

**Vergleichende Charakterisierung von
Synechocystis sp. PCC 6803 Wildtyp
und einer Histidin-Kinase (Slr1759)-freien Mutante**

**Vergleichende Charakterisierung von
Synechocystis sp. PCC 6803 Wildtyp
und einer Histidin-Kinase (Slr1759)-freien Mutante**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Anke Nodop

Bielefeld, im Mai 2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Cyanobakterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	1
1.1.1 Aufbau einer Cyanobakterienzelle	1
1.1.2 Photosynthese und Respiration in Cyanobakterien	4
1.1.3 Photosynthetischer Elektronentransport	6
Linearer photosynthetischer Elektronentransport	6
Zyklischer Elektronentransport	7
1.1.4 Respiratorischer Elektronentransport	8
NDH-1 Komplex	8
Weitere Substrat-Dehydrogenasen	10
1.2 Aufnahme von anorganischen Kohlenstoff in Cyanobakterien	12
1.2.1 “Carbon Concentrating Mechanism” (CCM)	12
1.2.2 HCO ₃ ⁻ -Aufnahme	14
HCO ₃ ⁻ -Transporter des ABC-Typs	14
Der Natrium-abhängige HCO ₃ ⁻ -Transporter	15
1.2.3 CO ₂ -Aufnahme und Umwandlung zu HCO ₃ ⁻ in der Zelle	17
Aufnahme von CO ₂	17
1.3 Zwei-Komponentensysteme	18
1.3.1 PAS-Domänen	21
1.3.2 Beispiele für Hybrid-Sensor-Kinasen	23
Die Histidin-Kinase ArcB	23
Die Histidin-Kinase BarA	25
Die Histidin-Kinase Aer	27
1.4 Ziele der Arbeit	28
2. Material und Methoden	29
2.1 Verwendete Stämme von <i>Synechocystis</i> PCC 6803	29
2.2 Anzucht von <i>Synechocystis</i> PCC 6803	29
2.3 Anzucht mit verschiedenen Stickstoffquellen	31

2.4 Bestimmung der Zelldichte	31
2.5 Zellernte der Kulturen für physiologische Messungen sowie für SDS-PAGE und Northern Blot-Hybridisierung	32
2.5.1 Zellernte der Kulturen für physiologische Messungen	32
2.5.2 Zellernte der Kulturen für SDS-PAGE und Northern Blot-Hybridisierung	32
2.6 Bestimmung des Chlorophyll-Gehalts	32
2.6.1 Chlorophyll-Bestimmung mit Originalkultur	32
2.6.2 Chlorophyll-Bestimmung mit eingestellten Zellsuspensionen	33
2.7 Messung des Protein-Gehalts	33
2.8 Messung der photosynthetischen und respiratorischen Aktivität	34
2.8.1 Messung der photosynthetischen Aktivität	34
2.8.2 Messung der respiratorischen Aktivität in der Cytoplasmamembran	35
2.9 Messung der 77 K-Pigment-Fluoreszenz	36
2.10 Messung der Nitratreduktase-Aktivität	37
2.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.11.1 Vorbereitung der Proben	38
2.11.2 SDS-PAGE	38
2.11.3 Immuno-Blot (Western-Blot)	40
2.11.4 Hybridisierung der Nitrocellulosemembranen mit verschiedenen Antikörpern	41
2.12 DNA-Isolierung und Herstellung von Sonden	43
2.12.1 DNA-Isolierung	43
2.12.2 Primerdesign und Sequenz der Primer	45
2.12.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)	46
2.12.4 Agarose-Gelelektrophorese mit DNA	47
2.13 RNA-Isolierung und Northern Blot-Hybridisierung	48
2.13.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Synechocystis</i> PCC 6803	48
2.13.2 Quantitative RNA-Bestimmung	49
2.13.3 Northern-Blot	49

2.13.3.1 Herstellung eines Formalin-Agarose-Gels	49
2.13.3.2 Denaturierung der Proben und Elektrophorese	50
2.13.3.3 Transfer der RNA auf eine Nylonmembran mittels Kapillarblot	50
2.13.3.4 Fixierung der RNA auf der Nylonmembran	51
2.13.3.5 DNA/RNA-Hybridisierung mit einer DIG-dUTP markierten Sonde	51
2.14 Bestimmung der Metaboliten-Menge	53
3. Ergebnisse	54
3.1 Auswahl der Histidin-Kinase Slr1759 als ein wahrscheinlicher Sensor des Redox-Zustandes der Cytoplasma- oder Thylakoid-Membran in <i>Synechocystis</i> PCC 6803	54
Zusammenfassung der Ergebnisse	57
3.2 Vergleichende Analyse von <i>Synechocystis</i> PCC 6803 WT und Hik14 bei Anzucht mit einer Lichtintensität von $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	58
3.2.1 Wachstum von <i>Synechocystis</i> PCC 6803 WT und Hik14 bei einer Lichtintensität von $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	59
3.2.2 Vergleichende Untersuchung zur Sensitivität gegenüber Photoinhi- bition von <i>Synechocystis</i> PCC 6803 WT und Hik14	61
3.2.3 Vergleichende Charakterisierung von <i>Synechocystis</i> PCC 6803 WT und Hik14	62
Analysen der 77 K Pigment-Fluoreszenz	63
Messung der photosynthetischen Aktivität	64
Messung der Nitratreduktase-Aktivität	65
Zusammenfassung der Ergebnisse	66
3.3 Vergleichende Analyse des Wachstums von <i>Synechocystis</i> PCC 6803 WT und Hik14 in BG11-Medium ohne und mit Epps-Puffer bei einer Lichtintensität von $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	67
Anzucht der Zellen bei einer Begasung mit Luft / 2 % CO_2	67
Anzucht von <i>Synechocystis</i> PCC 6803 WT und Hik14 bei Begasung mit Luft	70

Anzucht von <i>Synechocystis</i> PCC 6803 WT und Hik14 in BG11-Medium ohne und mit Zusatz von NaCl	71
Anzucht von <i>Synechocystis</i> PCC 6803 WT und Hik14 mit Ammonium als N-Quelle	72
Zusammenfassung der Ergebnisse	73
3.4 Vergleichende Analyse von <i>Synechocystis</i> PCC 6803 WT und Hik14 bei einer Lichtintensität von $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	74
3.4.1 Vergleichende Analyse des Wachstums	74
3.4.2 Vergleichende Analyse des Wachstums mit Epps-gepufferten BG11-Medium	77
3.4.3 Anzucht von <i>Synechocystis</i> PCC 6803 WT und Hik14 mit Ammonium als N-Quelle	79
3.4.4 Vergleichende Analysen der 77 K Pigment-Fluoreszenz	80
3.4.5 Vergleichende Analysen der photosynthetischen Sauerstoff-Entwicklung	81
3.4.6 Vergleichende Analyse der Nitratreduktase-Aktivität	82
3.4.7 Vergleichende Analysen der respiratorischen Sauerstoff-Aufnahme	82
3.4.8 Northern-Blot-Analysen von ausgewählten Transkripten	84
3.4.9 Western-Blot-Analysen von ausgewählten Proteinen	87
3.4.10 Metaboliten-Analysen	88
Zusammenfassung der Ergebnisse	89
4. Diskussion	91
5. Zusammenfassung	97
6. Literaturverzeichnis	99
7. Abkürzungsverzeichnis	113
8. Danksagung	116
9. Erklärung	117

1. Einleitung

Cyanobakterien sind die ältesten oxygenen photosynthetischen Organismen. Fossile Funde lassen eine Datierung des entwicklungsgeschichtlichen Alters auf 3,5 Milliarden Jahre zu (SCHOPF 1993). Ihre große Anpassungsfähigkeit hat dazu geführt, dass sich die Cyanobakterien im Laufe der Evolution die unterschiedlichsten Lebensräume erschließen konnten (WHITTON & POTTS 2000). So findet man sie beispielsweise in Süßwasser, Salzwasser, Thermalquellen und sogar in Gletschern sowie in Wüsten (VAN DEN HOEK *et al.* 1993).

1.1 Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

Das einzellige, im Süßwasser vorkommende Cyanobakterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 (im Folgenden als *Synechocystis* PCC 6803 bezeichnet) war das erste Cyanobakterium, dessen Genom vollständig sequenziert worden war (KANEKO *et al.* 1996). Das zirkulare Genom von *Synechocystis* PCC 6803 umfasst 3.573.470 bp und hat einen GC-Gehalt von 47,7 % (KANEKO *et al.* 1996). Durch Sequenzvergleiche konnte fast der Hälfte der Gene eine Funktion zugeordnet werden. Zudem ist *Synechocystis* PCC 6803 leicht transformierbar (GRIGORIEVA & SHESTAKOV 1982). In einigen Labor-Stämmen ist es möglich auch wichtige Photosynthesegene zu deletieren, da diese heterotroph mit Glucose wachsen können (RIPPKA *et al.* 1979; WILLIAMS 1988). Durch die Verfügbarkeit der gesamten Genomsequenz und die leichte Handhabung, ist *Synechocystis* PCC 6803 ein sehr beliebtes Untersuchungsobjekt.

1.1.1 Aufbau einer Cyanobakterienzelle

Die Erscheinungsform der Cyanobakterien ist vielfältig und reicht von einzelligen, über Kolonie-bildende, bis hin zu fädigen Formen. Da Cyanobakterien nicht über eine Geißel verfügen, ist ihnen eine gezielte Fortbewegung nicht möglich. Lediglich einige planktische Arten können durch kleine Gas-gefüllte Vesikel, die sogenannten Gasvakuolen, ihre Schwimmhöhe im Wasser regulieren und sich so in den Bereich der optimalen Lichtverhältnisse für die Photosynthese bewegen (VAN DEN HOEK *et al.* 1993). Da Cyanobakterien zur Gruppe der Prokaryoten gehören, weisen sie eine dementsprechende Zellorganisation auf. So fehlen ihnen die für Eukaryoten typischen Zellbestandteile wie Zellkern, Mitochondrien, Chloroplasten, Golgi-Apparat, endoplasmatisches Reticulum und Vakuolen.

In Abb. 1.1 ist der Aufbau einer Cyanobakterien-Zelle schematisch dargestellt. Nach außen hin ist die Zelle von der sogenannten Glycocalyx umgeben, einer aus Kohlenhydraten bestehenden faserigen Schicht. Sie schützt die Zelle vor Austrocknung, bzw. bei planktischen Arten vor Nährstoffverlust und hilft bei der Aufnahme von gelösten Substanzen.

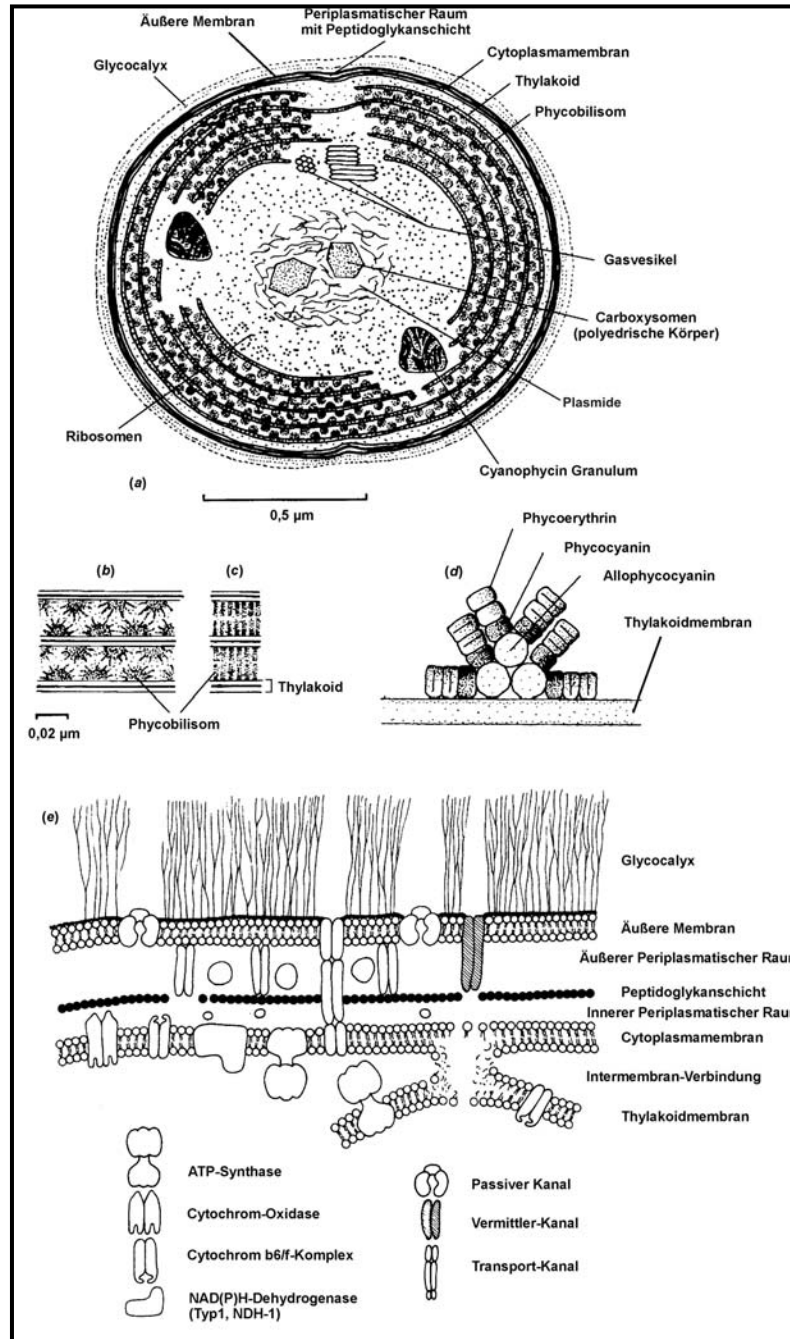


Abb. 1.1: Schematische Darstellung einer *Synechocystis*-Zelle. Dargestellt sind der Querschnitt einer Cyanobakterien-Zelle (a), die Thylakoidmembran mit Reihen von Phycobilisomen im Quer- (b) und Längsschnitt (c), Seitenansicht von Phycobilisomen (d) und der Membranaufbau einer Cyanobakterienzelle (e). (a)-(d) verändert nach VAN DEN HOEK *et al.* 1993, (e) verändert nach GANTT 1994.

Nach innen ist der Glycocalyx die Äußere Membran aufgelagert, auf welche, getrennt durch den periplasmatischen Raum, die Cytoplasmamembran folgt. Der periplasmatische Raum

wird durch eine Peptidoglukanschicht in einen äußeren und einen inneren Bereich unterteilt, die unterschiedliche Funktionen wahrnehmen (GANTT 1994). Bei dieser Peptidoglukanschicht handelt es sich um eine feste Zellwand, die Form gebend für die Zelle ist. Ihre Struktur ist mit der Peptidoglukanschicht vergleichbar, die in Gram-negativen nicht-photosynthetischen Bakterien vorliegt. Allerdings ist sie in Cyanobakterien dicker (GOLECKI 1988). Ihre chemischen Eigenschaften ähneln andererseits eher der Mureinschicht aus Gram-positiven Bakterien. Daher nimmt die Peptidoglukanschicht der Cyanobakterien neben der aus Gram-negativen und -positiven Bakterien eine eigenständige Position ein (JÜRGENS & WECKESSER 1985; GANTT 1994). Während die Cytoplasmamembran die Komponenten der Respiration trägt, sind in der Thylakoidmembran sowohl die Bestandteile für Respiration als auch für Photosynthese lokalisiert (GANTT 1994).

Den Thylakoidmembranen sind die Phycobilisomen aufgelagert, in denen die akzessorischen Pigmente Phycocyanin, Allophycocyanin, Phycoerythrin und in einigen Fällen Phycoerythrocyanin organisiert sind (VAN DEN HOEK *et al.* 1993). Bei den Phycobilisomen handelt es sich um die primären Lichtsammelkomplexe in Cyanobakterien, die allerdings auch in eukaryotischen Algengruppen wie den Glaucophyta und Rhodophyta zu finden sind. Die absorbierte Lichtenergie wird von den Phycobilisomen auf das Chlorophyll a übertragen, welches in Cyanobakterien im Reaktionszentrum der Photosysteme vorliegt. Innerhalb der Gruppe der Cyanobakterien bilden die Prochlorophyta eine Ausnahme, da sie keine Phycobilisomen haben, und zudem wie Höhere Pflanzen oder eukaryotische Algen Chlorophyll a und b, sowie gestapelte Thylakoidmembrane besitzen (BIBBY *et al.* 2003a, 2003b).

Die an der Thylakoidmembran mittels photosynthetischer Aktivität konservierte Energie wird in den Carboxysomen der CO₂-Fixierung zugeführt. In diesen polyedrischen Körpern sind große Mengen an Carboanhydrase und Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) enthalten.

Cyanobakterien verfügen über eine alternative CO₂-Fixierung und einen unvollständigen Tricarbonsäure-Zyklus. Normalerweise erfolgt die CO₂-Fixierung in oxygenen photosynthetischen Organismen über den reduktiven Pentosephosphat-Weg (Calvin-Zyklus). Hierbei wird CO₂ an Ribulose-1,5-Bisphosphat gebunden und anschließend über diverse Zwischenstufen und mehrfachem Umlauf unter Energieverbrauch zur Synthese von Glucose verwendet (TABITA 1994). Cyanobakterien verfügen über einen zusätzlichen Weg CO₂ zu fixieren. Hierbei wird zunächst durch die Carbamoylphosphat-Synthetase das Zwischenprodukt Carbamoylphosphat synthetisiert, eine instabile Verbindung aus ATP, CO₂

und Ammonium. Anschließend wird die Carbamoyl-Gruppe durch die Ornithin-Carbamoyltransferase unter Freisetzung von anorganischem Phosphat auf Ornithin übertragen. Hierbei entsteht Citrullin, welches dann in Arginin umgewandelt wird (CHEN *et al.* 1987; TABITA 1994).

Die zweite Auffälligkeit bei Cyanobakterien ist, dass sie nur einen „unvollständigen“ Tricarbonsäure-Zyklus besitzen, da sie weder den α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex noch die lösliche Succinat-Dehydrogenase besitzen (PEARS *et al.* 1969). Trotzdem könnte es sein, dass Cyanobakterien α -Ketoglutarat über einen alternativen Weg in Succinat umwandeln, und dass dieses dann durch Succinat-Dehydrogenasen zu Fumarat oxidiert wird (COOLEY *et al.* 2000).

Einige Cyanobakterien sind in der Lage einen Stickstoffspeicher zu synthetisieren. Hierbei handelt es sich um das 25-100 kDa große Polymer Cyanophycin, welches aus äquimolaren Mengen von L-Asparaginsäure und L-Arginin besteht und das Produkt einer nicht-ribosomalen Peptid-Synthese unter Beteiligung der Cyanophycin-Synthetase ist. Cyanophycin konnte auch in einigen wenigen heterotroph wachsenden Bakterien nachgewiesen werden, nicht aber in Algen und Pflanzen (ZIEGLER *et al.* 1998, 2002; BERG *et al.* 2000). Der Abbau von Cyanophycin erfolgt zunächst durch die Cyanophycinase, indem durch Hydrolyse das Dipeptid β -Aspartylarginin freigesetzt wird, das dann durch die Isoaspartyl-Dipeptidase in die Aminosäuren L-Asparaginsäure und L-Arginin gespalten wird (RICHTER *et al.* 1999).

Die genetische Information von Cyanobakterien ist in einer ringförmigen DNA organisiert, die zentral im Protoplasten vorliegt. Bei *Synechocystis* PCC 6803 liegt diese DNA in 6 - 8 chromosomale Kopien vor (WILLIAMS 1988).

1.1.2 Photosynthese und Respiration in Cyanobakterien

Obwohl Cyanobakterien als prokaryotische Algen keine Organellen, wie Chloroplasten oder Mitochondrien, besitzen, können sie oxygene Photosynthese und Respiration betreiben (CARR & WHITTON 1982; PESCHEK 1984). Aufgrund der fehlenden Kompartimentierung ist eine komplexe Koordination der verschiedenen Stoffwechselfvorgänge nötig (siehe auch Abb. 1.2). In einigen Arten haben sich gewisse Aufgabenteilungen entwickelt, so z. B. in *Anabaena*, einem fädig organisierten Cyanobakterium, in dem sich einige Zellen innerhalb des Zellverbandes zu Heterocysten differenziert haben.

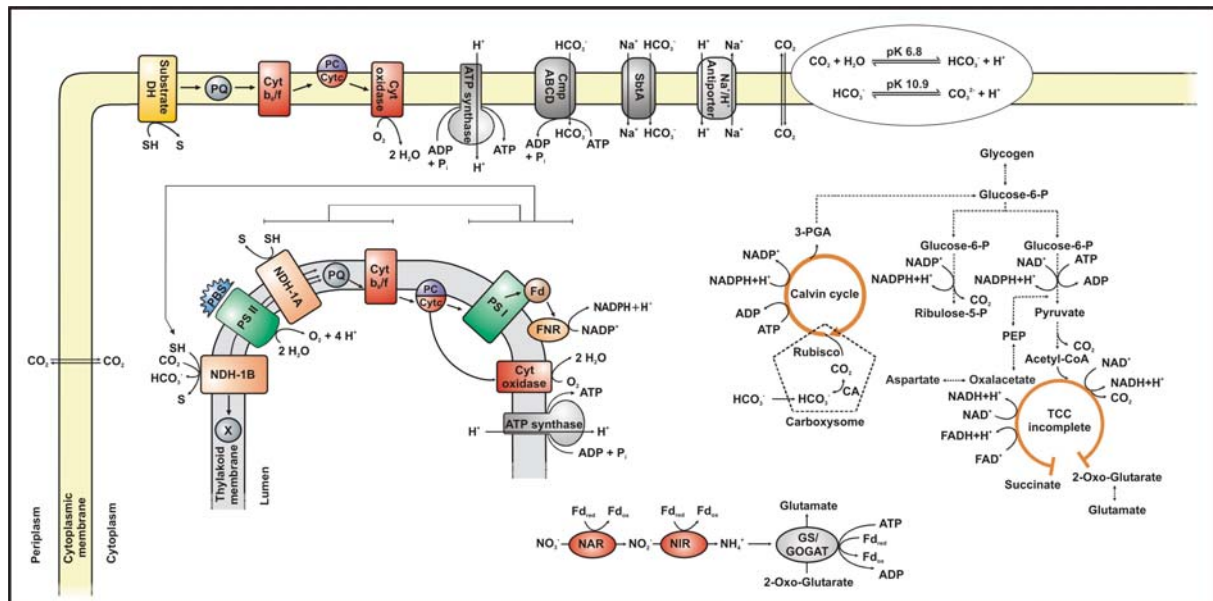


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Haupt-Stoffwechselwege der C- und N-Assimilation sowie des C-Katabolismus in Cyanobakterien. Abkürzungen: Plastochinon (PQ), Cytochrom *b6/f*-Komplex (Cyt *b6/f*), Cytochrom *c553* (Cyt*c*), Plastocyanin (PC), Cytochrom Oxidase (Cyt oxidase), „Cytoplasmic membrane protein“ (Cmp), Natrium-Bicarbonat-Transporter (Sodium-bicarbonat transport: SbtA), Tricarbonsäure-Zyklus (TCC), Carboanhydrase (CA), NADH-Dehydrogenase Typ A (NDH-1A), NADH-Dehydrogenase TypB (NDH-1B), Phycobilisomen (PBS), Substrat (S), Photosystem II (PS II), Photosystem I (PS I), Ferredoxin (Fd), Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase (FNR). (Michel unveröffentlicht)

Während der photosynthetische Elektronentransport in den meisten Cyanobakterien (mit Ausnahme von *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, GUGLIELMI *et al.* 1981) nur in der Thylakoidmembran abläuft, findet die Respiration an der Thylakoidmembran als auch an der Cytoplasmamembran statt. Somit ist an der Thylakoidmembran sowohl die photosynthetische Elektronentransport-Kette als auch die respiratorische Elektronentransport-Kette lokalisiert. Die Komponenten der photosynthetischen Elektronentransport-Kette sind Photosystem II (PS II), Plastochinon, Cytochrom *b6/f*-Komplex, Plastocyanin oder Cytochrom *c553* (je nach Verfügbarkeit von Kupfer wird eines dieser beiden löslichen luminalen Elektronen-Carrier genutzt, wobei Plastocyanin im Vergleich zu Cytochrom *c553* die wichtigere Funktion übernimmt), PS I, Ferredoxin und Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase (VERMAAS 2001). Die photochemische Ladungstrennung erfolgt in PS II und PS I. Für die an der Thylakoidmembran ebenfalls ablaufende Respiration werden zum Teil dieselben redoxaktiven Komponenten genutzt, nämlich Plastochinon, Cytochrom *b6/f*-Komplex, sowie Plastocyanin oder Cytochrom *c553* (SCHERER 1990; VERMAAS 2001; Schmetterer 1994). Außerdem stehen der Respiration NDH-1 und verschiedene weitere alternative Substrat-Dehydrogenasen zur Verfügung. An der Cytoplasmamembran läuft ebenfalls ein respiratorischer Elektronentransport ab unter Beteiligung von Substrat-Dehydrogenasen, Plastochinon, Cytochrom *b6/f*-Komplex, sowie Plastocyanin bzw. Cytochrom *c553* (KRAUSHAAR *et al.* 1990;

PESCHEK *et al.* 1989; MOSER *et al.* 1991; NICHOLLS *et al.* 1992; BERGER *et al.* 1991; WALKER 1992).

Es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass die Respiration in photosynthetisch aktiven Zellen durch Licht inhibiert wird, so z. B. der respiratorische Kohlenhydrat-Katabolismus in verschiedenen Cyanobakterien (SCHERER *et al.* 1988). Allerdings ist noch nicht geklärt, wie dieser Mechanismus funktioniert. So könnten z. B. Cytochrom-Oxidase und P700 miteinander um Elektronen konkurrieren oder die Regulation erfolgt über den Redox-Status des Plastochinon-Pools (MULLINEAUX & ALLEN 1986).

Im Folgenden werden die einzelnen Komponenten der verschiedenen Elektronentransport-Ketten beschrieben.

1.1.3 Photosynthetischer Elektronentransport

Die photosynthetische Elektronentransport-Kette in Cyanobakterien ist mit der von Pflanzen vergleichbar. Bei Sequenzvergleichen zwischen den Genen von *Synechocystis* PCC 6803 und den Plastiden von Algen und Höheren Pflanzen konnten 224 signifikant homologe Gene nachgewiesen werden. Die Rotalge *Porphyra purpurea* zeigt hierbei die höchste Übereinstimmung von 94% der Plastidengene mit *Synechocystis* PCC 6803 (REITH & MUNHOLLAND 1995; IKEUCHI & TABATA 2001). Eine Erklärung für diese Ähnlichkeit liefert die Endosymbiontentheorie, nach der sich Plastiden von endosymbiontischen Cyanobakterien ableiten.

In der Photosynthese wird Lichtenergie genutzt, um durch Wasseroxidation Reduktionsäquivalente ($\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$) sowie Energieäquivalente (ATP) zu bilden. Zur Generierung von ATP trägt sowohl der lineare Elektronentransport (siehe Abb. 1.3) als auch der zyklische Elektronentransport (Abb. 1.4) bei.

Linearer photosynthetischer Elektronentransport

Im linearen photosynthetischen Elektronentransport (siehe Abb. 1.3) nutzt das Photosystem II (PS II) die Lichtenergie, um Elektronen aus der Wasserspaltung auf Plastochinon (PQ) zu übertragen. Die Elektronen werden dann über den Cytochrom *b₆f*-Komplex (Cyt *b₆f*) an den löslichen, auf der Lumen-Seite der Thylakoidmembran lokalisierten Carrier Plastocyanin (PC) oder Cytochrom *c₅₅₃* (Cyt *c₅₅₃*) weitergegeben. Das oxidierte Reaktionszentrum von Photosystem I (PS I) nimmt die Elektronen von dem Carrier auf und gibt diese durch eine erneute Anregung mittels Licht an das Akzeptor-Chlorophyll A0 ab. Daran schließt sich eine

Übertragung der Elektronen über A1, Fe-S-Zentren und Ferredoxin (Fd) auf die Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase (FNR) an. Im letzten Schritt wird NADP⁺ durch FNR reduziert.

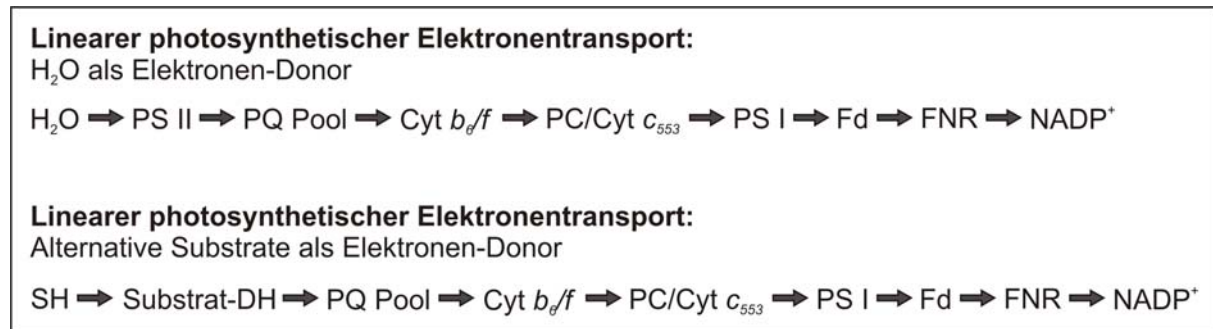


Abb. 1.3: Darstellung des linearen Elektronentransportes in Cyanobakterien. Gezeigt ist der lineare photosynthetische Elektronentransport einerseits mit Wasser als Elektronen-Donor und andererseits mit einem alternativen Substrat als Elektronen-Donor. Bei letzterem kann es sich um Substrate handeln, wie z. B. NAD(P)H, Succinat oder H₂ oder möglicherweise auch um L-Aminosäuren. (mit freundlicher Genehmigung von K.-P. Michel), Abkürzungen siehe Text.

Zyklischer Elektronentransport

Der zyklische Elektronentransport erfolgt unter Beteiligung von PS I und kann auf die in Abb. 1.4 beschriebenen vier verschiedenen Arten ablaufen.

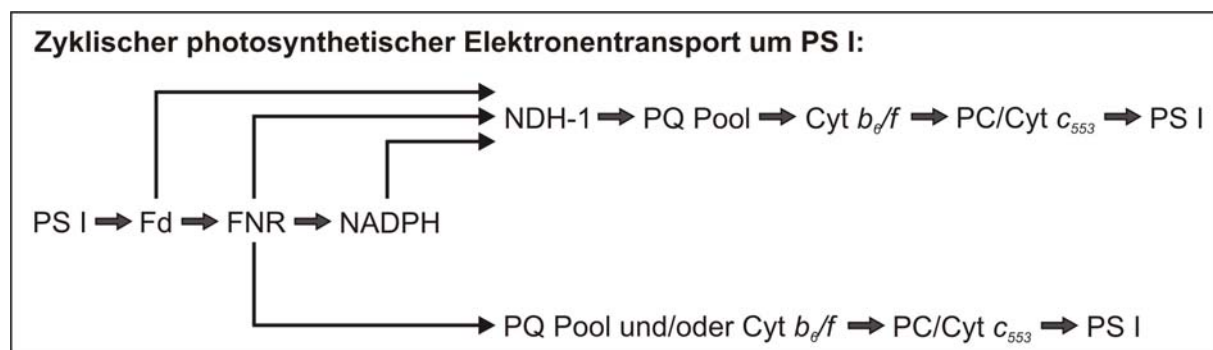


Abb. 1.4: Zyklischer Elektronentransport um PS I in Cyanobakterien. (mit freundlicher Genehmigung von K.-P. Michel), Erläuterungen und Abkürzungen siehe Text.

Es gilt als erwiesen, dass der NAD(P)H-Dehydrogenase-Komplex (NDH-1) zumindest an einigen dieser in Abb. 1.4 gezeigten Wege des zyklischen Elektronentransports beteiligt ist, indem dieser Elektronen auf den PQ-Pool überträgt, welche dann über den Cyt *b₆/f*-Komplex und PC/Cyt *c₅₅₃* auf PS I übertragen werden (OGAWA 1991). Der NDH-1 Komplex aus Cyanobakterien weist große Ähnlichkeit zum Komplex I aus *E. coli* und aus Mitochondrien auf (FRIEDRICH & SCHEIDE 2000). Komplex I aus Mitochondrien der Eukaryoten ist eine Komponente der respiratorischen Kette, die an der Translokation von Protonen beteiligt ist und auch als NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase bezeichnet wird. Komplex I der Mitochondrien wurde aus einem prokaryotischen Organismus durch Endosymbiose aufgenommen und ist sehr viel komplexer aufgebaut, als der aus Prokaryoten. Im Vergleich

zu *E. coli*, dessen NDH-1 Komplex aus 14 Untereinheiten besteht, ist der aus Mitochondrien aus mehr als 40 Untereinheiten aufgebaut (WALKER 1992). In Eukaryoten sind die für den NDH-1 Komplex kodierenden Gene sowohl im Mitochondrium als auch im Zellkern zu finden (WEISS *et al.* 1991; WALKER 1992; FRIEDRICH *et al.* 1995; FRIEDRICH & WEISS 1997; LANG *et al.* 1997). Der NDH-1 Komplex wird unter Abschnitt 1.1.4 näher beschrieben.

Es sollte auch noch erwähnt werden, dass im Gegensatz zu Pflanzen, in denen die Menge von PS I / PS II gleich ist, dieses Verhältnis in Cyanobakterien in einigen Fällen höher ist als eins, wie z. B. in *Synechocystis* PCC 6803, in dem das Verhältnis von PS I / PS II fast fünf beträgt (SHEN *et al.* 1993). Die von BENDALL & MANASSE (1995) vorgeschlagene Erklärung, dass diese höhere Rate mit einem entsprechend hohen Ausmaß an zyklischen Elektronentransport um PS I einhergehen könnte, konnte bisher nicht bestätigt werden (VERMAAS 2001). Die wahrscheinlichere Erklärung ist, dass der respiratorische Elektronentransport in hohem Maße Elektronen in den PQ-Pool einschleust, aber nicht in gleicher Weise zu einem Abfluss von Elektronen aus diesem beiträgt. Somit könnte eine höhere Menge an PS I dazu führen, dass der PQ-Pool im Licht in einem oxidierten Zustand vorliegt, was auch die Gefahr einer Lichtschädigung entgegenwirken würde (ANDERSSON & BARBER 1996).

1.1.4 Respiratorischer Elektronentransport

Wie oben schon erwähnt, läuft in Cyanobakterien der respiratorische Elektronentransport sowohl an der Thylakoidmembran als auch an der Cytoplasmamembran ab. Es gibt Hinweise auf verschiedene Donoren, die Elektronen in den PQ-Pool einschleusen.

NDH-1 Komplex

Der NDH-1 Komplex (NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase, auch Komplex I genannt) wurde für Bakterien, wie z. B. *E. coli* und für Mitochondrien aus Eukaryoten sehr gut charakterisiert (WEIDNER *et al.* 1993; FRIEDRICH 1998; GRIGORIEFF 1999). In *E. coli* besteht dieser Enzym-Komplex aus 14 Untereinheiten (NuoA-NuoN, siehe auch Tab. 1.1), die drei Komponenten bilden: eine Membran-gebundene Komponente, die mit dem Chinon interagiert, einem Verbindungsstück, dessen Funktion noch unbekannt ist und das den Membran-Teil mit dem Substrat-bindenden Teil, der dritten Komponente, koppelt (siehe Abb. 1.5A). Der Substrat-bindende Teil oxidiert NADH und enthält FMN und Fe-S-Zentren als prosthetische Gruppe, wobei letztere auch in dem Verbindungsstück enthalten sind (FRIEDRICH 1998; FRIEDRICH *et al.* 1995). Es wird vermutet, dass NDH-1 aus Proteinen hervorgegangen ist, die am

Elektronentransfer beteiligt sind und die noch heute in den löslichen Hydrogenasen nachweisbar sind (FRIEDRICH & SCHEIDE 2000).

<i>E. coli</i>	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	Lokalisation	mögliche Funktion
NuoA	NdhC	membraneous	-
NuoB	NdhK	peripheral	[4Fe-4S]-cluster
NuoC ^a	NdhJ	peripheral	-
NuoD ^a	NdhH	peripheral	Proton channel; [NiFe] cluster
NuoE	-	peripheral	[2Fe-2S]-cluster
NuoF	-	peripheral	NADH binding; FMN; 2x [4Fe-4S]
NuoG	-	peripheral	[4Fe-4S]; 1 (2) ^b x [2Fe-2S]
NuoH	NdhA	membraneous	Quinone binding
NuoI	NdhI	peripheral	2x [4Fe-4S]-cluster
NuoJ	NdhG	membraneous	-
NuoK	NdhE	membraneous	-
NuoL	NdhF	membraneous	Proton translocation
NuoM	NdhD	membraneous	Proton translocation
NuoN	NdhB	membraneous	Proton translocation

Tab. 1.1: NDH-1 Untereinheiten aus *E. coli* und *Synechocystis* PCC 6803 (FRIEDRICH & SCHEIDE 2000)

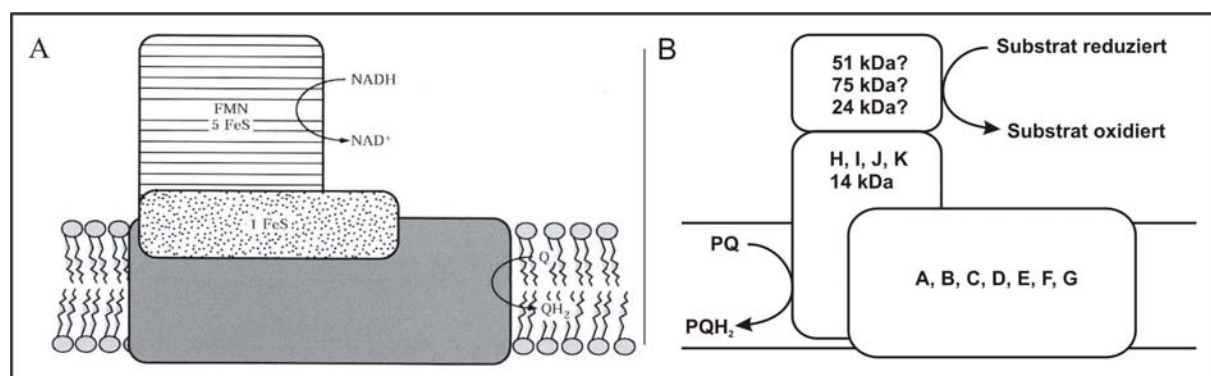


Abb. 1.5: Vergleich des NDH-1 Komplexes in *Escherichia coli* (A) und *Synechocystis* PCC 6803 (B)(nach FRIEDRICH & WEISS 1997, BERGER *et al.* 1993).

Im Genom von *Synechocystis* PCC 6803 konnten 11 Gene identifiziert werden, die Ähnlichkeiten zu den Genen *nuoA-D* und *nuoH-N* aus *E. coli* besitzen (KANEKO *et al.* 1996). Die entsprechenden Proteine des NDH-1 Komplexes aus *Synechocystis* PCC 6803 repräsentieren die sieben Untereinheiten der Membran-Komponente und die vier Untereinheiten der Verbindungs-Komponente des Komplex I (siehe Abb. 1.5B). Die Substrat-

bindende Komponente ist in *Synechocystis* PCC 6803 dagegen noch nicht bekannt (KÖSLING *et al.* 1999). Daher ist auch unklar, welches Substrat der NDH-1 Komplex aus Cyanobakterien umsetzt. Möglicherweise besitzt der NDH-1 Komplex in Cyanobakterien eine Funktion als NAD(P)H-Plastochinon- oder Ferredoxin-Plastochinon-Oxidoreduktase im zyklischen Elektronentransport um PS I. Es könnten aber auch Substrate wie z. B. L-Aminosäuren als Elektronen-Donoren wirken. Obwohl das Substrat nicht bekannt ist, wird der NDH-1 Komplex auch als NADH-Dehydrogenase bezeichnet.

Während neun der für NDH-1 aus *Synechocystis* PCC 6803 kodierenden Gene als einfache Kopie vorliegen, wurden fünf homologe Gene für *ndhD* und vier homologe Gene für *ndhF* nachgewiesen (KANEKO *et al.* 1996). Die entsprechenden Proteine für NdhD unterscheiden sich untereinander in ihrer Aminosäure-Sequenz, wobei hauptsächlich Ähnlichkeiten bestehen zwischen NdhD1 und NdhD2 sowie zwischen NdhD3, NdhD4 und NdhD5. Diese zwei Gruppen bilden zwei verschiedene NDH-1 Komplexe, die sich in ihrer Zusammensetzung der Untereinheiten und in ihrer Funktion voneinander unterscheiden. So ist der NDH-1 Komplex vom Typ A, der aus den Untereinheiten NdhF1 und NdhD1 oder NdhD2 besteht, für die Übertragung der Elektronen von NAD(P)H oder eines anderen Substrates auf Plastochinon verantwortlich und hat eine Funktion im zyklischen photosynthetischen sowie im respiratorischen Elektronentransport (YU *et al.* 1993; KLUGHAMMER *et al.* 1999; OHKAWA *et al.* 2000a; MI *et al.* 1992, 1994, 1995; SCHMETTERER 1994). Der NDH-1 Komplex vom Typ B enthält die Untereinheiten NdhF3 oder NdhF4 und NdhD3 oder NdhD4 und ist an der Umwandlung von CO₂ zu HCO₃⁻ beteiligt (KLUGHAMMER *et al.* 1999; OGAWA 1991a, 1991b; OHKAWA *et al.* 2000a, 2000b, 2001; SHIBATA *et al.* 2001; BADGER & PRICE 2003). Der NDH-1 Komplex in *Synechocystis* PCC 6803 ist an der Thylakoidmembran lokalisiert (OHKAWA *et al.* 2001).

Weitere Substrat-Dehydrogenasen

Im Folgenden werden weitere Substrat-Dehydrogenasen beschrieben, die Elektronen in die Respirationskette einschleusen können.

In dem Genom von *Synechocystis* PCC 6803 konnten drei Gene nachgewiesen werden, die für eine sogenannte NADH-Dehydrogenase vom Typ-2 (NDH-2) kodieren. Dieses Protein besteht nur aus einer Untereinheit, und bislang konnte keine Funktion in der Übertragung von Elektronen auf den Plastochinon-Pool nachgewiesen werden. Möglicherweise übernimmt NDH-2 Aufgaben im regulatorischen Bereich (HOWITT *et al.* 1999).

Die Succinat-Dehydrogenase oxidiert Succinat zu Fumarat und schleust Elektronen in den Plastchinon-Pool der Thylakoidmembran ein. Daher wird das Enzyme auch als Succinat-Plastochinon-Oxidoreduktasen bezeichnet. Es gibt Hinweise darauf, dass die Succinat-Dehydrogenase eine Rolle in der Respiration spielt (COOLEY *et al.* 2000; COOLEY & VERMAAS 2001).

Dess weiteren transportieren Hydrogenasen und Sulfid-Chinon-Oxidoreduktasen Elektronen in den PQ-Pool, auf die hier allerdings nicht weiter eingegangen werden sollen (PETERSON & BURRIS 1978; EISBRENNER & BOTHE 1979; PESCHEK 1980; SCHÜTZ *et al.* 1997).

Für *E. coli* ist bekannt, dass eine Aminosäure-Dehydrogenase Elektronen aus der Oxidation von den Aminosäuren D-Alanin und L-Prolin in die respiratorische Elektronentransport-Kette einschleusen kann (ANRAKU & GENNIS 1987). Es ist noch nicht geklärt, welche Rolle Aminosäure-Dehydrogenasen bei der Übertragung von Elektronen in die Elektronentransport-Kette in Cyanobakterien spielen. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 und PCC 6301 eine L-Arginin-Oxidase/Dehydrogenase unter bestimmten Bedingungen Elektronen in die Elektronentransport-Kette einschleust (PISTORIUS & VOSS 1980; ENGELS *et al.* 1992).

