Jarvis EE, Zeiler KG, Roessler PG, Brown LM (1992) Genetic engineering of microalgae for fuel production. *Appl Biochem Biotechnol* 34: 331–339
- Eberhard S, Finazzi G, Wollman F-A (2008) The dynamics of photosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* 42: 463–515
- Engel GS, Calhoun TR, Read EL, Ahn T-K, Mancal T, Cheng Y-C, Blankenship RE, Fleming GR (2007) Evidence for wavelike energy transfer through quantum coherence in photosynthetic systems. *Nature* 446: 782–786

- Eppard M, Rhiel E (1998) The genes encoding light-harvesting subunits of *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae) constitute a complex and heterogeneous family. *Mol Gen Genet* 260: 335–345
- Eppard M, Rhiel E (2000) Investigations on gene copy number, introns and chromosomal arrangement of genes encoding the fucoxanthin chlorophyll *a/c*-binding proteins of the centric diatom *Cyclotella cryptica*. *Protist* 151: 27–39
- Eudenbach M (2020) *Erstellung und Untersuchung von Exkonjuganten der zentralen Diatomee Cyclotella meneghiniana zur Verifikation eines Cas9-induzierten lhcx6_1-Knockouts*. Master-Thesis, Goethe-Universität Frankfurt
- Fajardo C, Donato M de, Carrasco R, Martínez-Viguer G, Mancera JM, Fernández-Acero FJ (2020) Advances and challenges in genetic engineering of microalgae. *Reviews in Aquaculture* 12: 365–381
- Falciatore A, Mock T (eds) (2022) *The Molecular Life of Diatoms*. Cham: Springer International Publishing AG
- Falkowski, Barber, Smetacek (1998) Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science* 281: 200–207
- Fan M, Li M, Liu Z, Cao P, Pan X, Zhang H, Zhao X, Zhang J, Chang W (2015) Crystal structures of the PsbS protein essential for photoprotection in plants. *Nat Struct Mol Biol* 22: 729–735
- Fawley MW, Morton SJ, Stewart KD, Mattox KR (1987) Evidence for a common evolutionary origin of light-harvesting Fucoxanthin Chlorophyll *a/c*-Protein complexes of *Pavlova gyra*ns and *Phaeodactylum tricornutum*. *J Phycol* 23: 377–381
- Ferroni L, Angeleri M, Pantaleoni L, Pagliano C, Longoni P, Marsano F, Aro E-M, Suorsa M, Baldisserotto C, Giovanardi M et al (2014) Light-dependent reversible phosphorylation of the minor photosystem II antenna Lhcb6 (CP24) occurs in lycophytes. *The Plant Journal* 77: 893–905
- Field, Behrenfeld, Randerson, Falkowski (1998) Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281: 237–240
- Fischer WW, Hemp J, Johnson JE (2016) Evolution of Oxygenic Photosynthesis. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 44: 647–683
- Fox KF, Ünlü C, Balevičius V, Ramdour BN, Kern C, Pan X, Li M, van Amerongen H, Duffy CDP (2018) A possible molecular basis for photoprotection in the minor antenna proteins of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1859: 471–481

- Fu C, Donovan WP, Shikapwashya-Hasser O, Ye X, Cole RH (2014) Hot Fusion: an efficient method to clone multiple DNA fragments as well as inverted repeats without ligase. *PLOS ONE* 9: e115318
- Ghazaryan A, Akhtar P, Garab G, Lambrev PH, Büchel C (2016) Involvement of the Lhcx protein Fcp6 of the diatom *Cyclotella meneghiniana* in the macro-organisation and structural flexibility of thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1857: 1373–1379
- Giovagnetti V, Jaubert M, Shukla MK, Ungerer P, Bouly J-P, Falciatore A, Ruban AV (2022) Biochemical and molecular properties of LHCX1, the essential regulator of dynamic photoprotection in diatoms. *Plant Physiol* 188: 509–525
- Giovagnetti V, Jaubert M, Shukla MK, Ungerer P, Bouly J-P, Falciatore A, Ruban AV (2022) Biochemical and molecular properties of LHCX1, the essential regulator of dynamic photoprotection in diatoms. *Plant Physiol* 188: 509–525
- Girolomoni L, Cazzaniga S, Pinnola A, Perozeni F, Ballottari M, Bassi R (2019) LHCSR3 is a nonphotochemical quencher of both photosystems in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116: 4212–4217
- Gorter E, Grendel F (1925) On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *The Journal of experimental medicine* 41: 439
- Goss R, Jakob T (2010) Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. *Photosynth Res* 106: 103–122
- Goss R, Pinto EA, Wilhelm C, Richter M (2006) The importance of a highly active and Δ tapH-regulated diatoxanthin epoxidase for the regulation of the PS II antenna function in diadinoxanthin cycle containing algae. *Journal of plant physiology* 163: 1008–1021
- Grantham R (1974) Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 185: 862–864
- Grieco M, Jain A, Ebersberger I, Teige M (2016) An evolutionary view on thylakoid protein phosphorylation uncovers novel phosphorylation hotspots with potential functional implications. *EXBOTJ* 67: 3883–3896
- Grote M, O'Malley MA (2011) Enlightening the life sciences: the history of halobacterial and microbial rhodopsin research. *FEMS Microbiol Rev* 35: 1082–1099
- Grouneva I, Jakob T, Wilhelm C, Goss R (2008) A New Multicomponent NPQ Mechanism in the Diatom *Cyclotella meneghiniana*. *Plant Cell Physiol* 49: 1217–1225
- Grouneva I, Rokka A, Aro E-M (2011) The thylakoid membrane proteome of two marine diatoms outlines both diatom-specific and species-specific features of the photosynthetic machinery. *J Proteome Res* 10: 5338–5353

- Guarnetti Prandi I, Sláma V, Pecorilla C, Cupellini L, Mennucci B (2022) Structure of the stress-related LHCSR1 complex determined by an integrated computational strategy. *Commun Biol* 5: 1–10
- Guex N, Peitsch MC, Schwede T (2009) Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis* 30: S162-S173
- Guillard RRL (1975) Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals* pp. 29–60: Springer, Boston, MA
- Gundermann K, Büchel C (2012) Factors determining the fluorescence yield of fucoxanthin-chlorophyll complexes (FCP) involved in non-photochemical quenching in diatoms. *Biochim Biophys Acta* 1817: 1044–1052
- Gundermann K, Schmidt M, Weisheit W, Mittag M, Büchel C (2013) Identification of several sub-populations in the pool of light harvesting proteins in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochim Biophys Acta* 1827: 303–310
- Gundermann K, Wagner V, Mittag M, Büchel C (2019) Fucoxanthin-chlorophyll protein complexes of the centric diatom *Cyclotella meneghiniana* differ in Lhcx1 and Lhcx6_1 content. *Plant Physiology* 179: 1779–1795
- Gyorgyi AS (1960) *Introduction to a Submolecular Biology*: Academic Press
- Higgins DG, Sharp PM (1988) CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73: 237–244
- Hohmann-Marriott MF, Blankenship RE (2011) Evolution of photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62: 515–548
- Huesgen PF, Alami M, Lange PF, Foster LJ, Schröder WP, Overall CM, Green BR (2013) Proteomic amino-termini profiling reveals targeting information for protein import into complex plastids. *PLOS ONE* 8: e74483
- Hutner SH, Provasoli L, Schatz A, Haskins CP (1950) Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proceedings of the American Philosophical Society* 94: 152–170
- Ishizaki A, Calhoun TR, Schlau-Cohen GS, Fleming GR (2010) Quantum coherence and its interplay with protein environments in photosynthetic electronic energy transfer. *Phys Chem Chem Phys* 12: 7319–7337
- Jakob T, Goss R, Wilhelm C (2001) Unusual pH-dependence of diadinoxanthin de-epoxidase activation causes chlororespiratory induced accumulation of diatoxanthin in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of plant physiology* 158: 383–390

