

Vergleichende Analyse von Lichtschutzmechanismen in 6 verschiedenen Repräsentanten der Archaeplastida

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Maria Rosmarie Handrich
aus Riesa

Düsseldorf, Mai 2020

aus dem Institut für Molekulare Evolution
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. PD Dr. Sven Gould

2. Prof. Dr. William Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 17.09.2020

Publikationen:

Knopp M, Garg SG, **Handrich M**, Gould SB (2020) Major changes in plastid protein import and the origin of the chloroplastida. *iScience*. 23(3):100896.

Gould SB, Garg SG, **Handrich M**, Nelson-Sathi S, Gruenheit N, Tielens AGM, Martin WF (2019) Adaptation to life on land at high O₂ via transition from ferredoxin-to NADH-dependent redox balance. *Proc Biol Sci*. 286(1909):20191491.

Handrich MR, Garg SG, Sommerville EW, Hirt RP, Gould SB (2019) Characterization of the BspA and Pmp protein family of trichomonads. *Parasit Vectors*. 12(1):406.

Dreyer I, Spitz O, Kanonenberg K, Montag K, **Handrich MR**, Ahmad S, Schott-Verdugo S, Navarro-Retamal C, Rubio-Meléndez ME, Gomez-Porras JL et al. (2019) Nutrient exchange in arbuscular mycorrhizal symbiosis from a thermodynamic point of view. *New Phytol*. 222(2):1043-53.

Handrich M, de Vries J, Gould SB, Serôdio J, Christa G (2017) Ulvophyceae photophysiology and research opportunities. *PiP*. 4(2):83-92.

Tagungsbeiträge:

Handrich MR, Fürst-Jansen JR, Jarquín-Cordero M, Nickelsen J, Gould SB (2019) Unravelling the functional evolution of the FtsH protease complex in algae. *International Plant Science Conference*. Rostock, Deutschland. Posterpräsentation.

Handrich M (2017) Identification of actin-associated proteins in *Trichomonas vaginalis* in light of early eukaryotic evolution and phagocytosis. *EMBO – Anaerobic protists: Integrating parasitology with mucosal microbiota and immunology*. Newcastle, Vereinigtes Königreich. Orale Präsentation.

Handrich M (2016) Comparative analysis of the response to high light throughout plastid evolution. *International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis (ICES)*. Kyoto, Japan. Orale Präsentation.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Abstract	2
3. Einleitung.....	3
3.1 <i>Endosymbiotischer Ursprung und Evolution der Archaeplastida.....</i>	3
3.2 <i>Mechanismen der Lichtabsorption und oxydativen Photosynthese.....</i>	5
3.3 <i>Lichtstress und Photoprotektion.....</i>	9
3.3.1 Photoinhibition und Funktion des FtsH-Protease Komplexes	13
3.4 <i>Evolution der LHC Superfamilie</i>	15
3.5 <i>Ziele der Dissertation</i>	19
4. Material & Methoden	21
4.1 <i>Material</i>	21
4.1.1 Medien und Chemikalien	21
4.1.2 Kits	24
4.1.3 Geräte	25
4.1.4 Organismen	26
4.1.4.1 Chlamydomonas reinhardtii FtsH-Überexpressionslinien	26
4.2 <i>Methoden</i>	27
4.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	27
4.2.1.1 Kultivierung	27
4.2.1.2 RNA Isolation & DNase Behandlung	27
4.2.1.3 Photometrische Messungen.....	28
4.2.1.4 Transelektronenmikroskopie.....	29
4.2.1.5 HPLC.....	30
4.2.2 Bioinformatische Methoden.....	30
4.2.2.1 Qualitätskontrolle und Säuberung der RNA-Rohsequenzen	30
4.2.2.2 De novo Rekonstruktion und Quantifizierung.....	31
4.2.2.3 Annotierung und funktionale Analysen	31
5. Ergebnisse.....	33
5.1 <i>Analyse von Lichtstressreaktionen innerhalb der Archaeplastida</i>	33
5.1.1 Vertreter der Chloroplastida zeigten eine erhöhte PSII Effizienz sowie NPQ Kapazität.....	35
5.1.2 Vertreter der Chloroplastida zeigten eine Licht-induzierte Auflösung ihrer Thylakoidstruktur ...	36
5.1.3 Analyse von Licht-abhängigen Veränderungen der Pigmentkomposition	38
5.2 <i>Analyse von Lichtstressreaktionen auf transkriptioneller Ebene</i>	40
5.2.1 Vertreter der Chloroplastida zeigten spezifische Starklicht-induzierte Expressionsmuster	42
5.2.2 Funktionale Einordnung differenziell exprimierter Gene.....	44
5.2.3 Vertreter der Chloroplastida zeigten eine erhöhte Starklicht-regulierte Expression.....	46
5.2.4 Analyse von Starklicht-induzierten biologischen Prozessen.....	49
5.3 <i>Analyse von C. reinhardtii FtsH-Überexpressionsmutanten</i>	53
5.3.1 FtsH-Überexpressionslinien zeigten keine morphologischen Veränderungen der Thylakoidorganisation	53
5.3.2 Einfluss von Starklicht auf die Pigmentkomposition der FtsH-Überexpressionslinien	55
5.3.3 Vaucheria-Überexpressionsmutanten zeigten eine deutlich geringere PSII Effizienz.....	56
5.3.4 Vaucheria-Überexpressionslinie wies eine veränderte NPQ Kapazität auf	57

6.	Diskussion.....	60
6.1	<i>Die Evolution von LHC-Komplexen implizierte komplexe NPQ Mechanismen</i>	60
6.2	<i>Einfluss von endosymbiotischen Gentransfer auf die Anzahl differenziell exprimierter nuklearer Gene.....</i>	62
6.2.1	<i>Identifikation des Sepx2 aus C. paradoxa mit putativer Funktion als pH-Sensor.....</i>	63
6.3	<i>Vertreter der Chloroplastida zeigten diverse Starklicht-aktivierte zelluläre Prozesse.....</i>	64
6.4	<i>Überexpression der V. litorea FtsH Protease hat Einfluss auf die Organisation der Photosysteme in C. reinhardtii</i>	73
6.4.1	<i>Die FtsH Protease zeigt eine hohe strukturelle und funktionale Konservierung</i>	75
6.5	<i>Erkenntnisse dieser Arbeit.....</i>	77
6.6	<i>Ausblick.....</i>	78
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	79
8.	Anhang	82
9.	Literaturverzeichnis	83

1. Zusammenfassung

Lichtenergie ist für nahezu jeden existierenden Organismus von essentieller Bedeutung. Sie ist die treibende Kraft der Photosynthese und damit Quelle allen aeroben Lebens auf unserem Planeten. Gleichzeitig ging mit dem Aufkommen der oxidativen Photosynthese die Produktion schädlicher Sauerstoffverbindungen einher. Eine übermäßige Lichtabsorption durch die Photosysteme, insbesondere des Photosystem II (PSII), führt zu einer Übersättigung des photosynthetischen Apparats und der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche zu irreversiblen Zellschäden führen können. Aufgrund sich ständig ändernder Umweltbedingungen, welche sich vor allem durch die Besiedlung von terrestrischen Gebieten durch erhöhte Schwankungen der Lichtintensität auszeichnen, haben photosynthetisch aktive Organismen verschiedene Mechanismen entwickelt, welche einen effektiven Ausgleich zwischen Energieaufnahme und -abgabe gewährleisten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine umfassende und vergleichende Analyse der Lichtstressantwort in sechs unterschiedlichen Algenspezies durchgeführt, welche verschiedene Stufen der plastidären Evolution repräsentieren. Zusätzlich wurden *C. reinhardtii* Überexpressionsmutanten mit einer plastidären Expression der FtsH Protease untersucht, welche eine fundamentale Rolle bei der Reparatur des PS II spielt. Mithilfe (photo)physiologischer Untersuchungen der photosynthetischen Prozesse und strukturellen Organisation der Thylakoidmembran sowie bioinformatischer Analysen von RNA Sequenzierungsdaten konnte ein Einblick in die Evolution photoprotektiver Mechanismen gewonnen werden. Während die Glaukophyte sowie die primäre und sekundäre Rotalge annähernd keine Reaktion auf die verwendeten Starklichtbedingungen zeigten, waren in den Vertretern der Chloroplastida weitreichende zelluläre Veränderungen zu erkennen. Neben einer Modifikation der photosynthetischen Komplexe zeigte sich unter exzessiver Lichteinstrahlung insbesondere in der sekundären Grünalge eine gesteigerte Aktivität verschiedener metabolischer Prozesse, welche vermutlich den Verlust der photosynthetischen ATP Produktion komplementieren. Weiterhin konnte ein Einfluss der FtsH Protease auf die Organisation der Photosysteme in *C. reinhardtii* Klonen festgestellt werden, welche eine plastidäre Expression des *V. litorea ftsH* aufwiesen. Gleichzeitig deutet eine vergleichbare Turnover-Rate des D1 Proteins in diesen Mutanten auf eine hohe funktionale Konservierung dieser Protease hin. Zusammengefasst unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit die Bedeutung von photoprotektiven Mechanismen insbesondere für die Evolution der Chloroplastida.

2. Abstract

Light energy is essential for almost every existing organism. It is the driving force of photosynthesis and thus the energetic foundation upon which all aerobic life rests. Concomitant with the emergence of oxidative photosynthesis was the production of harmful oxygen molecules. Excessive light absorption by the photosystems, especially photosystem II (PSII), leads to an oversaturation of the photosynthetic apparatus and the production of reactive oxygen species (ROS), which can cause irreversible cellular damage. Due to constantly changing environmental conditions – which in particular after the colonization of land are characterized by increased fluctuations in light intensity – photosynthetically active organisms have developed various mechanisms that secure an effective balance between energy absorption and dissipation.

In this thesis, a comprehensive and comparative analysis of light stress reactions in six algal species representing different major lineages of plastid evolution was performed. Additionally, *C. reinhardtii* overexpression mutants were analyzed that express a plastidal and additional copy of the D1 FtsH protease, which plays a fundamental role in PS II repair. (Photo)physiological investigations of photosynthetic processes and structural organizations of thylakoid membranes as well as bioinformatic analyses of RNA-Seq datasets provided insights into the evolution of photoprotective mechanisms. While the glaucophyte, as well as the primary and secondary red algae, showed almost no reaction to the high light conditions used, the representatives of the Chloroplastida showed extensive cellular changes. In addition to modifications of photosynthetic complexes, an increased activity of various metabolic processes was observed under excessive light exposure, especially in the secondary green algae *B. natans*, which probably complement the loss of photosynthetic ATP production. Furthermore, an influence of the FtsH protease on the organization of the photosystems in *C. reinhardtii* clones showing a plastidal expression of the *V. litorea ftsh* was detected. At the same time, a comparable turnover rate of the D1 protein in these mutants indicate a high functional conservation of this protease. In summary, the results of our work sheds light on the importance of photoprotective mechanisms especially for the evolution of the Chloroplastida.

3. Einleitung

3.1 Endosymbiotischer Ursprung und Evolution der Archaeplastida

Die Entstehung der oxidativen Photosynthese vor mehr als 2,5 Mrd. Jahren (Buick, 2008; Fischer et al., 2016) stellte ein Schlüsselereignis in der Evolution dar und hatte einen erheblichen Einfluss auf die weitere erdgeschichtliche Entwicklung. Der drastische Anstieg von Sauerstoff in der Erdatmosphäre (Bekker et al., 2004; Papineau et al., 2007) war die Basis für die Evolution von aeroben Organismen mit neuen biosynthetischen Möglichkeiten und ebnete den Weg für die Entstehung der heutigen globalen Vielfalt von Flora und Fauna (Nelson, 2011). Der Ursprung komplexer Lebewesen liegt bei einem endosymbiotischen Ereignis vor etwa 1,8 Mrd. Jahren (Knoll, 1992; Knoll et al., 2006). Die Aufnahme eines α -Proteobakteriums durch einen archaeellen Wirt stellte die Quelle eukaryotischen Lebens dar (Martin & Müller, 1998; Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017). Damit einher kam im Laufe der Evolution die Reduktion des einst freilebenden Bakteriums zu dem heutigen Mitochondrium, Zellkompartimentierung und Vielzelligkeit (Martin et al., 2015). Eine zweite Endosymbiose, bei welcher vor mehr als 1,2 Mrd. Jahren ein ursprüngliches Cyanobakterium von einem eukaryotischen Wirt aufgenommen wurde, markiert den Ursprung von photosynthetisch aktiven Eukaryoten (Gray, 1992; Gould et al., 2008; Parfrey et al., 2011) und damit aller heute existierenden Landpflanzen, welche unseren Planeten maßgeblich formten. Diese primäre, plastidäre Endosymbiose führte zu der Entstehung der Archaeplastida, welche sich in drei unterschiedliche Linien klassifizieren lässt: die (1) Glaukophyta, (2) Rhodophyta (Rotalgen) sowie (3) Chloroplastida (Grünalgen) (Abb. 3.1) (Adl et al., 2019).

Während die Glaukophyten allerdings nie über das Stadium der einzelligen Algen hinausgekommen sind, entwickelten sich aus den Rot- und Grünalgen mehrzellige Organismen, wobei die Vertreter der Chloroplastida, genauer eine streptophyte Alge (Becker & Marin, 2009; de Vries et al., 2016) den Übergang zum terrestrischen Leben bewerkstelligten. Neben den primären Linien der Archaeplastida, deren Plastiden sich durch den Besitz von zwei Membranen auszeichnen (Cavalier-Smith, 2000), führten weitere sekundäre Endosymbiosen spezieller Rot- sowie Grünalgen (Gibbs, 1981; McFadden, 2002) zur Entstehung komplexer Plastiden mit drei oder mehr Membranen (Cavalier-Smith, 2003; Gould et al., 2008). Ein besonderes Beispiel stellen hierbei die Cryptophyta der roten und Chlorarachniophyta der grünen Linie dar, welche weiterhin Relikte des ursprünglichen Zellkerns der aufgenommenen Alge besitzen (Abb. 3.1) (Cavalier-Smith, 2002; Curtis et al., 2012).

In jedem Fall führte jedoch die Reduktion des einstigen autonomen Cyanobakteriums zu den heutigen Plastiden zu einem weitreichenden Verlust von prokaryotischem Genmaterial (Weeden, 1981; Martin et al., 1998). In Laufe der Evolution sind etwa 95% der ursprünglichen Genomkapazität verloren gegangen oder wurden durch den Prozess des endosymbiotischen Gentransfers (EGT) in das Kerngenom des Wirts integriert (Martin & Herrmann, 1998; Timmis et al., 2004). Dies hat zur Folge, dass Proteine des plastidären Metabolismus im Cytosol des Wirts synthetisiert und demzufolge reimportiert werden. Ermöglicht wird dies durch die spezifischen Protein-Import Maschinerien TIC und TOC, welche an der Plastidenmembran lokalisiert sind (Soll & Schleiff, 2004; Garg & Gould, 2016). Hierdurch konnten trotz des erheblichen Verlustes von plastidärem Genmaterial die essentiellen Funktionen der Plastiden erhalten bleiben. Allerdings bedingte der Prozess des Gentransfers zusätzlich die Notwendigkeit einer inter-organellen Kommunikation.

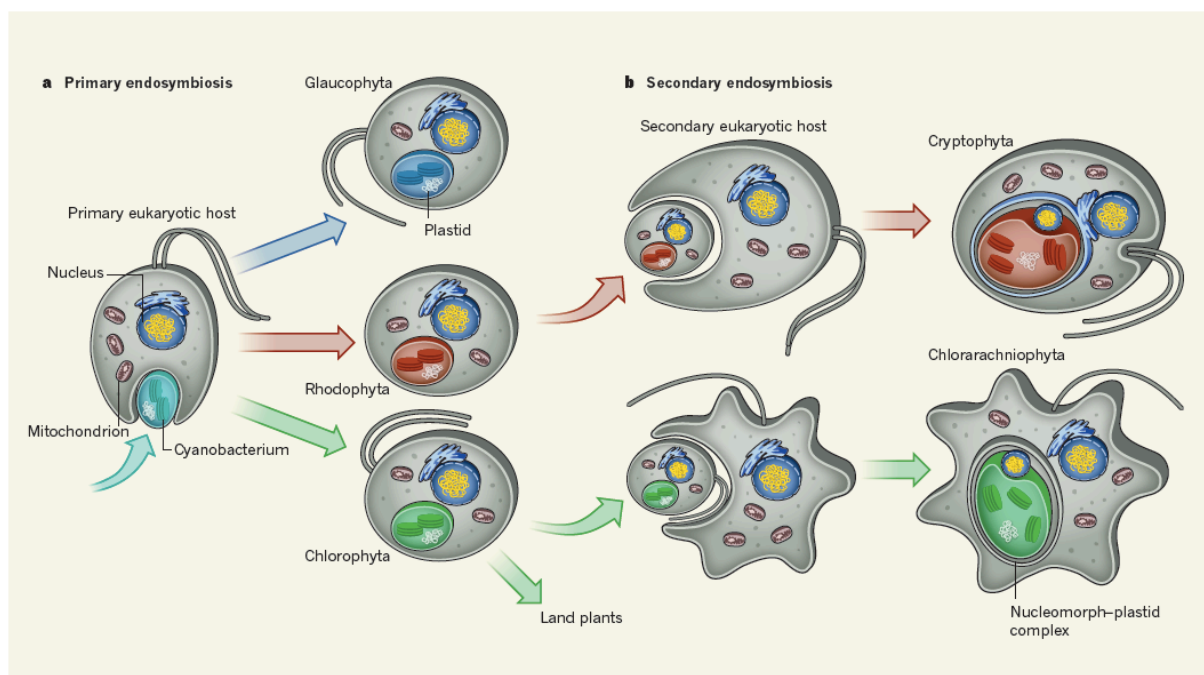


Abbildung 3.1: Evolution photosynthetischer Eukaryoten. (a) Der Ursprung aller photosynthetisch aktiver Eukaryoten liegt bei einem primären endosymbiotischen Ereignis, bei welchem ein ursprüngliches Cyanobakterium durch einen heterotrophen, eukaryotischen Wirt aufgenommen wurde. Dadurch entstanden die drei primären Linien der Archaeplastida: die (1) Glaucophyta, (2) Rhodophyta und (3) Chloroplastida, wobei sich aus den Vertretern der grünen Linie die heutigen Landpflanzen entwickelten. (b) Weitere sekundäre Endosymbiosen von Rot- und Grünalgen durch nicht-photosynthetische Eukaryoten führten zu der Entstehung komplexer Plastiden innerhalb der Cryptophyta und Chlorarachniophyta, welche sich durch den Besitz eines Nucleomorphs auszeichnen, einem Relikt des Zellkerns der ursprünglichen Alge (Gould, 2012).

Durch retrograden Signaltransfer vom Plastiden zum Zellkern wird eine Regulation der nuklearen Expression plastidärer Gene gewährleistet (Nott et al., 2006; Chan et al., 2016). Trotz des massiven Verlustes von plastidärem Genmaterial haben fast alle Plastiden eine gewisse Genomkapazität bewahrt. Insbesondere Gene der photosynthetischen Elektronentransportkette und der Proteinbiosynthese sind weiterhin Bestandteil des Plastidengenoms (Martin & Herrmann, 1998; Green, 2011). Ursache hierfür liegt laut der CORR-Hypothese bei der Notwendigkeit einer direkten Regulation dieser Gene als Reaktion auf bestimmte Umweltreize (Allen, 1993; Allen, 2003a). Die plastidäre Kodierung ermöglicht eine Transkriptionskontrolle, welche direkt durch das Redoxpotential des entsprechenden Produkts bestimmt wird (Allen, 1993; Pfannschmidt et al., 1999) und lässt somit eine unmittelbare Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen zu, was gegenüber der Kodierung im Kern einen erheblichen Vorteil darstellt (Allen, 2015). Obwohl alle photosynthetischen Eukaryoten ein vergleichbares Grundsortiment an Plastiden-kodierten Genen aufweisen, zeigen die Genomkapazitäten der verschiedenen Plastiden dennoch eine gewisse Varianz (Martin & Herrmann, 1998). Insbesondere Rotalgen zeichnen sich mit bis zu 200 Protein-kodierenden Genen durch eine deutlich höhere Plastidkapazität aus (Timmis et al., 2004; Green, 2011).

3.2 Mechanismen der Lichtabsorption und oxydativen Photosynthese

Die essentiellen photochemischen Prozesse der Photosynthese, welche die Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie ermöglichen, erfolgen an der Thylakoidmembran der Plastiden, wo die verschiedenen Multi-Proteinkomplexe des photosynthetischen Apparats lokalisiert sind (Abb. 3.2) (Nelson & Ben-Shem, 2004). Neben dem Photosystem II (PSII) (Berthold et al., 1981) und Photosystem I (PSI) (Bengis & Nelson, 1977) wird dieser zusätzlich von dem Cytochrom- b_6f Komplex (Cyt b_6f) (Hurt & Hauska, 1981) und einer ATP Synthase (Pick & Racker, 1979) gebildet. Allerdings sind diese Komplexe nicht gleichmäßig in der Thylakoidmembran verteilt. Während das PSI sowie die ATPase hauptsächlich in den Stroma Regionen lokalisiert sind, befindet sich das PSII vor allem in der dicht gepackten Grana Region (Andersson & Anderson, 1980; Kaftan et al., 2002). Der Cyt b_6f -Komplex ist dagegen sowohl innerhalb der Grana sowie an deren Randregionen zu finden (Kaftan et al., 2002). Während die Hauptfunktion des PSII und PSI die Absorption und Verwertung von Lichtenergie ist (Nelson & Yocum, 2006), dient der Cyt b_6f -Komplex in erster Linie der Weiterleitung von Elektronen und dem Aufbau eines elektrochemischen Gradienten (Cramer & Butler, 1967; Cramer et al., 2006).

Beim klassischen linearen Elektronentransport werden eintreffende Photonen von den Antennenkomplexen des PSII aufgenommen und an das Reaktionszentrum weitergeleitet (Mimuro, 1990; Mirkovic et al., 2017). Hier erfolgt die Anregung des primären Elektronendonators, ein spezielles Chlorophyll-Paar (P_{680}) (Telfer & Barber, 1989) und die Abgabe von Elektronen an den primären Akzeptor Plastochinon (PQ) (Knaff et al., 1977; Müh et al., 2012). Gleichzeitig erfolgt eine Oxidation von Wasser durch den Sauerstoffproduzierenden Komplex (OEC) (Ferreira et al., 2004). Hauptkomponente des OEC ist ein gebundenes Mangan-Cluster, welches durch Elektronenabgabe zu einer erneuten Reduktion des primären Elektronendonators beiträgt sowie die Spaltung von Wasser katalysiert, wobei molekularer Sauerstoff und Wasserstoffionen entstehen (Kok et al., 1970; Vrettos et al., 2001). Ausgehend von Plastochinon erfolgt ein Transport von Elektronen über den Cytb₆f-Komplex und Plastocyanin (PC) zum PSI (Hervás et al., 2003), wobei durch die Aktivität des Q-Zyklus zusätzlich Protonen ins Lumen abgegeben werden (Trumpower, 1990; Berry et al., 2000). Am PSI erfolgt eine erneute Anregung eines zentralen Chlorophyll-Paars (P_{700}) (Maggiore, 1979) und die Übertragung von Elektronen auf den finalen Elektronenakzeptor Ferredoxin sowie die Reduktion von $NADP^+$ zu NADPH durch eine Ferredoxin-NADP Reduktase (FNR) (Morales et al., 2000; Chitnis, 2001). Aufgrund der Aktivität des OEC und des Q-Zyklus erfolgt eine Anreicherung von Wasserstoffionen im Lumen der Thylakoidmembran. Dieser elektrochemische Gradient wird schließlich für die Produktion von energiereichem ATP durch die ATP Synthase verwendet (Elston et al., 1998; Richter et al., 2005).

Daneben findet zusätzlich ein zyklischer Elektronentransport statt, welcher ohne ein Mitwirken des PSII erfolgt (Bendall & Manasse, 1995; Allen, 2003b). Hierbei werden Elektronen am PSI nicht für die Reduktion von $NADP^+$ verwendet, sondern über Ferredoxin und Plastochinon an den Cytb₆f-Komplex zurückgeleitet. Im Gegensatz zum linearen Elektronentransport wird beim zyklischen Transfer daher lediglich ATP produziert (Johnson, 2011). Durch die Identifikation von 14 statt 12 c/III Untereinheiten der im Chloroplasten lokalisierten ATPase (Seelert et al., 2000) wurde deutlich, dass der Bedarf an ATP für den folgenden Calvin-Zyklus (3 Moleküle ATP/CO_2) durch eine Wasserspaltung (2,55 Moleküle ATP) nicht komplett gedeckt werden kann. Vermutlich trägt die zusätzliche Produktion von ATP durch den zyklischen Elektronentransport dazu bei, diesen Mangel zu kompensieren (Joliot & Joliot, 2002). Unterstützt wird diese Theorie durch eine um etwa 20% erhöhte Lichtabsorption des PSI im Vergleich zum PSII (Danielsson et al., 2004). Weiterhin wird eine Funktion des zyklischen Elektronentransports für die Photoprotektion vermutet (Munekage et al., 2002; Suorsa et al., 2012).

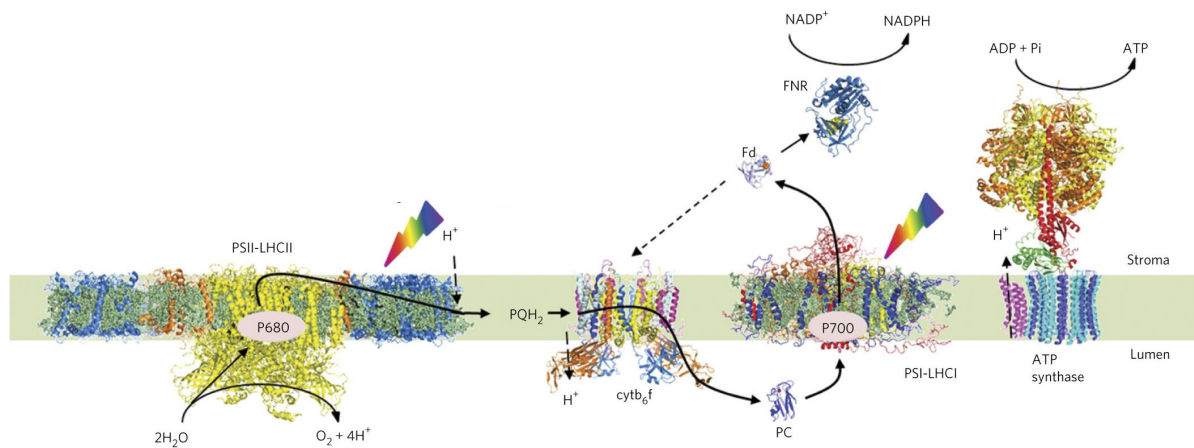


Abbildung 3.2: Organisation der photosynthetischen Komplexe in der Thylakoidmembran.

Schematische Darstellung der Multi-Proteinkomplexe, welche an dem Prozess der oxidativen Photosynthese beteiligt sind. Einfallende Lichtenergie wird von den Antennenkomplexen des Photosystem II (PSII-LHCII) absorbiert und nach Weiterleitung an das Reaktionszentrum zur Anregung eines speziellen Chlorophyll-Paars (P_{680}) verwendet. Daraufhin erfolgt eine Elektronenabgabe an den primären Akzeptor Plastochinon (PQ) und gleichzeitig durch den Prozess der Wasserspaltung eine erneute Reduktion des primären Elektronendonators. Nach einem Elektronentransport über den Cytochrom- b_6/f Komplex (Cyt b_6/f) und Plastocyanin (PC) erfolgt eine Weiterleitung an das Photosystem I (PSI), wobei durch die Aktivität des Q-Zyklus Wasserstoffionen in das Lumen gepumpt werden. Am PSI erfolgt nach erneuter Anregung von Chlorophyll (P_{700}) eine Elektronenübertragung auf Ferredoxin (Fd) und schließlich die Reduktion von $NADP^+$ zu NADPH durch die Ferredoxin-NADP Reduktase (FNR). Der durch die Anreicherung von H^+ -Ionen aufgebaute elektrochemische Gradient wird schließlich für die Produktion von ATP durch die ATP Synthase verwendet. Neben dem linearen (durchgezogene Linie) erfolgt zudem ein zyklischer Elektronentransport (gestrichelte Linie), wobei Ferredoxin nicht für die Reduktion von $NADP^+$ verwendet wird, sondern Elektronen an den Cyt b_6/f -Komplex zurückgibt (verändert nach Croce & van Amerongen, 2014).

Die Hauptaufgabe der Antennenkomplexe besteht in einer Maximierung der Lichtabsorption um ausreichend Energie für die photosynthetischen Prozesse bereitzustellen. Aufgrund der speziellen Pigmentanordnung wird innerhalb der Antennenkomplexe ein abfallendes Energieschema erzeugt, welches einen effektiven Transfer von Photonen aus den äußersten Bereichen zum Reaktionszentrum ermöglicht (Pieper et al., 2018). Trotz des gemeinsamen Ursprungs aller photosynthetischer Eukaryoten (McFadden & van Dooren, 2004; Gould et al., 2008) weisen die Antennenkomplexe der Archaeplastida aufgrund einer Adaption an unterschiedliche Umweltbedingungen, strukturelle Unterschiede auf (Ruban et al., 2011; Croce & van Amerongen, 2014).

Während Glaukophyten und Rotalgen Phycobilisome (PBS) besitzen (Gantt et al., 2003; Steiner & Löffelhardt, 2011), welche direkt auf den cyanobakteriellen Vorfahren zurückzuführen sind (Apt et al., 1995), weisen die Vertreter der Chloroplastida ausschließlich Antennenkomplexe der LHC Proteinfamilie auf (Jansson, 1999; Dekker & Boekema, 2005). Grundbausteine der PBS sind Phycobiliproteine, welche als Hexamere organisiert sind und unterschiedliche Pigmente binden (Glazer, 1994). Ausgehend von einem Kern aus zumeist drei Allophycocyanin (APC) Proteinen bilden Hexamere aus Phycocyanin (PhC), Phycoerythrin (PE) sowie Phycoerythrocyanin (PEC) mithilfe spezieller Hilfsproteine stäbchenförmige Antennen, welche je nach Organismus in ihrer Pigmentzusammensetzung variieren (Sidler, 1994; Watanabe & Ikeuchi, 2013).

Die Chlorophyll a/b bindenden (CAB) LHC Komplexe der chloroplastidären Linie bilden dagegen abhängig vom Photosystem Heterodimere bzw. -trimere. Während der kleinere LHC Komplex des PSI (LHCI) aus Heterodimeren gebildet wird (Ben-Shem et al., 2003; Amunts et al., 2007), besteht die LHCII Antenne aus Trimeren (Liu et al., 2004; Nield & Barber, 2006), welche entweder eng mit dem PSII Kernkomplex verbunden sind (S-Trimere) oder sich peripher an das PSII anlagern (M-Trimere) (Bassi & Dainese, 1992; Caffarri et al., 2009) sowie den drei Proteinen CP24, CP26 und CP29. Diese monomeren Untereinheiten sind dabei zwischen dem Reaktionszentrum und LHCII Komplexen lokalisiert (Boekema et al., 1999; Croce & van Amerongen, 2011), wobei CP29 das M-Trimer mit dem Kern verbindet und daher eine wichtige Aufgabe bei der Weiterleitung von Energie zum Reaktionszentrum besitzt (Caffarri et al., 2011; van Bezouwen et al., 2017).

Während Glaukophyten ausschließlich PBS Antennen besitzen, welche sowohl mit dem PSII wie auch PSI interagieren (Liu et al., 2013), besitzen Rotalgen zusätzlich LHC Proteine, welche lediglich Chlorophyll a binden (CAA) und für die Lichtabsorption am PSI verantwortlich sind (Marquardt & Rhiel, 1997; Gantt et al., 2003). In Algen mit komplexen roten Plastiden sind dagegen Chlorophyll a/c bindende (CAC) LHC Proteine zu finden (Bathke et al., 1999; Kereiche et al., 2008). Im Gegensatz zu den Chlorophyll-bindenden LHC Komplexen bilden im Fall der PBS verschiedene Phycobiline die Grundlage für die Lichtabsorption (Watanabe & Ikeuchi, 2013). Aus diesem Grund besitzen diese beiden Systeme unterschiedliche Absorptionsspektren. LHC Komplexe besitzen Absorptionsmaxima im Bereich von 440-470 nm sowie 650-670 nm (van Metter, 1977), wogegen PBS Antennenkomplexe vor allem im Wellenlängenbereich von ~560 nm (PE), ~615 nm (PhC), ~650 nm (APC) sowie ~575 nm (PEC) absorbieren (Bryant et al., 1979).

3.3 Lichtstress und Photoprotektion

Obwohl Licht für Pflanzen von essentieller Bedeutung ist, können zu hohe Lichtintensitäten zu einer Schädigung des photosynthetischen Apparats führen (Barber & Andersson, 1992). Absorbierte Photonen heben das im Reaktionszentrum des PSII gebundene Chlorophyll in einen angeregten Zustand ($^1\text{Chl}^*$), infolgedessen eine Ladungstrennung erfolgt und Elektronen für die photochemischen Prozesse bereitgestellt werden (Dekker & van Grondelle, 2000). Eine übermäßiger Energiefluss durch das PSII unter Bedingungen von intensiver Lichteinstrahlung führt allerdings zu einer Übersättigung des photosynthetischen Apparats, wodurch der lineare Elektronentransport an der Thylakoidmembran gehemmt wird (Styring et al., 1990). Folge ist die Entstehung von Triplett-Chlorophyllen ($^3\text{Chl}^*$), welche mit molekularem Sauerstoff reagieren können, wobei hoch reaktiver Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2^*$) entsteht (Abb. 3.3) (Durrant et al., 1990; Krieger-Liszkay, 2005). Diese reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) besitzen zwar eine wichtige Funktion als Signalmoleküle, indem sie unter anderem die Expression bestimmter Antioxidantien regulieren (Leisinger et al., 2001; Op den Camp et al., 2003), können jedoch bei übermäßiger Produktion massive Schäden an Proteinen, Pigmenten und Lipiden verursachen (Triantaphylidès et al., 2008).

Bei sich ständig wechselnden Umweltbedingungen sowohl in aquatischen als auch terrestrischen Systemen (Schubert & Forster, 1997; MacIntyre et al., 2000) spielt daher ein effektiver Ausgleich zwischen Energieaufnahme und -abgabe eine wesentliche Rolle. Aus diesem Grund haben photosynthetisch aktive Organismen verschiedene Mechanismen entwickelt, welche für die Regulation der photosynthetischen Prozesse verantwortlich sind und vor der Entstehung von ROS schützen sollen. Hierzu zählt vor allem die nicht-photochemische Löschung der Chlorophyll a Fluoreszenz (NPQ) (Abb. 3.4) (Müller et al., 2001). Unter Bedingungen von exzessiver Lichteinstrahlung wird mithilfe dieses molekularen Prozesses überschüssige Energie in Form von Wärme abgegeben (Niyogi, 1999; Ruban et al., 2007).

Ein entscheidendes Element des NPQ ist die Energie-abhängige Komponente (qE) (Krause et al., 1982; de Bianchi et al., 2010; Ruban et al., 2012; Niyogi & Truong, 2013), welche innerhalb weniger Minuten aktiviert wird (Horton & Hague, 1988; Krüger et al., 2012). Ausgehend von einem niedrigen pH-Wert im Lumen der Thylakoidmembran (Wraight & Crofts, 1970; Briantais et al., 1979) erfolgen dabei Konformationsänderungen innerhalb der LHCI Antennenkomplexe, wodurch vermehrt Wärmeenergie abgegeben wird (Ruban et al., 2012). In höheren Pflanzen ist dieser Prozess eng mit dem PsbS Protein (Li et al., 2000; Li et al., 2004) und dem Xanthophyll-Zyklus (Demmig-Adams, 1990; Jahns & Holzwarth, 2012) verbunden.

Eine erhöhte Aktivität des photosynthetischen Elektronentransports unter Starklichtbedingungen führt zu einer massiven Anreicherung von Protonen im Lumen der Thylakoidmembran. Die damit verbundene Reduktion des pH-Werts hat eine Protonierung des PsbS zur Folge (Li et al., 2004), was durch Konformationsänderungen des Proteins und einer direkten Interaktion mit LHC Proteinen (Teardo et al., 2007; Wilk et al., 2013) zu einer Reorganisation der PSII Antennenkomplexe (Bonente et al., 2008; Johnson & Ruban, 2011) sowie einer strukturellen Veränderung der Grana-Organisation führt (Betterle et al., 2009; Goral et al., 2012).

Zusätzlich erfolgt bei einem pH-Wert von etwa 5 eine Aktivierung der Violaxanthin De-epoxidase (VDE) (Hager, 1969; Pfündel et al., 1994), was zu einer Dimerisierung des Enzyms und einer Interaktion mit der Thylakoidmembran führt (Hager & Holocher, 1994; Arnoux et al., 2009). Dieses Enzym ist ein zentraler Bestandteil des Xanthophyll-Zyklus, welcher die reversible Umwandlung von Violaxanthin zu Zeaxanthin beschreibt und in zwei Schritten über das Zwischenprodukt Antheraxanthin erfolgt (Yamamoto et al., 1962; Hager, 1967).

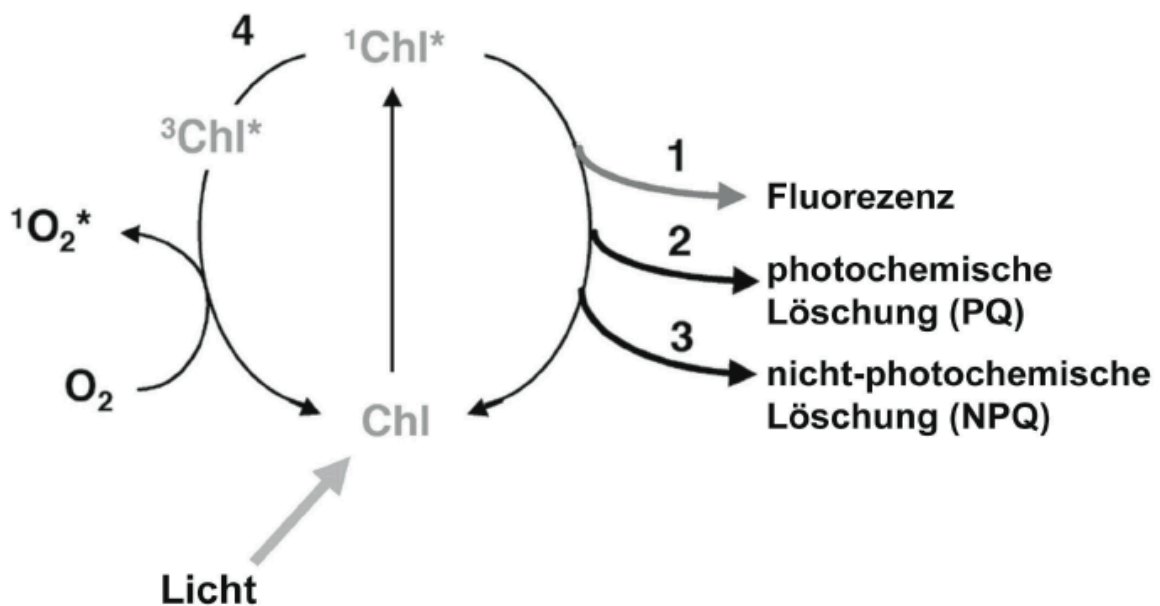


Abbildung 3.3: Möglichkeiten zur Deaktivierung von Singulett-Chlorophyllen ($^1\text{Chl}^*$). Durch Lichtenergie angeregtes Chlorophyll ($^1\text{Chl}^*$) kann durch unterschiedliche Prozesse der Energiedissipation wieder in den Grundzustand (Chl) zurückkehren. Hierzu gehören neben der Abgabe von Energie in Form von Fluoreszenz (1) vor allem die photochemischen Prozesse der Photosynthese (2) sowie die nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung (NPQ) (3), wobei überschüssige Energie in Form von Wärme abgegeben wird. Eine übermäßige Anregung kann dagegen zur Entstehung von Triplett-Chlorophyllen ($^3\text{Chl}^*$) führen (4), welche mit molekularem Sauerstoff reagieren und so zu der Produktion von reaktivem Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2^*$) beitragen (verändert nach Müller et al., 2001).

Diese Xanthophylle sind unter anderem an den PSII Antennenkomplex gebunden (Caffarri et al., 2001; Morosinotto et al., 2002; Jahns et al., 2009), wobei eine vermehrte Konzentration von Zeaxanthin die Reorganisation der LHCII Komplexe unterstützt (Ruban et al., 1997; Morosinotto et al., 2002; Nilkens et al., 2010). Zusätzlich fungiert es als Antioxidans indem es zur Deaktivierung von angeregtem Chlorophyll beiträgt (Frank et al., 1994; Jahns & Holzwarth, 2012).

Eine weitere Komponente des NPQ stellt der sogenannte Zustandswechsel (qT) dar (Wollman, 2001). Eine Reduktion des Plastochinon und Bindung an den Cytochrom-b₆f Komplex führt hierbei zur Aktivierung einer speziellen Protein Kinase (Zito et al., 1999) – STN7 in höheren Pflanzen (Bellafiore et al., 2005) und STT7 in Grünalgen (Depège et al., 2003) – welche für die reversible Phosphorylierung von LHC Untereinheiten des PSII verantwortlich ist. Dadurch erfolgt eine Ablösung von LHCII Komplexen verbunden mit einem gleichzeitigen Transfer eines Anteils der LHCII Antenne zum PSI (Allen, 1992; Ballottari et al., 2007; Galka et al., 2012). Dieser Prozess ermöglicht einen raschen Ausgleich der Energieaufnahme durch die beiden Photosysteme und vermindert somit den Energiefluss durch das PSII (Haldrup et al., 2001; Rochaix, 2014).