Die Pyruvat-Dehydrogenase ist ein Multienzym-Komplex (WILLIAMS 1976; PERHAM 1975; PETTIT *et al.* 1978). Er besteht aus den drei Komponenten Pyruvat-Dehydrogenase (E1), Dihydrolipoyl-Transacetylase (E2) sowie der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E3) (Stryer 1987).

Eine Komponente der Pyruvat-Dehydrogenase ist die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (LPD), die gut in *Synechocystis* PCC 6803 charakterisiert ist (ENGELS *et al.* 1997; ENGELS & PISTORIUS *et al.* 1997). Aufgrund ihrer Lokalisation an der Cytoplasmamembran in Cyanobakterien, könnte es sein, dass die Pyruvat-Dehydrogenase als Oxidoreduktase direkt mit der respiratorischen Elektronentransport-Kette interagiert (ENGELS *et al.* 1997). Die Interaktion einer Pyruvat-Dehydrogenase mit dem NDH-1 Komplex der Respirationskette in Mitochondrien aus Schweineherzen wurde von SUMEGI & SRERE (1984) gezeigt.

1.2 Aufnahme von anorganischen Kohlenstoff in Cyanobakterien

1.2.1 „Carbon Concentrating Mechanism“ (CCM)

Cyanobakterien, wie auch andere photosynthetische Organismen, decken ihren Bedarf an anorganischen Kohlenstoff über die Aufnahme von CO_2 und HCO_3^- . In einigen Organismen konnten Präferenzen hinsichtlich einer der beiden Kohlenstoffquellen nachgewiesen werden, und es gibt Überlegungen, dass sogar CO_3^{2-} als direkte anorganische Kohlenstoffquelle aufgenommen wird (MARCUS 1997). In *Synechocystis* PCC 6803 sowie *Synechococcus elongatus* PCC 7942 wurden je zwei CO_2 -Aufnahmesysteme und zwei HCO_3^- -Transporter nachgewiesen (OMATA *et al.* 1999; OHKAWA *et al.* 2000a; SHIBATA *et al.* 2001, 2002a, b; MAEDA *et al.* 2002). Während HCO_3^- über die Transporter in die Zelle gelangt, diffundiert CO_2 zunächst über die Äußere Membran und Cytoplasmamembran ins Zellinnere und wird dann zu HCO_3^- umgewandelt. Sowohl dieses als auch das aufgenommene HCO_3^- diffundieren in die Carboxysomen, wo HCO_3^- durch eine Carboanhydrase zu CO_2 umgewandelt und dann durch die Rubisco fixiert wird (PRICE *et al.* 1993; OGAWA 1993; KAPLAN & REINHOLD 1999; BADGER & PRICE 2003). Diese Vorgänge gehören zu dem sogenannten „Carbon Concentrating Mechanism“ (CCM, siehe auch Abb. 1.6), der letztendlich für eine ausreichende CO_2 -Menge in den Carboxysomen sorgt, um die geringe Affinität der Rubisco für CO_2 zu kompensieren (OGAWA & KAPLAN 2003).

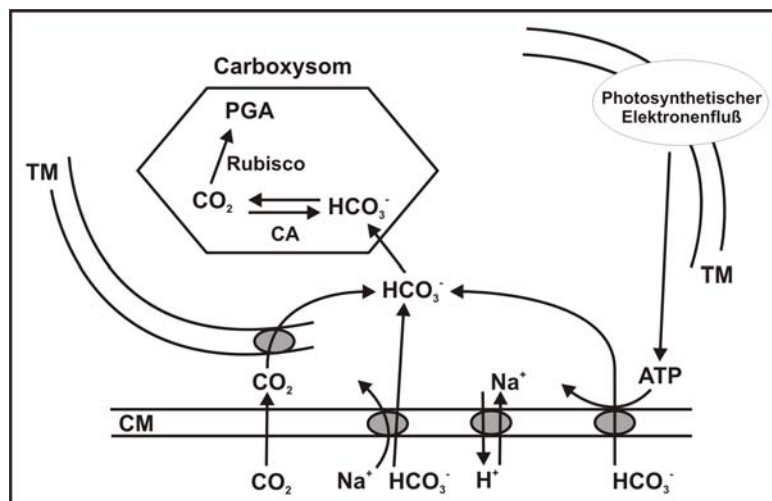


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des „Carbon Concentrating Mechanism“ (CCM) in Cyanobakterien. HCO_3^- wird über spezielle Transporter, die in der Cytoplasmamembran (CM) lokalisiert sind, aufgenommen. CO_2 diffundiert durch die Cytoplasmamembran und wird dann an der Thylakoidmembran (TM) zu HCO_3^- umgewandelt. Das in der Zelle akkumulierte HCO_3^- diffundiert in die Carboxysome und wird dort durch eine Carboanhydrase (CA) zu CO_2 umgewandelt, welches dann durch die Rubisco im Calvin-Zyklus fixiert wird (nach BLANKENSHIP 1992 verändert).

Die Aufnahme von anorganischem Kohlenstoff ist Energie abhängig. LI & CANVIN (1998) lieferten Hinweise dafür, dass in der Aufnahme von CO₂ der zyklische Elektronentransport indirekt involviert ist, während bei der Aufnahme von HCO₃⁻ der lineare Elektronentransport eine Rolle spielt. Sowohl der zyklische als auch der lineare Elektronentransport bauen einen Protonengradienten über die Thylakoidmembran auf, der dann zur ATP-Synthese führt.

Ein CCM konnte in vielen photoautotrophen Organismen, beginnend mit den Bakterien bis hin zu Höheren Pflanzen, nachgewiesen werden (HATCH 1992; REISKIND *et al.* 1997). Zudem wurde eine umgekehrte Korrelation zwischen der Effizienz des CCM und der Ineffizienz der Rubisco festgestellt, woraus geschlossen wurde, dass eine Ko-Evolution zwischen CCM und Rubisco stattgefunden haben könnte, und zwar als Reaktion auf sich verändernde CO₂-Konzentrationen in der Umwelt (BADGER & SPALDING 1999). Eine Abnahme der die Zelle umgebenden CO₂-Konzentration führt zu einer Erhöhung des CCM (BADGER *et al.* 1980). In Cyanobakterien führt dies unter anderem auch dazu, dass vermehrt Membran-Proteine gebildet werden, die an der Aufnahme von HCO₃⁻ beteiligt sind, allerdings ohne ihre Affinität zum entsprechenden Substrat zu erhöhen (KAPLAN 1980). Die Aufnahme von gelöstem CO₂ ist dagegen weit weniger von der CO₂-Konzentration beeinflusst als der HCO₃⁻ Transport (KAPLAN & REINHOLD 1999). Der Anstieg des CCM durch sich verändernde Umweltbedingungen gibt den Organismen den Vorteil, sich gut an variierende Kohlenstoff-Konzentrationen anpassen zu können. Veränderungen der CO₂/HCO₃⁻-Konzentration in dem die Zelle umgebenden Milieu führen zu einer Vielzahl von Reaktionen innerhalb der Zelle, wobei nur einige davon direkt in die Anpassung an die neuen Bedingungen involviert sind. So steigt z. B. in *Chlorella* während der Adaptation an niedrige CO₂-Verhältnisse die photosynthetische Aktivität (BRIGGS & WHITTINGHAM 1952).

Das Signal für eine Anpassung an sich verändernde Kohlenstoff-Konzentrationen ist noch unbekannt, aber es könnte sich hierbei um die Höhe der Konzentration von anorganischem Kohlenstoff, um das Verhältnis von [CO₂]/[O₂], oder aber um das gelöst vorliegende CO₂ in der Zelle handeln (MATSUDA & COLMAN 1995). Andererseits gibt es auch Hinweise darauf, dass als Signal Intermediate aus dem Kohlenstoff-Metabolismus dienen (KAPLAN & REINHOLD 1999). Zudem könnte es noch andere Signale geben, die zu einer Anpassung führen, wie z. B. der Reduktionszustand der photosynthetischen Elektronentransport-Kette (KAPLAN & REINHOLD 1999).

In Abb. 1.7 sind noch einmal die verschiedenen C-Aufnahmesysteme für marine und Süßwasser-bewohnende Cyanobakterien dargestellt.

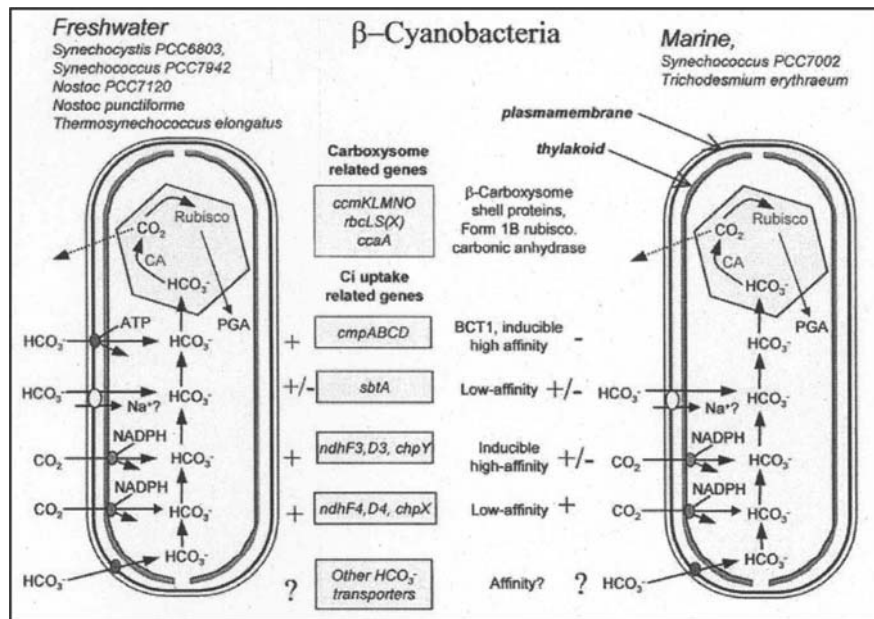


Abb. 1.7: HCO_3^- - und CO_2 -Aufnahmesysteme in Cyanobakterien. Gezeigt sind Süßwasser-bewohnende und marine Cyanobakterien. (BADGER & PRICE 2003).

1.2.2 HCO_3^- -Aufnahme

In *Synechocystis* PCC 6803 gibt es zwei HCO_3^- -Aufnahmesysteme, nämlich einen ABC-Transporter und einen Natrium-Bicarbonat-Transporter (SbtA), die im Folgenden näher erläutert werden sollen.

HCO_3^- -Transporter des ABC-Typs

In *Synechococcus elongatus* PCC 7942 wurde der erste HCO_3^- -Transporter (BCT1) auf molekularer Ebene charakterisiert (siehe auch Abb. 1.8, OMATA & OGAWA, 1985, 1986). Es handelt sich hierbei um ein Protein, welches in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist und dessen Expression durch niedrige CO_2 -Konzentrationen induziert wird. Das entsprechende Gen (*cmpA*, cytoplasmic membrane protein) für dieses Protein, bildet ein Operon mit *cmpB*, *cmpC* und *cmpD* (OMATA *et al.* 1990; OMATA 1992). Sequenz-Analysen ergaben, dass diese Gene für Untereinheiten eines Transporters des ABC-Typs kodieren, wobei die Expression von *cmpA* zur Bildung einer Substrat-bindenden Untereinheit führt. Eine Inaktivierung von *CmpA* in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 bewirkt jedoch keine nennenswerte Reduzierung der CO_2 oder HCO_3^- -Aufnahme (SCHWARZ *et al.* 1988). Transposon-Inaktivierungen von *cmpA* wirkten sich nur dann negativ auf das Wachstum von *Synechococcus elongatus* PCC 7942 und *Synechocystis* PCC 6803 aus, wenn die Mutanten einer CO_2 Menge unterhalb von 50 ppm ausgesetzt wurden (OHKAWA *et al.* 1998). Somit

nimmt der HCO_3^- -Transporter CmpA-D in *Synechocystis* PCC 6803 eine eher untergeordnete Position ein (OGAWA & KAPLAN 2003).

Der Natrium-abhängige HCO_3^- -Transporter

Bei dem zweiten HCO_3^- -Transporter handelt es sich um das SbtA-System (Sodium-bicarbonat transport, siehe auch Abb. 1.8). Es konnte gezeigt werden, dass Natrium-Ionen für die HCO_3^- -Aufnahme in Cyanobakterien notwendig und somit essentiell für deren Wachstum sind (REINHOLD *et al.* 1986; ESPIE & KANDASAMY 1994; SO *et al.* 1998; MILLER *et al.* 1984) und zwar besonders im alkalischen pH-Bereich, da unter diesen Bedingungen im Medium vermehrt HCO_3^- relativ zu CO_2 vorliegt. Das für den SbtA-Transporter kodierende Gen (*sbtA*) wurde von SHIBATA *et al.* (2002b) identifiziert. Nach Kultivierung von *Synechocystis* PCC 6803 mit 3 % CO_2 war die nachgewiesene Transkript-Menge von *sbtA* sehr gering. Ein Anstieg der Expression von *sbtA*-mRNA wurde erst nach 2 bis 6 h Anzucht mit Luft, die normale Mengen an CO_2 enthielt, gemessen. Parallel dazu erhöhte sich die Aktivität der HCO_3^- -Aufnahme (SHIBATA *et al.* 2002b).

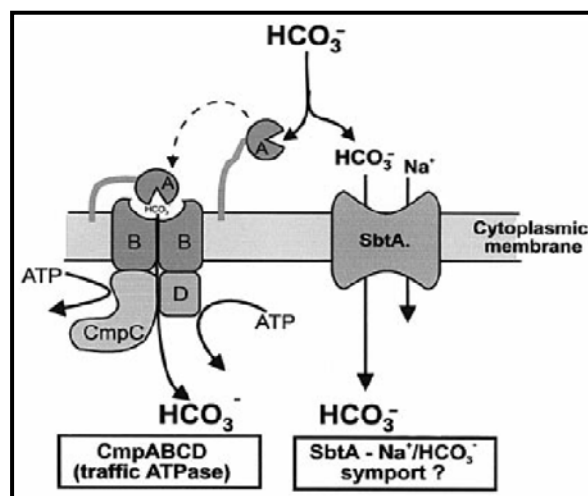


Abb. 1.8: Darstellung der beiden Transport-Systeme für HCO_3^- aus Cyanobakterien. BCT1, die „high affinity“ ATPase, ist links dargestellt. SbtA, ein möglicher $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Symporter, ist auf der rechten Seite gezeigt. (BADGER & PRICE, 2003)

Um HCO_3^- -Transporter charakterisieren zu können, wurden Mutanten in *Synechocystis* PCC 6803, deren CO_2 -Aufnahme inaktiviert worden war untersucht. So zeigt z. B. die Doppelmutante $\Delta\text{NdhD3}/\text{NdhD4}$ kein Wachstum mit Luft-Begasung im Medium mit pH 7,0. Im Gegensatz dazu fand bei pH 9,0 eine normale HCO_3^- -Aufnahme statt und das Wachstum war mit dem des Wildtyps vergleichbar (SHIBATA *et al.* 2002b).

Drei Theorien wurden aufgestellt, um die Abhängigkeit der HCO_3^- -Aufnahme über den SbtA-Transporter von Natrium-Ionen in Cyanobakterien zu erklären (KAPLAN *et al.* 1990; ESPIE & KANDASAMIE 1994):

Über einen Na^+/H^+ -Antiporter könnte Natrium für die Aufrechterhaltung eines bestimmten internen pH-Wertes während der CO_2 -Fixierung aus HCO_3^- verantwortlich sein. Dies ist allerdings eher unwahrscheinlich, da gezeigt werden konnte, dass die SbtA-abhängige HCO_3^- -Aufnahme stark vom umgebenden pH-Wert des Mediums beeinflusst wird. Die höchste Aktivität wurde bei einem pH von 9,0 nachgewiesen. Mit Abnahme des pH-Wertes verringerte sich auch die HCO_3^- -Aufnahme; so betrug sie bei einem pH von 8,0 noch 59 % der vorherigen Aktivität und bei einem pH von 7,0 sogar nur noch 20 % (OGAWA & KAPLAN 2003).

Als zweite mögliche Funktion von Natrium wäre denkbar, dass das Ion an den HCO_3^- -Transporter bindet und so dessen Affinität zum Substrat verändert (OGAWA & KAPLAN 2003). Ebenfalls vorstellbar wäre der Transport von HCO_3^- über einen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Symport, dessen Aktivität eng mit einem Na^+/H^+ -Antiporter gekoppelt ist, der für den nötigen Na^+ -Gradienten ($\Delta\mu_{\text{Na}^+}$) zwischen periplasmatischem Raum und Cytoplasma sorgt. Um diese These zu untersuchen, wurde sowohl in *Synechocystis* PCC 6803 Wildtyp als auch in der Doppelmutante $\Delta\text{ndhD3}/\text{ndhD4}$ (*ndhD3* und *ndhD4* kodieren für Untereinheiten der NAD(P)H-Dehydrogenase) das Gen *ntpJ* inaktiviert, welches Homologien zur Untereinheit von HKT1 aus *Arabidopsis thaliana*, einem an dem Na^+ -Transport beteiligten Protein, aufwies (UOZUMI *et al.* 2000). Die entsprechende $\Delta\text{ndhD3}/\text{ndhD4}/\text{ntpJ}$ -Mutante zeigte eine deutlich reduzierte HCO_3^- -Aufnahme im Vergleich zur Doppelmutante $\Delta\text{ndhD3}/\text{ndhD4}$ (SHIBATA *et al.* 2002b). Des Weiteren wurde mit dieser *ntpJ*-freien Mutante ein reduziertes Wachstum bei Anzucht mit Luft-Begasung, jedoch kein vermindertes Wachstum bei Kultivierung mit einer CO_2 -Konzentration von 3 % gemessen. Das Wachstum des Wildtyps, bei dem *ntpJ* inaktiviert wurde, war bei einer Na^+ -Konzentration über 0,1 M deutlich reduziert. Diese Erkenntnisse unterstützen die These, dass ein Natriumgradient über die Cytoplasmamembran die treibende Kraft für die HCO_3^- -Aufnahme mittels des SbtA-Systems ist und dass HCO_3^- in einem Symport mit Natrium in die Zelle aufgenommen wird (OGAWA & KAPLAN 2003).

Von den beiden HCO_3^- -Transportern (CmpA und SbtA) nimmt das Natrium-abhängige Aufnahmesystem eine wichtigere Rolle als das CmpA-System ein (OGAWA & KAPLAN 2003).

Mögliche Hinweise auf weitere Arten der HCO_3^- -Aufnahme in *Synechocystis* PCC 6803 konnten nicht bestätigt werden. So wurde zunächst vermutet, dass Slr1515 aus *Synechocystis* PCC 6803, einem Homolog zu IctB (Inorganic carbon transporter) aus *Synechococcus elongatus* PCC 7942, in die HCO_3^- -Aufnahme involviert sein könnte (KAPLAN & REINHOLD 1999, BONFIL *et al.* 1998). Um diese Theorie zu untersuchen, wurde eine Mutante charakterisiert, deren HCO_3^- -Aufnahme über die bisher bekannten Transporter inaktiviert worden war. Diese *Synechocystis* PCC 6803-Mutante $\Delta\text{ndhD3/ndhD4/sbtA/cmpA}$ (SHIBATA *et al.* 2002b) gab jedoch keinen weiteren Aufschluss darüber, ob es noch ein zusätzliches HCO_3^- -Aufnahmesystem gibt.

1.2.3 CO_2 -Aufnahme und Umwandlung zu HCO_3^- in der Zelle

Aufnahme von CO_2

Cyanobakterien nehmen aufgrund ihrer hohen Affinität zu CO_2 bevorzugt diese Kohlenstoff-Quelle auf. Dies geschieht selbst unter alkalischen Bedingungen, wenn sich das chemische Gleichgewicht von CO_2 in Richtung HCO_3^- verschiebt (OGAWA & KAPLAN 2003).

Die Aufnahme von CO_2 in die Zelle erfolgt durch passive Diffusion durch die Äußere Membran. Um den Diffusionsstrom aufrechtzuerhalten, bedarf es der Generierung eines Gradienten, dessen Konzentration in der Zelle abnimmt. Hierzu wird das CO_2 in der Zelle anschließend durch eine energieabhängige Carboanhydrase ähnliche Reaktion (FRIDLAND *et al.* 1996) zu HCO_3^- umgewandelt. Hinweise auf diesen Vorgang gaben Untersuchungen der CO_2 -Aufnahme, die zu einer Sättigungskinetik führten (MILLER *et al.* 1990; VOLOKITA *et al.* 1984).

Bei der Umwandlung von CO_2 zu HCO_3^- könnte die Energie-abhängige Reaktion eine Konformationsänderung des Carboanhydrase ähnlichen Komplexes sein, die dann zu einer Herabsenkung der Affinität für HCO_3^- und/oder Steigerung der Affinität für CO_2 führen kann. Somit würde die Hydrations-Reaktion begünstigt und die Dehydrations-Reaktion herabgesetzt werden (FRIDLAND *et al.* 1996). Diese Umwandlung von CO_2 zu HCO_3^- erfolgt in alkalischen Taschen, die von spezialisierten NDH-1 Komplexen unter Beteiligung des zyklischen Elektronentransportes in der Thylakoid-Membran gebildet werden (siehe Abb. 1.9). Durch die Elektronen-Übertragung im zyklischen Elektronentransport um PS I an dem der NDH-1 Komplex beteiligt ist, werden der Tasche Protonen entzogen (KAPLAN & REINHOLD 1999).

Für *Synechococcus* UTEX 625 konnte gezeigt werden, dass die CO_2 -Aufnahme mit dem zyklischen Elektronentransport in Verbindung steht, während die HCO_3^- -Aufnahme von dem linearen Elektronentransport abhängig ist (LI & CANVIN 1998).

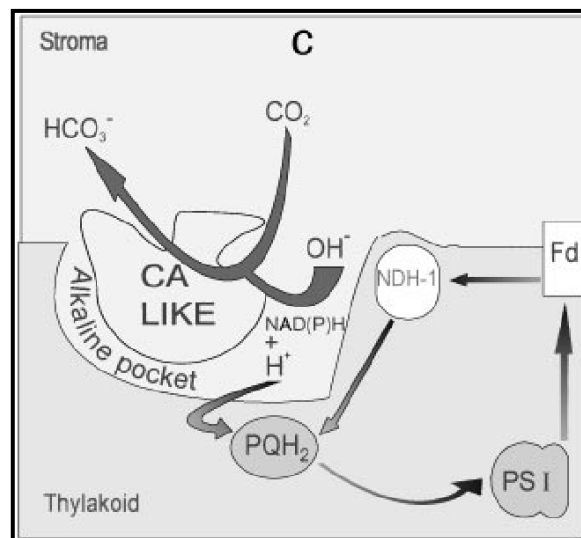


Abb. 1.9: Darstellung eines möglichen Mechanismus zur Bildung einer alkalischen Tasche in der Thylakoidmembran, in der die Umwandlung von CO_2 zu HCO_3^- unter Einfluß der zyklischen Elektronentransport-Kette um PS I stattfindet. An der Alkalisierung dieser Tasche ist ein spezialisierter NDH-1 Komplex beteiligt (PRICE *et al.* 1998; OHKAWA *et al.* 1998). Als Konsequenz aus der pH-Veränderung könnte CO_2 durch einen Carboanhydrase-ähnlichen Vorgang zu HCO_3^- umgewandelt werden. Hydrophobe Oberflächen könnten die Diffusion von H^+ zurück ins Cytoplasma erschweren, was zur Stabilisierung der alkalischen Tasche und damit zur Steigerung der Effizienz der Generierung von HCO_3^- beitragen würde. (KAPLAN & REINHOLD 1999)

1.3 Zwei-Komponentensysteme

Cyanobakterien sind einer Vielzahl von Umwelteinflüssen ausgesetzt, welche wahrgenommen werden müssen, um sich adäquat anzupassen und um zu überleben. Die Verbindung zwischen Signal und Zellantwort wird häufig durch ein sogenanntes regulatorisches Zwei-Komponenten-System hergestellt (siehe Abb. 1.10). Ein Zwei-Komponenten-System setzt sich aus Proteinen der Signaltransduktionskette zusammen und besteht typischer Weise aus einer Sensor-Kinase und einem Response-Regulator (CHANG & STEWART 1998; HAKENBECK & STOCK 1996; MIZUNO *et al.* 1996). Die Sensor-Kinase nimmt über ihre Sensor-Domäne Veränderungen der Umwelt wahr und gibt die Information an den Response-Regulator weiter, welcher dadurch aktiviert wird. Dieser bewirkt entsprechend dem äußeren Reiz Anpassungen in der Gen-Expression oder nimmt Einfluss auf andere Abläufe in der Zelle. Da die Out-Put-Domäne des Response-Regulators allerdings in der Regel DNA-bindende Eigenschaften besitzt, wirkt dieser meistens als Transkriptionsfaktor (PARKINSON & KOFOID 1992).

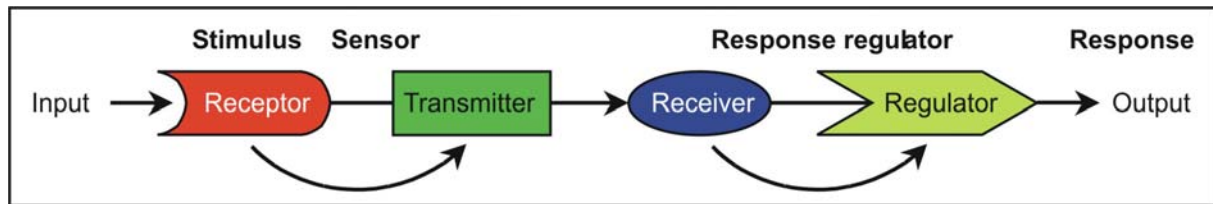


Abb. 1.10: Darstellung eines Zwei-Komponenten-Systems (LENGELER *et al.* 1999, modifiziert).

Die Informationsweiterleitung zwischen Sensor-Kinase und Response-Regulator erfolgt mittels Phosphotransfer-Reaktionen (Phosphorylierung und Dephosphorylierung) (LI & SHERMAN 2000; WEST & STOCK 2001). Die meisten dieser Signaltransduktions-Proteine besitzen eine der zwei allgemeinen Signal-Domänen für den Phosphotransfer - nämlich eine „Transmitter“- oder eine „Receiver“-Domäne (MIZUNO *et al.* 1996). Eine typische Sensor-Kinase trägt N-terminal eine Sensor-Domäne für die Signal-Wahrnehmung, sowie C-terminal eine Transmitter-Domäne mit einem konservierten Histidin-Rest, welcher durch ATP autophosphoryliert wird. Der Response-Regulator dagegen enthält N-terminal eine Receiver-Domäne und C-terminal eine „Signal-output“-Domäne. In seiner Receiver-Domäne ist ein konservierter Aspartat-Rest lokalisiert, auf den die Phosphat-Gruppe des Phospho-Histidins der Transmitter-Domäne übertragen wird. Die Aspartat-Phosphorylierung kontrolliert entweder die Bindung an die Ziel-Sequenz der DNA oder interagiert mit anderen Komponenten der Transkriptions-Maschine. Neben dieser Möglichkeit der Signaltransduktion gibt es noch einen sogenannten „alternativen Transmitter“. Dieser enthält eine kurze „Konsensus“-Region mit einem konservierten Histidin-Rest. Dieser Histidin-Rest kann sowohl eine Phosphat-Gruppe aufnehmen, als auch auf entsprechende Komponenten übertragen. Trägt ein Protein der Signal-Transduktion sowohl eine Kinase-Domäne als auch eine Response-Regulator-Domäne, dann handelt es sich um eine Hybrid-Histidin-Kinase (MIZUNO *et al.* 1996). Neben den normalen Zwei-Komponenten-Systemen und den Hybrid-Histidin-Kinasen gibt es einige Zwei-Komponenten-Systeme, die mehr als eine Histidin-Kinase oder mehr als einen Response-Regulator nutzen.

Zwei-Komponenten-Systeme finden sich sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten. In Prokaryoten wurden diese Signaltransduktions-Komponenten in mehr als 50 verschiedenen Bakterien nachgewiesen. Allein in *Escherichia coli* sind 40 verschiedene Sensor-Regulator-Paare an einem reibungslosen Ablauf in der Zelle beteiligt (MIZUNO *et al.* 1996). Die Vorstellung, dass es schon einer Vielzahl von Zwei-Komponenten-Systemen bedarf, um die Vorgänge in *Escherichia coli* zu koordinieren, lässt erahnen, um wie viel komplexer regulatorische Abläufe in oxygenen photosynthetischen Prokaryoten, wie den Cyanobakterien, sein müssen.

Durch die vollständige Aufklärung der Genom-Sequenz des Cyanobakteriums *Synechocystis* PCC 6803 konnte damit begonnen werden, Gene zu identifizieren, die Eigenschaften von Zwei-Komponenten-Systemen, wie Receiver-, Transmitter- oder alternative Transmitter-Domänen, in sich tragen (KANEKO *et al.* 1996). Es konnten 80 „Open reading frames“ (ORFs) als Bestandteile von Zwei-Komponenten-Systemen nachgewiesen werden. Vergleiche dieser ORFs hinsichtlich Ähnlichkeiten mit Genen von bekannten Zwei-Komponenten-Systemen aus anderen Bakterien ergaben eine große Anzahl von Übereinstimmungen. Analysen der Aminosäure-Sequenz dieser Kandidaten zeigten, dass jeder von ihnen konservierte Aminosäurebereiche und konservierte Aminosäure-Reste (Histidin oder Aspartat), die die Phosphat-Gruppe aufnehmen, trägt. Mittels detaillierterer Vergleichsanalysen konnten eine Reihe von ORFs als Bestandteile von Zwei-Komponenten-Systemen identifiziert werden: 26 mögliche Sensor-Kinasen mit Transmitter-Domäne, 38 mögliche Response-Regulatoren mit Receiver-Domäne und 16 mögliche Hybrid-Sensor-Kinasen, die sowohl einen Transmitter als auch einen Receiver tragen (siehe Tab. 1.1-2).

ORF	Position (L_end–R_end)	AA	Type ^{a)}	Similarity
sll0968	124,452–126,443	663	---H	Dfr
slr1414	179,734–181,047	437	--(H)	-
sll1003	518,287–520,272	661	---H	-
slr1393	701,343–704,267	974	-----H	-
slr1147	811,489–812,793	434	--H	-
sll1124	862,262–866,377	1,371	-----H	-
sll1353	1,084,757–1,087,753	998	-----H	-
slr1805	1,278,293–1,280,542	749	---H	-
sll1590	1,491,634–1,492,686	350	-H	-
sll1888	1,782,057–1,783,355	432	--H	-
sll1871	1,808,922–1,810,946	674	---H	-
slr1285	1,881,917–1,883,311	464	--(H)	-
sll0337	2,370,818–2,372,110	430	--H	SphS
sll0750	2,421,536–2,422,687	383	--H	SarA
slr0473	2,607,812–2,610,058	748	---H	Phytochrome
slr0484	2,618,067–2,620,094	675	---H	-
slr0640	2,661,959–2,663,284	441	--H	-
slr0210	2,747,604–2,748,857	417	--H	-
slr0073	2,869,752–2,870,699	315	H ²	-
sll0474	2,927,280–2,929,700	806	---H-	-
sll0094	2,990,525–2,991,898	457	--(H)	-
slr0311	3,032,495–3,034,774	759	---H	-
sll0798	3,048,901–3,050,265	454	--H	-
sll0790	3,063,548–3,064,924	458	--H	-
slr0533	3,192,683–3,193,900	405	--H	-
sll1475	3,399,457–3,400,350	297	H	-

Tab. 1.1: Liste der Sensor-Kinasen in dem Cyanobakterium *Synechocystis* PCC 6803. Die charakteristische Struktur der einzelnen Kinasen ist durch Symbole dargestellt: H symbolisiert einen Transmitter mit einem autophosphorylierbaren Histidin-Rest, der Strich und der Punkt stehen für Aminosäure-Sequenzen mit einer Länge von 100 bzw. 50 Aminosäuren. Vergleichsanalysen der ORFs aus *Synechocystis* PCC 6803 mit *E. coli* ergaben 26 mögliche Histidin-Kinasen. (MIZUNO *et al.* 1996)

Die Signal-Input-Domänen der 26 möglichen Sensor-Kinasen könnten aufgrund ihrer Aminosäure-Sequenz unterschiedliche Signale wahrnehmen. Die 38 möglichen Response-Regulatoren wurden größtenteils in verschiedene Unterfamilien eingeteilt, z. B. CheY-, OmpR-, NarL- oder PatA-Unterfamilie. So ist CheY z. B. auf molekularer Ebene an der Rotation des Flagellarmotors in *E. coli* beteiligt. Bei den 16 Hybrid-Sensor-Kinasen in *Synechocystis* PCC 6803 tragen einige noch zusätzlich eine alternative Transmitter-Domäne. Von den 80 ORFs liegen nur 32 als Kinase-Response-Regulator-Paar vor, während die übrigen separat im Genom vorhanden sind. (MIZUNO *et al.* 1996).

ORF	Position (L_end-R_end)	AA	Type ^{a)}	Similarity
sll1672	253,125–255,629	834	---HD-	-
slr1400	402,290–403,432	380	DH	-
slr1759	533,086–537,474	1,462	-----HDDH ²	-
sll1296	684,560–687,334	924	CheA-D	CheA
sll1905	1,441,002–1,444,046	1,014	D--H--DH ²	-
slr2098	1,563,115–1,566,900	1,261	-----HDDH ²	-
slr2099	1,566,990–1,568,090	366	DH	-
slr2104	1,572,849–1,575,701	950	----HDH ²	-
slr1324	1,653,402–1,654,664	420	DH	-
sll1229	1,663,554–1,664,690	378	DH	-
sll1228	1,664,798–1,666,699	633	--HD-	-
slr1969	1,777,729–1,779,981	750	---HD	-
sll1555	1,980,365–1,981,471	368	DH	-
slr0322	2,271,581–2,274,868	1,095	CheADD	CheA
slr0222	2,518,321–2,521,857	1,178	D-----H	-
sll0043	3,144,212–3,148,420	1,402	H ² -CheA-D	CheA

Tab. 1.2: Liste der Hybrid-Histidin-Kinasen in dem Cyanobakterium *Synechocystis* PCC 6803.

Die charakteristische Struktur der einzelnen Hybrid-Histidin-Kinasen ist durch Symbole dargestellt: H symbolisiert einen Transmitter mit einem autophosphorylierbaren Histidin-Rest, D symbolisiert eine Receiver-Domäne mit einem konservierten phosphorylierbaren Aspartat-Rest. Der Strich und der Punkt stehen für Aminosäure-Sequenzen mit einer Länge von 100 bzw. 50 Aminosäuren. Vergleichsanalysen der ORFs aus *Synechocystis* PCC 6803 mit *E. coli* ergaben 16 mögliche Hybrid-Histidin-Kinasen. (MIZUNO *et al.* 1996)

Da für bestimmte Reizwahrnehmungen der Histidin-Kinasen sogenannte PAS-Domänen essentiell sind, sollen diese im Folgenden näher beschrieben werden.

1.3.1 PAS-Domänen

Der Name PAS ist ein Akronym, welches aus den Namen der Proteine gebildet wurde, in denen diese Domäne zuerst nachgewiesen wurde: Drosophila period clock protein (PER), aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) aus Vertebraten, sowie Drosophila single-minded protein (SIM) (NAMBU *et al.* 1991).

PAS-Domänen konnten in Archaeeten, Bakterien und Eukaryoten nachgewiesen werden. Trotzdem ist nur wenig über die Mechanismen der Signaltransduktion bekannt. So kennt man diese Funktion bislang nur für den Photo-Sensor PYP (Photoactive Yellow Protein) aus

Bakterien und den Sauerstoff-Sensor FixL (REPIK *et al.* 2000). PAS-Domänen können aber auch Umweltfaktoren messen, die die Zellmembran überwinden und dann den Zellmetabolismus beeinflussen können (TAYLOR & ZHULIN 1999).

PAS-Domänen wurden hauptsächlich in Proteinen nachgewiesen, die sowohl direkt als auch indirekt an der Signal-Transduktion beteiligt sind. Bei den PAS-Domänen-tragenden Proteinen, deren Funktion bekannt ist, handelt es sich meist um Rezeptoren, Signal-Transducer oder Transkriptionsfaktoren (ZHULIN *et al.* 1997). In Bakterien und Archaeeten wurden PAS-Domänen hauptsächlich in Sensoren von Zwei-Komponenten-Systemen gefunden. In Eukaryoten wurden die PAS-Domänen in Transkriptionsfaktoren sowie in Ionen-Kanälen, die auf Spannung reagieren, nachgewiesen. Die Anwesenheit mehrerer PAS-Domänen in einem Protein könnte bedeuten, dass verschiedene Reize wahrgenommen werden können (TAYLOR & ZHULIN 1999).

Die meisten PAS-Domänen in Prokaryoten sind in Histidin-Sensor-Kinasen enthalten (PONTING & ARAVIND 1997; ZHULIN & TAYLOR 1998). PAS-Domänen sind hier beteiligt an der Wahrnehmung von Veränderungen in der Sauerstoff-Konzentration, im Redoxpotential oder in Licht-Intensitäten, sowie in Bezug auf den gesamten Energiestatus der Zelle. Sie sind im Cytosol lokalisiert und nehmen vermutlich Signale innerhalb der Zelle wahr (ZHULIN & TAYLOR 1999). Extrazelluläre Veränderungen könnten auch direkt gemessen werden, indem externe Stimuli in die Zelle gelangen, wie z. B. Licht. Die PAS-Domänen könnten auch indirekt auf diese Stimuli reagieren, indem sie Veränderungen in der Zelle wahrnehmen, welche durch äußere Einflüsse entstehen. PAS-Domänen kommen sowohl in löslichen als auch in Membran-gebundenen Proteinen vor. Wenn sie Bestandteil von Membran-gebundenen Proteinen sind, dann sind sie in der Nähe der Membran lokalisiert, möglicherweise um mit Domänen anderer Membran-assoziiierter Proteine zu interagieren (TAYLOR & ZHULIN 1999). Die Wahrnehmung von bestimmten Signalen durch PAS-Domänen basiert auf der Assoziation eines Kofaktors, wie z. B. FAD (TAYLOR & ZHULIN 1999). In PAS-Domänen-enthaltenen Proteinen wurden bisher nachfolgende Kofaktoren nachgewiesen: Häm, Fe-S, FMN / FAD sowie 4-Hydroxycinnamyl (TAYLOR & ZHULIN 1999). Es konnte keine Korrelation zwischen der Anzahl der PAS-Domänen und der Größe des Bakterien-Genoms festgestellt werden (TAYLOR & ZHULIN 1999). Allerdings konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen der Gesamtzahl von PAS-Domänen und den Komponenten der am respiratorischen und photosynthetischen Elektronentransport beteiligten Proteinen in vollständig sequenzierten bakteriellen Genomen besteht (siehe Tab. 1.3) (ZHULIN & TAYLOR 1998).

Arten	PAS ^a	Elektronentransport ^b
<i>Borrelia burgdorferi</i>	0	5
<i>Mycoplasma genitalum</i>	0	7
<i>Methanococcus jannaschii</i>	0	30
<i>Haemophilis influenzae</i>	0	40
<i>Heliobacter pylori</i>	0	47
<i>Escherichia coli</i>	6 (8)	64
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	9 (15)	68
<i>Bacillus subtilis</i>	6 (8)	69
<i>Aquiflex aeolicus</i>	6 (7)	76
<i>Synechocystis sp. PCC 6803</i>	17 (47)	108
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	17 (32)	120

^aAnzahl der Protein-Sequenzen mit postulierten PAS-Domänen

^bAnzahl der am Elektronentransport beteiligten Proteine

Tab. 1.3: Die Anzahl PAS-Domänen enthaltenen Proteine (in Klammern: Gesamtanzahl von PAS-Domänen) in einem Organismus ist mit der Komplexität und mit der Anzahl der am Elektronentransport beteiligten Proteine in dieser Spezies korreliert (Taylor & Zhulin 1999).

1.3.2 Beispiele für Hybrid-Sensor-Kinasen

Hybrid-Sensor-Kinasen sind aufgrund ihrer Komplexität in der Lage mehrere Signale zu verarbeiten. Von den fünf in *E. coli* bekannten Hybrid-Sensor-Kinasen (MIZUNO 1997) werden im Folgenden das ArcB- und das BarA-System sowie Aer vorgestellt. ArcB und Aer sind relativ gut charakterisiert, während die Funktion von BarA erst kürzlich teilweise geklärt werden konnte.

Die Histidin-Kinase ArcB

Das Arc (Anoxic redox control)-Zwei-Komponenten-System ist ein wichtiges Element in der komplexen Regulation auf Transkriptionsebene, wodurch fakultativ anaerobe Bakterien, wie z. B. *E. coli*, verschiedene respiratorische Wachstumsbedingungen wahrnehmen und ihre Gen-Expression an die Umweltverhältnisse anpassen können. Es ist aus der ArcB:Sensor-Kinase (einer Tripartit-Hybrid-Kinase) und dem ArcA:Response-Regulator im Cytosol aufgebaut. Dieses Zwei-Komponenten-System reguliert die Expression von zahlreichen Genen in Abhängigkeit von Veränderungen der Redox-Bedingungen der Cytoplasmamembran und in Abhängigkeit vom Metaboliten-Zustand der Zelle. ArcB hat im Vergleich zu typischen Tripartit-Sensor-Kinasen nur eine sehr kurze periplasmatische Aminosäure-Sequenz (eine Sequenz aus 16 Aminosäuren) zwischen seinen beiden Transmembranbereichen, die am N-terminalen Ende des Proteins lokalisiert sind. Diese beiden Transmembranbereiche sind nicht direkt an der Signalwahrnehmung beteiligt, sondern

sorgen für eine Verankerung der Kinase in der Membran in der Nähe zur Signalquelle. Der ins Cytoplasma reichende Bereich von ArcB ist ebenfalls ungewöhnlich. So besitzt ArcB drei katalytische Domänen, nämlich einen N-terminalen primären Transmitter mit einem konservierten Histidin-Rest (an Position 292), einen zentralen Receiver mit einem konservierten Aspartat (an Position 576), sowie eine C-terminale Phosphotransfer-Domäne mit ebenfalls einem konservierten Histidin-Rest (an Position 717). Außerdem befinden sich im Bereich zwischen katalytischem Zentrum und Transmembrandomänen ein möglicher Leucin-„Zipper“ sowie eine PAS-Domäne. ArcA ist dagegen ein klassischer Response-Regulator mit einer N-terminalen Receiver-Domäne, die einen konservierten Aspartat-Rest (an Position 54) trägt, und einer Helix-turn-helix-Domäne am C-terminalen Ende für Interaktionen mit der DNA. In Abb. 1.11 ist das Zwei-Komponenten-System ArcB-ArcA dargestellt.

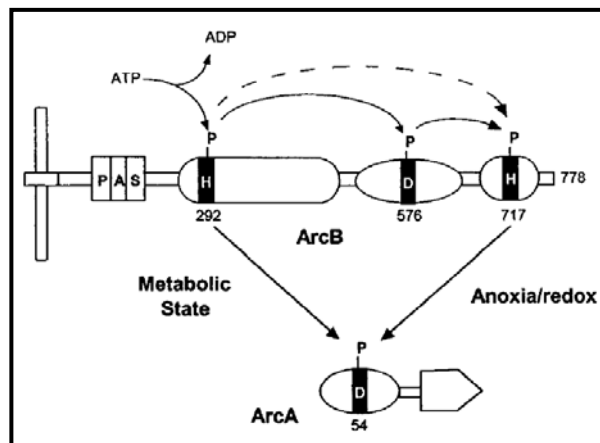


Abb. 1.11: Schematische Darstellung des ArcB-ArcA-Phosphorelay Systems. Transmembran-Domänen sind schwarz dargestellt. Von links ausgehend sind die Komponenten von ArcB gezeigt: PAS-Domäne, Transmitter-Domäne, Receiver-Domäne und HPT-Domäne (nach MATSUSHIKA & MIZUNO 1998, verändert durch TAYLOR & ZHULIN 1999). Die Kinase wird über den Redox-Zustand der respiratorischen Elektronentransport-Kette und den Metaboliten-Status der Zelle reguliert.

