

Funktionelle Analyse konservierter Gene aus Cyanobakterien und Chloroplasten

Untersuchungen zur Funktion und physiologischen
Relevanz der *Synechocystis* sp. PCC6803-Gene
ycf34, *ycf54* und *ycf59*

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
- Dr. rerum naturalium - *Dr. rer. nat.*

vorgelegt von

Dipl. Biol. Thomas Wallner

aus Neuenhagen bei Berlin

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

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie des Fachbereiches 08 der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von Juni 2008 bis April 2012 unter der Leitung von Prof. Dr. Annegret Wilde angefertigt.

1. Gutachter/in: Prof. Dr. Annegret Wilde

Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter/in: PD Dr. Mathias Zeidler

Institut für Pflanzenphysiologie

Justus - Liebig - Universität Gießen

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 13.04.2012

Inhaltverzeichnis

| | |
|---|------------|
| SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG | III |
| INHALTVERZEICHNIS | IV |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | VII |
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Cyanobakterien als Modellorganismen für die Aufklärung der pflanzlichen Photosynthese | 1 |
| 1.2 Komponenten des cyanobakteriellen Elektronentransports | 3 |
| 1.3 Chlorophyll-Biosynthese, Zweig der Tetrapyrrol-Biosynthese | 6 |
| 1.4 Vergleichende Analysen von cyanobakteriellen und chloroplastidären Genomen erlauben Einblick in die Evolution der Chloroplasten | 12 |
| 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit | 16 |
| 2 ERGEBNISSE | 17 |
| 2.1 Funktionelle Analyse des <i>ycf34</i> -Homologs in <i>Synechocystis</i> | 17 |
| 2.1.1 Bioinformatische Analysen..... | 17 |
| 2.1.2 Die Transkription des <i>ycf34</i> -Gens..... | 20 |
| 2.1.3 Konstruktion einer <i>ycf34</i> -Mutante..... | 22 |
| 2.1.4 Phänotypische Charakterisierung der <i>ycf34</i> -Mutante von <i>Synechocystis</i> | 23 |
| 2.1.4.1 Wachstum und Pigmentierung unter Standardbedingungen | 23 |
| 2.1.4.2 <i>ycf34</i> zeigt einen Wachstumsdefekt und eine veränderte Pigmentierung unter extrem schwachen Lichtintensitäten | 25 |
| 2.1.4.3 Komplementierung des <i>ycf34</i> -Phänotyps | 28 |
| 2.1.4.4 <i>ycf34</i> assembliert intakte, aber kleinere Phycobilisomen | 30 |
| 2.1.4.5 <i>ycf34</i> -Zellen zeigen eine retardierte <i>de novo</i> Assemblierung der Phycobilisomen | 34 |
| 2.1.4.6 <i>Synechocystis</i> Ycf34 interagiert nicht mit den Phycobilisomen | 35 |
| 2.1.4.7 <i>ycf34</i> -Mutanten zeigen eine veränderte Transkriptakkumulation des <i>cpcBAC2CID</i> -Operons | 37 |
| 2.1.4.8 Die Inaktivierung von <i>ycf34</i> verändert die photosynthetische Aktivität der Zellen | 40 |
| 2.1.4.9 Ycf34 ist ein Membranprotein und migriert zusammen mit photosynthetischen Membranproteinkomplexen im Saccharose-Gradienten | 45 |
| 2.1.5 Biochemische Charakterisierung von <i>Synechocystis</i> Ycf34..... | 48 |
| 2.1.5.1 Heterologe Expression und Reinigung von <i>Synechocystis</i> Ycf34 | 48 |
| 2.1.5.2 <i>Synechocystis</i> Ycf34 besitzt ein Eisen-Schwefel-Zentrum | 49 |
| 2.2 Funktionelle Analysen der <i>ycf59</i> und <i>ycf54</i> -Homologe in <i>Synechocystis</i> | 53 |
| 2.2.1 <i>Synechocystis ycf59</i> kodiert für die oxidative Cyclase I..... | 53 |
| 2.2.2 <i>cycI</i> und <i>ΔcycII</i> lassen sich durch Expression des jeweils homologen Genprodukts komplementieren | 56 |
| 2.2.3 <i>ycf54</i> , ein möglicher Kandidat für die fehlende Untereinheit der Cyclase | 59 |
| 2.2.4 <i>ycf54</i> -Zellen akkumulieren das Substrat der Cyclase | 62 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.2.5 | Verminderte Abundanz von Enzymen der Tetrapyrrol-Biosynthese in <i>ycf54</i> -Zellen..... | 63 |
| 2.2.6 | FLAG-Ycf54 erlaubt eine teilweise Komplementierung der <i>ycf54</i> -Mutante..... | 66 |
| 2.2.7 | <i>Synechocystis</i> Ycf54 und Ycf59 interagieren miteinander..... | 70 |
| 3 | DISKUSSION | 72 |
| 3.1 | Der hypothetische chloroplastidäre offenen Leserahmen <i>ycf34</i> von <i>Synechocystis</i> | 72 |
| 3.1.1 | Genomischer Kontext und Transkription von <i>Synechocystis ycf34</i> | 72 |
| 3.1.2 | Inaktivierung von <i>Synechocystis ycf34</i> | 73 |
| 3.1.3 | Reduktion des Phycobilisomen-Gehaltes in <i>ycf34</i> -Zellen..... | 75 |
| 3.1.4 | Biochemische Eigenschaften von <i>Synechocystis</i> Ycf34..... | 77 |
| 3.1.5 | Veränderungen des photosynthetischen Elektronenflusses in <i>ycf34</i> -Zellen..... | 78 |
| 3.2 | <i>Synechocystis ycf59</i> und <i>ycf54</i> | 81 |
| 3.2.1 | Die oxidative Cyclase..... | 81 |
| 3.2.2 | Ycf54, die fehlende Untereinheit der oxidativen Cyclase..... | 83 |
| 3.2.3 | Interaktion von Ycf54 und Ycf59, der oxidativen Cyclase..... | 85 |
| 4. | MATERIAL UND METHODEN..... | 87 |
| 4.1 | Material..... | 87 |
| 4.1.1 | Chemikalien..... | 87 |
| 4.1.1.1 | Radiochemikalien..... | 87 |
| 4.1.2 | Größenstandards..... | 87 |
| 4.1.3 | Antikörper..... | 88 |
| 4.1.4 | Plasmide..... | 89 |
| 4.1.5 | Enzyme..... | 90 |
| 4.1.6 | Synthetische Oligonukleotide..... | 90 |
| 4.1.7 | Sonstige Materialien..... | 94 |
| 4.1.8 | Technische Laborgeräte..... | 94 |
| 4.1.9 | Datenbanken und Software..... | 96 |
| 4.1.10 | Medien, Puffer und Stammlösungen..... | 97 |
| 4.1.11 | Mikroorganismen..... | 97 |
| 4.2 | Methoden..... | 99 |
| 4.2.1 | Allgemeine und physiologische Methoden..... | 99 |
| 4.2.1.1 | Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> | 99 |
| 4.2.1.1 | Allgemeine Kultivierung von <i>Synechocystis</i> | 100 |
| 4.2.1.2 | Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen..... | 101 |
| 4.2.1.1 | Absorptionsspektren ganzer Zellen von <i>Synechocystis</i> | 101 |
| 4.2.1.3 | 77K Fluoreszenzemissionsspektroskopie ganzer Zellen von <i>Synechocystis</i> | 101 |
| 4.2.1.4 | Bestimmung der Pigmentzusammensetzung von <i>Synechocystis</i> | 101 |
| 4.2.1.5 | Quantifizierung von Intermediaten der Chlorophyll-Biosynthese..... | 102 |
| 4.2.1.6 | Messung der Syntheserate von δ -Aminolävulininsäure..... | 103 |
| 4.2.1.7 | Messungen der Sauerstofffreisetzung von <i>Synechocystis</i> | 103 |
| 4.2.1.8 | Kinetik der P ₇₀₀ Oxidation, Re-Reduktion und PS I-Lichtkennlinien..... | 103 |
| 4.2.1.9 | Wachstumsanalysen von <i>Synechocystis</i> | 103 |
| 4.2.1.10 | Bestimmungen der Wachstumsraten..... | 104 |
| 4.2.1.11 | Degradation und <i>de novo</i> -Synthese der Phycobilisomen..... | 104 |
| 4.2.2 | Molekularbiologische Methoden..... | 104 |

| | | |
|-------------------------------|---|------------|
| 4.2.2.1 | Spezifische DNA-Amplifikationen mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion | 104 |
| 4.2.2.2 | Reinigung von PCR-Produkten | 105 |
| 4.2.2.3 | Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen | 105 |
| 4.2.2.4 | Generierung von 3'-Adenosin-Einzelstrangüberhängen..... | 105 |
| 4.2.2.5 | Intermolekulare Ligation von DNA-Molekülen | 105 |
| 4.2.2.6 | DNA-Sequenzierung | 106 |
| 4.2.2.7 | Isolation von Plasmid-DNA aus Zellen von <i>E.coli</i> | 106 |
| 4.2.2.8 | Isolation der Gesamt-DNA aus <i>Synechocystis</i> | 106 |
| 4.2.2.9 | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren..... | 107 |
| 4.2.2.10 | Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen..... | 107 |
| 4.2.2.11 | Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA | 108 |
| 4.2.2.12 | Transformation von <i>Synechocystis</i> | 108 |
| 4.2.2.13 | Konjugation von <i>Synechocystis</i> | 109 |
| 4.2.2.14 | Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese und Extraktion von DNA..... | 109 |
| 4.2.2.15 | <i>Southern Blot</i> -Analyse | 110 |
| 4.2.2.16 | Konstruktion des Plasmids pGEX-ycf34 zur heterologen Expression von GST-Ycf34 in <i>E. coli</i> | 111 |
| 4.2.2.17 | Zielgerichtete Mutagenese von Ycf34 zur heterologen Expression von GST-Ycf34 in <i>E.coli</i> | 112 |
| 4.2.2.18 | Generierung des Plasmids pSK9-FLAG-ycf34..... | 112 |
| 4.2.2.19 | Generierung des Plasmids pUR-FLAG-ycf54 | 113 |
| 4.2.3 | Methoden zur Analyse von Ribonukleinsäuren | 114 |
| 4.2.3.1 | Isolation der Gesamt-RNA von <i>Synechocystis</i> | 114 |
| 4.2.3.2 | Denaturierende elektrophoretische Auftrennung von RNA in Formaldehyd-Agarosegelen und Kapillar- <i>Blotting</i> | 114 |
| 4.2.3.3 | Denaturierende elektrophoretische Auftrennung von RNA in Harnstoff-Polyacrylamidgelen und Elektro- <i>Blotting</i> | 115 |
| 4.2.3.4 | Herstellung radioaktiv markierter Sonden für <i>Northern Blot</i> -Hybridisierungen | 115 |
| 4.2.3.5 | <i>Northern Blot</i> -Analysen | 116 |
| 4.2.3.6 | Determination von Transkriptenden - 5'-RACE (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>) | 117 |
| 4.2.4 | Biochemische Methoden..... | 118 |
| 4.2.4.1 | Ernte und Aufschluss von <i>Synechocystis</i> -Zellen | 118 |
| 4.2.4.2 | Isolation der Phycobilisomen von <i>Synechocystis</i> | 118 |
| 4.2.4.3 | Isolation der Thylakoidmembranen von <i>Synechocystis</i> | 119 |
| 4.2.4.4 | Co-Immunopräzipitation von FLAG-Fusionsproteinen..... | 120 |
| 4.2.4.5 | Heterologe Expression und Reinigung des GST-Ycf34-Fusionsproteins | 121 |
| 4.2.4.6 | Analyse des GST-Ycf34-Fusionsproteins | 122 |
| 4.2.4.7 | Präzipitation von Proteinen | 122 |
| 4.2.4.8 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen | 123 |
| 4.2.4.9 | <i>clear native</i> -Polyacrylamidgelelektrophorese (CN-PAGE) von Membranproteinkomplexen..... | 125 |
| 4.2.4.10 | Immunoblot-Analysen..... | 126 |
| ZUSAMMENFASSUNG..... | | 127 |
| ABSTRACT | | 128 |
| LITERATUR | | 129 |
| PUBLIKATIONSLISTE..... | | 143 |
| DANKSAGUNG | | 144 |

Abkürzungsverzeichnis

In diesem Verzeichnis werden keine SI-Einheiten, deren Symbole sowie Zeichen und Kürzel aus chemischen und mathematischen Formeln aufgeführt. Ebenso allgemein gebräuchliche Abkürzungen.

| Abkürzung | Begriff |
|----------------------|---|
| °C | Grad Celsius |
| A, C, G, T, U, N | Nukleinbasen der DNA und RNA |
| <i>a.u.</i> | <i>arbitrary units</i> , beliebige Einheiten |
| aa | <i>amino acid</i> , Aminosäure |
| AB | <i>Aktiebolag</i> , Aktiengesellschaft |
| ALA | δ -Aminolävulinsäure |
| Amp | Ampicillin |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BG | <i>blue green</i> |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| bp | Basenpaare |
| <i>ccm</i> | <i>CO₂ concentrating mechanism</i> |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> |
| <i>Chlamydomonas</i> | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> |
| Ci | Curie |
| Cm | Chloramphenicol |
| CN-PAGE | <i>clear native PAGE</i> |
| dCTP | Desoxy-Cytidintriphosphat |
| ddH ₂ O | zweifach destilliertes Wasser |
| DEPC | Diethyldicarbonat |
| DMF | Dimethylfuran |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| DOC | Natriumdesoxycholat |
| dsDNA | doppelsträngige DNA |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| eLL | <i>very low light</i> , Licht extrem schwacher Intensität |
| EPR | <i>electron paramagnetic resonance</i> , Elektronenspinresonanz |
| Ery | Erythromycin |
| <i>et al.</i> | <i>et alia</i> , und andere |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| fw | <i>forward</i> , vorwärts |
| g | Gravitationskonstante |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| h | Stunde(n) |
| HC | <i>high level of CO₂</i> , hohe CO ₂ -Konzentration |

| Abkürzung | Begriff |
|---------------------|--|
| HEPES | Hydroxyethylpiperazinesulfonsäure |
| HL | <i>high light</i> , Licht starker Intensität |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase |
| IgG | Immunglobulin G |
| IPTG | Isopropyl-thio- β -D-Galaktopyranosid |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| Km | Kanamycin |
| LB | <i>lysogeny broth</i> |
| LL | <i>low light</i> , Licht schwacher Intensität |
| MCS | <i>multiple cloning site</i> |
| MEN | MOPS-EDTA-Natrium-Acetat-Puffer |
| MgProto | Mg-Protoporphyrin IX |
| MgProtoME | Mg-Protoporphyrin IX monomethylester |
| min | Minute(n) |
| ML | <i>medium light</i> , Licht mittlerer Intensität |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure |
| MQ-H ₂ O | zweifach destilliertes und gefiltertes Reinstwasser |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> , Boten-RNA |
| MW | <i>molecular weight</i> , molekulare Masse |
| ncRNA | <i>noncoding RNA</i> |
| NPQ | <i>non photochemical quenching</i> |
| nt | Nukleotid(e) |
| OD | optische Dichte |
| ORF | <i>open reading frame</i> , offener Leserahmen |
| P | spezielles Chlorophyllpaar |
| PAGE | <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| PCC | <i>Pasteur Culture Collection</i> |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion |
| PDB | <i>protein data base</i> , Proteindatenbank |
| pH | <i>potentia Hydrogenii</i> |
| PpBQ | <i>phenyl-p-benzoquinone</i> , Phenyl-p-benzochinon |
| Proto | Protoporphyrin IX |
| PS | Photosystem |
| R | Resistenz |
| RACE | <i>rapid amplification of cDNA ends</i> |
| rev | <i>reverse</i> , rückwärts |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | <i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute |
| rRNA | ribosomale RNA |
| RT | Raumtemperatur oder Reverse Transkription/ reverse Transkriptase |
| S | Svedberg-Sedimentationskoeffizient |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulphate</i> , Natriumdodecylsulfat |
| Sm | Spectinomycin |
| SOB | <i>super optimal broth</i> |

| Abkürzung | Begriff |
|----------------------|--|
| <i>sp.</i> | <i>species</i> , Spezies |
| Strp | Streptomycin |
| <i>Synechococcus</i> | <i>Synechococcus elongatus</i> PCC7942 |
| <i>Synechocystis</i> | <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 |
| TAP | <i>tobacco acid pyrophosphatase</i> |
| TB | terrific broth |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| TBS | <i>Tris-buffered saline</i> |
| TBS-T | <i>Tris-buffered saline</i> mit Tween 20 |
| TCA | <i>trichloroacetic acid</i> , Trichloressigsäure |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin |
| TES | Tris(hydroxymethyl)methylaminoethansulfonsäure |
| Tet | Tetracyclin |
| Tricin | N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-glycin |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Triton X-100 | Octylphenylpoly(ethylenglykolether)n |
| TSS | <i>transcription start site</i> , Transkriptionsinitiationsort |
| Tween 20 | Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat |
| U | <i>unit</i> , Einheit |
| UTP | Uridintriphosphat |
| UTR | <i>untranslated region</i> |
| UV | Licht im ultravioletten Spektralbereich |
| v/v | Volumenteil pro Gesamtvolumen |
| Vis | <i>visual</i> , Licht im sichtbaren Spektralbereich |
| Vol. | Volumen |
| w/v | Massenanteil pro Gesamtvolumen |
| WT | Wildtyp |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid |
| <i>ycf</i> | <i>hypothetical chloroplast open reading frame</i> |
| β -DM | n-Dodecyl- β -D-Maltosid |
| λ | Wellenlänge, Phage Lambda |

Die Nomenklatur der Aminosäuren und die Verwendung der entsprechenden Symbole erfolgt im Einklang mit der IUPAC.

1. Einleitung

Die Entstehung der oxygenen Photosynthese in den Vorfahren der heutigen Cyanobakterien (Hohmann-Marriott und Blankenship, 2011) vor etwa 2,8 Milliarden ist eines der fundamentalsten Ereignisse in der Entwicklung des uns heute bekannten Lebens auf der Erde. Fossile Überreste, Stromatolithen, dieser ersten Cyanobakterien lassen sich noch heute an zahlreichen Orten auf dem Planeten entdecken (Olson, 2006). Die ältesten dieser Stromatolithen sind vermutlich 3,5 Milliarden Jahren alt. Ihr Ursprung wird innerhalb der Wissenschaft kontrovers diskutiert. Stellen sie wirklich die Fossilien von Vorläufern der modernen Cyanobakterien dar oder sind sie bloße Artefakte (Brasier *et al.*, 2002; Olson, 2006)? Die Vorfahren der heutigen Cyanobakterien waren die ersten Organismen, die Wasser als Protonen und Elektronendonator verwendeten. Als Konsequenz der photosynthetischen Aktivität wurde Sauerstoff als Endprodukt freigesetzt. Dies führte zu einem kontinuierlichen Anstieg des Sauerstoffgehaltes in der Atmosphäre von 0% auf das heutige Niveau von etwa 21% (Paumann *et al.*, 2005). Der Wechsel von einer ursprünglich anoxischen zu einer oxischen Atmosphäre erlaubte die Innovation der Zellatmung und des damit energieeffizienteren Metabolismus im Vergleich zur Fermentation (Paumann *et al.*, 2005). Diese evolutionären Neuerungen waren die Grundlage für die Entstehung komplexer, mehrzelliger, eukaryotischer Organismen (Dismukes *et al.*, 2001). Die stabile, dauerhafte Aufnahme eines Cyanobakteriums durch eine nichtphotosynthetische, eukaryotische Zelle war der nächste Meilenstein in der Evolution der Photosynthese. Dieses Ereignis der primären Endosymbiose fand vermutlich nur einmal vor 1,8 Milliarden Jahren statt (Gould *et al.*, 2008; Green, 2011; Tirichine und Bowler, 2011). Die Thekamöbe *Paulinella chromatophora* bildet eine Ausnahme (Marin *et al.*, 2005). Sie besitzt eine photosynthetische Organelle, die von einem *Synechococcus* oder *Prochlorococcus*-ähnlichem Cyanobakterium abstammt und dessen primäre Endosymbiose nur mindestens 60 Millionen Jahre zurück liegt (Yoon *et al.*, 2009). Diese Sonderstellung bietet die einmalige Gelegenheit, die Evolution der Chloroplasten zeitnah zu analysieren und offene Fragestellungen zu klären.

1.1 Cyanobakterien als Modellorganismen für die Aufklärung der pflanzlichen Photosynthese

In den letzten 30 Jahren hat sich das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 (nachfolgend als *Synechocystis* bezeichnet) als idealer Organismus für Untersuchungen und Analysen photosynthetischer Prozesse bewährt und etablierte sich als Modellorganismus zum

Studium der Photosynthese. Das einzellige, mesophile, nichtdiazotrophe Cyanobakterium wurde von R. Kunisawa 1968 aus einem Süßwasserhabitat in Kalifornien isoliert (Stanier *et al.*, 1971). Alle Vertreter der Gattung *Synechocystis* reproduzieren sich durch binäre Einschnürung, bilden keine Aggregate und besitzen keine Zellscheiden. Bereits 1982 konnte gezeigt werden, dass *Synechocystis* natürlich kompetent ist und sich durch Aufnahme von exogener DNA transformieren lässt (Grigorieva und Shestakov, 1982). Zudem verfügt der Organismus über ein effektives System zur Rekombination mittels *crossing-over*-Ereignissen und erlaubt damit die Integration von mutierten Genen und DNA-Abschnitten. Der Organismus enthält mehrere Chromosomenkopien pro Zelle, die genaue Anzahl ist allerdings noch nicht endgültig geklärt (Labarre *et al.*, 1989; Griese *et al.*, 2011). Die vollständige Nukleotidabfolge des *Synechocystis*-Genoms wurde 1996 durch eine japanische Arbeitsgruppe publiziert (Kaneko *et al.*, 1996) und eröffnete damit ein neues Kapitel in der Erforschung der Photosynthese. Die vollständige Genomsequenz war die erste eines photosynthetischen Organismus und die vierte überhaupt. Kürzlich wurden die Fortschritte der modernen Sequenzierungstechniken genutzt, um die Genome von verschiedenen *Synechocystis*-Stämmen erneut zu sequenzieren und spezifische Mutationen in einzelnen Stämmen zu analysieren (Tajima *et al.*, 2011).

Von besonderer Wichtigkeit für die Erforschung der Photosynthese ist die Fähigkeit des Cyanobakteriums zum chemoheterotrophen Wachstum (Rippka *et al.*, 1979; Williams und Lester Packer, 1988). Diese Kombination von Fähigkeiten erlaubte erst die vollständige Inaktivierung von essentiellen Genen der Photosyntheseprozesse. So wurden bereits Ende der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts von mehreren Arbeitsgruppen verschiedene Mutanten des Photosystems II (PS) erzeugt (Vermaas *et al.*, 1986; Jansson *et al.*, 1987; Yu und Vermaas, 1990). Im folgenden Jahrzehnt gelang es, Mutanten von *Synechocystis* zu erzeugen, die über kein funktionelles PS I verfügen (Smart *et al.*, 1991; Smart und McIntosh, 1993). Später wurden Zellen erzeugt, denen beide PS fehlten (Shen und Vermaas, 1994; Smart *et al.*, 1994) und die chemoheterotroph wuchsen. Auch Mutanten der Phycobilisomen, die cyanobakteriellen Lichtsammelkomplexe, wurden generiert (Ajilani und Vermaas, 1998; Ughy und Ajilani, 2004). Die Technik der zielgerichteten Mutagenese und der Austausch einzelner Aminosäuren erlaubte die Analyse und funktionelle Charakterisierung verschiedener Proteine. Die strukturelle Aufklärung der PS erfolgte jedoch zumeist mit thermophilen Cyanobakterien, insbesondere *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, aber auch mit dem mesophilen Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* PCC7942, da sie sich als geeigneter für die Kristallisation der Membranproteinkomplexe erwiesen. Sowohl für das cyanobakterielle PS I

(Jordan *et al.*, 2001) als auch für PS II (Loll *et al.*, 2005) liegen Strukturdaten mit einer Auflösung von 2,5 Å bzw. 3,2 Å vor. Die Struktur des pflanzlichen PS I konnte mit einer Auflösung von 3,4 Å untersucht werden (Amunts *et al.*, 2007). Für das pflanzliche PS II liegt keine vollständige Kristallstruktur vor; jedoch lieferte die Kombination von pflanzlichen und cyanobakteriellen Strukturdaten ein verfeinertes Modell des PS II (Nield und Barber, 2006).

1.2 Komponenten des cyanobakteriellen Elektronentransports

Die Lichtreaktionen, also die Photolyse von Wasser laufen in und/oder an den Thylakoidmembranen der Chloroplasten oder Cyanobakterien ab. Die einzige Ausnahme bildet das sehr ursprüngliche Cyanobakterium *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 (Rippka und Cohen-Bazire, 1983; Schneider und Jürgens, 1991); hier findet die Photosynthese in speziellen Bereichen der zytoplasmatischen Membran statt (Rexroth *et al.*, 2011). Fünf Proteinkomplexe sind maßgeblich an der Primärreaktion beteiligt, die in diese Membranen eingebettet sind: PS II, Cytochrom-*b₆f*-Komplex, PS I, Antennenproteine und ATP-Synthase. Diese Proteinkomplexe koordinieren und ermöglichen die Bildung von ATP und Reduktionsäquivalenten aus Licht und Wasser. Die Komplexe sind in Cyanobakterien und Plastiden ähnlich aufgebaut: Das Fehlen oder die Anwesenheit zumeist kleinerer Untereinheiten, die nicht primär für die Funktion notwendig sind, ist der Hauptgrund für die Unterschiede zwischen ihnen (Nelson und Yocum, 2006). Darüber hinaus unterscheidet sich das PS I von Pflanzen von dem von Cyanobakterien in seinem Grad der Oligomerisierung. Die pflanzliche Variante kommt als Monomer vor, die cyanobakteriellen Varianten bilden sehr stabile Trimere, vermittelt durch die PsaL-Untereinheit (Hladík und Sofrová, 1991; Chitnis und Chitnis, 1993). Der Aufbau der Antennensysteme für die Photosynthese unterscheidet sich dagegen sehr. Cyanobakterien besitzen Phycobilisomen als Lichtsammelkomplexe (MacColl, 1998), vorrangig als Antenne des PS II. Dies sind wasserlösliche, etwa 5-30 MDa große Proteinkomplexe, die lineare Tetrapyrrole (Phycobiline) als chromophore Gruppe tragen. Grünalgen und Pflanzen besitzen dagegen Lichtsammelkomplexe, die Chlorophyll *a* und *b* binden. Letzteres ist in Cyanobakterien mit Ausnahme der Prochlorophyten, nicht zu finden (Bullerjahn und Post, 1993).

Der Mechanismus des photosynthetischen Elektronentransportes läuft dabei in Algen, höheren Pflanzen und Cyanobakterien vergleichbar ab (Übersicht in Abbildung 1):

Nach der Absorption von Lichtquanten durch entsprechende Lichtsammelkomplexe sowie die zwei chlorophyllbindenden Proteine CP43 und CP47 erfolgt im Reaktionszentrum des PS II die Übertragung eines Elektrons auf ein reversibel gebundenes Plastochinon (Q_B). Die

Übertragung wird durch verschiedene Redoxsysteme innerhalb des PS II vermittelt. Die so entstandene Elektronenlücke im Zentrum wird durch ein Elektron geschlossen, das durch die Spaltung von Wasser generiert wird (Müh *et al.*, 2012). Die Aufnahme eines weiteren Elektrons und Anlagerung zweier Protonen führen zur vollständigen Reduktion von Plastochinon zu Plastohydrochinon (PQH₂). Dieses wird durch ein Molekül Plastochinon ersetzt, welches aus dem Plastochinonpool (PQ-Pool) innerhalb der Thylakoidmembran stammt. Das freie Plastohydrochinon diffundiert innerhalb der Thylakoidmembran und lagert sich an der Chinonbindungsstelle (Q_p) des Cytochrom-*b₆f*-Komplexes an. Die Übertragung des Elektrons auf die folgenden Transporter Plastocyanin (PC) oder alternativ Cytochrom *c₅₅₃* erfordert zwei Schritte über das [2Fe-2S]-Zentrum des Rieske Proteins hin zum Cytochrom *f*. Dabei entsteht Semichinon, welches sofort das benachbarte b_L-Häm im Cytochrom b₆ Protein reduziert. Dies wiederum führt zur rapiden Reduktion des Häms b_H. Das Häm b_H reduziert seinerseits ein Chinon an der Q_n-Seite zu einem stabilen Semichinon. Ein zweiter Durchgang reduziert dieses dann weiter zum vollständig reduzierten Plastohydrochinon, welches dann die Q_n-Bindungsstelle verlässt und in der Membran diffundiert. Diesen Q-Zyklus genannte Elektronentransportweg ermöglicht den Transport von zwei weiteren Protonen in das Thylakoidlumen, neben denen, die bei der Oxidation des Plastohydrochinons zum Plastochinon abgegeben wurden. Diese zusätzlichen Protonen tragen zu einer Erhöhung der ATP-Bildung bei (Cramer *et al.*, 2012).

Nach der Absorption von Licht im PS I wird ein Elektron von PC über verschiedene Redoxkomponenten auf Ferredoxin, oder alternativ in Cyanobakterien auch auf Flavodoxin, übertragen. Vom Ferredoxin werden die Elektronen auf das Enzym Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase (FNR) transferiert. Die FNR überträgt diese anschließend auf NADP⁺, das zum Reduktionäquivalent NADPH+H⁺ reduziert wird. Die zwei benötigten Protonen stammen aus dem Cytoplasma. Der durch den Elektronentransport entlang der Thylakoidmembran beinhaltet die Translokation von Protonen und resultiert in einem Protonengradienten (elektrochemischer Gradient), der gemäß der Mitchell entwickelten Hypothese zur Synthese von ATP genutzt (Mitchell, 1966).

Neben dem linearen Elektronentransport existiert ein zweiter Weg für das vom PS I abgegebene Elektron, der zyklische Elektronentransport rund um PS I. Vermutlich beginnt dieser mit Ferredoxin und schließt den Cytochrom-*b₆f*-Komplex ein (Heimann und Schreiber, 1999; Battchikova *et al.*, 2011). Der zyklische Elektronentransport liefert keine Reduktionsäquivalente. Die Aufnahme von zwei Protonen erhöht aber den Protonengradient über der Membran und führt damit zur verstärkten Bildung von ATP.

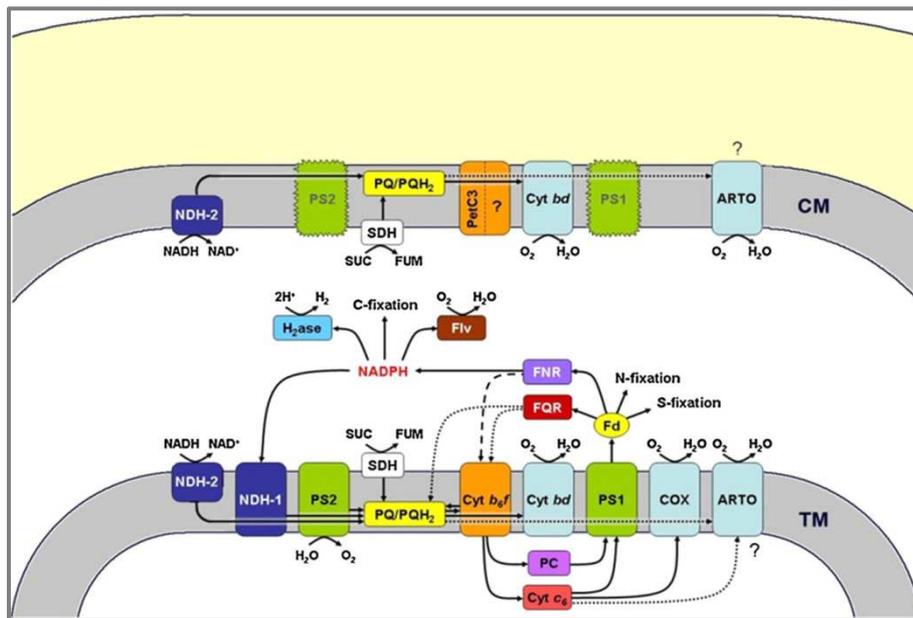


Abbildung 1: Bestandteile und Routen des cyanobakteriellen Elektronentransports in den Thylakoid- und Cytoplasmamembranen von *Synechocystis* (nach Nowaczyk 2010).

Die Prozesse des Elektronentransports in der Cytoplasmamembran (CM im oberen Teil) sind aufgrund fehlender oder unvollständiger Bestandteile eingeschränkt. Die Lokalisation (gekennzeichnet durch ein Fragezeichen) und das Substrat (gepunktete Linie) der alternativen terminalen Oxidase (ARTO) sind noch unklar. Ebenso unklar ist die genaue Route des Elektronentransport der Reduktion von Plastochinon (PQH₂) durch die Ferredoxin: Plastochinon (Fd:PQ) Oxidoreduktase (FQR) (gepunktete Linie). Die angedachte, direkte Reduktion des Cytochrom-*b₆f*-Komplexes via Fd/FNR ist durch die gestrichelte Linie markiert. COX, Cytochrom *c* Oxidase; Cyt *bd*, Cytochrom *bd* Oxidase; H₂ase, Hydrogenase; Flv, Flavoprotein-1 und -3; FNR, Fd: NADP⁺ Oxidoreduktase; NDH-1 und -2, NADPH Dehydrogenase vom Typ I bzw. II; PC, Plastocyanin; SDH, Succinat-Dehydrogenase. Weitere Details und Referenzen sind in Bernát und Rögner (2011) zu finden.

Die Membranen von Cyanobakterien enthalten darüber hinaus auch Komponenten des respiratorischen Elektronentransports. Zudem erscheinen die Elektronentransportketten eher verzweigt als linear zu sein und einzelne Abschnitte teilen sich bestimmte Komplexe (Hart *et al.*, 2005). Während die photosynthetischen Komplexe in den Thylakoidmembranen vorkommen, sind Komponenten des respiratorischen Elektronentransports auch in der Cytoplasmamembran zu finden (Nowaczyk *et al.*, 2010). Der PQ-Pool kann daher nicht nur vom PS II reduziert werden, sondern auch von der NAD(P)H-Dehydrogenase bzw. seinen Variationen (Battchikova *et al.*, 2011). Zusätzlich scheint auch die Succinat-Dehydrogenase an der Reduktion von PQ innerhalb der Cytoplasmamembran beteiligt zu sein (Cooley und Vermaas, 2001). Neben dem PS I kann auch die terminale Cytochrom-Oxidase als Elektronenakzeptor dienen, die dann Elektronen auf Sauerstoff überträgt.

Zentraler Dreh und Angelpunkt des photosynthetischen und respiratorischen Elektronentransports ist der Cytochrom-*b₆f*-Komplex. Er besteht aus vier Untereinheiten:

Cytochrom *b*₆, Cytochrom *f*, Untereinheit IV und dem Rieske Eisen-Schwefel-Protein sowie einigen kleineren Untereinheiten, die eine akzessorische Funktion ausüben (Schneider *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2004; Volkmer *et al.*, 2007; Baniulis *et al.*, 2008; Baniulis *et al.*, 2009; Tsunoyama *et al.*, 2009). Der Cytochrom-*b*₆/*f*-Komplex von höheren Pflanzen, Grünalgen und Cyanobakterien enthält daneben immer noch ein fest gebundenes Chlorophyll *a* Molekül und ein β -Carotin Molekül (Cramer *et al.*, 2005; Wenk *et al.*, 2005), die vermutlich als Schutz des Komplexes vor radikalen Sauerstoffspezies agieren.