Trotz grundsätzlicher Gemeinsamkeiten der photoprotektiven NPQ Mechanismen, sind dennoch einige Unterschiede innerhalb der Chloroplastida zu erkennen. Während qT in höheren Pflanzen weniger stark ausgeprägt ist und nur etwa 10% - 20% der abgelösten LHCII Untereinheiten einen Transfer zum PSII aufweisen (Kyle et al., 1983; Allen, 1992; Rochaix, 2014), spielt dieser Prozess in Grünalgen wie *Chlamydomonas reinhardtii* eine entscheidende Rolle (Delosme et al., 1996; Allorement et al., 2013), wo bis zu 80% der LHCII Komplexe eine Mobilität innerhalb der Thylakoidmembran aufweisen (Delosme et al., 1996). Dagegen ist die Beteiligung des Xanthophyll-Zyklus an der Photoprotektion in diesen Organismen deutlich geringer (Masojidek et al., 2004). Weiterhin wird in Grünalgen die Funktion des PsbS von Vertretern der LhcSR Proteinfamilie übernommen (Peers et al., 2009; Bonente et al., 2011). In *C. reinhardtii* sind zwei Kopien des LhcSR – LhcSR1 und LhcSR3 – aktiv an NPQ beteiligt (Bonente et al., 2011; Dinc et al., 2016). Im Gegensatz zu höheren Pflanzen, wo ein Verlust des LhcSR erfolgte (Niyogi & Truong, 2013), konnte in *Chlamydomonas* eine Expression des PsbS nachgewiesen werden (Tibiletti et al., 2016; Correa-Galvis et al., 2016). Vermutlich unterstützten hier durch Interaktionen mit dem PsbS induzierte Konformationsänderungen innerhalb der LHCII Komplexe die Bindung von LhcSR Proteinen (Correa-Galvis et al., 2016).

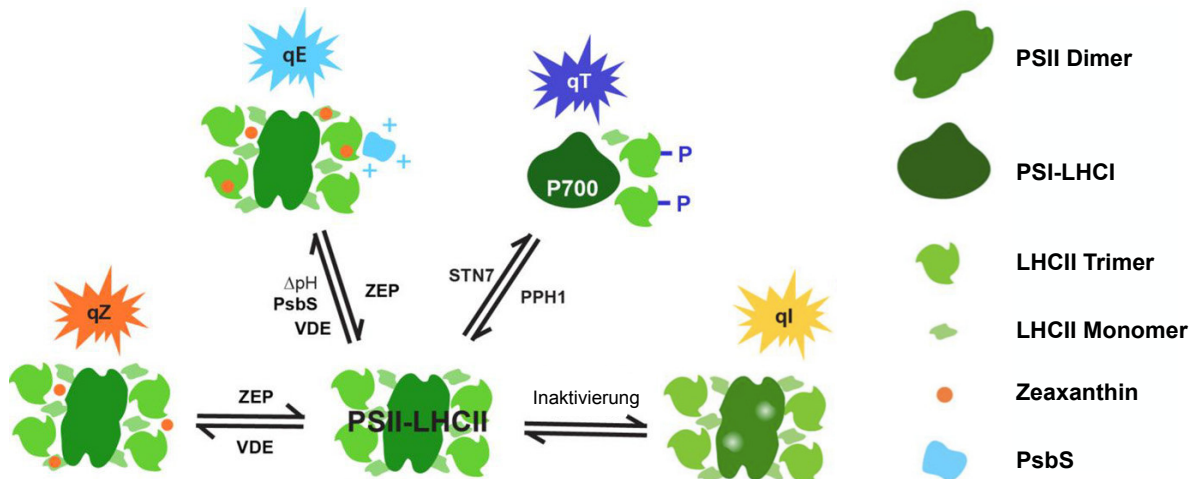


Abbildung 3.4: Verschiedene Komponenten der nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung (NPQ). Die Energie-abhängige Komponente des NPQ (qE) ist vor allem in höheren Pflanzen eng mit den Xanthophyll-Zyklus (qZ) und dem PsbS Protein verknüpft. Eine Reduktion des pH-Werts im Lumen der Thylakoidmembran, aufgrund einer erhöhten Photosyntheserate, führt hierbei zur Protonierung (+) spezifischer Aminosäuren des PsbS sowie einer Aktivierung der Violaxanthin De-epoxidase (VDE), welche die Licht-induzierte Umwandlung von Violaxanthin zu Zeaxanthin katalysiert. Beide sowohl das PsbS als auch Zeaxanthin sind schließlich für Konformationsänderungen innerhalb der LHCII Antennenkomplexe verantwortlich, was zu einer vermehrten Energieabgabe in Form von Wärme beiträgt. Der Prozess des Zustandswechsels (qT) wird durch die Aktivität von spezifischen Kinasen (STN7 in höheren Pflanzen) reguliert, welche für die reversible Phosphorylierung von LHCII Untereinheiten verantwortlich sind. Dies führt zu einer Ablösung der Antennenkomplexe vom PSII sowie einem Transfer der LHCII zum Photosystem I. Die Photoinhibition (qI) wird dagegen hauptsächlich durch Schäden am PSII, insbesondere des D1 Proteins, charakterisiert (verändert nach Malnoë, 2018).

Im Gegensatz zu der Chloroplastida besitzen Rotalgen und Glaukophyten Phycobilisome, welche für die Lichtabsorption am PSII verantwortlich sind (Neilson & Durnford, 2010). Aus diesem Grund fehlen diesen Organismen die klassischen NPQ Mechanismen, welche hauptsächlich durch eine Modifikation der LHCII Antennenkomplexe zu einer Abgabe von überschüssiger Energie beitragen (Ruban et al., 2007). Dennoch zeigen auch diese Algen eine Licht-abhängige Reduktion der Chl a Fluoreszenz. Hierbei spielen vor allem zwei Prozesse eine wichtige Rolle: (i) durch eine fehlende räumliche Trennung der beiden Photosysteme wird in diesen Organismen eine direkte Energieübertragung vom PSII zum PSI (*energy spillover*) ermöglicht (Yokono et al., 2011; Kowalczyk et al., 2013). Dieser Mechanismus wird über den Redoxfaktor des PQ reguliert und führt unter Bedingungen von exzessiver Lichteinstrahlung zu einer Reduktion des Energieflusses durch das PSII (Kowalczyk et al., 2013).

(ii) Zudem konnte in einigen Rotalgen eine pH-abhängige Reduktion der PBS Antennenkomplexe festgestellt werden, welcher sich insbesondere durch eine Ablösung der Phycoerythrin-bindenden Proteine auszeichnet (Ritz et al., 2000; Liu et al., 2008).

3.3.1 Photoinhibition und Funktion des FtsH-Protease Komplexes

Das plastidär-kodierte D1 Protein des PSII ist besonders sensitiv gegenüber Lichtstress (Mattoo et al., 1984; Ohad et al., 1990). Unter Bedingungen von exzessiver Lichteinstrahlung erfolgt eine Übersättigung des photosynthetischen Apparats, was zu einer vermehrten Produktion von ROS (Macpherson et al., 1993; Krieger-Liszkay, 2005) und irreversiblen Schädigungen des D1 Proteins führen kann (Barber & Andersson, 1992). Dadurch wird der lineare Elektronentransport an der Thylakoidmembran gehemmt und es kommt zu einer Photoinhibition (qI) (Krause, 1988; Aro et al., 1993), wobei das Ausmaß von qI durch die jeweilige Rate von Reparatur und Schädigung bestimmt wird (Murata et al., 2007).

Um eine dauerhafte Inhibition der photosynthetischen Prozesse zu verhindern, muss die Funktion des PSII wiederhergestellt werden, indem das zerstörte D1 abgebaut und durch ein neu synthetisiertes Protein ersetzt wird (Komenda et al., 2012a). Aus diesem Grund spielt der PSII Reparaturzyklus eine erhebliche Rolle für die Photoprotektion (Takahashi & Badger, 2011). Eine Phosphorylierung von PSII Untereinheiten durch spezifische Kinasen (Tikkanen et al., 2008) führt hierbei zunächst zu einer partiellen Auflösung des PSII Superkomplexes (Johnson et al., 2011) und einem Transfer des PSII zu den weniger dicht gepackten Stroma Regionen innerhalb der Thylakoidmembran (Baena-González et al., 1999; Yoshioka-Nishimura & Yamamoto, 2014). Dort erfolgt eine De-phosphorylierung des Komplexes, was den Abbau des geschädigten D1 Proteins durch spezifische Proteasen initiiert (Koivuniemi et al., 1995; Samol et al., 2012). Anschließend wird mithilfe membrangebundener Ribosomen ein neu synthetisiertes D1 Protein ko-translational in das PSII Reaktionszentrum eingebaut (Zhang et al., 1999). Dabei ist die FtsH Protease, welche für den Abbau von D1 verantwortlich ist, von fundamentaler Bedeutung (Abb. 3.5) (Lindahl et al., 2000; Bailey et al., 2002).

Die FtsH Protease gehört zur Familie der AAA-Typ ATPasen (Tomoyasu et al., 1993a; Neuwald et al., 1999). Sie besitzt zumeist zwei N-terminale Transmembrandomänen, welche für die Verankerung der Protease in der Thylakoidmembran verantwortlich sind (Tomoyasu et al., 1993b), gefolgt von einer AAA-ATPase Domäne mit den konservierten Walker A und B Motiven (Krzywda et al., 2002), sowie einer Zn²⁺ Metalloprotease Domäne (HEXXH), welche das aktive Zentrum der Protease markiert (Bieniossek et al., 2006).

Zusätzlich besitzt sie eine zweite Region der Homologie (SRH), an deren C-terminalen Ende der so genannte Arginin-Finger liegt, welcher für die Hydrolyse von ATP essentiell ist (Karata et al., 1999; Ogura et al., 2004). Die ebenfalls C-terminal gelegene Leucin-reiche Region (LRR) (Shotland et al., 2000) ist dagegen vermutlich an der Erkennung spezifischer Substrate beteiligt (Graef et al., 2007).

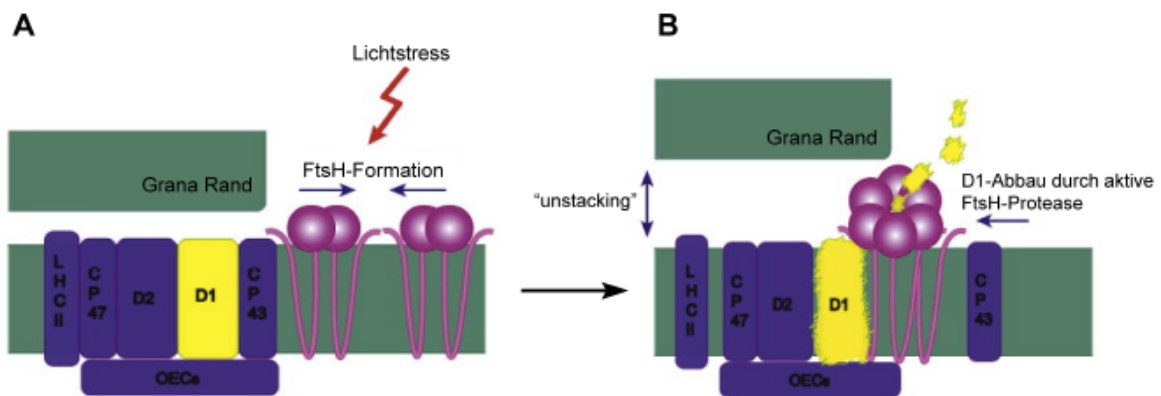


Abbildung 3.5: Reparaturmechanismus des FtsH-Protease Komplexes. (A) Untereinheiten der FtsH-Protease sind vor allem in den Stroma Regionen zu finden, wo sie mit ihren Transmembran-domänen innerhalb der Thylakoidmembran verankert sind, wobei es erst unter exzessiver Lichteinstrahlung zu einer Bildung des proteolytisch aktiven FtsH-Oligomerkomplexes kommt. Gleichzeitig kann Lichtstress durch einen gesteigerten Energiefluss durch das Photosystem II (PSII) zu einer Schädigung des D1 Kernproteins führen. (B) Aufgrund der hohen molekularen Masse des FtsH-Hexamers ist eine Voraussetzung für den Reparaturmechanismus des PSII die Auflösung der gestapelten Thylakoidstruktur, wodurch der Zugang zu den PSII-reichen Grana Regionen ermöglicht wird. Gleichzeitig kommt es zu einem partiellen Abbau des PSII Superkomplexes. Nach der Degradierung des D1 Proteins durch die FtsH Protease kann dieses durch ein neu synthetisiertes Protein ersetzt werden und es erfolgt ein erneuter Zusammenbau des PSII (verändert nach Yoshioka-Nishimura & Yamamoto, 2014).

Während FtsH unter moderaten Lichtbedingungen hauptsächlich in der Stroma Region der Thylakoidmembran lokalisiert ist, wobei sie Mono- oder Dimere bildet, erfolgt bei hohen Lichtintensitäten die Formation von funktional aktiven Hexameren, welche eine Anhäufung in den Randregionen der Grana aufweisen (Yoshioka et al., 2010; Yoshioka-Nishimura & Yamamoto, 2014). Aufgrund der hohen molekularen Masse dieses Protease Komplexes wird ein Zugang zu der dicht gepackten und PSII-reichen Grana Region verhindert (Suno et al., 2006; Kirchoff, 2013). Daher ist eine Destabilisierung der kompakten Membranstruktur eine Voraussetzung für die Aktivität der FtsH Protease (Khatoun et al., 2009).

Die initiale Phosphorylierung von geschädigtem PSII führt hierbei zu strukturellen Veränderungen der Thylakoidmembran (Fristedt et al., 2009), was den Transfer von Proteinen insbesondere von Untereinheiten des Photosystem II erleichtert (Khattoon et al., 2009, Goral et al., 2010).

Die FtsH Protease ist sowohl in Pro- wie auch Eukaryoten konserviert (Shao et al., 2018). Während die bakterielle Protease allerdings vor allem für den Abbau von Membranproteinen und für die Regulation spezifischer Stressantworten verantwortlich ist (Tomoyasu et al., 1995; Akiyama et al., 1996), besitzen Cyanobakterien spezielle FtsH Proteine mit einer Funktion innerhalb des Reparaturzyklus des PSII (Silva et al., 2003; Komenda et al., 2006). Daher ist die Evolution dieser Protease eng mit der Entstehung des Sauerstoffproduzierenden PSII verknüpft (Shao et al., 2018). In *Synechocystis* ist ein Hetero-Hexamere aus FtsH2 und FtsH3 für den Abbau von lichtgeschädigtem D1 verantwortlich (Boehm et al., 2012), wobei vor allem in höheren Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* zumeist mehrere Kopien des *ftsh* Gens vorhanden sind (Friso et al., 2004), welche systematisch in zwei Kategorien – Typ A und Typ B (Zaltsman et al., 2005) – eingeteilt werden. Der aktive FtsH-Protease Komplex besteht dabei aus einem Hetero-Hexamere aus Typ A und Typ B Untereinheiten mit einem Verhältnis von 1:2 (Zaltsman et al., 2005; Moldavski et al., 2012).

3.4 Evolution der LHC Superfamilie

Die erweiterte Familie der LHC Proteine besteht aus integralen Membranproteinen, welche sowohl in pro- wie auch eukaryotischen Organismen konserviert ist (Heddad & Adamska, 2002; Engelken et al., 2010). Ausgehend von der Funktion der jeweiligen Proteine innerhalb der photosynthetischen Prozesse kann die LHC Superfamilie in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden. Während die Hauptaufgabe der klassischen LHCs in der Absorption von Lichtenergie und Weiterleitung an die jeweiligen Reaktionszentren von Photosystem I und II liegt, weswegen sie als Antennenkomplexe fungieren (Green & Durnford, 1996), besteht die Funktion weitere Proteine dieser Familie vor allem in der Photoprotektion (Adamska, 2001; Giovagnetti & Ruban, 2018; Rochaix & Bassi, 2019). Zu diesen gehören sowohl die Gruppen der HLIPs (Dolganov et al., 1995; Funk & Vermaas, 1999) / OHPs (Jansson et al., 2000; Andersson et al., 2003), SEPs (Heddad & Adamska, 2000) und ELIPs (Montané & Klopstech, 2000; Adamska, 2001) sowie die LhcSR (Peers et al., 2009) und PsbS (Funk, 2001) Proteine. Trotz eines gemeinsamen evolutionären Ursprungs dieser Proteinfamilie (Wolfe et al., 1994; Heddad & Adamska, 2002) und einiger identischer struktureller Charakteristika (Green & Kühlbrandt, 1995) besitzen die verschiedenen LHC Proteine unterschiedliche Funktionen.

Die cyanobakteriellen HLIP Proteine binden Chlorophyll (Storm et al., 2008) und besitzen eine Transmembrandomäne (TMD) (Funk & Vermaas, 1999). Während die eukaryotischen OHP1 Proteine direkt auf die HLIPs der Cyanobakterien zurückgeführt werden können (Jansson et al., 2000), evolvierte das OHP2 vermutlich unabhängig von OHP1 (Engelken et al., 2012). Grundsätzlich sind diese Proteine für den Transport von Chlorophyll verantwortlich und besitzen eine wichtige Funktion bei dem Aufbau des PSII Reaktionszentrums (Knoppová et al., 2014; Myouga et al., 2018). Gleichzeitig dienen sie womöglich als vorübergehendes Reservoir für Chlorophyll bei der Reparatur des Photosystem II (Promnares et al., 2006; Yao et al., 2007) und vermitteln somit ein Recycling von Chlorophyll a Molekülen (Vavilin et al., 2007). In Cyanobakterien bildet HLID zusammen mit YCF39 einen Chlorophyll a und β -Carotin bindenden Komplex, welcher mit dem D1/D2 Reaktionszentrum interagiert und vermutlich für die Bereitstellung von Chlorophyll a bei dem Aufbau des PSII verantwortlich ist (Knoppová et al., 2014). In höheren Pflanzen ist OHP1 für den Transport von Chlorophyll zum PSII verantwortlich (Myouga et al., 2018), während OHP2 mit HCF244 – einem Homolog des bakteriellen YCF39 – interagiert und ebenfalls an dem Aufbau des PSII Komplexes beteiligt ist (Hey & Grimm, 2018).

Die SEP Proteine, auch LIL genannt (Jansson, 1999), besitzen dagegen zwei TMDs (Heddad & Adamska, 2000) und sind ausschließlich bei Eukaryoten vertreten (Engelken et al., 2010). Sie besitzen ebenfalls ein Chlorophyll-Bindungsmotiv (Heddad & Adamska, 2000; Adamska, 2001) und sind funktional eng mit der Chlorophyll Biosynthese verknüpft. In *A. thaliana* spielt LIL3 vermutlich eine wichtige Rolle für die Aktivität der Geranylgeranyl Reduktase (CHLP) und Protochlorophyllid Oxidoreduktase (POR), welche an dem finalen Schritt in der Chlorophyll Synthese beteiligt sind (Tanaka et al., 2010; Hey et al., 2017). In der Gerste bildet LIL3 einen Chlorophyll a und Protochlorophyll a bindenden Komplex, welcher vermutlich an der Übermittlung von Protochlorophyll a an die Chlorophyll Synthase sowie der Übergabe von Chlorophyll an die PSI und PSII Komplexe beteiligt ist (Reisinger et al., 2008).

ELIPs sind ausschließlich in der chloroplastidären Linie vertreten (Engelken et al., 2010) und besitzen ebenso wie die klassischen LHC Proteine drei TMDs (Green & Kühlbrandt, 1995), weisen aber eine veränderte Pigmentzusammensetzung auf (Adamska et al., 1999). Neben Chlorophyll a besitzen diese eine hohe Konzentration an Lutein und Carotinoiden (Adamska et al., 1999). Obwohl die genaue Funktion dieser Proteine weitestgehend ungeklärt ist, spricht eine deutliche Korrelation zwischen der Anhäufung an ELIP Proteinen und dem Ausmaß an Photoinhibition für eine photoprotektive Funktion (Adamska et al., 1992; Pötter & Kloppstech, 1993; Hutin et al., 2003; Heddad et al., 2006).

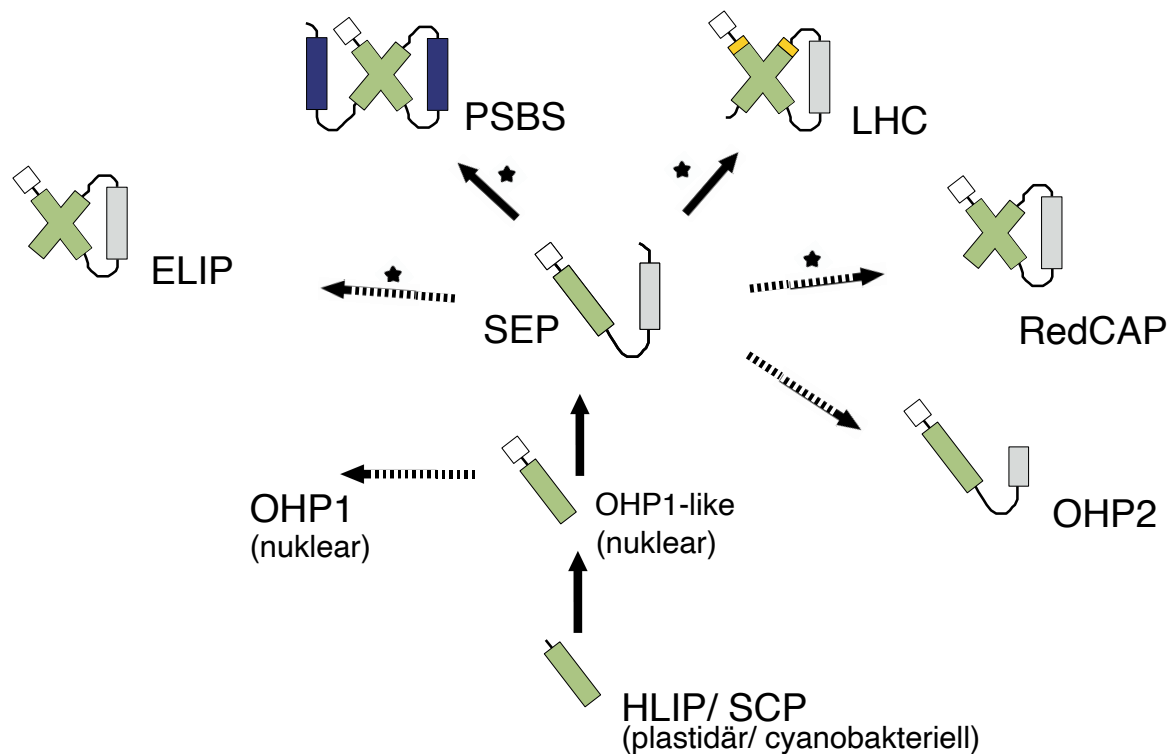


Abbildung 3.6: Model für die Evolution der erweiterten LHC Proteinfamilie. Ausgehend von den cyanobakteriellen HLIP Proteinen mit einer Transmembrandomäne (TMD) und spezifischen Chlorophyll-Bindungsmotiven (grüne Box) entwickelten sich in dem gemeinsamen Vorfahren der Archaeplastida die OHP1 Proteine, welche sich durch den Besitz eines Transitpeptids (weiße Box) auszeichnen. Auf diese lassen sich verschiedene SEP Proteine zurückführen, welche eine zweite TMD (graue Box) besitzen. Die OHP2 Proteine entstanden vermutlich durch die Degeneration eines SEP Proteins, wogegen der Ursprung weiterer LHC Proteine wahrscheinlich bei mehreren individuellen internen Genduplikationen (Sternchen) innerhalb der SEP Proteinfamilie liegt. Während sich die klassischen LHC Proteine hierbei durch den Besitz von spezifischen Carotinoid-Bindungsstellen (orange Box) auszeichnen und vor der Aufspaltung der roten und grünen Linie entstanden, sind die RedCAP und ELIP/PsbS Proteine spezifisch für die Rhodophyta bzw. Chloroplastida (verändert nach Engelken et al., 2012).

Das ELIP2 Protein aus *A. thaliana* besitzt eine mögliche Funktion als Chlorophyll Sensor, welcher die Synthese von Chlorophyll reguliert (Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007). Das MSF1 Protein aus *C. reinhardtii*, welches strukturelle Ähnlichkeiten zu den ELIP Proteinen aufweist und für die Stabilität des PSI verantwortlich ist, zeigt ebenfalls eine Beteiligung an der Chlorophyll Biosynthese (Zhao et al., 2017), was darauf schließen lässt, dass MSF1 eine Verbindung zwischen der Synthese von Chlorophyll und dem Aufbau des Photosystem I herstellt und damit vor freiem Chlorophyll schützt (Zhao et al., 2017).

Basierend auf phylogenetischen Analysen liegt der Ursprung aller LHC Proteine beim letzten gemeinsamen Vorfahren der Archaeplastida. Ausgehend von den HLIP Proteinen der Cyanobakterien entwickelte sich im Laufe der Evolution die erweiterte Familie der LHCs (Abb. 3.6) (Heddad & Adamska, 2002; Green, 2003). Während interne Genduplikationen innerhalb der OHP1 Proteinfamilie zunächst zur Entstehung der SEP Proteine führte (Green & Pichersky, 1994; Engelken et al., 2010), sind bis zu 4 weitere unabhängige Duplikationsereignisse zusammen mit Genfusionen und -deletionen innerhalb der SEP Familie für die Entstehung der erweiterten LHC Proteinfamilie verantwortlich (Engelken et al., 2010; Engelken et al., 2012). Grundlegende Unterschiede zwischen diesen Gruppen ist die Anzahl an vorhandenen TMDs sowie die Anwesenheit spezifischer Carotenoid-Bindungsmotive innerhalb der Gruppe der klassischen LHCs (Bassi et al., 1999).

Während das PsbS Protein in höheren Pflanzen als pH-Sensor fungiert (Li et al., 2004), wird diese Funktion innerhalb der Grünalgen von dem LhcSR Protein übernommen (Ballottari et al., 2016), welches im Laufe der Evolution in Landpflanzen systematisch verloren ging (Niyogi & Truong, 2013). Beide Proteine sind über eine Protonierung spezifischer Aminosäuren (Li et al., 2004; Ballottari et al., 2016) für die pH-abhängige Aktivierung der Energie-abhängigen Komponente des NPQ verantwortlich (Li et al., 2000; Peers et al., 2009; Bonente et al., 2011). Trotz dieser gemeinsamen Funktion sind dennoch grundlegende Unterschiede zwischen diesen beiden Proteinen zu finden. LhcSR Proteine besitzen Bindungsstellen für Chlorophyll a und b, Lutein sowie Violaxanthin und Zeaxanthin und sind daher selbst unter limitierenden Lichtbedingungen zu einer Dissipation von Wärmeenergie in der Lage (Bonente et al., 2011). Eine Regulation der Genexpression von *lhcSR*, welche einen aktiven Elektronentransport benötigt (Maruyama et al., 2014) und durch Lichtstress induziert wird (Tokutsu & Minagawa, 2013; Petroustos et al., 2016) verhindert jedoch eine verschwenderische Energieabgabe unter moderaten Lichtbedingungen. PsbS bindet dagegen keine Pigmente (Dominici et al., 2002; Bonente et al., 2008; Fan et al., 2015), sondern ist durch Interaktionen mit LHC Untereinheiten indirekt für eine Energieabgabe verantwortlich (Kiss et al., 2008; Kereiche et al., 2010; Goral et al., 2012). Im Gegensatz zu LhcSR zeigt das PsbS Protein eine konstitutive Expressionsrate, wodurch eine unmittelbare Aktivierung des qE ermöglicht wird (Gerotto et al., 2012). Dies lässt eine direkte Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen zu (Külheim et al., 2002), welche insbesondere bei Landpflanzen von essentieller Bedeutung ist, da sie erhöhten Schwankungen der Lichtintensität ausgesetzt sind (Delwiche & Cooper, 2015; de Vries & Archibald, 2018).

Das Moos *Physcomitrella patens*, welches evolutionär zwischen Grünalgen und Landpflanzen positioniert ist, besitzt sowohl LhcSR als auch PsbS, wobei beide Proteine unabhängig voneinander aktiv an NPQ beteiligt sind (Alboresi et al., 2010; Gerotto et al., 2011). Dabei weisen sie unterschiedliche Lokalisationen innerhalb der Thylakoidmembran auf. Während PsbS hauptsächlich in der Grana Region zu finden ist (Suorsa et al., 2014; Pinnola et al., 2015) befindet sich das LhcSR Protein vor allem in der Stroma Region sowie den Granarändern (Pinnola et al., 2015). Neben einem erhöhten Bedarf an flexiblen NPQ Kapazitäten aufgrund veränderter Lichtbedingungen (Gerotto et al., 2011) bedingte daher vermutlich zudem eine verstärkte Lokalisierung von PSII Reaktionszentren innerhalb der Grana Region (Kaftan et al., 2002) den Verlust des LhcSR-abhängigen NPQs in höheren Pflanzen (Pinnola, 2019).

3.5 Ziele der Dissertation

Die nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung (NPQ) ist in Grünalgen und höheren Pflanzen ein gut untersuchter und effizienter Mechanismus zum Schutz vor exzessiver Lichteinstrahlung (Müller et al., 2001). Durch Modifikationen der LHCII Antennenkomplexe wird die Energieaufnahme durch das PSII verringert und es erfolgt eine vermehrte Energieabgabe in Form von Wärme (Ruban et al., 2012). Im Gegensatz zur Chloroplastida ist über photoprotektive Prozesse in Glaukophyten und Rotalgen bisher nur wenig bekannt.

Ziel dieser Dissertation war eine umfassende Untersuchung von Lichtschutzmechanismen in unterschiedlichen Repräsentanten der Archaeplastida, wobei durch annähernd identische Kultivierungsbedingungen eine vergleichende Analyse zwischen den unterschiedlichen Organismen ermöglicht wurde. Neben (photo)physiologischen Untersuchungen sollte vor allem mithilfe von RNA-Sequenzierungsdaten ein umfangreicher Einblick in die Stressreaktion der Algen gewonnen werden. Zunächst sollte mithilfe von Chlorophyll a Messungen der Einfluss intensiver Lichteinstrahlung auf die Effizienz der photosynthetischen Prozesse bestimmt werden. Insbesondere ein Vergleich zwischen Spezies mit unterschiedlichen Antennenkomplexen war hierbei von Interesse. Weiterhin sollten mittels transelektronenmikroskopischer Aufnahmen und HPLC gestützte Verfahren Licht-induzierte Veränderungen innerhalb der Thylakoidstruktur sowie Pigmentkomposition untersucht werden. Zusätzlich sollte durch eine detaillierte RNA-Seq. Analyse der Einfluss unterschiedlicher Lichtbedingungen auf die nukleare Genexpression analysiert werden. Insbesondere sollte hierdurch die Theorie einer gesteigerten Autonomie von Plastiden mit einer erhöhten Plastomkapazität überprüft werden, wie sie in Glaukophyten sowie Rotalgen vorkommt.

Des Weiteren sollten Gene mit einer spezifischen Expression unter Starklichtbedingungen Aufschluss über die aktivierten Mechanismen zur Photoprotektion geben, wobei *C. paradoxa* und die Vertreter der Rhodophyta von besonderem Interesse waren.

Ferner sollte eine Charakterisierung von *C. reinhardtii* FtsH-Überexpressionsmutanten durchgeführt werden. Die FtsH Protease ist für den Abbau von lichtgeschädigtem D1 verantwortlich und spielt daher eine essentielle Rolle bei der Reparatur des Photosystem II (Lindahl et al., 2000; Bailey et al., 2002). Ein erhöhter Anteil von Typ B Untereinheiten innerhalb des FtsH-Oligomerkomplexes lässt vermuten, dass diese bei der Assemblierung des proteolytisch aktiven Protease-Komplexes womöglich regulative Funktionen besitzt. Diese Theorie sollte mithilfe einer plastidären Überexpression des *Chlamydomonas fish2* Gens überprüft werden. Zusätzlich sollte durch die Überexpression der plastidär-kodierten FtsH Protease aus der Xanthophyceae *Vaucheria litorea* der Grad der evolutionären Konservierung analysiert werden.

4. Material & Methoden

4.1 Material

4.1.1 Medien und Chemikalien

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Nährmedien wurden mit demineralisiertem Wasser hergestellt und vor Gebrauch mithilfe einer Dampf-Sterilisation im Autoklaven oder durch Filtrierung sterilisiert. Die verwendeten Chemikalien besaßen höchste Reinheit und Qualität.

HSM Medium (Sueoka, 1960)

40x HSM-Beijerinck Salze	2,5%
100x HSM-Phosphat	1%
<i>Hunters</i> Spurenelemente	0,1%

40x HSM-Beijerinck Salze

Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	373,9 mM
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	3,25 mM
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂) x 2 H ₂ O	2,65 mM

100x HSM-Phosphat

Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	631,46 mM
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	529,08 mM

Hunters Spurenelemente

Na ₂ EDTA	171,09 mM
Zinksulfat Heptahydrat (ZnSO ₄ x 7 H ₂ O)	76,51 mM
Borsäure (H ₃ BO ₃)	184,38 mM
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat (MnCl ₂ x 4 H ₂ O)	25,57 mM
Cobalt(II)-chlorid Hexahydrat (CoCl ₂ x 6 H ₂ O)	6,77 mM
Kupfersulfat Pentahydrat (CuSO ₄ x 5 H ₂ O)	6,29 mM
Ammoniumheptamolybdat ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O)	890,07 µM
Eisen(II)-sulfat Heptahydrat (FeSO ₄ x 7 H ₂ O)	17,95 mM
20% KOH	8,5%

TL30 Medium (pH 8) (Larsen et al., 1994)

Natriumnitrat (NaNO_3)	1,19 mM
Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$)	55,84 μM
Erdeextrakt	0,3%
37 % Meerwasser	99,5%
L1 Spurenmetalle Stammlösung	0,1%

L1 Spurenmetalle Stammlösung

Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat ($\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$)	909,5 μM
Zinksulfat Heptahydrat ($\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)	76,51 μM
Cobalt(II)-chlorid Hexahydrat ($\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$)	42,03 μM
Kupfersulfat Pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$)	9,81 μM
Natriummolybdat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	82,25 μM
Selenige Säure (H_2SeO_3)	10,08 μM
Nickel(II)-sulfat Hexahydrat ($\text{NiSO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$)	10,27 μM
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	10,01 μM
Kaliumchromat (K_2CrO_4)	1 μM
NaFeEDTA	13,62 mM

f/2 Medium (Guillard, 1975)

Natriumnitrat (NaNO_3)	882,41 μM
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)	36,23 μM
Natriummetasilikat Nonahydrat ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$)	105,56 μM
f/2 Spurenmetalle Stammlösung	0,1%
f/2 Vitaminstammlösung	0,1%

f/2 Spurenmetalle Stammlösung

Eisen(III)-chlorid Hexahydrat ($\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$)	11,65 mM
$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$	11,71 mM
Kupfersulfat Pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$)	39,25 μM
Natriummolybdat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	26,04 μM
Zinksulfat Heptahydrat ($\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)	76,51 μM
Cobalt(II)-chlorid Hexahydrat ($\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$)	42,03 μM
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat ($\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$)	909,5 μM

f/2 Vitaminstammlösung

Thiamin Hydrochlorid (Vitamin B ₁)	593 µM
Biotin (Vitamin B ₇)	4,09 µM
Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	737,8 nM

ESP Ag Medium (SAG, Culture Collection of Algae at Goettingen University)

Kaliumnitrat (KNO ₃)	1,98 mM
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	114,8 µM
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	81,2 µM
Erdeextrakt	3%
Pepton	1 g/l
Agar	10 g/l
Mikronährstofflösung	0,5%

Mikronährstofflösung

Zinksulfat (ZnSO ₄)	6,19 µM
Mangan(II)-sulfat (MnSO ₄)	13,24 µM
Borsäure (H ₃ BO ₃)	161,75 µM
Cobalt(II)-nitrat (Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O)	3,44 µM
Natriummolybdat Dihydrat (Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O)	4,13 µM
Kupfersulfat Pentahydrat (CuSO ₄ x 5 H ₂ O)	20,02 nM
Eisen(II)-sulfat (FeSO ₄)	4,61 mM
Na ₂ EDTA	2,74 mM

NF2 Medium (Larsen et al., 1994)

Eisen(III)-chlorid (FeCl ₃)	3,7 µM
Natriumchlorid (NaCl)	427,8 µM
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	300,2 µM
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ x 2 H ₂ O)	173,4 µM
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	430 µM
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	550,4 µM
Erdeextrakt	3%

MV10 Medium (pH 7,7) (Christensen, 1982)

37% Meerwasser	27%
Erdeextrakt	2,5%
Tricin	2,79 mM
ES1 Stammlösung	2%
P2 Spurenmetalle Stammlösung	25%

ES1 Stammlösung (pH 7)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	41,27 mM
Natriumnitrat (NaNO ₃)	41,18 mM
Na ₂ -β-glycerophosphat x 5 H ₂ O	2,32 mM
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	674,3 μM
Eisen(III)-chlorid Hexahydrat (FeCl ₃ x 6 H ₂ O)	447,67 μM
Kaliumiodid (KI)	7,83 μM

P2 Spurenmetalle Stammlösung

Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	2,69 mM
Borsäure (H ₃ BO ₄)	18,5 mM
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat (MnCl ₂ x 4 H ₂ O)	727,6 μM
Eisen(III)-chlorid Hexahydrat (FeCl ₃ x 6 H ₂ O)	181,29 μM
Zinkchlorid (ZnCl ₂)	73,4 μM
Cobalt(II)-chlorid Hexahydrat (CoCl ₂ x 6 H ₂ O)	1,68 μM

4.1.2 Kits

Bezeichnung	Hersteller
TRIZOL Reagenz®	Sigma Aldrich
Spectrum™ Plant Total RNA-Kit	Sigma Aldrich
Qubit™ RNA BR Assay Kit	Invitrogen
DNase I, RNase-frei	Thermo Scientific

4.1.3 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
2D-Schüttler	GFL
Autoklav	Fedegari
Eismaschine	Ziegra
Feinwaage TE64	Sartorius
FluorCam FC 800MF	Photon Systems Instruments
Fluoreszenz-Mikroskop Eclipse Ti	Nikon
HPLC	Merck
JTS-10	BioLogic
Kreis-Schüttler 3005	GFL
LED Sunstrip	econlux
Lichtmikroskop Dialux 20EB	Leitz
Magnetrührer	IKAMAG®
Mastercycler Gradient	Eppendorf
Megafuge 1.0R	Heraeus
Mikroliterpipetten	Gilson
Mikrowelle Quick-Cookman	Deawoo
Mini-PAM; Photosynthesis Yield Analyzer	WALZ
Mini-Rocker MR-1	peQlab
Mini-Zentrifuge Galaxy MiniStar	VWR
pH-Meter	Schott
Qubit® 2.0 Fluorometer	Invitrogen
Sterilbank	Heraeus
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Transelectronenmikroskop EM902	Zeiss
Vortexer REAX top	Heidolph
Waage BL1500S	Sartorius
Zellzähler TC20™	Bio-Rad
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus

4.1.4 Organismen

Organismus	Herkunft
<i>Cyanophora paradoxa</i> (Glaukophyta)	SCCAP K-06262
<i>Porphyridium purpureum</i> (Rhodophyta)	SCCAP K-0515
<i>Guillardia theta</i> (Cryptophyta)	Philipps Universität Marburg
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Chloroplastida)	SCCAP K-1017
<i>Bigelowiella natans</i> (Chlorarachniophyta)	SCCAP K-0501
<i>Klebsormidium flaccidum</i> (Streptophyta)	SAG 2307

SCCAP – *Scandinavian Culture Collection of Algae & Protozoa*

SAG – *Culture Collection of Algae at Goettingen University*

Philipps Universität Marburg – Fachbereich Biologie, Zellbiologie und Angewandte Botanik,
Prof. Dr. Uwe G. Maier

4.1.4.1 *Chlamydomonas reinhardtii* FtsH-Überexpressionslinien

Die in dieser Arbeit analysierten *Chlamydomonas reinhardtii* FtsH-Überexpressionsmutanten wurden an der LMU München, Institut für Molekulare Pflanzenwissenschaften unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg Nickelsen hergestellt. Hierzu wurden das Kern-kodierte *ftsh2* aus *C. reinhardtii* sowie Plastiden-kodiertes *ftsh* aus der Xanthophyceae *Vaucheria litorea* über homologe Rekombination in das Plastidengenom des *C. reinhardtii* *Fud50*-Stamms eingebracht.

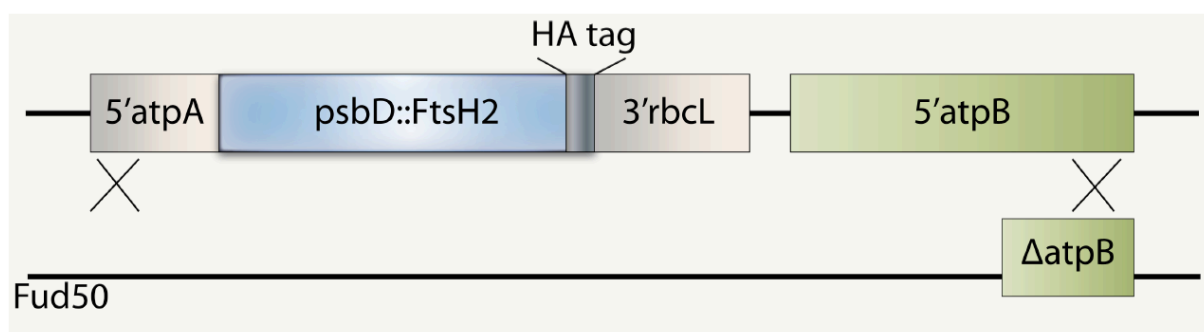


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des rekombinanten FtsH Konstrukts. Das Kern-kodierte *ftsh2* Gen aus *C. reinhardtii* wurde mit einem C-terminalen HA-Tag versehen und mithilfe von homologer Rekombination in das plastidäre Genom des *Chlamydomonas Fud50* Stamms eingebracht. Über eine Kompensation des defekten *atpB* Gens erfolgte unter photoautotrophen Bedingungen eine Selektion auf positive Transformanten (Janine Fürst-Jansen, Masterarbeit, 2018).

