

**Proteolyse in *Synechocystis* sp. PCC 6803:
Funktion der Methionin-Aminopeptidase 2 und FtsH2-
Protease für die Photosystem II-Stressresistenz**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt von
Diplom-Biologin Miriam Drath
aus Berlin

angefertigt im Fachbereich Biologie und Chemie am
Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie an der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Peter R. Schreiner

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Forchhammer
Institut für Mikrobiologie/Organismische Interaktionen
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2. Gutachter: Prof. Dr. C. Forreiter
Institut für Pflanzenphysiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Cyanobakterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 als Modellorganismus	1
1.2 Proteasen.....	2
1.2.1 Die Deg-Peptidasefamilie	2
1.2.2 Die SppA-Peptidasen.....	3
1.2.3 Die FtsH-Peptidasenfamilie	3
1.2.4 Die Clp-Peptidasenfamilie.....	5
1.2.5 Die Methionin-Amino-peptidasen	5
1.3 Photosynthese	7
1.3.1 Photosynthesepigmente und Antennenkomplexe der Cyanobakterien.....	7
1.3.2 Der Photosyntheseapparat von Cyanobakterien.....	9
1.3.3 Der Multiproteinkomplex Photosystem II (PSII).....	10
1.3.4 Photoinhibition	12
1.4 Stickstoff-Metabolismus in Cyanobakterien	12
1.5 Ammonium-Toxizität	15
1.6 Globale Stickstoffkontrolle und die P _{II} -Proteine.....	16
1.6.1 Das P _{II} -System.....	16
1.6.2 Transkriptionelle Stickstoffregulation in Cyanobakterien.....	17
1.7 Stickstoffmangel (Chlorose) in Cyanobakterien	18
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Chemikalien, Enzyme und Größenstandards.....	23
2.1.1 Enzyme.....	23
2.1.2 Größenstandards	23
2.2 Molekularbiologische Kits	24
2.3 Plasmide und Oligonukleotide.....	24
2.4 Bakterienstämme	26
2.4.1 Cyanobakterien.....	26
2.4.2 <i>Escherichia coli</i> (E.coli)	27

2.5	Kulturmedium.....	27
2.5.1	Kulturmedium für Cyanobakterien.....	27
2.5.2	Kulturmedium für <i>E.coli</i>	28
2.6	Puffer und spezielle Reagenzien	29
2.6.1	Puffer	29
2.6.2	Antibiotika	29
2.6.3	Photosynthese-Inhibitoren und Hill-Reagenzien	29
2.7	Antikörper.....	30
2.8	Kultivierung von Bakterienstämmen.....	30
2.8.1	Anzucht von Cyanobakterien	30
2.8.2	Induktion von Stress in <i>Synechocystis</i> -Zellen	31
2.8.2.1	Stickstoffmangel.....	31
2.8.2.2	Hochlicht-Exposition	32
2.8.2.3	Ammoniak-Behandlung.....	32
2.8.3	Die Regeneration und Überlebensfähigkeit von Cyanobakterien.....	32
2.8.4	Anzucht von <i>E.coli</i>	33
2.8.5	Kultivierung von Stammkulturen	33
2.8.6	Bestimmung der Zelldichte	33
2.9	Zellernte.....	34
2.9.1	Zellernte für physiologische Experimente	34
2.9.2	Zellernte für Proteinanalysen/RNA-Isolierung.....	34
2.10	Molekularbiologische Standardtechniken.....	34
2.10.1	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Synechocystis</i> -Zellen	34
2.10.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	35
2.10.3	Isolierung der Gesamt-RNA aus <i>Synechocystis</i> -Zellen	36
2.10.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	37
2.10.5	Agarose-Gelelektrophorese	38
2.10.6	Präparation von DNA aus dem Agarosegel	38
2.10.7	Restriktion von DNA.....	38
2.10.8	Ligation von DNA-Fragmenten und Vektoren	39
2.10.9	Das Einbringen von Fremd-DNA.....	39
2.10.9.1	Transformation von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	39
2.10.9.2	Transformation von <i>E.coli</i>	40
2.10.9.3	Konjugation von <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	41
2.10.10	DNA-Sequenzanalyse.....	42
2.10.11	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	42
2.10.11.1	Ganz-Zell-PCR von <i>Synechocystis</i> -Zellen	43
2.10.11.2	Semi-quantitative RT-PCR.....	43
2.10.11.3	Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR.....	44
2.10.12	5`RACE (<u>R</u> apid <u>A</u> mplification of 5` <u>c</u> DNA <u>e</u> nds).....	45

2.11	Überexpression und Reinigung von Fremdprotein in <i>E.coli</i>	46
2.11.1	Überexpression von MAP-2 in <i>E.coli</i>	46
2.11.2	Aufreinigung des MAP-2-Proteins (MAP-2-His)	47
2.11.3	Dialyse von MAP-2 und Antikörperproduktion	48
2.12	Proteinanalysen	48
2.12.1	Herstellung von Proteinextrakten	48
2.12.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	49
2.12.3	Proteinfractionierung durch Ultrazentrifugation.....	49
2.12.4	Präparationen von Thylakoidmembranen	49
2.12.5	Photometrische Spektren.....	50
2.12.6	Elektrophoretische Trennung der Proteine	50
2.12.6.1	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	50
2.12.6.2	Denaturierende PAGE	51
2.12.6.2.1	Denaturierende PAGE nach Laemmli	51
2.12.6.2.2	Denaturierende PAGE nach Schagger und von Jagow	52
2.12.7	Färbemethoden für Proteingele	53
2.12.7.1	Coomassie-Färbung	53
2.12.7.2	Silberfärbung nach Blum	53
2.13	Western-Blot-Analyse	54
2.14	Protein-DNA-Interaktionsstudien.....	55
2.14.1	Retardierungs-Analyse	55
2.14.1.1	Radioaktiv Markierung von DNA-Fragmenten	55
2.14.1.2	Aufreinigung radioaktiv markierter DNA-Fragmente	56
2.14.1.3	Reaktionsansatz für die Gel-Retardierung	56
2.14.2	Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse (<i>BIAcore</i>)	57
2.15	Physiologische Experimente mit Cyanobakterien	58
2.15.1	Nachweis von Biolumineszenz in <i>Synechococcus</i> -Zellen.....	58
2.15.2	Extraktion von Chlorophyll <i>a</i> nach Tandeau de Marsac.....	59
2.15.3	Extraktion von Chlorophyll <i>a</i> nach Mackinney	59
2.15.4	Pigmentanalyse in Cyanobakterien.....	59
2.15.5	Fluoreszenzmessungen.....	60
2.15.5.1	77K Pigment-Fluoreszenzemissions-Spektroskopie	60
2.15.5.2	<i>In vivo</i> PSII-Analyse mittels Chlorophyll Fluoreszenz Fluorometer	61
2.15.6	Photosynthetische und respiratorische <i>in vivo</i> Aktivität von <i>Synechocystis</i> -Zellen	63
2.15.7	Belichtungsexperimente mit monochromatischem Licht	64
2.16	Mikroskopie von gefärbten <i>Synechocystis</i> -Zellen	65

I.	Physiologische und molekularbiologische Charakterisierung der Methionin-Aminopeptidase 2 (MetAP2)-defizienten Mutante in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	
3.1	Phänotypische Charakterisierung von <i>Synechocystis</i> -Zellen unter Stickstoffmangel (Chlorose)	67
3.1.1	Pigmentabbau während der Chlorose	67
3.1.2	PSII-Aktivität während der Chlorose	69
3.1.3	Abbau der Gesamtproteine in den ersten Phasen der Chlorose	72
3.1.4	Regenerationsfähigkeit chlorotischer <i>Synechocystis</i> -Kulturen	73
3.1.4.1	Regenerationsexperimente auf festem BG-11 ^N Medium	74
3.1.4.2	Regenerationsexperimente in flüssigem BG-11 ^N Medium	74
3.1.4.3	Mikroskopische Analyse chlorotischer Zellen (<i>Life/Dead Stain</i>)	75
3.2	Charakterisierungen der <i>Synechocystis</i> -Zellen während der Hochlicht-Exposition	77
3.2.1	<i>In vivo</i> PSII-Analyse während der Hochlichtbestrahlung	77
3.2.2	Spektroskopische Untersuchung des Pigmentabbaus	78
3.2.3	Überlebensfähigkeit der MetAP2-defizienten-Zellen während der Hochlichtbestrahlung	79
3.3	Phänotypische Charakterisierung von <i>Synechocystis</i> -Zellen unter stickstoffreichen, photoautotrophen Bedingungen	80
3.3.1	Analyse der Wachstumsrate	80
3.3.2	Spektroskopische Analyse der Pigmentzusammensetzung	81
3.3.3	Messung der photosynthetischen und respiratorischen Aktivität <i>in vivo</i>	82
3.3.4	<i>In vivo</i> PSII-Analyse unter Standardbedingungen	83
3.3.5	DCMU-Toleranz	87
3.4	Spektroskopische Analyse des PSII der MetAP2-defizienten <i>Synechocystis</i> -Zellen	89
3.4.1	Tiefemperatur-Pigment-Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie	89
3.4.1.1	77K Pigment-Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie von <i>Synechocystis</i> -Zellen unter Standardbedingungen	89
3.4.1.2	77K Pigment-Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie von <i>Synechocystis</i> -Zellen nach der Hochlicht-Exposition	90
3.4.1.3	77K Pigment-Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie von <i>Synechocystis</i> -Zellen unter Stickstoffmangel	92
3.4.2	Biochemische Analyse der PSII-Untereinheiten der MetAP2-defizienten <i>Synechocystis</i> -Zellen	93
3.4.2.1	PSII unter stickstoffreichen Bedingungen	94
3.4.2.2	PSII nach der Hochlicht-Exposition	95

3.5	Einfluss von Stress auf die Expression der <i>map</i> -Gene	95
3.5.1	Sättigungsbestimmung der Amplifikation	96
3.5.2	Expression der <i>map</i> -Gene während des Stickstoffmangels.....	96
3.5.3	Expression der <i>map</i> -Gene während der Hochlicht-Exposition	97
3.5.4	Expression der <i>map</i> -Gene unter photoautotrophen Bedingungen ..	97
3.5.5	Expression der <i>map-1</i> - und <i>map-3</i> -Gene in MetAP2-defizienten Zellen	98
3.6	Zelluläre Lokalisation der MetAP2 in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (Antikörperproduktion)	99
3.6.1	Lokalisation von MetAP2 unter photoautotrophen Bedingungen ...	100
3.6.2	Lokalisation und Expression von MetAP2 unter Stickstoffmangel..	101
3.7	Promotoranalyse des <i>map-2</i> -Gens	102
3.7.1	Untersuchung des 5` Endes des <i>map-2</i> - (slr0918) Transkripts.....	102
3.7.2	Bindungsanalyse von NtcA an das potentielle NtcA-Bindemotiv der <i>map-2</i> -Promotorregion	103
3.7.2.1	Biolumineszenzanalyse in <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	103
3.7.2.2	Gel-Retardierungs-Analyse.....	104
3.7.2.3	Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse (<i>BIAcore</i>)	105
3.8	Stammbaumanalyse der MetAP`s in Cyanobakterien.....	107
II.	Das Phänomen der Ammonium-Toleranz in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 und die Beteiligung der FtsH2-Protease	
3.9	Ammonium-Toleranz in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	109
3.9.1	Die Überlebensfähigkeit der <i>Synechocystis</i> -Zellen in der Gegenwart von Ammoniak	109
3.9.2	Ammonium-Toleranz der <i>Synechocystis</i> Wildtyp- und FtsH2-defizienten-Zellen	110
3.10	Inhibition der PSII-Aktivität in der Gegenwart von Ammoniak	111
3.11	Inhibition der PSII-Aktivität in Abhängigkeit der Lichtintensität.....	113
3.12	Abhängigkeit der Ammonium-Toleranz vom FtsH2-vermittelten PSII-Reparaturzyklus	114
3.12.1	Inhibition des PSII-Reparaturzyklus in der Gegenwart von Ammoniak.....	114
3.12.2	Abbau des D1-(PsbA) Proteins in der Gegenwart von Ammoniak	116
3.13	Wellenlängen-abhängige Inhibition der PSII-Aktivität in der Gegenwart von Ammoniak	116

4	Diskussion	118
I.	Charakterisierung der <i>Mmap2</i> in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	
4.1	Das PSII der <i>Mmap2</i> -Zellen ist in seiner Funktion beeinträchtigt.....	118
4.1.1	Ist das D1-(PsbA) Protein ein direktes Substrat der MetAP2 in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803?.....	118
4.1.2	In dem PSII der <i>Mmap2</i> -Zellen ist das CP47-Protein fehlerhaft assoziiert.....	121
4.1.3	Das PSII in <i>Mmap2</i> -Zellen ist nicht resistent gegenüber Streß.....	124
4.2	Vergleich der <i>map-2</i> -Mutante mit phänotypisch ähnlichen PSII-Mutanten und die mögliche Beteiligung weiterer PSII-Untereinheiten am <i>Mmap2</i> -Phänotyp.....	126
4.3	Physiologische Funktionen der MetAP`s in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	127
4.4	Transkriptionelle Regulation des <i>map-2</i> -Gens in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	129
II.	Das Phänomen der Ammonium-Toleranz in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 und die Beteiligung der FtsH2-Protease an diesem Prozess	
4.5	Ökologische Relevanz der Ammonium-Toxizität in Habitaten photoautotropher Organismen	133
4.6	Ammoniak-induzierte Photoinhibition des PSII in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 und die Wichtigkeit der FtsH2-Protease in diesem Prozess.	134
4.7	Das Phänomen der PSII-Inhibition.....	137
4.8	Ein Modell der durch Ammoniak-induzierten Photoinhibition des PSII in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	138
5	Zusammenfassung	141
6	Literaturverzeichnis	143
7	Abkürzungsverzeichnis	160

1 Einleitung

1.1 Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 als Modellorganismus

Cyanobakterien sind Gram-negative Bakterien, die ein eigenes Phylum im Reich der *Bacteria* einnehmen. Ihre Morphologie ist sehr vielfältig: sie kommen als Einzeller, stäbchen- und kokkenförmige Bakterien, sowie in filamentösen Formen vor. Durch ihren vielseitigen Metabolismus sind Cyanobakterien in der Lage, alle Ökosysteme zu besiedeln: Terrestrische, Süß- und Meerwasserbiotope und ebenso extreme Habitate, wie heiße Quellen, Wüstenböden und Salzseen. Einige Arten leben in Symbiosen mit Pflanzen (Farne, Moose, Cycaden) Pilzen, und Invertebraten. Cyanobakterien betreiben oxygene Photosynthese und besitzen einen Photosyntheseapparat, der den Pflanzen ähnlich ist, und unterscheiden sich damit von anderen photoautotrophen Prokaryonten, die anoxygene Photosynthese betreiben. Mittels der Photosynthese generieren sie Reduktionsäquivalenten und ATP zur Assimilation anorganischer Nährstoffe und nutzen Kohlendioxid als Kohlenstoffquelle, welches über den Calvin-Zyklus fixiert wird. Cyanobakterien sind wichtig für globale Kohlenstoff-, Sauerstoff- und Stickstoffzyklen. Die Vorläufer der heutigen Cyanobakterien begannen vor 3,5 Milliarden Jahren die damals reduzierte Atmosphäre mit Sauerstoff anzureichern und gelten als die Vorläufer der Plastiden in Pflanzen (Endosymbiontentheorie).

In dieser Arbeit wurde mit dem einzelligen Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gearbeitet. *Synechocystis* ist der erste photosynthetisch aktive Organismus, dessen Genom komplett sequenziert wurde (Kaneko *et al.*, 1996). Das Genom hat eine Größe von 3.57 Mbp und kodiert für 3168 offene Leserahmen (ORF). Jede Zelle weist 10-12 Kopien der Chromosome auf.

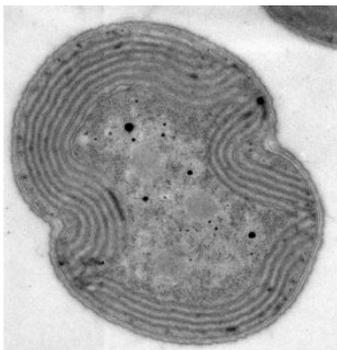


Abbildung 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme des einzelligen *Synechocystis* sp. PCC 6803. Sichtbar sind die Thylakoide an der Peripherie der Zellwand, sowie mittig gelegene Carboxysomen und andere Zelleinschlüsse.

Alle Bakterien sind in ihrem Lebensraum verschiedenen Umweltfaktoren ausgesetzt und unterliegen damit ständigen Schwankungen der abiotischen Faktoren wie Temperatur, Licht, pH-Wert und Nährstoffangebot. Die Anpassung erfolgt intrazellulär zum einen auf der Ebene der Genexpression (transkriptionell) durch Regulationen der Aktivität von Transkriptionsfaktoren. Die zweite gleichermaßen bedeutende Regulationsebene ist die Post-translationelle Regulation. Von herausragender Bedeutung sind hierbei regulierte proteolytische Prozesse, die die Aktivierung neu-synthetisierter Proteine, die Stabilität oder den Abbau von regulatorischen oder missgefalteten Proteinen beeinflussen.

1.2 Proteasen

Proteasen katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen. Sie werden auf Grund des katalytischen Mechanismus, der Substratspezifität, den Cofaktoren und der chemischen Beschaffenheit ihres katalytischen Zentrums klassifiziert. Der spezifischen Substraterkennung dienen kurze Aminosäuresequenzen, die sich N- oder C-terminal befinden und zur Erkennung des jeweiligen Substrats exponiert sein müssen.

Im Genom von *Synechocystis* sp. PCC 6803 kodieren 63 Genloci für Proteasen, was einem Anteil von 2% des Gesamtgenoms entspricht (Sokolenko *et al.*, 2002). Interessanterweise besitzen Organismen mit unterschiedlicher Lebensform und Zellstruktur ein ähnliches Komplement an Proteasen. Die zellulären Proteasen von *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*) wurden auf Grund von Homologien zueinander in Familien eingeteilt (Sokolenko *et al.*, 2002). Die Einteilung der Proteasen erfolgte in acht Gruppen mit den Familien der Clp-, Deg-, FtsH-, SppA-Proteasen, den prozessiven Peptidasen und prozessiven Metalloproteasen, sowie den *leader*- und Amino-peptidasen.

1.2.1 Die Deg-Peptidasefamilie

Die Mitglieder der Deg-Peptidasefamilie sind ATP-abhängige Serinproteasen, die in Eukaryonten und Prokaryonten zu finden sind und eine Rolle beim Abbau von beschädigten und missgefalteten Proteinen unter Stressbedingungen spielen. Sie

kommen membrangebunden oder löslich im Periplasma der Zellen vor. In *A.thaliana* sind 14 Mitglieder der Deg (Htr)-Proteasen bekannt, während in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (HtrA, HhoA, HhoB) und *E.coli* (DegP, DegQ, DegS) nur drei Mitglieder vorhanden sind. Die Deg2-Protease in *A.thaliana* ist in dem primären Prozess des Austausches des D1-Proteins im PSII beteiligt (Haußühl *et al.*, 2001).

1.2.2 Die SppA-Peptidasen

SppA-Peptidasen sind an der cytoplasmatischen Seite in der Thylakoidmembran lokalisiert und an der Anpassung von veränderten Lichtbedingungen beteiligt. SppA-Peptidasen in *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurden zwei Mitglieder (SppA1 und SppA2) und in *A.thaliana* nur eine SppA-Protease identifiziert (Pojidaeva *et al.*, 2004).

1.2.3 Die FtsH-Peptidasefamilie

Die FtsH-Proteasen sind membrangebundene ATP- und Zn^{2+} -abhängige Metalloproteasen und Mitglieder der AAA-Protease Familie (Gottesman, 1997a). Die FtsH-Protease zeigt zwei transmembrane Helices in der Thylakoidmembran und eine ATPase-Domäne, die katalytische Domäne (Zink-bindende Domäne), sowie einen Leuzin-*zipper* in der cytoplasmatischen Seite (Ogura *et al.*, 1991). Die Protease ist als hexamerer Holoenzym in der Thylakoidmembran aktiv. Das Substrat wird ATP-abhängig durch die zentrale Pore geleitet und mittels der Zink-bindenden Domäne degradiert.

Das Genom von *Synechocystis* sp. PCC 6803 kodiert für vier putative FtsH-Homologe aus *E.coli* (Kaneko *et al.*, 1996). FtsH1 (slr1390) und FtsH3 (slr1604) sind für die Lebensfähigkeit der Zellen unter Standardbedingungen notwendig (Mann *et al.*, 2000). Während die Deletion von *ftsH4* (slr1463) keinen veränderten Phänotyp hervorruft (Mann *et al.*, 2000), führt die Insertionsmutagenese von *ftsH2* (slr0228) zu photosensitivem Wachstum und einer beeinträchtigten PSII-Reparatur (Silva *et al.*, 2003; Komenda *et al.*, 2006). In *Synechocystis* sp. PCC 6803 konnte mittels Mutagenese gezeigt werden, dass die FtsH2-Protease in den ersten

Phasen der D1-Degradierung eine Rolle spielt. Allerdings, anders als in Pflanzen (Lindahl *et al.*, 2000; Haußühl *et al.*, 2001), ist keine der Deg-Proteasen für die D1-Degradierung in *Synechocystis* sp. PCC 6803 essentiell (Barker *et al.*, 2006).

Im Genom von *A.thaliana* wurden 12 Gene, die für FtsH kodieren identifiziert (Sokolenko *et al.*, 2002) und sind in den Thylakoiden der Chloroplasten oder in den Mitochondrien lokalisiert (Adam *et al.*, 2001a und b). Das Homolog zu FtsH2 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist die Var2-Protease in *A.thaliana* (Sokolenko *et al.*, 2002). Var2 ist in den Thylakoidmembranen in den Chloroplasten lokalisiert und an der D1-Degradierung während der Photoinhibition beteiligt, wie die FtsH2-Protease in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Lindahl *et al.*, 1996; Bailey *et al.*, 2002). Die FtsH2-Protease ist ebenso in der Biogenese und der Degradierung von PSII-Untereinheiten involviert (Silva *et al.*, 2003; Komenda *et al.*, 2006; Stirnberg *et al.*, 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass die FtsH2-Protease eine Rolle in dem CCM (*CO₂-concentrating-mechanism*) in *Synechocystis* sp. PCC 6803 unter geringer anorganischer Kohlenstoff-Signalisierung und an der Expression von CCM-induzierten Genen beteiligt ist (Zhang *et al.*, 2007).

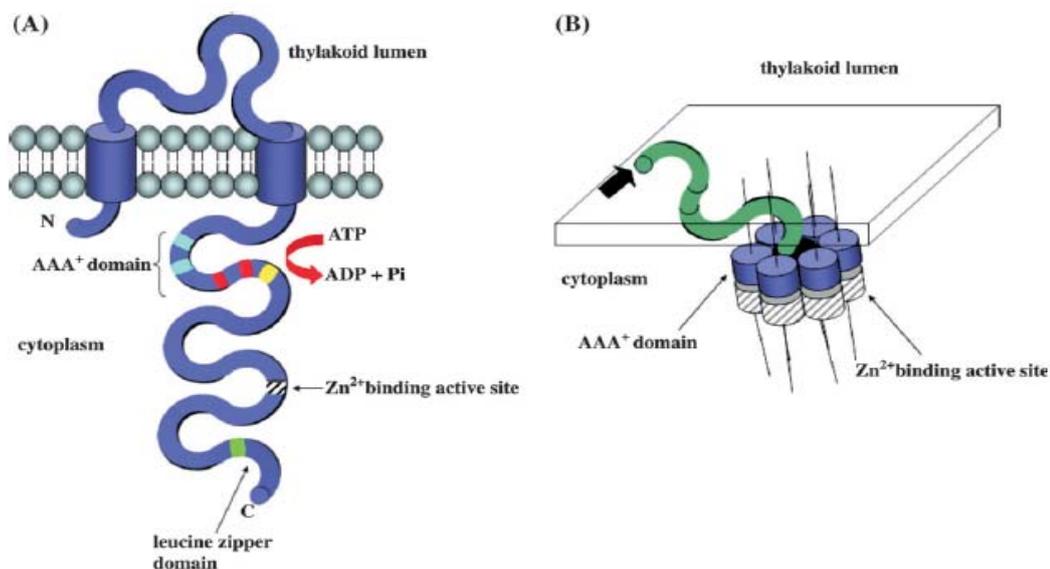


Abbildung 1.2: Struktur der FtsH-Protease. (A) Schematische Darstellung der FtsH-Protease Untereinheiten. Gezeigt sind zwei transmembrane Helices, die ATPase-Domäne (AAA⁺), die Zinkbindende Seite, sowie der Leuzin-zipper. (B) Die Skizze zeigt FtsH während der Spaltung des D1-Proteins in der zentralen Pore des hexameren Holoenzym. Die Abbildung wurde Nixon (2005) entnommen.

Nixon erstellte ein Modell der PSII-Reparatur in *Synechocystis* sp. PCC 6803, basierend auf dem Modell der PSII-Reparatur in den Chloroplasten von höheren Pflanzen (Aro *et al.*, 1993; Nixon, 2005). Zunächst führt die Beschädigung des PSII zu einer Konformationsänderung, die die Schädigung des D1-Proteins

signalisiert, worauf eine Monomerisierung und eine Disassemblierung des PSII-Komplexes folgen. Das D1-Protein wird FtsH2-abhängig degradiert und der Austausch des neu-synthetisierten D1-Proteins erfolgt synchron. Anschließend findet der Zusammenbau der extrinsischen Proteine in den Thylakoiden statt.

1.2.4 Die Clp-(*caseino-lytic protease*) Peptidasenfamilie

Mitglieder der Clp-Peptidasenfamilie sind ATP-abhängige Serinproteasen, die löslich im Cytoplasma von Eubakterien, im Stroma der Chloroplasten oder in anderen Pflanzenorganen lokalisiert sind. Die Anzahl der *clp*-Gene variiert in den photosynthetisch aktiven Organismen (Clarke, 1999; Sokolenko *et al.*, 2002). In *Synechocystis* sp. PCC 6803 kodieren insgesamt acht Gene für die Clp-Protease-Untereinheiten, während in *A.thaliana* 26 Gene für Clp-Proteasen existieren. Die Proteasen sind aus mehreren Untereinheiten aufgebaut (Schirmer *et al.*, 1996; Gottesman, 1997a und b) und fungieren als molekulare Chaperone, die eine Korrektur oder Degradierung der missgefalteten Proteine bewirken (Sokolenko *et al.*, 2002; Sjögren *et al.*, 2006). Clp-Proteasen werden durch unterschiedliche Stressfaktoren (Hochlicht, Hitze oder Nährstoffmangel) in *A.thaliana*, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *E.coli* und *Bacillus subtilis* induziert (Sokolenko *et al.*, 2002; Kock *et al.*, 2004).

1.2.5 Die Methionine-Amino-peptidasen (MetAP)

Die pro- und eukaryontischen MetAP`s sind Metalloamino-peptidasen, kommen universell vor und haben eine essentielle, physiologische Bedeutung. Sie sind Exopeptidasen, die ATP-unabhängig eine Reifung des Proteins in eine aktive Form durch die Abspaltung von einem Aminosäurenrest, dem Methionin co- oder post-translationell durchführen (Frottin *et al.*, 2006). Die Proteinsynthese in Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten höherer Pflanzen beginnt mit einem Formylmethionin (fMet), welches durch die Peptid-Deformylase-Aktivität entfernt wird. Somit kann das nun freistehende Methionin am N-Terminus der Proteine von MetAP`s prozessiert werden. Da mindestens 80% der synthetisierten Proteine N-terminal prozessiert werden, sind MetAP`s essentiell für die Lebensfähigkeit der Zellen (Giglion *et al.*, 2003). Die Aktivität der MetAP`s spielt für das intrazelluläre

targeting einiger Proteine und für den Protein-Umsatz eine essentielle Rolle (Bazan *et al.*, 1994; Lowther und Matthews, 2002; Frottin *et al.*, 2006). MetAP`s zeigen eine enge Substratspezifität, wobei die Spaltung des Methionins von der Größe und Ladung der benachbarten Aminosäuren abhängig ist (Tsunasawa *et al.*, 1985; Huang *et al.*, 1987; Ben-Bassat *et al.*, 1987).

Die Kristallisation des Enzyms MetAP aus *E.coli* zeigte eine symmetrische *pita-bread*-Struktur mit einem aktiven Zentrum und Kobalt oder Zink als Cofaktoren. Das zweikernige Metallzentrum wird von fünf konservierten Aminosäuren des N-Terminus gebildet, in dem der N-Terminus des Substrats binden kann (Methionin-Bindenische). Somit kommt es zu Wechselwirkungen des Substrates mit den Cofaktoren (Roderick und Matthews, 1993; Lowther *et al.*, 1999). Der katalytische Mechanismus der Methionin-Spaltung ist bisher nicht detailliert aufgeklärt.

Aufgrund ihrer essentiellen Funktion spielen Inhibitoren eukaryontischer MetAP`s in der Entwicklung von Medikamenten gegen Krebs, Parasiten, Atherosklerose und Angiogenese im Menschen eine wichtige Rolle (Ingber *et al.*, 1990; Vaughan *et al.*, 2002).

In *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurden drei Gene (*map-1-3*) identifiziert, die funktionale MetAP`s monocitronisch kodieren und deren *in vitro* Aktivität untersucht wurde (Atanassova *et al.*, 2003). Diese Aminopeptidasen (MetAP1-3) spalten *in vitro* das Methionin von Tripeptiden und besitzen Zn^{2+} , Co^{2+} oder Mg^{2+} als Cofaktoren in der katalytischen Domäne. Die drei cyanobakteriellen MetAP`s zeigen Unterschiede in Substratspezifität, pH- und Temperatur-Optimum (Atanssova *et al.*, 2003). MetAP3 (c3MetAP-Ia) zeigte die höchste Aktivität aller MetAP`s in *Synechocystis* und eine effektive Dipeptidasen-Aktivität. Im Gegensatz dazu hatte das *map-1*-Genprodukt (c2MetAP-Ia) kaum *in vitro* Aktivität unter den getesteten Bedingungen, während das *map-2*-Produkt (c1MetAP-Ia) eine, im Vergleich zu MetAP3, nur leicht eingeschränkte Aktivität zeigte. Die Bedeutung der drei MetAP`s in *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist ungeklärt.

1.3 Photosynthese

Die Lebensprozesse auf der Erde hängen von der Energie des Sonnenlichts direkt (Phototrophie) oder indirekt (Heterotrophie) ab. Pflanzen, tierische und bakterielle Organismen, können mithilfe von Pigmenten und Photorezeptoren bestimmte Strahlungsanteile des Lichts absorbieren. Der bedeutendste und der auf der Erde am längsten (3,5-4 Milliarden Jahren) vorkommende biochemische Prozess der Umwandlung von Lichtenergie ist die Photosynthese. Bei dieser Reaktion werden die energiereichen Verbindungen Adenosintriphosphat (ATP) und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) lichtabhängig gebildet, die bei der Kohlenstofffixierung im Calvin-Zyklus für die Synthese von Kohlenwasserstoffen genutzt werden. Pflanzen, Algen und Cyanobakterien sind in der Lage, unter der Nutzung von Wasser als Elektronendonator oxygene Photosynthese zu betreiben, wobei molekularer Sauerstoff produziert wird.

Die Fähigkeit Photosynthese zu betreiben, geht ursprünglich auf Bakterien zurück, deren anaerob arbeitende Photosyntheseapparate nur ein Reaktionszentrum besitzen. Cyanobakterien besitzen im Gegensatz dazu einen modernen oxygenen Photosyntheseapparat mit zwei Reaktionszentren, an denen im Laufe der Evolution kaum Veränderungen stattfanden. Die Proteinkomplexe eukaryontisch photosynthetisch-aktiver Organismen sind bakteriellen Ursprungs (Mereschkowsky, 1905; Martin *et al.*, 1998; McFadden und van Dooren, 2004). Die heute allgemein anerkannte Endosymbiontentheorie, postuliert von Margulis (1970), besagt, dass ein frei lebender phototropher Prokaryont von einem Eukaryont phagocytotisch als Endosymbiont aufgenommen wurde und sich beide co-evolutionär entwickelt haben. Der photosynthetische Prokaryont wurde nicht katabolisiert, sondern im Zellinneren domestiziert, wodurch die photosynthetischen Eukaryonten entstanden.

1.3.1 Photosynthesepigmente und Antennenkomplexe der Cyanobakterien

Cyanobakterien besitzen so genannte Phycobilisomen (PBS) als Lichtsammelkomplexe, welche die absorbierte Lichtenergie effizient an das

photochemisch aktive Reaktionszentrum weiterleiten. PBS sind mobile Komplexe, die auf der Oberfläche zwischen Photosystem (PS) II und PSI bei bestimmten Lichtbedingungen wandern (Mullineaux und Emlyn-Jones, 2005). Sie bestehen aus Phycobiliproteinen, die über Thioetherbrücken kovalent Phycobiline als Chromophore (offenkettige Tetrapyrrole) gebunden haben. Die Phycobiliproteine sind Heterodimere mit α - und β -Untereinheiten, wobei drei Heterodimere zu einem Trimer aggregieren und die Bausteine der PBS bilden (Bryant, 1994). Das Phycobiliprotein Allophycocyanin bildet den Kern, während Phycocyanin und Phycoerythrin periphere Stäbchen bilden. Alle Komponenten sind über Chromophor-freie Linkerproteine untereinander, sowie der Kern mit der Thylakoidmembran verbunden. PBS binden an der cytoplasmatischen Seite der Thylakoidmembranen an das Photosystem. Unter Schwachlichtbedingungen spielt das Phänomen der *state transition* in Cyanobakterien eine bedeutende Rolle, indem durch die Mobilität der PBS die Effizienz der Antennenkomplexe maximiert wird (Bryant, 1994; Mullineaux und Emlyn-Jones, 2005).

Zur Erweiterung des spektralen Wirkungsbereichs der Photosynthese besitzen Cyanobakterien zusätzlich Chlorophyll *a* und Carotinoide als Lichtsammelpigmente (Siefermann-Harms, 1987). Zudem sind Chlorophylle im Photosystem essentiell zur primären Ladungstrennung. Carotinoide in Pflanzen und photosynthetisch aktiven Prokaryonten spielen eine wichtige Rolle im Schutz der Reaktionszentren vor Photooxidation (Frank und Cogdell, 1996). Sie sind membranständige *quencher*, die die Strahlungsenergie von angeregten Molekülen (Tripletchlorophyll und Singluettsauerstoff) übernehmen und diese Energie in Form von Wärme abgeben (Krinsky und Deneke, 1982; Edge *et al.*, 1997). Bezüglich der Carotinoidzusammensetzung unterscheiden sich Cyanobakterien von den höheren Pflanzen (Bramley *et al.*, 1985). Cyanobakterien fehlt der Xanthophyllzyklus, den höhere Pflanzen zur schnellen Anpassung an hohe Lichtintensitäten nutzen (Demming-Adams *et al.*, 1996).

1.3.2 Der Photosyntheseapparat von Cyanobakterien und der Elektronentransport in den Thylakoidmembranen

Der offenkettige Elektronentransport innerhalb des Photosyntheseapparates erfolgt von dem Multiproteinkomplex PSII über Plastochinon, einem mobilen Elektronenüberträger, zu Cytochrom b_6f -Komplex, über Plastocyanin zu dem Multiproteinkomplex PSI und NADPH (siehe Abb.1.3). Die meisten Komponenten des Photosyntheseapparates liegen in Cyanobakterien und höheren Pflanzen hoch konserviert vor. Die Multienzymkomplexe der Photosynthese sind in den Thylakoidmembranen eingebettet und durchspannen diese mit ihren Membrandomänen. In Cyanobakterien liegen die Thylakoide unkompartimentiert, als ein konzentrisch angeordnetes Netzwerk im Bereich der Zellperipherie vor. Dort sind ebenso die Komponenten der Atmungskette zu finden.

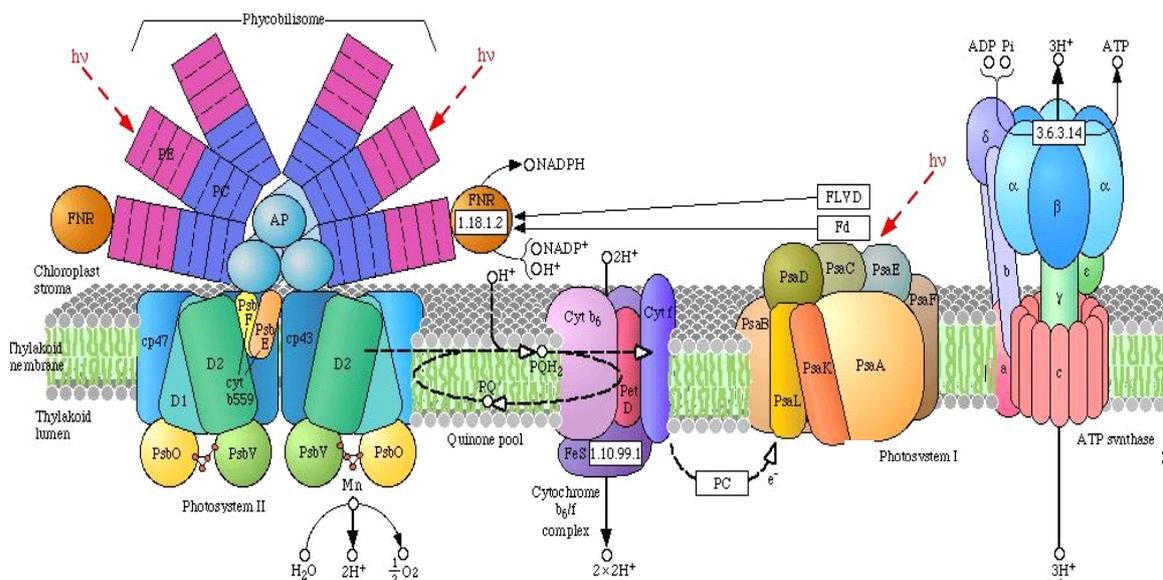


Abbildung 1.3: Darstellung des Photosyntheseapparates in Cyanobakterien. Gezeigt sind die Komponenten des Elektronentransports: Phycobilisomen (PE: Phycoerythrin; PC: Phycocyanin; AP: Allophycocyanin), Photosystem II, Chinonpool, Cytochrom b_6f Komplex, PC (Plastocyanin), Photosystem I, FNR (Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase), Fd (Ferredoxin) und die ATP-Synthase in den Thylakoidmembranen. Die Abbildung wurde Bryant (2004) entnommen.

Der primäre Elektronendonator P680 des PSII, ein Cluster aus vier Chlorophyllmolekülen, geht in einen angeregten Zustand (P680*) über und erreicht ein stark negatives Redoxpotential. Dadurch kann ein Elektron zu Pheophytin transferiert werden. Dieser Zustand des Radikalpaares ist kurzlebig und ein Elektron wird über ein im D2-Protein gebundenes Plastochinonmolekül Q_A zu Plastochinon Q_B transferiert, das in der Plastochinon-Bindenische bindet. Q_B

nimmt zur Ladungsstabilisierung zwei Elektronen vom PSII und zwei Protonen von der Stromaseite auf und bildet das Hydrochinon (PQH₂). Das Hydrochinon überträgt die Elektronen und Protonen auf den Cytochrom *b₆f*-Komplex, wobei Protonen ins Lumen abgegeben werden. Die Elektronen werden über Cytochrom *f* und das Rieske-Protein auf Plastocyanin transferiert, das sich von dem Cytochrom *b₆f*-Komplex löst und PSI reduziert (Kurisu *et al.*, 2003). Im PSI erfolgt die Ladungstrennung, der transmembrane Elektronentransfer auf Ferredoxin und die Abgabe von Protonen ins Lumen (Jordan *et al.*, 2001). PSI kann durch exergonische Reaktionen Elektronen über Ferredoxin auf NADP⁺ übertragen, wobei NADPH entsteht (katalysiert durch die Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase, FNR). Der durch das PSII in Zusammenarbeit mit Cytochrom *b₆f*-Komplex und PSI entstandene transmembrane elektrochemische Protonengradient wird zur Synthese von energiereichem ATP durch die ATP-Synthase genutzt.

Werden Elektronen von dem Mangan-Komplex im OEC auf das Kationradikal (P680⁺) im PSII über das Tyr_Z des D1-Proteins transferiert, wird ein Tyrosin-Radikal gebildet, das als Oxidationsmittel für den Prozess der Wasseroxidation am OEC fungieren kann. Es werden zwei Wassermoleküle gespalten und CO₂ und 4H⁺ freigesetzt, sodass der Mangan-Komplex zu seiner reduzierten Form regeneriert wird (Barber und Nield, 2002; Rappaport *et al.*, 2002; Barber *et al.*, 2006). Der OEC (*oxygen-evolving complex*) wird schrittweise durch die Absorption von vier Lichtquanten oxidiert, wie es im Kok-Zyklus beschrieben wird (Kok, 1970).

1.3.3 Der Multiproteinkomplex Photosystem II (PSII)

Der Multiproteinkomplex des PSII (siehe Abb. 1.4) besteht aus 30 Untereinheiten (Kashino *et al.*, 2002) und hat, abhängig von dem jeweiligen Organismus eine Molekularmasse von 450-700 kDa (Boekema *et al.*, 1995). Verschiedene Röntgenstrukturanalysen von cyanobakteriellem PSII führten zur Aufklärung der Struktur, sowie Funktion der Untereinheiten und der gebundenen Cofaktoren (Zouni *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2004).

Im nativen Zustand liegt das PSII als Dimer mit intrinsischen und extrinsischen Proteinen innerhalb der Thylakoidmembran vor (Boekema *et al.*, 1995; Ferreira *et al.*, 2004). Das Kernstück des PSII ist das Reaktionszentrum, in dem es zur

primären Ladungstrennung kommt. Es besteht aus zwei homologen Proteinen: D1 (PsbA) und D2 (PsbD). Als Cofaktoren binden Chlorophyll *a*, Pheophytin *a*, Plastochinone, β -Carotin und ein Nicht-Häm Eisen, sowie der Tetramangancluster des wasserspaltenden Komplexes an das D1/D2-Heteromer (Zouni *et al.*, 2001; Loll *et al.*, 2005). Diesem Komplex sind Cytochrom *b*₅₅₉, PsbK und die Chlorophyll-bindenden Proteinen CP43 (PsbC) und CP47 (PsbB) der inneren Antenne angelagert (Hankamer *et al.*, 2001).

Einige *low-molecular-mass* Untereinheiten sind in der Peripherie assoziiert, die die Bindung von Chlorophyllen und Carotinoiden stabilisieren (PsbK, PsbJ, PsbN, PsbZ) und die Bindung des Dimers aufrechterhalten (PsbL, PsbM, PsbT).

In Cyanobakterien befindet sich der wasserspaltende Komplex OEC an der lumenalen Seite des PSII und wird von den Aminosäureresten des D1-Proteins, sowie extrinsischen Proteinen PsbO, PsbU und PsbV gebildet. Die PSII Struktur von *Thermosynechococcus elongatus* zeigte, dass der OEC aus einem kubisch angeordnetem Mn_3CaO_4 Cluster besteht und mit einem vierten Mangan-Atom verbunden ist (Chu *et al.*, 1995; Hankamer *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2007).

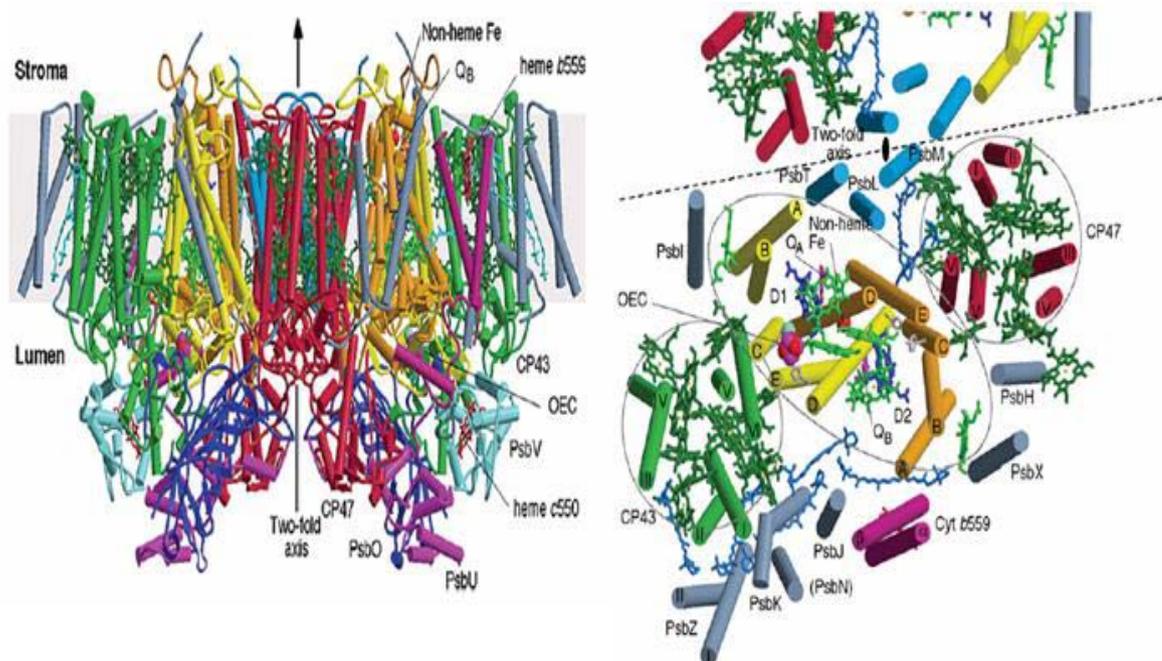


Abbildung 1.4: Röntgenstrukturanalyse des PSII-Komplex von *Thermosynechococcus elongatus*. Die Zylinder repräsentieren die α -Helices von D1 (gelb), D2 (orange), CP47 (rot), CP43 (grün), *Cyt*₅₉₉ (weinrot), PsbL, PsbM, PsbT (blau), PsbH, PsbI, PsbK, PsbZ, PsbN (hellblau). Die extrinsischen Proteine PsbO (dunkelblau), PsbU (purpurrot), PsbV (blaugrün). Chlorophylle der D1/D2 RZ (hellgrün), Pheophytin (blau), die Chlorophylle der Antennenkomplexe (dunkelgrün), β -Carotin (orange), Häm (rot), nicht-Häm-Eisen (rot), Q_A und Q_B sind purpurrot. Das OEC ist in rot gezeigt, die Mn-Ionen in purpurrot und die Ca^{2+} -Ionen in blaugrün. Die Abbildung wurde Barber (2006) entnommen.

1.3.4 Photoinhibition

Das PSII, vor allem das D1-Protein ist eine empfindliche Komponente gegenüber Stressbedingungen. Das D1-Protein ist das Protein mit der höchsten Umsatzrate aller Proteine in der Thylakoidmembran (Aro *et al.*, 1993). Es ist Ziel der lichtinduzierten Schädigung oder Angriffsort vieler Photosynthese-Inhibitoren, wie Herbizide. Der Lichtstress des PSII *in vivo* reduziert die Photosyntheseleistung sobald die Rate der Schädigungen die Kapazität der Reparaturprozesse übersteigt (Photoinhibition). In Pflanzen und in dem Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* konnte gezeigt werden, dass die Photoinhibition des PSII durch Schädigungen des Mangan-Komplexes des OEC ausgelöst wird (Hakala *et al.*, 2005 und 2006; Ohnishi *et al.*, 2005). Die Reaktivierung des Reaktionszentrums erfordert einen effizienten PSII-Reparaturzyklus (Aro *et al.*, 1993). Das geschädigte D1-Protein wird in Pflanzen und Cyanobakterien durch die membrangebundene FtsH2-Protease degradiert (siehe Abschnitt 1.2.3).

1.4 Stickstoff-Metabolismus in Cyanobakterien

Die meisten Cyanobakterien nutzen Nitrat-, Nitrit- oder Ammonium-Verbindungen als Stickstoffquelle. Im Allgemeinen müssen alle aufgenommenen Stickstoffverbindungen intrazellulär zu Ammonium reduziert werden, bevor sie über den GS-GOGAT-Zyklus assimiliert werden können. Somit ist die energetisch günstigste Verbindung Ammonium die bevorzugte Stickstoffquelle.

Die Aufnahme von Ammonium ist von dem pH-Wert der Umgebung abhängig. Ammoniak (NH_3) überwiegt unter alkalinen Bedingungen und kann in Cyanobakterien durch die Membranen diffundieren, während die protonierte Form Ammonium (NH_4^+) in die Zelle transportiert wird (Ritchie und Gibson, 1987; Kleiner, 1981). Ist Ammonium (NH_4^+) in micromolaren Konzentrationen ($0,1\text{-}5\ \mu\text{M}$) vorhanden wird es über hoch affine Ammonium/Methylammonium-Permeasen assimiliert, die in Cyanobakterien über die *amt*-Gene kodiert werden. In *Synechocystis* sp. PCC 6803 konnten drei *amt*-Gene identifiziert werden (*amt1-3*), deren Expression bei hohen Ammoniumkonzentrationen reprimiert wird (Montesinos *et al.*, 1998). Demgegenüber konnte in *Synechococcus elongatus*

PCC 7942 bisher nur ein *amt*-Gen (*amt1*) identifiziert werden (Vazquez-Bermudez *et al.*, 2002), welches genauso wie *amt1* aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 zu dem NtcA-Regulon zählt (s.u.). Die Amt-Proteine der Cyanobakterien sind hydrophobe Polypeptide, die Gaskanäle in der Membran bilden und diese mit 10-12 transmembranen Regionen durchspannen. Amt-Transporter binden extrazellulär NH_4^+ , welches deprotoniert wird und als NH_3 durch einen kleinen Gaskanal geleitet wird (Khademi *et al.*, 2004).

Nitrat ist die hauptsächliche Stickstoffquelle der photosynthetisch aktiven Organismen und kommt in der Umwelt in geringen Konzentrationen ($<1 \mu\text{M}$) vor, weshalb Organismen für die Aufnahme von Nitrat und Nitrit ein hoch-affines ABC (*ATP-binding cassette*)-Transportsystem (Permeasen) besitzen. Diese Transporter binden und hydrolysieren ATP, welches eine Konformationsänderung der transmembranen Domänen bewirkt und den Transport von gelösten Stoffen vermittelt (Davidson und Chen, 2004). Die aktive Aufnahme erfolgt bei geringen Nitrat-Konzentrationen und wird durch die Anwesenheit von Ammonium inhibiert (Flores *et al.*, 1980). In *Synechococcus elongatus* PCC 7942 wird der ABC-Transporter durch die Gene *nrtABCD* kodiert (Luque *et al.*, 1992; Omata *et al.*, 1993), die mit den Genen der Nitrit(*nirA*)- und Nitrat(*narB*)-Reduktase in einem Operon vorliegen (Suzuki *et al.*, 1993). In *Synechocystis* sp. PCC 6803 besteht das Operon nur aus den Genen *nrtABCD-narB*, das Nitratreduktase-Gen (*nirA*) wurde an einer anderen Stelle im Genom lokalisiert (Aichi *et al.*, 2001).

Nitrat und Nitrit werden intrazellulär über die Nitrat- und Nitrit-Reduktase zu Ammonium reduziert (Guerrero *et al.*, 1981; Luque *et al.*, 1994). Zunächst katalysiert die Nitrat-Reduktase (NR) die Reduktion von Nitrat zu Nitrit, wobei zwei Elektronen benötigt werden. Die cyanobakterielle Nitratreduktase ist ein Monomer (80 kDa), enthält Molybdän, sowie ein [4Fe-4S]-Cluster als Cofaktor und wird durch das Gen *narB* kodiert. Die Nitritreduktase (NIR) katalysiert, unter Verwendung von sechs Elektronen, die Reduktion von Nitrit zu Ammonium. Die cyanobakterielle monomere Nitritreduktase wird durch das Gen *nirA* kodiert. Das Genprodukt (56 kDa) enthält ein Eisen-Schwefel-Cluster, sowie ein Sirohäm als prosthetische Gruppen (Rubio *et al.*, 2002; Jepson *et al.*, 2004). Der Prozess ist

an die Photosynthese gekoppelt, da beide Enzymsysteme reduziertes Ferredoxin als physiologischen Elektronendonator verwenden (Manzano *et al.*, 1976).

Die Stickstoffaufnahme ist auf transkriptioneller (siehe Abschnitt 1.6.2) und auf post-translationeller Ebene reguliert. In Cyanobakterien konnte durch Analysen von Mutanten gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Ammonium die Transporterfunktion hemmt. In diesen Prozess sind das Signaltransduktionsprotein P_{II}, sowie das Protein NrtC involviert (Kobayashi *et al.*, 1997 und 2005; Lee *et al.*, 2000). Allerdings ist der molekulare Mechanismus noch nicht bekannt.

Exogen aufgenommenes oder intrazellulär produziertes Ammonium wird in Cyanobakterien in zwei aufeinander folgenden Schritten über den GS-GOGAT-Zyklus assimiliert (Flores und Herrero 1994). Zunächst katalysiert die Glutaminsynthetase (GS) die ATP-abhängige Übertragung von Ammonium auf die Carboxylgruppe von Glutamat, um Glutamin zu erhalten. Im zweiten Schritt wird die Amidogruppe von Glutamin auf das Kohlestoffgerüst α -Ketoglutarat übertragen. Diese Reaktion wird von dem Enzym Glutamat-Synthase bzw. Glutamin-Ketoglutarat-Amidotransferase (GOGAT) unter der Verwendung von zwei Elektronen, die von dem PSI-reduzierten Ferredoxin übertragen werden, katalysiert. Dadurch entstehen zwei Moleküle Glutamat, wovon ein Molekül wieder über die GS amidiert wird und ein Molekül für die Biosynthese von anderen stickstoffhaltigen Verbindungen verwendet wird. Das Kohlenstoffgerüst α -Ketoglutarat wird aus dem Citrat-Zyklus zur Verfügung gestellt.

Cyanobakterien besitzen einen unvollständigen Citrat-Zyklus, da sie das Enzym α -Ketoglutarat-Dehydrogenase nicht besitzen (Stanier und Cohen-Bazire, 1977). Der Metabolit α -Ketoglutarat wird über den GS-GOGAT-Weg aus dem Citrat-Zyklus entfernt und wird in Form von Glutamin zur Biosynthese von Aminosäuren, Nucleinsäuren und anderen stickstoffhaltigen Verbindungen verwendet. Somit ist α -Ketoglutarat in Cyanobakterien die Schnittstelle zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus.

In Cyanobakterien wurden bisher zwei Typen des Enzyms Glutamin-Synthetase (GS) identifiziert, wobei in den meisten Cyanobakterien die GS Typ I, kodiert durch *glnA*, vorkommt. Einige Cyanobakterien, wie *Synechocystis* sp. PCC 6803

enthalten eine weitere GS des Typs III, kodiert durch das *glnN*-Gen, und werden in nicht-diazotrophen Cyanobakterien nur unter Stickstoffmangelbedingungen exprimiert (Reyes und Florencio, 1994; Garcia-Dominguez *et al.*, 1997). Die GS-Aktivität wird auf transkriptioneller (siehe Abschnitt 1.6.2) und post-translationeller Ebene in *Synechocystis* sp. PCC 6803 über eine Protein-Protein-Interaktion der Inaktivierungsfaktoren IF7 und IF17 reguliert (Garcia-Dominguez *et al.*, 1999). Die Inaktivierungsfaktoren werden durch die Gene *gifA* und *gifB* kodiert und stehen unter der Kontrolle von dem Transkriptionsfaktor NtcA (siehe Abschnitt 1.6.2).

1.5 Ammonium-Toxizität

Ammonium ist die hauptsächliche Stickstoffquelle der Pflanzen, Bakterien und Pilze. Allerdings ist es ein paradoxer Nährstoff, denn es hat ebenfalls zytotoxische Wirkung. Pflanzen, die mit Ammonium als alleinige Stickstoffquelle wachsen zeigen Wachstums-, sowie physiologische und morphologische Funktionsstörungen und eine geringere Biomassenproduktion, sowie Änderungen in dem Hormonhaushalt (Britto und Kronzucker, 2002). Die Sensitivität gegenüber Ammonium bewirkt beispielsweise das Absterben der Wälder und das Aussterben einzelner Arten (Britto *et al.*, 2001a und b). Daher ist es essentiell, dass die Ammoniumaufnahme strikt reguliert wird.

In Pflanzen wird die Aktivität der Nitratreduktase posttranslationell reguliert, um hohe, toxisch wirkende Konzentrationen von Nitrat und Ammonium zu vermeiden (Kaiser und Huber, 2001). Die Ammoniumtoxizität in Pflanzen ist auf der zellulären Ebene noch nicht aufgeklärt. Es wurde angenommen, dass Ammonium-Toxizität durch die Entkopplung der Photophosphorylierung verursacht wird (Gerendas *et al.*, 1997; Bligny *et al.*, 1997). Allerdings sind diese Erklärungen sehr umstritten. Im Gegensatz zu Pflanzen sind heterotrophe Bakterien (*Corynebacterium glutamicum*, *E.coli*, *Bacillus subtilis*) resistent gegenüber Ammonium, sie tolerieren Ammonium bis sie durch dessen Aufnahme osmotischen Stress erleiden (Müller *et al.*, 2006). In Cyanobakterien wurde die Ammonium-Toxizität noch nicht untersucht.

1.6 Globale Stickstoffkontrolle und die P_{II}-Proteine

Die Stickstoffaufnahme und Assimilation eines Organismus unterliegt einer strikten Kontrolle und ist abhängig von der Verfügbarkeit verschiedener Stickstoffquellen. Die Anwesenheit von Ammonium führt dazu, dass regulatorische Mechanismen zur Aufnahme anderer Stickstoffquellen unterdrückt werden, die so genannte Ammoniumrepression (Muro-Pastor und Florencio, 2003; Flores und Herrero, 2005).