- Järvi S, Suorsa M, Paakkari V, Aro E-M (2011) Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super- and mega-complexes. *Biochem J* 439: 207–214
- Jeffrey SW, Humphrey GF (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 167: 191–194
- Kansy M, Volke D, Sturm L, Wilhelm C, Hoffmann R, Goss R (2020) Pre-purification of diatom pigment protein complexes provides insight into the heterogeneity of FCP complexes. *BMC Plant Biol* 20: 1–16
- Kassaw TK, Paton AJ, Peers G (2022) Episome-Based Gene Expression Modulation Platform in the Model Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *ACS Synthetic Biology* 11: 191–204
- Kilian O, Kroth PG (2005) Identification and characterization of a new conserved motif within the presequence of proteins targeted into complex diatom plastids. *Plant J* 41: 175–183
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T (2009) Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nat Protoc* 4: 1513–1521
- Kozioł AG, Borza T, Ishida K-I, Keeling P, Lee RW, Durnford DG (2007) Tracing the Evolution of the Light-Harvesting Antennae in Chlorophyll a/b-Containing Organisms. *Plant Physiol* 143: 1802–1816
- Krebs EG, Fischer EH (1956) The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 20: 150–157
- Krogh A, Larsson B, Heijne G von, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305: 567–580
- Kühlbrandt W, Wang DN, Fujiyoshi Y (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367: 614–621
- Kühlbrandt W, Wang DN, Fujiyoshi Y (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367: 614–621
- Kützing FT (1844) *Die kieselschaligen Bacillarien oder Diatomeen: (Mit 30 vom Verfasser gravirten Tafeln)*: W. Köhne
- Lämmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685

- Lavaud J, Rousseau B, Etienne A-L (2002) In diatoms, a transthylakoid proton gradient alone is not sufficient to induce a non-photochemical fluorescence quenching. *FEBS Letters* 523: 163–166
- Lee H, Cheng Y-C, Fleming GR (2007) Coherence dynamics in photosynthesis: protein protection of excitonic coherence. *Science* 316: 1462–1465
- Lepetit B, Dietzel L (2015) Light signaling in photosynthetic eukaryotes with ‘green’ and ‘red’ chloroplasts. *Environmental and Experimental Botany* 114: 30–47
- Lepetit B, Volke D, Szabó M, Hoffmann R, Garab G, Wilhelm C, Goss R (2007) Spectroscopic and molecular characterization of the oligomeric antenna of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochemistry* 46: 9813–9822
- Li X-P, Björkman O, Shih C, Grossman AR, Rosenquist M, Jansson S, Niyogi KK (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403: 391–395
- Li X-P, Phippard A, Pasari J, Niyogi KK (2002) Structure-function analysis of photosystem II subunit S (PsbS) in vivo. *Functional Plant Biol.* 29: 1131–1139
- Liguori N, Roy LM, Opacic M, Durand G, Croce R (2013) Regulation of light harvesting in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the C-terminus of LHCSR is the knob of a dimmer switch. *Journal of the American Chemical Society* 135: 18339–18342
- Liu Z, Yan H, Wang K, Kuang T, Zhang J, Gui L, An X, Chang W (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* 428: 287–292
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^(-ΔΔC_T) Method. *Methods* 25: 402–408
- Longoni P, Douchi D, Cariti F, Fucile G, Goldschmidt-Clermont M (2015) Phosphorylation of the light-harvesting complex II isoform Lhcb2 is central to state transitions. *Plant Physiology* 169: 2874–2883
- Malviya S, Scalco E, Audic S, Vincent F, Veluchamy A, Poulain J, Wincker P, Iudicone D, Vargas C de, Bittner L et al (2016) Insights into global diatom distribution and diversity in the world’s ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E1516-E1525
- Marder JB, Chapman DJ, Telfer A, Nixon PJ, Barber J (1987) Identification of psbA and psbD gene products, D1 and D2, as reaction centre proteins of photosystem 2. *Plant Mol Biol* 9: 325–333
- Martin W, Russell MJ (2003) On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358: 59-83; discussion 83-5

- McFadden GI (2001) Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *Journal of Phycology* 37: 951–959
- Mereschowsky C (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biologisches Centralblatt* 25: 293–604
- Miyata T, Miyazawa S, Yasunaga T (1979) Two types of amino acid substitutions in protein evolution. *J Mol Evol* 12: 219–236
- Moustafa A, Beszteri B, Maier UG, Bowler C, Valentin K, Bhattacharya D (2009) Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms. *Science* 324: 1724–1726
- Nagao R, Kato K, Ifuku K, Suzuki T, Kumazawa M, Uchiyama I, Kashino Y, Dohmae N, Akimoto S, Shen J-R et al (2020) Structural basis for assembly and function of a diatom photosystem I-light-harvesting supercomplex. *Nat Commun* 11: 2481
- Nagao R, Kato K, Kumazawa M, Ifuku K, Yokono M, Suzuki T, Dohmae N, Akita F, Akimoto S, Miyazaki N et al (2022) Structural basis for different types of hetero-tetrameric light-harvesting complexes in a diatom PSII-FCPII supercomplex. *Nat Commun* 13: 1764
- Neilson JAD, Durnford DG (2010) Structural and functional diversification of the light-harvesting complexes in photosynthetic eukaryotes. *Photosynth Res* 106: 57–71
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal* 1: 841–845
- Nymark M, Valle KC, Brembu T, Hancke K, Winge P, Andresen K, Johnsen G, Bones AM (2009) An integrated analysis of molecular acclimation to high light in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLOS ONE* 4: e7743
- Nymark M, Valle KC, Hancke K, Winge P, Andresen K, Johnsen G, Bones AM, Brembu T (2013) Molecular and photosynthetic responses to prolonged darkness and subsequent acclimation to re-illumination in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLOS ONE* 8: e58722
- Oesterhelt D, StoECKENIUS W (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol* 233: 149–152
- Oesterhelt D, StoECKENIUS W (1973) Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 2853–2857
- Peers G, Truong TB, Ostendorf E, Busch A, Elrad D, Grossman AR, Hippler M, Niyogi KK (2009) An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis. *Nature* 462: 518–521

- Perozeni F, Beghini G, Cazzaniga S, Ballottari M (2020) Chlamydomonas reinhardtii LHCSR1 and LHCSR3 proteins involved in photoprotective non-photochemical quenching have different quenching efficiency and different carotenoid affinity. *Sci Rep* 10: 1–10
- Pi X, Zhao S, Wang W, Liu D, Xu C, Han G, Kuang T, Sui S-F, Shen J-R (2019) The pigment-protein network of a diatom photosystem II-light-harvesting antenna supercomplex. *Science* 365: eaax4406
- Pinnola A (2019) The rise and fall of Light-Harvesting Complex Stress-Related proteins as photoprotection agents during evolution. *J Exp Bot* 70: 5527–5535
- Porra RJ, Thompson WaA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 975: 384–394
- Pribil M, Pesaresi P, Hertle A, Barbato R, Leister D (2010) Role of plastid protein phosphatase TAP38 in LHCII dephosphorylation and thylakoid electron flow. *PLOS Biology* 8: e1000288
- Provasoli L, MCLAUGHLIN JJ, Droop MR (1957) The development of artificial media for marine algae. *Arch Mikrobiol* 25: 392–428
- Pyszniak AM, Gibbs SP (1992) Immunocytochemical localization of photosystem I and the fucoxanthin-chlorophylla/c light-harvesting complex in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Protoplasma* 166: 208–217
- Rappaport F, Diner BA (2008) Primary photochemistry and energetics leading to the oxidation of the (Mn) 4Ca cluster and to the evolution of molecular oxygen in Photosystem II. *Coordination Chemistry Reviews* 252: 259–272
- Remelli R, Varotto C, Sandonà D, Croce R, Bassi R (1999) Chlorophyll binding to monomeric light-harvesting complex. A mutation analysis of chromophore-binding residues. *J Biol Chem* 274: 33510–33521
- Reyes-Prieto A, Weber APM, Bhattacharya D (2007) The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annu. Rev. Genet.* 41: 147–168
- Richard C, Ouellet H, Guertin M (2000) Characterization of the LI818 polypeptide from the green unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* 42: 303–316
- Rieske JS, MacLennan DH, Coleman R (1964) Isolation and properties of an iron-protein from the (reduced coenzyme Q)-cytochrome C reductase complex of the respiratory chain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 15: 338–344