Unter reduzierenden Bedingungen findet am ArcB eine ATP-abhängige Autophosphorylierung statt, einem Vorgang, der durch bestimmte Metabolite des anaeroben Stoffwechsels, wie z. B. D-Laktat, Acetat oder Pyruvat, verstärkt werden kann. Es folgt dann eine Übertragung des Phosphatrestes auf ArcA, über einen sogenannten Phosphorelay-Vorgang: His292 → Asp576 → His717 → Asp54, was eine Erhöhung der Affinität von ArcA für seine Ziel-DNA bewirkt. Im phosphorylierten Zustand unterdrückt ArcA-P einerseits die Expression vieler Gene, die in dem respiratorischen Metabolismus involviert sind, z. B.

Enzyme des Elektronentransports, des Tricarbonsäure-Zyklus und des Glyoxylat-Shunts. Andererseits bewirkt ArcA-P durch Binden an spezifische DNA-Sequenzen die Aktivierung von Genen, die für Proteine des fermentativen Metabolismus kodieren, z. B. Hydrogenase I. Unter aeroben Bedingungen wird ArcB durch oxidiertes Chinon, das als direktes negatives Signal wirkt, inhibiert. ArcB übernimmt dann die Funktion einer Phosphatase und bewirkt eine Dephosphorylierung von ArcA-P über einen umgekehrten Phosphorelay $\text{Asp54} \rightarrow \text{His717} \rightarrow \text{Asp576} \rightarrow \text{Pi}$. Der molekulare Ablauf der Inhibierung von ArcB ist mittlerweile durch MALPICA *et al.* (2004) sehr gut aufgeklärt. Hierbei spielt die Oxidation von zwei im Cytosol lokalisierten redox-aktiven Cystein-Resten der Kinase eine Rolle. Durch Chinon findet eine Oxidation der Cystein-Reste unter Ausbildung einer Disulfid-Bindung statt. Die Regulation der ArcB-Kinase erfolgt somit über eine Redox-Regulation in Abhängigkeit des Redox-Zustandes des Chinon-Pool der respiratorischen Elektronentransport-Kette und in Abhängigkeit vom Metaboliten-Status des Cytosols (MALPICA *et al.* 2004).

Die Histidin-Kinase BarA

Ein weiteres Beispiel für eine sehr komplexe Tripartit-Hybrid-Sensor-Kinase ist BarA aus *E. coli*. BarA gehört zur ArcB-Unterfamilie der Sensor-Kinasen, die drei katalytische Domänen aufweisen. Der Partner dieser Membran-assoziierten Kinase ist der Response-Regulator UvrY. Das phosphorylierte BarA überträgt Phosphat-Gruppen auf UvrY. Es sind keine weiteren Proteine bekannt, die an dieser Übertragung beteiligt wären, so dass davon ausgegangen wird, dass die Übertragung direkt stattfindet.

Das Zwei-Komponenten-System BarA-UvrY reguliert das Csr-System (Carbon storage regulation). PERNSTIG *et al.* (2003) stellte die These auf, dass das BarA-UvrY-Zwei-Komponenten-System den Kohlenstoff-Metabolismus über das CsrA/CsrB-System reguliert (siehe Abb. 1.12). Die Regulation erfolgt durch eine positive Kontrolle der untranslatierten RNA von CsrB. Es ist bekannt, dass große Mengen von CsrB-RNA das CsrA-Protein, ein RNA-Bindeprotein, binden. CsrA reguliert den Kohlenstoff-Fluß in der Zelle, indem es die Expression von Genen, die an der Glykolyse beteiligt sind, aktiviert und andererseits die Expression von Genen der Gluconeogenese hemmt.

PERNSTIG *et al.* (2003) konnte mit *E. coli* in Langzeit-Kompetitionsversuchen zwischen WT und Mutanten, in denen BarA oder UvrY inaktiviert wurde, zeigen, dass je nach Art der angebotenen Kohlenstoff-Quelle sich ein Wachstumsvorteil für den Wildtyp oder für die Mutante ergab:

Bei Wachstum mit Kohlenstoff-Quellen, die in die Glykolyse eingehen, besitzt der Wildtyp einen Wachstumsvorteil. Die hier nötige Flexibilität, um die während einer Langzeitanzucht sich ansammelnden verschiedenen Zwischenprodukte umsetzen zu können, ist in den Mutanten nicht mehr gegeben, wodurch sie langsamer wachsen als der Wildtyp.

Bei Zugabe von Kohlenstoff-Quellen, die in der Gluconeogenese genutzt werden, hatten die BarA- und UvrY-freien Mutanten gegenüber dem Wildtyp einen Vorteil und wuchsen besser. Dies wurde damit erklärt, dass diese Mutanten nicht mehr in der Lage waren, zwischen verschiedenen metabolischen Stoffwechselvorgängen zu wechseln, die unter Langzeitanzucht keinen Vorteil erbringen würden, da die Energie unter diesen Bedingungen aus dem Krebs-Zyklus resultiert. Zudem ist bekannt, dass CsrA unter bestimmten Bedingungen die Aminosäure-Aufnahme beeinflusst (WEI *et al.* 2000). Eine weitere Möglichkeit für den Wachstumsvorteil der Mutante könnte darin liegen, dass die Enzyme der Glukoneogenese über das Csr-System herunterreguliert werden. Dies ist im Wildtyp nicht der Fall, wodurch es zum Ablauf von „unnötigen“ Vorgängen in der Zelle kommen könnte.

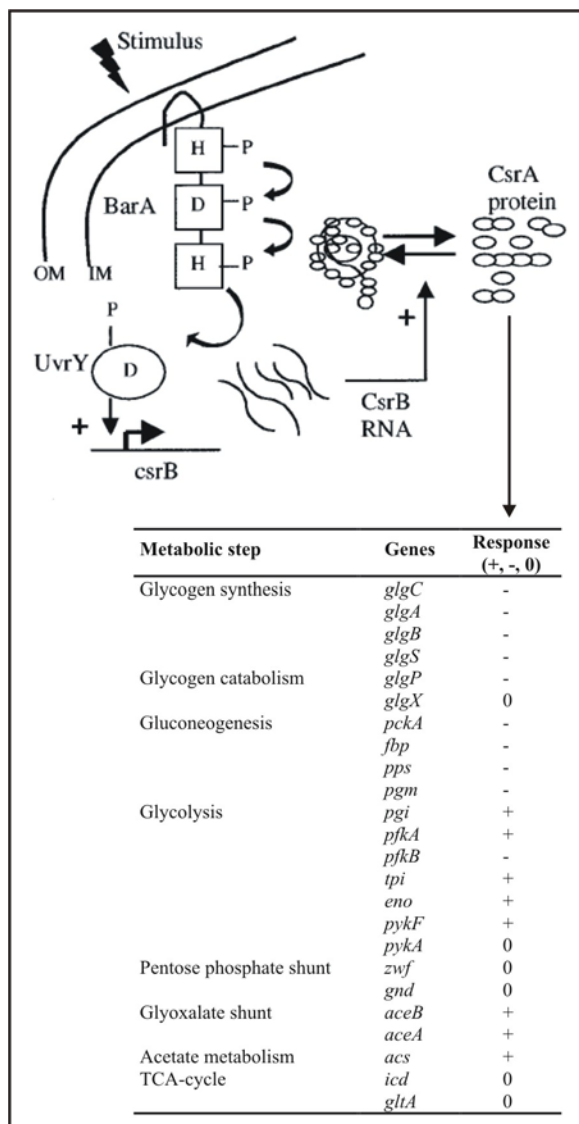


Abb 1.12: Schematische Darstellung der Regulation des Kohlenstoff-Metabolismus über das Zwei-Komponenten-System BarA-UvrY. Durch ein bislang unbekanntes Signal wird die Histidin-Sensor-Kinase BarA, die auf der Innenseite der Inneren Membran lokalisiert ist, stimuliert, was zu einer Phosphorylierung des entsprechenden UvrY-Response-Regulators führt. Der phosphorylierte UvrY-Response-Regulator wirkt sich positiv auf die Transkription des CsrB-Gens aus. Untranslatierte CsrB-RNA bindet freie CsrA-Proteine. Freies CsrA hat den dargestellten Effekt auf den Kohlenstoff-Metabolismus durch posttranskriptionale Regulation (ROMEO 1998). PERNESTIG *et al.* (2003) zeigte, dass dieses Zwei-Komponenten-System wichtig ist bei Anzucht mit Medien, in dem es von Vorteil ist, wenn die Bakterien schnell zwischen verschiedenen Kohlenstoff-Quellen wechseln müssen. Es konnte gezeigt werden, dass CsrA die dargestellten Gene aktiviert (+), hemmt (-) oder keinen Einfluss (0) auf sie hat. Abkürzungen: OM, outer membrane, IM, inner membrane (PERNESTIG *et al.* 2003).

Es ist noch nicht bekannt, welches das physiologische Signal ist, das von dem Sensor von BarA wahrgenommen wird. PERNESTIG *et al.* (2003) schlägt vor, dass es sich hierbei um Metabolite handelt, die den vorherrschenden Energiestatus der Zelle repräsentieren.

Die Histidin-Kinase Aer

Für Bakterien, wie z. B. *E. coli* oder *Salmonella typhimurium*, die nur unter aeroben Bedingungen effektiv wachsen können, ist die sogenannte Aerotaxis (Bewegung in Richtung Sauerstoff) eine wichtige Anpassung. Dies macht ein funktionelles Elektronentransportsystem mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor erforderlich (LASZLO & TAYLOR, 1981; TAYLOR, 1983). Veränderungen im Redox- oder Energie-Status der Elektronentransport-Kette werden von dem Signal-Transducer Aer wahrgenommen und in ein entsprechendes Signal übertragen (siehe Abb. 1.13). Dies führt letztendlich zu einer Veränderung der Rotation des Flagellar-Motors, wodurch sich die Zellen in Sauerstoffreichere Regionen bewegen. Aer ist eine Tripartit-Hybrid-Kinase, die nicht kovalent gebundenes FAD enthält. FAD ist über die PAS- und die Hamp-Domäne gebunden. Die Eigenschaften von Aer-assoziiertem FAD lassen darauf schließen, dass Aer möglicherweise Veränderungen in der Elektronentransportkette misst, und zwar zwischen Dehydrogenasen und Chinonen. Aer könnte auch indirekt Veränderungen im Protonendruck messen, da eine vom Protonendruck abhängige Umkehr des Elektronentransports FAD reduzieren könnte. In Aer konnte eine hochkonservierte PAS-Domäne, die in der Zelle lokalisiert ist, nachgewiesen werden, welche auch in verschiedenen anderen Sensor-Proteinen gefunden wurde (ZHULIN *et al.* 1997).

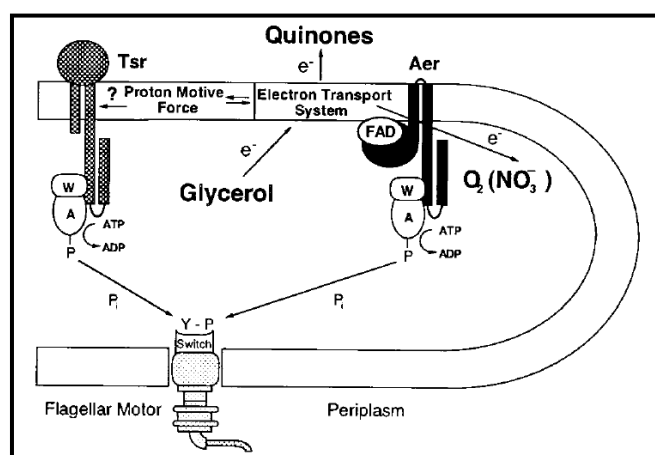


Abb. 1.13: Schematische Darstellung der Energie-Sensor-Eigenschaft von Aer. Aer nimmt Veränderungen im Elektronentransport-System wahr, was vermutlich über den Kofaktor FAD von Aer abläuft. Homologe Signal-Domänen in Aer binden an den CheA/CheW-Komplex und regulieren letztendlich die Phosphorylierung des CheY Response-Regulators. A, CheA Sensor-Kinase; W, CheW docking protein; Y, CheY response regulator; Z, CheZ phosphatase (REBBAPRAGADA 1997).

1.4 Ziele der Arbeit

In Cyanobakterien besteht eine komplexe Wechselbeziehung zwischen Photosynthese und Respiration sowie Kohlenstoff-Anabolismus und -Katabolismus. In Bezug auf die Koordination dieser Stoffwechselwege gibt es nach wie vor sehr viele offene Fragen. Aus heterotroph wachsenden Bakterien, wie *Escherichia coli*, ist bekannt, dass viele metabolische Stoffwechselwege über Zwei-Komponenten-Systeme, die in der Regel aus einer Histidin-Kinase und einem Response-Regulator bestehen, reguliert werden.

Das Genom des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 liegt vollständig sequenziert vor. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Cyanobakterium 42 Histidin-Kinasen besitzt (MIZUNO *et al.* 1996), und in der Gruppe von Prof. Murata (SUZUKI *et al.* 2000) lagen zu Beginn meiner Arbeiten auch bereits alle Histidin-Kinase-freien *Synechocystis*-Mutanten vor. Das Ziel meiner Arbeit war es, einen Beitrag zum Verständnis der komplexen Wechselbeziehung der oben definierten Stoffwechselvorgänge in dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 zu erarbeiten. Um dieses Ziel zu erlangen, sollte zunächst mit einem bioinformatischen Ansatz eine Histidin-Kinase, die eine mögliche Rolle in der Koordination einiger dieser Stoffwechselwege haben könnte, in dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 ausgewählt werden.

Nach der Auswahl einer solchen Histidin-Kinase sollte es dann das Ziel sein zu klären, welche Stoffwechselwege durch diese Kinase reguliert werden. Dies sollte durch vergleichende Analysen von *Synechocystis* sp. PCC 6803 Wildtyp und einer entsprechenden Histidin-Kinase-freien Mutante (die aus dem Labor von Prof. Murata zur Verfügung gestellt werden konnte) erfolgen.

Um dieses Ziel zu erlangen sollten zunächst Wachstumsbedingungen gefunden werden, unter denen das Wachstum der Histidin-Kinase-freien Mutante Unterschiede zum Wachstum des Wildtyps zeigt. Nach Kultivierung der Zellen unter den entsprechenden Wachstumsbedingungen sollten dann die Wildtyp- und Mutanten-Zellen mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden weiter charakterisiert werden, um den Phänotyp der Mutante genau definieren zu können.

Das übergeordnete Ziel meiner Arbeiten war es somit zu klären, welche Funktion die von mir ausgewählte Histidin-Kinase in der Regulation des Kohlenhydrat-Stoffwechsels in dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 besitzt.

2. Material und Methoden

Sofern dies nicht anders vermerkt ist, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen, Aldrich, Fluka, Bio-Rad, Roche, Sigma und VWR bezogen.

2.1 Verwendete Stämme von *Synechocystis* PCC 6803

Die Untersuchungen wurden mit dem Cyanobakterium *Synechocystis* PCC 6803 und der aus diesem Wildtyp generierten *Slr1759*-freien Mutante (Hik14) durchgeführt. Der Wildtyp und die Mutante Hik14 stammen aus dem Labor von Prof. Dr. Norio Murata und Prof. Dr. Iwane Suzuki (Division of Cellular Regulation, National Institute for Basic Biology, Myodaiji, Okazaki 444-8585 Japan) und wurde uns freundlicherweise für unsere Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Wildtyp und Hik14 wurde uns über Prof. Dr. Hagemann aus der Universität Rostock zugeschickt. Die Mutante enthält in dem Gen *slr1759* eine Resistenz-Kassette (Spektinomycin) und ist vollständig segregiert (SUZUKI *et al.* 2000). In dem Experiment, in dem die Kulturen auf Photoinhibition getestet wurden, wurde die PsbO-freie *Synechocystis* PCC 6803 Mutante, hergestellt von Alexandra Lott, und der entsprechende Wildtyp (Institut Pasteur, Collection National de Cultures de Microorganismes, Paris Cedex, Frankreich) als Kontrolle verwendet (LOTT 1993; ENGELS *et al.* 1994).

2.2 Anzucht von *Synechocystis* PCC 6803



Abb. 2.1: Kultivierung der *Synechocystis* PCC 6803 Kulturen bei einer Lichtintensität von $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Die Anzucht der Kulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen in Gaswaschflaschen (250 ml). Die Zellen wurden, falls nicht anders vermerkt, mit Pressluft, die mit 2 % CO₂ angereichert wurde, begast. Um das Gasmisch zu reinigen, wurde es nacheinander durch 2 N H₂SO₄, steriles bidest. H₂O und einen sterilen Filter (Midisart 2000, Satorius, Ø 0,2 µm) geleitet. Die Gaswaschflaschen wurden in den Algenbecken in 30°C warmem Wasser temperiert und mit Lampen von Philips (Cool Spot, 12°, 150 W) bei einer Lichtintensität von 200 µE m⁻² s⁻¹ oder von 60 µE m⁻² s⁻¹ beleuchtet. Die Lichtintensität wurde auf der Wasseroberfläche mit einem LI-250 Light Meter mit einem LI-190SZ Quantum Sensor (Li-COR, Lincoln, Nebraska, USA) in einem Wellenlängenbereich von 400 nm bis 700 nm gemessen. In Abb. 2.1 ist der Aufbau eines Anzuchtbeckens gezeigt. Die Zellen wurden in BG11-Medium nach RIPPKA *et al.* (1979) mit leichten Veränderungen angezogen (siehe STEPHAN *et al.* 2000).

Substanz	MG [g mol ⁻¹]	Stammlsg. [g l ⁻¹]	ml Stammlsg. l Nährmedium ⁻¹	Endkonz. im Nährmedium
NaNO ₃	84,99	150,0	10	17,650 mM
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	228,23	41,0	1	0,180 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	246,48	74,0	1	0,300 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	147,02	36,7	1	0,250 mM
Na ₂ -EDTA*	372,24	1,1	1	0,003 mM
Na ₂ CO ₃	105,99	20,1	1	0,190 mM
Zitronensäure x H ₂ O	210,14	6,2	1	0,029 mM
Eisen-III-Citrat* x 5 H ₂ O	335,03	1,0	10	0,030 mM
Mikroelemente- Stammlsg.	-	-	1	-
H ₃ BO ₃	61,83	2,8400		46,00 µM
CoSO ₄ x 7 H ₂ O*	281,10	0,0477		0,17 µM
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	249,68	0,0799		0,32 µM
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	197,91	1,8200		9,20 µM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	241,95	0,3871		1,60 µM
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	287,54	0,2214		0,77 µM

Tab. 2.1: Zusammensetzung des BG11-Mediums (modifiziert nach RIPPKA *et al.* 1979).

Nach dem Autoklavieren des BG11-Mediums betrug dessen pH-Wert 7,5.

Eisen-III-Citrat und Citronensäure wurden nach dem Autoklavieren bei 4°C gelagert, alle übrigen Stammkulturen bei Raumtemperatur.

*Modifikationen: EDTA wird nach RIPPKA *et al.* (1979) als Dinatrium-Magnesium-Salz (0,001 g/l Medium), Eisen-III-Citrat als Ammoniumsalz (0,006 g/l Medium) und Kobalt als Co(NO₃)₂ x 6 H₂O (0,0494 g/l Mikroelemente Stammlösung) eingesetzt. Unsere Modifikationen (*) beziehen sich auf diese drei Substanzen.

Autoklaviertes BG11-Medium hatte einen pH-Wert von 7,5. Durch die Begasung mit Luft / 2 % CO₂ sank der pH-Wert des BG11-Mediums ohne Zellen von 7,1 auf bis zu pH 6,3. Das Medium wurde sowohl ohne als auch mit zusätzlichem 50 mM Epps-NaOH oder Mops-NaOH pH 7,5 verwendet. Bei zusätzlicher Pufferung blieb der pH-Wert des Mediums in einem Bereich von 7,1 bis 7,4. Für die Anzucht der Mutanten wurde dem Medium Spektinomycin (20 µg ml Medium⁻¹) für die Slr1759-freie Mutante und Kanamycinsulfat (7,5 µg ml Medium⁻¹) für die PsbO-freie Mutante zugesetzt. Die Kultivierung des *Synechocystis* PCC 6803 Wildtyps erfolgte entsprechend ohne Zugabe eines Antibiotikums.

Die Stammkulturen wurden bei einer Belichtung mit 200 µE m⁻² s⁻¹ in einem dreitägigen Rhythmus überimpft, indem am Ende einer solchen Periode soviel von der Stammkultur in frisches BG11-Medium überführt wurde, wie einer Zelldichte von OD_{750nm} von 0,4 (= 0,4 µl Zellen ml Medium⁻¹) entspricht. Die Zelldichte wurde in einem Spektralphotometer (UV-1202, Shimadzu) bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen. Bei einer Lichtintensität von 60 µE m⁻² s⁻¹ wurden die Stammkulturen in einem zweitägigen Rhythmus mit einer Zelldichte von OD_{750nm} von 0,4 überimpft. Die Anzuchtdauer und die Animpfdichte für die Experimente sind für den jeweiligen Versuch unter dem Kapitel Ergebnisse aufgeführt. Zum Animpfen der Zellen für die Experimente wurden die Kulturen unter sterilen Bedingungen für 15 min bei 2200 x g abzentrifugiert und anschließend in frischem BG11-Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann zum Animpfen der Versuchskulturen verwendet.

2.3 Anzucht mit verschiedenen Stickstoffquellen

Zur Anzucht auf anderen Stickstoffquellen als Nitrat wurde NaNO₃-freies BG11-Medium verwendet, das vor dem Autoklavieren mit 50 mM Epps-NaOH pH 7,5 abgepuffert wurde. Als alternative Stickstoffquelle wurden 5 mM NH₄Cl ausgewählt. NH₄Cl wurde hierzu in Wasser gelöst, durch einen Minisart Einwegfilter (0,2 µm Porengröße) sterilfiltriert und beim Animpfen der Kulturen zum Nitrat-freien BG11-Medium gegeben.

2.4 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer Kultur oder Zellsuspension wurde durch Messung der optischen Dichte bei 750 nm (OD_{750nm}) in einem Perkin-Elmer λ3 Spektralphotometer bei RT gegen BG11 bestimmt (FLORES *et al.* 1982). Hierfür wurden Glasküvetten mit 1 cm Schichtdicke verwendet. Eine OD_{750nm} von 0,1 entspricht dabei ungefähr einer Zelldichte von 0,1 µl gepacktem Zellvolumen (GZV) ml Zellkultur⁻¹. Diese Beziehung ist bis zu einer OD_{750nm} von 0,1 linear.

2.5 Zellernte der Kulturen für physiologische Messungen sowie für SDS-PAGE und Northern Blot-Hybridisierung

2.5.1 Zellernte der Kulturen für physiologische Messungen

Zur Zellernte wurden die Kulturen in einer Stockzentrifuge für 20 min bei 2200 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet je nach Experiment mit Puffer oder neuem Medium gewaschen und erneut für 20 min bei 2200 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in Puffer oder Medium aufgenommen und auf 100 µl GZV ml Zellsuspension⁻¹ eingestellt. Hierzu wurde die Zelldichte im Photometer bei einer Wellenlänge von OD_{750nm} überprüft. Um genaue Messungen durchführen zu können, wurde jeweils eine 1:200-Verdünnung für die Messung im Photometer hergestellt.

2.5.2 Zellernte der Kulturen für SDS-PAGE und Northern Blot-Hybridisierung

Nach der Anzucht der Kulturen wurden jeweils 30 - 35 ml Aliquots in *Falcon-Tubes*, die vorher auf Eis gekühlt wurden, überführt. Zu den Aliquots wurde Eis gegeben, bis die *Falcon-Tubes* randvoll waren, um die Proben zu kühlen. Dann erfolgte eine Zentrifugation für 3 min bei 3000 x g. Der Überstand wurde zügig dekantiert, sodass möglichst kein Flüssigkeitsrest über dem Pellet zurück blieb. Das Pellet wurde anschließend in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Entweder wurden die Proben direkt verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.6 Bestimmung des Chlorophyll-Gehalts

Die Bestimmung der Chlorophyll-Konzentration der Proben erfolgte nach GRIMME und BOARDMAN (1972) mittels einer Methanolextraktion.

Die Chlorophyll-Konzentration wurde sowohl mit Originalkulturen als auch mit auf 100 µl GZV ml⁻¹ eingestellten Zellsuspensionen gemessen.

2.6.1 Chlorophyll-Bestimmung mit Originalkultur

Zwischen 1 bis 5 ml der Originalkultur wurden 5 min bei 2900 x g (Labofuge Ae, Heraeus Sepatech) abzentrifugiert und das Pellet in 2,5 ml Methanol (100 %, p.a.) resuspendiert. Nach 10 min Inkubation erfolgte eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 2900 x g. Der Überstand wurde im Perkin-Elmer λ3 Spektralphotometer bei den Wellenlängen 665 nm und 650 nm gemessen. Berechnung der Chlorophyll-Konzentration siehe unten.

2.6.2 Chlorophyll-Bestimmung mit eingestellten Zellsuspensionen

Jeweils 25 µl Zellsuspension (eingestellt auf 100 µl GZV ml⁻¹) wurden mit 2,5 ml Methanol (100 %, p.a.) gemischt, 10 min inkubiert und anschließend für 5 min bei 2900 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann im Perkin-Elmer λ3 Spektralphotometer bei den Wellenlängen 665 nm und 650 nm gemessen.

Der Chlorophyll-Wert errechnet sich dann mittels folgender Formel:

$$\text{Chlorophyll a (mg/mL)} = \frac{(\text{Abs.}_{665\text{nm}} \times 16,5 - \text{Abs.}_{650\text{nm}} \times 8,3) \times V_{\text{Gesamt}}}{(V_{\text{Probe}} \times 1000)}$$

Abs. = Absorption

V_{Gesamt} = Gesamtvolumen des Ansatzes in ml

V_{Probe} = Volumen der Probe in ml

2.7 Messung des Protein-Gehalts

Die Bestimmung des Protein-Gehalts erfolgte nach BRADFORD (1976). 0,1 ml Probe (bzw. 10 µl Probe + 90 µl bidest H₂O) wurden mit 5 ml Bradford-Reagenz gemischt, 5 min im Dunkeln inkubiert und anschließend in einer Glasküvette im Perkin-Elmer λ3 Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen Wasser gemessen. Die optische Dichte wurde dann mit einer parallel gemessenen Eichgerade (10 – 120 µg RSA) in Beziehung gesetzt, um die Protein-Mengen zu ermitteln.

Bradford-Reagenz

100 mg	Coomassie Brilliant Blue
(oder 70 mg	Serva Blue)
50 ml	95 % Ethanol (p.a.)
100 ml	85 % Phosphorsäure

Mit H₂O auf 1 l Gesamtvolumen auffüllen.

Das Bradford-Reagenz ist licht- und temperaturempfindlich und sollte daher in einer dunklen Flasche bei 4°C gelagert werden.

2.8 Messung der photosynthetischen und respiratorischen Aktivität

Zur Messung der photosynthetischen Aktivität (als Sauerstoff-Entwicklung im Licht) oder der respiratorischen Aktivität (als Sauerstoff-Verbrauch im Dunkeln) wurde eine Clark-Sauerstoffelektrode[®] (Gylson Oxygraph) verwendet. Diese Elektrode besteht aus einem Messraum, welcher eine Platin-Kathode und eine Silber-Anode enthält, sowie einen Reaktionsraum, der durch einen Stopfen verschließbar ist. Durch eine KCl-Lösung wird eine leitende Verbindung zwischen den beiden Elektroden hergestellt.

Der Messraum wird durch eine Sauerstoff-durchlässige Teflon-Membran von dem Reaktionsraum getrennt. Der Reaktionsraum wurde mit einer Halogenlampe (24 V, 250W, Spindler und Hoyer, Göttingen) belichtet. Das Licht wurde durch eine Küvette mit 2 % (w/v) CuSO₄-Lösung sowie durch einen roten Plexiglasfilter (RG1-610, Schott, Mainz) gefiltert. Es wurde mit Lichtintensitäten von 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ belichtet. Bei Messung einer Photoinhibition wurde der Rotlichtfilter entfernt, sodass die Reaktionskammer mit einer Lichtintensität von 5000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ belichtet wurde. Die Messungen fanden bei einer Temperatur von 30°C in einem Reaktionsvolumen von 3,0 ml statt. Vor dem Start jeder Messung erfolgte eine Dunkeladaptation, die einige Minuten andauerte.

Es wurde von außen eine Polarisierungsspannung von 800 mV an die beiden Elektroden gelegt. An der Silber/Platin-Elektrode wird Sauerstoff zu Wasser reduziert, wodurch ein elektrischer Strom fließt. Die Stärke des Stromflusses ist der Menge an reduziertem Sauerstoff proportional. Die Veränderung des Stromflusses in Abhängigkeit von der Zeit wurde durch einen Rekorder (Servogor 310, Eingangsempfindlichkeit 1 mV) dokumentiert.

Die Eichung der Elektrode erfolgte jeweils nach Beendigung eines Messtages. Hierzu wurde der gesamte in 3,0 ml Wasser enthaltene Sauerstoff durch hinzufügen einer Spatelspitze Natriumdithionit chemisch reduziert. Der dabei registrierte Schreiberausschlag entsprach der bei 30°C in 3,0 ml sauerstoffgesättigtem Wasser gelösten Menge von 0,711 $\mu\text{mol O}_2$.

Für die Messungen in der Sauerstoffelektrode wurden intakte Zellen verwendet, die nach der Zellernte auf 100 $\mu\text{l GZV ml}^{-1}$ Zellsuspension eingestellt worden waren.

2.8.1 Messung der photosynthetischen Aktivität

Die photosynthetische Aktivität wurde mit intakten Zellen bei 30°C mit Natriumhydrogencarbonat als Elektronenakzeptor gemessen. Bei dieser Reaktion wird die gesamte photosynthetische Elektronentransportkette gemessen, d.h. von der Oxidation des Wassers an PS II bis hin zur CO₂-Fixierung ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NaHCO}_3$). Die Messung führt zur ATP-Synthese (HIPKINS & BAKER, 1986). Gemessen wurde die Sauerstoff-Entwicklung im Reaktionsansatz.

Zur Herstellung der Zellsuspension wurden die Zellen in BG11-Medium (entsprechend der Anzucht) aufgenommen.

Reaktionsansatz

15 mM NaHCO_3
5 – 15 μg Chlorophyll Zellsuspension (intakte Zellen)
Mit BG11-Medium auf 3 ml Gesamtvolumen auffüllen.

Zur Messung wurde BG11-Medium verwendet, welches dem bei der Anzucht verwendeten entsprach.

2.8.2 Messung der respiratorischen Aktivität in der Cytoplasmamembran

Die Messung der respiratorischen Aktivität erfolgte mit intakten Zellen. Zur Herstellung der Zellsuspension wurden die Zellen in 10 mM HEPES pH 7,0 aufgenommen und im Dunkeln verwahrt.

Die Respirationmessung erfolgte im Dunklen bei 30°C. Der Reaktionsansatz wurde folgendermaßen pipettiert: Zunächst wurden alle Substanzen bis auf EDTA in den Reaktionsansatz gegeben, der Reaktionsraum verschlossen und abgedunkelt. Nach einer Dunkeladaptation von einigen Minuten wurde EDTA hinzugefügt und der Ansatz sofort wieder verschlossen und abgedunkelt. Dieser Vorgang sollte möglichst schnell erfolgen, damit die Zellen nicht zu lange dem Licht ausgesetzt sind, da sonst die zu messende Respiration von der Photosynthese überlagert wird. Um sicherzustellen, dass es sich bei der gemessenen Reaktion tatsächlich um Respiration handelt, kann dem Reaktionsansatz am Anfang noch KCN hinzugefügt werden. Zusätzlich kann die Reaktion durch Zugabe von CaCl_2 gehemmt werden.

Reaktionsansatz

33 mM HEPES-NaOH (pH 7,0)
1 mM EDTA (pH 8,0)
10-20 μl intakte Zellen (\approx 2,5-10 μl GZV)

Mit bidest. H_2O auf 3,0 ml auffüllen.

zusätzliche Respirationmessungen mit den Hemmstoffen

0,4 mM KCN oder
5 mM CaCl_2

2.9 Messung der 77 K-Pigment-Fluoreszenz

Die Messungen der Tieftemperatur-Chlorophyll-Fluoreszenz wurden in einem Perkin-Elmer LS 50-B Lumineszenz-Spektrometer[®] durchgeführt. Durch Bestrahlung einer Chlorophyll a-haltigen Probe mit Blau- oder Rotlicht wird eine messbare rote Fluoreszenz emittiert.

Das Emissionsspektrum ist gegenüber dem Absorptionsspektrum um 5 nm bis 17 nm in Richtung längerer Wellenlänge verschoben.

Durch die Messung der variablen Chlorophyll-Fluoreszenz können photosynthetische Teilschritte oder Beeinträchtigungen der Elektronentransport-Kette aufgedeckt werden. Die Messung bei RT eignet sich nur zur Untersuchung der Fluoreszenz von PS II, da PS I unter diesen Bedingungen nur eine geringe Fluoreszenz zeigt. Eine Messung bei 77 K macht auch die PS I-Fluoreszenz signifikant detektierbar.

Nach Anzucht unter bestimmten Bedingungen wurde von jeder Kultur zunächst der Chlorophyllgehalt bestimmt. Anschließend wurden aus jeder Kultur ein Aliquot entnommen, auf einen Chlorophyllgehalt von 1 µg Chlorophyll ml⁻¹ eingestellt (in BG11-Medium, welches dem Anzuchtmedium entsprach) und dann in Messküvetten mit flüssigem Stickstoff sofort eingefroren. Der Messraum des 77 K-Spektrometers wurde vor den entsprechenden Messungen zunächst mit Stickstoff begast, um einen Feuchtigkeitsniederschlag in dem Gerät zu vermeiden und anschließend mit flüssigem Stickstoff befüllt, um so eine Temperatur von 77 K zu gewährleisten. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 435 nm und einer Spaltbreite (Blende) von 10 nm (*Excitation*) bzw. 5 nm (Emission) oder bei einer Wellenlänge von 600 nm und einer Spaltbreite (Blende) von 10 nm (*Excitation*) bzw. 5 nm (Emission).

Fluoreszenz bei	Anregung mit 435 nm
685 nm	Terminaler Emitter der Phycobilisomen (L _{CM}) und PS II-Antenne (CP43)
695 nm	P680 und CP47 von PS II
725 nm	PS I
Fluoreszenz bei	Anregung mit 600 nm
650-670 nm	Phycobilisomen Chromophore (Phycocyanin bei 650 nm; Allophycocyanin bei 665 nm)
685-695 nm	Phycobilisomen, mit Übertragung eines Teils der Energie auf CP43 (685 nm) und CP47 (695 nm)
725-735 nm	Phycobilisomen, mit Übertragung eines Teils der Energie auf PS I

Tabelle 2.2: Zuordnung der bei 77 K gemessenen Fluoreszenzmaxima von Komponenten der photosynthetischen Elektronentransport-Kette.

Die Fluoreszenz wurde zwischen 630 nm und 770 nm bei einer Scan-Geschwindigkeit von 200 nm min⁻¹ gemessen (Spaltbreite des Filters 5 nm, *cut-off* Filter 515 nm). Die Fluoreszenz-

Maxima können nach MULLINEAUX & ALLEN (1990), WITTMERSHAUS *et al.* (1992), MEUNIER *et al.* (1997) und VAN THOR *et al.* (1999) wie in Tab. 2.2 dargestellt, zugeordnet werden.

2.10 Messung der Nitratreduktase-Aktivität

Nach Anzucht unter definierten Bedingungen wurden die Zellen in einer Stockzentrifuge für 20 min bei 2200 x g abzentrifugiert und mit 10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8 auf 100 μl Zellen ml^{-1} eingestellt. Zu je 1 ml Zellsuspension (verdünnt auf 10 μl Zellen ml^{-1}) wurden 20 μl Toluol gegeben. Das Gemisch wurde anschließend für 90 Sekunden gevortext. Je ein Aliquot von 0,1 ml und 0,05 ml dieses Gemisches (0,05 ml mit 10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8 auf 0,1 ml auffüllen) wurden dann zu 0,8 ml Reaktionsmischung gegeben. Das darin enthaltene Methylviologen dient als Reduktant für die Nitratreduktase.

Reaktionsmischung

0,125 M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Puffer, pH 10,5

0,025 M KNO_3

0,005 M Methylviologen

Mit bidest. Wasser auf 25 ml

Anschließend wurde der Ansatz vorsichtig gemischt. Dann wurden 0,1 ml frisch hergestellte Dithionit-Lösung (20 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ pro ml 0,3 M NaHCO_3) hinzugegeben. Es wurde erneut vorsichtig gemischt (Zufuhr von Sauerstoff vermeiden, da sich sonst das Methylviologen entfärbt) und 5 min bei 30°C inkubiert. Durch Vortexen wurde die Reaktion gestoppt, bis sich das blaue (also reduzierte) Methylviologen entfärbt hatte. Anschließend wurden 0,1 ml einer 25 %igen ZnSO_4 zu dem Ansatz gegeben und nach ca. 50 sec 0,1 ml 1 N NaOH hinzugefügt. Nachdem der Ansatz einige Minuten auf Eis gestellt wurde, erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 2900 x g (Labofuge Ae, Heraeus Sepatech), um die ausgefallenen Proteine zu entfernen. Die Nitritbestimmung erfolgte mit einem Aliquot des Überstandes (0,5 ml oder 1 ml Probe). Zu diesem wurden jeweils 0,5 ml Lösung S und Lösung N pipettiert und die Ansätze mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 2,5 ml aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 10 min wurde der Ansatz im Perkin-Elmer $\lambda 3$ Spektralphotometer gegen Wasser bei einer Wellenlänge von 546 nm gemessen. Die Berechnung der Nitritkonzentration erfolgte mittels einer Eichgerade (0,01 - 0,05 $\mu\text{mol NO}_2$), die parallel dazu gemessen wurde. Die errechneten Werte wurden in $\mu\text{mol NO}_2 \text{ min}^{-1} 100 \mu\text{l GZV}^{-1}$ angegeben.

Lösung S: 1 % Sulfanilamid (1g in 25 ml 25 %iger HCl und 75 ml Wasser
In dunkler Flasche aufbewahren.

Lösung N: 0,025 % N-(Naphthyl)-Ethylendiamin-HCl (25 mg in 100 ml Wasser)
In dunkler Flasche aufbewahren.

2.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.11.1 Vorbereitung der Proben

Die Proben (siehe Abschnitt 2.5.2) wurden in ca. 50 - 80 µl Zellaufbruchpuffer, zu dem anschließend 0,1 mM PMSF (in Ethanol frisch ansetzen) pipettiert wurde, aufgenommen, gevortext und in 1,5 ml Mikro-Schraubgefäßen mit Verschuß (Sarstedt) überführt. Zu dieser Zellsuspension wurde etwa eine Spatelspitze Glasperlen (0,10 – 0,11 mm) gegeben.

Zellaufbruchpuffer

50 mM Tris-HCl pH 7,4
5 mM EDTA pH 7,4
1 mM Benzamidin (in aqua dest.)

Mit bidest H₂O auf 10 ml auffüllen.

Der Zellaufbruch erfolgte in einem Ribolyser (Thermo Hybaid, Ribolyser Cell Disrupter) bei folgender Einstellung:

Speed 6,5
Time 2 - 5 x 5 sec (3 x 15 sec)
Run Start

Nach dem Zellaufbruch wurden die Glasperlen und die Zelltrümmer entfernt, indem für 1 min bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und nach einer Proteinbestimmung für den Gellauf verwendet.

2.11.2 SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proben mittels Gelelektrophorese erfolgte nach der Methode von LAEMMLI (1970). Das denaturierende Gel wurde mit einem Mini-Protean II Elektrophoresesystem (BioRad) gegossen. Die Dicke der Gele betrug 0,75 mm. Bei dem hier angewandten Verfahren wurden die Trenneigenschaften zweier kombinierter Gele (Trenngel und Sammelgel) mit einem diskontinuierlichen pH- und Konzentrations-Übergang genutzt. Die Proteine der Probe trennen sich in diesem System ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht, da sie durch die Anlagerung von SDS dieselbe Ladung aufweisen.

Zunächst wurde das Trenngel gegossen, mit Isobutanol überschichtet und 12 h zum Auspolymerisieren bei 4 °C gelagert. Vor dem Gießen des Sammelgels wurde das Trenngel mit Wasser gewaschen. Das Sammelgel konnte nun auf das Trenngel gegossen werden und der Kamm zur Bildung der Probenaschen wurde eingesetzt. Nachdem das Sammelgel mindestens 30 min auspolymerisierte, wurden die gegossenen Gele in die Elektrophoresekammer eingesetzt, die Kammer mit Elektrodenpuffer befüllt und der Kamm aus dem Sammelgel gezogen. Anschließend wurden die Taschen mit Hilfe einer Spritze gespült.

10%iges Trenngel:

5 ml	Gelpuffer (pH 9,4)
5 ml	40 % Acrylamid/1,6 % Bis-Acrylamid
5 ml	H ₂ O
5 ml	0,8 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Gelpuffer (pH 9,4)

1,5 M	Tris-HCl
0,23 % (w/v)	TEMED
0,4 % (w/v)	SDS

4%iges Sammelgel:

1,52 ml	30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid
1,52 ml	1M Tris (pH 6,8)
0,12 ml	10 % (w/v) SDS
3,00 ml	60 % (w/v) Sucrose
5,80 ml	H ₂ O
8 µl	TEMED
76 µl	10 % (w/v) Ammoniumperoxidsulfat

Elektrodenpuffer (pH 8,6)

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

Von verschiedenen Proben wurden 15 µg Protein auf das Gel aufgetragen. Um ein einheitliches Volumen zu erhalten, wurden die Proben mit Wasser aufgefüllt und im Verhältnis 1:2,5 mit dem Denaturierungspuffer gemischt. Anschließend erfolgte eine Denaturierung für 20 min bei 60 °C. Nach der Denaturierung wurden die Proben in die

Geltaschen gefüllt. Die Größenbestimmung der Proteinbanden erfolgte durch den Vergleich mit dem Proteinstandard peqGOLD Prestained Proteinmarker (Peqlab). Die Elektrophorese wurde im Sammelgel mit 20 mA durchgeführt, im Trenngel mit 40 mA (pro Gel).

Denaturierungspuffer

200 mM	Tris pH 6,8
5 mM	Na ₂ -EDTA
1 M	Sucrose
3 % (w/v)	SDS
10 mM	DTT
25 % (v/v)	Glycerin
0,01 % (w/v)	Bromphenolblau

2.11.3 Immuno-Blot (Western-Blot)

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine für den immunologischen Nachweis mittels eines Druckblottes auf eine Nitrocellulosemembran BA85 (Schleicher & Schüll) übertragen. Das ungefärbte SDS-Gel wurde vor dem Transfer 3 x 10 min mit Transferpuffer gewaschen. Für den Blot wurden 6 Filterpapiere (Whatman) und 2 Nitrocellulosemembranen BA85 (Schleicher & Schüll) auf die Größe des Gels zugeschnitten und mit Transferpuffer getränkt. Zum Aufbau des Blots wurde eine Glasplatte als Unterlage verwendet. Auf die Glasplatte wurden 3 Filterpapiere luftblasenfrei aufgelegt, dann eine Nitrocellulosemembran und anschließend das Gel. Als Nächstes wurde auf das Gel wieder eine Nitrocellulosemembran gelegt, dann 3 Filterpapiere und zum Schluss wieder eine Glasplatte. Dieser Aufbau wurde in eine mit etwas Transferpuffer (1x) gefüllte Plastik-Tüte überführt und diese luftdicht verschlossen, um ein Austrocknen zu verhindern. Das Beschweren des Blots mit einem 1 kg Gewicht sorgte für einen gleichmäßigen Druck auf die Konstruktion. Der Transfer erfolgte über Nacht.