1.3 Chlorophyll-Biosynthese, Zweig der Tetrapyrrol-Biosynthese

Der Chelat-Komplex Chlorophyll bildet zusammen mit den linearen Bilinen, Coenzym F₄₃₀, Vitamin B₁₂ sowie den weiteren Chelat-Komplexen Häm bzw. Sirohäm eine Molekülfamilie, die man als Pigmente des Lebens bezeichnet und von besonderer Bedeutung sind (Battersby, 2000). Sie sind natürliche Farbstoffe und gehören zu den Tetrapyrrolen. Deren Grundgerüst besteht aus vier kondensierten Pyrrolringen, die über Methin- oder Methylbrücken verbunden sind. Das photosynthetische Pigment Chlorophyll leitet sich wie die anderen zyklischen Tetrapyrrole von einer gemeinsamen Grundstruktur ab: dem Porphyrin-Molekül. Porphyrine besitzen ein weitreichendes π -Elektronensystem mit partiellem, aromatischem Charakter, welches die selektive Absorption von Licht im sichtbaren Spektrum ermöglicht und darüber hinaus die spezifische Farbigkeit der Porphyrine definiert. Die Fähigkeit, Elektronen zu transportieren, macht Porphyrine unabdingbar für die energetischen Prozesse in Zellen; daher sind sie allen Organismen zu finden. Die funktionellen Besonderheiten eines einzelnen Porphyrins werden durch die Natur der chemischen Modifikationen sowie Ringsubstitutionen der Porphyrin-Grundstruktur und durch die Art des komplexierten Metallions definiert. Die Biosynthese der ubiquitären Tetrapyrrole erfolgt zum Teil über einen gemeinsamen Stoffwechselweg, wie die zugrundeliegenden chemischen Grundgerüste vermuten lassen. Eine thematische Übersicht liefern u.a. Beale, Willows, Tanaka und Tanaka, Chew und Bryant sowie Masuda (1993; 2003; 2006; 2007; 2007; 2008). Der Biosyntheseweg von Chlorophyll *a* ist im Folgenden beschrieben (Abbildung 2).

Einleitung

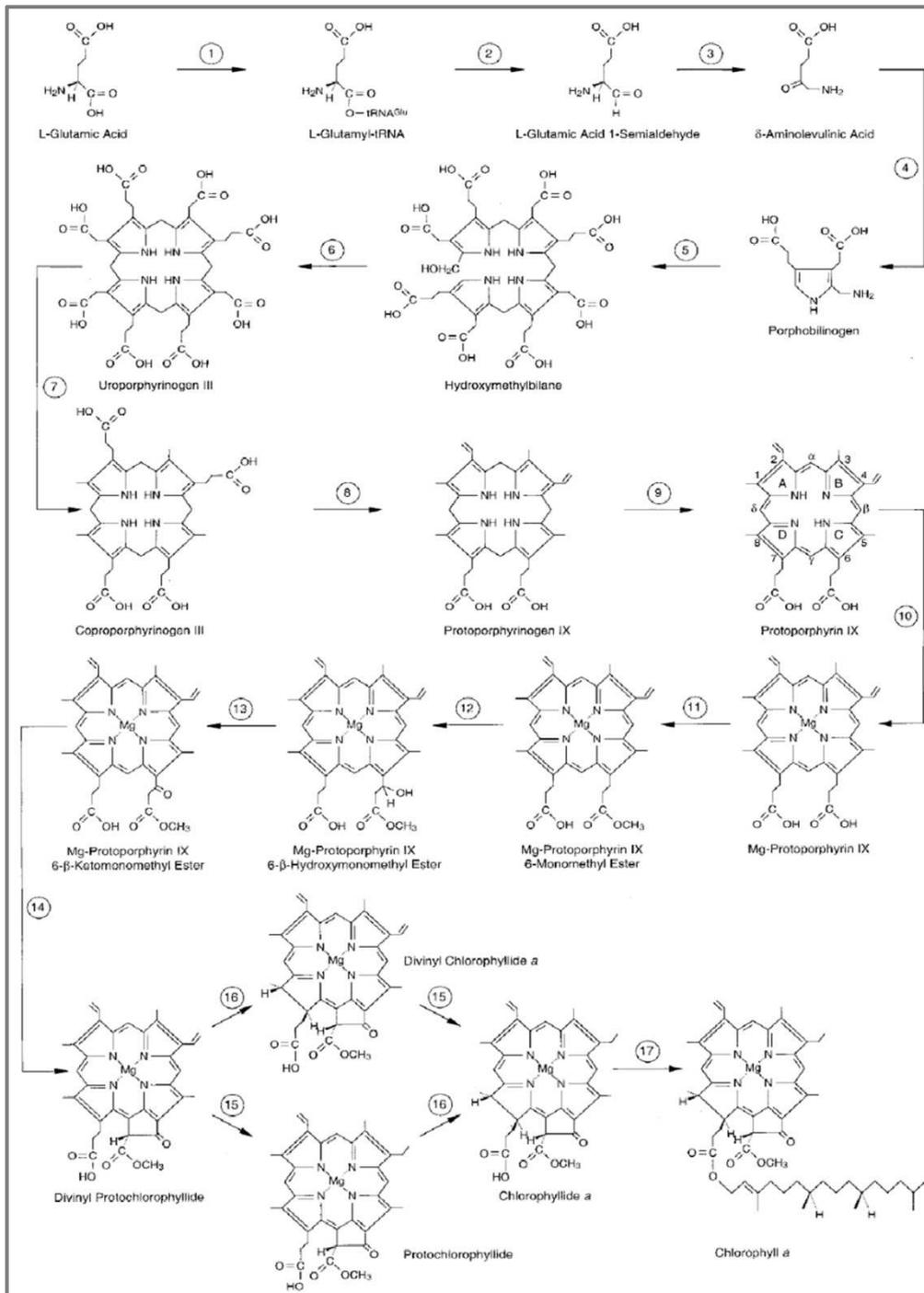


Abbildung 2: Abfolge der Reaktionen der Biosynthese von Chlorophyll a (nach Beale, 1999)

(1) Glutamyl-tRNA-Synthetase; (2) Glutamyl-tRNA-Reduktase; (3) Glutamat-1-semialdehyd-Aminotransferase; (4) Porphobilinogen-Synthase; (5) Porphobilinogen-Deaminase; (6) Uroporphyrinogen-III-Synthase; (7) Uroporphyrinogen-III-Decarboxylase; (8) Coproporphyrinogen-III-Oxidase; (9) Protoporphyrinogen-IX-Oxidase; (10) Magnesiumchelatase; (11) Mg Protoporphyrin-IX-Methyltransferase; (12-14) Mg Protoporphyrin-IX-monomethylester-Cyclase; (15) Divinyl-Reduktase; (16) NADPH-Protoporphyrinid-Oxidoreduktase; (17) Chlorophyll-Synthase

Das erste Intermediat, welches ausschließlich in der Tetrapyrrole-Biosynthese vorkommt, ist die δ-Aminolävulinsäure (ALA). Sie wird durch zwei verschiedene Synthesewege gebildet.

Der Shemin-Weg ist nur in den Mitochondrien von nicht photosynthetischen Eukaryoten und in α -Proteobakterien zu finden (Shemin und Russell, 1953). Der andere, evolutionär ältere Weg wurde 1987 in Pflanzen entdeckt (Woese, 1987), wobei zunächst die Aminosäure Glutamat enzymatisch an die tRNA_{Glu} gebunden und aktiviert wird. Danach erfolgt eine NADPH-abhängige Reduktion zu Glutamat-1-semialdehyd, wobei die tRNA_{Glu} freigesetzt wird. Die anschließende Transaminierungsreaktion bewirkt die intermolekulare Verschiebung einer Aminogruppe und leitet die Bildung von ALA ein (Abbildung 2, Schritt 1-3) (Beale, 1999). Die anschließenden Reaktionsschritte zur Entstehung des makrozyklischen Tetrapyrrols Uroporphyrinogen III verlaufen in allen Lebewesen über dieselben Intermediate und unterscheiden sich nur hinsichtlich der Lokalisation der beteiligten Enzyme (Mitochondrien, Chloroplasten oder Cytoplasma).

Zunächst wird das asymmetrische Pyrrolderivat Porphobilinogen aus zwei ALA-Molekülen gebildet (Abbildung 2, Schritt 4); die Reaktion durch die Porphobilinogen-Synthase katalysiert (Schmid und Shemin, 1955). Danach werden vier Porphobilinogen-Moleküle durch die Porphobilinogen-Deaminase polymerisiert (Abbildung 2, Schritt 5), das lineare Produkt Tetrapyrrol Hydroxymethylbilan entsteht (Bogorad, 1958a). Die Uroporphyrinogen-III-Synthase katalysiert die anschließende Inversion eines der Ringe von Hydroxymethylbilan und damit die nachfolgende Cyclisierung zu Uroporphyrinogen III (Abbildung 2, Schritt 6) (Bogorad, 1958b). Die Asymmetrie in der Ringstruktur von Uroporphyrinogen III ist essentiell für die Interaktion mit nachfolgenden Enzymen; zudem verzweigt sich die Tetrapyrrol-Biosynthese an diesem Punkt. Über das Molekül Precorrin-2 führt ein Weg zum mikrobiellen Vitamin B₁₂, zum bakteriellen und pflanzlichen Sirohäm sowie zum Coenzym F₄₃₀ methanogener Archaea (Battersby, 2000). Der andere Zweig führt zu Häm und Chlorophyll.

Zunächst erfolgt die schrittweise Decarboxylierung von Acetatresten des Uroporphyrinogens III zu Methylgruppen durch die Uroporphyrinogen-III-Decarboxylase (Abbildung 2, Schritt 7) (Granick und Mauzerall, 1958). Zwei weitere oxidative Decarboxylierungen setzen das Produkt Coproporphyrinogen III zu Protoporphyrinogen IX um (Abbildung 2, Schritt 8). Dies kann durch zwei Typen von Coproporphyrinogen-III-Oxidase gesehen: ein sauerstoffabhängiges (HemF) oder ein sauerstoffunabhängiges Enzym (HemK) (Seehra *et al.*, 1983), die beide in *Synechocystis* vorkommen (Goto *et al.*, 2010). Die nachfolgende Reaktion liefert den letzten gemeinsamen Vorläufer von Chlorophyll und Häm, Protoporphyrin IX (Proto). Die drei hintereinander folgenden Desaturierungen und Tautomerisierungen führen

zur Entstehung eines konjugierten Doppelbindungssystems (Abbildung 2, Schritt 9) und werden durch die Protoporphyrinogen-IX-Oxidase katalysiert (Leeper, 1989). Analog zur Coproporphyrinogen-III-Oxidase gibt es zwei Typen der Protoporphyrinogen-IX-Oxidase: eine sauerstoffabhängige, die hauptsächlich in Eukaryoten und aeroben Bakterien vorkommt (HemY) (Hansson und Hederstedt, 1992; Lermontova *et al.*, 1997) sowie eine menaquinon-abhängige in γ -Proteobakterien (HemG) (Boynton *et al.*, 2009). Interessanterweise kodiert das Genom von *Synechocystis* eine dritte Form dieses Enzyms, HemJ, welches sich deutlich von HemY und HemG-Proteinen unterscheidet und in Cyanobakterien und anderen Klassen von Bakterien vorkommt (Kato *et al.*, 2010).

Der Syntheseweg spaltet sich hier einerseits in den Fe-Zweig, der zu Häm und den linearen Bilinen führt und andererseits in den Mg-Zweig, der die Synthese von Chlorophyll bzw. Bakteriochlorophyll beinhaltet. Die Komplexierung des Eisens bzw. Magnesiumatoms erfolgt prinzipiell analog. Jedoch unterscheiden sich die beiden Reaktionen hinsichtlich der Anforderungen der beteiligten Enzyme und derer katalytischen Eigenschaften (Beale, 1999). Die monomere oder dimere Ferrochelatase (HemH) katalysiert die Chelatierung eines Eisenatoms in Protoporphyrin IX, ohne dass Ko-Faktoren notwendig sind (Cornah *et al.*, 2003). Das Produkt, Protohäm IX bildet die Grundlage für alle Häme und Biline, die als lineare Tetrapyrrole den Chromophor für die Phycobiliproteine und Phytochrome bilden (MacColl, 1998; Ulijasz und Vierstra, 2011). Wie das Substrat Protoporphyrin IX zwischen den konkurrierenden Zweigen verteilt wird, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Wobei sich der Bedarf an Häm und Chlorophyll zwischen Pflanzen und Cyanobakterien aufgrund der Natur der Lichtsammelantennen und ihrer Chromophore unterscheidet. So besitzt Tabak zum Beispiel zwei Formen von Protoporphyrinogen-IX-Oxidasen, von denen jeweils eine in den Chloroplasten bzw. in die Mitochondrien importiert wird (Lermontova *et al.*, 1997). Die Rolle von post-translationalen Regulatoren wie dem pflanzlichen GUN4-Protein (Peter und Grimm, 2009) bzw. seinem cyanobakteriellen Gun4-Homolog (Wilde *et al.*, 2004) wurde erst kürzlich entdeckt. Das GUN4-Protein stimuliert unter anderem die Interaktion der pflanzlichen Magnesiumchelatase Untereinheit H mit der Chloroplastenmembran (Adhikari *et al.*, 2011). Durch die Verstärkung von Interaktionen zwischen verschiedenen Membranproteinen kann das Gun4-Protein die Austauschraten von Substraten mit nachfolgenden Enzymen der Chlorophyll-Biosynthese erhöhen (Sobotka *et al.*, 2008; Peter *et al.*, 2011).

Die Magnesiumchelatase ist ein dreiteiliger Enzymkomplex, der die Komplexierung eines Magnesiumatoms in das Protoporphyrin IX-Grundgerüst katalysiert (Abbildung 2, Schritt 10)

(Masuda, 2008). Das Produkt dieser Reaktion ist Mg-Protoporphyrin IX (MgProto). Die anschließende Veresterung der Propionatseitenkette am Ring C (Abbildung 2, Schritt 11) durch die S-Adenosyl-L-methionin-abhängige MgProto-Methyltransferase (Radmer und Bogorad, 1967) liefert mit dem Produkt Mg-Protoporphyrin IX monomethylester (MgProtoME) die Voraussetzung für die nachfolgende Cyclisierungsreaktion (Abbildung 2, Schritt 12-14). Diese oxidative Cyclisierung führt zu Bildung des charakteristischen, fünften Ringes im Chlorophyllmolekül (Willows, 2003) und wird durch den bisher noch nicht vollständig charakterisierten Enzymkomplex der MgProtoME-Cyclase (oxidative Cyclase) katalysiert. Dabei existieren zwei komplett unterschiedliche Reaktionsmechanismen in oxygenen und anoxygenen phototrophen Organismen (Tanaka und Tanaka, 2006), die Identität der beteiligten Enzyme blieb aber lange Zeit unbekannt. Die sauerstoffunabhängige Cyclase verwendet Wasser als Quelle für den in der Reaktion benötigten Sauerstoff (Porra *et al.*, 1995). Homologe des Gens *bchE* von *Rhodobacter capsulatus*, welches die sauerstoffunabhängige Cyclase kodiert (Bollivar *et al.*, 1994) kommen in den Genomen photosynthetischer Bakterien wie Purpurbakterien, grünen Schwefelbakterien und Cyanobakterien vor (Ouchane *et al.*, 2004). Die Inaktivierung eines *bchE*-Homologs *chlE* (*slr0509*) in *Synechocystis* hat keinerlei Auswirkung auf den Chlorophyll-Metabolismus (Bollivar, 2006).

Die biochemischen Charakteristika des Komplexes und notwendige Ko-Faktoren wurden jedoch schon vor langer Zeit aufgeklärt. Die oxidative Cyclase verwendet atmosphärischen Sauerstoff und braucht neben dem MgProtoME-Substrat, Magnesium, Eisen und NADPH für die Reaktion. Ferner enthält es essentielle Thiolgruppen und besteht aus mindestens zwei verschiedenen Untereinheiten: einem wasserlöslichen Protein und einem membrangebundenen Protein, die von mindestens zwei verschiedenen Genen kodiert werden (Wong und Castelfranco, 1984; Walker *et al.*, 1988; Walker *et al.*, 1989; Bollivar und Beale, 1996) Die postulierte, wasserlösliche Untereinheit ist bis heute unbekannt. Die zweite, membranständige Untereinheit dieses Enzymkomplexes wurde 2002 im Purpurbakterium *Rubrivivax gelatinosus* identifiziert (Pinta *et al.*, 2002) und wird als *aerobic cyclisation system Fe-containing subunit AcsF* bezeichnet. Entsprechende Homologe wurden in Cyanobakterien, Algen und Pflanzen gefunden (Moseley *et al.*, 2002; Tottey *et al.*, 2003; Rzeznicka *et al.*, 2005; Minamizaki *et al.*, 2008; Peter *et al.*, 2009). In den Genomen von einzelligen Phototrophen wie Cyanobakterien und Algen finden sich häufig mehrere Gene, die Homologie zum ursprünglichen *acsF*-Gen von *Rubrivivax gelatinosus* haben. Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlamydomonas*) besitzt zwei *acsF*-Homologe: Cth1

und Crd1, wobei eines konstitutiv exprimiert wird (*cth1*), während das andere unter Kupfer- und Sauerstoffmangel (*crd1*) produziert wird (Moseley *et al.*). Das Genom von *Synechocystis* enthält die beiden offenen Leserahmen *sll1214* und *sll1874*, die von zwei Arbeitsgruppen parallel untersucht und beschrieben wurden. Sowohl Minamizaki *et al.* als auch Peter *et al.* (2008; 2009) konnten zeigen, dass die jeweiligen Genprodukte signifikante Homologie zu AcsF haben. Das Gen *sll1214* und sein Genprodukt erhielten die Namen *chlA_I*/ChlA_I bzw. *cycI*/CycI. Das CycI-Protein ist unter normalen, aeroben Wachstumsbedingungen unentbehrlich für das Leben der Zelle. Das zweite Gen *sll1874* und sein Genprodukt erhielten die Namen *chlA_{II}*/ChlA_{II} bzw. *cycII*/CycII. Das Protein CycII wird nur unter anaeroben Bedingungen für die Cyclase-Reaktion gebraucht und das Gen ist Teil eines Operons, welches nur unter mikrooxygenen Konditionen transkribiert wird (Summerfield *et al.*, 2008). Die Inaktivierung des Gens *sll1874/cycII/chlA_{II}* verursacht keine negativen Auswirkungen unter normalen, aeroben Bedingungen (Minamizaki *et al.*, 2008; Peter *et al.*, 2009). Weitere Ausführungen zur Funktionsweise und zum Zusammenspiel der beiden Proteine, eine phänotypische Charakterisierung und ihrer Auswirkungen auf die Regulationsmechanismen der Tetrapyrrol-Biosynthese sind in den Abschnitten 2.2.1 und 2.2.2 zu finden.

Das Produkt der Cyclase-Reaktion ist Divinyl-Protochlorophyllid (Abbildung 2, Produkt Schritt 14), dessen weitere Umwandlung über zwei Wege möglich ist (Abbildung 2, Schritt 15,16): Zuerst erfolgt die Umwandlung der 4-Vinylgruppe in eine Ethylgruppe und dann die Reduktion des Pyrrolrings D oder die Reaktionen erfolgen in der umgekehrten Reihenfolge (Beale, 1999). Im ersten Fall wird die Umwandlung der Vinylgruppe durch die Divinyl-Reduktase katalysiert und Monovinyl-Protochlorophyllid entsteht. Das entsprechende Enzym in *Synechocystis* akzeptiert sowohl Divinyl-Protochlorophyllid als auch Divinyl-Chlorophyllid *a* als Substrat (Islam *et al.*, 2008; Ito *et al.*, 2008), welches im zweiten Fall vorliegt. Die Reduktion des Pyrrolrings D wird in Angiospermen von einer NADPH- und lichtabhängigen Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (LPOR) katalysiert. In photosynthetischen Bakterien, Algen, Moosen, Lebermoosen und Gymnospermen existiert ein zweiter Reaktionsweg, katalysiert durch die ATP-abhängige, lichtunabhängige Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (DPOR), die strukturelle Ähnlichkeit mit dem Enzym Nitrogenase besitzt (Willows, 2003; Bröcker *et al.*, 2010). Für Cyanobakterien konnte mehrfach gezeigt werden, dass LPOR und DPOR differentiell, abhängig von der Sauerstoffkonzentration agieren (Yamazaki *et al.*, 2006; Reinbothe *et al.*, 2011). Ähnliches wurde bereits für die Coproporphyrinogen-III-Oxidase, die oxidative Cyclase und die Häm-Oxygenase von *Synechocystis* beschrieben (Minamizaki *et al.*, 2008; Peter *et al.*, 2009; Goto

et al., 2010; Aoki *et al.*, 2011). Das generelle Endprodukt der Chlorophyll-Biosynthese ist immer Chlorophyll *a*, welches durch die Chlorophyll-Synthase aus Chlorophyllid *a* gebildet wird (Abbildung 2, Schritt 17). Die hydrophobe Kette von Phytylpyrophosphat bzw. Geranylgeranylpyrophosphat wird dabei an dem Propionatrest des Ringes D des Chlorophyllids *a* verestert (Oster *et al.*, 1997). Chlorophyll *a* kann zu Chlorophyll *b* konvertiert werden und umgekehrt (Tanaka und Tanaka, 2007). Die Bildung von Chlorophyll *a* findet in der Thylakoidmembran statt (Bollivar, 2006). Die Prozesse die zur Umwandlung von Chlorophyll *a* bzw. (Monovinyl/Divinyl)-Protochlorophyllid *a* in andere Varianten wie Chlorophyll *c*, *d* oder *f* führen, sind nur zum Teil verstanden und Gegenstand der aktuellen Forschung (Chen *et al.*, 2010; Mizoguchi *et al.*, 2011).

1.4 Vergleichende Analysen von cyanobakteriellen und chloroplastidären Genomen erlauben Einblick in die Evolution der Chloroplasten

Soweit heute bekannt ist, besitzen alle eukaryotischen Zellen Mitochondrien oder Hydrogenosomen, modifizierte anaerobe Formen der Mitochondrien. Die Etablierung dieser Partnerschaft stellt den Ursprung aller Eukaryoten dar (van der Giezen, 2005). Der Erwerb von Plastiden durch Eukaryoten geschah später, als eine der heterotrophen eukaryotischen Linien einen Endosymbiont ähnlich den Cyanobakterien aufnahm und die Fähigkeit der Autotrophie erwarb. Im Laufe der Zeit verlor der Symbiont schrittweise seine Autonomie. Die morphologischen und molekularen Untersuchungen und Vergleiche (Gray, 1993; Martin *et al.*, 2002) von Cyanobakterien und Chloroplasten von Algen und höheren Pflanzen untermauern die von Mereschkowsky 1905 erstellte Hypothese, dass Chloroplasten aus den Vorläufern der rezenten Cyanobakterien hervorgingen (Mereschkowsky, 1905). Die Unterschiede zwischen pflanzlicher und cyanobakterieller Photosynthese sind trotz großer evolutionärer Distanz erstaunlicherweise nur gering, wie unter anderem Untersuchungen an einzelnen Untereinheiten der PS zeigten (Xu *et al.*, 2001; De Las Rivas *et al.*, 2004). Die Sequenzierung einer Vielzahl von cyanobakteriellen und Plastiden-Genomen und entsprechende vergleichende Studien offenbarten eine große Ähnlichkeit zwischen verschiedenen Pflanzen, Algen und Cyanobakterien hinsichtlich der Kodierungskapazität und Struktur der jeweiligen (plastidären) Genome (Martin *et al.*, 1998; Gray, 1999; Martin *et al.*, 2002). Die Kapazität umfasst vor allem Gene der Photosynthese und sowie Gene für die Aufrechterhaltung des Chloroplasten-Genoms selber; zur Bewahrung seiner genetischen Stabilität. Außerdem kodiert es Gene die essentiell für die plastidäre Transkriptions- und Translationsmaschinerie sind (Liere *et al.*, 2011). Die Kodierungsfähigkeiten sind jedoch recht unterschiedlich. Das Plastiden-Genom der parasitären Pflanze *Epifagus virginiana*

kodiert nur 42 Gene (Wolfe *et al.*, 1992), das Chloroplasten-Genom von *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) kodiert 125 Gene (Sato *et al.*, 1999). Generell kodieren Chloroplasten-Genome von Algen eine größere Zahl an Genen als höhere Pflanzen, wie am Beispiel der Rotalge *Porphyra purpurea* sichtbar ist, die etwa 252 Proteine im Chloroplasten-Genom kodiert (Reith und Munholland, 1995). Die heutigen Cyanobakterien besitzen eine vielfach größere Kodierungskapazität, die um den Faktor 30 höher ist. So enthalten die Genome von *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 und *Anabaena sp. PCC 7120* (*Anabaena*) etwa 6191 bzw. 5437 Gene (Nakao *et al.*, 2010). Selbst Vertreter der Gattung *Prochlorococcus*, die ein massiv reduziertes Genom aufweisen, enthalten noch etwa 1900 Gene (Partensky und Garczarek, 2010). Es muss also nach der primären Endosymbiose zu einer enormen Reduktion des Chloroplasten-Genoms gekommen sein.

Erstaunlicherweise findet sich aber in den Chloroplasten etwa die gleiche Anzahl an Proteinen wieder, wie sie von modernen Cyanobakterien synthetisiert werden (Abdallah *et al.*, 2000; Cavalier-Smith, 2000). Folglich muss eine Vielzahl von Proteinen in den Chloroplasten transportiert werden und die dazu erforderlichen Transport- und Importsystem vorhanden sein (Hörmann *et al.*, 2007). Diese im Chloroplasten benötigten Proteine sind somit im Kern kodiert, werden dort transkribiert, an zytoplasmatischen Ribosomen translatiert und in den Chloroplasten transportiert, wo dann der endgültige Zusammenbau der photosynthetischen Komplexe inklusive der notwendigen photosynthetischen Pigmente erfolgt. So besitzen kernkodierte Proteine, die in den Chloroplasten importiert werden sollen eine N-terminale Erkennungssequenz im Präprotein, die den Import in den Plastiden erlaubt. Vor 10 Jahren (Martin *et al.*, 2002) ergaben vergleichende Analysen der Sequenzen von cyanobakteriellen Genomen, Chloroplasten-Genomen von Algen und dem Kerngenom von *Arabidopsis*, dass etwas 18% der proteinkodierenden Gene in *Arabidopsis* einen cyanobakteriellen Ursprung haben. Außerdem wurden 117 normalerweise im Kern von *Arabidopsis* kodierte Gene gefunden, denen homologe Gene in mindestens einem Chloroplasten-Genom von Algen zugeordnet werden konnten (Martin *et al.*, 2002). Weiterführende, bioinformatische und experimentelle Studien offenbarten zahlreiche kernkodierte Chloroplasten-Proteine mit endosymbiontischen Ursprung (CPRENDOS, *chloroplast proteins of endosymbiotic origin*) (Sato *et al.*, 2005; Ishikawa *et al.*, 2009), von denen einige noch immer in den Chloroplasten-Genomen von Algen kodiert werden. Bereits in den 1990er wurden zahlreiche konservierte offene Leserahmen mit unbekannter Funktion in den Chloroplasten-Genomen von Algen entdeckt, denen bis heute keine Funktion zugeschrieben werden konnte. Sie werden daher als *ycf*-Gene (*hypothetical chloroplast open reading frame*) (Hallick und Bairoch, 1994)

bezeichnet. Es finden sich homologe Sequenzen für die meisten dieser 80 Gene in fast allen Genomen von oxygenen Phototrophen, von Cyanobakterien bis hin zu höheren Pflanzen, wobei etliche nicht mehr im Chloroplasten-Genom kodiert werden, sondern in das Kerngenom transferiert wurden. Neben vergleichenden Analysen über die Konservierung und phylogenetische Verteilung in Landpflanzen und Algen, wurden klassische genetische und biochemische Strategien angewendet, um die Funktion dieser konservierten, hoch interessanten *ycf*-Gene zu untersuchen.

Fast alle bisher untersuchten *ycfs* sind direkt oder indirekt an der Photosynthese beteiligt oder agieren in assoziierten Prozessen. So kodieren die *ycf*-Gene *ycf8*, *ycf9* und *ycf12* für strukturelle Untereinheiten des PS II (Monod *et al.*, 1994; Swiatek *et al.*, 2001; Kashino *et al.*, 2007). Andere wie *ycf3*, *ycf4* und *ycf37* (Wilde *et al.*, 1995; Boudreau *et al.*, 1997; Wilde *et al.*, 2001; Dühning *et al.*, 2006) sind notwendige Faktoren, die den Zusammenbau bzw. die Stabilität des PS I ermöglichen. Die Genprodukte von *ycf48* und *ycf79* (Komenda *et al.*, 2008; Dobáková *et al.*, 2009) unterstützen den Zusammenbau des PSII und sind an der Reparatur des photosynthetischen Membranproteinkomplexes beteiligt. Zahlreiche *ycfs* wie *ycf18*, *ycf27*, *ycf28* oder *ycf30* (Frias *et al.*, 1993; Grossman *et al.*, 1993; Ashby und Mullineaux, 1999; Karradt *et al.*, 2008; Minoda *et al.*, 2010) sind an der Regulation der photosynthetischen Prozesse beteiligt. Andere wie *ycf53* und *ycf59* (Wilde *et al.*, 2004; Minamizaki *et al.*, 2008; Sobotka *et al.*, 2008; Peter *et al.*, 2009) agieren in den Stoffwechselwegen die zur Biosynthese von Chlorophyll führen oder erlauben die Assemblierung von notwendigen Ko-Faktoren in die Proteinkomplexe. Des Weiteren sind *ycfs* an der Erhaltung und Stressantwort der Zelle bzw. Organelle beteiligt. Neben etlichen Komponenten des Elektronentransports, insbesondere strukturelle Einheiten des Cytochrom-*b₆f*-Komplexes werden auch Proteine, die eine regulatorische Funktion innerhalb des Netzwerkes haben, von *ycfs* kodiert. Von den bisher definierten und annotierten 85 *ycf*-Genen kommen nur 18 nicht im Genom von *Synechocystis* vor. Ein Vergleich mit der Rotalge *Porphyra purpurea* offenbarte zudem, dass sich für 94% der im Plastiden-Genom kodierten Gene des Organismus entsprechende homologe Gene im bakteriellen Genom von *Synechocystis* finden lassen (Reith und Munholland, 1995; Ikeuchi und Tabata, 2001). Von denen im Chloroplasten-Genom vorkommenden *ycfs* sind nur zwei, *ycf1* und *ycf2*, nicht in Cyanobakterien vorhanden. Bisher konnte erst 28 *ycf*-Genen von *Synechocystis* eine Funktion zugewiesen werden. Einen aktuellen Überblick gibt die nachfolgende Tabelle 1:

Tabelle 1: Liste von *ycfs* in *Synechocystis* mit ihren bisher bekannten oder vermuteten Funktionen

| Plastid ORF | <i>Synechocystis</i> ORF | Funktion/ mögliche Funktion | Referenz |
|--------------------|---------------------------------|--|--|
| <i>ycf3</i> | <i>slr0823</i> | Biogenese PS I | (Boudreau <i>et al.</i> , 1997) |
| <i>ycf4</i> | <i>sll0226</i> | Biogenese PS I | (Wilde <i>et al.</i> , 1995; Boudreau <i>et al.</i> , 1997) |
| <i>ycf5</i> | <i>sll1513</i> | Biogenese von Cytochromen des c-Typs | (Xie und Merchant, 1996; Hübschmann <i>et al.</i> , 1997) |
| <i>ycf6</i> | <i>sml0004</i> | Cytochrom- <i>b₆f</i> -Komplex (PetN) | (Schneider <i>et al.</i> , 2007) |
| <i>ycf7</i> | <i>ssl3803</i> | Cytochrom- <i>b₆f</i> -Komplex (PetL) | (Schneider <i>et al.</i> , 2007) |
| <i>ycf8</i> | <i>smr0001</i> | Untereinheit des PS II (PsbT) | (Monod <i>et al.</i> , 1994) |
| <i>ycf9</i> | <i>sll1281</i> | photosynthetischer Elektronentransport, PsbZ | (Swiatek <i>et al.</i> , 2001; Bishop <i>et al.</i> , 2007) |
| <i>ycf10</i> | <i>sll1685</i> | CO ₂ Aufnahmesystem | (Kato <i>et al.</i> , 1996) |
| <i>ycf12</i> | <i>sll0047</i> | Untereinheit des PS II (Psb30) | (Kashino <i>et al.</i> , 2007) |
| <i>ycf18</i> | <i>ssl0452/ ssl0453</i> | Regulator des Abbaus der Phycobilisomen, NblA | (Grossman <i>et al.</i> , 1993; Baier <i>et al.</i> , 2001) |
| <i>ycf27</i> | <i>slr0115/ slr0947</i> | Regulator der Phycobilisomenfunktion, <i>state transitions</i> | (Ashby und Mullineaux, 1999) |
| <i>ycf28</i> | <i>sll1423</i> | Regulator des C/N-Metabolismus, NtcA | (Frias <i>et al.</i> , 1993) |
| <i>ycf30</i> | <i>sll0998</i> | Transkriptionsregulator in Cyanobakterien und Rotalgen, RbcR | (Minoda <i>et al.</i> , 2010) |
| <i>ycf31</i> | <i>smr003</i> | Cytochrom- <i>b₆f</i> -Komplex (PetM) | (Schneider <i>et al.</i> , 2001) |
| <i>ycf32</i> | <i>sml0007</i> | assoziierte Untereinheit des PS II | (Mant und Robinson, 1998; Meenam <i>et al.</i> , 1999; Neufeld <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>ycf33</i> | <i>ssl1417</i> | zyklischer Elektronentransport um PS I | (Ohtsuka <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>ycf34</i> | <i>ssr1425</i> | Elektronentransport bei Lichtlimitation | vorliegende Arbeit |
| <i>ycf37</i> | <i>slr0171</i> | Biogenese PS I | (Wilde <i>et al.</i> , 2001; Dühring <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>ycf39</i> | <i>slr0399</i> | Bindung von Chinon an PS II | (Ermakova-Gerdes und Vermaas, 1999) |
| <i>ycf42</i> | <i>sll0755</i> | Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) | (Kobayashi <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>ycf44</i> | <i>slr2087</i> | Biogenese von Cytochromen des c-Typs | (Inoue <i>et al.</i> , 1997) |
| <i>ycf48</i> | <i>slr2034</i> | Assemblierung und Reparatur des D1-Proteins von PS II | (Komenda <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>ycf50</i> | <i>slr2073</i> | Zellteilung (<i>septum formation protein</i> SepF) | (Miyagishima <i>et al.</i> , 2005; Marbouty <i>et al.</i> , 2009) |
| <i>ycf53</i> | <i>sll0558</i> | Regulation der Tetrapyrrol-Biosynthese | (Wilde <i>et al.</i> , 2004; Sobotka <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>ycf54</i> | <i>slr1780</i> | Untereinheit der oxidativen Cyclase | vorliegende Arbeit |
| <i>ycf58</i> | <i>slr2049</i> | Reifung von Phycobiliproteinen, Lyase | (Shen <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>ycf59</i> | <i>sll1214</i> | Untereinheit der oxidativen Cyclase | (Minamizaki <i>et al.</i> , 2008; Peter <i>et al.</i> , 2009) |
| <i>ycf64</i> | <i>slr1846</i> | Monothiol-Glutaredoxin CGFS-Typ | (Lopez-Maury <i>et al.</i> , 2009) |
| <i>ycf65</i> | <i>slr0923</i> | plastidenspezifisches Protein der pflanzlichen 30S Ribosomen | (Yamaguchi und Subramanian, 2003) |
| <i>ycf79</i> | <i>slr1846</i> | Assemblierung PS II | (Dobáková <i>et al.</i> , 2009) |

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die bisherigen Untersuchungen zur Funktion der hypothetischen, offenen chloroplastidären Leserahmen wiesen diesen zumeist eine Rolle innerhalb der Photosynthese und ihrer assoziierten Prozesse zu. Trotz Fortschreitens der wissenschaftlichen Erkenntnisse sind längst noch nicht alle Prozesse im Detail bekannt. Die fortführende Analyse von *ycf*-Genen und ihre funktionelle Charakterisierung sollen weiteren Einblick in die Mechanismen der Photosynthese liefern und unser Verständnis für diesen lebenswichtigen Prozess erweitern. Obendrein lassen sich tiefere Einblicke in die Evolution der Chloroplasten gewinnen und man gewinnt Einsichten, welche Ursachen und Mechanismen zum Erhalt und Fortbestehen der *ycf*-Gene in photosynthetischen Organismen führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausgewählte *ycf*-Gene des Cyanobakteriums *Synechocystis* charakterisiert und ihnen eine Funktion zugewiesen. Dazu wurden die entsprechenden Gene inaktiviert und die Auswirkungen auf die physiologischen Eigenschaften des Organismus untersucht und sowie damit begonnen, die biochemischen Eigenschaften der Proteine zu bestimmen.