Round FE, Crawford RM, Mann DG (1990) *Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*: Cambridge University Press

Ruiz Villarreal M (2007) *File:Phospholipids aqueous solution structures.svg – Wikimedia Commons, the free media repository*

Russell M (2006) First life: Billions of years ago, deep under the ocean, the pores and pockets in minerals that surrounded warm, alkaline springs catalyzed the beginning of life. *American Scientist* 94: 32–39

Russell M, Hall A. J. (1997) The emergence of life from iron monosulphide bubbles at a submarine hydrothermal redox and pH front. *JGS* 154: 377–402

Russell M, Hall A. J., Cairns-Smith AG, Braterman PS (1988) Submarine hot springs and the origin of life. *Nature* 336: 117

Rutherford AW, Heathcote P (1985) Primary photochemistry in photosystem-I. *Photosynth Res* 6: 295–316

Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N (1987) Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology* 5: 27–37

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463–5467

Sattler J (2021) *Auswirkungen von unterschiedlichen Lichtqualitäten und -quantitäten auf Superkomplex-Remodeling in Cyclotella meneghiniana*. Bachelor-Thesis, Goethe-Universität Frankfurt

Savard F, Richard C, Guertin M (1996) The *Chlamydomonas reinhardtii* LI818 gene represents a distant relative of the *cabI/II* genes that is regulated during the cell cycle and in response to illumination. *Plant Mol Biol* 32: 461–473

Schägger H, Jagow G von (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* 199: 223–231

Schimper AFW (1883) Ueber die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Botanische Zeitung* 41: S 105 - S 160

Scholz M, Gäbelein P, Xue H, Mosebach L, Bergner SV, Hippler M (2019) Light-dependent N-terminal phosphorylation of LHCSR3 and LHCB4 are interlinked in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* 99: 877–894

Schönberg A, Rödiger A, Mehwald W, Galonska J, Christ G, Helm S, Thieme D, Majovsky P, Hoehenwarter W, Baginsky S (2017) Identification of STN7/STN8 kinase targets reveals

connections between electron transport, metabolism and gene expression. *The Plant Journal* 90: 1176–1186

Semchonok DA, Sathish Yadav KN, Xu P, Drop B, Croce R, Boekema EJ (2017) Interaction between the photoprotective protein LHCSR3 and C2S2 Photosystem II supercomplex in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1858: 379–385

Shrestha RP, Hildebrand M (2017) Development of a silicon limitation inducible expression system for recombinant protein production in the centric diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Cyclotella cryptica*. *Microb Cell Fact* 16: 1–14

Slovacek RE, Hind G (1977) Influence of antimycin a and uncouplers on anaerobic photosynthesis in isolated chloroplasts. *Plant Physiol* 60: 538–542

Specht E, Miyake-Stoner S, Mayfield S (2010) Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnol Lett* 32: 1373–1383

Standfuss J, van Terwisscha Scheltinga AC, Lamborghini M, Kühlbrandt W (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *The EMBO Journal* 24: 919–928

Stransky H, Hager A (1970) Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyllcyclus in verschiedenen Algenklassen. *Archiv. Mikrobiol.* 71: 164–190

Taddei L, Chukhutsina VU, Lepetit B, Stella GR, Bassi R, van Amerongen H, Bouly J-P, Jaubert M, Finazzi G, Falciatore A (2018) Dynamic Changes between Two LHCX-Related Energy Quenching Sites Control Diatom Photoacclimation. *Plant Physiol* 177: 953–965

Taddei L, Stella GR, Rogato A, Bailleul B, Fortunato AE, Annunziata R, Sanges R, Thaler M, Lepetit B, Lavaud J et al (2016) Multisignal control of expression of the LHCX protein family in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J Exp Bot* 67: 3939–3951

Takahashi H, Okamuro A, Minagawa J, Takahashi Y (2014) Biochemical Characterization of Photosystem I-Associated Light-Harvesting Complexes I and II Isolated from State 2 Cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol* 55: 1437–1449

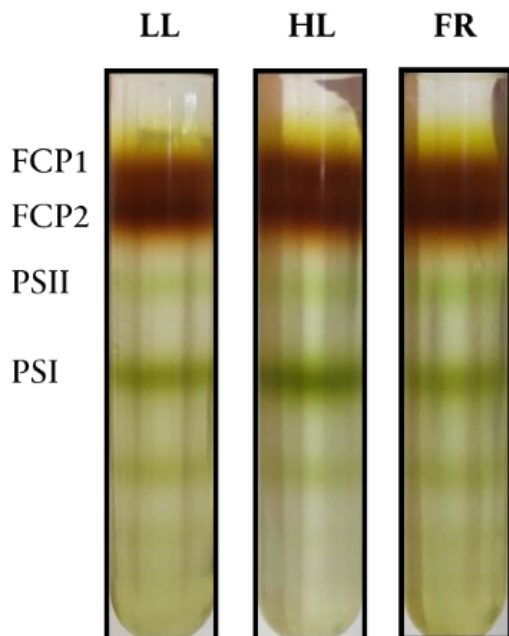
Tan MH, Smith SR, Hixson KK, Tan J, McCarthy JK, Kustka AB, Allen AE (2020) The Importance of Protein Phosphorylation for Signaling and Metabolism in Response to Diel Light Cycling and Nutrient Availability in a Marine Diatom. *Biology* 9: 155

Teramoto H, Nakamori A, Minagawa J, Ono T (2002) Light-Intensity-Dependent Expression of Lhc Gene Family Encoding Light-Harvesting Chlorophyll-a/b Proteins of Photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 130: 325–333

- Thiel J, Byrne JM, Kappler A, Schink B, Pester M (2019) Pyrite formation from FeS and H₂S is mediated through microbial redox activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 6897–6902
- Tibiletti T, Auroy P, Peltier G, Caffarri S (2016) Chlamydomonas reinhardtii PsbS Protein Is Functional and Accumulates Rapidly and Transiently under High Light. *Plant Physiol* 171: 2717–2730
- 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
- Townsend AJ, Saccon F, Giovagnetti V, Wilson S, Ungerer P, Ruban AV (2018) The causes of altered chlorophyll fluorescence quenching induction in the Arabidopsis mutant lacking all minor antenna complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1859: 666–675
- Traller JC, Cokus SJ, Lopez DA, Gaidarenko O, Smith SR, McCrow JP, Gallaher SD, Podell S, Thompson M, Cook O et al (2016) Genome and methylome of the oleaginous diatom *Cyclotella cryptica* reveal genetic flexibility toward a high lipid phenotype. *Biotechnol Biofuels* 9: 258
- Trotta A, Suorsa M, Rantala M, Lundin B, Aro E-M (2016) Serine and threonine residues of plant STN 7 kinase are differentially phosphorylated upon changing light conditions and specifically influence the activity and stability of the kinase. *The Plant Journal* 87: 484–494
- Vainonen JP, Hansson M, Vener AV (2005) STN8 protein kinase in *Arabidopsis thaliana* is specific in phosphorylation of photosystem II core proteins. *Journal of Biological Chemistry* 280: 33679–33686
- van Bezouwen LS, Caffarri S, Kale RS, Kouřil R, Thunnissen A-MWH, Oostergetel GT, Boekema EJ (2017) Subunit and chlorophyll organization of the plant photosystem II supercomplex. *Nature Plants* 3: 17080
- Veith T, Brauns J, Weisheit W, Mittag M, Büchel C (2009) Identification of a specific fucoxanthin-chlorophyll protein in the light harvesting complex of photosystem I in the diatom *Cyclotella meneghiniana*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787: 905–912
- Veith T, Büchel C (2007) The monomeric photosystem I-complex of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* binds specific fucoxanthin chlorophyll proteins (FCPs) as light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1767: 1428–1435