In der Koordination des Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus spielen die hoch konservierten P_{II}-Signaltransduktionsproteine eine zentrale Rolle und kommen in Bakterien, Archaeae, eukaryontischen Algen und in den Chloroplasten der Pflanzen vor (Tsinoremas *et al.*, 1991; Arcondeguy *et al.*, 2001; Moorhead und Smith, 2003). Die Proteine der P_{II}-Familie können in drei Untergruppen klassifiziert werden: GlnB, GlnK, Nifl (Arcondeguy *et al.*, 2001). Die Signalwahrnehmung erfolgt durch die synergistische Bindung von Effektormolekülen, wie ATP und α -Ketoglutarat (Kamberov *et al.*, 1995; Forchhammer und Hedler, 1997; Jiang *et al.*, 1998). Erfolgen intrazelluläre Änderungen des Stickstoff- oder Kohlenstoffstatus, so kann das P_{II}-Protein kovalent modifiziert werden. Somit wird eine Interaktion mit Rezeptorproteinen möglich, um dessen Aktivität an die vorherrschende Bedingung anzupassen.

1.6.1 Das P_{II}-System

Das cyanobakterielle P_{II}-Protein (GlnB) wird an dem Serinrest 49 der T-Schleife phosphoryliert (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1994 und 1995a). Im Gegensatz dazu werden die P_{II}-Proteine GlnB und GlnK aus *E.coli* an dem benachbarten Tyrosinrest 51 uridylyliert (Jaggi *et al.*, 1996). Die Uridylylierung von P_{II} erfolgt in Abhängigkeit des zellulären Glutamin-Spiegels, während die Phosphorylierung von P_{II} in Cyanobakterien ausschließlich durch α -Ketoglutarat und ATP gesteuert wird (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1995b).

In *Synechocystis* sp. PCC 6803 wird der Nitratstatus einer Zelle anhand des intrazellulären Pools von α -Ketoglutarat bemessen (Muro-Pastor *et al.*, 2001b).

Cyanobakterielle P_{II} -Proteine kommen als Homotrimere vor und reagieren auf den Stickstoffstatus der Zelle mit drei modifizierten Formen. In der Gegenwart von Ammonium liegt P_{II} komplett dephosphoryliert vor (Ruppert *et al.*, 2002), während der Phosphorylierungsstatus in Nitrat von der Verfügbarkeit des Kohlenstoffs abhängt. Unter Stickstoffmangelbedingungen liegt P_{II} in Abhängigkeit von der intrazellulären α -Ketoglutarat-Konzentration maximal phosphoryliert vor (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1994 und 1995a; Forchhammer und Hedler, 1997; Irmler *et al.*, 1997). Unter Stickstoffmangelbedingungen und im Nitratüberschuss bindet α -Ketoglutarat in Synergie mit ATP an das P_{II} -Protein, wodurch eine Konformationsänderung erfolgt, die von der P_{II} -Kinase erkannt wird. Die P_{II} -Kinase dephosphoryliert P_{II} . Bei niedriger α -Ketoglutarat-Konzentration löst sich α -Ketoglutarat vom P_{II} -Protein und wird von der P_{II} -Phosphatase dephosphoryliert (Irmler *et al.*, 1997). In *Synechocystis* sp. PCC 6803 wird P_{II} von einer Phosphatase PphA der PP2C-Familie dephosphoryliert (Irmler *et al.*, 2001; Kloft *et al.*, 2005a und b). Unter Schwachlichtbedingungen kontrolliert unphosphoryliertes P_{II} die Aufnahme von Nitrat (Kloft *et al.*, 2005b).

Die bislang identifizierten Rezeptorproteine von P_{II} sind die N-Acetyl-L-Glutamat-Kinase (NAG-Kinase), das Schlüsselenzym der zyklischen Argininbiosynthese in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (Heinrich *et al.*, 2004; Burillo *et al.*, 2004; Maheswaran *et al.*, 2004). Zudem konnte PipX (P_{II} interacting protein X) identifiziert werden, das P_{II} oder NtcA in Abhängigkeit der Stickstoffverfügbarkeit (α -Ketoglutarat-Konzentration) bindet (Espinosa *et al.*, 2006 und 2007).

1.6.2 Transkriptionelle Stickstoffregulation in Cyanobakterien

In Cyanobakterien steht die Transkription Nitrat-regulierter Gene unter der Kontrolle des DNA-bindenden Protein NtcA (*nitrogen transcription control*). NtcA gehört zu der Crp/FNR (*cAMP receptor protein*) Familie der bakteriellen Transkriptionsfaktoren. Sie zeichnen sich durch eine N-terminal lokalisierte regulatorische Domäne und einem C-terminalen DNA-bindendes Helix-turn-Helix-Motiv aus (Vegas-Palás *et al.*, 1990 und 1992; Körner *et al.*, 2003) und reguliert dadurch die Transkription. Der Transkriptionsfaktor NtcA erkennt und bindet als Dimer eine palindrome Konsensussequenz auf der DNA spezifischer Gene und

Grossman und Mitarbeiter konnten anhand von Mutanten in *Synechococcus elongatus* PCC 7942, die während Nährstoffmangel nicht ausbleichen, drei Gene (*nblA*, *nblB*, *nblR*) identifizieren, deren Produkte essentiell für die PBS-Degradierung sind (Collier und Grossman, 1994; Schwarz und Grossman, 1998). Die Expression des Gens *nblA* (*nbl*=*nonbleaching*) wird unter Stickstoff- und Schwefelmangel induziert und kodiert ein kleines Polypeptid mit 59 Aminosäuren. Die genaue Funktion von NblA ist jedoch ungeklärt (Collier und Grossman, 1994). Es konnte eine direkte Interaktion von NblA und PBS *in vitro* in *Anabaena* und *Tolypothrix* beobachtet werden (Luque *et al.*, 2003; Bienert *et al.*, 2006).

In *Synechocystis* sp. PCC 6803 existieren zwei homologe Gene (*nblA1,2*) zu *nblA* aus *Synechococcus elongatus* PCC 7942, die essentiell für den PBS-Abbau in Stickstoffmangel sind (Li und Sherman, 2000 und 2002) und dessen Expression unter Stickstoffmangel induziert wird (Baier *et al.*, 2001). Die Transkripte konnten während Schwefelmangel nicht detektiert werden, passend zu der Beobachtung, dass in *Synechocystis* sp. PCC 6803 unter Schwefelmangel die PBS nicht degradiert werden (Richaud *et al.*, 2001). In *Synechococcus elongatus* PCC 7942 ist NblR ein *response* Regulator und NblS eine Histidinkinase und Sensor eines Zwei-Komponenten-Systems, welches auf wechselnde Nährstoffangebote und Lichtverhältnisse reagiert und die Expression von *nblA* induziert (Schwarz und Grossman, 1998; van Waasbergen *et al.*, 2002). Ebenso ist NblC, ein Homolog zu dem eubakteriellen anti-Sigmafaktor, eine Komponente des *nbl*-abhängigen Signalweges (Sendersky *et al.*, 2005). In *Synechocystis* sp. PCC 6803 konnte ein redoxsensitives Zwei-Komponenten-System (RppAB) identifiziert werden, dass in der Expression von *nblA* involviert ist.

Der globale Transkriptionsfaktor NtcA ist essentiell für den PBS-Abbau in *Synechococcus* PCC 7942 unter Stickstoffmangel (Sauer *et al.*, 1999). Ebenso konnte in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 gezeigt werden, dass die alternative GSIII den Zellen eine schnellere Regeneration nach Langzeit-Chlorose ermöglicht, aber nicht essentiell ist (Sauer *et al.*, 2000).

Die durch Stickstoff- und Schwefelmangel induzierte Chlorose wurde in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 ausgiebig untersucht (Görl *et al.*, 1998;

Sauer *et al.*, 2001; Doktorarbeit Sauer 2002). Der Verlauf der Differenzierungsprozesse während der Chlorose ist von Temperatur, Lichtintensität und CO₂-Verfügbarkeit, sowie von der Methode der Induktion abhängig (Görl *et al.*, 1998; Barker-Aström *et al.*, 2005).

Die Differenzierungsreaktionen der Zellen im Stickstoffmangel wurden in drei Phasen untergliedert (Görl *et al.*, 1998; Sauer *et al.*, 2001; Forchhammer, 2002). Die erste Phase dauert 2-3 Tage. Innerhalb der ersten Stunde nach Mangelinduktion findet der charakteristische PBS-Abbau statt. Gleichzeitig wird der Level der PBS-kodierenden Transkripte (*cpcBA* und *apcAB*) reduziert. Die Sauerstoffproduktion sinkt innerhalb der ersten Tage auf ein undetektierbares Level, welches mit der Abnahme der PSII-Aktivität korreliert, während die PSI-Aktivität langsamer sinkt. Die Zellen teilen sich noch einmal bevor das Wachstum eingestellt wird. In der zweiten Phase (3-15 Tage) erfolgt der Abbau der Chlorophyll *a*-Moleküle und eine allgemeine Proteolyse der löslichen Proteine ist sichtbar. Die PSI-Aktivität nimmt bis zur Nachweisgrenze ab. Die dritte Phase (>15 Tage) ist die finale Phase der Chlorose. Die Zellen sind depigmentiert und zeigen eine stark reduzierte Stoffwechselaktivität, sowie photosynthetische Aktivität. Die Zellen sind, auch nach Langzeit-Chlorose von zwei Jahren, nach der Zugabe einer Stickstoffquelle fähig, das Wachstum innerhalb weniger Tage wieder aufzunehmen (Doktorarbeit Sauer, 2002).

Synechocystis sp. PCC 6803 zeigt ein ähnliches Verhalten im Stickstoffmangel, wie *Synechococcus elongatus* PCC 7942, allerdings erfolgen die Differenzierungsprozesse etwas langsamer. Die vollständige PBS-Degradierung erfolgt nach drei Tagen und die Degradierung von Chlorophyll *a* dauert 5-6 Tage an (Li und Sherman, 2002).

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Synechocystis sp. PCC 6803 ist ein photoautotroph lebendes Bakterium, das nahezu alle lichtdurchfluteten Habitate besiedelt, wodurch es wechselnden, z.T. auch toxisch wirkenden Nährstoffangeboten, sowie anderen Stressbedingungen ausgesetzt ist. Um sich den veränderten Umweltbedingungen anzupassen, ist eine Vielzahl intrazellulärer proteolytischer Prozesse notwendig. Diese Arbeit hatte die Charakterisierung von zwei Protease-defizienten Stämmen in *Synechocystis* sp. PCC 6803 zum Ziel, die unter bestimmten Stressbedingungen einen veränderten, bislang nicht analysierten Phänotyp zeigten.

Die Inaktivierung des *map-2*-Gens, welches für eine Methionin-Aminopeptidase (MetAP2) kodiert, führte unter Stickstoffmangel zum Absterben der Zellen. Ziel dieser Arbeit war es, den Phänotyp der MetAP2-defizienten Mutante unter verschiedenen Stressbedingungen mittels physiologischer Experimente, biochemischer und molekularbiologischer Methoden zu analysieren. Die Ergebnisse der angestrebten Versuche sollten tiefere Einblicke in die physiologische Relevanz der MetAP2-vermittelten Prozessierung zellulärer Proteine und die transkriptionelle Regulation des *map-2*-Gens geben.

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass das Fehlen der FtsH2-Protease in *Synechocystis*-Zellen in der Gegenwart von Ammoniak zum Absterben führt, während der Wildtyp im Gegensatz dazu Ammoniak-tolerant ist (N.Kloft, unveröffentlicht). Aufbauend auf diesen Beobachtungen sollte im Rahmen dieser Dissertation der Wirkungsmechanismus der Ammoniak-Toxizität der FtsH2-defizienten Zellen mittels physiologischen Untersuchungen und *in vivo* PSII-Messungen näher charakterisiert werden. Zudem sollten biochemische und physiologische Analysen die Bedeutung des FtsH2-vermittelten PSII-Reparaturzyklus an diesem Prozess aufklären. Da es über den Mechanismus der Ammoniak/Ammonium-Toxizität in Pflanzen kontroverse Erkenntnisse gibt und Cyanobakterien ebenfalls oxygene Photosynthese betreiben, war es von Interesse, Einblicke in die Ammoniak-Toleranz des photoautotrophen Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 zu erlangen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Größenstandards

Die Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (München), Fluka (Neu-Ulm), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Amersham Pharmacia Biotech (München) und Biorad (München) bezogen.

Radioaktiv markierte Isotope ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$) wurden von Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg) bezogen.

2.1.1 Enzyme

2.1.1.1 Restriktionsenzyme

Die eingesetzten Enzyme wurden von den Firmen Promega (Mannheim), New England BioLabs (Schwalbach/Taunus), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen und nach den Herstellerempfehlungen verwendet.

2.1.1.2 Weitere Enzyme

T4 DNA Ligase	Promega GmbH, USA
Ribonuclease-Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.2 Größenstandards

2.1.2.1 Proteinstandard

PageRuler™ (Prestained Protein Ladder (SM0671))	Fermentas, St. Leon-Rot
Protein Molecular Weight Marker (SM0431)	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.2.2 DNA-Standard

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (SM0321)	Fermentas, St.Leon-Rot
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (SM0311)	Fermentas, St.Leon-Rot

2.2 Molekularbiologische Kits

RiboPure-Bacteria Kit	Ambion, USA
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
Qiagen OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
5`/3`RACE Kit	RocheGmbH, Mannheim
TOPO® TA cloning Kit	Invitrogen, USA
Live/dead BacLight™ (Bacterial viability Kit)	Invitrogen, USA
5`End Labeling Kit	Amersham, München

2.3 Plasmide und Oligonukleotide

2.3.1 Plasmide

Tab. 2.1: Die Beschreibung der Plasmide und deren Herkunft.

Plasmid	Beschreibung
pET-15b	5,7 kb, Amp ^R , zur Überproduktion eines Proteins mit N-terminaler His ₆ -Tag-Sequenz, Induzierbar über IPTG (Novagen)
MD1-pET15b	6,48 kb, Amp ^R , pET-15b mit 0,78 kb <i>map-2</i> -Gen (slr0981) in den Schnittstellen 5`NdeI und 3`XhoI (diese Arbeit)
pGEM-T Vektor	3,0 kb, Amp ^R , zur Klonierung von PCR-Fragmenten (Promega)
pAM1580	10,8 kb, Cm ^R , Amp ^R , Promotorloses Derivat von pAM1573, mit <i>luxA</i> und <i>luxB</i> (Andersson <i>et al.</i> , 2000)
pAMmap2luxAB	11,2 kb, pAM1580 mit Promotorregion (405 bp) von <i>map-2</i> (slr0918) mit Schnittstellen 5`XhoI und 3`Sall stromaufwärts der <i>luxAB</i> Gensequenz (diese Arbeit)
pRK2013	Km ^R , Helferplasmid zur Konjugation von Cyanobakterien, ColE1-Replikon, TraRK2 ⁺ Mob ⁺ (Figurski und Helinski, 1979)

pRL443	Amp ^R , Plasmid für die Konjugation von Cyanobakterien (Elhai <i>et al.</i> , 1997)
pVZ322	8,4 kb, Km ^R , Gm ^R , Mob ⁺ , für die Transformation von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (Zinchenko <i>et al.</i> , 1999)

2.3.2 Oligonukleotide (Primer) und deren Sequenz

Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Software Primer3 (http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) konstruiert und die Synthese wurde bei der Firma MWG-Biotech in Auftrag gegeben. Die Sequenzen aller verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Name und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide. Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5'... 3'
Oligonukleotide für Gel Retardierungs-Experimente	
5'EcoRlmap2	GGA ATT CAG TTG CTT TGA CGG TGC ATA
3'Xbamap2map1	TGG TTC ATG CTA GCA GCT GGT TTC ACT TTC AGT TT
glnA5	CGC CTG CAA GAT TTC GTT AC
glnA6	CAC AAC CAG GAA CTG AAG AC
Oligonukleotide für die RT-PCR	
map3 rev	AGC GGA CGT TAA ACA CAT GG
map3 for	ATT GCG GTG GGT AAG GTT TC
map1 rev	GCC TCG GCA TAT GCT TGA AT
map1 for	GGA ATA CCG AAC CCA AAG CA
5`rnpB	GTGAGGACAGTGCCACAGAA
3`rnpB	GGCAGGAAAAAGACCAACCT
5`map2	TCA CCT AGC GCC AAT GGT
3`map2	TGC CTG CAA TAC CCG TTT
5`psbK	AAT TTA TTT GCT CGC TAA ATT
3`psbK	CAC ACA AAG GCC AAA GCC AA
5`psbX	AAA CTT TCT CTG GAG CCT GGT
3`psbX	GGA ACG GGT GAT TTT GTC TT
Oligonukleotide für die Klonierung des <i>map2-luxAB</i>-Konstrukts	
Xholmap2-P	<u>CCG CTC GAG</u> AGT TGC CTT TGA CGG TGC AT
map2Sall	CAT TGA TGC TGG TGC AAA TAG <u>CAG CTG CAG CCG</u>
Oligonukleotide für die Überexpression von Map2	
map2NdeI	<u>GGA ATT CCA TAT</u> GGG CGA CAC TAT TAC CCT
map2XhoI	<u>CCG CTC GAG</u> TTA CTC CCC TAG GGT CAA AAT TTC C
Oligonukleotide für <i>BIAcore</i>- Experimente	
5`map2-P-biot (5`biotinyliert)	CAC TCC CCA GGG CAC ATT GA
3`map2P-biacore	GAT AGG CTG GTT TCA CTT TCA
For_Kana_biot (5`biotinyliert)	CT TTG TTG AAT AAA TCG AAC TTT TGC T
Rev_Kana	AGC CAG AAA GTG AGG GAG CCA CG

Oligonukleotide für 5' RACE	
map2SP1	TTC CCA GGT GCC TTC ATT GA
map2SP2	TCT TCG GTC ACT TTG ACC AG
map2SP3	TGC CTG CAA TAC CCG TTT
Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese	
5'EcoRlmap2	<u>GGA ATT CAG TTG CTT TGA CGG TGC ATA</u>
5'Xbalmap2	<u>GCT CTA GAG CAG TTG CCT TTG ACG GTG CAT A</u>
5' map3Gen	GTC AAG GCC AGC ATG GCC T
3' mapmap3 Ü	TTC CTC CAA AGT TTC CAT GGG CTG GTT TCA CTT TCA GTT T
3' map3Xbal	ATT CGA ACT GGG GGT AAA GA
3'Xbalmap2map1	TGG TTC ATG CTA GCA GCT GGT TTC ACT TTC AGT TT
5' map1Gen	TGC TAG CAT GAA CCA GCA TGA
3' map1Sacl	<u>CGA GCT CGT TAG GCA AGA GTT AAA ATT TCT AC</u>
3' map2Sacl	<u>CGA GCT CGT TAC TCC CCT AGG GTC AAA ATT</u>

2.4 Bakterienstämme

2.4.1 Cyanobakterien

Die in dieser Doktorarbeit verwendeten Stämme von *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Synechococcus elongatus* PCC 7942 sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Verwendete Cyanobakterien-Stämme.

Stamm	Herkunft/Referenz	Genotyp
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Grigorieva und Shestakov, 1982	Wildtyp
<i>Mmap2</i> in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803,	K.Baier, AG Lockau, Berlin (nicht publiziert)	<i>map-2 (slr0918)::Kana^R</i> (Insertionsmutagenese)
<i>ftsH2</i> in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Stirnberg <i>et al.</i> , 2007	<i>ftsH2 (slr0228)::Kana^R</i> (Insertionsmutagenese)
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7492	Kuhlemeier <i>et al.</i> , 1983	Wildtyp

2.4.2 *Escherichia coli* (*E.coli*)

Es wurden folgende *E.coli*-Stämme für Klonierungen verwendet:

Tabelle 2.4: Verwendete *E.coli*-Stämme

Stamm	Herkunft/Referenz	Genotyp
XL1-Blue	Bullock <i>et al.</i> , 1987	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, relA1, supE44, lac, [F`proAB, lacI_{ZM15}Tn10(Tet)]</i>
BL21 (DE3)	Grodberg und Dunn, 1988	<i>F-, ompT, hsdSB, (rB⁻, mB⁻) gal, dcm, (DE3)</i>
HB101	Boyer <i>et al.</i> , 1969	

2.5 Kulturmedien

Angegebene Prozentwerte bezeichnen Gewicht pro Volumen (w/v) bei Feststoffen und Volumen (v/v) bei Flüssigkeiten.

Die verwendeten Puffer, Lösungen und Medien wurden mit zweifach destilliertem Wasser (A.bidest) angesetzt und vor Gebrauch 20 min autoklaviert (120°C, 2 bar) oder sterilfiltriert. Die verwendeten Kolben wurden vor Gebrauch autoklaviert (120°C, 2 bar).

2.5.1 Kulturmedium für Cyanobakterien

Cyanobakterien wurden mit BG-11 Medium nach Rippka (1988) angezogen.

BG-11 Medium	17,65 mM	NaNO ₃
	0,18 mM	K ₂ HPO ₄ * 3H ₂ O
	0,30 mM	MgSO ₄ * 7H ₂ O
	0,25 mM	CaCl ₂ * 2H ₂ O
	0,03 mM	Zitronensäure
	0,03 mM	Eisen-III-Citrat
	0,003 mM	EDTA
	0,19 mM	Na ₂ CO ₃

	1 ml/l	Spurenelemente (A ₅ +Co)
Spurenelemente (A ₅ +Co)	46 μM	H ₃ BO ₄
	9,2 μM	MnCl ₂ * 2H ₂ O
	0,77 μM	ZnSO ₄ * 7H ₂ O
	1,6 μM	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O
	0,32 μM	CuSO ₄ * 5H ₂ O
	0,17 μM	Co(NO ₃) ₂ * 6H ₂ O

Das Medium wurde autoklaviert und es wurde für jede Anzucht 5 mM sterilfiltriertes NaHCO₃ frisch zugegeben. BG-11 Platten wurden durch die Zugabe von 15 g Agar auf 1 Liter Medium hergestellt.

In der Arbeit wurden folgende Medien verwendet:

BG-11^N (enthält 17,6 mM NaNO₃)

BG-11^{lowN} (enthält 1 mM NaNO₃)

BG-11⁰ (enthält keine Stickstoffquelle)

BG-11^A (enthält 5 mM NH₄Cl, ungepuffert oder mit 20 mM HEPES pH 7,8)

2.5.2 Kulturmedium für *E.coli*

E.coli Zellen wurden mit Luria-Bertani (LB) Medium nach Sambrook *et al.* (1989) angezogen.

LB-Medium:	1%	Pepton/Trypton
	0,5%	NaCl
	0,5%	Hefeextrakt

LB-Platten wurden durch Zugabe von 15 g Agar-Agar (Roth) auf einen Liter Medium hergestellt. Die Antibiotika wurden bei einer Temperatur des Mediums von 60 °C zugegeben.

2.6 Puffer und spezielle Reagenzien

2.6.1 Puffer

1x SDS-Probenpuffer	50 mM	Tris-HCl pH 6,8
(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	100 mM	DTT
	2%	SDS
	10%	Glycerin
	0,1%	Bromphenol blau
1 x DNA-Auftragspuffer	50 %	Glycerin
(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	0,25 %	Bromphenolblau
10 x TAE Agarosepuffer	400 mM	Tris
(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	30 mM	Natrium-Acetat
	500 mM	EDTA
	mit Essigsäure auf pH 7,8 einstellen	
Laufpuffer für	25 mM	Tris
SDS-PAGE	192 mM	Glycin
(Laemmli, 1970)	0,1%	SDS

2.6.2 Antibiotika

Kanamycin	(Stammlösung 50 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	(Stammlösung 50 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	(Stammlösung 100 mg/ml)	Roth, Karlsruhe

Die Antibiotikum-Lösungen wurden sterilfiltriert.

2.6.3 Photosynthese-Inhibitoren und Hill-Reagenzien

3-(3,4-Dichloro-phenyl)-1,1-Dimethyl-urea (DCMU)	Fluka, Neu-Ulm
(C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O)	
1,4-Benzochinon (C ₆ H ₄ (=O) ₂)	Sigma, München

2,5-Dimethylbenzochinon	Fluka, Neu-Ulm
Kaliumhexacyanidoferrat(III) ($K_3 [Fe(CN)_6]$) (Kaliumferricyanid)	Sigma, München

2.7 Antikörper

Tabelle 2.5: Verwendete Antiseren und ihre eingesetzte Verdünnung.

Protein	Aus dem Organismus	Eingesetzte Verdünnung	Herkunft/Referenz
MAP-2	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	1:10000	Diese Doktorarbeit
PsbO	<i>Avena spec.</i>	1:5000	AG Kuhlmann
PsbA (D1)		1:5000	AgriSera, Schweden
PsbB (CP47)	<i>Avena spec.</i>	1:5000	AG Gärtner
Gesamt-Phycobilisom	<i>Mastidogladus laminosum</i>	1:10000	Biochemie, Universität Gießen

Als sekundärer Antikörper wurde *POD- α -Anti-Rabbit IgG*-Antikörper Peroxidase-Konjugat (Sigma) angewendet bzw. Rabbit anti-chicken IgY-Antikörper (AgriSera) für den immunologischen Nachweis von D1 (PsbA) verwendet.

2.8 Kultivierung von Bakterienstämmen

2.8.1 Anzucht von Cyanobakterien

Die Anzucht erfolgt unter sterilen Bedingungen in Schikanekolben (Bellco Glass, Inc., NJ), die maximal mit 150 ml Volumen befüllt und mit Silikon-Kulturkappen verschlossen wurden. Die entsprechenden Antibiotika, zur Aufrechterhaltung der Selektion wurden in Endkonzentrationen von 50-80 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Für physiologische Experimente wurden die flüssige Stammkultur in BG-11^N Medium auf eine optische Dichte $(OD)_{750}$ von 0,2-0,4 angeimpft und für 20-48 Stunden bis zu einer OD_{750} von 0,4-0,8 kultiviert. Die Zellen wurden photoautotroph bei 28°C und einer konstanten Beleuchtung mit einer Fluenzrate von 80 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Leuchtstoffröhren L36W/30, warmwhite, Osram) in einem Klimaschrank (ECD01E, Snijders Scientific B.V., Holland) oder in einem Kulturenraum mit Licht einer Fluenzrate von 10-60 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (L18W/954. LUMILUX de Lux,

Daylight, Osram) kultiviert. Um die Durchlüftung der Kulturen aufrecht zu erhalten wurden die Schikanekolben schüttelnd (130-140 U/min) inkubiert.

Die Zellen wurden aus einer exponentiell wachsenden Kultur in BG-11^N Medium auf eine OD₇₅₀ von 0,2-0,4 angeimpft und 20-24 Stunden inkubiert. Die physiologischen Experimente erfolgten nur mit Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase mit einer OD₇₅₀ zwischen 0,2 und 0,8. Zellen in der stationären Phase (OD₇₅₀ >0,9) wurden nur für die Stammkultivierung verwendet. Die Cyanobakterien wurden ebenfalls auf BG-11^N Agarplatten mit der sterilen Impföse ausgestrichen und bei Licht einer Fluenzrate von 20 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Lichtschrank mehrere Tage inkubiert.

Zur Überprüfung der mikrobiellen Verunreinigung einzelner Kulturen wurden die Cyanobakterien auf Casamino-Platten (BG-11^N Platten mit Zugabe von 0,02% Casaminsäure, 0,2% Glucose und 1 mM Na₂S₂O₃) im Dunkeln und über Nacht bei RT inkubiert.

2.8.2 Induktion von Stress in *Synechocystis*-Zellen

2.8.2.1 Stickstoffmangel

Stickstoffmangel wurde durch zwei unterschiedliche Methoden induziert. Für Versuche der Langzeit-Chlorose wurden die Zellen in einem BG-11^{LowN}-Medium mit einer Animpfdichte (OD₇₅₀) von 0,1 angezogen und für mehrere Wochen unter Standardbedingungen im Lichtschrank schüttelnd inkubiert. Um einen genauen Zeitpunkt des Stickstoffmangels definieren zu können, wurden 200-400 ml Kultur exponentiell wachsende Kultur (OD₇₅₀ von 0,4-0,8) mittels Filtrierung durch Membranfilter HV mit einer Porengröße von 0,45 μm , des Typs Millipore (Durapore, Irland) geerntet. Die Zellen wurden mit stickstofffreiem BG-11⁰ Medium gewaschen und darin resuspendiert. Die Zelldichte wurde auf OD₇₅₀ von 0,4-0,5 eingestellt und die Zellen im Klimaschrank unter Standardbedingungen (80 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 28°C) schüttelnd inkubiert.

2.8.2.2 Hochlicht-Exposition

Die Hochlichtbestrahlung von Kulturen in exponentieller Phase (OD_{750} von 0,4) erfolgte mit einem Halogenstrahler Lampentyp: R7S (düwi, Breckerfeld) bei einer Fluenzrate von $400 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Zellen (100 ml) wurden in 500 ml Schikanekolben schüttelnd und bei einer konstanten Temperatur von 28°C für 24h bestrahlt.

2.8.2.3 Ammoniak-Behandlung

Die Zugabe von Ammonium (1-60 mM NH_4Cl) erfolgte zu Kulturen in exponentieller Phase (OD_{750} von 0,6-0,8), die für den Versuch auf eine OD_{750} von 0,4 mit BG-11^N Medium verdünnt wurden. Die Zellen (10 ml) wurden in 50 ml-Kolben schüttelnd (140 U/min) und bei Licht einer Fluenzrate von $5-40 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ oder im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Zellen wurden dem Ammoniumchlorid ungepuffert bei pH 8,8 im Medium ausgesetzt. Zur Hemmung der zellulären Proteinbiosynthese wurde 10 min nach der Zugabe von Ammonium, Chloramphenicol mit einer Endkonzentration von $30 \mu\text{g/ml}$ zugegeben.

2.8.3 Die Regeneration und Überlebensfähigkeit von Cyanobakterien

Die Regenerations- und Überlebensfähigkeit von *Synechocystis*-Zellen wurde in zwei unterschiedlichen Ansätzen untersucht. Es wurden $10-20 \mu\text{l}$ der entsprechenden Kultur mit einer OD_{750} von 0,4-0,5 auf eine BG-11^N oder BG-11^A Agarplatte aufgetropft oder $50-100 \mu\text{l}$ einer Kultur ausgestrichen und diese einige Tage unter Standardbedingungen inkubiert ($20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 28°C). Zusätzlich wurden 10 ml der hungernden Zellkultur nach der Zugabe des fehlenden Nährstoffes unter Standardbedingungen inkubiert. Die Regenerationsfähigkeit in Flüssigkultur wurde täglich mit Messungen der photosynthetischen Aktivität in dem WATER-PAM Chlorophyll Fluorometer (Walz GmbH, Effeltrich) untersucht.

2.8.4 Anzucht von *E.coli*

Die Anzucht erfolgte in flüssigem LB-Medium schüttelnd oder auf Agarplatten bei einer konstanten Temperatur von 37°C. Zur Selektion der Transformanten wurde 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

2.8.5 Kultivierung von Stammkulturen

Eine flüssige Stammkultur von Cyanobakterien wurde in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben in einem Volumen von 30 ml BG-11^N Medium angeimpft und bis zu einer OD₇₅₀>2 photoautotroph kultiviert und anschließend bei geringer Lichtintensität stehend aufbewahrt. Von dieser Stammkultur wurde 1 ml in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C für längere Zeit aufbewahrt. Zur Reaktivierung der gefrorenen Cyanobakterien wurde etwas Kultur entnommen, auf eine BG-11^N Agarplatte ausgestrichen und im schwachen Licht mehrere Tage inkubiert oder direkt in flüssigem Medium angezogen.

E.coli Zellen wurden in 50% Glycerin in Flüssigstickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

2.8.6 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer Kultur wurde über die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 750 nm bei Cyanobakterien und einer Wellenlänge von 600 nm bei *E.coli*-Zellen in einem Spektralphotometer (Ultrospec 3000 *pro*, Pharmacia Biotech) in 1ml-Küvetten gemessen. Das jeweilige Medium wurde als Referenz verwendet. Eine optische Dichte von 1 entspricht 2x10⁸ Zellen/ml für Cyanobakterien und 5x10⁸ Zellen/ml für *E.coli*.

2.9 Zellernte

2.9.1 Zellernte für physiologische Experimente

Die Kulturprobe wurde steril abgenommen und mit dem jeweiligen Medium auf eine bestimmte OD_{750} im Spektralphotometer (Ultrospec 3000 *pro*, Pharmacia Biotech) eingestellt und für physiologische Experimente verwendet.

2.9.2 Zellernte für Proteinanalysen/RNA-Isolierung

Die Kultur, deren RNA aufgereinigt werden sollte, wurde steril in gekühlte Zentrifugenbecher gefüllt und in flüssigem Stickstoff gekühlt. Die Zentrifugation erfolgte bei 6000 U/min für 15 min bei 4°C (Beckman J2-21 centrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld). Die Zellsedimente wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C aufbewahrt. Für Proteinanalysen wurden 30-60 ml Kultur steril entnommen in flüssigem Stickstoff gekühlt und durch Zentrifugation (6.000 U/min, 10 min, 4°C) geerntet. Die Zellsedimente wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.10 Molekularbiologische Standardtechniken

2.10.1 Isolierung von genomischer DNA aus *Synechocystis*-Zellen

Zur Isolierung genomischer DNA wurden 3 ml der *Synechocystis*-Kultur (OD_{750} von 0,8-1,0) durch Zentrifugation (14.000 U/min, 5 min, 4°C (HERMLE Z 233 MK, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen)) geerntet. Das Zellsediment wurde in 567 µl TE-Puffer resuspendiert. Es erfolgte der Zellaufbruch durch die Zugabe von 30 µl 10% SDS und 3 µl einer ProteinaseK-Lösung (20 mg/ml) und einer einstündigen Inkubation bei 37°C. Es wurden 100 µl 5 M NaCl zugegeben, gründlich gemischt und nach der Zugabe von 80 µl der CTAB/NaCl-Mischung bei 65°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden 780 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zur Reinigung der Suspension von Proteinen zugegeben und gemischt. Die Suspension wurde zentrifugiert (13.000 U/min, 4 min, RT (Eppendorf centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg)) und der Überstand, in dem sich die DNA befindet, wurde in ein neues Gefäß überführt. Es erfolgte die Zugabe des gleichen

Volumens von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und eine erneute Zentrifugation (13.000 U/min, 4 min, RT). Zur Fällung der genomischen DNA wurde der Überstand mit dem 0,6-fachen Volumen Isopropanol versetzt und erneut zentrifugiert (13.000 U/min, 4 min, 4°C). Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen zur Entfernung von Phenol- und Salzreste und 10 min bei 37°C getrocknet. Das trockene Pellet konnte in 40 µl A.bidest resuspendiert und bei 4°C gelagert werden.

TE-Puffer

1 mM EDTA

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

CTAB/NaCl-Lösung

2,05 g NaCl

5 g Cetyl trimethyl ammonium bromide

Mit A.bidest auf 50 ml auffüllen, bei 65°C lösen. Lagerung bei RT.

2.10.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen erfolgte nach der Alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979). Es wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur geerntet (6.000 U/min, 5 min, RT) und das Pellet in 100 µl Lösung I resuspendiert, gut vermischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Zur Bakterienlyse wurden 200 µl Lösung II zugegeben, vermischt und erneut 5 min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von SDS (in Lösung II) wurden zelluläre Proteine, chromosomale DNA und auch die Plasmid-DNA denaturiert. Anschließend wurden 150 µl Lösung III zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zugabe des Kaliumacetats (in Lösung III) neutralisierte die Lösung und Lipide, Proteine und chromosomale DNA fallen als unlösliche Komplexe aus. Die Suspension wurde zweimal zentrifugiert (13.000 U/min, 15 min, 4°C), um die unlöslichen Komplexe von der Plasmid-DNA zu trennen. Zur Präzipitation der DNA wurde 0,7-faches Volumen eiskaltes Isopropanol zu dem Überstand gegeben und vermischt. Durch Zentrifugation (13.000 U/min, 15 min, 4°C) wurde die DNA pelletiert und anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Das trockene Pellet konnte in 40 µl A.bidest gelöst und bei -20°C gelagert werden.

Lösung I	Lösung II	Lösung III
50 mM Glucose	200 mM NaOH	3 M Kaliumacetat, pH 5,2
25 mM Tris-HCl, pH 8,0	1% SDS	
10 mM EDTA		
20 mg/ml RNaseA		

2.10.3 Isolierung der Gesamt-RNA aus *Synechocystis*-Zellen

Es wurden zwei unterschiedliche Isolierungen der Gesamt-RNA verwendet. Die Isolierung mit RiboPure-Bacteria Kit (Ambion) erfolgte nach Herstellerangaben. Die *Synechocystis*-Zellen wurden zu bestimmten Zeitpunkten mittels Zentrifugation (2.9.2) geerntet und das Zellpellet wurde in 350 µl RNAwiz durch vortexen resuspendiert. Die Zellen wurden im RiboLyser FP 120HY230 (Thermo Hybaid-AGS, Heidelberg) aufgebrochen und das Lysat wurde mit der Zugabe von Chloroform in seine Bestandteile getrennt. Die obere, RNA enthaltende Phase wurde abgenommen. Anschließend wurde die RNA über eine Säule mit Waschlösungen gereinigt und mit 2x25 µl A.bidest eluiert. Ein DNase-Verdau wurde mit DNA-freeTM Kit durchgeführt, um restliche genomische DNA zu entfernen. Es wurde folgender Reaktionsansatz (40 µl) gewählt: 4 µl 10x DNase I Puffer, 4 µl (8 Units) DNase I, 1000-5000 ng RNA. Der Ansatz wurde für 40 min bei 37°C inkubiert und für 1 min auf Eis gekühlt. Zur Entfernung der DNase wurde ein Inaktivierungsreagenz (20% des Gesamtvolumens) zugegeben und für 2 min bei RT inkubiert. Die Mischung wurde zweimal zentrifugiert (13.200 U/min, 1 min, RT), wodurch das Reagenz, die DNase und größere Moleküle von der RNA-Lösung getrennt wurden. Die Konzentration und die Qualität der RNA-haltigen Lösung wurden über ein Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel (2.10.5) kontrolliert. Eine eventuelle Kontamination mit chromosomaler DNA wurde in einer PCR überprüft, die bei reiner RNA kein PCR-Produkt gezeigt hat. Das Ergebnis wurde über Agarose-Gelelektrophorese (2.10.5) überprüft.

Die Isolierung der RNA mit RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen) erfolgte modifiziert nach Herstellerangaben. Zunächst wurden 30 ml Kultur (OD₇₅₀ von 0,4-0,8) geerntet (2.9.2) und das Pellet in 200 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 200 µl RLT Puffer und 7 µl β-Mercaptoethanol, der Aufbruch im RiboLyser FP 120HY230 (Thermo Hybaid-AGS, Heidelberg) und die weitere

Zugabe von 500 µl RLT Puffer. Die Suspension wurde für 3 min auf Eis inkubiert und zweimal zentrifugiert (13.000 U/min, 3 min, 4°C). Der Überstand wurde mit 98%igem Ethanol gemischt und auf eine Säulenmatrix gegeben, zentrifugiert und mit RW1- sowie RPE-Puffer gewaschen. Die RNA wurde mit 2x30 µl dest. RNase-freiem Wasser eluiert. Nun erfolgte ein DNase-Verdau nach Qiagen (RNase free DNase Set) mit folgendem Ansatz: 60 µl RNA-Lösung, 3 µl DNase und 6 µl RDD-Puffer. Der Ansatz wurde für 60 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mit RLT-Puffer und Ethanol über die Säule gegeben, die RNA auf der Säulenmatrix gewaschen und mit 2x25 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration und Qualität der RNA-Lösung wurden über ein Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel (2.10.5) kontrolliert.

2.10.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die quantitative DNA/RNA-Bestimmung erfolgte mittels eines Spektralphotometers (Ultrospec 3000 *pro*, Pharmacia Biotech). Die DNA/RNA-Lösung wurde 1:100 bzw. 1:50 in A.bidest verdünnt und die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette mit einem Volumen von 100 µl gemessen. Die Konzentration errechnete sich aus der gemessenen OD_{260} , der Verdünnung und einem für DNA/RNA-spezifischen Multiplikationsfaktor. Eine $OD_{260}=1$ entspricht 50 µg/ml ds DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Zusätzlich wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen, um aus dem Verhältnis von OD_{260} und OD_{280} eine Aussage über die Proteinkontamination der Lösung zu erhalten. Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung weist ein Verhältnis von 1,8-2,0 auf. Ebenso konnte die Konzentration mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.10.5) quantifiziert werden, mit einer Nachweisgrenze von 5 ng DNA pro Bande. Dazu wurde 1-3 µl der Probe und ein Größenstandard aufgetragen (2.1.2) und anschließend die Konzentration anhand der bekannten Konzentration einzelner Banden des Markers abgeschätzt.

2.10.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Trennung der Desoxyribonukleinsäure-Fragmente erfolgte nach Größe (bp) sowie Konformation mittels der Gelelektrophorese in einer Agarose-Matrix. Die Agarosegele wurden abhängig von der DNA-Fragmentgröße mit 0,8-2,0% Agarose in TAE-Puffer (2.6.1) zubereitet. Die Probe wurde mit 6x DNA-Auftragspuffer (2.6.1) vermischt und in die Geltaschen geladen. Die Laufbedingungen waren konstant bei 50-80 Volt in TAE-Puffer. Anschließend wurde das Agarosegel mit Ethidiumbromid gefärbt, das in die Basen der DNA interkaliert und mit UV-Licht sichtbar gemacht wurde.

2.10.6 Präparation von DNA aus dem Agarosegel

Um ein DNA-Fragment aus einem Agarosegel zu isolieren wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die Ethidiumbromid-gefärbte DNA wurde aus dem Agarosegel mit einem sauberen Skalpell unter schwachem UV-Licht geschnitten, das dreifache Volumen an Puffer QG zugegeben und für 10 min bei 50°C inkubiert. Die Isolierung und Reinigung der DNA erfolgte über eine Säule nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die gereinigte DNA mit 20-40 µl A.bidest von der Säule eluiert, die Konzentration bestimmt (2.10.4) und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.10.7 Restriktion von DNA

Restriktionsenzyme erkennen kurze (4-8 bp) palindromische Sequenzen und katalysieren dort eine hydrolytische Spaltung beider DNA-Stränge. Dabei können je nach Enzym glatte oder überhängende Enden entstehen. Die Enzymreaktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zur Kontrolle einer Transformation wurde ein 20 µl-Ansatz verwendet:

100-1000 ng DNA

2 µl 10x Puffer

0,3-0,8 µl Enzym (1-2 U/µl)

Ein präparativer Verdau erfolgte in einem 70 µl-Ansatz:

0,8 µl Enzym

7 µl Puffer

30 µl DNA

Die Ansätze wurden bei 37°C für 2-3 Stunden oder über Nacht inkubiert. Zur Charakterisierung eines Plasmids oder für die Klonierung wurde die geschnittene Plasmid-DNA in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (2.10.5).

2.10.8 Ligation von DNA-Fragmenten und Vektoren

Ungeschnittene PCR-Fragmente wurden zur besseren Handhabung, da die Restriktion von kleinen PCR-Fragmenten schwierig ist, in den pGEM-T Vektor (Promega) kloniert. Die Ligation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Fragmente konnten im Folgenden durch Restriktion herausgeschnitten werden und in den Zielvektor (pET-15b, pAM1580, siehe Tab.2.1) ligiert werden. Die Ligation erfolgte mit dem Enzym T4 DNA Ligase, das die Reaktion zwischen der 5`-Phosphatgruppe und der 3`-Hydroxylgruppe zweier DNA-Enden zu einer neuen Phosphodiesterbindung katalysiert und zu einer kovalenten Bindung zwischen Insert und Vektor führt. Die Inkubation erfolgte bei RT über Nacht.

Es wurde folgender 20 µl-Ansatz verwendet:

2 µl 10x Puffer

1 Unit T4 DNA Ligase

100 ng Vektor, 200-300 ng Insert

2.10.9 Das Einbringen von Fremd-DNA

2.10.9.1 Transformation von *Synechocystis* sp. PCC 6803

Die Transformation ist ein Mechanismus der DNA-Übertragung bei Mikroorganismen, die im Zustand der Kompetenz nackte DNA in die Zelle aufnehmen.

Exponentiell wachsende *Synechocystis*-Kultur einer OD_{750} von 0,4-0,6 wurden mittels Zentrifugation (5.000 U/min, 8 min, RT) geerntet und in 1 ml BG-11^N Medium gewaschen und erneut zentrifugiert (s.o.). Das Pellet wurde in 1ml BG-11^N Medium resuspendiert. 2-3 μg der Plasmid-DNA wurden mit 100 μl der Zellsuspension vermischt. Die Zellen wurden im Dunkeln über Nacht schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 500 μl BG-11^N Medium zu den Zellen gegeben und ebenfalls über Nacht mit einer Fluenzrate von 20 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ schüttelnd inkubiert. 300 μl der Zellsuspension wurde auf BG-11^N Agarplatten (mit 30 $\mu\text{g/ml}$ des jeweiligen Antibiotikums) ausplattiert und die Platten über Nacht unter Standardbedingungen (RT, 20 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) inkubiert. Die Klone wurden weiterhin auf Platten mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Antibiotikum selektiert.

2.10.9.2 Transformation von *E.coli*

Die Übertragung von DNA in *E.coli*-Zellen diente hier der Vervielfältigung des Zielvektors oder der Überproduktion eines Fremdproteins. Die aufgenommene Plasmid-DNA wird von Bakterien, unabhängig vom Chromosom, vermehrt und an die Tochterzelle weitergegeben. Somit ist eine stabile Reproduktion des Zielvektors innerhalb einer Kolonie gewährleistet. Die Transformation erfolgte in hitzekompetenten *E.coli* XL1-, *E.coli* BL21- oder *E.coli* HB101-Zellen (siehe Tab. 2.4). Die Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut und 10 μl des Ligationsansatzes (2.10.8) mit 100 μl Zellsuspension vermischt. Zur Aufnahme der DNA in die Bakterienzelle wurde die Zellsuspension für 45 s bei 42°C und anschließend für zwei min auf Eis inkubiert. Zur Regeneration der Zellen wurde 500 μl LB-Medium zugegeben und die Suspension für eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Zur Selektion der positiven Transformanten wurden jeweils 50, 100, 150 und 200 μl einer Suspension auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien konnten auf den Erhalt des Zielplasmids mittels einer Plasmid-Isolierung (2.10.2) und einer Restriktionsanalyse (2.10.7) untersucht werden.

2.10.9.3 Konjugation von *Synechococcus elongatus* PCC 7942

Als Konjugation wird die Plasmid-vermittelte Übertragung von DNA nach Zellkontakt bei Bakterien bezeichnet. Über die ausgebildeten Pili können die Bakterien kommunizieren und DNA-Stränge vom Donor (Spender) zum Rezipienten (Empfänger) austauschen. Dafür sind plasmidkodierte Gene zuständig: die *tra*-Gene, die verantwortlich für den Kontakt der Bakterien über Pili sind, sowie die *mob*-Gene, die für ein Mobilisierungsprotein kodieren und für den Transfer nötig sind. In der vorliegenden Arbeit wurde die Konjugation verwendet, um in *Synechococcus*-Zellen das Plasmid pAMmap2luxAB (siehe Tab. 2.1) zu transferieren. Es wurde der Stamm *Synechococcus* verwendet, da das System zur Promotoranalyse mit dem Vektor pAM1580 bisher nur in *Synechococcus* erfolgreich transformiert wurde, nicht aber in *Synechocystis*. Die Ziel-DNA wurde mithilfe von triparentaler Konjugation in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 Wildtyp-Zellen eingebracht (Wolk *et al.*, 1984). Zunächst wurde das Plasmid pRL443 in *E.coli* HB101, sowie das Helferplasmid pRK2013 zusammen mit dem Zielplasmid pAMmap2luxAB in *E.coli* HB101 transformiert (2.10.9.2). Die Übernachtskultur der Stämme *E.coli* HB101-pRL443 und *E.coli* HB101-pRK2013-pAMmap2luxAB wurde 1:20 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 unter Standardbedingungen inkubiert. Es wurden 1,5 ml geerntet und gewaschen. Die *Synechococcus*-Kultur wurde auf eine OD₇₅₀ von 0,4-0,6 angezogen, 1,5 ml geerntet und das Pellet wurde in 200 µl BG-11^N Medium resuspendiert. Zur Konjugation wurden beide Pellets der *E.coli*-Stämme mit der *Synechococcus*-Suspension vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde ausplattiert (BG-11^N Gelrite-Platten mit 5% LB-Medium) und in einem Lichtschrank bei RT über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit 1 ml BG-11^N Medium gespült, die Suspension abgenommen und zentrifugiert (6.000 U/min, 1 min, RT). Das Pellet wurde mit 0.9% NaCl gewaschen, darin resuspendiert, anschließend ausplattiert (BG-11^N Gelrite-Platten) und über Nacht im Lichtschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde zur Selektion Antibiotikum (Chloramphenicol 5-7,5 µg/ml) unterschichtet und die Platten im Lichtschrank weiter inkubiert. Die Einzelkolonien wurden auf Selektionsplatten ausgestrichen und mittels Ganz-Zell-PCR (2.10.11.1) auf den Erhalt des richtigen Klons überprüft.

2.10.10 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenz der hergestellten Plasmide und PCR-Fragmente wurde über Sequenzierung (Sanger, 1977) kontrolliert. Dazu wurden Plasmide in *E.coli* transformiert (2.10.9) und isoliert (2.10.2), PCR-Fragmente wurden mittels des QIAquick PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt, um sie anschließend in bestimmten Konzentrationen, abhängig von ihrer Größe zur Sequenzierung in Auftrag zu geben (AG Kröger, IFZ, Gießen). Die Sequenzierung wurde mit dem Sequenzer ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Perkin-Elmer) durchgeführt. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden unter Nutzung der Nukleotid/Nukleotid Blast-Funktion der Datenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) abgeglichen.

2.10.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR dient der enzymatischen Amplifikation beliebiger Nucleinsäureabschnitten. Ein Standard PCR-Ansatz besteht aus drei Reaktionsschritten, die sich zyklisch wiederholen. Zunächst wird der DNA-Doppelstrang denaturiert (Denaturierung), es folgte die Anlagerung (*annealing*) der Oligonukleotide an der Ziel-DNA (*template*). Abschließend erfolgte die Synthese (*elongation*) des komplementären Stranges durch die (DNA-abhängige) DNA-Polymerase. Die Temperatur für die Anlagerung ist abhängig von der Basenzusammensetzung der Oligonukleotide und die Synthesezeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments (1 min pro 1 kb). Als Kontrolle diente immer ein Ansatz ohne Matrize (*template*).

Ein durchgeführter PCR-Ansatz (50 µl) bestand aus:

DNA	100 ng genomische DNA oder 10-20 ng Plasmid-DNA
5`Oligonukleotid	10 pmol
3`Oligonukleotid	10 pmol
dNTP's	2,5 mM pro dNTP
Taq-Polymerase	1 U
10x Taq-Polymerasen-Puffer, A.bidest	

Die PCR wurde mit folgendem Standard-Programm durchgeführt:

2-5 min 94°C	Denaturierung	
1 min 94°C	Denaturierung	25-30 Zyklen
30 s 46-57°C	<i>Annealing</i>	
1-5 min 72°C	Elongation	
10 min 72°C	Extension der DNA-Synthese	

Die PCR-Reaktion wurde mit der hitzestabilen Taq-Polymerase (Fermentas) in einem Thermocycler TPersonal oder TGradient (Biometra GmbH, Göttingen) durchgeführt.

2.10.11.1 Ganz-Zell-PCR von *Synechocystis*-Zellen

Die Matrize (*template*) einer Ganz-Zell-PCR war entweder eine Kolonie von einer Platte oder pelletierte, gewaschene Zellkultur. Die Zellen wurden in 200 µl A.bidest resuspendiert und für einen 100 µl-Ansatz wurden 76 µl der Zellsuspension in dem PCR-Gefäß für 4 min auf 96°C erhitzt um die Zellen zu denaturieren. Anschließend wurde folgender PCR-Mix zugegeben und das PCR-Programm (siehe 2.10.11) durchgeführt.

20 pmol beider Oligonukleotide

10 mM dNTP-Mix

1 U Taq-Polymerase

10 xTaq-Polymerasen-Puffer

2.10.11.2 Semi-quantitative RT-PCR

Die in dieser Arbeit durchgeführten RT-PCRs dienten der Genexpressionsanalyse von Genen nach unterschiedlichen Stressinduktionen. In dieser PCR-Reaktion wurde RNA als *template* eingesetzt, die innerhalb des ersten Programm-Schritts durch die zugegebene Reverse Transkriptase zu cDNA umgeschrieben wurde.

Alle Reaktionen wurden mit dem Qiagen OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) durchgeführt und es wurde folgender, modifizierter Standard-Ansatz (15 µl) gewählt:

RNA	60 ng	RNase-Inhibitor	0,1 µl
5`Oligonukleotid	18 pmol	Enzym-Mix	0,6 µl
3`Oligonukleotid	18 pmol	5x Puffer	3,0 µl
dNTP`s	0,6 µl	A.bidest	5,1 µl

Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler TPersonal oder TGradient mit folgendem Standard-Programm durchgeführt:

30 min 50°C	RT-Reaktion	
15 min 95°C	Inaktivierung der rev.Transkriptase, Denaturierung der cDNA	
1 min 94°C	Denaturierung	25-30 Zyklen
30 s 51-57°C	Annealing	
1 min 72°C	Elongation	
10 min 72°C	Extension der DNA-Synthese	

Alle PCR-Produkte wurden über Agarose-Gelelektrophorese (2.10.5) aufgetrennt, das in Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel mit schwachem UV-Licht bestrahlt und fotografiert. Die Auswertung erfolgte mit BioRad Quantity one/Fluor-S™. Die Bandenstärke der Agarosegele wurde ermittelt, wobei der Hintergrund als Referenz diente. So konnte die Bandenstärken eines Gels miteinander verglichen werden.

2.10.11.3 Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR (*site-directed mutagenesis*)

Zum Erstellen von transkriptioneller Promotor-Gen-Fusionen wurden die offenen Leserahmen der Gene *map-1* (873 bp) und *map-3* (890 bp) mittels PCR unter Verwendung der Primerpaare 5`*map1Gen* und 3`*map1Sacl*, sowie 5`*map3Gen* und 3`*map3Xbal* aus genomischer DNA aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 als *template* amplifiziert. Zusätzlich wurde die Promotorregion von *map-2* (144 bp), die die Promotorsequenz einschließlich des Transkriptionsstartpunkts enthielt, ebenfalls über PCR amplifiziert. Es wurden die Primer 5`*EcoRImap2* und 3`*Xbalmap2map1* für das *map2-map1*-Konstrukt verwendet, sowie die Primer 5`*Xbalmap2* und 3`*map2ma3Ü* für das *map2-map3*-Konstrukt. Die Primer wurden

so gewählt, dass sie am 3'Ende eine überlappende Sequenz (40 bp) des Gens *map-1* oder *map-3*, sowie endständige Schnittstellen enthielten. Die Fragmente wurden über Qiagen Purification Kit nach Herstellerangaben gereinigt (2.10.6) und in einer weiteren PCR zunächst miteinander fusioniert. Im zweiten Schritt wurde das Fusionsfragment durch die Zugabe der jeweils äußeren Primer (5'*EcoR**lmap2* und 3'*map1Sacl* oder 5'*Xba**lmap2* und 3'*map3Xba**l*) amplifiziert. Zur Kontrolle wurde ein Fragment des *map-2*-Gens, das ebenfalls die Promotorsequenz und den gesamten ORF des *map-2*-Gens beinhaltet über PCR amplifiziert (5'*EcoR**lmap2* und 3'*map2Sacl*). Die Fragmente wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese (2.10.5) aufgetrennt, gereinigt (2.10.6) und anschließend sequenziert (siehe Abschnitt 2.10.10). Die Fragmente konnten nun in einen geeigneten Transformationsvektor für *Synechocystis* (pVZ322) mit Hilfe der Schnittstellen (siehe Tab. 2.1) kloniert werden. Die sequenzierten Klone wurden in *Synechocystis Mmap2*-Zellen transformiert (siehe Abschnitt 2.10.9.1).