Transferpuffers (1x)

10 mM	Tris-HCl (pH 8,8)
2 mM	Na ₂ -EDTA
50 mM	NaCl
1 mM	DTT

2.11.4 Hybridisierung der Nitrocellulosemembranen mit verschiedenen Antikörpern

Alle folgenden Inkubationsschritte wurden bei RT auf einem Schüttler durchgeführt. Nach dem Waschen der Nitrocellulosemembranen für 3 x 10 min mit CMF-PBS-Puffer erfolgte die Absättigung für 1 h mit Absättigungslösung. Danach wurden die Membranen für 2 x für 10 min mit Waschlösung gewaschen.

Calcium- und Magnesium-freier Phosphat-Puffer (CMF-PBS)

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
8 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
1,5 mM	KH ₂ PO ₄

Absättigungslösung

5 % (w/v) Milhpulver in CMF-PBS

Waschlösung

0,5 % (w/v) Milhpulver in CMF-PBS

0,05 % (v/v) Tween 20

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper für 2 h. Die Antikörper wurden hergestellt, indem das entsprechende Protein gereinigt und dann einem Kaninchen subkutan injiziert wurde. Durch Blutabnahme konnte ein Antiserum gewonnen werden. Eine Aufstellung der verwendeten Antiseren zeigt Tab. 2.3.

Protein	aus dem Organismus	Verdünnung	Referenz
MSP (PsbO)	<i>Avena sativa</i>	1:1000	KUHLMANN 1988
D1 (PsbA)	<i>Avena sativa</i>	1:1000	GÄRTNER 1989
PS I (PsaA/B)	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	1:1000	KRUIP, Bochum
LpdA (Slr1096)	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	1:8000	ENGELS <i>et al.</i> 1997
CF ₁ (AtpA)	<i>Spinacea oleracea</i>	1:2000	MEYER 1985

Tab. 2.3: Verwendete Antiseren und ihre Verdünnung.

Antiserum-Verdünnungslösung

0,5 % (w/v) BSA in CMF-PBS

Um alle ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die Membranen 3 x 10 min mit Waschlösung gewaschen. Nun folgte die Inkubation mit dem zweiten Antiserum. Hierbei

wurde für die mit PS I inkubierten Blots ein Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, gekoppelt mit einer alkalinen Phosphatase (DAKO A/S, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Dieser Antikörper wurde in AP-Puffer angesetzt.

Alkaline Phosphatase-Puffer (AP-Puffer)

100 mM	Tris-Cl pH 9,5
100 mM	NaCl
50 mM	MgCl ₂

Für alle anderen Blots wurde als zweiter Antikörper ein Peroxidase gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (DAKO A/S, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:250 – 500 verwendet. Da dieser Antikörper lichtempfindlich ist, musste die 45-minütige Inkubation und alle danach folgenden Schritte im Dunkeln durchgeführt werden. Der Blot wurde erneut 3 x für 10 min mit Waschlösung gewaschen, um anschließend die Membranen 10 min in CMF-PBS und je nach Art des zweiten Antikörpers 10 min in AP-Puffer bzw. Tris-HCl-Puffer zu inkubieren. Die Membranen wurden anschließend im Dunkeln (ohne Schütteln) mit dem frisch angesetzten Entwickler inkubiert. Durch die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase bzw. alkaline Phosphatase wird eine Farbreaktion katalysiert, durch welche die Protein-Banden sichtbar werden. Nach Erscheinen der Banden wurde die Reaktion mit bidest. H₂O abgestoppt und die Membranen getrocknet. Die Dokumentation erfolgte durch einscannen der Membranen.

Tris-HCl-Puffer

50 mM	Tris-HCl, pH 7,35
-------	-------------------

Entwickler bei Verwendung eines alkaline Phosphatase-gekoppelten Antikörpers

45 µl	Nitroblau-Tetrazolium-Lösung (NBT, 75 mg ml ⁻¹ in 70 % (w/v) Dimethylformamid)
35 µl	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat p-Toluidin-Salz (X-Phosphat, 50 mg ml ⁻¹ in Dimethylformamid)
In 10 ml AP-Puffer	

Entwickler bei Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten Antikörpers

2,79 mM	4-Chloro-1-Naphtol in 4 ml Methanol lösen
41,6 mM	Tris-HCl-Puffer, pH 7,35
0,005 % (v/v)	H ₂ O ₂

2.12 DNA-Isolierung und Herstellung von Sonden

2.12.1 DNA-Isolierung

Für die DNA-Isolierung wurden 10 ml Flüssigkultur von *Synechocystis* PCC 6803 für 3 min bei 3000 x g abzentrifugiert und in 500 µl SE-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in einer Eppifuge 5 min bei 10000 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 340 µl Lyse-Puffer (2 mg ml⁻¹ frisch eingewogenes Lysozym) resuspendiert und anschließend für 60 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dann wurden 2 µl Proteinase K (10 mg ml⁻¹) und 8 µl 25 % (v/v) Sarkosyl hinzugefügt und für 30 min bei 55°C inkubiert. Anschließend wurden 55 µl 5 M NaCl und 45 µl 10 % (w/v) CTAB/NaCl hinzugegeben (NaCl-Konzentration über 0,7 M) und gevortext und anschließend für 10 min bei 65 °C inkubiert.

Dann folgte die Extraktion der DNA mit 500 µl 24:1 Chloroform/Iso-Amylalkohol. Hierbei wurde nach Vortexen 15 min bei RT bei 10000 x g zentrifugiert.

Die untere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 500 µl TE äquilibrierten Phenol extrahiert, indem erneut gevortext und für 15 min bei RT bei 10000 x g zentrifugiert wurde. Die nun obere wässrige Phase wurde ebenfalls in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und erneut mit 500 µl 24:1 Chloroform/Iso-Amylalkohol ausgeschüttelt. Anschließen wurde wieder gevortext und für 15 min bei RT bei 10000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde wieder in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert und 2 µl Rnase (1mg/ml RnaseA, DNase-frei, Roche) hinzugefügt. Anschließend wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die EDTA-Konzentration der wässrigen Phase wurde auf 5 mM angehoben. Durch Hinzufügen von 2 Volumenanteilen 100 % Ethanol wurde die DNA präzipitiert. Anschließend wurde wieder für 15 min bei 10000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde 2-mal mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol (-20 °C) ohne zu vortexen gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in der *Speedvac* getrocknet. Das DNA-Pellet wurde dann in 100 µl TE bei 60 °C resuspendiert.

SE-Puffer

128 mM NaCl
12,8 mM EDTA (pH 8)

Lyse-Puffer

50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
10 mM EDTA (pH 8,0)
25 % (w/v) Sucrose
2 mg/ml Lysozym frisch dazu geben

CTAB/NaCl-Puffer

10 % (w/v) CTAB in 0,7 M NaCl

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
1 mM EDTA (pH 7,5)

Proteinase K-Lösung

50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
1 mM CaCl₂
10 mg/ml Proteinase K

Sarkosyllösung

25 % (v/v) in bidest. H₂O.

2.12.2 Primerdesign und Sequenz der Primer

Die Primer wurden mit dem Programm „Primer“ hergestellt. In der nachfolgenden Tabelle sind die hergestellten Primer aufgeführt.

Gen (kodiert für)	Gennummer oder EMBL Accession-Nummer	Sequenz in 5'-3'-Richtung
<i>petH</i> (Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase)	<i>slr1643</i>	ATGTACAGTCCCGGTTACGTAG
		TTAGTAGGTTTCCACGTGCCAG
<i>ndhH</i> (NADH Dehydrogenase Untereinheit 7)	<i>slr0261</i>	TATGCACGGGGTGTACGTT
		GTCCACCGATCCCATGATAA
<i>ndhD1</i> (NADH Dehydrogenase Untereinheit 4)	<i>slr0331</i>	TGTGGCGGCTTTATTCATTC
		TGACTTCCAAGGGTGAAAGG
<i>ndhD2</i> (NADH Dehydrogenase Untereinheit 4)	<i>slr1291</i>	TCCGTTAATCCCGACAAAG
		GGAATGTGGGGAGCAGTTAAT
<i>ndhD3</i> (NADH Dehydrogenase Untereinheit 4)	<i>sll1733</i>	CCTGCCAGTTATCGGAGCTT
		CACCAGATGGAACAGCAGAG
<i>ndhD4</i> (NADH Dehydrogenase Untereinheit 4)	<i>sll0027</i>	CAATGATGACCACCGCCAAG
		TCCACACCTGGCTACCGGAT
<i>petC1</i> (Cytochrom <i>b6-f</i> Komplex Eisen-Schwefel-Untereinheit (Rieske Eisen-Schwefel-Protein))	<i>sll1316</i>	ACTGTCATTGGCTAGTCAGG
		GGTCCAGGTGCTGAGCACTA
<i>petC3</i> (Cytochrom <i>b6-f</i> Komplex alternative Eisen-Schwefel-Untereinheit (Rieske Eisen-Schwefel-Protein))	<i>sll1182</i>	CCAAGTCCACCGCATCGAA
		ACCAGAATGTTGTTGCCGCT
E3 der Pyruvat-Dehydrogenase <i>lpdA</i> (Dihydrolipoamid Dehydrogenase)	<i>slr1096</i>	TTGGTGATTATTGGCGCTGG
		TACGCTTCGTCCAACACTTC
E1 der Pyruvat-Dehydrogenase, α -Untereinheit	<i>slr1934</i>	CCTGAATTGAACACCGCAGA
		TGCTGGCTAATTCGTGTTCC
<i>rnpB</i> (RNase P Untereinheit B)	AF056387	GCGGCCTATGGCTCTAATCA
		TTGACAGCATGCCACTGGAC

Tab. 2.4: Verwendete Primer für die PCR

2.12.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Mittels PCR (*Polymerase Chain Reaktion*, MULLIS *et al.* 1986) wurden Sonden für den Northern-Blot hergestellt. In einer PCR wird durch die zyklische Wiederholung dreier Reaktionsschritte unter bestimmten Bedingungen die Menge des gewünschten DNA-Moleküls in jedem Zyklus verdoppelt, was zu einer Potenzierung der Menge des gewünschten DNA-Abschnitts führt. Hierbei wird zunächst der DNA-Doppelstrang aufgelöst (Denaturierung). Dann erfolgt die Anlagerung (*Annealing*) der Oligonukleotide (*Primer*) an die Ziel-DNA (*Template*), es bilden sich *Primer-Template*-Komplexe. Im dritten Schritt (*Extension*) findet die Synthese des komplementären Stranges durch eine DNA-Polymerase statt.

Die PCR erfolgte mittels *Taq*-DNA-Polymerase (Qiagen) in einem Thermocycler MJ Research PTC-200 (Biozym). Sie wurde mit spezifischen *Primern* unter Zugabe des DIG-markierten Nukleotids UTP durchgeführt, so dass gleichzeitig eine Amplifizierung und DIG-Markierung des Gens stattfand. In den Reaktionsansatz wurden hierzu neben dATP, dCTP und dGTP auch das markierte DIG-11-dUTP (Enzo) zu dem funktionell äquivalenten dTTP pipettiert. Nach erfolgter PCR wurden DIG-gelabelte Sonde neben nicht gelabelten Amplifikaten in der Agarose-Gelelektrophorese überprüft, um zu kontrollieren, ob der Einbau von DIG-11-dUTP erfolgreich verlaufen ist. In diesem Fall zeigt die Sonde ein anderes Laufverhalten als das nicht gelabelte PCR-Produkt, da DIG-11-dUTP bedingt durch das Digoxigenin schwerer als dTTP ist. Die Ansätze für die jeweilige PCR wurden nach den Tabellen 2.5 und 2.6 pipettiert.

Konzentration im Ansatz	Substanz
1 x	10x PCR Puffer (Qiagen)
200 μ M	dATP
200 μ M	dGTP
200 μ M	dCTP
180 μ M	dTTP
20 μ M	DIG-11-dUTP
0,4 μ M	<i>Forward Primer</i>
0,4 μ M	<i>Reverse Primer</i>
1 μ g	DNA
2 U	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (Qiagen)
variabel	bidest. H ₂ O

Tab. 2.5: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsgemisches zur Sondenherstellung.

Das Reaktionsgemisch wurde wie angegeben angesetzt und anschließend nach den Reaktionsprotokollen von Tabelle 2.6 eine PCR durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in einem Agarose-Gel aufgetragen.

Phase	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min
34 Zyklen		
Denaturierung	94 °C	30 s
<i>Annealing</i>	53 °C	45 s
<i>Extension</i>	72 °C	1,5 min
Finale Extension	72 °C	5 min
Schluss	4 °C	30 min

Tab. 2.6: Reaktionsprofil der PCR zur Sondenherstellung für die Northernblot-Analyse.

Sowohl die Annealing-Temperatur als auch die Dauer der Extension wurde in Abhängigkeit der verwendeten Primer variiert.

2.12.4 Agarose-Gelelektrophorese mit DNA

Zur Überprüfung der erhaltenen DNA-Fragmente aus der PCR wurde ein nicht-denaturierendes TAE-Agarosegel verwendet (SAMBROOK *et al.* 1989). Die doppelsträngigen DNA-Fragmente wurden so ihrer Größe nach aufgetrennt. Als Längenstandard wurde der DNA Molecular Weight Marker X (Roche) verwendet.

TAE-Puffer

40 mM	Tris-Essigsäure (pH 7,8)
10 mM	Natriumacetat
1 mM	Na ₂ -EDTA

BPB-Ladepuffer

50 % (v/v)	Glycerin in TAE-Puffer
0,1 % (w/v)	Bromphenolblau (BPB)

Agarose-Gel

1 % (w/v)	Agarose in TAE-Puffer
-----------	-----------------------

Die Agarose wurde in dem TAE-Puffer aufgekocht und anschließend in eine Gel-Kammer gegossen. Nach dem Abkühlen wurde der Kamm gezogen und das Gel mit TAE-Puffer, der als Laufpuffer diente, überschichtet. Die DNA Proben und der Marker wurden im Verhältnis 1:10 mit Ladepuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 100 V. Nach dem Anfärben in 1 mg/l Ethidiumbromidlösung konnten die entstandenen Produkte im UV-Licht detektiert werden.

2.13 RNA-Isolierung und Northern Blot-Hybridisierung

Die Vorschriften für die Arbeit mit RNA wurden, wenn nicht anders angegeben, aus SAMBROOK *et al.* (1989) entnommen und gegebenenfalls modifiziert. RNasen sind extrem hitzestabil und benötigen keine Kofaktoren, so dass bei RNase-freiem Arbeiten besondere Vorkehrungen getroffen werden müssen. Alle verwendeten Glasgeräte sollten deshalb ü.N. bei 180 °C sterilisiert werden. Geräte und Materialien, die solchen Temperaturen nicht standhalten, sollten dreimal autoklaviert werden. Alle hier verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-(Diethylphenylcarbonat-)H₂O angesetzt.

2.13.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Synechocystis* PCC 6803

Das verwendete Protokoll zur Isolierung von Gesamt-RNA vereint eine saure phenolische Extraktion der Gesamt-RNA (REDDY *et al.* 1990) und eine Kit-basierte Cartridge-Reinigung der Firma Qiagen (RNeasy Mini-Kit).

Das schockgefrorene Pellet der wie in Kapitel 2.5.2 beschriebenen gesammelten Proben wurde in 100 µl TE-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 350 µl RLT-Puffer wurde die Suspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Der RLT-Puffer enthält Guanidin-Isothiocyanat, das hochgradig denaturierend wirkt, alle RNasen inaktiviert und so die Isolierung intakter RNA gewährleistet. Die Zugabe von 300 µl warmem saurem Phenol und die Inkubation für 10 min bei 65 °C führte zur Lyse der Zellen. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis wurden 300 µl Chlorophorm zugegeben und für 5 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde dekantiert, mit 500 µl Chlorophorm ausgeschüttelt und nochmals für 5 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach diesem Schritt wurde das Qiagen-Protokoll, wie in der Anweisung des Herstellers beschrieben, durchgeführt. Nach Zugabe von Ethanol zu dem erhaltenen Überstand konnte die Gesamt-RNA an der Silicagel-Membran binden. Anschließend wurde die gebundene RNA gewaschen und mit Wasser eluiert. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

TE-Puffer

10 mM	Tris (pH 7,5)
1 mM	EDTA (pH 7,5)

Komplementierter RLT-Puffer

1 ml	RLT Puffer
10 µl	β-Mercaptoethanol

2.13.2 Quantitative RNA-Bestimmung

Die Konzentration der eluierten RNA wurde mittels eines Spektralphotometers (das neue Perkin-Elmer) im UV-Bereich gemessen. Hierzu wurden 2 µl der gereinigten RNA in 500 µl sterilem bidest. Wasser verdünnt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Der Reinheitsgrad der gewonnenen RNA ergibt sich aus dem Quotienten 260 nm/280 nm, wobei dieser bei Werten von 1,8 bis 2,0 für eine sehr reine RNA-Lösung steht, wohingegen Werte $\leq 1,3$ für eine verunreinigte RNA steht. Zur Berechnung der vorhandenen RNA-Konzentration gilt, dass 40 µg RNA/ml einer $A_{260\text{nm}}$ von 0,1 entsprechen.

2.13.3 Northern-Blot

Die für die Northern-Hybridisierung benötigte Auftrennung der Gesamt-RNA wurde in einem denaturierenden Agarosegel durchgeführt. Dadurch wurden die von der nativen RNA gebildeten Sekundärstrukturen aufgelöst, und es konnte eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht erfolgen.

2.13.3.1 Herstellung eines Formalin-Agarose-Gels

Die Agarose wurde mit H₂O und 10x MOPS-Puffer aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf 60 °C wurde 37%iges Formaldehyd zugegeben und das Gel gegossen. Mit 1x MOPS-Puffer als Laufpuffer erfolgte der Gellauf bei 80 mA für 4 h.

10x MOPS-Puffer

0,2 M	MOPS (pH 7,0)
0,05 M	Natriumacetat
0,01 M	EDTA

Formalin-Agarose-Gel

1,3 % (w/v)	Agarose
1 x	MOPS (pH 7,0)
6,2 % (v/v)	Formaldehyd

2.13.3.2 Denaturierung der Proben und Elektrophorese

Für jede Probe wurden 5-10 µg RNA im Verhältnis 1:4,5 mit einem Denaturierungspuffer versetzt und 10 min bei 68 °C im Wasserbad inkubiert. Nach kurzer Lagerung auf Eis konnten die Proben auf das Gel aufgetragen werden. Nachdem der Gellauf beendet war, wurde die RNA über Nacht auf eine Nylonmembran transferiert.

Denaturierungspuffer (27 µl Gesamtvolumen)

1 x	MOPS
46 % (v/v)	Formamid
5,4 % (v/v)	Formaldehyd
0,018 % (v/v)	Ethidiumbromid
1,5 µl	Stopplösung

Stopplösung

95 % (w/v)	Formamid
20 mM	Na ₂ -EDTA (pH 7,0)
0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
0,1 % (w/v)	Xylencyanol

2.13.3.3 Transfer der RNA auf eine Nylonmembran mittels Kapillarblot

Der Blotaufbau erfolgte in einer Elektrophoresekammer, wie sie zuvor für den Gellauf verwendet wurde. Ein Whatman 3MM-Filterpapier wurde auf die Breite des Gels und 25 cm Länge zugeschnitten und mit 20x SSC-Puffer getränkt. Es wurde so auf den Gelträger gelegt, dass die Enden in die Vorrattanks der Gelkammer hineinragten, die ebenfalls mit 20x SSC Puffer befüllt waren. Das Gel wurde *upside-down* auf das Filterpapier gelegt und die Geltaschen mit dem Skalpell entfernt. Für den weiteren Blotaufbau folgte eine Hybond N⁺-Membran und drei Whatman 3MM-Filterpapiere, die alle vorher in 20x SSC-Puffer getränkt und auf die Größe des Gels zugeschnitten worden waren. Den Abschluss bildete ein 10 cm hoher Stapel aus Papiertüchern und eine Glasplatte. Diese Konstruktion wurde über Nacht mit einem 1 kg-Gewicht beschwert.

20x SSC-Puffer

0,3 M	Na-Citrat (pH 7,0)
3 M	NaCl

2.13.3.4 Fixierung der RNA auf der Nylonmembran

Nach dem Transfer der RNA auf die Nylonmembran wurde der Blot abgebaut und die Membran 10 min bei 50 °C getrocknet. Anschließend wurde die Membran in Frischhaltefolie gewickelt und mit der dem Gel zugewandten Seite nach unten 5 min auf einem Transilluminator (UVP) fixiert.

2.13.3.5 DNA/RNA-Hybridisierung mit einer DIG-dUTP markierten Sonde

Die Hybridisierung mit einer DIG-dUTP markierten Sonde erfolgte, indem die Membran mit der dem Gel zugewandten Seite nach innen in ein Hybridisierungsröhrchen überführt und im Wärmeschrank gerollt wurde.

Zur Vorhybridisierung wurde die Membran 2 h mit CHURCH-Puffer bei 52 °C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte mit 1 bis 3 µg DNA-Sonde die zuvor 10 min bei 90 °C denaturiert worden war. Die in 7 ml CHURCH-Puffer aufgenommene Sonde wurde heiß auf die Membran aufgebracht und bei 52 °C über Nacht inkubiert.

Zur Wiederverwertung konnte die Sonde aufgefangen und eingefroren werden. Nachdem die Membran bei RT mit Waschpuffer 1 für 5 min von den Resten der Sonde befreit worden war, konnten zwei weitere Waschschrte für 20 min mit Waschpuffer 2, einmal bei 52 °C und einmal bei 68 °C, alle nicht fest gebundenen Sondenreste entfernen. Nach einem Waschschrte für 1 min mit Puffer 1 wurden 20 ml Puffer 2 für 30 min bei 52 °C aufgebracht, um alle nicht von Sonden besetzten Stellen abzusättigen. Reste der *Blocking*-Lösung wurden mit 50 ml Puffer 1 bei RT abgewaschen um dann die anti-Dig-Antikörperlösung für 30 min bei RT aufzubringen. Die Lösung wurde verworfen und die Membran zweimal für 15 min mit 50 ml Puffer 1 gewaschen. Das Waschen der Membran mit 10 ml Puffer 3 bei RT vor dem Färben, führte zu einem besseren Ergebnis beim Entwickeln des Blots. Zur immunologischen Detektion wurde die Membran vom Hybridisierungsröhrchen in eine Blotschale mit 10 ml Färbelösung überführt. Nach der Farbentwicklung und Erscheinen der einzelnen Banden wurde die Färbelösung entfernt und die Reaktion mit 10 ml Puffer 4 gestoppt.

Mit Hilfe des ebenfalls DIG-markierten Längenstandards (PeqLab) konnte die Größe des angefärbten Fragments bestimmt werden. Zur Dokumentation wurden die Membranen anschließend gescannt.

CHURCH-Puffer

7 % (w/v)	SDS
50 % (v/v)	Formamid (deionisiert)
5 x	SSC-Puffer (pH 7,0)
2 % (w/v)	Blocking Reagenz
50 mM	Natriumphosphatpuffer (pH 7,0)
0,1 % (w/v)	Laurylsarkosyl

Waschpuffer 1

2 x	SSC (pH 7,0)
0,1 % (w/v)	SDS

Waschpuffer 2

0,1 x	SSC-Puffer (pH 7,0)
0,1 % (w/v)	SDS

Puffer 1

100 mM	Tris-Cl (pH 7,5)
150 mM	NaCl

Puffer 2

1 % (w/v)	<i>Blocking-Reagenz</i> in Puffer 1
-----------	-------------------------------------

Puffer 3

100 mM	Tris-Cl (pH 9,5)
100 mM	NaCl
5 mM	MgCl ₂

Puffer 4

100 mM	Tris-Cl (pH 8,0)
1 mM	EDTA

Antikörperlösung

4 µl	Dig-Fab-Fragment in Puffer 1
------	------------------------------

Färbelösung

45 µl	NBT (Nitroblau-Tetrazolium; 50 mg/ml in 70 % DMF)
52,5 µl	BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat p-Toluidin-Salz X-Phosphat; 50 mg/ml in 100 % DMF)
10 ml	Puffer 3

2.14 Bestimmung der Metaboliten-Menge

Die Probenernte wurde hierfür nach der Methode von BARSCH *et al.* (2004) durchgeführt. Nach der Anzucht wurden die Kulturen sobald sie aus den Anzucht-Flaschen entfernt wurden, mittels eines Cellulose-Nitrat-Filters (0,1 µm, Sartorius) und unter Anlegen eines Vakuums abgenutscht, bis ein trockenes Zellpellet auf dem Filter sichtbar war. Dann wurden die Zellen mit einem in flüssigen Stickstoff gekühlten Spatel abgekratzt und in ein Schraubdeckel-Eppendorf-Gefäß überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Zellpellets erfolgte bei – 80 °C. Die weitere Bearbeitung der Proben und die Bestimmung der relativen Metaboliten-Menge wurde von Aiko Barsch in dem Labor von Prof. Dr. K. Niehaus durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Auswahl der Histidin-Kinase Slr1759 als ein wahrscheinlicher Sensor des Redox-Zustandes der Cytoplasma- oder Thylakoid-Membran in *Synechocystis* PCC 6803

Es ist gut in der Literatur dokumentiert, dass viele Regulationskaskaden in Prokaryoten unter Beteiligung eines Zwei-Komponenten-Systems, das aus einer Histidin-Kinase und einem Response-Regulator besteht, ablaufen (PARKINSON & KOFOID 1992; ALEX & SIMON 1994; CHANG & STEWART 1998; STOCK *et al.* 2000). Einige dieser Kinasen sind redox-reguliert und detektieren den Redox-Zustand der Cytoplasmamembran, wie z. B. die Kinasen Aer und ArcB aus *E. coli* (REBBAPRAGADA *et al.* 1997; MALPICA *et al.* 2004). Es ist weiter gezeigt worden, dass in *E. coli* Stoffwechselwege des Kohlenstoff-Metabolismus unter Beteiligung von Histidin-Kinasen (z. B. wie durch die Tripartit-Hybrid-Histidin-Kinase BarA) reguliert werden (PERNESTIG *et al.* 2003). In Cyanobakterien besteht eine extrem komplexe Wechselbeziehung zwischen Respiration und Photosynthese sowie Kohlenstoff-Anabolismus und -Katabolismus. Die Wahrscheinlichkeit ist daher sehr hoch, dass auch hier eine Redox-regulierte Histidin-Kinase an der Koordination dieser Prozesse beteiligt ist.

Mit Hilfe von bioinformatischen Methoden wurde eine Histidin-Kinase, die eine solche Rolle besitzen könnte, ausgewählt. Die Wahl fiel auf die Histidin-Kinase Slr1759 in *Synechocystis* PCC 6803, und zwar auf der Basis der nachfolgenden Kriterien: Das Genom von *Synechocystis* PCC 6803 ist vollständig sequenziert (KANEKO *et al.* 1996). Zudem konnte gezeigt werden, dass das Genom 26 mögliche Histidin-Kinasen und 16 mögliche Hybrid-Sensor-Kinasen, die sowohl eine Receiver als auch eine Transmitter-Domäne tragen, enthält (MIZUNO *et al.* 1996; WEST & STOCK 2001). Des Weiteren konnten 38 ORF's eine Funktion als Response-Regulator zugeordnet werden (MIZUNO *et al.* 1996).

Für die Wahrnehmung von Signalen, die letztendlich zur Redox-Regulation führen, enthalten viele Histidin-Kinasen sogenannte PAS-Domänen (Per Arnt Sim). Hierbei handelt es sich um Domänen für eine Protein-Protein-Interaktion, die häufig an der Detektion von Redox-Potential, Lichtintensität, Sauerstoff-Konzentration oder zellulären Energie-Status beteiligt sind (TAYLOR & ZHULIN 1999). Die Anzahl der im Genom enthaltenen PAS-Domänen korreliert nicht mit der Größe des Genoms, es besteht jedoch eine Korrelation zwischen der Anzahl der PAS-Domänen und der Anzahl der Proteine, die am Elektronentransport beteiligt sind (ZHULIN & TAYLOR 1998).

Meine Untersuchung ergab, dass unter den 42 Sensor-Histidin-Kinasen fünf Kinasen eine mögliche PAS-Domäne aufweisen (hierbei handelt es sich um die Kinasen Slr1759, Slr0221, Slr2098, Sll1124 sowie Slr0311). Zwei dieser Kinasen, nämlich Slr1759 und Slr2098,

besitzen Transmembran-Helices. Da Slr1759 zusätzlich noch ein GXGXXG-Motif am C-terminalen Ende aufweist, welches eine mögliche Binde-Domäne für Dinukleotide (z. B. für FAD, WIERENGA *et al.* 1986) ist, wurde diese Kinase für meine Arbeit ausgewählt. Die gesamte Domänenstruktur von Slr1759 ist in Abb. 3.1 wiedergegeben.

Abb. 3.1 zeigt die Lokalisation des Gens *slr1759* auf dem Genom von *Synechocystis* PCC 6803. In der nachfolgenden Tabelle in Abb. 3.1 werden die von den Genen kodierten Proteine genannt.

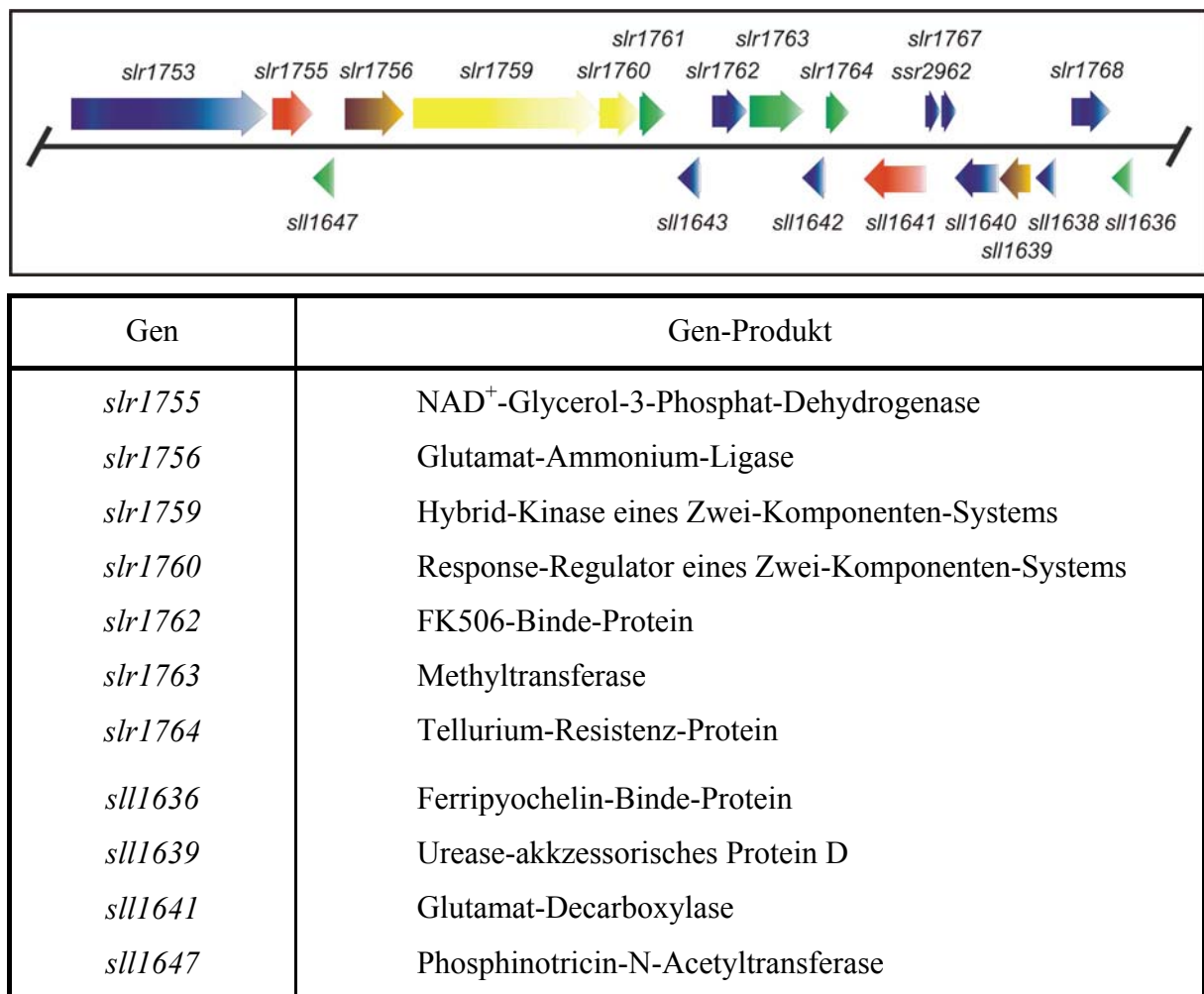


Abb. 3.1: Lokalisation des Gens *slr1759* auf dem Genom von *Synechocystis* PCC 6803. In der Tabelle sind zur Erläuterung von Abb 3.1 die stromaufwärts und -abwärts von *slr1759* liegenden Gene und die von diesen Genen kodierten Proteine aufgeführt.

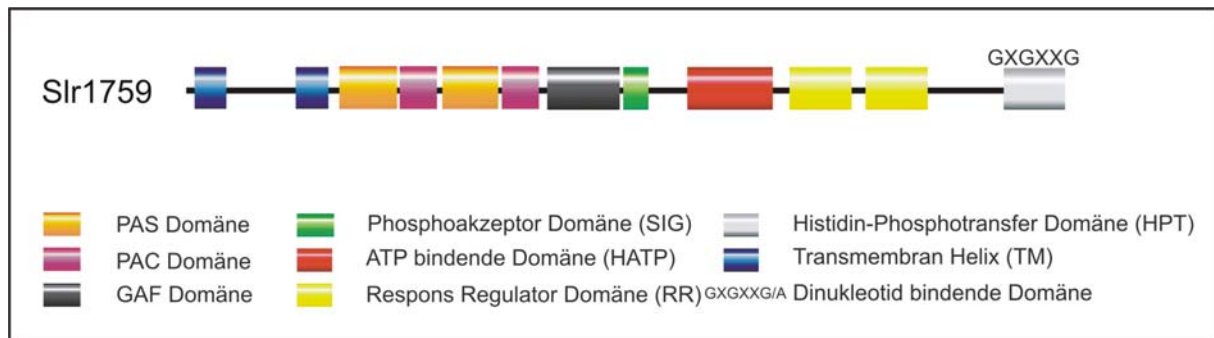


Abb. 3.2: Domänenstruktur der Histidin-Kinase Slr1759 aus *Synechocystis* PCC 6803.

Die Histidin-Kinase Slr1759 (Abb. 3.2) enthält eine charakteristische Histidin-Kinase-Domäne mit einem konservierten Histidin-Rest (SIG-Domäne), eine weitere Phosphorylierungs-Domäne (HPT), eine ATP bindende Domäne (HATP), eine GAF-Domäne und zwei Response-Regulator-Domänen. Daher wird Slr1759 in die Gruppe der Hybrid-Histidin-Kinasen eingeordnet, welche eine sehr komplexe Domänen-Struktur besitzen. Durch diese komplexe Domänenstruktur können möglicherweise zusätzliche Veränderungen der Signal-Transduktion zum Regulator-Protein durchgeführt oder verschiedene Stoffwechselwege reguliert werden. In der N-terminalen Region besitzt das Enzym zwei Transmembran-Helices und zwei PAS-Domänen mit zwei assoziierten PAC-Domänen, wodurch die Möglichkeit besteht, dass das Enzym eine Membran-verankerte Histidin-Kinase ist, welche den Redox-Status der Membran wahrnimmt. Dabei ist es sehr wahrscheinlich, dass der Redox-Status der Cytoplasmamembran gemessen wird. Weniger wahrscheinlich ist eine Assoziation der Kinase mit der Thylakoid-Membran. Da Slr1759 zwei PAS/PAC-Domänen in der N-terminalen Region in der Nähe der Membran-Region besitzt und zudem ein putatives FAD-bindendes Motif in der HPT-Domäne der C-terminalen Region aufweist, könnte das Enzym mehr als ein Signal wahrnehmen. Durch das Vorhandensein von zwei Transmembran-Regionen (welche durch etwa 240 Aminosäure-Reste getrennt sind – 54 dieser Aminosäuren enthalten R-Reste, die je nach pH des Periplasmas protoniert oder deprotoniert werden können: 14 Arg, 15 Glu, 20 Asp, 5 Lys) gehört das Protein in die Gruppe der Tripartit-Histidin-Kinasen. Die bislang am ausführlichsten charakterisierten, mit der Cytoplasmamembran verankerten Histidin-Kinasen sind z. B. Aer, BarA und ArcB in *E. coli* (IUCHI & LIN 1995; REBBAPRAGADA *et al.* 1997; PERNESTIG *et al.* 2001, 2003; MATSUSHIKA & MIZUNO 1998; GEORGELLIS *et al.* 2001; MALPICA *et al.* 2004). Letztere reguliert drei aerobe C-Stoffwechselwege in Abhängigkeit eines von der Cytoplasmamembran ausgehenden Signals (TCC, Glyoxylat-Weg und terminaler Elektronentransport zum molekularen Sauerstoff) (IUCHI & LIN 1988; GEORGELLIS *et al.* 2001).

Die Hybrid-Kinase Slr1759 in *Synechocystis* PCC 6803 besteht aus 1462 Aminosäuren, besitzt eine molekulare Masse von 164 kDa und einen kalkulierten pI von 5,06. Slr1759 zeigt die höchste Ähnlichkeit zur Hybrid-Histidin-Kinase BarA aus *E. coli* (918 Aminosäuren, molekulare Masse von 102 kDa, pI 5,41), bei der es sich ebenfalls um eine Tripartit-Hybrid-Histidin-Kinase (PERNESTIG *et al.* 2003) handelt. Die Identität zwischen Slr1759 und BarA beträgt 30,6 %, und die Ähnlichkeit beträgt 48,8 %. Die Funktion von BarA in *E. coli* war über lange Zeit unbekannt. So konnten trotz verschiedener Anzuchtbedingungen zunächst keine Unterschiede im Wachstum zwischen Wildtyp und Mutante gemessen werden. PERNESTIG *et al.* (2003) konnten jedoch kürzlich zeigen, dass BarA und UvrY ein neues Zwei-Komponenten-System bilden. Mutationen in der Sensor-Kinase wirkten sich drastisch auf das Überleben der Kulturen in langfristigen Konkurrenz-Anzuchten aus. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei Anzucht mit Kohlenstoff-haltigen Medien, welche die Gluconeogenese fördern, die Mutante gegenüber dem Wildtyp einen Wachstumsvorteil hat, wenn aber Medien verwendet wurden, deren Kohlenstoff-Quellen in die Glykolyse eingehen, konnte der Wildtyp besser wachsen. Die Autoren schlagen daher vor, dass das Zwei-Komponenten-System BarA-UvrY eine wesentliche Rolle bei einer effizienten Adaptation an verschiedene C-Quellen bei schnell wechselnden Umweltbedingungen hat (PERNESTIG *et al.* 2003). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Slr1759 zu BarA ist es möglich, dass Slr1759 eine ähnliche Funktion in *Synechocystis* PCC 6803 übernimmt.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Das Ziel der bioinformatischen Analysen des Genoms des Cyanobakteriums *Synechocystis* PCC 6803 war es, eine Histidin-Kinase auszuwählen, die eine mögliche Rolle bei der komplexen Interaktion von Photosynthese und Respiration, sowie C-Assimilation besitzen könnte und die zumindest zum Teil in Abhängigkeit vom Redox-Zustand der Cytoplasma- oder Thylakoidmembran reguliert wird.

- Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Histidin-Kinase Slr1759 ausgewählt, die in die Gruppe der Hybrid-Histidin-Kinasen gehört und aufgrund ihrer komplexen Domänenstruktur an der Regulation mehrerer Stoffwechselwege beteiligt sein könnte. Neben den charakteristischen Phosphorylierungs-Domänen und zwei Response-Regulator-Domänen besitzt sie eine weitere Phosphorylierungs-Domäne mit einem GXGXXG-Motif als einer möglichen FAD-Bindestelle. Außerdem enthält Slr1759 zwei PAS-Domänen, die mit zwei PAC-Domänen assoziiert sind. Somit ist diese Kinase bestens für eine Redox-Wahrnehmung geeignet. Im N-terminalen Bereich sind zwei Transmembran-Helices lokalisiert, weshalb man davon ausgehen kann, dass Slr1759 Membran-assoziiert ist.

- Slr1759 besitzt Ähnlichkeit zu der Histidin-Kinase BarA in *E. coli*, die eine Rolle bei der Koordination des C-Stoffwechsels spielt. Slr1759 scheint damit der am besten geeignete Kandidat für die oben definierte Rolle zu sein.

3.2 Vergleichende Analyse von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 bei Anzucht mit einer Lichtintensität von $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Um die Funktion der Histidin-Kinase Slr1759 in *Synechocystis* PCC 6803 zu untersuchen, wurden zunächst vergleichende Wachstumsanalysen mit Wildtyp (WT) und einer Slr1759-freien Mutante, die auch Hik14 genannt wird, durchgeführt. Die Mutante wurde mir von Herrn Prof. N. Murata und Herrn Prof. Dr. I. Suzuki (Division of Cellular Regulation, National Institute for Basic Biology, Myodaiji, Okazaki 444-8585 Japan) zur Verfügung gestellt. Sie enthält in dem Gen *slr1759* eine Resistenz-Kassette (Spektinomycin) und ist vollständig segregiert (SUZUKI *et al.* 2000).

Die Kultivierung für die Versuche von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 erfolgte in Anzuchtflaschen, welche in einem Wasserbad auf 30°C temperiert wurden. Die Kulturen wurden mit unterschiedlichen Animpfdichten in BG11-Medium angezogen und mit Luft begast, die zusätzlich 2 % CO_2 (nachfolgend auch als Luft / 2 % CO_2 bezeichnet) enthielt. Lediglich in einem Versuch wurden die Zellen mit Luft ohne zusätzlich zugesetztem CO_2 angezogen (siehe Abb. 3.9). Das BG11-Medium wurde ohne oder mit 50 mM Epps-NaOH pH 7,5 verwendet. Die Belichtungsanlage war über dem Becken angebracht, und die Lichtintensität auf der Wasseroberfläche betrug $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ oder $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die genauen Angaben, welche der Anzuchtbedingung gewählt wurde, befinden sich jeweils in den Legenden zu den Abbildungen bzw. Tabellen.

Das Wachstum der Stammkulturen von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 erfolgte in einem dreitägigen Rhythmus bei Anzucht mit einer Lichtintensität von $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einem zweitägigen Rhythmus bei Anzucht mit einer Lichtintensität von $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ausnahmen von dieser Anzucht werden in den Legenden zu den Abbildungen oder Tabellen aufgeführt. Für die Stammkulturen wurden Aliquots aus den Kulturen entnommen und überimpft, wobei auf eine Zelldichte von $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,4 (= $0,4 \mu\text{l Zellen ml Medium}^{-1}$) eingestellt wurde. Für die Versuchsreihen wurden die zwei- bzw. dreitägigen Zellen abzentrifugiert und in einer kleinen Menge des entsprechenden Mediums resuspendiert. Anschließend wurden die Versuchskulturen mit Aliquots dieser Zellsuspension auf die gewünschte $\text{OD}_{750\text{nm}}$ eingestellt. Die Zelldichten, mit denen angeimpft wurde, sind jeweils in den Legenden der Abbildungen und Tabellen angegeben.

Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt, wobei in dieser Arbeit jeweils ein repräsentatives Ergebnis dargestellt wird.