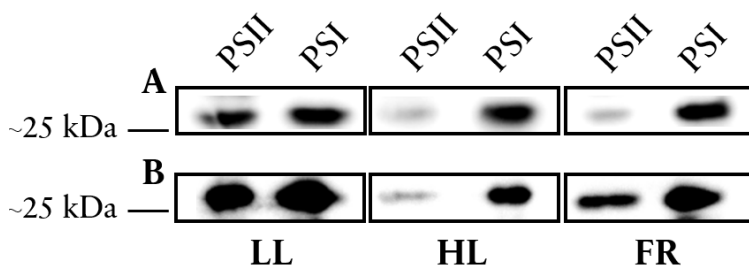
- Vener AV, Harms A, Sussman MR, Vierstra RD (2001) Mass spectrometric resolution of reversible protein phosphorylation in photosynthetic membranes of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 276: 6959–6966
- Vener AV, Ohad I, Andersson B (1998) Protein phosphorylation and redox sensing in chloroplast thylakoids. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 217–223
- Wächtershäuser G (1988) Pyrite Formation, the First Energy Source for Life: a Hypothesis. *Systematic and Applied Microbiology* 10: 207–210
- Wächtershäuser G (1992) Groundworks for an evolutionary biochemistry: The iron-sulphur world. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 58: 85–201
- Wächtershäuser G (2006) From volcanic origins of chemoautotrophic life to Bacteria, Archaea and Eukarya. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1787-806; discussion 1806-8
- Wang W, Yu L-J, Xu C, Tomizaki T, Zhao S, Umena Y, Chen X, Qin X, Xin Y, Suga M et al (2019) Structural basis for blue-green light harvesting and energy dissipation in diatoms. *Science* 363
- Wang W, Zhao S, Pi X, Kuang T, Sui S-F, Shen J-R (2020) Structural features of the diatom photosystem II-light-harvesting antenna complex. *The FEBS Journal* 287: 2191–2200
- Wei X, Su X, Cao P, Liu X, Chang W, Li M, Zhang X, Liu Z (2016) Structure of spinach photosystem II-LHCII supercomplex at 3.2 Å resolution. *Nature* 534: 69–74
- Wolf P (2021) *Time-resolved photosynthetic protein dynamics and consequential changes in light harvesting and light protection of Cyclotella meneghiniana*. Bachelor-Thesis, Goethe-Universität Frankfurt
- Xue H, Bergner SV, Scholz M, Hippler M (2015) Novel insights into the function of LHCSR3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Signaling & Behavior* 10: e1058462
- Yamano T, Miura K, Fukuzawa H (2008) Expression analysis of genes associated with the induction of the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 147: 340–354
- Yang J, Zhang Y (2015) I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucl Acids Res* 43: W174-W181
- Zhu S-H, Green BR (2010) Photoprotection in the diatom *Thalassiosira pseudonana*: role of LI818-like proteins in response to high light stress. *Biochim Biophys Acta* 1797: 1449–1457
- Zuo J, Niu Q-W, Chua N-H (2000) An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *The Plant Journal* 24: 265–273

Anhang



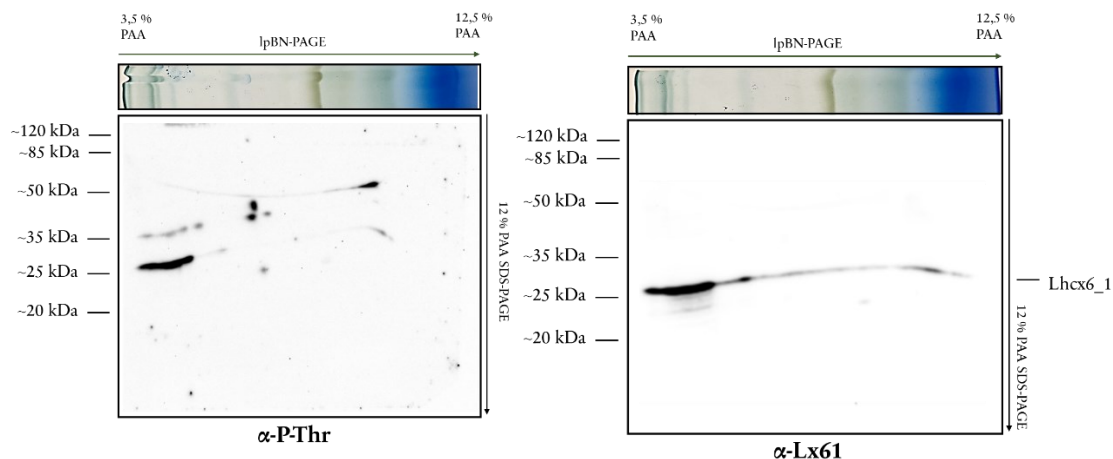
Anhang 1: Separation solubilisierter Thylakoidmembran-Proteinkomplexe aus *C. meneghiniana* auf Saccharosedichtegradienten.

Thylakoide entsprechend 125 µg Chla einer 10-Tage alten *C. meneghiniana* Schwachlicht- Starklicht- und Fernrot-Kultur wurden isoliert, mit 0,75 % (w/v) alpha-DDM solubilisiert und durch Zentrifugation auf Saccharosedichtegradienten getrennt. LL = Schwachlicht, HL = Starklicht, FR = Fernrotlicht. FCP = Diatomeen Lichtsammelkomplex, PSII = Photosystem II, PSI = Photosystem I.



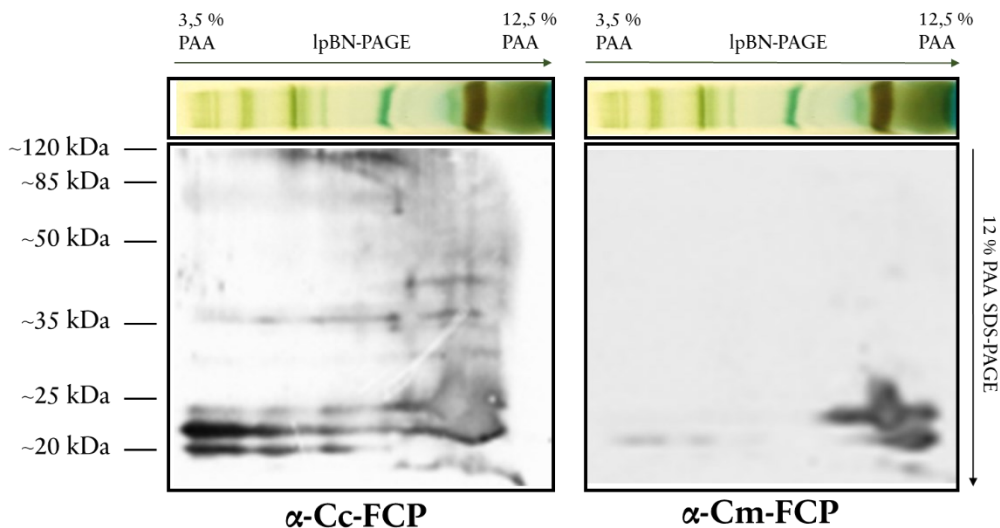
Anhang 2: Western Blot der 2D-PAGE von aufgereinigten PSI- und PSII-Proben aus *C. meneghiniana* unter Schwach- Stark- und Fernrot-Anzucht und Immunodetektion mittels Lhcx6_1 Antikörper.

Thylakoide einer 10-Tage alten *C. meneghiniana* Schwachlicht-, Starklicht- und Fernrotlicht-Kultur wurden isoliert, mit 0,75 % (w/v) alpha-DDM solubilisiert und mittels Saccharosedichtegradienten getrennt. Im Anschluss erfolgte eine weitere Auftrennung von je 1,25 µg Chla PSII und PSI-Fraktion des Gradienten mittels IpBN-PAGE (3,5 % zu 12,5 % PAA). Die IpBN-PAGE Proben des PSII und PSI wurden ausgeschnitten, in 2D-Äquilibriumspuffer inkubiert und in einer denaturierenden PAGE aufgetrennt. Die separierten Proteine wurden auf Nitrocellulose übertragen. Nach Blockieren der Membran wurden diese mit spezifischem Antikörper beprobt. Nach Inkubation in sekundärem HRP-Antikörper erfolgte die Detektion der Immunreaktion mit ECL und INTAS-Imager. Als Größenstandard diente der Pierce™ Prestained MW Marker. LL = Schwachlicht; HL = Starklicht; FR = Fernrotlicht. A: Western Blot einer 12 % PAA SDS-PAGE und Proteinnachweis mit Lhcx6_1-Antikörper. B: Replikat Western Blot einer 12 % PAA SDS-PAGE und Proteinnachweis mit Lhcx6_1-Antikörper.