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Suche nach der fehlenden Untereinheit der oxidativen Cyclase, die die Bildung des fünften Rings im Chlorophyll-Molekül katalysiert. Die Produkte der *Synechocystis*-Gene *sll1214/ycf59/cycI/chlA_I* und *sll1874/ycf59/cycII/chlA_{II}* wurden von Minamizaki *et al.* (2008) und Peter *et al.* (2009) als membranständige Bestandteile der oxidativen Cyclase beschrieben. Ziel der Arbeit war, das Zusammenspiel der beiden Isoformen der oxidativen Cyclase in *Synechocystis* zu untersuchen und unter Verwendung von Methoden der Affinitätschromatographie mögliche Interaktionspartner der Cyclase zu identifizieren und die Natur der bisher fehlenden Untereinheit zu bestimmen. Sollte diese gefunden werden, wäre es erstmalig möglich, die Funktionsweise und Beschaffenheit des Enzymkomplexes zu definieren und den Reaktionsmechanismus in Enzymassays zu rekonstruieren.

Die so gewonnenen Ergebnisse über die Funktion der *ycfs* und das genaue Wissen über die Abläufe der Chlorophyll-Biosynthese könnten helfen, die Prozesse der Photosynthese besser zu verstehen. Erst die vollständige Kenntnis über die zugrundeliegenden Mechanismen können uns dem großen Ziel einer künstlichen Photosynthese näher bringen und damit helfen, die Probleme der aktuellen Energieversorgung durch fossile Brennstoffe zu lösen.

2 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden funktionelle und strukturelle Untersuchungen zu den hypothetischen Chloroplastenleserahmen *ycf34*, *ycf59* und *ycf54* in dem Modellorganismus *Synechocystis* durchgeführt. Die Darstellung der gewonnenen Ergebnisse ist in zwei Hauptabschnitte unterteilt.

Der erste, folgende Teil befasst sich mit der funktionellen, physiologischen und molekularen Analyse einer Mutante des genomischen Locus *ssr1425*, welcher das *ycf34*-Homolog des Cyanobakteriums *Synechocystis* kodiert.

Im zweiten Teil folgt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung zur Funktion des *ycf59*-Genprodukts von *Synechocystis*. Im Anschluss daran folgt eine erste funktionelle Charakterisierung des hypothetischen offenen Leserahmens *ycf54* und die Analyse der Interaktion der beiden Genprodukte Ycf54 und Ycf59 innerhalb des Stoffwechselweges der Chlorophyll-Biosynthese.

2.1 Funktionelle Analyse des *ycf34*-Homologs in *Synechocystis*

2.1.1 Bioinformatische Analysen

Da die Funktion des *ycf34*-Gens und des resultierenden Genprodukts Ycf34 nicht bekannt war, wurden bioinformatische Analysen durchgeführt, um Ideen für mögliche Funktionen zu erhalten, die weitere Experimente definieren könnten. Zudem bietet die Definition als *ycf* nur geringe Anhaltspunkte, abgesehen vom Grad der Konservierung und der Verteilung in phylogenetischen Gruppen. Die folgende Tabelle 2 listet eine Übersicht über die ermittelten Parameter des Ycf34-Proteins.

Tabelle 2: Bioinformatische Analyse von *Synechocystis* Ycf34

| Protein | Gen | Cyanobase-Eintrag | MW (kDa) | pI | Transmembran-Helices | Aliphatischer Index |
|---------|--------------|-------------------|----------|------|----------------------|---------------------|
| Ycf34 | <i>ycf34</i> | <i>ssr1425</i> | 9,57 | 5,29 | ungeklärt | 72,32 |

Ycf34 ist ein 9,57 kDa großes Protein mit einem geringen aliphatischen Index, welcher auf eine möglicherweise geringe Stabilität des Proteins hinweist (Ikai, 1980). Die Aminosäuresequenzen weisen darüber hinaus keine weiteren Ähnlichkeiten zu konservierten Domänen bekannter Proteine oder Proteinfamilien auf. Sequenzvergleiche der verschiedenen *ycf34*-Homologe zeigen, dass alle vollständig sequenzierten cyanobakteriellen Genome ein

ycf34-Gen besitzen. Dabei lässt sich das *ycf34*-Gen sowohl in den Genomen der Gattung *Prochlorococcus* (Partensky und Garczarek, 2010) als auch im Genom des Cyanobakteriums UCYN-A (Tripp *et al.*, 2010) finden, beides marine Spezies mit ausgeprägter Reduktion der Genom- und Zellgröße. Zusätzlich besitzen zahlreiche Rotalgen und Organismen mit einem sekundären, von Rotalgen stammenden Chloroplasten, ein *ycf34*-Gen. Interessanterweise lassen sich keine Homologe in den Chloroplasten- oder Kerngenomen von höheren Pflanzen oder Grünalgen finden, zudem enthalten die Genome anderer Bakterien keine *ycf34*-Homologe.

Die Aminosäuresequenzen sind hochgradig konserviert, mit 35-80% Identität zur Sequenz des *Synechocystis* Ycf34-Proteins. Eine Auswahl an Ycf34-Proteinen aus Cyanobakterien, Rotalgen, Braunalgen und Diatomeen wurde analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3A dargestellt. Auffallend ist neben der starken Konservierung von Aminosäuren die häufige Übereinstimmung der Gesamtlänge der verschiedenen Ycf34-Proteine in den Organismen. So besitzen 63 der 80 positiven Treffer eines BLAST P-Vergleichs (Altschul *et al.*, 1990) (UniProtKB, blosum80 Matrix, Grenzwert 1) eine Gesamtlänge von 80-85 Aminosäuren (Abbildung 3). All diese Sequenzen liegen kodiert in den Genomen von Cyanobakterien vor. Die Gesamtlänge aller weiteren homologen Proteine variiert zwischen 41-77 und 92-148 Aminosäuren; ausschließlich Sequenzen von Rot- und Braunalgen.

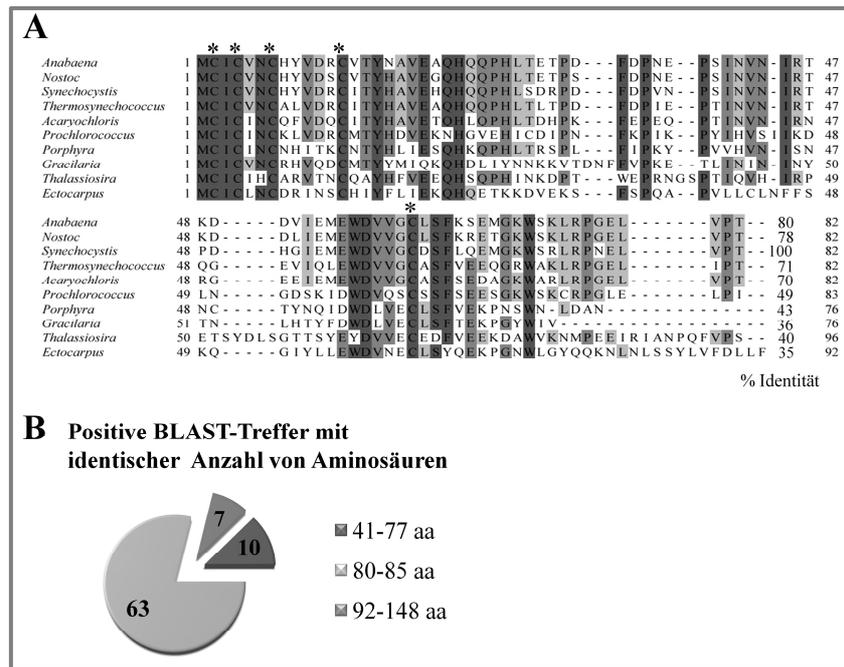


Abbildung 3: Aminosäure-Sequenzvergleiche von Ycf34-Polypeptiden.

(A) Die Aminosäuresequenzen von Ycf34 aus den Cyanobakterien *Anabaena* sp. PCC 7120, *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, *Synechocystis* 6803, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Acaryochloris marina* MBIC 11017, *Prochlorococcus marinus* MED4, aus den Rotalgen *Porphyra yezoensis* und *Gracilaria tenuistipitata*, aus der Braunalge *Ectocarpus siliculosus* sowie aus der marinen Diatomee *Thalassiosira pseudonana* wurden unter Verwendung der Programme ClustalX2 (Version 2.0.12) und JalView (Version 2.7) verglichen. Aminosäurereste, die in allen sechs Organismen konserviert vorliegen, sind dunkelgrau unterlegt. Seitenketten mit starker Konservierung sind grau schattiert, Seitenketten mit geringer Konservierung hellgrau. Die fünf hochkonservierten Cystein-Reste sind durch Sternchen markiert.

(B) Gruppierung und Verteilung der Gesamtlänge von Ycf34-Homologen. Alle positiven Treffer eines Vergleiches mit dem BLAST P-Algorithmus (UniProtKB, blosum80 Matrix, Grenzwert 1) wurden in die Analyse einbezogen.

Mit Hilfe verschiedener Algorithmen (Rost *et al.*, 2004; Kelley und Sternberg, 2009) wurden Aussagen über die mögliche Sekundärstruktur des *Synechocystis* Ycf34-Proteins getroffen. Diese schlagen eine Sekundärstruktur bestehend aus einer α -Helix im N-terminalen Bereich des Proteins zwischen den Seitenkettenpositionen 9 und 22 vor, gefolgt von zwei β -Faltblättern (Seitenkettenpositionen 41-46 und 52-60). Die auffälligste Besonderheit der Ycf34-Proteine ist die Konservierung von vier Cystein-Seitenketten im N-Terminus des Proteins (Abbildung 3A). Diese Seitenketten suggerieren das Vorhandensein eines gebundenen Eisenions. Ein fünftes Cystein an Position 61 des *Synechocystis* Proteins ist ebenfalls stark konserviert.

2.1.2 Die Transkription des *ycf34*-Gens

Analog zur Funktion des Proteins liegen nur wenige Daten zur Akkumulation der mRNA des *ycf34*-Gens von *Synechocystis* in Abhängigkeit von Umweltbedingungen vor. Die wenigen vorhandenen Daten stützen sich zum größten Teil auf Expressionsanalysen mithilfe der Microarray-Technologie (Huang *et al.*, 2002; Aguirre von Wobeser *et al.*, 2011). Die genaue Bestimmung der präzisen Position der Transkriptionsinitiation des *Synechocystis ycf34*-Gens erfolgte durch eine 5'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) Analyse. Die von Besing *et al.* (1996) beschriebene Methodik zur Analyse von bakteriellen RNAs ist eine sensitive RT-PCR-Technik und erlaubt die Unterscheidung von primären 5'-Transkriptenden und prozessierten.

Die Sequenzierung von 14 (+TAP)-Klonen identifiziert für das Transkript von *ycf34* ein 5'-Ende 26 nt vor dem Startkodon ATG, welches innerhalb eines polyA-Stranges liegt (Abbildung 4A). Basierend auf den Daten aus einer globalen Analyse des *Synechocystis* Transkriptoms (Mitschke *et al.*, 2011), welche ebenfalls zwischen primären und prozessierten Transkripten differenziert, und der experimentellen Bestimmung des 5'-Endes des Transkripts lässt sich schlussfolgern, dass das *ycf34*-Gen als monocistronische mRNA von seinem eigenen Promoter transkribiert wird. Zudem liefern Expressionsdaten aus Microarray-Analysen von vier verschiedenen Wachstumsbedingungen (Mitschke *et al.*, 2011) erste Hinweise auf eine differentielle Regulation der *ycf34*-Genexpression. Dunkelheit oder sehr starke Lichtintensitäten führen zu einer leicht verminderten Abundanz des Transkripts, ein Mangel an Kohlendioxid als anorganische Kohlenstoffquelle erhöht seine Abundanz geringfügig. Der Mangel an Stickstoff (Osanai *et al.*, 2006; Aguirre von Wobeser *et al.*, 2011) und hohe Intensitäten von UV-B-Licht (Huang *et al.*, 2002) führen ebenfalls zu einer erhöhten Akkumulation des *ycf34*-Transkripts in *Synechocystis*-Zellen.

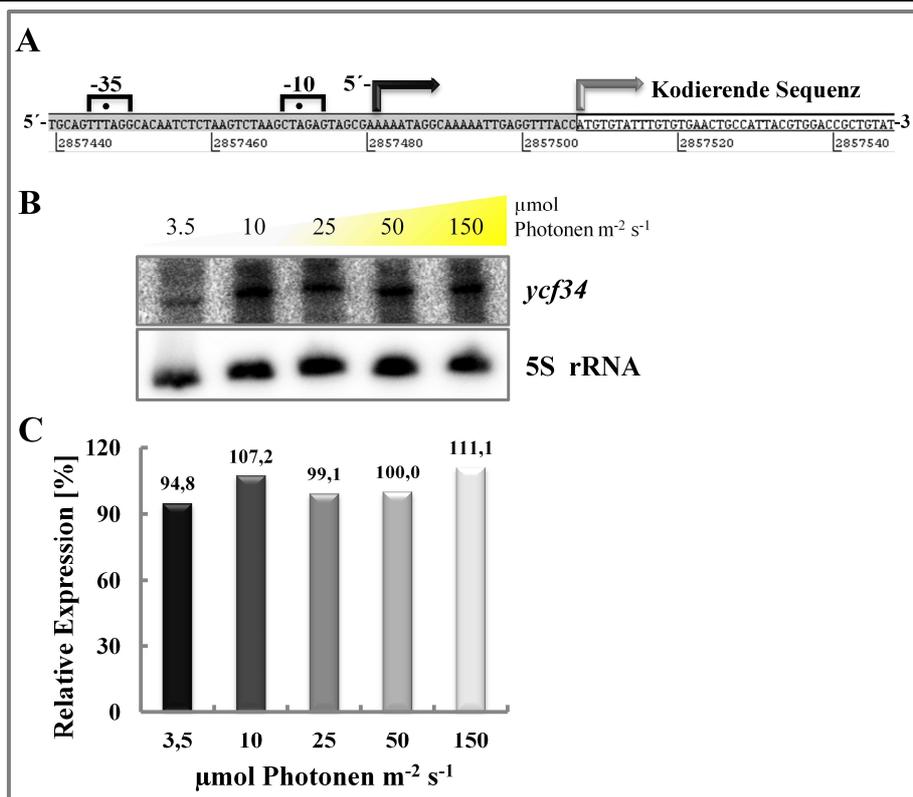


Abbildung 4: Analysen der Transkription des *Synechocystis ycf34*-Gens

(A) Experimentelle Bestimmung des 5'-Endes von *Synechocystis ycf34*. Dargestellt ist die genomische Abfolge am Beginn der kodierenden Sequenz von *ycf34* (hellgrauer Pfeil). Das durch 5'-RACE ermittelte Transkriptende ist durch einen schwarzen Pfeil markiert. Die Positionen der -10 und -35 Regionen des putativen Promoters sind relativ zum bestimmten Transkriptende und durch Balken gekennzeichnet.

(B) Northern Blot-Analyse der *ycf34* Transkription in Abhängigkeit der Beleuchtungsintensität im Wildtyp (WT). Die Gesamt-RNA wurde aus flüssigen Zellkulturen während der logarithmischen Wachstumsphase isoliert und je 10 μg in einem 10%igen Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde die RNA mit einer radioaktiv markierten, genspezifischen dsDNA-Sonde gegen *Synechocystis ycf34* hybridisiert. Als Kontrolle dient eine spezifische Oligonukleotid-Sonde gegen *Synechocystis* 5S rRNA.

(C) Semi-quantitative, densitometrische Auswertung der gewonnenen Hybridisierungssignale. Die relative Intensität der genspezifischen Hybridisierung wurde auf die Intensität der Kontrollhybridisierung normiert; der Wert für die Standardbedingungen auf 100% gesetzt.

Desweiteren wurde die Akkumulation des *ycf34*-Transkripts in Abhängigkeit der Beleuchtungsintensität untersucht. Dazu wurde *Synechocystis* WT in fünf parallelen Ansätzen zunächst unter ML kultiviert und diese dann für 24 h einer Beleuchtungsintensität von 3,5, 10, 25, 50 und 150 μmol Photonen m⁻² s⁻¹ ausgesetzt. Dabei zeigen sich keine signifikanten Änderungen in der Akkumulation des *ycf34*-Transkripts im *Synechocystis* WT unter den verschiedenen Lichtintensitäten (Abbildung 4B). Im Vergleich zu ML sinkt die relative Akkumulation um 5,2 % unter eLL und steigt um 11,1% unter hohen Intensitäten (Abbildung

4C). Es konnte keine Lichtabhängigkeit der *ycf34*-Transkriptakkumulation unter diesen Bedingungen festgestellt werden.

2.1.3 Konstruktion einer *ycf34*-Mutante

Durch Inaktivierung von Genen und den daraus resultierenden phänotypischen Veränderungen im Vergleich zum WT lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion eines unbekanntes Genprodukts gewinnen. Um die Funktion des *ycf34*-Genprodukts in *Synechocystis*-Zellen zu analysieren, wurde zu Beginn dieser Arbeit der kodierende Bereich des *Synechocystis ycf34*-Homologs durch Insertionsmutagenese im Genom deaktiviert. Der gesamte Locus *ssr1425*, inklusive seiner strukturellen und funktionellen Sequenzbereiche, wurde mit Hilfe des Primerpaars *ycf34-fw* und *ycf34-rev* (Tabelle 16) amplifiziert und in den Vektor pGEM-T easy (Promega) ligiert. Das Amplikon umfasst dabei die flankierende Gene *pcnB* (PolyA-Polymerase, genomischer Locus *slr0825*) und *ndhF1* (NADH-Dehydrogenase Untereinheit 5, genomischer Locus *slr0844*), um eine ausreichende Sequenzlänge für eine effiziente homologe Rekombination zu erreichen. Anschließend erfolgte die Insertion einer Kanamycin(Km)-Resistenzgen-Kassette (*aph*) in *antisense*-Orientierung in die BsaBI-Schnittstelle des offenen Leserahmens *ycf34*. Eine schematische Übersicht der verwendeten Strategie zeigt die Abbildung 5A. Ein motiler WT-Stamm von *Synechocystis* wurde mit dem resultierenden pGEM-T-*ycf34*-Konstrukt transformiert (Ermakova-Gerdes und Vermaas, 1999). Die hieraus folgenden Transformanten wurden auf Km-haltigem BG11-Festmedium selektiert. Die vollständige Segregation der Mutanten-Kopien in der resultierenden *ycf34*-Mutante wurden mithilfe von PCR und Southern Blot-Analysen verifiziert (Abbildung 5B+C).

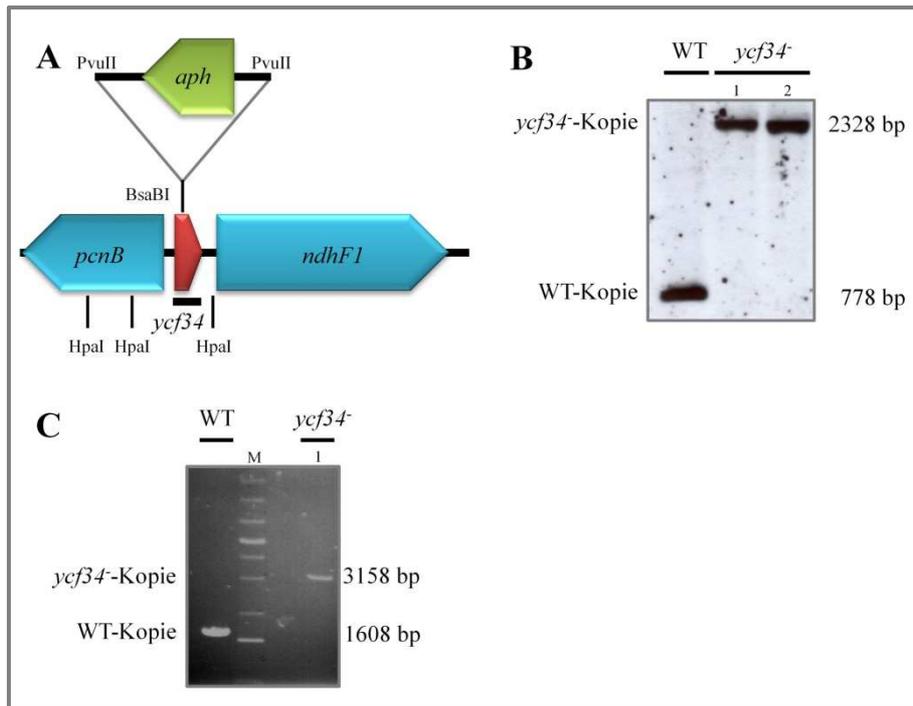


Abbildung 5: Inaktivierung von *ycf34* in *Synechocystis*

(A) Schematische Darstellung der Mutagenese. Das *ycf34*-Gen (*ssr1425*) befindet sich im Genom von *Synechocystis* zwischen den Genen *pcnB* (*sll0825*) und *ndhF1* (*slr0844*), die eine polyA Polymerase bzw. die Untereinheit 5 des NADH-Dehydrogenase-Komplexes kodieren. Der gesamte DNA-Abschnitt wurde mithilfe des Primerpaars *ycf34*-fw und *ycf34*-rev amplifiziert. Die Insertion der Kanamycin-Resistenzgen-Kassette (*aph*) erfolgte über die BsaBI-Schnittstelle in der *ycf34* Genesequenz.

(B) Southern-Blot-Analyse zur Verifikation der vollständigen Segregation der *ycf34*-Mutation. Genomische DNA, isoliert aus WT und *ycf34*-Zellen, wurde mit der Restriktionsendonuklease HpaI gespalten, in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt, auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und anschließend mit einer nicht-radioaktiv markierten, genspezifischen dsDNA-Sonde gegen *Synechocystis ycf34* hybridisiert. Die Sonde, dargestellt als schwarzer Balken in (A), deckt die kodierende Sequenz von *ycf34* ab und wurde mit dem Primerpaar *ycf34*-seq-fw und *ycf34*-seq-rev mittels PCR generiert.

(C) Zusätzliche Verifikation der vollständigen Segregation der *ycf34*-Mutation mittels PCR-Analyse, ebenfalls unter Verwendung des Primerpaars *ycf34*-seq-fw und *ycf34*-seq-rev. M kennzeichnet den verwendeten Größenstandard für die Elektrophorese.

Die Mutation konnte vollständig segregiert werden, somit besitzt das *ycf34*-Gen keine essentielle Funktion für den Organismus unter Standardbedingungen.

2.1.4 Phänotypische Charakterisierung der *ycf34*-Mutante von *Synechocystis*

2.1.4.1 Wachstum und Pigmentierung unter Standardbedingungen

Zu Beginn der phänotypischen Untersuchung der *ycf34*-Mutante wurden vollständig segregierte Klone unter Standardbedingungen (30°C, 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (ML)) in Flüssigkultur mit kontinuierlicher Luftbegasung kultiviert und diese mit dem *Synechocystis*

WT bezüglich Wachstum und Quantität der wichtigsten photosynthetischen Pigmente verglichen. Ein Vergleich der Wachstumskurven von WT und *ycf34*-Mutante offenbart keine Unterschiede im Verlauf der Kurve (siehe Abbildung 6A). Beide, WT und Mutante, zeigen in den ersten Tagen ein logarithmisches Wachstum, welches sich mit Fortschreiten der Zeit einem „Plateau“ annähert, aber noch nicht endgültig erreicht. Die Berechnung der Verdopplungszeiten liefert für WT und *ycf34*-Mutante Werte, die nahezu gleich (siehe Tabelle 3) sind. Wurden die Zellen zusätzlich mit 5% (v/v) CO₂ (HC) begast, um einen Vergleich der maximalen Wachstumsraten zu ermöglichen, ändert sich das Bild nicht (Abbildung 6B). Auch liefert die Berechnung der Verdopplungszeiten Werte, die nahezu gleich sind (Tabelle 3; ~ 1% Abweichung). Sie liegen zudem in Bereichen, die typisch für *Synechocystis* unter diesen Bedingungen sind (Ohkawa *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2008).

Tabelle 3: Physiologische Parameter von *ycf34*-Zellen im Vergleich zum WT bei mittleren Lichtintensitäten

| | mittlere Lichtintensität ^a | |
|---|---------------------------------------|--------------|
| | WT | <i>ycf34</i> |
| Verdopplungszeit, Luft [h] | 27 ± 0,5 | 26 ± 0,7 |
| Verdopplungszeit, 5% (v/v) CO ₂ [h] | 9,7 ± 0,5 | 9,6 ± 0,7 |
| Chlorophyll [$\mu\text{g (mg Protein)}^{-1}$] | 27,7 ± 2,3 | 26,5 ± 3,2 |
| Phycocyanin [$\mu\text{g (mg Protein)}^{-1}$] | 202 ± 27 | 180 ± 24 |
| Allophycocyanin [$\mu\text{g (mg Protein)}^{-1}$] | 72,3 ± 12,5 | 67,9 ± 11,1 |
| Phycocyanin zu Chlorophyll-Verhältnis | 7,3 | 6,8 |
| Phycocyanin zu Allophycocyanin-Ratio | 2,8 | 2,7 |

^a 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Die Quantifizierung der wichtigsten photosynthetischen Pigmente von *Synechocystis* WT und *ycf34*-Zellen, Phycocyanin, Allophycocyanin und Chlorophyll *a*, ist in Tabelle 3 dargestellt. Die Inaktivierung des *ycf34*-Gens führt sowohl unter Standardkonditionen (Tabelle 3) als auch bei zusätzlicher Begasung mit 5% (v/v) CO₂ zu keiner wesentlichen Änderung des Wachstums und der Pigmentierung. Die Übereinstimmung des Pigmentgehalts spiegelt sich auch in den Absorptionsspektren ganzer Zellen von WT und *ycf34*-Mutante wieder (Abbildung 6C+D). Die charakteristischen Spitzen bei 625 und 680 nm im Absorptionsspektrum von *Synechocystis*-Zellen, die die Maxima von Phycocyanin und Chlorophyll *a* repräsentieren, sind nahezu identisch.

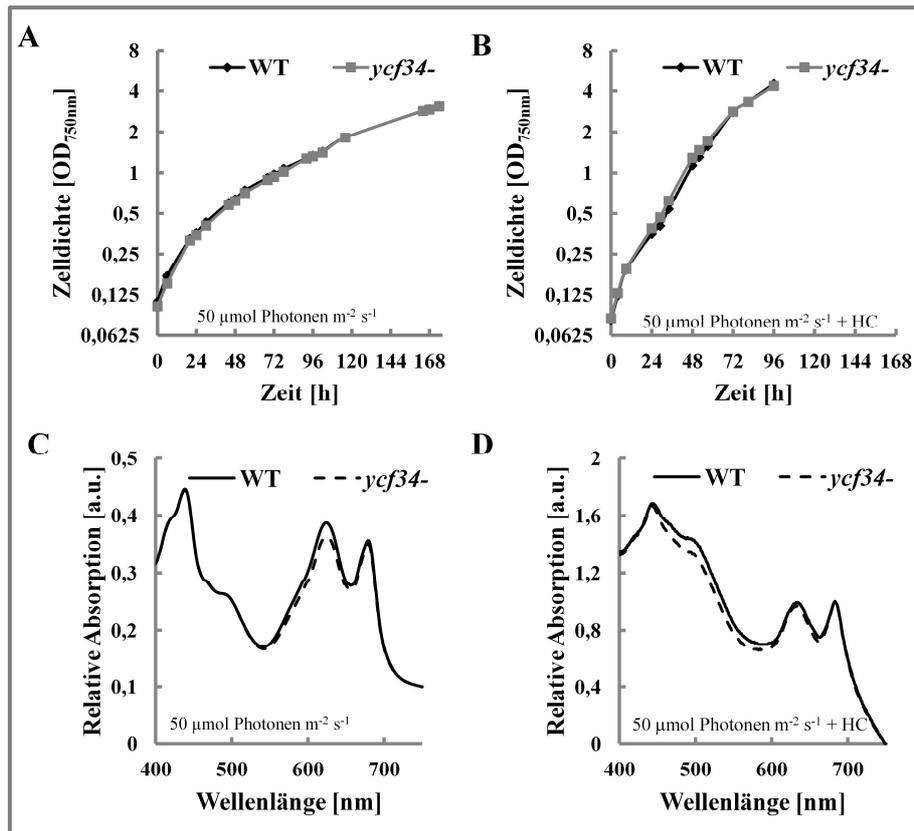


Abbildung 6: Wachstum und Pigmentierung von WT und *ycf34*-Zellen in Flüssigkultur unter Standardbelichtungsintensitäten

(A) WT und *ycf34*-Zellen wurden bei 30°C in BG11-Medium mit kontinuierlicher Begasung mit Luft oder (B) 5% (v/v) CO₂ (HC) und einer Lichtintensität von 50 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ kultiviert. Zu Beginn der Versuche wurde die Zellichte auf OD_{750nm} = ~0,1 justiert. Die Bestimmung des Wachstums erfolgt durch Protokollierung der OD_{750nm}.

(C) Absorptionsspektren von ganzen WT und *ycf34*-Zellen, die unter ML-Bedingungen wuchsen. Lokale Maxima bei 625 und 685 nm kennzeichnen die Absorption von Phycocyanin und Chlorophyll *a*. Die Spektren wurden in einem Photometer aufgezeichnet, welches mit einer integrierenden Sphäre nach Ulbricht (1920) ausgerüstet war und auf die Chlorophyll *a*-Absorption bei 685 nm normalisiert. *a.u.*, arbitrary units.

(D) Absorptionsspektren von ganzen WT und *ycf34*-Zellen, die unter ML-Bedingungen mit zusätzlicher CO₂-Begasung (5% (v/v)) wuchsen. Die Spektren wurden auf die Chlorophyll *a*-Absorption bei 685 nm und OD_{750nm} normalisiert.

Unter den gewählten Standardbedingungen und bei erhöhter CO₂-Atmosphäre ließen sich keine Veränderungen des WT-Phänotyps durch die Inaktivierung von *ycf34* aufzeigen.

2.1.4.2 *ycf34* zeigt einen Wachstumsdefekt und eine veränderte Pigmentierung unter extrem schwachen Lichtintensitäten

Das bisherige Bild, ein Fehlen von phänotypischen Merkmalen, ändert sich, wenn Zellen der *ycf34*-Mutante einer extrem schwachen Beleuchtungsintensität (3,5 µmol Photonen m⁻² s⁻¹, (eLL)) ausgesetzt werden. Wurde das Wachstum von WT-Zellen unter diesen Bedingungen

protokolliert (Abbildung 7A), zeigte sich zwar ein Wachstum über den gesamten Zeitraum der Messung; ein „Plateau“ wie unter Standardbedingungen wird jedoch nicht erreicht. Zudem benötigen die WT-Zellen die dreifache Zeit für eine Verdopplung im Vergleich zu Standardbedingungen (siehe Tabelle 4), wie die entsprechende Berechnung ergab. Im Vergleich zum WT verläuft die Wachstumskurve der *ycf34*-Mutante mit noch geringerer Steigung (Abbildung 7A). Die Mutante besitzt eine mit 157 ± 42 h ungefähr zweimal so große Verdopplungszeit wie der WT (Tabelle 4), was etwa 206% dessen Niveaus entspricht. Darüber hinaus weisen die Absorptionsspektren von *ycf34*-Zellen eine deutliche Reduktion des Absorptionsmaximums bei 620 nm auf (Abbildung 7B). Das Absorptionsmaximum von Chlorophyll (685 nm) ist im Gegensatz dazu unverändert. Die Quantifizierung der photosynthetischen Pigmente von WT und Mutante verdeutlicht die spektralen Charakteristika. Während die Gehalte an Chlorophyll in WT und *ycf34*-Zellen bei dieser geringen Belichtungsintensität annähernd gleich sind (Tabelle 4), ergibt die Quantifizierung eine drastische Reduktion der Menge an Phycocyanin in der *ycf34*-Mutante. Die zelluläre Konzentration liegt bei nur noch 45% des WT. Der Allophycocyanin-Gehalt ist ebenfalls gegenüber dem WT vermindert und erreicht etwa 80% des WT-Niveaus. Folgerichtig ist das Verhältnis von Phycocyanin zu Chlorophyll reduziert.

Tabelle 4: Physiologische Parameter von *ycf34*-Zellen im Vergleich zum WT bei extrem schwachen Lichtintensitäten

| | extreme schwache Lichtintensität ^a | |
|---|---|-----------------|
| | WT | <i>ycf34</i> |
| Verdopplungszeit, Luft [h] | 76 ± 12 | 157 ± 42 |
| Verdopplungszeit, 5% (v/v) CO ₂ [h] | $67,3 \pm 3,4$ | $95 \pm 4,7$ |
| Chlorophyll [$\mu\text{g (mg Protein)}^{-1}$] | $23,4 \pm 0,9$ | $22,8 \pm 3,0$ |
| Phycocyanin [$\mu\text{g (mg Protein)}^{-1}$] | $216,1 \pm 16,1$ | $94,4 \pm 14,4$ |
| Allophycocyanin [$\mu\text{g (mg Protein)}^{-1}$] | $93,9 \pm 7,9$ | $73,7 \pm 8,9$ |
| Phycocyanin zu Chlorophyll-Ratio | 9,2 | 4,1 |
| Phycocyanin zu Allophycocyanin-Ratio | 2,3 | 1,3 |

^a $3,5 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Die Erhöhung der Verfügbarkeit von anorganischem Kohlenstoff durch Begasung mit 5% (v/v) CO₂ führt zu keiner Kompensation der bisher beobachteten Verlangsamung des Wachstums (Tabelle 4, Abbildung 7C). So liegt die Verdopplungszeit mit $95 \pm 4,7$ h noch immer 40% unter dem Niveau des WT. Die drastische Reduktion des Phycocyanin-Gehaltes

besteht weiterhin (Tabelle 4). WT-Zellen (Abbildung 7D) zeigen den für diese lichtlimitierten Bedingungen typischen Anstieg der Absorption von Phycocyanin (Grossman *et al.*, 1993; Mitschke *et al.*, 2011) im Absorptionsspektrum. Im Gegensatz dazu stagniert das Absorptionsmaxima in *ycf34*-Zellen auf einem vergleichbar niedrigen Niveau wie zuvor (vgl. Abbildung 6B).