Dieser besitzt ein defektes *atpB* Gen, welches durch das rekombinante *ftsh*-Konstrukt komplementiert wird und auf diese Weise unter photoautotrophen Kultivierungsbedingungen eine Selektion auf positive Klone ermöglicht.

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Kultivierung

Die für die Transkriptomanalyse verwendeten Algenspezies wurden unter photoauto- bzw. mixotrophen Bedingungen und konstanten Temperaturen von 15 °C und 20 °C kultiviert. Die verwendeten Lichtintensitäten betragen jeweils $\sim 50 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ bei einem Tag/Nachtzyklus von 12h/12h.

Tabelle 4.1: Übersicht über die verwendeten Kultivierungsbedingungen

Organismus	Medium	Temperatur	Lichtintensität	Tag-/Nachtzyklus
<i>C. paradoxa</i>	NF2	15 °C	$\sim 50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	12h/12h
<i>P. purpureum</i>	MV10	15 °C	$\sim 50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	12h/12h
<i>G. theta</i>	F/2	15 °C	$\sim 50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	12h/12h
<i>C. reinhardtii</i>	NF2	15 °C	$\sim 50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	12h/12h
<i>B. natans</i>	TL30	20 °C	$\sim 50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	12h/12h
<i>K. flaccidum</i>	ESP Ag	20 °C	$\sim 50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	12h/12h

Die *C. reinhardtii* FtsH-Überexpressionsmutanten wurden in HSM Medium unter photoautotrophen Bedingungen und bei 15 °C kultiviert. Dabei waren sie konstanten Lichtintensitäten von $\sim 50 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Normallicht [L]) oder $650 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Starklicht [HL]) ausgesetzt.

4.2.1.2 RNA Isolation & DNase Behandlung

Die Isolation von RNA erfolgte innerhalb des 12h/12h Tag/Nachtzyklus jeweils nach 6 h Licht [L] und Dunkelheit [D] sowie nach 1 h Starklichtbehandlung mit $600 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [HL]. Im Fall von *C. paradoxa*, *P. purpureum*, *G. theta*, *C. reinhardtii* und *K. flaccidum* wurde die RNA unter Zuhilfenahme des Reagenz Trizol® extrahiert. Hierzu wurden je 50-200 ml Kultur bei Raumtemperatur (RT) pelletiert, in 500 μl Trizol resuspendiert und anschließend mithilfe eines Tenbroeck Homogenisators für 5 min homogenisiert.

Darauf folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 12.000xg für 10 min. Der klare Überstand wurde abgenommen, mit 100 µl Chloroform versetzt und mittels Vortexer für etwa 30 s gemixt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde das Gemisch bei 4 °C und 12.000xg für 15 min zentrifugiert. Schließlich wurde durch die Zugabe von 250 µl Isopropanol die RNA aus dem Überstand gefällt und nach einer erneuten Zentrifugation das entstandene Pellet mit 75%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das RNA Pellet in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und durch eine Inkubation bei 58 °C für 10 min gelöst. Die Extraktion von RNA aus *B. natans* erfolgte dagegen mithilfe des Spectrum™ Plant Total RNA Kits nach Herstellerangaben (Protokoll A).

Nach einer Konzentrationsbestimmung mit dem Qubit™ RNA BR Assay, erfolgte eine DNase Behandlung um Kontaminationen mit genomischer DNA zu entfernen. Hierzu wurde die DNase I und das entsprechende Herstellerprotokoll verwendet. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte schließlich bei -80 °C.

4.2.1.3 Photometrische Messungen

Die Messungen der Chlorophyll a Fluoreszenz im Rahmen der Transkriptomanalyse wurden mithilfe der FluorCam FC 800MF durchgeführt. Das Messlicht wurde hier aus moduliertem Rotlicht mit einer Intensität von weniger als 0,1 µmol Photonen m⁻²s⁻¹ und die Sättigungsimpulse durch intensives Blaulicht mit einer Stärke von mehr als 8.000 µmol Photonen m⁻²s⁻¹ generiert. Für die Messung wurden die entsprechenden Proben zunächst für 5 min dunkel-adaptiert und anschließend steigenden Lichtintensitäten (13, 48, 122, 160, 200, 235, 305, 375, 542, 670 µmol Photonen m⁻² s⁻¹) ausgesetzt. Neben einer Bestimmung der Grundfluoreszenz (F₀) konnte hierbei mithilfe von regelmäßigen Sättigungsimpulsen die maximale Fluoreszenz (F_m) bestimmt werden. Anhand dieser Messwerte war es möglich, die maximale photochemische Effizienz des PSII (F_v/F_m), die relative Elektronentransportrate (rETR) sowie die nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung (NPQ) zu ermitteln:

$$\text{ETR} = (\text{Fq}'/\text{Fm}') \times \text{PAR}$$

$$\text{NPQ} = (\text{Fm} - \text{Fm}') / \text{Fm}'$$

Die Messungen der Chlorophyll a Fluoreszenz der *C. reinhardtii* FtsH-Überexpressionslinien wurden im Institut für Photosynthese und Stressphysiologie der Pflanzen unter der Leitung von Prof. Dr. Jahns durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das JTS-10 Spektrophotometer verwendet.

Die jeweiligen Kulturen wurden vor jeder Messung auf eine Zelldichte von 1×10^6 eingestellt und für 30 min dunkel-adaptiert. Pro Messung wurden 2 ml Kultur verwendet, welche mithilfe einer Vakuumpumpe auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran übertragen wurden. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 20 min bei konstanten Lichtintensitäten von 82, 170, 560 und $940 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, gefolgt von einer dunklen Relaxionsphase von 10 min.

4.2.1.4 Transelektronenmikroskopie

Für die Aufnahmen mit dem Transelektronenmikroskop wurden Kulturen mit einer Zelldichte von $2-3 \times 10^6$ Zellen/ml verwendet. Diese wurden zunächst bei 800xg pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Fixierung mit 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer für 2-3 Tage bei 4 °C. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Pellets viermal für mindestens 10 min mit 0,1 M Cacodylat-Puffer gewaschen, wobei die Zentrifugation für 2 min bei 13.000 rpm erfolgte. Danach wurden die Zellpellets zur Kontrastierung mit 2% Osmium(VIII)-oxid + 0,8% Kaliumhexacyanoferrat versetzt und nach einer Inkubationszeit von mindestens 1 h bei RT erneut etwa fünfmal mit 0,1 M Cacodylat gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3,5% Agarose und nach vorsichtiger Resuspension eine Inkubation auf Eis für mindestens 10 min. Nach Erhärtung der Agarose konnten mithilfe einer Guillotine die Spitzen der Eppendorfgefäße abgetrennt und die eingebetteten Pellets in spezielle Glasgefäße überführt werden. Nachfolgend wurden diese durch eine Waschreihe mit aufsteigenden Ethanolkonzentrationen dehydriert:

Konzentration	Dauer
60% Ethanol	1x 10 min
70% Ethanol	2x 10 min
80% Ethanol	2x 10 min
90% Ethanol	2x 10 min
100% Ethanol	1x 10 min
100% Ethanol + Molekularsieb	1x 10 min
Propylenoxid	1x 30 min

Im Anschluss wurden die Pellets mit einem Gemisch aus Epoxidharz (Epon) und Propylenoxid versetzt, wobei der Anteil an Epon stetig erhöht wurde. Auf ein anfängliches Verhältnis von Epon/Propylenoxid von 1:2 und einer Inkubation von 1 h bei RT, folgte ein 1:1 Verhältnis mit erneuter einstündiger Inkubationszeit.

Schließlich wurde die Konzentration von Epon auf 2:1 erhöht und die Pellets mit dieser Mixtur über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellpellets mit purem Epon versetzt und für 4 h unter Vakuum inkubiert, wodurch verbleibender Sauerstoff komplett entzogen wurde. Schließlich wurden die getrockneten Pellets in ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten und zusammen mit frischem Epon auf spezielle Einbettungs-Matten gegeben, welche zunächst für 24 h bei 40 °C und anschließend für 24 h bei 60 °C inkubiert wurden. Nachdem die Proben mithilfe eines Ultramikrotoms geschnitten wurden, konnten sie schließlich auf spezielle Gitternetze platziert und unter dem Transelektronenmikroskop (Zeiss EM902) untersucht werden.

4.2.1.5 HPLC

Für eine Analyse der jeweiligen Pigmentkompositionen wurde eine Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) durchgeführt. Hierzu wurden je 50 ml Kultur pelletiert und in 100%igem Aceton resuspendiert. Nach einer Inkubation bei -20 °C über Nacht wurden die Proben erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und schließlich zur Bestimmung der absoluten Zellmasse herangezogen. Der Überstand wurde durch eine 200 nm PTFE (Polytetrafluoroethylen) Membran gefiltert und schließlich mittels HPLC mit einem (UV/VIS) Spektroskopie Detektor (Hitachi/Merck) untersucht. Die Identifizierung einzelner Pigmente erfolgte hierbei mithilfe externer Standards.

4.2.2 Bioinformatische Methoden

4.2.2.1 Qualitätskontrolle und Säuberung der RNA-Rohsequenzen

Die RNA-Sequenzierung wurde durch das Beijing Genome Institut (BGI) in Hong Kong durchgeführt, wobei pro Probe biologische Triplikate analysiert wurden. Hierzu wurde die Illumina HiSeq2000 Methode verwendet, wobei 150 bp lange *paired-end* Sequenzen entstanden, welche durch das BGI bereits auf einen minimalen Anteil von 95% eindeutiger Nukleotide gefiltert wurden. Weiterhin wurden Sequenzen aussortiert, bei welchen mehr als 20% der Nukleotide einen Qualitätswert von unter 10 aufwiesen. Basierend auf einer ersten Qualitätskontrolle der erhaltenen Rohdaten mithilfe des Programms FASTQC (Babraham Bioinformatics) wurden die Sequenzen weiteren Filterungsschritten unterzogen. Hierzu gehörte die Entfernung von Adaptersequenzen (ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE-2.fa:2:30:10) und der ersten 10 Basenpaare (HEADCROP:10) sowie Sequenzabschnitten mit einem Qualitätswert von unter 15 (LEADING:15; TRAILING:15; SLIDINGWINDOW:4:15) mittels des Programms Trimmomatic (v. 0.35) (Bolger et al., 2014). Gleichzeitig wurden Sequenzen aussortiert, welche kleiner als 25 bp (MINILEN:25) lang waren.

Im nächsten Schritt wurden mithilfe des Programms Prinseq-lite (v. 0.20.4) (Schmieder & Edwards, 2011) Poly-A/T Schwänze mit 5 oder mehr Nukleotiden entfernt (`trim_tail_left 5; trim_tail_right 5`). Die gesäuberten Rohsequenzen wurden in der SRA Datenbank des NCBI unter den Zugriffsnummern PRJNA400667, PRJNA509798 und PRJNA634446 hinterlegt.

4.2.2.2 De novo Rekonstruktion und Quantifizierung

Zur weiteren Analyse der Sequenzierungsdaten wurde unter Zuhilfenahme der Trinity Software (v. 2.2.0) (Grabherr et al., 2011) eine quantitative Bestimmung von Expressionsmustern durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Normalisierung der Sequenzen nach einer minimalen Abdeckung (*coverage*) von 30% (`insilico_read_normalization.pl --max_cov 30 --pairs_together --PARALLEL_STATS`). Anschließend wurde anhand aller gesäuberten Sequenzen ein Referenzgenom erstellt (`trinity.pl`), welches mithilfe eines betriebsinternen Perl-Skripts nach einer minimalen Transkriptlänge von 300 bp gefiltert wurde. Im nächsten Schritt wurden mithilfe der RSEM Methode die individuellen Sequenzen der jeweils untersuchten Bedingungen – Dunkelheit, Normallicht und Starklicht – mit dem erstellten Referenzgenom abgeglichen (`align_and_estimate_abundance.pl --est_method RSEM --aln_method bowtie --trinity_mode --prep_reference`), was eine Quantifizierung einzelner Transkripte ermöglichte (`abundance_estimates_to_matrix.pl --est_method RSEM`). Schließlich wurden durch paarweise Vergleiche zwischen den analysierten Konditionen diejenigen Sequenzen identifiziert, welche eine differenzielle Expression aufwiesen (`run_DE_analysis.pl --method edgeR`). Hierbei diente ein minimaler *fold change* von 4 sowie ein Signifikanzwert von 0,001 als Schwellenwert (`analyze_diff_expr.pl -C 2 -P 0.001`). Abschließend wurden diese Transkripte nach einer minimalen Summe von 150 Rohsequenzen gefiltert.

4.2.2.3 Annotierung und funktionale Analysen

Weiterhin wurden mithilfe des Programms Transdecoder (v. 3.0.1) (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder/wiki>) offene Leseraster (ORF) identifiziert (`TransDecoder.LongOrfs`), welche anschließend unter Zuhilfenahme der Pfam-Datenbank (El-Gebali et al., 2019) und des *Hidden Markov Models* (HMM) (<http://hmmer.org>) mit bekannten Proteinfamilien abgeglichen wurden (`hmmsearch PfamA.hmm longest_orfs.pep`). Die auf diese Weise identifizierten Proteinsequenzen wurden schließlich mithilfe von BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al., 1997) und den jeweiligen Referenzgenomen der untersuchten Organismen sowie einer Datenbank aus verschiedenen photosynthetischen

Organismen annotiert, wobei ein maximaler E-Wert von 10^{-10} sowie eine minimale lokale Identität von 30% vorausgesetzt wurden (`blastp -evalue 1e-10 -qcov_hsp_perc 30`). Eine funktionale Kategorisierung der identifizierten Proteine erfolgte mithilfe der EggNOG Datenbank (v. 4.5.1) (Huerta-Cepas et al., 2016). Weiterhin wurde unter Zuhilfenahme des KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) Mappers (Kanehisa & Sato, 2020) eine Analyse der zugehörigen biologischen Prozesse durchgeführt. Hierbei wurden den identifizierten Proteinsequenzen zunächst mittels BlastKOALA (KEGG *Orthology and Links Annotation*) (Kanehisa et al., 2016) die entsprechenden KO (KEGG *Orthology*) Nummern zugewiesen, welche im nächsten Schritt mithilfe des *Reconstruct Pathway* den verschiedenen zellulären Prozessen zugeordnet wurden.

5. Ergebnisse

5.1 Analyse von Lichtstressreaktionen innerhalb der Archaeplastida

Für eine detaillierte und vergleichende Analyse der molekularen Lichtstressreaktionen wurden verschiedene Repräsentanten der Archaeplastida ausgewählt (Tab. 5.1). Hierzu zählen drei Spezies der primären Linie: (1) die zu der Glaukophyta gehörende Alge *Cyanophora paradoxa*, (2) die zu der Rhodophyta (Rotalgen) zählende Alge *Porphyridium purpureum* und (3) *Chlamydomonas reinhardtii*, welche der Chloroplastida (Grünalgen) zugeordnet wird. Zudem wurden zwei weitere Spezies untersucht, welche aus einer sekundären Endosymbiose hervorgingen: (4) die zu der Chlorarachniophyta gehörende Alge *Bigelowiella natans* sowie (5) *Guillardia theta*, welche zu der Cryptophyta gezählt wird und (6) *Klebsormidium flaccidum*, welche der Streptophyta zugeordnet wird und somit als nahe Verwandte der Landpflanzen gilt. Sowohl *C. paradoxa* und *C. reinhardtii* als auch beide sekundäre Algen sind einzellige, Flagellen-tragende Spezies. Während beide primäre Algen allerdings hauptsächlich in kleinen Süßgewässern zu finden sind, kommen *G. theta* und *B. natans* vor allem in Küstenregionen vor. Dagegen bewohnen die einzellige Rotalge *P. purpureum* sowie die mehrzellige Streptophyte *K. flaccidum* sowohl stehende und fließende Süßgewässer als auch feuchte terrestrische Gebiete.

Zu allen Spezies liegen vollständig sequenzierte Genome vor (Tab. 5.1), wobei beide sekundäre Algen eine gesonderte Position einnehmen, da sie im Gegensatz zu den primären Spezies und *K. flaccidum* ein viertes Genom besitzen, welches ein Relikt des ursprünglichen Zellkerns des Endosymbionten darstellt (Cavalier-Smith, 2002; Curtis et al., 2012). Ein Vergleich der jeweiligen Kerngenome zeigt, dass die Glaukophyte sowie beide sekundäre Algen mit über 20.000 Protein-kodierenden Genen eine erhöhte Kapazität aufweisen. Zudem besitzen *C. paradoxa* und beide Vertreter der Rhodophyta eine erhöhte Kapazität des Plastidengenoms. Weiterhin variieren diese Spezies in ihrer Pigmentzusammensetzung und verwenden unterschiedliche Antennenkomplexe zur Lichtabsorption. Während *C. paradoxa* ausschließlich Phycobilisome (PBS) besitzt (Steiner & Löffelhardt, 2011), welche auf den cyanobakteriellen Vorfahren zurückzuführen sind (Apt et al., 1995), sind in der primären Rotalge *P. purpureum* neben PBS ebenfalls LHC Proteine zu finden (Gantt et al., 2003). Die sekundäre Rotalge *G. theta* dagegen verwendet neben Chlorophyll a/c bindenden LHC Komplexen (Macpherson & Hiller, 2003) eine modifizierte Variante der Phycobiliproteine, welche spezifisch für die Cryptophyta ist (Spear-Bernstein & Miller, 1989; Glazer & Wedemayer, 1995).

Tabelle 5.1: Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den analysierten Spezies in Bezug auf Genomkapazität, photosynthetische Antennenkomplexe, Thylakoidorganisation und Speicherkohlenstoffe.

Organismus	Protein-kodierende Gene		Antennen Proteine	Chlorophylle	Pigmente	Thylakoid Organisation	Speicherkohlenstoff	Speicherort		
<i>Cyanophora paradoxa</i> (Glaukophyta)	Nukleus	Plastid	Mitochondrium	Nukleomorph						
	27.921 ¹	149 ²	44 ¹		Phycobilisome (PBS)	a	β -Carotin, Zeaxanthin	einzel, ungestapelt	floride Stärke	Cytosol
<i>Porphyridium purpureum</i> (Rhodophyta)	9.8981 ³	199 ⁴	n.d.		Phycobilisome (PBS) + LHC Proteine	a	β -Carotin, Zeaxanthin	einzel, ungestapelt	floride Stärke, Glykogen	Cytosol
<i>Guillardia theta</i> (Cryptophyta)	24.840 ⁵	145 ⁵	36 ⁵	487 ⁵	Phycobiliproteine (PBP) + LHC Proteine	a, c	α -Carotin, Alloxanthin	gestapelt	Stärke	perplastidäres Kompartiment
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Chloroplastida)	14.411 ⁶	69 ⁶	8 ⁶		LHC Protein Komplex	a, b	β -Carotin, Lutein, Neoxanthin, Violaxanthin, Antheraxanthin, Zeaxanthin	gestapelt	Stärke	Plastid
<i>Bigeloviella natans</i> (Chlorarachniophyta)	21.708 ⁵	57 ⁵	34 ⁵	284 ⁵	LHC Protein Komplex	a, b	β -Carotin, Lutein, Neoxanthin, Violaxanthin, Antheraxanthin, Zeaxanthin	gestapelt	Chrysolaminarin	Vakuole
<i>Klebsormidium flaccidum</i> (Streptophyta)	16.063 ⁷	117 ⁷	35 ⁷		LHC Protein Komplex	a, b	β -Carotin, Lutein, Neoxanthin, Violaxanthin, Antheraxanthin, Zeaxanthin	gestapelt, Grana	Stärke	Plastid

[1] Price et al. "Cyanophora paradoxa genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants." (2012)

[2] Sirewait et al. "Nucleotide sequence of the cyanelle genome from *Cyanophora paradoxa*." (1995)

[3] Bhattacharya et al. "Genome of the red alga *Porphyridium purpureum*." (2013)

[4] Guici "Characterization of the complete plastid genome of *Porphyridium purpureum* strain CCMP-1328." (2017)

[5] Curtis et al. "Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs." (2012)

[6] Merchant et al. "The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant function." (2007)

[7] Hori et al. "Klebsormidium flaccidum genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation." (2014)

Die Vertreter der Chloroplastida besitzen indes ausschließlich Chlorophyll a/b bindende LHC Proteinkomplexe (Dekker & Boekema, 2005). Zusätzlich unterscheiden sich die untersuchten Algen in ihren jeweiligen Speicherkohlenhydraten (Kim & Archibald, 2009; Suzuki & Suzuki, 2013) sowie ihrer ultramolekularen Organisation der Thylakoidmembran. In *Cyanophora* und *Porphyridium* liegt die Thylakoidmembran einzeln und ungestapelt vor, wogegen die sekundäre Rotalge sowie die Vertreter der Chloroplastida dichter gepackte Thylakoidstapel unterschiedlicher Anzahl aufweisen (Gibbs, 1970; Kirchhoff, 2019).

5.1.1 Vertreter der Chloroplastida zeigten eine erhöhte PSII Effizienz sowie NPQ Kapazität

Zu Beginn wurde mithilfe photometrischer Messungen der Einfluss von steigenden Lichtintensitäten auf die photosynthetischen Prozesse der verschiedenen Spezies ermittelt. Der Fv/Fm Wert beschreibt hierbei die maximale photochemische Effizienz des Photosystem II und gibt somit Aufschluss über die Lichtabsorption der PSII Antennenkomplexe (Kitajima & Butler, 1975; Baker, 2008).

Unter dunkel-adaptierten Bedingungen zeigte die Rotalge *P. purpureum* mit etwa 0,3 den geringsten Fv/Fm Wert, gefolgt von *C. paradoxa* und der sekundären Rotalge *G. theta* (Abb. 5.1). Alle Vertreter der Chloroplastida wiesen dagegen eine höhere PSII Effizienz auf, wobei die Streptophyte *K. flaccidum* mit etwa 0,7 den höchsten Fv/Fm Wert zeigte. Mit steigender Lichtintensität sank die Aufnahmefähigkeit des PSII bei allen untersuchten Organismen stetig bis auf unter 0,2, wobei sich bei Intensitäten von über $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ein Plateau ausbildete. Eine Ausnahme stellte hierbei die Glaukophyte *C. paradoxa* dar. Im Gegensatz zur roten und grünen Linie zeigte diese zunächst einen Anstieg der PSII Effizienz. Zusätzlich wurde die relative Elektronentransportrate (rETR) bestimmt. Mit erhöhter Lichtstärke stieg auch die Rate des Elektronentransports, bis dieser ebenfalls ab einer Intensität von etwa $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ relativ konstante Werte aufwies. Allein in *Guillardia* und *Chlamydomonas* war bei über $550 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ eine leichte Steigerung der rETR zu erkennen, während in *Cyanophora* und *Klebsormidium* ein geringer Abfall zu verzeichnen war. Mit Werten von über 80 besaßen *G. theta* und *K. flaccidum* die höchsten rETR Werte, wogegen die sekundäre Grünalge mit ca. 50 die geringste Transportrate aufwies. Schließlich wurde die Kapazität von NPQ Mechanismen bestimmt, welche mit steigender Lichtintensität ebenso zunahm. Hierbei zeigten alle Vertreter der Chloroplastida mit 0,9 – 1,2 die höchsten maximalen Werte, wobei in *C. paradoxa* und *P. purpureum* kaum NPQ ausgebildet wurde. Interessanterweise zeigte *Cyanophora* zunächst einen deutlichen Abfall des NPQ in den negativen Bereich. Erst bei Lichtintensitäten von über $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ konnten hier positive Werte verzeichnet werden.

K. flaccidum wies im Vergleich zu den anderen Grünalgen eine verzögerte NPQ Aktivierung auf. Während *C. reinhardtii* und *B. natans* bereits bei etwa $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ positive NPQ Werte zeigten, erfolgte dies in der Streptophyte erst bei Lichtstärken von über $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

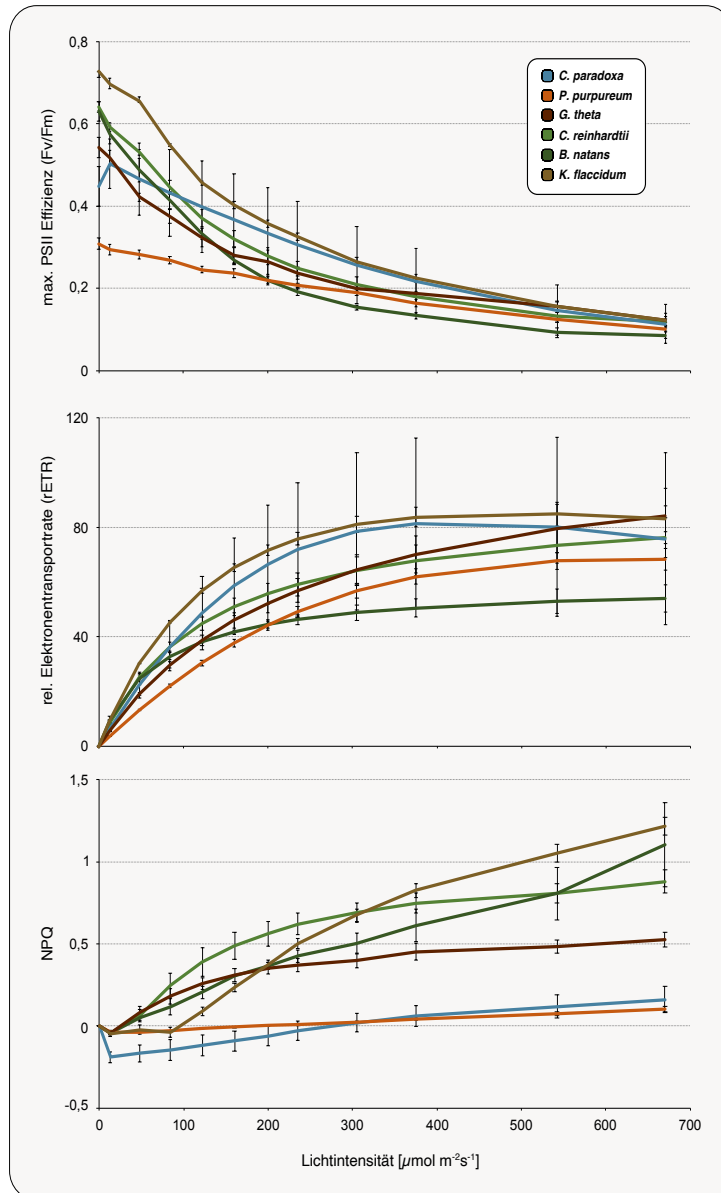


Abbildung 5.1: Fv/Fm, rETR und NPQ. Die analysierten Spezies wurden unter steigenden Lichtintensitäten hinsichtlich ihrer maximalen photochemischen Effizienz des PSII (Fv/Fm) (*oben*), der relativen Elektronentransportrate (rETR) (*Mitte*) (verändert nach Knopp et al., 2020) und der nicht-photochemischen Löschung der Chlorophyll a Fluoreszenz (NPQ) (*unten*) untersucht. Obwohl alle Organismen hierbei grundsätzlich einen klaren Abfall der Fv/Fm Werte aufwiesen, war bei niedrigen Lichtintensitäten in der Glaukophyte zunächst ein Anstieg der PSII Effizienz zu erkennen. Dagegen war bei hohen Lichtintensitäten eine Steigerung der rETR sowie des NPQ zu verzeichnen. Hierbei zeigten alle Vertreter der Chloroplastida deutlich höhere maximale NPQ Werte als *Cyanophora* und die Vertreter der Rhodophyta.

5.1.2 Vertreter der Chloroplastida zeigten eine Licht-induzierte Auflösung ihrer Thylakoidstruktur

Die Organisation der Thylakoidmembran spielt gerade bei höheren Pflanzen eine wichtige Rolle im Hinblick auf eine hocheffiziente Photosyntheseleistung (Mullineaux, 2005). Mithilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde bei unterschiedlichen Lichtbedingungen – Dunkelheit ($0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), Normal- ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) sowie Starklicht ($600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) – eine morphologische Untersuchung der Plastiden und ihrer Thylakoidstruktur durchgeführt.

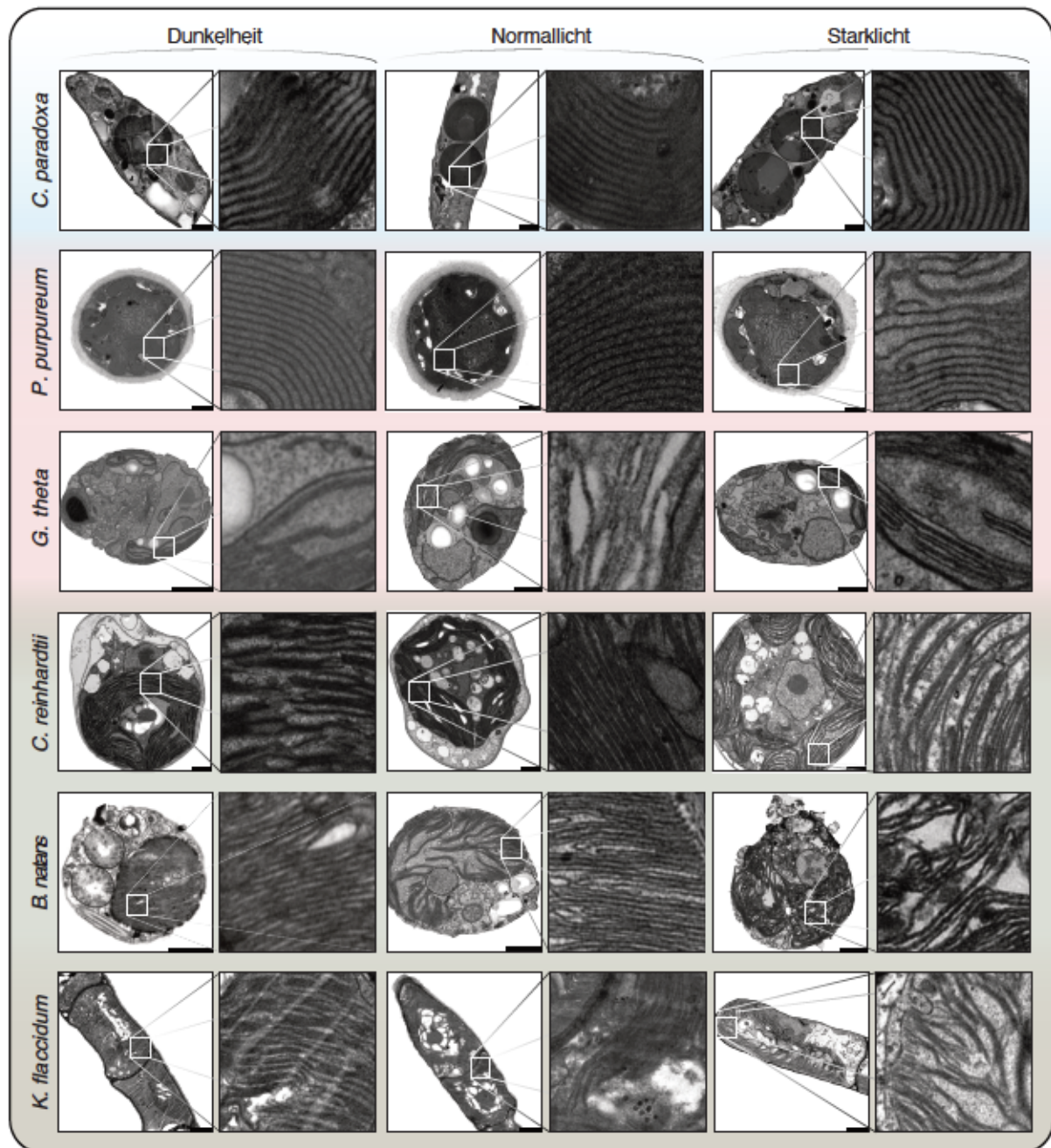


Abbildung 5.2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der analysierten Algen unter verschiedenen Lichtbedingungen. Bei Dunkelheit ($0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) sowie unter Normallichtbedingungen ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) wiesen die sekundäre Rotalge *G. theta* und alle Vertreter der Chloroplastida unterschiedlich dicht gepackte Thylakoidstapel auf, wogegen die Thylakoidmembran in *C. paradoxa* und *P. purpureum* einzeln und ungestapelt vorlag. Unter Starklichtbedingungen ($600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) war weder in *Cyanophora* noch in den beiden Rotalgen eine Veränderung der Thylakoidorganisation zu erkennen, während die Chloroplastida eine deutliche Auflösung ihrer Thylakoidstruktur aufwies. Skalierung: $1\mu\text{m}$ (verändert nach Knopp et al., 2020).

Grundsätzlich wiesen die sekundäre Rotalge *G. theta* sowie die Vertreter der Chloroplastida dicht gepackte Thylakoidstapel auf, wogegen eine derartige Organisation in *C. paradoxa* und der primären Rotalge *Porphyridium* nicht erkennbar war (Abb. 5.2). Unter Starklichtbedingungen war allerdings eine eindeutige Auflösung dieser Thylakoidstruktur in der grünen Linie ersichtlich, wobei die Glaukophyte sowie die Vertreter der Rhodophyta keine Veränderungen innerhalb der Membranorganisation zeigten.

5.1.3 Analyse von Licht-abhängigen Veränderungen der Pigmentkomposition

Zur Bestimmung von möglichen Licht-induzierten Veränderungen in der Pigmentzusammensetzung wurde mittels HPLC eine Analyse des Pigmentgehalts in den verschiedenen Algen durchgeführt. Alle drei Vertreter der Chloroplastida wiesen dabei eine identische Pigmentzusammensetzung auf, wogegen in der Glaukophyte und den Rotalgen – insbesondere bei *G. theta* – eindeutige Unterschiede zu erkennen waren (Tab. 5.2). Während die drei Grünalgen sowohl Chlorophyll a als auch b besitzen, liegt in *Cyanophora* und *Porphyridium* lediglich Chlorophyll a vor. Die sekundäre Rotalge besitzt dagegen zusätzlich Chlorophyll c. Neben Zeaxanthin, welches mit Ausnahme von *Guillardia* in allen untersuchten Organismen vorkommt, besitzen *C. reinhardtii*, *B. natans* und *K. flaccidum* zusätzlich die Xanthophylle Neoxanthin, Violaxanthin und Antheraxanthin. *G. theta* weist stattdessen das Pigment Alloxanthin auf. Bei den Carotinoiden stellt *Guillardia* ebenfalls eine Ausnahme dar. Anstelle von β -Carotin, besitzt diese α -Carotin.

Tabelle 5.2: Pigmentzusammensetzung der untersuchten Algenspezies.

Organismus	Chlorophylle			Xanthophylle					Carotinoide	
	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Chlorophyll c	Violaxanthin	Antheraxanthin	Zeaxanthin	Neoxanthin	Alloxanthin	α -Carotin	β -Carotin
<i>Cyanophora paradoxa</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Porphyridium purpureum</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Guillardia theta</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
<i>Bigelowiella natans</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
<i>Klebsormidium flaccidum</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+

Zusätzlich wurde eine quantitative Analyse der Pigmentzusammensetzung bei unterschiedlichen Lichtbedingungen ($0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [D]; $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [L]; $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [HL]) durchgeführt. Hierbei war zu erkennen, dass die beiden Grünalgen *C. reinhardtii* und *B. natans* grundsätzlich einen deutlich höheren Anteil an Chlorophyll a sowie b aufwiesen (Abb. 5.3A). Ein Vergleich zwischen den untersuchten Lichtverhältnissen zeigte allerdings allein bei *Porphyridium* und *Bigelowiella* einige signifikante Unterschiede. Während die Rotalge bei Dunkelheit deutlich mehr Chlorophyll a besaß, zeigte *Bigelowiella* unter Starklichtbedingungen einen eindeutig geringeren Anteil sowohl an Chlorophyll a als auch b.

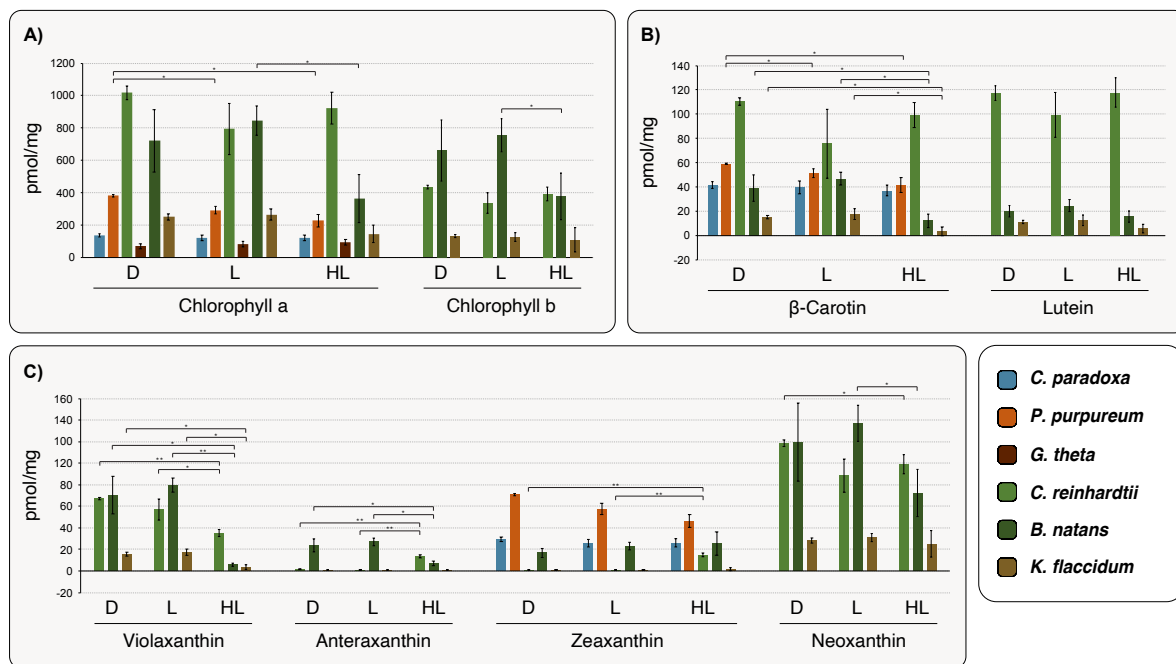


Abbildung 5.3: Analyse der Pigmentkompositionen bei unterschiedlichen Lichtbedingungen.

(A) Bestimmungen des Chlorophyllgehalts zeigten grundsätzlich erhöhte Chlorophyll a und b Konzentrationen in *C. reinhardtii* und *B. natans*. Gleichzeitig waren in der primären Rotalge *P. purpureum* bei Dunkelheit ($0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [D]) deutlich höhere Chlorophyll a Konzentrationen zu verzeichnen, während *B. natans* unter Starklicht ($600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [HL]) weniger Chlorophyll a als auch b aufwies. (B) Messungen des Gehalts an β -Carotin zeigten bei exzessiver Lichteinstrahlung in *B. natans* sowie *K. flaccidum* deutlich verringerte Werte. In der primären Rotalge waren die Konzentrationen sowohl unter Normal- ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [L]) als auch Starklicht deutlich reduziert. Dagegen zeigte die Bestimmung der Luteinkonzentrationen keine Licht-abhängigen Veränderungen. (C) Messungen der Xanthophyllkonzentrationen zeigten in allen Vertretern der Chloroplastida eine Licht-induzierte Umwandlung von Violaxanthin, wobei allerdings unter Starklicht nur in *C. reinhardtii* eine eindeutige Zunahme des Gehalts an Zeaxanthin zu verzeichnen war. Zusätzlich war in beiden einzelligen Grünalgen ein Licht-induzierter Abbau von Neoxanthin zu erkennen (verändert nach Knopp et al., 2020).

Bei den Carotinoiden war in der primären Grünalge ebenfalls ein erhöhter Pigmentanteil auszumachen (Abb. 5.3B). Die Glaukophyte sowie *C. reinhardtii* wiesen hierbei nur geringfügige Unterschiede auf, wogegen *P. purpureum*, *B. natans* und *K. flaccidum* Licht-abhängige Veränderungen zeigten. Während die Rotalge bei Dunkelheit deutlich mehr β -Carotin besaß, war in *Bigelowiella* und *Klebsormidium* unter Starklicht weniger β -Carotin vorhanden. Die zum Xanthophyll-Zyklus gehörenden Pigmente Viola-, Antera- und Zeaxanthin waren lediglich in den Vertretern der Chloroplastida ausnahmslos vorhanden (Abb. 5.3C). Während dabei der Licht-induzierte Abbau von Violaxanthin in allen drei Linien sehr klar zu erkennen war, zeigte unter Starklicht lediglich *Chlamydomonas* einen deutlich erhöhten Anteil an Zeaxanthin. Im Gegensatz dazu zeigte die primäre Rotalge bei Dunkelheit einen erhöhten Anteil an Zeaxanthin, wobei *Porphyridium* generell einen hohen Anteil dieses Pigments aufwies. Das nur in der Chloroplastida vorkommende Xanthophyll Neoxanthin zeigte sowohl in *Chlamydomonas* als auch *Bigelowiella* eine Licht-abhängige Veränderung. Während die primäre Grünalge bei Dunkelheit mehr Neoxanthin aufwies, war es in der sekundären Grünalge unter Starklicht deutlich weniger.

5.2 Analyse von Lichtstressreaktionen auf transkriptioneller Ebene

Weiterhin wurden die Lichtstressreaktionen der verschiedenen Algen auf transkriptioneller Ebene untersucht. Hierzu wurden bei unterschiedlichen Lichtbedingungen RNA Proben entnommen und mithilfe von bioinformatischen Methoden analysiert (Tab. 5.3).

Tabelle 5.3: Übersicht über die Transkriptomanalyse.