3.2.1 Wachstum von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 bei einer Lichtintensität von $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Zur Identifizierung von Unterschieden im Wachstum von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 wurden die Zellen zunächst in BG11-Medium ohne zusätzlichen Epps-Puffer mit einer Begasung mit Luft / 2 % CO_2 und einer Lichtintensität von $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Es wurden unterschiedliche Animpfdichten verglichen. In dem ersten Versuch wurden Anfangszellichten von $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,2, 0,3, 0,4 und 0,6 eingesetzt (siehe Abb. 3.3).

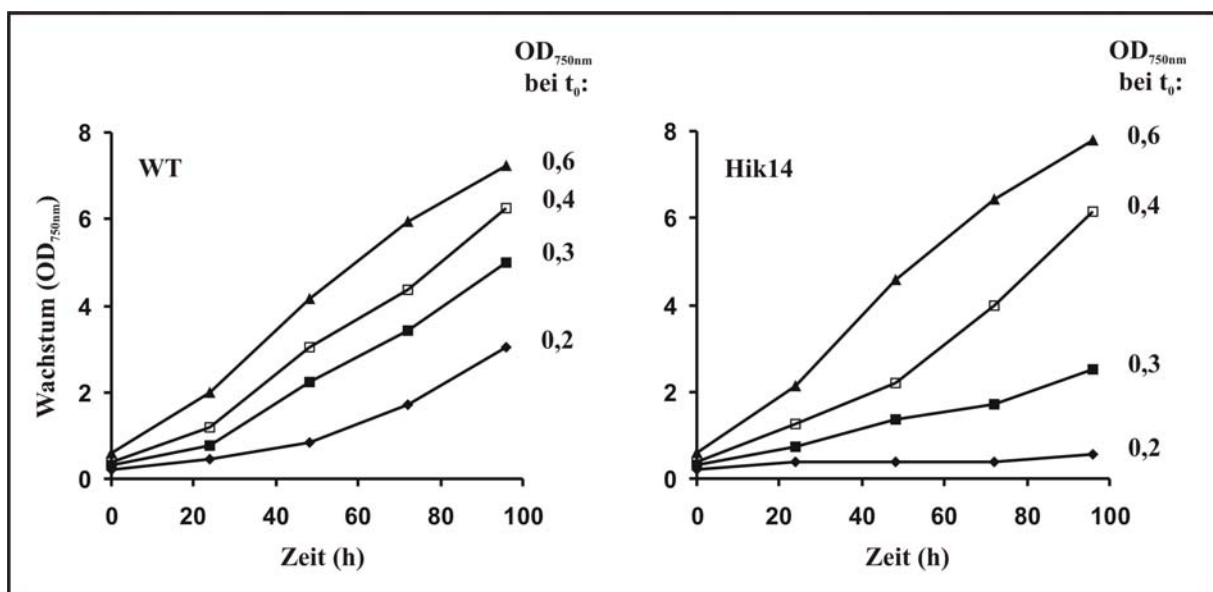


Abb. 3.3: Wachstum von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 nach Animpfen mit unterschiedlichen Zelldichten.

Synechocystis PCC 6803 WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit einer Begasung mit Luft / 2 % CO_2 und einer Lichtintensität von $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit dreitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit Zelldichten von $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,2, 0,3, 0,4 sowie 0,6 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 96 h.

Es konnte gezeigt werden, dass Hik14 nach Animpfen mit einer hohen Zelldichte genauso gut wächst wie der WT. Im Gegensatz dazu treten bei den niedrigen Zelldichten extreme Unterschiede auf. Bei einer Animpfdichte von $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,3 beträgt das Wachstum von Hik14 nach 96 h nur noch 50 % im Vergleich zum WT, und bei einer Animpfdichte von $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,2 ist kaum noch Wachstum mit Hik14 messbar.

Wird die Animpfdichte auf Werte von $\text{OD}_{750\text{nm}} < 0,2$ reduziert (nicht gezeigt), wächst auch der WT unter den bisher beschriebenen Anzuchtbedingungen nicht mehr.

Das Wachstum von WT bei niedrigen Animpfdichten, besonders gut zu erkennen bei OD_{750nm} von 0,2, zeigt eine Phase reduzierten Wachstums von etwa 48 h. Nach diesem Zeitraum steigt das Wachstum signifikant an. In der Mutante ist das Wachstum bei den niedrigen Zelldichten von OD_{750nm} von 0,2 und 0,3 über den gesamten Zeitraum von 96 h geringer als im WT. Bei der Animpfdichte von OD_{750nm} von 0,4 ist zunächst in Hik14 auch eine Phase mit reduziertem Wachstum (48 h) zu erkennen. Danach steigt das Wachstum deutlich an.

Zum besseren Vergleich sind drei der in Abb. 3.3 gezeigten Animpfdichten noch einmal jeweils mit WT und Mutante in einer Grafik dargestellt (siehe Abb. 3.4). Abb. 3.5 zeigt eine Anzucht von WT und Hik14 nach Animpfen mit OD_{750nm} von 0,2 als einen zweiten unabhängigen Versuch, bei dem die Mutante auch nach 96 h noch kein Wachstum zeigte, um die gute Reproduzierbarkeit des Unterschieds im Wachstum von WT und Hik14 zu dokumentieren.

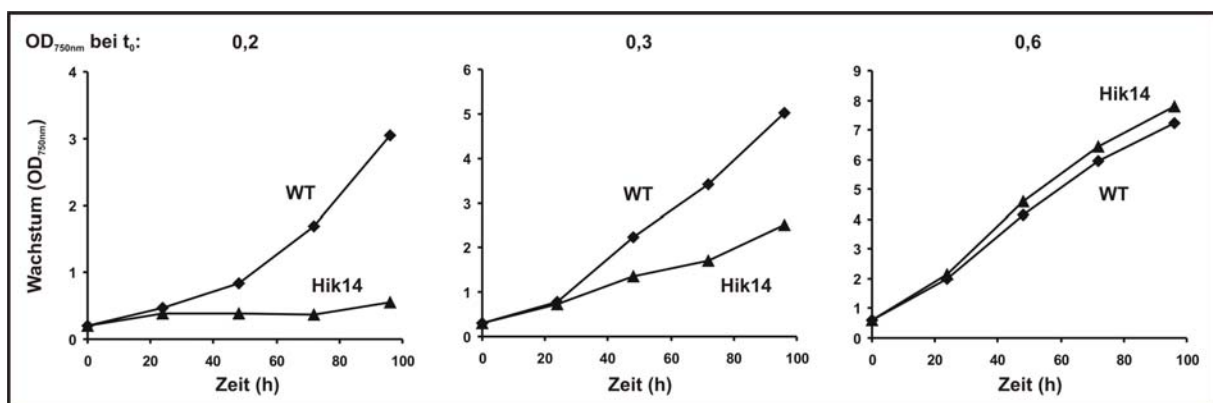


Abb. 3.4: Direkte vergleichende Darstellung des Wachstums von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 nach Animpfen mit unterschiedlichen Zelldichten.

Synechocystis PCC 6803 WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit einer Begasung mit Luft / 2 % CO_2 und einer Lichtintensität von $200 \mu E m^{-2} s^{-1}$ angezogen. Mit dreitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit Zelldichten von OD_{750nm} von 0,2, 0,3 sowie 0,6 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 96 h.

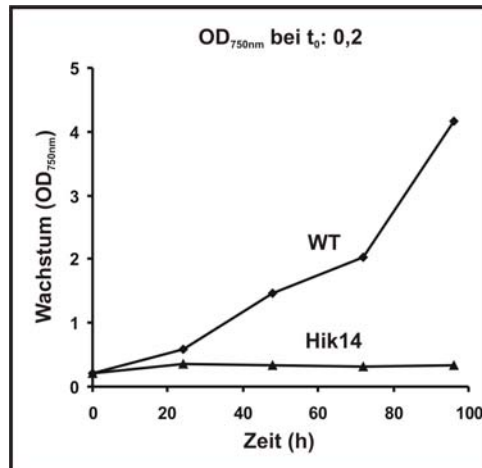


Abb. 3.5: Wachstum von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 nach Animpfen mit einer geringen Zelldichte. *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit einer Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtintensität von 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit dreitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit Zelldichten von OD_{750nm} von 0,2 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 96 h.

Die Ergebnisse zeigen, dass der hohe Unterschied zwischen WT und Mutante bei den hier gewählten Anzuchtbedingungen nur in einem engen Bereich der Animpfdichte von OD_{750nm} von 0,2 - 0,3 deutlich dokumentiert und reproduzierbar nachgewiesen werden kann. Bei hohen Animpfdichten dagegen wachsen WT und Mutante vergleichbar. Die Mutante wächst sogar etwas besser als der WT (nach 96 h um 7,6 %), wenn die Zellen mit einer OD_{750nm} von 0,6 angeimpft wurden. Bei Animpfdichten von OD_{750nm} < 0,2 wachsen weder WT noch Hik14 (nicht gezeigt).

3.2.2 Vergleichende Untersuchung zur Sensitivität gegenüber Photoinhibition von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14

Da die vorangegangenen Untersuchungen ergeben haben, dass die *Synechocystis*-Mutante Hik14 bei den niedrigeren Animpfdichten (OD_{750nm} von 0,2 und 0,3) ein deutlich geringeres Wachstum als der WT aufweist, sollte untersucht werden, ob die Mutante eine höhere Sensitivität als der WT gegenüber Photoinhibition zeigt. Bei diesen vergleichenden Untersuchungen wurde zusätzlich eine PsbO-freie *Synechocystis*-Mutante eingesetzt, für die gezeigt worden war, dass sie extrem sensitiv gegenüber Photoinhibition ist (ENGELS *et al.* 1994; PHILBRICK *et al.* 1991). Um den Stress während der Anzucht möglichst gering zu halten, wurden die Kulturen mit einer Lichtintensität von 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Der photoinhibitorische Effekt sollte erst während der Messung zum Tragen kommen. Die photosynthetische Sauerstoff-Entwicklung wurde mit intakten Zellen und Bicarbonat als

Elektronenakzeptor in einer Clark-Elektrode bei einer Belichtung mit $5000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gemessen.

Die PsbO-freie Mutante zeigt nach wenigen Minuten eine vollständige Hemmung der Sauerstoff-Entwicklung (siehe Abb. 3.6). Im Gegensatz zur PsbO-freien Mutante weist die Mutante Hik14 eine mit dem WT vergleichbare Sauerstoff-Entwicklung auf. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass der primäre Grund für das geringere Wachstum von Hik14 nicht auf einer erhöhten Sensitivität gegenüber Photoinhibition basiert. Dies schließt allerdings nicht aus, dass es zu sekundären Schädigungen der Zellen durch Photoinhibition kommen kann, insbesondere bei solchen Zellen, die über einen längeren Zeitraum kein Wachstum zeigen (siehe Abb. 3.3, Animpfdichte mit $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,2).

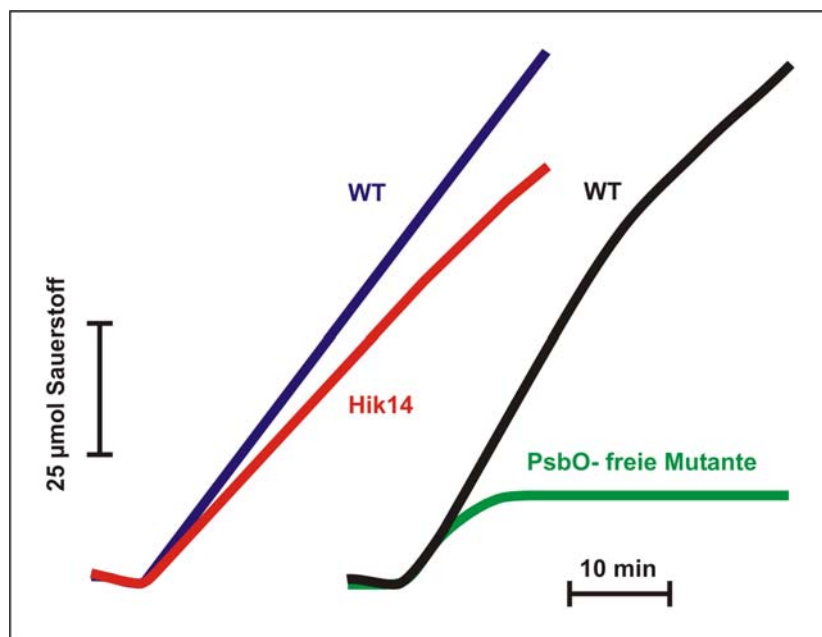


Abb. 3.6: Untersuchungen zur Sensitivität der Mutante Hik14 gegenüber Photoinhibition.

Die photosynthetische Sauerstoff-Entwicklung wurde bei 30°C mit intakten Zellen und Bicarbonat als Elektronenakzeptor und einer Lichtintensität von $5000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gemessen. Zur Messung der photosynthetischen Sauerstoff-Entwicklung wurde eine Zellmenge eingesetzt, die $2,5 \mu\text{g}$ Chlorophyll entsprach. Folgende Kulturen wurden miteinander verglichen: *Synechocystis* PCC 6803 WT und eine PsbO-freie Mutante, die extrem sensitiv gegenüber Photoinhibition ist (PHILBRICK *et al.* 1991), sowie *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14. Die Zellen wurden in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit einer Begasung mit Luft / 2 % CO_2 und einer Lichtintensität von $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit zweitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit Zelldichten von $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,1 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 48 h.

3.2.3 Vergleichende Charakterisierung von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14

Für die vergleichenden Untersuchungen von *Synechocystis* WT und Hik14 wurden die Zellen in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) bei einer Begasung mit Luft / 2 % CO_2 und einer Lichtintensität von $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Es wurden unterschiedliche Zelldichten beim

Animpfen eingesetzt, und zwar solche Zelldichten, bei denen der Unterschied zwischen WT und Hik14 optimal erkennbar war (siehe Abb. 3.3). Da in Abschnitt 3.2.2 gezeigt werden konnte, dass der primäre Grund für das geringere Wachstum von Hik14 nicht auf einer erhöhten Photoinhibition basiert, wurden *Synechocystis* WT und Hik14 in Bezug auf die 77 K Pigment-Fluoreszenz, photosynthetische Sauerstoffentwicklung und Nitratreduktase-Aktivität vergleichend analysiert.

Analysen der 77 K Pigment-Fluoreszenz

Für die Analysen der 77 K Pigment-Fluoreszenz wurden die Zellen mit einer OD_{750nm} von 0,3, 0,5 und 0,7 angeimpft. Die Zellen wurden für 48 h angezogen. Nach dieser Zeit wurden Proben entnommen, auf gleiche Chlorophyll-Konzentration ($1 \mu\text{g Chlorophyll ml}^{-1}$) eingestellt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Messung wurden die Proben einer Anregungsenergie von sowohl 435 nm als auch 600 nm ausgesetzt. Durch die Anregungsenergie mit Licht von 435 nm erhält man 77 K Fluoreszenz-Emissionsspektren mit drei charakteristischen Fluoreszenz-Maxima. Das Maximum bei 685 nm entspricht der Fluoreszenz des terminalen Emitters der Phycobilisomen und der inneren PS II-Antenne CP43. Das Maximum bei 695 nm entspricht der Fluoreszenz der inneren PS II-Antenne CP47 und des Reaktionszentrum-Chlorophylls P680. Das Maximum bei 725 nm entspricht der Fluoreszenz von PS I (MULLINEAUX & ALLEN 1990). Durch die Anregungsenergie mit Licht von 600 nm werden die Phycobiline zur Fluoreszenz angeregt. Das Emissions-Maximum bei 660 nm entspricht der Fluoreszenz der Phycobilisomen (MULLINEAUX & ALLEN 1990, MEUNIER *et al.* 1997). Abb. 3.7 zeigt, dass bei Anregung mit Licht von 435 nm es keine signifikanten Unterschiede in der Chlorophyll-Fluoreszenz zwischen WT und Mutante gab. Andererseits zeigte sich bei Anregung mit Licht von 600 nm ein deutlicher Unterschied der Phycobilisomen-Fluoreszenz zwischen WT und Mutante, und zwar dann, wenn die Zellen mit einer geringen Animpfdichte von OD_{750nm} von 0,3 angezogen worden waren, nicht jedoch in den Zellen mit hoher Animpfdichte. Die Mutante zeigte eine deutlich höhere Phycobilisomen-Fluoreszenz als der WT. Dies deutet auf eine teilweise Ablösung der Phycobilisomen von den Reaktionszentren hin. Die Ursache hierfür könnte ein Nährstoffmangel oder eine andere Stresssituation sein, wenn die Mutante bei niedrigen Animpfdichten angezogen worden war.

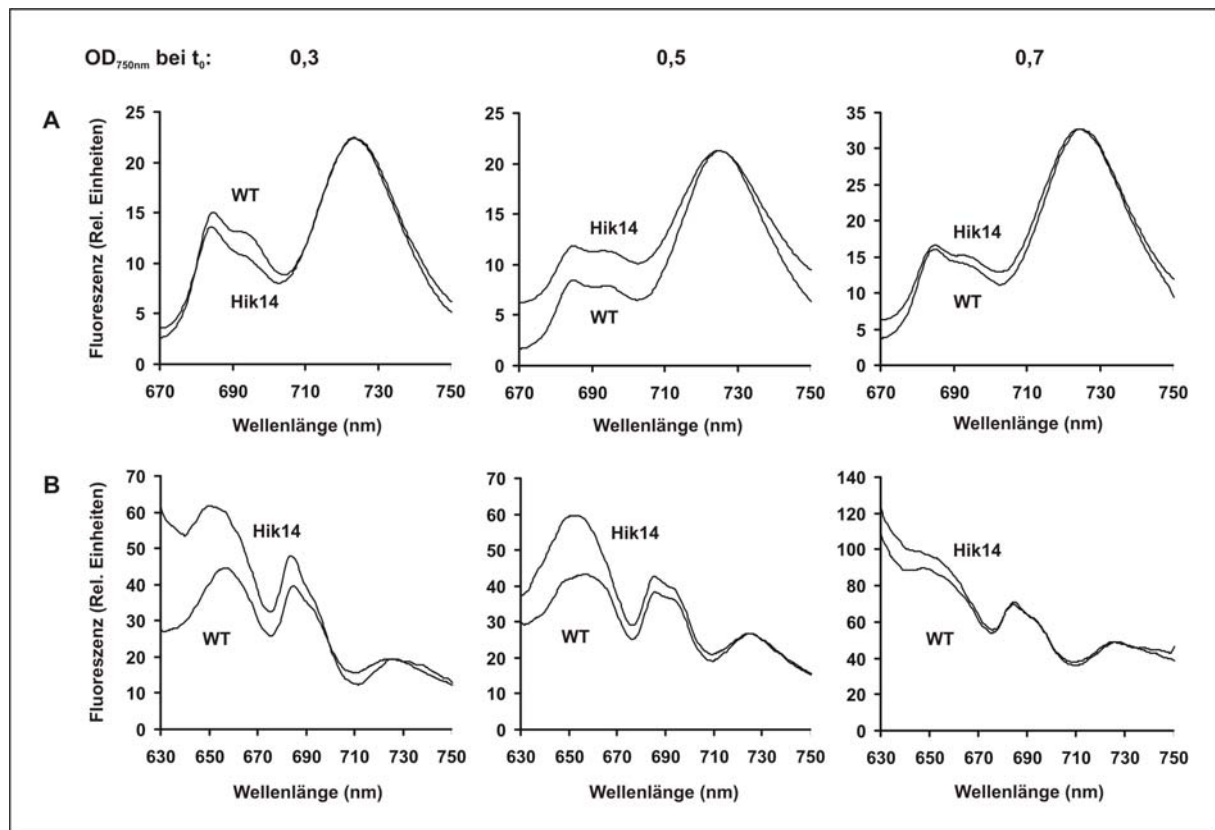


Abb. 3.7: Analyse der 77 K Pigment-Fluoreszenz von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14.

Die Zellen wurden in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit einer Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtintensität von 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit dreitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit Zelldichten von OD_{750nm} von 0,3, 0,5 sowie 0,7 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 48 h. Für die Messung wurde eine Probenmenge eingesetzt, die 1 μg Chlorophyll ml^{-1} entsprach.

A: Chlorophyll a-Fluoreszenz nach Anregung mit Licht von 435 nm.

B: Phycocyanobilin-Fluoreszenz nach Anregung mit Licht von 600 nm.

Die Kurven wurden jeweils auf den PS I Peak (bei 725 nm) normiert.

Messung der photosynthetischen Aktivität

Für die vergleichende Analyse der photosynthetischen Aktivität von *Synechocystis* WT und Hik14 wurden die Zellen mit einer Zelldichte von OD_{750nm} von 0,4, 0,5 oder 0,6 angeimpft. Die photosynthetische Sauerstoff-Entwicklung von intakten Zellen wurde mit Bicarbonat als Elektronenakzeptor gemessen. Da der Chlorophyll-Wert zwischen WT und Hik14 unterschiedlich war, wurde die Aktivität sowohl auf gepacktes Zellvolumen (GZV) als auch auf mg Chlorophyll bezogen. Tab. 3.1 zeigt, dass bei den beiden höheren Animpfdichten von OD_{750nm} von 0,5 und 0,6 Wachstum, Chlorophyll und photosynthetische Sauerstoff-Entwicklung der Mutante vergleichbar mit entsprechenden Werten des WTs war. Andererseits war bei der niedrigen Animpfdichte von OD_{750nm} von 0,4 bei einer Anzuchtdauer von 72 h wie erwartet, das Wachstum von Hik14 geringer als von WT (siehe auch Abb. 3.3). Unter diesen Bedingungen war im Vergleich zum WT auch der Chlorophyll-Gehalt der Mutante um

20,5 % geringer. Die Photosynthese-Aktivität der Mutante betrug hier im Vergleich zum WT 64,1 % bezogen auf GZV sowie 81,9 % auf Chlorophyll-Basis.

	Wachstum OD _{750nm}	Chlorophyll mg 100µl GZV ⁻¹	Photosynthetische O ₂ -Entwicklung H ₂ O → NaHCO ₃	
			µmol O ₂ 100 µl GZV ⁻¹ h ⁻¹	mg Chl ⁻¹ h ⁻¹
OD _{750nm} an t ₀ : 0,4				
WT	4,75	0,39	118,87	303,24
Hik14	1,99	0,31	76,21	248,24
OD _{750nm} an t ₀ : 0,5				
WT	4,11	0,37	122,46	327,42
Hik14	3,65	0,36	130,15	361,52
OD _{750nm} an t ₀ : 0,6				
WT	5,20	0,41	122,34	295,29
Hik14	5,45	0,39	110,87	284,79

Tab. 3.1: Messung der photosynthetischen Sauerstoff-Entwicklung von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14.

WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit einer Begasung mit Luft / 2 % CO₂ bei einer Lichtintensität von 200 µE m⁻² s⁻¹ angezogen. Mit dreitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit Zelldichten von OD_{750nm} von 0,4, 0,5 sowie 0,6 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 72 h.

Die Messung der photosynthetischen Sauerstoff-Entwicklung erfolgte bei 30°C mit intakten Zellen und Bicarbonat als Elektronen-Akzeptor. Es wurden Probenmengen verwendet, die 2,5 µg Chlorophyll entsprachen.

Messung der Nitratreduktase-Aktivität

Zur Messung der Nitratreduktase-Aktivität wurden *Synechocystis* WT und Hik14 mit einer Animpfdichte von OD_{750nm} von 0,3, 0,4, und 0,7 angezogen. Die Nitratreduktase-Aktivität wurde als Nitrit-Bildung mit Dithionit-reduziertem Methylviologen als Reduktant bestimmt. Auch hier zeigte sich wieder, dass bei der niedrigen Animpfdichte die Mutante eine geringere Aktivität als der WT hatte, und zwar entsprach die Nitratreduktase-Aktivität der Mutante bei einer Animpfdichte von OD_{750nm} von 0,3 nach 48 h 60 % der Aktivität des WTs (siehe Tab. 3.2). Bei einer höheren Animpfdichte (OD_{750nm} von 0,7) wurde mit der Mutante keine geringere Aktivität im Vergleich zum WT gemessen.

Kultur	Anzuchtdauer (h)	Wachstum (OD _{750nm})	Nitratreduktase-Aktivität μmol NO ₂ ⁻ gebildet 100 μl GZV ⁻¹ min ⁻¹
OD _{750nm} an t ₀ : 0,3			
WT	24	0,67	0,42
	48	1,25	0,37
Hik14	24	0,56	0,38
	48	0,81	0,22
OD _{750nm} an t ₀ : 0,4			
WT	24	0,76	0,25
	48	2,08	0,70
Hik14	24	0,79	0,17
	48	1,35	0,59
OD _{750nm} an t ₀ : 0,7			
WT	24	2,24	0,63
	48	4,12	0,24
Hik14	24	2,16	0,63
	48	4,41	0,30

Tab. 3.2.: Messung der Nitratreduktase-Aktivität von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14. WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer), mit einer Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtintensität von 200 μE m⁻² s⁻¹ angezogen. Mit dreitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit Zelldichten von OD_{750nm} von 0,3, 0,4 und 0,7 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 24 h und 48 h.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Synechocystis PCC 6803 WT und eine Slr1759-freie Mutante (genannt Hik14) wurden vergleichend, und zwar zunächst bei Anzucht in BG11-Medium, Begasung mit Luft / 2% CO₂ und einer Lichtintensität von 200 μE m⁻² s⁻¹ angezogen.

- Wenn die *Synechocystis*-Zellen mit Zelldichten im Bereich von OD_{750nm} von 0,4 bis 0,6 angeimpft wurden, und zwar in BG11-Medium ohne Epps-Puffer, dann war zwischen WT und Mutante kein signifikanter Unterschied im Wachstum zu erkennen. Wenn die Zellen mit einer niedrigen Zelldichte (OD_{750nm} von 0,2 bis 0,3) angeimpft wurden, zeigte die Mutante ein deutlich geringeres Wachstum als der WT. Bei einer Animpfdichte von OD_{750nm} von 0,2 zeigte die Mutante praktisch kein Wachstum, während der WT nach einer Phase mit reduziertem Wachstum fast ebenso wuchs wie nach Animpfen mit hohen Zelldichten.
- Es konnte weiter gezeigt werden, dass der primäre Grund für das schlechtere Wachstum der Mutante im Vergleich zum Wachstum des WT bei der niedrigen Animpfdichte nicht auf einer erhöhten Sensitivität der Mutante gegenüber Photoinhibition basiert.
- Die vergleichenden Analysen zur Charakterisierung von WT und Hik14 ergaben, dass die Mutanten-Zellen, wenn sie mit einer niedrigen Zelldichte angeimpft wurden, eine erhöhte 77 K Phycobilisomen-Fluoreszenz zeigten, sowie eine geringere photosynthetische O₂-

Entwicklung mit Bicarbonat als Elektronen-Akzeptor und eine geringere Nitratreduktase-Aktivität aufwiesen. Diese Reduzierungen könnten jedoch auch Sekundär-Effekte sein, die aus dem reduzierten Wachstum bei Belichtung mit einer hohen Lichtintensität resultieren.

3.3 Vergleichende Analyse des Wachstums von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 in BG11-Medium ohne und mit Epps-Puffer bei einer Lichtintensität von $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Zur Klärung der primären Ursache für die Wachstumsreduktion der Mutante nach Animpfen mit einer geringen Zelldichte wurden die Zellen in BG11-Medium mit und ohne zusätzlicher Epps-Pufferung (50 mM Epps-NaOH, pH 7,5) und bei einer Lichtintensität von $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen.

Anzucht der Zellen bei einer Begasung mit Luft / 2 % CO_2

In den in Abb. 3.8A und 3.8B dargestellten Versuchen wurden WT und Hik14 mit BG11-Medium ohne und mit Epps-Puffer und einer Lichtintensität von $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Die Animpfdichte betrug $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,2 und 0,4. Bei der Animpfdichte von $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,2 und Kultivierung ohne Epps-Puffer zeigte die Mutante praktisch kein Wachstum, während das Wachstum des WT's anfangs zwar gering war, dann aber mit einer guten Rate signifikant verlief (siehe auch Abb. 3.3). Wird das BG11-Medium zusätzlich mit 50 mM Epps-NaOH pH 7,5 gepuffert, zeigten WT und Mutante beide nach einer geringen Phase mit reduziertem Wachstum ein logarithmisches Wachstum. Der pH-Wert des Mediums (siehe Abb. 3.8A und 3.8 B) ohne Epps-Puffer liegt nach Autoklavieren zwischen 7,1 und 7,3. Wird dieses Medium ohne Zellen mit Luft / 2 % CO_2 begast, fällt der pH auf etwa 6,6 – 6,3. Der WT ist in der Lage, den pH des Mediums innerhalb von 48 h wieder auf pH 7,0 zu erhöhen und dann effektiv zu wachsen. Die Mutante Hik14 schafft es dagegen nicht den pH signifikant zu erhöhen und als Konsequenz erfolgt kein effektives Wachstum. Wird das Medium mit 50 mM Epps-NaOH pH 7,5 zusätzlich gepuffert, bleibt der pH des Mediums zwischen 7,1 und 7,3, und sowohl der WT als auch die Mutante können effektiv wachsen. Wenn die Animpfdichte auf $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,4 erhöht wird, dann zeigt die Mutante auch ohne zusätzlichen Epps-Puffer ein zum WT vergleichbares Wachstum. Bei der höheren Zelldichte war auch die Mutante in der Lage durch ihre metabolischen Aktivitäten den pH des Mediums in kürzester Zeit wieder zu erhöhen, und zwar in vergleichbarer Weise wie der WT.

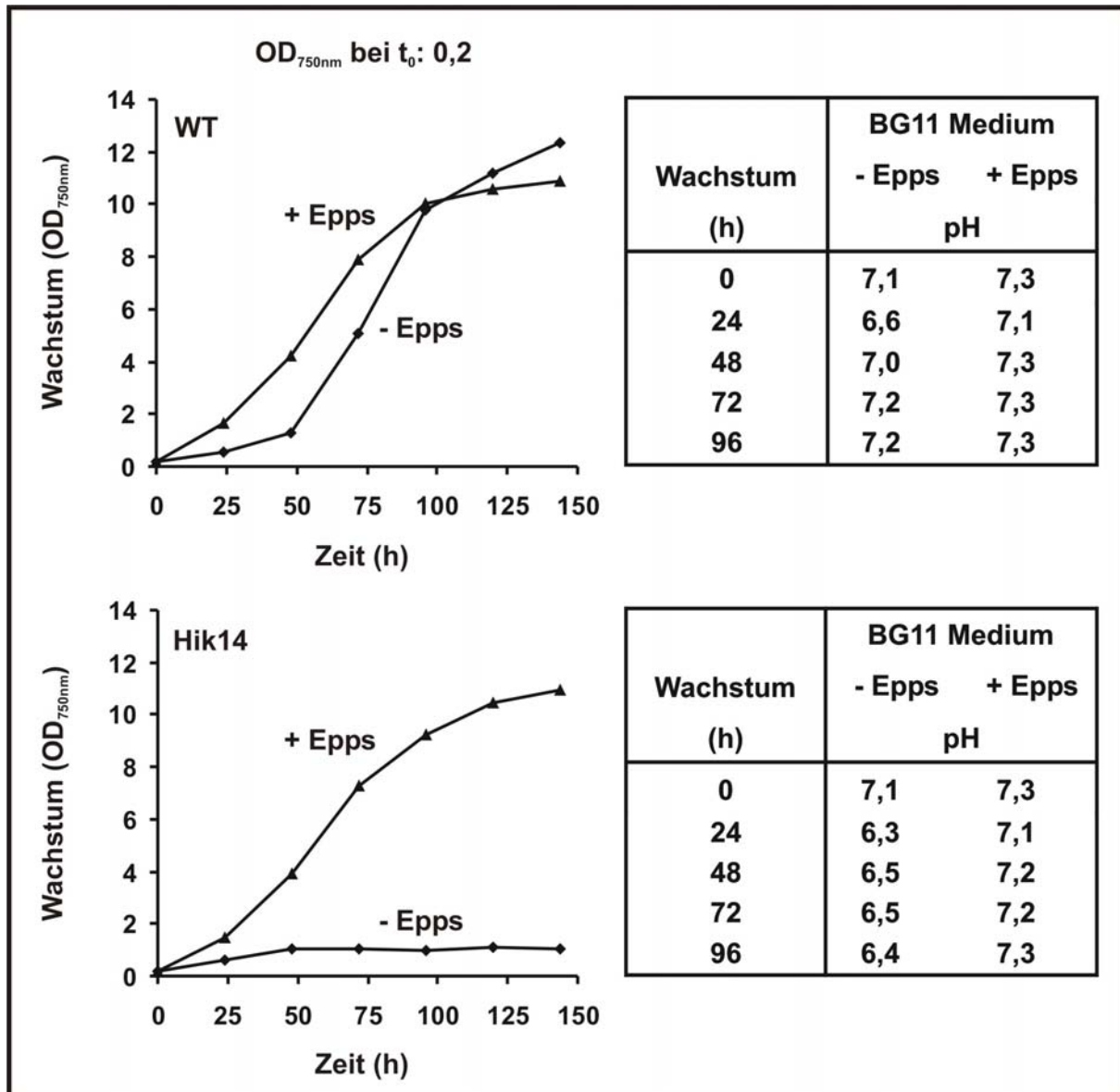


Abb. 3.8A: Wachstum von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 in BG11-Medium ohne und mit zusätzlicher Epps-Pufferung.

WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (ohne und mit 50 mM Epps-NaOH pH 7,5) mit einer Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtintensität von 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit dreitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit einer Zelldichte von OD_{750nm} von 0,2 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 144 h. Dargestellt sind die Wachstumskurven der Zellen und die pH-Werte des Mediums während der Wachstumsphase.

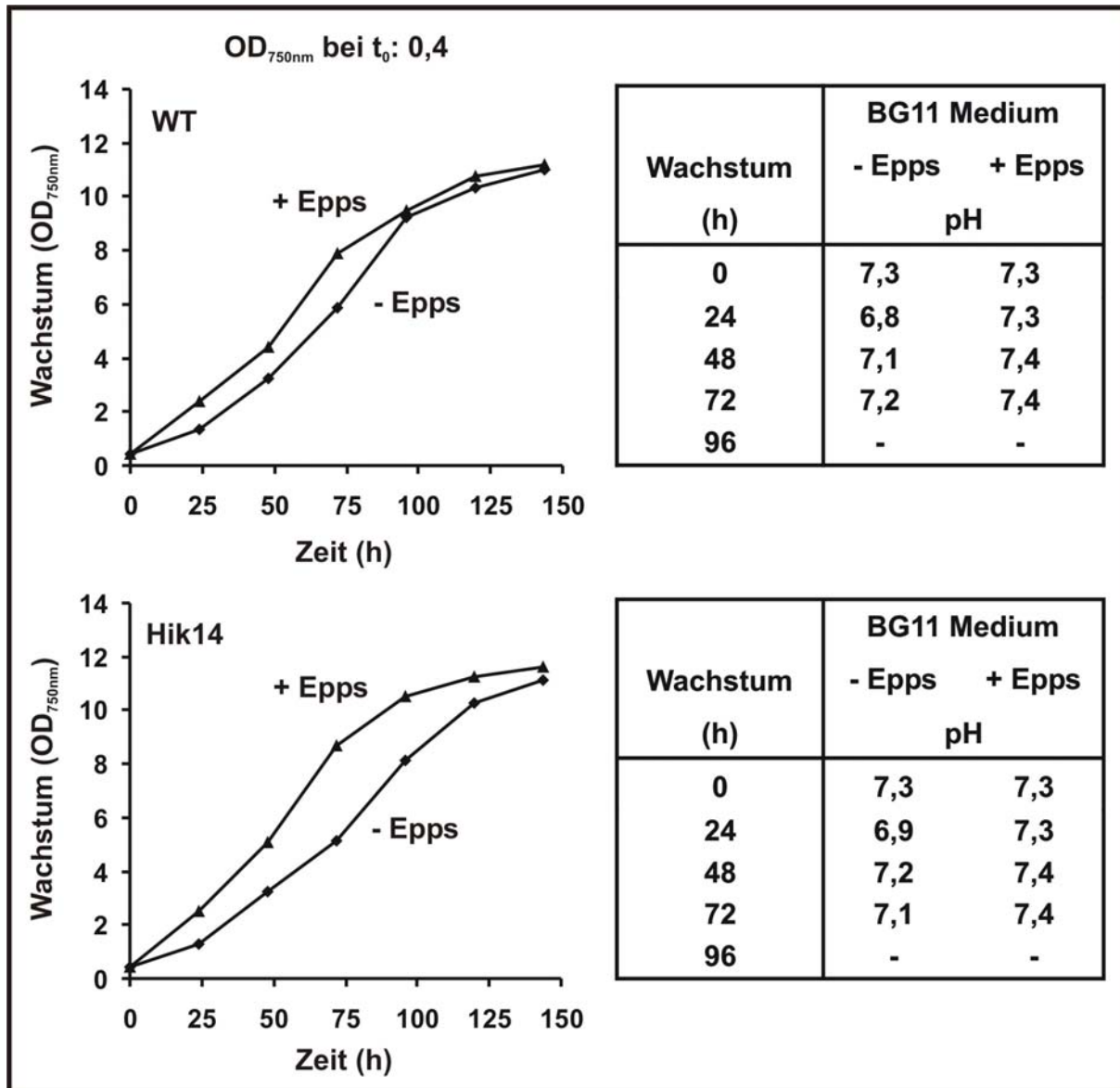


Abb. 3.8B: Wachstum von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 in BG11-Medium ohne und mit zusätzlicher Epps-Pufferung.

WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (ohne und mit 50 mM Epps-NaOH pH 7,5) mit einer Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtintensität von 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit dreitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit einer Zelldichte von OD_{750nm} von 0,4 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 144 h. Dargestellt sind die Wachstumskurven der Zellen und die pH-Werte des Mediums während der Wachstumsphase.

Dies bedeutet, dass bei Animpfen mit geringer Zelldichte der WT effektiver einer Ansäuerung des Mediums entgegen wirken kann, indem er besser H⁺ aufnehmen oder OH⁻ Ionen (oder andere saure oder basische Substanzen ausscheiden/aufnehmen) ausscheiden kann. Wird die Zelldichte beim Überimpfen erhöht, ist auch die Mutante in der Lage in kürzester Zeit den pH-Wert des Mediums zu erhöhen.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist festzuhalten, dass eine zusätzliche Pufferung des BG11-Mediums eine Wachstumsreduktion der Mutante im Vergleich zum Wildtyp nach Animpfen mit einer geringen Zelldichte verhindert.

Anzucht von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 bei Begasung mit Luft

Da es zu einem Abfall des pH-Wertes von BG11-Medium ohne zusätzliche Epps-Pufferung durch Begasung mit Luft / 2 % CO₂ kommt, wurden *Synechocystis* WT und Hik14 zusätzlich in BG11-Medium ohne und mit 50 mM Epps-NaOH pH 7,5 und einer Begasung mit Luft angezogen (siehe Abb. 3.9).

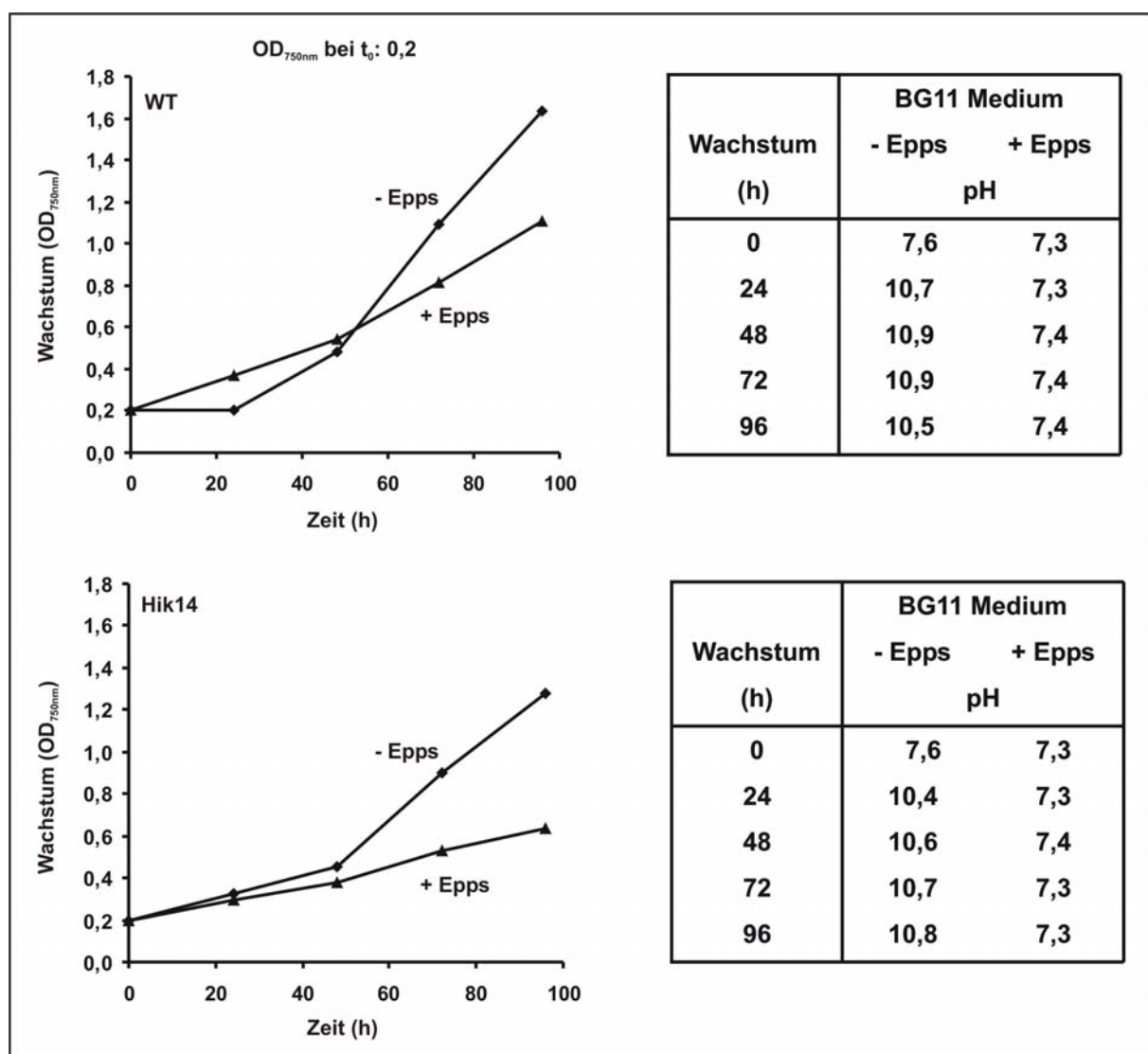


Abb. 3.9: Wachstum von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 nach Anzucht mit Luft.

WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (ohne und mit 50 mM Epps-Puffer pH 7,5) einer Begasung mit Luft und einer Lichtintensität von 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit dreitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit einer Zelldichte von OD_{750nm} 0,2 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 96 h.

Dargestellt sind die Wachstumskurven der Zellen und die pH-Werte des Mediums während der Wachstumsphase.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Wachstum bei niedriger Animpfdichte von WT und Mutante bei Begasung mit Luft deutlich geringer ist als bei Begasung mit Luft / 2 % CO₂ (siehe zum Vergleich Abb. 3.8A). Die Anzucht bei Begasung mit Luft zeigt weiterhin, dass es nach 24 h sowohl mit WT als auch mit Hik14 zu einer starken Alkalisierung des Mediums (pH 10,7 und 10,4) kommt, wenn die Zellen mit BG11-Medium ohne Epps-Puffer angezogen wurden. Vergleicht man das Wachstum dieser Zellen mit dem Wachstum von WT und Hik14, die mit BG11-Medium mit 50 mM Epps-NaOH angezogen wurden, so fällt auf, dass sowohl der WT als auch die Mutante in dem ungepufferten Medium besser wachsen können. Das Wachstum mit gepufferten BG11-Medium beträgt nach 96 h für den WT 68,0 % und für Hik14 49,9 % des Wachstums mit ungepufferten Medium. Das Wachstum der Mutante beträgt im Vergleich zum WT in BG11-Medium ohne Epps-Puffer 78,1 % und in BG11-Medium mit Epps-Puffer 57,3 %. Das Wachstum der Mutante ist zwar im Vergleich zum WT reduziert, allerdings scheint die Alkalisierung des Mediums einen positiven Effekt auf das Wachstum der Mutante zu haben.