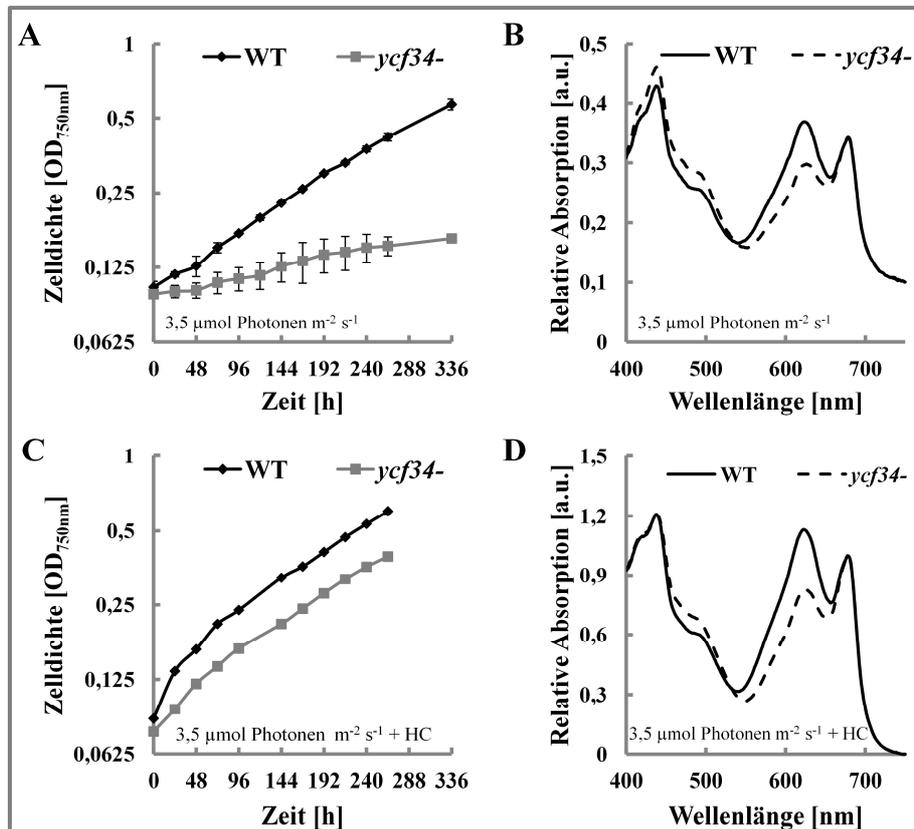


Abbildung 7: Wachstum und Pigmentierung von WT und *ycf34*-Zellen in Flüssigkultur unter extrem geringen Lichtintensitäten

(A) WT und *ycf34*-Zellen wurden bei 30°C in BG11-Medium mit kontinuierlicher Begasung mit Luft oder (C) 5% (v/v) CO₂ (HC) und einer Lichtintensität von 3,5 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ kultiviert. Zu Beginn der Versuche wurde die Zelldichte auf OD_{750nm} = ~0,1 justiert. Die Bestimmung des Wachstums erfolgt durch Protokollierung der OD_{750nm}.

(B)+(D) Absorptionsspektren von ganzen WT und *ycf34*-Zellen, die unter eLL-Bedingungen mit Luft- oder CO₂-Begasung wuchsen. Lokale Maxima bei 625 und 685 nm kennzeichnen die Absorption von Phycocyanin und Chlorophyll *a*. Die Spektren wurden in einem Photometer aufgezeichnet, welches mit einer integrierenden Sphäre (Ulbricht, 1920) ausgerüstet war und auf die Chlorophyll *a*-Absorption bei 685 nm normalisiert.

Die Inaktivierung von *ycf34* führt in *Synechocystis* zu einer starken Inhibierung des Wachstums und zu einer drastischen Reduktion der zellulären Gehalte an Phycocyanin, wobei die observierten phänotypischen Änderungen abhängig von der Quantität des Lichtes sind und nur bei extrem geringen Beleuchtungsintensitäten auftreten.

2.1.4.3 Komplementierung des *ycf34*-Phänotyps

Die bisher beobachteten Phänomene könnten ursächlich ein Ergebnis der Inaktivierung des *Synechocystis ycf34*-Gens sein oder aber auf sekundären Effekten der Insertionsmutation selbst oder weiteren Mutationen beruhen. Um dies auszuschließen, wurde versucht, eine genetische Komplementierung der Mutante *in trans* zu generieren. Zellen des *ycf34*-Stammes wurden dazu mit dem in Abschnitt 4.2.2.18 beschriebenen Plasmid pSK9-FLAG-*ycf34* transformiert. Das zugrundeliegende Schema des Plasmids ist in Abbildung 8A dargestellt. Entsprechende Transformanten wurden auf einem Cm + Km-haltigem BG11-Festmedium selektiert. Die vollständige Segregation der Expressionsplattform in der resultierenden *ycf34*/FLAG-*ycf34*-Mutante wurde mithilfe der PCR (Abbildung 8B) verifiziert.

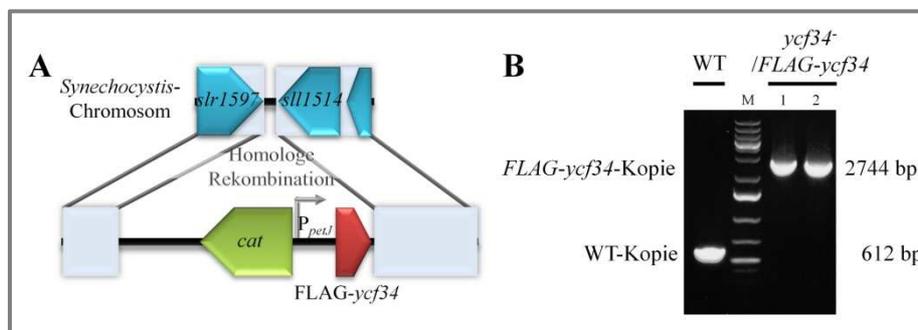


Abbildung 8: Komplementierung der *ycf34*-Mutation

(A) Schematische Darstellung der Komplementierungsstrategie. Die kodierende Sequenz von *Synechocystis ycf34* wurde mit einer Sequenz fusioniert, die ein 3xFLAG-tag kodiert (roter Pfeil). Die Expression des Fusionsproteins erfolgt durch den kupferabhängigen Promoter des *Synechocystis petJ*-Gens (grauer Pfeil). Das FLAG-*ycf34* Konstrukt wurde in das Genom von *Synechocystis* in die intergenische Region zwischen *parA/slr1597* (*chromosome partitioning* ATPase) und *hspA/sll1514* (16,6 kDa *small heat shock protein*) durch homologe Rekombination integriert.

(B) Verifikation der vollständigen Integration des FLAG-*ycf34*-Konstrukts in das Genom von *Synechocystis ycf34*-Mutanten mittels Kolonie-PCR unter Verwendung des Primerpaars pSK9-F1 und pSK9-R. M kennzeichnet den verwendeten Größenstandard für die Elektrophorese.

Es ist somit möglich, das Ycf34-Protein als N-terminales Fusionsprotein mit einem FLAG-tag *in vivo* in *Synechocystis* herzustellen. Unter Verwendung des Promoters des *petJ*-Gens (Cytochrom *c553*, *sll1796*) von *Synechocystis* erfolgt die Transkription der chimären 3xFLAG-*ycf34* mRNA in Abhängigkeit der Kupferkonzentration des Mediums (Zhang *et al.*, 1994; Tous *et al.*, 2001). Die Expression erfolgt dabei ektopisch von einem neutralen Ort innerhalb des *Synechocystis*-Genoms nach Integration zwischen die offenen Leserahmen *slr1597* (*chromosome partitioning* ATPase) und *sll1514* (16.6 kDa Hitzeschockprotein) (Peter *et al.*, 2009). Zellen des Stammes *ycf34*/FLAG-*ycf34*-Zellen produzieren das Fusionsprotein unter Kupfermangel, wie entsprechende Immunoblot-Analysen zeigen. Das FLAG-Ycf34 Protein

wird mit einem gegen das FLAG-Epitop gerichteten Antikörper spezifisch in diesem Stamm detektiert (Abbildung 9A). Zudem wird die Expression durch Kupferkonzentrationen von 2,5 μM inhibiert (Abbildung 9B). Absorptionsspektren von Zellen des komplementierten Stammes demonstrieren unter eLL-Bedingungen vergleichbare Charakteristika wie WT-Zellen (Abbildung 9C).

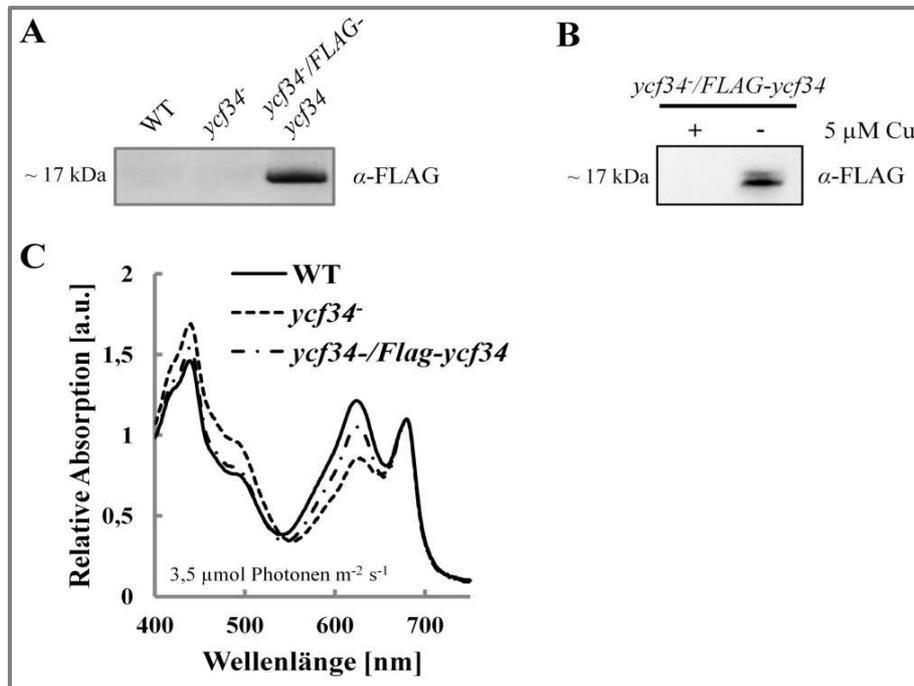


Abbildung 9: Analyse der FLAG-Ycf34-Expression und Komplementierung von *ycf34*-Zellen

(A) Immunologische Detektion von FLAG-Ycf34 in den Gesamtextrakten von WT, *ycf34* und *ycf34/FLAG-ycf34*. Je 20 μg Protein wurden in einen 16%igen SDS-Polyacrylamidgel mit 6M Harnstoff (Schägger und von Jagow, 1987) elektrophoretisch getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mit anti-FLAG-AP-Konjugat inkubiert. Die Detektion des FLAG-Ycf34 Fusionsproteins erfolgt über den chromogenen Niederschlag der von der alkalischen Phosphatase katalysierten Reaktion.

(B) Repression und Induktion der Expression von FLAG-Ycf34 durch die Kupferkonzentration im Medium. Je 20 μg Protein des Gesamtextraktes von *ycf34/FLAG-ycf34*-Zellen, die in Anwesenheit von 5 μM CuSO_4 (Cu) oder ohne Cu im Medium wuchsen, wurden in einen 16%igen SDS-Polyacrylamidgel mit 6M Harnstoff (Schägger und von Jagow, 1987) elektrophoretisch getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mit anti-FLAG-HRP-Konjugat inkubiert. Die Detektion des FLAG-Ycf34 Fusionsproteins erfolgt über die Chemilumineszenz der von der Meerrettich-Peroxidase katalysierten Reaktion.

(C) Absorptionsspektren von *Synechocystis* WT, *ycf34* und komplementierten Zellen. Die Zellen wurden bei einer Beleuchtungsintensität von 3,5 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in der Abwesenheit von Kupfer im Medium kultiviert, um eine Expression des FLAG-Ycf34 Proteins zu erlauben. Lokale Absorptionsmaxima bei 625 und 685 nm kennzeichnen die Absorption von Phycocyanin und Chlorophyll *a*. Die Spektren wurden in einem Photometer aufgezeichnet, welches mit einer integrierenden Sphäre (Ulbricht, 1920) ausgerüstet war und auf die Chlorophyll *a*-Absorption bei 685 nm normalisiert.

Es muss jedoch erwähnt werden, dass der hohe Gehalt an Phycocyanin, wie er typisch für an diese Bedingungen adaptierte WT-Zellen ist, nicht vollständig erreicht wird. Der Phycocyanin-Gehalt von *ycf34/FLAG-ycf34*-Zellen beträgt bei extrem schwachen Intensitäten $95,7\% \pm 6,3$ des WT (Daten nicht gezeigt). Die mögliche Ursache hierfür könnte in einer Energie-Limitation liegen, bedingt durch die zusätzliche Transkription der mRNAs für die anschließende Expression der Proteine (Antibiotika-Resistenzen, FLAG-Ycf34) (Bentley *et al.*, 1990). Das rekombinante FLAG-Ycf34 scheint jedoch funktionell zu sein und soll im Weiteren verwendet werden, um Aussagen über die Lokalisation des Ycf34-Proteins in der Zelle zu treffen (siehe Abschnitt 2.1.4.9). Zudem wird der *ycf34/FLAG-ycf34*-Stamm für Co-Immunopräzipitationen von möglichen mit Ycf34 interagierenden Proteinen verwendet. Die Verwendung des FLAG-tags und der kommerziell erhältlichen Antikörper erlauben die einfache und schnelle Detektion des Fusionsproteins.

2.1.4.4 *ycf34* assembliert intakte, aber kleinere Phycobilisomen

Die auf die Mutation des *ycf34*-Gens zurückzuführenden Veränderungen des Phänotyps beinhalten eine Reduktion der Phycobilisomen-Untereinheiten Phycocyanin und Allophycocyanin. Eine Verminderung ihrer Abundanz sollte Konsequenzen auf die Charakteristika der Phycobilisomen wie vollständiger Aufbau, Größe, Komposition der Untereinheiten und Gesamtzahl haben. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden die Phycobiliproteinkomplexe aus an eLL-Bedingungen adaptierte WT und *ycf34*-Zellen durch Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation isoliert. Intakte Phycobilisomen zeigen sich in solchen Dichtegradienten als scharfe, tiefblaue Bande (Bande I) in der Schicht mit 1M Saccharose (Abbildung 10A). Sowohl der WT als auch die *ycf34*-Mutante sind in der Lage, vollständige Phycobilisomen unter den genannten Bedingungen zu assemblieren. Jedoch migrieren die aus der Mutante isolierten intakten Phycobilisomen langsamer als entsprechende Phycobilisomen des WT (Abbildung 10A). Zusätzlich tritt eine untypische, leichtblaue Bande an der Grenze zwischen den Schichten mit 0,75 und 0,5 M Saccharose auf (Bande II). Die Analyse der intakten Phycobilisomen (Bande I) offenbarte eine veränderte Komposition der Untereinheiten in der *ycf34*-Mutante. Die Menge des Linkerproteins CpcC2/ L_R^{30} (*sll1579*) ist reduziert (Abbildung 10B). Das CpcC2/ L_R^{30} Linkerprotein verbindet das mittlere Phycocyanin-Hexamer mit dem äußeren; während das Linkerprotein CpcC1/ L_R^{33} (*sll1580*) das kernnahe Phycocyanin-Hexamer mit dem mittleren verbindet (Ughy und Ajlani, 2004). Interessanterweise lassen sich keine Unterschiede in der Abundanz und Komposition der Untereinheiten aufdecken, wenn Phycobilisomen aus an ML-Bedingungen adaptierten

WT und *ycf34*-Zellen isoliert wurden (Abbildung 10C). Die Beobachtung deckt sich mit den Gehalten an Phycocyanin und Allophycocyanin, wie sie für die entsprechenden Kulturen ermittelt wurden (siehe Tabelle 3 in Abschnitt 2.1.4.1).

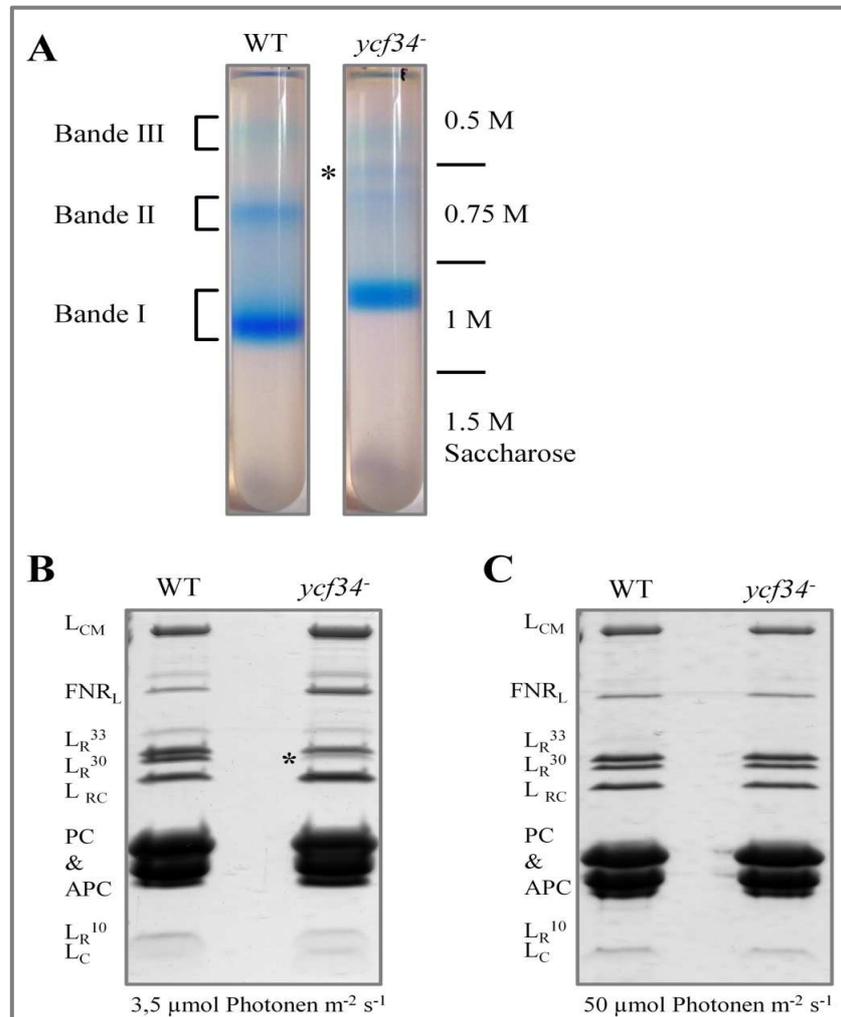


Abbildung 10: Veränderungen an den Phycobilisomen von *ycf34*-Zellen

(A) Profil der Saccharose-Dichtegradienten von WT und *ycf34*-Zellen, die unter eLL-Bedingungen kultiviert wurden. Intakte Phycobilisomen wurden der dunkelblauen Bande I zugewiesen. Bande II und Bande III enthalten vollständige Arme oder den Kern aus Allophycocyanin. Die zusätzliche, schwachblaue Bande im Gradienten der *ycf34*-Mutante ist durch einen Stern markiert.

(B) Komposition der Untereinheiten intakter Phycobilisomen aus an eLL-Konditionen adaptierte WT und *ycf34*-Zellen. Intakte Phycobilisomen (A, Bande I) wurden elektrophoretisch in einem 16%igen SDS-Polyacrylamidgel mit 6M Harnstoff (Schägger und von Jagow, 1987) getrennt und die Polypeptide mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau R250 visualisiert. Die Zuordnung der Untereinheiten erfolgt nach Ughy und Ajlani (2004). Die verminderte Akkumulation des Linkerproteins CpcC2/ L_R^{30} (*sll1579*) ist durch einen Stern gekennzeichnet.

(C) Komposition der Untereinheiten intakter Phycobilisomen aus an ML-Konditionen adaptierte WT und *ycf34*-Zellen.

Zusammenfassend kann man aus den bisherigen Ergebnissen schließen, dass die Inaktivierung von *ycf34* in *Synechocystis* zur Assemblierung von intakten, aber kleineren Phycobilisomen unter extremen Schwachlichtbedingungen führt. Ob dieser Effekt primären oder möglicherweise sekundären Ursprungs ist, muss durch weitere Experimente geklärt werden.

Die Reduktion des Phycocyanin-Gehalts und die damit einhergehenden Veränderungen der Phycobilisomen sollten erwartungsgemäß Auswirkungen auf die Effizienz der Lichtabsorption durch die photosynthetischen Komplexe in *Synechocystis* haben. Eine Möglichkeit den Energietransfers von den Phycobilisomen zu den PS zu analysieren, bietet die Technik der 77K-Fluoreszenzemissionsspektroskopie. Alle nachfolgenden Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Roman Sobotka (Institut für Phototrophe Mikroorganismen, Třeboň, Tschechische Republik) durchgeführt. Die Resultate einer solchen 77K-Fluoreszenzspektroskopie erlauben detaillierte Aussagen über die Quantität der PS I und II, sowie ihrer Stöchiometrie (Campbell *et al.*, 1998). Bei direkter Anregung von Chlorophyll *a* ($\lambda_{\text{ex}}=440$ nm) zeigen Spektren von *Synechocystis*-Zellen charakteristische Emissionsmaxima an definierten Wellenlängen, die mit verschiedenen Protein-Chlorophyll-Komplexen assoziiert werden (Campbell *et al.*, 1998; Mao *et al.*, 2003): Der terminaler Emitter der Phycobilisomen und die CP43-Untereinheit des PS II emittieren bei 685 nm. Bei 695 nm emittieren die CP47-Untereinheit des PS II und das Reaktionszentrum des PS II selbst. Die stärkste Emission bei 725 nm stammt von Chlorophyll *a*-Molekülen, die mit dem PS I assoziiert sind. Wurde Chlorophyll *a* direkt angeregt ($\lambda_{\text{ex}}=440$ nm), zeigten sich nur geringe Unterschiede in den Fluoreszenzemissionsspektren von WT und *ycf34*-Mutante sowohl unter ML- (Abbildung 11A) als auch unter eLL-Bedingungen (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der Quantifizierung der photosynthetischen Pigmente und bestätigen, dass das zelluläre Niveau der PS in beiden Stämmen nahezu gleich ist; abgesehen von einem leicht erhöhten Gehalt an PS I in der *ycf34*-Mutante.

Die Anregung der Phycobilisomen ($\lambda_{\text{ex}}=590$ nm) und die Analyse des Energietransfers auf die PS in *Synechocystis* zeigt ein anderes Bild: Die Biliproteine Phycocyanin und Allophycocyanin emittieren bei 650 und 665 nm (Mao *et al.*, 2003). Ein entsprechendes Fluoreszenzemissionsspektrum der *ycf34*-Mutante, unter eLL-Bedingungen gewachsen, zeigt deutliche Unterschiede in den lokalen Maxima der Fluoreszenz (Abbildung 11B). So findet man eine drastisch reduzierte Intensität der emittierten Fluoreszenz von Phycocyanin ($\lambda_{\text{em}}=650$ nm) (Abbildung 11B), die etwa 50% der Intensität des WT-Niveau entspricht. Zudem ist die Fluoreszenzemission von Allophycocyanin ($\lambda_{\text{em}}=665$ nm) reduziert, wenn auch

in geringerem Maße (78% WT-Niveau). Diese Veränderungen der Emission stehen in guter Übereinstimmung mit der Quantifizierung der photosynthetischen Pigmente (siehe Tabelle 4 in Abschnitt 2.1.4.2).

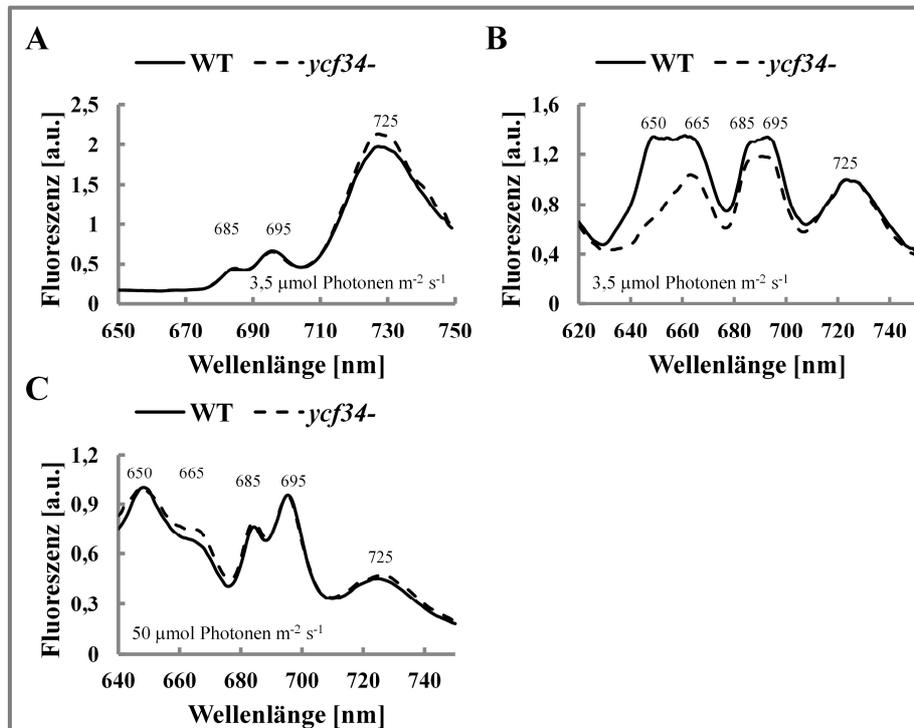


Abbildung 11: 77K Fluoreszenzemissionsspektren von WT und *ycf34*-Zellen unter verschiedenen Lichtbedingungen

(A) Eine identische Zahl an Zellen von WT und *ycf34* ($OD_{730\text{nm}} = 0,2$), die unter eLL-Konditionen wuchsen, wurden mit $2\mu\text{M}$ Rhodamin vermischt und in flüssigem Stickstoff bei 77K gefroren. Die Anregung von Chlorophyll *a* erfolgte mit einer Wellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 435\text{ nm}$. Maxima der Fluoreszenz bei 685, 695 und 725 nm wurden PS II und I zugeordnet (Campbell *et al.*, 1998; Mao *et al.*, 2003). Die Spektren wurden auf das Emissionsmaximum von Rhodamin (573 nm) normiert.

(B) Fluoreszenzemission derselben Zellen bei spezifischer Anregung der Phycobilisomen mit einer Wellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 590\text{ nm}$. Maxima der Fluoreszenz bei 650, 665 und 685 nm wurden Phycocyanin, Allophycocyanin und dem terminalen Emitter zugeordnet (Campbell *et al.*, 1998; Mao *et al.*, 2003). Die weiteren Maxima bei 695 und 725 resultieren aus dem Transfer der Anregungsenergie von den Phycobilisomen an PS II und PSI. Die Spektren wurden auf die Emission von PS I (725 nm) normiert.

(C) Fluoreszenzemission von an ML-Konditionen adaptierte WT und *ycf34*-Zellen bei spezifischer Anregung der Phycobilisomen mit einer Wellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 590\text{ nm}$.

Dies lässt den Schluss zu, dass der Effekt der *ycf34*-Inaktivierung auf die zelluläre Akkumulation von Allophycocyanin und damit auf den Kern der Phycobilisomen geringer ist als auf die Abundanz von Phycocyanin. Die reduzierte Fluoreszenz der Phycocyanine führt konsequenterweise zu einer reduzierten Emission vom PS II (Abbildung 11B), welches ein gutes Indiz für die verminderte Fähigkeit des *ycf34*-Stammes ist, Licht unter diesen Bedingungen zu sammeln. Erwartungsgemäß offenbaren die Emissionsspektren von an ML-

Bedingungen adaptierte Zellen bei Anregung von Phycocyanin keine Unterschiede zwischen WT und *ycf34*-Mutante (Abbildung 11C).

2.1.4.5 *ycf34*-Zellen zeigen eine retardierte *de novo* Assemblierung der Phycobilisomen

Die observierte Reduktion der verkleinerten Phycobilisomen suggeriert eine mögliche Rolle des Ycf34-Proteins von *Synechocystis* innerhalb der Degradation oder der Assemblierung der cyanobakteriellen Lichtsammelkomplexe. Da Phycobilisomen neben ihrer Funktion als Lichtsammelkomplexe auch ein zelluläres Reservoir für Kohlenstoff und Stickstoff darstellen, werden sie unter entsprechenden Mangelbedingungen abgebaut (Lau *et al.*, 1977; Grossman *et al.*, 1993). WT und *ycf34*-Zellen können durch Stickstoffmangel forciert werden, ihre Phycobilisomen abzubauen. Eine Zugabe von NaNO₃ als N-Quelle induziert die *de novo* Synthese. Für die folgenden Experimente wurde eine etwas höhere Lichtintensität von 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ verwendet, die jedoch immer noch Schwachlichtbedingungen darstellt. Sie ist ein Kompromiss zwischen Stärke des Phänotyps von *ycf34* und der Forderung nach vergleichbaren Wachstumsraten von WT und Mutante. Diese Ab- und Aufbauprozesse können relativ einfach spektroskopisch verfolgt werden, wobei sich das Verhältnis von Phycocyanin zu Chlorophyll *a* (PC-Chl-Ratio, siehe Abschnitt 4.2.1.4) (Myers *et al.*, 1980) spezifisch für die oben genannten Zustände verändert.

Stickstoffmangel führt sowohl in WT als auch in *ycf34*-Zellen zu einem Abbau der Phycobilisomen innerhalb von 24 Stunden (Abbildung 12, linke Seite), wobei sich die PC-Chl-Ratio vermindert. Die Kinetik der Ratio ist dabei für beide Stämme während des Abbauprozesses gleich. Die unterschiedlichen Startwerte (WT = 0,89; *ycf34* = 0,79) reflektieren den schon beschriebenen, verminderten Phycocyanin-Gehalt der *ycf34*-Mutante. Die Sättigung des Medium mit anorganischem Stickstoff führt im Falle des WT zu einer schnellen Adaptation und der *de novo* Synthese von Phycobilisomen. Sichtbar ist dies im Anstieg des PC-Chl-Verhältnisses, wobei der Verlauf der Kurve in erster Näherung sigmoidalen Charakter (Abbildung 12, rechte Seite) hat. Dieser sigmoidale Verlauf ist für die *ycf34*-Mutante nicht gegeben. Die PC-Chl-Ratio steigt in erster Näherung nur linear an. Die unterschiedlichen Zeitpunkte zu denen die jeweiligen Ausgangspunkte wieder erreicht werden, verdeutlichen die verschiedenen Typen der Kinetik. Das Ausgangsniveau des WT (0,89) wird bereits nach circa 15,5 h erreicht und danach sogar überschritten (0,92). Die Mutante erlangt ihren geringeren Startwert (0,79) selbst nach 24 h noch nicht wieder (0,76).

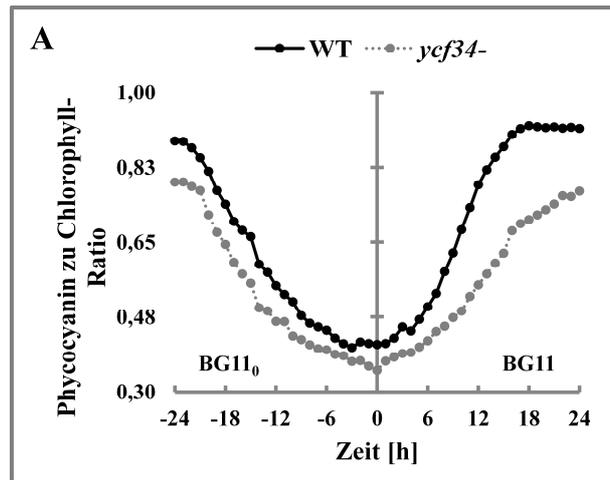


Abbildung 12: Degradation und *de novo* Synthese von Phycobilisomen in WT und *ycf34*-Zellen

WT und *ycf34*-Zellen, die in BG11-Medium bei $25 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wuchsen, wurden in BG11₀-Medium ohne Natriumnitrat gewaschen und auf eine $\text{OD}_{750\text{nm}} = 0,4$ verdünnt (Zeitpunkt -24 h). Die Zellen wurden in diesem Medium für weitere 24 h kultiviert. Durch Zentrifugation wurden die Zellen gesammelt, in BG11-Medium mit 17,6 mM Natriumnitrat als Stickstoffquelle resuspendiert (Zeitpunkt 0) und die Kultivierung für weitere 24 h fortgesetzt. Absorptionsspektren ganzer Zellen von WT und *ycf34* wurden jede Stunde in einem Shimadzu UV2401PC Spektrophotometer, ausgestattet mit einer integrierenden Sphäre (Ulbricht, 1920) zur Minimierung der Streuung, aufgezeichnet. Das Verhältnis von Phycocyanin zu Chlorophyll wurde aus den Spektren bestimmt (Myers *et al.*, 1980) und gegen die Zeit graphisch dargestellt.

Eine Rolle innerhalb der Degradationsprozesse von Phycobilisomen kann Ycf34 nicht zugeordnet werden. Für den Aufbau der Lichtsammelkomplexe wird Ycf34 ebenfalls nicht essenziell benötigt. Die Inaktivierung des *ycf34*-Gens erlaubt noch immer die Assemblierung von Phycobilisomen, auch wenn diese verlangsamt von statten geht und die Zusammensetzung gegenüber dem WT etwas verändert sind.