Anhang 3: Western Blot der 2D-PAGE von IpBN-separierten Thylakoidmembranen aus *C. meneghiniana* und Immunodetektion mittels Phospho-Threonin sowie Lhcx6_1 spezifischer Antikörper.

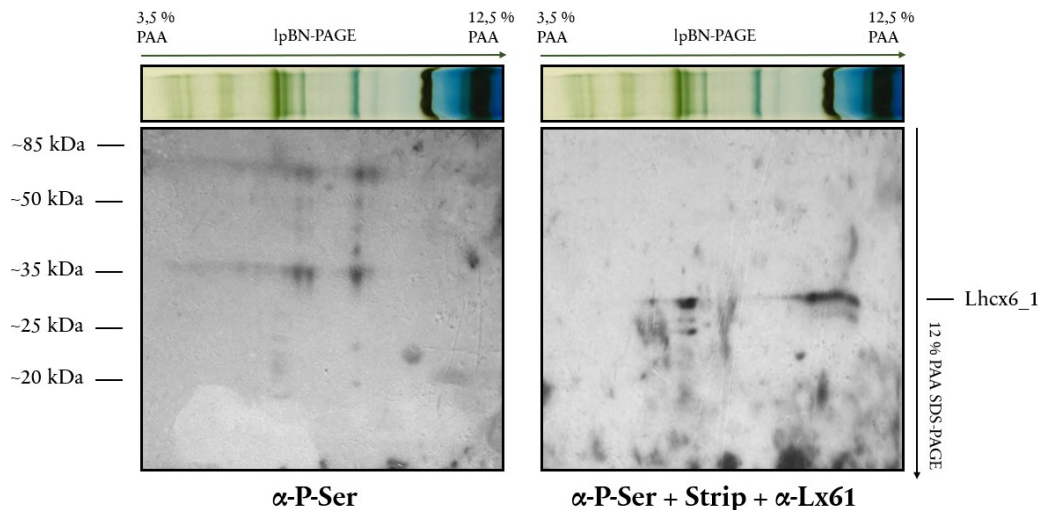
Thylakoide entsprechend 5 µg Chla einer 10-Tage alten *C. meneghiniana* Schwachlicht-Kultur wurden isoliert, mit 0,75 % (w/v) alpha-DDM solubilisiert und mittels IpBN-PAGE (3,5 % zu 12,5 % PAA) getrennt. Die IpBN-Streifen wurden ausgeschnitten, in 2D-Äquilibriumspuffer inkubiert und in einer 12 % PAA SDS-PAGE denaturierend aufgetrennt. Die separierten Proteine wurden auf Nitrocellulose übertragen. Nach Blockieren der Membran wurden diese mit Phospho-Threonin- oder Lhcx6_1-spezifischem Antikörper beprobt. Nach Inkubation in sekundärem HRP-Antikörper erfolgte die Detektion der Immunreaktion mit ECL und INTAS-Imager. Als Größenstandard diente der Pierce™ Prestained MW Marker.



Anhang 4: Western Blot der 2D-PAGE von IpBN-separierten Thylakoidmembranen aus *C. meneghiniana* und Immunodetektion mittels FCP-spezifischer Antikörper.

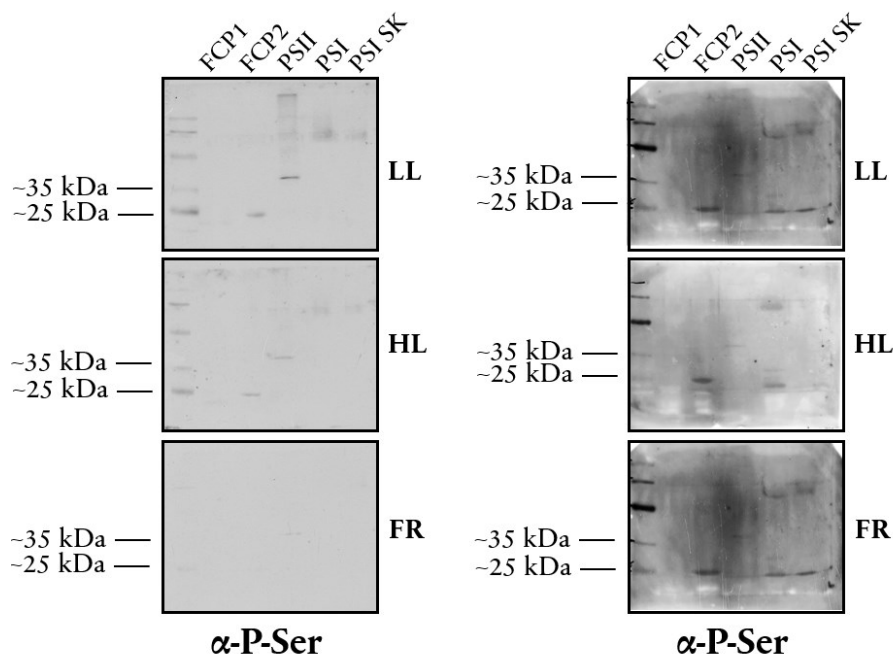
Thylakoide entsprechend 10 µg Chla einer 10-Tage alten *C. meneghiniana* Schwachlicht-Kultur wurden isoliert, mit 0,75 % (w/v) alpha-DDM solubilisiert und mittels IpBN-PAGE (3,5 % zu 12,5 % PAA) getrennt. Die IpBN-Streifen wurden ausgeschnitten, in 2D-Äquilibriumspuffer inkubiert und in einer 12 % PAA SDS-PAGE denaturierend aufgetrennt. Die separierten Proteine wurden auf Nitrocellulose übertragen. Nach Blockieren der Membran wurden diese mit α-Cc-FCP oder α-Cm-FCP Antikörper beprobt. Nach Inkubation in sekundärem HRP-Antikörper erfolgte die Detektion der Immunreaktion mit ECL und Röntgenfilm. Als Größenstandard diente der Pierce™ Prestained MW Marker.

Anhang



Anhang 5: Western Blot der 2D-PAGE von lpBN-separierten Thylakoidmembranen aus *C. meneghiniana* und Immunodetektion mittels Phospho-Serin sowie Lhcx6_1 spezifischer Antikörper.

Thylakoide entsprechend 20 µg Chla einer 10-Tage alten *C. meneghiniana* Schwachlicht-Kultur wurden isoliert, mit 0,75 % (w/v) alpha-DDM solubilisiert und mittels lpBN-PAGE (3,5 % zu 12,5 % PAA) getrennt. Die lpBN-Streifen wurden ausgeschnitten, in 2D-Äquilibriumspuffer inkubiert und in einer 12 % PAA SDS-PAGE denaturierend aufgetrennt. Die separierten Proteine wurden auf Nitrocellulose übertragen. Nach Blockieren der Membran wurden diese mit Phospho-Serin- oder Lhcx6_1-spezifischem Antikörper beprobt. Nach Inkubation in sekundärem HRP-Antikörper erfolgte die Detektion der Immunreaktion mit ECL und Röntgenfilm. Als Größenstandard diente der Pierce™ Prestained MW Marker.