Die starke Alkalisierung des BG11-Mediums zeigt, dass *Synechocystis*-Zellen während der Wachstumsphase effektiv H⁺ aufnehmen und/oder OH⁻ Ionen (oder andere saure oder basische Substanzen) ausschleusen.

Dieses Ergebnis in Kombination mit den Ergebnissen der Abb. 3.8 zeigt deutlich, dass der Abfall des pH-Wertes im Medium die Hauptursache ist für das geringere Wachstum der Mutante im Vergleich zum WT bei einer niedrigen Animpfdichte. Das geringere Wachstum der Mutante kann verhindert werden, wenn das BG11-Medium zusätzlich mit 50 mM Epps-NaOH gepuffert wird oder die Zelldichte erhöht wird.

Anzucht von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 in BG11-Medium ohne und mit Zusatz von NaCl

Einer der beiden Bicarbonattransporter in *Synechocystis* ist eng gekoppelt mit einem Na⁺ / H⁺-Antiporter, der für die Ausschleusung von Natrium-Ionen aus der Zelle und einer Aufnahme von Protonen aus dem Medium verantwortlich ist (OGAWA & KAPLAN 2003). Daher könnte dieser Antiporter ein Grund für die Alkalisierung des Mediums sein, wie bei Anzucht der Zellen mit Luft-Begasung gezeigt werden konnte (siehe Abb. 3.9). Dieser Antiporter sollte weniger effektiv arbeiten, wenn die Natriumkonzentration im Medium erhöht wird. Es war daher die Frage, ob Zusatz von 0,4 M NaCl in das BG11-Medium mit 50 mM Epps-NaOH pH 7,5 einen stärkeren Effekt auf Hik14 hat als auf WT. Als Animpfdichte wurde hier OD_{750nm} von 0,4 gewählt, da bei einer geringeren Zelldichte das Wachstum der Mutante zu

stark gehemmt werden würde, so dass der mögliche Unterschied zwischen Anzucht ohne und mit NaCl nicht mehr deutlich erkennbar wäre. Die Ergebnisse der Abb. 3.10 zeigen, dass durch Zusatz von 0,4 M NaCl in das BG11-Medium sich das Wachstum nach 72 h im WT um 20,4 % und in der Mutante um 39 % reduziert. Somit führt Zusatz von NaCl zum BG11-Medium zu einer etwa doppelt so hohen Hemmung des Wachstums in der Mutante als im WT.

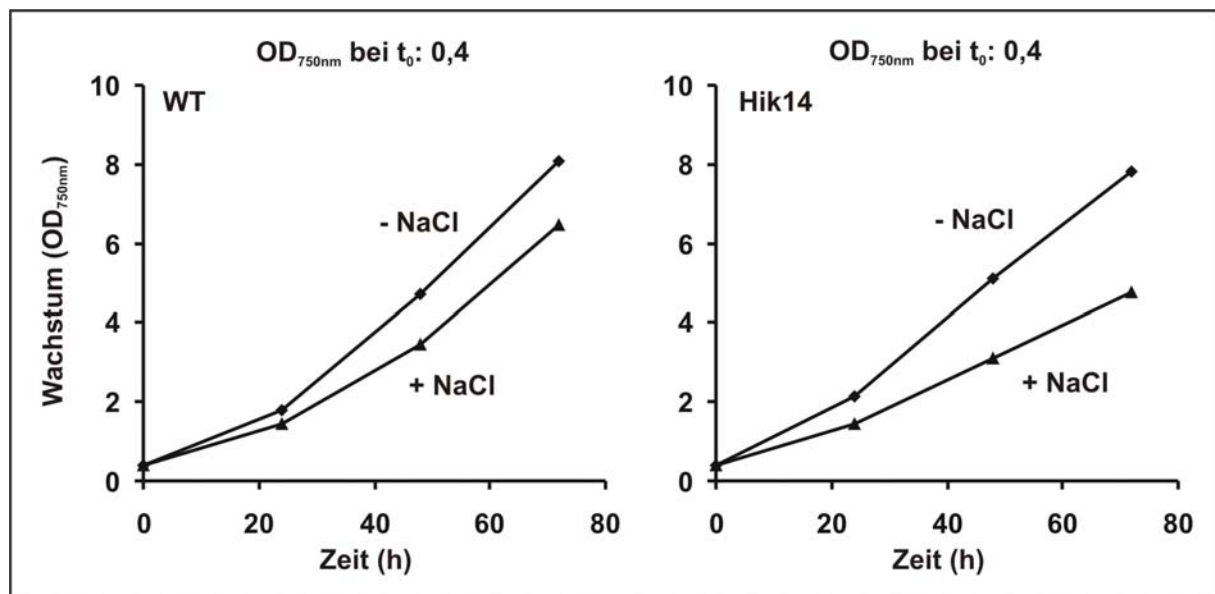


Abb. 3.10: Anzucht von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 ohne und mit Zusatz von 0,4 M NaCl. WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (mit 50 mM Epps-NaOH pH 7,5) mit Zusatz von 0,4 M NaCl, bei Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtintensität von 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit dreitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit einer Zelldichte von OD_{750nm} von 0,4 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 72 h.

Anzucht von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 mit Ammonium als N-Quelle

Das nachfolgende Ergebnis (siehe Abb. 3.11) soll abschließend für die Anzucht mit 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zeigen, dass die Mutante Hik14 in BG11-Medium mit Epps-Puffer und mit einer geringen Animpfdichte (OD_{750nm} von 0,2) auch mit anderen Stickstoff-Quellen wachsen kann. In diesem Fall wurde das im BG11-Medium enthaltene Nitrat durch 5 mM Ammonium-Chlorid ersetzt. Die Wachstumskurve zeigt, dass das Wachstum der Mutante zwar im Vergleich zum WT leicht reduziert ist, aber ansonsten mit dem des WTs vergleichbar ist. Die Mutante ist also in der Lage, in gepufferten Medium auch mit Ammonium als N-Quelle bei geringer Animpfdichte zu wachsen. Die Ergebnisse zeigen somit noch einmal deutlich, dass unabhängig von der N-Quelle die Mutante bei geringen Animpfdichten vergleichbar zum WT wächst, wenn das BG11-Medium mit Epps-NaOH pH 7,5 zusätzlich gepuffert ist.

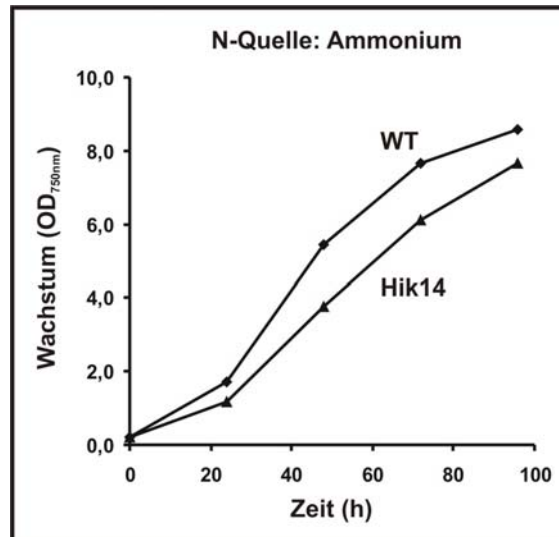


Abb. 3.11: Anzucht von WT und Hik14 mit Ammonium als N-Quelle.

WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (mit 50 mM Epps-NaOH pH 7,5) mit 5mM Ammoniumchlorid als N-Quelle, mit Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtintensität von 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit dreitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit einer Zelldichte von OD_{750nm} von 0,2 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 120 h.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Um den primären Grund für das geringere Wachstum der Mutante im Vergleich zum WT zu finden, wurden die *Synechocystis*-Zellen in BG11-Medium ohne und mit einer zusätzlichen Pufferung mit 50 mM Epps-NaOH pH 7,5, bei Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und Belichtung mit 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kultiviert.

- Die Untersuchungen ergaben, dass der Unterschied im Wachstum zwischen WT und Mutante bei niedrigen Animpfdichten nur dann auftrat, wenn das BG11-Medium keinen zusätzlichen Epps-Puffer enthielt. Durch die Begasung von BG11-Medium mit Luft / 2 % CO₂ fällt der pH von etwa 7,1 – 7,3 auf pH 6,6 ab. Der WT kann durch seine metabolischen Aktivitäten relativ schnell bewirken, dass der pH des Mediums wieder ansteigt, während die Mutante dazu nicht im gleichen Ausmaß in der Lage ist. Da der Unterschied im Wachstum zwischen WT und Mutante bei niedriger Animpfdichte und Epps-Puffer im BG11-Medium nicht auftritt, ist dies ein weiterer guter Beweis, dass die Mutante keine höhere Sensitivität gegenüber Photoinhibition besitzt. Der Defekt in der Mutante ist somit besonders deutlich zu detektieren, wenn die Zellen mit niedriger Animpfdichte in BG11-Medium ohne Epps-Puffer angeimpft und mit Luft / 2 % CO₂ begast werden. Dies führt zu einem Abfall des pH-Wertes im Medium, der von der Mutante nicht im gleichen Ausmaß wie vom WT kompensiert werden kann.
- Das Wachstum von *Synechocystis* PCC 6803 in BG11-Medium führt zu einer Alkalisierung des Mediums, was sehr gut durch die Anzucht dieser Kultur in BG11-Medium und Begasung mit Luft gezeigt werden konnte.

- Es konnte außerdem gezeigt werden, dass durch Zugabe von NaCl ins BG11-Medium, das Wachstum der Mutante stärker als das Wachstum von WT reduziert wird, was andeuten könnte, dass der HCO_3^- -Transporter, der mit einem H^+/Na^+ -Antiporter gekoppelt ist, in der Mutante stärker zur C-Assimilation beiträgt als im WT.
Da ein Abfall des pH-Wertes das Gleichgewicht von CO_2 zu HCO_3^- zu Gunsten von CO_2 verschiebt, deuten diese Ergebnisse bereits an, dass der WT offensichtlich unter diesen Bedingungen CO_2 besser als die Mutante assimilieren kann.

3.4 Vergleichende Analyse von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 bei einer Lichtintensität von $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Um sekundäre Schädigungen durch Photoinhibition möglichst gering zu halten, wurde die Lichtintensität von $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ reduziert. In den nachfolgenden Untersuchungen wurden die *Synechocystis*-Zellen in BG11-Medium (ohne oder mit 50 mM Epps-NaOH pH 7,5) bei einer Begasung mit Luft / 2 % CO_2 und einer Lichtintensität von $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit zweitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit einer Zelldichte von $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,1 angeimpft. In einigen Versuchen wurden der WT und Hik14 zusätzlich nach Animpfen mit $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,4 miteinander verglichen.

Die Animpfdichte von $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,1 wird nachfolgend auch niedrige Animpfdichte und die $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,4 als hohe Animpfdichte bezeichnet.

3.4.1 Vergleichende Analyse des Wachstums

Abb. 3.12 zeigt, dass bei Anzucht mit BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) nach Animpfen der Kulturen mit einer niedrigen Animpfdichte sowohl der WT als auch die Mutante eine zweitägige Phase mit reduziertem Wachstum aufweisen. Danach steigt die Wachstumsrate des Wildtyps signifikant an und verläuft während der weiteren Anzuchtdauer linear. Im Gegensatz dazu ist die Phase mit reduziertem Wachstum in der Mutante bei einer niedrigen Animpfdichte um mindestens zwei Tage verlängert und beträgt zwischen 96 h und 120 h. Erst dann setzt ein zum WT vergleichbares Wachstum ein. Die Veränderungen des pH-Wertes im Medium lassen auch deutlich erkennen, dass der WT bei der niedrigen Animpfdichte in der Lage ist, die pH-Werte des Mediums nach 48 h auf pH 6,9 hoch zu regulieren, während mit der Mutante ein vergleichbarer pH-Wert des Mediums erst nach etwa 96 h erreicht wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass der WT effektiver als die Mutante in der Lage ist, bei einem Abfallen des pH-Wertes im Medium seine metabolischen Aktivitäten umzustellen und so einer Ansäuerung des Mediums schneller entgegenwirken kann.

Wird die Animpfdichte auf OD_{750nm} von 0,4 erhöht, ist sowohl das Wachstum als auch die Veränderung des pH-Wertes des Mediums von WT und Mutante vergleichbar. Es sollte auch noch erwähnt werden, dass bei einer Animpfdichte von OD_{750nm} von 0,4 die Mutante ein leicht höheres Wachstum als der WT zeigt, welches in der späteren Wachstumsphase nach 144 h um 36 % höher war als beim WT. Somit zeigen diese Ergebnisse, dass die Abwesenheit der Histidin-Kinase Slr1759 sowohl einen deutlichen Nachteil aber auch einen geringen Vorteil in Bezug auf das Wachstum der Mutante ausmacht. Bei geringer Animpfdichte zeigt die Mutante eine wesentlich längere Phase mit reduziertem Wachstum als der WT, bevor effektives Wachstum beginnt. Bei einer höheren Animpfdichte ist das Wachstum in der Mutante im Vergleich zum WT leicht erhöht.

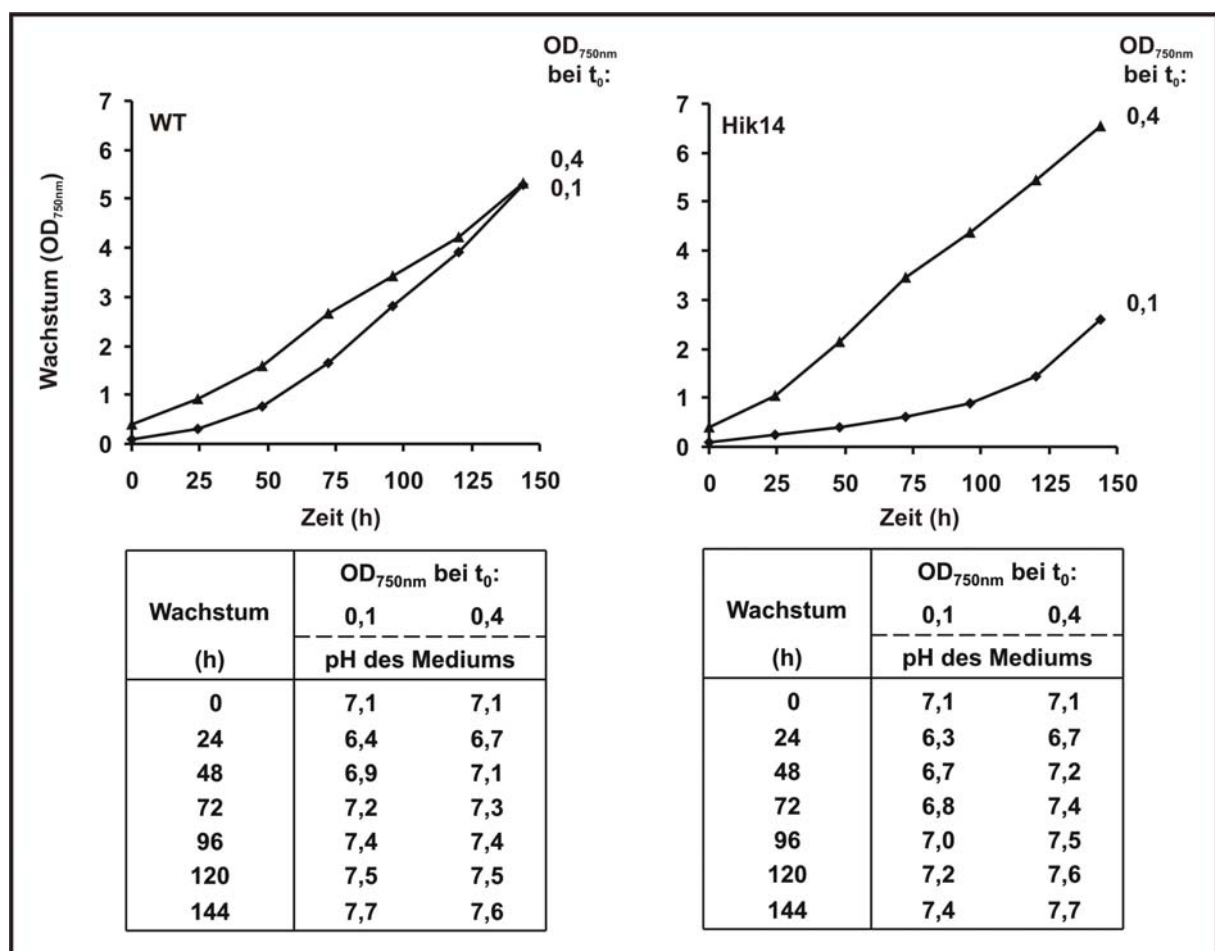


Abb. 3.12: Wachstum von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 nach Animpfen mit unterschiedlichen Zelldichten.

WT (links) und Hik14 (rechts) wurden in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtintensität 60 $\mu E m^{-2} s^{-1}$ angezogen. Mit zweitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit Zelldichten von OD_{750nm} von 0,1 und 0,4 angeimpft. Die Anzucht-dauer betrug 144 h. Dargestellt sind die Wachstumskurven der Zellen und die pH-Werte der Medien während der Wachstumsphase.

Zum besseren Vergleich wurde das Wachstum noch einmal dargestellt, indem WT und Mutante direkt in einer Abbildung verglichen wurden (Abb. 3.13). Dies macht noch einmal deutlich, dass bei geringer Animpfdichte die Mutante schlechter wächst als der WT und zwar hauptsächlich in der Anfangsphase nach dem Animpfen, und dass die Mutante bei hoher Animpfdichte ein leicht besseres Wachstum als der WT hat und zwar vor allem in der späteren Wachstumsphase.

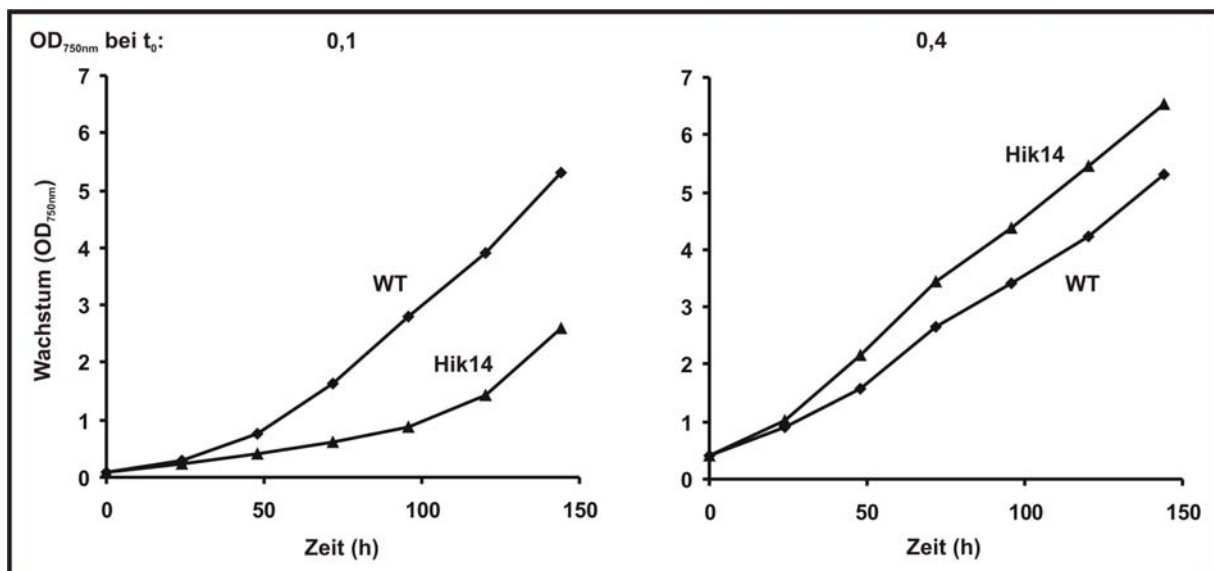


Abb. 3.13: Wachstum von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 nach Animpfen mit unterschiedlichen Zelldichten.

WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtintensität von $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit zweitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit Zelldichten von OD_{750nm} von 0,1 und 0,4 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 144 h.

Vergleichend dargestellt sind WT und Hik14 in einer Abbildung, links bei niedriger Animpfdichte und rechts bei hoher Animpfdichte.

In Abb. 3.14 ist nochmals eine Anzucht von WT und Hik14 mit einer geringen Animpfdichte dargestellt, um die Reproduzierbarkeit zu dokumentieren.

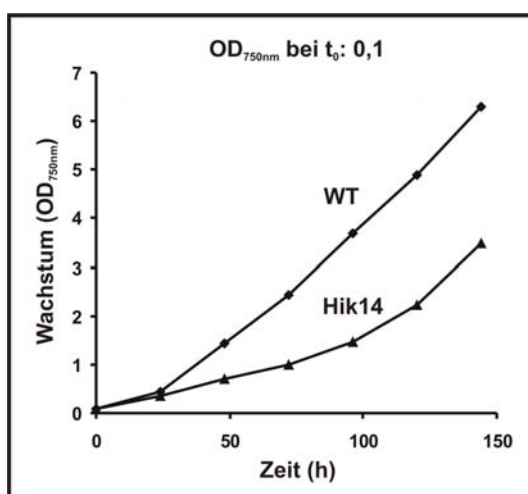


Abb. 3.14: Wachstum von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 nach Animpfen mit einer geringen Zelldichte.

WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtintensität von $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit zweitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit Zelldichten von OD_{750nm} von 0,1 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 144 h.

Die Ergebnisse zeigen, dass somit Bedingungen gefunden wurden, bei denen das geringere Wachstum der Mutante im Vergleich zum WT zwar immer noch deutlich messbar war, jedoch durch die Reduzierung der Lichtintensität von $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ die Schädigung der Mutanten-Zellen durch Photoinhibition als ein sekundärer Effekt nicht mehr vorhanden war oder zumindest deutlich geringer war als bei der höheren Lichtintensität. Die Zellen zeigen nach 96 h ein effektives Wachstum, woraus geschlossen werden kann, dass sie nicht irreversibel geschädigt sind. Somit wurden optimale Bedingungen gefunden, um weitere vergleichende Untersuchungen von WT und Hik14 durchzuführen. Hierbei soll geklärt werden, welche metabolischen Aktivitäten in Hik14 reduziert oder erhöht vorliegen unter den Wachstumsbedingungen, unter denen Hik14 ein deutlich schlechteres Wachstum zeigt als der WT.

3.4.2 Vergleichende Analyse des Wachstums mit Epps-gepufferten BG11-Medium

Die eben dargestellte Anzucht (Abschnitt 3.4.1) wurde in einem weiteren Experiment mit BG11-Medium durchgeführt, welches mit 50 mM Epps-NaOH pH 7,5 zusätzlich gepuffert worden war. Alle übrigen Details zu den Versuchsbedingungen entsprechen den unter Abschnitt 3.4.1 aufgeführten Angaben.

Abb. 3.15 zeigt, dass die Mutante bei Anzucht mit BG11-Medium, welches mit 50 mM Epps-NaOH pH 7,5 gepuffert worden war, auch mit einer niedrigen Animpfdichte ein signifikantes Wachstum zeigt, welches mit dem des WTs vergleichbar ist. Die entsprechenden pH-Werte des Mediums zeigen, dass nach einem anfänglichen Absinken auf pH von 7,2, der pH-Wert nach 48 h beim WT bzw. 72 h bei der Mutante auf 7,4 angestiegen ist. Diese leichte Verzögerung in der Mutante scheint sich nicht negativ auf ihr Wachstum auszuwirken, da sich diesbezüglich keine Unterschiede zum WT feststellen lassen. Bei einer hohen Animpfdichte ist das Wachstum von WT und Hik14 ebenfalls gleich. Die pH-Werte der Medien beider Kulturen erreichen nach einem anfänglich leichten Absinken auf pH von 7,2 wieder einen pH-Wert von 7,4 nach 48 h beim WT bzw. 72 h bei der Mutante.

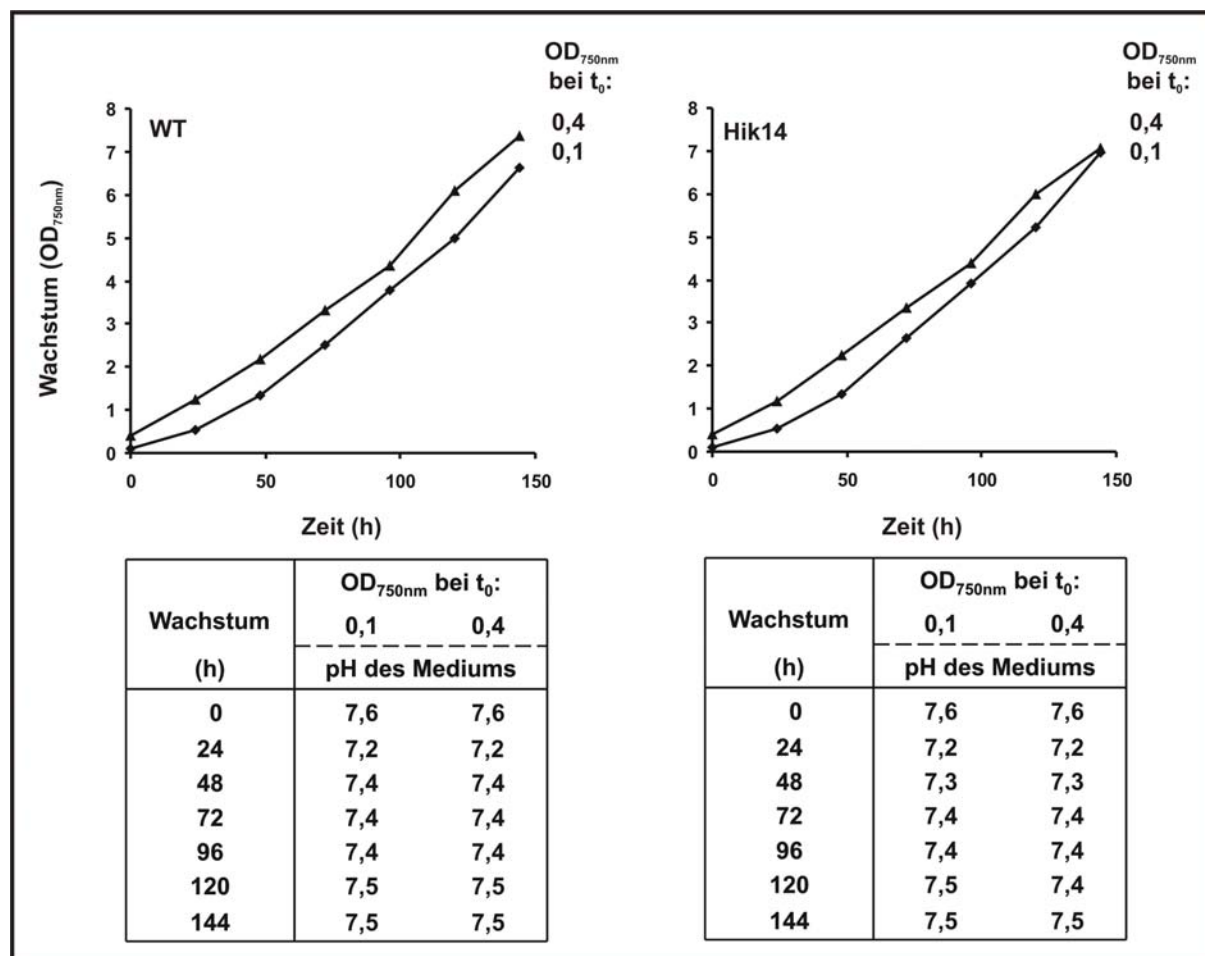


Abb. 3.15: Wachstum von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 in BG11-Medium mit 50 mM Epps-NaOH pH 7,5 und unterschiedlichen Animpfdichten.

WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (mit 50 mM Epps-NaOH pH 7,5) mit Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtintensität von 60 μE m⁻² s⁻¹ angezogen. Mit zweitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit Zelldichten von OD_{750nm} von 0,1 und 0,4 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 144 h. Gezeigt sind die Wachstumskurven und die dazu gehörenden pH-Werte des Mediums.

Die Tab. 3.3 auf der folgenden Seite zeigt, dass für die Anzucht von WT und Mutante das pH-Optimum des BG11-Mediums während der Begasung der Zellen mit Luft / 2 % CO₂ zwischen 7,0 und 7,5 liegt. Für diese Versuche wurde das BG11-Medium mit 50 mM Mops-NaOH für die pH-Werte 6,5 und 7,0 gepuffert und mit 50 mM Epps-NaOH für die pH-Werte 7,5 und 8,5 gepuffert.

		pH-Wert des BG11-Mediums							
		6,5		7,0		7,5		8,5	
Anzucht		OD _{750nm}							
(h)	WT	Hik14	WT	Hik14	WT	Hik14	WT	Hik14	
0	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	
6	0,17	0,16	0,14	0,17	0,14	0,16	0,14	0,14	
24	0,27	0,30	0,28	0,44	0,31	0,45	0,30	0,32	
30	0,33	0,37	0,35	0,57	0,39	0,59	0,41	0,41	
48	0,58	0,60	0,69	1,19	0,79	1,23	0,78	0,81	

Tab. 3.3: Anzucht von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 in BG11-Mediums mit pH-Werten im Bereich von pH 6,5 bis pH 8,5.

WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (zusätzlich gepuffert mit 50 mM Mops-NaOH für die pH-Werte 6,5 und 7,0, sowie mit 50 mM Epps-NaOH für die pH-Werte von 7,5 und 8,5) mit Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtintensität von 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit zweitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit einer Zelldichte von OD_{750nm} von 0,1 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 48 h.

3.4.3 Anzucht von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 mit Ammonium als N-Quelle

Auch bei einer Lichtintensität von 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kann Hik14 in BG11-Medium mit Epps-Puffer und mit einer geringen Animpfdichte (OD_{750nm} von 0,1) ebenfalls mit anderen Stickstoff-Quellen wachsen. Wie auch in Abb. 3.11 für 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gezeigt, wurde auch hier das im BG11-Medium enthaltene Nitrat durch 5 mM Ammoniumchlorid ersetzt (siehe Abb. 3.16). Im Vergleich zum WT zeigt die Mutante nach 72 h schon ein deutlich höheres Wachstum, welches nach 120 h Anzucht das Wachstum des WTs um 25,5 % übersteigt. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass auch bei 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ die Mutante vergleichbar zum WT oder sogar besser wächst, wenn das BG11-Medium mit Epps-NaOH pH 7,5 zusätzlich gepuffert ist.

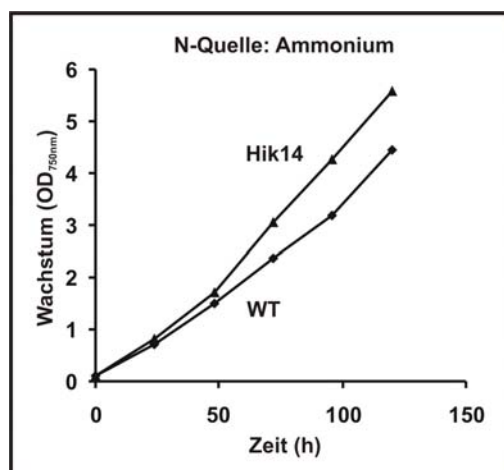


Abb. 3.16: Anzucht von WT und Hik14 mit Ammonium als N-Quelle.

WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (mit 50 mM Epps-NaOH pH 7,5) mit 5mM Ammoniumchlorid als N-Quelle, mit Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtintensität von 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit zweitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit einer Zelldichte von OD_{750nm} von 0,1 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 120 h.

3.4.4 Vergleichende Analysen der 77 K Pigment-Fluoreszenz

Für die weitere Charakterisierung von *Synechocystis* WT und Hik14 wurden die Zellen in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtintensität von 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Es wurde eine niedrige und eine hohe Animpfdichte ($\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,1 und 0,4) eingesetzt. Zur Messung der 77 K Pigment-Fluoreszenz wurden die Zellen nach 48 h geerntet, auf eine Chlorophyll-Konzentration von 1 $\mu\text{g ml Kultur}^{-1}$ eingestellt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Direkt im Anschluss wurde die Pigment-Fluoreszenz bei 77 K gemessen. Zuordnung der einzelnen Maxima siehe unter Abschnitt 3.2.3 Analysen der 77 K Pigment-Fluoreszenz.

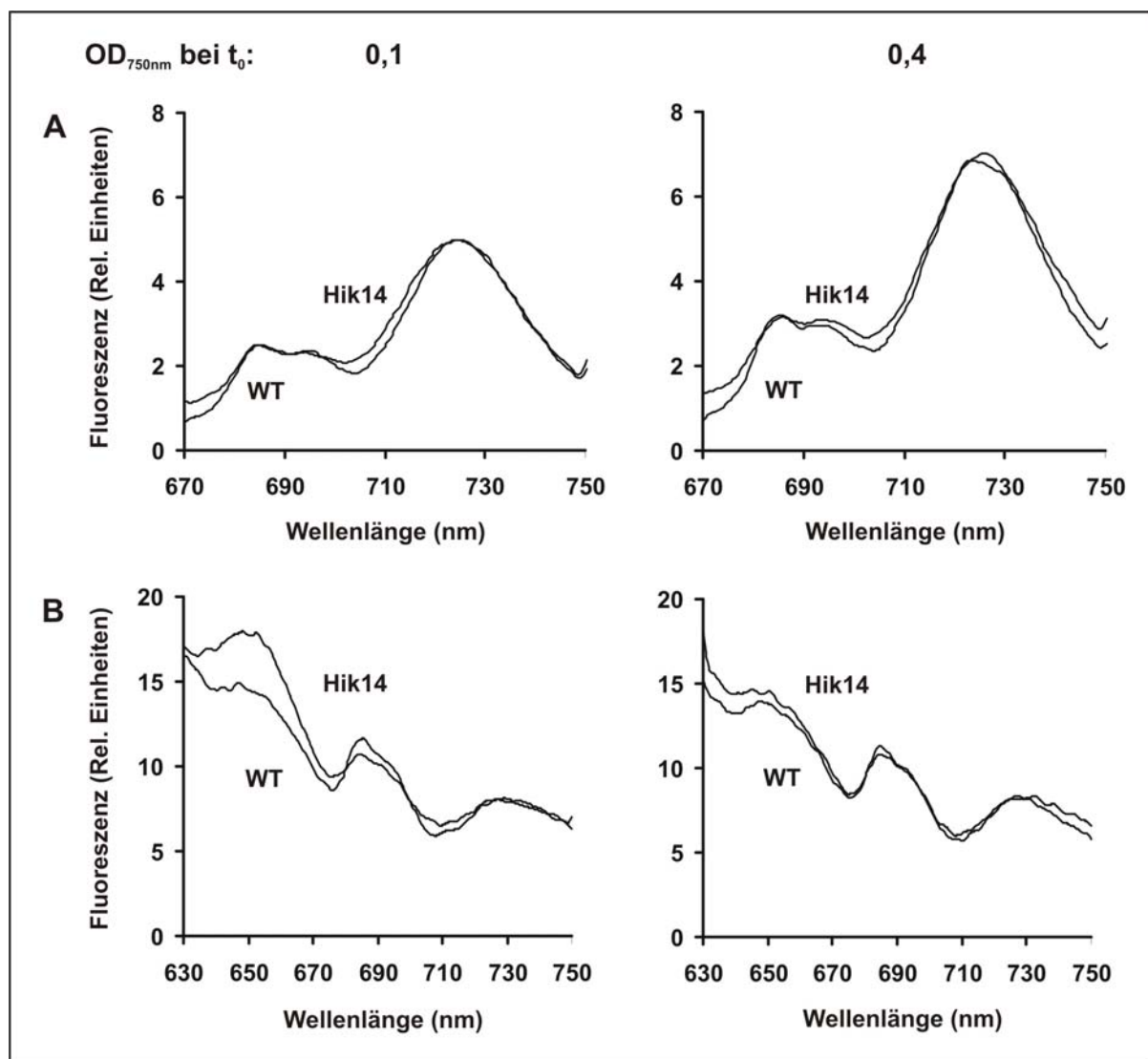


Abb. 3.17: Vergleichende Analyse der Pigment-Fluoreszenz bei 77 K von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14.

WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtintensität von 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit zweitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit einer Zelldichte von $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,1 und 0,4 angeimpft. Die Anzucht erfolgte für 48 h.

A: Chlorophyll a-Fluoreszenz nach Anregung mit Licht von 435 nm.

B: Phycocyanobilin-Fluoreszenz nach Anregung mit Licht von 600 nm.

Die Kurven wurden jeweils auf den PS I-Peak normiert.

Wie in den Ergebnissen der Messungen bei einer Lichtintensität von $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Abb. 3.7), zeigte sich auch bei Anzucht mit $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kein wesentlicher Unterschied zwischen WT und Mutante nach Chlorophyll-Anregung mit Licht von 435 nm. Andererseits ist die Fluoreszenz der Phycobiline in der Mutante nach entsprechender Anregung mit Licht von 600 nm auch hier deutlich höher, wenn Hik14 mit einer geringen Zelldichte angeimpft wurde. Auch dieses Ergebnis deutet auf ein teilweises Ablösen der Phycobilisomen von den Reaktionszentren hin. Bei einer hohen Animpfdichte ist auch hier wieder kein Unterschied zwischen WT und Hik 14 festzustellen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.17 dargestellt.

3.4.5 Vergleichende Analysen der photosynthetischen Sauerstoff-Entwicklung

In diesem Versuch wurde die photosynthetische Sauerstoff-Entwicklung mit Bicarbonat als Elektronen-Akzeptor gemessen. WT und Hik14 wurden mit BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit Begasung mit Luft / 2 % CO_2 und einer Lichtintensität von $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit zweitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit einer Zelldichte von $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,1 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 48 h, 72 h und 96 h.

	Wachstum $\text{OD}_{750\text{nm}}$	Chlorophyll $\text{mg } 100 \mu\text{l GZV}^{-1}$	Photosynthetische O_2 -Evolution $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NaHCO}_3$	
			$100 \mu\text{l GZV}^{-1} \text{h}^{-1}$	$\mu\text{mol O}_2$ $\text{mg Chl}^{-1} \text{h}^{-1}$
Wachstum für 48 h				
WT	0,81	0,38	87,5	231,2
Hik14	0,51	0,42	81,7	193,5
Wachstum für 72 h				
WT	1,18	0,49	106,5	209,9
Hik14	0,64	0,39	57,9	149,0
Wachstum für 96 h				
WT	1,92	0,46	107,7	232,6
Hik14	0,76	0,32	42,9	135,8

Tab. 3.4: Photosynthetische Sauerstoff-Entwicklung von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14.

WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit Begasung mit Luft / 2 % CO_2 und einer Lichtstärke von $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit zweitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit einer Zelldichte von $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,1 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 48 h, 72 h und 96 h.

Im Reaktionsansatz wird die O_2 -Entwicklung mit Bicarbonat als Elektronen-Akzeptor bei einer Lichtintensität von $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und mit $5 \mu\text{g}$ Chlorophyll gemessen.

Die Tab. 3.4 zeigt, dass über die gesamte Anzucht-Phase das Wachstum und der Chlorophyll-Gehalt in der Mutante geringer als im WT sind (lediglich nach 48 h ist der Chlorophyll-Gehalt der Mutante mit dem des WTs vergleichbar). Die Werte für die photosynthetische Aktivität sind wieder auf gepacktes Zellvolumen (GZV) und auf mg Chlorophyll bezogen. Auf Chlorophyllbasis ist die Aktivität der Mutante nach 48 h um 16,3 % geringer als im WT, nach 72 h um 29 % und nach 96 h um 41,6 %.

3.4.6 Vergleichende Analyse der Nitratreduktase-Aktivität

Die Aktivität der Nitratreduktase wurde als NO_2^- -Bildung mit Dithionit-reduziertem Methylviologen gemessen. *Synechocystis* WT und Hik14 wurden hierzu in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit Begasung mit Luft / 2 % CO_2 und einer Lichtintensität von $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit zweitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit einer Zelldichte von $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,1 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 24 h, 48 h und 72 h. Wie die Ergebnisse der Tab. 3.5 zeigen, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und Mutante in Bezug auf die Nitratreduktase-Aktivität gemessen werden.

Kultur	Anzuchtdauer (h)	Wachstum ($\text{OD}_{750\text{nm}}$)	Nitratreduktase-Aktivität $\mu\text{mol NO}_2^-$ gebildet $100 \mu\text{l GZV}^{-1} \text{min}^{-1}$
WT	24	0,35	0,601
	48	1,19	0,745
	72	2,05	0,575
Hik14	24	0,24	0,624
	48	0,51	0,793
	72	1,61	0,672

Tab. 3.5: Messung der Nitratreduktase-Aktivität von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14. WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit Begasung mit Luft / 2 % CO_2 und einer Lichtintensität von $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit zweitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit einer Zelldichte von $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,1 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 24 h, 48 h und 72 h.

3.4.7 Vergleichende Analysen der respiratorischen Sauerstoff-Aufnahme

Bei diesen Analysen wurde die potentielle respiratorische Aktivität der Cytoplasmamembran bestimmt. Es wurde der Sauerstoff-Verbrauch von intakten Zellen im Dunkeln vor und nach EDTA-Zugabe gemessen. Da EDTA nicht von den Zellen aufgenommen wird, bedeutet dessen Stimulierung der Sauerstoff-Aufnahme, dass EDTA Kationen bindet und dadurch eine respiratorische Aktivität in der Cytoplasmamembran nachweisbar wird. Durch Zugabe von CaCl_2 konnte diese Aktivität wieder gehemmt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass KCN diese respiratorische Aktivität hemmt, was beweist, dass die Sauerstoff-Aufnahme

über die terminale Cytochrom-Oxidase erfolgt. Somit detektiert dieser Test die potentielle Kapazität der Respiration in der Cytoplasmamembran und das Vorhandensein von einem bisher nicht identifizierten endogenen Substrat. WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtstärke von 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit zweitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit einer Zelldichte von OD_{750nm} von 0,1 oder 0,4 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 48 h bzw. 72 h.