Organismus	<i>Cyanophora paradoxa</i>	<i>Porphyridium purpureum</i>	<i>Guillardia theta</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Bigelowiella natans</i>	<i>Klebsormidium flaccidum</i>
Rohsequenzen	2x 101.640.264	2x 99.381.845	2x 87.339.268	2x 96.612.850	2x 94.335.188	2x 98.651.101
≥ 30% Abdeckung	2x 5.796.233	2x 3.592.549	2x 6.054.741	2x 5.060.279	2x 6.665.755	2x 8.788.270
Transkripte	97.730	67.745	160.956	102.603	199.501	252.932
≥ 300 bp/Transkript	79.440	41.347	137.966	76.337	164.869	177.835
differenziell exprimiert (≥ log ₂ 2)	1.593 (2%)	99 (0,2%)	115 (0,08%)	3.121 (4,1%)	10.209 (6,2%)	877 (0,5%)
≥ 150 Rohsequenzen/Transkript	1.087 (1,4%)	96 (0,2%)	115 (0,08%)	2.515 (3,3%)	9.392 (5,7%)	864 (0,5%)
Blast Treffer	739 (0,9%)	48 (0,1%)	78 (0,06%)	1.691 (2,2%)	7.108 (4,3%)	559 (0,3%)

Zunächst wurden die erhaltenen Rohsequenzen nach einer minimalen Abdeckung (*coverage*) von 30% gefiltert, wobei über 90% der Sequenzen aussortiert wurden. Anschließend wurde anhand der verbleibenden Sequenzen ein Referenzgenom erstellt, welches nach einer minimalen Sequenzlänge von 300 bp gefiltert wurde. Die geringste Anzahl an identifizierten Transkripten wies hierbei mit 41.347 die Rotalge *Porphyridium purpureum* auf. Darauf folgten mit 76.337 und 79.440 die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* und die Glaukophyte *Cyanophora paradoxa*. Die aus einer sekundären Endosymbiose hervorgegangen Algen *Guillardia theta* und *Bigeloviella natans* wiesen dagegen eine Genomgröße von 137.966 und 164.869 auf und die höchste Anzahl an Transkripten zeigte mit 177.835 die mehrzellige Streptophyte *Klebsormidium flaccidum*. Im nächsten Schritt wurden die anfänglich identifizierten Sequenzen der jeweils analysierten Lichtbedingungen ($0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [D]; $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [L]; $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [HL]) mit dem erstellten Referenzgenom abgeglichen um eine quantitative Expressionsanalyse der einzelnen Transkripte zu ermöglichen. Hierdurch war es möglich diejenigen Sequenzen zu identifizieren, welche eine signifikante Veränderung ihrer Expressionsrate bei einer der untersuchten Konditionen zeigten. Abschließend wurden diese Transkripte nach einer minimalen Anzahl von 150 Rohsequenzen pro Transkript gefiltert sowie diejenigen Sequenzen aussortiert, welche keine Blast Treffer aufwiesen.

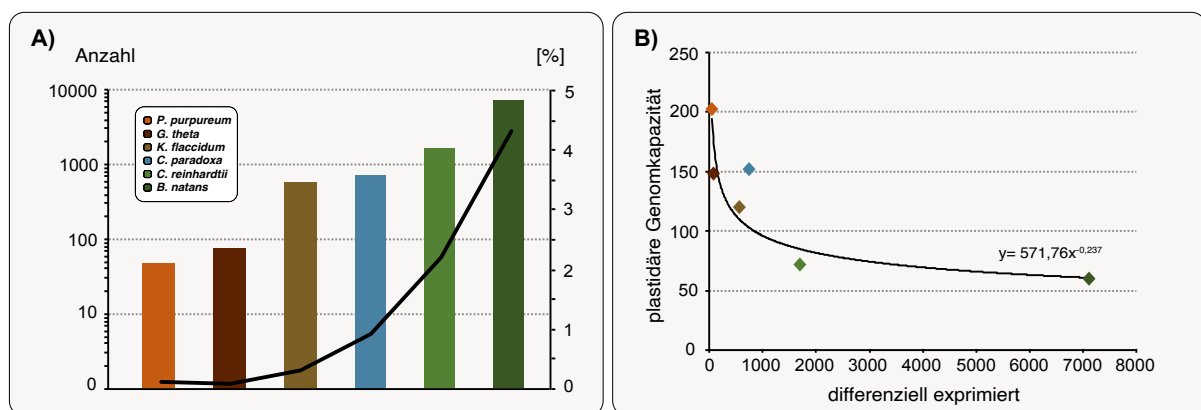


Abbildung 5.4: Anzahl/Anteil an differenziell exprimierten Genen und deren Korrelation mit den jeweiligen Plastomkapazitäten. (A) Beide Rotalgen wiesen mit weniger als 100 Transkripten eine deutlich geringere Anzahl an differenziell exprimierten Genen auf als die Glaukophyte und die Vertreter der Chloroplastida. Gemessen an der Gesamt-Transkriptmenge stieg der Anteil an Genen mit signifikanten Expressionsunterschieden von etwa 0,1% in *P. purpureum* und *G. theta* auf über 4% in der sekundären Grünalge *B. natans*. (B) Ein Vergleich mit den jeweiligen Plastomkapazitäten der analysierten Algen wies hierbei eine deutliche negative Korrelation auf. Je größer die plastidäre Genomkapazität desto geringer die Anzahl an differenziell exprimierten nuklearen Genen.

Die Anzahl an Transkripten mit signifikanten Expressionsunterschieden zeigte bei den analysierten Organismen eindeutige Unterschiede. Während in den Rotalgen *P. purpureum* und *G. theta* nur 48 bzw. 78 Transkripte eine Licht-abhängige Expression aufwiesen war es mit 559 und 739 Transkripten bei *K. flaccidum* und *C. paradoxa* etwa die zehnfache Menge (Abb. 5.4A). Die Grünalge *C. reinhardtii* wies 1.691 differenziell exprimierte Sequenzen auf und mit Abstand die höchste Anzahl zeigte mit 7.108 Transkripten die sekundäre Grünalge *B. natans*. Prozentual gemessen anhand der Gesamt-Transkriptmenge entsprachen diese Werte 0,06% - 4,3%. Aufgetragen gegen die Genomkapazität der jeweiligen Plastiden war deutlich zu erkennen, dass zwischen diesen beiden Eigenschaften eine negative Korrelation besteht (Abb. 5.4B). Je geringer die Anzahl an Plastiden-kodierten Genen, desto höher war die Zahl der Transkripte mit signifikanten Expressionsunterschieden.

5.2.1 Vertreter der Chloroplastida zeigten spezifische Starklicht-induzierte Expressionsmuster

Zur weiteren Untersuchung wurden die identifizierten differenziell exprimierten Transkripte nach ihrer Zugehörigkeit zu speziellen funktionalen Kategorien (COG) eingeteilt. In *C. paradoxa*, *P. purpureum* und *K. flaccidum* konnten etwa ein Drittel der Sequenzen keiner speziellen Kategorie zugeordnet werden. Bei *C. reinhardtii* waren es 43%, gefolgt von *B. natans* und *G. theta*, bei welchen etwa die Hälfte der gefundenen Sequenzen nur unzureichend charakterisiert werden konnten. Von diesen abgesehen gehörte mit Ausnahme von *B. natans*, bei welcher mit 19% zelluläre Prozesse und Signalmechanismen dominierten, der größte Anteil zur Kategorie des Metabolismus. Dieser machte 21,8% - 33,3% aller gefundenen Sequenzen aus. Die geringste Anzahl an Transkripten gehörte mit Ausnahme von *C. paradoxa* zur Kategorie der Informationsverarbeitung und -speicherung.

Eine genauere Betrachtung des Expressionsverhaltens unter Starklichtbedingungen verdeutlichte, dass in der Glaukophyte sowie der sekundären Grünalge hierbei eine Abregulation der entsprechenden Transkripte überwog (Abb. 5.5). In der sekundären Rotalge und der Streptophyte dagegen herrschte eine Hochregulation vor. Während in *C. reinhardtii* eine vergleichbare Anzahl an ab- sowie hochregulierten Transkripten vorlag, war in *P. purpureum* kein einheitliches Muster erkennbar. Transkripte, welche den Kategorien des Metabolismus und zellulärer Prozesse zugeordnet wurden, wiesen eine Hochregulation auf, wogegen Sequenzen, welche der Informationsverarbeitung und -speicherung zugewiesen wurden, eine Abregulation zeigten.

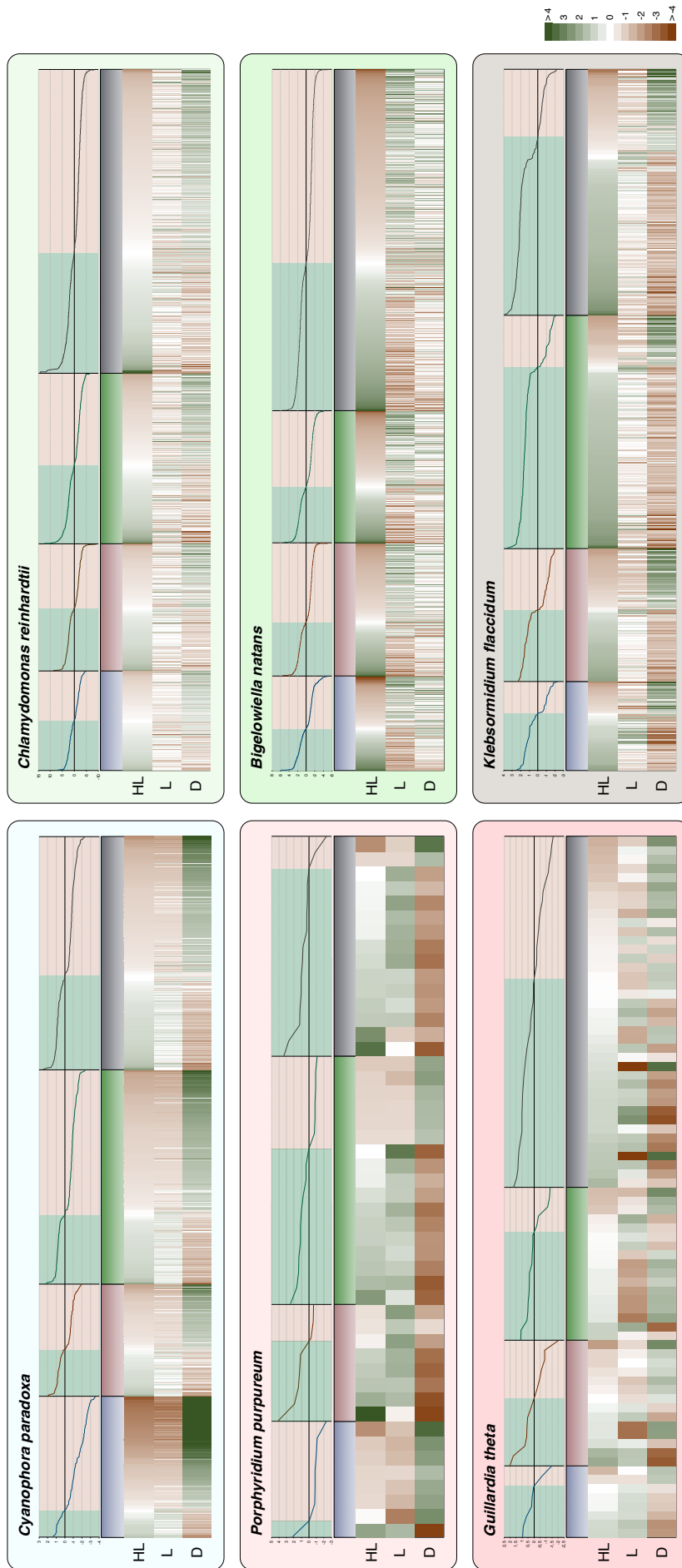
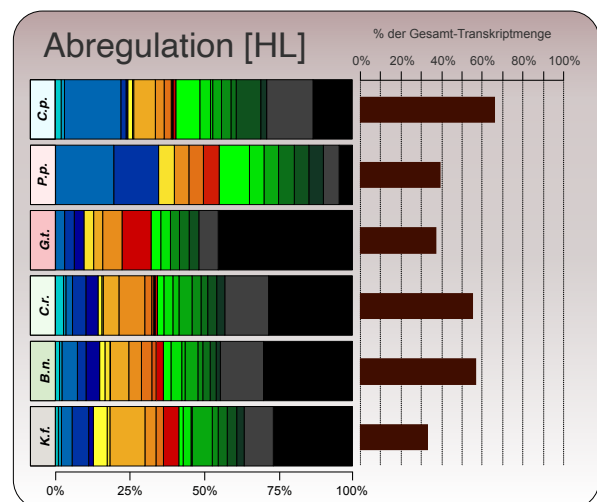
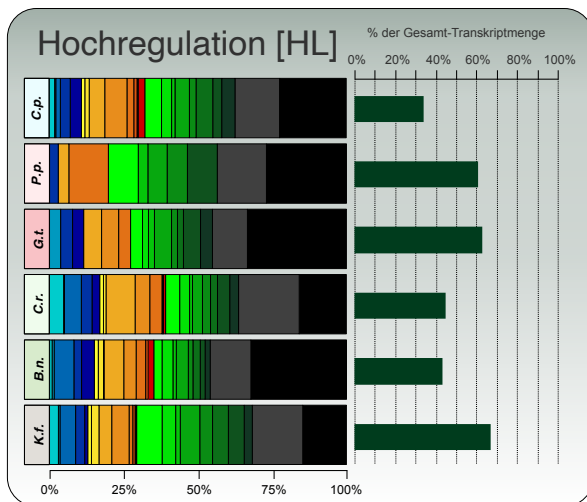
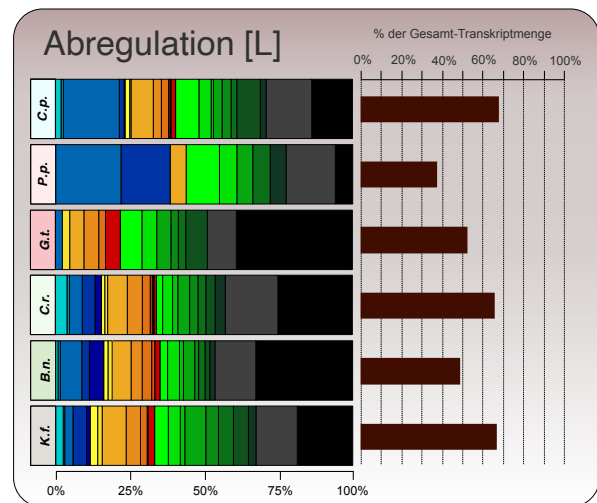
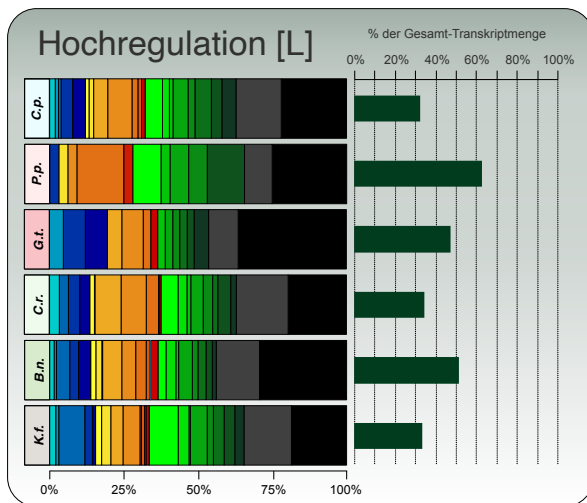
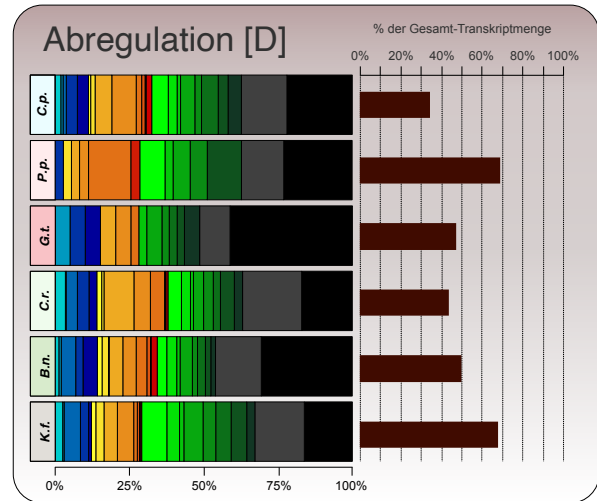
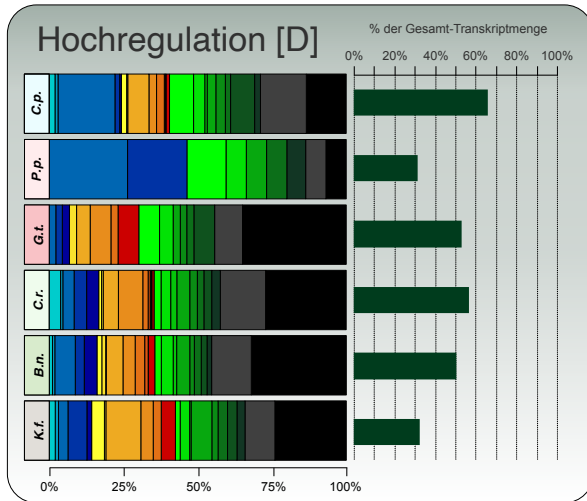


Abbildung 5.5: Expressionsmuster differenziell exprimierter Gene bei unterschiedlichen Lichtbedingungen. Die identifizierten Transkripte wurden ihren jeweiligen funktionalen Kategorien (COG) zugeordnet und zusätzlich anhand ihres Expressionsverhaltens unter Starklichtbedingungen sortiert. Neben einem hohen Anteil an Genen, welche nur unzureichend charakterisiert werden konnten, gehörte der größte Anteil zumeist zur Kategorie des Metabolismus. Während unter Starklicht ($600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [HL]) in *C. paradoxa* und *B. natans* eine Abregulation der entsprechenden Transkripte zu verzeichnen war, dominierte in den Vertretern der Rhodophyta und *K. flaccidum* eine Hochregulation. Zusätzlich zeigten die untersuchten Spezies neben eines gegensätzlichen Expressionsverhaltens bei Dunkelheit ($0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [D]), unterschiedliche Expressionsmuster unter Normallicht ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [L]).

Weiterhin war bei allen untersuchten Organismen eine entgegengesetzte Regulation dieser Transkripte bei Dunkelheit (in der Nacht) zu verzeichnen. Unter Normallichtbedingungen waren ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Algen zu erkennen. Während bei *C. paradoxa* und *P. purpureum* die Expressionsmuster denen unter Starklicht glichen, zeigten sie im Fall von *B. natans* eine ähnliche Regulation wie bei Dunkelheit. In *Chlamydomonas*, *Guillardia* und *Klebsormidium* zeigten die identifizierten Sequenzen unter Normallicht ein gesondertes Expressionsverhalten.

5.2.2 Funktionale Einordnung differenziell exprimierter Gene

Eine detaillierte Analyse der zugeordneten funktionalen Kategorien und ihrer Expressionsmuster zeigte ebenfalls einige eindeutige Unterschiede zwischen den untersuchten Organismen (Abb. 5.6). Während in den Vertretern der Chloroplastida grundsätzlich nur geringfügige Lichtabhängige Unterschiede auszumachen waren, zeigten die Glaukophyte sowie die analysierten Rotalgen stärkere Abweichungen. In *C. paradoxa* und *C. reinhardtii* machten bei jeder der untersuchten Lichtbedingungen Transkripte, die dem Metabolismus zugeordnet wurden, den Hauptanteil der hoch- sowie abregulierten Gene aus. Diese Kategorie repräsentierte in der Grünalge jeweils 22% - 25% und in *Cyanophora* 30% der identifizierten Sequenzen. Während in *Chlamydomonas* mit etwa 15% die Kategorie der Informationsverarbeitung und -speicherung ausnahmslos die kleinste Gruppe darstellte, wurden in *C. paradoxa* diese Transkripte bei Dunkelheit stärker exprimiert. In *Bigeloviella* dagegen dominierte die Kategorie der zellulären Prozesse, welche bei jeder der untersuchten Bedingungen etwa 20% der hoch- sowie abregulierten Sequenzen darstellte. In *Klebsormidium* im Gegensatz fand bei Dunkelheit eine stärkere Hochregulation dieser Transkripte statt, während unter Normal- und Starklichtbedingungen Gene, die dem Metabolismus zugeordnet wurden, dominierten. Sequenzen der Informationsverarbeitung und -speicherung stellten mit etwa 15% in beiden Organismen die kleinste Gruppe dar. In *P. purpureum* waren dagegen sehr deutliche Unterschiede zwischen den analysierten Lichtbedingungen zu erkennen. Während bei Dunkelheit mit fast 50% hauptsächlich Transkripte der Informationsverarbeitung und -speicherung hochreguliert wurden, dominierten bei Normal- und Starklichtbedingungen mit über 35% Gene des Metabolismus. In der sekundären Rotalge dagegen überwogen diese Sequenzen sowohl bei Dunkelheit als auch unter Starklicht. Hier machte diese Kategorie etwa 25% der hochregulierten Transkripte aus, während unter Normallichtbedingungen die Klasse der Informationsverarbeitung und -speicherung überwog.



Informationsverarbeitung und -speicherung

- RNA Prozessierung und Modifikation
- Chromatinstruktur und -dynamik
- Translation, Ribosomenstruktur und -biogenese
- Transkription
- Replikation, Rekombination und Reparatur

Zelluläre Prozesse und Signaltransduktion

- Zellzykluskontrolle, Zellteilung, Chromosomen Aufteilung
- Zellwand- und Membranbiogenese
- Zellbewegung
- Posttranslationale Modifikation, Proteinumsatz, Chaperone
- Signaltransduktionsmechanismen
- Intrazellulärer Transport, Sekretion, Vesikeltransport
- Verteidigungsmechanismen
- Extrazelluläre Strukturen
- Zellkernstruktur
- Cytoskelett

Metabolismus

- Energieproduktion und -umwandlung
- Aminosäuretransport und -metabolismus
- Nukleotidtransport und -metabolismus
- Kohlenhydrattransport und -metabolismus
- Koenzymtransport und -metabolismus
- Fettsäuretransport und -metabolismus
- Anorganischer Ionentransport und -metabolismus
- Biosynthese von sekundären Metaboliten, Transport und Katabolismus

unzureichend charakterisiert

- nur generelle Funktionsbeschreibung
- unbekannte Funktion

Abbildung 5.6: Funktionale Einordnung hoch- sowie abregulierter Gene bei unterschiedlichen Lichtbedingungen. Bei Dunkelheit ($0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [D]) dominierte in *C. paradoxa* eine Hoch- und in *P. purpureum* sowie *K. flaccidum* eine Abregulation der entsprechenden Transkripte. Während in der Glaukophyte hierbei vor allem Gene betroffen waren, welche an der Translation beteiligt sind, überwogen in *Porphyridium* Prozesse des intrazellulären Transports, der Sekretion und des Vesikeltransports. In *Klebsormidium* stachen dagegen verschiedene metabolische Stoffwechselwege hervor. Bei Normallicht ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [L]) dominierte in *C. paradoxa*, *C. reinhardtii* und *K. flaccidum* eine Ab- und in *P. purpureum* eine Hochregulation der Genexpression, wobei in der Glaukophyte sowie der primären Rotalge erneut Prozesse der Translation und Transportmechanismen hervorstachen. Unter Starklichtbedingungen ($600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [HL]) überwog in *C. paradoxa* und beiden einzelligen Grünalgen eine Hochregulation, während die Vertreter der Rhodophyta und *Klebsormidium* vor allem eine Abregulation zeigten.

Eine genauere Betrachtung der jeweiligen Prozesse, mit welchen die identifizierten Transkripte in Verbindung stehen, zeigte in *C. paradoxa* und *P. purpureum* eine erhöhte Expression von Genen, welche an der Translation beteiligt sind (Abb. 5.6). Bei Dunkelheit machten diese mit 19% - 26% den Hauptteil der hochregulierten Gene aus. In *Chlamydomonas* und *Klebsormidium* dagegen überwogen bei Dunkelheit mit ca. 10% Signalübertragungsmechanismen und posttranslationale Modifikationen. Unter Normal- und Starklichtbedingungen dagegen dominierten mit Ausnahme von *K. flaccidum* Sequenzen, welche der Kategorie der zellulären Prozesse und Signaltransduktion zugeordnet wurden. Während in *Cyanophora* Prozesse der Signalübertragung hervorstachen, waren es in *Porphyridium* mit etwa 15% intrazelluläre Transportmechanismen. In *C. reinhardtii* sowie *Bigeloviella* überwogen mit 7% - 9% Prozesse der posttranslationalen Modifikation. Im Gegensatz wurde in der Streptophyte der Hauptteil der hochregulierten Sequenzen den Mechanismen zur Energiegewinnung zugeordnet. In der sekundären Rotalge *G. theta* ließ sich dagegen allein unter Starklichtbedingungen eine deutliche Abregulation von Transkripten erkennen, welche mit dem Cytoskelett in Verbindung stehen.

5.2.3 Vertreter der Chloroplastida zeigten eine erhöhte Starklicht-regulierte Expression

Um einen genaueren Einblick in die Lichtstressreaktion der unterschiedlichen Spezies zu erlangen, wurden weiterhin Transkripte identifiziert, welche eine spezifische Expression unter Starklicht zeigten (Abb. 5.7). In beiden Rotalgen wiesen dabei nur drei Transkripte eine Starklicht-abhängige Regulation auf, während es in *C. paradoxa* 24 Gene waren.

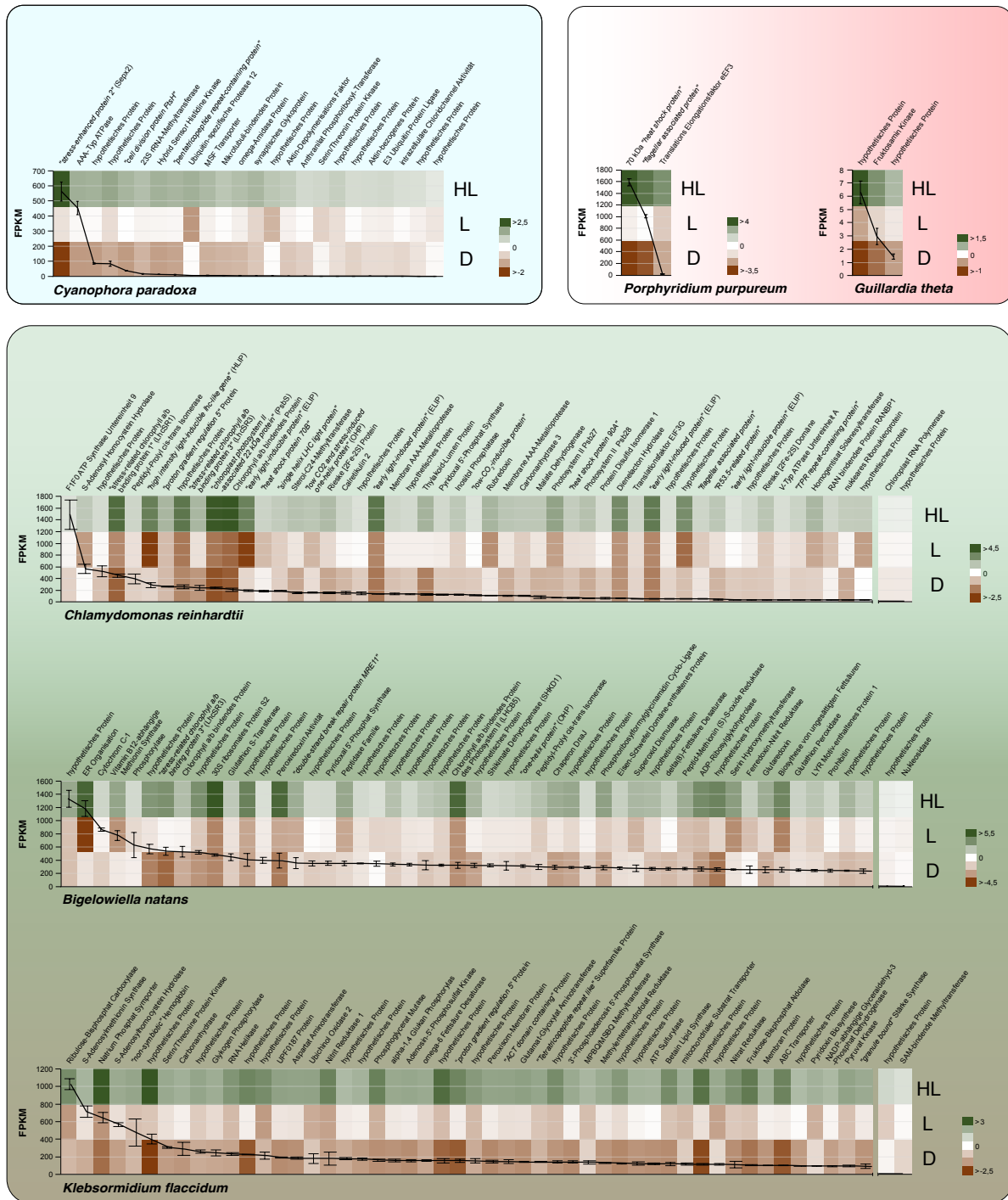


Abbildung 5.7: Identifikation von Transkripten mit spezifischer Expression unter Starklichtbedingungen. Differenziell exprimierte Gene, welche eine spezifische Expression unter exzessiver Lichteinstrahlung ($600 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ [HL]) aufwiesen, wurden anhand der vorliegenden Transkriptmenge sortiert. Während beide Vertreter der Rhodophyta mit drei identifizierten Transkripten eine sehr geringe Anzahl an Starklicht-regulierten Genen zeigten, wies die chloroplastidäre Linie und insbesondere die sekundäre Grünalge mit über 1.500 Transkripten eine deutlich erhöhte Starklicht-Regulation auf. In der Glaukophyten war hierbei eine Anhäufung des “*stress-enhanced-protein 2*“ und einer AAA-Typ ATPase zu erkennen, während in den Vertretern der Chloroplastida verschiedene Proteine der LHC Familie, der Proteinbiosynthese und Kohlenstofffixierung oder mit antioxidativen Eigenschaften akkumulierten.

Bei allen drei Vertretern der Chloroplastida zeigten dagegen deutlich mehr Transkripte eine Starklicht-spezifische Expression. In *C. reinhardtii* und *K. flaccidum* waren es 274 bzw. 213 Sequenzen und in der sekundären Grünalge *B. natans* wiesen 1.590 Gene dieses Expressionsmuster auf. Die identifizierten Sequenzen wurden zusätzlich nach der bei Starklicht vorliegenden Transkriptmenge sortiert (Abb. 5.7). In der Glaukophyten zeigten mit ca. 500 FPKM zwei Transkripte eine eindeutig erhöhte Akkumulation. Das "stress-enhanced protein 2" sowie eine AAA-Typ ATPase. Weiterhin konnte eine erhöhte Expression des "cell division protein *FtsH*" festgestellt werden. Zusätzlich war eine Anhäufung von Transkripten erkennbar, welche mit dem Cytoskelett in Verbindung stehen oder für Proteine mit verschiedenen Transporteraktivitäten kodieren. In der Rotalge *P. purpureum* zeigten bei intensiver Lichteinstrahlung ebenfalls zwei Sequenzen eine starke Anhäufung. Das 70kDa "heat shock protein" mit fast 1.600 FPKM gefolgt von dem "flagellar associated protein" mit etwa 1.000 FPKM. In der sekundären Rotalge im Gegensatz zeigten mit FPKM Werten von unter 10 alle drei identifizierten Sequenzen eine sehr geringe Transkriptmenge.

Tabelle 5.4: Identifizierte Starklicht-regulierte Proteine mit antioxidativen Eigenschaften.

Organismus	Trinity ID	Definition	rel. Expression (HL)	FPKM (HL)
<i>C. reinhardtii</i>	TRINITY_DN10605_c0_g2_i1	Pyridoxal 5'-Phosphat Synthase	1,11	125,99
	TRINITY_DN13190_c0_g2_i1	"R53.5-related protein"	1,60	42,11
<i>B. natans</i>	TRINITY_DN1704_c0_g2_i1	Glutathion S-Transferase	1,93	444,82
	TRINITY_DN19008_c8_g2_i1	Peroxiredoxin	5,35	392,18
	TRINITY_DN19347_c0_g1_i9	Pyridoxal 5'-Phosphate Synthase	1,37	352,12
	TRINITY_DN15945_c0_g1_i11	Superoxid Dismutase	2,53	275,34
	TRINITY_DN17612_c0_g1_i15	Peptid-Methionin (S)-S-oxid Reduktase	2,88	270,24
	TRINITY_DN15071_c0_g1_i11	Glutaredoxin	2,89	253,96
	TRINITY_DN20058_c12_g1_i4	Glutathion Peroxidase	1,59	247,91
<i>K. flaccidum</i>	TRINITY_DN60413_c0_g1_i1	Pyridoxin Biosynthese	1,54	94,39

In *C. reinhardtii* war vor allem eine massive Expression von Genen zu erkennen, welche zur erweiterten Gruppe der LHC Proteine gezählt werden. Darunter sowohl die linienübergreifenden Familien der HLIPs und OHPs sowie ELIP und LhcSR Proteine, welche nur in der Chloroplastida vertreten sind. Zudem drei Proteine – PsbS, Psb27 und Psb28 – welche direkt mit dem Photosystem II in Verbindung stehen. Zusätzlich zeigten Proteine, welche an verschiedenen Schritten der Proteinbiosynthese beteiligt sind, eine deutliche Steigerung ihrer Expressionsrate. Dazu zählen vor allem Chaperone wie die "heat shock" Proteine Hsp70B und Hsp90A, welche an der Proteinfaltung und posttranslationalen Modifikation beteiligt sind sowie der Translationsfaktor EIF3G.

In *B. natans* war dagegen eine starke Anhäufung von Proteinen mit antioxidativen Eigenschaften zu erkennen (Tab. 5.4) wie zum Beispiel Peroxiredoxin, eine Superoxid Dismutase oder die Glutathion Peroxidase, welche für die Entfernung von ROS verantwortlich sind. Zudem mehrere Proteine mit einer Chlorophyll a/b Bindungsdomäne, welche vermutlich zur erweiterten Familie der LHC Proteine gehören und mit dem Photosystem I oder II assoziiert sind. Weiterhin zeigten verschiedene Proteine mit einer Funktion innerhalb der Proteinbiosynthese eine erhöhte Transkriptmenge. Hierzu zählen unter anderem Chaperone wie das DnaJ sowie ein ribosomales Protein. In der Streptophyte *K. flaccidum* zeigte sich unter anderem eine Akkumulation von Genen, welche am Cystein- und Methionin Metabolismus beteiligt sind. Vor allem die S-Adenosylmethionin Synthase zeigte hierbei eine stark erhöhte Expression. Weiterhin weist die Anhäufung der RubisCO sowie einer Carbonanhydrase auf eine gesteigerte Kohlenstofffixierung hin. Gleichermaßen war eine Akkumulation von Enzymen des Glykolyse/Glukoneogenese Metabolismus sowie des Stickstoff-Zyklus zu verzeichnen ebenso wie verschiedene Transporterproteine.

5.2.4 Analyse von Starklicht-induzierten biologischen Prozessen

Weiterhin wurden innerhalb der Chloroplastida die identifizierten Sequenzen mit einer Starklicht-spezifischen Expression auf ihre Beteiligung an verschiedenen biologischen Prozessen analysiert. Bei allen drei Organismen konnte hierbei ein großer Anteil dieser Transkripte dem Metabolismus zugeordnet werden, gefolgt von Prozessen der genetischen Informationsverarbeitung. Während in der primären Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* mit ca. 15% der Fettsäuren Metabolismus hervorstach (Abb. 5.8), dominierten in der sekundären Alge *Bigeloviella natans* mit etwa 15% sowie der Streptophyte *K. flaccidum* mit ca. 20% der Aminosäuren- und Kohlenstoff Metabolismus (Abb. 5.9 und 5.10). Daneben waren in *Chlamydomonas* mit durchschnittlich 8% Prozesse der Proteinfaltung, -sortierung und des Proteinabbaus sowie der Translation stark vertreten. In *B. natans* stachen zudem Mechanismen der DNA Replikation und Reparatur hervor.

Gemessen an der Anzahl an Starklicht exprimierten Proteinen überwogen in *Chlamydomonas* vor allem die Prozesse der genetischen Informationsverarbeitung, insbesondere die Proteinmodifikation im ER, der Proteinabbau, RNA Transport und mRNA Prozessierung (Abb. 5.8). Gleichzeitig zeigte sich eine Akkumulation von photosynthetischen Proteinen. In der sekundären Grünalge *B. natans* dominierten dagegen metabolische Stoffwechselwege wie der Cystein- und Methionin Metabolismus sowie die Prozesse der Glykolyse/Glukoneogenese und der oxidativen Phosphorylierung (Abb. 5.9).

Daneben stach vor allem die Anhäufung von verschiedenen ribosomalen Proteinen hervor. In *Klebsormidium* überwogen ebenfalls metabolische Prozesse, insbesondere die Glykolyse/ Glukoneogenese sowie der Stickstoff- und Purin Metabolismus (Abb. 5.10).

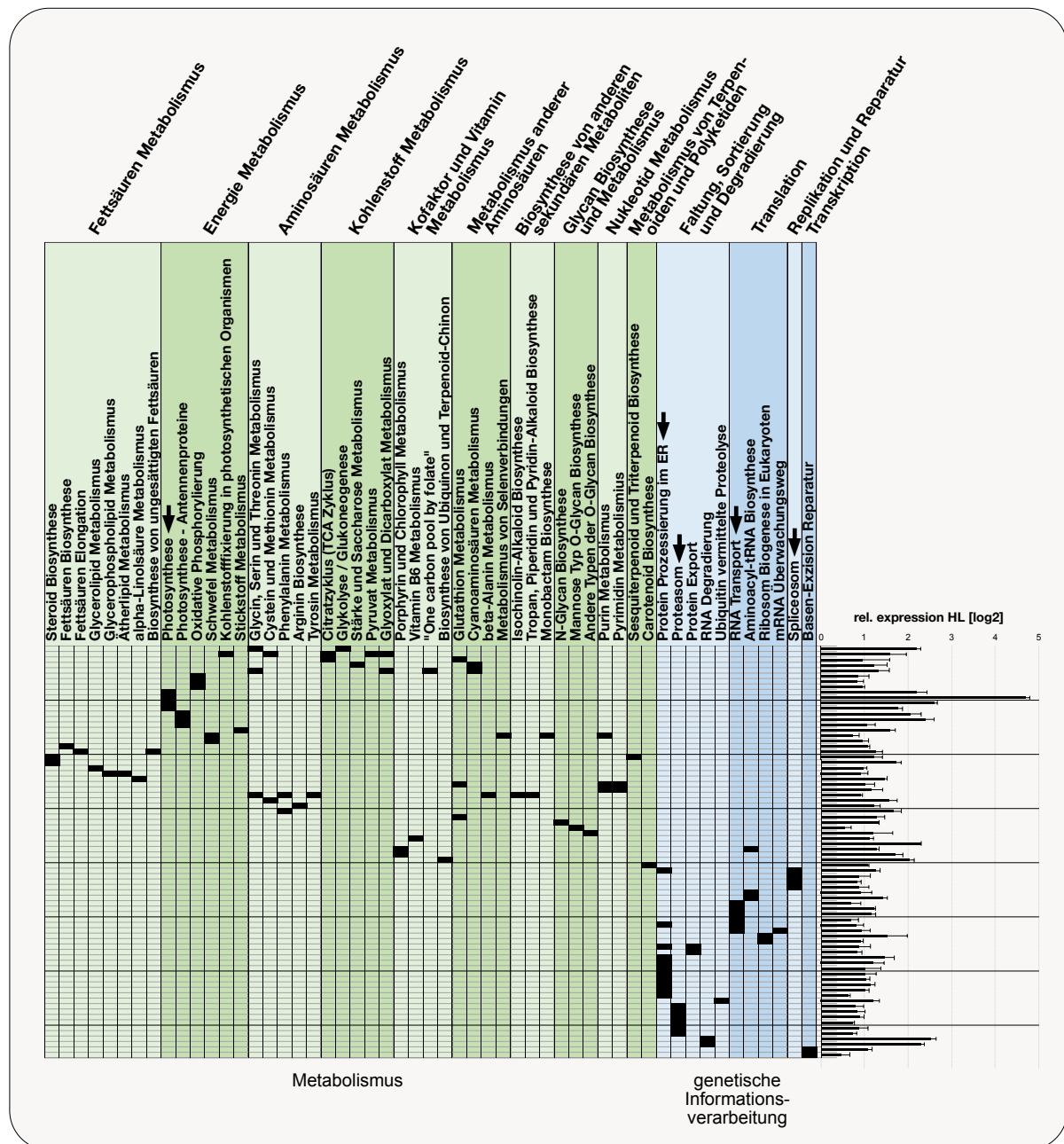


Abbildung 5.8.: Identifikation von Starklicht-aktivierten biologischen Prozessen in *C. reinhardtii*.

Mithilfe der KEGG Datenbank wurden die identifizierten Transkripte mit einer spezifischen Expression unter Starklicht den entsprechenden zellulären Prozessen zugeordnet. Unter exzessiver Lichteinstrahlung war in der primären Grünalge vor allem eine erhöhte Aktivität der genetischen Informationsverarbeitung, insbesondere der Proteinfaltung, -sortierung und -degradierung sowie Translation zu erkennen. Vor allem dominierten hierbei Prozesse der Protein Prozessierung im ER, des Proteinabbaus und des RNA Transports.