2.1.4.6 *Synechocystis* Ycf34 interagiert nicht mit den Phycobilisomen

Ausgehend von den bisherigen Beobachtungen eines reduzierten PC-Gehalts und verlangsamtem *de novo* Aufbau der Phycobilisomen in der *ycf34*-Mutante, wäre es immer noch möglich, dem Ycf34-Protein eine Rolle als Chaperon oder Assemblierungsfaktor in diesem Prozess zu zuweisen. So verursacht die Inaktivierung des *Synechococcus elongatus* PCC7942 Hitzeschockproteins HtpG ein reduziertes Vorkommen des Linkerprotein L_R³⁰ (*cpcH*/ *Synpcc7942_1049*) und eine langsamere Wanderung der intakten Phycobilisomen im Saccharose-Dichtegradienten (Sato *et al.*, 2010). In diesem Fall müsste sich eine Interaktion von *Synechocystis* Ycf34 mit Bestandteilen der Phycobilisomen nachweisen lassen. Dementsprechend wurden Phycobilisomen aus *ycf34*/FLAG-*ycf34*-Zellen isoliert, die resultierenden Proteinfractionen des Saccharose-Dichtegradienten elektrophoretisch

aufgetrennt und anschließend das Fusionsprotein immunologisch detektiert. Kein Ycf34-Protein ließ sich in Fraktionen nachweisen, die intakte Phycobilisomen oder Untereinheiten derselben enthielten (Abbildung 13A+B). Ebenso konnten keine Phycobiliproteine zusammen mit dem FLAG-Ycf34 Protein im Rahmen von Interaktionsanalysen aus löslichen Extrakten der *ycf34/FLAG-ycf34*-Zellen präzipitiert werden (Daten nicht gezeigt). Zudem besitzen Phycobilisomen in *ycf34*-Zellen eine mit WT-Phycobilisomen vergleichbare Stabilität, wie Hitzeschock-Versuche ergaben (Daten nicht gezeigt).

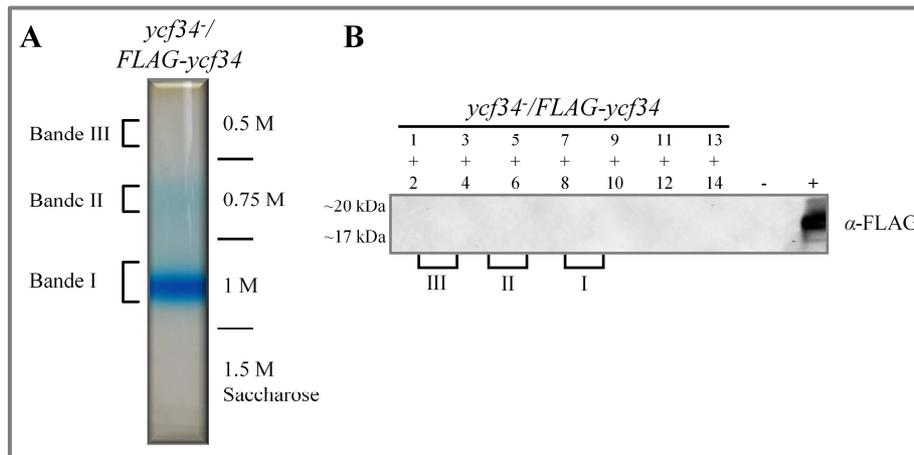


Abbildung 13: Immunologische Untersuchungen zu Interaktionspartnern von FLAG-Ycf34

(A) Profil der Saccharose-Dichtegradienten von *ycf34/FLAG-ycf34*-Zellen, die unter eLL-Bedingungen in kupferfreiem BG11-Medium kultiviert wurden. Intakte Phycobilisomen wurden der dunkelblauen Bande I zugewiesen. Bande II und Bande III enthalten vollständige Arme oder den Kern aus Allophycocyanin.

(B) Immunologische Analyse eines solchen Gradienten. Je zwei Fraktionen wurden vereint (1+2 bis 13+14) und in einem 16%igen SDS-Polyacrylamidgel mit 6M Harnstoff (Schägger und von Jagow, 1987) elektrophoretisch getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und das FLAG-Ycf34 Protein immunologisch mit dem Primärantikörper anti-FLAG-AP-Konjugat detektiert. Das Eluat einer FLAG-Ycf34-Affinitätsaufreinigung (+) dient als Positivkontrolle. Die vereinte Fraktion 1+2 entspricht der obersten Schicht des Gradienten in (A).

Diese Versuche unterstützen die Aussage, dass das *Synechocystis* Ycf34-Protein nicht mit Untereinheiten der Phycobilisomen interagiert und auch keine Funktion als Chaperon oder Assemblierungsfaktor der Phycobilisomen besitzt.

2.1.4.7 *ycf34*-Mutanten zeigen eine veränderte Transkriptakkumulation des *cpcBAC2CID*-Operons

Der reduzierte Gehalt an Phycobilisomen und Phycocyanin in den *ycf34*-Zellen wurde bisher nur auf Ebene der Proteine untersucht. Die veränderte Abundanz kann durch einen erhöhten proteolytischen Abbau, eine inhibierte Translation oder eine modifizierte Transkription der zugrundeliegenden Gene verursacht worden sein. Daher wurde die relative Expression des *cpcBAC2CID*-Operons in WT und *ycf34*-Zellen unter verschiedenen Lichtintensitäten analysiert. Die Gene des *cpcBAC2CID*-Operons (*cpcBACD*-Operon) kodieren die strukturellen β/α Phycocyanin-Untereinheiten (*cpcB/sll1577*; *cpcA/sll1578*) sowie die Linkerproteine CpcC2, CpcC1 und CpcD (*cpcC2/sll1579*; *cpcC1/sll1580* und *cpcD/sll3039*). Die Transkription des Operons resultiert in drei unterschiedlich langen Transkripten von 3800, 3400 und 1660 nt Länge (Ughy und Ajlani, 2004). Zunächst wurden WT und *ycf34*-Zellen unter ML-Bedingungen kultiviert und anschließend für 24 bzw. 48 Stunden in eLL-Bedingungen transferiert. Vor und nach der jeweiligen Behandlung erfolgte die Probenentnahme und Isolation der Gesamt-RNA. Die verwendete RNA-Sonde hybridisiert mit dem 3'-Bereich von *cpcA* und dem 5'-Bereich von *cpcC2* und erlaubt die Detektion der drei verschiedenen *cpcBACD*-Transkripte; hauptsächlich jedoch des *cpcBA*-Transkripts mit einer Größe von etwa 1600 nt. Die Northern Blot-Analyse mithilfe dieser Sonde deckt eine drastisch verringerte Akkumulation des *cpcBA*-Transkripts auf, die nur in Zellen in der *ycf34*-Mutante unter eLL-Bedingungen (Abbildung 14A) auftritt. Die Akkumulation der anderen beiden Transkripte *cpcBAC2C1* und *cpcBAC2CID* ist ebenfalls reduziert (Daten in Abbildung 14A nicht gezeigt). Wurden *ycf34*-Zellen unter ML-Bedingungen kultiviert, wo die Mutante eine dem WT ähnliche Pigmentierung zeigt, ließ sich keine verringerte Transkriptakkumulation detektieren (Abbildung 14A). Folglich kann man schlussfolgern, dass das beobachtete Phycobilisomen-Defizit in *ycf34*-Zellen die Konsequenz der reduzierten *cpcBACD*-Transkription und damit einhergehenden verminderten Expression der Proteine ist.

Es ist jedoch bekannt, dass verschiedene abiotische Umweltfaktoren einen Einfluss auf die Expression der Phycocyanin-Gene haben. Die Limitation an anorganischem CO₂ (Grossman *et al.*, 1993) oder Stickstoff (Wang *et al.*, 2004a) führen ebenso zu einer verminderten Transkription des Operons wie auch ein veränderter Redox-Status des Plastochinon-Pools (PQ) (Alfonso *et al.*, 2000). Um auszuschließen, dass die veränderte Expression die Folge einer solchen Limitation ist, wurde die Expression von Genen analysiert, die als Indikatoren

für bestimmte Stressarten bekannt sind. Dazu zählen *glnA* (*slr1756*, Glutamat-Ammonium-Ligase) und *ndhF3* (*sll1732*, NADH-Dehydrogenase Untereinheit 5). Die *glnA*-mRNA akkumuliert normalerweise unter Stickstoffmangel (Reyes und Florencio, 1995; Reyes *et al.*, 1997), während die Transkription von *ndhF3* durch CO₂-Mangel induziert wird (Ohkawa *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004a). Das Genprodukt ist Teil des induzierbaren, hochaffinen CO₂-Aufnahmesystems (*ccm*, CO₂ concentrating mechanism) (Battchikova und Aro, 2007). Die Regulation und Aktivität der beiden *ccm*-Systeme ist neben der Verfügbarkeit von CO₂ auch von der Belichtungsintensität und der photosynthetischen Kapazität der Zelle abhängig (McGinn *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2008). Die Kombination aus bestimmten Lichtintensitäten und CO₂-Partialdruck führt zu einer variablen Grenze, die einen Mangel an CO₂ definiert und damit die differentielle Expression der verschiedenen *ccm*-Systeme induziert (Battchikova *et al.*, 2011). So kann man eine Akkumulation der *ndhF3* und *glnA* Transkripte in WT und *ycf34*-Zellen unter ML-Bedingungen feststellen (Abbildung 14B). Die verwendeten Lichtintensitäten und damit möglichen Wachstumsraten führen zu einer Limitierung von CO₂ und N in Zellen von WT und Mutante. Die Expression dieser beiden Indikatoren ist aber in der *ycf34*-Mutante im Vergleich zum WT unverändert ist. Wuchsen die WT und *ycf34*-Zellen unter eLL-Konditionen, ließen sich durch die *Northern Blot*-Analyse ebenfalls keine oder nur äußerst geringe Menge der *glnA* bzw. *ndhF3*-Transkripte nachweisen (Abbildung 14B).

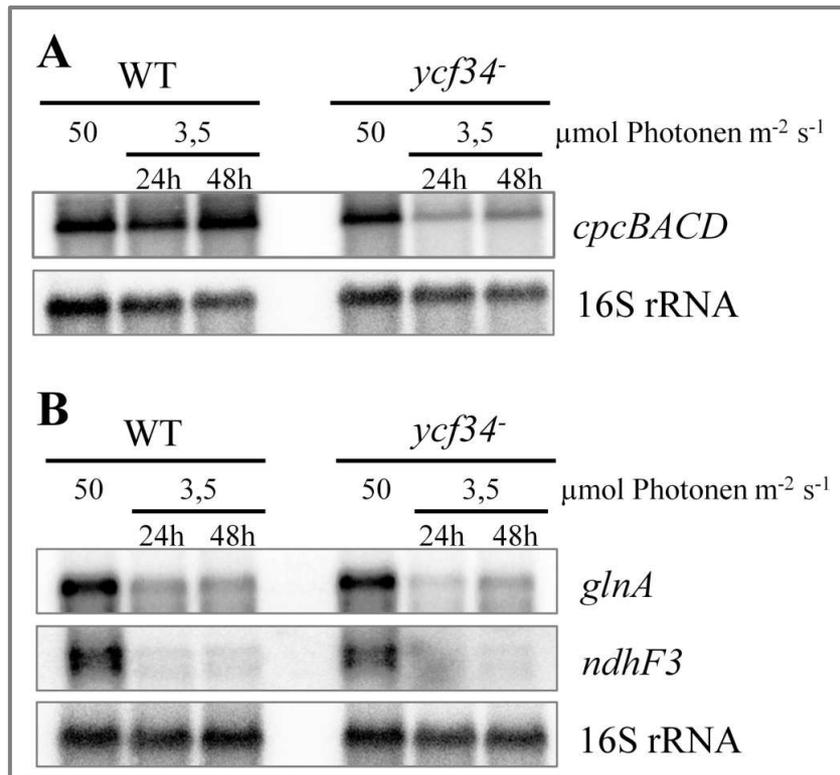


Abbildung 14: Akkumulation von Transkripten in WT und *ycf34*-Zellen unter verschiedenen Lichtintensitäten

WT und *ycf34*-Zellen wuchsen mit einer Beleuchtungsintensität von 50 μmol Photonen m⁻² s⁻¹ und wurden dann für 24 bzw. 48 h unter extrem schwachen Beleuchtungsintensitäten 3,5 μmol Photonen m⁻² s⁻¹ inkubiert. Die Gesamt-RNA beider Stämme wurde vor und nach dem Wechsel der jeweiligen Wachstumsbedingungen wie in Abschnitt 4.2.3.1 beschrieben isoliert. Je 3 μg dieser Gesamt-RNA wurden in 1,3%igen denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert. Diese wurden mit Sonden gegen (A) das *cpcBACD*-Operon und gegen (B) *glnA* und *ndhF3* hybridisiert. Die Transkripte der Gene für die 16S rRNA dienten als interne Ladungskontrolle.

Der verminderte Phycobilisomen-Gehalt in *ycf34*-Zellen unter extrem schwachen Lichtintensitäten, aufgrund der reduzierten Expression des *cpcBACD*-Operons, ist keine Konsequenz eines Mangels an Stickstoff oder CO₂. Nicht ausgeschlossen werden kann eine generelle Limitation der für den N- und C-Metabolismus notwendigen Transportprozesse oder der hierfür benötigten Energie. Als weitere Ursache für die veränderte Transkription der *cpcBAC2CID*-Gene wäre ein stärker reduzierter PQ-Pool in Betracht zu ziehen.

2.1.4.8 Die Inaktivierung von *ycf34* verändert die photosynthetische Aktivität der Zellen

Ein Teil der von Chlorophyllmolekülen absorbierten Lichtenergie wird nicht durch photochemische Prozesse umgesetzt (*photochemical quenching*), sondern als Wärme abgegeben (*non-photochemical quenching*, NPQ) oder als Fluoreszenz emittiert. Generell stehen die drei Prozesse in Konkurrenz zu einander. Je höher die Chlorophyllfluoreszenz desto geringer ist der Anteil an Energie, der durch photochemische Prozesse umgesetzt oder als Hitze abgegeben wird. Über die Messung der Chlorophyllfluoreszenz lassen sich so Aussagen über die Effizienz des photosynthetischen Elektronentransports treffen (Campbell *et al.*, 1998; Maxwell und Johnson, 2000). Alle nachfolgenden Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Gábor Bernát (Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen, Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt, der auch für die biophysikalischen Berechnungen verantwortlich zeichnet.

Einen möglichen Hinweis auf Störungen des photosynthetischen Elektronentransports oder des Transports von CO₂ bzw. dessen Fixierung in *Synechocystis*-Zellen liefert die Messung der Sauerstofffreisetzungsrates unter sättigenden Lichtbedingungen. Zusätzlich liefert die Verwendung von künstlichen Elektronenakzeptoren erste Anhaltspunkte zur Lokalisation eventueller Veränderungen in der photosynthetischen Elektronentransportkette. Entsprechende Messungen ohne den Einsatz eines artifiziellen Akzeptors ergeben dabei vergleichbare Raten für WT und *ycf34*-Zellen, die an ML-Bedingungen adaptiert waren (Tabelle 5). Die Quantifizierung der Sauerstofffreisetzungsrates offenbarte deutliche Unterschiede zwischen WT und *ycf34*-Zellen, wenn diese unter eLL-Bedingungen wuchsen. So weisen Zellen der *ycf34*-Mutante eine auf 74% des WT-Niveaus verringerte Rate auf (siehe Tabelle 5).

Die Freisetzungsrates wurden erneut in Anwesenheit von 500 µM Phenyl-*p*-Benzoquinon (*phenyl-p-benzoquinone*, PpBQ) für WT und Mutante bestimmt, um den Ort der Störung genauer zu bestimmen. Analog zu den vorherigen Messungen, lassen sich wieder vergleichbare Raten für Kulturen aus ML-Bedingungen determinieren (Tabelle 5). Die Rate der Sauerstofffreisetzung und damit die Aktivität des PS II von an eLL-Bedingungen adaptierten *ycf34*-Zellen ist interessanterweise sogar leicht erhöht gegenüber dem WT (Tabelle 5). Diese Beobachtung ist ein Indiz dafür, dass die durch die Inaktivierung von *ycf34*

Ergebnisse

verursachte Einschränkung des photosynthetischen Elektronentransports vermutlich zwischen dem PQ-Pool und dem PS I zu finden ist.

Tabelle 5: Sauerstofffreisetzungsraten von WT und *ycf34*-Zellen

| | extreme schwache Lichtintensität ^a | | mittlere Lichtintensitäten ^b | |
|---|---|--------------|---|--------------|
| | WT | <i>ycf34</i> | WT | <i>ycf34</i> |
| Sauerstofffreisetzung, H ₂ O → CO ₂ [μmol O ₂ (mg Chl) ⁻¹ h ⁻¹] | 267 ± 8 | 198 ± 11 | 405 ± 55 | 396 ± 23 |
| Sauerstofffreisetzung, H ₂ O → PpBQ [μmol O ₂ (mg Chl) ⁻¹ h ⁻¹] | 321 ± 30 | 370 ± 10 | 481 ± 14 | 476 ± 74 |

^a 3,5 μmol Photonen m⁻² s⁻¹

^b 50 μmol Photonen m⁻² s⁻¹

Eine genauere Bestimmung erfolgte durch die Analysen der Chlorophyllfluoreszenz in einem Dual-PAM-Chlorophyll-Fluorometer (Walz, Effeltrich). Die Kinetik der P₇₀₀ Oxidation und Re-Reduktion wurde im Anschluss an einen sättigenden Lichtblitz von 30 ms Dauer aufgezeichnet (siehe Abschnitt 4.2.1.8), der eine vollständige Oxidation aller P₇₀₀-Zentren bewirkt. Die Abnahme der Intensität der Chlorophyllfluoreszenz mit der Zeit (Abbildung 15A) ist dabei für WT und *ycf34*-Zellen gleich, sofern diese unter ML-Bedingungen wuchsen. Diese Werte stehen in Einklang mit den bereits gewonnenen Daten für die Sauerstofffreisetzungsraten (siehe oben). Die *ycf34*-Mutante zeigt jedoch eine verlangsamte Abnahme der Fluoreszenz, wenn die Zellen unter geringen Lichtintensitäten kultiviert wurden. Wie in Abbildung 15B sichtbar ist der Abfall der Kurve geringer. Die aus dem Graphen ermittelte Zeitkonstante beträgt für *ycf34* in diesem Fall 11 ms, das entspricht 138% der Konstante des WT (8 ms). Dies deutet auf eine mögliche Beeinträchtigung des Elektronenflusses an der Donorseite des PS I hin. In Übereinstimmung mit den Kinetiken der P₇₀₀ Oxidation und Reduktion findet man ein ähnliches Muster in den PS I-Lichtkennlinien von WT und Mutante wieder (Abbildung 15C+D). Dabei wurden bei steigender Intensität des Messlichts mithilfe der Dual-PAM-Software diverse P₇₀₀ Zustände wie *steady state* (P), Maximum (Pm, Pm') und Null (Po) aufgezeichnet und bestimmt (siehe Abschnitt 4.2.1.8). Aus diesen Kenngrößen lassen sich weitere Parameter definieren, die Aufschluss über den Zustand des Photosyntheseapparats geben:

- (i) die Quantenausbeute der photochemischen Energiekonversion im PS I [Y(I)]
- (ii) die Quantenausbeute der nicht-photochemischen Dissipation von Energie aufgrund einer Limitation an der Donorseite des PS I [Y(ND)]
- (iii) und Akzeptorseite des PS I [Y(NA)]

Zudem gelten: $Y(I) = \frac{b}{(a+b+c)}$ und $Y(ND) = \frac{a}{(a+b+c)}$;

wobei **a**, **b** und **c** folgende Fraktionen repräsentieren: durch Limitation der Donorseite geschlossene PS I Zentren ($P_{700}^+ A$), offene PS I Zentren ($P_{700} A$) und durch Limitation der Akzeptorseite geschlossene PS I Zentren ($P_{700} A^-$) (Klughammer und Schreiber, 2008).

Die graphische Darstellung der so gewonnenen photosynthetischen Parameter erfolgt gegen die Intensität des Messlichts. Wurden WT und *ycf34*-Zellen unter ML-Bedingungen kultiviert, so finden sich in den Kennlinien der verschiedenen Größen nur geringfügige Unterschiede, wie in Abbildung 15C dargestellt. Der Kurvenverlauf für die Quantenausbeute bzw. Effizienz der photochemischen Prozesse im PS I [Y(I)] fällt in beiden Zelltypen ab einem Wert von etwa $30 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kontinuierlich ab und erreicht sein Minimum bei $500 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Dagegen weisen entsprechende Kurven von an eLL-Bedingungen adaptierten WT und *ycf34*-Zellen deutliche Unterschiede für die *ycf34*-Mutante auf (Abbildung 15D). Die [Y(I)]-Kurve fällt im Vergleich zum WT steiler ab und erreicht ihr Minimum bereits bei $125 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Dies ist übereinstimmend mit den vorherigen Messungen der P_{700} -Kinetik, die auf eine Beeinträchtigung des Elektronenflusses an der Donorseite des PS I hindeuten. Der [Y(ND)]-Wert, also die nicht-photochemische Ableitung von Energie, steigt gleichzeitig an. Zudem wurde keine Limitierung an der Akzeptorseite gefunden (Daten nicht gezeigt), wobei anzumerken ist, dass folgende Formel gilt:

$$Y(I) + Y(NA) + Y(ND) = 1$$

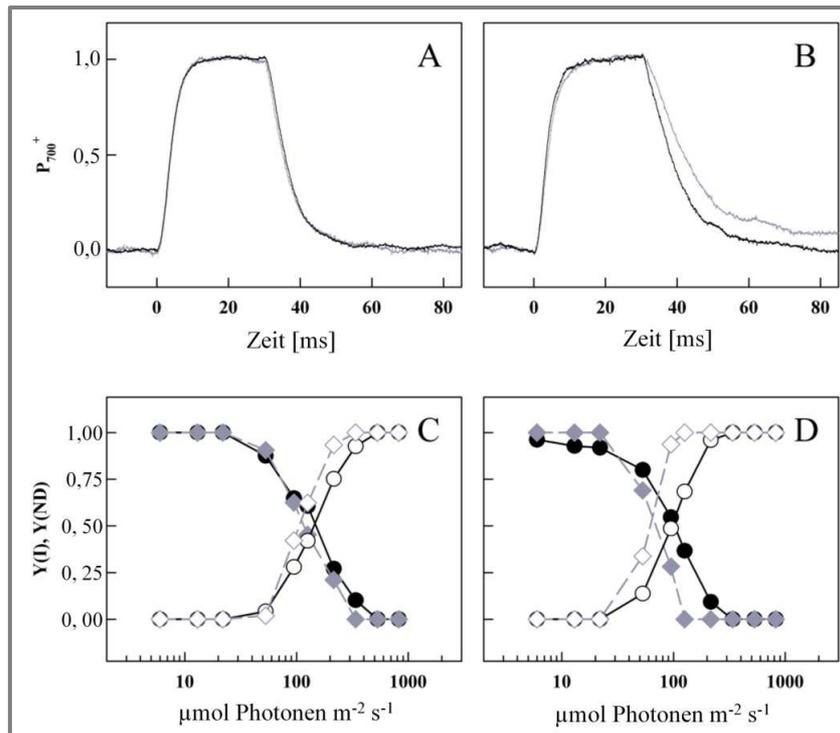


Abbildung 15: Kinetik der P₇₀₀ Oxidation-Reduktion und PS I-Lichtkennlinien

Die Messungen erfolgten mit Zellen von WT (schwarz) und *ycf34*-Mutante (grau), die an mittlere (A+C) und extrem schwache Beleuchtungsintensitäten (B+D) adaptiert waren. Alle Messungen wurden dreimal wiederholt.

(A+B) Kinetik der P₇₀₀ Oxidation und Reduktion nach einem sättigenden Lichtblitz von 30 ms.

(C+D) Quantenausbeute der photochemischen Energiekonversion im PS I [Y(I), geschlossene Symbole] und Quantenausbeute der nicht-photochemischen Dissipation von Energie aufgrund von Limitation an der Donorseite des PSI [Y(ND), offene Symbole] wurden bei definiten Lichtintensitäten aus den P₇₀₀-Zustände *steady state* (P), Maximum (P_m, P_m') und Null (P_o) berechnet. Zwischen der stufenweisen Erhöhung (logarithmische Zunahme) des aktinischen Lichtintensität von 0 bis 850 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ lagen jeweils 30 s Zeit für die Adaption der Zellen.

Die hier vorliegenden Resultate der Messung von photosynthetischen Parametern lassen den Schluss zu, dass der Elektronentransport in *ycf34*-Zellen zwischen dem PQ-Pool und dem PS I beeinträchtigt ist, wenn diese unter Lichtintensitäten von 3,5 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ wuchsen. Zwischen dem PQ-Pool und dem PS I befindet sich der Cytochrom-*b₆f*-Komplex, der zentrale Dreh- und Angelpunkt des photosynthetischen Elektronentransports. Die Inaktivierung von *Synechocystis ycf34* könnte sowohl zu einer veränderten Stabilität bzw. Assemblierung des Komplexes selber führen oder als auch zu einer Beeinträchtigung des Elektronentransports durch denselben, wie im Abschnitt davor gezeigt wurde. Um ersteres zu überprüfen wurde die Cytochrom *f* Untereinheit immunologisch quantifiziert, um so eine Aussage über die Abundanz des Komplexes zu treffen.

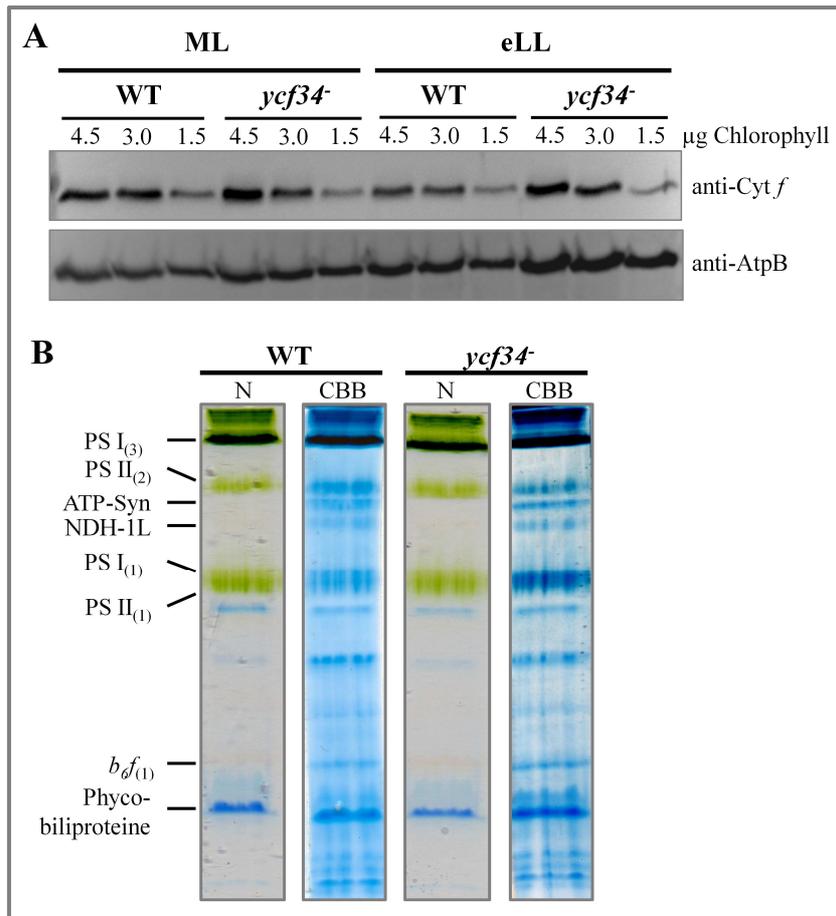


Abbildung 16: Analyse der Akkumulation und Assemblierung des Cytochrom-*b₆f*-Komplexes

(A) Die Membranfraktionen von WT und *ycf34*-Zellen, die an mittlere (ML) oder extreme schwache (eLL) Lichtintensitäten adaptiert waren, wurden elektrophoretisch in einem 16%igen SDS-Polyacrylamidgel (Schägger und von Jagow, 1987) elektrophoretisch getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die immunologische Detektion der Cytochrom *f* Untereinheit des Cytochrom-*b₆f*-Komplexes erfolgte unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen *Synechocystis* Cytochrom *f* und über einen Chemilumineszenz-Assay der konjugierten Meerrettich-Peroxidase des sekundären Antikörpers anti-Kaninchen-HRP-Konjugat. Ein Antikörper gerichtet gegen die β -Untereinheit der *Synechocystis* F₀F₁-ATP-Synthase (AtpB) wurde als interne Kontrolle verwendet.

(B) Die solubilisierten Membranproteinkomplexe von WT und *ycf34*-Zellen, die bei 3,5 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wuchsen, wurden wie in einem 4,5-14% Gradienten-Polyacrylamidgel elektrophoretisch unter nativen Bedingungen, wie in Abschnitt 4.2.4.9 beschrieben, getrennt. Das Gel wurde vor (N) und nach dem Färben mit Coomassie (CBB) dokumentiert. Die Zuordnung der Membranproteinkomplexe erfolgt nach Herranen *et al.* (2004): PS I₍₃₎ und PS I₍₁₎, Trimer und Monomer des PS I Komplexes; PS II₍₂₎ und PS I₍₁₎, Dimer und Monomer des PS II Komplexes; *b₆f*₍₁₎ Monomer des Cytochrom-*b₆f*-Komplexes; ATP-Syn, ATP-Synthase Komplex; NDH-1L, NADH-Dehydrogenase-Komplex 1L.

Dabei zeigte sich, dass die Mutante unter mittleren und geringen Intensitäten vergleichbare Mengen an Cytochrom *f* wie der WT akkumuliert (Abbildung 16A). Eine Analyse der Membranproteinkomplexe unter Verwendung der nativen Elektrophoresetechnik CN-PAGE

(siehe 4.2.4.9) demonstrierte, dass gleiche Mengen des Komplexes vollständig assembliert in den Thylakoidmembranen von WT und *ycf34*-Zellen vorliegen, wenn diese unter geringen Lichtintensitäten wuchsen (Abbildung 16B). Dies lässt den Schluss zu, dass das Ycf34-Protein nicht für die Assemblierung und Stabilität des Cytochrom-*b₆f*-Komplexes benötigt wird.

2.1.4.9 Ycf34 ist ein Membranprotein und migriert zusammen mit photosynthetischen Membranproteinkomplexen im Saccharose-Gradienten

Genauere Kenntnisse über die Lokalisation eines unbekanntes Genprodukts erlauben Rückschlüsse auf die mögliche Funktion des Proteins. Um die Lokalisation des Ycf34-Proteins genauer zu analysieren, wurde der Gesamtextrakt (siehe Abschnitt 4.2.4.1) von *ycf34/FLAG-ycf34*-Zellen durch Zentrifugation (4°C, 21100 × g, 1 h) in eine lösliche und unlösliche Proteinfraction unterteilt. Die darin enthaltenen zytosolischen Proteine und die Membranproteine wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit spezifischen Antikörpern gegen das FLAG-Epitop untersucht. Die immunologische Detektion des FLAG-Ycf34 Proteins zeigt hierbei ein sehr starkes Signal in der Membranproteinfraction (siehe Abbildung 17A), neben einem schwachen Signal in der löslichen Fraction. In Proteinfractionen von *Synechocystis* WT und *ycf34*-Zellen, die wie oben beschrieben behandelt wurden, ließ sich kein Signal detektieren. Ferner wurde die Membranproteinfraction von *ycf34/FLAG-ycf34*-Zellen zusätzlichen Waschschrirten und einer Behandlung mit 2 M Natriumchlorid unterzogen, um locker assoziierte lösliche und extrinsische Membranproteine zu entfernen (Boudreau *et al.*, 1997). Diese Schritre verminderten die Signalintensität in den jeweiligen Membranfractionen nicht (Abbildung 17B). Das *Synechocystis* Ycf34-Protein ist fest an die Membran gebunden; auch wenn der zugrunde liegende Mechanismus nicht klar ist. Die α -Helix im N-Terminus basiert auf einer theoretischen Vorhersage.

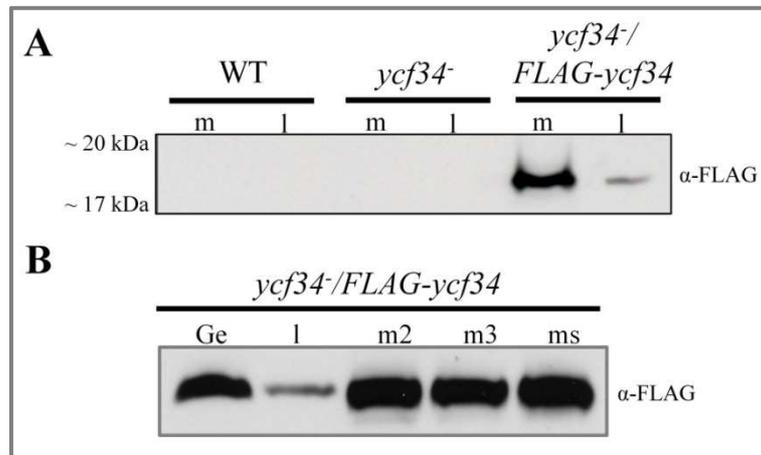


Abbildung 17: Lokalisation des *ycf34*-Genprodukts

(A) Lokalisation des Ycf34-Proteins. Immunologische Detektion von FLAG-Ycf34 in den Gesamtextrakten von WT, *ycf34*⁻ und *ycf34*⁻/*FLAG-ycf34*. Je 40 µg Protein wurden in die lösliche und unlösliche Fraktion unterteilt und in einen 16%igen SDS-Polyacrylamidgel mit 6M Harnstoff (Schägger und von Jagow, 1987) getrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und der Inkubation der Membran mit anti-FLAG-HRP-Konjugat erfolgt die Detektion des FLAG-Ycf34 Fusionsproteins über die Chemilumineszenz der von der Meerrettich-Peroxidase katalysierten Reaktion.

(B) Subzelluläre Lokalisation des Ycf34-Proteins in dem Gesamtextrakt von *ycf34*⁻/*FLAG-ycf34*-Zellen. Je 20 µg bzw. 40 µg Protein des Gesamtextrakts (Ge) wurden verwendet, um die lösliche und die unlösliche Fraktion herzustellen, welche dann mit den folgenden Waschschritten behandelt wurde. Die Membranen wurden zweimal (m2) oder dreimal (m3) in Extraktionspuffer⁺ gewaschen, gefolgt von einem zusätzlichen Waschschritt mit 2 M NaCl in Extraktionspuffer⁺ (ms). Die verschiedenen Membranfraktionen, die lösliche Proteine (l) und der Gesamtextrakt wurden in einem 16%igen SDS-Polyacrylamidgel mit 6M Harnstoff (Schägger und von Jagow, 1987) elektrophoretisch getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend das FLAG-Ycf34 Fusionsproteins wie zuvor beschrieben detektiert.

Detailliertere Aussagen bezüglich der genauen Lokalisation des Ycf34-Proteins können behilflich sein, die bisherigen Ergebnisse in ein ganzheitliches Bild zu bringen. Zudem stellt sich die Frage, ob eine mögliche Assoziation mit den Membranproteinkomplexen von *Synechocystis* besteht. Dazu wurden die solubilisierten Membranproteinkomplexe des *ycf34*⁻/*FLAG-ycf34*-Stammes durch Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation getrennt. Die so gewonnenen Fraktionen wurden immunologisch auf die Anwesenheit des FLAG-Ycf34 Proteins untersucht. Die Saccharose-Dichtegradienten (Abbildung 18A) enthalten drei pigmentierte Banden, denen folgenden Membranproteinkomplexe zugeordnet werden können (Dühring *et al.*, 2006): Die obere, orange Bande (Abbildung 18A, Bande I) enthält überwiegend die roten und orangenen Carotinoidproteine. Die grün-bläuliche Bande (Abbildung 18A, Bande II) enthält die monomeren Formen der PS II und I, sowie den

Cytochrom-*b₆f*-Komplex (Rögner *et al.*, 1990). Die trimeren PS I-Komplexe bilden den Hauptbestandteil der dunkelgrünen Bande (Abbildung 18A, Bande III). Unter Verwendung aller Fraktionen eines solchen Gradienten wurde das Fusionsprotein in den Fraktionen 5 bis 7 immunologisch nachgewiesen (Abbildung 18B). Dies sind jene Fraktionen, die die grün-bläuliche Bande II enthalten. Es zeigt sich, dass das FLAG-Ycf34 Protein mit den Monomeren von PS II bzw. PS I und dem Cytochrom-*b₆f*-Komplex zusammen migriert.