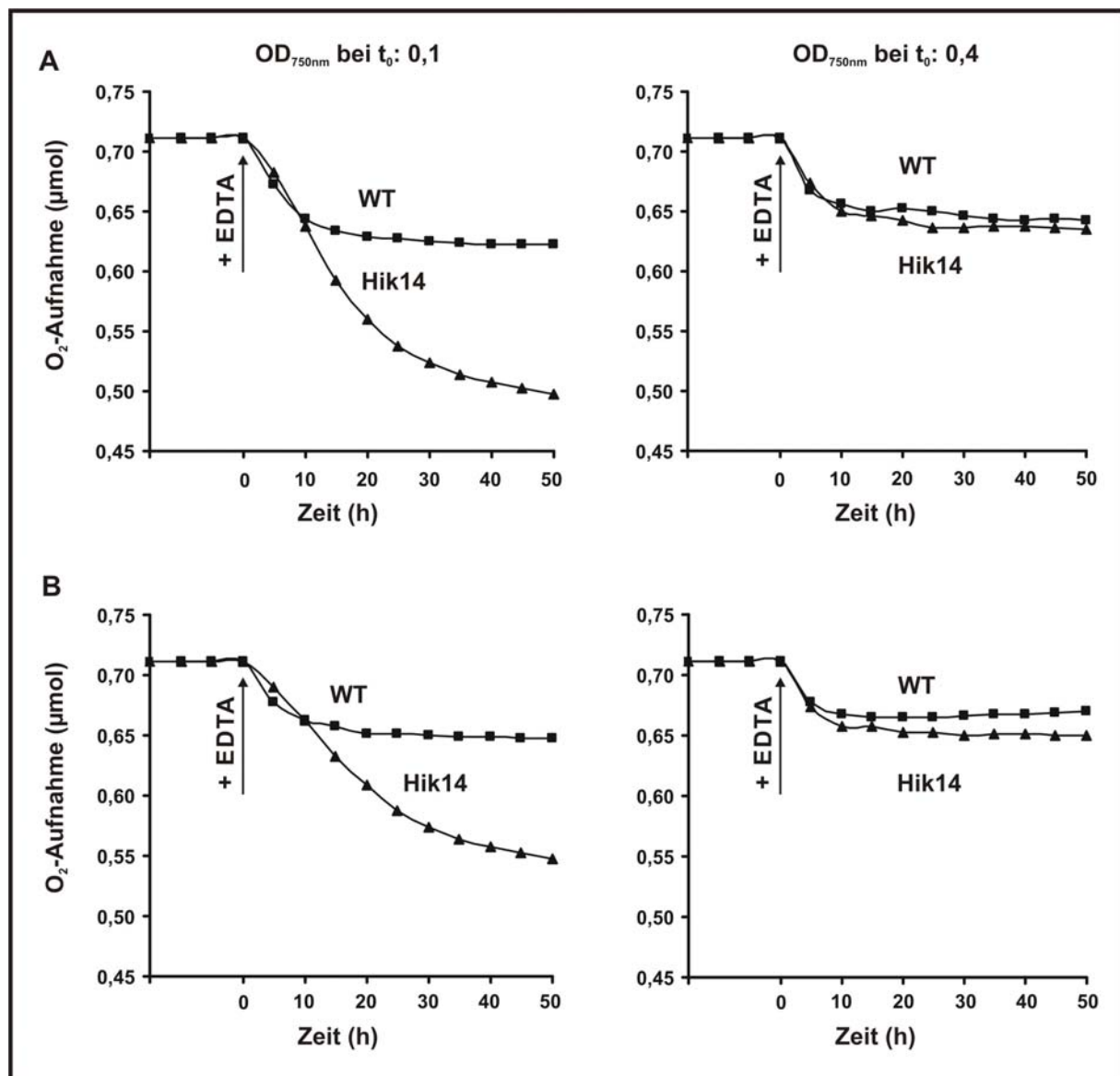


Abb. 3.18: Respiratorische Sauerstoff-Aufnahme von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14.

WT und Hik14 wurden mit BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtintensität von 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit zweitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit einer Zelldichte von OD_{750nm} von 0,1 (links) sowie 0,4 (rechts) angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 48 h (A), sowie 72 h (B). Die Sauerstoff-Aufnahme von intakten Zellen wurde vor und nach Zugabe von EDTA gemessen.

Die Ergebnisse in Abb. 3.18 zeigen, dass bei einer Animpfdichte von OD_{750nm} von 0,1 Hik14 eine deutlich höhere EDTA-stimulierte potentielle respiratorische Aktivität besitzt als der

WT. Dies war nicht der Fall wenn die Zellen mit OD_{750nm} von 0,4 angeimpft worden waren. Hier zeigten WT und Mutante miteinander vergleichbare Respirations-Raten.

3.4.8 Northern-Blot-Analysen von ausgewählten Transkripten

Für die Northern-Blot-Analysen wurden Proben von WT und Hik14 verwendet, die mit BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit Begasung mit Luft / 2 % CO_2 und mit einer Lichtstärke von $60 \mu E m^{-2} s^{-1}$ angezogen worden waren. Angeimpft wurde mit niedriger (OD_{750nm} von 0,1) und hoher (OD_{750nm} von 0,4) Zelldichte. Die Anzucht erfolgte für 48 h.

Es wurden die nachfolgend aufgelisteten Transkripte untersucht:

- mRNA für PetH (Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase)
- mRNA der Untereinheiten des NDH-1 Komplexes: Ndh-1-H, Ndh-D1-4
- mRNA für PetC1 und PetC3 (Rieske-Fe-S-Protein des Cytochrom *b6/f*-Komplexes)
- mRNA für Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (*slr1096*, Gen auch als *lpdA* bezeichnet, Proteinbezeichnung ist Lpd, E3-Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes)
- mRNA für Pyruvat-Dehydrogenase (*slr1934*, E1-Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes)

Die ausgewählten Transkripte kodieren für Proteine, die direkt oder indirekt an der Respiration der Cytoplasmamembran oder an der Kohlenstoffaufnahme beteiligt sind. Sie wurden ausgewählt, da die vorangegangenen Untersuchungen Hinweise dafür geliefert hatten, dass die Mutante weniger effektiv von einer HCO_3^- -Aufnahme auf eine CO_2 -Assimilation umstellen kann und die Respiration in der Cytoplasmamembran weniger effektiv herunterreguliert ist.

Die Northern-Blot Analysen (siehe Abb. 3.19) ergaben folgendes Ergebnis:

Der Hauptunterschied zwischen WT und Mutante wurde in den Transkriptmengen von *petH* und *ndhD4* detektiert, und zwar dann wenn die Kulturen mit einer geringen Zelldichte angeimpft wurden. Unter diesen Bedingungen sind die Transkriptmengen von *petH* und *ndhD4* in der Mutante niedriger als im WT. Bei hoher Animpfdichte ist kein Unterschied zwischen WT und Hik14 nachweisbar.

PetH kodiert für die Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase und hat eine Funktion in der NADP⁺-Reduktion und im zyklischen Elektronentransport um PS I (VAN THOR *et al.* 2000; MATTHIJS *et al.* 2002). Es gibt Hinweise, dass der zyklische Elektronentransport an der Umwandlung von CO_2 zu HCO_3^- beteiligt ist (KAPLAN & REINHOLD 1999; PRICE *et al.* 2002; SHIBATA *et al.* 2002; BADGER & PRICE 2003).

Bei der Umwandlung von CO_2 zu HCO_3^- spielen spezialisierte NDH-1 Komplexe eine Rolle, die die Untereinheiten NdhD3 oder NdhD4 enthalten. Während mit NdhD3 kein Unterschied zwischen WT und Mutante festzustellen war, ist die Transkriptmenge von NdhD4 nach Animpfen mit geringer Zelldichte im WT höher als in der Mutante. Nach Animpfen mit hoher Zelldichte ist kein Unterschied zwischen WT und Mutante erkennbar.

Die Untersuchung von Transkripten der Gene, die für respiratorische Proteine kodieren, haben trotz höherer Respiration der Mutante im Vergleich zum WT (siehe Abb. 3.18), entweder keine Unterschiede erbracht oder die gemessenen Unterschiede waren nicht konstant zu reproduzieren: *ndhD1* und *ndhD2* kodieren für Untereinheiten des NDH-1 Komplexes, die an der Respiration beteiligt sind.

Gewisse Unterschiede sind auch für das Rieske-Protein des Cyt *b6/f*-Komplexes detektiert worden. Es gibt drei Formen des PetC-Proteins, die von den Genen *petC1: sll1316*, *petC2: slr1185* und *petC3: sll1182* kodiert werden. Die Proteine PetC1 und PetC2 sind Komponenten des regulären Cytochrom-Komplexes. Die Funktion von PetC3, das ein höheres Redoxpotential besitzt (+ 135 mV, SCHNEIDER 2000), ist unklar. Laut Rögner (persönliche Mitteilung) ist PetC3 an der Cytoplasmamembran lokalisiert und könnte somit am respiratorischen Elektronentransport beteiligt sein. Meine Ergebnisse zeigen, dass die Transkriptmenge für PetC1 in der Mutante reduziert ist, während für PetC3 eine höhere Transkriptmenge für Hik14 detektiert wurde.

Weitere an der Respiration der Cytoplasmamembran beteiligte Komponenten sind der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, mit den drei Untereinheiten Pyruvat-Dehydrogenase (E1), Dihydrolipoyl-Transacetylase (E2) sowie die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E3) (Stryer 1987; ENGELS & PISTORIUS 1997). Mittels Northern Blot-Analyse wurden die Untereinheit E1 (*slr1934*) sowie die Untereinheit E3 (*lpdA*) untersucht. Bei Anzucht mit einer geringen Zelldichte, war die Transkriptmenge von *slr1934* und *lpdA* in der Mutante erhöht. Allerdings unterlag dieses Ergebnis Schwankungen, sodass dieser Unterschied nicht konstant reproduzierbar war. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass die Transkriptmenge dieser Gene sehr leicht durch den Zustand des Stoffwechsels beeinflusst wird.

Die Untersuchung von *ndhH*-mRNA hat keinen Unterschied zwischen WT und Mutante gezeigt. Der Nachweis der Transkriptmengen von *rnpB* diente nur der Kontrolle, um zu dokumentieren, dass gleiche mRNA-Mengen auf die Gele aufgetragen wurden.

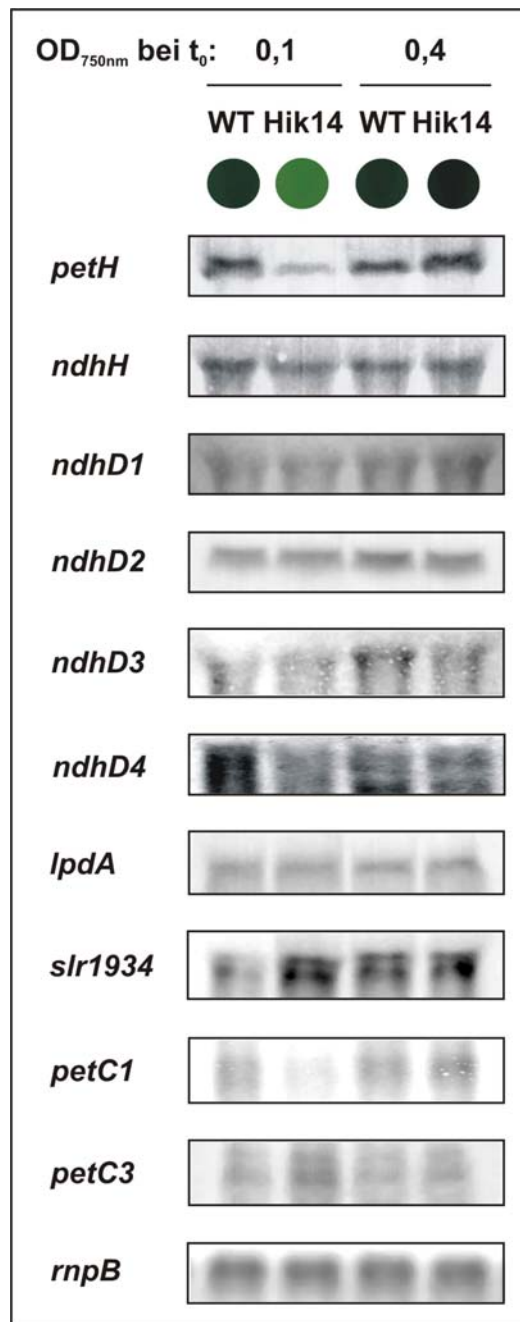


Abb. 3.19: Northern Blot-Analyse von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Mutante Hik14.

WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtintensität von 60 μE m⁻² s⁻¹ angezogen. Mit zweitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit einer Zelldichte von OD_{750nm} 0,1 und 0,4 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 48 h.

3.4.9 Western-Blot-Analysen von ausgewählten Proteinen

Da die physiologischen Messungen Unterschiede in der photosynthetischen Aktivität zwischen WT und Hik14 zeigten und da die Northern Blot-Analysen Hinweise auf einen Unterschied in Bezug auf die Transkriptmenge für Lpd gaben, wurden die Proben in Western Blot-Analysen mit den in der Arbeitsgruppe vorhandenen Antikörper gegen Proteine der photosynthetischen Elektronentransport-Kette sowie gegen Lpd untersucht. Für die Western-Blot Analysen wurden Proben von WT und Hik14 verwendet, die wie unter Abschnitt 3.4.8 beschrieben angezogen wurden.

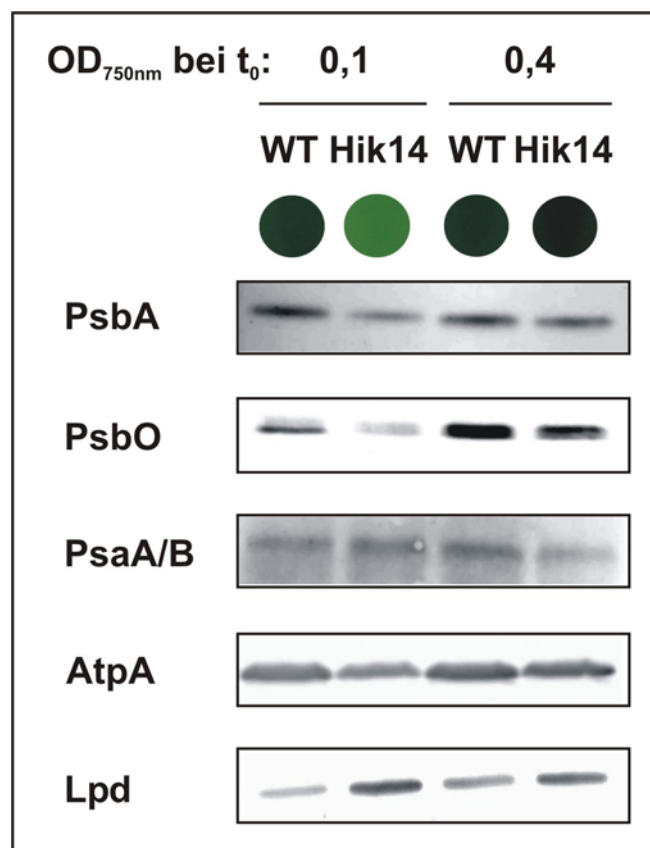


Abb. 3.20: Western Blot-Analysen von *Synechocystis* PCC 6803 Wildtyp und Mutante Hik14. WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit Begasung mit Luft / 2 % CO_2 und einer Lichtintensität von $60 \mu E m^{-2} s^{-1}$ angezogen. Mit zweitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit einer Zelldichte von OD_{750nm} von 0,1 und 0,4 angeimpft. Die Anzucht-dauer betrug 48 h.

Die Western-Blot Analysen (siehe Abb. 3.20) ergaben einen leichten Unterschied in der Menge von PsbA und eine signifikant niedrigere Menge an PsbO in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp, wenn die Kulturen mit einer geringen Zelldichte angeimpft wurden. Diese Beobachtung stimmt gut mit der geringeren photosynthetischen Aktivität der Mutante im Vergleich zum Wildtyp unter den in Abschnitt 3.4.8 genannten Bedingungen überein (siehe

auch Tab. 3.4). Die Protein-Menge von PsaA/B (PS I) zeigte keine Unterschiede zwischen WT und Hik14. Im Gegensatz dazu war die AtpA-Menge in der Mutante sowohl bei niedriger als auch bei hoher Animpfdichte im Vergleich zum WT reduziert. Einer der Hauptunterschiede war die Menge von Lpd, welches eine Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes ist und in *Synechocystis* PCC 6803 mit der Cytoplasmamembran assoziiert ist (ENGELS & PISTORIUS 1997). Die Protein-Menge von Lpd war in der Mutante signifikant höher als im Wildtyp, insbesondere dann, wenn die Kulturen mit einer niedrigen Zelldichte angeimpft wurden, aber auch bei Animpfen mit einer hohen Zelldichte.

3.4.10 Metaboliten-Analysen

Da die Mutante sowohl in ihrer Photosynthese- als auch in ihrer Respirations-Aktivität Unterschiede zum WT aufwies, sollte untersucht werden, ob sich diese Abweichungen auch in dem Metaboliten-Status der Mutante wiederfinden. Hierzu wurden WT und Hik14 in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtstärke von 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Nach Animpfen mit einer Zelldichte von OD_{750nm} 0,1 und 0,4 wurden die Kulturen für 48 h angezogen.

Es wurden alle hydrophilen Metabolite untersucht, die in BARSCH *et al.* (2004) aufgeführt sind. Ein gut reproduzierbarer Unterschied wurde beim Pyruvat-Gehalt festgestellt, wenn die Zellen mit einer niedrigen Animpfdichte angezogen wurden. Dies stimmt gut überein mit dem Ergebnis, dass das Protein Lpd, als Bestandteil der Pyruvat-Dehydrogenase, in größerer Menge in der Mutante vorhanden ist als im WT, und dass die Mutante eine höhere respiratorische Aktivität an der Cytoplasmamembran besitzt. Dadurch wird Pyruvat in der Mutante stärker umgesetzt als im WT, was sich in einer niedrigeren Pyruvat-Menge widerspiegelt. Die Werte für Pyruvat in der Mutante entsprechen 36 % bis 55 % der WT-Werte. Im Gegensatz dazu waren die Pyruvat-Mengen zwischen WT und Mutante nach Anzucht mit hoher Animpfdichte miteinander vergleichbar.

Das reduzierte Wachstum der Mutante bei niedriger Animpfdichte (siehe Abb. 3.13) führte auch zu einem deutlich geringeren L-Glutamat-Gehalt. Wurden die Kulturen dagegen mit hohen Zelldichten angeimpft, war kein Unterschied in der L-Glutamat-Menge zwischen WT und Hik14 zu erkennen.

OD _{750nm} an t ₀ :	0,1		0,4	
Kultur	WT	Hik14	WT	Hik14
Pyruvat-Konzentration: Rel. Einheiten				
1. Experiment	1,196	0,661	0,977	1,128
2. Experiment	0,870	0,381	0,891	0,944
3. Experiment	0,460	0,177	-	-
4. Experiment	0,436	0,155	-	-
L-Glutamat-Konzentration: Rel. Einheiten				
1. Experiment	31,672	3,953	60,553	98,847
2. Experiment	130,086	82,510	116,058	116,356
3. Experiment	31,490	1,317	-	-
4. Experiment	106,734	1,573	-	-

Tab. 3.6: Untersuchung der relativen Konzentration von Pyruvat und L-Glutamat aus *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14.

WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtintensität von 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mit zweitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit einer Zelldichte von OD_{750nm} 0,1 und 0,4 angeimpft. Die Anzucht-dauer betrug 48 h. Dargestellt sind die Pyruvat- und die L-Glutamat-Konzentration als relative Einheiten.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Um einen Einfluss durch Photoinhibition als Sekundär-Effekt möglichst gering zu halten, wurden die Versuche bei einer Belichtung der Zellen mit 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durchgeführt.

Die Zellen wurden in BG11-Medium ohne Epps-Puffer, mit einer Begasung mit Luft / 2 % CO₂ angezogen und mit einer OD_{750nm} von 0,1 (niedrige Zelldichte) und 0,4 (hohe Zelldichte) angeimpft. Wurden die Zellen mit einer niedrigen Zelldichte in BG11-Medium ohne Epps-Puffer angeimpft, ergaben sich nachfolgende Unterschiede zwischen WT und Mutante hinsichtlich des Wachstums und ausgewählter Charakteristika:

- Bei Anzucht von WT und Mutante mit einer niedrigen Zelldichte ist die 77 K Phycobilisomen-Fluoreszenz in der Mutante erhöht. Ihre photosynthetische Aktivität ist gegenüber dem WT reduziert. Western Blot-Analysen zeigten, dass die Protein-Menge von PsbA (D1) und PsbO (MSP) in der Mutante geringer war als im WT.
- Die Messung der Nitrat-Reduktase-Aktivität ergab keinen wesentlichen Unterschied zwischen WT und Mutante.
- Wachstumsanalysen zeigten, dass die Mutante nach Animpfen mit einer niedrigen Zelldichte ein deutlich reduziertes Wachstum im Vergleich zum WT zeigte. Während der Anzucht sank durch die Begasung mit Luft / 2 % CO₂ der pH-Wert des BG11-Mediums (ohne Epps-Puffer) nach 24 h Anzucht unter pH 7,0, was vom WT in kürzerer Zeit

kompensiert werden konnte als von der Mutante. Da bei einer pH-Absenkung die Assimilation von CO_2 relativ zur HCO_3^- -Aufnahme optimiert werden muß, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Mutante ihre C-Aufnahme nicht so effektiv wie der WT von HCO_3^- -Assimilation auf CO_2 -Assimilation umstellen kann. Diese Theorie wird durch die Ergebnisse der Northern Blot-Analysen unterstützt. Die Transkriptmenge der Untereinheiten des NDH-1 Komplex *ndhD1* und *ndhD2* sind in WT und Mutante fast gleich. Im Gegensatz dazu ist die mRNA-Menge für *ndhD4* in der Mutante niedriger als im WT. NdhD4 spielt eine Rolle bei der Umwandlung von CO_2 zu HCO_3^- . Die für diesen Vorgang benötigte Energie wird vorrangig vom zyklischen Elektronentransport um PS I geliefert. An diesem ist auch die Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase (PetH) beteiligt, deren Transkriptmenge in der Mutante ebenfalls geringer als im WT ist.

- Außerdem ist die Respiration an der Cytoplasmamembran in der Mutante höher als im WT. Die Proteinmenge von Lpd, die eine Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes ist, ist in der Mutante ebenfalls höher als im WT, was sehr gut mit der erhöhten Respiration in der Mutante korreliert. Ein weiterer Hinweis für eine höhere Respiration in der Mutante im Vergleich zum WT ist die im Rahmen der Metaboliten-Messung nachgewiesene niedrigere Pyruvat-Konzentration in der Mutante als im WT.
- Das geringere Wachstum der Mutante im Vergleich zum WT geht gut einher mit der in der Metaboliten-Messung gezeigten geringeren Glutamat-Menge, da dies demonstriert, dass die Mutante unter diesen Umständen nicht in der Lage ist, Glutamat als Speichersubstanz im gleichen Ausmaß wie der WT aufzubauen.

Wenn die Kulturen mit einer hohen Zelldichte angeimpft wurden, konnte die pH-Absenkung sowohl vom WT als auch von der Mutante bereits nach 48 h kompensiert werden, was sich auch in einem vergleichbaren Wachstum beider Kulturen zeigt. Unter diesen Bedingungen war das Wachstum der Mutante im Vergleich zum WT sogar um 36 % erhöht, was darauf hindeutet, dass das Fehlen der Histidin-Kinase unter bestimmten Bedingungen einen Vorteil für die Zellen darstellt.

In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen in BG11-Medium mit Epps-NaOH pH 7,5, mit einer Begasung mit Luft / 2 % CO_2 angezogen und mit einer $\text{OD}_{750\text{nm}}$ von 0,1 (niedrige Zelldichte) und 0,4 (hohe Zelldichte) angeimpft.

- Unter diesen Anzucht-Bedingungen zeigten sowohl der WT als auch die Mutante unabhängig von der Animpfdichte ein vergleichbares Wachstum.
- Untersuchungen des pH-Optimums für die Anzucht haben gezeigt, dass der optimale pH-Bereich 7,0 bis 7,5 beträgt.

4. Diskussion

In Prokaryoten sind sogenannte „Zwei-Komponenten-Systeme“, die aus einer Histidin-Kinase und einem Response-Regulator bestehen, häufig an Signaltransduktionskaskaden beteiligt (PARKINSON & KOFOID 1992; ALEX & SIMON 1994; CHANG & STEWART 1998; STOCK *et al.* 2000). Für *E. coli* wurde z. B. gezeigt, dass mindestens zwei Histidin-Kinasen, nämlich ArcB und BarA, an der Regulation des Kohlenstoff-Metabolismus beteiligt sind (MALPICA *et al.* 2004; PERNESTIG *et al.* 2003). In Cyanobakterien liegt dagegen eine wesentlich komplexere Interaktion der verschiedenen Stoffwechselvorgänge als in *E. coli* vor, da in Cyanobakterien nicht nur Respiration und Kohlenstoff-Metabolismus, sondern zusätzlich noch die Photosynthese und die CO₂-Assimilation miteinander koordiniert werden müssen. Es war somit davon auszugehen, dass ebenfalls eine (oder auch mehrere) Histidin-Kinasen an der Koordination dieser Stoffwechselwege beteiligt sind.

Da die vollständige Genomsequenz des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 vorliegt und da für dieses Cyanobakterium gezeigt worden war, dass es 42 putative Histidin-Kinasen besitzt, wurde dieser Organismus gewählt, um einen Beitrag zum Verständnis der komplexen Wechselbeziehung zwischen Photosynthese/Respiration und Kohlenstoff-Anabolismus/Katabolismus zu erarbeiten (KANEKO *et al.* 1996; MIZUNO *et al.* 1996).

Am Anfang dieser Arbeit stand eine bioinformatische Analyse zur Auswahl einer Histidin-Kinase, die einen möglichen Kandidaten für eine solche Kinase repräsentiert, welche die oben definierte Funktion haben könnte. Es wurde die Histidin-Kinase Slr1759 ausgewählt, da es sich bei dieser um eine Hybrid-Sensor-Kinase handelt, die sowohl eine Receiver- als auch eine Transmitter-Domäne trägt.

Die Histidin-Kinase Slr1759 besitzt die nachfolgende Domänenstruktur (Abb. 4.1):

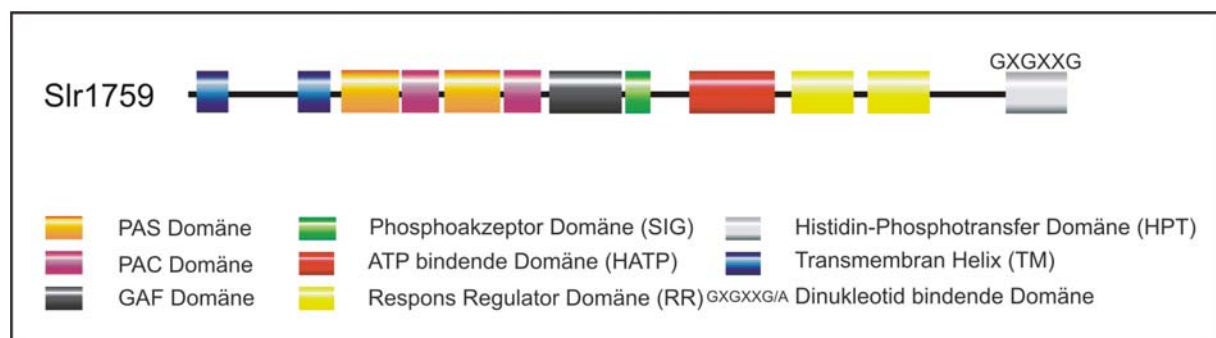


Abb. 4.1: Domänenstruktur der Histidin-Kinase Slr1759.

Diese Kinase ist Membran-assoziiert. Sie besitzt zwei PAS-Domänen, die für ein Redox-Signalling geeignet sind, und außerdem eine extrem komplexe Domänen-Struktur, was auf die Detektion und Integration verschiedener Signale hindeutet. Slr1759 erschien uns somit als ein besonders gut geeigneter Kandidat für eine mögliche Funktion bei der Koordination des Kohlenstoff-Metabolismus in *Synechocystis* PCC 6803.

Im zweiten Teil meiner Arbeit wurden vergleichende Untersuchungen von *Synechocystis* PCC 6803 WT und einer Slr1759-freien Mutante durchgeführt, um zu klären, welche Funktion diese Histidin-Kinase im Stoffwechsel von *Synechocystis* PCC 6803 besitzt. Die Mutante wurde mir von Prof. Murata und Prof. Suzuki (SUZUKI *et al.* 2000) zur Verfügung gestellt.

Die Analysen des Wachstums ergaben, dass ein deutlicher Unterschied im Wachstum von WT und Mutante nur unter ganz genau definierten Bedingungen detektiert werden konnte. Bei diesen handelt es sich um eine Anzucht mit BG11-Medium (ohne zusätzlichen Epps-Puffer), mit einer Begasung mit Luft / 2 % CO₂, einer Belichtung mit 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einer Animpfdichte von OD_{750nm} im Bereich von 0,2 – 0,3 oder einer Belichtung mit 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einer Animpfdichte von OD_{750nm} im Bereich von 0,1.

Die Ergebnisse der Wachstumsanalysen zeigten, dass ein deutlicher Unterschied zwischen WT und Mutante detektierbar war, wenn Metaboliten-reiche Zellen in BG11-Medium (ohne zusätzlichen Epps-Puffer) verdünnt und mit CO₂ angereicherter Luft begast wurden. Diese Art von Begasung des Mediums führte jeweils zu Beginn der Anzucht zu einem Abfall des pH-Wertes im Medium von pH 7,3 auf pH 6,6 beim WT und auf pH 6,3 bei der Mutante. Unter diesen Bedingungen zeigte die Mutante eine wesentlich längere Phase mit einem reduzierten Wachstum als der WT. Das heißt, dass die Mutante bedeutend länger als der WT benötigte, um logarithmisches Wachstum zu erreichen. Wurden die Zellen mit einer hohen Zelldichte angeimpft, dann konnten sowohl der WT als auch die Mutante den Abfall des pH-Wertes bereits nach 48 h kompensieren. Dementsprechend gut war das Wachstum der Zellen, das während der gesamten Anzuchtdauer linear verlief. Wenn das BG11-Medium zusätzlich mit Epps-NaOH pH 7,5 gepuffert wurde, war dieser Abfall des pH-Wertes im Medium nicht vorhanden und WT und Mutante zeigten ein vergleichbares Wachstum. In Abb. 4.2 ist der hauptsächliche Unterschied im Wachstum von WT und Mutante noch einmal dokumentiert.

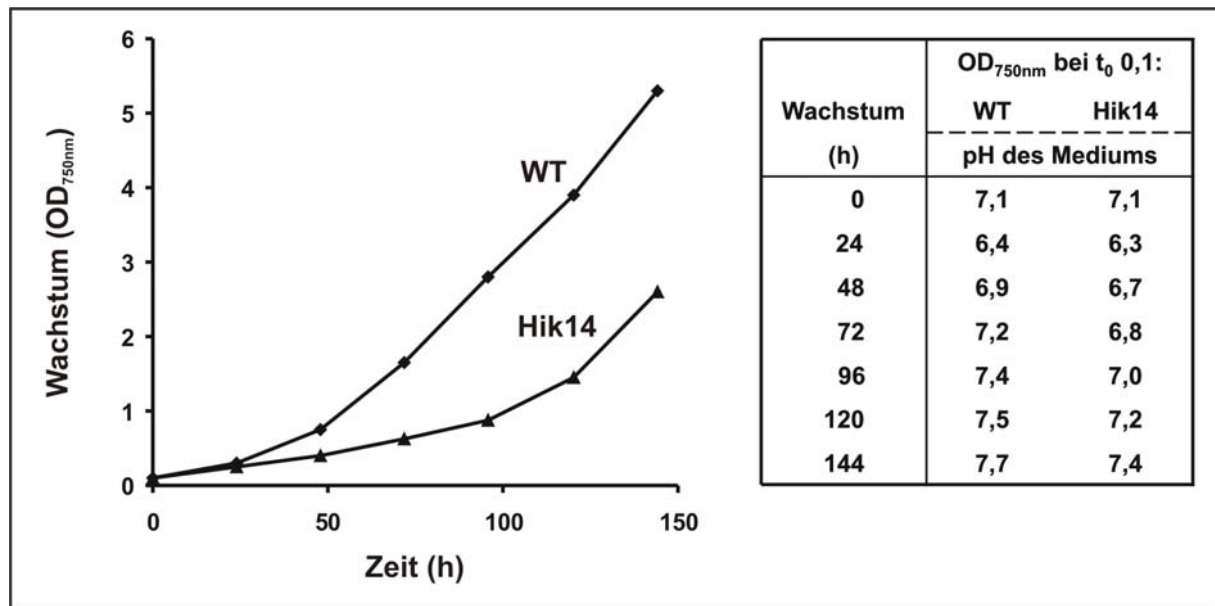


Abb. 4.2: Wachstum von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Hik14 nach Animpfen mit einer Zelldichte von OD_{750nm} von 0,1.

WT und Hik14 wurden in BG11-Medium (ohne Epps-Puffer) mit Begasung mit Luft / 2 % CO₂ und einer Lichtintensität 60 μE m⁻² s⁻¹ angezogen. Mit zweitägigen Stammkulturen wurden die Versuchsansätze mit einer Zelldichte von OD_{750nm} von 0,1 angeimpft. Die Anzuchtdauer betrug 144 h. Dargestellt sind die Wachstumskurven der Zellen und die pH-Werte der Medien während der Wachstumsphase.

Die Abbildung zeigt, dass die Mutante nach einer Phase reduzierten Wachstums (nach 96 h) in vergleichbaren Raten zum WT wächst. Ebenfalls in der Abbildung dargestellt sind die entsprechenden pH-Werte der Medien. Sowohl beim WT als auch bei der Mutante sinkt der pH-Wert des Mediums nach 24 h ab, und zwar auf pH 6,4 (WT) und 6,3 (Hik14). Während der WT bereits nach 72 h die pH-Absenkung kompensiert hat (der pH-Wert des Mediums betrug dann 7,2) ist der pH-Wert des Mediums bei der Mutante erst nach 96 h im neutralen Bereich (pH 7,0). Dieser Unterschied im Wachstum von WT und Mutante wurde nicht detektiert, wenn das BG11-Medium mit Epps-NaOH pH 7,5 gepuffert wurde oder wenn die Zellen mit einer hohen Animpfdichte in BG11-Medium (ohne zusätzlichen Puffer) angeimpft wurden.

Die Konsequenz des abfallenden pH-Wertes im Medium bei Anzucht ohne zusätzlichen Epps-Puffer ist eine Verschiebung des Gleichgewichts von HCO₃⁻ / CO₂ zu Gunsten von CO₂ im Medium. Die Zellen müssen sich dann von einer vorrangigen HCO₃⁻-Aufnahme auf eine CO₂-Assimilation umstellen. Offensichtlich ist der WT besser in der Lage als die Mutante, diese Umstellung durchzuführen.

In *Synechocystis* PCC 6803 erfolgt die HCO₃⁻-Aufnahme über zwei Transporter in der Cytoplasmamembran, während CO₂ durch die Cytoplasmamembran diffundieren kann und dann unter Beteiligung spezialisierter NDH-1 Komplexe (vom Typ B) und des zyklischen Elektronentransportes zu HCO₃⁻ umgewandelt und anschließend in die Carboxysomen transportiert wird (BADGER & PRICE 2003; KAPLAN & REINHOLD 1999). Die Northern Blot-Analysen gaben Hinweise dafür, dass die CO₂-Aufnahme in der Mutante beeinträchtigt ist, da hier die Transkriptmengen für *petH* (Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase) und *ndhD4* (eine Untereinheit des NDH-1-Komplexes vom Typ B) verringert sind. PetH hat sowohl die Funktion NADP⁺ zu reduzieren als auch Elektronen im zyklischen Elektronentransport um PS

I zu übertragen. Sowohl der zyklische Elektronentransport als auch der NDH-1 Komplex vom Typ B werden für die Umwandlung von CO_2 zu HCO_3^- benötigt.

Somit bestätigen die Transkript-Untersuchungen, dass in der anfänglichen Wachstumsphase die Mutante weniger effektiv als der WT ihre metabolischen Aktivitäten verändern kann, die zu einer erhöhten CO_2 -Assimilation relativ zur HCO_3^- -Aufnahme führen.

Als eine Konsequenz aus der geringen C-Assimilation und einem damit verbundenen C-Mangel kann sicher die reduzierte photosynthetische Sauerstoff-Entwicklung und die erhöhte 77 K Phycobilisomen-Fluoreszenz in der Mutante angesehen werden. Dies bedeutet, dass die Zellen einen Mangel an fixiertem Kohlenstoff haben, was letztendlich einen Nährstoffmangel bedeutet und zu einer Stress-Situation führt, da die Energie-anliefernden und -verbrauchenden Reaktionen nicht mehr im Gleichgewicht stehen (siehe z.B. Review HUNER 1996). Dies wird besonders deutlich durch die erhöhte Phycobilisomen-Fluoreszenz, was bedeutet, dass weniger Lichtenergie auf PS II übertragen wird, was zu einer Verringerung der photosynthetischen Aktivität führt.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen WT und Mutante zeigte sich bei der potentiellen respiratorischen Aktivität der Cytoplasmamembran. Respirationsmessungen haben ergeben, dass die Mutanten-Zellen eine deutlich höhere Sauerstoff-Aufnahme im Dunkeln nach EDTA-Zugabe zeigten als die WT-Zellen. Dies deutet auf eine höhere Kapazität des Respirationsapparates in der Cytoplasmamembran der Mutante im Vergleich zum WT hin. Darüber hinaus haben die Western Blot-Analysen ergeben, dass das Protein Lpd (Dihydrolipoamid-Dehydrogenase) in der Mutante in deutlich höheren Mengen als im WT vorlag. Die Lpd ist eine Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes und ist in *Synechocystis* PCC 6803 ausschließlich (oder fast ausschließlich) an der Cytoplasmamembran lokalisiert (ENGELS *et al.* 1997) Da in Arbeiten von SUMEGI & SRERE (1984) gezeigt wurde, dass der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex mit dem NDH-1 Komplex der Mitochondrienmembran interagieren kann, können die mit *Synechocystis* PCC 6803 erhaltenen Ergebnisse dahin gehend interpretiert werden, dass der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex nach Oxidation von Pyruvat Elektronen in die respiratorische Elektronentransportkette der Cytoplasmamembran einschleusen kann. Die höhere respiratorische Kapazität der Cytoplasmamembran würde bedeuten, dass die Mutante nach Überimpfen in der anfänglichen Wachstumsphase ihre respiratorische Aktivität in der Cytoplasmamembran nicht im gleichen Ausmaße herunterreguliert wie der WT, sondern

Pyruvat noch weiter oxidiert, wenn die Energie eigentlich hauptsächlich über die photosynthetische Aktivität erhalten werden sollte. Die angenommene höhere Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase in den Mutanten-Zellen in der anfänglichen Wachstumsphase nach Überimpfen wird durch die höhere Protein-Menge von Lpd und auch durch den geringeren Pyruvat-Gehalt in den Mutanten-Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen unterstützt.

Unter Wachstums-Bedingungen, in denen die Photosynthese eine Rolle spielt, ist diese erhöhte Respiration von Nachteil. Anstatt Reduktionsäquivalente zu bilden und den C-Anabolismus zu fördern, sind diese Vorgänge reduziert.

Diese erhöhte respiratorische Kapazität in der Cytoplasmamembran in der Mutante kann aber offensichtlich unter bestimmten Wachstumsbedingungen (und zwar in der späten Wachstumsphase) auch von Vorteil sein, und zwar wenn die Bedingungen eine respiratorische Aktivität im Licht zusätzlich zur Photosynthese ermöglichen, wie dies z. B. der Fall ist, wenn die Lichtintensität aufgrund einer hohen Zelldichte abnimmt und die Zellen außerdem reich an Metaboliten sind (siehe Abb. 3.13). Da die respiratorische Aktivität in der Mutante erhöht ist, kann sie wahrscheinlich schneller ansteigen, wenn die Zellen die stationäre Wachstumsphase erreichen und die photosynthetische Aktivität abnimmt.

Somit haben die vergleichenden Analysen von *Synechocystis* PCC 6803 WT und Mutante Hik14 ergeben, dass bei einem Fehlen der Histidin-Kinase Slr1759 die Zellen sich weniger effektiv von einer vorrangigen HCO_3^- -Aufnahme auf eine vorrangige CO_2 -Assimilation umstellen können, was z. B. bei einem Abfallen des pH-Wertes im Medium unter pH 6,8 (der pK des Gleichgewichts für $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ ist 6,8) erforderlich ist. Diese Schlussfolgerung wird durch die physiologischen Untersuchungen weiter untermauert. Es konnte gezeigt werden, dass in der Mutante der spezialisierte NDH-1 Komplex vom Typ B, der eine Rolle bei der Umwandlung von CO_2 zu HCO_3^- spielt, weniger stark hochreguliert ist. Für diese Umwandlung wird außerdem der zyklische Elektronentransport um PS I benötigt. Zumindest an einer dieser zyklischen Wege ist die Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase (PetH) beteiligt. Auch für dieses Protein konnte gezeigt werden, dass das Transkript in der Mutante nicht im gleichen Ausmaß wie im WT hochreguliert wird. Andererseits zeigt die Mutante eine erhöhte Pyruvat-Oxidation im Vergleich zum WT in der anfänglichen Wachstumsphase. Dieser Defekt der Mutante ist aber nur dann gut erkennbar, wenn die Mutante mit einer niedrigen Zelldichte angeimpft wird. Eine geringe Zellmenge ist in der anfänglichen Wachstumsphase nicht in der Lage, den Abfall im pH des Mediums durch seine metabolischen Aktivitäten in

relativ kurzer Zeit zu kompensieren. Bei einer hohen Zelldichte beim Animpfen ist auch die Mutante dazu in der Lage, durch ihre metabolischen Aktivitäten den pH im Medium wieder anzuheben und dann vergleichbar zum WT zu wachsen. Die Ergebnisse zeigen somit, dass die Histidin-Kinase *Srl1759* eine wesentliche Rolle bei der für diese Kompensation erforderliche Umstellung des Stoffwechsels spielt. Bei Fehlen der Kinase verläuft diese Umstellung wesentlich langsamer. Die physiologischen Analysen haben ergeben, dass bei Fehlen der Kinase die respiratorische Aktivität nicht in gleichem Ausmaß wie im WT in der anfänglichen Wachstumsphase herunterreguliert ist und die CO_2 -Assimilation nicht in gleichem Ausmaß wie im WT heraufreguliert ist, wenn bei Überimpfen der Zellen der pH im Medium abfällt. Der Mangel an fixiertem Kohlenstoff führt letztendlich zu einer Schädigung des photosynthetischen Elektronentransports.

Das Fehlen der Histidin-Kinase *Srl1759* führt zu einer weniger effektiven Regulation bestimmter Enzymaktivitäten. In Abb. 4.3 ist die mögliche Funktion der Histidin-Kinase *Srl1759* bei der Regulation dieser Aktivitäten dargestellt. Diese sind die Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase, die Aktivität eines spezialisierten NDH-1 Komplexes sowie der zyklische Elektronentransport unter Beteiligung von *PetH*.

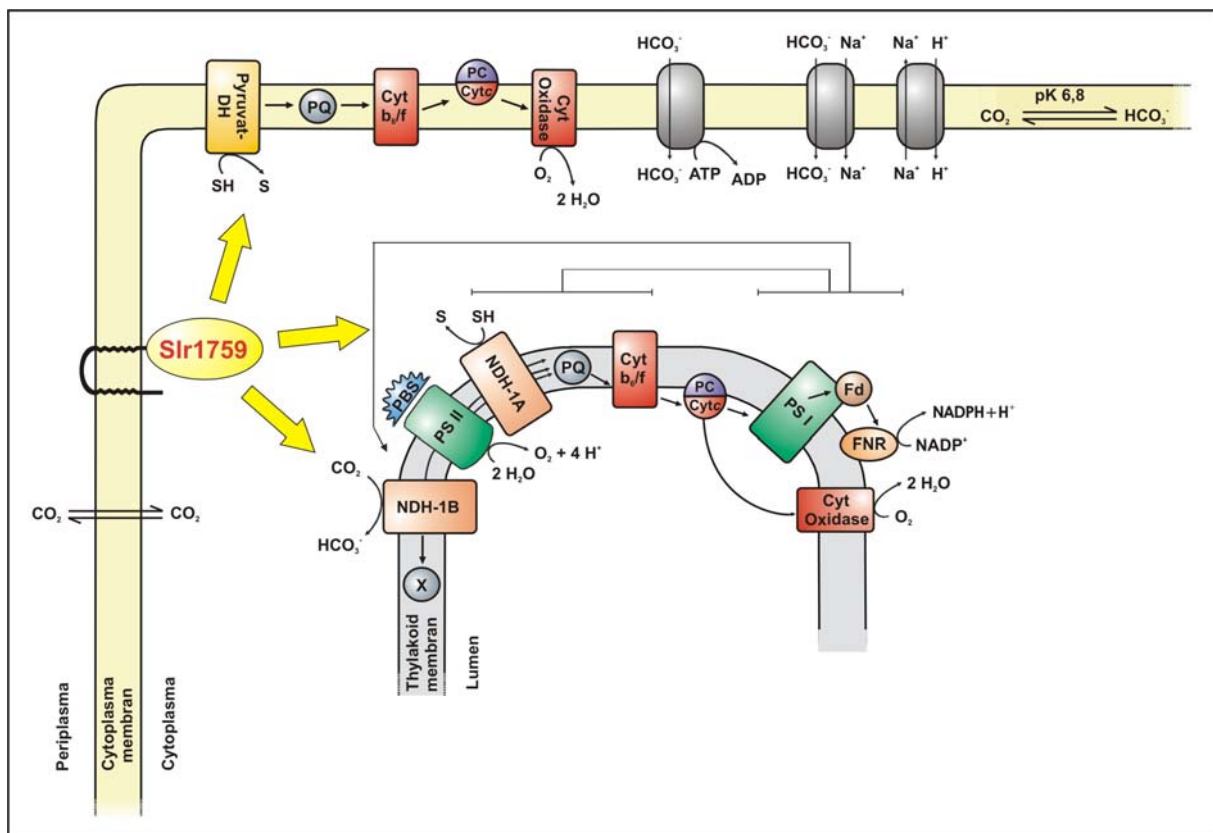


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der möglichen Funktion der Histidin-Kinase *Srl1759* in *Synechocystis* PCC 6803. (Michel unveröffentlicht)

5. Zusammenfassung

In Prokaryoten sind sogenannte „Zwei-Komponenten-Systeme“, die aus einer Histidin-Kinase und einem Response-Regulator bestehen, häufig an Signaltransduktionskaskaden beteiligt. Das Ziel meiner Arbeit war es, eine Histidin-Kinase in dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 zu identifizieren, die eine Rolle bei der Koordination von Photosynthese/Respiration und Kohlenstoff-Anabolismus/-Katabolismus hat. Auf der Basis von bioinformatischen Auswertungen wurde die Histidin-Kinase Slr1759 ausgewählt. Diese Kinase hat eine sehr komplexe Domänen-Struktur, was darauf hindeutet, dass sie mehrere Signale detektieren und auch integrieren kann. Da sie zwei Transmembran-Helices besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass sie Membran-assoziiert ist. Durch das Vorhandensein von zwei PAS/PAC-Domänen ist sie bestens für ein Sensing des Redox-Zustandes von Komponenten der Elektronentransportkette(n) geeignet.