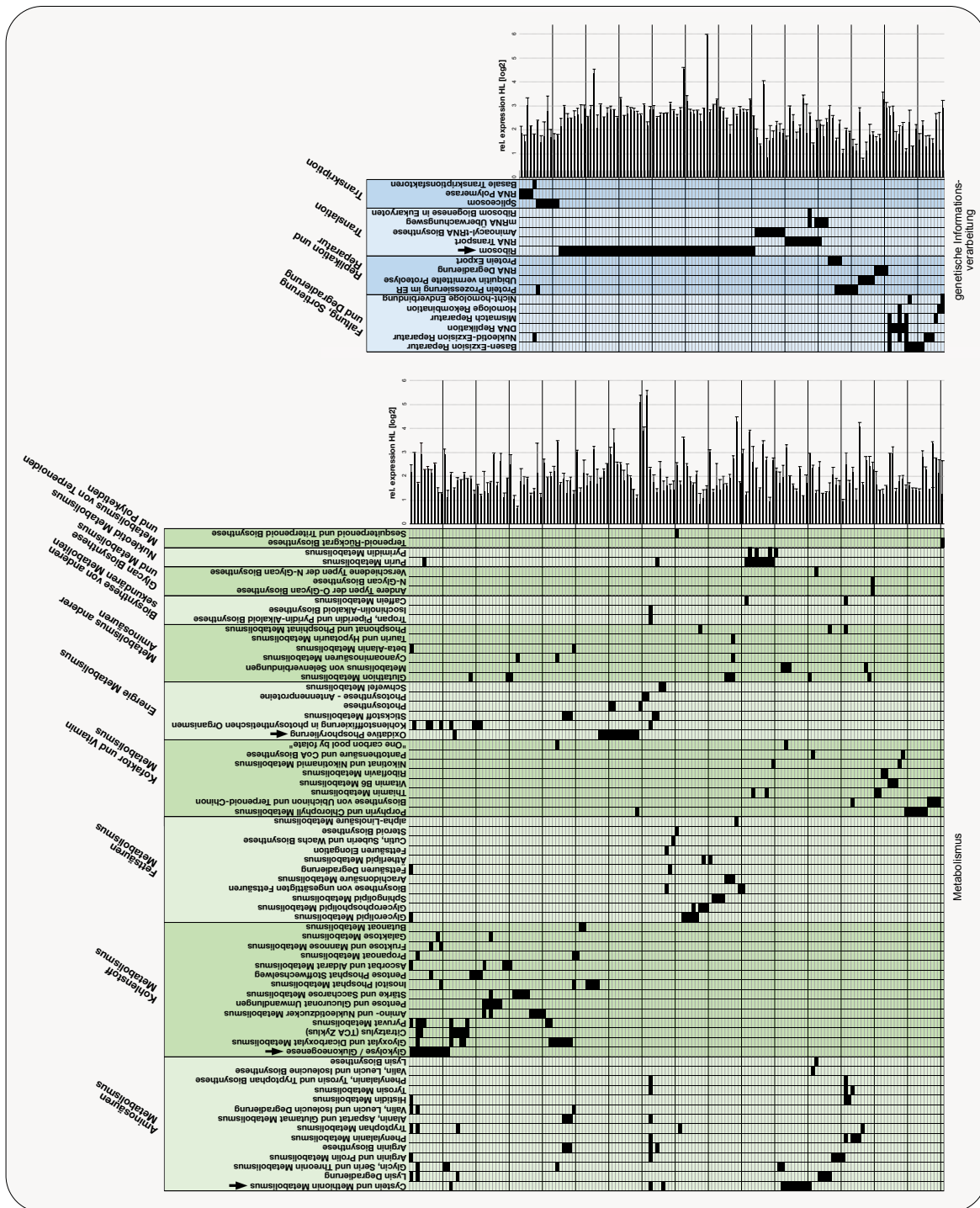


Abbildung 5.9: Identifikation von Starklicht-induzierten metabolischen Stoffwechselwegen in *B. natans*. Mithilfe der KEGG Datenbank wurden die identifizierten Transkripte mit einer Starklicht-induzierten Expression den entsprechenden biologischen Prozessen zugeordnet. Unter Bedingungen von intensiver Lichteinstrahlung konnte in der sekundären Grünalge eine verstärkte Aktivität verschiedener Metabolismuswege wie dem Aminosäuren- und Kohlenstoff Metabolismus aufgezeigt werden. Hierbei dominierten vor allem die Prozesse des Cystein- und Methionin Metabolismus, der Glykolyse/ Glukoneogenese sowie oxidativen Phosphorylierung. Daneben konnte eine erhöhte Aktivität der Translation verzeichnet werden, wobei vor allem eine verstärkte Expression von ribosomalen Untereinheiten hervorstach.

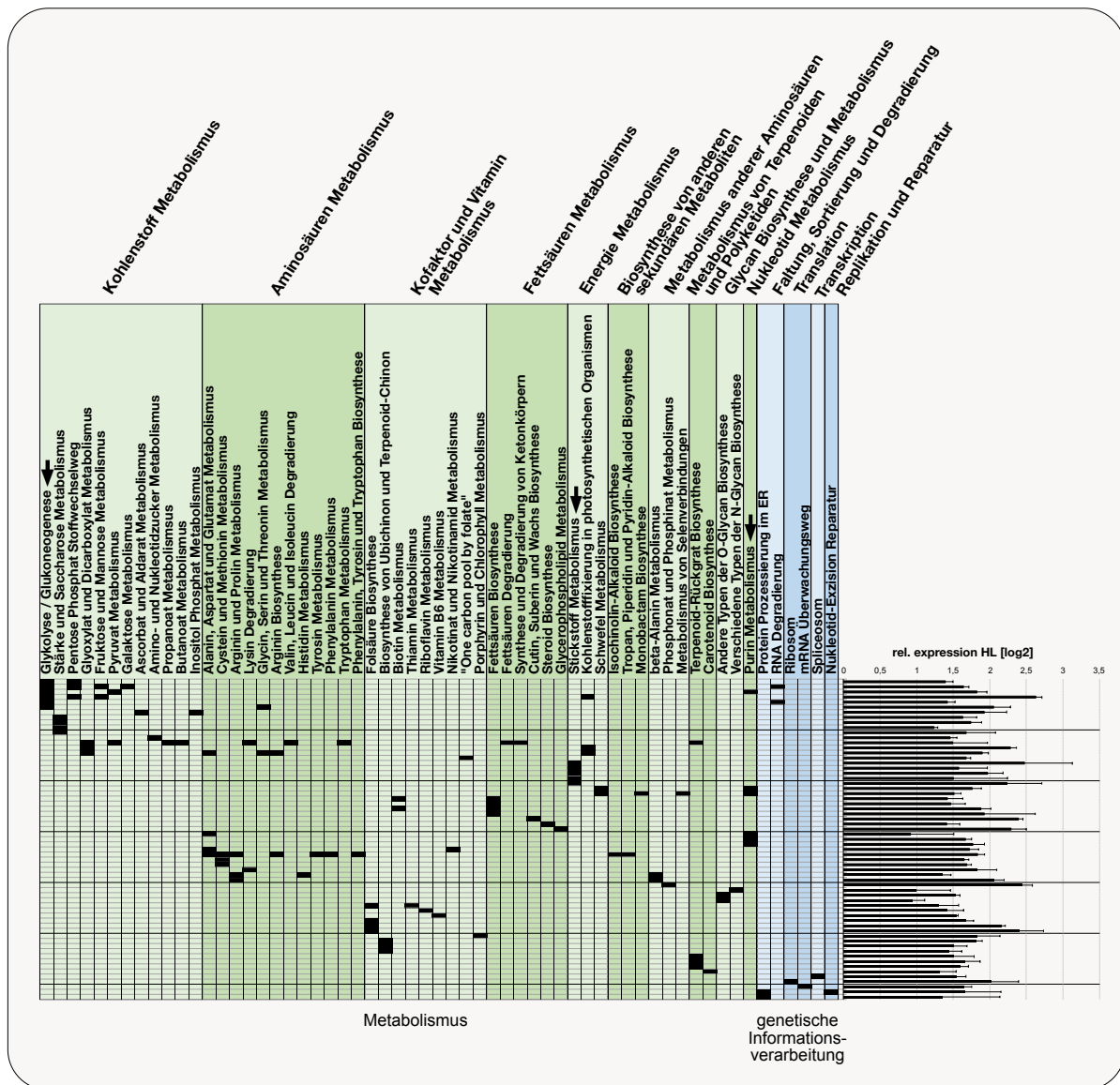


Abbildung 5.10: Identifikation von Starklicht-aktivierten biologischen Prozessen in *K. flaccidum*.

Mithilfe der KEGG Datenbank konnten die identifizierten Transkripte mit einer spezifischen Expression unter Starklicht den entsprechenden zellulären Prozessen zugeordnet werden. Unter Starklichtbedingungen war in der Streptophyte eine Aktivität verschiedener metabolischer Stoffwechselwege erkennbar, wobei vor allem eine erhöhte Aktivität des Kohlenstoff- und Aminosäuren Metabolismus zu verzeichnen war. Insbesondere Enzyme, welche an der Glykolyse/Glukoneogenese beteiligt sind zeigten hierbei eine deutliche Anhäufung. Weiterhin war eine verstärkte Aktivität des Stickstoff- sowie Purin Metabolismus zu erkennen.

5.3 Analyse von *C. reinhardtii* FtsH-Überexpressionsmutanten

Zur genaueren Untersuchung der FtsH Protease wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich *Chlamydomonas reinhardtii* FtsH-Überexpressionsmutanten analysiert. Hierzu wurden das Kern-kodierte *ftsh2* aus *C. reinhardtii* sowie das plastidär-kodierte *ftsh* aus der Xanthophyceae *Vaucheria litorea* durch homologe Rekombination in das Plastidengenom von *Chlamydomonas* eingebracht und überexprimiert. Insbesondere der Einfluss dieser plastidären Überexpression von FtsH unter Bedingungen von exzessiver Lichteinstrahlung war hierbei von Interesse. Je drei Klone der jeweiligen Überexpressionsmutanten sowie des Kontrollstamms (Tab. 5.5) wurden zu diesem Zweck sowohl auf morphologischer sowie photophysilogischer Ebene untersucht.

Tabelle 5.5: Übersicht über die analysierten *C. reinhardtii* FtsH-Überexpressionsmutanten

Kontrolle	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>ftsh2</i>	<i>Vaucheria litorea</i> <i>ftsh</i>
cg13#4	830#15	927#2
cg13#10	830#66	927#3
cg13#12	830#68	927#11

5.3.1 FtsH-Überexpressionslinien zeigten keine morphologischen Veränderungen der Thylakoidorganisation

Mithilfe von transelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde zunächst eine phänotypische Untersuchung der verschiedenen *C. reinhardtii* Klone durchgeführt. Insbesondere die Auswirkungen von intensiver Lichteinstrahlung auf die Struktur der Plastiden war hierbei von Interesse. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Überexpressionslinien sowie der Kontrollstamm unter Normallicht- ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [L]) wie auch verschiedenen Starklichtbedingungen (300 bzw. $650 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [HL]) kultiviert. Ein spezielles Merkmal dieser einzelligen Grünalge ist ein einzelner „becherförmiger“ Chloroplast (Cl), welcher die komplette Zelle durchzieht und in allen untersuchten Klonen deutlich zu erkennen war (Abb. 5.11). Zusätzlich waren die im Plastiden lokalisierten Pyrenoide (Py) zu erkennen, welche zumeist von Stärkekörnern (Sk) umgeben sind. Daneben konnten die im Cytosol lokalisierte Zellkerne (N) wie auch Mitochondrien (M) identifiziert werden. Anhand dieser Aufnahmen konnten allerdings keine Licht-abhängigen Veränderungen der Zell- oder Thylakoidorganisation festgestellt werden.

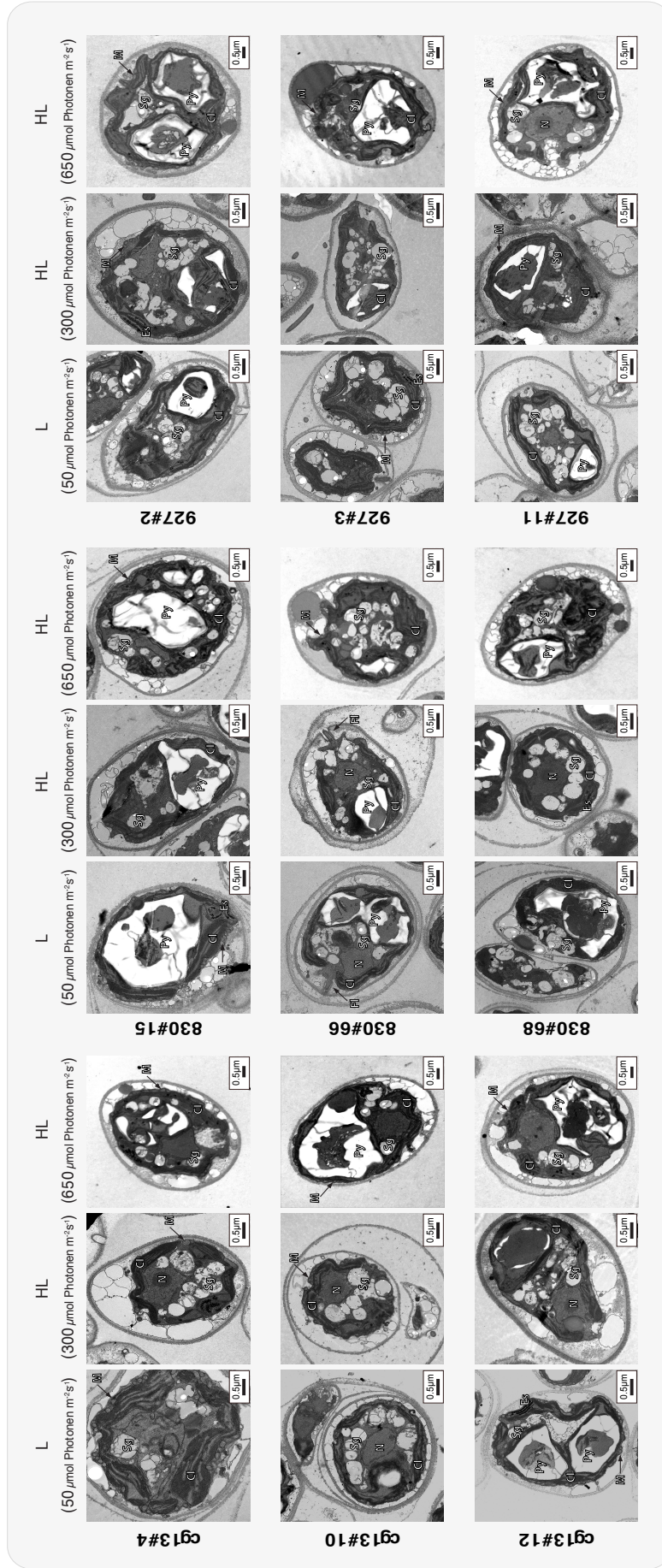


Abbildung 5.11: Transelektronenmikroskopische Aufnahmen der *C. reinhardtii* FtsH-Überexpressionsmutanten bei unterschiedlichen Lichtbedingungen. Die verschiedenen *Chlamydomonas* Klone wurden unter Normallicht ($50 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) bzw. Starklicht (300 und $650 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) kultiviert und anschließend mithilfe einer Transelektronenmikroskopie auf ihre zelluläre Organisation hin untersucht. Neben dem charakteristischen Chloroplasten (Cl) konnten hierbei die im Plastiden lokalisierten Pyrenoide (Py) sowie Stärkekörper (Sk) identifiziert werden. Daneben waren vereinzelt Zellkerne (N) und Mitochondrien (M) zu erkennen, welche sich im Cytosol der Zelle befinden sowie der Augenfleck (Af) oder Ansätze der Flagellen (Fl). Ein struktureller Vergleich zwischen den untersuchten Lichtbedingungen zeigte allerdings keine Veränderungen der Thylakoidorganisation in den FtsH-Überexpressionslinien (verändert nach Janine Fürst-Jansen, Masterarbeit, 2018).

Weiterhin zeigten die *C. reinhardtii* FtsH-Überexpressionsmutanten im Vergleich zur cg13 Kontrolle keine Unterschiede weder in der Struktur der Plastiden noch der Anzahl oder Größe der Pyrenoide und Stärkekörner.

5.3.2 Einfluss von Starklicht auf die Pigmentkomposition der FtsH-Überexpressionslinien

Für eine genauere Charakterisierung von Licht-induzierten Veränderungen der Pigmentzusammensetzung, wurde weiterhin eine HPLC gestützte Pigmentanalyse durchgeführt. Hierzu wurden die unterschiedlichen Überexpressionslinien entweder unter Normal- ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [L]) oder Starklichtbedingungen ($650 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [HL]) kultiviert und anschließend der Gehalt an unterschiedlichen Pigmenten bestimmt. Grundsätzlich zeigten hierbei alle untersuchten Klone eine ähnliche Konzentration an Chlorophyll a und b (Abb. 5.12A). Mit einem Pigmentgehalt von etwa 300 und 600 pmol/mg wiesen sowohl der cg13 Kontrollstamm sowie beide Überexpressionsmutanten ein durchschnittliches Chl a/Chl b Verhältnis von 2 auf. Allerdings wiesen Starklicht-adaptierte Klone mit einer plastidären Überexpression von *ftsh* aus *V. litorea* im Vergleich zu Normallicht-adaptierten Zellen eine signifikant geringere Konzentration an Chlorophyll b auf. Daher zeigten diese Klone unter Starklichtbedingungen eine Steigerung des Chl a/Chl b Verhältnisses von 1,9 auf 2,1 (Abb. 5.12B). Dagegen war eine erhöhte Konzentration von Chlorophyll a in Starklicht-kultivierten Zellen der 830 Überexpressionslinie für eine gleichwertige Steigerung der Chl a/Chl b Rate verantwortlich.

Weiterhin war ein signifikanter Anstieg der Lutein- sowie β -Carotinkonzentrationen in Zellen zu erkennen, welche an intensive Lichtintensitäten adaptiert waren (Abb. 5.12C). Während der Gehalt an Lutein von $60,3 \text{ pmol/mg} \pm 4,7$ auf $195,3 \text{ pmol/mg} \pm 26,2$ anstieg, zeigte β -Carotin eine Erhöhung von $90 \text{ pmol/mg} \pm 5,2$ auf $134,3 \text{ pmol/mg} \pm 25,2$. Dagegen war ein eindeutiger Licht-abhängiger Abfall des Gehalts an Neoxanthin von $85,6 \text{ pmol/mg} \pm 5,9$ auf $47,7 \text{ pmol/mg} \pm 9,3$ zu verzeichnen. Allerdings war hierbei kein Unterschied zwischen dem Kontrollstamm und den FtsH-Überexpressionsmutanten zu erkennen. Zudem wiesen alle untersuchten Klone nach Starklichtbehandlung eine deutlich erhöhte Konzentration an Antheraxanthin sowie Zeaxanthin auf (Abb. 5.12D). Während dabei in der 927 Überexpressionslinie ebenfalls ein eindeutiger Abfall des Gehalts an Violaxanthin zu erkennen war, zeigte der Kontrollstamm eine geringere Reduktion und die 830 FtsH-Überexpressionsmutanten keine signifikanten Veränderungen.

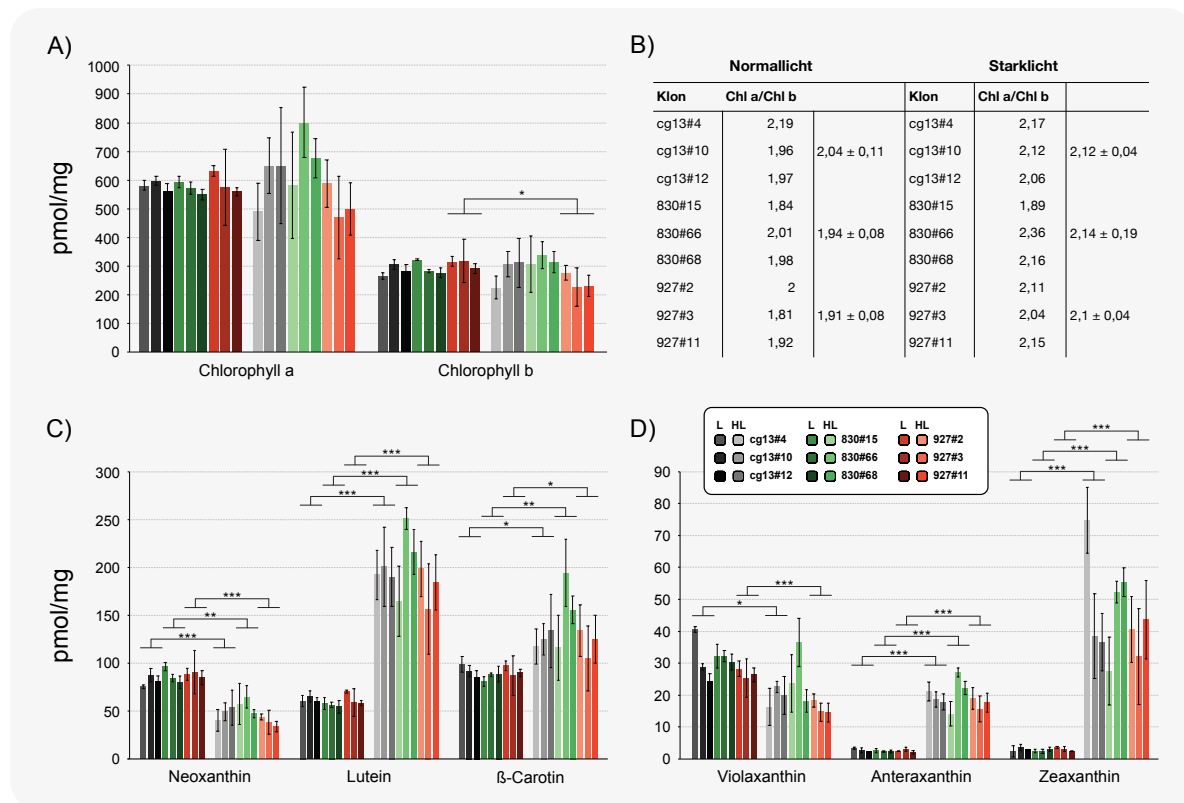


Abbildung 5.12: Analyse der Pigmentkompositionen der *Chlamydomonas* FtsH-Überexpressionslinien bei unterschiedlichen Lichtbedingungen. (A) Messungen der Chlorophyll (Chl) Konzentrationen zeigten unter Starklicht ($650 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [HL]) in allen untersuchten Klonen nur geringe Schwankungen des Chl a Gehalts. Im Vergleich zu Normallichtbedingungen ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [L]) wiesen die *Vaucheria* Überexpressionsmutanten dagegen bei exzessiver Lichteinstrahlung deutlich weniger Chl b auf. (B) Obwohl die Bestimmungen des Chl a/b Verhältnisses grundsätzlich Werte von etwa 2 zeigten, war in allen untersuchten Klonen eine leichte Steigerung dieses Verhältnisses unter Starklichtbedingungen zu verzeichnen, was vor allem in der 927 Linie auf eine geringere Chl b Konzentration zurückzuführen war. (C) Messungen des Gehalts an verschiedenen Carotinoiden zeigten unter Starklicht in allen untersuchten Klonen eine eindeutig reduzierte Konzentration an Neoxanthin. Gleichzeitig war eine signifikante Steigerung der Lutein- sowie β -Carotinkonzentrationen zu verzeichnen. (D) Sowohl die cg13 Kontrolle als auch beide Überexpressionslinien zeigten einen aktiven Xanthophyll-Zyklus mit einer deutlichen Licht-abhängigen Umwandlung von Violaxanthin zu Zeaxanthin.

5.3.3 *Vaucheria*-Überexpressionsmutanten zeigten eine deutlich geringere PSII Effizienz

Des Weiteren wurde ein möglicher Einfluss der plastidären Überexpression von *ftsH* auf die Photosyntheseleistung der *Chlamydomonas* Kulturen untersucht. Hierzu wurde zunächst die maximale photochemische Effizienz des Photosystem II (Fv/Fm) bestimmt, wobei die analysierten Klone an Normal- ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [L]) oder Starklichtbedingungen ($650 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [HL]) adaptiert waren.

In beiden Fällen sank die photochemische Effizienz des PSII mit steigender Lichtintensität von etwa 0,5 – 0,6 in dunkel-adaptierten Zellen auf Werte von unter 0,1 bei Intensitäten von über $900 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Abb. 5.13). Bei Normallicht-adaptierten Zellen waren hierbei signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Klonen zu erkennen. Während der *C. reinhardtii* cg13 Kontrollstamm und Kulturen mit einer Überexpression des *ftsh2* aus *Chlamydomonas* maximale Fv/Fm Werte von 0,55 – 0,61 aufwiesen, zeigten Klone, welche das *ftsh* Gen aus *Vaucheria* exprimierten mit maximal 0,53 deutlich geringere Werte. In Starklicht-adaptierten Kulturen zeigten die untersuchten Klone dagegen keine eindeutigen Abweichungen. Zusätzlich zeigten der cg13 Kontrollstamm sowie Klone der *C. reinhardtii ftsh2* Überexpression eine deutliche Veränderung ihrer photochemischen Effizienz in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen. Stresslicht-adaptierte Zellen wiesen hier eine eindeutig geringere photochemische Effizienz auf.

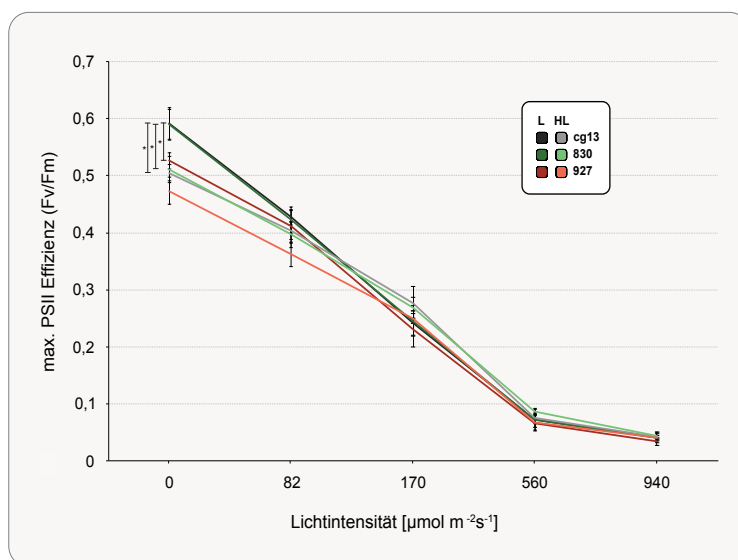


Abbildung 5.13: Maximale photochemische Effizienz des PSII. Der cg13 Kontrollstamm sowie beide *C. reinhardtii* FtsH-Überexpressionslinien wurden hinsichtlich ihrer Fv/Fm Werte untersucht. Hierbei zeigte die 927 Linie unter Normallichtbedingungen ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [L]) eine deutlich geringere Effizienz und keine signifikante Reduktion des Fv/Fm unter Starklicht ($650 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [HL]).

5.3.4 *Vaucheria*-Überexpressionslinie wies eine veränderte NPQ Kapazität auf

Zur weiteren Analyse von Lichtschutzmechanismen wurde bei unterschiedlichen Lichtintensitäten zudem die nicht-photochemische Löschung der Chlorophyll a Fluoreszenz (NPQ) bestimmt. Hierzu wurden die verschiedenen *C. reinhardtii* Kulturen ebenfalls bei unterschiedlichen Lichtbedingungen – Normal- ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [L]) sowie Starklicht ($650 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [HL]) – kultiviert. Während Normallicht-adaptierte Zellen bei einer Messlichtintensität von $82 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ kaum NPQ aufwiesen, nahm die Fluoreszenzlöschung mit steigender Intensität des aktinischen Lichts kontinuierlich zu (Abb. 5.14).

In Starklicht-adaptierten Zellen dagegen war erst ab einer Lichtstärke von $560 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ein eindeutiger Anstieg des NPQ zu verzeichnen. Obwohl in der anschließenden Relaxionsphase bei allen untersuchten Klonen eine unmittelbare Abnahme der Fluoreszenzlöschung zu erkennen war, stiegen auch in der Dunkelphase die gemessenen NPQ Werte mit Zunahme der aktinischen Lichtintensität. Weiterhin war bei Normallicht-adaptierten Kulturen ein deutlicher Unterschied zwischen den FtsH-Überexpressionsmutanten zu erkennen. Während Klone mit einer plastidären Expression des *C. reinhardtii fsh2* bei allen untersuchten Messlichtbedingungen vergleichbare durchschnittliche NPQ Werte aufwiesen wie der cg13 Kontrollstamm, zeigten die Klone, in welchen *fsh* aus *Vaucheria* exprimiert wurde, eine eindeutig schwächere Ausprägung von NPQ Mechanismen.

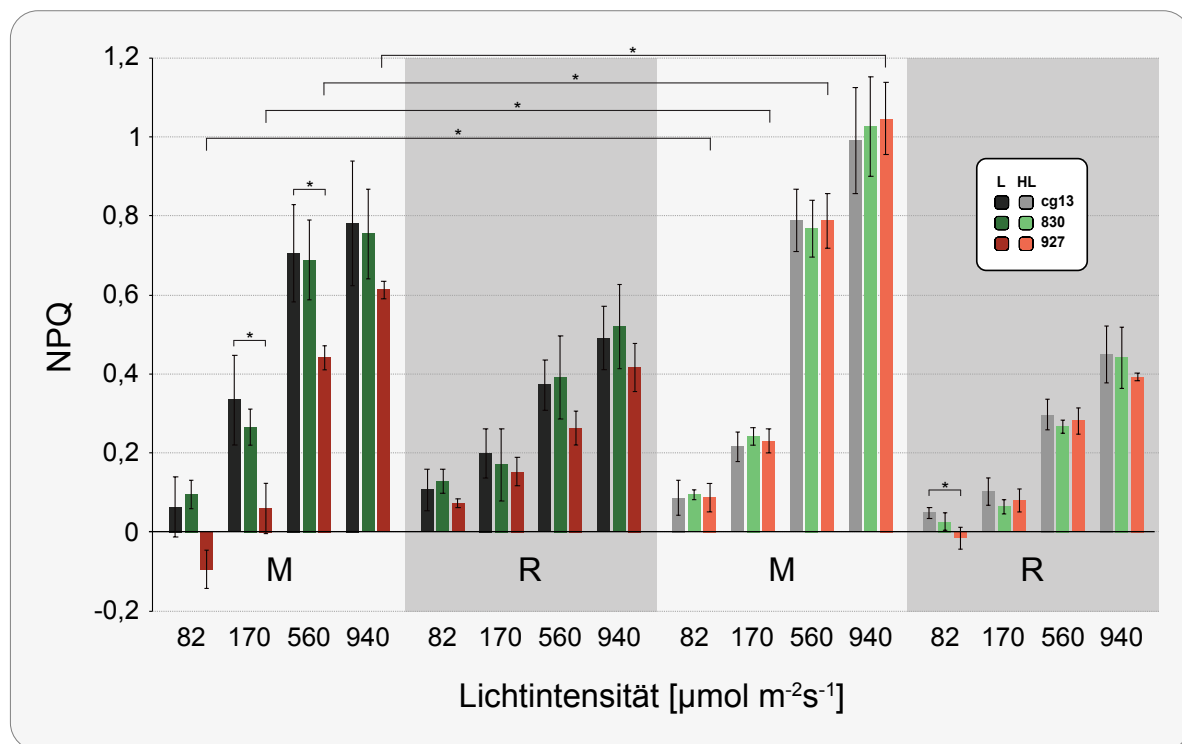


Abbildung 5.14: NPQ Kapazitäten der *C. reinhardtii* FtsH-Überexpressionsmutanten bei unterschiedlichen Lichtbedingungen. Es wurden die durchschnittlichen NPQ Werte von Normal- ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [L]) als auch Starklicht- ($650 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [HL]) adaptierten Klonen der cg13 Kontrolle sowie beider FtsH-Überexpressionslinien bestimmt. Hierbei waren die verschiedenen *C. reinhardtii* Kulturen für 20 min unterschiedlichen aktinischen Messlichtintensitäten ausgesetzt (M) gefolgt von 10 min Relaxion (R) in Dunkelheit. Während die 830 Überexpressionslinie ähnliche Werte aufwies wie der Kontrollstamm, waren in Normallicht-adaptierten Zellen der 927 Linie deutlich geringere NPQ Kapazitäten zu verzeichnen, insbesondere bei Messlichtintensitäten von 170 und $560 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Gleichzeitig war in Starklicht-adaptierten Kulturen der *Vaucheria* Expressionslinie deutlich höhere NPQ Werte zu erkennen, vergleichbar mit denen des Kontrollstamms und der 830 Linie.

Insbesondere bei aktinischen Lichtintensitäten von $170 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ und $560 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ war eine signifikante Reduktion der nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung zu erkennen. Zusätzlich zeigten Normallicht-adaptierte Klone der 927 Überexpressionslinie bei aktinischen Lichtintensitäten von $82 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ negative NPQ Werte. Gleichzeitig wiesen diese Klone im Gegensatz zu der Kontrolle und den *C. reinhardtii ftsh2* exprimierenden Zellen bei allen untersuchten Messlichtintensitäten eine signifikante Steigerung des NPQ nach einer Kultivierung unter Starklichtbedingungen auf.

6. Diskussion

6.1 Die Evolution von LHC-Komplexen implizierte komplexe NPQ Mechanismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in verschiedenen Algenspezies eine umfassende Analyse von Starklicht-induzierten Stressreaktionen durchgeführt. Zunächst wurde mithilfe von photometrischen Messungen der Chlorophyll a Fluoreszenz die maximale photochemische Effizienz des PSII sowie die Ausbildung von NPQ Mechanismen bestimmt. Sowohl *Cyanophora paradoxa* als auch *Porphyridium purpureum* verwenden Phycobilisome zur Lichtabsorption am PSII (Gantt et al., 2003; Steiner & Löffelhardt, 2011). Dennoch zeigten dunkel-adaptierte Zellen der primären Rotalge eine deutlich geringere maximale photochemische Effizienz (Abb. 5.1), vermutlich aufgrund der unterschiedlichen Organisation des photosynthetischen Apparats. Neben einer veränderten Pigmentzusammensetzung der PBS Antennenkomplexe – *Porphyridium* besitzt mit 85% einen sehr hohen Anteil an Phycoerythrin (Algarra & Rüdiger, 1993), welches in *C. paradoxa* gänzlich fehlt (Steiner et al., 2003) – besitzt die primäre Rotalge zusätzlich Chlorophyll a bindende LHC Komplexe, welche mit dem PSI assoziiert sind (Gantt et al., 2003). Im Gegensatz dazu besitzen die Vertreter der Chloroplastida Chlorophyll a/b bindende LHCII Komplexe (Dekker & Boekema, 2005), welche unter den verwendeten Bedingungen eine besonders effektive Lichtabsorption gewährleisten und daher eine deutliche Steigerung der Fv/Fm Werte ermöglichen.

Gleichzeitig gibt es eine negative Korrelation zwischen der PSII Effizienz und der Ausbildung von NPQ Mechanismen (Weis & Berry, 1987; Genty et al., 1989). Mit steigender Lichtintensität nahm der Fv/Fm Wert stetig ab, wogegen die NPQ Kapazität zunahm (Abb. 5.1). Während die Glaukophyte *C. paradoxa* sowie die primäre Rotalge *P. purpureum* allerdings kaum NPQ aufwiesen, waren in der sekundären Rotalge sowie den Vertretern der Chloroplastida deutlich höhere maximale NPQ Werte zu erkennen. Zusätzlich zeigte sich bei *C. paradoxa* ein anfänglicher Anstieg des Fv/Fm und gleichzeitiger Abfall der NPQ Kurve in den negativen Bereich, was darauf schließen lässt, dass bei geringeren Lichtintensitäten zunächst ein Anstieg der maximalen Fluoreszenz zu verzeichnen war. Ursache hierfür liegt vermutlich bei einem Licht-induzierten Transfer von PBS Komplexen vom Photosystem I zum Photosystem II. Glaukophyten besitzen wie ihre cyanobakteriellen Vorfahren ausschließlich Phycobilisome, welche für die Absorption der Lichtenergie und deren Weiterleitung an die Reaktionszentren von PS II und PSI verantwortlich sind (Steiner & Löffelhardt, 2011). Diese besitzen aufgrund einer geringen Bindungsspezifität ein hohes Maß an Mobilität (Joshua & Mullineaux, 2004).

In Cyanobakterien erfolgt aufgrund einer fehlenden räumlichen Trennung respiratorischer und photosynthetischer Prozesse auch bei Dunkelheit eine partielle Reduktion von Plastochinonen des photosynthetischen Apparats (Mi et al., 1992; Ogawa et al., 2013), weswegen die PBS Komplexe vermehrt mit dem PSI assoziiert sind. In dunkel-adaptierten Zellen der Glaukophyte konnte ebenfalls eine verstärkte Reduktion des PQ Pools festgestellt werden, vermutlich aufgrund von Chlororespiration, einem respiratorischen Elektronentransport von NADPH auf Plastochinon (Misumi & Sonoike, 2017). Daher erfolgte bei Anregung mit geringen Lichtintensitäten und Oxidation der Plastochinone zunächst wahrscheinlich ein Transfer der PBS zum PSII, was einen Anstieg der maximalen Fluoreszenz bedingte.

Da die klassischen NPQ Mechanismen vor allem auf eine Modifikation der LCHII Komplexe zurückzuführen sind (Ruban et al., 2007), zeigten sowohl *Cyanophora* als auch *Porphyridium* nur sehr geringe maximale NPQ Werte. In der sekundären Rotalge war dagegen eine erhöhte NPQ Kapazität zu erkennen, welche vermutlich hauptsächlich auf eine partielle Ablösung der integralen Chlorophyll a/c bindenden Antennenkomplexe zurückzuführen ist (Cheregi et al., 2015). Im Vergleich zeigten die Vertreter der Chloroplastida eine deutliche Steigerung der NPQ Kapazität. Unter anderem ist daran die Licht-induzierte Umwandlung von speziellen Xanthophyllen beteiligt, welche besonders in höheren Pflanzen eine wichtige Rolle bei der Photoprotektion spielt (Demmig-Adams, 1990; Jahns & Holzwarth, 2012). Die Aktivität des Xanthophyll-Zyklus in den Vertretern der Chloroplastida konnte mithilfe einer HPLC gestützten Pigmentanalyse nachgewiesen werden (Abb. 5.3). Obwohl geringer ausgeprägt in *K. flaccidum*, zeigten alle drei Organismen eine Licht-induzierte Umwandlung von Violaxanthin zu Zeaxanthin, welches aktiv an NPQ beteiligt ist (Frank et al., 1994; Nilkens et al., 2010). Die Streptophyte, welche unter den analysierten Organismen den Landpflanzen evolutionär am nächsten steht und unter anderem terrestrische Gebiete besiedelt, zeigte zudem eine verzögerte Aktivierung von NPQ Mechanismen (Abb. 5.1), was vermutlich auf eine frühe Adaption an die veränderten Lichtbedingungen zurückzuführen ist.

Zudem zeigten die Vertreter der Chloroplastida sowie die sekundäre Rotalge *G. theta* bei Dunkelheit sowie Normallichtbedingungen eine eindeutige Stapelung der Thylakoidmembran (Abb. 5.2), wodurch der Abstand zwischen den einzelnen Membranen verringert wird. Dies hat eine Vergrößerung der Gesamtoberfläche zur Folge und erlaubt insbesondere unter limitierenden Lichtbedingungen eine effektive Photosyntheseleistung (Mullineaux, 2005). In *Cyanophora* sowie *Porphyridium* wird eine derartige Organisation aufgrund der Antennenkomplexe verhindert. Eine deutlich größere molekulare Masse der PBS im Vergleich zu den LHC Proteinen verhindert eine Stapelung der Thylakoidmembran (Liberton et al., 2013).

Unter exzessiver Lichteinstrahlung war in der grünen Linie jedoch eine deutliche Auflösung dieser Struktur erkennbar. Die Ursache hierfür liegt hauptsächlich bei einer erhöhten Schädigung des D1 Proteins, wodurch eine Reparatur des PSII erforderlich wird (Komenda et al., 2012a). Basis dieses Reparaturmechanismus ist der FtsH-Protease Komplex, welcher für den Abbau von geschädigtem D1 verantwortlich ist (Lindahl et al., 2000; Bailey et al., 2002). Die hohe molekulare Masse des aktiven FtsH-Oligomerkomplexes verhindert allerdings den Zugang zum PSII in Regionen mit dicht gestapelten Thylakoiden (Suno et al., 2006; Kirchhoff, 2013). Eine Auflösung dieser Struktur ist daher Voraussetzung für den PSII Reparaturzyklus (Khatoon et al., 2009). Weiterhin steht diese Veränderung der Membranorganisation eng mit der Kapazität der qT Komponente des NPQ in Verbindung (Nagy et al., 2014), was auf einen vermehrten Transfer von LHCII Antennenkomplexen verweist.

6.2 Einfluss von endosymbiotischen Gentransfer auf die Anzahl differenziell exprimierter nuklearer Gene

Eine detaillierte Analyse der Stressreaktionen auf transkriptioneller Ebene zeigte eine eindeutige Korrelation zwischen der Anzahl an Transkripten mit signifikanten Expressionsunterschieden und der Genomkapazität der jeweiligen Plastiden (Abb. 5.4). Im Laufe der Evolution erfolgte aufgrund von massiven endosymbiotischen Gentransfer sowie Genverlust eine starke Reduktion des Plastidengenoms (Martin & Herrmann, 1998; Timmis et al., 2004). Dabei ist allerdings ein klarer Unterschied zwischen den untersuchten Linien zu erkennen. Beide Rotalgen besitzen eine deutlich höhere plastidäre Genomkapazität als die Vertreter der Chloroplastida (Tab. 5.1), weswegen sie eine geringere Expressionsänderung von nuklearen Genen zeigten. Insbesondere *B. natans* wies dagegen eine sehr hohe Anzahl an differenziell exprimierten Genen auf. Neben einer geringen Plastomkapazität ist dies zusätzlich das Resultat einer erhöhten Anzahl an Kern-kodierten plastidären Genen aufgrund verschiedener Ereignisse von horizontalem Gentransfer (HGT) (Archibald et al., 2003; Hopkins et al., 2012).

Unter Starklichtbedingungen zeigte die Glaukophyte wie auch *Porphyridium* ein mit Normallichtbedingungen vergleichbares Expressionsmuster (Abb. 5.5), was auf eine fehlende spezifische Antwort auf exzessive Lichtintensitäten verweist. In allen Vertretern der Chloroplastida war dagegen ein eindeutiger Einfluss von Starklicht auf das Expressionsverhalten zu erkennen. Zusätzlich zeigten in beiden Rotalgen nur drei Transkripte eine spezifische Starklicht-Regulation (Abb. 5.7), was die Theorie einer fehlenden nuklearen Stressantwort in diesen beiden Organismen zusätzlich stützt. Vermutlich liegt die Ursache hierfür bei der einer durch die höhere Kapazität des Plastidengenoms bedingten größeren Autonomie der Plastiden.