2.10.12 5' RACE (Rapid Amplification of 5' cDNA ends)

Das 5'/3' RACE Kit, 2nd generation (Roche Applied Science, Mannheim) wurde verwendet, um das 5'Ende des *map-2* (slr0981)-Transkripts zu untersuchen. Zunächst wurden drei *map-2*-spezifische antisense Oligonukleotide konstruiert und synthetisiert (Tab. 2.2): 1.) *map2SP1* (617 bp stromabwärts von ATG) wurde für das Umschreiben der mRNA in cDNA verwendet, 2.) *map2SP2* (372 bp stromabwärts von ATG) und 3.) *map2SP3* (280 bp stromabwärts von ATG), die beide für die cDNA Amplifikationen verwendet wurden. Die Gesamt-RNA von Stickstoff gehungerten (72 Stunden) *Synechocystis*-Zellen wurde aufgereinigt (2.10.3 nach Ambion) und das Experiment wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die cDNA-Synthese wurden 0,5 µg Gesamt-RNA und 50 pmol *map2SP1* in die RT-Reaktion eingesetzt. Die Komponenten wurden für 60 min bei 55°C und für 5 min bei 85°C inkubiert. Anschließend wurden die cDNA-Fragmente aufgereinigt (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche). Für das Poly(A)-*tailing* der cDNA am 3'Ende wurden 1/3 der Lösung für die erste PCR eingesetzt. Die Reaktion wurde mit einem oligo-T-Primer und dem inneren Gen-spezifischen *map2SP2* Primer durchgeführt und das verdünnte Produkt (1:10) wurde als Matrize für die zweite PCR mit den Primern *PCR anchor primer* und *map2SP3*

eingesetzt, um die markierte (Poly(A)*tailed*) cDNA zu amplifizieren. Das PCR Produkt (430 bp) wurde aufgereinigt (2.10.6). Alle im Protokoll des Herstellers angegebenen Kontrollen wurden erfolgreich durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde für die Sequenzierung in den Vektor pCR[®]II-TOPO[®] nach Herstellerangaben kloniert und die Selektion der Transformanten erfolgte über Blau-Weiß-Selektion auf LB-Platten mit Ampicillin (100 mg/ml). Die positiven, weißen Kolonien wurden gepickt und eine Übernachtskultur damit angeimpft. Die Plasmide wurden isoliert (2.10.2) und zur Sequenzierung (2.10.10) gegeben. Die Sequenzen wurden mit NCBI BLAST ausgewertet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

2.11 Überexpression und Reinigung von Fremdprotein in *E.coli*

2.11.1 Überexpression von MAP-2 in *E.coli*

Die Überexpression von Proteinen in *E.coli* ist eine Möglichkeit eine größere Menge eines definierten Proteins zu gewinnen. Dazu wurde die kodierende Region (ORF) von *map-2* (slr0918) in einen geeigneten Vektor (pET-15b, Novagen) kloniert. Der Vektor pET-15b enthält einen T7/*lac* Promotor und Sequenzen für ein Affinitätsepitop, ein 6x His-Epitop, welches die Aufreinigung des Proteins ermöglicht. Der Genomabschnitt slr0918 wurde mittels einer PCR (2.10.11) und den spezifischen Oligonukleotiden (5'*map2NdeI* und 3'*map2XhoI*) amplifiziert. Der 5'-Primer enthielt am 5'-Ende Sequenzen für eine *NdeI*-Schnittstelle und der 3'-Primer am 3'-Ende Sequenzen einer *XhoI*-Schnittstelle. Das PCR-Fragment wurde aufgereinigt (2.10.6) mit *NdeI* und *XhoI* restringiert (2.10.7) und in den ebenfalls mit *NdeI*- und *XhoI*- geschnittenen Vektor pET-15b (siehe Tab. 2.1) nach Herstellerangaben ligiert. Es folgte eine Transformation (2.10.9.2) in hitzekompetente *E.coli* XL1 Zellen. Der auf Ampicillin (100 µg/ml) selektierte Klon (MD1-pET15b, Tab. 2.1) wurde sequenziert (2.10.10) und für eine Ringtransformation in *E.coli*-Stamm BL21(DE3) verwendet. Nach Optimierung der Expressionsbedingungen konnte die Überexpression erfolgen. Eine Vorkultur (6 ml) von *E.coli* MD1-pET15b in LB-Medium wurde für das Animpfen der größeren Kultur (500 ml LB-Medium) verwendet, die bei 37°C schüttelnd inkubiert wurde. Bei einer OD₆₀₀ von 0,8 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM

IPTG induziert und die Zellen über Nacht bei 20°C schüttelnd inkubiert. Die Kontroll-Kultur wurde gleich behandelt und enthielt den leeren pET-15b-Vektor. Die Ernte erfolgte bei 4°C durch Zentrifugation (6000 U/min, 10 min). Die Effizienz der Expression wurde über eine SDS-PAGE (Laemmli, 1970) der abgenommenen Zellproben vor und nach der Induktion kontrolliert (siehe Abschnitt 2.12.6.2.1).

2.11.2 Aufreinigung des MAP-2-Proteins (MAP-2-His)

Der Zellaufbruch von MAP-2-His (29 kDa) exprimierenden *E.coli*-Zellen erfolgte in dem modifizierten Lysis-Puffer nach Atanassova (2003) mittels Ultraschall auf Eis (Sonoplus GM70 (Sonifier), Bandelin). Nach Entfernung der Zelltrümmer durch zwei Zentrifugationsschritte (7.000 U/min, 10 min, 4°C) wurde 1 ml des Zelllysates auf eine His-SelectTM-Säule (Ni-NTA, Sigma) geladen, die vorher mit Äquilibrierungspuffer gewaschen wurde. Mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1ml/min wurden nicht gebundene Proteine mit Waschpuffer von der Säule gespült und anschließend das gebundene MAP-2-His-Protein mit Elutionspuffer eluiert. Die Effizienz der Aufreinigung wurde von ausgewählten Wasch- und Elutionsschritten mittels SDS-PAGE kontrolliert (2.12.6.2.1).

Lysis-Puffer (pH 8,0)

50 mM NaH₂PO₄
400 mM NaCl
10 mM Imidazol
1 mM PMSF

Äquilibrierungspuffer

50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0
300 mM NaCl
10 mM Imidazol

Waschpuffer (pH 8,0)

20 mM Tris-HCl, pH 8,0
400 mM NaCl
20 mM Imidazol

Elutionspuffer (pH 8,0)

20 mM Tris-HCl, pH 8,1
400 mM NaCl
250 mM Imidazol

Alle Puffer wurden mit NaOH auf einen pH von 8,0 eingestellt, sterilfiltriert und entgast.

2.11.3 Dialyse von MAP-2 und Antikörperproduktion

Zur Entsalzung und Umpufferung wurden die Elutionsfraktionen 1 und 2 in einem ZelluTrans-Dialyseschlauch (Roth, Porengröße: 25 µm) gegen 500 ml des Dialyse-Puffers (modifiziert nach Atanssova, 2003) über Nacht bei 4°C unter leichtem Rühren dialysiert. Die Konzentration und Reinheit der Proteinlösung wurde spektrometrisch bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die Antikörperherstellung gegen MAP-2 (im Kaninchen) erfolgte beim Antikörperservice Pineda in Berlin (<http://www.pineda-abservice.de/>).

Dialyse-Puffer

100 mM K ₂ HPO ₄	100 mM KCl	50% Glycerin
100 mM KH ₂ PO ₄	100 mM NaCl	

2.12 Proteinanalysen

2.12.1 Herstellung von Proteinextrakten

Die Zellkultur wurde mittels Zentrifugation geerntet, das Zellpellet in 40-150 µl Zellaufbruchspuffer resuspendiert und es wurde ein Volumenanteil an Glaskugeln (Durchmesser: 0,10-0,11 mm, Braun Melsungen AG) zugegeben. Unter Anwendung des RiboLyser FP 120HY230 (Thermo Hybaid-AGS, Heidelberg) wurden die Zellen aufgebrochen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (3.500 g, 5 min, 4°C) entfernt und der Überstand wurde abgenommen. Die Lysate wurden immer auf Eis aufbewahrt.

Zellaufbruchspuffer

20 mM Tris-HCl, pH 7,4
50 mM KCl
5 mM MgCl ₂
2 mM DTT
0,5 mM EDTA
1 mM Benzamidin
0,2 mM PMSF (in Ethanol lösen, frisch zugeben)

2.12.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Protein-Konzentration von Lösungen nach Bradford (1976) wurde der Biorad Protein-Assay (Biorad, Bad Soden) verwendet. Diese Methode beruht auf der Bindung des Trimethylmethan-Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau an Proteinen im sauren Milieu. Durch den Farbstoff-Proteinkomplex verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Um diese zu berechnen wurde eine BSA-Eichgerade erstellt. Es wurden 1-5 µl der Proteinlösung, mit A.bidest auf 800 µl aufgefüllt und 200 µl der Protein-Assay-Lösung zugegeben. Als Blindwert wurden 800 µl des A.bidest und 200 µl der Bradford-Lösung gemischt. Nach mindestens 5 min konnte die Extinktion bei 595 nm gemessen werden und der Eichgerade die Proteinkonzentration berechnet werden. Es wurden immer Parallellbestimmungen durchgeführt.

2.12.3 Proteinfractionierung durch Ultrazentrifugation

Durch eine Ultrazentrifugation (Optima™ TLX Ultracentrifuge, Beckman Coulter GmbH, USA) wurde die lösliche Proteinfraction (S) von der unlöslichen Pelletfraction (P) getrennt. Das unbehandelte Zellpellet wurde in 150 µl Zellaufbruchpuffer resuspendiert, mit Glasperlen im RiboLyser FP 120HY230 (Thermo Hybaid-AGS, Heidelberg) aufgebrochen und die Zelltrümmer und Glasperlen abzentrifugiert (3.500 g, 1 min, 4°C). Der Überstand wurde für die analytische Ultrazentrifugation (Rotor: TLA 100, 100.000 g, 60 min, 4°C) verwendet. Der erste Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 150 µl Zellaufbruchpuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (100.000 xg, 60 min, 4°C). Das Pellet wurde in 50 µl Puffer aufgenommen. Für die Analyse der Proteinfractionen wurden 5-8 µg Protein über SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.12.6.2.1).

2.12.4 Präparationen von Thylakoidmembranen

Die Thylakoid-Präparation erfolgte modifiziert nach Dühring (2006). *Synechocystis*-Zellen (OD 7-12) wurden geerntet (6.000 g, 10 min, 4°C) und das

Pellet in 500 µl Thylakoid-Puffer resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurde eine Spatelspitze Glasperlen (Durchmesser 0,1-0,11 mm) zugegeben und mittels RiboLyser FP 120HY230 (Thermo Hybaid-AGS, Heidelberg) wurden die Zellen aufgebrochen. Zelltrümmer und Glasperlen wurden durch eine Zentrifugation (3.500 g, 5 min, 4°C) entfernt und der Thylakoid-haltige Überstand wurde erneut zentrifugiert (13.000 U/min, 30 min, 4°C). Der Überstand enthielt neben den löslichen Proteinen auch Plasmamembranen. Das Pellet enthielt die Thylakoid-Membranen und wurde in 20-40 µl Thylakoid-Puffer resuspendiert. Die Protein- und Chlorophyll *a*-Konzentrationen wurden bestimmt, wie in Abschnitte 2.12.2 und 2.15.2 beschrieben.

Thylakoid-Puffer

50 mM	HEPES, pH 7,0
5 mM	MgCl ₂
25 mM	CaCl ₂
10%	Glycerin

2.12.5 Photometrischen Spektren

Photometrische Messungen erfolgten in dem Spektralphotometer (Ultraspec 3000*pro*, Amersham). Absorptionsspektren zwischen 350-750 nm wurden von Cyanobakterien, Kulturen und Thylakoidfraktionen erstellt. Die Absorption der Lösung wurde in Abhängigkeit der Zeit grafisch dargestellt.

2.12.6 Elektrophoretische Trennung der Proteine

2.12.6.1 Native Polyacrylamid-Geleelektrophorese (PAGE)

Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und für mindestens eine Stunde bei RT polymerisiert. Die Proben wurden mit Probenpuffer (ohne SDS) versehen und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 0,5x TBE-Puffer bei 60-100 V bei RT für zwei Stunden. Die native PAGE wurde für die DNA-Protein-Komplexe des Gel Retardierungs-Experiments verwendet, um die Protein-Konformation und Komplexe zu erhalten.

6% Polyacrylamidgel

20% Acrylamid (30% Stammlösung; 29:1)

2,6% TBE

0,5% APS

0,1% TEMED

10x TBE-Puffer

890 mM Tris

890 mM Borsäure

25 mM EDTA, pH 8,3

2.12.6.2 Denaturierende PAGE

Die Auftrennung der Proteine kann durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) und bei einem pH von 8,9 unabhängig vom Ladungszustand und nur nach der Größe des Proteins erfolgen. Das Detergenz SDS denaturiert Proteine. Durch die Aufspaltung der Wasserstoffbrücken und verleiht ihnen eine negative Ladung, so dass deren Wanderungsgeschwindigkeit nur in Abhängigkeit der Größe erfolgt. Durch die angelegte Spannung erfahren sie eine Beschleunigung in Richtung Anode.

2.12.6.2.1 Denaturierende PAGE nach Laemmli

Es wurde die diskontinuierliche, denaturierende Elektrophorese, mit unterschiedlichen pH-Werten von Sammel- und Trenngel nach Laemmli (1970) angewandt. Eine bessere Denaturierung von Membranproteinen im Zellextrakt wurde durch die Zugabe von Harnstoff (6-7 M) im Proteingel erreicht. Je nach gewünschtem Trennbereich wurden unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen gewählt (12,5-15%). Mit steigender Acrylamidkonzentration im Gel erhöht sich dessen Trennleistung. Zwischen zwei Glasplatten wurde zunächst das Trenngel gegossen, mit A.bidest überschichtet und je nach Gelgröße 20-30 min bei RT auspolymerisiert. Anschließend wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen, sowie der Probenkamm eingesteckt. Das Gel wurde für ein bis 5 Stunden zum Auspolymerisieren bei RT stehen gelassen. Die Proben wurden mit 4x SDS-Probenpuffer versehen, bei 100°C für 5 min denaturiert und auf das Gel geladen. Die PAGE erfolgte in SDS-Laufpuffer (2.6.1) und je nach Gelgröße bei 60-160 Volt für 1-16 Stunden bei RT.

Trenngel

375 mM Tris-HCl (pH 8,9)
 12,5-15% Acrylamid (30% Stammlösung; 29:1)
 0,1% SDS
 0,05% APS
 0,1% TEMED

Sammelgel

125 mM Tris-HCl (pH 6,8)
 6% Acrylamid (29:1)
 0,1% SDS
 0,05% APS
 0,1% TEMED

2.12.6.2.2 Denaturierende PAGE nach Schägger und von Jagow

Für die bessere Auftrennung kleinerer Proteine wurde ein 15%iges Tris/Tricine SDS-Polyacrylamidgel nach Schägger und von Jagow (1987) verwendet. Das Gel wurde wie unter 2.12.6.2.1 beschrieben hergestellt. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 mA für eine Stunde zum Einlaufen der Proteine in das Sammelgel und 20 mA über Nacht bei RT.

15% Trenngel

20% 3x Gelpuffer
 15% Acrylamid (30% Stammlösung; 29:1)
 8% Glycerin
 0,3% APS
 0,03% TEMED

4% Sammelgel

20% 3x Gelpuffer
 4% Acrylamid
 13% Glycerin
 0,2% APS
 0,04% TEMED

Laufpuffer:**Kathodenpuffer (pH 8,25)**

0,1 M Tris
 0,1 M Tricin
 0,1% SDS

Anodenpuffer (pH 8,9)

0,2 M Tris-HCl

3 x Gelpuffer

3 M Tris-HCl (pH 8,5)
 0,3% SDS

2.12.7 Färbemethoden für Proteingele

2.12.7.1 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung wurde angewandt, um Proteine nach einer vollendeten Gelelektrophorese nachzuweisen. Die Nachweisempfindlichkeit liegt bei 100 ng-1 µg Protein. Der Farbstoff lagert sich reversibel an Amino-Gruppen der Proteine an. Zunächst wird das Proteingel in Coomassie-Färbelösung inkubiert und gleichzeitig werden die Proteine im Gel fixiert durch die Essigsäure in der Färbelösung. Zur Entfärbung des blauen Hintergrunds wurde das Gel in A.bidest schüttelnd inkubiert.

Färbelösung

0,25 mM Coomassie-Brilliant-Blau 10% Essigsäure
50% Methanol

2.12.7.2 Silberfärbung nach Blum (1987)

Die Nachweisgrenze dieser sensitiven Färbung liegt bei 5-10 ng Protein, allerdings ist nur eine eingeschränkte Quantifizierung möglich, da die Silber-Ionen nicht-stöchiometrisch an die Proteine binden. Das Proteingel wurde für mindestens 60 min in einer Fixierlösung bei RT schwenkend inkubiert und anschließend dreimal in 50%igem Ethanol jeweils für 60 s gewaschen. Es folgte eine Vorbehandlung des Gels in 0,02% Natriumthiosulfat-Lösung für 1 min. Das Gel wurde anschließend dreimal für 20 s in A.bidest gewaschen und zur Imprägnierung für 20 min in 0,2% Silbernitrat-Lösung inkubiert. Durch das wiederholte Waschen mit A.bidest (3x 20 s) wurde freies Silbernitrat entfernt. Beim Imprägnieren bilden die Glutamat-, Aspartat- und Cysteinreste der Proteine mit den Silber-Ionen Komplexe. Das Proteingel wird nun in Entwicklerlösung inkubiert. Die Lösung enthält ein starkes und alkalisches Reduktionsmittel (Formaldehyd), wodurch die Silber-Ionen zu metallischem Silber reduziert werden und an den Stellen der Protein-Silber-Komplexen eine braune oder schwarze Färbung auftritt. Die Reaktion wurde, als die Proteinbanden im Gel sichtbar waren durch die Zugabe

von Stopp-Lösung (verdünnte Essigsäure) und die dadurch hervorgerufene starke pH-Änderung beendet. Das Gel wurde in 50%igem Ethanol aufbewahrt.

Fixierlösung

50% Ethanol

12% Essigsäure

0,5 ml/l 37% Formaldehyd

Vorbehandlung

0,02% Natriumthiosulfat

Imprägnierlösung0,2% AgNO₃

0,75 ml/l 37% Formaldehyd

Entwicklerlösung6% NaCO₃

0,5 ml/l 37% Formaldehyd

0,005% Natriumthiosulfat

Stopp-Lösung

50% Ethanol

12% Essigsäure

2.13 Western-Blot-Analyse

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden Proteingemische nach der Auftrennung, durch eine SDS-PAGE, mittels dem *semi-dry-blotting* Verfahren elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Transfer erfolgte mit nachstehendem Blotaufbau. Die Anode stellten in Transferpuffer (Anodenpuffer 1 und 2) getränkte Filterpapiere (Whatman 3MM Filterpapier) dar, darauf wurden die Nitrocellulose-Membran (BioTrace[®]NT Pure Nitrocellulose Blotting Membrane, Pall corporation) und das Proteingel gelegt. Die Kathode bestand aus in Transferpuffer (Kathodenpuffer) getränkten Filterpapieren. Der Proteintransfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 150 mA für 30 min bei RT. Die Membran wurde anschließend für 30 min in TBS-gelöstem Milchpulver (10%) zum Absättigen der unspezifischen Bindestellen auf der Membran bei RT inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in einer 1%igen Milch-TBS-Lösung bei 4°C über Nacht. Die verwendeten Konzentrationen des jeweiligen Antikörpers sind in Tabelle 2.5 angegeben. Anschließend wurde der Blot dreimal für 20 s in TBS gewaschen und wieder in einer 1%igen Milch-TBS-Lösung mit dem sekundären Antikörper (Tab. 2.5) in einer 1:10.000-fachen

Verdünnung für mindestens zwei Stunden bei RT inkubiert. Der Blot wurde erneut zweimal mit TBS und zweimal mit A.bidest gewaschen und die Membran mit Chemilumineszenz-Reagenz (*LumiLight*-Western Blotting Substrate, Roche) für eine Minute inkubiert. Das Antikörper-Enzym-Konjugat wurde durch Chemiluminogramm (Filme: CEA RP NEW, Röntgen Bender) und deren Entwicklung nachgewiesen.

TBS

20 mM Tris-HCl (pH 7,4)
6,5 mM NaCl

Anodenpuffer I

300 mM Tris
20% Methanol

Anodenpuffer II

25 mM Tris
20% Methanol

Kathodenpuffer

25 mM Tris
20% Methanol
40 mM 6-Amino-n-Caprinsäure

2.14 Protein-DNA-Interaktionsstudien

Zur Untersuchung der Affinität des Proteins NtcA zu der Promotorregion des Gens *map-2* wurden folgende Interaktions-Experimente durchgeführt.

2.14.1 Retardierungs-Analyse

Bindet das Protein an die zuvor markierte DNA-Sequenz, bildet sich ein Nukleinsäure-Proteinkomplex, der in einer nativen PAGE ein langsames Laufverhalten als freie Nukleinsäuren zeigt.

2.14.1.1 Radioaktiv Markierung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Fragmente wurden mittels PCR (siehe Abschnitt 2.10.11) mit genomischer *Synechocystis* sp. PCC 6803 DNA und den spezifischen Oligonukleotiden für *map-2* (5`*EcoRI*map2; 3`*Xba*map2map1) und für *glnA* (5`*glnA*5; 3`*glnA*6) amplifiziert. Die DNA-Fragmente enthielten mittig die

palindrome Sequenz der putativen NtcA-Bindestelle. Die Fragmente wurden anschließend gereinigt (QIAquick PCR Purification Kit) und deren Größe und Reinheit auf einem Agarosegel (1%) kontrolliert.

Die radioaktive Markierung der Promotorsequenz der *map-2*- und *glnA*-Gene erfolgte mit dem 5' End Labeling Kit (Amersham), mit folgendem Ansatz:

200 ng DNA

20 μ Ci [γ - 32 P]ATP

1 Unit T4 Polynukleotid-Kinase (PNK)

PNK-Puffer

Die Inkubation erfolgte nach Herstellerangaben. Zum Beenden der Reaktion wurde 30 μ l STE-Puffer zugegeben.

STE-Puffer (pH 7,5)

100 mM NaCl

20 mM Tris-HCl

10 mM EDTA

2.14.1.2 Aufreinigung radioaktiv markierter DNA-Fragmente

Die DNA-Fragmente wurden über *ProbeQuant G-50 Micro Columns* aufgereinigt. Der Ansatz wurde auf die homogenisierte Säulenmatrix gegeben und zentrifugiert (2.600 U/min, 1 min, RT), wobei die gereinigte, radioaktiv markierte DNA in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen wurde. Die Effizienz der Markierung wurde in einem Szintillationszähler durch das Messen der radioaktiven Strahlung festgestellt.

2.14.1.3 Reaktionsansatz für die Gel-Retardierung

Radioaktiv markierte DNA (1,25 ng, 1500 cpm) wurde mit dem Protein NtcA (500 ng) im Reaktionspuffer nach Vazquez-Bermudez (2002) in einem 20 μ l-Ansatz für 30 min bei RT inkubiert. Zur Verbesserung der Bindungsspezifität wurden dem Ansatz das P_{II} interagierende Protein (PipX) (500 ng), EDTA (1 mM), $CaCl_2$ (0,1 mM), $MgCl_2$ (1 mM) oder α -Ketoglutarat (1-20 mM) zugegeben. Der Ansatz wurde auf einer nativen 6% PAGE aufgetrennt (2.12.6.1) und anschließend

das Gel auf Whatman-Papier für 90 min bei 70°C getrocknet. Das Gel wurde über Nacht auf einen Screen in einer Filmkassette exponiert. Die qualitative Auswertung erfolgte durch Autoradiographie (Molecular Imager Fx, BioRad).

Reaktionspuffer modifiziert nach Vazquez-Bermudez (2002)

12 mM HEPES (pH 8,0)	8% Glycerin
4 mM Tris-HCl (pH 8,0)	50 µg Rinderserumalbumin
50 mM KCl	35 µg Lachssperma-DNA
1 mM DTT	

2.14.2 Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse (*BIAcore*)

Zur Messung der Wechselwirkung zwischen DNA und Protein wurde die Oberflächen-Plasmon-Resonanz- (SPR) Analyse verwendet. Die Versuche wurden in dem Gerät *BIACORE X* (Biacore, Uppsala) mit der zugehörigen Software *BIAsimulation* (Biacore, Uppsala), die den Messverlauf (Bindungsstudie) in einem Sensorgramm darstellt, und einem Sensor-Chip durchgeführt. Der Sensor-Chip besteht aus einer Goldschicht mit einer Oberflächenmatrix, an die der zu untersuchende Bindungspartner immobilisiert werden kann und die in dem Gerät angedockt wird. Das Gerät enthält einen Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Detektor und ein spezielles Fließinjektionssystem, von dem aus Puffer und Probe an der Chip-Oberfläche entlang laufen. Die Bindung einer Probe führt zu einem Signalausschlag, der in Resonanz Unit (RU) gemessen wird. Die Änderung des Signals zeigt das Bindeverhalten des Proteins. Anschließend werden nicht gebundene Proteine mit der Zugabe von Laufpuffer entfernt. Die Kurven des Sensorgramms wurden mit der Software *BIAevaluation* Version 3.0 ausgewertet. Der Puffer wurde vor Gebrauch sterilfiltriert und entgast.

Zur Untersuchung der putativen NtcA-Bindesequenz des *map-2*-Gens wurde ein SA-Chip verwendet, der über Streptavidin biotinylierte DNA auf der Oberfläche kovalent bindet. Zunächst wird die 5'biotinylierte DNA (700 ng) kovalent an den Chip gebunden und die zu untersuchenden Proteine werden in geeignetem Puffer zu dem Chip gegeben. Das *map-2*-Fragment (184 bp) wurde mittels PCR aus chromosomaler *Synechocystis* sp. PCC 6803 DNA und den Oligonukleotiden 5'*map2P-biot* und 3'*map2P-biacore* (Tab. 2.1) amplifiziert. Als Kontrolle wurde ein

160bp-DNA-Fragment verwendet, dass aus einer Kanamycin-Resistenzkassette stammt und mittels den Oligonukleotiden *for_kana_biot* und *rev_kana* und dem Plasmid pVZ322 (siehe Tab. 2.1), als Matrize amplifiziert wurde.

Injektionspuffer (pH 6,0)

20 mM HEPES	50 mM Natrium-Acetat
200 mM NaCl	1 mM DTT
50 mM KCl	0.015% NP40

2.15 Physiologische Experimente mit Cyanobakterien

2.15.1 Nachweis von Biolumineszenz in *Synechococcus*-Zellen

Die Transkriptionseffizienz des *map-2*-Promotors konnte durch die Klonierung der Sequenz stromaufwärts des Luziferase-Gens (*luxAB* aus *Vibrio harveyi*) in dem Reporterplasmid pAM1580 untersucht werden. Das Enzym Luziferase katalysiert die Umsetzung des Substrates Luziferin unter Emission von Licht mit einer Wellenlänge von 490 nm. Die enzymatische Aktivität und somit die Aktivität des zu untersuchenden Promotors, ist in einem Luminometer (Lumat LB9501, Berthold) messbar. In diesem Versuch wurde ein aliphatisches Aldehyd (Dodecanal) als Substrat verwendet. Die Aktivität wurde in Kulturen mit unterschiedlichen Stickstoffquellen (BG-11^N oder BG-11^A) und nach der Induktion von Stickstoffmangel gemessen (in BG-11⁰). Dazu wurde 1 ml einer zu untersuchenden *Synechococcus*-Kultur (OD₇₅₀ von 0,4) in einem Sarstedt-Röhrchen mit 5 µl Dodecanal-Lösung (50 mM) gemischt, das einer Endkonzentration von 0,25 mM entspricht. Die entstehende Lichtemission, gemessen in relative Lichteinheit (RLU= Relative Light Units) wurden in einem Luminometer (Lumat LB0501, Berthold) in einem Zeitraum von 20 min und einem Zeitintervall von 30 s gemessen. Die maximale Lichtemission (in RLU) wurde als Messwert verwendet.

Dodecanal-Lösung (500 mM)

94 µl Dodecanal in 906 µl DMSO lösen

2.15.2 Extraktion von Chlorophyll a nach Tandeau de Marsac

Der Gehalt an Chlorophyll a wurde photometrisch durch die Methanol-Extraktion nach Tandeau de Marsac (1988) bestimmt. Die Cyanobakterien-Zellen wurden durch Zentrifugation (13,200 U/min, 2 min, RT) geerntet und das Zellpellet in 20 µl BG-11^N Medium resuspendiert. Zur Extraktion wurden 980 µl Methanol zugegeben und die Suspension für 30 min bei RT im Dunkeln schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden Zellreste durch Zentrifugation (13.200 U/min, 2 min, RT) entfernt und der Überstand für photometrische Messungen verwendet. Der Chlorophyll a-Gehalt wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Chlorophyll a (mg/ml Kultur)} = (0,01629 * A_{665}) - (0,00854 * A_{652})$$

2.15.3 Extraktion von Chlorophyll a nach Mackinney

Die Konzentrationsbestimmung von Chlorophyll a für die Sauerstoffmessungen erfolgte nach Mackinney (1941). 1 ml der Zellkultur wurde durch Zentrifugation geerntet (14.000 U/min, 3 min, RT) und in 1 ml 99% Methanol resuspendiert und für 30 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer entfernt (14.000 U/min, 1 min, RT) und der klare Chlorophyll a-haltige Überstand für photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 665 nm verwendet. Die Chlorophyll a-Konzentration wurde nach folgender Gleichung von Mackinney (1941) berechnet:

$$\text{Chlorophyll a (mg/ml Kultur)} = [\text{OD}_{665} * (V_{\text{Probe}} + V_{\text{Methanol}})] / (74,5 * V_{\text{Probe}})$$

2.15.4 Pigmentanalyse in Cyanobakterien

Die Veränderungen im Pigmentgehalt der Cyanobakterien wurden vor und nach der Induktion von Stress untersucht. Der Gehalt von Phycobiliproteinen (PBS) und Chlorophyll a wurden photometrisch nach einer modifizierten Methode nach Myers (1980), mittels eines Ganz-Zell-Spektrums (350-750 nm) erfasst.

Der Gehalt der Pigmente wurde nach folgenden modifizierten Formeln berechnet:

$$\text{PBS} = (1.0162 * A_{631\text{korr}}) - (0.120 * A_{684\text{korr}})$$

$$\text{Chla} = (1.0162 * A_{684\text{korr}}) - (0.063 * A_{631\text{korr}})$$

Der Wert $A_{684\text{korr}}$ stellt die Differenz ($A_{684\text{gem}} - A_{684\text{errech}}$) der gemessenen und errechneten ($A_{684\text{errech}} = [0,3666 * (A_{570} - A_{750}) + A_{750}]$) Werte der Absorptionen dar. Ebenso stellt der Wert $A_{631\text{korr}}$ die Differenz ($A_{631\text{gem}} - A_{631\text{errech}}$) der gemessenen und errechneten ($A_{631\text{errech}} = [0,6555 * (A_{570} - A_{750}) + A_{750}]$) Werte der Absorptionen dar.

2.15.5 Fluoreszenzmessungen

2.15.5.1 77K Pigment-Fluoreszenz-emissions-Spektroskopie

Werden chlorophyllhaltige Proben mit blauem oder rotem Licht bestrahlt, emittieren die Chlorophylle die messbare Anregungsenergie als Fluoreszenz im roten Bereich. Durch die Messungen mit Tieftemperatur (77K) gelingt es einzelne Komplexe in der Absorption sichtbar zu machen, da die störenden Nebenanregungen (Rotationsanregung, Vibrationsanregung) bei Tieftemperaturen gering sind. Die Messungen der Tieftemperatur-Chlorophyll-Fluoreszenz-emission, deren Ergebnisse in dieser Arbeit dargestellt sind, wurden in Bielefeld, in der Arbeitsgruppe von Dr. Michel mit einem PerkinElmer LS 50-B Lunimeszenz-Spektrometer[®] (PerkinElmer Inc., USA) durchgeführt.

Es wurden Emissions-Spektren (600-750 nm) bei einer Anregung von 435 ± 10 nm (Chlorophyll *a*) und bei einer Anregung von 600 ± 10 nm (Phycobilisomen) erstellt. Die *Synechocystis*-Zellen wurden auf eine Chlorophyll *a*-Konzentration von 10 µg/ml mit dem jeweiligen Medium eingestellt und 350 µl der Suspension wurden in eine Messküvette (Kryoröhrchen) gefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Der Messraum des Spektrometers wurde vor der Messung mit flüssigem Stickstoff geflutet, um eine Temperatur von 77K während der Messung zu gewährleisten. Die Fluoreszenz-Messung erfolgte bei einer Scann-Geschwindigkeit von 200 nm/min. Es wurden zwei Spektren pro Probe angefertigt.

Die Auswertung erfolgte mit der Software *FLWinLab* und SigmaPlot 10.0. Die Zuordnung der gemessenen Fluoreszenzmaxima erfolgte nach Mullineaux und Allen (1990) und Wittmershaus (1992).

2.15.5.2 *In vivo* PSII-Analyse mittels Chlorophyll Fluoreszenz Fluorometer

Die Chlorophyllfluoreszenz ist ein Indikator der photosynthetischen Energieumwandlung in höheren Pflanzen, Algen und Bakterien. Die Energie eines angeregten Chlorophyllmoleküls kann in die Elektronentransportkette fließen (Photochemie), in Form von Wärme oder als Phosphoreszenz oder Fluoreszenz abgegeben werden. Wichtige Parameter der Photosystem II (PSII) Analyse sind die Grundfluoreszenz (F_0) und die maximale Fluoreszenz (F_m), wie in Abb. 2.1 dargestellt. Die Grundfluoreszenz (F_0) gibt die Fluoreszenzstrahlung wieder, die durch die Anregungsenergie in den Antennensystemen des PSII vor Erreichen der Reaktionszentren verursacht wird. Steigt die Fluoreszenz nach gegebenem, sättigendem Starklichtpuls auf einen Maximalwert an (F_m), liegen alle Primärakzeptoren (Q_A) im reduzierten Zustand vor und kein weiterer Elektronentransport ist mehr möglich. Die Differenz der beiden Zustände wird als variable Fluoreszenz (F_v) bezeichnet.

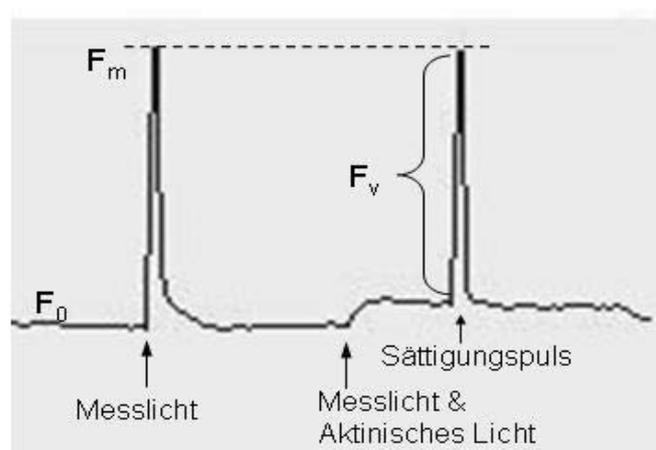


Abbildung 2.1. Prinzip der saturierenden Pulsmethode in dem WATER-PAM Chlorophyll Fluorometer. Darstellung der Fluoreszenzparameter von dunkeladaptierten Zellen. Grundfluoreszenz (F_0), variable Fluoreszenz (F_v) und maximale Fluoreszenz (F_m) (modifiziert nach Schreiber, Datenblatt zur Apparatur).

Die Quantenausbeute (*yield*), das Verhältnis von F_v zu F_m ($yield = (F_m - F_0) / F_m$) ist das Maß für die Effizienz des PSII, mit der die Anregungsenergie von den

Antennenkomplexen zu den offenen Reaktionszentren geleitet wird. Die Elektronentransportrate (ETR) beinhaltet die Quantenausbeute bezogen auf die eingestrahlte photosynthetisch aktive Strahlung (PAR= photosynthetic active radiation) und wird vom System wie folgt berechnet:

$$\text{ETR} = \text{ETR-Faktor} \times \text{yield} \times \text{PAR}.$$

Die Komponenten des WATER-PAM (Puls-Amplituden-Modulation) Chlorophyll Fluorometer sind die PAM-Kontroll-Einheit (Mikroprozessor), die alle Puls-Programme erzeugt und durchführt. Die geschlossene Messzelle WATER-ED Emitter-Detektor, in der die Probe in einer Quarzküvette (Durchmesser: 15 mm) bestrahlt und die Fluoreszenz mit einem Photomultiplier-Detektor (Hamamatsu H-6779-01) detektiert wird (Fluoreszenz-Emission bei 710 nm). Die Lichtquelle besteht aus kreisförmig angeordneten LEDs (light-emitting-diode) als Messlicht, als Starklichtpuls (Peak bei 650 nm) zur Fluoreszenz-Anregung und weitere als Aktinisches Licht (Peak bei 660 nm). Das PAM-Fluorometer erreicht durch die zeitliche Trennung der Einstrahlung von Messlicht und aktinischem Licht, dass nur Fluoreszenz-Signale, die vom aktinischen Licht angeregt wurden, gemessen werden. Somit gibt es keine Störung durch überlagerte Lichtsignale. Die effektive Quantenausbeute des PSII und die ETR können mit der saturierenden Pulsmethode und durch die Anregung mit 650-660 nm Lichtqualität bestimmt werden (Genty *et al.*, 1989, Schreiber *et al.*, 1995, Sauer *et al.*, 2001). Die Messeinheit wurde mithilfe der Software *WinControl* Version 2.13 über den PC gesteuert. Für alle Messungen wurden die Proben 1:10 in einem Gesamtvolumen von 2 ml in dem Probenmedium verdünnt und vor der Messung für 5 min im Dunkeln inkubiert. Alle Messungen wurden im optimalen Messbereich des Geräts, bei einer Grundfluoreszenz von 400-500 mV, durchgeführt und wurden durch den Verstärkungsfaktor (GAIN) auf jede Probe neu angepasst.

Zur Messung der photosynthetischen Aktivität des PSII *in vivo* während unterschiedlichen Wachstums- und Stressbedingungen wurde eine Chlorophyllfluoreszenz-Messung in dem WATER-PAM Chlorophyll Fluorometer (Walz GmbH, Effeltrich) mittels einer modifizierten saturierenden Pulsmethode durchgeführt. Dazu wurde während der Bestrahlung mit Messlicht ein Starklichtpuls gegeben und die maximale Fluoreszenz (F_m) bestimmt.

Anschließend wurde bei unterschiedlichen Fluenzraten (55, 67, 1127 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) des aktinischen Lichtes Sättigungspulse gegeben und die variable Fluoreszenz (F_v) ermittelt. Die vom System berechnete Elektronentransportrate (ETR), wurde normiert und der Verstärkungs- und Verdünnungsfaktor mit einberechnet ($\text{ETR}_{\text{max}} = (\text{ETR}/1,47^{\text{Verstärkungsstufe}}) * \text{Verdünnungsfaktor}$). Die ETR_{max} -Werte wurden gegen die Zeit grafisch dargestellt, um die PSII-Aktivität unter verschiedenen Wachstumsbedingungen darzustellen.

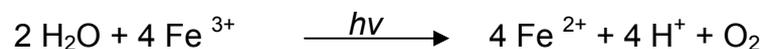
Für die Messungen der Ammonium-Sensitivität wurde F_0 und F_m sowie F_v bei dunkeladaptierten Zellen mit aktinischem Licht einer Fluenzrate von 55 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gemessen. Die vom System errechnete ETR, als Maß für die photosynthetische Aktivität des PSII, wurde gegen die Zeit graphisch dargestellt. Die Messungen wurden unter identischen Bedingungen (Verdünnungsstufe, OD_{750} und Verstärkungsfaktor) durchgeführt und waren somit vergleichbar.

2.15.6 Photosynthetische und respiratorische *in vivo* Aktivität von *Synechocystis*-Zellen

Zur Messung der photosynthetischen und respiratorischen Aktivität intakter Zellen wurde eine Clark-Sauerstoffelektrode (Hansatech, Reutlingen) verwendet. Die Sauerstoffmesseinheit bestand aus einem Reaktionsraum für 2 ml Probe, der mit Elektroden im Messraum verbunden ist, und der die Sauerstoffentwicklung an den Verstärker weitergibt. Die Clark-Elektrode besteht aus einer Platin-Kathode und einer Silber-Anode, die über eine Elektrolytlösung (3 M Kaliumchlorid) in Verbindung stehen und von der Probe durch eine sauerstoffdurchlässige Membran getrennt wird. Die Messungen erfolgten nach dem Prinzip von Clark (1956). Zunächst wird der entstandene Sauerstoff der Probe an der Platin-Kathode zu Wasser reduziert. Die Elektronen fließen über die Elektrolyt-Lösung zur Silber-Anode, auf der sich Silberchlorid abscheidet. Es wurde von Außen eine Polarisationsspannung an beide Elektroden gelegt. Die Stärke des Stromflusses ist der Menge an reduziertem Sauerstoff proportional.

Die Kalibrierung der Messsignale erfolgte mit Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) zur vollständigen Reduktion des Sauerstoffs aus der Lösung (A.dest) und mit

Sauerstoffgesättigtem A.dest. Der registrierte Schreiberausschlag entsprach einer gelösten Sauerstoffmenge von 0,92 $\mu\text{mol O}_2$ (bei RT und in 2 ml Sauerstoffgesättigtem Wasser). Der Verlauf der Sauerstoffentwicklung wurde mit einem Schreiber Pharmacia-LKB-REC 101 (Pharmacia, Freiburg) mit einer Schreibergeschwindigkeit von 10 mm/min aufgezeichnet. Die photosynthetische Aktivität von *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde anhand der Sauerstoffentwicklung im Licht gemessen. Die Zellen wurden in der mittleren exponentiellen Phase (OD_{750} von 0,8) für den Versuch auf OD_{750} von 0,4 oder 0,6 mit BG-11^N Medium verdünnt und in die Reaktionskammer überführt, in der sie mit einem Magnetrührer gerührt wurden. Vor der Bestrahlung erfolgte eine Dunkeladaptation der Zellen für mehrere Minuten. Die Zellen im Reaktionsraum wurden mit 1000 und 3000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei konstanter Raumtemperatur bestrahlt. Die Lichtintensität wurde mit einem LI-COR Light Meter LI-189 (LI-COR, USA) bestimmt. Die respiratorische Aktivität der *Synechocystis*-Zellen wurde anhand des Sauerstoffverbrauchs im Dunkeln gemessen. Durch die Zugabe von 1 mM Kaliumferricyanid und 1 mM 1,4-Benzochinon bzw. 1 mM 2,5-Dimethylbenzochinon zu der Kultur, konnte die PSII-Aktivität *in vivo* separat nach der Hill-Reaktion (Hill, 1937) mit folgender Gleichung ermittelt werden:



2.15.7 Belichtungsexperimente mit monochromatischem Licht

Die Belichtungen von *Synechocystis* sp. PCC 6803 mit monochromatischem Licht wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Batschauer an der Universität Marburg durchgeführt. Es wurden Zellen mit Weißlicht und der Fluenzrate von 10 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bis zu einer OD_{750} von 0,8 angezogen und in der mittleren exponentiellen Phase für den Versuch auf eine OD_{750} von 0,4 mit BG-11^N Medium verdünnt. Die Zellen (5 ml) wurden in Petrischalen pipetiert und 5 mM NH_4Cl wurde zugegeben. Die Kultur wurde mit monochromatischem Licht mit einer Photonen Fluenzrate von 5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ unter der Verwendung von Doppel-Interferenzfiltern (Schott, Deutschland) mit Wellenlängen von 360-700 nm (Halbwertbreite ± 14 nm) für 240 min bestrahlt. Der Energiefluss der jeweiligen Wellenlängen wurde für eine Fluenzrate von 5 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ berechnet

und mit einem P-2000 Optometer und einem kalibrierten PD-9306-2 Detektor (Gigahertz, Puchheim, Deutschland) eingestellt. Anschließend wurde die photosynthetische Aktivität der Zellen mittels WATER-PAM Chlorophyll Fluorometer mit der saturierenden Pulsmethode (siehe Abschnitt 2.15.5.2) bestimmt.

2.16 Mikroskopie von gefärbten *Synechocystis*-Zellen

Zur Untersuchung der Lebensfähigkeit von *Synechocystis*-Zellen vor und nach der Induktion des Stickstoffmangels wurden die Zellen mit LIVE/DEAD®*BacLight* Assay (MoBiTec, Göttingen) angefärbt und anschließend mikroskopiert. Das Prinzip der Färbung beruht auf zwei spezifischen Nukleinsäure-Färbungen, SYTO 9 und Propidium-Iodid. SYTO 9 färbt alle Bakterienzellen grün-fluoreszent, während Propidium-Iodid nur in Bakterienzellen mit geschädigter Membran eindringen kann. Die Zellen erscheinen rot-fluoreszent und verringern somit die grüne Färbung von SYTO 9. Die Zellen wurden in folgendem Ansatz für die Mikroskopie gefärbt: 0,3 µl der Komponente A und 0,3 µl der Komponente B mit 0,6 µl A.bidest direkt vor der Mikroskopie frisch angesetzt. Die Zellen (100 µl) gleicher OD₇₅₀ wurden mit 0,2 µl der Färbelösung vermischt und im Dunkeln für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 15 µl auf einen Objektträger getropft und mit Deckglas mit 1000-facher Vergrößerung mikroskopiert (Nikon ECLIPSE 80i, Nikon, München) und zur Auswertung fotografiert. Durch die Belichtung der Zellen mit UV-Licht (Filter: UV-2A; EX330-380; DM400; BA 420) erscheinen die lebenden Zellen grün und die toten Zellen rot.

3 Ergebnisse

I. Physiologische und molekularbiologische Charakterisierung der Methionine-Aminopeptidase 2 (MetAP2)-defizienten Mutante in *Synechocystis* sp. PCC 6803

In *Synechocystis* sp. PCC 6803 kodieren drei offene Leseraster (ORF) für vermeintliche Methionin-Aminopeptidasen (MetAP), deren Gene als *map-1* (slr0786), *map-2* (slr0918) und *map-3* (sll0555) bezeichnet wurden (Kaneko *et al.*, 1996; Atanassova *et al.*, 2003). Atanassova (2003) zeigte für die Aktivität der drei Enzyme in *Synechocystis* sp. PCC 6803 unterschiedliche pH- und Temperatur-Optima, sowie unterschiedliche Substratspezifitäten. Der Vergleich der Primärsequenzen der cyanobakteriellen MetAP's mit der MetAP aus *E.coli* zeigte, dass die Aminosäuren, die für die Enzymaktivität verantwortlich sind, in den cyanobakteriellen MetAP's konserviert vorliegen (Atanassova *et al.*, 2003).

Zur physiologischen Analyse der MetAP's in *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurden Insertionsmutanten durch homologe Rekombination erzeugt. Homozygote *map-1*- und *map-2*-Mutanten wurden im Labor von Prof. Dr. W. Lokau (Humboldt-Universität zu Berlin) hergestellt. Dazu wurden die Antibiotikum-Resistenzkassetten (Kanamycin-Resistenzkassetten aus dem Plasmid pUC4K) in die entsprechende Peptidase-kodierende Region eingefügt. Es konnte keine homozygote Mutante des *map-3*-Gens hergestellt werden, da sich diese Mutation vermutlich letal auf die Zellen auswirkt. In Untersuchungen der Mutanten bezüglich ihres Phänotyps unter Stickstoffmangelbedingungen (Chlorose) zeigte die MetAP1-defiziente Mutante keinen auffälligen Phänotyp, während die MetAP2-defiziente Mutante in der Langzeit-Chlorose einen veränderten Phänotyp hatte. Es konnte gezeigt werden, dass die *Mmap2*-Zellen die Fähigkeit der Regeneration während der Chlorose verlieren (Diplomarbeit Rustler, 2003).

Zu Beginn dieser Arbeit war die physiologische Funktion der drei cyanobakteriellen MetAP's nicht bekannt. Es stellte sich die Frage, welche Funktion die drei MetAP's in *Synechocystis* sp. PCC 6803 ausführen und ob diese

in unterschiedlichen Umweltbedingungen ausgeführt werden oder unter gleichen Umweltbedingungen unterschiedliche Substrate prozessiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die MetAP2-defiziente Mutante (*Mmap2*) unter Standard- und verschiedenen Stressbedingungen phänotypisch und molekularbiologisch charakterisiert, um Aufschluss über die Funktion und die Substrate der Peptidase MetAP2 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 zu erhalten.

3.1 Phänotypische Charakterisierung von *Synechocystis*-Zellen unter Stickstoffmangel (Chlorose)

Bekannt ist, dass *Synechocystis* sp. PCC 6803, als ein nicht diazotrophes Cyanobakterium während des Stickstoffmangels in Chlorose eintritt (Übersichtsartikel: Schwarz und Forchhammer, 2005). Stickstoffmangel bewirkt eine Differenzierung in der Cyanobakterien-Zelle, die in einem unpigmentierten Ruhezustand der Zelle endet, in dem sie lange Mangelperioden überleben kann (Görl *et al.*, 1998). Die Differenzierung der Zelle erfordert viele proteolytische Prozesse, wobei die in der Chlorose involvierten Proteasen nur wenig bekannt sind. Um zu untersuchen, ob die Peptidase MetAP2 in die Prozesse der Zelldifferenzierung während der Chlorose involviert ist, wurde Stickstoffmangel induziert und zunächst eine spektroskopische Analyse des Pigmentabbaus durchgeführt.

3.1.1 Pigmentabbau (Chlorophyll *a* und Phycobilisomen) während der Chlorose

Die Chlorose der Cyanobakterien kann in mehrere Stadien eingeteilt werden (Sauer *et al.*, 1999), in denen zunächst die Photosyntheseleistung durch den Abbau photosynthetisch aktiver Pigmente verringert wird, was durch das Ausbleichen der Zellen sichtbar wird. Die Abbildung 3.1 zeigt eine phänotypische Analyse von *Synechocystis* sp. PCC 6803 Wildtyp- und *Mmap2*-Zellen während der durch Stickstoffmangel induzierten Chlorose. Die Abbildung präsentiert die blau-grüne Farbe von *Synechocystis* sp. PCC 6803 in stickstoffreichem BG-11^N Medium (+N) und die Kulturen in der ersten Phase (nach fünf und elf Tagen) und der dritten Phase (nach 30 und 90 Tagen) der Chlorose in stickstofffreiem BG-11⁰

Medium. Die Mutante zeigte ein dem Wildtyp ähnliches Ausbleichen der Zellen von blau-grün bis weiß.

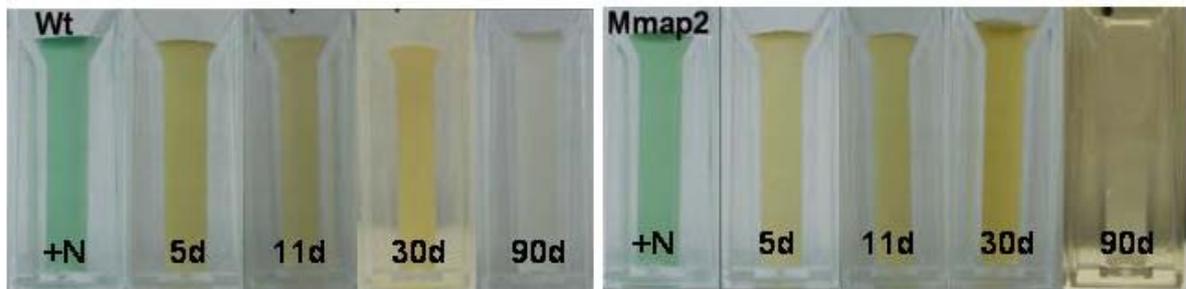


Abbildung 3.1: Verlauf der Chlorose von *Synechocystis* sp. PCC 6803 Zellen. Die Wildtyp- (links) und *Mmap2*- (rechts) Zellen wurden in BG-11^N Medium kultiviert und bei Erreichen der exponentiellen Phase wurde Stickstoffmangel mittels Filtrierung induziert (siehe Abschnitt 2.8.2.1). Die Proben (1 ml) wurden vor der Induktion (+N) und nach 5, 11, 30 und 90 Tagen entnommen, auf die gleiche optische Dichte mit dem jeweiligen Medium eingestellt und in Küvetten fotografiert.

Phycocyanin und Allophycocyanin sind die Pigmente der Antennenkomplexe (Phycobilisomen) in Cyanobakterien. In den Antennenkomplexen sind weitere Moleküle assoziiert, wie Chlorophyll *a* und Carotinoide. Chlorophyll *a* ist ein zusätzlicher Sammler und Weiterleiter von Lichtenergie. Carotinoide wirken einerseits als akzessorische Antennenpigmente und andererseits als *Lichtquencher*, die Strahlungsenergie von angeregten Molekülen übernehmen und diese strahlungsfrei in Form von Wärme wieder abgeben. Anhand eines Absorptionsspektrums können das Verhältnis und die Menge an Pigmenten bestimmt werden, da sie Licht verschiedener Wellenlängen absorbieren.

Der Abbau der photosynthetischen Pigmente Chlorophyll *a* und Phycobilisomen wurde mittels photometrischer Messung und Berechnung der Pigmentmenge nach einer modifizierten Formel nach Myers (1980) vor der Induktion und während des Stickstoffmangels bestimmt (siehe Abschnitt 2.15.4). Abbildung 3.2 zeigt die Pigmentmenge der Kultur in Prozent in Abhängigkeit der Zeit. In Wildtyp-Zellen konnte beobachtet werden, dass innerhalb der ersten 24 Stunden der Chlorose die Phycobilisomen bis zu 70% abgebaut wurden. Nach 72 Stunden Stickstoffmangel konnten keine Phycobilisomen in den Zellen mehr nachgewiesen werden (Abb. 3.2 A). Dieser Abbau konnte auch mithilfe der Western-Blot-Analyse mit einem spezifischen Antikörper gegen Gesamt-Phycobilisomen gezeigt werden (Abb. 3.2 B). Der Abbau von Chlorophyll *a* konnte ebenfalls in der ersten Phase

der Chlorose (Abb. 3.2 A) beobachtet werden, allerdings langsamer. Nach 144 Stunden waren bis zu 20% der Chlorophyll in den Zellen abgebaut.

Der Pigment-Abbau in der Peptidase-Mutante ist nicht durch die Mutation beeinträchtigt und zeigte Wildtyp-ähnliche Charakteristika. Dies zeigt, dass die Peptidase MetAP2 nicht in dem Prozess des Pigmentabbaus involviert ist.

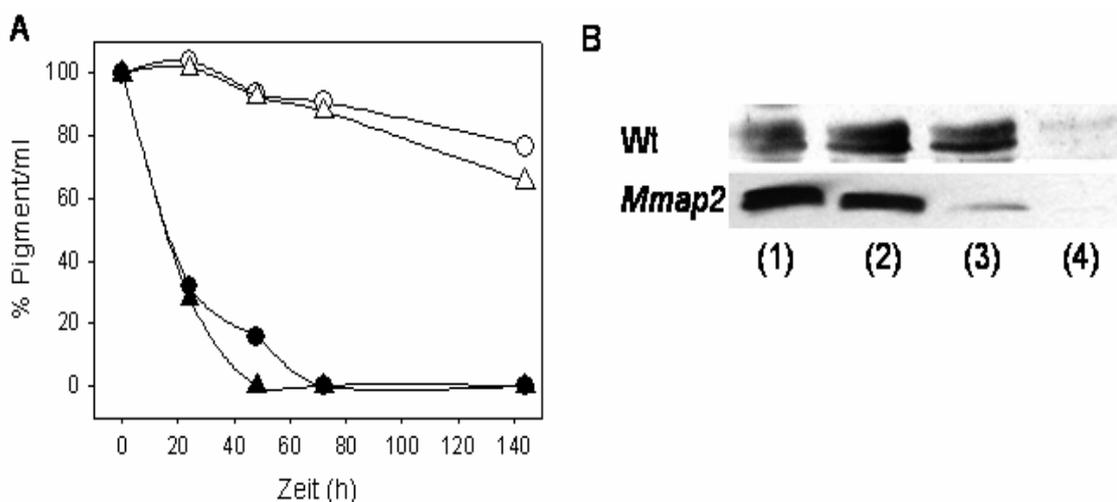


Abbildung 3.2: Pigmentabbau in *Synechocystis* sp. PCC 6803 Zellen während der Chlorose. (A) Die Graphik zeigt den Abbau der Phycobilisomen (geschlossene Symbole) und Chlorophyll *a* (offene Symbole) in Prozent pro ml Kultur in *Synechocystis* sp. PCC 6803 Wildtyp (Kreise) und *Mmap2* (Dreiecke) während des Stickstoffmangels. (B) Nachweis von Phycobilisomen (Western-Blot-Analyse) in Wildtyp- und *Mmap2*-Zellen (1) in BG-11^N Medium (2) nach 24 h, (3) 48 h und (4) nach 72 h Stickstoffmangel. Die Zellen wurden in 150 μ l Zellaufbruchspuffer (siehe 2.12.1) resuspendiert, Zelltrümmer entfernt (3.500 g, 5 min, 4°C) und die Proteinfractionen mittels Ultrazentrifugation (100.000 xg, 1h, 4°C) erstellt. Die löslichen Proteinfractionen (5 μ g) wurden über eine 12,5%ige SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.12.6.2.1) aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und der Antikörper-Protein-Komplex wurde nachgewiesen, wie in Abschnitt 2.13 beschrieben. Der verwendete Antikörper und dessen Verdünnung sind in Tab. 2.5 aufgeführt. Die Versuche wurden mehrmals wiederholt mit jeweils ähnlichen Ergebnissen.

3.1.2 PSII-Aktivität während der Chlorose

Nach der Induktion des Stickstoffmangels verdoppelt sich die Zelldichte zunächst noch einmal bevor die Differenzierung der Zellen, in Vorbereitung auf den Ruhezustand, beginnt. In *Synechococcus elongatus* PCC 7942 konnte gezeigt werden, dass sich in der ersten Phase der Chlorose die PSII-Aktivität zunächst um 80% verringert, während die PSI-Aktivität noch aufrechterhalten bleibt. Die PSII-Aktivität sinkt in der zweiten Phase bis auf eine minimale Aktivität und auch die PSI-Aktivität sinkt bis auf 0,1%. Der Erhalt der photosynthetischen Restaktivität ist lichtabhängig und für die Regenerationsfähigkeit der Zellen essentiell (Görl, *et al.*, 1998; Sauer *et al.*, 2001; Doktorarbeit Sauer, 2002).

Die PSII-Aktivitäten der *Synechocystis*-Zellen während der Chlorose wurde mittels WATER-PAM Chlorophyll Fluorometers unter Anwendung der saturierenden Pulsmethode untersucht, wie im Abschnitt 2.15.5.2 beschrieben. Die PSII-Aktivität kann ermittelt werden, indem die variable Chlorophyllfluoreszenz (F_v) unter verschiedenen Lichtbedingungen gemessen wird. F_v ist dabei die Differenz zwischen Grundfluoreszenz (F_0) bei gegebener Beleuchtung und Maximalfluoreszenz nach einem Starklichtpuls (F_m). Diese Daten lassen auf den physiologischen Zustand des Photosyntheseapparates schließen. Die Abbildung 3.3 zeigt die Elektronentransportrate (ETR) in Prozent der jeweiligen Zeitpunkte der Chlorose. Die PSII-Aktivität im Wildtyp wurde in den ersten 24 Stunden um 70% reduziert und nach 48 Stunden um weitere 20% verringert. In den Messungen nach 72 und 144 Stunden Mangel konnte nur noch eine Restaktivität des PSII festgestellt werden (Abb. 3.3). Die Peptidase-Mutante *Mmap2* konnte, wie der Wildtyp, die PSII-Aktivität während der ersten Phasen des Stickstoffmangels verringern und zeigte ebenso nach 72 Stunden nur noch eine PSII-Restaktivität (Abb. 3.3).