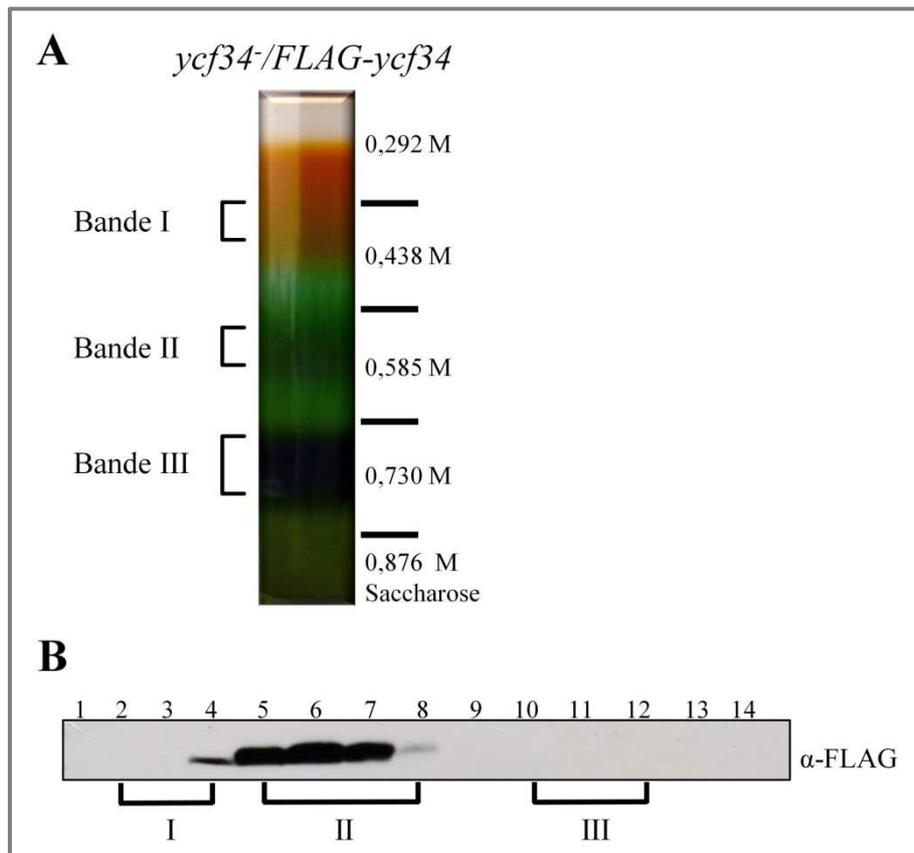


Abbildung 18: Ko-Lokalisation des FLAG-Ycf34 Proteins mit Membranproteinkomplexen

(A) Profil der solubilisierten Thylakoidmembranen des *ycf34/FLAG-ycf34*-Stammes nach der Ultrazentrifugation in einem Saccharose-Dichtegradienten. Ein solcher Gradient enthält drei farbige Banden, denen folgende Membranproteinkomplexe zugeordnet wurden: Die orange Bande I enthält Carotinoide, die hellgrüne Bande II die monomeren Formen von PS I und PS II, die dunkelgrüne Bande III setzt sich zum größten Teil aus dem trimeren PS I zusammen. Solubilierte Thylakoidmembranen, die einer Proteinmenge von 12 mg entsprechen, wurden für den Gradienten verwendet.

(B) Die Fraktionen eines solchen Gradienten wurden in einen 16%igen SDS-Polyacrylamidgel mit 6M Harnstoff (Schägger und von Jagow, 1987) elektrophoretisch getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und das FLAG-Ycf34 Protein immunologisch mit dem Primärantikörper anti-FLAG-HRP-Konjugat detektiert. Fraktion 1 entspricht der obersten Schicht des Gradienten in (A).

Wie bereits in Abschnitt 2.1.4.6 erwähnt, ließ sich das FLAG-Ycf34-Protein in keiner Fraktion nachweisen, die Phycobilisomen enthielten. Das Ycf34-Protein von *Synechocystis* ist ein fest an die Membran gebundenes Protein, welches zusammen mit den Proteinkomplexen des photosynthetischen Elektronentransports lokalisiert. Es konnte jedoch bis jetzt noch keine direkte Interaktion mit einem spezifischen Protein oder Proteinkomplex nachgewiesen werden.

2.1.5 Biochemische Charakterisierung von *Synechocystis* Ycf34

2.1.5.1 Heterologe Expression und Reinigung von *Synechocystis* Ycf34

Neben der phänotypischen Charakterisierung eines Genprodukts in seinem Ursprungsorganismus, können biochemische Eigenschaften sehr gut mit rekombinant exprimierten Proteinen untersucht werden. Zu diesem Zwecke wurde *Synechocystis* Ycf34 heterolog unter Verwendung des zum *GST Gene Fusion System* (GE Healthcare) gehörenden Expressionsvektors pGEX-6P-1 in *E. coli* produziert. Das resultierende Fusionsprotein besitzt einen Glutathion-S-Transferase (GST)-tag am N-Terminus (siehe Abschnitt 4.2.2.16) und wird im Folgenden als GST-Ycf34 bezeichnet. Der besondere Vorteil des verwendeten Systems liegt in der Möglichkeit, den potentiell störenden Affinitäts-tag durch spezifischen proteolytischen Verdau mit der PreScission-Protease zu entfernen. Dabei verbleibt ein Rest von nur fünf Aminosäuren (Gly-Pro-Leu-Gly-Ser) am N-Terminus. In ersten Vorversuche erwies sich eine dreistündige, induzierte Expression bei 37° im Stamm *E. coli* BL21 (DE3) pGEX-ycf34 als ungeeignet (Abbildung 19), da das Protein überwiegend unlöslich war.

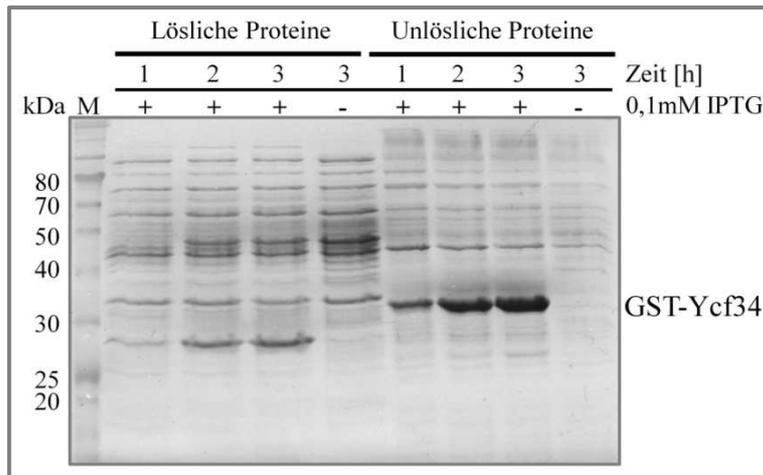


Abbildung 19: Vorversuch zur heterologen Expression von GST-Ycf34 in *E. coli*

Zellen des *E. coli* Stammes BL21 (DE3) *pGEX-ycf34* wurden bei 37°C in LB-Medium bis zu einer $OD_{600nm} = 0,5$ kultiviert und anschließend die Expression der Fusionsproteins GST-Ycf34 durch Zugabe von 0,1 mM Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert. Je 2 ml Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und ein Gesamtextrakt aus ihnen hergestellt. Je 10 μ g Protein wurden in die lösliche und unlösliche Fraktion unterteilt und in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli *et al.* (1970) elektrophoretisch getrennt. Die Polypeptide wurden mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau R250 visualisiert.

Die im Folgenden beschriebene Optimierung der Expression und die erfolgreiche Reinigung des *Synechocystis* Ycf34 Proteins aus dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) *pGEX-ycf34* wurde durch Dr. Yoshinori Hagiwara (AG Physiologie der Mikroorganismen an der Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt.

2.1.5.2 *Synechocystis* Ycf34 besitzt ein Eisen-Schwefel-Zentrum

Eine ausreichende Ausbeute und die Verbesserung der Löslichkeit wurden durch Veränderungen der Expressionsbedingungen und des verwendeten Mediums erreicht (siehe Abschnitt 4.2.4.5). Das so gewonnene Protein ist exemplarisch in Abbildung 20A auf einem SDS-PAGE analysiert worden. Interessanterweise wies das gereinigte Ycf34-Protein eine bräunliche Färbung auf; ein Hinweis auf einen an das Protein gebundenen Ko-Faktor. Das Absorptionsspektrum des gereinigten Proteins im ultravioletten und sichtbaren Bereich des Licht weist eine Schulter bei 320 nm und ein Absorptionsmaximum bei 420 nm auf (Abbildung 20B). Das Maximum bei 420 nm ließ sich durch Zugabe des Reduktionsmittels Na-Dithionit signifikant reduzieren, wobei die Schulter bei 320 nm an Intensität zunahm (Abbildung 20B). Basierend auf den spektralen Eigenschaften des gereinigten Proteins liegt der Schluss nahe, dass das in *E. coli* rekombinant hergestellt *Synechocystis* Ycf34 Protein ein Eisen-Schwefel-Protein sein könnte (Flint *et al.*, 1993; Gibney *et al.*, 1996; Pietsch *et al.*, 2011).

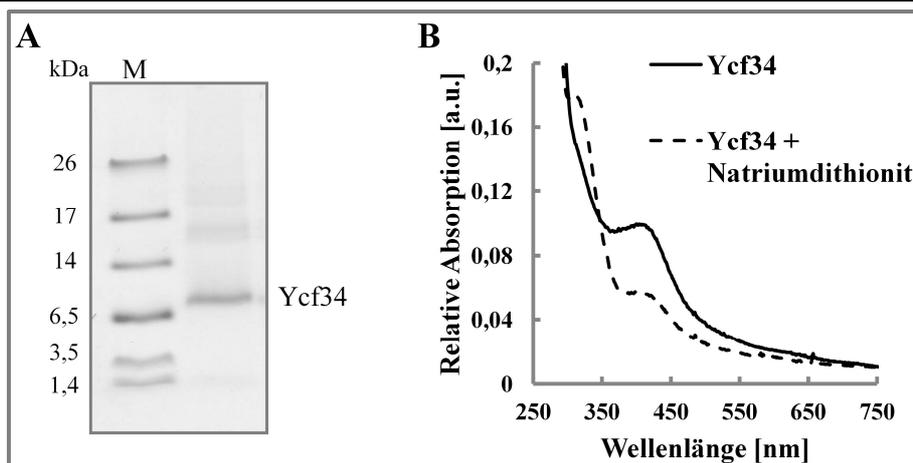


Abbildung 20: Aufreinigung von *Synechocystis* GST-Ycf34

(A) Das über einen GST-tag gereinigte Genprodukt von *Synechocystis ycf34* wurde in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel nach Schagger & von Jagow (1987) getrennt und mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau R250 visualisiert.

(B) UV/Vis Absorptionsspektren des nativen (ganze Linie) und reduzierten (gestrichelte Linie) *Synechocystis* Ycf34-Proteins. Ycf34 lag in einer Konzentration von 3 μM in Lyse-Puffer vor. Die Reduktion des Proteins erfolgt durch einen Überschuss an Natriumdithionit.

Die Bestimmung der Menge an Eisen, welches fest an das Protein gebunden ist und der Menge an Schwefel, welches nur schwach am Protein gebunden ist, konnte die Beobachtungen bestätigen. Diese Untersuchungen wurden von Dr. Yoshinori Hagiwara durchgeführt. Die quantitative Analyse wurde durch Beinert sowie Fish (1983; 1988) beschrieben und definiert dabei eine Stöchiometrie von $1,06 \pm 0,15$ Eisenatomen und $0,81 \pm 0,02$ Sulfidionen pro Ycf34-Monomer. Es ergibt sich dabei ein Eisen zu Schwefel-Verhältnis von etwa 1,29. Diese Stöchiometrie ist kleiner als das notwendige Verhältnis von Eisen zu Schwefel, welches für die Assemblierung von klassischen Fe-S Cluster wie [2Fe-2S] oder [4Fe-4S] benötigt wird. Das Ycf34-Protein formt möglicherweise ein Homo-Oligomer, das dann den Fe-S Cluster koordiniert, oder der Fe-S Cluster im rekombinanten Protein ist nur teilweise intakt. Die mit dem gereinigten Ycf34-Protein von Dr. Edward J. Reijerse (MPI für Bioanorganische Chemie, Mülheim an der Ruhr) durchgeführten spektroskopischen Untersuchungen zur Elektronenspinresonanz (EPR) lieferten keine eindeutigen Resultate. Daher wurden durch Dr. Edward J. Reijerse zusätzliche Mößbauer-Spektroskopien mit dem anaerob gereinigten, rekombinanten Ycf34-Protein durchgeführt (Abbildung 21A).

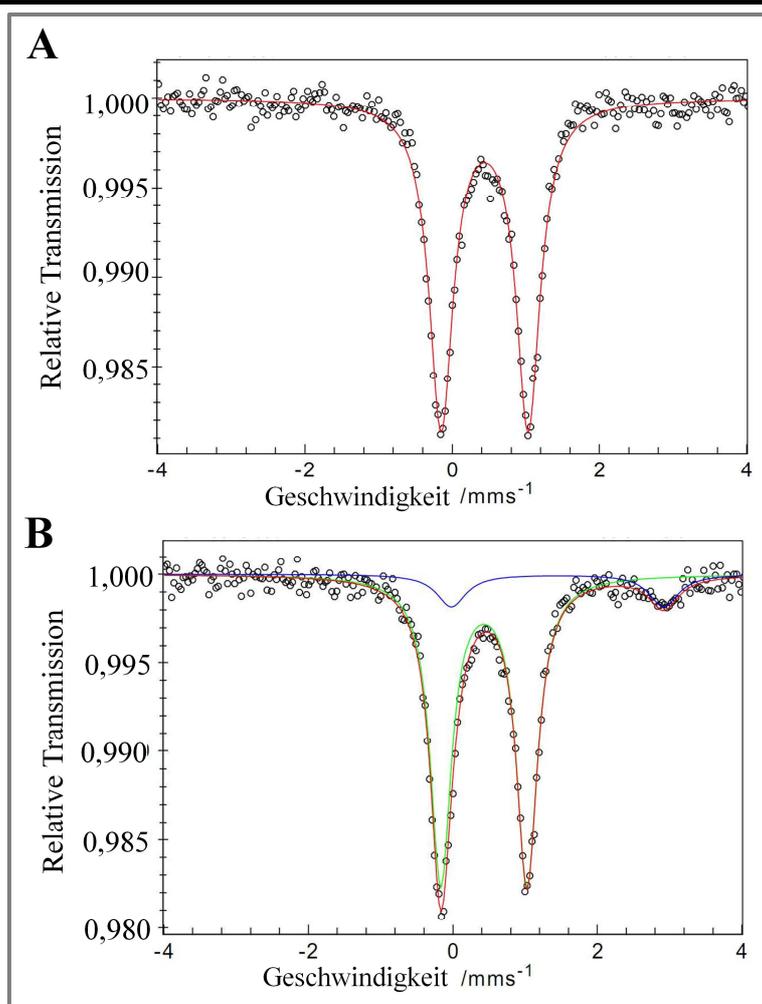


Abbildung 21: Mößbauer-Spektroskopie des rekombinanten, gereinigten *Synechocystis* Ycf34

(A) Mößbauer-Spektrum des anaerob gereinigten Ycf34-Proteins bei 77K. Isomerverschiebung = 0,44 mm s^{-1} und Quadrupol-Spaltung $\Delta Q = 1,18 \text{ mm s}^{-1}$.

(B) Mößbauer-Spektrum des anaerob gereinigten Ycf34-Proteins (250 nM) bei 77K, welches zuvor mit Titan(III)citrat (250 nM) reduziert wurde. Spezies 1 (gelbe Linie, 88%) entspricht dem oxidierten [4Fe-4S]-Cluster von Ycf34 mit einer Isomerverschiebung = 0,44 mm s^{-1} und einer $\Delta Q = 1,18 \text{ mm s}^{-1}$. Spezies 2 (blauer Linie, 12%) entspricht Fe(II), welches durch Wasser koordiniert ist und auf eine Beschädigung des Proteins durch die Prozedur hinweist. Spezies 2 weist eine Isomerverschiebung = 0,44 mm s^{-1} und eine $\Delta Q = 1,18 \text{ mm s}^{-1}$ auf.

Die beobachtete Verschiebung des Isomers von 0,44 mm s^{-1} und eine Quadrupol-Spaltung (ΔQ) von 1,8 mm s^{-1} sind repräsentativ für Eisenatome mit einer gemischten, delokalisierten Valenz von +2,5. Dies ist charakteristisch für einen [4Fe-4S]-Cluster mit 2Fe(II)2Fe(III)4S (Schünemann und Winkler, 2000). Eine alternative Konfiguration kann aufgrund der bestimmten Stöchiometrie von Eisen und Schwefel (1:1) ausgeschlossen werden. Weitere Mößbauer-Spektren wurden aufgezeichnet und definieren den Cluster als diamagnetisch (Daten nicht gezeigt). Zusätzliche Experimente mit dem starken Reduktionsmittel

Titan(III)citrat verursachten keine Änderungen am Redox-Status des [4Fe-4S]-Clusters (Abbildung 21B). Der Cluster ist unter *in vitro* Bedingungen nicht reduzierbar. Möglicherweise ist der Cluster nicht zugänglich für Lösungsmittel oder er bedarf eines zusätzlichen Partners, um den Cluster zugänglich zu machen und zu reduzieren.

Die bereits beschriebene Konservierung der fünf Cystein-Reste stellt einen weiteren Ansatzpunkt für Untersuchungen hinsichtlich des Eisen-Schwefel-Zentrums dar. Durch eine zielgerichtete Mutagenese der einzelnen Cysteine lassen sich Erkenntnisse gewinnen, welche der fünf Aminosäuren an Position 2, 4, 7, 13 und 61 im *Synechocystis* Ycf34-Protein essentiell zur Ausbildung des Zentrums sind. Dazu wurden synthetische DNA-Fragmente mit veränderter Abfolge der Basen (Life Technologies) bestellt, so dass je eine Cystein-Aminosäure durch ein Serin ersetzt wurde (siehe Abschnitt 4.2.2.17). Die Herstellung der Expressionskonstrukte war Teil dieser Arbeit. Diese Varianten des Ycf34-Protein (C2S, C4S, C7S, C13S und C61S) sollten analog zum Originalprotein in *E. coli* hergestellt, gereinigt und anschließend auf die Präsenz des Eisen-Schwefel-Zentrums untersucht werden. Trotz mehrfacher Wiederholung war es jedoch nur möglich, die C2S-Variante als lösliches Protein in *E. coli* zu produzieren, die die identischen spektralen Eigenschaften der WT-Variante aufwies. Die Expression der anderen Varianten resultierte stets in einem unlöslichen Protein (Dr. Yoshinori Hagiwara, persönliche Mitteilung). Dies legt den Schluss nahe, dass die vier anderen Cysteinreste essentiell für die Stabilität und Ausbildung des Eisen-Schwefel-Zentrums sind und die jeweiligen Aminosäuresubstitutionen zu einem Verlust der strukturellen Integrität des Ycf34-Proteins führen. Das Ycf34-Protein von *Synechocystis* ließ sich rekombinant in *E. coli* herstellen und reinigen. Spektroskopische Untersuchungen des gereinigten Proteins und die quantitative Analyse der gebundenen Eisenatome und assoziierten Sulfidanionen identifizierten ein [4Fe-4S]-Zentrum im Ycf34-Protein.

2.2 Funktionelle Analysen der *ycf59* und *ycf54*-Homologe in *Synechocystis*

Ein Teil der in Peter *et al.* (2009; 2011) veröffentlichten Ergebnisse entstanden im Rahmen dieser Arbeit. Ähnliche Ergebnisse zur Funktion von *Synechocystis* Genen, die Teil der Chlorophyll-Biosynthese sind, wurden in unabhängigen Untersuchungen von Minamizaki *et al.* (2008) kurz zuvor publiziert. Besonderes Augenmerk galt hierbei den letzten verbliebenen Lücken innerhalb des Stoffwechselweges, die bisher mit keinem Gen oder Genprodukt assoziiert sind. Dazu zählt die oxidative Cyclase I, die die Cyclisierung des fünften, isozyklischen Rings des Substrates Magnesium-Protoporphyrin IX monomethylester katalysiert.

2.2.1 *Synechocystis ycf59* kodiert für die oxidative Cyclase I

Die zwei offenen Leserahmen *sll1214* und *sll1874* kodieren ein Protein mit jeweils 358 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 42,2 bzw. 41,9 kDa. Die beiden auch als *ycf59* bzw. AT103 annotierten offenen Leserahmen wurden erstmalig von Minamizaki *et al.* (2008) als *chlA_I* und *chlA_{II}* bezeichnet. Innerhalb der parallelen Veröffentlichung (Peter *et al.*, 2009) werden die Genbezeichnungen *cycI* für *sll1214* und *cycII* für *sll1874* verwendet. Die Genprodukte von *cycI* und *cycII*, die beiden Proteine CycI und CycII, sind zu 57% identisch in ihrer Aminosäuresequenz. Zwischen dem *Arabidopsis thaliana* Homolog CHL27 und CycI sowie CHL27 und CycII besteht eine 58%ige bzw. 47%ige Ähnlichkeit der Sequenzen, wie eine entsprechende Analyse mit dem BLAST P Algorithmus zeigt (Altschul *et al.*, 1990). Interessanterweise finden sich die *cyc*-Gene im *Synechocystis*-Genom in potentiellen Operonstrukturen wieder, deren Gene ebenfalls eine Funktion in der Tetrapyrrol-Biosynthese besitzen.

Das Gen *cycI* (*sll1214*) liegt vor dem Gen *ycf53* (*sll0558*), welches ein Homolog des pflanzlichen GUN4-Proteins kodiert (Wilde *et al.*, 2004; Sobotka *et al.*, 2008). Die Transkription von *cycI* wird durch Licht reguliert (Peter *et al.*, 2009; Mitschke *et al.*, 2011). Hohe Lichtintensitäten oder Dunkelheit vermindern die Akkumulation des Transkripts. Das Gen *cycII* (*sll1874*) liegt am Beginn eines Operons, welches unter anaeroben Bedingungen in *Synechocystis* induziert und transkribiert wird (Summerfield *et al.*, 2008). Weitere Bestandteile dieses Operons sind die Gene *ho2* (*sll1875*), welches eine der beiden Isoformen der Hämoxygenase kodiert (Yilmaz *et al.*, 2010), und *hemNI* (*sll1876*), die sauerstoff-

unabhängige Coproporphyrinogen III-Oxidase (Goto *et al.*, 2010), ein Enzym aus dem frühen Zweig der Tetrapyrrol-Biosynthese (siehe 1.3).

Beide *cyc*-Gene von *Synechocystis* wurden im Rahmen der funktionellen Charakterisierung durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzgen-Kassette inaktiviert (Abbildung 22A+B). Die Inaktivierung des *cycI*-Gens ist nur partieller Natur, die resultierende *cycI*-Mutante von *Synechocystis* zeigt keine vollständige Segregation der Mutantenallele unter aeroben (Abbildung 22C) und anaeroben Bedingungen; photoautotroph wie mixotroph (Peter *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu konnte Minamizaki *et al.* (2008) eine vollständige Segregation der *cycI*-Mutantenallele unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen demonstrieren. Es ist anzunehmen, dass diese Unterschiede ihren Ursprung in den unterschiedlichen WT-Stämmen haben, die verwendet wurden oder die anaeroben bzw. mikroaeroben Anzuchtbedingungen sich zwischen den Laboren unterscheiden. Die vollständige Inaktivierung von *cycII* ist unter aeroben, photoautotrophen Wachstumsbedingungen dagegen möglich. Die Mutante Δ *cycII*, mit teilweiser Deletion der kodierenden Bereiche von CycII, ist vollständig segregiert (Abbildung 22D). Es muss daher angenommen werden, dass *cycI* ein essentielles Gen für *Synechocystis* ist, während *cycII* unter aeroben Bedingungen entbehrlich ist, was in Einklang mit den Transkriptionsdaten für das *cycII-ho2-hemN1*-Operon und *cycII* steht (Summerfield *et al.*, 2008; Peter *et al.*, 2009).

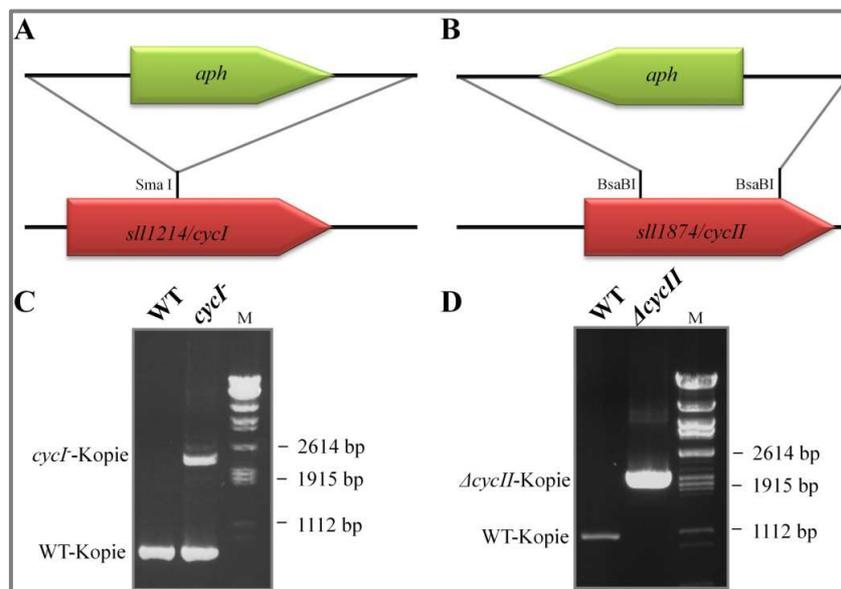


Abbildung 22: Inaktivierung der beiden *cyc*-Gene von *Synechocystis*

(A) Schematische Darstellung der Inaktivierung des *sll1214/cycI*-Gens von *Synechocystis* durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzgen-Kassette in eine *SmaI*-Schnittstelle in der kodierenden Sequenz von *sll1214/cycI*.

(B) Schematische Darstellung der Inaktivierung des *sll1874/cycII*-Gens von *Synechocystis* durch Deletion von Teilen der kodierenden Sequenz und Insertion einer Kanamycin-Resistenzgen-Kassette (*aph*) zwischen die verwendeten BsaBI-Schnittstellen.

(C+D) PCR-Analysen zur Verifikation der Segregationsgrade der jeweiligen Mutation von *cycI* und *cycII*. M kennzeichnet den verwendeten Größenstandard für die Elektrophorese. Adaptiert aus Peter *et al* (2009).

Die Inaktivierung von *cycI* führt unter aeroben Bedingungen zu einer Reduktion des Chlorophyll-Gehalts in *cycI*-Zellen auf etwa 64% im Vergleich zu WT (Tabelle 6). Die Analyse der *steady state* Gehalte an Mg-Porphyrinen und anderen Chlorophyllvorstufen (siehe Abschnitt 4.2.1.5) offenbarte eine dramatische Akkumulation von MgProtoME, dem Substrat der oxidativen Cyclase, in Zellen mit verminderter Abundanz von CycI (Abbildung 23). Die Größenordnung der Anreicherung liegt eine Magnitude über dem WT-Niveau. Interessanterweise zeigen Zellen des Stammes Δ *cycII*-Zellen, die kein CycII-Protein herstellen, unter aeroben Wachstumsbedingungen keine Veränderung des Chlorophyll-Gehalts (Tabelle 6). Zudem ist keine Akkumulation von MgProtoME unter aeroben Wachstumsbedingungen zu detektieren (Abbildung 23). Nur bei einem Wachstum der Δ *cycII*-Zellen unter anaeroben Atmosphäre kam zu einer 38 fachen Akkumulation des Cyclase-Substrates MgProtoME (Abbildung 23) wie entsprechende Analysen ergaben.

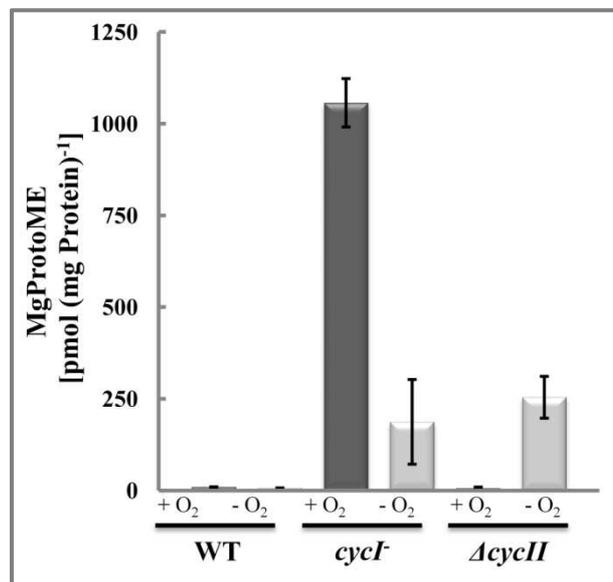


Abbildung 23: Akkumulation von MgProtoME in Cyclase-Mutanten von *Synechocystis*

Zellen der Stämme WT, *cycI* und Δ *cycII* wuchsen bei 30°C und konstanter Beleuchtung von 20 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in BG11-Medium mit 0,2% (w/v) Glukose. Mit Luft (+O₂) oder mit Stickstoff (-O₂) begaste Fermentoren kamen als Wachstumsgefäße zum Einsatz. Die Analyse der photosynthetischen Pigmente und der Akkumulation von Chlorophyllvorstufen erfolgte nach zweitägigem Wachstum der Zellen unter den entsprechenden Bedingungen.

Ergebnisse

Die Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Akkumulation von Mg-Porphyrinen und den Gehalt der wichtigsten Pigmente in *Synechocystis* WT, *cycI* und Δ *cycII*-Zellen unter aeroben Schwachlichtbedingungen.

Tabelle 6: Pigmentzusammensetzung und Akkumulation von Mg-Porphyrinen im WT und in Mutanten der oxidativen Cyclase unter aeroben Bedingungen

| | aerobe, Schwachlichtbedingungen ^a | | |
|--|--|-----------------|-----------------------|
| | WT | <i>cycI</i> | Δ <i>cycII</i> |
| Chlorophyll [μ g (mg Protein) ⁻¹] | 26,6 \pm 2,9 | 16,9 \pm 0,8 | 28,4 \pm 1,6 |
| Phycocyanin [μ g (mg Protein) ⁻¹] | 155 \pm 20 | 138 \pm 24 | 154 \pm 23 |
| ProtoIX [pmol (mg Protein) ⁻¹] | 12,2 \pm 9,8 | 25,3 \pm 3,4 | 10,4 \pm 3,0 |
| MgP [pmol (mg Protein) ⁻¹] | 0,89 \pm 0,05 | 2,17 \pm 1,00 | 1,26 \pm 0,14 |
| MgProtoME [pmol (mg Protein) ⁻¹] | 7,1 \pm 1,8 | 1057 \pm 66 | 1,7 \pm 0,9 |

^a 20 μ mol Photonen m⁻² s⁻¹; BG11; 0,2 (w/v) % Glukose; Luft

Interessanterweise häufen *cycI*-Zellen unter diesen anaeroben Bedingungen weiterhin MgProtoME an. Dies geschieht jedoch auf einem geringeren Niveau als unter aeroben Bedingungen (Abbildung 23). In beiden Publikationen (Minamizaki *et al.*, 2008; Peter *et al.*, 2009) wurde gezeigt, dass die Gene *cycI* und *cycII* in *Synechocystis* für die oxidative MgProtoME-Cyclase kodieren, eines der Schlüsselenzyme der Chlorophyll-Biosynthese.

2.2.2 *cycI* und Δ *cycII* lassen sich durch Expression des jeweils homologen Genprodukts komplementieren

Um weiteren Einblick in die Funktion der zwei *cyc*-Gene zu erhalten und um die Frage zu klären, warum zwei *cyc*-Gene im Genom von *Synechocystis* kodiert sind, sollten funktionelle Komplementierungen der jeweiligen Gene analysiert werden. Dies geschah im Rahmen dieser Arbeit und Resultate dieser Versuche sind ebenfalls in Peter *et al.* (2009) beschrieben. Die inaktivierten Gene sollen dabei durch die ektopische Expression der jeweiligen Genprodukte als FLAG-Fusionsprotein komplementiert werden. Dies geschah analog zu dem in Abschnitt 2.1.4.3 gezeigten FLAG-Ycf34-Protein. Die Induktion der Proteinexpression von FLAG-CycI bzw. FLAG-CycII erfolgt durch Kupfermangel im Medium (Tous *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004a; Peter *et al.*, 2009). Um ein ausreichendes Expressionsniveau der Proteine zu gewährleisten, wurden die Zellen zunächst für 5 bis 7 Tage in kupferfreiem Medium aerob unter Schwachlichtbedingungen kultiviert, bevor die eigentlichen Versuche in aerober oder anaerober Atmosphäre begannen. Sowohl unter aeroben wie auch unter anaeroben

Konditionen war es möglich, die Fusionsproteine FLAG-CycI und FLAG-CycII in Zellen der *Synechocystis*-Stämme *cycI/FLAG-cycI*, *cycI/FLAG-cycII* und $\Delta cycII/FLAG-cycII$ herzustellen, wie die immunologische Detektion der FLAG-Fusionsproteine in Abbildung 24A+B zeigt. Nach Induktion der Expression zeigen Zellen der Stämme *cycI/FLAG-cycI* und $\Delta cycII/FLAG-cycII$ eine drastische Reduktion der MgProtoME-Akkumulation unter aeroben wie anaeroben Wachstumsbedingungen im Vergleich zu den jeweiligen *cycI* bzw. $\Delta cycII$ -Mutanten (Abbildung 24C+D, Tabelle 7).