6.2.1 Identifikation des Sepx2 aus *C. paradoxa* mit putativer Funktion als pH-Sensor

Obwohl auch *Cyanophora* unter exzessiver Lichteinstrahlung zunächst keine eindeutige Reaktion aufwies, zeigten in der Glaukophyten 24 Gene eine spezifische Expression unter Starklichtbedingungen (Abb. 5.7). Eine Anhäufung von Proteinen, welche mit dem Cytoskelett in Verbindung stehen, deuten hierbei unter anderem auf eine verstärkte Zellmotilität hin. Daneben zeigte insbesondere das “*stress-enhanced protein 2*“ (Sepx2) sowie eine AAA-Typ ATPase eine starke Akkumulation der Transkriptmenge.

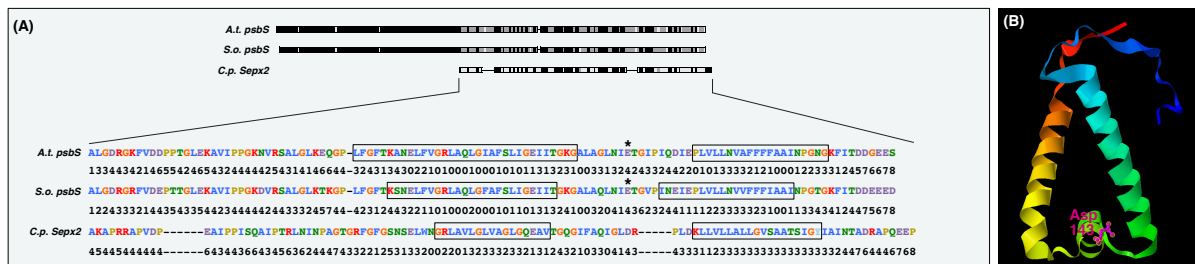


Abbildung 6.1: Sequenzanalyse des Sepx2 aus *Cyanophora paradoxa*. (A) Dargestellt ist ein multiples Alignment des Sepx2 mit bekannten PsbS Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* und *Spinacia oleracea*, wobei Boxen die Position der Transmembrandomänen und Nummern die Zugänglichkeit der jeweiligen Aminosäuren repräsentieren. Voraussetzung für die Funktion des PsbS sind protonierbare Aminosäurereste (Sternchen), welche innerhalb der Proteinschleife im Lumen der Thylakoidmembran lokalisiert sind. (B) Modellierter 3-D Struktur des Sepx2 Proteins mithilfe der I-TASSER Software (Yang & Zhang, 2015). Dargestellt ist neben den beiden Transmembrandomänen der innerhalb der Proteinschleife lokalisierte und putativ protonierbare Asparaginsäurerest.

Eine genauere Untersuchung des Sepx2 mittels Sequenzanalyse lässt eine Funktion dieses Proteins als pH Sensor – ähnlich wie das PsbS in höheren Pflanzen (Li et al., 2004) – vermuten. PsbS gehört zu der erweiterten Familie der LHC Proteine, besitzt vier Transmembrandomänen und ist in der Thylakoidmembran lokalisiert (Funk, 2001). Voraussetzung für seine Funktion als pH-Sensor sind zwei protonierbare Glutaminsäurereste, welche sich in den Proteinschleifen auf der Seite des Lumen befinden (Li et al., 2004; Fan et al., 2015). Das Sepx2 Protein aus *C. paradoxa* besitzt zwei Transmembrandomänen und auch hier befindet sich im Lumen ein putativ protonierbarer Asparaginsäurerest (Abb. 6.1), welcher möglicherweise an der Regulation von pH-induzierten Mechanismen beteiligt ist. Basierend auf phylogenetischen Analysen liegt der Ursprung des PsbS bei einem internen Duplikationsereignis innerhalb der SEP Proteinfamilie (Engelken et al., 2010; Engelken et al., 2012), was die Möglichkeit einer gemeinsamen Funktion zusätzlich stützt.

6.3 Vertreter der Chloroplastida zeigten diverse Starklicht-aktivierte zelluläre Prozesse

Eine genauere Betrachtung der zellulären Metabolismuswege sowie biologischen Prozesse, welche spezifisch unter Starklichtbedingungen aktiviert wurden, zeigte in *C. reinhardtii* unter anderem eine erhöhte Expression von photosynthetischen Genen (Abb. 5.8). Hierbei handelt es sich ausnahmslos um Proteine, welche mit dem Photosystem II assoziiert sind (Tab. 6.1). Mit Ausnahme des *psbw* Gens zeigten diese zudem eine deutliche Anhäufung der Transkriptmenge (Abb. 5.7). Sowohl Psb27 als auch Psb28 assistieren bei der Reparatur des Photosystem II. Um geschädigtes D1 zu entfernen, abzubauen und durch ein neues Protein zu ersetzen, wird das PS II bis zum RC47 Kernkomplex aufgelöst (Nixon et al., 2005; Johnson et al., 2011). Nach dem erfolgreichen Austausch des D1 Proteins erfolgt eine erneute Zusammensetzung der verschiedenen PSII Untereinheiten (Nixon et al., 2010). Psb28 ist dabei auf der Cytoplasma Seite der Thylakoidmembran lokalisiert und bindet locker an den RC47 Komplex, wobei es die Anbindung der inneren CP43 Antenne stabilisiert (Dobáková et al., 2009). Psb27 dagegen ist auf der Seite des Lumen lokalisiert, wo es ebenfalls mit CP43 interagiert (Liu et al., 2011; Komenda et al., 2012b). Zusätzlich erleichtert Psb27 die Bereitstellung von Untereinheiten des OEC wie PsbO (Nowaczyk et al., 2006; Cormann et al., 2009). Eine Stabilisierung des PSII Superkomplexes wird schließlich durch das PsbW Protein vermittelt (García-Cerdán et al., 2011).

Tabelle 6.1: Starklicht-induzierte Proteine des photosynthetischen Apparats

Photosynthese				
Organismus	Trinity ID	Definition	rel. Expression (HL)	FPKM (HL)
<i>C. reinhardtii</i>	TRINITY_DN13944_c0_g1_i1	PsbS	4,70	236,38
	TRINITY_DN1668_c0_g1_i1	Psb27	2,60	71,84
	TRINITY_DN10032_c0_g1_i2	PsbW	2,18	11,89
	TRINITY_DN11755_c0_g1_i1	Psb28	1,76	66,80
<i>B. natans</i>	TRINITY_DN18851_c0_g2_i2	PsbB	5,08	202,74
	TRINITY_DN5458_c0_g1_i1	AtpD	3,39	42,74
	TRINITY_DN18812_c0_g1_i1	AtpA	2,91	22,80

Die Starklicht-induzierte Expression dieser Proteine lässt auf eine erhöhte Schädigung des D1 Proteins schließen, wodurch eine gesteigerte Aktivität des PSII Reparaturmechanismus notwendig wird. Interessanterweise war zusätzlich eine erhöhte Expression des *psbS* Gens zu verzeichnen.

Während PsbS in höheren Pflanzen in der Thylakoidmembran lokalisiert ist und als pH Sensor für die Aktivierung von qE Mechanismen verantwortlich ist (Li et al., 2004), war die Funktion dieses Proteins in der Grünalge lange Zeit ungeklärt. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass das PsbS in *Chlamydomonas* die Anbindung von LhcSR Proteinen unterstützt (Correa-Galvis et al., 2016), welche in Grünalgen die Funktion des pH Sensors übernehmen (Peers et al., 2009) und ebenfalls eine starke Akkumulation unter Starklichtbedingungen zeigten (Abb. 5.7). Eine gesteigerte Expression dieser Proteine weist auf die Aktivierung von qE Mechanismen hin, wodurch eine verstärkte Energieabgabe in Form von Wärme ermöglicht wird (Ruban et al., 2012). Zusätzlich war eine vermehrte Anhäufung an Transkripten der erweiterten LHC Proteinfamilie zu erkennen (Abb. 5.7). Während die HLIP/OHP Proteine an dem Aufbau und der Reparatur photosynthetischer Komplexe beteiligt sind (Hey & Grimm, 2018; Li et al., 2019), ist die Funktion der photoprotektiven ELIP Proteine bisher weitestgehend ungeklärt. Allerdings weist eine Beteiligung dieser Proteine an der Chlorophyll Synthese (Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007; Zhao et al., 2017) ebenfalls auf eine gesteigerte Aktivierung von PSII Reparaturmechanismen hin.

Während das LhcSR3 Protein sowie weitere Vertreter der LHC Familie auch in *Bigeloviella* eine erhöhte Anzahl an Transkripten aufwies (Abb. 5.7), war in der Streptophyte *K. flaccidum* keine spezifische Expression dieser Proteine unter Starklichtbedingungen vorhanden. Dabei weist eine fehlende Starklicht-induzierte Expression von LhcSR Proteinen, welche in beiden einzelligen Grünalgen eine essentielle Funktion bei Photoprotektion spielen, auf eine verstärkte PsbS-abhängige Aktivierung von qE hin, welche womöglich mit der Grana-Organisation der Thylakoidmembran in Verbindung steht.

Daneben zeigten in *Chlamydomonas* Proteine mit einer Funktion innerhalb der posttranslationalen Prozessierung im Endoplasmatischen Retikulum (ER) eine spezifische Anhäufung an Transkripten (Abb. 5.8), insbesondere Proteine, welche an der ER-assoziierten Protein Degradierung (ERAD) beteiligt sind (Tab. 6.2). Nicht korrekt gefaltete Proteine werden von verschiedenen Chaperonen wie dem BiP (*“binding immunoglobulin protein“*) (Plempner et al., 1997; Hendershot, 2004) oder Calnexin und Calretikulin (Hebert et al., 1995; Williams, 2006) im Lumen des ER erkannt und anschließend mithilfe von ERAD ubiquitiniert und schließlich über das Proteasom abgebaut (Meusser et al., 2005; Hegde & Ploegh, 2010). Hierbei wiesen vor allem verschiedene Chaperone wie das Hsp70B, Hsp90A, Calretikulin und eine Disulfid-Isomerase (PDI), welche an dem ERAD gestützten Proteinabbau beteiligt sind (Fewell et al., 2001; Nishikawa et al., 2005) eine hohe Transkriptmenge auf (Tab. 6.2).

Tabelle 6.2: Starklicht-induzierte Proteine mit einer Funktion innerhalb der posttranslationalen Prozessierung im Endoplasmatischen Retikulum

Protein Prozessierung im ER					
Organismus	Trinity ID	Definition	Funktion	rel. Expression (HL)	FPKM (HL)
<i>C. reinhardtii</i>	TRINITY_DN14477_c7_g2_i1	Hsp90A	ERAD	1,44	69,32
	TRINITY_DN13833_c2_g3_i1	Hsp70B	ERAD/Ubiquitin Ligase Komplex	1,24	187,24
	TRINITY_DN14251_c8_g1_i1	Calretikulin	Chaperon	1,20	156,16
	TRINITY_DN44326_c0_g1_i1	TRAB, beta	Protein Targeting	1,13	30,88
	TRINITY_DN6519_c0_g2_i1	TRAB, alpha	Protein Targeting	1,03	32,96
	TRINITY_DN35106_c0_g1_i1	PDI A1	Protein Targeting	1,00	61,84
	TRINITY_DN14237_c1_g2_i1	Hsp90B	Chaperon	1,00	15,01
	TRINITY_DN13849_c6_g1_i2	ER ATPase CDC48	ERAD	0,99	22,65
	TRINITY_DN14042_c11_g1_i2	Sec61	Translokon	0,87	10,27
	TRINITY_DN238_c0_g1_i1	Sec13/COP-II	Vesikeltransport	0,82	13,02
	TRINITY_DN13276_c1_g2_i1	Ufd1	ERAD/Transport Komplex	0,62	5,55
<i>B. natans</i>	TRINITY_DN9741_c1_g1_i1	HspA1s	ERAD/Ubiquitin Ligase Komplex	2,37	10,73
	TRINITY_DN2841_c0_g1_i1	Hsp90A	ERAD	1,95	6,64
	TRINITY_DN19183_c3_g1_i1	Calnexin	Chaperon	1,85	5,89
	TRINITY_DN17503_c2_g2_i1	BiP	Chaperon	1,56	79,29
	TRINITY_DN13708_c0_g1_i6	HspBP1	ERAD/Ubiquitin Ligase Komplex	1,31	20,60
	TRINITY_DN19631_c0_g1_i10	ER ATPase CDC48	ERAD	1,11	27,50
	TRINITY_DN19987_c0_g2_i9	Hsp90A	ERAD	1,03	2,38
<i>K. flaccidum</i>	TRINITY_DN64282_c0_g2_i8	RAD23	ERAD	1,66	6,90
	TRINITY_DN64866_c2_g1_i10	Sec31	Vesikeltransport	1,35	4,58

Zudem zeigen sowohl 26S Elemente des proteasomalen proteolytischen Zentrums sowie verschiedene regulatorische 20S Proteine eine deutliche Anhäufung (Tab. 6.3). Zusammen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass unter den analysierten Starklichtbedingungen generell eine gesteigerte Proteinabbaurate auftrat. Auch in *B. natans* war unter intensiver Lichteinstrahlung eine erhöhte Aktivität von Proteinabbau-Mechanismen zu erkennen (Abb. 5.9). Neben einer gesteigerten Expression des BiP waren hier ebenfalls verschiedene Komponenten der ERAD Maschinerie wie Calnexin, Hsp90A, HspA1s und eine ER-typische ATPase (CDC48) vertreten (Tab. 6.2). In *K. flaccidum* war dagegen lediglich eine spezifische Expression der RAD23 Komponente der ERAD Maschinerie und des Sec31 Proteins erkennbar, welches an der Vesikelbildung an der ER Membran beteiligt ist (Tab. 6.2) (Salama et al., 1997).

Tabelle 6.3: Starklicht-induzierte Proteine des Proteasoms

Proteasom					
Organismus	Trinity ID	Definition	Funktion	rel. Expression (HL)	FPKM (HL)
<i>C. reinhardtii</i>	TRINITY_DN42745_c0_g1_i1	Rpn3	regulatorische 26S Untereinheit	0,88	17,82
	TRINITY_DN14075_c4_g3_i2	Rpn8	regulatorische 26S Untereinheit	0,86	6,69
	TRINITY_DN8969_c0_g2_i1	PSMA5	proteolytische 20S Untereinheit	0,83	14,47
	TRINITY_DN15098_c0_g1_i1	PSMA2	proteolytische 20S Untereinheit	0,78	17,72
	TRINITY_DN12136_c0_g1_i1	Rpn9	regulatorische 26S Untereinheit	0,72	6,92
	TRINITY_DN12427_c0_g2_i1	Rpn6	regulatorische 26S Untereinheit	0,71	9,46

Tabelle 6.4: Starklicht-induzierte Proteine beteiligt am RNA Transport

RNA Transport					
Organismus	Trinity ID	Definition	Funktion	rel. Expression (HL)	FPKM (HL)
<i>C. reinhardtii</i>	TRINITY_DN50984_c0_g1_i1	EIF3G	Translationsfaktor	1,21	53,61
	TRINITY_DN14604_c1_g1_i2	EIF3E	Translationsfaktor	1,14	12,76
	TRINITY_DN238_c0_g1_i1	Sec13	Nuklearer Kernkomplex (NPC)	0,82	13,02
	TRINITY_DN14138_c12_g2_i1	THOC5	Transkriptions-Export Komplex (TRES)	0,68	9,68
	TRINITY_DN13536_c0_g1_i4	EIF2B	Translationsfaktor	0,68	2,54
<i>B. natans</i>	TRINITY_DN17664_c0_g1_i5	EIF4E	Translationsfaktor	3,28	36,09
	TRINITY_DN63579_c0_g1_i1	EEF1A	Elongationsfaktor	2,91	19,73
	TRINITY_DN14995_c0_g4_i1	EIF3E	Translationsfaktor	2,37	84,82
	TRINITY_DN19185_c4_g1_i1	Upf2	Exon-Junction Komplex	2,26	25,93
	TRINITY_DN19485_c5_g6_i3	Upf1	Exon-Junction Komplex	2,07	11,08
	TRINITY_DN8068_c0_g4_i1	EIF4A	Translationsfaktor	2,05	7,50
	TRINITY_DN36086_c0_g1_i1	Upf1	Exon-Junction Komplex	1,95	57,37
	TRINITY_DN19199_c0_g1_i4	EIF4G	Translationsfaktor	1,87	13,72
	TRINITY_DN56250_c0_g1_i1	EIF3D	Translationsfaktor	1,60	4,42

Neben der offensichtlich gesteigerten Degradierung von Proteinen war in der primären Grünalge zusätzlich eine erhöhte Proteinbiosynthese zu verzeichnen (Abb. 5.8). Sowohl ein gesteigerter RNA Transport aus dem Kern (Tab. 6.4) sowie eine Anhäufung von verschiedenen Untereinheiten des Spliceosom-Komplexes (Tab. 6.5) weisen auf eine erhöhte Rate von Transkription sowie Translation hin. Besonders auffällig war hier eine Starklicht-spezifische Expression von Genen, deren Produkte Translationsfaktoren darstellen oder Bestandteile des nuklearen Kernkomplexes (NPC) oder des Transkript-Export Komplexes (TRES) sind. Besonders der Transkriptionsfaktor EIF3G zeigte eine starke Akkumulation unter Starklichtbedingungen.

Tabelle 6.5: Starklicht-induzierte Proteine des Spliceosoms

Spliceosom					
Organismus	Trinity ID	Definition	Funktion	rel. Expression (HL)	FPKM (HL)
<i>C. reinhardtii</i>	TRINITY_DN13833_c2_g3_i1	HspA1s	mRNA Prozessierung/ Prp19 Komplex	1,2	187,2
	TRINITY_DN13835_c12_g1_i1	SNRPA1	Spliceosom Ribonukleoprotein A	0,9	23,6
	TRINITY_DN13890_c23_g1_i1	SF3A1	Splicingfaktor	0,9	11,4
	TRINITY_DN50314_c0_g1_i1	SNRPD2	Spliceosom Ribonukleoprotein D2	0,8	25,5
<i>B. natans</i>	TRINITY_DN18670_c9_g1_i5	SF3B4	Splicingfaktor	2,8	18,8
	TRINITY_DN9741_c1_g1_i1	HspA1s	mRNA Prozessierung/ Prp19 Komplex	2,4	10,7
	TRINITY_DN16203_c0_g1_i6	AQR	mRNA Prozessierung/ Prp19 Komplex	1,9	8,8
	TRINITY_DN17072_c0_g1_i4	PQBP1	mRNA Prozessierung/ Prp19 Komplex	1,8	24,5
	TRINITY_DN12121_c0_g1_i2	PRPF31	U4/U6 Ribonukleoprotein PRP31	1,7	31,5
	TRINITY_DN19905_c1_g1_i3	SF3B1	Splicingfaktor	1,7	5,5
	TRINITY_DN8772_c0_g1_i4	PRP28	RNA Helikase	1,6	31,5
	TRINITY_DN17451_c0_g1_i17	PRP22	RNA Helikase	1,5	5,3
	TRINITY_DN11682_c0_g1_i2	SNRPF	Spliceosom Ribonukleoprotein F	1,3	131,3
	TRINITY_DN12151_c0_g3_i2	CDC5	Splicingfaktor	1,1	67,1
<i>K. flaccidum</i>	TRINITY_DN64988_c0_g1_i2	DBP2	RNA Helikase	1,5	50,9

Die sekundäre Grünalge *Bigelowiella natans* wies dagegen eine stark erhöhte Expression von ribosomalen Proteinen auf (Abb. 5.9), was ebenfalls auf eine verstärkte Proteinbiosynthese hinweist. Zusätzlich zeigte sich auch hier eine Anhäufung von Translationsfaktoren, von Komponenten des NPC Komplexes sowie verschiedenen Untereinheiten des Spliceosoms (Tab. 6.4 und 6.5). In erster Linie ist diese erhöhte Aktivität der Proteinbiosynthese wohl auf die verstärkte Produktion von Proteinen zurückzuführen, welche als Reaktion auf die veränderten Umweltbedingungen exprimiert werden. In *Chlamydomonas* sind dies unter anderem Proteine der erweiterten LHC Familie mit photoprotektiven Funktionen, wogegen in *B. natans* vermehrt Proteine mit antioxidativen Eigenschaften synthetisiert wurden (Tab. 5.4). In *Klebsormidium* konnte dagegen eine derartige Steigerung von Transkription bzw. Translation nicht verzeichnet werden.

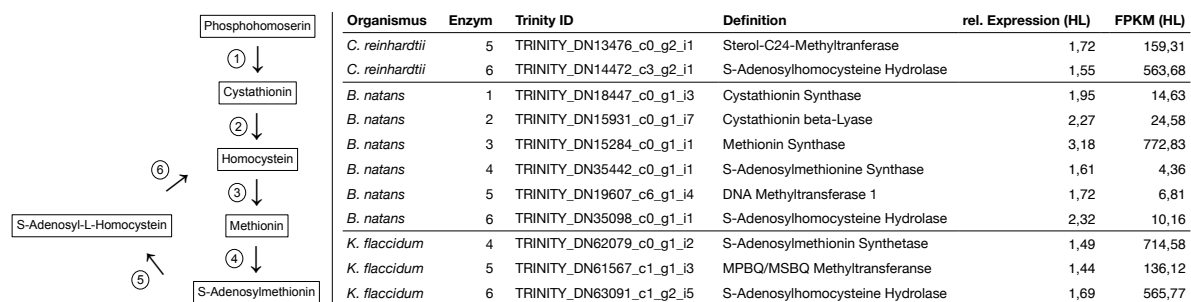
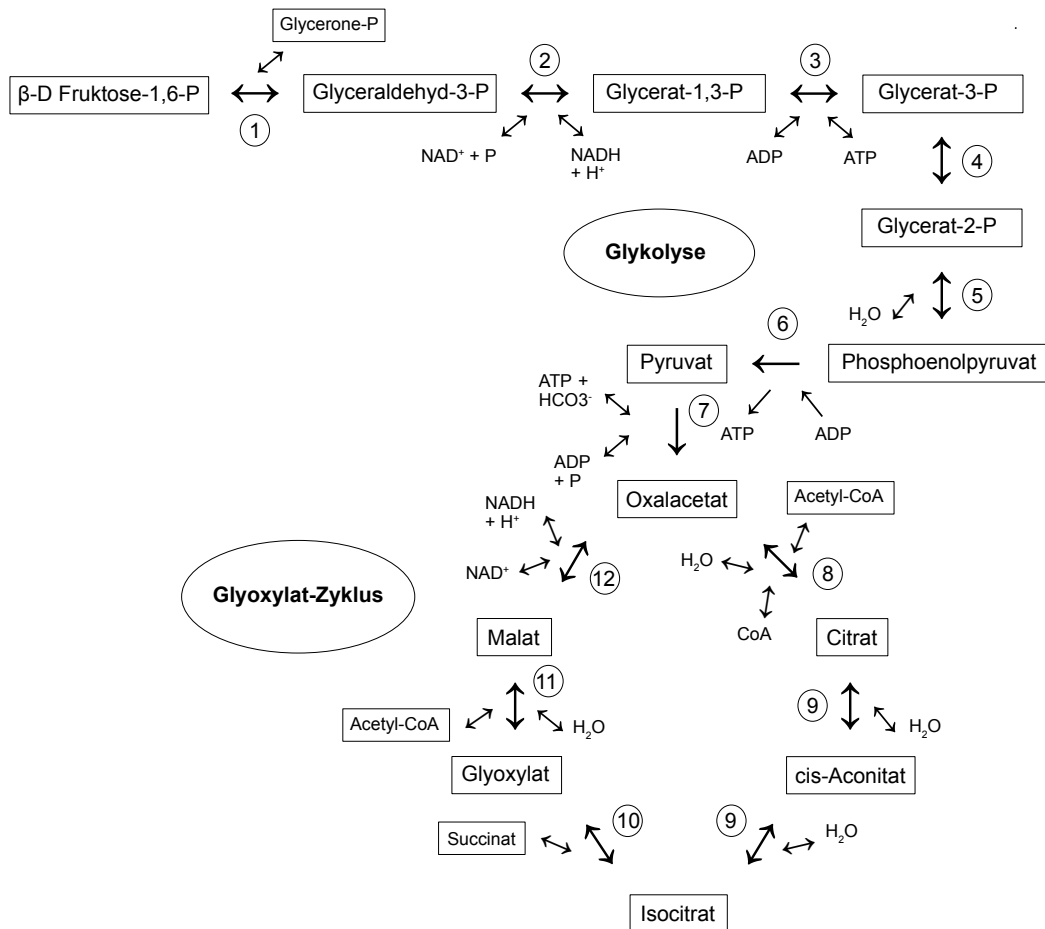


Abbildung 6.2: Starklicht-induzierte Expression von Enzymen der S-Adenosylmethionin Synthese. (*links*) Schematische Darstellung der einzelnen enzymatischen Schritte, welche für die Produktion von S-Adenosylmethionin (SAM) verantwortlich sind. (*rechts*) Alle Vertreter der Chloroplastida – insbesondere die sekundäre Grünalge *B. natans* – zeigten eine Starklicht-induzierte Expression von Enzymen, welche an der Synthese von SAM involviert sind. Während die beteiligten Methyltransferasen in *C. reinhardtii* und *K. flaccidum* auf eine verstärkte Produktion von Steroiden bzw. Tocopherol und Plastochinon hindeuten, war in *Bigelowiella* die Starklicht-induzierte Expression einer DNA-Methyltransferase zu erkennen.

Weiterhin war in der sekundären Grünalge *B. natans* unter Starklicht eine verstärkte Aktivität innerhalb des Cystein- und Methionin Metabolismus zu erkennen (Abb. 5.9), wobei Aspartat, Cystein und Serin als Ausgangsstoff für die Synthese von S-Adenosylmethionin (SAM) dient (Ravel et al., 1998). Vor allem die Methionin Synthase, welche innerhalb des SAM-Zyklus Methionin aus Homocystein generiert (Eichel et al., 1995), wies hierbei eine besonders starke Akkumulation auf (Abb. 6.2). SAM ist als universeller Spender von Methylgruppen an diversen biologischen Prozessen wie der Methylierung von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren beteiligt (Poulton, 1981; Moffatt & Weretilnyk, 2002).

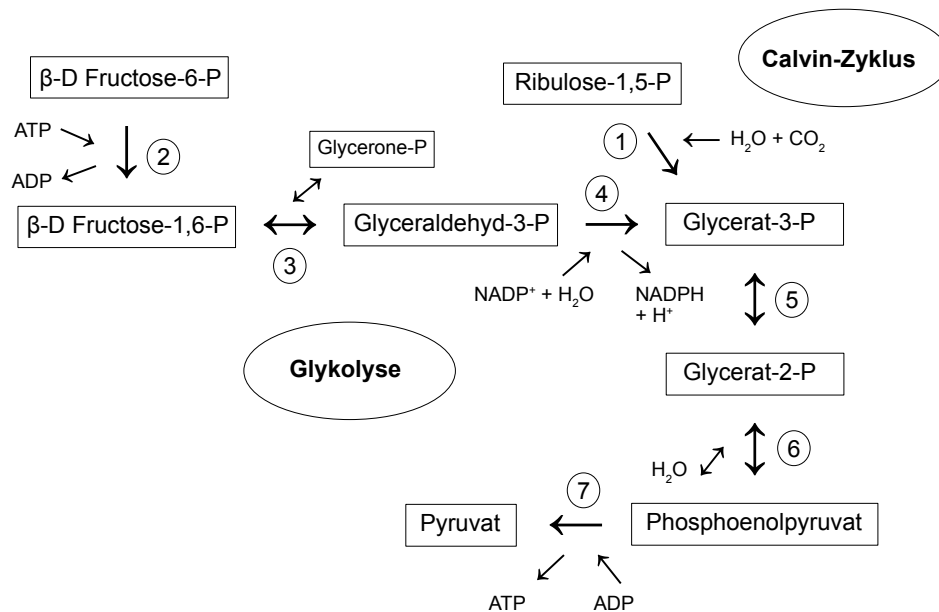


Enzym	Trinity ID	Definition	rel. Expression (HL)	FPKM (HL)
1	TRINITY_DN56302_c0_g1_i1	Fruktose-Bisphosphat Aldolase	2,14	8,34
2	TRINITY_DN2636_c0_g1_i1	Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase	2,94	20,35
3	TRINITY_DN15462_c0_g1_i1	Phosphoglycerat Kinase	2,29	16,29
4	TRINITY_DN7472_c0_g1_i2	Phosphoglycerat Mutase	1,14	25,76
5	TRINITY_DN54582_c0_g1_i1	Enolase	2,47	12,11
6	TRINITY_DN5178_c0_g2_i1	Pyruvat Kinase	2,25	9,43
7	TRINITY_DN7974_c0_g2_i1	Pyruvate Carboxylase	1,87	5,98
8	TRINITY_DN63349_c0_g1_i1	Citrat Synthase	1,82	5,67
9	TRINITY_DN5196_c0_g1_i1	Aconitat Hydratase	2,05	7,42
10	TRINITY_DN45242_c0_g1_i1	Isocitrate Lyase	1,63	4,47
11	TRINITY_DN17752_c0_g1_i5	Malate Synthase	2,01	8,39
12	TRINITY_DN36206_c0_g1_i1	Malate Dehydrogenase	2,07	7,61

Abbildung 6.3: Schematische Darstellung der unter Starklicht aktivierten metabolischen Stoffwechselwege in *B. natans*. Neben der Glykolyse (1-6), bei welcher Pyruvat, ATP und NADH gebildet wird, war unter exzessiver Lichteinstrahlung in *Bigelowiella* zudem eine erhöhte Aktivität des Glyoxylat-Zyklus (7-13) zu erkennen, welcher eine modifizierte Variante des Citrat-Zyklus darstellt. Hierbei dient Acetyl-CoA als Ausgangsstoff für die Produktion von Succinat und NADH, welche anschließend als Substrate für die mitochondriale Atmungskette verwendet werden.

Weiterhin wird es für die Synthese von Ethylen verwendet (Adams & Yang, 1979), welches als Signalmolekül eine wichtige Rolle bei der allgemeinen Stressantwort von Pflanzen besitzt (Morgan & Drew, 1997). Die Starklicht-induzierte Expression einer DNA-Methyltransferase (Abb. 6.2) deutet in *Bigelowiella* allerdings auf eine gesteigerte Methylierung von DNA hin, womöglich als Bestandteil einer Expressionskontrolle (Chinnusamy & Zhu, 2009). Eine gesteigerte Expression der S-Adenosylmethionin Synthase in *K. flaccidum* verweist ebenfalls auf eine vermehrte Produktion von SAM (Abb. 6.2). Im Gegensatz zu *Bigelowiella* weist die erhöhte Expressionsrate einer MPBQ/MSBQ Methyltransferase in *Klebsormidium* jedoch auf eine vermehrte Produktion von Tocopherol bzw. Plastochinon hin (Cheng et al., 2003). Neben einer Funktion des Plastochinons innerhalb der photosynthetischen Elektronentransportkette, besitzen beide Proteine antioxidative Eigenschaften indem sie zur Deaktivierung von Singulett-Sauerstoff beitragen (Kruk et al., 2005; Nowicka & Kruk, 2012). In *C. reinhardtii* war dagegen eine verstärkte Aktivität der S-Adenosylhomocystein Hydrolase sowie einer Sterol-C24-Methyltransferase zu erkennen (Abb. 6.2), was auf eine verstärkte Produktion von Steroiden hinweist.

Daneben war in *Bigelowiella* vor allem ein verstärkter Kohlenhydrat Metabolismus zu erkennen, einschließlich Glykolyse/Glukoneogenese, Glyoxylat Metabolismus sowie eine auffällige Aktivität der oxidativen Phosphorylierung (Abb. 5.9). Hierbei weist die Starklicht-induzierte Expression der Pyruvat Kinase auf eine verstärkte Produktion von Pyruvat im Zuge der Glykolyse hin, wobei gleichzeitig ATP und NADH generiert wird (Abb. 6.3). Zusätzlich war eine erhöhte Aktivität des Glyoxylat Metabolismus erkennbar, genauer gesagt des Glyoxylat-Zyklus – eine modifizierte Variante des Citrat-Zyklus (Cioni et al., 1981; Beeckmans, 2001). Dabei wird Acetyl-CoA als Ausgangsstoff für Herstellung von Succinat und NADH verwendet, welche vermutlich als Substrate für die mitochondriale Atmungskette dienen. Auch in *K. flaccidum* stach unter anderem der Prozess der Glykolyse/Glukoneogenese hervor (Abb. 5.10), wobei die Starklicht-induzierte Expression der 6-Phosphofruktokinase (2), Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (4) sowie Pyruvat Kinase (7) in *Klebsormidium* ebenfalls auf eine vermehrte Aktivität der Glykolyse und Produktion von Pyruvat schließen lässt (Abb. 6.4). Zusätzlich war eine gesteigerte Kohlenstofffixierung durch die RubisCO und Produktion von Glycerat-3-Phosphat zu verzeichnen, welches allerdings nicht für den Aufbau von Stärke verwendet wird, sondern größtenteils im Zuge der Glykolyse verstoffwechselt wird. Insbesondere RubisCO (1) sowie die drei Enzyme Fruktose-Bisphosphat Aldolase (3), Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (7) und Pyruvat Kinase (4) zeichneten sich zusätzlich durch eine stark erhöhte Transkriptmenge aus (Tab. 6.4).



Enzym	Trinity ID	Definition	rel. Expression (HL)	FPKM (HL)
1	TRINITY_DN61798_c4_g1_i3	Ribulose-Bisphosphate Carboxylase	2,28	1026,03
2	TRINITY_DN65684_c0_g1_i1	6-Phosphofruktokinase 1	1,64	35,37
3	TRINITY_DN61372_c0_g1_i1	Fructose-Bisphosphat Aldolase	2,63	104,58
4	TRINITY_DN62140_c1_g1_i2	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (NADP+)	1,40	94,37
5	TRINITY_DN59909_c1_g2_i6	Phosphoglycerat Mutase	2,05	40,17
6	TRINITY_DN58419_c1_g2_i1	Enolase	1,42	3,54
7	TRINITY_DN64244_c0_g2_i2	Pyruvat Kinase	1,83	94,14

Abbildung 6.4: Schematische Darstellung der unter Starklicht aktivierten metabolischen Stoffwechselwege in *K. flaccidum*. In der Streptophyte war unter Starklichtbedingungen unter anderem eine verstärkte Kohlenstofffixierung und Produktion von Glycerat-3-Phosphat durch die RubisCO (1) zu erkennen. Gleichzeitig weist die spezifische Expression der 6-Phosphofruktokinase (2), Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (4) sowie Pyruvat Kinase (7) auf eine verstärkte Aktivität der Glykolyse (2-7) hin, wobei Pyruvat und NADPH gebildet wird.

In der Streptophyte *K. flaccidum* war zudem eine verstärkte Aktivität des Stickstoff-Zyklus zu verzeichnen (Abb. 5.10). Hierbei wird extrazelluläres Nitrat aufgenommen und über die assimilatorische Nitratreduktion in biologisch nutzbares Ammonium umgewandelt (Fernandez & Galvan, 2008). Die Ferredoxin-Nitrite Reduktase, welche dabei den zentralen Schritt – die Reduktion von Nitrit zu Ammonium – katalysiert, zeigte unter intensiver Lichteinstrahlung sowohl in *K. flaccidum* als auch *B. natans* eine starke Anhäufung der Transkriptmenge (Tab. 6.6). Ammonium wird unter anderem für den Aufbau von stickstoffhaltigen Proteinen und Nukleinsäuren verwendet.

Tabelle 6.6: Starklicht-induzierte Proteine des Stickstoff Metabolismus**Stickstoff Metabolismus**

Organismus	Trinity ID	Definition	rel. Expression (HL)	FPKM (HL)
<i>B. natans</i>	TRINITY_DN20144_c1_g9_i5	Ferredoxin Nitrit Reduktase	1,74	256,74
<i>K. flaccidum</i>	TRINITY_DN64261_c0_g1_i2	Ferredoxin Nitrit Reduktase	2,48	180,50
	TRINITY_DN66298_c0_g3_i1	Nitrat Reduktase	2,23	68,09
	TRINITY_DN65609_c0_g2_i1	Nitrat/Nitrit Transporter	1,50	62,55

Zusammengefasst zeigten im Vergleich zu *C. paradoxa* und der Rhodophyta alle Vertreter der Chloroplastida deutlich ausgeprägte Reaktionen auf die verwendeten Starklichtbedingungen. Hauptaufgabe von photoprotektiven Mechanismen ist die Vermeidung von ROS, welche bei einem intensiven Energiefluss durch das PSII entstehen (Krieger-Liszkay, 2005). Neben der Aktivierung von NPQ Mechanismen, welche eine reduzierte Energieaufnahme am PSII sowie eine vermehrte Energieabgabe in Form von Wärme ermöglichen (Müller et al., 2001), war eine Starklicht-spezifische Aktivität unterschiedlicher zellulärer Prozesse zu erkennen. Intensive Lichtbedingungen sind durch eine erhöhte Photosyntheserate und damit gesteigerten Kohlenstofffixierung unter normalen Kultivierungsbedingungen – ohne zusätzliche Gabe an CO₂ – zumeist gleichbedeutend mit einer Limitierung an Kohlenstoffdioxid. Dies wiederum führt durch einen reduzierten Kohlenstoff Metabolismus zu einer Limitierung an NADP⁺ und ADP, was den photosynthetischen Elektronentransport rückwirkend hemmt (Stitt, 1986). Eine Möglichkeit dieses Problem zu lösen, ist die Aktivierung von sogenannten Kohlenstoff-konzentrierenden Mechanismen (CCM) (Ghoshal & Goyal, 2000), welche die Konzentration an CO₂ steigern und somit zur Aufrechterhaltung des Calvin-Zyklus beitragen.

Sowohl in *C. reinhardtii* als auch *K. flaccidum* war die Starklicht-spezifische Expression einer Carbonanhydrase zu erkennen (Abb. 5.7), welche die Umwandlung von Hydrogencarbonat zu Kohlenstoffdioxid katalysiert (Badger, 2003) und somit ein zentraler Bestandteil verschiedener CCM Mechanismen ist. Daneben war in beiden Organismen eine verstärkte Expression des “proton gradient regulation 5“ Proteins (PGR5) auffällig (Abb. 5.7), welches eine wichtige Funktion innerhalb des zyklischen Elektronentransports spielt (Munekage et al., 2002). Durch ein Recycling von Elektronen am PSI wird hierbei auch ohne die Verfügbarkeit von NADP⁺ ein elektrochemischer Gradient aufrechterhalten, was zum einen die Produktion von ATP ermöglicht und zudem pH-regulierte NPQ Mechanismen aktiviert (Joliot & Johnson, 2011), wobei letzteres die Bedeutung des zyklischen Elektronentransports für die Photoprotektion unterstreicht.

Während in *Chlamydomonas* und *Klebsormidium* demzufolge die Modifikation der photosynthetischen Prozesse im Vordergrund steht, weist in *Bigeloviella* die massiv gesteigerte Produktion von Proteinen mit antioxidativen Eigenschaften auf eine erhöhte Schädigung der Photosysteme hin, wodurch der photosynthetische Elektronentransport womöglich stark eingeschränkt ist. Unterstützt wird dies durch eine geringere relative Elektronentransportrate in der sekundären Grünalge (Abb. 5.1). Dies könnte die Ursache für die verstärkte Aktivität der Glykolyse, des Glyoxylat-Zyklus sowie der oxidativen Phosphorylierung innerhalb der mitochondrialen Membran sein, welche zusammen womöglich den Verlust der photosynthetischen ATP Produktion komplementieren.

Zusätzlich war in *K. flaccidum* eine erhöhte Expression des “non symbiotic hemoglobin“ erkennbar (Abb. 5.7). Obwohl Hämoglobine hauptsächlich unter Bedingungen von Hypoxie exprimiert werden (Taylor et al., 1994), erfolgt die direkte Regulation vermutlich über eine reduzierte ATP Produktion (Nie & Hill, 1997). Es ist für die Deaktivierung von Stickstoffmonoxid verantwortlich, wobei gleichzeitig Nitrat zurückgewonnen wird (Igamberdiev & Hill, 2004). Zusammen mit der gesteigerten Aktivität des Stickstoff-Zyklus verweist dies womöglich auf die verstärkte Bedeutung des Nitrats als limitierender Faktor in höheren Wasserpflanzen (Vitousek & Howarth, 1991).

6.4 Überexpression der *V. litorea* FtsH Protease hat Einfluss auf die Organisation der Photosysteme in *C. reinhardtii*

Des Weiteren wurde eine Untersuchung von *C. reinhardtii* FtsH-Überexpressionsmutanten durchgeführt. Hierzu wurde zum einen das Kern-kodierte *ftsh2* aus *Chlamydomonas* sowie Plastiden-kodiertes *ftsh* aus der Xanthophyceae *Vaucheria litorea* in das Plastom von *C. reinhardtii* eingebracht. Während morphologische Untersuchungen mithilfe von trans-elektronenmikroskopischen Aufnahmen keine Veränderung innerhalb der Plastiden- oder Thylakoidorganisation aufwiesen (Abb. 5.11), zeigten Messungen der maximalen photochemischen Effizienz des PSII (Fv/Fm) einige deutliche Veränderungen.

Bei Normallicht-adaptierten Zellen zeigte die 927 Überexpressionslinie im Vergleich zu dem cg13 Kontrollstamm und den 830 Mutanten eindeutig geringere Fv/Fm Werte (Abb. 5.13). Gleichzeitig war hier nach einer Kultivierung unter Starklichtbedingungen kein signifikanter Abfall der PSII Effizienz zu erkennen, welcher sowohl bei der cg13 Kontrolle sowie den Klonen der 830 Überexpressionslinie zu verzeichnen war. Hauptsächlich liegt diese Starklicht-induzierte Reduktion der Fv/Fm Werte in einer Aktivierung von NPQ Mechanismen begründet.