Im zweiten Teil meiner Arbeit wurden vergleichende Untersuchungen von *Synechocystis* sp. PCC 6803 Wildtyp (WT) und einer Slr1759-freien Mutante durchgeführt. Die Analysen des Wachstums ergaben, dass unter genau definierten Bedingungen die Mutante ein deutlich geringeres Wachstum als der WT zeigte, und zwar in der anfänglichen Wachstumsphase, bevor das logarithmische Wachstum einsetzte. Dieser Unterschied wurde dann detektiert, wenn Zellen, die sich der stationären Wachstumsphase annäherten, in frisches BG11-Medium mit einer geringen Zelldichte angeimpft und mit CO₂-angereicherter Luft begast wurden. Die Begasung führt zu einem Abfall des pH-Wertes im Medium von pH 7,3 auf pH 6,6 beim WT und pH 6,3 bei der Mutante. Der WT war in der Lage, durch seine metabolischen Aktivitäten den pH-Wert in relativ kurzer Zeit wieder zum neutralen Bereich hin anzuheben, während die Mutante dazu wesentlich länger brauchte (bei Anzucht mit Licht von 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) oder überhaupt nicht mehr wuchs (bei Anzucht mit Licht von 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Wurden die Zellen mit einer höheren Dichte angeimpft, wuchs die Mutante genauso gut wie der WT. Es konnte weiter gezeigt werden, dass beim Animpfen der Zellen mit geringer Animpfdichte und einer zusätzlichen Pufferung des BG11-Mediums mit Epps-NaOH, pH 7,5 die Mutante ein zum WT vergleichbares Wachstum zeigte. Unter diesen Bedingungen sank der pH des Mediums durch die Begasung mit CO₂-angereicherter Luft nicht in den sauren Bereich ab.

Ein Absinken des pH-Wertes im Medium unter pH 6,8 bedeutet, dass die Zellen sich von einer vorrangigen HCO₃⁻-Aufnahme auf eine vorrangige CO₂-Assimilation umstellen müssen (der pK des Gleichgewichts von HCO₃⁻ / CO₂ beträgt 6,8). Offensichtlich ist der WT dazu besser in der Lage als die Mutante.

Northern Blot-Analysen ergaben weiter, dass die Mutante unter den Anzuchtbedingungen, unter denen das reduzierte Wachstum in der anfänglichen Wachstumsphase detektierbar war, eine geringere Transkript-Menge für die D4-Untereinheit des NDH-1 Komplexes (vom Typ B) und für Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase (PetH) hatte. Beide Aktivitäten werden für die Umwandlung von CO₂ zu HCO₃⁻, das nachfolgend in die Carboxysomen transportiert wird, benötigt. Diese Ergebnisse sind somit ein weiterer guter Hinweis darauf, dass bei Abwesenheit der Histidin-Kinase Slr1759 die Zellen sich weniger effektiv von einer HCO₃⁻-Aufnahme auf eine CO₂-Assimilation umstellen können.

Des Weiteren haben Western Blot- und Metaboliten-Analysen gezeigt, dass die Mutante weniger gut ihre respiratorische Aktivität in der Cytoplasma-Membran nach Überimpfen herunterregulieren kann, was durch den erhöhten Gehalt des Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Proteins (einer Untereinheit des in *Synechocystis* PCC 6803 an der Cytoplasmamembran lokalisierten Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes) und durch den geringen Pyruvat-Gehalt angezeigt wird.

Abschließend kann festgehalten werden, dass das Fehlen der Histidin-Kinase Slr1759 in *Synechocystis* PCC 6803 dazu führt, dass die Mutanten-Zellen sich weniger effektiv auf eine CO₂-Assimilation umstellen können und außerdem weniger effektiv ihre respiratorische Aktivität in der Cytoplasmamembran herunterregulieren können. Dies führt zu einer Schädigung der Photosynthese und letztendlich einer Reduzierung des Wachstums. Dieser Defekt tritt auf, wenn die Zellen mit geringer Dichte in BG11-Medium angeimpft werden, das mit CO₂-angereicherter Luft begast wird, was zu einem anfänglichen Absinken des pH-Wertes im Medium führt. Die Histidin-Kinase Slr1759 besitzt somit eine Rolle bei der Koordination von Photosynthese, Respiration und Kohlenstoff-Assimilation, und zwar vor allem in der anfänglichen Wachstumsphase.

6. Literaturverzeichnis

- Alex, L.A., Simon, M.I. (1994)** Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet.* 10: 133-138
- Andersson, B., Barber, J. (1996)** Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. In: *Photosynthesis and the Environment*. Baker, N.R. (ed), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p.101-121
- Anraku, Y., Gennis, R.B. (1987)** The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci.* 12: 262-266
- Badger, M.R., Kaplan, A., Berry, J.A. (1980)** The internal inorganic carbon pool of *Chlamydomonas reinhardtii*: evidence for a CO₂ concentrating mechanism. *Plant. Physiol.* 66: 407-413
- Badger, M.R., Price, G.D. (2003)** CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J. Exp. Bot.* 54: 609-622
- Badger, M.R., Spalding, M.H. (2000)** CO₂ Acquisition, Concentration and Fixation in Cyanobacteria and Algae. In: *Advances in Photosynthesis*, Leegood RC, Sharkey TD and von Caemmerer S (ed.), Kluwer Academic Publishers, p. 399-434, Dordrecht, The Netherlands
- Barsch, A., Patschkowski, T., Niehaus, K. (2004)** Comprehensive metabolite profiling of *Sinorhizobium meliloti* using gas chromatography-mass spectrometry. *Funct. Integr. Genomics.* 4: 219-230
- Bendall, D.S., Manasse, R.S. (1995)** Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochem. Biophys. Acta.* 1229: 23-38
- Berg, H., Ziegler, K., Piotukh, K., Baier, K., Lockau, W., Volkmer-Engert, R. (2000)** Biosynthesis of the cyanobacterial reserve polymer multi-L-arginyl-poly-L-aspartic acid (cyanophycin): mechanism of the cyanophycin synthetase reaction studied with synthetic primers. *Eur. J. Biochem.* 267: 5561-70
- Berger, S., Ellersiek, U., Kinzelt, D., Steinmüller, K. (1993)** Immunopurification of a subcomplex of the NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* 326: 249-250
- Berger, S., Ellersiek, U., Steinmüller, K. (1991)** Cyanobacteria contain a mitochondrial complex I-homologous NADH-dehydrogenase. *FEBS.* 286: 129-132
- Bibby, T.S., Mary, I., Nield, J., Partensky, F., Barber, J. (2003)** Low-light-adapted *Prochlorococcus* species possess specific antennae for each photosystem. *Nature.* 424: 1051-1054

- Bibby, T.S., Nield, J., Chen, M., Larkum, A.W.D., Barber, J. (2003)** Structure of a photosystem II supercomplex isolated from *Prochloron didemni* retaining its chlorophyll a/b light-harvesting system. PNAS. 100: 9050-9054
- Blankenship, R.E. (1992)** Origin and early evolution of photosynthesis. Photosynth. Res. 33: 91-111
- Blankenship, R.E., Hartman, H. (1998)** The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. TIBS 23: 94-97
- Bonfil, D.J., Ronen-Tarazi, M., Sültemeyer, D., Lieman-Hurwitz, J., Schatz, D., Kaplan, A. (1998)** A putative HCO₃⁻ transporter in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942. FEBS Lett. 430: 236-240
- Bradford, M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254
- Carr, N.G., Whitton, B.A. (1982)** ed., The Biology of Cyanobacteria. Oxford, UK. Blackwell Scientific Publishers
- Chang, C., Stewart, R.C. (1998)** The two-component system. Regulation of diverse signalling pathways in prokaryotes and eukaryotes. Plant. Physiol. 117: 723-731
- Chen, C., van Baalen, C., Tabita, F.R. (1987)** DL-7 Azatryptophan and citrullin metabolism in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 1F. J. Bacteriol. 169: 1114-1119
- Cooley, J.W., Howitt, C.A., Vermaas, W.F. (2000)** Succinate:quinol oxidoreductases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: presence and function in metabolism and electron transport. J. Bacteriol. 182: 714-722
- Cooley, J.W., Vermaas, W.F. (2001)** Succinate dehydrogenase and other respiratory pathways in thylakoid membranes of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: capacity comparisons and physiological function. J. Bacteriol. 183: 4251-4258
- Eisbrenner, G., Bothe, H. (1979)** Modes of electron transfer from molecular hydrogen in *Anabaena cylindrica*. Arch. Microbiol. 123: 37-45
- Engels, A., Kahmann, U., Ruppel, H.G., Pistorius, E.K. (1997)** Isolation, partial characterization and localization of a dihydrolipoamide dehydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Biochim. Biophys. Acta. 1340: 33-44
- Engels, A., Pistorius, E.K. (1997)** Characterization of a gene encoding dihydrolipoamide dehydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Microbiology. 143: 3543-3553
- Engels, D.H., Engels, A., Pistorius, E.K. (1992)** Isolation and partial characterization of a L-amino acid oxidase and of photosystem II complexes from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. Bioscience C. 47: 859-866

- Engels, D.H., Lott, A., Schmid, G.H., Pistorius, E.K. (1994)** Inactivation of the water-oxidizing enzyme in manganese stabilizing protein-free mutant cells of the cyanobacteria *Synechococcus* PCC 7942 and *Synechocystis* PCC 6803 during dark incubation and conditions leading to photoactivation. *Photosynth. Res.* 42: 227-244
- Espie, G.S., Kandasamy R.A. (1994)** Monensin inhibition of Na⁺-dependent HCO₃⁻ transport distinguishes it from Na⁺-independent HCO₃⁻ transport and provides evidence for Na⁺/HCO₃⁻ symport in the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. *Plant Physiol.* 104: 1419-1428
- Flores, E., Herrero, A., Guerrero, M.G. (1982)** Production of ammonium dependent on basic L-amino acids by *Anacystis nidulans*. *Arch. Microbiol.* 131: 91-94
- Fridlyand L., Kaplan, A., Reinhold, L. (1996)** Quantitative evaluation of the role of a putative CO₂-scavenging entity in the cyanobacterial CO₂-concentrating mechanism. *Biosystems.* 37: 229-238
- Friedrich, T. (1998)** The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1364: 134-146
- Friedrich, T., Scheide, D. (2000)** The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *FEBS Lett.* 479: 1-5
- Friedrich, T., Steinmüller, K., Weiss, H. (1995)** The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS Lett.* 367: 107-111
- Friedrich, T., Weiss, H. (1997)** Modular evolution of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase and the origin of its modules. *J. Theor. Biol.* 187: 529-40
- Gantt, E. (1994)** Supramolecular membrane organisation. In: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Bryant, D.A. (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p.119-138
- Gärtner, S. (1989)** Isolierung einiger intrinsischer Peptide des Photosystem II-Komplexes aus Hafer und die Gewinnung der entsprechenden Antikörper. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld.
- Georgellis, D., Kwon, O., Lin, E.C. (2001)** Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science.* 292: 2314-2316
- Golecki, J.R. (1988)** Analysis of the structure and development of bacterial membranes (outer, cytoplasmic and intracytoplasmic membranes). *Meth. Microbiol.* 20: 61-77
- Grigorieff, N. (1999)** Structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 476-483
- Grigorieva, G., Shestakov, S. (1982)** Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 13: 367-370

- Grimme, L.H., Boardman, N.K. (1972)** Photochemical activation of a particle fraction P1 obtained from the green algae *Chlorella fusca*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 49: 1617-1623
- Guglielmi, G., Cohen-Bazire, G. & Bryant, D.A. (1981)** The structure of Gloeobacter violaceus and its phycobilisomes. Arch. Microbiol. 129: 181-189
- Hakenbeck, R., Stock, J.B. (1996)** Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation. Methods Enzymol. 273: 281-300
- Hatch, M.D. (1992)** C₄ Photosynthesis: an unlikely process full of surprises. Plant. Cell. Physiol. 33: 333-342
- Hipkins, M.F., Baker, N.R. (1986)** Photosynthesis: energy transduction. A practical approach. In: Practical Approach Series. Rickwood, D., Hames, B.D. (ed.), IRL Press, Oxford, p.103-141
- Howitt, C.A., Udall, P.K., Vermaas, W.F. (1999)** Type 2 NADH dehydrogenases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 are involved in regulation rather than respiration. J. Bacteriol. 181: 3994-4003
- Huner, N.P.A., Maxwell, D.P., Gray, G.R., Savitch, L.V., Krol, M., Ivanov, A.G., Falk, S. (1996)** Sensing environmental temperature change through imbalances between energy supply and energy consumption: Redox state of photosystem II. Physiologia Plantarum. 98: 358-364
- Ikeuchi, M., Tabata, S. (2001)** *Synechocystis* sp. PCC 6803 - a useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria. Photosynt. Res. 70: 73-83
- Iuchi, S., Lin, E.C.C. (1988)** *arcA*(dye), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in anaerobic pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1888-1892
- Iuchi, S., Lin, E.C.C. (1995)** Signal transduction in the ARC system for control of operons encoding aerobic respiratory enzymes. In: Two-component signal transduction. Hoch, J.A., Silhavy, T.J. (ed.), ASM Press, Washington, D.C. p. 223-231
- Jürgens, U.J., Weckesser, J. (1985)** The final structure and chemical composition of the cell wall and sheath layers of cyanobacteria. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 136A: 41-44
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., Tabata, S. (1996)** Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement). DNA Res. 3: 185-209
- Kaplan, A., Badger, M.R., Berry, J.A. (1980)** Photosynthesis and intracellular inorganic carbon pool in the blue-green algae *Anabaena variabilis*: Response to external CO₂ concentration. Planta 149: 219-226

- Kaplan, A., Reinhold, L. (1999)** CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 50: 539-570
- Kaplan, A., Schwarz, R., Ariel, R., Reinhold, L. (1990)** The CO₂ concentrating system in cyanobacteria: perspectives and prospects. In: Regulation of Photosynthetic Processes. Kanai, R.; Katoh, S., Miyachi, S. (ed.) *Bot. Mag. Tokyo Special Issue 2*: p. 53-72
- Klughammer, B., Sultemeyer, D., Badger, M.R., Price, G.D. (1999)** The involvement of NAD(P)H dehydrogenase subunits, NdhD3 and NdhF3, in high-affinity CO₂ uptake in *Synechococcus* sp. PCC7002 gives evidence for multiple NDH-1 complexes with specific roles in cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* 32: 1305-15
- Kösling, S., Appel, J., Schulz, R., Steinmüller, K. (1999)** The complex I-homologous NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase of *Synechocystis* sp. PCC 6803. In: The Phototrophic Prokaryotes. Peschek, G.A., Löffelhardt, W., Schmetterer, G. (ed.), Kluwer Academic Publishers, New York, p. 211- 215
- Kraushaar, H., Hager, S., Wastyn, M., Peschek, G.A. (1990)** Immunologically cross-reactive and redox-competent cytochrome *b₆/f*-complexes in the chlorophyll-free plasma membrane of cyanobacteria. *FEBS Lett.* 273: 227-231
- Kuhlmann, M. (1988)** Funktionelle und immunologische Charakterisierung der extrinsischen Peptide einer Photosystem II-Präparation aus Hafer und Spinat. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld.
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685
- Lang, B.F., Burger, G., O'Kelly, C.J., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., Gray, M.W. (1997)** An ancestral mitochondrial DNA resembling an eubacterial genome in miniature. *Nature* 387: 493-497
- Laszlo, D.J., Taylor, B.L. (1981)** Aerotaxis in *Salmonella typhimurium*: role of electron transport. *J. Bacteriol.* 145: 990-1001
- Lengeler, J.W., Drews, G., Schlegel, H.G. (eds) (1999)** Biology of the prokaryotes: The Photosynthesis of cyanobacteria is oxygenic. Thieme Stuttgart, New York, p. 336-338
- Li, H., Sherman, L.A. (2000)** A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 182: 4268-4277
- Li, Q., Calvin, D.T. (1998)** Energy sources for HCO₃⁻ and CO₂ transport in air-grown cells of *Synechococcus* UTEX 625. *Plant. Physiol.* 116: 1125-1132
- Lott, A. (1993)** Insertionsinaktivierung des *psbO*-Gens, das für das manganstabilisierende Peptid kodiert, in *Synechocystis* PCC 6803. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld.

- Maeda, S., Badger, M.R., Price, G.D. (2002)** Novel gene products associated with NdhD3/D4-containing NDH-1 complexes are involved in photosynthetic CO₂ hydration in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol. Microbiol.* 43: 425-435
- Malpica, R., Franco, B., Rodriguez, C., Kwon, O., Georgellis, D. (2004)** Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 13318-13323
- Marco, E., Ohad, N., Schwarz, R., Lieman-Hurwitz, J., Gabay, C., Kaplan, A. (1993)** High CO₂ concentration alleviates the block in photosynthetic electron transport in an *ndhB*-inactivated mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Plant. Physiol.* 101: 1047-1053
- Marcus, Y. (1997)** Distribution of inorganic carbon among its component species in cyanobacteria: Do cyanobacteria in fact actively accumulate inorganic carbon? *J. Theor. Biol.* 185: 31-45
- Matsuda, Y.; Colman, B. (1995)** Induction of CO₂ and bicarbonate transport in the green Algae *Clorella ellipsoidea*. II. Evidence for induction in response to external CO₂ concentration. *Plant. Physiol.* 108: 253-260
- Matsushika, A., Mizuno, T. (1998)** A dual-signalling mechanism mediated by the ArcB hybrid sensor kinase containing the histidine-containing phosphotransfer domain in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180: 3973-3977
- Matthijs, H.C., Jeanjean, R., Yeremenko, N., Huiwman, J., Joset, F., Hellingwerf, K.J. (2002)** Hypothesis: versatile function of ferredoxin-NADP⁺ reductase in cyanobacteria provides regulation for transient photosystem I-driven cyclic electron transport. *Funct. Plant. Biol.* 29: 201-210
- Meunier, P.C., Colon-Lopez, M.S., Sherman, L.A. (1997)** Temporal changes in state transitions and photosystem organization in the unicellular, diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142. *Plant. Physiol.* 115: 991-1000
- Meyer, R. (1985)** Isolierung und Reindarstellung des Kopplungsfaktors der Photophosphorylierung und seiner Untereinheiten. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld.
- Mi, H., Endo, T., Ogawa, T., Asada, K. (1995)** Thylakoid Membrane-Bound, NADPH-Specific Pyridine Nucleotide Dehydrogenase Complex Mediates Cyclic Electron Transport in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant. Cell. Physiology.* 36: 661-668
- Mi, H., Endo, T., Schreiber, U., Ogawa, T., Asada, K. (1992)** Electron donation from cyclic and respiratory flows to the photosynthetic intersystem chains is mediated by pyridine nucleotide dehydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant. Cell. Physiol.* 33: 1233-1237

- Mi, H., Endo, T., Schreiber, U., Ogawa, T., Asada, K. (1994)** NAD(P)H Dehydrogenase-Dependent Cyclic Electron Flow around Photosystem I in the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: a Study of Dark-Starved Cells and Spheroplasts. *Plant. Cell. Physiology.* **35**: 163-173
- Miller, A.G., Espie, G.S., Canvin, D.T. (1990)** Physiological aspects of CO₂ and HCO₃⁻ transport by cyanobacteria: a review. *Can. J. Bot.* **68**: 1291-1302
- Miller, A.G., Turpin, D.H., Canvin, D.T. (1984)** Na⁺ requirement for growth, photosynthesis and pH regulation in the alkalotolerant cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis*. *J. Bacteriol.* **159**: 100-106
- Mizuno, T., Kaneko, T., Tabata, S. (1996)** Compilation of all genes encoding bacterial two-component signal transducers in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *DNA Res.* **3**: 407-414
- Moser, D., Nicholls, P., Wastyn, M., Peschek, G. (1991)** Acidic cytochrome c₆ of unicellular cyanobacteria is an indispensable and kinetically competent electron donor to cytochrome oxidase in plasma and thylakoid membranes. *Biochem. Intern.* **24**: 757- 768
- Mullineaux, C. W., Allen, F. (1990)** State 1-State 2 transitions in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 are controlled by the redox state of electron carriers between photosystem I and II. *Photosynth. Res.* **23**: 297-311
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986)** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273
- NAMBU, J.R., LEWIS, J.O., WHARTON, K.A.J., CREWS, S.T. (1991)** The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* **67**: 1157-1167
- Nicholls, P., Obinger, C., Niederhauser, H., Peschek, G.A. (1992)** Cytochrome oxidase in *Anacystis nidulans*: stoichiometries and possible functions in the cytoplasmic and thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1098**: 184-190
- Ogawa, T. (1991)** A gene homologous to the subunit-2 gene of NADH dehydrogenase is essential to inorganic carbon transport of *Synechocystis* PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**: 4275-4279
- Ogawa, T. (1991)** Cloning and inactivation of a gene essential to inorganic carbon transport in *Synechocystis* PCC 6803. *Plant. Physiol.* **96**: 280-284
- Ogawa, T. (1992)** Identification and characterization of the *ictA/ndhL* gene product essential to inorganic carbon transport of *Synechocystis* PCC 6803. *Plant. Physiol.* **99**: 1604-1608
- Ogawa, T. (1993)** Molecular analysis of the CO₂ concentrating mechanism in cyanobacteria. In *Photosynthetic Responses to the Environment*, Yamamoto, H.; Smith, C. (ed.), Am. Soc. Plant Physiol., p. 113-125. Rockville, M.D

- Ogawa, T., Kaplan, A. (2003)** Inorganic carbon acquisition systems in cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 77: 105-115
- Ogawa, T., Kaplan, A. (2003)** Inorganic carbon acquisition systems in cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 77: 105-115
- Ohkawa, H., Pakrasi, H.B., Ogawa, T. (2000)** Two types of functionally distinct NAD(P)H dehydrogenases in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *J. Biol. Chem.* 275: 31630-31634
- Ohkawa, H., Price, G.D., Badger, M.R., Ogawa, T. (2000)** Mutation of *ndh* genes leads to inhibition of CO₂ uptake rather than HCO₃⁻ uptake in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 182: 2591-2596
- Ohkawa, H., Sonoda, M., Katoh, H., Ogawa, T. (1998)** The use of mutants in the analysis of the CCM in cyanobacteria. *Can. J. Bot.* 76: 1025-1034
- Ohkawa, H., Sonoda, M., Shibata, M., Ogawa, T. (2001)** Localization of NAD(P)H dehydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 183: 4938-4939
- Omata, T. (1992)** Characterization of the downstream region of *cmpA*: identification of a gene cluster encoding a putative permease of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. In: *Research in Photosynthesis: Proc. Int. Congr. Photosynthesis.* Murata, N. (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands: p. 807-810
- Omata, T., Carlson, T.J., Ogawa, T., Piece, J. (1990)** Sequencing and modification of the gene encoding the 42-kilodalton protein in the cytoplasmic membrane of *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Physiol.* 93: 305-311
- Omata, T., Ogawa, T. (1985)** Changes in the polypeptide composition of the cytoplasmic membrane of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* during adaptation to low CO₂ conditions. *Plant. Cell. Physiol.* 26: 1075-1081
- Omata, T., Ogawa, T. (1986)** Biosynthesis of a 42 kDa polypeptide in the cytoplasmic membrane of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* strain R₂ during adaptation to low CO₂ concentration. *Plant. Physiol.* 80: 525-530
- Omata, T., Price, G.D., Badger, M.R., Okamura, M., Gohta, S., Ogawa, T. (1999)** Identification of an ATP-binding cassette transporter involved in bicarbonate uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 13571-13576
- Parkinson, J.S., Kofoid, E.C. (1992)** Communication modules in bacterial signalling proteins. *Annu. Rev. Genet.* 26: 71-112
- Pears, J., Leach, C.K., Carr, N.G. (1969)** The incomplete citric acid cycle in the blue-green algae *Anabaena variabilis*. *J. Gen. Microbiol.* 49: 301-313

Perham, R.N. (1975) Self-Assembly of Biological Macromolecules. Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B. 272: 123-136

Pernestig, A.K., Georgellis, D., Romeo, T., Suzuki, K., Tomenius, H., Normark, S., Melefors, O. (2003) The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources. J. Bacteriol. 185: 843-853

Pernestig, A.K., Melefors, Ö., Georgellis, D. (2001) Identification of UvrY as the Cognate Response Regulator for the BarA Sensor Kinase in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 276: 225-231

Peschek, G.A. (1980) Restoration of respiratory electron-transport reactions in quinone-depleted particle preparations from *Anacystis nidulans*. Biochem. J. 186: 515-523

Peschek, G.A., Wastyn, M., Trnka, M., Fry, I.V., Packer, L. (1989) Characterization of the cytochrome c oxidase in isolated and purified plasma membranes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. Biochem. 28: 3057-3063

Peterson, R.B., Burris, R.H. (1978) Hydrogen metabolism in isolated heterocysts of *Anabaena* 7120. Arch. Microbiol. 116: 125-132

Pettit, F.H., Yeaman, S.J., Reed, L.J. (1978) Purification and Characterization of Branched Chain α -keto Acid Dehydrogenase Complex of Bovine Kidney. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 4881-4885

Philbrick, J.B., Diner, B.A., Zilinskas, B.A. (1991) Construction and characterization of cyanobacterial mutants lacking the manganese-stabilizing polypeptide of photosystem II. J. Biol. Chem. 266: 13370-13376

Pieulle, L., Guedeney, G., Cassier-Chauvat, C., Jeanjean, R., Chauvat, F., Peltier, G. (2000) The gene encoding the NdhH subunit of type 1 NAD(P)H dehydrogenase is essential to survival of *Synechocystis* PCC 6803. FEBS Letters. 487: 272-276

Pistorius, E.K., Voss, H. (1980) Some properties of a basic L-amino acid oxidase from *Anacystis nidulans*. Biochim. Biophys. Acta. 611: 227-240

Ponting, C.P., Aravind, L. (1997) PAS: a multifunctional domain family comes to light. Curr. Biol. 7: R674-677

Price, G.D., Howitt, S.M., Harrison, K., Badger M.R. (1993) Analysis of a genomic DNA region from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942 involved in carboxysome assembly and function. J. Bacteriol. 175: 2871-2879

Price, G.D., Maeda, S., Omata, T., Badger, M.R. (2002) Modes of active inorganic carbon uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. Funct. Plant. Biol. 29: 131-149

- Price, G.D., Sültemeyer, D., Klughammer, B., Ludwig, M., Badger, M.R. (1998)** The functioning of the CO₂ concentrating mechanism in several cyanobacterial strains: a review of general physiological characteristics, genes, proteins and recent advances. *Can. J. Bot.* 76: 973-1002
- Rebbapragada, A., Johnson, M.S., Harding, G.P., Zuccarelli, A.J., Fletcher, H.M., Zhulin, I.B., Taylor, B.L. (1997)** The Aer protein and the serine chemoreceptor Tsr independently sense intracellular energy levels and transduce oxygen, redox, and energy signals for *Escherichia coli* behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 10541-10546
- Reddy, K.J., Webb, R., Sherman, L.A. (1990)** Bacterial RNA isolation with one hour centrifugation in a table-top ultracentrifuge. *BioTechniques.* 8: 250-251
- Reinhold, L., Zviman, M., Kaplan, A. (1986)** Inorganic carbon fluxes and photosynthesis in cyanobacteria – a quantitative model. In: *Progress in Photosynthesis Research*, Biggins, J. (ed.) Martinus Nijhoff Publishers, The Hague p. 289-296
- Reiskind, J.B., Madsen, T.V., Van Ginkel, L.C., Bowes, G. (1997)** Evidence that inducible C4-type photosynthesis is a chloroplastic CO₂-concentrating mechanism in *Hydrilla*, a submersed monocot. *Plant. Cell. Environ.* 20: 211-220
- Reith, M.E., Munholland, J. (1995)** Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 13: 333-335
- Repik, A., Rebbapragada, A., Johnson, M.S., Haznedar, J.O., Zhulin, I.B., Taylor, B.L. (2000)** PAS domain residues involved in signal transduction by the Aer redox sensor of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 36: 806-816
- Richter, R., Hejazi, M., Kraft, R., Ziegler, K., Lockau, W. (1999)** Cyanophycinase, a peptidase degrading the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartic acid (cyanophycin): molecular cloning of the gene of *Synechocystis* sp. PCC 6803, expression in *Escherichia coli*, and biochemical characterization of the purified enzyme. *Eur. J. Biochem.* 263: 163-169
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y. (1979)** Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 1-61
- Romeo, T. (1998)** Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol. Microbiol.* 29: 1321-1330
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989)** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Scherer, S. (1990)** Do photosynthetic and respiratory electron transport chains share redox proteins? *TIBS.* 15: 458-463

- Scherer, S., Almon, H., Böger, P. (1988)** Interaction of photosynthesis, respiration and nitrogen fixation in cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 15: 95-114
- Scherer, S., Alpes, I., Sadowski, H., Boger, P. (1988)** Ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase is the respiratory NADPH dehydrogenase of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 267: 228-235
- Schmetterer, G. (1994)** Cyanobacterial respiration. In: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Bryant, D.A. (ed), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p. 409-435
- Schmetterer, G., Alge, D., Gregor, W. (1994)** Deletion of cyt *c* oxidase genes from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.* 42: 43-50
- Schneider, D., Jaschkowitz, K., Seidler, A., Rogner, M. (2000)** Overexpression and reconstitution of a Rieske iron-sulfur protein from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Indian. J. Biochem. Biophys.* 37: 441-446
- Schopf, J.W. (1993)** Microfossils of the early archean apex chert – new evidence of the antiquity of life. *Science* 260: 640-646
- Schütz, M., Shahak, Y., Padan, E., Hauska, G. (1997)** Sulfide-Quinone Reductase from *Rhodobacter capsulatus*. *J. Biol. Chem.* 272: 9890-9894
- Schwarz, R., Friedberg, D., Kaplan, A. (1988)** Is there a role for the 42 kilodalton polypeptide in inorganic carbon uptake by cyanobacteria? *Plant. Physiol.* 88: 284-288
- Shen, J.R., Inoue, Y. (1993)** Binding and functional properties of two new extrinsic components, cytochrome *c*-550 and a 12-kDa protein, in cyanobacterial photosystem II. *Biochemistry.* 32: 1825-1832
- Shibata, M., Ohkawa, H., Kaneko, T., Fukuzawa, H., Tabata, S., Kaplan, A., Ogawa, T. (2001)** Distinct constitutive and low-CO₂-induced CO₂ uptake systems in cyanobacteria: genes involved and their phylogenetic relationship with homologous genes in other organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 11789-11794
- Shibata, M., Ohkawa, H., Katoh, H., Shimoyama, M., Ogawa, T. (2002)** Two CO₂ uptake systems in cyanobacteria: four systems for inorganic carbon acquisition in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Funct. Plant. Biol.* 29: 123-129
- Siedow, J.N., Umbach, A.L. (1995)** Plant Mitochondrial Electron Transfer and Molecular Biology. *Plant. Cell.* 7: 821-831
- So, A.K.C., Espie, G.S. (1998)** Cloning, characterization and expression of carbonic anhydrase from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant. Mol. Biol.* 37: 205-215
- Stephan, D.P., Ruppel, H.G., Pistorius, E.K. (2000)** Interrelation between cyanophycin synthesis, L-arginine catabolism and photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Z. Naturforsch. [C].* 55: 927-942

- Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N. (2000)** Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 183-215
- Stryer, L. (1987)** Biochemie, deutsche Übersetzung, 4. Auflage, Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig
- Sumegi, B., Srere, P.A. (1984)** Complex I binds several mitochondrial NAD-coupled dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 259: 15040-15045
- Suzuki, I., Los, D.A., Kanesaki, Y., Mikami, K., Murata, N. (2000)** The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis*. *Embo J.* 19: 1327-1334
- Tabita, F.R. (1994)** The biochemistry and molecular regulation of carbon dioxide metabolism in cyanobacteria. In: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Bryant, D.A. (ed), Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Boston, London, p. 437-467
- Taylor, B.L. (1983)** Role of proton motive force in sensory transduction in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 37: 551-573
- Taylor, B.L., Zhulin, I.B. (1999)** PAS domains: Internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 479-506
- Uozumi, N., Kim, E.J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker, E.P., Nakamura, T., Schroeder, J.I. (2000)** The Arabidopsis HKT1 gene homolog mediates inward Na^+ currents in *xenopus laevis* oocytes and Na^+ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant. Physiol.* 122: 1249-1259
- van den Hoek, C., Jahns, H.M., Mann, D.G. (1993)** Algen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, London.
- Van Thor, J.J., Gruters, O.W.M., Matthijs, H.C.P., Hellingwerf, K.J. (1999)** Localization and function of ferredoxin:NADP⁺ reductase bound to the phycobilisomes of *Synechocystis*. *The EMBO Journal*: 18: 4128-4136
- van Thor, J.J., Jeanjean, R., Havaux, M., Sjollem, K.A., Joset, F., Hellingwerf, K.J., Matthijs, H.C. (2000)** Salt shock-inducible photosystem I cyclic electron transfer in *Synechocystis* PCC6803 relies on binding of ferredoxin:NADP(+) reductase to the thylakoid membranes via its CpcD phycobilisome-linker homologous N-terminal domain. *Biochem. Biophys. Acta.* 1457: 129-144
- Vermaas, W.F. (2001)** Photosynthesis and respiration in cyanobacteria. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, London, p. 1-7
- Volokita, M., Zenvirth, D., Kaplan, A., Reinhold, L. (1984)** Nature of the inorganic carbon species actively taken up by the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Plant. Physiol.* 76: 599-602
- Walker, J.E. (1992)** The NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Quart. Rev. Biophys.* 25: 253-324

- Wei, B., S. Shin, D. LaPorte, A. J. Wolfe, and T. Romeo. 2000.** Global regulatory mutations in *csrA* and *rpoS* cause severe central carbon stress in *Escherichia coli* in the presence of acetate. *J. Bacteriol.* 182:1632-1640.
- Weidner, U., Geier, S., Ptock, A., Friedrich, T., Leif, H., Weiss, H. (1993)** The gene locus of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase in *Escherichia coli*. Organization of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of mitochondrial complex I. *J. Mol. Biol.* 233: 109-122
- Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G., Preis, D. (1991)** The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria, *Eur. J. Biochem.* 197: 563-576
- West, A.H., Stock, A.M. (2001)** Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signalling systems. *Trends Biochem. Sci.* 26: 369-376
- Whitton, B.A., Potts, M. (2000)** Introduction to the cyanobacteria. In: *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space.* Whitton, B.A.; Potts, M. (ed.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, London, Boston p. 1-11
- Wierenga, R.K., Terpstra, P., Hol, W.G. (1986)** Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint: *J. Mol. Biol.* 187: 101-107
- Williams, C.H., Jr. (1976)** In: *The Enzymes.* Boyer, P.W. (ed.), Academic Press, London p.89-173
- Williams, J.G.K. (1988)** Construction of Specific Mutation in Photosystem II Photosynthetic Reaction Center by Genetic Engineering Methods in *Synechocystis* 6803. *Methods in Enzymology.* 167: 766-778
- Wittmershaus, B.P., Woolf, V.M., Vermaas, W.F.J. (1992)** Temperature dependence and polarization of fluorescence from Photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.* 31: 75-87
- Yano, T., Chu, S.S., Sled', V.D., Ohnishi, T., Yagi, T. (1997)** The Proton-translocating NADH-Quinone Oxidoreductase (NDH-1) of Thermophilic Bacterium *Thermus thermophilus* HB-8. Complete DNA Sequence of the Gene Cluster and Thermostable Properties of the expressed NQO2 Subunit. *J. Biol. Chem.* 272: 4201-4211
- Yu, L., Zhao, J., Lu, W., Bryant, D.A., Golbeck, J.H. (1993)** Characterization of the [3Fe-4S] and [4Fe-4S] clusters in unbound PsaC mutants C14D and C51D. Midpoint potentials of the single [4Fe-4S] clusters are identical to FA and FB in bound PsaC of photosystem I. *Biochemistry.* 32: 8251-8258
- Zhulin, I.B., Taylor, B.L. (1998)** Correlation of PAS domains with electron transport-associated proteins in completely sequenced microbial genomes. *Mol. Microbiol.* 29: 1522-1523

Zhulin, I.B., Taylor, B.L., Dixon, R. (1997) PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem. Sci.* 22: 331-333

Ziegler, K., Deutzmann, R., Lockau, W. (2002) Cyanophycin synthetase-like enzymes of non-cyanobacterial eubacteria: characterization of the polymer produced by a recombinant synthetase of *Desulfitobacterium hafniense*. *Z. Naturforsch. [C]*. 57: 522-529

Ziegler, K., Diener, A., Herpin, C., Richter, R., Deutzmann, R., Lockau, W. (1998) Molecular characterization of cyanophycin synthetase, the enzyme catalyzing the biosynthesis of the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartate (cyanophycin). *Eur. J. Biochem.* 254: 154-159

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AP	alkaline Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arc	<u>A</u> noxic <u>r</u> edox <u>c</u> ontrol
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat p-Toluidin
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
RSA	Rinderserumalbumin
CA	Carboanhydrase
CCM	<u>C</u> arbon <u>c</u> oncentrating <u>m</u> echanism
CM	Cytoplasmamembran
CMF-PBS	Calcium- und Magnesium-freier Puffer
CP43	Chlorophyll-bindendes Protein 43 kDa
CP47	Chlorophyll-bindendes Protein 47 kDa
Cmp	<u>C</u> ytoplasmic <u>m</u> embran <u>p</u> rotein
Csr	<u>C</u> arbon <u>s</u> torage <u>r</u> egulation
Cyt c	Cytochrom c
Cyt b ₆ /f	Cytochrom b ₆ /f-Komplex
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Epps	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-3-Propansulfonsäure
FAD	Flavinadeninmononukleotid
Fd	Ferredoxin
FMN	Flavinmononukleotid

FNR	Ferredoxin-NADP ⁺ -Oxidoreduktase
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
Glu	Glutaminsäure
GZV	Gepacktes Zellvolumen
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonat
IgG	Immunglobulin der Klasse G
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
mA	Milliampere
MG	Molekulargewicht
N	Normal
Min	Minute
Mops	3-[N-Morpholino]Propansulfonsäure
mV	Millivolt
mRNA	messenger-RNA
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NADP ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidierte Form)
NAR	Nitratreduktase
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
NDH-1	NADH-Dehydrogenase (Typ 1)
NDH-2	NADH-Dehydrogenase (Typ 2)
NIR	Nitritreduktase
nm	Nanometer
OD _{750nm}	Optische Dichte bei 750 nm
ORF	Open-Reading-Frame
p.a.	pro analysis (zur Analyse)
P680	Pigment 680, Reaktionszentrums-Chlorophyll in PS II
P700	Pigment 700, Reaktionszentrums-Chlorophyll in PS I
PBS	Phycobilisomen
PC	Phycocyanin
PCC	Pasteur Culture Collection
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
P _i	anorganisches Phosphat
pI	theoretischer Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid

ppm	parts per million
PQ	Plastochinon
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
PYP	<u>P</u> hotoactive <u>Y</u> ellow <u>P</u> rotein
Rel. Einheit	Relative Einheit
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RR	Response Regulator
RT	Raumtemperatur
SbtA	<u>S</u> odium <u>b</u> icarbonate <u>t</u> ransport
SDS	Sodium Dodecylsulfate (Natrium-Dodecylsulfat)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sec	Sekunde
sp.	Spezies
Stammlsg.	Stammlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Thylakoidmembran
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
ü.N.	über Nacht
U	Enzymeinheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v / v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
W	Watt
w / v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
WT	Wildtyp

8. Danksagung

Frau Prof.'in Dr. E.K. Pistorius danke ich für die interessante Aufgabenstellung, für die engagierte Betreuung und die vielen konstruktiven Ideen und Anregungen.

Frau Prof.'in Dr. D. Staiger als Leiterin des Lehrstuhls für Molekulare Zellphysiologie und Herrn Prof. Dr. G.H. Schmid als ehemaligem Leiter des Lehrstuhls für Zellphysiologie danke ich für die Bereitstellung eines Laborplatzes.

Herrn Prof. Dr. N. Murata und Herrn Prof. Dr. I. Suzuki (Division of Cellular Regulation, National Institute for Basic Biology, Myodaiji, Okazaki 444-8585, Japan) danke ich dafür, dass sie mir die von ihnen hergestellte Slr1759-freie Mutante (Hik14) aus *Synechocystis* PCC 6803 für meine Arbeit zur Verfügung gestellt haben.

Bei Herrn PD M. Hagemann (Abteilung für Pflanzenphysiologie, Fachbereich Biowissenschaften, Universität Rostock) bedanke ich mich dafür, dass er mir die Slr1759-freie Mutante (Hik14) hat zukommen lassen.

Bei Herrn HD Dr. K. Niehaus (Leiter der Arbeitsgruppe für Molekulare Phytopathologie am Lehrstuhl für Genetik) möchte ich mich für die Metaboliten-Messungen meiner Proben bedanken, die in seiner Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank Aiko Barsch, der die Probenmessungen sehr engagiert und interessiert durchführte und immer ein offenes Ohr für Fragen hatte.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern (auch den Ehemaligen Dr. Stefanie Neufeld, Dr. Dirk Paul Stephan und Dr. Jörg Tölle) des Lehrstuhls für Molekulare Zellphysiologie, die immer sehr Hilfsbereit waren und für ein sehr angenehmes wissenschaftliches sowie persönliches Arbeitsklima gesorgt haben. Es hat sehr viel Spaß mit Euch gemacht. Hierbei möchte ich besonders PD Dr. Klaus-Peter Michel für seine konstruktiven Besprechungen und seine große Hilfsbereitschaft danken.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung und den bedingungslosen Rückhalt. Mein Dank gilt auch meinen Freunden, insbesondere Sven und Sabine Brand sowie Ursus für die Korrekturen meines Manuskriptes und für die zahlreichen Gespräche.

9. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst habe und keine anderen als die genannten Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Bielefeld, im Mai 2005

Anke Nodop