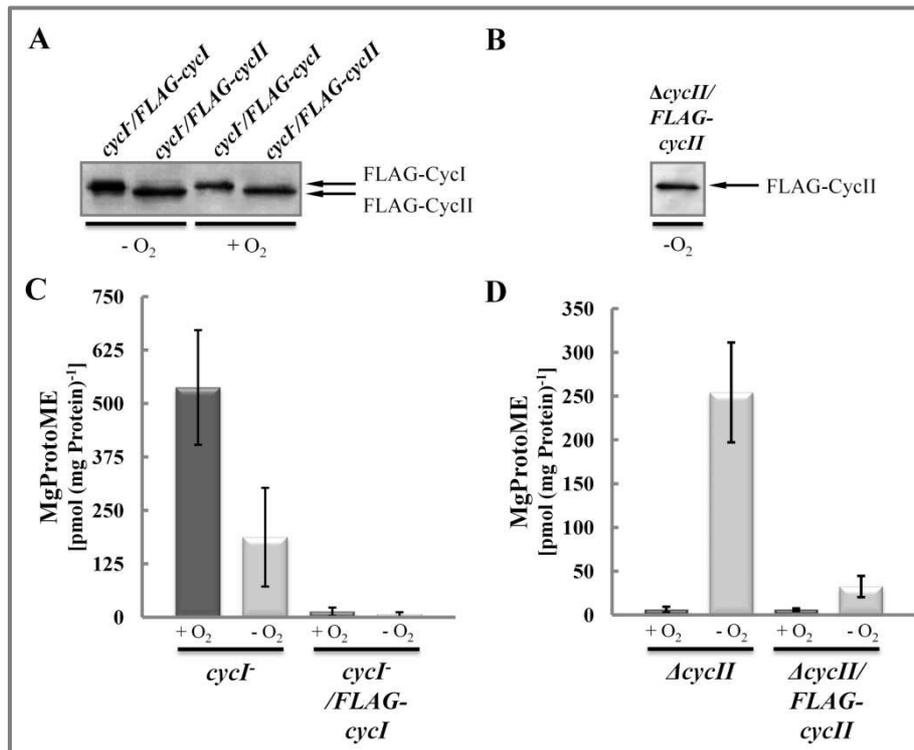


Abbildung 24: Komplementierung des Phänotyps der Cyclase-Mutanten

(A+B) Nachweise der Expression von FLAG-CycI und FLAG-CycII in den jeweiligen Cyclase-Mutanten *cycI/FLAG-cycI*, *cycI/FLAG-cycII* unter aeroben und anaeroben Bedingungen sowie $\Delta cycII/FLAG-cycII$ unter anaeroben Konditionen. Gesamtzellextrakte der Stämme, die 5-7 Tage in Medium ohne Kupfer wuchsen, wurden elektrophoretisch in SDS-Polyacrylamidgelen getrennt (Laemmli, 1970; Schägger und von Jagow, 1987), auf Nitrozellulosemembranen transferiert und die FLAG-Fusionsprotein immunologisch mit anti-FLAG-AP-Konjugat detektiert. Adaptiert aus Peter *et al* (2009).

(C) Akkumulation von MgProtoME in *cycI* und *cycI/FLAG-cycI* Zellen, die in kupferfreiem BG11-Medium mit 0,2% (w/v) Glukose mit Luft (+O₂) oder Stickstoff-Begasung (-O₂) wuchsen.

(D) Akkumulation von MgProtoME in $\Delta cycII$ und $\Delta cycII/FLAG-cycII$ Zellen. Das Wachstum der Zellen erfolgte analog zu (C). Die Bestimmung der Chlorophyllvorstufen erfolgte wie in Abschnitt 4.2.1.5 beschrieben.

Die ektopische Expression von FLAG-CycI ist funktionell und komplementiert die partielle Inaktivierung von *cycI* unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Die Menge des Substrates

MgProtoME liegt in *cycI/FLAG-cycI*-Zellen auf dem Niveau von WT-Zellen (Tabelle 7). Analog hierzu komplementiert die Expression des FLAG-CycII die vollständige Deletion von *cycII* unter anaeroben Bedingungen (Tabelle 7). Die artifizielle Produktion von FLAG-CycII unter aeroben Bedingungen, welche die Expression des endogenen CycII-Proteins inhibieren, führt im genetischen Hintergrund der Δ *cycII*-Mutante zu keiner Akkumulation von Mg-Porphyrinen. Darüber hinaus scheint sie keinen weiteren Einfluss auf das System der oxidativen Cyclase unter aeroben Bedingungen zu besitzen.

Tabelle 7: Akkumulation von MgProtoME im WT, den Cyclase-Mutanten und ihren Komplementanten unter aeroben und anaeroben Bedingungen

| | aerob ^a | anaerob ^b |
|--|--------------------|----------------------|
| MgProtoME [pmol (mg Protein) ⁻¹] | | |
| WT | 7,1 ± 1,8 | 6,7 ± 0,5 |
| <i>cycI</i> | 1057 ± 66 | 187,2 ± 115,5 |
| Δ <i>cycII</i> | 1,7 ± 0,9 | 254,2 ± 57,1 |
| <i>cycI/FLAG-cycI</i> | 12,4 ± 9,6 | 6,6 ± 5,1 |
| <i>cycI/FLAG-cycII</i> | 661 ± 52 | 150 ± 84,3 |
| Δ <i>cycII/FLAG-cycII</i> | 6,14 ± 1,39 | 32,5 ± 12,1 |

^a 20 μ mol Photonen m⁻² s⁻¹; BG11 -Cu; 0,2 % (w/v) Glukose; Luft

^b wie ^a; jedoch 100% (v/v) N₂

Auffällig war jedoch die Beobachtung, dass die Überexpression von FLAG-CycII im genetischen Kontext der partiellen *cycI*-Inaktivierung (*cycI/FLAG-cycII*) zu keiner vollständigen Komplementierung der Mutation führt, wie in Abbildung 25 dargestellt. Zellen des *cycI/FLAG-cycII* Stammes akkumulieren weiterhin MgProtoME mit einem ähnlich hohen Niveau wie *cycI*-Zellen unter beiden Sauerstoffkonzentrationen (Abbildung 25, Tabelle 7).

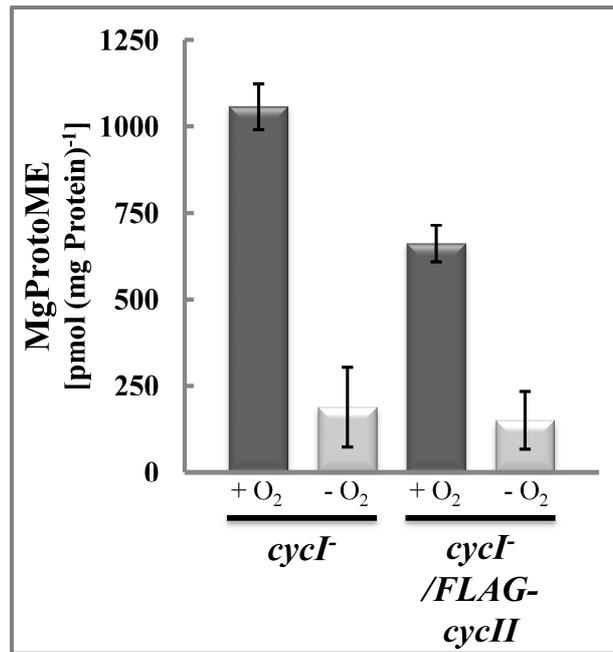


Abbildung 25: Partielle Komplementierung von *cycI* durch *FLAG-cycII*

Akkumulation von MgProtoME in *cycI* und *cycI/FLAG-cycII* Zellen, die in kupferfreiem BG11-Medium mit 0,2% (w/v) Glukose mit Luft (+O₂) oder Stickstoff-Begasung (-O₂) wuchsen.

Die hier erarbeiteten Daten hinsichtlich der Komplementierung der einzelnen Cyclase-Mutanten durch das jeweilige, ektopisch exprimierte FLAG-Fusionsprotein unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen sowie die durch Minamizaki *et al.* (2008) gewonnenen Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass die Proteine CycI und CycII Isoformen der oxidativen MgProtoME-Cyclase darstellen, die durch unterschiedliche Affinität zum molekularen Sauerstoff gekennzeichnet sind. Dabei katalysiert alleinig das CycI-Protein unter aeroben Bedingungen die isozyklische Formation des fünften Rings innerhalb des Chlorophyll-Moleküls. Das *cycII*-Gen kodiert dagegen für eine Isoform der Cyclase mit höherer Affinität zu molekularem Sauerstoff. Diese wird erst unter mikroaeroben Bedingungen exprimiert und ermöglicht die Katalyse der Reaktion zusammen mit CycI. Der genaue Mechanismus der Interaktion der beiden Cyclase-Isoformen ist bisher noch nicht aufgeklärt.

2.2.3 *ycf54*, ein möglicher Kandidat für die fehlende Untereinheit der Cyclase

Im Rahmen des Teilprojektes A8 des DFG-Sonderforschungsbereiches SFB-429 wurden noch weitere *ycf*-Gene des photosynthetischen Modellorganismus *Synechocystis* untersucht und versucht, eine funktionelle Charakterisierung ihrer Genprodukte zu erstellen. Ein besonderes Augenmerk galt dabei einer möglichen Rolle innerhalb der Prozesse der Photosynthese, insbesondere der Tetrapyrrol-Biosynthese. So sind immer noch einige Enzyme, die Schritte in

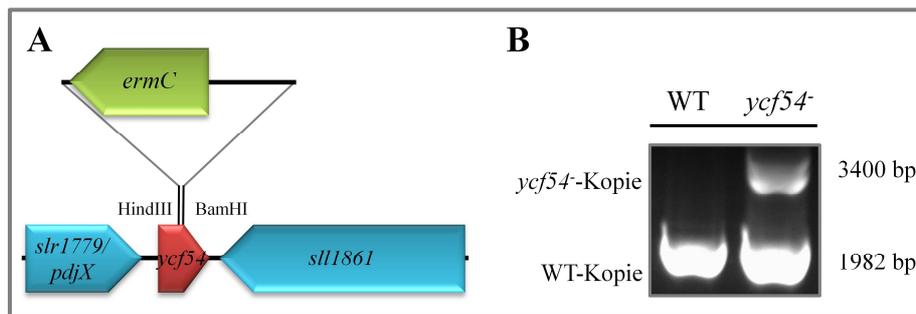
diesem Stoffwechselweg katalysieren, nicht ausreichend charakterisiert, gänzlich unbekannt oder wurden erst im Verlauf der letzten zwei Jahre publiziert (Goto *et al.*, 2010; Aoki *et al.*, 2011). Die Untersuchungen an einer Vielzahl von phototrophen Organismen zur vollständigen Aufklärung der chemischen Katalyse der isozyklischen Ringbildung im Chlorophyll-Molekül führten zu der mehreren Annahmen: (i) Das oxidative Cyclase-System muss aus mehr als einer Enzym-Untereinheit bestehen (Wong und Castelfranco, 1984; Bollivar und Beale, 1996) und (ii) diese Untereinheiten werden durch unterschiedliche Genen kodiert (Walker *et al.*, 1991). Ein Gen, welches möglicherweise die fehlende Untereinheit kodiert, ist der hypothetische chloroplastidäre Leserahmen *ycf54*, der sich im *Synechocystis*-Genom im Locus *slr1780* befindet (Kaneko *et al.*, 1996). Vor dem *ycf54*-Gens liegt der offene Leserahmen *slr1779*, der als *pdxJ*-Gen annotiert ist (Kaneko *et al.*, 1996). Das Produkt PdxJ (*pyridoxine 5'-phosphate synthase*) ist Teil der Biosynthese von Vitamin B₆ (Garrido-Franco, 2003), wobei die genaue Initiation der Proteintranslation unbekannt ist (Ishino *et al.*, 2007). An dieser Stelle sollte darauf hingewiesen werden, dass das Endprodukt der Vitamin B₆ Biosynthese als Ko-Faktor der δ -Aminolävulinsäure-Synthase (ALA-Synthase) benötigt wird (Davies und Neuberger, 1979a; Davies und Neuberger, 1979b). Die ALA-Synthase katalysiert den ratenbestimmenden ersten Schritt der Tetrapyrrol-Biosynthese und unterliegt einer strikten Regulation (Beale, 1993; Tanaka und Tanaka, 2006). Auf dem Gegenstrang, stromabwärts, kodiert das Gen *sll1681* ein hypothetisches Protein unbekannter Funktion (Kaneko *et al.*, 1996). Basierend auf den vorhandenen Daten zur Transkription der beiden Gene (Mitschke *et al.*, 2011) muss davon ausgegangen werden, dass das *ycf54*-Gen über keinen eigenen Promoter verfügt und ein gemeinsames Transkript mit *pdxJ* bildet. Dunkelheit oder eine reduzierte Verfügbarkeit von Kohlendioxid als anorganische Kohlenstoffquelle führen zu einer verminderten Akkumulation des Transkripts von *ycf54*. Die beobachteten Änderungen der Transkriptabundanz unterscheiden sich von der des *pdxJ*-Transkripts.

Das Ycf54-Genprodukt ist ein 12,2 kDa großes Protein, dessen Homolog in allen bisher vollständig sequenzierten Genomen aerober photoautotropher Organismen gefunden werden kann. Sequenzvergleiche, unter Verwendung des BLAST P-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990), zwischen *Synechocystis* Ycf54 und den homologen Proteinen von *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* offenbaren eine 47%ige Identität der Aminosäuren. Die folgende Tabelle 8 listet einige physikochemische Parameter des Ycf54-Proteins auf. Es liegt die Kristallstruktur des Ycf54-Homologs von *Anabaena* sp. PCC7120 vor, jedoch erlaubt diese keine funktionelle Zuordnung (unveröffentlicht, PDB-Datenbank 3JSR).

Tabelle 8: Bioinformatische Analyse von *Synechocystis* Ycf54

| Protein | Gen | Cyanobase-Eintrag | MW (kDa) | pI | Transmembran-Helices | Aliphatischer Index |
|---------|--------------|-------------------|----------|------|----------------------|---------------------|
| Ycf54 | <i>Ycf54</i> | <i>Slr1780</i> | 12,18 | 4,70 | ungeklärt | 90,28 |

Eine entsprechende *ycf54*-Mutante wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Teruo Ogawa (*Shanghai Institutes for Biological Sciences*, Shanghai, China) in Japan bereits Ende des letzten Jahrtausends generiert und in dieser Arbeit untersucht. Dabei kam ein anderer WT-Stamm von *Synechocystis* zur Anwendung (siehe Abschnitt 4.1.11), der generell weniger starke Pigmentierung zeigt als der WT-Stamm, der für die *ycf34*-Mutante verwendet wurde. Da über das zugrundeliegende Konstruktionsschema keine Auskünfte von der Arbeitsgruppe erhältlich waren, wurde versucht, die Strategie der Inaktivierung des *ycf54*-Gens über Sequenzierung der genomischen DNA zu rekonstruieren.

Abbildung 26: *Synechocystis ycf54* und Mutagenese

(A) Schematische Darstellung der Mutagenese von *ycf54*. Das *ycf54*-Gen (*slr1780*) befindet sich im Genom von *Synechocystis* hinter dem Gen *pdxJ* (*slr1779*), das für die Pyridoxin 5'-phosphat Synthase kodiert. Auf dem Gegenstrang kodiert das Gen *sll1681* ein hypothetisches Protein unbekannter Funktion. Die Insertion der Erythromycin-Resistenzgen-Kassette (*ermC*) erfolgte vermutlich über artifiziell eingefügte HindIII und BamHI-Schnittstellen in die *ycf54* Nukleotidabfolge.

(B) PCR-Analyse zur Verifikation der Segregation der *ycf54*-Mutation. Die DNA-Fragmente wurden mit dem Primerpaar *ycf54*-seg-fw und *sll1681*-rev amplifiziert. Kürzere DNA-Fragmente entsprechen der WT-Kopie des *ycf54*-Gens, längere der mutierten Variante. Genomische DNA, isoliert aus WT und *ycf54*-Zellen, diente als Matrize der PCR.

Die Insertion einer Erythromycin-Resistenzgen-Kassette in die kodierende Sequenz von *ycf54* erfolgte vermutlich über mittels PCR eingeführte Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen (Abbildung 26A). Die Kassette mit dem Selektionsmarker hat dabei eine gegenläufige Orientierung zu den beiden Genen *pdxJ* und *ycf54*. Die Mutante wurde freundlicherweise von Prof. Masahiko Ikeuchi (Universität Tokio, Japan) zur Verfügung gestellt, der die Betreuung und Pflege der Kollektion von *Synechocystis*-Mutanten von Prof. Ogawa fortführt. Wie Prof. Ikeuchi mitteilte (mündliche Kommunikation), ist die *ycf54*-Mutante nicht vollständig

segregiert. Eine PCR-Analyse bestätigte dies (Abbildung 26B). So lassen sich mithilfe einer Kolonie-PCR nur geringe Spuren eines DNA-Fragments detektieren, das der *ycf54*-Mutation entspricht. Vielmehr überwiegt ein DNA-Fragment, welches der originalen WT-Kopie entspricht.

2.2.4 *ycf54*-Zellen akkumulieren das Substrat der Cyclase

Die partielle Inaktivierung des *ycf54*-Genprodukts führt zu keiner Veränderung des Verhältnisses zwischen Phycobilinen und Chlorophyll wie aus dem Vergleich der Absorptionsspektren von *Synechocystis* WT und *ycf54*-Zellen sichtbar wird (Abbildung 27A). Vielmehr ist die *ycf54*-Mutante durch eine gleichzeitige Reduktion der zellulären Gehalte an Phycocyanin und Chlorophyll charakterisiert (Tabelle 9). Die jeweiligen Absorptionsmaxima für Phycocyanin und Chlorophyll sind im Vergleich zum WT reduziert.

Tabelle 9: Zusammensetzung der photosynthetischen Pigmente und Akkumulation von Mg-Porphyrinen in WT und *ycf54*-Zellen

| | Schwachlichtbedingungen ^a | |
|---|--------------------------------------|------------------|
| | WT | <i>ycf54</i> |
| Chlorophyll [$\mu\text{g (mg Protein)}^{-1}$] | $25,7 \pm 2,0$ | $23,9 \pm 2,1$ |
| Phycocyanin [$\mu\text{g (mg Protein)}^{-1}$] | $194,1 \pm 39,5$ | $160,6 \pm 31,3$ |
| Allophycocyanin [$\mu\text{g (mg Protein)}^{-1}$] | $51,2 \pm 16,2$ | $45,7 \pm 18,0$ |
| ProtoIX [$\text{pmol (mg Protein)}^{-1}$] | $5,4 \pm 2,3$ | $10,3 \pm 4,8$ |
| MgP [$\text{pmol (mg Protein)}^{-1}$] | $0,07 \pm 0,01$ | $0,22 \pm 0,13$ |
| MgProtoME [$\text{pmol (mg Protein)}^{-1}$] | $3,9 \pm 0,8$ | $104,2 \pm 9,6$ |

^a $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 2 Tage

Eine Reduktion der Pigmentierung kann mannigfaltige Ursachen haben. Analog zu den Cyclasen-Mutanten (vgl. Abschnitt 2.2.1) wurde die Akkumulation von Chlorophyllvorstufen und Intermediaten der Tetrapyrrol-Biosynthese in Zellen analysiert, die eine verminderte Menge an Ycf54-Protein besitzen, um weitere Einsicht in die Funktion des *ycf54*-Gens zu erhalten. Die partielle Inaktivierung von *ycf54* geht mit einer Akkumulation von MgProtoME einher. MgProtoME ist das Substrat der oxidativen MgProtoME-Cyclase, die zusammenfassend im Abschnitt 2.2.1 beschrieben wurde. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 9 und Abbildung 27B dargestellt. *Ycf54*-Zellen haben ein 40x fach höheres Niveau an MgProtoME als WT-Zellen unter vergleichbaren Bedingungen. Die anderen Intermediate, MgProto und Proto, sind nur geringfügig erhöht (Tabelle 9). Die Höhe der

MgProtoME-Akkumulation in *ycf54*-Zellen entspricht etwa einem Zehntel der von *cycI*-Zellen, die Zellen wuchsen jedoch nur mit denselben Lichtbedingungen auf (siehe dazu Tabelle 6 und Abbildung 23 in Abschnitt 2.2.1). Analog zur *cycI*-Mutante konnte ebenfalls keine vollständige Segregation der *ycf54*-Mutation erreicht werden (vgl. Abbildung 22C und Abbildung 26B).

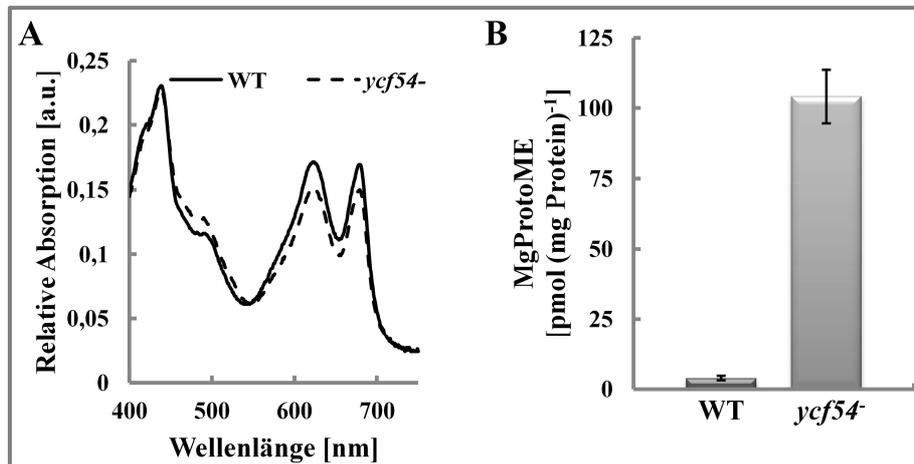


Abbildung 27: Phänotyp der partiellen Inaktivierung von *Synechocystis ycf54*

(A) Absorptionsspektren ganzer Zellen von *Synechocystis* WT und *ycf54*⁻, die photoautotroph in BG11-Medium bei einer Beleuchtungsintensität von 20 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wuchsen. Die Zellen wurden auf eine gemeinsame $\text{OD}_{750\text{nm}} = 0,4$ verdünnt und die Spektren in einem Shimadzu UV2401PC Spektrophotometer aufgenommen, welches mit einer integrierenden Sphäre (Ulbricht, 1920) bestückt war. Lokale Maxima bei 625 und 685 nm repräsentieren die Absorptionsmaxima von Phycocyanin und Chlorophyll *a*.

(B) Akkumulation von MgProtoME in WT und *ycf54*⁻-Zellen, die unter den oben genannten Bedingungen für 3 Tage wuchsen. Die Bestimmung der Chlorophyllvorstufen erfolgte wie in Abschnitt 4.2.1.5 der Sektion Material und Methoden beschrieben.

Das *ycf54*-Gen ist essentiell für *Synechocystis* und kodiert für ein Protein welches eine Funktion in der Chlorophyll-Biosynthese hat. Die partielle Inaktivierung führt zur Anreicherung von MgProtoME, dem Substrat der oxidativen MgProtoME-Cyclase und zu gleichzeitigen Reduktion der photosynthetischen Pigmente Chlorophyll *a* und Phycocyanin.

2.2.5 Verminderte Abundanz von Enzymen der Tetrapyrrol-Biosynthese in *ycf54*-Zellen

Die zuvor beschriebenen Auswirkungen der partiellen Inaktivierung von *ycf54* werfen Fragen hinsichtlich der Auswirkungen auf den gesamten Biosyntheseweg auf. Eine genaue Kontrolle des gesamten Stoffwechselweges und der beteiligten Enzyme erlaubt einen ausbalancierten Fluss von Metaboliten (Tanaka und Tanaka, 2006; Tanaka und Tanaka, 2007) und verhindert eine gleichzeitige Akkumulation der hochreaktiven Porphyrin-Intermediate (Mochizuki *et al.*,

2010). Die Inaktivierung einzelner Enzyme des Stoffwechselweges oder die Desintegration von beteiligten Enzymkomplexen kann dabei unterschiedliche Auswirkungen auf die Aktivität, Stabilität und Bildung von anderen Enzymen haben, sowohl auf die Bestandteile der Tetrapyrrol-Biosynthese selber als auch auf Komponenten, die Tetrapyrrole als Ko-Faktoren verwenden, wie etwa die photosynthetischen Komplexe oder Phycocyanobilin bindende Proteine. Die Proteinextrakte von *Synechocystis* WT und *ycf54*-Zellen wurden hinsichtlich dieser Fragestellung immunologisch untersucht. Dies erlaubt es, Aussagen über die Abundanz wichtiger Enzyme und struktureller Komponenten der PS zu treffen. Die semi-quantitativen Immunoblot-Analysen erfolgten unter Verwendung von Verdünnungsreihen, um auch geringe Veränderungen zu visualisieren.

Die Analyse offenbarte eine Reduktion der Menge an CycI, der oxidativen Cyclase, in *ycf54*-Zellen unter photoautotrophen Wachstumsbedingungen (CHL27, Abbildung 28A), im Vergleich zu WT-Zellen, die unter vergleichbaren Konditionen wuchsen. Ebenso ist der zelluläre Gehalt der Ferrochelatase (HemH, Abbildung 28A) in *ycf54*-Zellen vermindert. Im Gegensatz dazu scheint die Abundanz von ChlM, der Magnesium-Protoporphyrin XI Methyltransferase, in der Mutante leicht erhöht zu sein (ChlM, Abbildung 28A). All diese Enzyme sind im späteren Verlauf der Tetrapyrrol-Biosynthese (siehe Abschnitt 1.3) zu finden und gehören zum Häm-Ast (Ferrochelatase) bzw. Chlorophyll-Ast (oxidative Magnesium-Protoporphyrin IX monomethylester Cyclase und Magnesium-Protoporphyrin IX Methyltransferase) des verzweigten Stoffwechselweges. Die Reduktion des CycI-Gehaltes bzw. die verminderte Stabilität des Proteins ist möglicherweise eine direkte Konsequenz der verringerten Menge an Ycf54 in der Zelle. Des Weiteren kann eine Verminderung der Abundanz von PsaC (PsaC, Abbildung 28A), einem Eisen-Schwefel-Protein des PS I, beobachtet werden. Dies korreliert mit den verringerten Chlorophyll-Gehalten der Mutante (siehe Tabelle 9 und Tabelle 10). Eine leichte Reduktion der PS I-Untereinheit PsaL (PsaL, Abbildung 28A) ist ebenfalls sichtbar. Der Gehalt an PS II, hier veranschaulicht durch eine der beiden Hauptkomponenten, das D1-Protein, scheint durch die partielle Inaktivierung nicht beeinflusst zu sein (PsbA, Abbildung 28A). Ebenso die Menge der β -Untereinheit der F_0F_1 -ATP-Synthase, die hier als Kontrollprotein dient (AtpB, Abbildung 28A).

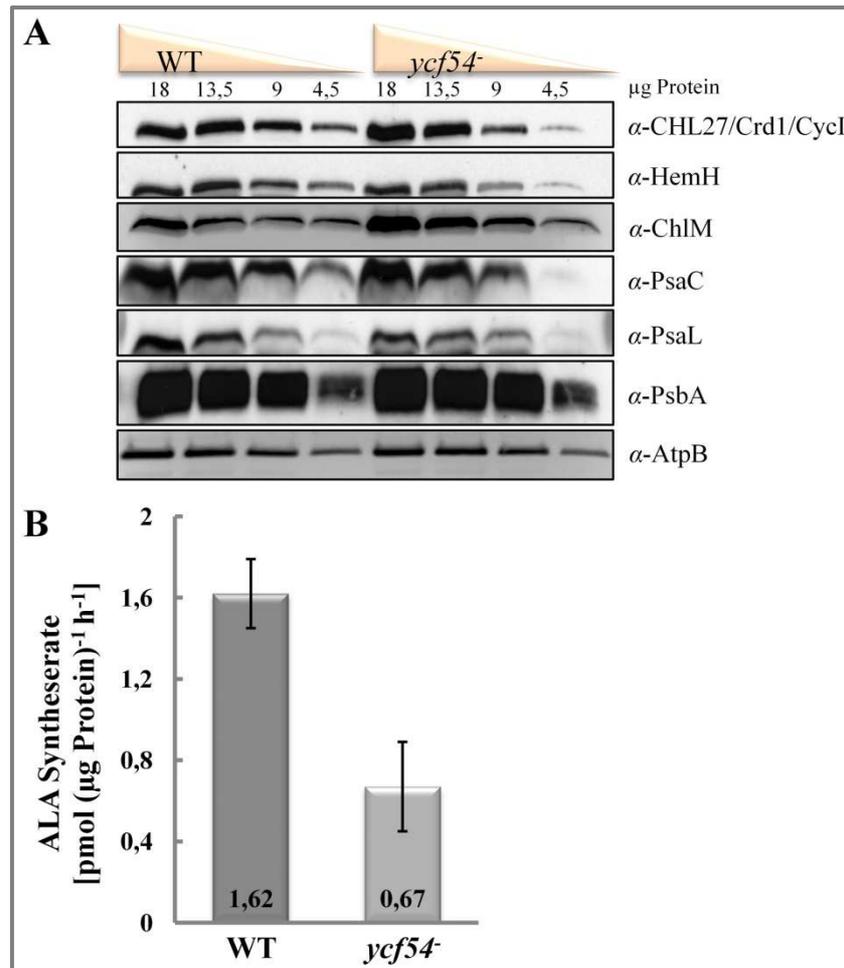


Abbildung 28: Veränderte Abundanz von Enzymen der Tetrapyrrol-Biosynthese und der Proteine des PS I in der *ycf54*-Mutante

(A) Semi-quantitative Immunoblot-Analysen. Verdünnungsreihen (18 μ g = 100 %) von Proteinen aus den Gesamtextrakten von WT und *ycf54*-Zellen, die unter photoautotrophen Schwachlichtbedingungen wuchsen, wurden in SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970; Schagger und von Jagow, 1987) getrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die immunologische Detektion von Enzymen der Tetrapyrrol-Biosynthese und von Proteinen der PS erfolgte durch spezifische Antikörper, gerichtet gegen: CHL27 aus *Arabidopsis*, Ferrochelatase (HemH), MgProto-Methyltransferase (ChlM), PS I Eisen-Schwefel-Protein PsaC, PS I Protein PsaL und PS II Protein D1 (PsbA). Ein Antikörper gerichtet gegen die β -Untereinheit der *Synechocystis* F₀F₁-ATP-Synthase (AtpB) wurde als interne Kontrolle verwendet. Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz-Assays unter Verwendung der konjugierten Meerrettich-Peroxidase des sekundären Antiköpers anti-Kaninchen-HRP-Konjugat. Alle verwendeten Antikörper sind an der rechten Seite gelistet.

(B) Aktivität der δ -Aminolävulinsäure-Synthase in WT und *ycf54*-Zellen. Die Bestimmung der Synthesekapazität erfolgte wie in Abschnitt 4.2.1.6 beschrieben.

Die in Abschnitt 2.2.4 beobachtete und quantifizierte Abnahme des Phycocyanin-Gehaltes konnte durch die veränderte Abundanz der Ferrochelatase verifiziert werden (Abbildung 28A). Die Ferrochelatase katalysiert den ersten Schritt der Häm-Biosynthese, von der die Synthese der Phycocyanobiline abzweigt. Dies ist vermutlich eine Konsequenz des Rückstaus

des Intermediates MgProtoME und führt zu einer der generellen Anpassung der Flussraten durch den Stoffwechselweg. Diese Vermutung wird durch die Bestimmung der Syntheserate von δ -Aminolävulinsäure in *ycf54*-Zellen untermauert. Die Messung der Kapazität des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts innerhalb der Tetrapyrrol-Biosynthese gibt Auskunft über die Gesamtleitung und den Zustand des Stoffwechselweges. Sie wurde durch Annabel Salinas Hartwig in der AG Pflanzenphysiologie am Institut für Biologie der Humboldt Universität Berlin bestimmt. So besitzen *ycf54*-Zellen nur 41% der Synthesekapazität des WT (Abbildung 28B), verursacht durch die Akkumulation von MgProtoME und/ oder den Mangel an Ycf54. Die partielle Inaktivierung des *ycf54*-Gens von *Synechocystis* beeinflusst die Abundanz der Enzyme der Tetrapyrrole-Biosynthese, insbesondere der oxidativen Cyclase und reduziert die Kapazität der δ -Aminolävulinsäure-Bildung. Damit einhergehend zeigt sich auch eine verminderte Abundanz der photosynthetischen Proteinkomplexe, hauptsächlich von PS I.

2.2.6 FLAG-Ycf54 erlaubt eine teilweise Komplementierung der *ycf54*-Mutante

Um mögliche polare Effekt der Inaktivierung von *Synechocystis ycf54* auf die Transkription und Stabilität der benachbarten Gene *pdxJ* und *sll1681* auszuschließen, wurde der neue Expressionsvektor pUR-FLAG-*ycf54* konstruiert, der die Produktion eines FLAG-Ycf54-Fusionsproteins erlaubt. Das zugrundeliegende selbstreplizierende, konjugative Plasmid pVZ321 (Zinchenko *et al.*, 1999) wurde dabei, wie im Abschnitt 4.2.2.19 beschrieben, modifiziert. Das konstruierte Plasmid pUR-FLAG-*ycf54* (Abbildung 29A) erlaubt die Expression eines Ycf54-Proteins mit einem N-terminalen FLAG-tag unter Kontrolle der *petJ*-Promoters, der durch Kupfermangel induziert wird (Zhang *et al.*, 1994; Tous *et al.*, 2001). Die Verwendung von *petJ*-Promoter zur Expression eines FLAG-Fusionsproteins kam bereits mehrfach erfolgreich zum Einsatz (Sobotka *et al.*, 2008; Peter *et al.*, 2009). Das Plasmid pUR-FLAG-*ycf54* wurde in Zellen des *ycf54*-Stammes durch Konjugation transferiert und die Präsenz des Vektors in Zellen des hieraus folgenden *ycf54*/FLAG-*ycf54*-Stammes (Abbildung 29B) verifiziert. Proteinextrakte von *ycf54*/FLAG-*ycf54*-Zellen, die in Abwesenheit oder Anwesenheit von 2,5 μ M CuSO₄ wuchsen, wurden in eine lösliche und unlösliche Fraktion unterteilt und die Akkumulation des FLAG-Ycf54 Proteins durch Immunoblot-Analyse untersucht. Das FLAG-Ycf54 Protein akkumuliert in der Fraktion unlöslicher Proteine von Zellen, die unter Kupfermangel kultiviert wurden (Abbildung 29C). Kein FLAG-Protein konnte in Anwesenheit von Kupfer im Wachstumsmedium detektiert werden. Interessanterweise führt das Einbringen des komplementierenden Konstrukts zu keiner

vollständigen Segregation der ursprünglichen, chromosomalen *ycf54*-Kopien (Abbildung 29D) in *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen, wenn diese unter Kupfermangel FLAG-Ycf54 exprimieren. Ein Vergleich mit dem Grad der Segregation der *ycf54*-Mutation (vgl. dazu Abbildung 26B) lässt die Vermutung zu, dass in *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen mehr WT-Kopien des *ycf54*-Gens durch die mutierte Variante ersetzt wurden. Diese Annahme müsste aber durch quantitative Untersuchungen untermauert werden.