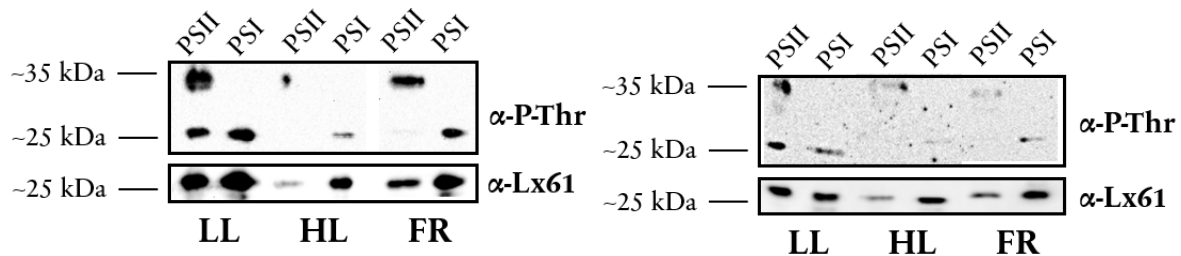


Anhang 6: Western Blot von Saccharosedichtegradienten Fraktionen aus *C. meneghiniana* und Immunodetektion mittels Phospho-Serin Antikörper durch J. Sattler (2021).

Thylakoide entsprechend 10 µg Chla von Fraktionen eines Saccharosedichtegradienten einer 10-Tage alten *C. meneghiniana* Schwachlicht-, Starklicht- und Fernrot-Kultur wurden in einer 12 % PAA SDS-PAGE denaturierend aufgetrennt. Die separierten Proteine wurden auf Nitrocellulose übertragen. Nach Blockieren der Membran wurden diese

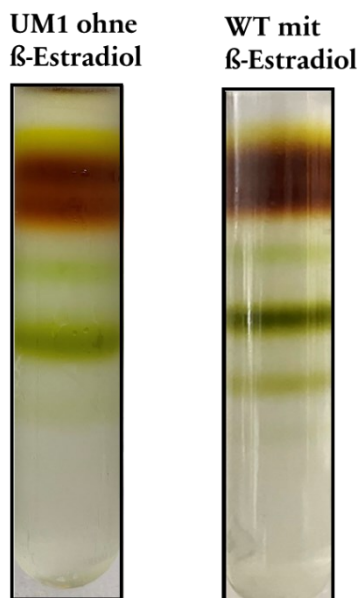
Anhang

mit Phospho-Serin-spezifischem Antikörper beprobt. Nach Inkubation in sekundärem HRP-Antikörper erfolgte die Detektion der Immunreaktion mit ECL und Röntgenfilm. Als Größenstandard diente der Pierce™ Prestained MW Marker. **LL** = Schwachlicht; **HL** = Starklicht; **FR** = Fernrotlicht.



Anhang 7: Western Blot der 2D-PAGE von aufgereinigten PSI- und PSII-Proben aus *C. meneghiniana* unter Schwach- Stark- und Fernrot-Anzucht und Immunodetektion mittels verschiedener Antikörper.

Thylakoide einer 10-Tage alten *C. meneghiniana* Schwachlicht-, Starklicht- und Fernrotlicht-Kultur wurden isoliert, mit 0,75 % (w/v) alpha-DDM solubilisiert und mittels Saccharosedichtegradienten getrennt. Im Anschluss erfolgte eine weitere Auftrennung von je 1,25 μ g Chla PSII und PSI-Fraktion des Gradienten mittels IpBN-PAGE (3,5 % zu 12,5 % PAA). Die IpBN-PAGE Proben des PSII und PSI wurden ausgeschnitten, in 2D-Äquilibriumspuffer inkubiert und in einer denaturierenden PAGE aufgetrennt. Die separierten Proteine wurden auf Nitrocellulose übertragen. Nach Blockieren der Membran wurden diese mit spezifischem Antikörper beprobt. Nach Inkubation in sekundärem HRP-Antikörper erfolgte die Detektion der Immunreaktion mit ECL und Röntgenfilm oder INTAS-Imager. Als Größenstandard diente der Pierce™ Prestained MW Marker. **LL** = Schwachlicht; **HL** = Starklicht; **FR** = Fernrotlicht. Western Blot einer 12 % PAA SDS-PAGE und Proteinnachweis mit Phospho-Threonin- und Lhcx6_1-Antikörper.



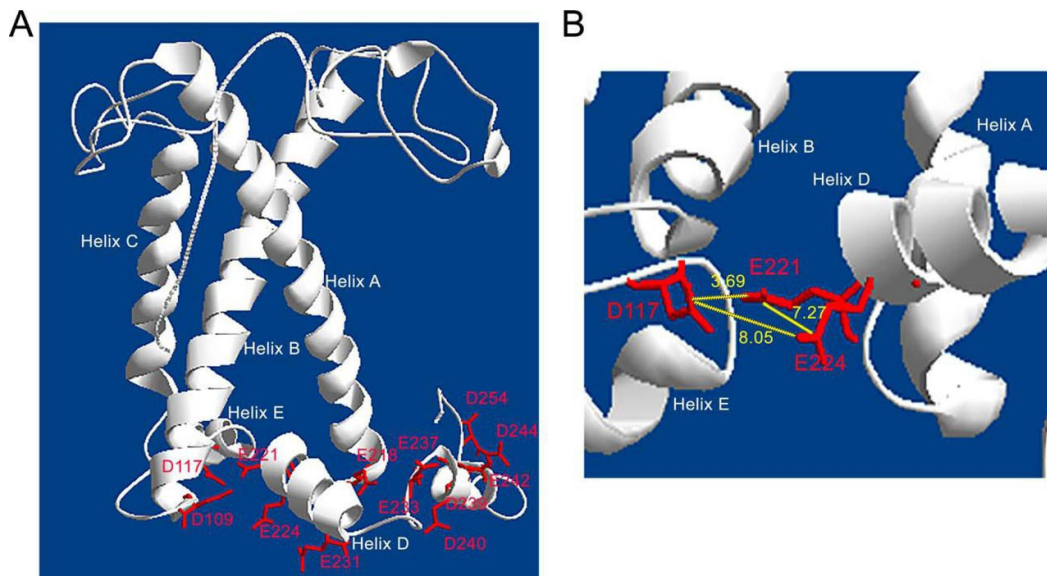
Anhang 8: Untersuchung solubilisierter Thylakoidmembran-Proteinkomplexe des Wildtypen und der UM1-Mutante. UM1 ohne β -Estradiol-Zugabe und Wildtyp mit β -Estradiol-Zugabe.

Thylakoide entsprechend 125 μ g Chla einer 10-Tage alten *C. meneghiniana* Wildtyp oder UM1-Kultur mit oder ohne β -Estradiol wurden isoliert, mit 0,75 % (w/v) alpha-DDM solubilisiert und durch Zentrifugation auf Saccharosedichtegradienten getrennt.