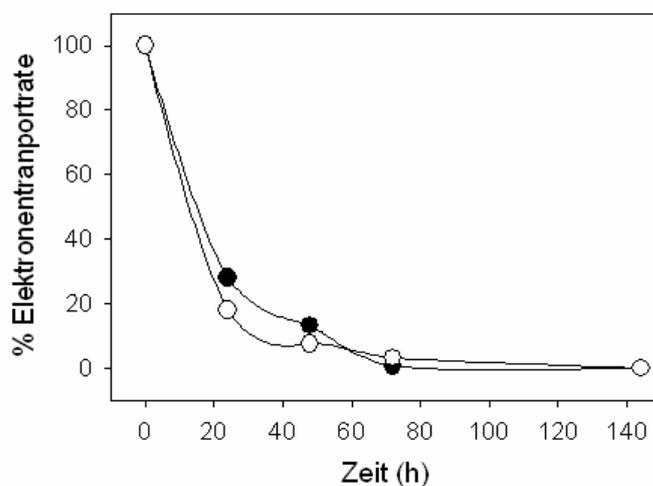


Abbildung 3.3: In vivo PSII-Aktivität während der Chlorose. Die Abbildung zeigt die ETR in Prozent von Wildtyp- (geschlossene Kreise) und *Mmap2*- (offene Kreise) Zellen in dem Verlauf der ersten und zweiten Phase der Chlorose. Zu angegebenen Zeitpunkten des Mangels wurden die PAM-Messungen ($1127 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durchgeführt. Die ETR_{max} wurde berechnet (siehe 2.15.5.2). Die 100% Werte stellen Werte der ETR vor der Induktion des Stickstoffmangels dar. Die Messung ist repräsentativ für 3 Messungen, die ähnliche Ergebnisse zeigten.

Die PSII-Aktivität von *Synechocystis*-Zellen während der Langzeit-Chlorose wurde ebenfalls mittels Messungen der Chlorophyllfluoreszenz analysiert. Dazu wurden die Zellen nach 63 Tagen Stickstoffmangel entnommen und Chlorophyllfluoreszenz-Messungen in dem WATER-PAM Chlorophyll Fluorometer, wie im Abschnitt 2.15.5.2 beschrieben, durchgeführt. In den Langzeit-chlorotischen Wildtyp-Zellen konnte ein Anstieg der Grundfluoreszenz und variablen Fluoreszenz gemessen werden, während in den *Mmap2*-Zellen dies

nicht zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Die Messung zeigte, dass das PSII der Wildtyp-Zellen aktiv ist und ein Elektronentransport stattfindet. Dieser Elektronentransport konnte durch die Zugabe des Photosynthese-Inhibitors 3-(3,4-Dichloro-phenyl)-1,1-Dimethyl-urea (DCMU) inhibiert werden (siehe Abb. 3.4). Dazu wurde den Zellen gleicher OD₇₅₀ direkt vor der Messung 10 µmol DCMU zugegeben, nach ca. 40 Sekunden wurde aktinisches Licht eingeschaltet, woraufhin die Grundfluoreszenz unmittelbar anstieg. Bei anschließenden Starklichtpulsen (Abb. 3.4; Pfeile) konnte keine weitere Erhöhung der Fluoreszenz festgestellt werden, d.h. durch das aktinische Licht war bereits F_m erreicht, was auf die Inhibition des PSII durch DCMU zurück zu führen ist. Im Gegensatz dazu konnte in *Mmap2*-Zellen nur eine minimale Änderung der Chlorophyllfluoreszenz nach Einschalten des aktinischen Lichts beobachtet werden (Abb. 3.4 B). Das bedeutet, dass in den *Mmap2*-Zellen nach Langzeit-Chlorose kaum mehr PSII-Aktivität vorhanden ist. Somit ist die Peptidase-Mutante nicht in der Lage, die lebenswichtige Restaktivität des PSII während des Mangels aufrecht zu erhalten.

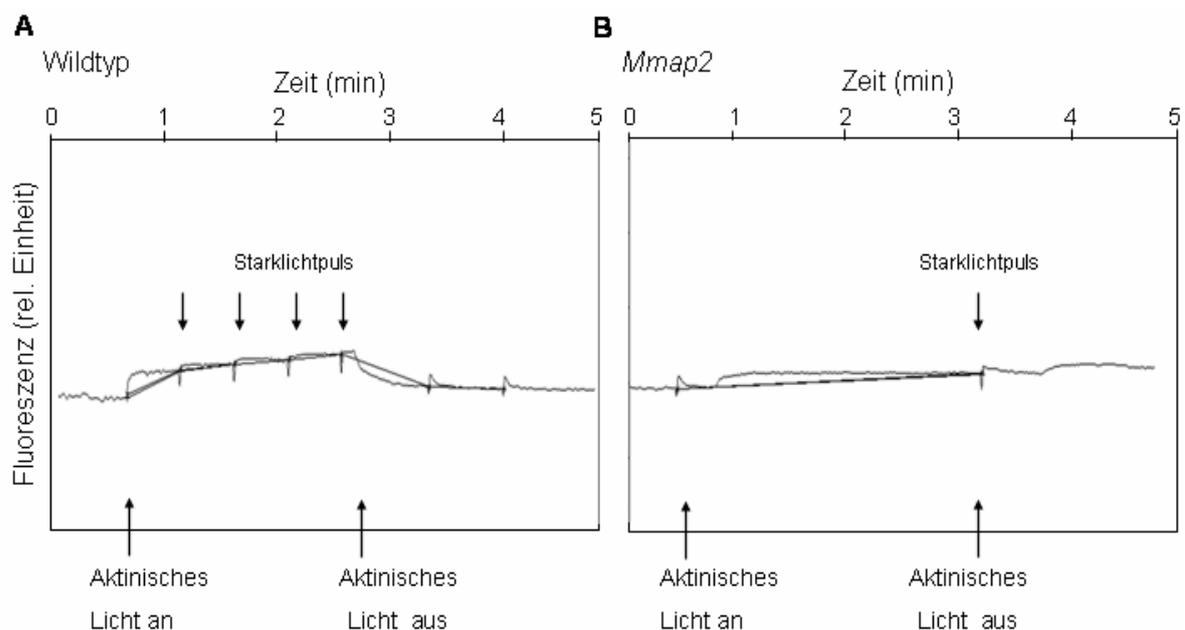


Abbildung 3.4: In vivo PSII-Aktivitätsanalysen der *Synechocystis*-Zellen nach 63 Tagen der Chlorose in der Anwesenheit von DCMU. Die Abbildungen zeigen Fluoreszenzmessungen im WATER-PAM Chlorophyll Fluorometer von Wildtyp- (A) und *Mmap2*- (B) Zellen nach 63 Tagen der Chlorose. Die PSII-Aktivität wurde mittels der saturierenden Pulsmethode analysiert. Die Messung ist repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente, die ähnliche Ergebnisse zeigten.

3.1.3 Abbau der Gesamtproteine in den ersten Phasen der Chlorose

Bereits veröffentlichte Arbeiten zeigten, dass in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 in der zweiten und dritten Phase der Chlorose ein Teil des Gesamtproteingehalts mit Ausnahme einzelner Proteine (z.B. die Membranproteine SomA und SomB; Sauer *et al.*, 2001) abgebaut wird. Dieser Prozess erfordert eine erhöhte proteolytische Aktivität einzelner Proteasen.

Um zu klären, ob MetAP2 eine Funktion in dem proteolytischen Abbau während der Chlorose hat, wurde der Abbau der Gesamtproteine in *Synechocystis* Wildtyp und MetAP2-Mutante mittels eindimensionaler SDS-PAGE untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Die Proteinbanden der löslichen Fraktionen in den Wildtyp-Zellen (Abb. 3.5 A; 1-6) nahmen innerhalb 144 Stunden Stickstoffmangel stetig ab. Nach 48 und 72 Stunden Mangel war eine Zunahme einiger größerer (100 kDa) Proteine und die gleichzeitige Abnahme der Phycobiliproteine mit Molekulargewichten zwischen 21 und 31 kDa sichtbar. Es konnten Unterschiede im Proteinbandenmuster des Wildtyps und der Mutante beobachtet werden (Vergleich Abb. 3.5 A und B). Auffällig war, dass während der Chlorose die Abnahme der Gesamtproteine in den *Mmap2*-Zellen vermindert stattfand (Abb. 3.5 B; 2-5). Eine Ausnahme bildeten die Phycobiliproteine (21-31 kDa), die sichtbar abgebaut wurden. Proteine mit einer Molekulargröße von 55-100 kDa und 14-31 kDa akkumulierten in den löslichen Extrakten der Mutante. In den Pellet-Fraktionen der *Mmap2*, die die Thylakoide enthielten, wurde ebenfalls ein verminderter Proteinabbau nach 144 Stunden der Chlorose festgestellt, vor allem von Proteinen der Größen 100 kDa und 10-30 kDa.

MetAP2 könnte einen direkten oder indirekten Einfluss auf die akkumulierten Proteine haben. Eine weitere Untersuchung mittels einer zweidimensionalen Gelelektrophorese konnte bis zum Ende dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

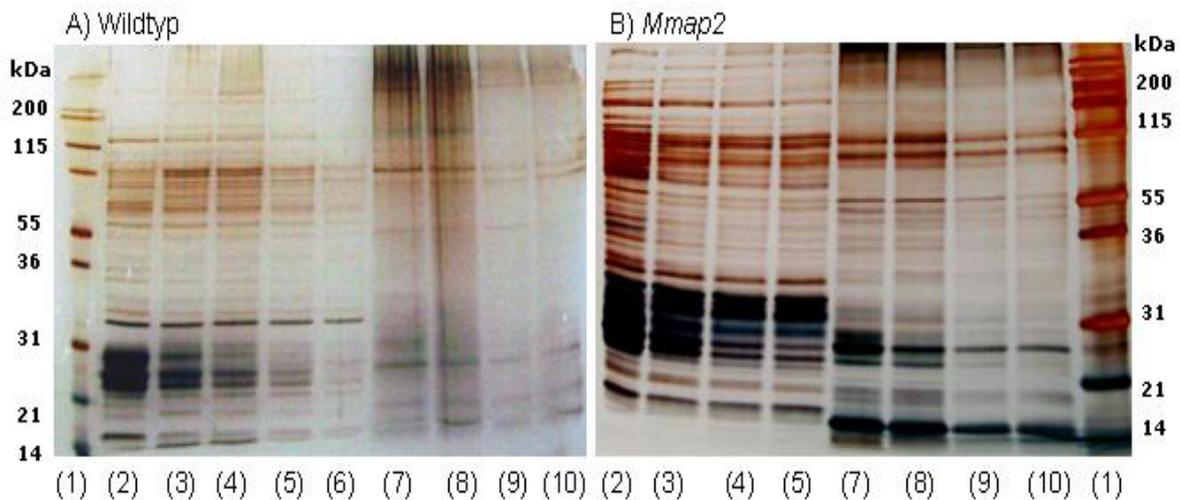


Abbildung 3.5: SDS-PAGE von löslicher und Pellet-Proteinfraktionen aus *Synechocystis*-Zellen während der Chlorose. In exponentiell wachsenden Wildtyp- (A) und *Mmap2*- (B) Zellen wurde Stickstoffmangel induziert (siehe Abschnitt 2.8.2.1) und nach angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellpellets in 150 μ l Zellaufbruchpuffer (siehe Abschnitt 2.12.1) lysiert und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (3.500 xg, 1 min, 4°C) entfernt. Eine folgende Proteinfraktionierung mittels einer Ultrazentrifugation (siehe Abschnitt 2.12.3) trennte die löslichen Bestandteile des Cytoplasmas von der Pellet-Fraktion. Die Proteinkonzentration der Probe vor Mangelinduktion wurde bestimmt und das Volumen, das 6 μ g Protein entspricht, wurde allen Proben entnommen, in SDS-Probenpuffer (siehe Abschnitt 2.6) denaturiert (100°C, 6 min) und über eine 15%ige SDS-PAGE aufgetrennt (2.16.2.1). Die Proteinbanden wurden anschließend mit einer Silberfärbung, wie in Abschnitt 2.12.7.2 beschrieben, sichtbar gemacht. Lösliche Proteinfraktionen von Zellen (2) in BG-11^N Medium, (3) nach 48 h, (4) nach 72 h, (5) nach 96 h (6) und nach 144 h Stickstoffmangel. Die Pellet-Fraktionen von Zellen (7) in BG-11^N Medium, (8) nach 48 h, (9) nach 96 h, (10) und nach 144 h Stickstoffmangel, (1) Proteinmarker SM0431 (siehe 2.1.2.1).

3.1.4 Regenerationsfähigkeit chlorotischer *Synechocystis*-Kulturen

Synechococcus elongatus PCC 7942 geht nach den Abbauprozessen der ersten und zweiten Phase der Chlorose in einen Ruhezustand über (> 15 Tage), in dem es monatelangen Nährstoffmangel überleben kann (Doktorarbeit Sauer, 2002). In chlorotischen Zellen bleibt Chlorophyll a (0,16%) vorhanden und ein Elektronenfluss (0,1%) durch beide Photosysteme ist messbar, der die Grundenergieversorgung der Zellen für wesentliche Proteinbiosynthesen und zur Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit während des Mangels gewährleistet. Um die Lebensfähigkeit der Zellen während der Chlorose zu untersuchen, wurde zunächst die Regenerationsfähigkeit der Wildtyp- und *Mmap2*-Zellen auf festem und in flüssigem Medium untersucht, sowie die Vitalität der Zellen mittels der Live/dead BacLightTM-Färbung mikroskopisch evaluiert.

3.1.4.1 Regenerationsexperimente auf festem BG-11^N Medium

Die Regeneration chlorotischer Zellen wurde ermittelt indem hungernde Zellen auf einer nitrathaltigen Agarplatte ausgestrichen, inkubiert (siehe 2.8.3) und die Lebend-Zellzahl, sowie die Dauer der Regeneration bestimmt wurden. Der 100% Wert stellt die Lebend-Zellzahl der auf Agarplatten gewachsenen Zellen vor der Induktion des Stickstoffmangels dar. Die *Synechocystis* sp. PCC 6803 Wildtyp-Zellen regenerierten zu 90% innerhalb von 48 Stunden Inkubation auf festem BG-11^N Medium nach 7, 13 und 35 Tagen des Stickstoffmangels (Abb. 3.6, A-C). Die *Mmap2*-Zellen regenerierten zu 60% innerhalb von 96 Stunden auf nitrathaltiger Agarplatte nach 7 Tagen Chlorose (Abb. 3.6 A). Nach 13 Tagen Chlorose nahm die Regenerationsfähigkeit der *Mmap2*-Zellen ab und es wuchsen nur noch 30% der Zellen (Abb. 3.6 B). Nach 35 Tagen Chlorose waren die *Mmap2*-Zellen nicht mehr fähig auf BG-11^N Medium anzuwachsen (Abb. 3.6 C).

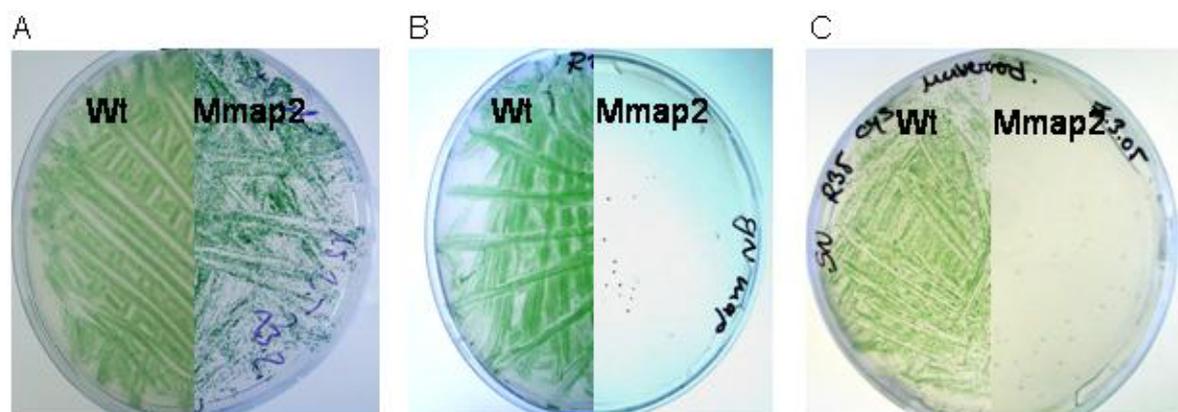


Abbildung 3.6: Koloniebildung der *Synechocystis* sp. PCC 6803 Kulturen auf festem BG-11^N Medium. Die chlorotischen Wildtyp- (linke Hälfte der BG-11^N Platte) und *Mmap2*- (rechte Hälfte) Kulturen (100 μ l) wurden nach (A) 7 Tagen, (B) nach 13 Tagen und (C) nach 35 Tagen Stickstoffmangel entnommen und auf eine BG-11^N Agarplatte ausplattiert. Die Platten wurden mit 20 μ mol Photonen $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ unter Standardbedingungen inkubiert und fotografiert.

3.1.4.2 Regenerationsexperimente in flüssigem BG-11^N Medium

Die Fähigkeit chlorotischer Kulturen zu regenerieren, wurde durch Messungen der PSII-Aktivität nach Zugabe von Nitrat überprüft. Dazu wurden 5 ml der Mangelkultur mit Natriumnitrat (17,6 mM NaNO_3) als Stickstoffquelle versehen und unter Standardbedingungen im Klimaschrank (siehe 2.8.1) schüttelnd inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten während der Regeneration wurde die *in vivo* PSII-Aktivität mit Hilfe des WATER-PAM Chlorophyll Fluorometers gemessen (siehe 2.15.5.2).

Die Zellen wurden auf gleiche OD₇₅₀ eingestellt und die maximale, sowie die variable Fluoreszenz (F_m , F_v) bei aktinischem Licht einer Photonenflussdichte von $1127 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gemessen und die maximale ETR berechnet (siehe Gleichung 2.15.5.2). In der Abbildung 3.7 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Wildtyp-Zellen, die sich 7 Tage im Stickstoffmangel befanden, regenerierten die PSII-Aktivität in der Gegenwart von Nitrat innerhalb 144 Stunden zu 100% (Abb. 3.7 A). Nach 13 und 35 Tagen der Chlorose konnte nur eine geringe Beeinträchtigung der Regenerationsfähigkeit der Wildtyp-Zellen beobachtet werden (Abb. 3.7 B, C). Hingegen zeigten die *Mmap2*-Zellen einen graduellen Verlust der PSII-Aktivität, denn nach 7 Tagen Chlorose konnten die *Mmap2*-Zellen die PSII-Aktivität innerhalb 144 Stunden nach der Stickstoffzugabe zu 100% regenerieren. Allerdings nach 13 Tagen der Chlorose konnte ein Anstieg von nur noch 40% des Ausgangswertes der maximalen Elektronentransportrate innerhalb 144 Stunden gemessen werden. Nach 35 Tagen der Chlorose waren die Zellen nicht mehr fähig ihre PSII-Aktivität *in vivo* zu regenerieren (Abb. 3.7 C).

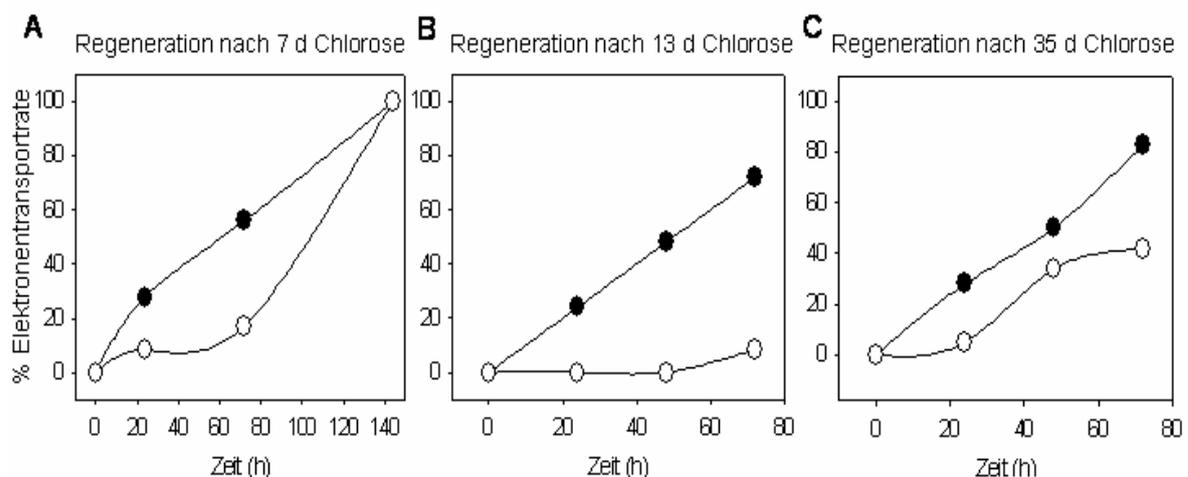


Abbildung 3.7: Regeneration der PSII-Aktivität in *Synechocystis*-Zellen während des Stickstoffmangels. Die Graphiken zeigen die maximale Elektronentransportrate in Prozent von Wildtyp- (geschlossene Kreise) und *Mmap2*- (offene Kreise) Zellen in dem Verlauf der Regeneration nach (A) 7 Tagen, (B) 13 Tagen und nach (C) 35 Tagen Stickstoffmangel. Die 100% Werte entsprechen dem Wert, der maximal erreicht wurde bei der Regeneration nach 7 Tagen der Chlorose. Die Werte sind repräsentativ für zwei Messungen, die unabhängig voneinander durchgeführt wurden und ähnliche Ergebnisse zeigten.

3.1.4.3 Mikroskopische Analyse chlorotischer Zellen (*Life/Dead Stain*)

Die Lebensfähigkeit der *Synechocystis*-Zellen während des Stickstoffmangels wurde durch die Mikroskopie unter der Verwendung der Live/dead BacLight™-Färbung untersucht. Diese Färbung lässt lebende Zellen grün und tote Zellen rot

erscheinen, da der rote Nukleinsäurefarbstoff nur in Zellen eindringen kann, deren Membran beschädigt ist. Die *Synechocystis*-Zellen wurden dem Stickstoffmangel ausgesetzt (siehe Abschnitt 2.8.2.1) und für 34 Tage im BG-11⁰ Medium unter Standardbedingungen im Klimaschrank inkubiert. Während des Mangels wurden Aliquots entnommen, gefärbt und mikroskopiert (siehe Abschnitt 2.16). Zum Vergleich wurden *Synechocystis*-Zellen untersucht, die in stickstoffreichem Medium kultiviert wurden. Vegetativ wachsende Cyanobakterien zeigen während der Bestrahlung mit UV-Licht eine rote Eigenfluoreszenz aufgrund der Phycobiliproteine und Chlorophylle. Im Verlauf der Chlorose verschwindet allerdings diese Eigenfluoreszenz aufgrund des Phycobiliprotein-Abbaus. Abbildung 3.8 2A zeigt Wildtyp- und *Mmap2*-Zellen und deren Eigenfluoreszenz nach Bestrahlung mit UV-Licht. Es waren keine signifikanten Unterschiede in Form und Größe zwischen den beiden Stämmen zu erkennen. Nach 12 Tagen Chlorose waren Wildtyp-, sowie *Mmap2*-Zellen lebensfähig, was anhand der grünen Fluoreszenz sichtbar ist (Abb. 3.8; B2). Nach 34 Tagen Chlorose weisen die *Mmap2*-Zellen rot-fluoreszierende Stellen auf, was darauf hindeutet, dass die Zellen in diesem Stadium der Chlorose an Lebensfähigkeit verlieren (Abb. 3.8; C2), während die Wildtyp-Zellen weiterhin grün fluoreszierten, was auf noch lebende Zellen hinwies (Abb. 3.8; C2).

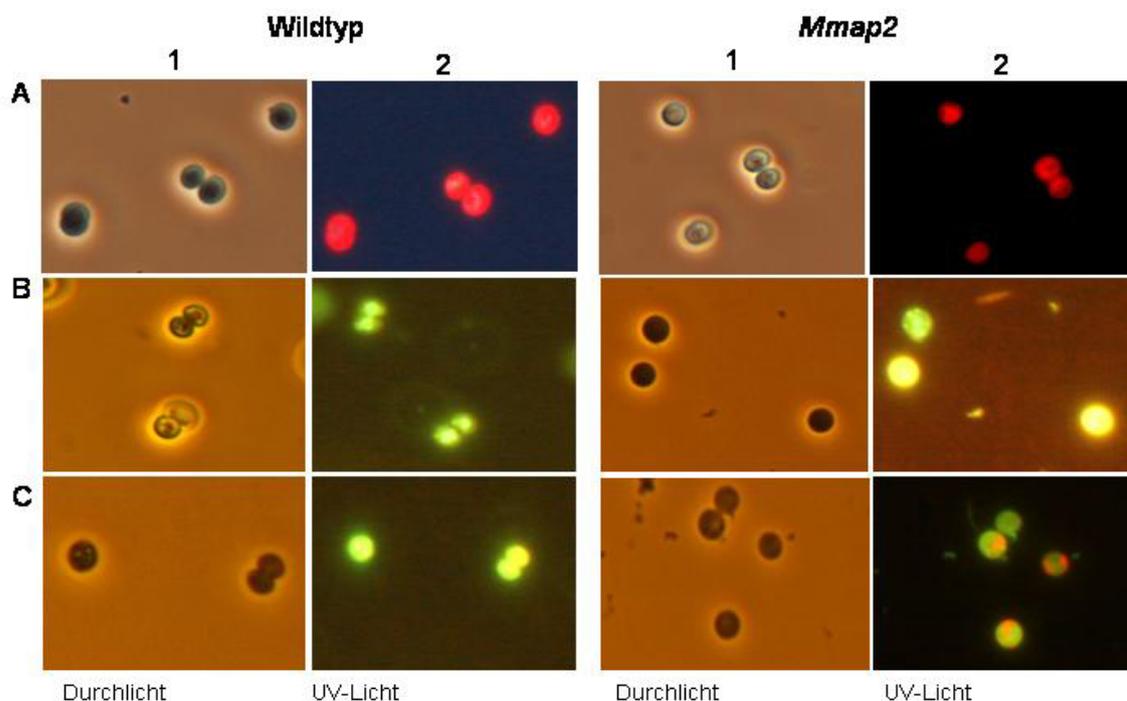


Abbildung 3.8: Mikroskopie der *Synechocystis*-Zellen nach Färbung mit Live/dead BacLight™. Die Zellen wurden (1) mit Durchlicht und (2) mit UV-Licht bestrahlt und mikroskopiert. (A) Zellen in BG-11^N Medium. (B) Gefärbte Zellen in BG-11⁰ Medium nach 12 Tagen Stickstoffmangel (C) in BG-11⁰ Medium nach 34 Tagen Stickstoffmangel.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Peptidase-Mutante *Mmap2* einen graduellen Verlust der Regenerationsfähigkeit während der Langzeit-Chlorose aufweist, da die Zellen nach 35 Tagen Chlorose nicht fähig waren die PSII-Aktivität zu regenerieren und die Lebensfähigkeit während des Mangels aufrecht zu erhalten. Der Verlust der Regenerationsfähigkeit der PSII-Aktivität korrelierte mit dem Absterben der Zellen (Abb. 3.6, 3.7, 3.8). Dies zeigt, dass MetAP2 essentiell für die Aufrechterhaltung der PSII-Aktivität und somit der Vitalität der Zellen unter Stickstoffmangel ist.

3.2 Charakterisierungen von *Synechocystis*-Zellen während der Hochlicht-Exposition

Die PSII-Aktivität der *Mmap2*-Zellen wurde unter Lichtstress (Hochlicht) analysiert. Unter verschiedenen Lichtbedingungen regulieren Cyanobakterien die Menge der photosynthetischen Pigmente, das der Minimierung der Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies unter Hochlicht dient, die Stöchiometrie der photochemischen Reaktionszentren und die Expression verschiedener Gene, um den photosynthetischen Elektronenfluss den Lichtbedingungen anzupassen (Anderson *et al.*, 1995; Sonoike *et al.*, 2001).

3.2.1 *In vivo* PSII-Analyse während der Hochlichtbestrahlung

Die PSII-Aktivität der *Synechocystis*-Zellen wurde mittels des WATER-PAM Chlorophyll Fluorometers während der Hochlichtbestrahlung gemessen. Dazu wurden die Chlorophyllfluoreszenzen mittels der saturierenden Pulsmethode bei einer Fluenzrate des aktinischen Lichtes von $55 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gemessen und zur Berechnung der maximalen ETR verwendet (siehe Gleichung 2.15.5.2). Abbildung 3.9 zeigt die maximale Elektronentransportrate in Prozent des PSII bei Hochlichtbestrahlung im Zeitverlauf. Die Wildtyp-Zellen konnten, als Anpassung an die Hochlichtbedingung die PSII-Aktivität stufenweise reduzieren. Innerhalb der ersten Stunde der Bestrahlung erfolgte eine Reduktion um 25% und innerhalb der nächsten 10 Stunden blieb diese Aktivität konstant. Nach 15 Stunden erfolgt eine Verminderung um weitere 35%, die innerhalb der nächsten 10 Stunden nochmals um 20% reduziert wurde, so dass eine Restaktivität des PSII von 20% erhalten

werden konnte. Die *Mmap2*-Zellen reduzierten die Aktivität anfangs nur um 10% und hielten diese konstant innerhalb der nächsten 10 Stunden der Exposition. Nach 15 Stunden nahm die Aktivität um weitere 60% ab und nach 24 Stunden konnte eine Restaktivität von 10% gemessen werden (Abb. 3.9). Zur Kontrolle wurden die Wildtyp- und *Mmap2*-Zellen mit Licht einer Fluenzrate von $40 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für 24 Stunden bestrahlt und zeigten dabei keine Reduktion der PSII-Aktivität (Daten nicht gezeigt).

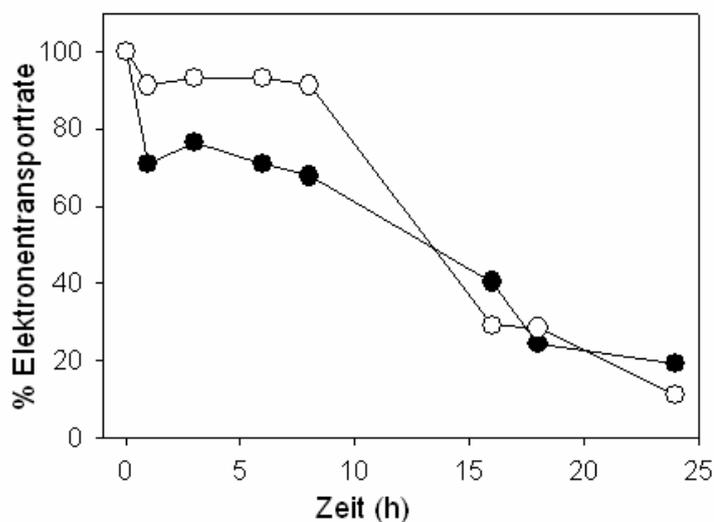


Abbildung 3.9: PSII-Aktivität während der Hochlichtbestrahlung. Exponentiell wachsende Wildtyp- (geschlossene Kreise) und *Mmap2*- (offene Kreise) Zellen mit einer OD_{750} von 0,4 wurden mit Hochlicht bestrahlt, wie unter 2.8.2.2 beschrieben. Die Graphik zeigt Mittelwerte aus zwei unterschiedlich durchgeführten Experimenten. Die Abweichung beträgt maximal 24%. Der 100% Wert entspricht dem ETR-Wert direkt vor der Bestrahlung

3.2.2 Spektroskopische Untersuchung des Pigmentabbaus

Um die Pigmentzusammensetzungen der *Mmap2*- und Wildtyp-Zellen während der Exposition von Hochlicht zu vergleichen, wurden die Absorptionsspektren von *Synechocystis* sp. PCC 6803 Wildtyp und *Mmap2* unter Standardbedingungen und nach 6- und 24-stündiger Bestrahlung mit Hochlicht erstellt. Die Spektren beider Stämme (Abb. 3.10) zeigten die typischen Absorptionsmaxima der Pigmente: Chlorophyll *a* bei 440 nm und 680 nm und ein Maximum bei 630 nm der akzessorischen Pigmente Phycocyanin und Allophycocyanin. Das Maximum bei 500 nm entspricht dem Maximum der Carotinoide.

Die Wildtyp-Zellen zeigten eine graduelle Abnahme der Chlorophyll *a*- und Phycobilisomen-Absorption im Verlauf der Hochlichtbestrahlung (siehe Abb. 3.10). In den Wildtyp-Zellen stieg auch die Menge der Carotinoide an (Abb. 3.10). Die *Mmap2*-Zellen zeigten eine schnellere Abnahme der Chlorophyll *a*- und Phycobilisomen-Absorption nach 6 Stunden der Bestrahlung als Wildtyp-Zellen.

Nach 24 Stunden der Bestrahlung konnte in *Mmap2*-Spektren eine Abflachung des Spektrums beobachtet werden, was auf ein Absterben der Zellen hindeuten könnte.

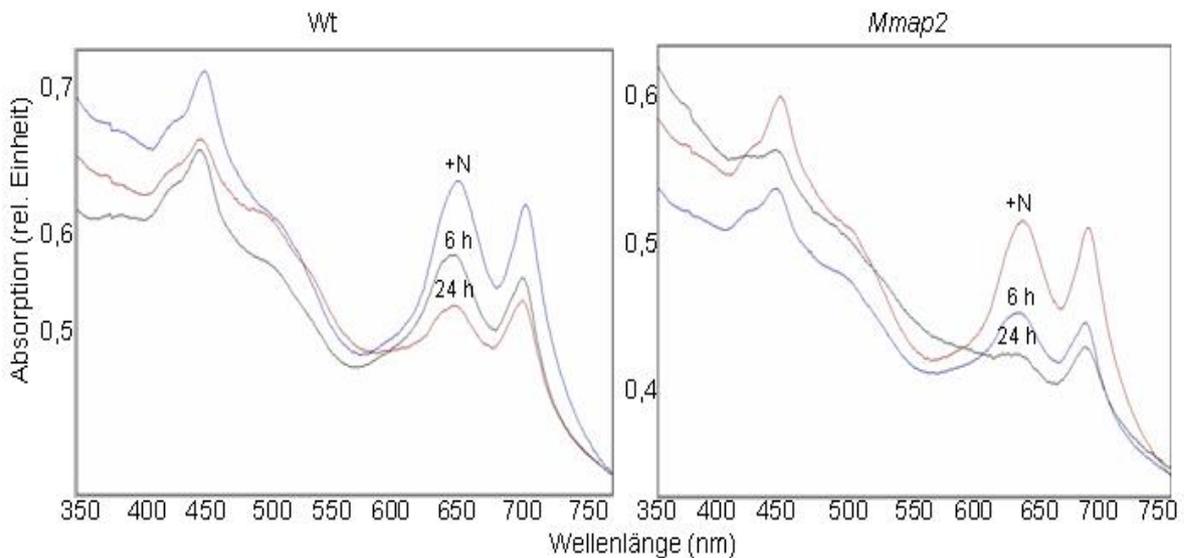


Abbildung 3.10: Absorptionsspektren von *Synechocystis*-Zellen vor und während der Bestrahlung mit Hochlicht. Von Wildtyp- (links) und *Mmap2*- (rechts) Zellen wurden zu angegebenen Zeitpunkten ein Ganz-Zell-Spektrum in einem Spektralphotometer erstellt (350 bis 750 nm) und wurden auf die Absorption bei 750 nm normiert. Die Spektren sind repräsentativ für mehrere Spektren, die unter gleichen Bedingungen erstellt wurden und ähnliche Ergebnisse zeigten.

3.2.3 Überlebensfähigkeit der *MetAP2*-defizienten-Zellen während der Hochlichtbestrahlung

Die Fähigkeit der Zellen eine Hochlicht-Exposition zu überleben, wurde untersucht, indem das Wachstum der Zellen auf festem BG-11^N Medium vor und während der Bestrahlung analysiert wurde. Vor der Bestrahlung mit Hochlicht waren beide Stämme in der Lage zu wachsen (siehe Abb. 3.11; 1). Ebenfalls zeigten Wildtyp-Zellen nach 24 Stunden Bestrahlung mit Hochlicht, sowie einer Bestrahlung mit Schwachlicht keine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit (Abb. 3.11; 1-4). In der *Mmap2*-Kultur nimmt im Laufe der Hochlichtbestrahlung die Fähigkeit zu überleben ab, denn nach 24 Stunden ist nur noch vereinzelt Wachstum sichtbar (Abb. 3.11; 3). Demgegenüber war das Wachstum der *Mmap2*-Zellen nach der Bestrahlung von 24 Stunden mit $40 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nicht beeinträchtigt (Abb. 3.11; 4). Das Absterben der *Mmap2*-Zellen korreliert mit der Reduktion der PSII-Aktivität in den *Mmap2*-Zellen (siehe Abb. 3.9), im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen.

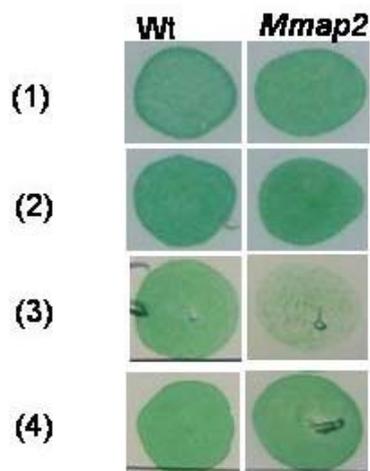


Abbildung 3.11: Überlebensfähigkeit der *Synechocystis*-Zellen während der Hochlicht-Exposition. Die Wildtyp- und *Mmap2*-Zellen (OD_{750} von 0,4) wurden (1) vor der Bestrahlung, (2) nach 6 h, (3) nach 24 h Hochlicht und (4) zur Kontrolle 24 h nach einer Bestrahlung mit Licht der Fluenzrate von $40 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf eine BG-11^N Agarplatte aufgetropft und unter Standardbedingungen ($20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 28°C) inkubiert. Die Auswertung erfolgte fotografisch nach einer Inkubation von fünf Tagen.

3.3 Phänotypische Charakterisierung von *Synechocystis*-Zellen unter stickstoffreichen, photoautotrophen Bedingungen

In den vorhergehenden Untersuchungen wurde festgestellt, dass die *Mmap2*-Zellen die PSII-Aktivität unter Stressbedingungen, wie Chlorose oder Hochlicht nicht aufrechterhalten können. Darüber hinaus sollte die Mutante *Mmap2* unter stickstoffreichen Standardbedingungen ($80 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 28°C , siehe Abschnitt 2.8.1) untersucht werden.

3.3.1 Analyse der Wachstumsrate

Abbildung 3.12 zeigt die Wachstumskurven von Wildtyp- und *Mmap2*-Zellen in Abhängigkeit der Zeit. Unter stickstoffreichen Bedingungen konnte im Vergleich zum Wildtyp keine veränderte Wachstumsrate der Mutante beobachtet werden. Die Verdopplungszeit beider Stämme betrug 20 Stunden.

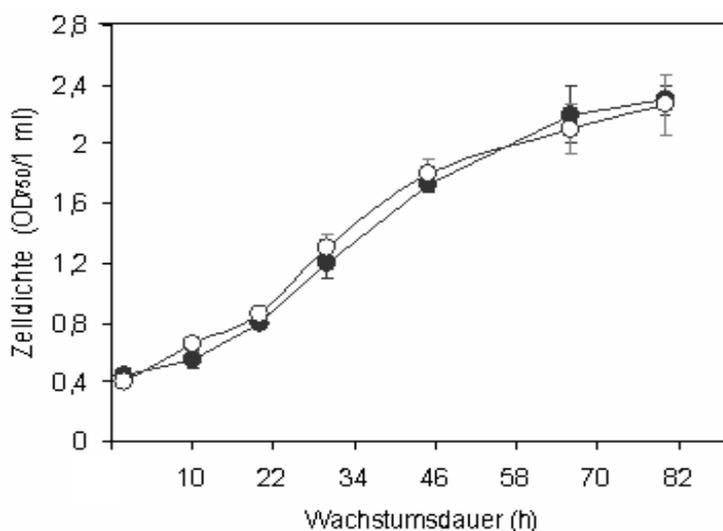


Abbildung 3.12: Wachstum der *Synechocystis*-Kulturen. Die Wildtyp- (geschlossene Kreise) und *Mmap2*- (offene Kreise) Kulturen wurden in BG-11^N Medium auf eine OD_{750} von 0,4 angezogen und unter Standardbedingungen kultiviert. Die OD_{750} wurde photometrisch ermittelt (siehe 2.8.6). Die Werte stellen Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten dar.

3.3.2 Spektroskopische Analyse der Pigmentzusammensetzung

Zunächst wurde die Pigment-Zusammensetzung durch das Erstellen eines Ganz-Zell-Absorptionsspektrums bei Raumtemperatur miteinander verglichen. Die Spektren beider Stämme (Abb. 3.13) zeigten die typischen Absorptionsmaxima der Pigmente Chlorophyll *a*, Phycobilisomen und Carotinoide. Die *Mmap2*-Zellen zeigten eine geringe Erhöhung der Chlorophyll *a*- und Carotinoid-Absorption. Deshalb wurde aus beiden Stämmen Chlorophyll *a* extrahiert und die Konzentration ermittelt (siehe Abschnitt 2.15.2). Die Messungen zeigten eine Chlorophyll *a*-Konzentration von 4,7 µg/ml Kultur für Wildtyp-Zellen und von 5,3 µg/ml Kultur für *Mmap2*-Zellen.

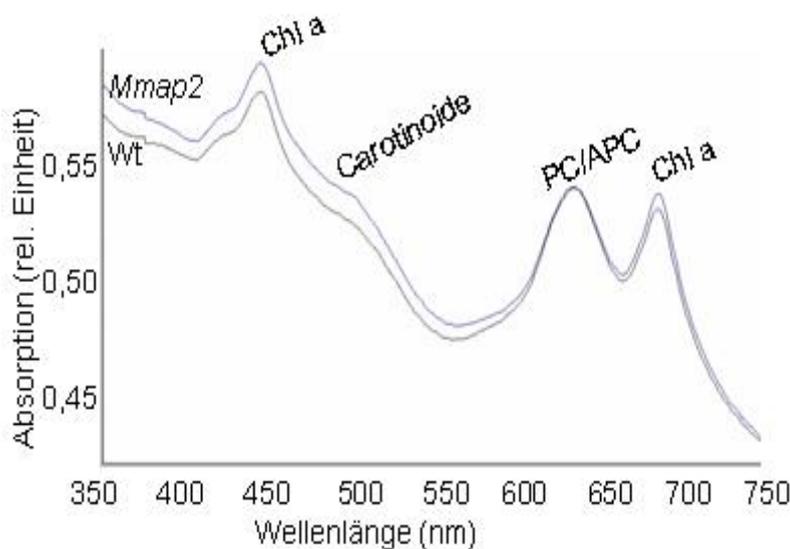


Abb. 3.13: Absorptionsspektren von *Synechocystis*-Zellen. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen in BG-11^N Medium im Klimaschrank kultiviert (siehe 2.8.1) und ein Ganz-Zell-Spektrum wurde erstellt (350 bis 750 nm). Die Spektren wurden auf die Absorption bei 750 nm normiert. Das Spektrum ist repräsentativ für mehrere Spektren, die unter gleichen Bedingungen erstellt wurden und ähnliche Ergebnisse zeigten.

Die Konzentration und die Zusammensetzung der Carotinoide in *Synechocystis*-Zellen wurden untersucht. Dies erfolgte mittels Hochflüssigkeitschromatographie (HPLC) in Zusammenarbeit mit dem Institut für Molekulare Biowissenschaften (Frankfurt) nach einer Methode, die in Steiger (1999) beschrieben wurde. Die Gesamtheit der Carotinoide bestehen in *Synechocystis* sp. PCC 6803 aus Myxoxanthophyll, Zeaxanthin, Dihydromyricetin (DHM), Echinenon und β -Carotin. Auffällig war der hohe Gesamtcarotinoidgehalt in den Zellen der Peptidase-Mutante von 3,52 mg/g Trockengewicht (TG). In den Wildtyp-Zellen wurde eine Konzentration von 1,98 mg/g TG des Gesamtcarotinoidgehalts bestimmt. Der Anteil des β -Carotins betrug in den Mutantenzellen 49,1% der Gesamtkonzentration, während in den Wildtyp-Zellen eine Konzentration von nur

37,3% vorlag. Zusätzlich konnte ein geringerer relativer Gehalt des Carotionids Myxoxanthophyll in der Mutante festgestellt werden, im Vergleich zum Wildtyp.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Carotinoide in Wildtyp- und *Mmap2*-Zellen in BG-11 Medium (in % bezüglich des Gesamtcarotinoidgehalts).

	<i>Myxo-xanthophyll</i>	<i>Zeaxanthin</i>	<i>DHM</i>	<i>Echinenon</i>	β - <i>Carotin</i>
Wildtyp	13,7	25,4	2,1	20,9	37,3
<i>Mmap2</i>	9,8	23,3	1,3	16,6	49,1

3.3.3 Messungen der photosynthetischen und respiratorischen Aktivität *in vivo*

Mit Sauerstoffmessungen in der Clark-Elektrode wurde untersucht, ob *Mmap2* eine veränderte respiratorische Aktivität oder photosynthetische Gesamtaktivität aufweist. Die Abbildung 3.14 zeigt die Sauerstoffproduktion unter Lichteinstrahlung und Dunkelatmung der Wildtyp- und *Mmap2*-Zellen. Die Peptidase-Mutante zeigte keinen Unterschied in der Sauerstoffproduktion im Vergleich zum Wildtyp. Die Gesamt-Photosyntheseaktivität wurde durch die Mutation nicht beeinträchtigt, denn der Elektronentransport auf den Endakzeptor erfolgte, welches in der Produktion von Sauerstoff sichtbar wurde. Die dunkeladaptierten Zellen beider Stämme zeigten eine Sauerstoffabnahme, die so genannte Dunkelatmung. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp festgestellt werden.

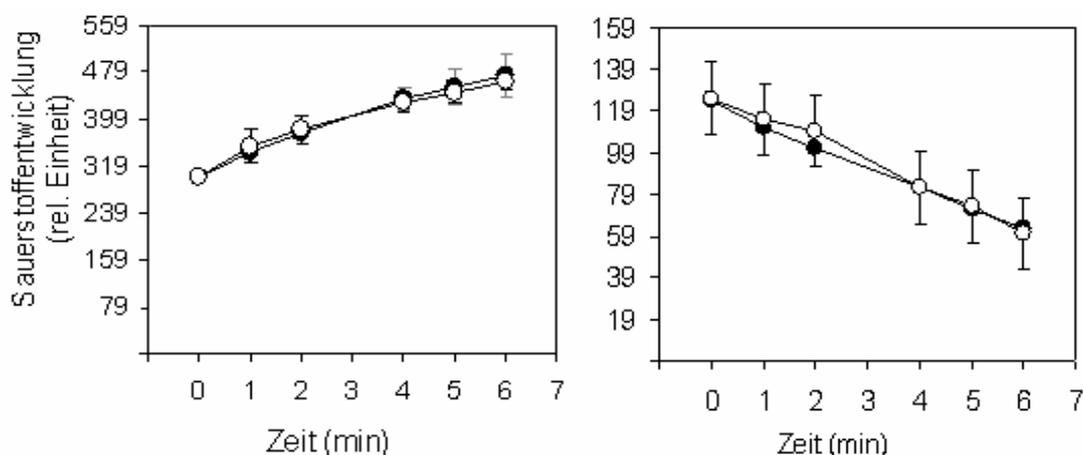


Abbildung 3.14: Sauerstoffmessungen der *Synechocystis*-Kulturen. Die Graphik zeigt die Sauerstoffproduktion der exponentiell wachsenden Wildtyp- (geschlossene Kreise) und *Mmap2*- (offene Kreise) Zellen (OD_{750} von 0,5) während der Bestrahlung mit Licht einer Photonenflussdichte von $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in Abhängigkeit der Zeit (siehe Abschnitt 2.15.6). Der Mittelwert aus drei Experimenten ist mit Standardabweichungen angegeben.

3.3.4 *In vivo* PSII-Aktivität unter Standardbedingungen

Da die PSII-Aktivität der *Mmap2*-Zellen unter Stressbedingungen beeinträchtigt ist, sollte diese unter Standardbedingungen ebenfalls analysiert werden. Die PSII-Aktivität der Wildtyp- und *Mmap2*-Zellen wurde mittels saturierender Pulsmethode in dem WATER-PAM Chlorophyll Fluorometer mit unterschiedlichen Fluenzraten des aktinischen Lichts (67, 856 und 1127 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) untersucht (siehe Abschnitt 2.15.5.2).

Abbildung 3.15 zeigt die Chlorophyllfluoreszenz-Messungen von *Synechocystis*-Zellen unter stickstoffreichen Standardbedingungen. Zunächst wurde mit Hilfe des Messlichtes eine Grundfluoreszenz (F_0) der Zellen auf 400-500 eingestellt und mit einem saturierenden Starklichtpuls die maximale Fluoreszenz (F_m) bestimmt. Anschließend wurde aktinisches Licht eingeschaltet, wodurch die Grundfluoreszenz anstieg. Durch die Gabe weiterer Starklichtpulse (Peak) konnte die variable Fluoreszenz (F_v) bestimmt werden. Der Fluoreszenzanstieg beim Anschalten des aktinischen Lichtes spiegelt die Reduktion der PSII-Akzeptorstellen durch die Elektronen aus der Wasserspaltung wieder. Bei der Gabe eines saturierenden Lichtpulses befinden sich die reduzierten Chinone an der Akzeptorstelle des PSII und kein weiterer Elektronentransport ist mehr möglich. Dadurch wird die gesamte Energie als Fluoreszenz abgegeben und ist im Fluorometer messbar.

Die Chlorophyllmessungen bei aktinischem Licht der Fluenzrate von 67 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ war in beiden Kulturen ähnlich (Abb. 3.15 A und B). Durch die Bestrahlung der Zellen mit einer Fluenzrate von 1127 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ des aktinischen Lichts konnte in der Peptidase-Mutante (Abb. 3.15 B) im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.15 A) ein geringerer Anstieg der Grundfluoreszenz beobachtet werden. Bei hohem aktinischem Licht war im Wildtyp kaum mehr eine variable Fluoreszenz nach der Gabe von Starklichtpulsen zu beobachten, d.h. es wurde bereits nahezu F_m erreicht (Abb. 3.15 A, Pfeile), weil eine Sättigung des PSII stattgefunden hatte. Die *Mmap2*-Zellen zeigten nach einem Starklichtpuls jedoch keinen maximalen Anstieg der Fluoreszenz bei gleicher Fluenzrate und es konnte noch deutliche variable Fluoreszenz gemessen werden (Abb. 3.15 B;

Pfeile). Folglich zeigt die Mutante ein effektiveres Fluoreszenz-Quenching als der Wildtyp.

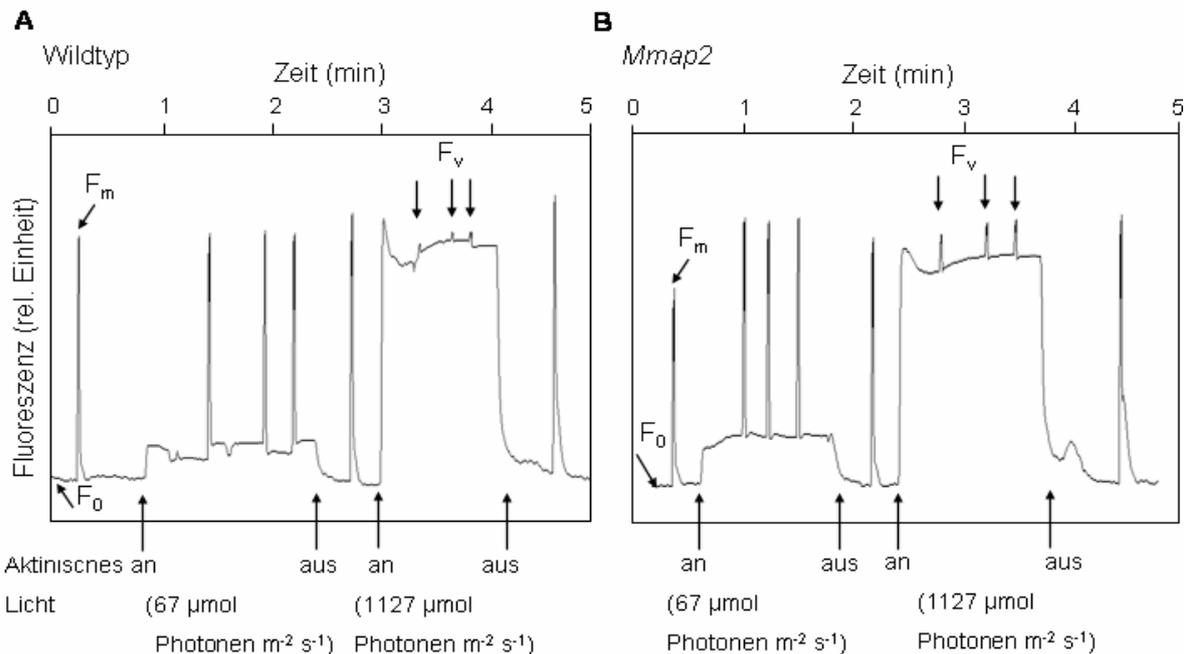


Abbildung 3.15: Chlorophyllfluoreszenz-Messungen unter stickstoffreichen Standardbedingungen. Die *Synechocystis*-Zellen wurden bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD_{750} von 0,6-0,8) unter Standardbedingungen im Klimaschrank angezogen. Die Fluoreszenzmessungen wurden im WATER-PAM Chlorophyll Fluorometer durchgeführt und erfolgte bei angegebenen Fluenzraten des aktinischen Lichtes. Die Abbildung zeigt die Messungen der Chlorophyllfluoreszenzen (F_0 , F_m , F_v) von dunkeladaptierten (A) *Synechocystis* sp. PCC 6803 Wildtyp-Zellen und (B) *Synechocystis* sp. PCC 6803 *Mmap2*-Zellen in Abhängigkeit der Zeit.

Die Differenz zwischen Wildtyp und Mutante kann auf einer veränderten Verfügbarkeit der Elektronenakzeptoren in der Mutante basieren. Um zwischen metabolischen Effekten (z.B. Redoxstatus des Plastochinonpools) und direkten Effekten am PSII zu unterscheiden, wurde eine Messung in Gegenwart von 1,4-Benzochinon und Kaliumferricyanid als künstliche Elektronenakzeptoren des PSII durchgeführt, wodurch die PSII-Reaktion physiologisch entkoppelt ist (Hill-Reaktion). In den Chlorophyllfluoreszenz-Messungen in der Gegenwart von 1,4-Benzochinon/Kaliumferricyanid konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp- und *Mmap2*-Zellen bei einer Fluenzrate des aktinischen Lichts von $67 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ festgestellt werden (Abb. 3.16, A, B). Allerdings konnte bei einer erhöhten Fluenzrate des aktinischen Lichts ($1127 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ein deutlich verstärkter Anstieg der Fluoreszenz in der Peptidase-Mutante beobachtet werden, der den Wert der initialen, maximalen Fluoreszenz (F_m) der dunkeladaptierten Zellen übersteigt (Abb. 3.16 B). Es konnte nach der Gabe von saturierenden Lichtpulsen aufgrund der maximal ansteigenden Grundfluoreszenz keine variable

Fluoreszenz (F_v) beobachtet werden (Abb. 3.16 B, Pfeile), aufgrund einer kompletten Stilllegung der Akzeptorstellen. Das 1,4-Benzochinon scheint ein ungeeigneter Elektronenakzeptor in dem PSII der Mutante zu sein. Dieses lässt auf eine veränderte Bindung des 1,4-Benzochinons in der Q_B -Bindenische der Mutante schließen und gibt somit einen Hinweis auf eine Beeinträchtigung der Akzeptorseite des PSII in der Mutante.

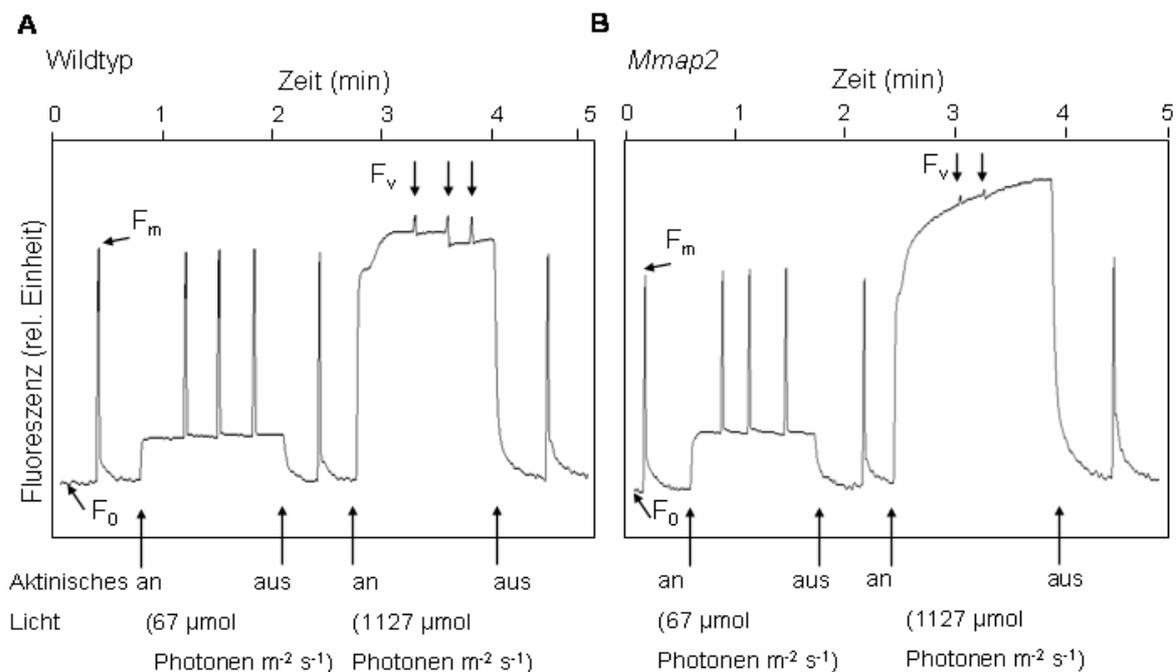


Abbildung 3.16: Chlorophyllfluoreszenz-Messungen in der Gegenwart von 1,4-Benzochinon und Kaliumferricyanid. Die *Synechocystis*-Zellen wurden bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD_{750} von 0,6-0,8) unter Standardbedingungen im Klimaschrank inkubiert. Die Fluoreszenzmessungen wurden von dunkeladaptierten Wildtyp- (A) und *Mmap2*- (B) Zellen in Abhängigkeit der Zeit im PAM Chlorophyll Fluorometer durchgeführt und erfolgten bei Fluenzraten des aktinischen Lichtes wie angegeben. Direkt vor der Messung wurden 1 mM 1,4-Benzochinon und 1 mM Kaliumferricyanid zugegeben.