Neben einer verstärkten Energieabgabe in Form von Wärme erfolgt durch den sogenannten Zustandswechsel q_T ein Abbau der LHCII Antennenkomplexe (Delosme et al., 1996), was eine verminderte Energieaufnahme durch das PSII zur Folge hat. Zusätzlich führen anhaltende Bedingungen von exzessiver Lichteinstrahlung zu einer vermehrten Schädigung des D1 Proteins. Daher führte bei Starklicht-adaptierten Kulturen eine verstärkte Reparatur des Photosystem II zu einer partiellen Auflösung des PSII Superkomplexes, was die photochemische Effizienz signifikant verringerte. Die deutlich reduzierten Werte in der 927 Überexpressionsmutante weisen auf eine veränderte Organisation der photosynthetischen Komplexe, insbesondere des PSII hin. Ein Pigmentgehalt an Chlorophyll a und b, welcher dem der Kontrolle gleicht (Abb. 5.12), spricht hierbei jedoch gegen eine vermehrte Auflösung des PSII Superkomplexes oder von LHCII Antennenproteinen. Nach Starklichtbehandlung dagegen weist die 927 Überexpressionslinie eine verringerte Konzentration an Chlorophyll b auf, was auf einen verstärkten Abbau von LHCII Komplexen unter diesen Bedingungen hinweist.

Zusätzlich zeigten Klone der 927 Linie nach einer Kultivierung unter moderaten Lichtbedingungen eine deutlich geringere NPQ Kapazität im Vergleich zum Kontrollstamm und den 830 Überexpressionsmutanten (Abb. 5.14). Diese Ergebnisse gehen mit der verminderten Effizienz des PSII einher. Im Gegensatz zeigten Starklicht-adaptierte Zellen der 927 Mutante eine vergleichbare NPQ Kapazität wie die cg13 Kontrolle und 830 Linie, was grundsätzlich nicht auf eine reduzierte Photoprotektion hinweist. Dies wird zusätzlich durch die Anwesenheit eines aktiven Xanthophyll-Zyklus gestützt. Basierend auf den Ergebnissen der HPLC Analyse war im Vergleich zum cg13 Kontrollstamm und den Klonen der 830 Linie in den 927 Mutanten keine Veränderung innerhalb der Licht-induzierten Umwandlung von Violaxanthin zu Zeaxanthin zu erkennen (Abb. 5.12). Gleichzeitig zeigten alle untersuchten Klone eine vergleichbare Licht-induzierte Veränderung der Neoxanthin-, Lutein- und β -Carotin Konzentrationen. Während der Anstieg an Lutein und β -Carotin auf deren photoprotektive Funktionen zurückzuführen sind, da sie zur Deaktivierung von Triplett-Chlorophyllen bzw. Singulett-Sauerstoff beitragen (Telfer, 2002; Jahns & Holzwarth, 2012), ist eine deutlich geringere Konzentration an Neoxanthin vermutlich in einem vermehrten Abbau von LHCII M-Trimeren begründet, welche etwa 90% des in der Zelle vorhandenen Neoxanthins binden (Croce et al., 1999).

Interessanterweise zeigten Normallicht-adaptierte Klone der 927 Mutante bei geringen Intensitäten des aktinischen Messlichts negative NPQ Werte (Abb. 5.14), ähnlich wie die Glaukophyte *C. paradoxa* (Abb. 5.1).

Womöglich ist dies auf eine vermehrte Assoziation von Antennenkomplexen mit dem PSII aufgrund eines reduzierten PQ Pools zurückzuführen. Ein leichter Anstieg der Lichtintensität würde demnach zu einer verstärkten Oxidation von Plastochinonen und damit zu einem Transfer von LHCII Antennen zum PSII führen, wodurch zunächst ein Anstieg der maximalen Fluoreszenz und Reduktion des NPQ erfolgt. Gleichzeitig würde dies die deutlich geringeren Fv/Fm Werte unter moderaten Lichtbedingungen erklären. Die Xanthophyceae *V. litorea* besitzt spezielle Fucoxanthin Chlorophyll a/b bindende Antennenkomplexe (FCP) zur Lichtabsorption (Grossman et al., 1990). Womöglich besitzt die FtsH Protease aufgrund dieser veränderten Thylakoidorganisation ebenfalls eine modifizierte Funktion. Eine erhöhte Aktivität innerhalb des Cytochrom-b₆f Abbaus würde beispielsweise zu einer verstärkten Reduktion von Plastochinonen und somit einer Ablösung von LHCII Komplexen führen, was eine geringere Effizienz des PSII zur Folge hätte.

6.4.1 Die FtsH Protease zeigt eine hohe strukturelle und funktionale Konservierung

Während das FtsH Protein aus Grünalgen und höheren Pflanzen gut charakterisiert ist, ist über die Zusammensetzung und genaue Funktionsweise dieser Protease in Glaukophyten sowie Rotalgen nur wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine AAA-Typ ATPase identifiziert werden, welche in *C. paradoxa* eine deutliche und spezifische Hochregulation unter Starklichtbedingungen aufwies (Abb. 5.7). Mithilfe einer Sequenzanalyse konnten weiterhin typische Elemente der FtsH Proteinfamilie identifiziert werden (Abb. 6.5). Ein multiples Alignment zusammen mit bekannten FtsH Sequenzen des Cyanobakteriums *Synechocystis* sowie der Modellorganismen *C. reinhardtii* und *A. thaliana* zeigt, dass dieses Protein sowohl spezifische Motive der AAA-ATPase Domäne wie die konservierten Walker A und B Motive sowie das Zn²⁺ Metalloprotease Motiv besitzt. Die in *Cyanophora* identifizierte "cell division protease FtsH" weist dagegen keine dieser typischen Sequenzmotive auf. Interessanterweise deutet eine erste phylogenetische Analyse darauf hin, dass die *C. paradoxa* ATPase zur Typ A Untereinheit gezählt werden kann (Abb. 6.5). Von Vertretern der Chloroplastida ist bekannt, dass die FtsH Protease Hetero-Oligomere aus Typ A und Typ B Untereinheiten bildet, wobei an diesem Komplex doppelt so viele Typ B Einheiten beteiligt sind (Zaltsman et al., 2005). Die alleinige Anhäufung der Typ A Untereinheit in *C. paradoxa* kann auf mehrere Ursachen zurückgeführt werden. Zum einen bildet die *Cyanophora* FtsH Protease womöglich funktionale Homo-Oligomere wie zum Beispiel FtsH4 in *Synechocystis* (Boehm et al., 2012).

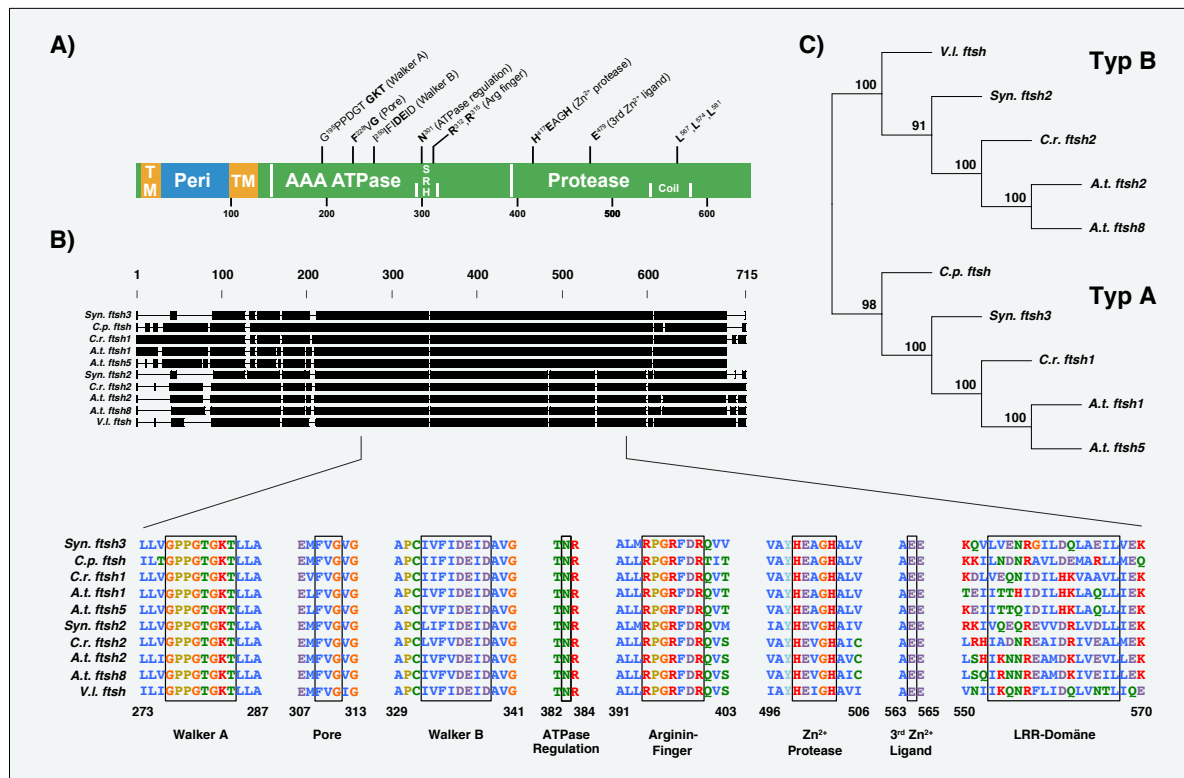


Abbildung 6.5: Sequenzanalyse und phylogenetische Einordnung von verschiedenen FtsH Proteinen. (A) Schematische Darstellung der charakteristischen Proteindomänen der FtsH Protease. Neben zwei N-terminalen Transmembrandomänen (TMD) zeichnet sich dieses Protein durch den Besitz einer AAA-ATPase- sowie Protease-Domäne aus (verändert nach Ito & Akiyama, 2005). (B) Ein multiples Alignment von FtsH Sequenzen verschiedener Organismen zeigt eine hohe strukturelle Konservierung dieses Proteins. Alle untersuchten Sequenzen wiesen unter anderem die charakteristischen Walker A und B Motive sowie den Arginin-Finger der AAA-ATPase-Domäne auf. Zusätzlich besaßen sie das katalytisch aktive Zentrum innerhalb der Protease-Domäne, welches sich durch ein HEXXH Motiv auszeichnet. (C) Eine phylogenetische Einordnung der verschiedenen FtsH Proteine zeigte eine eindeutige Trennung von Typ A und Typ B Untereinheiten. Anhand dieser Analyse konnte die bisher noch unbekannte FtsH Protease aus *C. paradoxa* dem Typ A zugeordnet werden, während FtsH aus der Xanthophyceae *V. litorea* vermutlich zum Typ B gezählt wird.

Des Weiteren weist die Typ B Untereinheit möglicherweise eine konstitutive Expression auf, wodurch diese Sequenz in der hier durchgeführten Transkriptomanalyse nicht identifiziert werden konnte. In diesem Fall würde die Regulation der Aktivität dieser Protease einzig durch die Licht-induzierte Expression der quantitativ weniger benötigten Typ B Untereinheit erfolgen, was durch den Verbrauch von weniger Ressourcen energetische Vorteile bietet. Interessanterweise wird FtsH in *E. coli* mit einer 23S-Methyltransferase (FtsJ) ko-transkribiert (Ogura et al., 1991), welche auch in *C. paradoxa* eine spezifische Anhäufung zeigte (Abb. 5.7).

Diese Methylierung wird für die ribosomale Stabilität benötigt (Caldas et al., 2000) und steht in der Glaukophyte womöglich mit der gesteigerten Neusynthese des D1 Proteins in Verbindung.

Zusätzlich wurden *C. reinhardtii* FtsH-Überexpressionsmutanten untersucht, welche eine plastidäre Expression des *ftsh* aus *V. litorea* aufwiesen, einer Xanthophyceae mit sekundären roten Plastiden. Basierend auf einer ersten phylogenetischen Analyse ist diese ebenso wie *ftsh2* aus *Chlamydomonas* dem Typ B zuzuordnen (Abb. 6.5), wobei sie ebenfalls alle typischen Motive dieser Proteinfamilie aufweist. Starklicht-adaptierte Klone der 927 Überexpressionslinie, bei welchen aufgrund der dauerhaften Kultivierung unter exzessiver Lichteinstrahlung von einer konstanten Schädigung des D1 Kernproteins auszugehen ist, zeigten keine signifikanten Einschränkungen der maximalen PSII Effizienz (Abb. 5.13). Daher kann anhand der vorliegenden Daten davon ausgegangen werden, dass der Reparaturzyklus des Photosystem II durch die plastidäre Expression des *V. litorea ftsh* nicht eingeschränkt ist. Zusammen mit einer hohen Sequenzübereinstimmung weist dies auf eine sehr hohe evolutionäre Konservierung dieser Protease hin.

6.5 Erkenntnisse dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine vergleichende Analyse von photoprotektiven Mechanismen durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass die untersuchten Organismen sehr unterschiedliche Reaktionen auf die verwendeten Starklichtbedingungen zeigten. Während die Glaukophyte und insbesondere die Vertreter der Rhodophyta kaum Starklicht-induzierte Veränderungen aufwiesen weder auf physiologischer noch transkriptioneller Ebene, zeigten die Vertreter der Chloroplastida weitreichende zelluläre Reaktionen. Neben der Aktivierung von NPQ Mechanismen war unter Bedingungen von exzessiver Lichteinstrahlung eine deutliche Auflösung der Thylakoidstruktur zu erkennen. Während in *C. reinhardtii* und *K. flaccidum* neben NPQ durch einen erhöhten zyklischen Elektronentransport sowie gesteigerten CO₂-Fixierung einer Produktion von ROS vorgebeugt und gleichzeitig eine Aufrechterhaltung der photosynthetischen Prozesse gewährleistet wird, deuten die vorliegenden Daten der sekundären Grünalge auf eine verstärkte Schädigung des photosynthetischen Apparats hin, was eventuell durch eine gesteigerte Aktivität der Glykolyse, des Glyoxylat-Zyklus und der oxidativen Phosphorylierung ausgeglichen wird. Weiterhin wurde das Spx2 Protein aus *C. paradoxa* identifiziert, welches eine deutliche Starklicht-abhängige Expression aufwies und möglicherweise eine Funktion als pH-Sensor besitzt.

Zusätzlich wurden *C. reinhardtii* FtsH-Überexpressionsmutanten mit einer plastidären Expression des Kern-kodierten *ftsh2* aus *Chlamydomonas* sowie des Plastiden-kodierten *ftsh* aus der Xanthophyceae *V. litorea* untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass diese Protease eine hohe strukturelle und funktionale Konservierung aufweist. Zudem zeigten Klone mit einer Überexpression des *ftsh* aus *V. litorea* unter moderaten Lichtbedingungen eine verringerte PSII Effizienz, vermutlich aufgrund einer veränderten Organisation der photosynthetischen Komplexe.

6.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem das Sepx2 Protein aus *C. paradoxa* identifiziert, welches eine mögliche Funktion als pH-Sensor besitzt. Eine Überprüfung dieser Hypothese unter Zuhilfenahme von Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) könnte Aufschluss über die Richtigkeit dieser Vermutung liefern. Dieses Agens bindet spezifisch und kovalent an Aminosäurereste, welche an einer reversiblen Protonierung beteiligt sind und wurde bereits für die funktionale Analyse von PsbS und LhcSR Proteinen verwendet (Li et al., 2004; Ballottari et al., 2016). Im genaueren könnte zu diesem Zweck eine C¹⁴ Isotopen-Markierung der Chemikalie und Bindungsexperimente mit dem nativen Protein sowie Sepx2 durchgeführt werden, bei welchem die zu analysierende Aminosäure ausgetauscht wurde.

Weiterhin könnte zu einer eindeutigen Überprüfung der Funktionalität der *V. litorea* FtsH Protease in den *C. reinhardtii* Überexpressionsmutanten die Expression des Kern-kodierten *ftsh2* blockiert oder alternativ die Chloroplasten isoliert werden und anschließend die D1 Abbaurate unter Starklichtbedingungen gemessen werden. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass *C. reinhardtii* Klone mit einer plastidären Überexpression der *V. litorea* FtsH Protease eine veränderte Organisation der photosynthetischen Komplexe aufweisen. Eine Isolation der Thylakoidmembran und Untersuchung der einzelnen Komponenten könnte genauere Hinweise über deren Zusammensetzung liefern und somit möglicherweise weitere Funktionen dieser Protease aufdecken.

7. Abkürzungsverzeichnis

~	circa
%	Prozent
°C	Grad Celsius
AAA-ATPase	<i>ATPases associated with diverse cellular activities</i>
Abb	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP Synthase
BGI	<i>Beijing Genome Institut</i>
BiP	<i>binding immunoglobulin protein</i>
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar
bzw	beziehungsweise
CAA	Chlorophyll a bindend
CAB	Chlorophyll a/b bindend
CAC	Chlorophyll a/c bindend
CCM	<i>carbon concentrating mechanism</i>
Chl	Chlorophyll
COG	<i>clusters of orthologous groups</i>
CORR	<i>co-localisation of gene and gene product for redox regulation</i>
Cytb ₆ f	Cytochrom-b ₆ f
D	Dunkelheit
Da	Dalton
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EGT	endosymbiotischer Gentransfer
ELIP	<i>early light-inducible protein</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Degradierung
F0	Grundfluoreszenz
FCP	<i>fucoxanthin-chlorophyll a/c-binding protein</i>
Fd	Ferredoxin
Fm	maximale Fluoreszenz
FNR	Ferredoxin-NADP Reduktase
FPKM	<i>fragments per kilobase million</i>
FtsH	<i>filamentous temperature sensitive H</i>
Fv/Fm	maximale photochemische Effizienz des Photosystem II
g	Gramm
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HGT	horizontaler Gentransfer

HL	<i>high light</i>
HLIP	<i>high-light-inducible protein</i>
HMM	<i>hidden markov model</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSM	<i>Sueoka's high salt medium</i>
Hsp	<i>heat shock protein</i>
k	Kilo (10^3)
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KO	<i>KEGG orthology</i>
KOALA	<i>KEGG orthology and links annotation</i>
l	Liter
L	Licht
LHC	<i>light-harvesting complex</i>
LHCI	<i>light-harvesting complex of photosystem I</i>
LHCII	<i>light-harvesting complex of photosystem II</i>
LIL	<i>light-harvesting-like protein</i>
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LRR	Leucin-reiche Region
m	Milli (10^{-3})
m	Meter
M	Molar (Mol pro Liter)
min	Minute
Mrd	Milliarden
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Nano (10^{-9})
NAD ⁺	Nicotinamadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP ⁺	Nicotinamadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NCBI	<i>National Centre for Biotechnology Information</i>
NPC	<i>nuclear pore complex</i>
NPQ	<i>non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence</i>
OEC	<i>oxygen-evolving complex</i>
OHP	<i>one-helix protein</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
p	Piko (10^{-12})
PBS	Phycobilisom
PBP	Phycobiliproteine
PC	Plastocyanin
PDI	Protein Disulfid-Isomerase
PE	Phycoerythrin
PEC	Phycoerythrocyanin
pH	$-\log_{10} [H^+]$
PhC	Phycocyanin
PQ	<i>plastoquinone</i>

PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
PTFE	Polytetrafluoroethylen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qE	<i>high-energy-state quenching</i>
qI	<i>photoinhibitory quenching</i>
qT	<i>state transition quenching</i>
qZ	<i>zeaxanthin-dependent quenching</i>
RedCAP	<i>red lineage chlorophyll a/b-binding-like proteins</i>
rETR	relative Elektronentransportrate
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RubisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/-Oxygenase
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAG	<i>Culture Collection of Algae at Goettingen University</i>
SAM	S-Adenosylmethionin
SCCAP	<i>Scandinavian Culture Collection of Algae & Protozoa</i>
SEP	<i>stress-enhanced protein</i>
SRA	<i>sequence read archive</i>
SRH	<i>second region of homology</i>
Tab	Tabelle
TIC	<i>translocon of the inner chloroplast membrane</i>
TOC	<i>translocon of the outer chloroplast membrane</i>
TMD	Transmembrandomäne
TREX	<i>transcription-export complex</i>
VDE	Violaxanthin De-epoxidase
xg	Erdbeschleunigung [9,81 m s ⁻¹]
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
μmol m ⁻² s ⁻¹	μmol Photonen m ⁻² s ⁻¹

8. Anhang

Eine detaillierte Auflistung der identifizierten differenziell exprimierten Transkripte der analysierten Organismen (Tab. 8.1 - 8.6) ist der digitalen Version beigelegt.

9. Literaturverzeichnis

- Adams DO, Yang SF** (1979) Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76:170-74.
- Adamska I** (2001) The Elip family of stress proteins in the thylakoid membrane of pro- and eukaryota. In *Advances in Photosynthesis and Respiration – Regulation of Photosynthesis*. Vol. 11, Aro EM. Springer, Dordrecht. 487-505.
- Adamska I, Ohad I, Kloppstech K** (1992) Synthesis of the early light-inducible protein is controlled by blue light and related to light stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89(7):2610-3.
- Adamska I, Roobol-Bóza M, Lindahl M, Andersson B** (1999) Isolation of pigment-binding early light-inducible proteins from pea. *Eur J Biochem*. 260(2):453-60.
- Adl SM, Bass D, Lane CE, Lukeš J, Schoch CL, Smirnov A, Agatha S, Berney C, Brown MW, Burki F et al.** (2019) Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol*. 66(1):4-119.
- Akiyama Y, Kihara A, Tokuda H, Ito K** (1996) FtsH (HflB) is an ATP-dependent protease selectively acting on SecY and some other membrane proteins. *J Biol Chem*. 271(49):31196-201.
- Alboresi A, Gerotto C, Giacometti GM, Bassi R, Morosinotto T** (2010) *Physcomitrella patens* mutants affected on heat dissipation clarify the evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107(24):11128-33.
- Algarra P, Rüdiger W** (1993) Acclimation processes in the light harvesting complex of the red alga *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross, according to irradiance and nutrient availability. *Plant Cell Environ*. 16:149-59.
- Allen JF** (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1098(3):275-335.
- Allen JF** (1993) Redox control of gene expression and the function of chloroplast genomes – an hypothesis. *Photosynth Res*. 36(2):95-102.
- Allen JF** (2003a) The function of genomes in bioenergetic organelles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 358(1429):19-37.
- Allen JF** (2003b) Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. *Trends Plant Sci*. 8(1):15-9.

- Allen JF** (2015) Why chloroplasts and mitochondria retain their own genomes and genetic systems: colocation for redox regulation of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112(33):10231-8.
- Allorent G, Tokutsu R, Roach T, Peers G, Cardol P, Girard-Bascou J, Seigneurin-Berny D, Petroustos D, Kuntz M, Breyton C et al.** (2013) A dual strategy to cope with high light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*. 25(2):545-57.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 25(17):3389-402.
- Amunts A, Drory O, Nelson N** (2007) The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution. *Nature*. 447(7140):58-63.
- Andersson B, Anderson JM** (1980) Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*. 593(2):427-40.
- Andersson U, Heddad M, Adamska I** (2003) Light stress-induced one-helix protein of the chlorophyll a/b-binding family associated with photosystem I. *Plant Physiol*. 132(2):811-20.
- Apt KE, Collier JL, Grossman AR** (1995) Evolution of the phycobiliproteins. *J Mol Biol*. 248(1):79-96.
- Archibald JM, Rogers MB, Toop M, Ishida K, Keeling PJ** (2003) Lateral gene transfer and the evolution of plastid-targeted proteins in the secondary plastid-containing alga *Bigeloviella natans*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(13):7678-83.
- Arnoux P, Morosinotto T, Saga G, Bassi R, Pignol D** (2009) A structural basis for the pH-dependent xanthophyll cycle in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 21(7):2036-44.
- Aro EM, Virgin I, Andersson B** (1993) Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta*. 1143(2):113-34.
- Badger M** (2003) The roles of carbonic anhydrases in photosynthetic CO₂ concentrating mechanisms. *Photosynth Res*. 77(2-3):83-94.
- Baena-González E, Barbato R, Aro EM** (1999) Role of phosphorylation in the repair cycle and oligomeric structure of photosystem II. *Planta*. 208:196-204.
- Bailey S, Thompson E, Nixon PJ, Horton P, Mullineaux CW, Robinson C, Mann NH** (2002) A critical role for the Var2 FtsH homologue of *Arabidopsis thaliana* in the photosystem II repair. *J Biol Chem*. 277(3):2006-11.

- Baker NR** (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu Rev Plant Biol.* 59:89-113.
- Ballottari M, Dall'Osto L, Morosinotto T, Bassi R** (2007) Contrasting behavior of higher plant photosystem I and II antenna systems during acclimation. *J Biol Chem.* 282(12):8947-58.
- Ballottari M, Truong TB, De Re E, 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*. *J Biol Chem.* 291(14):7334-46.
- Barber J, Andersson B** (1992) Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem Sci.* 17(2): 61-6.
- Bassi R, Croce R, Cugini D, Sandonà D** (1999) Mutational analysis of a higher plant antenna protein provides identification of chromophores bound into multiple sites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(18):10056-61.
- Bassi R, Dainese P** (1992) A supramolecular light-harvesting complex from chloroplast photosystem-II membranes. *Eur J Biochem.* 204(1):317-26.
- Bathke L, Rhiel E, Krumbein WE, Marquardt J** (1999) Biochemical and immunochemical investigations on the light-harvesting system of the cryptophyte *Rhodomonas* sp.: evidence for a photosystem I specific antenna. *Plant Biol.* 1(5):516-23.
- Becker B, Marin B** (2009) Streptophyte algae and the origin of embryophytes. *Ann Bot.* 103(7):999-1004.
- Beeckmans S** (2001) Glyoxylate cycle. *eLS.* 1-12
- Bekker A, Holland HD, Wang PL, Rumble D, Stein HJ, Hannah JL, Coetzee LL, Beukes NJ** (2004) Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature.* 427(6970):117-20.
- Bellafiore S, Barneche F, Peltier G, Rochaix JD** (2005) State transition and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature.* 433(7028):892-5.
- Bendall DS, Manasse RS** (1995) Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochim Biophys Acta.* 1229(1):23-38.
- Bengis C, Nelson N** (1977) Subunit structure of chloroplast photosystem I reaction center. *J Biol Chem.* 252(13):4564-9.
- Ben-Shem A, Frolow F, Nelson N** (2003) Crystal structure of plant photosystem I. *Nature.* 426(6967):630-5.
- Berry EA, Guergova-Kuras M, Huang LS, Crofts AR** (2000) Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu Rev Biochem.* 69:1005-75.

- Berthold DA, Babcock GT, Yocum CF** (1981) A highly resolved oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS Lett.* 134(2):231-4.
- Betterle N, Ballottari M, Zorzan S, de Bianchi S, Cazzaniga S, Dall'Osto L, Morosinotto T, Bassi R** (2009) Light-induced dissociation of an antenna hetero-oligomer is needed for non-photochemical quenching induction. *J Biol Chem.* 284(22):15255-66.
- Bhattacharya D, Price DC, Chan CX, Qiu H, Rose N, Ball S, Weber AP, Arias MC, Henrissat B, Coutinho PM et al.** (2013) Genome of the red alga *Porphyridium purpureum*. *Nat Commun.* 4:1941.
- Bieniossek C, Schalch T, Bumann M, Meister M, Meier R, Baumann U** (2006) The molecular architecture of the metalloprotease FtsH. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(9):3066-71.
- Boehm M, Yu J, Krynicka V, Barker M, Tichy M, Komenda J, Nixon PJ, Nield J** (2012) Subunit organization of a synechocystis hetero-oligomeric thylakoid FtsH complex involved in photosystem II repair. *Plant Cell.* 24(9):3669-83.
- Boekema EJ, van Roon H, Calkoen F, Bassi R, Dekker JP** (1999) Multiple types of association of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Biochemistry.* 38(8):2233-9.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B** (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 30(15):2114-20.
- 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 Biol.* 9(1):e1000577.
- Bonente G, Howes BD, Caffarri S, Smulevich G, Bassi R** (2008) Interactions between the photosystem II subunit PsbS and xanthophylls studied *in vivo* and *in vitro*. *J Biol Chem.* 283(13):8434-45.
- Briantais JM, Verrotte C, Picaud M, Krause GH** (1979) A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. *Biochim Biophys Acta.* 548(1):128-38.
- Bryant DA, Guglielmi G, Tandeau de Marsac N, Castets AM, Cohen-Bazire G** (1979) The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Arch Microbiol.* 123:113-27.
- Buick R** (2008) When did oxygenic photosynthesis evolve? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 363(1504):2731-43.

- Caffarri S, Broess K, Croce R, van Amerongen H** (2011) Excitation energy transfer and trapping in higher plant photosystem II complexes with different antenna sizes. *Biophys J.* 100(9):2094-103.
- Caffarri S, Croce R, Breton J, Bassi R** (2001) The major antenna complex of photosystem II has a xanthophyll binding site not involved in light harvesting. *J Biol Chem.* 276(38):35924-33.
- Caffarri S, Kouril R, Kereïche S, Boekema EJ, Croce R** (2009) Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *EMBO J.* 28(19):3052-63.
- Caldas T, Binet E, Bouloc P, Richarme G** (2000) Translational defects of *Escherichia coli* mutants deficient in the Um(2552) 23S ribosomal RNA methyltransferase RrmJ/FTSJ. *Biochem Biophys Res Commun.* 271(3):714-8.
- Cavalier-Smith T** (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.* 5(4):174-82.
- Cavalier-Smith T** (2002) Nucleomorphs: enslaved algal nuclei. *Curr Opin Microbiol.* 5(6):612-9.
- Cavalier-Smith T** (2003) Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358(1429):109-33.
- Chan KX, Phua SY, Crisp P, McQuinn R, Pogson BJ** (2016) Learning the languages of the chloroplast: retrograde signaling and beyond. *Annu Rev Plant Biol.* 67:25-53.
- Cheng Z, Sattler S, Maeda H, Sakuragi Y, Bryant DA, DellaPenna D** (2003) Highly divergent methyltransferases catalyze a conserved reaction in tocopherol and plastoquinone synthesis in cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes. *Plant Cell.* 15(10):2343-56.
- Cheregi O, Kotabová E, Prášíl O, Schröder WP, Kaňa R, Funk C** (2015) Presence of state transitions in the cryptophyte alga *Guillardia theta*. *J Exp Bot.* 66(20):6461-70.
- Chinnusamy V, Zhu JK** (2009) Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 12(2):133-9.
- Chitnis PR** (2001) Photosystem I: Function and Physiology. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 52:593-626.
- Christensen T** (1982) Alger i naturen og i laboratoriet. *Nucleus Århus.* ISBN 87-87661-37-3. 136 pp.
- Cioni M, Pinzauti G, Vanni P** (1981) Comparative biochemistry of the glyoxylate cycle. *Comp Biochem Physiol.* 70B:1-26.

- Cormann KU, Bangert JA, Ikeuchi M, Rögner M, Stoll R, Nowaczyk MM** (2009) Structure of Psb27 in solution: implications for transient binding to photosystem II during biogenesis and repair. *Biochemistry*. 48(37):8768-70.
- Correa-Galvis V, Redekop P, Guan K, Griess A, Truong TB, Wakao S, Niyogi KK, Jahns P** (2016) Photosystem II subunit PsbS is involved in the induction of LhcSR protein-dependent energy dissipation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem*. 291(33):17478-87.
- Cramer WA, Butler WL** (1967) Light-induced absorbance changes of two cytochrome b components in the electron-transport system of spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*. 143(2):332-9.
- Cramer WA, Zhang H, Yan J, Kurisu G, Smith JL** (2006) Transmembrane traffic in the cytochrome b6f complex. *Annu Rev Biochem*. 75:769-90.
- Croce R, Remelli R, Varotto C, Breton J, Bassi R** (1999) The neoxanthin binding site of the major light harvesting complex (LHCII) from higher plants. *FEBS Lett*. 456:1-6.
- Croce R, van Amerongen H** (2011) Light-harvesting and structural organization of photosystem II: from individual complexes to thylakoid membrane. *J Photochem Photobiol B*. 104(1-2):142-53.
- Croce R, van Amerongen H** (2014) Natural strategies for photosynthetic light harvesting. *Nat Chem Biol*. 10(7):492-501.
- Curtis BA, Tanifuji G, Burki F, Gruber A, Irimia M, Maruyama S, Arias MC, Ball SG, Gile GH, Hidakawa Y et al.** (2012) Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. *Nature*. 492(7427):59-65.
- de Bianchi S, Ballottari M, Dall'Osto L, Bassi R** (2010) Regulation of plant light harvesting by thermal dissipation of excess energy. *Biochem Soc Trans*. 38(2):651-60.
- de Vries J, Archibald JM** (2018) Plant evolution: landmarks on the path to terrestrial life. *New Phytol*. 217(4):1428-34.
- de Vries J, Stanton A, Archibald JM, Gould SB** (2016) Streptophyte terrestrialization in light of plastid evolution. *Trends Plant Sci*. 21(6):467-76.
- Dekker JP, Boekema EJ** (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta*. 1706(1-2):12-39.
- Dekker JP, van Grondelle R** (2000) Primary charge separation in photosystem II. *Photosynth Res*. 63(3):195-208.

- Danielsson R, Albertsson PA, Mamedov F, Styring S** (2004) Quantification of photosystem I and II in different parts of the thylakoid membrane from spinach. *Biochim Biophys Acta*. 1608(1):53-61.
- Delosme R, Olive J, Wollman F** (1996) Changes in light energy distribution upon state transitions: an *in vivo* photoacoustic study of the wild type and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas*. *Biochim Biophys Acta*. 1273(2):150-8.
- Delwiche CF, Cooper ED** (2015) The evolutionary origin of a terrestrial flora. *Curr Biol*. 25(19):R899-910.
- Demmig-Adams B** (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim Biophys Acta*. 1020(1):1-24.
- Depège N, Bellafiore S, Rochaix JD** (2003) Role of chloroplast protein kinase STT7 in LHCII phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science*. 299(5612):1572-5.
- Dinc E, Tian L, Roy LM, Roth R, Goodenough U, Croce R** (2016) LhcSR1 induces a fast and reversible pH-dependent fluorescence quenching in LHCII in *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 113(27):7673-8.
- Dobáková M, Sobotka R, Tichý M, Komenda J** (2009) Psb28 protein is involved in the biogenesis of the photosystem II inner antenna CP47 (PsbB) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol*. 149(2):1076-86.
- Dolganov NA, Bhaya D, Grossman AR** (1995) Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants: evolution and regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92(2):636-40.
- Dominici P, Caffarri S, Armenante F, Ceoldo S, Crimi M, Bassi R** (2002) Biochemical properties of the PsbS subunit of photosystem II either purified from chloroplast or recombinant. *J Biol Chem*. 277(25):22750-8.
- Durrant JR, Giorgi LB, Barber J, Klug DR, Porter G** (1990) Characterisation of triplet states in isolated photosystem II reaction centres: oxygen quenching as a mechanism for photodamage. *Biochim Biophys Acta*. 1017(2):167-75.
- Eichel J, González JC, Hotze M, Matthews RG, Schröder J** (1995) Vitamin-B₁₂-independent methionine synthase from a higher plant (*Catharanthus roseus*). Molecular characterization, regulation, heterologous expression, and enzyme properties. *Eur J Biochem*. 230:1053-8.
- El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, Luciani A, Potter SC, Qureshi M, Richardson LJ, Salazar GA, Smart A et al.** (2019) The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res*. 47(D1):D427-32.

- Elston T, Wang H, Oster G** (1998) Energy transduction in ATP synthase. *Nature*. 391(6666):510-3.
- Engelken J, Brinkmann H, Adamska I** (2010) Taxonomic distribution and origins of the extended LHC (light-harvesting complex) antenna protein superfamily. *BMC Evol Biol*. 10:233.
- Engelken J, Funk C, Adamska I** (2012) The extended light-harvesting complex (LHC) protein superfamily: Classification and evolutionary dynamics. In *Advances in Photosynthesis and Respiration – Functional Genomics and Evolution of Photosynthetic Systems*. Vol. 33, Burnap R, Vermaas W. Springer, Dordrecht. 265-84.
- 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(9):729-35.
- Fernandez E, Galvan A** (2008) Nitrate assimilation in *Chlamydomonas*. *Eukaryot Cell*. 7(4):555-9.
- Ferreira KN, Iverson TM, Maghlaoui K, Barber J, Iwata S** (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science*. 303(5665):1831-8.
- Fewell SW, Travers KJ, Weissman JS, Brodsky JL** (2001) The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet*. 35:149-91.
- Fischer WW, Hemp J, Johnson JE** (2016) Evolution of oxygenic photosynthesis. *Annu Rev Earth Planet Sci*. 44:647-83.
- Frank HA, Cua A, Chynwat V, Young A, Gosztola D, Wasielewski MR** (1994) Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Photosynth Res*. 41(3):389-95.
- Friso G, Giacomelli L, Ytterberg AJ, Peltier JB, Rudella A, Sun Q, Wijk KJ** (2004) In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell*. 16(2):478-99.
- Fristedt R, Willig A, Granath P, Crèvecoeur M, Rochaix JD, Vener AV** (2009) Phosphorylation of photosystem II controls functional macroscopic folding of photosynthetic membranes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 21(12):3950-64.
- Funk C** (2001) The PsbS protein: A Cab-protein with a function of its own. In *Advances in Photosynthesis and Respiration – Regulation of Photosynthesis*. Vol. 11, Aro EM, Andersson B. Springer, Dordrecht. 453-67.

- Funk C, Vermaas W** (1999) A cyanobacterial gene family coding for single-helix proteins resembling part of the light-harvesting proteins from higher plants. *Biochemistry*. 38(29):9397-404.
- Fürst-Jansen JMR** (2018) Vergleichende Analyse zweier *Chlamydomonas reinhardtii* FtsH-Überexpressionsmutanten unter Starklichteinfluss. Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität.
- Galka P, Santabarbara S, Khuong TT, Degand H, Morsomme P, Jennings RC, Boekema EJ, Caffarri S** (2012) Functional analyses of the plant photosystem I-light-harvesting complex II supercomplex reveal that light-harvesting complex II loosely bound to photosystem II is a very efficient antenna for photosystem I in state II. *Plant Cell*. 24(7):2963-78.
- Gantt E, Grabowski B, Cunningham FX** (2003) Antenna systems of red algae: phycobilisomes with photosystem II and chlorophyll complexes with photosystem I. In *Advances in Photosynthesis and Respiration – Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis. Vol. 13*, Green BR, Parson WW. Springer, Dordrecht. 307-22.
- García-Cerdán JG, Kovács L, Tóth T, Kereiche S, Aseeva E, Boekema EJ, Mamedov F, Funk C, Schröder WP** (2011) The PsbW protein stabilizes the supramolecular organization of photosystem II in higher plants. *Plant J*. 65(3):368-81.
- Garg SG, Gould SB** (2016) The role of charge in protein targeting evolution. *Trends Cell Biol*. 26(12):894-905.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR** (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta*. 990(1):87-92.
- Gerotto C, Alboresi A, Giacometti GM, Bassi R, Morosinotto T** (2011) Role of PsbS and LhcSR in *Physcomitrella patens* acclimation to high light and low temperature. *Plant Cell Environ*. 34(6):922-32.
- Gerotto C, Alboresi A, Giacometti GM, Bassi R, Morosinotto T** (2012) Coexistence of plant and algal energy dissipation mechanisms in the moss *Physcomitrella patens*. *New Phytol*. 196(3):763-73.
- Ghoshal D, Goyal A** (2000) Carbon concentration mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Indian J Biochem Biophys*. 37(6):383-94.
- Gibbs SP** (1970) The comparative ultrastructure of the algal chloroplast. *Ann NY Acad Sci*. 175(1):454-73.

- Gibbs SP** (1981) The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae. *Ann NY Acad Sci.* 361: 193-208.
- Giovagnetti V, Ruban AV** (2018) The evolution of the photoprotective antenna proteins in oxygenic photosynthetic eukaryotes. *Biochem Soc Trans.* 46(5):1263-77.
- Glazer AN** (1994) Phycobiliproteins – a family of valuable, widely used fluorophores. *J Appl Phycol.* 6:105-12.
- Glazer AN, Wedemayer GJ** (1995) Cryptomonad biliproteins – an evolutionary perspective. *Photosynth Res.* 46(1-2):93-105.
- Goral TK, Johnson MP, Brain AP, Kirchhoff H, Ruban AV, Mullineaux CW** (2010) Visualizing the mobility and distribution of chlorophyll proteins in higher plant thylakoid membranes: effects of photoinhibition and protein phosphorylation. *Plant J.* 62(6):948-59.
- Goral TK, Johnson MP, Duffy CD, Brain AP, Ruban AV, Mullineaux CW** (2012) Light-harvesting antenna composition controls the macrostructure and dynamics of thylakoid membranes in *Arabidopsis*. *Plant J.* 69(2):289-301.
- Gould SB** (2012) Evolutionary genomics: algae's complex origins. *Nature.* 492(7427):46-8.
- Gould SB, Waller RF, McFadden GI** (2008) Plastid evolution. *Annu Rev Plant Biol.* 59:491-517.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q et al.** (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol.* 29(7):644-52.
- Graef M, Seewald G, Langer T** (2007) Substrate recognition by AAA+ ATPases: distinct substrate binding modes in ATP-dependent protease Yme1 of the mitochondrial intermembrane space. *Mol Cell Biol.* 27(7):2476-85.
- Gray MW** (1992) The endosymbiont hypothesis revisited. *Int Rev Cytol.* 141:233-57.
- Green BR** (2003) The evolution of light-harvesting antennas. In *Advances in Photosynthesis and Respiration – Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis*. Vol. 13, Green BR, Parson WW. Springer, Dordrecht. 129-68.
- Green BR** (2011) Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes. *Plant J.* 66(1):34-44.
- Green BR, Durnford DG** (1996) The Chlorophyll-Carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 47:685-714.
- Green BR, Kühlbrandt W** (1995) Sequence conservation of light-harvesting and stress-response proteins in relation to the three-dimensional molecular structure of LHCII. *Photosynth Res.* 44(1-2):139-48.