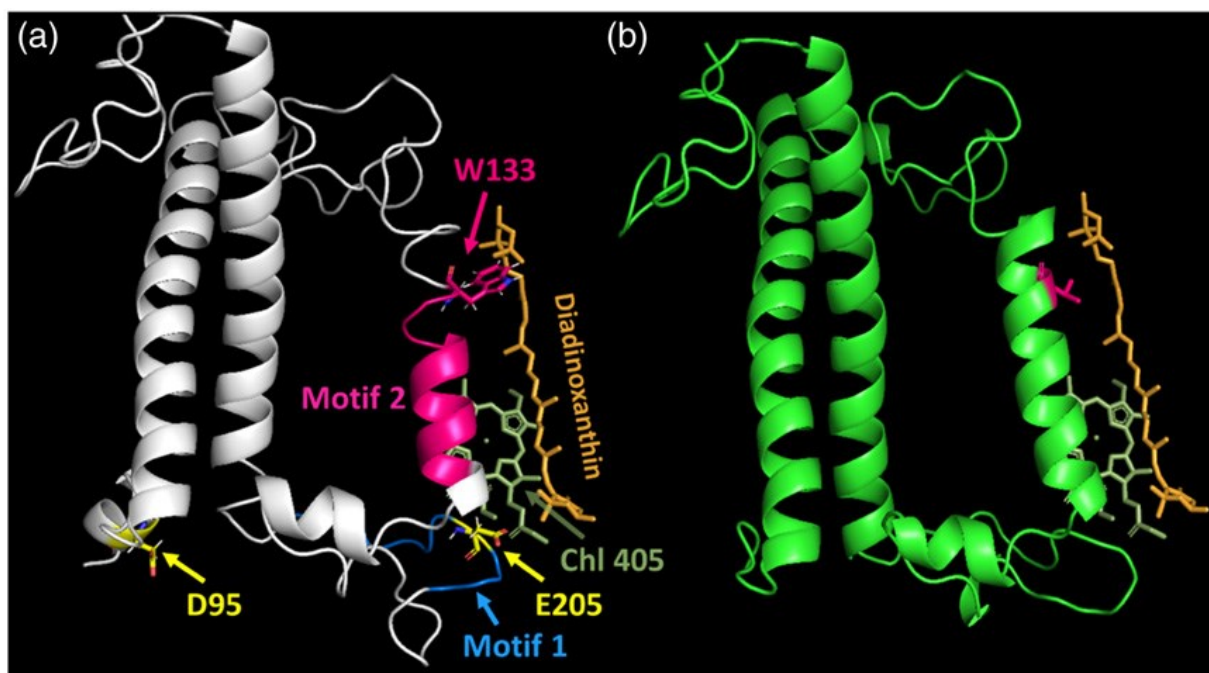
Anhang

Anhang 9: Clustal-Sequenz-Alignment der *A. thaliana* CP24, CP26 und CP29.1 Proteine mit dem sequenzierten Lhcx6_1 aus *C. meneghiniana* zur Veranschaulichung der N-terminalen Sequenz.

cp24at	MAMAVSGAVLSGLGSSFLTGGKRG--TALASGVGTGAQVRVGRKTLIVAAAAAQPKKSWI	58
lx61cm	MKLAILSTLLAT-ASAFAP-AQQGPSITALAAT RAV-AKAAPKKEAAPKKAAAAPKKA-	56
	* :*: .::*: .:* * .::* ***** . . *: . :* *** **:	
cp24at	PAVKGGGNFLDPEWLDGSLPGDFGDFPLGLG--KDPAPFLKWYREAEIHRWAMAALVGI	116
lx61cm	-AVKK-PAAQAPPGLV GALPPVGFDPAGFAAKASPQELARYREVEIMHGRFAQLAVLGF	114
	*** * * *:* ** *** *:. .* * ***. *:***:* *****:	
cp24at	FVQAWSGVAWFEGAQPDAIAPF-----SFGS-LLGTQLLLMGWVESKRWVDF--	165
lx61cm	I IPEKCA YDGSFG----DDFLAPTGRALEVNTDPLWLGLTLAVISALETVRLIETEPGT	170
	:: : : . * * :** . . ** * :. :*: * ::	
cp24at	--NPDSQSVEWATPWSKTAENFANYTGDQGYPGGRFFDPLGLAGKNRDGVYEPDFEKLER	223
lx61cm	RTDAKIEGLGWRP---KTESEYINYQ-----	193
	: . :. : * ** .: : **	
cp24at	LKLAEIKHSRLAMVAMLIIFYFEAGQG---KTPL---GALGL---	258
lx61cm	--VRELQQGR LAMLAF---AGEVAQELVNDKPLL VNLQDSGFVSW	233
	: *:::.*****:* *..* ..** *:	
cp26at	MASLGVSEMLGTPLNFRAVSRSSAPLASSPSTFKT-----VAL-FSKKKPAPAKSKAVSE	54
lx61cm	MKLAILSTLLATASAF-----APAQQGPSITALAAT RAVAKAAPKKEAAPKKA AAAPK	53
	* :* :*. * * ** ..** ** **: ** * : . :	
cp26at	TSDELAKWYGPDRRIFLPDGLDDRSEIPEYLNGEVA--GDYGYDPFGLGKKPENFAKYQA	112
lx61cm	KAAAVK--KP--AAQAPPG -----LVGALPPVGFDPAGFAAKASPQELARYRE	98
	.: : * * * * : * :. * . .*:*:*:*::	
cp26at	FELIHARWAMLGAAGFIIPEALNKYGANCGPEAVWFKTGALLLDGNTLNYFGKN-IPINL	171
lx61cm	VEIMHGRFAQLAVLGFIIPEKCA YDGS-FGDDF-----LAPTGRALEVNTDPLWLGL	150
	.*:*:*: *.. ***** *: * : * * :*: * :. : . *	
cp26at	VLA VVAEVLLGGA EYRITNGLDFEDKLHPGGPFDPGLGLAKDP-EQGALLKVK EIKNGR	230
lx61cm	TLAVISALET---VRLIETEPGTR-----TDAKIEGLGWRPKTESEYINYQVRELQQGR	201
	.***: : . . * . . :. : ** . . : :*:*:*:**	
cp26at	LAMFAMLGFFIQAYVTGEGPVENLAKHLSDPFGNNLLTVIAGTAERAPTL	280
lx61cm	LAMLAFAGEVAQELVNDKPLL VNLQDSGFVSW-----	233
	***:*: * . * *..: : ** . :	
lx61cm	MKLAILSTLLATASAFAPAQQGPSITALAAT RAVAKAAPKKEAAPKKA AAAP-KKAAAVK	59
cp29.1at	--MAATSAAAAASSIMGTRVAPGIHPGSGRFTAVFGFGKKAAPKKS AKKT VTTDRPLW	58
	:* * : *:*: :. :.* . . :. . **:*:*:*:* . . :	
lx61cm	KPAAQA PPGLV GALPPVGFDPAG-----	83
cp29.1at	YPGAISP DWLDGSLVGDYGFDPFGLGKPAEYLQFDIDSLDQNLAKNLAGDVIGTRTEAAD	118
	*. * : * * *:* *** *	
lx61cm	-----FAAKASPQELARYREVEIMHGRFAQLAVLGFIIPEKCA---YDGS-----FGDD	129
cp29.1at	AKSTPFQPYSEVFGIQRFRECELIHRWAMLATLGALSVEWLTGVTWQDAGKVELVDGSS	178
	* . : *:* * *:*:* * **.* : * : :. : *	
lx61cm	FLAPTGRALEVNTDPLWLGLTLAVISALETVRLIETEPGTR--T-DAKIEGLGWRPKTE	186
cp29.1at	Y---LGQPLPFSISTLIWIEVLV--IGYIEFQRNAELDSEKRLYPGGKFFDPLGLAAD-P	232
	: * : * . : :*: : : * . : * * : . * . : : ** .	
lx61cm	SEYINYQVRELQQGR LAMLAFAGEVAQELVNDKPLL VNLQDSGFVSW-----	233
cp29.1at	EKTAQLQLAEIKHARLAMVAVLGFVQAAATGKGP-----LNNWATHLSDPLHTTII	284
	.: : * : *:::.*****:* * ..* ..* : . *	
lx61cm	-----	233
cp29.1at	DTFSSS	290



Anhang 12: Strukturmodell des LhcSR3 und protonierbare Aminosäuren aus Ballottari *et al.* (2016).
 A: Strukturmodell des LhcSR3 aus *C. reinhardtii*. B: Abstand [Å] der nachweislich protonierbaren und für NPQ essenziellen Aminosäuren in gelb dargestellt. D = Asparaginsäure, E = Glutaminsäure.