Zusätzlich wurde die Sauerstoffentwicklung in Gegenwart von 1,4-Benzochinon und Kaliumferricyanid in der Clark-Elektrode gemessen, wie unter 2.15.6 beschrieben, das Ergebnis ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Die Sauerstoffproduktion in den *Mmap2*-Zellen war nach der Zugabe von 1,4-Benzochinon und Kaliumferricyanid um 20% reduziert, was die gemessene Inhibition des Elektronentransports in dem WATER-PAM Chlorophyll Fluorometer bestätigte (Vergleich siehe Abb. 3.16 und 3.17). Die Sauerstoffproduktion der Wildtyp-Zellen wurde unter diesen Bedingungen nicht beeinträchtigt (Abb. 3.17).

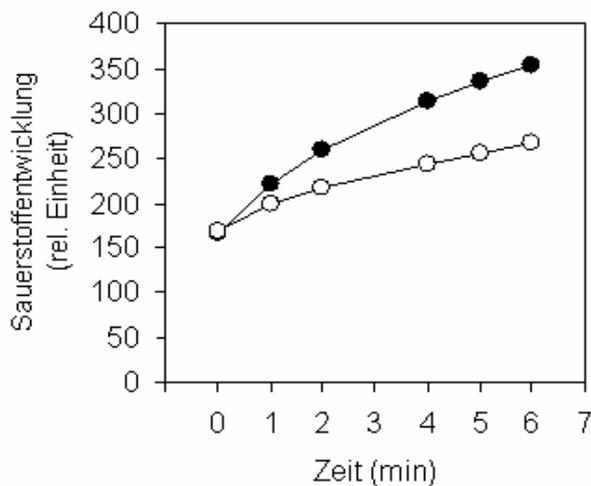


Abbildung 3.17: Sauerstoffmessungen an der Clark-Elektrode. *Synechocystis*-Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und für die Messungen auf eine OD_{750} von 0,5 verdünnt. Die Graphik zeigt die Sauerstoffproduktion der Wildtyp- (geschlossene Kreise) und *Mmap2*- (offene Kreise) Zellen während der Bestrahlung mit Licht einer Fluenzrate von $1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-2}$ in Abhängigkeit der Zeit und nach der Zugabe von 1 mM 1,4-Benzochinon und 1 mM Kaliumferricyanid. Der Mittelwert aus 3 Experimenten ist angegeben. Die Standardabweichungen sind unter 1%.

Zur genaueren Analyse der Q_B -Bindenische im PSII der Mutante sollte die Chlorophyllfluoreszenz-Messung in Anwesenheit des Photosynthese-Inhibitors 3,3,4-Dichloro-phenyl)-1,1-Dimethyl-urea (DCMU) durchgeführt werden, denn DCMU bindet nicht-kovalent in der Plastochinon-Bindenische (Q_B), die von den D1- und akzessorischen Proteinen in *Synechocystis* sp. PCC 6803 gebildet wird (Kern *et al.*, 2005). Durch die Bindung verdrängt DCMU die nativen Plastochinone aufgrund einer höheren Affinität zur Bindenische (Oettmeier, 1999). Ist die Q_B -Bindenische besetzt, kommt der Elektronentransfer im Reaktionszentrum des PSII zum Stillstand, denn das Herbizid kann nicht als Elektronen-Akzeptor fungieren (Rutherford und Krieger-Liszky, 2001). Narusaka und Mitarbeiter haben gezeigt, dass Herbizid-resistente Mutanten in *Synechocystis* sp. PCC 6803 einen Aminosäureaustausch in dem D1-Protein in der Region aufweisen, die als Herbizid-Bindestelle diskutiert wird (Narusaka *et al.*, 1987).

Die Sensitivität gegenüber dem Herbizid DCMU wurde in dem WATER-PAM Chlorophyll Fluorometer mittels der saturierenden Pulsmethode (siehe Abschnitt 2.15.5.2) nach der Zugabe verschiedener Konzentrationen ($0,01 \mu\text{mol}$ - $10 \mu\text{mol}$) untersucht. Die Abbildung 3.18 stellt die Chlorophyllfluoreszenz-Messungen der *Synechocystis*-Zellen in der Gegenwart von $0,01 \mu\text{mol}$ DCMU dar. In den Wildtyp-Zellen war eine starke Grundfluoreszenz nach Einschalten des aktinischen Lichtes (67 und $856 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) als Reaktion auf die DCMU-Zugabe zu beobachten. Nach Bestrahlung der *Mmap2*-Zellen mit Licht der Fluenzrate von 67 und $856 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ist eine niedrige Grundfluoreszenz zu sehen und unter beiden Lichtbedingungen konnte eine hohe variable Fluoreszenz gemessen werden (Abb. 3.18 B; Pfeile). Dies zeigt, dass die PSII-Akzeptorstellen nicht

effizient durch DCMU blockiert werden. Im Gegensatz dazu wurde in den Wildtyp-Zellen eine geringere variable Fluoreszenz beobachtet, was aufgrund einer partiellen Blockierung durch DCMU eine Sättigung des PSII zeigt (Abb. 3.18 A).

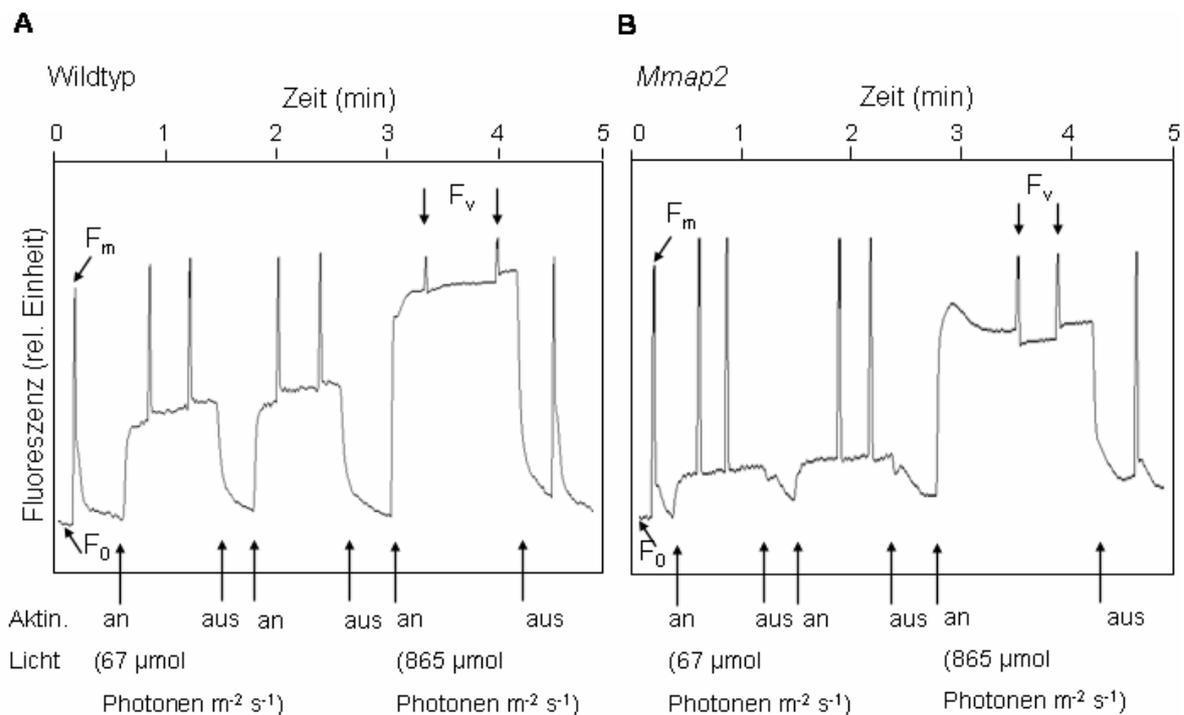


Abbildung 3.18: Chlorophyllfluoreszenz-Messungen nach der Zugabe von 0,01 μmol DCMU. Die *Synechocystis*-Zellen wurden bis zur mittleren exponentiellen Phase (OD_{750} von 0,6-0,8) unter Standardbedingungen angezogen. Direkt vor der Messung wurde 0,01 μmol DCMU zugegeben. Die Abbildung zeigt die Messungen der Chlorophyllfluoreszenz (F_0 , F_m , F_v) von dunkeladaptierten (A) *Synechocystis* sp. PCC 6803 Wildtyp-Zellen und (B) *Synechocystis* sp. PCC 6803 *Mmap2*-Zellen in Abhängigkeit der Zeit.

Durch die Zugabe von 10 μmol DCMU wurde in beiden Stämmen bei einer Fluenzrate von 856 μmol Photonen $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ der Elektronentransport durch das PSII vollständig gehemmt (Daten nicht gezeigt). Die geringere Sensitivität gegenüber dem Photosynthese-Inhibitor DCMU ist ein weiterer Beleg für eine veränderte Akzeptorseite im Bereich der Q_B -Bindenische im PSII der Mutante.

3.3.5 DCMU-Toleranz

In einem Wachstums-Experiment sollte die gesteigerte Toleranz der *Mmap2*-Zellen gegenüber dem Herbizid DCMU überprüft werden. Abbildung 3.19 zeigt das Wachstum der *Synechocystis*-Zellen in Gegenwart und Abwesenheit von DCMU. *Mmap2* wuchs sowohl mit 0,1 μmol als auch mit 1 μmol DCMU im Medium. Hingegen war das Wachstum der Wildtyp-Zellen bereits mit 0,1 μmol DCMU vermindert. Deutliche Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Mutante

zeigten sich mit 1 μmol DCMU im Medium, denn der Wildtyp konnte unter diesen Bedingungen nicht wachsen (Abb. 3.19). Die Zugabe von 10 μmol DCMU hemmte das Wachstum der Wildtyp- und *Mmap2*-Zellen vollständig (Daten nicht gezeigt). Das Experiment zeigt, dass die Peptidase-Mutante eine höhere Toleranz gegenüber dem Photosynthese-Inhibitor DCMU aufweist.

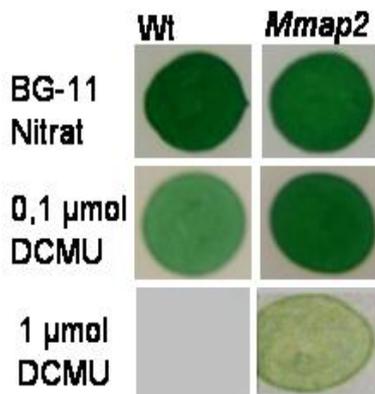


Abbildung 3.19: Wachstum der *Synechocystis*-Zellen in Gegenwart von DCMU. Die Abbildung zeigt Ausschnitte einer BG-11^N Agarplatte mit *Synechocystis* Wildtyp- und *Mmap2*-Zellen in Gegenwart von angegebenen DCMU-Konzentrationen. Die Zellen (20 μl ; OD₇₅₀ von 0,5) wurden auf den Platten für 24 h vorinkubiert. Die angegebene DCMU-Konzentration (in 1ml BG-11^N) wurde unter den Agar gegeben. Die Platten wurden für weitere sieben Tage unter Standardbedingungen (siehe 2.8.3) inkubiert und zur Auswertung fotografiert.

Zusammenfassend demonstrierten diese Daten eine veränderte Q_B-Bindenische, denn 1,4-Benzochinon bindet fest und effizient (Abb. 3.16), während DCMU weniger effizient in der Mutante als in Wildtypzellen bindet (Abb. 3.18 und 3.19). Da das D1-Protein an der Bildung der Q_B-Bindenische an der Akzeptorseite des PSII maßgeblich beteiligt ist (Übersichtsartikel: Barber *et al.*, 2006), wäre ein Defekt oder eine fehlerhafte Assemblierung des D1-Proteins im PSII der Peptidase-Mutante denkbar.

In *Synechocystis* sp. PCC 6803 sind zwei weitere Proteine PsbX und PsbK an der Bildung der Plastochinon-Bindenische, sowie an der Bindung der Plastochinone beteiligt (Zheleva *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2004).

Um den Einfluss der MetAP2 auf diese Proteine zu untersuchen, wurde die Expression der Gene *psbX* und *psbK* mittels semi-quantitativer RT-PCR in Wildtyp- und *Mmap2*-Zellen analysiert, wie in Abschnitt 2.10.11.2 beschrieben.

Es wurde kein Unterschied zwischen der Expression der Gene in den Wildtyp-Zellen zu der Expression in den *Mmap2*-Zellen festgestellt (Abb. 3.19 A). Somit wurde gezeigt, dass MetAP2 keinen Einfluss auf die Transkription dieser PSII-Untereinheiten hat. Eine mögliche Beteiligung der Proteine an dem *map2*-Phänotyp müsste somit post-transkriptionell erfolgen.

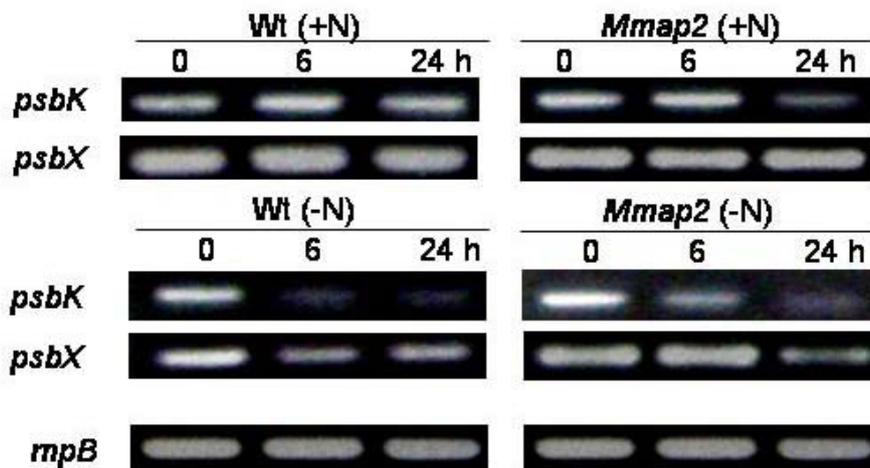


Abbildung 3.19 A: Expressionsanalyse der *psbX*- und *psbK*-Gene. *Synechocystis*-Zellen wurden unter Standardbedingungen (+N) oder im stickstofffreien Medium (-N) inkubiert (siehe 2.8.1). Zu den Zeitpunkten 0, 6 und 24 h wurde RNA isoliert und eine semi-quantitative RT-PCR durchgeführt. Die Expression des konstitutiv exprimierten Gens *rnpB* (RNaseP-Untereinheit aus *Synechocystis* sp. PCC 6803) diente hier der Kontrolle der eingesetzten RNA-Quantität.

3.4 Spektroskopische Analyse des PSII der *MetAP2*-defizienten *Synechocystis*-Zellen

3.4.1 Tieftemperatur-Pigment-Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie

Die Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie diente hier der Charakterisierung der Bestandteile der photosynthetischen Komplexe in *Synechocystis* sp. PCC 6803 unter verschiedenen Bedingungen (Stickstoffmangel, Hochlicht, stickstoffreichen Standardbedingungen). Durch die Fluoreszenzmessungen bei Tieftemperaturen (77K) gelingt es einzelne Komplexe in der Absorption sichtbar zu machen, da die störenden Nebenanregungen (Rotationsanregung, Vibrationsanregung) bei Tieftemperaturen gering sind.

3.4.1.1 77K Pigment-Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie von *Synechocystis*-Zellen unter Standardbedingungen

Die Abbildung 3.20 zeigt das Fluoreszenz-Emissionsspektrum der Chlorophylle nach der Anregung mit 435 nm von Wildtyp- und *Mmap2*-Zellen unter stickstoffreichen Bedingungen. Das 77K Fluoreszenz-Emissionsspektrum zeigt drei charakteristische Fluoreszenz-Maxima. Das Maximum bei 685 nm entspricht dem der inneren PSII-Antenne CP43 (PsbC) und das Fluoreszenz-Maximum bei

695 nm entspricht der Fluoreszenz der inneren PSII-Antenne CP47 (PsbB). Bei einer Wellenlänge von 725 nm emittiert das PSI (Mullineaux und Allen, 1990).

In dem Spektrum der *Mmap2*-Zellen wurde eine deutlich reduzierte Chlorophyllemission bei 695 nm gemessen (siehe Abb. 3.20, Ausschnitt). Dies zeigt eine reduzierte Menge des Proteins CP47 (PsbB) in dem PSII der Mutante. Zudem konnte eine geringere Fluoreszenz bei 725 nm (PSI) festgestellt werden.

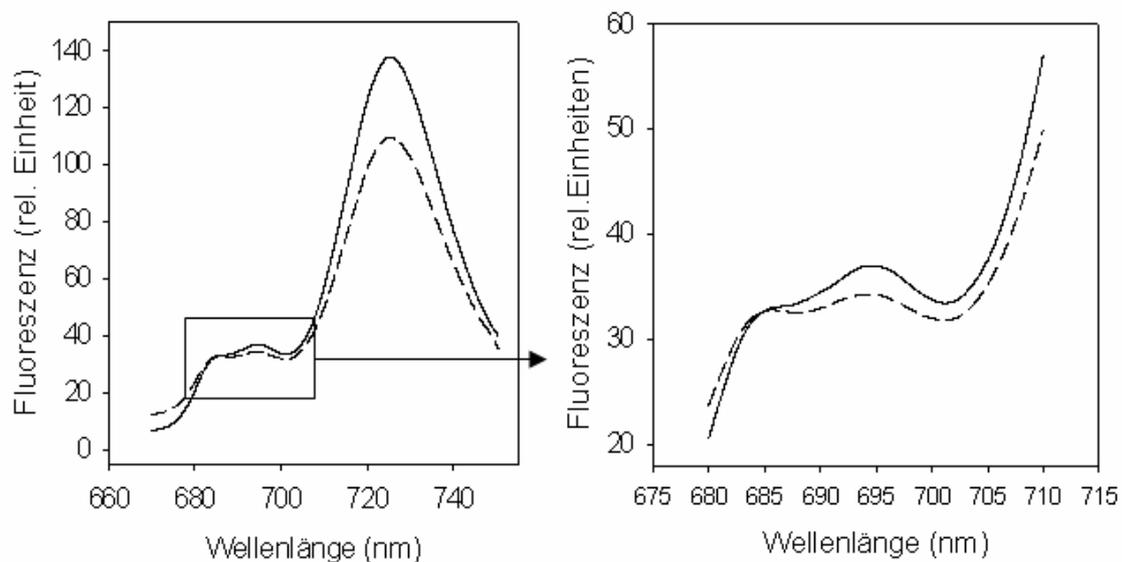


Abbildung 3.20: Analyse der 77K Pigment-Fluoreszenz von *Synechocystis* sp. PCC 6803 Zellen unter stickstoffreichen Bedingungen. In exponentiell wachsenden Wildtyp- (durchgezogene Linie) und *Mmap2*- (gestrichelte Linie) Kulturen wurden für die Messungen eine Konzentration von 10 µg/ml Chlorophyll *a* eingestellt und ein Emissions-Spektrum angefertigt. Die Spektren wurden auf 685 nm normiert. Die Abbildung (rechts) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Bereichs 675-715 nm der 77K-Fluoreszenz-Spektroskopie. Die Spektren sind Mittelwerte aus jeweils 2 Spektren, die in unterschiedlichen Experimenten erstellt wurden mit einer Standardabweichung von unter 5%.

3.4.1.2 77K Pigment-Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie von *Synechocystis*-Zellen nach der Hochlicht-Exposition

Die Abbildung 3.21 A zeigt das Spektrum der Chlorophyllemission nach der Anregung mit 435 nm von Wildtyp- und *Mmap2*-Zellen nach einer 18-stündigen Hochlichtbestrahlung. Es ist ebenfalls eine Abnahme der CP47-Fluoreszenz zu erkennen, die ausgeprägter ist als unter Standardbedingungen (Abb. 3.20). Zudem konnte, im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 3.20), eine Abnahme der Chlorophyllfluoreszenz bei 725 nm (PSI) im Wildtyp um 14% und in der Mutante um 18% als Reaktion auf die Hochlichtbestrahlung beobachtet werden. Das Spektrum der Wildtyp-Zellen (Abb. 3.21 B) zeigte eine um 38% gesteigerte Phycobilisomen-Fluoreszenz (bei 660 nm) nach der Hochlichtbestrahlung, die auf

eine Ablösung der Phycobilisomen von den Reaktionszentren hindeuten könnte. Die *Mmap2*-Zellen hingegen zeigten eine geringere Fluoreszenz. Dies könnte auf die fehlende Anpassung der Peptidase-Mutante an die Hochlichtbedingungen zurückzuführen sein.

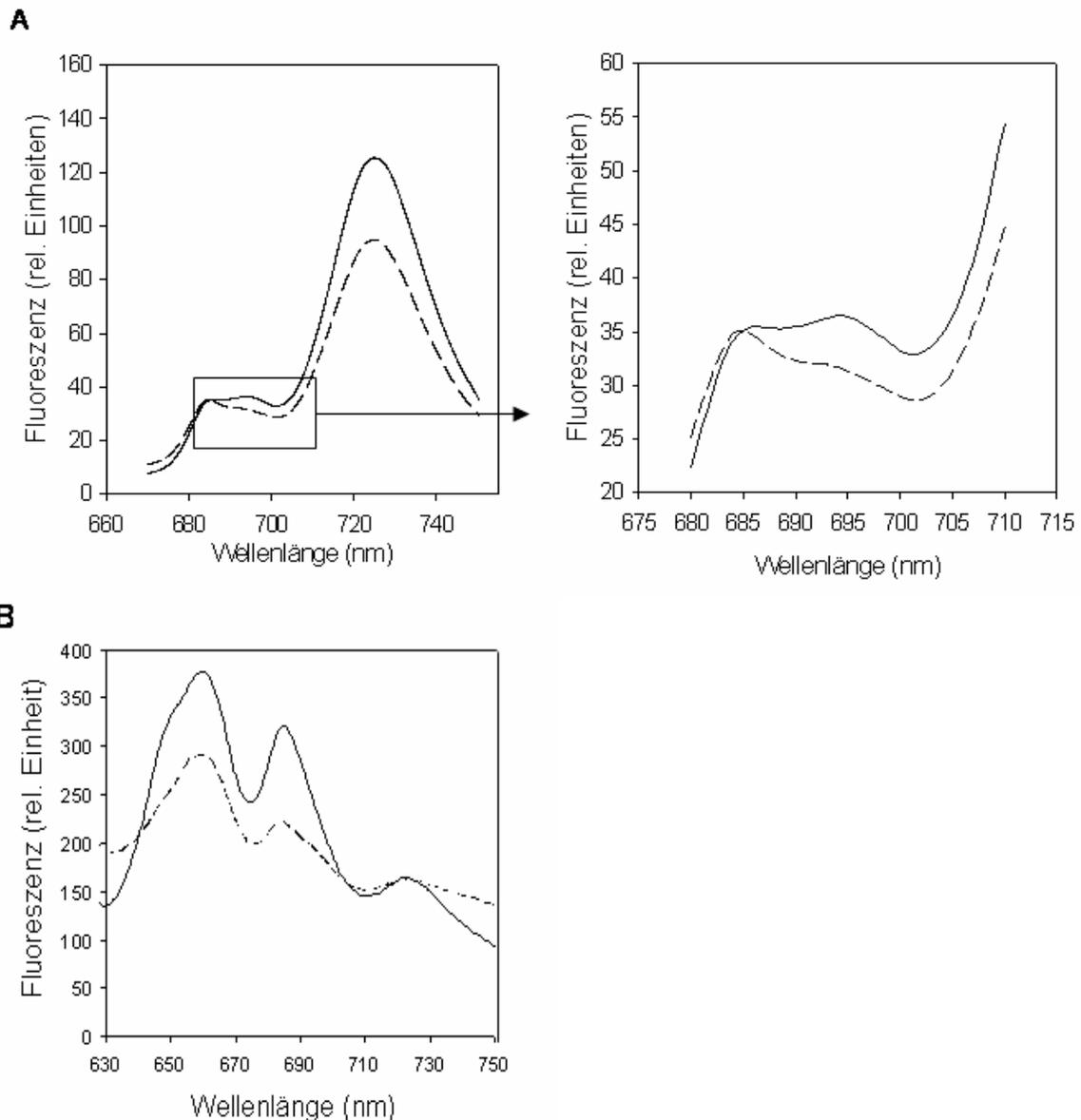


Abbildung 3.21: Analyse der 77K Pigment-Fluoreszenz-Emission von *Synechocystis* sp. PCC 6803 Zellen nach der Hochlichtbestrahlung. Die Abbildung zeigt die Fluoreszenz-Emission der Wildtyp- (durchgezogene Linie) und *Mmap2*- (gestrichelte Linie) Zellen in BG-11^N Medium nach 18 h Hochlichtbestrahlung. (A) zeigt die Chlorophyll *a*-Fluoreszenz nach Anregung mit Licht von 435 nm. Die Spektren wurden auf 685 nm normiert. Die Abbildung (rechts) zeigt einen Ausschnitt des Bereichs 675-715 nm der 77K-Fluoreszenz-Spektroskopie (A). Die Abbildung (B) zeigt die Phycocyanobilin-Fluoreszenz nach Anregung mit Licht von 600 nm und wurde auf 725 nm normiert. Die Spektren sind Mittelwerte aus jeweils 2 Spektren, die in unterschiedlichen Experimenten erstellt wurden mit einer Standardabweichung von unter 5%.

Die Stöchiometrie des PSI und PSII lässt sich anhand des Verhältnisses der Emissionen bei 695 nm (PSII) und 725 nm (PSI) berechnen (F_{695}/F_{725}). Die Ratio ist unter Hochlichtbedingungen erhöht, auf Grund der Abnahme des PSI (Fujimori

et al., 2005). Das Verhältnis PSII/PSI war in beiden Stämmen unter Standardbedingungen ($60 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ähnlich und war wie erwartet, in beiden *Synechocystis*-Stämmen unter Hochlichtbedingungen leicht erhöht (Daten nicht gezeigt).

3.4.1.3 77K Pigment-Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie von *Synechocystis*-Zellen unter Stickstoffmangel

Die Abbildung 3.22 A (1,2) zeigt Fluoreszenz-Emissionsspektren mit der Anregungsenergie des Lichts der Wellenlänge von 435 nm von Wildtyp- und *Mmap2*-Zellen (1) nach 8 und (2) nach 15 Tagen der Chlorose. Es konnte die Abnahme der Chlorophyllfluoreszenz im Bereich der Wellenlängen 680-695 nm in Wildtyp- und *Mmap2*-Zellen im Verlauf der Chlorose festgestellt werden (Abb. 3.22 A), das einer Reduktion des PSII-Komplexes und der Chlorophylle im Reaktionszentrum entspricht (Mullineaux und Allen, 1990). Im Vergleich mit den Messungen unter Standardbedingungen (Abb. 3.20) wurde in beiden Stämmen eine Abnahme der Fluoreszenz um 25% nach 8 Tagen (Abb. 3.22, A1) und um weitere 50% nach 15 Tagen Stickstoffmangel gemessen (Abb. 3.22, A2). Die Chlorophyllfluoreszenz des PSI (725 nm) nahm in den Wildtyp-Zellen um 14% ab, während diese in *Mmap2*-Zellen während der Chlorose unverändert blieb (Abb. 3.22 A).

Die Anregung mit Licht der Wellenlänge von 600 nm ergibt ein Spektrum mit drei Absorptionsmaxima der Komponenten der photosynthetischen Elektronentransportkette. Die Zellen der Peptidase-Mutante zeigten eine dem Wildtyp ähnliche Phycobilisomen-Fluoreszenz (Abb. 3.22 B). Diese zeigte eine generelle Abnahme der Komponenten der Elektronentransportkette im Verlauf der Chlorose, das auf eine verringerte photosynthetische Aktivität während des Stickstoffmangels hinweist (Abb. 3.22 B). Die Abnahme der Absorptionsmaxima bestätigte, dass die photosynthetische Aktivität während der Chlorose durch den Abbau der Photosysteme und der Reduktion der Elektronentransportkette minimiert wird.

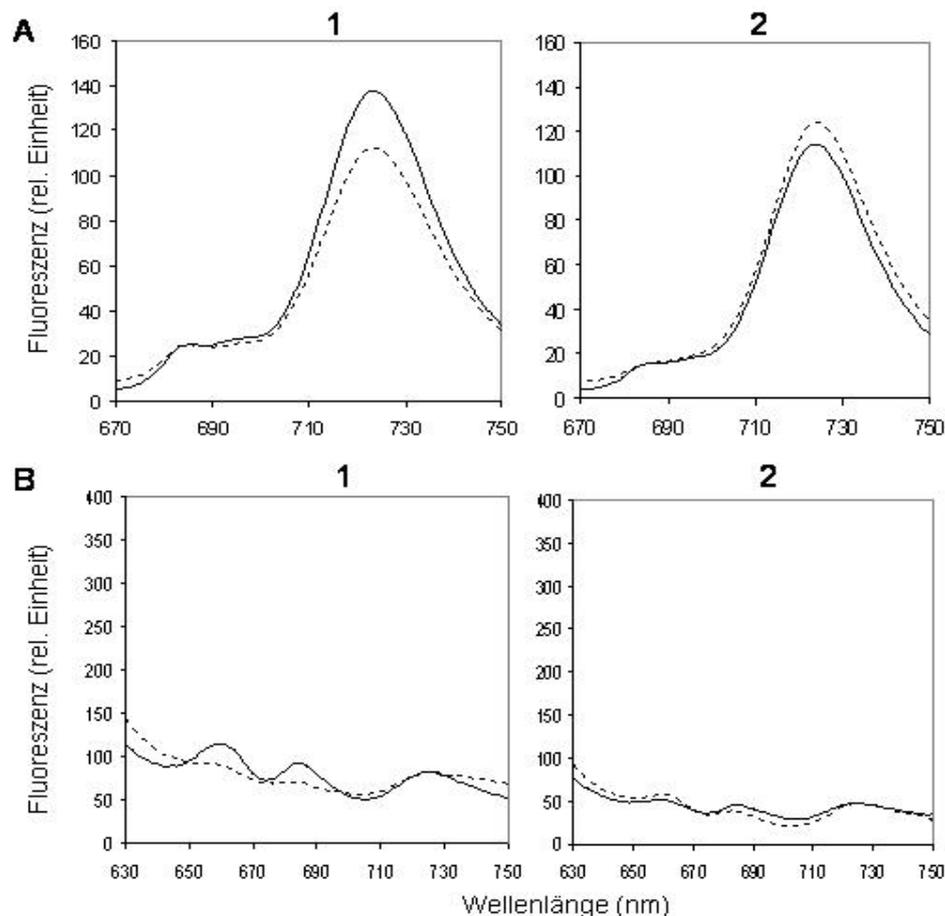


Abbildung 3.22: Analyse der 77K Pigment-Fluoreszenz-Emission von *Synechocystis* sp. PCC 6803 Zellen unter Stickstoffmangel. In exponentiell wachsenden Wildtyp- (durchgezogene Linie) und *Mmap2*- (gestrichelte Linie) Zellen wurde Stickstoffmangel induziert (siehe Abschnitt 2.8.2.1). Die Proben wurden auf eine Chlorophyllkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ eingestellt und die Emissions-Spektren erstellt. Die Abbildung (A) zeigt die Chlorophyll *a*-Fluoreszenz nach Anregung mit Licht von 435 nm. Die Spektren wurden auf 685 nm normiert. Die Abbildung (B) zeigt die Phycocyanobilin-Fluoreszenz nach Anregung mit Licht von 600 nm. Die Spektren wurden auf 725 nm normiert. (1) Kulturen nach 8 Tagen Chlorose und (2) Kulturen nach 15 Tagen Chlorose. Die Spektren sind Mittelwerte aus jeweils 2 Spektren, die in unterschiedlichen Experimenten erstellt wurden mit einer Standardabweichung von unter 5%.

3.4.2 Biochemische Analyse der PSII-Untereinheiten von *MetAP2*-defizienten *Synechocystis*-Zellen

Um die Zusammensetzung der PSII beider Stämme miteinander zu vergleichen, wurden die Thylakoide präpariert (siehe Abschnitt 2.12.4) und in den Fraktionen (Überstand, Pellet) wurden die PSII-Untereinheiten CP47 (PsbB), D1 (PsbA), PsbO mittels Western-Blot-Analyse (siehe 2.13, Tab. 2.5) nachgewiesen. Die Spektren und die Chlorophyll *a*-Bestimmung der Fraktionen der Thylakoid-Präparationen wurden analysiert und die Daten präsentierten eine eindeutige Trennung der Thylakoide von dem Überstand der Präparation (Daten nicht gezeigt). Durch die gewählte Zentrifugationsgeschwindigkeit (15.000 $\times g$) kann

davon ausgegangen werden, dass sich im Pellet die Thylakoide und in dem Überstand die löslichen Proteine, sowie Plasmamembranen befinden.

3.4.2.1 PSII unter stickstoffreichen Bedingungen

In beiden Stämmen konnte D1 (PsbA) mit einem kalkulierten Molekulargewicht (www.expasy.org/tools/pi_tool.html) von 30 kDa, wie erwartet, in der Cytoplasma-, sowie in der Thylakoid-haltigen Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 3.23). Das Mangan-Komplex-stabilisierende Protein PsbO (33 kDa) konnte in beiden Fraktionen nachgewiesen werden, wie es in bereits veröffentlichten Analysen in Wildtyp-Zellen gezeigt wurde (Zak *et al.*, 2001). Das Antennenprotein CP47 (56,2 kDa) wurde in beiden Stämmen, wie erwartet, in der Thylakoid-haltigen Pelletfraktion detektiert, allerdings in *Mmap2*-Zellen in reduzierter Menge. Unerwartet konnte CP47 in den *Mmap2*-Zellen auch in dem Überstand nachgewiesen werden (Abb. 3.23). Die Western-Blot-Analyse zeigte, dass die Quantität des CP47-Proteins in beiden Stämmen gleich ist.

Das reduzierte Vorkommen des CP47 in den Thylakoiden bestätigt das Ergebnis der Tieftemperatur-Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie (siehe Abb. 3.20). Da die Synthese des CP47-Proteins nicht der limitierende Faktor zu sein scheint ist es möglich, dass CP47 in der MetAP2-defizienten Mutante reduziert im PSII-Komplex assoziiert ist.

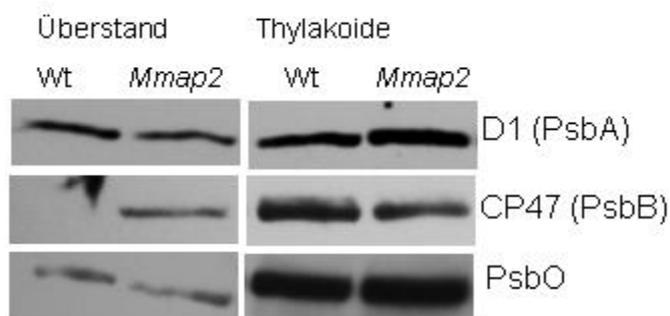


Abbildung 3.23: Western-Blot-Analyse der PSII-Untereinheiten. Es wurde eine 15%ige SDS-PAGE nach Shägger und von Jagow der präparierten Thylakoide (10 µg Protein) und ein Western-Blot mit den Antikörpern gegen D1, CP47 und PsbO durchgeführt (siehe Tab. 2.5). Die Nachweise sind repräsentativ für jeweils zwei Experimente, die in unterschiedlichen Experimenten erstellt wurden und ähnliche Ergebnisse zeigten.

3.4.2.2 PSII nach der Hochlicht-Exposition

Die Abb. 3.24 zeigt die Western-Blot-Analyse einzelner PSII-Untereinheiten nach 18-stündiger Hochlicht-Exposition. Das D1-Protein konnte in beiden Stämmen in den Thylakoiden in gleichen Mengen nachgewiesen werden, allerdings zeigten die *Mmap2*-Zellen im Überstand eine erhöhte Menge des nicht im PSII assoziierten D1-Proteins (siehe Abb. 3.24). Das Antennenprotein CP47 konnte, wie erwartet, im Pellet der Extrakte nachgewiesen werden. Allerdings konnte CP47 in den *Mmap2*-Präparationen auch im Überstand detektiert werden. Das PSII-spezifische PsbO-Protein wurde ebenfalls erhöht im Überstand und reduziert im Pellet der *Mmap2*-Präparation, im Vergleich zum Wildtyp, nachgewiesen.

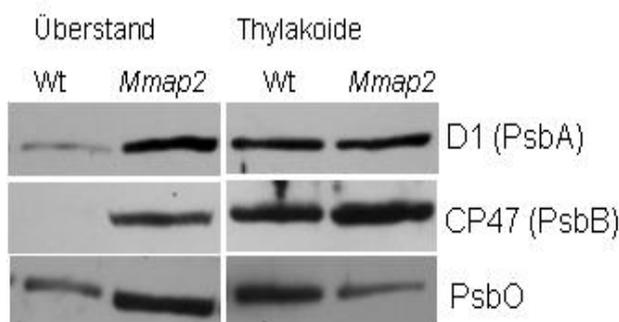


Abbildung 3.24: Western-Blot-Analyse der PSII-Untereinheiten der *Synechocystis*-Zellen nach der Hochlichtbestrahlung. Die Thylakoide wurden präpariert, wie unter Abschnitt 2.12.4 beschrieben. Es wurden Western-Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen CP47 (PsbB), D1 (PsbA) und PsbO durchgeführt (Tab. 2.5). Die Nachweise sind repräsentativ für jeweils zwei Experimente, die unter gleichen Bedingungen erstellt wurden und ähnliche Ergebnisse zeigten.

3.5 Einfluss von Stress auf die Expression der *map*-Gene

Um eine Aussage über die Beteiligung der *map*-Genprodukte unter verschiedenen Bedingungen in *Synechocystis* sp. PCC 6803 machen zu können, wurden die Expressionen der Gene *map-1* (slr0786), *map-2* (slr0918) und *map-3* (slr0555) mittels semi-quantitativer RT-PCR untersucht. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase oder nach angegebenen Zeitpunkten des Mangels oder der Exposition geerntet (6.000 U/min, 10 min, 4°C) und die Gesamt-RNA gereinigt, wie unter 2.10.3 (nach Quiagen) beschrieben. Die gereinigte RNA wurde für die RT-PCR (siehe Abschnitt 2.10.11.2) eingesetzt. Die Expression von *map-1* wurde mit den Oligonukleotiden *map1rev* und *map1for* (Tab. 2.2) in der RT-PCR mit einer *annealing*-Temperatur von 53°C ermittelt. Für die Analyse der *map-2* und *map-3* Gene wurden die Oligonukleotide 5`*map2* und 3`*map2*, sowie

map3rev und *map3for* mit einer *annealing*-Temperatur von 53°C verwendet. Die PCR-Fragmente wurden über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels BioRad Quantity one/Fluor-S™ ausgewertet (siehe Abschnitt 2.10.5). Zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Menge in die RT-PCR-Reaktion wurde die Expression des konstitutiv exprimierten Gens *rnpB* eingesetzt, das für die Untereinheit B der RNaseP in *Synechocystis* sp. PCC 6803 kodiert.

3.5.1 Sättigungsbestimmung der Amplifikation

Zunächst wurde für jedes Gen die Sättigung der Amplifikation bei unterschiedlichen Zyklusanzahlen getestet (Abb. 3.25). So wurde die jeweilige Zykluszahl bestimmt, bei der noch keine Sättigung erreicht war und diese für weitere Experimente verwendet. Für *map-1* wurde ein RT-PCR-Programm mit 26 Zyklen, für *map-2* mit 24 Zyklen, für *map-3* mit 22 Zyklen und für *rnpB* mit 15 Zyklen durchgeführt.

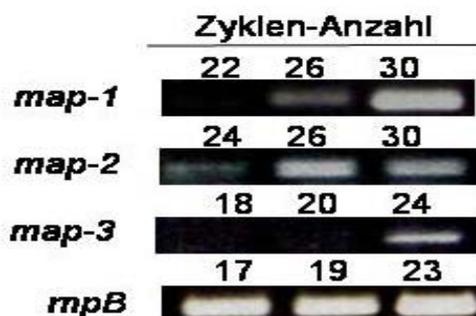


Abbildung 3.25: RT-PCR der *map*- und *rnpB*-Gene mit unterschiedlicher Zyklusanzahl. Die RT-PCR der verschiedenen Gene wurden nach unterschiedlichen Zyklen beendet, um den Grad der Sättigung zu bestimmen und die nicht sättigende Zyklusanzahl in der folgenden Analyse zu verwenden.

3.5.2 Expression der *map*-Gene während des Stickstoffmangels

Das Expressionsprofil der drei *map*-Gene unter Stickstoffmangel innerhalb der ersten und zweiten Phase der Chlorose wurde untersucht und Abbildung 3.26 zeigt das Ergebnis. Es konnte ein temporärer Anstieg der Expression von *map-1* innerhalb 72 Stunden Stickstoffmangel beobachtet werden, allerdings sank die Expression nach 144 h wieder. Die *map-2* Expression war um das Zweifache nach 24 Stunden Stickstoffmangel erhöht. Dieser Transkriptlevel stieg in den nächsten 48 Stunden weiter an und blieb noch nach 144 Stunden auf einem erhöhten Level. Die Expression von *map-3* nahm unter Mangelbedingungen stetig ab.

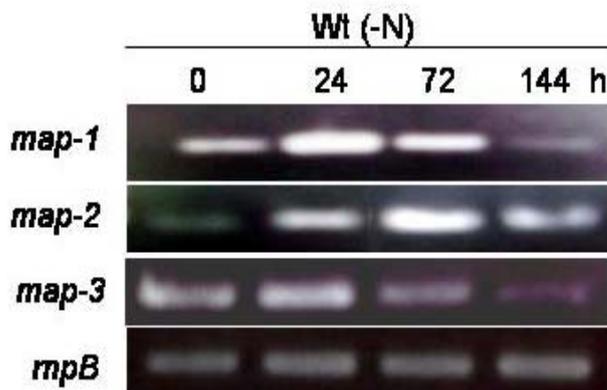


Abbildung 3.26: Expressionsanalyse der *map*-Gene während der Chlorose. In *Synechocystis* Wildtyp-Zellen wurde nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase Stickstoffmangel induziert (siehe Abschnitt 2.8.2.1) und unter Standardbedingungen für 144 Stunden inkubiert. Es wurde direkt vor der Induktion und nach angegebenen Zeiten im Mangel Aliquots für die RNA-Aufreinigung geerntet.

3.5.3 Expression der *map*-Gene während der Hochlicht-Exposition

Die Expressionsanalyse der *map*-Gene während der Bestrahlung mit Hochlicht ist in Abbildung 3.27 dargestellt. Der Transkriptlevel von *map-1* stieg während 24 Stunden Hochlicht um den Faktor 2,4. Ebenfalls konnte eine erhöhte Expression von *map-2* um einen Faktor von 1,8 beobachtet werden, die nach 24 Stunden Bestrahlung konstant blieb. Die Expression von *map-3* zeigte eine temporäre Erhöhung um das 1,5-fache nach sechs Stunden Hochlicht-Exposition, die allerdings nach 24 Stunden Bestrahlung wieder auf das Ausgangsniveau sank.

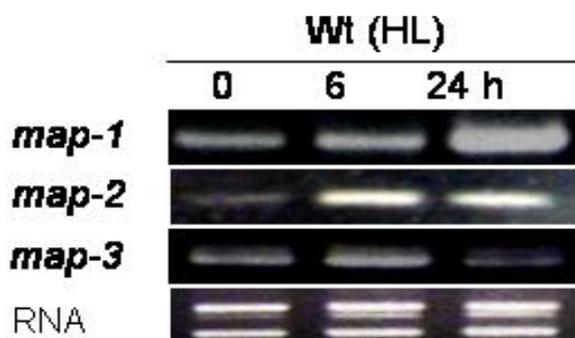


Abbildung 3.27: Expressionsanalyse der *map*-Gene während der Hochlichtbestrahlung. Die *Synechocystis* Wildtyp-Zellen wurden für 24 h mit Hochlicht (HL) (siehe 2.8.2.2) bestrahlt. Zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Konzentrationen in die PCR wurde diese in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt, da das Gen *mpB* unter diesen Bedingungen nicht konstitutiv exprimiert wird.

3.5.4 Expression der *map*-Gene unter photoautotrophen Bedingungen

Die Abbildung 3.28 zeigt die Expression der drei *map*-Gene unter photoautotrophen Standardbedingung mit Natriumnitrat als Stickstoffquelle zu Beginn der Wachstumsphase, nach 6, sowie nach 24 Stunden der Inkubation. Die drei *map*-Gene wurden unter stickstoffreichen Standardbedingungen exprimiert (Abb. 3.28). Der Transkriptlevel von *map-3* stieg im Laufe des exponentiellen

Wachstums an, während die *map-1* Expression unabhängig von der Wachstumsphase konstant blieb (Abb. 3.28). Es konnte beobachtet werden, dass die Expression von *map-2* nach sechs Stunden gering zunahm (um einen Faktor von 1,7) und auch nach 24 Stunden Inkubation konstant blieb.

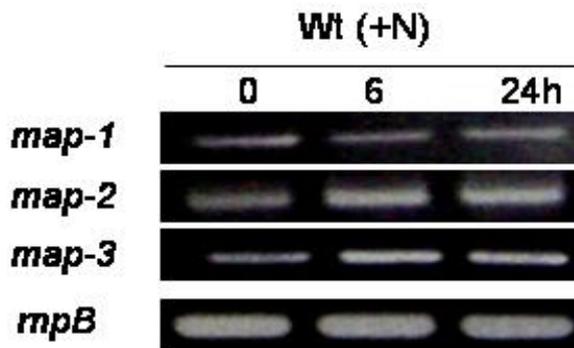


Abbildung 3.28: Expressionsanalyse der *map*-Gene unter photoautotrophen Standardbedingungen. Die Proben der *Synechocystis*-Kulturen wurden zu angegebenen Zeitpunkten entnommen, die RNA isoliert (2.10.3) und eine semi-quantitative RT-PCR wurde durchgeführt (2.10.11.2). Die Expression des Gens *mpB* diente hier der RNA-Quantitätskontrolle.

3.5.5 Expression der *map-1*- und *map-3*-Gene in MetAP2-defizienten Zellen

Eine weitere Fragestellung in dieser Arbeit war, ob die Peptidase MetAP1 oder MetAP3 in *Mmap2* die Funktion der MetAP2 übernehmen könnte. Dazu mussten die Expressionen der Gene *map-1* und *map-3* unter Bedingungen, die die *map-2*-Expression induziert, analysiert werden.

Einen Hinweis darauf kann die Expression der *map-1*- und *map-3*-Gene in der Peptidase-Mutante geben. Dazu wurde die Expression der Gene unter verschiedenen Wachstumsbedingungen mittels semi-quantitativer RT-PCR untersucht (Abbildung 3.29). Im Vergleich zu Wildtyp-Zellen konnte eine erhöhte Expression der Gene *map-1* und *map-3* unter stickstoffreichen Bedingungen in der Mutante beobachtet werden (Vergleich von Abb. 3.28 und Abb. 3.29).

Ebenso konnte gezeigt werden, dass unter Stickstoffmangel beide Gene in der *map-2*-Mutante konstant erhöht exprimiert wurden. Diese Daten geben einen Hinweis darauf, dass trotz gesteigerter Expression der *map-1*- und *map-3*-Gene die Funktion von MetAP2 nicht oder nur teilweise ausgeführt werden kann, da ein *Mmap2*-Phänotyp nachgewiesen wurde.

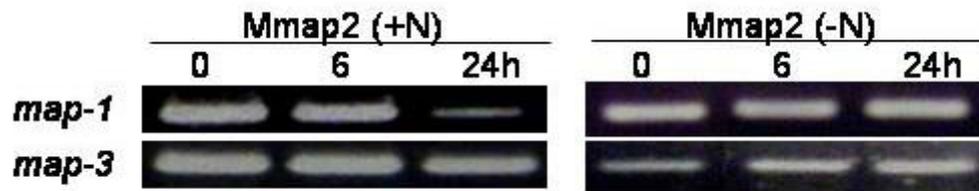


Abbildung 3.29: Expressionsanalyse der *map*-Gene in *Mmap2*. Die *Mmap2*-Zellen wurden unter Standardbedingungen (+N) inkubiert oder Stickstoffmangel wurde induziert (-N). Zu den Zeitpunkten 0, 6 und 24 Stunden wurde RNA isoliert und eine semi-quantitative RT-PCR durchgeführt.

Um eindeutig klären zu können, ob die Peptidasen einander ersetzen können, musste gewährleistet werden, dass die zu untersuchenden Peptidasen (MetAP1 und MetAP3) unter gleichen Bedingungen wie MetAP2 exprimiert werden. Dazu wurden transkriptionelle Promotor-Gen-Fusionen erstellt, bei denen die *map-2*-Promotorregion mit dem jeweiligen Leserahmen von *map-1* oder *map-3* fusioniert wurden. Die Fusion erfolgte über eine modifizierte Form der zielgerichteten Mutagenese (siehe Abschnitt 2.10.11.3). Diese Promotor-Gen-Fusionen sollten in einem geeigneten Transformationsvektor in *Mmap2* transformiert werden, um anschließend eine Phänotypenanalyse durchzuführen. Bis zum Ende dieser Arbeit war es jedoch nicht möglich die Peptidase-Mutante erfolgreich zu transformieren, um Wachstumsexperimente durchführen zu können.

3.6 Zelluläre Lokalisation von MetAP2 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Antikörperproduktion)

Zum Nachweis des MAP-2-Proteins in Zellextrakten unter verschiedenen Wachstumsbedingungen wurde der spezifische Antikörper gegen MAP-2 (α -MAP-2) hergestellt. Zunächst wurde die Peptidase mittels des pET-Systems (Novagen) in *E.coli* überexprimiert. Der offene Leserahmen des Gens slr0918 (*map-2*) wurde unter Verwendung der Oligonukleotide 5' *map2NdeI* und 3' *map2XhoI* (siehe Tab. 2.2) in einer PCR mit genomischer *Synechocystis* sp. PCC 6803 DNA als Matrize amplifiziert. Das gereinigte PCR-Fragment (780 bp) wurde mit den endständigen Schnittstellen (5' *NdeI* und 3' *XhoI*), die durch die Sequenz der Oligonukleotide in der PCR dem Fragment angefügt wurden, in den pET-15b Vektor kloniert. Der sequenzierte MD1-pET15b-Vektor (siehe Tab. 2.1) wurde in *E.coli* (BL21)-Zellen

transformiert (siehe Abschnitt 2.10.9.2). Durch die IPTG-Zugabe wurde das Protein in den Zellen überproduziert. Die Aufreinigung von MAP-2 erfolgte nativ mittels Affinitätschromatographie über die His-SelectTM-Säule (siehe Abschnitt 2.11). Das Ergebnis der erfolgreichen Aufreinigung wurde über SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.12.6.2.1) analysiert und ist in Abbildung 3.30 dargestellt. Es wurden zehn Waschschriffe zur Beseitigung unspezifischer Proteine vorgenommen. In den ersten und zweiten Elutionsfraktionen konnte das gereinigte, rekombinante Protein erfolgreich eluiert werden, mit der für MetAP2 erwarteten Größe von 29 kDa. Die Elutionsfraktionen 1 und 2 wurden gegen den Dialysepuffer (siehe Abschnitt 2.11.3) über Nacht dialysiert. Es wurden 500 µg rekombinantes Protein für die Immunisierung eines Kaninchens (Pineda Antikörper Service, Berlin) verwendet. Die Immunisierung wurde nach 91 Tagen beendet. Der Antikörper konnte nun für Western-Blot-Analysen verwendet werden.

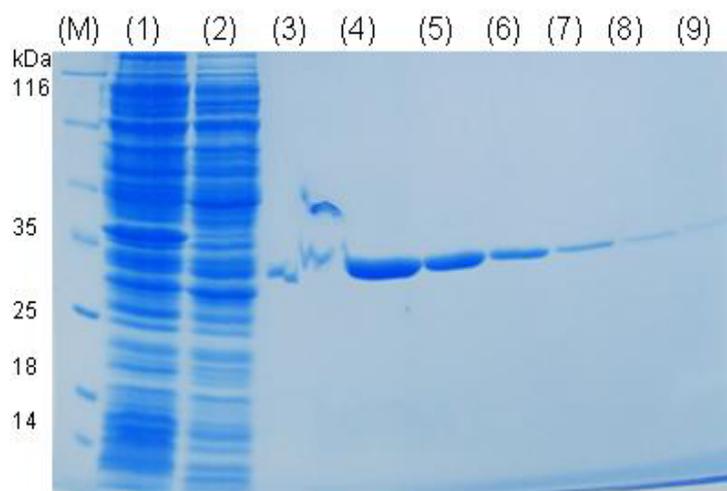


Abbildung 3.30: Reinigung der überproduzierten His₆-MetAP2. Die Abbildung zeigt die Überproduktion von MetAP2-His (29 kDa) in einer 12,5%igen SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. (M) Proteinstandard SM0431 (1) Zellysate nach Zellaufbruch und anschließender Zentrifugation (2) 1. Waschfraktion (3) 10. Waschfraktion (4-9) 1.-6. Elutionsfraktionen von MAP-2.

3.6.1 Lokalisation von MetAP2 unter photoautotrophen Bedingungen

Die Lokalisation von MAP-2 sollte mittels des spezifischen Antikörpers analysiert werden. Dazu wurden Wildtyp-Zellen unter photoautotrophen Standardbedingungen im Klimaschrank inkubiert (siehe Abschnitt 2.8.1). Nach angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels Ultrazentrifugation Fraktionen hergestellt (siehe Abschnitt 2.12.3). Abbildung 3.31 zeigt das Ergebnis der Western-Blot-Analyse. Das MAP-2-Protein konnte unter photoautotrophen Standardbedingungen in der löslichen Fraktion des Zellextrakts nachgewiesen werden. In der Pelletfraktion konnte kein MAP-2-Protein detektiert

werden (Abb. 3.31). In dem Zellextrakt der Mutante konnte, wie erwartet, ebenfalls kein MAP-2-Protein nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

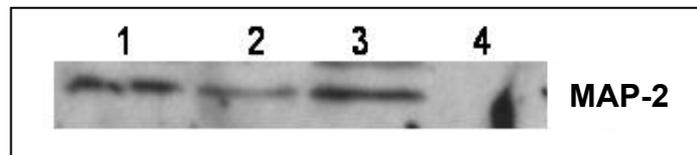


Abbildung 3.31: Western-Blot-Analyse von *Synechocystis*-Wildtyp Proteinextrakten zum Nachweis von MAP-2 unter stickstoffreichen Bedingungen. Die Extrakte wurden mittels Ultrazentrifugation, wie unter 2.12.3 beschrieben in Pellet- und lösliche Fraktionen unterteilt. Die Fraktionen wurden in einer 12,5%igen SDS-PAGE nach Laemmli aufgetrennt und eine Western-Blot-Analyse durchgeführt, wie unter 2.13 beschrieben. Die Membran wurde mit dem MAP-2-spezifischen Antikörper (1:5000) und mit dem zweiten Antikörper (*POD-anti rabbit*, 1:10000) inkubiert. Zellextrakte von Wildtyp-Zellen in BG-11^N Medium (1) direkt nach der Anzucht (2) nach 24 h (3) nach 72 h in BG-11^N Medium (4) Pelletfraktion von Wildtyp-Zellen in BG-11^N Medium direkt nach der Anzucht.

3.6.2 Lokalisation und Expression von MetAP2 unter Stickstoffmangel

Zur Analyse der Proteinexpression unter Stickstoffmangel wurde in den Wildtyp-Zellen Chlorose induziert und die Proben direkt nach der Induktion, nach 72 und 144 Stunden Stickstoffmangel geerntet (6.000 U/min, 10 min, 4°C) und mittels Ultrazentrifugation Fraktionen hergestellt.

Die Abbildung 3.31 zeigt die Western-Blot-Analyse der *Synechocystis*-Zellextrakte. Die MetAP2 konnte unter Stickstoffmangel nachgewiesen werden (Abb. 3.32) und es konnte eine Zunahme der MetAP2 nach 72 Stunden Stickstoffmangel detektiert werden (Abb. 3.32).

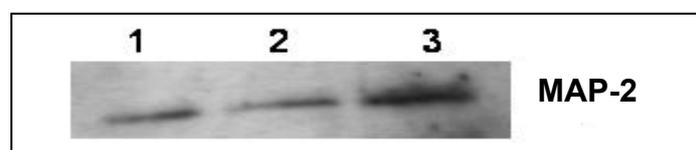


Abbildung 3.32: Western-Blot-Analyse zum Nachweis von MAP-2 während des Stickstoffmangels. Für die Western-Blot-Analyse wurden 15 µg des Überstandes mittels 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und eine Western-Blot-Analyse durchgeführt (siehe Abschnitt 2.13). (1) Zellextrakte von Wildtyp-Zellen in BG-11^N Medium (2) direkt nach der Mangelinduktion (3) nach 72 h des Mangels.

3.7 Promotoranalyse des *map-2*-Gens

3.7.1 Untersuchung des 5' Ende des *map-2*- (slr0918) Transkripts

Die Promotorsequenz des *map-2*-Gens wurde auf Bindesequenzen für bekannte Transkriptionsaktivatoren untersucht, da eine gesteigerte Expression unter Stressbedingungen beobachtet wurde (siehe Abschnitt 3.5). Zunächst wurde dafür das 5' Ende des *map-2*- (slr0918) Transkripts bestimmt. Die Analyse des 5' Ende des slr0918-Transkripts wurde mit Hilfe des 5`/3`RACE Kits durchgeführt, wie unter 2.10.12 beschrieben und mit anschließendem Abgleich (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) der erhaltenen Sequenzen mit der Datenbank (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/>) untersucht.