- Green BR, Pichersky E** (1994) Hypothesis for the evolution of three-helix Chl a/b and Chl a/c light-harvesting antenna proteins from two-helix and four-helix ancestors. *Photosynth Res.* 39(2):149-62.
- Grossman A, Manodori A, Snyder D** (1990) Light-harvesting proteins of diatoms: their relationship to the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants and their mode of transport into plastids. *Mol Gen Genet.* 224(1):91-100.
- Guillard RRL** (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Smith WL, Chanley MH. Springer, Boston, MA. 29-60.
- Guiqi B** (2017) Characterization of the complete plastid genome of *Porphyridium purpureum* strain CCMP1328. *Mitochondrial DNA B.* 2(2):489-90.
- Hager A** (1967) Untersuchungen über die lichtinduzierten, reversiblen Xanthophyllumwandlungen an *Chlorella* und *Spinacia oleracea*. *Planta.* 74:148-72.
- Hager A** (1969) Lichtbedingte pH-Erniedrigung in einem Chloroplasten-Kompartiment als Ursache der enzymatischen Violaxanthin-Zeaxanthin-Umwandlung: Beziehungen zur Photophosphorylierung. *Planta.* 89:224-43.
- Hager A, Holocher K** (1994) Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease. *Planta.* 192:581-9.
- Haldrup A, Jensen PE, Lunde C, Scheller HV** (2001) Balance of power: a view of the mechanism of photosynthetic state transition. *Trends Plant Sci.* 6(7):301-5.
- Hebert DN, Foellmer B, Helenius A** (1995) Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell.* 81(3):425-33.
- Heddad M, Adamska I** (2000) Light stress-regulated two-helix proteins in *Arabidopsis thaliana* related to the chlorophyll a/b-binding gene family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(7):3741-6.
- Heddad M, Adamska I** (2002) The evolution of light stress proteins in photosynthetic organisms. *Comp Funct Genomics.* 3(6):504-10.
- Heddad M, Norén H, Reiser V, Dunaeva M, Andersson B, Adamska I** (2006) Differential expression and localization of early light-induced proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 142(1):75-87.
- Hegde RS, Ploegh HL** (2010) Quality and quantity control at the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol.* 22(4):437-46.
- Hendershot LM** (2004) The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai Med.* 71(5):289-97.

- Hervás M, Navarro JA, De La Rosa MA** (2003) Electron transfer between membrane complexes and soluble proteins in photosynthesis. *Acc Chem Res.* 36(10):798-805.
- Hey D, Grimm B** (2018) One-helix protein2 (OHP2) is required for the stability of OHP1 and assembly factor HCF244 and is functionally linked to PSII biogenesis. *Plant Physiol.* 177(4):1453-72.
- Hey D, Rothbart M, Herbst J, Wang P, Müller J, Wittmann D, Gruhl K, Grimm B** (2017) LIL3, a light-harvesting complex protein, links terpenoid and tetrapyrrole biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 174(2):1037-50.
- Hopkins JF, Spencer DF, Laboissiere S, Neilson JA, Eveleigh RJ, Durnford DG, Gray MW, Archibald JM** (2012) Proteomics reveals plastid- and periplastid-targeted proteins in the chlorarachniophyte alga *Bigeloviella natans*. *Genome Biol Evol.* 4(12):1391-406.
- Hori K, Maruyama F, Fujisawa T, Togashi T, Yamamoto N, Seo M, Sato S, Yamada T, Mori H, Tajima N et al.** (2014) *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nat Commun.* 5:3978.
- Horton P, Hague A** (1988) Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts. IV. Resolution of non-photochemical quenching. *Biochim Biophys Acta.* 932:107-15.
- Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Forslund K, Cook H, Heller D, Walter MC, Rattei T, Mende DR, Sunagawa S, Kuhn M et al.** (2016) eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Res.* 44(D1):D286-93.
- Hurt E, Hauska G** (1981) A cytochrome f/b6 complex of five polypeptides with plastoquinol-plastocyanin-oxidoreductase activity from spinach chloroplasts. *Eur J Biochem.* 117(3):591-5.
- Hutin C, Nussaume L, Moise N, Moya I, Kloppstech K, Havaux M** (2003) Early light-induced proteins protect *Arabidopsis* from photooxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(8):4921-6.
- Igamberdiev AU, Hill RD** (2004) Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways. *J Exp Bot.* 55(408):2473-82.
- Ito K, Akiyama Y** (2005) Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu Rev Microbiol.* 59:211-31.
- Jahns P, Holzwarth AR** (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim Biophys Acta.* 1817(1):182-93.

- Jahns P, Latowski D, Strzalka K** (2009) Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochim Biophys Acta*. 1787(1):3-14.
- Jansson S** (1999) A guide to the LHC genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*. 4(6):236-40.
- Jansson S, Andersson J, Kim SJ, Jackowski G** (2000) An *Arabidopsis thaliana* protein homologous to cyanobacterial high-light-inducible proteins. *Plant Mol Biol*. 42(2):345-51.
- Johnson GN** (2011) Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants. *Biochim Biophys Acta*. 1807(3):384-9.
- Johnson MP, Goral TK, Duffy CD, Brain AP, Mullineaux CW, Ruban AV** (2011) Photoprotective energy dissipation involves the reorganization of photosystem II light-harvesting complexes in the grana membranes of spinach chloroplasts. *Plant Cell*. 23(4):1468-79.
- Johnson MP, Ruban AV** (2011) Restoration of rapidly reversible photoprotective energy dissipation in the absence of PsbS protein by enhanced DeltapH. *J Biol Chem*. 286(22):19973-81.
- Joliot P, Johnson GN** (2011) Regulation of cyclic and linear electron flow in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108(32):13317-22.
- Joliot P, Joliot A** (2002) Cyclic electron transfer in plant leaf. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99(15):10209-14.
- Joshua S, Mullineaux CW** (2004) Phycobilisome diffusion is required for light-state transitions in cyanobacteria. *Plant Physiol*. 135(4):2112-9
- Kaftan D, Brumfeld V, Nevo R, Scherz A, Reich Z** (2002) From chloroplasts to photosystems: *in situ* scanning force microscopy on intact thylakoid membranes. *EMBO J*. 21(22):6146-53.
- Kanehisa M, Sato Y** (2020) KEGG mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Sci*. 29(1):28-35.
- Kanehisa M, Sato Y, Morishima K** (2016) BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J Mol Biol*. 428(4):726-31.
- Karata K, Inagawa T, Wilkinson AJ, Tatsuta T, Ogura T** (1999) Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. Site-directed mutagenesis of the ATP-dependent protease FtsH. *J Biol Chem*. 274(37):26225-32.

- Kereïche S, Kiss AZ, Kouril R, Boekema EJ, Horton P** (2010) The PsbS protein controls the macro-organisation of photosystem II complexes in the grana membranes of higher plant chloroplasts. *FEBS Lett.* 584(4):759-64.
- Kereïche S, Kouril R, Oostergetel GT, Fusetti F, Boekema EJ, Doust AB, van der Weijde Wit CD, Dekker JP** (2008) Association of chlorophyll a/c(2) complexes to photosystem I and photosystem II in the cryptophyte *Rhodomonas* CS24. *Biochim Biophys Acta.* 1777(9):1122-8.
- Khatoon M, Inagawa K, Pospíšil P, Yamashita A, Yoshioka M, Lundin B, Horie J, Morita N, Jajoo A, Yamamoto Y et al.** (2009) Quality control of photosystem II: thylakoid unstacking is necessary to avoid further damage to the D1 protein and to facilitate D1 degradation under light stress in spinach thylakoids. *J Biol Chem.* 284(37):25343-52.
- Kim E, Archibald JM** (2009) Diversity and evolution of plastids and their genomes. In *The Chloroplast – Plant Cell Monographs*. Vol. 13, Sandelius AS, Aronsson H. Springer, Berlin, Heidelberg. 1-39.
- Kirchhoff H** (2013) Structural constraints for protein repair in plant photosynthetic membranes. *Plant Signal Behav.* 8(4):e23634.
- Kirchhoff H** (2019) Chloroplast ultrastructure in plants. *New Phytol.* 223(2):565-74.
- Kiss AZ, Ruban AV, Horton P** (2008) The PsbS protein controls the organization of the photosystem II antenna in higher plant thylakoid membranes. *J Biol Chem.* 283(7):3972-8.
- Kitajima M, Butler WL** (1975) Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim Biophys Acta.* 376(1):105-15.
- Knaff DB, Malkin R, Myron JC, Stoller M** (1977) The role of plastoquinone and beta-carotene in the primary reaction of plant photosystem II. *Biochim Biophys Acta.* 459(3):402-11.
- Knoll AH** (1992) The early evolution of eukaryotes: a geological perspective. *Science.* 256(5057):622-7.
- Knoll AH, Javaux EJ, Hewitt D, Cohen P** (2006) Eukaryotic organisms in Proterozoic oceans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361(1470):1023-38.
- Knopp M, Garg SG, Handrich M, Gould SB** (2020) Major changes in plastid protein import and the origin of the chloroplastida. *iScience.* 23(3):100896.
- Knoppová J, Sobotka R, Tichy M, Yu J, Konik P, Halada P, Nixon PJ, Komenda J** (2014) Discovery of a chlorophyll binding protein complex involved in the early steps of photosystem II assembly in *Synechocystis*. *Plant Cell.* 26(3):1200-12.

- Koivuniemi A, Aro EM, Andersson B** (1995) Degradation of the D1- and D2-proteins of photosystem II in higher plants is regulated by reversible phosphorylation. *Biochemistry*. 34(49):16022-9.
- Kok B, Forbush B, McGloin M** (1970) Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution-I. A linear four step mechanism. *Photochem Photobiol*. 11(6):457-75.
- Komenda J, Barker M, Kuvilková S, de Vries R, Mullineaux CW, Tichy M, Nixon PJ** (2006) The FtsH protease *slr0228* is important for quality control of photosystem II in the thylakoid membrane of *Synechocystis sp.* PCC 6803. *J Biol Chem*. 281(2):1145-51.
- Komenda J, Knoppová J, Kopečná J, Sobotka R, Halada P, Yu J, Nickelsen J, Boehm M, Nixon PJ** (2012b) The Psb27 assembly factor binds to the CP43 complex of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Plant Physiol*. 158(1):476-86.
- Komenda J, Sobotka R, Nixon PJ** (2012a) Assembling and maintaining the photosystem II complex in chloroplasts and cyanobacteria. *Curr Opin Plant Biol*. 15(3):245-51.
- Kowalczyk N, Rappaport F, Boyen C, Wollman FA, Collén J, Joliot P** (2013) Photosynthesis in *Chondrus crispus*: the contribution of energy spill-over in the regulation of excitonic flux. *Biochim Biophys Acta*. 1827(7):834-42.
- Krause GH** (1988) Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol Plant*. 74(3):566-74.
- Krause GH, Vernotte C, Briantais JM** (1982) Photoinduced quenching of chlorophyll fluorescence in intact chloroplasts and algae. Resolution into two components. *Biochim Biophys Acta*. 679(1):116-24.
- Krieger-Liszkay A** (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *J Exp Bot*. 56(411):337-46.
- Krüger TP, Iliaia C, Johnson MP, Ruban AV, Papagiannakis E, Horton P, van Grondelle R** (2012) Controlled disorder in plant light-harvesting complex II explains its photoprotective role. *Biophys J*. 102(11):2669-76.
- Kruk J, Holländer-Czytka H, Oettmeier W, Trebst A** (2005) Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *J Plant Physiol*. 162(7):749-57.
- Krzywda S, Brzozowski AM, Verma C, Karata K, Ogura T, Wilkinson AJ** (2002) The crystal structure of the AAA domain of the ATP-dependent protease FtsH of *Escherichia coli* at 1.5 Å resolution. *Structure*. 10(8):1073-83.
- Külheim C, Agren J, Jansson S** (2002) Rapid regulation of light harvesting and plant fitness in the field. *Science*. 297(5578):91-3.

- Kyle DJ, Staehelin LA, Arntzen CJ** (1983) Lateral mobility of the light-harvesting complex in chloroplast membranes controls excitation energy distribution in higher plants. *Arch Biochem Biophys.* 222(2):527-41.
- Larsen NH, Moestrup Ø, Pedersen PM** (1994) Scandinavian Culture Centre for Algae & Protozoa. Catalogue 1994. *Department of Biology, University of Copenhagen.* 51 pp.
- Leisinger U, Rüfenacht K, Fischer B, Pesaro M, Spengler A, Zehnder AJ, Eggen RI** (2001) The glutathione peroxidase homologous gene from *Chlamydomonas reinhardtii* is transcriptionally up-regulated by singlet oxygen. *Plant Mol Biol.* 46(4):395-408.
- Li XP, 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(6768):391-5.
- Li XP, Gilmore AM, Caffarri S, Bassi R, Golan T, Kramer D, Niyogi KK** (2004) Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein. *J Biol Chem.* 279(22):22866-74.
- Li Y, Liu B, Zhang J, Kong F, Zhang L, Meng H, Li W, Rochaix JD, Li D, Peng L** (2019) OHP1, OHP2, and HCF244 form a transient functional complex with the photosystem II reaction center. *Plant Physiol.* 179(1):195-208.
- Liberton M, Page LE, O'Dell WB, O'Neil H, Mamontov E, Urban VS, Pakrasi HB** (2013) Organization and flexibility of cyanobacterial thylakoid membranes examined by neutron scattering. *J Biol Chem.* 288(5):3632-40.
- Lindahl M, Spetea C, Hundal T, Oppenheim AB, Adam Z, Andersson B** (2000) The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell.* 12(3):419-31.
- Liu H, Huang RY, Chen J, Gross ML, Pakrasi HB** (2011) Psb27, a transiently associated protein, binds to the chlorophyll binding protein CP43 in photosystem II assembly intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108(45):18536-41.
- Liu H, Zhang H, Niedzwiedzki DM, Prado M, He G, Gross ML, Blankenship RE** (2013) Phycobilisome supply excitations to both photosystems in a megacomplex in cyanobacteria. *Science.* 342(6162):1104-7.
- Liu LN, Elmalk AT, Aartsma TJ, Thomas JC, Lamers GE, Zhou BC, Zhang YZ** (2008) Light-induced energetic decoupling as a mechanism for phycobilisome-related energy dissipation in red algae: a single molecule study. *PLoS One.* 3(9):e3134.
- 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(6980):287-92.

- Macpherson AN, Hiller RG** (2003) Light-harvesting systems in chlorophyll c-containing algae. In *Advances in Photosynthesis and Respiration – Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis*. Vol. 13, Green BR, Parson WW. Springer, Dordrecht. 323-52.
- Macpherson AN, Telfer A, Barber J, Truscott TG** (1993) Direct detection of singlet oxygen from isolated photosystem II reaction centres. *Biochim Biophys Acta*. 1143:301-9.
- Maggiore GM** (1979) Assessment of reaction center special-pair chlorophyll models. *Int J Quantum Chem*. 16(2):331-52.
- Malnoë A** (2018) Photoinhibition or photoprotection of photosynthesis? Update on the (newly termed) sustained quenching component qH. *Environ Exp*. 154:123-33.
- Marquardt J, Rhiel E** (1997) The membrane-intrinsic light-harvesting complex of the red alga *Galdieria sulphuraria* (formerly *Cyanidium caldarium*): biochemical and immunochemical characterization. *Biochim Biophys Acta*. 1320(2):153-64.
- Martin W, Herrmann RG** (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiol*. 118(1):9-17.
- Martin W, Müller M** (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature*. 392(6671):37-41.
- Martin W, Stoebe B, Goremykin V, Hapsmann S, Hasegawa M, Kowallik KV** (1998) Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature*. 393(6681):162-5.
- Martin WF, Garg S, Zimorski V** (2015) Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 370(1678):20140330.
- Maruyama S, Tokutsu R, Minagawa J** (2014) Transcriptional regulation of the stress-responsive light harvesting complex genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol*. 55(7):1304-10.
- Masojidek J, Kopecký J, Koblížek M, Torzillo G** (2004) The xanthophyll cycle in green algae (chlorophyta): its role in the photosynthetic apparatus. *Plant Biol*. 6(3):342-9.
- Mattoo AK, Hoffman-Falk H, Marder JB, Edelman M** (1984) Regulation of protein metabolism: Coupling of photosynthetic electron transport to *in vivo* degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81(5):1380-4.
- MacIntyre HL, Kana TM, Geider RJ** (2000) The effect of water motion on short-term rates of photosynthesis by marine phytoplankton. *Trends Plant Sci*. 5(1):12-7.
- McFadden GI** (2002) Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *Eur J Phycol*. 37(6):951-59.

- McFadden GI, van Dooren GG** (2004) Evolution: red algal genome affirms a common origin of all plastids. *Curr Biol.* 14(13):R514-6.
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, Maréchal-Drouard L et al.** (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science.* 318(5848):245-50.
- Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T** (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol.* 7(8):766-72.
- Mi H, Endo T, Schreiber U, Ogawa T, Asada K** (1992) Electron donation from cyclic and respiratory flows to the photosynthetic intersystem chain is mediated by pyridine nucleotide dehydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 33(8):1233-37.
- Mimuro M** (1990) Studies on excitation energy flow in the photosynthetic pigment system; structure and energy transfer mechanism. *Bot Mag Tokyo.* 103:233-53.
- Mirkovic T, Ostroumov EE, Anna JM, van Grondelle R, Govindjee, Scholes GD** (2017) Light absorption and energy transfer in the antenna complexes of photosynthetic organisms. *Chem Rev.* 117(2):249-93.
- Misumi M, Sonoike K** (2017) Characterization of the influence of chlororespiration on the regulation of photosynthesis in the glaucophyte *Cyanophora paradoxa*. *Sci Rep.* 7:46100.
- Moffatt BA, Weretilnyk EA** (2002) Sustaining S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase activity in plant cells. *Physiol Plant.* 113(4):435-42.
- Moldavski O, Levin-Kravets O, Ziv T, Adam Z, Prag G** (2012) The hetero-hexameric nature of a chloroplast AAA+ FtsH protease contributes to its thermodynamic stability. *PLoS One.* 7(4):e36008.
- Montané MH, Kloppstech K** (2000) The family of light-harvesting-related proteins (LHCs, ELIPs, HLIPs): was the harvesting of light their primary function? *Gene.* 258(1-2):1-8.
- Morales R, Charon MH, Kachalova G, Serre L, Medina M, Gómez-Moreno C, Frey M** (2000) A redox-dependent interaction between two electron-transfer partners involved in photosynthesis. *EMBO Rep.* 1(3):271-6.
- Morgan PW, Drew MC** (1997) Ethylene and plant responses to stress. *Physiol Plant.* 100(3):620-30.
- Morosinotto T, Baronio R, Bassi R** (2002) Dynamics of chromophore binding to LHC proteins *in vivo* and *in vitro* during operation of the xanthophyll cycle. *J Biol Chem.* 277(40):36913-20.

- Müh F, Glöckner C, Hellmich J, Zouni A** (2012) Light-induced quinone reduction in photosystem II. *Biochim Biophys Acta*. 1817(1):44-65.
- Müller P, Li XP, Niyogi KK** (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol*. 125(4):1558-66.
- Mullineaux CW** (2005) Function and evolution of grana. *Trends Plant Sci*. 10(11):521-5.
- Munekage Y, Hojo M, Meurer J, Endo T, Tasaka M, Shikanai T** (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell*. 110(3):361-71.
- Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev SI** (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochem Biophys Acta*. 1767(6):414-21.
- Myouga F, Takahashi K, Tanaka R, Nagata N, Kiss AZ, Funk C, Nomura Y, Nakagami H, Jansson S, Shinozaki K** (2018) Stable accumulation of photosystem II requires one-helix protein1 (OHP1) of the light harvesting-like family. *Plant Physiol*. 176(3):2277-91.
- Nagy G, Ünneper R, Zsiros O, Tokutsu R, Takizawa K, Porcar L, Moyet L, Petrousos D, Garab G, Finazzi G et al.** (2014) Chloroplast remodeling during state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii* as revealed by noninvasive techniques *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111(13):5042-7.
- Neilson JA, Durnford DG** (2010) Structural and functional diversification of the light-harvesting complexes in photosynthetic eukaryotes. *Photosynth Res*. 106(1-2):57-71.
- Nelson N** (2011) Photosystems and global effects of oxygenic photosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1807(8):856-63.
- Nelson N, Ben-Shem A** (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5(12):971-82.
- Nelson N, Yocum CF** (2006) Structure and function of photosystem I and II. *Annu Rev Plant Biol*. 57:521-65.
- Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV** (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res*. 9(1):27-43.
- Nie X, Hill RD** (1997) Mitochondrial respiration and hemoglobin gene expression in barley aleurone tissue. *Plant Physiol*. 114(3):835-40.
- Nield J, Barber J** (2006) Refinement of the structural model for the photosystem II supercomplex of higher plants. *Biochim Biophys Acta*. 1757(5-6):353-61.

- Nilkens M, Kress E, Lambrev P, Miloslavina Y, Müller M, Holzwarth AR, Jahns P** (2010) Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in *Arabidopsis*. *Biochim Biophys Acta*. 1797(4):466-75.
- Nishikawa S, Brodsky JL, Nakatsukasa K** (2005) Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J Biochem*. 137(5):551-5.
- Nixon PJ, Barker M, Boehm M, de Vries R, Komenda J** (2005) FtsH-mediated repair of the photosystem II complex in response to light stress. *J Exp Bot*. 56(411):357-63.
- Nixon PJ, Michoux F, Yu J, Boehm M, Komenda J** (2010) Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. *Ann Bot*. 106(1):1-16.
- Niyogi KK** (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 50:333-59.
- Niyogi KK, Truong TB** (2013) Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*. 16(3):307-14.
- Nott A, Jung HS, Koussevitzky S, Chory J** (2006) Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annu Rev Plant Biol*. 57:739-59.
- Nowaczyk MM, Hebel R, Schlodder E, Meyer HE, Warscheid B, Rögner M** (2006) Psb27, a cyanobacterial lipoprotein, is involved in the repair cycle of photosystem II. *Plant Cell*. 18(11):3121-31.
- Nowicka B, Kruk J** (2012) Plastoquinol is more active than α -tocopherol in singlet oxygen scavenging during high light stress of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta*. 1817(3):389-94.
- Ogawa T, Harada T, Ozaki H, Sonoike K** (2013) Disruption of the *ndhF1* gene affects Chl fluorescence through state transition in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, resulting in apparent high efficiency of photosynthesis. *Plant Cell Physiol*. 54(7):1164-71.
- Ogura T, Tomoyasu T, Yuki T, Morimura S, Begg KJ, Donachie WD, Mori H, Niki H, Hiraga S** (1991) Structure and function of the *ftsH* gene in *Escherichia coli*. *Res Microbiol*. 142(2-3):279-82.
- Ogura T, Whiteheart SW, Wilkinson AJ** (2004) Conserved arginine residues implicated in ATP hydrolysis, nucleotide-sensing, and inter-subunit interactions in AAA and AAA+ ATPases. *J Struct Biol*. 146(1-2).106-12.

- Ohad I, Adir N, Koike H, Kyle DJ, Inoue Y** (1990) Mechanism of photoinhibition *in vivo*. A reversible light-induced conformational change of reaction center II is related to an irreversible modification of the D1 protein. *J Biol Chem.* 265(4):1972-9.
- Op den Camp RG, Przybyla D, Ochsenein C, Laloi C, Kim C, Danon A, Wagner D, Hideg E, Göbel C, Feussner I et al.** (2003) Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 15(10):2320-32.
- Papineau D, Mojzsis SJ, Schmitt AK** (2007) Multiple sulfur isotopes from Paleoproterozoic Huronian interglacial sediments and the rise of atmospheric oxygen. *Earth Planet Sci Lett.* 255(1-2):188-212.
- Parfrey LW, Lahr DJ, Knoll AH, Katz LA** (2011) Estimating the timing of early eukaryotic diversification with multigene molecular clocks. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108(33):13624-9.
- 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(7272):518-21.
- Petroutsos D, Tokutsu R, Maruyama S, Flori S, Greiner A, Magneschi L, Cusant L, Kottke T, Mittag M, Hegemann P et al.** (2016) A blue-light photoreceptor mediates the feedback regulation of photosynthesis. *Nature.* 537(7621):563-66.
- Pfannschmidt T, Nilsson A, Allen JF** (1999) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature.* 397(6720):625-8.
- Pfündel EE, Renganathan M, Gilmore AM, Yamamoto HY, Dilley RA** (1994) Intrathylakoid pH in isolated pea chloroplasts as probed by violaxanthin deepoxidation. *Plant Physiol.* 106(4):1647-58.
- Pick U, Racker E** (1979) Purification and reconstitution of the N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-sensitive ATPase complex from spinach chloroplasts. *J Biol Chem.* 254(8):2793-9.
- Pieper A, Hohgardt M, Willich M, Gacek DA, Hafi N, Pfennig D, Albrecht A, Walla PJ** (2018) Biomimetic light-harvesting funnels for re-directioning of diffuse light. *Nat Commun.* 9(1): 666.
- Pinnola A** (2019) The rise and fall of light-harvesting complex stress-related proteins as photoprotection agents during evolution. *J Exp Bot.* 70(20):5527-35.
- Pinnola A, Cazzaniga S, Alboresi A, Nevo R, Levin-Zaidman S, Reich Z, Bassi R** (2015) Light-harvesting complex stress-related proteins catalyze excess energy dissipation in both photosystems of *Physcomitrella patens*. *Plant Cell.* 27(11):3213-27.

- Plempner RK, Böhmler S, Bordallo J, Sommer T, Wolf DH** (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature*. 388(6645):891-5.
- Pötter E, Kloppstech K** (1993) Effects of light stress on the expression of early light-inducible proteins in barley. *Eur J Biochem*. 214(3):779-86.
- Poulton JE** (1981) Transmethylation and demethylation reactions in the metabolism of secondary plant products. In *The Biochemistry of Plants*. Stumpf PK, Conn EE. Vol. 7, Academic Press: New York. 667-723.
- Price DC, Chan CX, Yoon HS, Yang EC, Qiu H, Weber AP, Schwacke R, Gross J, Blouin NA, Lane C et al.** (2012) *Cyanophora paradoxa* genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants. *Science*. 335(6070):843-7.
- Promnares K, Komenda J, Bumba L, Nebesarova J, Vacha F, Tichy M** (2006) Cyanobacterial small chlorophyll-binding protein ScpD (HliB) is located on the periphery of photosystem II in the vicinity of PsbH and CP47 subunits. *J Biol Chem*. 281(43):32705-13.
- Ravanel S, Gakière B, Job D, Douce R** (1998) The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(13):7805-12.
- Reisinger V, Plösch M, Eichacker LA** (2008) LIL3 assembles as chlorophyll-binding protein complex during deetiolation. *FEBS Lett*. 582(10):1547-51.
- Richter ML, Samra HS, He F, Giessel AJ, Kuczera KK** (2005) Coupling proton movement to ATP synthesis in the chloroplast ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr*. 37(6):467-73.
- Ritz M, Thomas JC, Spilar A, Etienne AL** (2000) Kinetics of photoacclimation in response to a shift to high light of the red alga *Rhodella violacea* adapted to low irradiance. *Plant Physiol*. 123(4):1415-26.
- Rochaix JD** (2014) Regulation and dynamics of the light-harvesting system. *Annu Rev Plant Biol*. 65:287-309.
- Rochaix JD, Bassi R** (2019) LHC-like proteins involved in stress responses and biogenesis/repair of the photosynthetic apparatus. *Biochem J*. 476(3):581-93.
- Rossini S, Casazza AP, Engelmann EC, Havaux M, Jennings RC, Soave C** (2006) Suppression of both ELIP1 and ELIP2 in *Arabidopsis* does not affect tolerance to photoinhibition and photooxidative stress. *Plant Physiol*. 141(4):1264-73.
- Ruban AV, Berera R, Iliaia C, van Stokkum IH, Kennis JT, Pascal AA, van Amerongen H, Robert B, Horton P, van Grondelle R** (2007) Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature*. 450(7169):575-8.

- Ruban AV, Johnson MP, Duffy CDP** (2011) Natural light harvesting: principles and environmental trends. *Energy Environ Sci.* 4:1643-50.
- Ruban AV, Johnson MP, Duffy CDP** (2012) The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochim Biophys Acta.* 1817(1):167-81.
- Ruban AV, Phillip D, Young AJ, Horton P** (1997) Carotenoid-dependent oligomerization of the major chlorophyll a/b light harvesting complex of photosystem II of plants. *Biochemistry.* 36(25):7855-9.
- Salama NR, Chuang JS, Schekman RW** (1997) Sec31 encodes an essential component of the COPII coat required for transport vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell.* 8(2):205-17.
- Samol I, Shapiguzov A, Ingelsson B, Fucile G, Crèvecoeur M, Vener AV, Rochaix JD, Goldschmidt-Clermont M** (2012) Identification of a photosystem II phosphatase involved in light acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 24(6):2596-609.
- Schmieder R, Edwards R** (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics.* 27(6):863-4.
- Schubert H, Forster RM** (1997) Sources of variability in the factors used for modelling primary productivity in eutrophic waters. *Hydrobiologia.* 349:75-85.
- Seelert H, Poetsch A, Dencher NA, Engel A, Stahlberg H, Müller DJ** (2000) Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature.* 405(6785):418-9.
- Shao S, Cardona T, Nixon PJ** (2018) Early emergence of the FtsH proteases involved in photosystem II repair. *Photosynthetica.* 56:163-77.
- Shotland Y, Teff D, Koby S, Kobiler O, Oppenheim AB** (2000) Characterization of a conserved alpha-helical, coiled-coil motif at the C-terminal domain of the ATP-dependent FtsH (HflB) protease of *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 299(4):953-64.
- Sidler WA** (1994) Phycobilisome and phycobiliprotein structures. In *Advances in Photosynthesis – The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Vol. 1, Bryant DA. Springer, Dordrecht. 139-216.
- Silva P, Thompson E, Bailey S, Kruse O, Mullineaux CW, Robinson C, Mann NH, Nixon PJ** (2003) FtsH is involved in the early stages of repair of photosystem II in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant Cell.* 15(9):2152-64.
- Soll J, Schleiff E** (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(3):198-208.
- Spear-Bernstein L, Miller KR** (1989) Unique location of the phycobiliprotein light-harvesting pigment in the cryptophyceae. *Eur J Phycol.* 25(3):412-19.

- Steiner JM, Löffelhardt W** (2011) The photosynthetic apparatus of the living fossil, *Cyanophora paradoxa*. In *Bioenergetic Processes of Cyanobacteria*. Peschek G, Obinger C, Renger G. Springer, Dordrecht. 71-87.
- Steiner JM, Pompe JA, Löffelhardt W** (2003) Characterization of *apcC* the nuclear gene for the phycobilisome core linker polypeptide Lc^{7,8} from the glaucocystophyte alga *Cyanophora paradoxa*. Import of the precursor into isolated cyanelles and integration of the mature protein into intact phycobilisomes. *Curr Genet*. 44:132-7.
- Stitt M** (1986) Limitation of photosynthesis by carbon metabolism. *Plant Physiol*. 81:1115-22.
- Stirewalt VL, Michalowski CB, Löffelhardt W, Bohnert HJ, Bryant DA** (1995) Nucleotide sequence of the cyanelle genome from *Cyanophora paradoxa*. *Plant Mol Biol Rep*. 13(4):327-32.
- Storm P, Hernandez-Prieto MA, Eggink LL, Hooper JK, Funk C** (2008) The small CAB-like proteins of *Synechocystis sp.* PCC 6803 bind chlorophyll. *In vitro* pigment reconstitution studies on one-helix light-harvesting-like proteins. *Photosynth Res*. 98(1-3):479-88.
- Styring S, Virgin I, Ehrenberg A, Andersson B** (1990) Strong light photoinhibition of electrontransport in photosystem II. Impairment of the function of the first quinone acceptor, Q_A. *Biochim Biophys Acta*. 1015(2):269-78.
- Sueoka N** (1960) Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 46(1):83-91.
- Suno R, Niwa H, Tsuchiya D, Zhang X, Yoshida M, Morikawa K** (2006) Structure of the whole cytosolic region of ATP-dependent protease FtsH. *Mol Cell*. 22(5):575-85.
- Suorsa M, Järvi S, Grieco M, Nurmi M, Pietrzykowska M, Rantala M, Kangasjärvi S, Paakkarinen V, Tikkanen M, Jansson S et al.** (2012) Proton gradient regulation5 is essential for proper acclimation of *Arabidopsis* photosystem I to naturally fluctuating light conditions. *Plant Cell*. 24(7):2934-48.
- Suorsa M, Rantala M, Danielsson R, Järvi S, Paakkarinen V, Schröder WP, Styring S, Mamedov F, Aro EM** (2014) Dark-adapted spinach thylakoid protein heterogeneity offers insights into the photosystem II repair cycle. *Biochim Biophys Acta*. 1837(9):1463-71.
- Suzuki E, Suzuki R** (2013) Variation of storage polysaccharides in phototrophic microorganisms. Special Issue: Starch metabolism, structure and properties. *J Appl Glycosci*. 60:21-27.
- Takahashi S, Badger MR** (2011) Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends Plant Sci*. 16(1):53-60.

- Tanaka R, Rothbart M, Oka S, Takabayashi A, Takahashi K, Shibata M, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Grimm B et al.** (2010) LIL3, a light-harvesting-like protein, plays an essential role in chlorophyll and tocopherol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107(38):16721-5.
- Taylor ER, Nie XZ, MacGregor AW, Hill RD** (1994) A cereal haemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions. *Plant Mol Biol*. 24(6):853-62.
- Teardo E, de Laureto PP, Bergantino E, Dalla Vecchia F, Rigoni F, Szabò I, Giacometti GM** (2007) Evidences for interaction of PsbS with photosynthetic complexes in maize thylakoids. *Biochim Biophys Acta*. 1767(6):703-11.
- Telfer A** (2002) What is beta-carotene doing in the photosystem II reaction centre? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 357(1426):1431-40, 1469-70.
- Telfer A, Barber J** (1989) Evidence for the photo-induced oxidation of the primary electron donor P680 in the isolated photosystem II reaction centre. *FEBS Lett*. 246(1-2):223-8.
- 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(4):2717-30.
- Tikkanen M, Nurmi M, Kangasjärvi S, Aro EM** (2008) Core protein phosphorylation facilitates the repair of photodamaged photosystem II at high light. *Biochim Biophys Acta*. 1777(11):1432-7.
- Timmis JN, Ayliffe MA, Huang CY, Martin W** (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet*. 5(2):123-35.
- Tokutsu R, Minagawa J** (2013) Energy-dissipative supercomplex of photosystem II associated with LhcSR3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(24):10016-21.
- Tomoyasu T, Gamer J, Bukau B, Kanemori M, Mori H, Rutman AJ, Oppenheim AB, Yura T, Yamanaka K, Niki H et al.** (1995) *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor sigma 32. *EMBO J*. 14(11):2551-60.
- Tomoyasu T, Yamanaka K, Murata K, Suzaki T, Bouloc P, Kato A, Niki H, Hiraga S, Ogura T** (1993b) Topology and subcellular localization of FtsH protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 175(5):1352-7.

- Tomoyasu T, Yuki T, Morimura S, Mori H, Yamanaka K, Niki H, Hiraga S, Ogura T** (1993a) The *Escherichia coli* FtsH protein is a prokaryotic member of a protein family of putative ATPases involved in membrane functions, cell cycle control, and gene expression. *J Bacteriol.* 175(5):1344-51.
- Triantaphylidès C, Krischke M, Hoeberichts FA, Ksas B, Gresser G, Havaux M, van Breusegem F, Mueller MJ** (2008) Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiol.* 148(2):960-8.
- Trumpower BL** (1990) The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc₁ complex. *J Biol Chem.* 265(20):11409-12.
- Tzvetkova-Chevolleau T, Franck F, Alawady AE, Dall'Osto L, Carrière F, Bassi R, Grimm B, Nussaume L, Havaux M** (2007) The light stress-induced protein ELIP2 is a regulator of chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 50(5):795-809.
- van Bezouwen LS, Caffarri S, Kale RS, Kouñl R, Thunnissen AWH, Oostergetel GT, Boekema EJ** (2017) Subunit and chlorophyll organization of the plant photosystem II supercomplex. *Nat Plants.* 3:17080.
- van Metter RL** (1977) Excitation energy transfer in the light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Biochim Biophys Acta.* 462:642-58.
- Vavilin D, Yao D, Vermaas W** (2007) Small Cab-like proteins retard degradation of photosystem II-associated chlorophyll in *Synechocystis sp.* PCC 6803: kinetic analysis of pigment labeling with ¹⁵N and ¹³C. *J Biol Chem.* 282(52):37660-8.
- Vitousek PM, Howarth RW** (1991) Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur? *Biogeochemistry.* 13:87-115.
- Vrettos JS, Limburg J, Brudvig GW** (2001) Mechanism of photosynthetic water oxidation: combining biophysical studies of photosystem II with inorganic model chemistry. *Biochim Biophys Acta.* 1503(1-2):229-45.
- Watanabe M, Ikeuchi M** (2013) Phycobilisome: architecture of a light-harvesting supercomplex. *Photosynth Res.* 116(2-3):265-76.
- Weeden NF** (1981) Genetic and biochemical implications of the endosymbiotic origin of the chloroplast. *J Mol Evol.* 17(3):133-9.
- Weis E, Berry JA** (1987) Quantum efficiency of photosystem II in relation to 'energy'-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta.* 894(2):198-208.

- Wilk L, Grunwald M, Liao PN, Walla PJ, Kühlbrandt W** (2013) Direct interaction of the major light-harvesting complex II and PsbS in nonphotochemical quenching. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(14):5452-6.
- Williams DB** (2006) Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*. 119(Pt 4):615-23.
- Wolfe GR, Cunningham FX, Durnford D, Green BR, Gantt E** (1994) Evidence for a common origin of chloroplasts with light-harvesting complexes of different pigmentation. *Nature*. 367:566-68.
- Wollman FA** (2001) State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO J*. 20(14):3623-30.
- Wraight CA, Crofts AR** (1970) Energy-dependent quenching of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. *Eur J Biochem*. 17(2):319-27.
- Yamamoto HY, Nakayama TO, Chichester CO** (1962) Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. *Arch Biochem Biophys*. 97:168-73.
- Yang J, Zhang Y** (2015) I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res*. 43(W1):W174-81.
- Yao D, Kieselbach T, Komenda J, Promnares K, Prieto MA, Tichy M, Vermaas W, Funk C** (2007) Localization of the small CAB-like proteins in photosystem II. *J Biol Chem*. 282(1):267-76.
- Yokono M, Murakami A, Akimoto S** (2011) Excitation energy transfer between photosystem II and photosystem I in red algae: larger amounts of phycobilisome enhance spillover. *Biochim Biophys Acta*. 1807(7):847-53.
- Yoshioka M, Nakayama Y, Yoshida M, Ohashi K, Morita N, Kobayashi H, Yamamoto Y** (2010) Quality control of photosystem II: FtsH hexamers are localized near photosystem II at grana for the swift repair of damage. *J Biol Chem*. 285(53):41972-81.
- Yoshioka-Nishimura M, Yamamoto Y** (2014) Quality control of photosystem II: the molecular basis for the action of FtsH protease and the dynamics of the thylakoid membranes. *J Photochem Photobiol B*. 137:100-6.
- Yu F, Park S, Rodermeier SR** (2004) The *Arabidopsis* FtsH metalloprotease gene family: interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes. *Plant J*. 37(6):864-76.
- Zaltsman A, Ori N, Adam Z** (2005) Two types of FtsH protease subunits are required for chloroplast biogenesis and Photosystem II repair in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 17(10):2782-90.

- Zaremba-Niedzwiedzka K, Caceres EF, Saw JH, Bäckström D, Juzokaite L, Vancaester E, Seitz KW, Anantharaman K, Starnawski P, Kjeldsen KU et al.** (2017) Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*. 541(7637):353-58.
- Zhang L, Paakkanen V, van Wijk KJ, Aro EM** (1999) Co-translational assembly of the D1 protein into photosystem II. *J Biol Chem*. 274(23):16062-7.
- Zhao L, Cheng D, Huang X, Chen M, Dall'Osto L, Xing J, Gao L, Li L, Wang Y, Bassi R et al.** (2017) A light harvesting complex-like protein in maintenance of photosynthetic components in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol*. 174(4):2419-33.
- Zito F, Finazzi G, Delosme R, Nitschke W, Picot D, Wollman FA** (1999) The Q₀ site of cytochrome b6f complexes controls the activation of the LHCII kinase. *EMBO*. 18(11):2961-9.

Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. William Martin dafür danken, dass ich die Möglichkeit hatte meine Dissertation im Institut für Molekulare Evolution anzufertigen und für die Bereitstellung eines sehr angenehmen Arbeitsplatzes.

PD Dr. Sven Gould danke ich für die kompetente Betreuung meiner Arbeit und hilfreiche Begleitung innerhalb der vergangenen 4 Jahre. Besonders möchte ich mich für sein Vertrauen in meine Person, seine motivierende Art und fortwährende Unterstützung bedanken.

Gleichzeitig danke ich Dr. Verena Zimorski für ihre stetige Hilfsbereitschaft und positives Gemüt und dem gesamten MolEvol Team für die wunderbare Arbeitsatmosphäre, dem Beistand bei Problemen jeglicher Art und vielen vergnüglichen Stunden auf der Terrasse.

Bei Prof. Dr. Peter Jahns sowie seiner Arbeitsgruppe möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung von Gerätschaften, Hilfestellungen bei der Durchführung und natürlich ihre geopfert Zeit bedanken.

Zu guter letzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie: Holger, Cony und selbstverständlich Martin, die immer an mich geglaubt haben und auch in schwereren Zeiten stets zu mir standen und mir dadurch viel Kraft und Mut verliehen haben. Meiner Flohmarkt-Familie danke ich für ihre fabelhafte Freundschaft, ihre moralische Unterstützung und den aufheiternden Gesprächen am Lügen-Tisch ;-)

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Meine Dissertation wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form bei anderen Instituten eingereicht. Bisher habe ich keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 23.05.2020

Maria Handrich