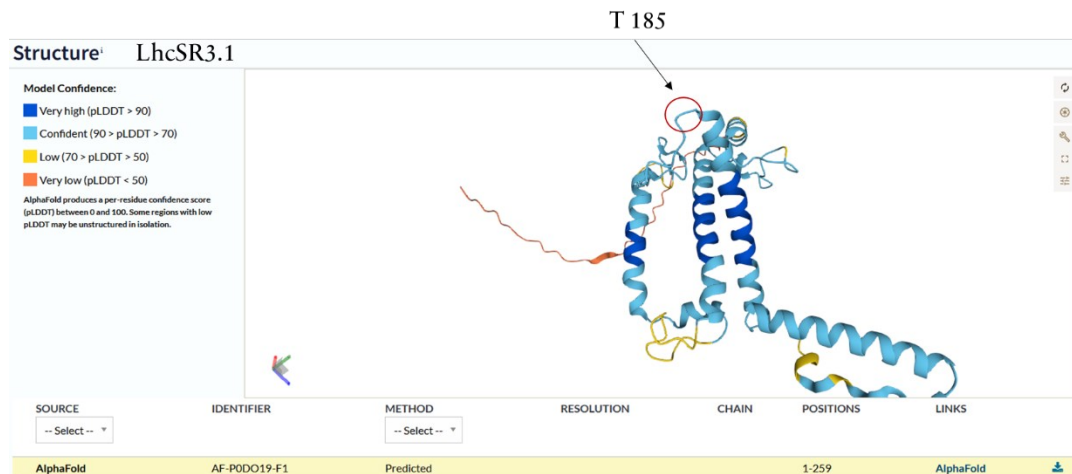
Anhang 13 A: Strukturmodell des LhcX1 aus *P. tricornutum* und Vergleich zu LhcF4 des Organismus aus Buck *et al.* (2021).
 (a) Strukturmodell des LhcX1 mit der nachweislich nicht am NPQ beteiligten Aminosäuren D 95 und E 205. Motif 2 beinhaltet das W 133, welches NPQ relevant ist. D = Asparaginsäure, E = Glutaminsäure, W = Tryptophan. (b) Struktur LhcF4 nach Wang *et al.* (2019).

Anhang

Anhang 14 A: Clustal-Sequenz-Alignment verschiedener LI818-Kandidaten.

Das *C. meneghiniana* Lhcx6_1, *P. tricorutum* Lhc3 und die LhcSR1 und-3 Proteine aus *C. reinhardtii* wurden in ihrer Sequenz miteinander verglichen und das konservierte Threonin T 185 rot unterlegt.

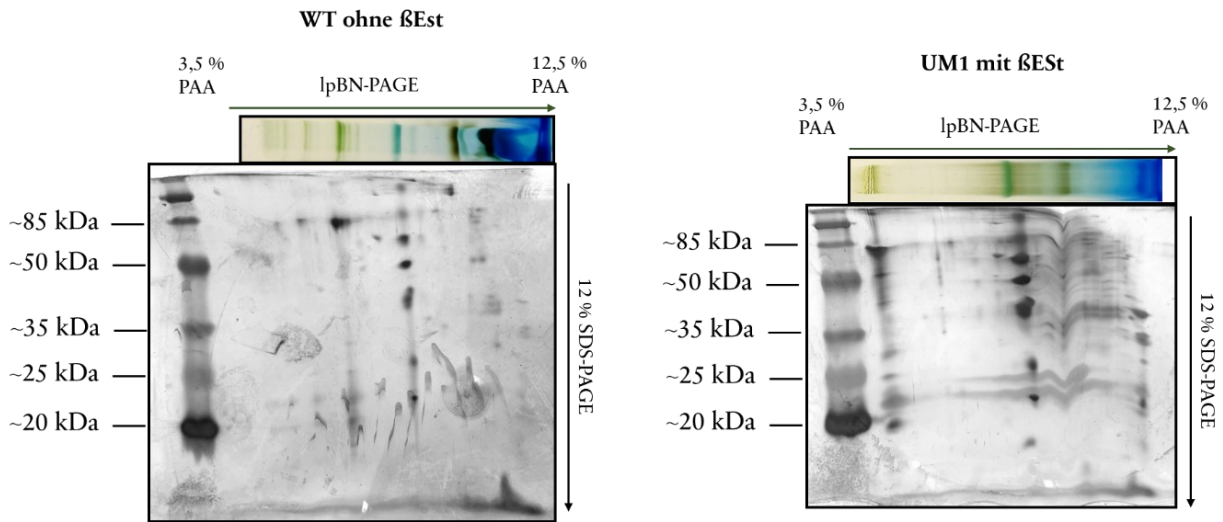
lhcx6_1	MKLAILSTLLATASAFAP--AQQGPSITALAATRAVAKAAPKKEAAPKAAAAAPKAAAV	58
lhc3pt	-----MKCIAATALLATTA---SAFNA-----FGA-----A---KKAAPKK----	30
lhcsr1	--M---AMMMRKAAA-VPASSRRSVAVNSVSGKRTVSGK-----A---GAPVPED----	41
lhcsr3	MLA---NVVSRKASGLRQTPARATVAVKSVSGRRTAAE-----PQTAAPVAED-----	47
	* . : : : : . . .	
lhcx6_1	KKPAAQAPPGLV GAL-PPVGFDPAGFAAKAS PQELARYREVEIMHGRFAQLAVLGF IIP	117
lhc3pt	--PV-FSIETIPGALAP-VGIFDPLGFAAKADESTLKRYREAE LTHGRVAMLATVGF LVG	86
lhcsr1	--VL-AYAKTLPGV TAPFDNFDPAGFLATASVKDVRRWRESE ITHGRVAMLAALGF IVG	98
lhcsr3	--VF-AYTKNLPGV TAPFEGVDFPAGFLATASIKDVRRWRESE ITHGRVAMLAALGF VVG	104
	: * . * . . * * * * * . * . . : * : * * * * : * * * . * * * . * * : * : :	
lhcx6_1	EKCAYDGSFGDDFLAPTGRALEV F--NTDPLWLGLT LAVISALETVRLI-E-----	165
lhc3pt	EAVEGSS--FLFDASIKGPAISHLAQVPTPFVWLLTIFIGAA-EQTRAVIGWRDPSDVPF	143
lhcsr1	EQLQDFPLFFNFDRVSGPAIYHFQQIGQGFWEPLLI AIGVA-ESYRVAVGWATPTGTGF	157
lhcsr3	EQLQDFPLFFNWDGRVSGPAIYHFQQIGQGFWEPLLI AIGVA-ESYRVAVGWATPTGTGF	163
	* . * * : : : * * * : : * * *	
lhcx6_1	-----TEPGTRTDAKIEGLGWRPKT ESEYINYQVRELQQRLAMLAFAGEVAQELVNDK	219
lhc3pt	DKPGLLNEDYTPGDIGFDPLGLKPT DAEELRVLQTKELQNGRLAMLAAAGFMAQELVDGK	203
lhcsr1	N---SLKDDYEPGDLGFDPLGLKPT DPEELKTLQTKELNNGRLAMIAIAAFVAQELVEQT	214
lhcsr3	N---SLKDDYEPGDLGFDPLGLKPT DPEELKVMQTKELNNGRLAMIAIAAFVAQELVEQT	220
	: : * : : * * : * . * * * . : * : * * * : * * * * * : * * . : * * * * : .	
lhcx6_1	PLLVLNQDS----GFVSW-----	233
lhc3pt	GILEHLL-----	210
lhcsr1	EIFEHLVLRFEKEVILELEDVERDLGLPLTLPDNLKAI	253
lhcsr3	EIFEHLALRFEKEAILELDDIERDLGLPVTPLPDNLKSL	259
	: : : *	



Anhang 14 B: AlphaFold Modell des LhcSR3.1 aus *C. reinhardtii* und Lokalisation des T 185.

Die modellierte Sequenz wurde der Vorhersage durch AlphaFold auf www.uniprot.org entnommen und die Lokalisation des Threonin T 185 markiert.

Anhang



Anhang 15: Silberfärbung 2D-PAGE von IpBN-separierten Thylakoidmembranen aus *C. meneghiniana* Wildtypen und der UM1-Mutante mit *Lhcx6_1* Knockdown Induktion.

Thylakoide entsprechend 10 µg Chla einer 10-Tage alten *C. meneghiniana* Wildtyp- und UM1-Schwachlicht-Kultur wurden isoliert, mit 0,75 % (w/v) alpha-DDM solubilisiert und mittels IpBN-PAGE (3,5 % zu 12,5 % PAA) getrennt. Die IpBN-Streifen wurden ausgeschnitten, in 2D-Äquilibriumspuffer inkubiert und in einer 12 % PAA SDS-PAGE denaturierend aufgetrennt. Die Proteine wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Als Größenstandard diente der Pierce™ Prestained MW Marker.