Es konnte ein Transkriptionsstartpunkt (G) ermittelt werden, welcher sich 57 Basenpaare stromaufwärts von dem putativen Startcodon ATG befindet (Abb. 3.33). Im Abgleich der Promotorsequenz mit bekannten Bindesequenzen von Transkriptionsfaktoren konnte 84 Basenpaare stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes (+1) eine nicht perfekte Konsensussequenz des Transkriptionsregulators NtcA identifiziert werden. Abbildung 3.33 zeigt den Abgleich der *map-2*-Sequenz mit der des *glnA*-Gens, welches ein perfektes Bindemotiv für NtcA zeigt. Das Gen *glnA* (slr1756) kodiert in *Synechocystis* sp. PCC 6803 für die Glutaminsynthetase und ist ein NtcA aktiviertes Gen (Reyes *et al.*, 1997).

Promotorregion <i>glnA</i>	... <u>GTA</u> N ₈ <u>TAC</u> N ₂₂ <u>TA</u> N ₃ <u>I</u> GGATAGT <u>CG</u> N ₄₈ ATG...
Promotorregion <i>map-2</i>	... <u>GTC</u> N ₈ <u>TAC</u> N ₅₉ <u>TA</u> N ₃ <u>I</u> GAAAGT <u>G</u> N ₅₇ ATG...

Abbildung 3.33: Vergleich des Promotorbereichs der Gene *glnA* und *map-2* aus *Synechocystis* sp. PCC 6803. Die Genomausschnitte (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) stellen den Promotorbereich von *map-2* (slr0918) und *glnA* (slr1756) dar. Die Transkriptionsstartpunkte (+1) sind rot gekennzeichnet. Die NtcA-Bindesequenz, sowie die TATA-Box (-10) sind schwarz unterstrichen. Die Positionen der Basen sind bezüglich des Transkriptionsstartpunktes angegeben.

3.7.2 Bindungsanalyse von NtcA an das potentielle NtcA-Bindemotiv in der *map-2*-Promotorregion

3.7.2.1 Biolumineszenz-Analyse in *Synechococcus elongatus* PCC 7942

Im vorhergehenden Experiment wurde in der *map-2* Promotorregion ein NtcA-Bindemotiv ermittelt. Die Bindung des Transkriptionsfaktors NtcA und somit die Aktivität des *map-2* Promotors sollte experimentell mit Hilfe einer Luziferase-Untersuchung analysiert werden. Die Luziferase-Untersuchung ermöglicht die Ermittlung der Aktivität eines spezifisch ausgewählten Promotors unter verschiedenen Bedingungen, messbar durch die Expression des Reportergens Luziferase. Dieser Versuch wurde in dem verwandten Stamm *Synechococcus elongatus* PCC 7942 durchgeführt, da die Biolumineszenz-Analyse mittels des Vektors pAM1580 in diesem Stamm bereits erfolgreich angewandt wurde (Andersson *et al.*, 2000). Die Promotorsequenz von *map-2* wurde in den promotorlosen Vektor pAM1580 stromabwärts des Gens *luxAB* kloniert (siehe Tab. 2.1, pAM*map2luxAB*) und anschließend mittels Konjugation in *Synechococcus* Wildtyp-Zellen eingebracht, wie in Abschnitt 2.10.9.3 beschrieben. Die *Synechococcus* Wildtyp-Zellen, die das positive Plasmid enthielten, wurden in unterschiedlichen Stickstoffquellen (BG-11^N oder BG-11^A, siehe Abschnitt 2.5.1) kultiviert oder in stickstofffreies Medium (BG-11⁰) überführt und kultiviert.

Das Ergebnis der Biolumineszenz-Analyse ist in Abb. 3.34 dargestellt. Die Luziferaseaktivität stieg in den Zellen mit Nitrat als Stickstoffquelle und in denen, die Stickstoffmangel ausgesetzt waren, deutlich an, während die Luziferase-Aktivität in Gegenwart von Ammoniumchlorid reprimiert wurde (Abb. 3.34). Diese Daten wiesen die typische Charakteristik eines Stickstoff-regulierten Gens auf, dessen Transkription von NtcA aktiviert wird (Luque *et al.*, 1994; Herrero *et al.*, 2001). Diese Gene zeigten unter Stickstoffmangel eine erhöhte Expression, während deren Expression in Ammonium reprimiert wurde.

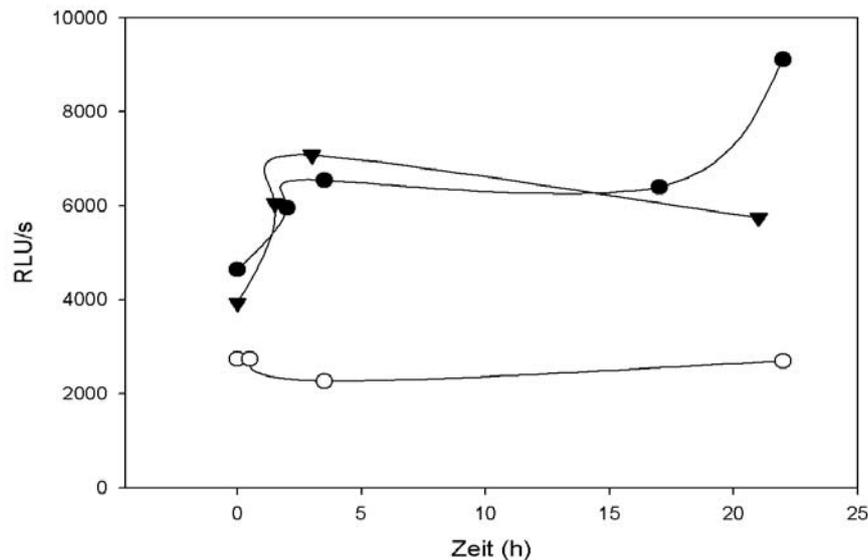


Abbildung 3.34: Biolumineszenz des *map-2*-Promotors in *S. elongatus* PCC 7942. Die Zellen wurden in HEPES gepuffertem BG-11^A Medium (pH 7,8) (offene Kreise), in BG-11^N Medium (Dreiecke) für 20 Stunden inkubiert und für den Versuch mit dem jeweiligen Medium auf die OD₇₅₀ von 0,4 verdünnt oder mittels Filtrierung in BG-11⁰ Medium überführt (geschlossene Kreise). Die Kulturen wurden unter Standardbedingungen weiter inkubiert und nach angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, um die Messungen in dem Luminometer durchzuführen, wie unter 2.15.1 beschrieben. Die Abbildung zeigt die Aktivität der Luziferase, gemessen in RLU/s gegen die Zeit grafisch dargestellt. Die Daten stellen Mittelwerte aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dar mit einer Standardabweichung von unter 5%.

Die vorhergehende Bestimmung der Promotor-Aktivität bei verschiedenen Stickstoffquellen zeigte, dass *map-2* die Expression eines Stickstoff-regulierten Gens mittels des Transkriptionsfaktors NtcA aufweist, allerdings konnte die Aktivierung durch den Transkriptionsfaktor mittels der Biolumineszenz nicht nachgewiesen werden. Die potentielle NtcA-Bindung sollte mit einer DNA-Protein-Interaktionsstudie experimentell bestätigt werden.

3.7.2.2 Gel Retardierungs-Analyse

Es wurde das Bindungsverhalten von NtcA an die *map-2*-Promotorsequenz durch Gel Retardierungs-Analysen untersucht. Dafür wurden radioaktiv markierte DNA Fragmente eingesetzt, die die NtcA-Bindesequenz des Promotorbereichs der Gene *map-2* und *glnA* enthielten. Die *glnA*-Promotorsequenz wurde als Positivkontrolle verwendet. Die Abbildung 3.35 zeigt die Ergebnisse der Gel Retardierungs-Analyse. Es konnte eine schwache Bindung von NtcA an die *map-2*-Promotorregion beobachtet werden (Abb. 3.35, Pfeil). Die Bindung konnte jedoch nicht durch die Zugabe bekannter, stimulierender Effektormoleküle von

NtcA verbessert werden. Das NtcA-Bindemotiv in der *map-2*-Promotorregion ist nicht perfekt, denn sie weicht von der Konsensussequenz ab (siehe Abb. 3.33). Diese Abweichung wirkt sich vermutlich negativ auf die Bindungsspezifität aus und führt zu einer geringeren Affinität von NtcA zu dieser Sequenz (Jiang *et al.*, 2000). Die Bindung von NtcA an den Promotorbereich des Gens *glnA* konnte gezeigt werden (Abb. 3.35).

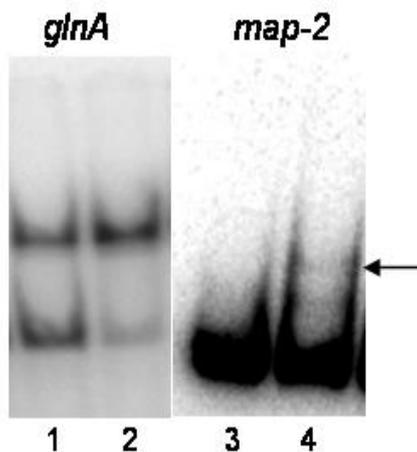


Abbildung 3.35: Gel Retardierungs-Analyse zur Untersuchung der Bindung von NtcA an die *map-2*-Promotorregion. Der Reaktionsansatz für die Bindungsstudie des *map-2*-Promotors enthielt: 1,25 ng radioaktiv markierte DNA, 500 ng NtcA, 1 mM EDTA, 0,1 mM MgCl₂, 1 mM α -Ketoglutarat und 500 ng PipX, inkubiert in modifiziertem Reaktionspuffer nach Vazquez-Bermudez (2002). Die Bindungsstudie des *glnA*-Promotors erfolgte im Reaktionsansatz mit 1,25 ng DNA, (1) 10 und (2) 20 ng NtcA, 1 mM α -Ketoglutarat. Die Bindung von NtcA an (1,2) Promotorregion von *glnA* (slr1756) mit NtcA-Bindesequenz und steigender NtcA-Konzentration (3) den Promotorbereich von *map-2*, Negativkontrolle, der Ansatz wurde ohne NtcA inkubiert (4) an die Promotorregion von *map-2* (slr0918).

3.7.2.3 Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse (BIAcore)

Mit der Gel Retardierungs-Analyse konnte kein eindeutiges Ergebnis der Bindung von NtcA an die *map-2*-Promotorregion erhalten werden, daher wurde eine Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Analyse durchgeführt, wie im Abschnitt 2.14.2 beschrieben. Mit dieser Methode kann eine direkte Interaktion des Proteins an DNA durch Veränderungen des Signals in Resonanzeinheit (*Resonanz Unit*, RU) gemessen werden. Die DNA-Fragmente (700 ng DNA) wurden in unterschiedliche Fließzellen auf den SA-Chip mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 μ l/min geladen. Nach dem Beladen des biotinylierten *map-2*-Promotor-Fragments (184 bp) in Fließkammer 1 und der Negativkontrolle (160 bp), die keine NtcA Bindesequenz enthielt, in Fließkammer 2, wurden die optimalen Bedingungen der Bindung von NtcA ausgetestet und die Bindungsstudie durchgeführt (siehe Abschnitt 2.14.2). Abbildung 3.36 A zeigt die Bindungs- und Dissoziationsphase von NtcA an die *map-2*- und an die Kontroll-DNA und Abbildung 3.36 B zeigt das Differenzspektrum der Bindungs- und Dissoziationsphase von 3.36 A.

Es konnte eine eindeutige Bindung von NtcA an die *map-2*-Promotorregion beobachtet werden (Abb. 3.36 B). Die Bindung bewirkte einen um den Wert 900 höheren Anstieg der Resonanzeinheit (RU), im Vergleich zu der Bindung an die unspezifische DNA, die als Kontrolle diente (Abb. 3.36). Die Bindung konnte nicht durch Effektormoleküle, wie α -Ketoglutarat, verändert werden.

Es wurde *in vitro* bestätigt, dass der Transkriptionsfaktor NctA an die Promotorregion des *map-2*- Gens bindet und vermutlich dessen Transkription dadurch reguliert. Diese Daten passen zu den Ergebnissen der Expressionsanalysen, die eine gesteigerte *map-2*-Expression unter Stickstoffmangel zeigten (siehe Abschnitt 3.5).

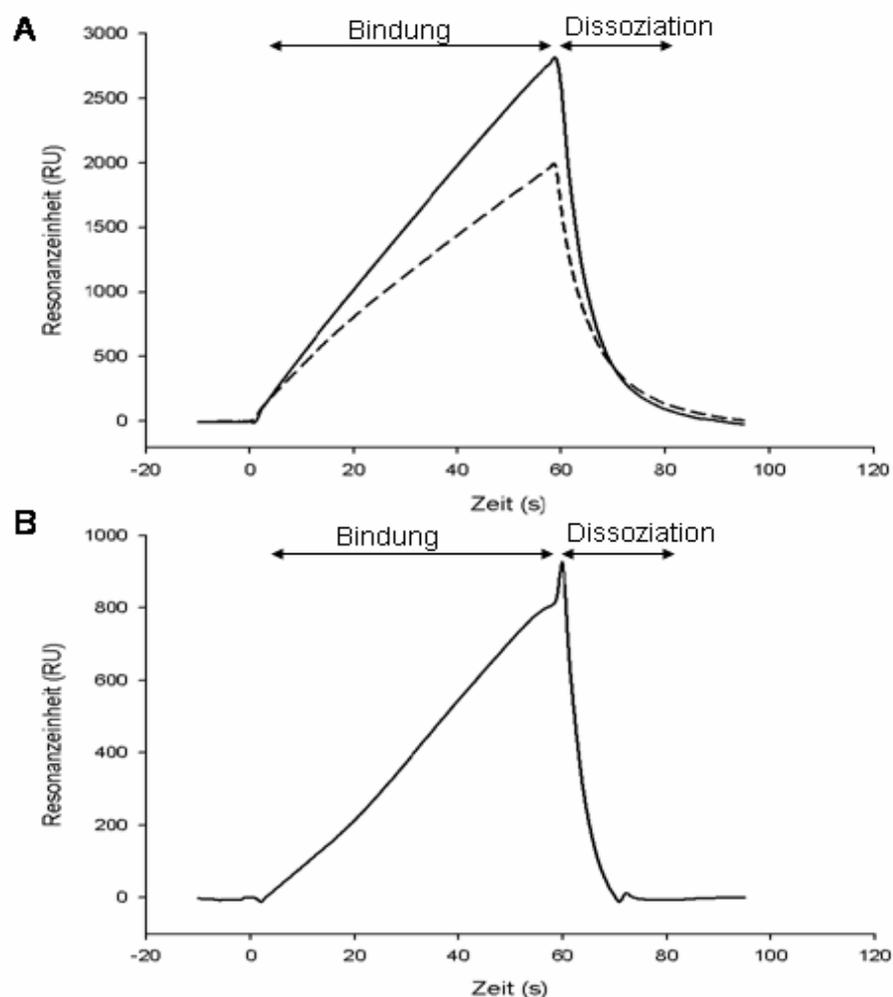


Abbildung 3.36: Bindung und Dissoziation des Transkriptionsfaktors NtcA an die *map-2*-Promotorregion. Die Abbildung zeigt die Sensorgramme der SPR-Analyse (*BIAcore*) der NtcA-Bindung an die jeweilige DNA. In (A) ist die Bindungs- und Dissoziationsphase an die *map-2*-Promotorregion (durchgezogene Linie) und Kontroll-DNA (gestrichelte Linie) gezeigt. Abbildung (B) zeigt das Differenzspektrum der Bindungs- und Dissoziationsphase aus (A). Das Experiment wurde in dem Injektionspuffer (siehe 2.14.2) durchgeführt und wurde zweimal wiederholt mit ähnlichen Ergebnissen.

3.8 Stammbaumanalyse der MetAP`s in Cyanobakterien

Zur Erstellung eines Stammbaumes wurde zunächst ein Abgleich (BLAST) der Sequenzen der *map*-Gene innerhalb der Cyanobakterien durchgeführt (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/>). Das *map-3*-Gen wurde in allen Cyanobakterien gefunden, deren Genome sequenziert sind. Das Gen *map-2* ist in den ursprünglichen Cyanobakterien und in filamentösen, sowie in thermophilen Stämmen vorhanden, nicht aber in Frischwasser- und marinen *Synechococcus*- und *Prochlorococcus*-Stämmen. Kein anderes Cyanobakterium, außer *Synechocystis* sp. PCC 6803 hat ein originales *map-1*-Gen. Der phylogenetische Stammbaum der MetAP`s in *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde mit den Proteinsequenzen der Homologen aus weiteren Cyanobakterien und mit Hilfe des Programms ClustalW erstellt (Abb. 3.37). Der Stammbaum zeigt zwei Cluster: 1) der ursprünglichen Cyanobakterien und der *Synechocystis*-Gruppe und 2) der *Nostocales*-Gruppe. Diese Aufteilung entspricht der des phylogenetischen Stammbaums der 16S rRNA von Cyanobakterien (Voß *et al.*, 2007). Die Homologe zu *map-2* ist in den nahverwandten Stämmen von *Synechocystis* sp. PCC 6803 in dem ursprünglichen *Crocospheera watsonii*, *Cyanotheceae* PCC 7421, in *Gloeobacter violaceus* und in thermophilen *Synechococcus*-Stämmen vorhanden, was zeigt, dass *map-2* ursprünglich vorhanden war. Es ist denkbar, dass in den marinen *Synechococcus*- und *Prochlorococcus*-Stämmen das *map-2*-Gen eliminiert wurde, da sie reduzierte Genome besitzen (Voß *et al.*, 2007).

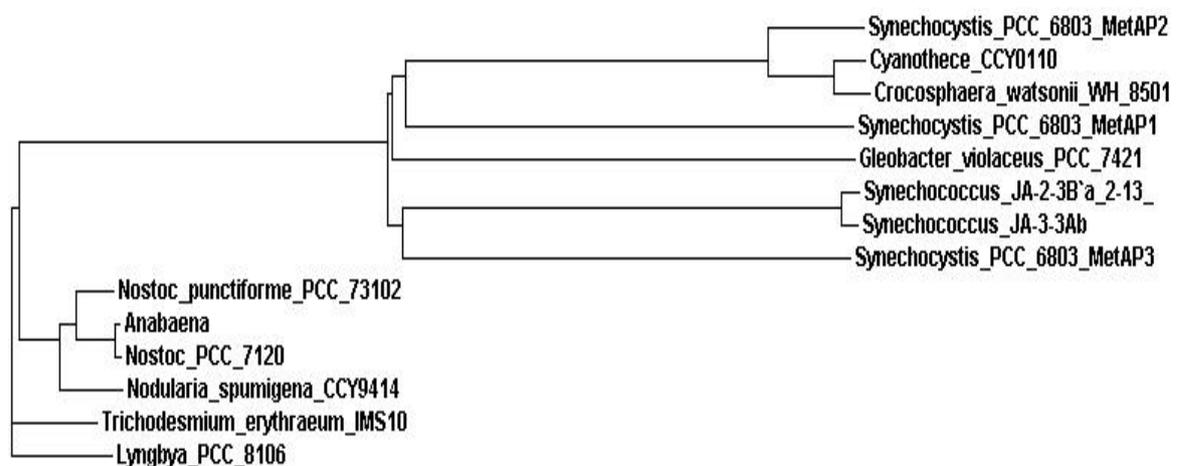


Abbildung 3.37: Phylogenetischer Stammbaum der MetAP`s in Cyanobakterien. Der Stammbaum wurde mittels der Datenbank Cyanobase (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/>) und des *Multiple Alignment Programms ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html#>) erstellt.

II. Das Phänomen der Ammonium-Toleranz in *Synechocystis* sp. PCC 6803 und die Beteiligung der FtsH2-Protease

Ammonium hat eine toxische Wirkung auf Organismen, die Photosynthese betreiben. Allerdings ist der Mechanismus der Toxizität bislang ungeklärt. In diesem Teil der Arbeit wurde das Phänomen der Ammonium-Toleranz in *Synechocystis* sp. PCC 6803 untersucht.

In Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe konnte beobachtet werden, dass die FtsH2-defiziente Mutante in *Synechocystis* sp. PCC 6803 sensitiv gegenüber Ammonium ist (N.Kloft, unveröffentlichte Daten). Die Zellen verloren die PSII-Aktivität in der Gegenwart von 5 mM Ammoniumchlorid innerhalb von fünf Stunden im Schwachlicht (Photonenflussrate von $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Hingegen überlebten die Wildtyp-Zellen die Inkubation mit Ammoniumchlorid unter gleichen Bedingungen. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust der PSII-Aktivität in der Mutante von dem pH-Wert und somit von der Ammoniak-Konzentration des Mediums abhängt (N-Kloft, unveröffentlicht). Mit höherem pH-Wert des BG-11^N Mediums steigt die Konzentration des freien Ammoniaks (berechnet mit einem pKs-Wert von 9,2 für Ammonium, Tab. 3.2). Bei einem pH-Wert des Mediums von 8,2 beträgt die Ammoniak-Konzentration 0,45 mM und nach fünf Stunden Inkubation behielten die *ftsH2*⁻-Zellen 63% der anfänglichen PSII-Aktivität (siehe Tab. 3.2). Nach der Inkubation von fünf Stunden mit einer Ammoniak-Konzentration von 1,45 mM (pH 8,8 des BG-11^N Mediums) konnte keine PSII-Aktivität mehr gemessen werden (siehe Tab. 3.2). Dieses Phänomen konnte nicht in der Gegenwart von Nitrit oder Nitrat beobachtet werden (siehe Tab. 3.2).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Verlust der PSII-Aktivität in *ftsH2*⁻-Zellen mit steigender Ammoniak-Konzentration im Medium korreliert und, dass Ammoniak das schädigende Agens ist. Daher wurden weitere Experimente bei einem pH-Wert von 8,8 in BG-11^N Medium in der Gegenwart von 5 mM Ammoniumchlorid oder in BG-11^N Medium in der Abwesenheit von Ammoniumchlorid durchgeführt.

Tabelle 3.2: Ammonium-Toleranz in *Synechocystis* sp. PCC 6803 *ftsH2*⁻-Zellen. Die Tabelle zeigt die gemessenen ETR-Werte in dem WATER-PAM Chlorophyll Fluorometer (siehe Abschnitt 2.15.5.2) der *ftsH2*⁻-Zellen in der Gegenwart von 5 mM NH₄Cl oder Nitrit und unterschiedlichen pH-Werten (gepuffert durch 20 mM MES oder 20 mM HEPES) des BG-11^N Mediums. Die Zellen wurden bei einer Photonenfluenzrate von 10 μmol m⁻² s⁻¹ kultiviert und anschließend auf eine OD₇₅₀ von 0,5 verdünnt und bei einer Photonenfluenzrate von 20 μmol m⁻² s⁻¹ in der Gegenwart der angegebenen Stickstoffquelle inkubiert und die ETR wurde nach fünf Stunden Inkubation gemessen. Die 100% Werte entsprechen dem Wert, der vor der Zugabe der Stickstoffquelle gemessen wurde. Die Werte sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und die Standardabweichung ist unter 0,05. Die Konzentration des freien Ammoniaks wurde mit einem pKs-Wert von 9,2 für Ammonium berechnet.

Medium und Pufferbedingungen	pH	Freie Ammoniak-Konzentration in (mM)	% PSII-Aktivität nach 5 h Inkubation
BG-11 ^N + 5 mM NH ₄ Cl /Karbonat	8,8	1,45	0
BG-11 ^N + 5 mM NH ₄ Cl /MES	8,6	1,0	7
BG-11 ^N + 5 mM NH ₄ Cl /HEPES	8,5	0,83	22
BG-11 ^N + 5 mM NH ₄ Cl /HEPES	8,2	0,45	63
BG-11 ^N (17,6 mM NaNO ₃)/Karbonat	9,1	0	100
BG-11 ^N + 10 mM NO ₂ /Karbonat	9,1	0	74

3.9 Ammonium-Toleranz in *Synechocystis* sp. PCC 6803

3.9.1 Die Überlebensfähigkeit der *Synechocystis*-Zellen in Anwesenheit von Ammoniak

Eine anfängliche Beobachtung war, dass die Zellen der *ftsH2*⁻-Mutante in der Gegenwart von 5 mM NH₄Cl bei einer Photonenfluenzrate von 20 μmol m⁻² s⁻¹ nach 24 Stunden Inkubation ausbleichen (Abb. 3.38).



Abb. 3.38: Depigmentierung der *ftsH2*⁻-Zellen in Gegenwart von Ammoniumchlorid. Die exponentiell wachsenden *Synechocystis ftsH2*⁻-Zellen wurden für 24 h in BG-11^N Medium (pH 8,8) in der Gegenwart (links) und in der Abwesenheit (rechts) von 5 mM NH₄Cl bei einer Photonenfluenzrate von 20 μmol m⁻² s⁻¹ inkubiert.

Die Lebensfähigkeit der *Synechocystis*-Zellen in der Gegenwart und zur Kontrolle in der Abwesenheit von Ammoniak wurde mittels eines Wachstumsexperiments auf BG-11^N Agarplatten untersucht (Abb. 3.39).

Zu sehen ist, dass die Lebensfähigkeit der *ftsH2*⁻-Zellen nach einer 5-stündigen Inkubation mit Ammoniak stark abnahm (Abb. 3.39 A), im Vergleich zu den Kontrollzellen in Gegenwart von Nitrat (Abb. 3.39 B). Nach 24 Stunden Inkubation sind die *ftsH2*⁻-Zellen abgestorben und konnten nicht mehr auf Platte anwachsen (Abb. 3.39 A), während der Wildtyp unter den untersuchten Bedingungen gut wachsen konnte (Abb. 3.39 A, B). Zusätzlich wurde ein Wachstumsexperiment auf BG-11^N Agarplatten, die 5 mM Ammoniumchlorid enthielten, durchgeführt. Das Ergebnis zeigt, dass die *ftsH2*⁻-Zellen nicht in der Lage waren, in der Gegenwart von Ammoniak zu wachsen, während die Wildtyp-Zellen ein dem Kontrollexperiment ähnliches Wachstum zeigten (Vergleich Abb. 3.39 B und C).

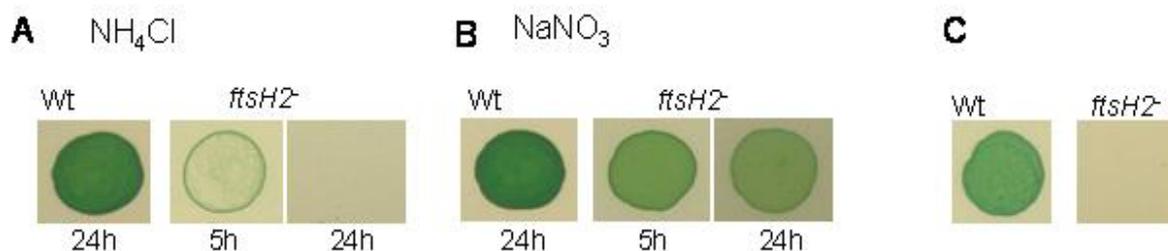


Abbildung 3.39: Wachstumsexperiment auf BG-11^N Agarplatten. Die Abbildung zeigt Ausschnitte der BG-11^N Agarplatten in Gegenwart von (A,B) 17,6 mM Natriumnitrat oder (C) 17,6 mM Natriumnitrat und 5 mM Ammoniumchlorid. Exponentiell wachsende Zellen wurden für den Versuch auf OD₇₅₀ von 0,4 mit BG-11^N Medium verdünnt und bei 20 μmol Photonen m⁻² s⁻¹ inkubiert. Zu angegebenen Zeitpunkten wurden 10 μl der Zellen der Inkubation (A) in Gegenwart von 5 mM NH₄Cl oder (B) zur Kontrolle in Abwesenheit von NH₄Cl auf eine Agarplatte getropft und für sieben Tage unter Standardbedingungen im Lichtschrank inkubiert. (C) Die exponentiell wachsenden Zellen einer OD₇₅₀ von 0,4 wurden auf die Ammoniak-haltige Platte getropft (jeweils 10 μl) und unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Auswertung wurden die Platten fotografiert. Der Versuch wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten wiederholt und die Ergebnisse zeigten die gleichen Tendenzen.

3.9.2 Ammonium-Toleranz der *Synechocystis* Wildtyp- und *FtsH2*-defizienten Zellen

Weiterhin wurde die Toleranz von Wildtyp und *ftsH2*⁻-Mutante gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen von Ammoniumchlorid in BG-11^N Medium (pH 8,8) anhand von PSII-Aktivitätsmessungen im WATER-PAM Chlorophyll Fluorometer (siehe Abschnitt 2.15.5.2) bestimmt. Die *ftsH2*⁻-Mutante ist, aufgrund

des beeinträchtigten PSII-Reparaturzyklus, sensitiver gegenüber Licht höherer Photonenflussraten unter Standardbedingungen. Die Mutation beeinflusst auch die Pigmentierung der Mutantenzellen und hat einen geringeren photosynthetischen Elektronentransport zur Folge. Deshalb zeigt die Mutante in den folgenden Versuchen eine geringere photosynthetische Aktivität als Wildtyp-Zellen (Silva *et al.*, 2003). Die Abbildung 3.40 B zeigt, dass die *ftsH2*⁻-Mutante, nach der Inkubation mit 1 mM NH₄Cl, bereits 40% der PSII-Aktivität verloren hat. Die Inkubation mit 5 mM NH₄Cl führte zu einem kompletten Verlust der photosynthetischen Aktivität (Abb. 3.40 B). Im Gegensatz dazu wurde die PSII-Aktivität der Wildtyp-Zellen nach einer Inkubation von bis zu 10 mM NH₄Cl nicht beeinträchtigt. Höhere Konzentrationen von Ammoniumchlorid führten stufenweise zur Abnahme der PSII-Aktivität in Wildtyp-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die *ftsH2*⁻-Zellen sensitiv gegenüber Ammoniak-Konzentrationen im Medium reagierten, welche die Wildtyp-Zellen nicht beeinträchtigten.

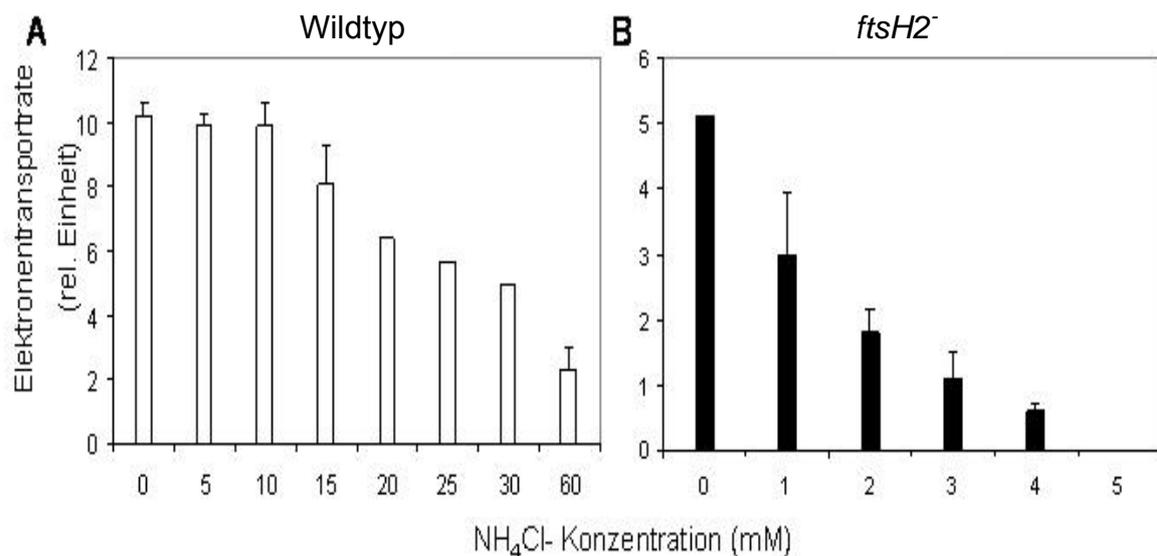


Abbildung 3.40: Ammonium-Toleranz in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Die Abbildung zeigt die Ammonium-Toleranz der Wildtyp- (A) und *ftsH2*⁻- (B) Zellen. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ammoniumchlorid mit Licht einer Photonenflussrate von 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für fünf Stunden inkubiert. Anschließend wurde die PSII-Aktivität (ETR) im WATER-PAM Chlorophyll Fluorometer bestimmt, wie unter Abschnitt 2.15.5.2 beschrieben. Die Werte sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

3.10 Inhibition der PSII-Aktivität in der Gegenwart von Ammoniak

Um die PSII-Aktivität in der Gegenwart von Ammoniak im Zeitverlauf zu untersuchen, wurden zwei voneinander unabhängige Methoden durchgeführt. Zunächst wurde die Sauerstoffentwicklung in der Clark-Elektrode (siehe Abschnitt

2.15.6) untersucht und die *in vivo* PSII-Aktivität durch die saturierende Pulsmethode mit aktinischem Licht einer Photonenfluenzrate von $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in dem WATER-PAM Chlorophyll Fluorometer gemessen, wie im Abschnitt 2.15.5.2 beschrieben. Damit gewährleistet wurde, dass die gemessene Sauerstoffproduktion von einem funktionierenden OEC/PSII produziert wird und gleichzeitig ausgeschlossen werden kann, dass Artefakte, wie Quenching-Effekte gemessen werden, wurden die Sauerstoffmessungen in der Gegenwart von einem künstlichen Elektronenakzeptor-System (1 mM 2,5-Dimethyl-Benzochinon und 1 mM Kaliumhexacyanidoferrat(III)) und mit saturierendem Licht der Photonenfluenzrate von $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durchgeführt. Die photosynthetische Sauerstoffentwicklung wurde in $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg Chlorophyll}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ in Abhängigkeit der Zeit in Abbildung 3.41 A grafisch dargestellt. Die ETR-Werte wurden gegen die Zeit in Abbildung 3.41 B grafisch dargestellt. Eine temporäre Reduktion der Sauerstoffentwicklung (A), sowie der PSII-Aktivität (B) wurde in Wildtyp-Zellen, als Reaktion auf die Ammoniak-Zugabe beobachtet, allerdings stieg die photosynthetische Aktivität nach 240 min wieder bis fast zum Ausgangswert. Im Gegensatz dazu sank die photosynthetische Aktivität der *ftsH2*-Zellen in der Gegenwart von Ammoniak innerhalb von 400 min bis auf den Wert Null (Abb. 3.41 A). Hingegen zeigte die photosynthetische Aktivität der *ftsH2*- und Wildtyp-Kontrollzellen im Nitratmedium keine Veränderungen.

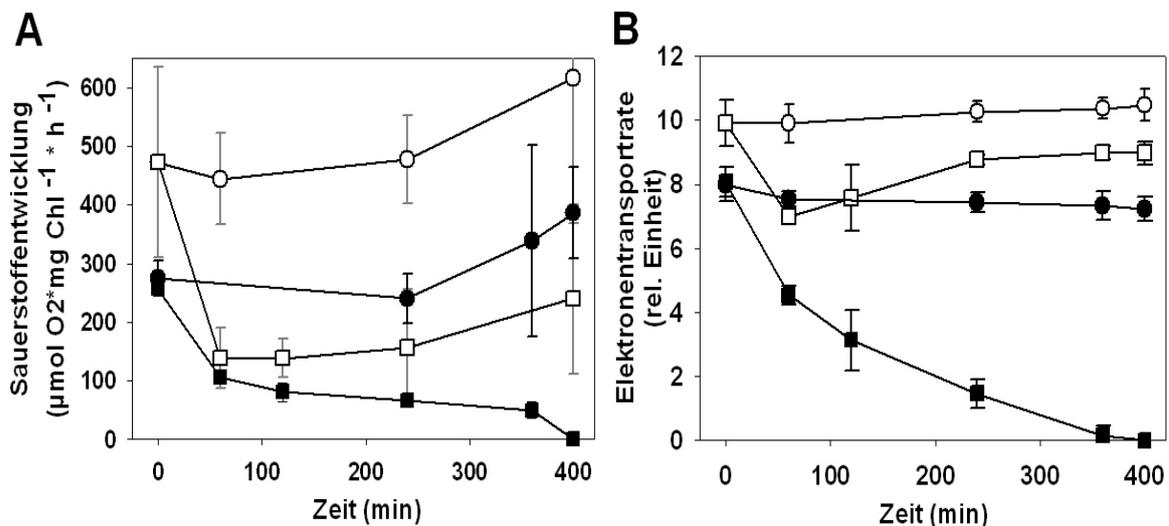


Abbildung 3.41: PSII-Inhibition in der Gegenwart von Ammoniak. Die Abbildung zeigt die PSII-Inhibition bei einer Photonenfluenzrate von $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in der Gegenwart von 5 mM NH_4Cl , gemessen mit der Clark-Elektrode (A) und dem PAM Chlorophyll Fluorometer (B). Exponentiell wachsende Kulturen von Wildtyp- (offene Symbole) und *ftsH2*- (geschlossene Symbole) Zellen wurden mit 5 mM Ammoniumchlorid (Quadrate) und zur Kontrolle in BG-11^N Medium (Kreise) inkubiert. Nach angegebenen Zeitpunkten wurden die ETR und die Sauerstoffproduktion gemessen. Die Daten sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und die Balken geben die jeweiligen Standardabweichungen an.

Da die Daten der PSII *in vivo* Analyse mit den Daten der Clark-Elektrode in beiden Durchführungen miteinander korrelierten, wurden in weiteren Messungen nur die experimentell einfacheren PAM-Messungen durchgeführt.

3.11 Inhibition der PSII-Aktivität in Abhängigkeit der Lichtintensität

Da die Mutante in der Gegenwart von Ammoniak die PSII-Aktivität verliert und die FtsH2-Protease, die wie bereits erwähnt, in dem D1-Reparaturzyklus involviert ist, wurde eine Schädigung des PSII in diesem Prozess vermutet.

Daher wurde die Sensitivität gegenüber Ammoniak mittels der PSII-Aktivitätsmessung in Abhängigkeit der Photonenflussrate des Lichts untersucht. Dazu wurden die Zellen in der Gegenwart von 5 mM NH₄Cl mit Licht der Photonenflussraten von 10, 20 und 40 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und im Dunkeln inkubiert. Die ETR-Werte wurden nach angegebenen Zeitpunkten gemessen und in Abb. 3.42 gegen die Zeit grafisch dargestellt. Während der Inkubation der *ftsH2*⁻ Zellen mit 10 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nahm die PSII-Aktivität innerhalb von 60 min um 40% ab, nach 220 min war keine photosynthetische Aktivität mehr messbar (Abb. 3.42 B). Die Inkubation von *ftsH2*⁻-Zellen mit einer Photonenflussrate von 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zeigte eine Abnahme von 70% nach 40 min und nach 180 min konnte keine PSII-Aktivität mehr gemessen werden. Die Inkubation mit einer Photonenflussrate von 40 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ inhibierte die Aktivität schneller, schon nach 120 min erfolgte ein kompletter Verlust der PSII-Aktivität (Abb. 3.42 B). Allerdings befähigte die Inkubation im Dunkeln die *ftsH2*⁻-Zellen die PSII-Aktivität aufrecht zu erhalten (Abb. 3.42 B). In den Wildtyp-Zellen nahm die PSII-Aktivität zunächst um 30-50% innerhalb von 60 min Inkubation ab und stieg anschließend bis fast zum Ausgangswert wieder an (Abb. 3.42 A). Die Abnahme der PSII-Aktivität in den *ftsH2*⁻-Zellen erfolgte in Abhängigkeit der Photonenflussrate, denn stärkere PSII-Inhibitionen sind bei höheren Lichtintensitäten zu beobachten. Im Gegensatz dazu regenerierten die Wildtyp-Zellen die PSII-Aktivität nach anfänglicher Reduktion wieder bis fast zum Ausgangswert (Abb. 3.42 A).

Diese Daten zeigten, dass Ammoniak das PSII lichtabhängig schädigt. Zudem scheint die FtsH2-vermittelte Reparatur für die Ammoniak-Toleranz der Wildtyp-

Zellen verantwortlich zu sein, denn in den *ftsH2*⁻-defizienten Mutanten, in denen die PSII-Reparatur vermindert stattfand, konnte die PSII-Aktivität im Licht nicht regeneriert werden.

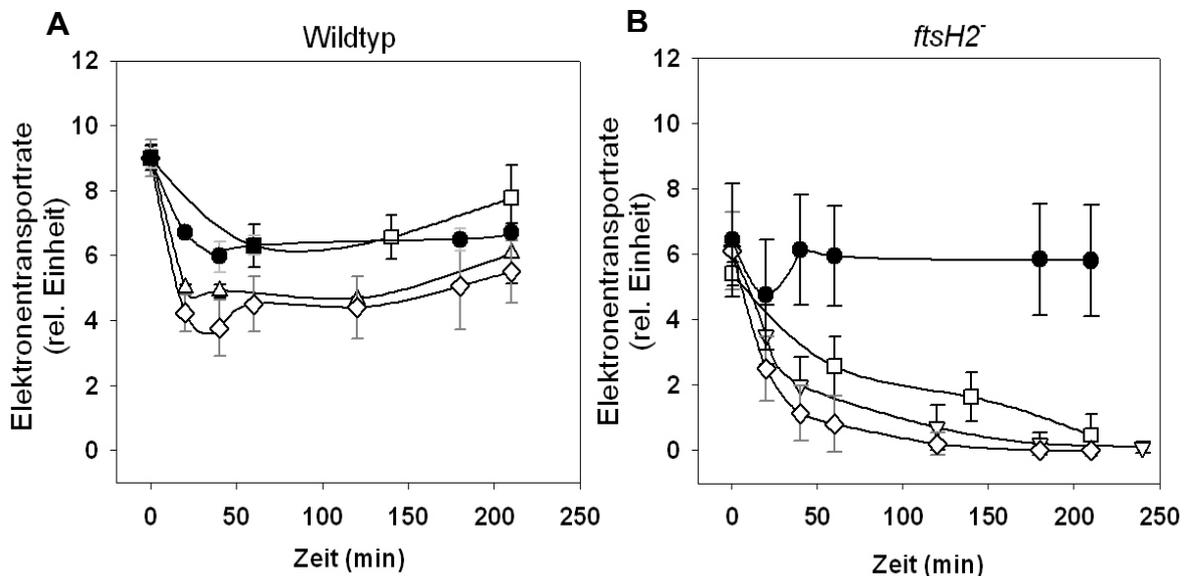


Abbildung 3.42: Die lichtabhängige PSII-Inhibition in der Gegenwart von Ammoniak. Die Abbildung zeigt die PSII-Inhibition in Abhängigkeit steigender Photonenflussraten in der Gegenwart von Ammoniak. Wildtyp- (A) und *ftsH2*⁻ (B) Zellen wurden mit 5 mM NH₄Cl unter verschiedenen Photonenflussraten: 10 (Quadrate), 20 (Dreiecke) und 40 (Rauten) µmol m⁻² s⁻¹ oder in Dunkelheit (Kreise) inkubiert. Nach angegebenen Zeitpunkten wurde die ETR in dem WATER-PAM Chlorophyll Fluorometer gemessen. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

3.12 Abhängigkeit der Ammonium-Toleranz vom FtsH2-vermittelten PSII-Reparaturzyklus

3.12.1 Inhibition des PSII-Reparaturzyklus in der Gegenwart von Ammoniak

Der D1-Reparaturzyklus des PSII befähigt die Cyanobakterien- und Pflanzenzellen Schädigungen des PSII zu überleben (Aro *et al.*, 1993). Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob der fehlende PSII-Reparaturzyklus die Ammonium-Sensitivität in den *ftsH2*⁻-Zellen bewirkt. Dazu wurde in Wildtyp-Zellen der PSII-Reparaturzyklus inhibiert. Dieses konnte durch die Hemmung der Proteinbiosynthese mit einem Antibiotikum erfolgen, denn der Austausch des D1-(PsbA) Proteins und dadurch die Reparatur des PSII, erfolgt nur in der

Abhängigkeit von dessen Neusynthese (Nixon *et al.*, 2005). Das Resultat des Experiments ist in Abbildung 3.43 dargestellt.

Die Inhibition der Proteinbiosynthese in der Gegenwart von Ammonium führte in den Wildtyp-Zellen zu einer Abnahme der ETR von 80% innerhalb von 280 min. Dies zeigte, dass die Wildtyp-Zellen sensitiv auf Ammoniak im Licht reagierten, wenn der PSII-Reparaturzyklus durch Chloramphenicol gehemmt wurde. Durch die Inhibition der Proteinsynthese wiesen die Wildtyp-Zellen den gleichen Phänotyp auf wie die *ftsH2*⁻-Mutante (Abb. 3.43 A). Die Behandlung mit Chloramphenicol beschleunigte aber nicht die Abnahme der ETR in den *ftsH2*⁻-Zellen (Abb. 3.42 B und Abb. 3.43 A).

Weder in Wildtyp- noch in *ftsH2*⁻-Zellen mit Chloramphenicol in Abwesenheit von Ammoniumchlorid, konnte eine Inhibition der PSII-Aktivität beobachtet werden (Abb. 3.43 B). Die Daten bestätigen, dass die Ammonium-Toleranz in *Synechocystis* sp. PCC 6803 von dem Reparaturzyklus des PSII, vermittelt durch die FtsH2-Protease, abhängig ist.

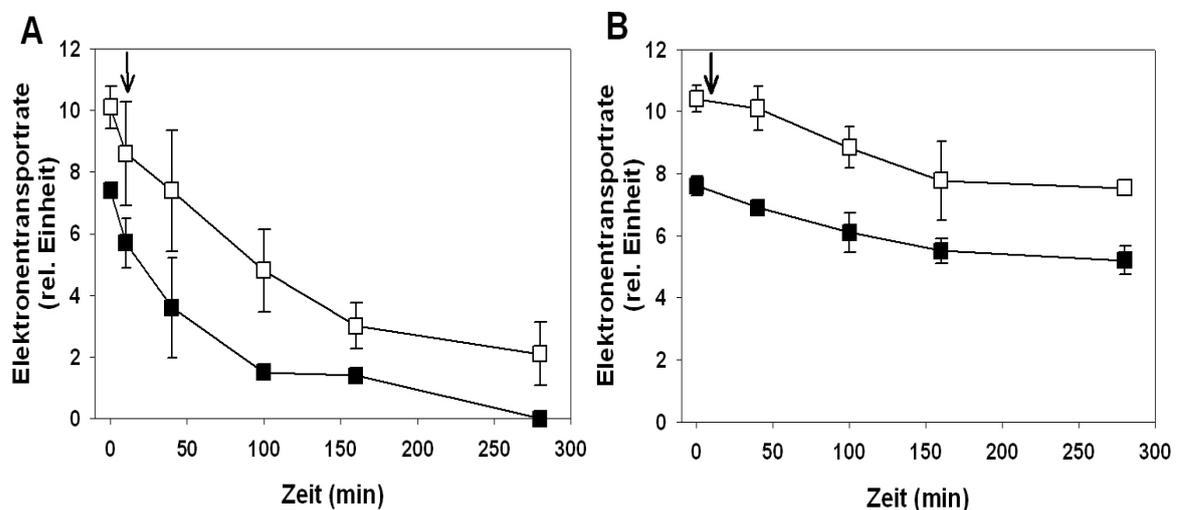


Abbildung 3.43: Inhibition des PSII-Reparaturzyklus. Das Experiment wurde (A) in der Gegenwart von 5 mM NH₄Cl und (B) in Abwesenheit von Ammoniak durchgeführt. Die Wildtyp- (offene Symbole) und *ftsH2*⁻ (geschlossene Symbole) Kulturen wurden für zehn min mit 5 mM NH₄Cl oder zur Kontrolle in BG-11^N Medium ohne NH₄Cl inkubiert und die Proteinbiosynthese durch die Zugabe von Chloramphenicol (30 µg/ml) in beiden Kulturen inhibiert (Pfeil). Die Zellen wurden mit Licht der Photonenflussdichte von 20 µmol m⁻² s⁻¹ bestrahlt und nach angegebenen Zeiten die ETR in dem WATER-PAM Chlorophyll Fluorometer ermittelt (siehe 2.15.5.2). Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Balken geben die Standardabweichung an.

3.12.2 Abbau des D1- (PsbA) Proteins in der Gegenwart von Ammoniak

Der direkte Effekt von Ammoniak auf die D1-Degradierung wurde mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse untersucht. Dazu musste, wie oben erwähnt (3.12.1) die Proteinbiosynthese gehemmt werden, um den FtsH2-vermittelten Abbau beobachten zu können. In Wildtyp-Zellen in Gegenwart von Ammoniak (NH_3) wurde D1 innerhalb von 150 min vollständig abgebaut, während das D1-Protein in BG-11^N Medium nach 230 min noch stabil war (Abb. 3.44 A). Der Abbau von D1 in den Mutanten fand, wie erwartet, aufgrund der fehlenden FtsH2-Protease nicht statt (Abb. 3.44 B). Diese Daten zeigten einen beschleunigten Abbau des geschädigten D1-Proteins in der Anwesenheit von Ammoniak durch die FtsH2-Protease, im Vergleich zu einem schwachen Abbau des D1-Proteins in Nitrat-inkubierten Zellen.

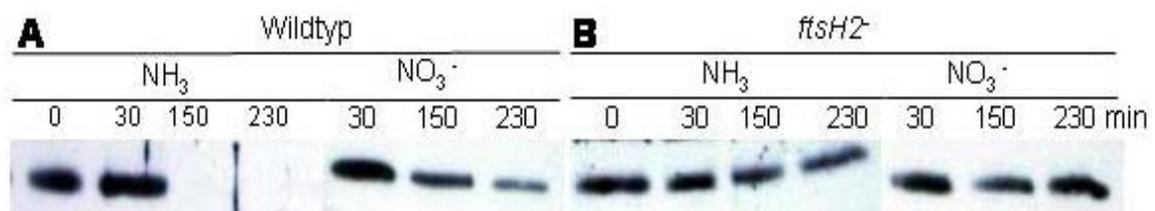


Abbildung 3.44: Western-Blot-Analyse des D1-Proteins in der Gegenwart von unterschiedlichen Stickstoffquellen. Die Wildtyp- (A) und *ftsH2*- (B) Zellen wurden in der Gegenwart von Ammoniak (NH_3) oder Nitrat (NO_3^-) für zehn min inkubiert und anschließend wurde den Kulturen Chloramphenicol (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugegeben (Pfeile). Die Zellen wurden mit Licht der Fluenzrate von 20 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ inkubiert. Die Proteinextrakte, die einer Chlorophyll *a*-Konzentration von 10 μg entsprachen, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.12.6.2.1) und D1 wurde immunologisch nachgewiesen (siehe 2.13 und Tab. 2.5).

Die Bedeutung der FtsH2-Protease für die Toleranz der Zellen gegenüber Ammoniak zeigte auch eine Northern-Blot-Analyse des *ftsH2*-Gens, denn die Expression von *ftsH2* (*slr0228*) stieg bedeutsam in der Gegenwart von Ammoniak an (N. Kloft; nicht veröffentlicht).

3.13 Wellenlängen-abhängige Inhibition der PSII-Aktivität in der Gegenwart von Ammoniak

Bereits veröffentlichte Studien zeigten, dass die Absorption von Blau- und UV-A-Licht eine Schädigung des Mangan-Komplexes im OEC des PSII in

Cyanobakterien und Pflanzen auslöst (Ohnishi *et al.*, 2005; Hakala *et al.*, 2005). Ebenfalls war bekannt, dass Ammoniak im PSII den Mangan-Komplex als einen überbrückenden Liganden bindet (Evans *et al.*, 2005; Britt *et al.*, 2004). Um das Zusammenspiel von Licht und Ammoniak während der PSII-Inhibition zu untersuchen, wurde ein Aktionsspektrum der Photoinhibition des PSII in der Gegenwart von Ammoniak erstellt (siehe Abb. 3.45). Die Bestrahlung der *ftsH2*⁻-Zellen in Gegenwart von Ammoniak mit Licht der Wellenlängen 442-700 nm zeigte eine geringe Abnahme der PSII-Aktivität von 4-25%. Licht der Wellenlänge 680 nm und 700 nm, das von Chlorophyll *a* absorbiert wird, hatte keinen Effekt auf die PSII-Aktivität. Eine geringe Abnahme der ETR um 25% zeigten Zellen, die mit Licht der Wellenlänge 621 nm (Absorptionsmaximum der Phycobilisomen) bestrahlt wurden. Die größte Reduktion der PSII-Aktivität wurde nach der Bestrahlung mit Wellenlängen im Blau- und UV-A-Bereich des Lichts gemessen. Die Bestrahlung mit 421 nm bewirkte einen ETR-Verlust von 30%, die Beleuchtung mit 393 nm einen Verlust von 60%. Eine drastische PSII-Inhibition von 85% wurde nach der Bestrahlung mit UV-A (360 nm) gemessen. Die PSII-Aktivität der Wildtyp-Zellen wurde durch die Bestrahlungen nicht beeinträchtigt (Abb. 3.45). Ebenso zeigte die Mutante in Abwesenheit von Ammoniumchlorid keine Schädigung der PSII-Aktivität unter gleichen Bedingungen (Abb. 3.45).

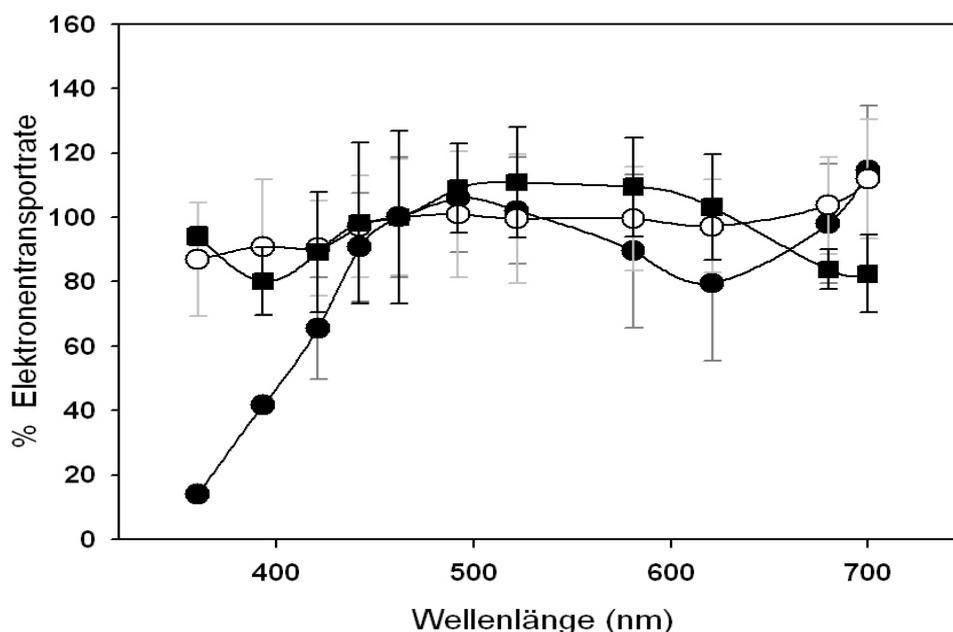


Abbildung 3.45: Inhibition der PSII-Aktivität. Wildtyp- (Quadrate) und *ftsH2*⁻ (geschlossene Kreise) Kulturen in der Gegenwart von 5 mM NH₄Cl und *ftsH2*⁻-Kultur in BG-11^N Medium ohne Ammoniak (offene Kreise). Die Bestrahlung erfolgte mit Licht der angegebenen Wellenlängen und einer Fluenzrate von 5 μmol Photonen m⁻² s⁻¹, gleichen Energiegehalts, für 240 min. Die 100% Werte entsprechen dem gemessenen Wert bei der Wellenlänge von 462 nm. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

4 Diskussion

I. Charakterisierung der *Mmap2* in *Synechocystis* sp. PCC 6803

Im Genom des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 kodieren drei Gene für MetAP`s (Kaneko *et al.*, 1996; Atanassova *et al.*, 2003). Im Vergleich der Primärsequenzen der cyanobakteriellen MetAP`s mit der der MetAP aus *E.coli* weisen die cyanobakteriellen MetAP`s hoch konserviert vorliegenden Aminosäuren auf, die für eine Peptidaseaktivität verantwortlich sind. Die cyanobakteriellen, rekombinant aufgereinigten Enzyme zeigten *in vitro* Peptidaseaktivität (Atanassova *et al.*, 2003).

Die physiologischen Funktionen der MetAP`s in *Synechocystis* sp. PCC 6803 waren bisher unbekannt. In dieser Arbeit wurde eine Charakterisierung des Phänotyps der MetAP2-defiziente Mutante (*Mmap2*) unter Stressbedingungen, sowie unter photoautotrophen Standardbedingungen angestrebt. Ebenso war die molekularbiologische Charakterisierung des *map-2*-Gens und dessen Transkriptions-Regulation ein Ziel dieser Arbeit.

4.1 Das Photosystem (PS) II der *Mmap2*-Zellen ist in seiner Funktion beeinträchtigt

4.1.1 Ist das D1- (PsbA) Protein ein direktes Substrat der MetAP2 in *Synechocystis* sp. PCC 6803?

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das PSII der MetAP2-defizienten Mutante eine Beeinträchtigung der PSII-Akzeptorseite aufweist (siehe Abschnitt 3.3.4 und 3.3.5). In PSII *in vivo*- und Wachstumsanalysen zeigten die *Mmap2*-Zellen eine Toleranz gegenüber dem Photosynthese-Inhibitor 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-Dimethyl-urea (DCMU) (Abb. 3.18 und 3.19), denn dieser bindet in geringerer Affinität in der Q_B-Bindenische der *Mmap2*-Zellen. Somit wird der Elektronentransport in der Gegenwart von subletalen DCMU-Konzentrationen weniger inhibiert, wie es für die Wildtyp-Zellen gezeigt wurde (Abb. 3.18). DCMU

ist ein Totalherbizid und bindet synergistisch und nicht-kovalent an die Plastochinon Q_B -Bindenische des PSII. Dadurch werden die nativen Plastochinone aufgrund einer höheren Affinität zur Bindenische verdrängt und der Elektronentransport kommt zum Stillstand, da DCMU nicht als Elektronenakzeptor fungieren kann (Oettmeier, 1999). Fortlaufende Reaktionen schädigen dann das Reaktionszentrum des PSII (Rutherford und Krieger-Liszkay, 2001).

Im Gegensatz zu der DCMU-Toleranz bewirkte das kleinere Benzochinon-Analog (1,4-Benzochinon) einen partiell inhibitorischen Effekt auf die Q_B -Akzeptorstelle im PSII der *Mmap2*-Zellen, was durch verringerte variable Fluoreszenz und eine geringere Sauerstoffentwicklung im PSII festgestellt wurde (Abb. 3.16 und 3.17). Vermutlich bindet das 1,4-Benzochinon fest in der Q_B -Bindenische der *Mmap2*-Zellen, anstatt als künstlicher Elektronenträger zu fungieren, wie es für die Hill-Reaktion beschrieben wurde (Hill, 1937).

All diese Daten zeigen eindeutig eine veränderte Q_B -Bindenische an der PSII-Akzeptorseite in der MetAP2-defizienten Mutante.

Veränderte Bindungsaffinitäten oder Resistenzen gegenüber dem Photosynthese-Inhibitor DCMU können in *Synechocystis* sp. PCC 6803 und in höheren Pflanzen durch Mutationen einzelner Aminosäuren des D1-Proteins in der Q_B -Bindenische (in der Aminosäuren-Region Phe211 und Leu275) ausgelöst werden (Hirschberg *et al.*, 1987; Dalla Chiesa *et al.*, 1997; Narusaka *et al.*, 1998). So ist die D1-Mutante in *Synechocystis* sp. PCC 6803, die eine Mutation in Ser264 aufweist, sowie die D1-Mutante in *Glycine max* resistent gegenüber dem Photosynthese-Inhibitor Atrazin, der wie DCMU in der Chinon-Bindenische bindet (Alfonso *et al.*, 1996 und 2004).

Die Q_B -Bindenische wird von dem D1-Protein in photosynthetisch aktiven Organismen gebildet (Kern *et al.*, 2005; Übersichtsartikel: Barber, 2006). In *Synechocystis* sp. PCC 6803 und in *Spinacia oleracea* (Spinat) sind an der Bildung der Q_B -Bindenische und an dem Prozess der Chinon-Bindung noch weitere LMW- (*low molecular weight*) Untereinheiten PsbX und PsbK involviert (Übersichtsartikel: Shi und Schröder, 2004).

Basierend auf den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen und den erwähnten, veröffentlichten Studien, ist davon auszugehen, dass in den MetAP2-defizienten Zellen das D1-Protein im PSII-Zentrum nicht korrekt gefaltet und assoziiert ist.

Eine Erklärung für die fehlerhafte Assoziation des D1-Proteins wäre die fehlende Prozessierung durch die MetAP2, vorausgesetzt D1 ist ein Substrat der MetAP2 in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Normalerweise zeigen MetAP's aller Organismen eine enge Substratspezifität und deren prozessive Aktivität ist von der des Methionins benachbarten Aminosäure am N-Terminus abhängig. Ist diese Aminosäure klein und ungeladen (wie Threonin, Glycin, Valin oder Cystein) findet die Prozessierung statt (Tsunasawa *et al.*, 1985; Ben-Bassat *et al.*, 1987). Die N-terminalen Aminosäuren von D1 (PsbA1-3) in *Synechocystis* sp. PCC 6803 sind Met-Thr-Thr (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/>) und es wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 69% am N-Terminus prozessiert (<http://www.isv.cnrs-gif.fr/terminator2/index.html>). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass D1 ein Substrat einer MetAP ist.

In dieser Arbeit konnte mittels immunologischer Nachweisreaktion des D1-Proteins in Thylakoidfraktionen kein Unterschied in Synthese und Lokalisation zwischen Wildtyp- und *Mmap2*-Zellen unter photoautotrophen Standardbedingungen festgestellt werden (siehe Abb. 3.23). Allerdings lässt die Western-Blot-Analyse nur beschränkt Rückschlüsse zu, da post-translationelle Modifikationen der Proteine dadurch nicht festgestellt werden können. Um eine genauere Aussage machen zu können, ob das D1-Protein durch die MetAP2 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 prozessiert wird, müssten sich weitergehende Experimente anschließen. Aussagekräftig wäre eine zwei-dimensionale *Blue-native* PAGE der Thylakoide anzufertigen, um über eine anschließende MALDI-TOF-Analyse die N-terminale Primärsequenz des D1-Proteins zu analysieren. Ebenso wären Interaktionsstudien weitere, sinnvolle Projekte, um die Substrate der MetAP2 zu identifizieren.

4.1.2 In dem PSII der *Mmap2*-Zellen ist das CP47-Protein fehlerhaft assoziiert

Im PSII-Komplex der MetAP2-Mutante ist die Menge des Antennenproteins CP47 deutlich reduziert, wie es mittels spektroskopischen und biochemischen Analysen in dieser Arbeit ersichtlich wurde (siehe Abschnitt 3.4). Diese Daten erklären den geringeren Fluoreszenz-Anstieg in *Mmap2*-Zellen während der Bestrahlung mit hohem aktinischem Licht (siehe Abb. 3.15), denn das PSII der *map-2*-Mutante ist aufgrund der reduzierten CP47-Antenne unter diesen Bedingungen nicht saturiert.

Eine weitere interessante Beobachtung, die in diesem Zusammenhang erwähnt werden sollte, stellt der Carotinoid-Gehalt in der Peptidase-Mutante dar (siehe Abschnitt 3.3.2, Tab. 3.1). Im Gegensatz zum Wildtyp zeigt die Mutante einen erhöhten Gesamtcarotinoidgehalt mit höherer relativer Abundanz der β -Carotine und einer geringeren relativen Menge des Myxoxantophylls (Tab. 3.1). Diese Carotinoidzusammensetzung ist vergleichbar mit der einer *Synechocystis*-Schwachlichtkultur (Steiger *et al.*, 1999). Wird davon ausgegangen, dass unter Standardbedingungen (in BG-11^N Medium und 80 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) die Carotinoid-Biosynthese nicht beeinflusst wird, so herrscht in der *map-2*-Mutante ein geringerer Carotinoidabbau. Dies zeigt, dass die Mutante im Gegensatz zum Wildtyp unter gleichen Lichtbedingungen geringem photooxidativen Stress ausgesetzt ist. Bekanntermaßen wird den Carotinoiden, vor allem den β -Carotinen der Pflanzen und photosynthetisch aktiven Prokaryonten eine wichtige Rolle als Schutz der Reaktionszentren vor Photooxidation zugeteilt (Telfer *et al.*, 1994). Eine Erklärung für den Schwachlichtstatus der *Mmap2*-Zellen könnte die geringe Anregung des PSII-Reaktionszentrums, aufgrund der reduzierten, inneren Antenne (CP47) sein.

Weiterhin konnte mittels Western-Blot-Analyse gezeigt werden, dass die Gesamtmenge des CP47-Proteins in *Mmap2*-Zellen nicht durch die Mutation beeinträchtigt ist (siehe Abb. 3.23). Dies zeigt, dass die Synthese des CP47-Proteins nicht der limitierende Faktor für den Einbau im PSII der *Mmap2*-Zellen ist. Es ist also davon auszugehen, dass die Assoziation des CP47 in dem PSII der Mutante fehlerhaft ist. Mehrere Möglichkeiten sind daher denkbar:

a) Da CP47 unerwartet auch in dem Überstand der Thylakoid-Präparation, die lösliche Proteine und Plasmamembranen enthielt nachgewiesen wurde (siehe Abb. 3.23 und 3.24) ist es möglich, dass CP47 aus dem PSII-Komplex der *Mmap2*-Zellen durch die Präparation gelöst wurde. Damit wäre CP47 nicht fest im PSII der Mutante assoziiert, denn sogar unter Wildtyp-Bedingungen (in Gegenwart von Detergenzien) kann CP47 nicht leicht aus den Thylakoiden isoliert werden (Bricker und Frankel, 2002). Diese Möglichkeit impliziert einen direkten Einfluss von MetAP2 auf CP47, was aufgrund der Primärstruktur von CP47 möglich wäre. Allerdings spricht dagegen, dass eine Reduktion des CP47-Proteins im PSII der intakten *Mmap2*-Zellen spektroskopisch sichtbar ist (siehe Abschnitt 3.4.1).

b) Eine wahrscheinlichere Erklärung ist eine beeinträchtigte Assemblierung des CP47 in dem PSII der Mutante, aufgrund einer fehlerhaften Assoziation des D1-Proteins, das vermutlich in der MetAP2-defizienten Mutante erfolgt (s.o.).

Eine fehlerhafte Assoziation des CP47-Proteins konnte ebenfalls für eine D1-Deletionsmutante in *Synechocystis* sp. PCC 6803 beschrieben werden (Komenda *et al.*, 2004). In dieser Mutante wurden drei Gene (*psbA1-3*), die für die D1-Proteine kodieren inaktiviert und somit war keine D1-Synthese in diesen Zellen möglich. In zwei-dimensionalen *Blue-native* PAGE und Pulse Chase-Experimenten wurde deutlich, dass die Proteine des Kernkomplexes CP43, CP47, D2 und Cytochrom *b₅₅₉* synthetisiert wurden, aber nicht in den PSII-Komplexen assoziiert waren (Komenda *et al.*, 2004). Die Autoren zeigten, dass die Akkumulation von D1 und die fortlaufende Assemblierungen einzelner Untereinheiten zur Bildung eines vollständigen Komplexes von der geordneten Abfolge der PSII-Assoziation abhängig ist (Komenda *et al.*, 2004). Mutationen oder Inaktivierungen einzelner PSII-Untereinheiten führten zu instabilen PSII-Komplexen oder zu der Abwesenheit einzelner Proteine (Shen *et al.*, 1994; Komenda *et al.*, 2004).

Es ist bekannt, dass die Bindung der Antennenproteine CP47 und CP43 an dem D1-D2-Heterodimer essentiell für die Sauerstoffbildung ist (Hankamer *et al.*, 2001). Auch in höheren Pflanzen bildet CP47 die Bindungsseiten der extrinsischen Proteine PsbO, PsbP und PsbQ, die an der katalytisch aktiven Seite in der Nachbarschaft des Mangan-Komplexes liegen und die Sauerstoffproduktion verstärken (Bricker und Frankel, 1988; Enami *et al.*, 1991 und 1997; Razeghifard *et al.*, 1997). Zudem zeigen PSII-Mutanten in *Synechocystis* sp. PCC 6803 ein

reduziertes photoautotrophes Wachstum (Ikeuchi *et al.*, 1991; Keren *et al.*, 2005b). Hinsichtlich dieser Studien wäre zu erwarten, dass die MetAP2-defiziente Mutante aufgrund der reduzierten Quantität von CP47 und eine beeinträchtigte D1-Assoziation im PSII eine reduzierte Sauerstoffentwicklung und eine verringerte Wachstumsrate zeigen. Interessanterweise beeinträchtigt die Mutation des *map-2*-Gens die Lebensfähigkeit der Zellen unter photoautotrophen Standardbedingungen nicht, wie Wachstumsanalysen dieser Arbeit zeigten (siehe Abschnitt 3.3.1; Abb. 3.12 und Abschnitt 3.3.3; Abb. 3.14). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Donorseite in *Mmap2* intakt ist, da das CP47-bindende PsbO-Protein im PSII-Komplex der Peptidase-Mutante Wildtyp-ähnlich lokalisiert ist, wie es mittels Western-Blot-Analysen experimentell bestätigt wurde (siehe Abschnitt 3.4.2.1, Abb. 3.23). Jedoch konnte eine veränderte Assoziation und somit ein Defekt der Donorseite mithilfe dieser Methode nicht untersucht werden.

Zudem ist es möglich, dass unter Standardbedingungen die vorhandene MetAP3 die Funktion der MetAP2 ausführt, was unter Stressbedingungen aufgrund der differenziellen Expression der *map*-Gene nicht erfolgen kann (siehe Abschnitt 3.5). Somit könnte es zu dem ausgeprägteren Phänotyp der MetAP2-defizienten Mutante unter Stressbedingungen kommen (siehe Abschnitt 3.1, 3.2, 3.4.1). Das könnte auch die erhöhte Expression des *map-3*-Gens in der Abwesenheit des *map-2*-Gens unter Stickstoffmangel erklären (siehe Abschnitt 3.5.5). Diese Möglichkeit setzt allerdings voraus, dass MetAP2 und MetAP3 *in vivo* die gleichen Substrate prozessieren. Eine bereits veröffentlichte Studie zeigte eine ähnliche *in vitro* Peptidaseaktivität für die MetAP2 und MetAP3 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 gegenüber den getesteten Tripeptiden, wobei MetAP2 eine leicht eingeschränkte Aktivität aufwies (Atanassova *et al.*, 2003). Um dies genauer zu analysieren müssten die entsprechenden MetAP`s unter Umweltbedingungen exprimiert werden, unter denen MetAP2 exprimiert wird (siehe Abschnitt 3.5.5). Diese Untersuchungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Ein *Mmap2*-ähnlicher Phänotyp wurde in einer kürzlich publizierten Studie in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* und in *Arabidopsis thaliana* beschrieben. Interessanterweise zeigten die Autoren, dass die N-terminale Entfernung des

Methionins zellulärer Proteine für die Biogenese des PSII essentiell ist (Giglione *et al.*, 2003). Für diese Analysen wurde in *C.reinhardtii* und in den Chloroplasten der *A.thaliana* das Enzym Peptid-Deformylase inhibiert, das für die Entfernung des *N*-formyl-Methionins neu synthetisierter Proteine in Prokaryonten verantwortlich ist. Ohne die Entfernung des *N*-formyl-Methionins kann die Methionin-Aminopeptidase das Methionin der neu-synthetisierten Proteine nicht abspalten. Die Organismen zeigten eine Dosis-abhängige Reduktion der photosynthetischen Aktivität in der Gegenwart des Inhibitors, sowie eine geringere Akkumulation der PSII-Untereinheiten D1, D2, CP43, CP47 und PsbH. Diese PSII-Untereinheiten konnten nicht in den Komplex assoziieren, was zu einem schnelleren Abbau dieser Untereinheiten führte (Giglione *et al.*, 2003).

4.1.3 Das PSII der *Mmap2*-Zellen ist nicht resistent gegenüber Stress

Unter Stressbedingungen, wie Stickstoffmangel (siehe Abschnitt 3.1) und Hochlichtbestrahlung (siehe Abschnitt 3.2), bei denen das PSII besonderen Belastungen ausgesetzt wird, verstärkt sich der *Mmap2*-Phänotyp. Dieses äußerte sich darin, dass die Peptidase-Mutante die PSII-Aktivität auf Dauer nicht aufrechterhalten konnte, was mit einem Verlust der Lebensfähigkeit korrelierte (siehe Abschnitt 3.1.4 und 3.2.3).

In bereits publizierten Studien in dem Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* PCC 7492 konnte während des Stickstoffmangels gezeigt werden, dass die Aufrechterhaltung der Zellvitalität ein lichtabhängiger und somit eine Photosynthese-abhängiger Prozess ist. Die Aufrechterhaltung der photosynthetischen Restaktivität ist essentiell in *Synechococcus elongatus* PCC 7492, um die Grundenergieversorgung der Zelle für wesentliche Proteinbiosynthesen zu gewährleisten, vor allem von Proteinen des Photosyntheseapparates und den Komponenten, die an der Stickstoffassimilation beteiligt sind. Dadurch ist eine schnelle Regeneration des Zellwachstums in der Gegenwart von Stickstoff möglich. In langzeit-chlorotischen *Synechococcus*-Zellen wurde ein minimaler Chlorophyll *a*-Gehalt von etwa 0,16% und ein Elektronenfluss durch beide Photosysteme von 0,1% gemessen, im Vergleich zu vegetativen Zellen (Sauer *et al.*, 2001).

Eine Funktion der MetAP2 in den einleitenden Prozessen der Chlorose konnte experimentell ausgeschlossen werden, wie detaillierte Untersuchungen der *Mmap2*-Zellen in den ersten Phasen der Chlorose in dieser Arbeit zeigten (siehe Abschnitt 3.1; Abbildung 3.2 und 3.3). Die Analyse des Phänotyps der MetAP2-defizienten Mutante in Langzeit-Chlorose zeigte, dass die *Mmap2*-Zellen die Fähigkeit den Elektronenfluss durch das PSII aufrecht zu erhalten mit der Zeit verlieren, was zum Zelltod führt (siehe Abb. 3.4). Somit ist MetAP2 essentiell für die Erhaltung der PSII-Aktivität und dadurch verantwortlich für die Lebensfähigkeit der Zellen während des Stickstoffmangels.

Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben ist *Mmap2* sensitiv gegenüber Hochlicht (siehe Abschnitt 3.2). Die Reduktion der PSII-Aktivität korreliert in den *Mmap2*-Zellen mit einer reduzierten Überlebensfähigkeit, im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen. Diese reduzieren die PSII-Aktivität aufgrund der Hochlicht-Exposition ohne an Lebensfähigkeit zu verlieren (siehe Abb. 3.9 und 3.11). Zudem konnte in *Mmap2*-Zellen eine erhöhte D1-Menge, die nicht in den Thylakoiden inkorporiert waren, beobachtet werden, im Vergleich zu Wildtypzellen (siehe Abschnitt 3.4; Abb. 3.24). Dieses Ergebnis könnte auf eine gesteigerte D1-Proteinsynthese aufgrund eines erhöhten D1-Umsatzes im PSII hindeuten und lässt eine erhöhte Schädigung des PSII in der MetAP2-defizienten Mutante vermuten. Denn schon publizierte Daten von Sippola und Tyystjärvi konnten zeigen, dass die *psbA*-Expression in *Synechocystis*-Zellen während der Hochlichtbestrahlung steigt, da unter diesen Bedingungen ein erhöhter D1-Reparaturzyklus für die Erhaltung des PSII essentiell ist (Sippola und Aro, 2000; Tyystjärvi *et al.*, 2002; Vass, 2007). Eine vermehrte D1-Reparatur in *Mmap2*-Zellen konnte auf Dauer die Schädigungen des PSII scheinbar nicht ausgleichen, wie es in den überlebenden Wildtyp-Zellen zu beobachten war (Abb. 3.11). Nach diesen Daten zu urteilen scheint die Hochlichtsensitivität der *map-2*-Mutante auf eine geringere Stabilität des PSII zurück zu führen zu sein.

Veröffentlichte Arbeiten zeigten, dass das Angleichen des Elektronenflusses an die Hochlichtbedingung zwischen den Photosystemen über zwei Aktivitäten erfolgt: 1.) Die Antennenkomplexe werden reduziert und 2.) die PSII/PSI-Stöchiometrie wird der Lichtbedingung angepasst. Das PSII/PSI-Verhältnis wird

reduziert, da die Expression der Gene, welche die PSI-Untereinheiten kodieren herunter reguliert wird (Fujimori *et al.* 2005). Die Reduktion der Antennenkomplexe und der PSII/PSI-Stöchiometrie erfolgt in den *Mmap2*-Zellen, wie in dieser Arbeit angefertigte Spektren der Zellen bei Raumtemperatur und Tieftemperatur während einer Hochlichtbestrahlung zeigten (siehe Abb. 3.10 und Abschnitt 3.4.1.2, Abb. 3.21).

4.2 Vergleich der *map-2*-Mutante mit phänotypisch ähnlichen PSII-Mutanten und die mögliche Beteiligung weiterer PSII-Untereinheiten am *Mmap2*-Phänotyp

Eine Sensitivität gegenüber einer Hochlicht-Exposition, sowie die Reduktion des Antennenproteins CP47 sind, wie in *Mmap2* ebenfalls für die *psbH*-Deletionsmutante in *Synechocystis* sp. PCC 6803 bekannt (Komenda und Barber, 1995). Die Mutante akkumuliert aufgrund dessen instabile PSII-Komplexe und diese in reduzierter Quantität (Komenda *et al.*, 2002; 2005a und b). In der Grünalge *C.reinhardtii* verursacht die *psbH*- (*ssl12598*) Deletion aufgrund beeinträchtigter Bildung vollständiger und hochmolekularer PSII-Komplexe einen PSII-defizienten Phänotyp (Summer *et al.*, 1997; O'Connor *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass bei einer schwachen Bindung von CP47 an das D1-D2-Heterodimer die Untereinheiten des PSII-Komplexes destabilisiert sind (de Vitry *et al.*, 1989; van Wijk *et al.*, 1995).

Eine Reduktion der Sauerstoffentwicklung in der Anwesenheit des 1,4-Benzochinons, sowie eine DCMU-Toleranz sind Merkmale der *Mmap2* (siehe Abschnitt 3.3.4 und 3.3.5), die ebenfalls *psbK*- und *psbX*-Deletionsmutanten in *Synechocystis* sp. PCC 6803 zeigten (Übersichtsartikel: Shi und Schröder, 2004). Die Mutationen der *psbK*- (*sml0005*) und *psbX*- (*sml0002*) Gene in *Synechocystis* sp. PCC 6803, sowie in *C.reinhardtii* beeinträchtigen die Quantität der PSII-Zentren und führen zu reduzierten und instabilen PSII-Komplexen (Ikeuchi *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1994). Bereits veröffentlichte Daten charakterisierten das PsbX-Protein und dessen Funktionen anhand von Mutanten-Analysen. PsbX (4,0 kDa) ist wichtig bei der Bindung und dem Umsatz der Chinonmoleküle an der Q_B-Akzeptorseite des PSII. In *Synechocystis* sp. PCC

6803 ist dessen Expression unter Hochlichtbestrahlung gesteigert (Funk *et al.*, 2000).

Die *psbX*-Mutante in *Synechocystis* sp. PCC 6803 zeigt Wildtyp-ähnliches, photoautotrophes Wachstum und Sauerstoffentwicklung, obwohl sie eine reduzierte Menge an PSII-Komplexen aufwies (Funk *et al.*, 2000).

Eine mögliche Beteiligung der PsbX- und PsbK-Proteine an der Ausbildung des Phänotyps der Peptidase-Mutante *Mmap2* müsste auf der post-transkriptionellen Ebene stattfinden, da mittels semi-quantitativer RT-PCR in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass das Expressionsmuster der *psbK*- und *psbX*-Gene in *Mmap2*-Zellen Wildtyp-ähnlich ist (Abschnitt 3.3.5; Abb. 3.19 A). Es kann somit ausgeschlossen werden, dass MetAP2 einen Einfluss auf die Transkription von *psbK* und *psbX* hat. Eine weitere Analyse der Interaktion von MetAP2 und PsbK, sowie PsbX oder einer biochemischen Analyse dieser Proteine im PSII der Mutante wären weiterführende, interessante Projekte.

Die akzessorischen Proteine PsbH, PsbK und PsbX in *Synechocystis* sp. PCC 6803 wären aufgrund ihrer Primärsequenz mögliche Substrate einer MetAP, da sie mit einer Wahrscheinlichkeit von 97%, 99% und 90% am N-Terminus prozessiert werden (<http://www.isv.cnrs-gif.fr/terminator2/index.html>).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Phänotyp der *Mmap2*-Zellen den Phänotypen der *psbA*- (s.o.), sowie den *psbK*-, *psbX*- und *psbH*-Deletionsmutante ähnelt. Dies deutet darauf hin, dass mehrere PSII-Untereinheiten die Substrate der MetAP2 darstellen könnten.

4.3 Physiologische Funktionen der MetAP`s in *Synechocystis* sp. PCC 6803

In dieser Arbeit konnte der MetAP2 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 eine Funktion in der Reifung des PSII zugeordnet werden (s.o.). MetAP2 ist ein cytosolisches Protein, wie Western-Blot-Analysen (siehe Abschnitt 3.6) und die Analyse der Primärsequenz (<http://expasy.org/tools/>) bestätigten. Somit sind PSII-

Untereinheiten mögliche Substrate. Die Prozessierung durch die MetAP2 stabilisiert das PSII unter phototrophen Standardbedingungen und vor allem unter Stressbedingungen (siehe Abschnitt 3.1, 3.2, 3.3).

Die Regulation der Biogenese und der Assemblierung der Photosysteme in *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. In der Literatur existiert eine Vielzahl von Proteinen, die die Funktion des PSI und PSII beeinflussen. So regulieren in *Synechocystis* sp. PCC 6803 Chaperone (Produkt der Gene *slr2013* und *slr0171*) die funktionale Assemblierung des PSII, sowie die Bildung des PSI (Wilde *et al.*, 2001; Kufryk und Vermaas, 2003). Die FtsH2-Protease in *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist wichtig für die Reparatur beschädigter PSII-Komplexe und auch für die Biogenese des PSI (Mann *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2003, Komenda *et al.*, 2006). Für die Aktivität der Donorseite des PSII ist das Genprodukt *slr0286* in *Synechocystis* sp. PCC 6803 essentiell (Kufryk und Vermaas, 2001).

MetAP2 scheint eine spezielle Rolle in Cyanobakterien zu spielen, denn die Bedeutung von MetAP2 nimmt unter Stressbedingungen zu, wie aus den Expressions-, Protein- und physiologischen Phänotypen-Analysen dieser Arbeit ersichtlich wurde (siehe Abschnitt 3.1, 3.2, 3.3 und 3.5). Die Stammbaumanalyse zeigte, dass *map-2*-Homologe in ursprünglichen Cyanobakterien vorhanden sind (siehe Abschnitt 3.8). Das Vorkommen von *map-2* in der wandlungsfähigen *Synechocystis*-Gruppe und den multizellulären Cyanobakterien könnte einen selektiven Vorteil in einem Leben in komplexen Umweltbedingungen bieten. Hingegen besitzen die marinen *Synechococcus*- und *Prochlorococcus*-Stämme das *map-2*-Homolog nicht, vermutlich aufgrund ihrer Lebensweise in weniger komplexen Umgebungen. Denn diese wenig komplexe Lebensweise führte zu einer Reduktion der Genome (Voß *et al.*, 2007).

Die Aktivität der MetAP3 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 zeigte ein breites pH-Spektrum *in vitro*, was darauf hindeutet, dass dieses Enzym in Bereichen mit pH-Gradienten (wie sie in Thylakoiden und Cytoplasma bestehen) aktiv sein könnte (Atanassova *et al.*, 2003). Weiterhin konnte eine breite Substratspezifität für MetAP3 gezeigt werden (Atanassova *et al.*, 2003). Dieses Profil passt dazu, dass

die MetAP3-defiziente Mutante nicht lebensfähig ist (Baier, unveröffentlicht) und weist darauf hin, dass diese die essentielle (*housekeeping*) MetAP in *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist. Ein weiterer Beleg dafür ist die Expression des *map-3*-Gens, denn diese steigt unter photoautotrophen Standardbedingungen und sinkt unter Stressbedingungen (siehe Abschnitt 3.5; Abb. 3.26, 3.27, 3.28). Ebenfalls zeigt der Stammbaum der *map*-Gene die Wichtigkeit dieses Enzyms, denn *map-3* ist in allen Cyanobakterien zu finden, deren Genome sequenziert sind (siehe Abschnitt 3.8).

Für das Enzym MetAP1 konnte nur eine sehr geringe Enzymaktivität bezüglich der getesteten Tripeptiden nachgewiesen werden (Atanassova *et al.*, 2003). Diese Daten passen dazu, dass in der MetAP1-defizienten Mutante kein auffälliger Phänotyp unter Standard- oder Stressbedingungen beobachtet wurde (Forchhammer, unveröffentlicht). Der Stammbaum zeigt, dass MetAP1 nur in *Synechocystis* sp. PCC 6803 vorkommt (siehe Abb. 3.37). Möglich wäre, dass *map-1* aus dem Gen *map-2* durch Gendublikation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 entstanden ist. Die Funktion von MetAP1 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist bisher unbekannt und könnte durch eine physiologische Charakterisierung der Mutante aufgeklärt werden.

Die zeitgleiche Expression der *map-1*-, *map-2*- und *map-3*-Gene unter photoautotrophen Standardbedingungen und die zeitgleiche Expression von *map-1* und *map-2* in den ersten Stunden des induzierten Stresses (siehe Abschnitt 3.5) könnte mit einer partiell unterschiedlichen Substratspezifität erklärt werden.

4.4 Transkriptionelle Regulation des *map-2*-Gens in *Synechocystis* sp. PCC 6803

Das Expressionsprofil von *map-2* entspricht dem in der Literatur beschriebenen Nitrat-regulierten, NtcA-abhängigen Genen (Übersichtsartikel: Luque und Forchhammer, 2007), denn die *map-2* Expression steigt in der Abwesenheit von Nitrat und wird in der Gegenwart von Ammonium reprimiert, wie Biolumineszenz-Analysen in dieser Arbeit zeigten (siehe Abschnitt 3.7.2.1; Abb. 3.34).

Die *map-2*-Promotorregion zeigt kein perfektes Bindemotiv für den Transkriptionsfaktor NtcA. Die Abbildung 4.1 stellt einen Vergleich der *map-2*- und der *glnA*-Promotorregion, die ein kanonisches Bindemotiv für NtcA zeigt, mit der NtcA-Konsensussequenz dar.

In nicht kanonischen Promotoren NtcA-abhängiger Gene sind unterschiedliche Basen invariant. So sind die zweite und dritte Base des Quartetts (siehe Abb. 4.1, schwarz unterstrichen) essentiell für eine Bindung (Jiang, *et al.*, 2000). Diese sind in der *map-2*-Promotorregion vorhanden (siehe Abb. 4.1). Die *map-2*-Sequenz weist in den Quartetts Basen auf, die von der Konsensus-Bindesequenz abweichen (siehe Abb. 4.1, rote Basen). In den acht Basen zwischen den für die Bindung essentiellen Basen-Quartetts sind einige variant und dienen nicht der direkten Protein-DNA Erkennung. In dieser Sequenz nehmen die zweite, dritte, sechste und siebte Base starken Einfluss auf die NtcA-Bindung (Jiang *et al.*, 2000). Diese Basen weichen im *map-2*-Promotor von der kanonischen Sequenz ab (siehe Abb. 4.1), was eine geringere Affinität des NtcA-Proteins zu der *map-2*-Sequenz bewirken kann. Dies ist eine Erklärung dafür, dass der NtcA-*map-2*-Komplex mittels der Gel Retardierungs-Analyse in dieser Arbeit nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 3.7.2.2; Abb. 3.35). Dieses wurde mit vergleichbaren Sequenzen von Jiang und Mitarbeitern ebenfalls gezeigt (Jiang *et al.*, 2000). Die in dieser Arbeit verwendete Kontroll-DNA *glnA* zeigt ein perfektes Bindemotiv für NtcA, weshalb eine Verschiebung der *glnA*-NtcA-Bande in dem Gel Retardierungs-Experiment, aufgrund einer Bindung, zu sehen war (Abb. 3.35).

<i>glnA</i>	-40	... <u>TGTA</u> TCAGCTGT <u>TACA</u>	N ₂₂	-10	TA N ₃ T	GGATAGT	+1	<u>CG</u>
<i>map-2</i>	-84	... <u>TGTC</u> AGTCTCCC <u>TACT</u>	N ₅₉	-10	TA N ₃ T	GAAAGT	+1	<u>G</u>
Konsensus NtcA Bindesequenz		<u>GTA</u>	N ₈	<u>TAC</u>	N ₂₂	TA N ₃ T	N ₄₋₅	TSP

Abbildung 4.1: Abgleich der *map-2*- und *glnA*-Promotorsequenzen. Dargestellt ist die Sequenz der Gene *glnA* (slr1756) und *map-2* (slr0918) aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 und das NtcA Konsensus-Bindemotiv. Die wichtigen Sequenzen des NtcA-Bindemotivs sind schwarz unterstrichen. Die Transkriptionsstartpunkte (+1) sind grün markiert und die roten Sequenzen heben die Basen hervor, die von dem kanonischen Bindemotiv abweichen. Die Position der Basen relativ zum Transkriptionsstartpunkt (TSP) ist angegeben.

Auch für andere NtcA-regulierte Gene konnte eine nicht kanonische Bindesequenz in den Promotorenregionen gezeigt werden, wie für das Gen *glnN*, welches die GSIII in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 kodiert und nur unter Stickstoffmangel exprimiert wird (Reyes *et al.*, 1997; Aldehni *et al.*, 2005 und 2006).

In dieser Arbeit konnte die Bindung des Transkriptionsfaktors NtcA an die *map-2*-Gensequenz experimentell mittels der *BIAcore*-Analyse bestätigt werden (siehe Abschnitt 3.7.2.3; Abb. 3.36). Die *BIAcore*-Analyse ist eine sensitive Methode um Protein-Interaktionsstudien zu analysieren, denn eine Bindung wird unmittelbar nach der Zugabe des Analyts zu der DNA sichtbar. Somit können kurzlebige oder schwache Komplexbindungen nachgewiesen werden.

NtcA ist ein Protein der Crp/FNR Familie der Transkriptionsregulatoren (auch *catabolite gene activator protein* (CAP) genannt). NtcA aktiviert Gene, die eine Promotorstruktur zeigen, die der Crp-abhängigen Promotoren der Klasse I und II aus *E.coli* ähnlich sind (Vegas- Palas *et al.*, 1992; Herrero *et al.*, 2001). Die Crp-abhängigen Promotoren werden aufgrund unterschiedlicher Bindestellen der Crp-Proteine in drei Klassen unterteilt (Ebright, 1993; Busby und Ebright, 1994 und 1999). Die meisten in der Literatur beschriebenen NtcA-abhängigen Gene weisen eine Promotorstruktur der Klasse II auf (Herrero *et al.*, 2001; Herrero *et al.*, 2004), wie auch der Promotorbereich des *glnA*-Gens in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Die Bindestelle für das Crp-Protein überlappt mit der -35 Region des Promotors und führt zu einem engen Kontakt des Crp-Proteins mit der RNA-Polymerase.

Die Promotorsequenz des *map-2*-Gens (Abb. 3.33) ähnelt einer Crp-abhängigen Promotorstruktur der Klasse I, denn das NtcA-Bindemotiv befindet sich 59 Basenpaare stromaufwärts der -10-Box (an der Position -84 relativ zum Transkriptionsstartpunkt). In dieser Promotorstruktur liegt die Bindestelle des Crp-Proteins stromaufwärts der RNA-Polymerase-Bindestelle. Hierbei interagiert nur die α -Untereinheit der RNA-Polymerase mit einer Aktivierungsregion von Crp. Durch das Binden von Crp an die Promotor-DNA wird eine höhere Affinität der RNA-Polymerase zum Promotor erreicht (Ebright, 1993; Busby und Ebright, 1994 und 1997). Ein weiteres Beispiel für diese Promotorstruktur stellt der P1 des *lac*-

Gens in *E.coli* dar, dessen Bindestelle für Crp an Position -61,5 relativ zum TSP liegt. In *Synechocystis* sp. PCC 6803 reguliert NtcA die eigene Transkription (Autoregulation) und dessen Promotorregion zeigt eine Crp-abhängige Promotorstruktur der Klasse I, denn das NtcA-Bindemotiv befindet sich 77,5 Basenpaare stromaufwärts relativ zum TSP (Herrero *et al.*, 2001). Ebenfalls das Gen *nblA* in *Synechococcus elongatus* PCC 7942, sowie die Gene *cox2* und *cox3* in *Nostoc* sp. PCC 7120 weisen eine Crp-abhängige Promotorstruktur der Klasse I auf (Herrero *et al.*, 2004).

Die NtcA-Abhängigkeit der *map-2*-Expression konnte *in vivo* nicht mittels einer NtcA-defizienten Mutante untersucht werden, da sich eine vollständige Inaktivierung des Stickstoffregulators auf *Synechocystis* sp. PCC 6803 letal auswirkt (Garcia-Dominguez *et al.*, 2000). Das Fehlen von NtcA könnte zu einer konstitutiven Expression der Proteine IF7 und IF17 führen (den Inhibitoren der Glutamin-Synthetasen GlnA und GlnN) und somit die Glutamin-Synthetasen-Aktivitäten unter allen Stickstoffbedingungen inaktivieren. Daher könnte NtcA in *Synechocystis* sp. PCC 6803 essentiell sein.

Die Expression des Gens *map-2* wurde nicht nur in Abhängigkeit unterschiedlicher Stickstoffquellen reguliert, sondern auch unter Hochlichtbedingungen, wie es in dieser Arbeit anhand von Expressionsprofilen gezeigt wurde (siehe Abschnitt 3.5). Es wurde in *Synechocystis* sp. PCC 6803 bereits beschrieben, dass einige Gene, die in der Photosynthese involviert sind, ebenfalls eine NtcA-abhängige Transkription zeigen (Su *et al.*, 2005 und 2006). Es ist möglich, dass die Expression des *map-2*-Gens weitere Transkriptionsfaktoren benötigt. Dies wurde auch für einige andere NtcA-abhängige Promotoren beschrieben. So benötigt der Promotor des *glnA*- und *amt1*-Gens in *Synechocystis* sp. PCC 6803 die Bindung der Transkriptionsfaktoren SigB und SigC (Imamura *et al.*, 2006). Unter Stickstoffmangel aktivieren NtcA und NblR die Expression von *nblA* in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (Luque *et al.*, 2001). Eine mögliche Regulation des *map-2*-Gens in der Abhängigkeit eines weiteren Transkriptionsfaktors konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

II. Das Phänomen der Ammonium-Toleranz in *Synechocystis* sp. PCC 6803 und die Beteiligung der FtsH2-Protease an diesem Prozess

Ammonium ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) wirkt zytotoxisch in höheren Pflanzen und in einigen Bakterien. Die Ammonium-Sensitivität und Toxizität ist in Tieren, höheren Pflanzen und heterotrophen Bakterien gut untersucht, im Gegensatz zu der Ammonium-Toleranz in Cyanobakterien (von Wiren, 2000; Britto and Kronzucker, 2002; Müller, 2006).

In *Synechocystis* sp. PCC 6803 existieren vier unterschiedliche FtsH-Proteasen, wovon eine, FtsH2, in den ersten Phasen des PSII-Reparaturzyklus involviert ist. In vorangegangenen Studien konnte in der *ftsH2*-defizienten Mutante eine Sensitivität gegenüber mikromolaren Konzentrationen von Ammoniak beobachtet werden, die zu einem Ausbleichen der Zellen führt (N.Kloft, unveröffentlichte Daten). In den Studien wurde gezeigt, dass in der Gegenwart von erhöhten Ammoniak-Konzentrationen die PSII-Aktivität der *ftsH2*-Mutante sinkt, während der Wildtyp keine Beeinträchtigung aufweist.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Toleranz des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 gegenüber dem zytotoxisch wirkenden Ammoniak zu untersuchen und die Beteiligung der FtsH2-Protease an diesem Prozess aufzuklären.

4.5 Ökologische Relevanz der Ammonium-Toxizität in Habitaten photoautotropher Organismen

Pflanzen, die mit Ammonium als alleinige Stickstoffquelle wachsen, weisen neben Wachstumsstörungen physiologische und morphologische Funktionsstörungen, eine geringere Biomassenproduktion und eine Änderungen in ihrem Phytohormonhaushalt auf (Britto *et al.*, 2001a; Britto und Kronzucker, 2002). Daher ist der Wirkungsmechanismus der Ammonium-Toxizität vor allem in Organismen, die oxygene Photosynthese betreiben, von einem globalen

Interesse. Es gibt eine Vielzahl von Untersuchungen und Postulierungen bezüglich der Toxizität in Pflanzen, allerdings sind diese sehr umstritten (Britto *et al.*, 2001b).

Ammonium ist die bevorzugte Stickstoffquelle für Cyanobakterien und deshalb müssen auch Cyanobakterien mit dem zytotoxischen Effekt dieses Nährstoffes umgehen. In natürlichen Habitaten der Cyanobakterien herrschen vermehrt alkaline Bedingungen (pH-Werte bis 10) und zudem kommen durch den Harnstoffabbau der Urease-positiven Bakterien und anderen Umweltbedingungen (Landwirtschaft) erhöhte Ammoniak-Konzentrationen vor (Britto und Kronzucker, 2002). Der Organismus wird dem Ammoniak ungeschützt ausgesetzt, da Ammoniak (NH_3) durch die biologische Membranen frei in die Zelle diffundieren kann (Ritchie und Gibson, 1987; Kleiner, 1981). Diese Aufnahme kann nicht durch das Ammonium-Aufnahmesystem (Ammonium/Methylammonium-Permeasen, siehe Abschnitt 1.4) kontrolliert werden. Die protonierte Form Ammonium (NH_4^+) muss in die Zelle transportiert werden, dafür brauchen Organismen Regulationsmechanismen der Ammonium-Aufnahme (siehe Abschnitt 1.4).

4.6 Ammoniak-induzierte Photoinhibition des PSII in *Synechocystis* sp. PCC 6803 und die Wichtigkeit der FtsH2-Protease in diesem Prozess

In dieser Arbeit konnte mittels *in vivo* PSII-Analysen gezeigt werden, dass *Synechocystis* sp. PCC 6803 in der Lage ist, millimolare Konzentrationen von Ammoniak in der Gegenwart von Licht zu tolerieren (siehe Tab. 3.2, Abschnitt 3.9.2, Abb. 3.40; Abschnitt 3.10). Aufgrund von drei Beobachtungen kann vermutet werden, dass die *Synechocystis*-Zellen die Ammoniak-induzierte Schädigung des PSII durch einen erhöhten PSII-Reparaturzyklus kompensieren:

- 1.) Das Fehlen der FtsH2-Protease in der Gegenwart von Ammoniak führt zu dem Verlust der Lebensfähigkeit der *Synechocystis*-Zellen (siehe Abschnitt 3.9, Abb. 3.39).
- 2.) Es wurde eine steigende Induktion der *ftsh2*- (*slr0228*) Expression beobachtet, wodurch ein effizienter D1-Reparaturzyklus vermehrt erfolgen kann (N.Kloft, unveröffentlicht).
- 3.) In Versuchen dieser Arbeit, in denen der D1-Reparaturzyklus im Wildtyp durch Chloramphenicol gehemmt wurde, konnte eine ähnliche Sensitivität gegenüber Ammoniak gezeigt werden, wie es bereits bei den

FtsH2-defizienten Zellen beobachtet wurde (siehe Abschnitt 3.12, Abb. 3.43 und 3.44). Dafür spricht auch die lichtabhängige Empfindlichkeit der *Synechocystis*-Zellen in der Abwesenheit der FtsH2-Protease gegenüber Ammoniak (siehe Abschnitt 3.10 und 3.11).

Bereits veröffentlichte Studien zeigten, dass die FtsH2-Protease geschädigtes D1-Protein im PSII membranständig degradiert. Synchron erfolgt der Austausch des neu-synthetisierten D1-Proteins nur bei dessen Neusynthese, um das PSII wieder zu photoaktivieren (Lindahl *et al.*, 1996; Bailey *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2003). Deshalb hat die Zugabe von Chloramphenicol zur Folge, dass die Proteinbiosynthese inhibiert wird und somit ein FtsH2-vermittelter Abbau des D1-Proteins nachgewiesen werden kann, da D1 nicht effizient ausgetauscht wird (Silva *et al.*, 2003). Dieser effiziente Reparaturzyklus des PSII erlaubt photosynthetisch aktiven Organismen die Photoinhibition zu überleben (Aro *et al.*, 1993).

In dieser Arbeit konnte der FtsH2-Protease in *Synechocystis* sp. PCC 6803 eine weitere Funktion zugeordnet werden: die Toleranz gegenüber Ammonium.

Die in dieser Arbeit durch Ammoniak induzierte Photoinhibition des PSII wird durch die gleiche Lichtqualität (360-492 nm) ausgelöst (siehe Abschnitt 3.13, Abb. 3.45), die den Mangan-Cluster des wasserspaltenden Komplexes (OEC) schädigt. Dies ist auch der erste Schritt der lichtabhängigen Zerstörung des PSII in der Mangan-abhängigen Photoinhibition (Hakala *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu verursacht die Bestrahlung der *Synechocystis*-Zellen mit Rotlicht der Wellenlängen 621 nm (Absorptionsmaximum der Phycobilisomen), 680 nm (Absorptionsmaximum der Chlorophylle), sowie 700 nm in der Gegenwart von Ammoniak keine Abnahme der PSII-Aktivität in Ammonium-sensitiven *ftsH2*-Zellen (siehe Abschnitt 3.11; Abb. 3.45). Somit kann eine, durch Ammoniak induzierte Akzeptorseitige Schädigung experimentell ausgeschlossen werden.

Die Ammonium-abhängige Inhibition des PSII erfolgt in der *ftsH2*-Mutante wellenlängenabhängig, denn die stärkste Inhibierung wird nach der Bestrahlung mit UV-A Licht (360 nm) beobachtet, wie aus dem Aktionsspektrums der

Photoinhibition ersichtlich wurde (siehe Abschnitt 3.13; Abb. 3.45). Eine Vielzahl von bereits publizierten Studien zeigte eine Schädigung der Cyanobakterien-Zellen durch die Bestrahlung mit UV-A/UV-B Licht, wodurch die Zerstörung des PSII-Zentrums erfolgte (Turcsanyi und Vass, 2000; Sicora *et al.*, 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der mRNA-Level von *psbA* (D1) während der Photoinhibition unter UV-A Licht gesteigert ist. Die Bestrahlung mit Rotlicht erfordert eine geringere *psbA*-Expression (Tyystjärvi *et al.*, 2002). All dies verdeutlicht eine Schädigung des PSII-Komplexes per se durch die Bestrahlung mit UV-A Licht. Allerdings wurden die oben erwähnten Studien bei Photonenflussraten von über $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einer längeren Bestrahlungszeit durchgeführt. Im Gegensatz dazu erfolgten die in dieser Arbeit analysierten Schädigungen in Gegenwart von Ammoniak schon bei minimalen Photonenflussraten von $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einer Bestrahlungszeit von 240 Minuten (siehe Abschnitt 3.13; Abb. 3.45). Diese Photonenflussraten schädigen die Zellen in der Abwesenheit von Ammoniak nicht (siehe Abschnitt 3.13; Abb. 3.45). Dies zeigt, dass der in dieser Arbeit untersuchte Effekt ein spezifischer Blaulicht-, sowie UV-A Effekt in der Abhängigkeit von Ammoniak ist.

Interessanterweise wurde in bereits veröffentlichten Studien die Bindung von Ammoniak an der Chlorid-sensitiven Seite des OEC an dem Mangan-Komplex im S₂-Status gezeigt (Britt *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 2005). Außerdem stellt Ammoniak in PSII-Präparationen aus Pflanzen einen starken Inhibitor der wasserspaltenden Reaktion durch dessen Bindung an den Mangan-Komplex dar (Fang *et al.*, 2005).

In der Studie von Hakala wurden Aktionsspektren der Photoinhibition von Enzymen angefertigt. Dabei wurde beobachtet, dass die Mangan-Katalase aus *Lactobacillus plantarum*, die ein dem OEC ähnliches Mangan-Zentrum enthält, sensitiv gegenüber UV- und Blau-Licht ist. Es wird vermutet, dass der Mangan-Komplex als Photorezeptor der UV-Licht induzierten Photoinhibition fungiert (Hakala *et al.*, 2005 und 2006). Das Aktionsspektrum der Ammoniak-induzierten Photoinhibition der FtsH2-defizienten Mutanten zeigten eine Inhibition im Blau- und UV-A Licht (siehe Abschnitt 3.13; Abb 3.45) und ähnelt dem Absorptionsspektrum der Mangan-Katalase.

Diese Argumente lassen die Zerstörung des Mangan-Komplexes als den Grund der Ammonium-Toxizität vermuten, wie es für die Mangan-abhängige Photoinhibition gezeigt wurde (Hakala *et al.*, 2005 und 2006).

Es war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, die lichtabhängige Schädigung des Mangan-Komplexes des PSII durch die Bindung von Ammoniak experimentell zu bestätigen. Weiterführend wäre es möglich, diesen Schritt *in vitro* über Kristallographien der PSII-Zentren in der Gegenwart von Ammoniak zu untersuchen.

4.7 Das Phänomen der PSII-Photoinhibition

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Photoinhibition, induziert durch Ammoniak in *Synechocystis* sp. PCC 6803 dargestellt und kann mit dem derzeitigen Modell der Mangan-abhängigen Photoinhibition verglichen werden. Der Mechanismus der Photoinhibition in phototrophen Organismen ist sehr umstritten. Derzeit werden drei Mechanismen diskutiert: 1.) die Akzeptorseitige-, 2.) die Donorseitige- und 3.) die Mangan-abhängige Photoinhibition, die im Folgenden diskutiert werden.

1.) Der Akzeptorseitige-Mechanismus entsteht durch die Überreduktion der Plastochinone an der Akzeptorseite des PSII bei hohen Lichtintensitäten und führt zu der Entstehung von Triplettchlorophyllen. In der Anwesenheit von Sauerstoff kommt es so zu der Bildung der hoch reaktiven Sauerstoffspezies, die das D1-Protein und somit das PSII-Zentrum beschädigen (Vass *et al.*, 1992).

Ein Auftreten von reaktiven Sauerstoff-Spezies wurde während der Photoinhibition nachgewiesen (Hideg *et al.*, 1994), allerdings entsteht Singluett-Sauerstoff auch durch nicht intakte Antennenkomplexe oder PSII-Komponenten *in vitro* (Rinalducci *et al.*, 2004).

2.) Die Theorie der Donorseitigen-Photoinhibition besagt, dass die D1-Schädigung durch langlebige, hoch oxidative Spezies, wie dem $P680^+$ und dem Elektronendonator Tyr_z^+ im D1-Protein vermittelt wird und unabhängig von der Anwesenheit von Sauerstoff ist (Jegerschöld *et al.*, 1991; Yamamoto, 2001). Mittels dieser Theorie kann die Photoinhibition unter Schwachlichtbedingungen, sowie unter anaeroben Bedingungen erklärt werden, denn die Abwesenheit von

Sauerstoff schützt die Thylakoide nicht vor der Photoinhibition (Hakala *et al.*, 2005). Es ist bekannt, dass die D1-schädigenden $P680^+$ - und Tyr_Z^+ -Spezies langlebig sind, wenn der PSII-Komplex das katalytische Mangan-Cluster verliert (Yamamoto, 2001).

3.) In einer kürzlich publizierten Studie wurde der Mangan-abhängige Mechanismus, als der hauptsächlich vorkommende Mechanismus der Photoinhibition postuliert, der sich auf die Donorseitige-Photoinhibition stützt. Die primäre Reaktion der lichtinduzierten Mangan-abhängigen Photoinhibition ist die Anregung der Mangan-Ionen, die zu deren Entlassung aus dem OEC in das Lumen der Thylakoide führt. Das geschädigte OEC kann keine weiteren Elektronen zu $P680^+$ leiten, dadurch kommt es zur Schädigung des PSII-Reaktionszentrums (Hakala *et al.*, 2005 und 2006).

Es konnte in isolierten Thylakoiden der *Pisum sativa* (Erbse) gezeigt werden, dass der Mangan-Komplex des OEC das Ziel der Photoinhibition ist, verursacht durch UV-Licht und den sichtbaren Bereich des Lichts. Eine Vielzahl an experimentellen Beweisen unterstützt diese Theorie: a) Die PSII-Komplexe, die keine Mangan-Ionen enthalten, sind unter UV-Licht stabil (Hakala *et al.*, 2005). b) Das Aktionspektrum der Photoinhibition ähnelt dem Absorptionsspektrum von Mn(III)-, sowie Mn(IV)-Komponenten im UV-Bereich (Hakala *et al.*, 2005). c) Weiterhin wurde beobachtet, dass die Sauerstoffentwicklung sinkt, bevor die Elektronentransport-Aktivität von $P680$ zu Q_A sinkt, was kontrovers zu dem Mechanismus der Akzeptorseitigen-Photoinhibition ist. d) Ebenso zeigten Aktionsspektren der Photoinhibition in *Synechocystis* sp. PCC 6803, sowie in *Thermosynechococcus elongatus*, dass Licht der Wellenlänge 300-500 nm eine größere photoinhibitorische Effizienz aufweist, als Licht der Wellenlängen, die von den Antennenkomplexen absorbiert werden (600-700 nm) (Tyystjärvi *et al.*, 2002; Ohnishi *et al.*, 2005; Hakala *et al.*, 2005).

4.8 Ein Modell der durch Ammoniak-induzierten Photoinhibition des PSII in *Synechocystis* sp. PCC 6803

Bereits veröffentlichte Daten von EPR-spektroskopischen Untersuchungen von isolierten PSII-Membranen aus *P.sativa* zeigten, wie bereits erwähnt, dass

Ammoniak an dem Mangan-Komplex bindet. Weiterhin wurde in PSII-Präparationen höherer Pflanzen *in vitro* gezeigt, dass Ammoniak ein starker Inhibitor der wasserspaltenden Reaktion ist, was ein weiterer Beleg der Ammoniak-Bindung an dem OEC des PSII darstellt (Fang *et al.*, 2005).

Aus den Daten dieser Arbeit und unter Berücksichtigung der EPR-spektroskopischen Ergebnisse (s.o.), sowie der Theorie der Mangan-abhängigen Photoinhibition des PSII, postuliert von Hakala und Mitarbeitern (s.o.) (Hakala *et al.*, 2005 und 2006) wurde, zusammenfassend ein Modell der Ammoniak-abhängigen Photoinaktivierung des PSII in *Synechocystis* sp. PCC 6803 erstellt, das in Abbildung 4.2 dargestellt ist und im Folgenden erläutert wird.

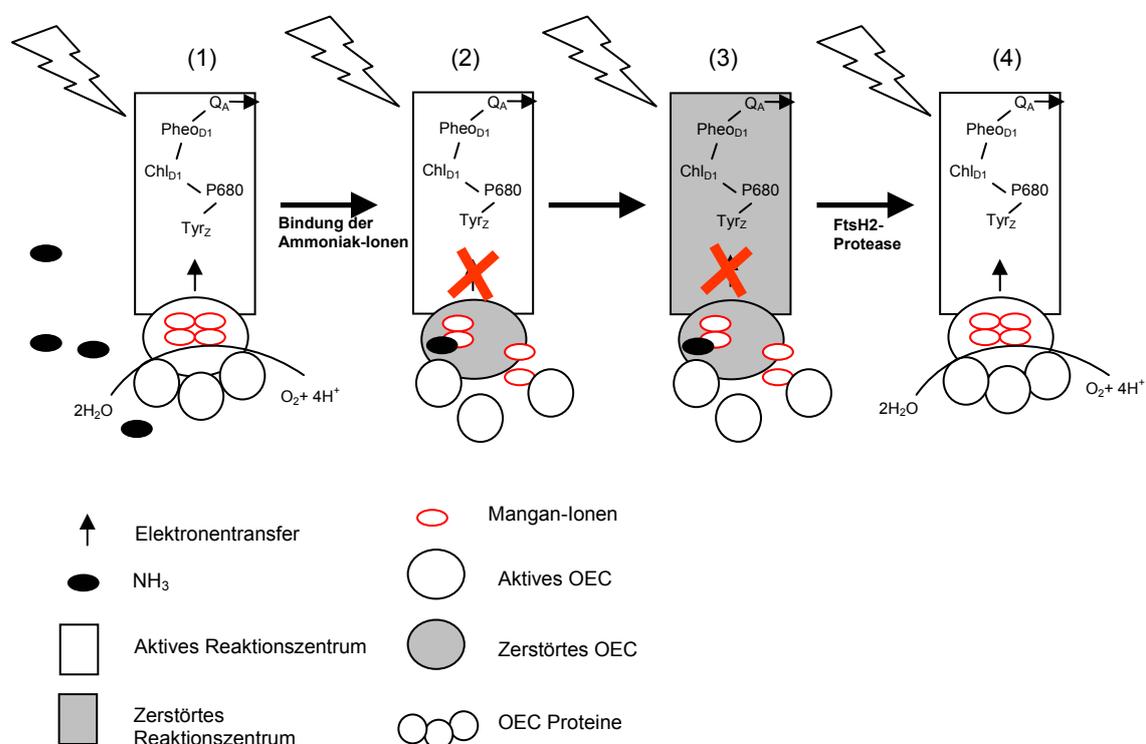


Abbildung 4.2: Modell der Ammoniak-abhängigen Photoinhibition des PSII in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Basierend auf den Daten dieser Arbeit, auf EPR-spektroskopischen Untersuchungen, die eine Bindung von Ammoniak an den wasserspaltenden Komplex *in vitro* gezeigt haben und auf der bereits bekannten Mangan-abhängigen Photoinhibition (Hakala *et al.*, 2005 und 2006), wurde dieses Modell erstellt. Es zeigt die Bindung von Ammoniak am OEC des PSII und den Mechanismus der anschließenden Photoinhibition. Die Symbole des Modells werden in der Abbildung erläutert.

(1) Die primäre Reaktion der Ammoniak-auslösenden Photoinhibition ist die Bindung von Ammoniak an den Mangan-Komplex an der Donorseite des PSII in *Synechocystis*-Zellen.

(2) Die Bindung des Ammoniak-Ions am PSII und die Anregung des Mangans durch Licht löst eine Schädigung des wasserspaltenden Komplexes aus. Fortschreitend inhibiert die Zerstörung der PSII-Donorseite den Elektronentransfer zu dem Tyrosin-Rest (Tyr_Z) des D1-Proteins. Weiterführende Anregungen schädigen das D1-Protein.

(3) Durch die Zerstörung des D1-Proteins ist die Elektronendonation zu dem oxidierten Chlorophyll-Komplex P680⁺ inhibiert, der unter diesen Bedingungen nicht reduziert werden kann, wie es bei der Photoinhibition vermutet wird (Hakala *et al.*, 2005). Dies führt in den *Synechocystis*-Zellen zu einer reduzierten PSII-Aktivität. Die Regeneration der photosynthetischen Aktivität erfordert den Austausch des geschädigten D1-Proteins.

(4) Zur Reaktivierung des PSII erfolgt ein vermehrter FtsH2-abhängiger D1-Reparaturzyklus, der durch die Induktion einer gesteigerten Expression des *ftsh2*-Gens erreicht wird. Die Zellen erhalten somit die Lebensfähigkeit in der Gegenwart von Ammoniak.

In veröffentlichten Studien wurde für Pflanzen gezeigt, dass der Effekt der Ammonium-Toxizität mit höheren Lichtintensitäten drastischer hervortritt (Britto und Kronzucker, 2002). Dies verdeutlicht, dass ein photoinhibitorischer Effekt in beiden Organismen in dem Mechanismus der Ammonium-Toxizität involviert ist. Da das PSII der Pflanzen und Cyanobakterien Ähnlichkeiten in Funktion, sowie im Aufbau zeigen, ist darauf zu schließen, dass in beiden Organismen der gleiche Mechanismus einer Ammonium-auslösenden Schädigung stattfindet.

5 Zusammenfassung

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die Methionin-Amino-peptidasen (MetAP) 1-3 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 funktionale Amino-peptidasen sind, allerdings waren die physiologischen Funktionen unbekannt. Die Analyse der MetAP2-defizienten Mutante in *Synechocystis* sp. PCC 6803 stellte ein Ziel dieser Arbeit dar und lieferte neue Erkenntnisse über deren physiologische Funktion.

Unter photoautotrophen Bedingungen zeigte die MetAP2-defiziente Mutante ein beeinträchtigt Photosystem II (PSII). *In vivo* PSII-Analysen zeigten eine veränderte Chinon-(Q_B) Bindenische an der PSII-Akzeptorseite, da das 1,4-Benzochinon mit hoher Affinität in der Q_B-Akzeptorstelle interagiert und eine partielle Inhibierung bewirkt. Im Gegensatz dazu konnte der Photosynthese-Inhibitor DCMU mit geringerer Affinität in der Q_B-Bindenische der Mutante binden und inhibierte somit den Elektronentransport in der Gegenwart von subletalen DCMU-Konzentrationen nicht so stark wie im Wildtyp. Die innere Antenne des PSII in der MetAP2-defizienten Mutante ist ebenfalls beeinträchtigt, denn das CP47-Protein war geringer im PSII der Mutante assoziiert, als in den Wildtypzellen. Die reduzierte CP47-Antenne in der Mutante führte zu einer geringeren Saturierung des PSII unter hohen Lichtbedingungen. Der *Mmap2*-Phänotyp verstärkte sich unter Stressbedingungen, denn die MetAP2-defiziente Mutante war nicht in der Lage die PSII-Aktivität und ihre Lebensfähigkeit während der Chlorose und der Hochlichtexposition aufrecht zu erhalten. Somit ist die MetAP2 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 essentiell für die Funktionalität und für die Reifung der PSII-Akzeptorseite.

Die Analyse der Expression der drei *map*-Gene in *Synechocystis* sp. PCC 6803 zeigte einen Anstieg der *map-1*- und *map-2*-Genexpression unter Stressbedingungen, wobei *map-1* nur temporär hochreguliert wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass die *map-2*-Expression durch den NtcA-Transkriptionsfaktor reguliert wird. In Cyanobakterien wurde das *map-1*-Gen bisher nur im Stamm *Synechocystis* sp. PCC 6803 gefunden, während das *map-2*-Gen auch in vielen anderen Stämmen, insbesondere den naheverwandten Arten sowie den komplexen filamentösen Gattungen vorhanden ist. Das in Cyanobakterien

universell verbreitete *map-3*-Gen wurde unter photoautotrophen, exponentiellen Wachstumsbedingungen exprimiert während unter Stressbedingungen dessen Expression stetig abnahm.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Ammoniak-Toleranz in *Synechocystis*-Zellen und die Wichtigkeit der Protease FtsH2 in diesem Prozess. Die zytotoxische Wirkung von Ammoniak auf photosynthetisch aktive Organismen war bekannt, allerdings ist der Mechanismus nicht eindeutig aufgeklärt. Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass *Synechocystis* sp. PCC 6803 tolerant gegenüber millimolaren Konzentrationen von Ammoniak ist, während die FtsH2-defiziente Zellen sterben.

Die Analysen dieser Arbeit zeigten, dass in FtsH2-defizienten Zellen innerhalb kurzer Zeit, in der Abhängigkeit von steigenden Ammoniak-Konzentrationen und steigenden Photonenflussraten die PSII-Aktivität inhibiert wird und die Zellen absterben (Ammoniak-induzierte Photoinhibition). Die Wildtypzellen waren sensitiv gegenüber Ammoniak, wenn der PSII-Reparaturzyklus gehemmt wurde. Zudem wurde beobachtet, dass der D1-Abbau durch die FtsH2-Protease in der Gegenwart von Ammoniak beschleunigt erfolgt.

Das Aktionspektrum der Ammoniak-induzierten Photoinhibition zeigte unter schwachem Blau- und UV-A-Licht die stärkste PSII-Reduktion von 65-85%. Da in diesem Wellenlängen-Bereich Schädigungen des Mangan-Komplexes erfolgen, wird vermutlich der wasserspaltende Komplex des PSII durch Ammoniak photosensibilisiert und die Photoinhibition dadurch beschleunigt. Die Chlorophyll *a*- und Phycobilisomen-absorbierenden Wellenlängen bewirkten keine PSII-Inhibition, was einen spezifischen Blau- und UV-A-Lichteffekt als primär schädigende Reaktion zeigte.

6 Literatur

- Adam, Z., Adamska, I., Nakabayashi, K., Ostersetzer, O., Haussuhl, K., Manuell, A., Zheng, B., Vallon, O., Rodermeil, S.R., Shinozaki, K., Clarke, A.K.** (2001a). Chloroplast and mitochondrial proteases in *Arabidopsis*. A proposed nomenclature. *Plant Physiol.* **125**:1912-1918
- Adam, Z., Ostersetzer, O.** (2001b). Degradation of unassembled and damaged thylakoid proteins. *Biochem.Soc.Trans.* **29**:427-430
- Aichi, M., Takatani, N. und T. Omata** (2001). Role of NtcB in activation of nitrate assimilation genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J.Bacteriol.* **183**:5840-5847
- Aldehni, M.F., Sauer, J., Spielhaupter, C., Schmid, R., Forchhammer, K.** (2003). Signal transduction protein P_{II} is required for NtcA-regulated gene expression during nitrogen deprivation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *J.Bacteriol.* **185**:2582–2591
- Aldehni, M.F.** (2005). Studie zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NtcA in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Doktorarbeit am Fachbereich Biologie (Molekular- und Mikrobiologie), Justus-Liebig-Universität Gießen
- Aldehni, M.F., Forchhammer, K.** (2006). Analysis of a non-canonical NtcA-dependent promoter in *Synechococcus elongatus* and its regulation by NtcA and P_{II}. *Arch.Microbiol.* **184**: 378-386
- Alfonso, M., Pueyo, J.J., Gaddour, K., Etienne, A.-L., Kirilovsky, D. und R. Picorel** (1996). Induced new mutation of D1 serine-268 in soybean photosynthetic cell cultures produced atrazine resistance, increased stability of S₂Q_B⁻ and S₃Q_B⁻ states, and increased sensitivity to light stress. *Plant Physiol.* **112**:1499-1508
- Alfonso, M., Collados, R., Yruela, I., Picorel, R.** (2004). Photoinhibition and recovery in a herbicide-resistant mutant from *Glycine max* (L.) Merr. cell cultures deficient in fatty acid unsaturation. *Planta* **219**:428-439
- Allen, M.M. und A.J. Smith** (1969). Nitrogen chlorosis in blue green algae. *Arch.Microbiol.* **69**:114-120
- Allen, M.M.** (1984). Cyanobacterial cell inclusions. *Ann.Rev.Microbiol.* **38**:1-25
- Anderson, J.M., Park, Y.-I., Chow, W.S.** (1998). Unifying model for the photoinactivation of photosystem II *in vivo*: A hypothesis. *Photosynth.Res.* **56**:1-13
- Andersson, C.R., Tsinoremas, N.F., Shelton, J., Lebedeva, N.V., Yarrow, J., Min, H. und S.S. Golden** (2000). Application of bioluminescence to the study of circadian rhythms in cyanobacteria. *Methods Enzymol.* **305**:527-542
- Arcondeguy, T., Jack, R. und M. Merrick.** (2001). P_{II} signal transduction proteins: Pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **65**:80-105
- Aro, E.-M., Virgin, I., Andersson B.** (1993). Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim.Biophys.Acta* **1143**:113-134
- Atanassova, A., Sugita, M., Sugiura, M., Pajpanova, T., Ivanov, I.** (2003). Molecular cloning, expression and characterization of three distinctive genes encoding methionine

aminopeptidases in cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Arch.Microbiol. **180**:185-193

Baier, K., Nicklisch, S., Grundner, C., Reinecke, J., Lockau, W. (2001). Expression of two *nblA*-homologous genes is required for phycobilisome degradation in nitrogen-starved *Synechocystis* sp. PCC 6803. FEMS Microbiol.Lett. **195**:35-39

Bailey, S., Thompson, E., Nixon, P.J., Horton P., Mullineaux, C.W., Robinson, C., Mann, N.H. (2002). A critical role for the Var2 FtsH homologue of *Arabidopsis thaliana* in the photosystem II repair cycle *in vivo*. J.Biol.Chem. **277**:2006-2011

Barber, J. und Nield, J. (2002). Organization of transmembrane helices in photosystem II: comparison of plants and cyanobacteria. Phil.Trans.R.Soc.Lond. **357**:1329-1335

Barber, J. (2006). Photosystem II: An enzyme of global significance. Biochem.Soc.Trans. **34**:619-631

Barker, M., de Vries, R., Nield, J., Komenda, J., Nixon, P.J. (2006). The Deg proteases protect *Synechocystis* sp. PCC 6803 during heat and light stresses but are not essential for removal of damaged D1 protein during the photosystem II repair cycle. J.Biol.Chem. **281**:30347-30355

Barker-Aström, K., Schelin, J., Gustafsson P., Clarke, A.K., Campbell D.A. (2005). Chlorosis during nitrogen starvation is altered by carbon dioxide and temperature status and is mediated by the ClpP1 protease in *Synechococcus elongates*. Arch.Microbiol. **183**:66-69

Bazan, J.F., Weaver, L.H., Roderick, S.L., Huber, R. und B.W. Matthews (1994). Sequence and structure comparison suggest that methionine aminopeptidase, prolidase, aminopeptidase P, and creatinase share a common fold. Proc.Natl.Acad.Sci.USA **91**:2473-2477

Ben-Bassat, A., Bauer, K., Chang, S.-Y., Myambo, K., Boosman, A. und S. Chang (1987). Processing of the initiation methionine from proteins: Properties of the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase and its gene structure. J.Bacteriol. **169**:751-757

Bienert, R., Baier, K., Volkmer, R., Lockau, W. und U. Heinemann (2006). Crystal structure of NblA from *Anabaena* sp. PCC 7120, a small protein playing a key role in phycobilisome degradation. J. Biol.Chem. **281**:5216-5223

Birnboim, H.C. und J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. **7**:1513-1523

Bligny, R., Gout, E., Kaiser, W., Heber, U., Walker, D. und R. Douce (1997). Biochim.Biophys.Acta **1320**:142-152

Blum, H., Beier, H. und H.J. Gross (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis **8**:93-99

Boekema, E. J., Hankamer, B., Bald, D., Kruip, J., Nield, J., Boonstra, A.F., Barber, J. und M. Rögner (1995). Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. Proc.Natl.Acad.Sci.USA **92**:175-179

Boyer, H.W., Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J.Mol.Biol. **14**:459-472

- 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.
- Bramley, P.M., Sandmann, G.** (1985). *In vitro* and *in vivo* biosynthesis of xanthophylls by the cyanobacterium *Aphanocapsa*. *Phytochemistry* **24**:2919-2922
- Bricker, T.M. und L.K. Frankel** (2002). The structure and function of CP47 and CP43 in photosystem II. *Photosynth.Res.* **72**:131-146
- Britt, D.T., Campbell, K.A., Peloquin, J.M., Gilchrist, M.L., Aznar, C.P., Dicus, M.M., Robblee, J., Messinger, J.** (2004). Recent pulsed EPR studies of the photosystem II oxygen-evolving complex: Implications as to water oxidation mechanisms. *Biochim.Biophys.Acta* **1655**:158-171
- Britto, D.T., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Kronzucker, H.J.** (2001a). Futile transmembrane NH_4^+ cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **98**:4255-4258
- Britto, D.T., Glass, A.D.M., Kronzucker, H.J. und M.Y. Siddiqi** (2001b). NH_4/NH_3 . An evaluation of recent proposals. *Plant Physiology* **125**:523-526
- Britto, D.T. und H.J. Kronzucker** (2002). NH_4^+ toxicity in higher plants: A critical review. *J. Plant.Physiol.* **159**:567-584
- Bryant, D.A.** (1994). The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic publisher in The Netherlands.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und J.M. Short** (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**:376-378
- Burillo, S., Luque, I., Fuentes, I. und A. Contreras** (2004). Interactions between the nitrogen signal transduction protein P_{II} and N-Acetyl Glutamate kinase in organisms that perform oxygenic photosynthesis. *J.Bacteriol.* **186**:3346-3354
- Busby, S. und R. Ebright** (1994). Promotor structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* **79**:743-746
- Busby, S. und R. Ebright** (1999). Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J.Mol.Biol.* **293**:199-213
- Caslake, L.F., Gruber, T.M., Bryant, D.A.** (1997). Expression of two alternative sigma factors of *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 is modulated by carbon and nitrogen stress. *Microbiology* **143**:3807-3818
- Chu, H.-A., Nguyen, A.P. und R. J. Debus** (1995). Amino acid residues that influence the binding of manganese or calcium to photosystem II. The carboxy-terminal domain of the D1 polypeptide. *Biochemistry* **34**:5859-5882
- Clark, L.C.** (1956). Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *Trans.Am.Soc.Art.Int. Organ* **2**:41-48
- Clarke, A.K.** (1999). ATP-dependending Clp proteases in photosynthetic organism- a cut above the rest. *Ann.Bot.* **83**:593-599

- Cohen, R.O., Nixon, P.J., Diner, B.A.** (2007). Participation of the C-terminal region of the D1-polypeptide in the first steps in the assembly of the Mn₄Ca cluster of photosystem II. *J.Biol.Chem.* **282**:7209-7218
- Collier, J.L. und A.R. Grossman** (1992). Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942: Not all bleaching is the same. *J.Bacteriol.* **174**:4718-4726
- Collier, J.L. und A.R. Grossman** (1994). A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria. *EMBO J.* **13**:1039-1047
- O' Connor, H.E., Ruffle, S.V., Cain, A.J., Deak, Z., Vass, I., Nugent, J.H.A. und S. Purton** (1998). The 9-kDa phosphoprotein of photosystem II. Generation and characterisation of *Chlamydomonas* mutant lacking PSII-H and a site-directed mutant lacking the phosphorylation site. *Biochim.Biophys.Acta* **1364**:63-72
- Dalla Chiesa, C.M., Fisico, G., Deak, Z., Vass, I., Barber, J., Nixon, P.J.** (1997). Reduced turnover of the D1 polypeptide and photoactivation of electron transfer in novel herbicide resistant mutants of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur.J.Biochem.* **15**:731-740
- Davidson A.L. und J. Chen** (2004). ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu.Rev.Biochem.* **73**:241-68
- Demming-Adams, B.W. und W. Adams** (1996). The role of xanthophylls cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trens.Plant Sci.* **1**:21-26
- Dürring, U., Irrgang K.-D., Lünser, K., Kehr, J., Wilde, A.** (2006). Analysis of photosynthetic complexes from a cyanobacterial *ycf37* mutant. *Biochim.Biophys.Acta* **1757**:3-11
- Ebright, R.** (1993). Transcription activation at class I CAP-dependent promoters. *Mol.Microbiol.* **8**:797-802
- Edge, R., McGarvey D.J. und T.G. Truscott** (1997). The carotenoids as anti-oxidants- a review. *J.Photochem.Photobiol. B* **4**:189-200
- Elhai, J., Vepriiskiy, A., Muro-Pastor, A.M., Flores, E., Wolk, C.P.** (1997). *J.Bacteriol.* **179**:1998-2005
- Enami, I., Kaneko, M., Kitamura, N., Koike, H., Sonoike, K., Inoue, Y. und S. Katoh** (1991). Total immobilisation of the extrinsic 33-kDa protein in spinach photosystem II membrane preparations. Protein stoichiometry and stabilisation of oxygen Evolution. *Biochim.Biophys.Acta* **1060**:224-232
- Enami, I., Tohri, A., Kamo, M., Ohta, H. und J.-R. Shen** (1997). Identification of domains on the 43 kDa chlorophyll-carrying protein (CP43) that are shielded from tryptic attack by binding of the extrinsic 33 kDa protein with photosystem II complex. *Biochim.Biophys.Acta* **1320**:17-26
- Espinosa, J., Forchhammer, K., Contreras, A.** (2007). Role of the *Synechococcus* PCC 7942 nitrogen regulator protein PipX in NtcA-controlled processes. *Microbiology* **153**:711-718

- Espinosa, J., Forchhammer, K., Burillo, S., Contreras, A.** (2006). Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with P_{II} and NtcA. *Microbiology* **61**:457-469
- Evans, M.C., Ball, R.J., Nugent, J.H.** (2005). Ammonia displaces methanol bound to the water oxidizing complex of photosystem II in the S₂ state. *FEBS Lett.* **579**:3081-3084
- Fang, C.-H., Chiang, K.-A., Hung, C.-H., Chang, K., Ke, S.-C. und H.-A. Chu** (2005). Effects of ethylene glycol and methanol on Ammonia-induced structural changes of the oxygen-evolving complex in photosystem II. *Biochemistry* **44**:9758-9765
- Ferreira, K.N., Iverson, T.M., Maghlaoui, K., Barber, J., Iwata, S.** (2004). Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* **303**:1831-1838
- Figurski, D.H. und D.R. Helinski** (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **76**:1648-1652
- Flores, E., Guerrero, M.G. und M. Losada** (1980). Short-term ammonium inhibition of nitrate utilization by *Anacystis nidulans* and other cyanobacteria. *Arch.Microbiol.* **128**:137-144
- Flores, E. und A. Herrero** (1994). Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. pp. 488-517. In: D.A. Bryant (ed) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL
- Flores, E. und A. Herrero** (2005). Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Biochem.Soc.Trans.* **33**:164-167
- Forchhammer, K.** (2002). Nitrogen-starvation in non-diazotrophic cyanobacteria: survival through chlorosis. *Rec Res Devel Microbiol* **6**: 45-54.
- Forchhammer, K. und N. Tandeau de Marsac** (1994). The P_{II} protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. *J.Bacteriol.* **176**:84-91
- Forchhammer, K. und N. Tandeau de Marsac** (1995a). Phosphorylation of the P_{II} protein (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: Analysis of *in vitro* kinase activity. *J.Bacteriol.* **177**:5812-5817
- Forchhammer, K. und N. Tandeau de Marsac** (1995b). Functional analysis of the phosphoprotein P_{II} from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J.Bacteriol.* **177**:2033-2040
- Forchhammer, K. und A. Hedler.** (1997). Phosphoprotein P_{II} from cyanobacteria: Analysis of functional conservation to the P_{II} signal transduction protein from *Escherichia coli*. *Eur.J.Biochem.* **244**:869-875
- Forchhammer, K.** (2002). Nitrogen-starvation in non-diazotrophic cyanobacteria: Survival through chlorosis. *Res.Devel.Microbiology* **6**:45-54
- Frank, H.A. und R.J. Codgell** (1996). Carotenoids in photosynthesis. *Photochem.Photobiol.* **63**:257-264

- Frottin, F., Martinez, A., Peynot, P., Mitra, S., Holz, R., Giglione, C. und T. Meinel** (2006). The proteomics of N-terminal methionine cleavage. *Mol Cell Proteomics* **5**:2336-2349.
- Fujimori, T., Higuchi, M., Sato, H., Muramatsu, M., Hihara, Y. und K. Sonoike** (2005). The mutant of *sll1961*, which encodes a putative transcriptional regulator, has a defect in regulation of photosystem stoichiometry in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* **139**:408-416
- Funk, C.** (2000). Functional analysis of the *PsbX* protein by deletion of the corresponding gene in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol.Biol.* **44**:815-827
- Garcia-Dominguez, M., Reyes, J.C. und F.J. Florencio** (1997). Purification and characterization of a new type of glutamine synthetase from cyanobacteria. *Eur.J.Biochem.* **244**:258-264
- Garcia-Dominguez, M., Reyes, J.C. und F.J. Florencio** (1999). Glutamine synthetase inactivation by protein-protein interaction. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **96**:7161-7166
- Garcia-Dominguez, M., Reyes, J.C. und F.J. Florencio** (2000). NtcA represses transcription of *gifA* and *gifB*, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol.Microbiol.* **35**:1192-1201
- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R.** (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim.Biophys.Acta* **990**:87-92
- Gerendas, J., Zhu, Z., Bendixen, R., Ratcliffe, R.G. und B. Sattelmacher** (1997). *Z.Pflanzenernähr.Bodenkd.* **160**:239-251
- Giglione, C., Vallon, O. und T. Meinel** (2003). Control of protein life-span by N-terminal methionine excision. *EMBO J.* **22**:13-23
- Gottesman, S., Maurizi, M.R., Wickner, S.** (1997a). Regulatory subunits of energy-dependent peptidases. *Cell* **91**:435-438
- Gottesman, S., Wickner, S., Maurizi, M.R.** (1997b). Protein quality control: Triage by chaperones and peptidases. *Genes Dev.* **11**:815-823
- Görl, M., Sauer, J., Baier, T. und K. Forchhammer** (1998). Nitrogen-starvation induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942: Adaptation to long-term survival. *Microbiology* **144**:2449-2458
- Grigorieva, G. und S.V. Shestakov** (1982). Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol.Lett.* **13**:367-370
- Grodberg, J. und J.J. Dunn** (1988). *OmpT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J.Bacteriol.* **170**:1245-1253
- Guerrero, M.G., Vega, J.M. und M. Losada** (1981). The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annu.Rev.Plant Physiol.* **32**:169-204
- Hakala, M., Tuominen, I., Keränen, M., Tyystjärvi, T., Tyystjärvi, E.** (2005). Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of photosystem II. *Biochim.Biophys.Acta* **1706**:68-80

- Hakala, M., Rantamäki, S., Puputti, E.-M., Tyystjärvi, T., Tyystjärvi, E.** (2006). Photoinhibition of manganese enzymes: Insights into the mechanism of photosystem II photoinhibition. *J.Exp.Bot.* **57**:1809-1816
- Hankamer, B., Morris, E., Niled, J., Gerle, C., Barber, J.** (2001). Three-dimensional structure of the photosystem II core dimer of higher plants determined by electron microscopy. *J.Struct.Biol.* **135**:262-269
- Haußühl, K., Andersson, B., Adamska, I.** (2001). A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *EMBO J.* **20**:713-722
- Heinrich, A., Maheswaran, M., Ruppert, U. und K. Forchhammer** (2004). The *Synechococcus elongatus* P_{II} signal transduction protein controls arginine synthesis by complex formation with N-acetyl-L-glutamate kinase. *Mol.Microbiol.* **52**:1303-1314
- Herrero, A., Muro-Pastor, A.M., Valladares, A., Flores, E.** (2004). Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol.Rev.* **28**:469-487
- Herrero, A., Muro-Pastor, A.M. und E. Flores** (2001). Nitrogen control in cyanobacteria. *J.Bacteriol.* **183**:411-425
- Hideg, E., Spetea, C. und I. Vass** (1994). Singlet oxygen and free radical production during acceptor- and donor-side-induced photoinhibition. Studies with spin trapping EPR spectroscopy. *Biochim.Biophys.Acta.* **1186**:143-152
- Hill, R.** (1937). Oxygen evolution by isolated chloroplasts. *Nature* **139**:881-882
- Hirschberg, J., Yehuda, A.B., Pecker, I., Ohad, N.** (1987). Mutations resistant to photosystem II herbicides. In *Plant Molecular Biology*, pp.357-366. Plenum NY
- Huang, S., Elliott, R.C., Liu, P.S., Koduri, R.K., Weickmann, J.L., Lee, J.H., Blair, L.C., Ghosh-Dastidar, P., Bradshaw, R.A., Bryan, K.M., Einanson, B., Kendall, R.L., Saito, K.** (1987). Specificity of cotranslational amino-terminal processing of proteins in yeast. *Biochemistry* **26**:8242
- Ikeuchi, M., Eggers, B., Shen, G., Webber, A., Yu, J., Hiranoy, A., Inoue, Y. und W. Vermaas** (1991). Cloning of the *psbK* gene from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and characterization of photosystem II in mutants lacking PSII-K. *J.Biol.Chem.* **266**:11111-11115
- Imamura, S., Tanaka, K., Shirai, M., und M. Asayama** (2006). Growth phase-dependent activation of nitrogen-related genes by a control network of group 1 and group 2 sigma factors in a cyanobacterium. *J.Biol.Chem.* **281**:2668-2675
- Ingber, D., Fujita, T., Kishimoto, S., Sudo, K., Kanamaru, T., Brem, H. und J. Folkman** (1990). Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature* **348**:555-557
- Irmiler, A., Sanner, S., Dierks, H. und K. Forchhammer** (1997). Dephosphorylation of the phosphoprotein P_{II} in *Synechococcus* PCC 7942: identification of an ATP and 2-oxoglutarate-regulated phosphatase activity. *Mol.Microbiol.* **26**:81-90

- Irmiler, A. und K. Forchhammer** (2001). A PP^oC-type phosphatase dephosphorylates the PII signalling protein in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **98**:12978-12983
- Jaggi, R., Ybarlucea, W., Cheah, E., Carr, P.D., Edwards, K.J., Ollis, D.L. und S.G. Vasudevan** (1996). The role of the T-loop of the signal transducing protein P_{II} from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **39**:223-228
- Jegerschöld, C. und S. Styring** (1991). Fast oxygen-independent degradation of the D1 reaction center protein in photosystem II. *FEBS* **280**:87-90
- Jepson, B.J.N., Anderson, L.J., Rubio, L.M., Taylor, C.J., Butler C.S., Flores E., Herrero, A., Butt, J.N. und D.J. Richardson** (2004). Tuning a nitrate reductase for function. *J.Biol.Chem.* **279**:32212-32218
- Jiang, P., Peliska, J.A. und A.J. Ninfa** (1998). Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme of *Escherichia coli* and its interaction with the P_{II} protein. *Biochemistry* **37**:12782-12794
- Jiang, F., Wissen, S., Widersten, M., Bergman und B. Mannervik** (2000). Examination of the transcription factor NtcA-binding motif by *in vitro* selection of DNA sequences from a random library. *J.Mol.Biol.* **301**:783-793
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Sängler, W. und N. Krauß** (2001). Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* **411**:909-917
- Kaiser, W.M. und S.C. Huber** (2001). Post-translational regulation of nitrate reductase: Mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J.Exp.Botany* **52**:1981-1989
- Kamberov, E.S., Atkinson, M.A. und A.J. Ninfa** (1995). The *Escherichia coli* signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. *J.Biol.Chem.* **270**:17797-17807
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., et al.** (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. *DNA Res.* **30**:109-136
- Kashino, Y., Lauber, W.M., Carroll, J.A., Wang, Q., Whitmarsh, J., Satoh, K., und H.B. Pakrasi** (2002). Proteomic analysis of a highly active photosystem II preparation from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 reveals the presence of novel polypeptides. *Biochemistry* **41**:8004-8012
- Kern, J., Loll, B., Zouni, A., Saenger, W., Irrgang, K.D. und J. Biesiadka** (2005). Cyanobacterial photosystem II at a 3.2 Å resolution- the plastoquinone binding pocket. *Photo.Res.* **84**:153-159
- Keren, N., Liberton, M. und H.B. Pakrasi** (2005a). Photochemical competence of assembled photosystem II core complex in cyanobacterial plasma membrane. *J.Biol.Chem.* **280**:6548-6553

- Keren, N., Ohkawa, H., Welsh, E.A., Liberton, M. und H.B. Pakrasi** (2005b). Psb29, a conserved 22-kDa protein, functions in the biogenesis of photosystem II in complexes in *Synechocystis* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**:2768-2781
- Khademi, S., O'Connell, J., Remis, J., Robles-Comares, Y., Miercke, J.W., Stroud, R.M.** (2004). Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Physiology* **21**:419-429
- Kleiner, D.** (1981). The transport of NH₃ and NH₄⁺ across biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **639**:41-52
- Kloft, N. und K. Forchhammer** (2005a). Signal transduction protein P_{II} phosphatase PphA is required for light-dependent control of nitrate utilization in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *J.Bacteriol.* **187**:6683-6690
- Kloft, N., Rasch, G. und K. Forchhammer** (2005b). Protein phosphatase PphA from *Synechocystis* PCC 6803: The physiological framework of P_{II}-P dephosphorylation. *Microbiology* **151**:1275-1283
- Kobayashi, M., Rodriguez, R., Lara, C. und T. Omata** (1997). Involvement of the C-terminal domain of an ATP-binding subunit in the regulation of the ABC-type Nitrate/Nitrite transporter of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J.Biol.Biochem.* **43**:27197-27201
- Kobayashi, M., Takatani, N., Taniwaga, M. und T. Omata** (2005). Posttranslational regulation of nitrate assimilation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *J.Bacteriol.* **187**:498-506
- Kock, H., Gerth, U. und M. Hecker** (2004). The ClpP peptidase is the major determinant of bulk protein turnover in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* **186**:5856-5864
- Kok, B., Forbush, B., McGloin, M.** (1970). *Photochem.Photobiol.* **11**:457
- Komenda, J. und Barber, B.** (1995). Comparison of *psb0* and *psbH* deletion mutants of *Synechocystis* PCC 6803 indicates that degradation of D1 protein is regulated by the Q_B site and dependent on protein synthesis. *Biochemistry* **34**:9625-9631
- Komenda, J., Lupinkova, L. und J. Kopecky** (2002) Absence of the *psbH* gene product destabilizes photosystem II complex and bicarbonate binding on its acceptor side in *Synechocystis* PCC 6803. *Eur.J.Biochem.* **269**:610-619
- Komenda, J., Reisinger, V., Müller, B.C., Dobakova, M., Granvogl, B. und A. Eichacker** (2004). Accumulation of the D2 protein is a key regulatory step for assembly of the photosystem II reaction center complex in *Synechocystis* PCC 6803. *J.Biol.Chem.* **279**:48620-48629
- Komenda, J., Tichy, M. und A. Eichacker** (2005a). The PsbH protein is associated with the inner antenna CP47 and facilitates D1 processing and incorporation into PSII in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* **46**:1477-1483
- Komenda, J.** (2005b). Autotrophic cells of the *Synechocystis psbH* deletion mutant are deficient in synthesis of CP47 and accumulate inactive PSII core complexes. *Photosynth.Res.* **85**:161-167
- Komenda, J., Barker, M., Kuvikova, S., de Vries, R., Mullineaux, C.W., Tichy, M., Nixon, P.J.** (2006). The FtsH protease slr0228 is important for quality control of

photosystem II in the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J.Biol.Chem.* **281**:1145-1151

Körner, H., Sofia, H.J., Zumft, W.G. (2003). Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:559-592

Kufryk, G.I. und W.F.J. Vermaas (2001). A novel protein involved in the functional assembly of the oxygen-evolving complex of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* **40**:9247-9255

Kufryk, G.I. und W.F.J. Vermaas (2003). Slr2013 is a novel protein regulating functional assembly of photosystem II in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J.Bacteriol.* **185**:6615-6623

Kuhlemeier, C.J., Thomas, A.A., van den Ende, A., van Leen, R.W., Borrias, W.E., van den Hondel, C.A. und G.A. van Arkel (1983). A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Plasmid* **10**:156-163

Kurusu, G., Zhang, H., Smith, J.L., Cramer W.A. (2003). Structure of the cytochrome *b6f* complex of the oxygenic photosynthesis: Tuning the cavity. *Science* **7**:1009-1014

Krinsky, N.I. und S.M. Deneke (1982). Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. *J.Natl.Cancer Inst.* **69**:205-210

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685

Lee, H.-M., Flores, E., Forchhammer, K., Herrero, A. und N. Tandeau de Marsac (2000). Phosphorylation of the signal transducer P_{II} protein and an additional effector are required for the P_{II}-mediated regulation of nitrate and nitrite uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Eur.J.Biochem.* **267**:591-600

Li, H. und L.A. Sherman (2000). A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J.Bacteriol.* **182**:4268-4277

Li, H. und L.A. Sherman (2002). Characterization of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and Δ nbl mutants under nitrogen-deficient conditions. *Arch.Microbiol.* **178**:256-266

Lindahl, M., Tabak, S., Cseke, L., Pichersky, E., Andersson, B., Adam, Z. (1996). Identification, characterization, and molecular cloning of a homologue of the bacterial FtsH protease in chloroplasts of higher plants. *J.Biol.Chem.* **271**: 29329-29334

Lindahl, M., Spetea, C., Hundal, T., Oppenheim, A.B., Adam, Z., Andersson, B. (2000). The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell* **12**:419-431

Loll B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A. und J. Biesiadka (2005). Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* **438**:1040-1044

Lowther, W.T. und B.W. Matthews (2002). Metalloaminopeptidases: Common functional themes in disparate structural surroundings. *Chem.Rev.* **102**:4581-4607

- Lowther, W.T., Orville, A.O., Madden, D.T., Lim, S., Rich, D.H. und Matthews B.W.** (1999). *Escherichia coli* methionine aminopeptidase: Implications of crystallographic analyses of the native, mutant, and inhibited enzymes for the mechanism of catalysis. *Biochemistry* **38**:7678-7688
- Luque, I., Herrero, A., Flores, E. und F. Madueno** (1992). Clustering of genes involved in nitrate assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Mol. Gen. Genet.* **232**:7-11
- Luque, I., Flores, E. und A. Herrero** (1994). Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *EMBO J.* **13**:2862-2869
- Luque, I. und K. Forchhammer** (2007). Nitrogen assimilation and C/N balance sensing. In: *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution* (eds: Flores, E. and Herrero, A.). Horizon Scientific Press 335-382
- Luque, I., Zabulon, G., Contreras, A., und J. Houmard** (2001). Convergence of two global transcriptional regulators on nitrogen induction of the stress-acclimation gene *nblA* in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol.Microbiol.* **41**:937-947
- Luque, I., Ochoa de Alda, J.A.G., Richaud, C., Zabulon, C., Thomas J.-C. und J. Houmard** (2003). The NblA protein from the filamentous cyanobacterium *Tolypothrix* PCC 7601: regulation of its expression and interactions with phycobilisome components. *Mol.Microbiol.* **50**:1043-1054
- Luque, I., Vazquez-Bermudez, M.F., Paz-Yepes, J., Flores, E. und A. Herrero** (2004). *In vivo* activity of the nitrogen control transcription factor NtcA is subjected to metabolic regulation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *FEMS Microbiol.Lett.* **236**:47-52
- Maeda, S.I., Kawaguchi, Y., Ohe, T.A. und T. Omata.** (1998). Cis-acting sequences required for NtcB-dependent, nitrite-responsive positive regulation of the nitrate assimilation operon in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J.Bacteriol.* **180**:4080-4088
- Mackinney, G.** (1941). Absorption of light by chlorophyll solution. *J.Biol.Chem.* **140**:315-322
- Maheswaran, M., Urbanke, C. und K. Forchhammer** (2004). Complex formation and catalytic activation by the P_{II} signalling protein of N-acetyl-L-glutamate kinase from *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *J.Biol.Chem.* **53**:55202-55210
- Mann, N.H., Novac, N., Mullineaux, C.W., Newman, J., Bailey, S., Robinson, C.** (2000). Involvement of an FtsH homologue in the assembly of functional photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* **479**:72-77
- Manzano, C., Candau, P., Gomez-Moreno, C., Relimpio, A.M. und M. Losada.** (1976). Ferredoxin-dependent photosynthetic reduction of nitrate and nitrite by particles of *Anacystis nidulans*. *Mol Cell.Biochem.* **10**:161-169
- Margulis L.** (1970). Origin of eukaryotic cells. In New Haven:Yale University Press **349**
- Martin, W., Hermann, R.G.** (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and why. *Plant Physiol.* **118**:9-17
- McFadden, G.I. und G.G. van Dooren** (2004). Evolution: red algal genome affirms a common origin of all plastids. *Curr.Biol.* **14**:514-516

- Melis, A., Mullineaux, C.W. und J.F. Allen** (1989). Acclimation of the photosynthetic apparatus to photosystem I or photosystem II light: Evidence from quantum yield measurement and fluorescence spectroscopy of cyanobacterial cells. *Z.Naturforsch.* **44**:109-118
- Mereschowsky, V.C.** (1905). Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol.Zentralblatt* **25**:593-604
- Michel, K.P., Pistorius, E.K., Golden, S.S.** (2001). Unusual regulatory elements for iron deficiency induction of the *idiA* gene of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J.Bacteriol.* **183**:5015-5024
- Moorhead, G.B.G. und C.S. Smith** (2003). Interpreting the plastid carbon, nitrogen and energy status. A role for P_{II} ? *Plant Physiol.* **133**:492-498
- Montesinos, M.L., Muro-Pastor, M.I., Herrero, A. und E. Flores** (1998). Ammonium/Methylammonium Permeases of a cyanobacterium. *J.Biol.Chem.* **273**:31463-31470
- Msadek, T., Dartois, V., Kunst, F., Herbaud, M.L., Denizot, F., Rapoport, G.** (1998). ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol.Microbiol.* **27**:899-914
- Mullineaux, C.W. und D. Emlyn-Jones** (2005). State transitions: an example of acclimation to low-light stress. *J.Exper.Botany* **56**:389-393
- Muro-Pastor, M.I., Herrero, A. und E. Flores** (2001a). Nitrogen-regulated group 2 sigma factors from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 involved in survival under nitrogen Stress. *J.Bacteriol.* **183**:1090-1095
- Muro-Pastor, M.I., Reyes, J.C. und F.J. Florencio** (2001b). Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels. *J.Biol.Chem.* **276**:38320-38328
- Muro-Pastor, M.I. und F.J. Florencio** (2003). Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. *Plant Physiol.Biochem.* **41**:595-603
- Mullineaux, C. W. und F. Allen** (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
- Müller, T., Walter, B., Wirtz, A., Burkovski, A.** (2006). Ammonium toxicity in bacteria. *Curr.Microbiol.* **52**:400-406
- Myers, J., Graham, J.-R. und R.T. Wang** (1980). Light harvesting in *Anacystis nidulans* studied in pigment mutants. *Plant Physiol.* **66**:1144-1149
- Nixon, P.J., Barker, M., Boehm, M., de Vries, R., Komenda, J.** (2005). FtsH-mediated repair of the photosystem II complex in response to light stress. *J.Exp.Bot.* **56**:357-63
- Narusaka, Y., Narusaka, M., Satoh, K.** (1998). The herbicide-resistant species of the cyanobacterial D1 protein. *Plant Cell Physiol.* **39**:620-626
- Ogura, T., Tomoyasu, T., Morimura, S., Begg, K.J.** (1991). Structure and function of the *ftsH* gene in *Escherichia coli*. *Res.Microbiol.* **142**:279-282.

- Ohnishi, N., Allakhverdiev, S.I., Takahashi, S., Higashi, S., Watanabe, M., Nishiyama, Y., Murata, N.** (2005). Two-Step mechanism of photodamage to photosystem II: Step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction centre. *Biochemistry* **44**:8494-8499
- Oettmeier, W.** (1999). Herbicide resistant supersensitivity in photosystem II. *Cell Mol.Life Sci.* **55**:1255-1277
- Omata, T., Andriesse, X. und A. Hirano** (1993). Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Mol.Gen.Genet.* **236**:193-202
- Pojidaeva, E., Zinchenko, V., Shestakov, S.V., Sokolenko, A.** (2004). Involvement of the SppA1 peptidase in acclimation to saturating light intensities in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J.Bacteriol.* **186**:3991-3999
- Rappaport, F., Guergova-Kuras, M., Nixon, P.J., Diner, B.A. und J. Lavergne** (2002). Kinetics and pathways of charge recombination in photosystem II. *Biochemistry* **41**:8518-8527
- Razeghifard, M.R., Wydrzynski, T., Pace, R. J. und R.L. Burnap** (1997). Yz reduction kinetics in the absence of the manganesestabilizing protein of photosystem II. *Biochemistry* **36**:14474-14478
- Reyes, J.C. und F.J. Florencio** (1994). A new type of glutamine synthetase in cyanobacteria: The protein encoded by the *glnN* gene supports nitrogen assimilation in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *J.Bacteriol.* **176**:1260-1267
- Reyes, J.C., Muro-Pastor M.I. und F.J. Florencio** (1997). Transcription of glutamine synthetase genes (*glnA* and *glnN*) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is differently regulated in response to nitrogen availability. *J.Bacteriol.* **179**:2678-2689
- Richaud, C., Zabulon, G., Joder, A. und J.-C. Thoma** (2001). Nitrogen or sulfur starvation differentially affects phycobilisome degradation and expression of the *nblA* Gene in *Synechocystis* strain PCC 6803. *J.Bacteriol.* **183**:2989-2994
- Rinalducci, S., Pedersen, J.Z., Zolla, L.** (2004). Formation of radicals from singlet oxygen produced during photoinhibition of isolated light-harvesting proteins of photosystem II. *Biochim.Biophys.Acta* **1608**:63-73
- Rippka, R.** (1988). Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzymol.* **167**:3-27
- Ritchie, R.J und J. Gibson** (1987). Permeability of ammonia and amines in *Rhodobacter sphaeroides* and *Bacillus firmus*. *Arch.Biochem.Biophys.* **258**:131-142
- Roderick, S.L. und B.W. Matthews** (1993). Structure of the cobalt-dependent methionine aminopeptidase from *Escherichia coli*: A new type of proteolytic enzyme. *Biochemistry* **32**:3907-3912
- Rubio, L.M., Flores, E., Herrero, A.** (2002). Purification, cofactor analysis, and site-directed mutagenesis of *Synechococcus* ferredoxin-nitrate reductase. *Phot.Res.* **72**:13-26

- Ruppert, U., Irmeler, A., Kloft, N. und K. Forchhammer** (2002). The novel protein phosphatase PphA from *Synechocystis* PCC 6803 controls dephosphorylation of the signalling protein P_{II}. *Mol.Microbiol.* **44**:855-864
- Rustler, S.** (2003). Diplomarbeit am Fachbereich Biologie (Molekular- und Mikrobiologie), Justus-Liebig-Universität Gießen
- Rutherford, A.W. und A. Kriger-Liszky** (2001). Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends Biochim.Sci.* **26**:648-653
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und T. Maniatis** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanger, F., Nicklen, S., und A.R. Coulson** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **74**:5463-5467
- Sauer, J., Görl, M. und K. Forchhammer** (1999). Nitrogen starvation in *Synechococcus* PCC 7942: Involvement of glutamine synthetase and NtcA in phycobiliprotein degradation and survival. *Arch.Microbiol.* **172**:247-255
- Sauer, J., Dirmeier, U. und K. Forchhammer** (2000). The *Synechococcus* strain PCC 7942 *glnN* product (Glutamine Synthetase III) helps recovery from prolonged nitrogen chlorosis. *J.Bacteriol.* **182**:5615-5619
- Sauer, J., Schreiber, U., Schmid, R., Völker, U., Forchhammer, K.** (2001). Nitrogen starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942. Low-level photosynthesis as a mechanism of long-term survival. *Plant.Physiol.* **126**:233-243
- Sauer, J.** (2002). Molekulare Grundlagen der Stickstoffmangelreaktion in *Synechococcus* PCC 7942: Chlorose als Überlebensstrategie. Doktorarbeit am Fachbereich Biologie (Molekular- und Mikrobiologie), Justus-Liebig-Universität Gießen
- Schägger, H. und G.V. Jagow** (1987). *Analyt.Biochem.* **166**:368-379
- Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A., Lindquist, S.** (1996). HSP100/Clp proteins: A common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem.Sci.* **21**:289-296
- Schwarz, R. und K. Forchhammer** (2005). Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: Emergence of a complex network of cellular responses. *Microbiology* **151**:2503-2514
- Schwarz, R. und A.R. Grossman** (1998). A response regulator of cyanobacteria integrates diverse environmental signals and is critical for survival under extreme conditions. *Plant Biology* **95**:11008-11013
- Schreiber, U., Endo, T., Mi, H., Asada, K.** (1995). Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse method: Particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* **36**:873-882
- Sendersky, E., Lahmi, R., Shaltiel, J., Perelman, A. und R. Schwarz** (2005). NblC, a novel component required for pigment degradation during starvation in *Synechococcus* PCC 7942. *Mol.Microbiol.* **58**:659-668
- Shen, G. und W.F.J. Vermaas** (1994). Chlorophyll in a *Synechocystis* sp. PCC 6803 mutant without photosystem I and photosystem II core complexes. *J.Biol.Chem.* **269**:13904-13910

- Shi, L.-X. und W.P. Schröder** (2004). The low molecular mass subunits of the photosynthetic supracomplex, photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* **1608**:75-96
- Sicora, C., Mate, Z. und I. Vass** (2003). The interaction of visible and UV-B light during photodamage and repair of photosystem II. *Photosynth. Res.* **75**:127-137
- Siefermann-Harms, D.** (1987). The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Plant Physiol.* **69**:561-568
- Silva, P., Thompson, E., Bailey, S., Kruse, O., Mullineaux, C.W., Robinson, C., Mann, N.H., Nixon, P.J.** (2003). FtsH is involved in the early stages of repair of photosystem II in *Synechocystis* sp PCC 6803. *The Plant Cell* **15**:2152-2164
- Sippola, K. und E.-M. Aro** (2000). Expression of *psbA* genes is regulated at multiple levels in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Photochem. Photobiol.* **71**:706-714
- Sjögren, L., Stanne, T.M., Zheng, B., Sutinen, S. und A.K. Clarke** (2006). Structural and functional insights into the chloroplast ATP-dependent Clp protease in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**:2635-2649
- Sokolenko, A., Poijedaeva, E., Zinchenko, V., Glaser, V.M., Herrmann, R.G., Shestakov, S.V.** (2002). The gene complement for proteolysis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Current. Genet.* **41**:291-310
- Sonoike, K., Hihara, Y. und M. Ikeuchi** (2001). Physiological significance of the regulation of photosystem stoichiometry upon high light acclimation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* **42**:379-384
- Stanier, R.Y. und G. Cohen-Bazire** (1977). Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**:225-274
- Steiger, S., Schäfer, L. und G. Sandmann** (1999). High-light upregulation of carotenoids and their antioxidative properties in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *J. Photochem. Photobiol. B* **52**:14-18
- Stirnberg, M., Fulda, S., Huckauf, J., Hagemann, M., Krämer, R., Marin, K.** (2007). A membrane bound FtsH protease is involved in osmoregulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803: The compatible solute synthesizing enzyme GgpS is one of the targets for proteolysis. *Mol. Microbiol.* **63**:86-102
- Su, Z., Olman, V., Mao, F. und Y. Xu** (2005). Comparative genomics analysis of NtcA regulons in cyanobacteria: Regulation of nitrogen assimilation and its coupling to photosynthesis. *Nucleic Acids Res.* **33**:5156-5171
- Su, Z., Mao, F., Dam, P., Wu, H., Olman, V., Paulsen, I. T., Palenik, B. und Y. Xu** (2006). Computational inference and experimental validation of the nitrogen assimilation regulatory network in cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH 8102. *Nucleic Acids Res.* **34**:1050-1065
- Summer, E.J., Schmid, V.H.R., Bruns, B.U. und G.W. Schmidt** (1997). Requirement for the H phosphoprotein in photosystem II of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **113**:1359-1368

- Suzuki, I., Sugiyama, T. und T. Omata** (1993). Primary structure and transcriptional regulation of the gene for nitrite reductase from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* **34**:1311-1320
- Takahashi, Y., Matsumoto H., Goldschmidt-Clermont, M., Rochaix, J.D.** (1994). Directed disruption of the *Chlamydomonas* chloroplast *psbK* gene destabilizes the photosystem II reaction center complex. *Plant Mol.Biol.* **24**:779-788
- Tandeau de Marsac, N. und J. Houmard** (1988). Complementary chromatic adaptation: Physiological conditions and action spectra. *Methods Enzymol.* **167**:318-328
- Telfer, A., Dahmi, S., Bishop, S.M., Phillips, D. und J. Barber** (1994). β -beta carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem II reaction centers. *Biochemistry* **33**:14469-14474
- Tsinoremas, N.F., Castets, A.M., Harrison, M.A., Allen, F.J. und N. Tandeau de Marsac** (1991). Photosynthetic electron transport controls nitrogen assimilation in cyanobacteria by means of post-translational modification of the *glnB* gene product. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **88**:4565-4569
- Tsunasawa, S., Stewart, J.W., Sherman, F.** (1985). Amino-terminal processing of mutant forms of yeast iso-1-cytochrome c. The specificities of methionine aminopeptidase and acetyltransferase. *J.Biol.Chem.* **260**:5382-5392
- Turcsanyi, E., Vass, I.** (2000). Inhibition of photosynthetic electron transport by UV-A radiation targets the photosystem II complex. *Photochem.Photobiol.* **72**:513-520
- Tyystjärvi, T., Tuominen, T., Herranen, M., Aro, E.-M., Tyystjärvi, E.** (2002). Action spectrum of *psbA* gene transcription is similar to that of photoinhibition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* **516**:167-171
- Vass, I., Cser, K., Cheregi, O.** (2007). Molecular mechanism of light stress of photosynthesis. *Ann.NY Acad.Sci.* **1113**:114-122
- Vass, I., Styring, S., Hundal, T., Koivuniemi, A., Aro, E.-M. und B. Andersson** (1992). Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: Stable reduced Q_A species promote chlorophyll triplet formation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **89**:1408-1412
- Vaughan, M. D., P. B. Sampson, and F. H. John.** (2002). Methionine in and out of Proteins: targets for drug design. *Curr. Med. Chem.* **9**:385-409.
- Vazquez-Bermudez, M.F., Herrero, A. und E. Flores** (2002). 2-Oxoglutarate increases the binding affinity of the NtcA (nitrogen control) transcription factor for the *Synechococcus glnA* promoter. *FEBS Lett.* **512**:71-74
- Vega-Palas, M.A., Madueno, F., Herrero, A. und E. Flores** (1990). Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942. *J.Bacteriol.* **172**:643-647
- Vega-Palas, M.A., Flores, E. und A. Herrero** (1992). NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of transcriptional regulators. *Mol.Microbiol.* **6**:1853-1859
- Vitry de, C., Olive, J., Drapier, D., Recouvreur, M. und F.-A. Wollman** (1989). Posttranslational events leading to the assembly of photosystem II protein complex: A

study using photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. J.Cell Biol. **109**:991-1006

Voß, B., Gierga, I. A. Axmann und W. R. Hess (2007). A motif-based search in bacterial genomes identifies the ortholog of the small RNA Yfr1 in all lineages of cyanobacteria. BMC Genomics **8**:375.

Waasbergen van, L.G., Dolganov, N. und A.R. Grossman (2002). *nbIS*, a gene involved in controlling photosynthesis-related gene expression during high light and nutrient stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. J.Bacteriol. **184**:2481-2490

Wijk van, K.J., Bingsmark, S., Aro, E.-M. und B. Andersson (1995). *In vitro* synthesis and assembly of photosystem II core proteins. J.Biol.Chem. **270**:25685-25695

Wilde, A., Lünser, O., Ossenbühl, F., Nickelsen, J. und T. Börner (2001). Characterization of the cyanobacterial *ycf37*: Mutation decreases the photosystem I content. Biochem. J. **357**:211-216

Wiren von, N., Merrick, M. (2004). Top.Curr.Genet. **9**:95-120

Wiren von, N., Lauter, F.R., Ninnemann, O., Gillissen, B., Walch-Liu, P., Engels, C., Jost, W., Frommer, W.B. (2000). Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. Plant J. **21**:167-175

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. Photosynt.Res. **31**:75-87

Wolk, C. P., Ernst, A. und J. Elhai (1994). Heterocyst metabolism and development, pp. 769-823. In D. A. Bryant (ed.). The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Yamamoto, Y. (2001). Quality control of photosystem II. Plant Cell Physiol. **42**:121-128

Zak, E., Norling, B., Maitra, R., Huang, F., Andersson, B. und H.B. Pakrasi (2001). The initial Steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes. Proc.Natl.Acad.Sci.USA **98**:13443-13448

Zhang, Z.-H., Mayes, S.R., Vass, I., Nagy, L. und J. Barber (1993). Characterisation of the *psbK* locus of the *Synechocystis* sp. PCC 6803 in terms of photosystem II function. Photosyn.Res. **38**:369-377

Zhang, P., Scora, C.I., Vorontsova, N., Allahverdiyeva, Y., Battchikova, N., Nixon, P.J. und E.-M. Aro (2007). FtsH protease is required for induction of inorganic carbon acquisition complexes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Mol.Microbiol. **65**:728-740

Zheleva, D., Sharma, J., Panico, M., Morris, H.R., Barber, J. (1998). Isolation and characterization of monomeric and dimeric CP47-reaction center photosystem II complexes. J.Biol.Chem. **273**:16122-16127

Zouni, A., Witt H.-T., Kern, J., Fromme, P., Krauß, N., Säneger, W., Orth, P. (2001). Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. Nature **409**:739-743

Zinchenko, V. V., I. Piven, V. Melnik, and S. Shestakov. (1999). Vectors for complementation analysis of mutants of cyanobacteria. Genetika. **35**: 291-296.

7 Abkürzungen

A	Absorption
Abb.	Abbildung
Amp^R	Ampicillin-Resistenz
bp	Basenpaar
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Chla	Chlorophyll a
Cm	Chloramphenicol
Cpm	counts per minute, Angabe des Zerfalls pro Minute
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide
d	Tage
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (<i>et altera</i>)
ETR	Elektronentransportrate
g	Gramm oder Gravitationskonstante
Gm	Gentamycin
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure
IF	Inaktivierungsfaktoren
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galakto-pyranosid

K	SI-Basiseinheit der thermodynamischen Temperatur
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria-Bertani
μCi	Mikrocurie (Einheit der Radioaktivität)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μmol	Mikromol
M	Molar
Mbp	Megabasenpaare
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
<i>Mmap2</i>	<i>map-2</i> -Mutante
MOPS	3-Morpholino-1-Propansulfonsäure
mV	Millivolt
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nikotinamid-Dinukleotid-Phosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte
ORF	offene Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PBS	Phycobilisomen
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	Säuregrad einer Lösung
pKs	neg. dekadischer Log. der Säurenstärke (Gleichgewichtskonst.)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
RLU	relative Lichteinheiten (<i>relative light units</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanz-Einheit (<i>resonance unit</i>)
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Borat-Natrium (<i>sodium</i>)-Puffer
TG	Trockengewicht
TSP	Transkriptionsstartpunkt
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt oder Volumen
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Eigene Veröffentlichungen

Drath, M., Kloft, N., Novak, J., Batschauer, A., Marin, K. und K. Forchhammer. Ammonia triggers photodamage of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Zur Veröffentlichung eingereicht, in Revision

Drath, M., Beier, K., Sandmann, G. und K. Forchhammer. Methionine aminopeptidase encoded by *map-2* is required for maintenance of photosystem II activity under stress conditions in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Zur Veröffentlichung eingereicht

Teilnahme an Kongressen mit eigenen Beiträgen

Miriam Drath, Karl Forchhammer (2005) „The role of aminopeptidases in nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803“. Tagungsband des 2. Symposium of the DFG Priority Program „Proteolysis in Prokaryotes: Protein Quality Control and Regulatory Principles“ , Berlin, Posterpräsentation

Miriam Drath, Karl Forchhammer (2006) „Functional characterization of methionine-aminopeptidase 2 in *Synechocystis* sp. PCC 6803“. Tagungsband des 12. International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Pau, Frankreich, Posterpräsentation

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Forchhammer für die Möglichkeit, eine so interessante und abwechslungsreiche Themenstellung in seinem Labor zu bearbeiten. Seine Diskussionsbereitschaft und Hilfestellungen haben zu dem Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. C. Forreiter für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Ein Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. A. Batschauer für die Möglichkeit in seinem Labor die Belichtungsexperimente durchzuführen. Vielen Dank, auch an die Mitglieder der AG, für die freundliche Aufnahme, die hilfreiche Unterstützung, die Diskussionen und den Kaffee!

Vielen Dank auch an Dr. P. Michel für die Möglichkeit in seinem Labor die Fluoreszenz-Emissionspektren anzufertigen.

Herrn Dr. K. Marin danke ich für die Bereitstellung der Mutanten-Kultur.

Für die nette Einführung in das Laborleben in Gießen und das schöne Arbeitsklima danke ich Carmen, Elvira und Ulrike. Ulrike: Danke für die fachkundigen Klonierungs-Hilfen! Nicole, Annette und Grit möchte ich herzlich für die Unterstützung im Labor, die Motivation und die netten und lustigen Stunden in der Zwischenzeit danken. Schön, dass unsere Freundschaft über das Labor hinaus hält! Grit: Danke für die Aufnahme während meines Tübinger Laboraufenthalts und den Hilfestellungen in dem mir fremden Labor und den vielen Postsendungen!

Danke liebe Nicole, Tanja, Grit, Axinia und lieber Markus für die hilfreichen Korrekturen meiner Arbeit!

Vielen Dank auch an die Mitglieder der AG Klug und AG Treuner-Lange für die Hilfe und auch für die lustigen Stunden während des Mittagessens! Danke Pamela für die vielen Mitfahrgelegenheiten!

Meinen Freunden und meiner Familie, die mich in dieser Zeit unterstützt, oft motiviert und aufgefangen haben, möchte ich ganz herzlich danken! Schön, dass es Euch gibt!

Danke Markus, für das Aushalten meiner unterschiedlichsten Launen während der Laborzeit und des Zusammenschreibens und, dass Du mich immer wieder zum Lachen bringst. Ich danke dir auch die vielen Wartungen und Hilfestellungen in Sachen Computer und Sicherungen meiner Daten...Dankeschön!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Miriam Drath, geboren am 27.06.1975 in Berlin, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig, gemäß der Promotionsordnung (vom 5. Februar 1990) für die Verleihung des Dr. rer. nat. durch die Naturwissenschaftlichen Fachbereiche der Justus-Liebig-Universität, selbständig verfasst habe und dabei keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Gießen, Januar 2008

(Miriam Drath)