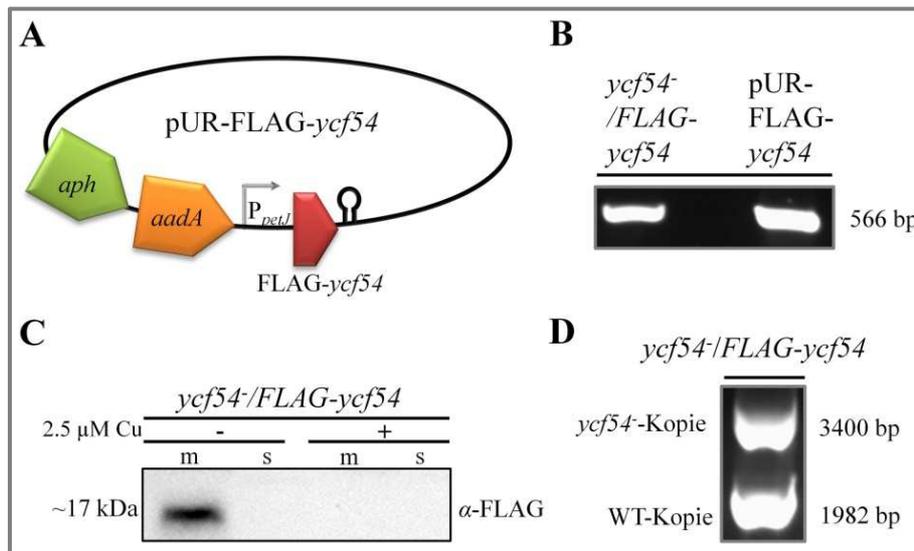


Abbildung 29: Komplementierung von *ycf54*

(A) Schematische Darstellung des selbstreplizierenden Plasmids pUR-FLAG-*ycf54*. Die kodierende Sequenz von *ycf54* wurde mit einer Sequenz fusioniert, die ein 3xFLAG-tag kodiert (roter Pfeil). Die Expression des Fusionsproteins FLAG-Ycf54 ist unter Kontrolle des Promotors des *Synechocystis petJ*-Gens (grauer Pfeil). Sequenzen, die den Terminator OOP des Phagen Lambda enthalten, beenden die Transkription der mRNA. Die Resistenzgen-Kassetten für Kanamycin (*aph*, grüner Pfeil) und Streptomycin (*aadA*, oranger Pfeil) dienen als Selektionsmarker.

(B) Nachweis des erfolgreichen Transfers von pUR-FLAG-*ycf54*. Das DNA-Fragment wurde mithilfe des Primerpaars pSK9-ORF-fw und pUR-rev amplifiziert. Die genomische DNA, isoliert aus *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen, dient als Matrize. Das originale pUR-FLAG-*ycf54* Plasmid dient als Positivkontrolle der PCR.

(C) Nachweis der Expression von FLAG-Ycf54 in Zellen des *ycf54/FLAG-ycf54*-Stammes. Die Zellen wurden in der Abwesenheit oder Anwesenheit von 2,5 μ M CuSO₄ (Cu) kultiviert, es wurde ein Gesamtextrakt hergestellt und je 12 μ g Protein dieser Gesamtextrakte in die lösliche und unlösliche Fraktion unterteilt. Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung in einem 16%igen SDS-Polyacrylamidgel (Schägger und von Jagow, 1987) wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und das Fusionsprotein FLAG-Ycf54 immunologisch mit anti-FLAG-HRP-Konjugat detektiert.

(D) PCR-Analyse zur Verifikation der Segregation der *ycf54*-Mutation in *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen. Die DNA-Fragmente wurden mit dem Primerpaar *ycf54-seg-fw* und *sll1681-rev* amplifiziert. Kürzere DNA-Fragmente entsprechen der WT-Kopie des *ycf54*-Gens, längere der mutierten Variante. Genomische DNA, isoliert aus *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen, diente als Matrize der PCR.

Ergebnisse

Wird die Expression von FLAG-Ycf54 durch 2,5 μM CuSO_4 im Medium inhibiert und kein Protein gebildet (Abbildung 29C), so akkumulieren *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen MgProtoME, das Substrat der Cyclase, im Vergleich zu *Synechocystis* WT-Zellen, die unter gleichen Bedingungen wuchsen (Abbildung 30A, Tabelle 10). Dies entspricht einer 22-fachen Anreicherung bezogen auf den WT. Keine Akkumulation von MgProtoME wurde in Zellen derselben Stämme detektiert, die in der Abwesenheit von Cu^{2+} im Wachstumsmedium wuchsen. Die determinierten Werte liegen auf dem Niveau von WT-Zellen (Abbildung 30A, Tabelle 10). Auffällig ist die drastische Reduktion der photosynthetischen Pigmente bei Anwesenheit von Kupfer im Medium wenn die Expression von FLAG-Ycf54 inhibiert ist, sowie ein retardiertes Wachstum der Zellen von *ycf54/FLAG-ycf54* (Daten nicht gezeigt). Dies könnte in dem höheren Grad der Segregation der *ycf54*-Mutation in den nicht induzierten komplementierten Mutanten begründet sein. Daraus resultiert ein noch niedrigerer Gehalt an Ycf54-Protein und vermutlich auch an CycI-Protein.

Tabelle 10: Quantifizierung der photosynthetischen Pigmente und Akkumulation von Mg-Porphyrinen in WT, *ycf54* und *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen in Ab- oder Anwesenheit von Kupfer im Medium

| | Schwachlichtbedingungen ^a | | | |
|--|--------------------------------------|-------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| | WT | <i>ycf54</i> | <i>ycf54/FLAG-ycf54</i> | CuSO_4 [μM] |
| Chlorophyll [μg (mg protein) ⁻¹] | 28,5 \pm 2,8 | 21,6 \pm 3,4 | 16,6 \pm 5,8 | 0 |
| Phycocyanin [μg (mg protein) ⁻¹] | 262,7 \pm 42,1 | 201,4 \pm 30,5 | 215,4 \pm 65,5 | 0 |
| Allophycocyanin [μg (mg protein) ⁻¹] | 80,3 \pm 16,3 | 62,5 \pm 13,4 | 72,7 \pm 27,4 | 0 |
| ProtoIX [pmol (mg protein) ⁻¹] | 10,9 \pm 3,4 | 21,6 \pm 5,4 | 43,3 \pm 3,3 | 0 |
| MgProto [pmol (mg protein) ⁻¹] | 0,5 \pm 0,1 | 1,1 \pm 0,3 | 0,3 \pm 0,2 | 0 |
| MgProtoME [pmol (mg protein) ⁻¹] | 12,6 \pm 9,4 | 551,4 \pm 160,6 | 9,8 \pm 3,5 | 0 |
| Chlorophyll [μg (mg protein) ⁻¹] | 28,5 \pm 2,8 | 22,0 \pm 1,5 | 10,4 \pm 3,1 | 2,5 |
| Phycocyanin [μg (mg protein) ⁻¹] | 258,3 \pm 13,5 | 227,1 \pm 19,0 | 141,9 \pm 85,0 | 2,5 |
| Allophycocyanin [μg (mg protein) ⁻¹] | 70,0 \pm 6,5 | 66,0 \pm 20,0 | 46,8 \pm 26,3 | 2,5 |
| ProtoIX [pmol (mg protein) ⁻¹] | 2,6 \pm 0,2 | 9,0 \pm 3,3 | 50,7 \pm 5,4 | 2,5 |
| MgProto [pmol (mg protein) ⁻¹] | 0,4 \pm 0,2 | 0,8 \pm 0,3 | 0,6 \pm 0,3 | 2,5 |
| MgProtoME [pmol (mg protein) ⁻¹] | 9,9 \pm 5,9 | 477,5 \pm 183,6 | 248,0 \pm 101,8 | 2,5 |

^a 20 μmol Photonen $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 7 Tage Kupfermangel

Entgegen den Erwartungen führt die Expression von FLAG-Ycf54 in *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen jedoch nicht zu einer vollständigen Wiederherstellung der WT-Phänotyps. Die

Absorptionsspektren unterscheiden sich von denen des WT und der *ycf54*-Mutante (Abbildung 30B). Wie im Fall von *ycf54*-Zellen zeigt sich eine deutliche Reduktion der Absorptionsmaxima für Phycocyanin und Chlorophyll, wenn FLAG-Ycf54 produziert wird. Interessanterweise liegt die Bildungsrate von δ -Aminolävulinsäure in *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen bei 90% des WT-Niveaus (Abbildung 30C) und sollte damit eigentlich eine normale, maximal leicht reduzierte Biosynthese von Tetrapyrrolen ermöglichen. Die Reduktion der Pigmente steht im Widerspruch zur Komplementierung auf Ebene der Chlorophyllvorstufen.

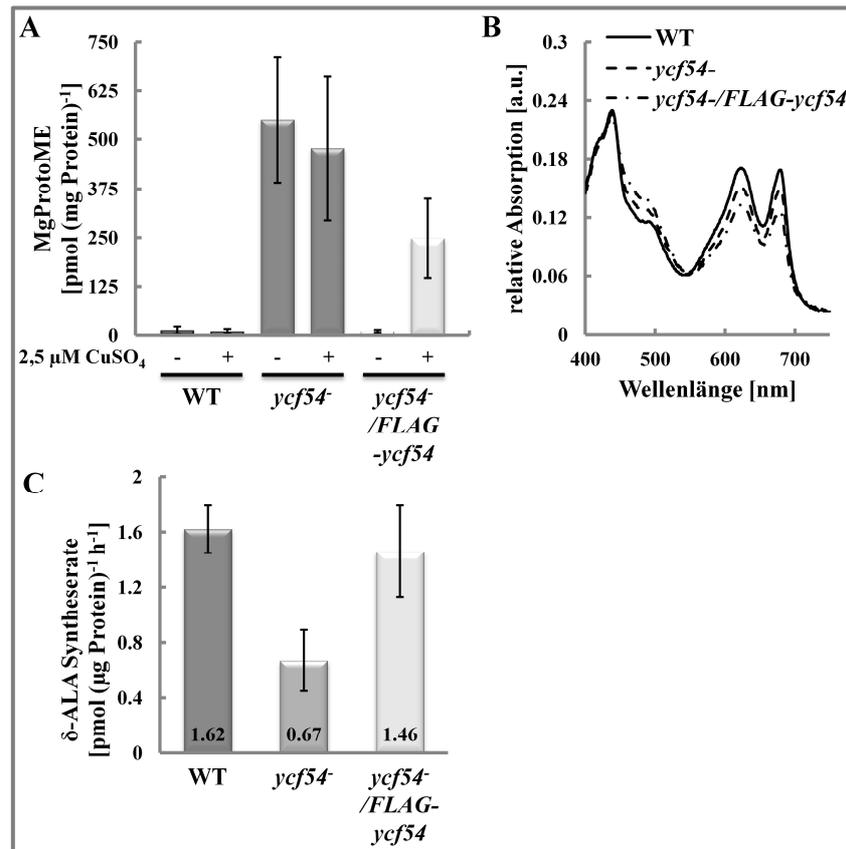


Abbildung 30: Grad der Komplementierung der *ycf54*-Mutation in *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen

(A) Akkumulation von MgProtoME. Die Stämme *Synechocystis* WT, *ycf54* und *ycf54/FLAG-ycf54* wurden für 7 Tage in Abwesenheit (-) oder Anwesenheit (+) von 2,5 μ M CuSO₄ im BG11-Medium bei Schwachlichtbedingungen von 20 μ mol Photonen m⁻² s⁻¹ kultiviert. Die Bestimmung der Chlorophyllvorstufen erfolgte wie in Abschnitt 4.2.1.5 beschrieben.

(B) Absorptionsspektren von Zellen des Stämme WT, *ycf54* und *ycf54/FLAG-ycf54*, die für 7 Tage in Abwesenheit (-) von 2,5 μ M CuSO₄ im BG11-Medium bei Schwachlichtbedingungen von 20 μ mol Photonen m⁻² s⁻¹ kultiviert wurden. Die Zellen wurde auf eine OD_{750nm} = 0,44 verdünnt und die Spektren in einem Photometer mit integrativer Sphäre (Ulbricht, 1920) aufgezeichnet. Lokale Maxima bei 625 und 685 nm repräsentieren die Absorptionsmaxima von Phycocyanin und Chlorophyll *a*.

(C) Aktivität der δ -Aminolävulinsäure-Synthase in WT, *ycf54* und *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen, die unter Bedingungen für die Expression von FLAG-Ycf54 wuchsen. Die Quantifizierung der Synthesekapazität erfolgte wie in Abschnitt 4.2.1.6 dargestellt.

Die Expression von FLAG-Ycf54 erlaubt eine vollständige Komplementierung der *ycf54*-Mutation in Hinblick auf die Akkumulation des Substrats der oxidativen Cyclase, MgProtoME und die Fähigkeit der Zellen, δ -Aminolävulinsäure zu bilden. Die Komplementierung führt aber nicht zur Wiederherstellung der Pigmentierung auf Niveaus des WT. Darüber hinaus scheint die genaue Menge an Ycf54-Protein in *Synechocystis*-Zellen einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Regulation und die Kapazität der Tetrapyrrol-Biosynthese zu besitzen.

2.2.7 *Synechocystis* Ycf54 und Ycf59 interagieren miteinander

Aus der immunologischen Analyse der an der Tetrapyrrol-Biosynthese beteiligten Proteine im (Abschnitt 2.2.5) ergibt sich die Fragestellung, ob eine direkte Interaktion zwischen Ycf54 und der Cyclase besteht. Die Technik der Co-Immunopräzipitation ist geeignet, um unter nativen Bedingungen interagierende Proteine zu finden und zu identifizieren. Voraussetzung hierfür ist unter anderem das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern gegen mögliche Interaktionspartner, eine Stöchiometrie zwischen den Partner, die eine spätere Identifikation zulässt und eine Interaktion von ausreichender Stabilität und Stärke, die über alle Schritte der Prozedur besteht. Sind diese Maßgaben zum größten Teil erfüllt, eignet sich insbesondere der FLAG-tag (Einhauer und Jungbauer, 2001), um in *Synechocystis* interagierende Proteine aufzudecken (Dühring *et al.*, 2006; Sobotka *et al.*, 2008).

Im Rahmen der Suche nach Interaktionspartnern der Cyclase wurden solubilisierete Proteinextrakte des *ycf54*/FLAG-*ycf54*-Stammes sowie eines FLAG-Ycf34 produzierenden Kontrollstammes (*ycf34*/FLAG-*ycf34*, Abschnitt 2.1.4.3) mit einer entsprechenden Affinitätsmatrix (anti FLAG M2 Agarose, Sigma-Aldrich) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Matrix wurden die gebundenen FLAG-Proteine und mögliche, interagierende Proteine von dieser Matrix in denaturierendem Probenpuffer eluiert. Die Eluate wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und immunologisch analysiert. Die jeweiligen FLAG-Fusionsproteine wurden mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen das FLAG-Epitop, detektiert, wie in Abbildung 31 dargestellt. Beide Proteine, FLAG-Ycf54 und FLAG-Ycf34, ließen sich im ausreichenden Maße konzentrieren (Abbildung 31). Darüber hinaus enthielt die Elutions-Fraktion des FLAG-Ycf54 Proteins die oxidative Cyclase-Untereinheit CycI (Abbildung 31); nachgewiesen durch die spezifische Immunreaktion der Antikörper gegen *Arabidopsis* CHL27, dem Homolog des cyanobakteriellen CycI-Proteins. Eine spezifische Interaktion von Ycf54 und dem HemH-

Protein konnte ausgeschlossen werden. Die sichere Identifikation der präzipitierten Proteine durch massenspektroskopische Untersuchungen misslang.

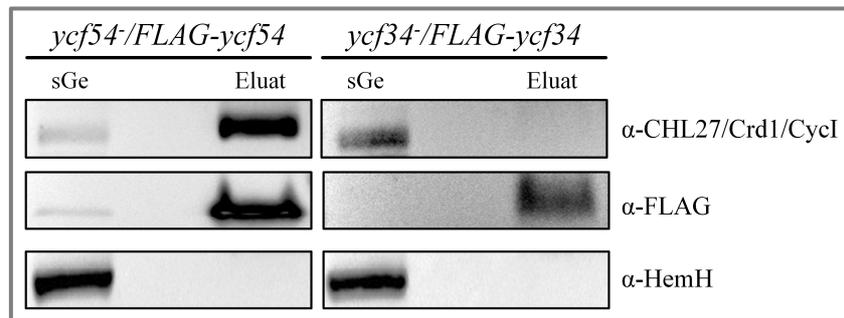


Abbildung 31: Affinitätsreinigung von FLAG-Ycf54

Reinigung von FLAG-Ycf54 über Affinitätschromatographie und Identifikation der MgProtoME-Cyclase CycI Untereinheit durch immunologische Detektion. Solubilisierete Gesamtextrakte (sGE) von *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen, welche das FLAG-Ycf54 Protein unter Kupfermangel exprimieren, wurden auf eine mit anti-FLAG M2 Agarose (Sigma-Aldrich) bestückte Chromatographiesäule gegeben. Im Anschluss an die zweistündige Inkubation wurden unspezifisch gebundene Proteine von der Affinitätsmatrix gewaschen. Komplexe aus FLAG-Ycf54 und spezifisch interagierenden Proteinen wurden von der Affinitätsmatrix durch eine 30-minütige Denaturierung bei 50°C in 1x SDS-Ladepuffer eluiert. Die Auftrennung der im Eluat befindlichen Proteine erfolgte in einem 16%igen SDS-Polyacrylamidgel mit 6M Harnstoff (Schägger und von Jagow, 1987), gefolgt von einem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran. Diese wurde anschließend mit Antisera gerichtet gegen CHL27 von *Arabidopsis*, den 3xFLAG-tag und Ferrochelatase (HemH) inkubiert. Die Detektion erfolgte über einen Chemilumineszenz-Assay unter Verwendung der konjugierten Meerrettich-Peroxidase des sekundären Antikörpers anti-Kaninchen-HRP-Konjugat oder des anti-FLAG-HRP-Konjugats. Alle verwendeten Antikörper sind an der rechten Seite gelistet. Solubilisierete Gesamtextrakte (sGE) von *ycf34/FLAG-ycf34*-Zellen, welche ein FLAG-Ycf34 Protein produzieren, wurden als Kontrolle verwendet.

Die hier gezeigt Co-Immunopräzipitation weist auf eine spezifische Interaktion zwischen den Genprodukten Ycf54 und Ycf59, der oxidativen Magnesium-Protoporphyrin XI monomethylester Cyclase, hin. Welche Rolle Ycf54 in dieser Interaktion spielt ist unklar. Mögliche Funktionen können die Bereitstellung von Ko-Faktoren, die Vermittlung von Interaktion mit anderen Enzymen der Tetrapyrrole-Biosynthese oder als Chaperon sein

3 Diskussion

In dieser Arbeit sollten die Funktionen von hypothetischen Chloroplasten-Leserahmen in einem photosynthetischen Modellorganismus untersucht und aufgeklärt werden. In der nachfolgenden Sektion werden die Ergebnisse dieser Analysen in Hinblick auf das Verständnis der Photosynthese und assoziierter Prozesse betrachtet.

3.1 Der hypothetische chloroplastidäre offenen Leserahmen *ycf34* von *Synechocystis*

Der hypothetische Chloroplasten-Leserahmen *ycf34* findet sich in allen Plastomen der Phycobilisomen enthaltenen Rotalgen und in den Genomen aller vollständig sequenzierten Cyanobakterien wieder. Sogar Genome von Cyanobakterien mit extrem stark reduzierter Größe enthalten dieses Gen, wie etwa Angehörige der Gattung *Prochlorococcus* oder UCYN-A (Partensky und Garczarek, 2010; Tripp *et al.*, 2010). Darüber hinaus lassen sich *ycf34*-Homologe in den Genomen von einigen Braunalgen entdecken (Cattolico *et al.*, 2008; Le Corguillé *et al.*, 2009), deren sekundärer Plastid von Rotalgen abstammt (Keeling, 2009). Die Konservierung über solch große phylogenetische Distanzen impliziert eine wichtige Funktion für das Ycf34-Protein, auch wenn keine Homologe von *ycf34* in Grünalgen oder höheren Pflanzen identifiziert wurden. Die Ycf34-Proteine aus verschiedenen Organismen weisen daneben einen hohen Grad an Konservierung der Gesamtlänge auf und alle besitzen fünf konservierte Cysteine, die einen metallischen Ko-Faktor binden können (Abbildung 3).

3.1.1 Genomischer Kontext und Transkription von *Synechocystis ycf34*

In bakteriellen Genomen liegen funktionell zusammengehörende Gene häufig in Operonstrukturen vor (Lawrence, 2002), die eine effiziente und hoch adaptive Expression der Genprodukte ermöglichen. *Synechocystis* unterscheidet sich in dieser Hinsicht von anderen Bakterien durch eine verminderte Anzahl von Operonstrukturen, deren konservierte Gene weiter voneinander entfernt liegen als in anderen prokaryotischen Genomen (Price *et al.*, 2005). Die direkte Nachbarschaft und Orientierung von *slr0844/ndhF1*, Untereinheit des NADH-Dehydrogenase-Komplexes NDH-I, zu *ycf34* suggeriert ein mögliches Gencluster dieser beiden Gene. Zur Klärung der Frage, ob das *Synechocystis ycf34*-Gen zusammen mit *ndhF1* transkribiert wird, wurden Daten aus einer 454-*pyrosequencing* basierten Analyse des Transkriptoms von *Synechocystis* verwendet (Mitschke *et al.*, 2011). Die hier verwendete Analyse erlaubt die Differenzierung von primären Transkripten und prozessierten Enden. Diese Daten und die parallele Bestimmung des Transkriptionsinitiationsortes von *ycf34* in

dieser Arbeit weisen auf eine eigenständige Transkription des Gens hin (Abbildung 4). Die Ergebnisse demonstrieren darüber hinaus, dass das benachbarte *ndhF1*-Gen von seinem eigenen Promoter transkribiert wird. Zudem liegt das *ndhF1*-Gen nur in *Synechocystis* in direkter Nachbarschaft zu *ycf34*. Das andere benachbarte Gen, *pcnB* findet sich weit häufiger an derselben Position in den Genomen von Cyanobakterien wieder.

Das *Synechocystis ycf34*-Gen wird unabhängig von der Belichtungsintensität transkribiert (Abbildung 4B). Expressionsdaten aus verschiedenen Microarray-Experimenten zeigen, dass sich die Transkriptakkumulation der *Synechocystis ycf34* mRNA durch abiotische Faktoren wie CO₂ und N-Verfügbarkeit oder hochenergetische UV-B-Strahlung verändert (Huang *et al.*, 2002; Osanai *et al.*, 2006; Aguirre von Wobeser *et al.*, 2011). Die von Mitschke *et al.* gezeigte leichte Reduktion der Transkriptakkumulation bei hohen Lichtintensitäten konnte mit der *Northern Blot*-Analyse (Abbildung 4B) nicht bestätigt werden. Die Ursache für diese Diskrepanz liegt vermutlich in der Dauer und in der Intensität der verwendeten Belichtung. Die Anpassung von *Synechocystis*-Zellen an starke Lichtintensitäten umfasst eine Phase der kurzfristigen Adaptation und eine mittel- bis langfristige (Hihara *et al.*, 2001). Die Experimente von Mitschke und Mitarbeiter zielen auf die kurzfristige Phase innerhalb einer Stunde ab und verwenden zudem Licht doppelter Intensität. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten stellen die Akkumulation des *ycf34*-Transkripts nach einer 24-stündigen Anpassungsphase an hohe Intensitäten dar.

3.1.2 Inaktivierung von *Synechocystis ycf34*

Das *ycf34*-Gen von *Synechocystis* wurde zur funktionellen Charakterisierung inaktiviert. Die Mutation ist vollständig segregiert. Das Gen ist nicht essentiell für den Organismus und gehört zu zahlreichen *ycf*-Genen, wie *ycf4*, *ycf37* und *ycf64*, die in *Synechocystis* keine essentielle Funktion besitzen (Wilde *et al.*, 1995; Wilde *et al.*, 2001; Lopez-Maury *et al.*, 2009). Es gibt aber eine Vielzahl von *ycf*-Genen, die essentiell für *Synechocystis*-Zellen sind und nicht vollständig inaktiviert werden können (Ashby und Mullineaux, 1999; Minamizaki *et al.*, 2008; Marbouty *et al.*, 2009; Peter *et al.*, 2009): u.a. *ycf27/rre26/rpaB*, *ycf50/sepF* oder *ycf59/cycl/chlA_I*. Desweiteren gibt es auch einige *ycf*-Gene, die wie *ycf28/ntcA* nur für *Synechocystis* essentiell (Garcia-Dominguez *et al.*, 2000) sind und sich in anderen Cyanobakterien wie *Anabaena* sp. PCC7120 oder *Synechococcus elongatus* PCC7942 (*Synechococcus*) ausschalten lassen (Vega-Palas *et al.*, 1992). Andere Leserahmen wiederum werden nur unter ganz bestimmten Bedingungen transkribiert: z.B. *ycf18/nblA*, das in den koordinierten Abbau der Phycobilisomen bei Stickstoffmangel involviert ist (Karradt *et al.*,

2008). Deren Inaktivierung verursacht keine Abweichungen vom WT-Phänotyp unter anderen Bedingungen wie einem Mangel an spezifischen Nährstoffen oder Veränderung der Qualität und Quantität des Lichts. Die Unterbrechung des *ycf34*-Gens in *Synechocystis* verursacht ebenfalls keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zum WT unter den untersuchten Standardbedingungen (30°C, 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Auswirkungen auf den Phänotyp, bedingt durch die Zerstörung des Leserahmens, wurden erst sichtbar, als die Intensität des verwendeten Lichtes auf ein Minimum (3,5 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) reduziert wurde. Unter diesen Bedingungen enthalten Zellen der *ycf34*-Mutante weniger Phycobiliproteine als vergleichbare WT-Zellen (vgl. Tabelle 4). Die Reduktion betrifft nur die Phycobiliproteine, nicht aber die Menge der PS, wie entsprechende Quantifizierungen der photosynthetischen Pigmente und 77K Fluoreszenzspektroskopie (siehe Abbildung 11) zeigten. In Folge dessen sinkt die Fähigkeit der Zellen, effizient Licht in ausreichendem Maße zu sammeln. Konsequenterweise demonstrieren *Synechocystis*-Zellen ohne Ycf34 einen massiven Wachstumsdefekt unter diesen Lichtintensitäten, mit Verdopplungszeiten im Bereich von Tagen (157 \pm 42 h). Die Verdopplungszeiten der WT-Zellen (76 \pm 12 h) sind dabei vergleichbar mit anderen Veröffentlichungen, die ähnlich geringe Beleuchtungsintensitäten verwendeten. So ließ sich für den *Synechocystis* WT im Rahmen der Analyse des *rpaC*-Gens (*regulator of phycobilisome association C*) zeigen, dass ein Wachstum sogar bei 2 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ möglich ist (Emlyn-Jones *et al.*, 1999); die Verdopplungszeit des WT lag bei 75 h. Das verlangsamte Wachstum der *Synechocystis rpaC*-Mutante (circa 95 h) ist zusätzlich abhängig von der Wellenlänge der Lichts. Die *ycf9/psbZ*-Mutante (Bishop *et al.*, 2007) ist ein weiteres Beispiel für reduziertes Wachstum, welches nur unter schwachen Lichtintensitäten augenscheinlich wird. Die Inhibierung des Wachstums in *ycf34*-Zellen konnte durch erhöhte Konzentrationen an CO₂ nur geringfügig vermindert werden. Ebenso erfolgte keine Kompensation der reduzierten Phycocyanin und Allophycocyanin-Gehalte unter diesen Bedingungen. Bei Belichtung mit hohen Lichtintensitäten traten keine Veränderungen auf (Daten nicht gezeigt). *ycf34*-Zellen erreichen bei hohen CO₂-Konzentrationen und hohen Lichtintensitäten maximale Wachstumsraten ähnlich wie der WT (Verdopplungszeiten von 9 h). Die Werte sind mit publizierten Daten vergleichbar (Ohkawa *et al.*, 2000; Liu und Curtiss, 2009).

Zum Ausschluss pleiotroper Effekte, bedingt durch die Insertion des Kanamycin-Resistenzgens in die genomische Region von *ycf34*, wurde die Mutante komplementiert. Dazu wurde die kodierende Sequenz von *ycf34* mit einem 3xFLAG-*tag* zur späteren immunologischen Detektion fusioniert, die Expression des FLAG-Ycf34 Proteins unter

Kontrolle des *petJ*-Promotors gestellt und dieses Konstrukt an eine neutrale Stelle in das Genom integriert. Der WT-Phänotyp wurde wieder hergestellt, wenn die komplementierten Zellen durch Kupfermangel das FLAG-Protein exprimieren (vgl. Abschnitt 2.1.4.3). Damit konnte deutlich gezeigt werden, dass die beobachteten phänotypischen Veränderungen ausschließlich auf die Inaktivierung von *ycf34* zurückzuführen sind.

3.1.3 Reduktion des Phycobilisomen-Gehaltes in *ycf34*-Zellen

Als Konsequenz der beobachteten Reduktion der Phycobiliproteine sind die Phycobilisomen der *ycf34*-Zellen verändert, sowohl in ihrer Größe als auch in der Komposition der Untereinheiten (siehe Abbildung 10). Gleichwohl ist die *ycf34*-Mutante in der Lage, intakte Phycobilisomen zu assemblieren, sowohl bei sehr schwachen als auch bei mittleren Intensitäten. Wurden Phycobilisomen aus *ycf34*-Zellen isoliert, die an sehr schwache Lichtintensitäten adaptiert waren, so wanderten die cyanobakteriellen Lichtsammelkomplexe langsamer im Saccharose-Gradienten und wiesen eine spezifische Reduktion des Linkerproteins CpcC2/L_R³⁰ auf. Das Muster der anderen Untereinheiten entspricht den Angaben aus der Literatur (Yamanaka und Glazer, 1980; Thomas *et al.*, 2006; Arteni *et al.*, 2009). Sato *et al.* (2010) untersuchten die Funktion des Hitzeschockproteins HtpG von *Synechococcus* und fanden dabei vergleichbare Änderungen an den Phycobilisomen in einer *htpG*-Mutante wieder. Im Gegensatz zu *Synechococcus*, wo HtpG spezifisch mit dem Linkerprotein CpcC2/L_R³⁰ interagiert, war es nicht möglich, eine direkte Interaktion von *Synechocystis* Ycf34 mit Komponenten der Phycobilisomen aufzudecken. Sowohl die immunologische Detektion des FLAG-Fusionsproteins in den Fraktionen entsprechender Saccharose-Gradienten (vgl. Abbildung 13) als auch Co-Immunopräzipitationen mit FLAG-Ycf34 lieferten keine Hinweise darauf (Daten nicht gezeigt). Daneben bestehen Unterschiede zwischen *Synechococcus* und *Synechocystis* hinsichtlich der Austauschbarkeit von Linkerproteinen. Die *Synechococcus* Linker CpcC2/L_R³⁰ und CpcC1/L_R³³ sind untereinander austauschbar und erlauben den Aufbau vollständiger Phycobilisomen (Bhalerao und Gustafsson, 1994). In *Synechocystis* ist dies nicht der Fall, wie Ughy und Ajlani (2004) zeigen konnten. Die Reduktion des Linkerproteins CpcC2/L_R³⁰ deutet auf Phycocyanin-*rods* hin, die nur aus dem mittleren und kernnahen Phycocyanin-Hexamere bestehen.

Der Großteil des Ycf34-Proteins wurde in der Membranfraktion von *Synechocystis* detektiert. Diese Lokalisation beruht entweder auf der vorhergesagten N-terminalen Helix, der Interaktion mit einem membranständigen Protein oder dem erst kürzlich entdeckten Effekt von zweiwertigen Kationen, die die Assoziation und Bindung von *Synechocystis* Proteinen

mit der Membran beeinflussen (Carmel *et al.*, 2011). Das Proteom von *Synechocystis* enthält etliche Proteine, die mit der Membran assoziiert sind, aber keine Transmembranhelix besitzen. Das *ycf79*-Gen (*psb28/psbW/sll1398*) kodiert das 13 kDa große Psb28/PsbW-Protein, ein Assemblierungsfaktor des PS II, welches ohne Transmembranhelix mit der Membran assoziiert (Dobáková *et al.*, 2009). Zudem konnte eine Migration von Ycf34 mit den photosynthetischen Komplexen und dem Cytochrom-*b₆f*-Komplex von *Synechocystis* gezeigt werden. Dieses Resultat liefert erste Hinweise auf eine mögliche Funktion innerhalb der energetischen Prozesse der Zelle.

Die verminderte Abundanz eines Proteins kann mehrere Ursachen haben: eine verminderte Stabilität bedingt durch einen erhöhten proteolytischen Abbau, eine Beeinträchtigung der Translation der mRNA oder Veränderungen der Transkription des zugrundeliegenden Gens. Letzteres wurde im Rahmen von *Northern Blot*-Analysen untersucht. Das *cpcBAC2CID*-Operon kodiert Komponenten der Phycobilisomen, die strukturellen Komponenten β/α -Phycocyanin sowie die Linkerproteine CpcC2, CpcC1 und CpcD. Die Analyse offenbarte eine drastisch reduzierte Akkumulation der drei Transkriptformen des *cpcBAC2CID*-Operons in der *ycf34*-Mutante (Abbildung 14A). Der verminderte Phycocyanin-Gehalt und die verkürzten Phycobilisomen-Strukturen sind sehr wahrscheinlich die Konsequenz einer verringerten Expression der Gene. Es besteht ein offensichtlicher Widerspruch zwischen der eigentlich notwendigen verstärkten Transkription des *cpcBACD*-Operons unter Schwachlichtbedingungen und der tatsächlichen. Wieder ist der Phänotyp abhängig von der Quantität des Lichts. So lassen sich identische Transkriptmengen in WT und Mutante bei mittleren Lichtintensitäten detektieren, einhergehend mit ähnlicher Pigmentierung (vgl. Tabelle 3). Zahlreiche Umweltfaktoren wie die Verfügbarkeit von Nährstoffen (CO₂, N, S) (Wang *et al.*, 2004a; Osanai *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008), die Quantität und Qualität des Lichts (de Lorimier *et al.*, 1992; Kalla *et al.*, 1993; Gutu und Kehoe, 2012) oder der Redox-Status des Plastochinon-Pools bestimmen die Expressionslevel der Phycocyanin-Gene (Alfonso *et al.*, 2000). Die Analysen der Transkription von Genen, die als Indikatoren für bestimmte Mangelbedingungen gelten (vgl. Abschnitt 2.1.4.7), demonstrieren, dass die verminderte Expression der Phycocyanin-Gene unter extrem schwachen Licht-Intensitäten keine Folge eines Mangels an Kohlendioxid oder Stickstoff ist. Zusätzliche Untersuchungen des Wachstums von *ycf34*-Zellen in Medium, welches spezifisch mit Ammonium oder Sulfat angereichert wurde, führten zu keiner Kompensation der reduzierten Phycocyanin-Gehalte (Daten nicht gezeigt).

3.1.4 Biochemische Eigenschaften von *Synechocystis* Ycf34

Das *ycf34*-Genprodukt wurde rekombinant in *E. coli* produziert, gereinigt und war bräunlich gefärbt. Dies verstärkte die bereits geäußerte Vermutung eines gebundenen Ko-Faktors. Die spektralen Eigenschaften deuten auf ein Eisen-Schwefel-Zentrum (Abbildung 20) hin, was durch die Quantifizierung der gebundene Eisen und Schwefel-Ionen noch bestärkt wurde. Die Messungen ergaben $1,06 \pm 0,15$ Eisenatomen und $0,81 \pm 0,02$ Sulfidionen pro Ycf34-Monomer; ein Eisen zu Schwefel-Verhältnis von etwa 1,29. Dieses Verhältnis ist aber zu gering für klassische Eisen-Schwefel-Zentren wie [2Fe-2S] oder [4Fe-4S]. Zusätzliche EPR-Untersuchungen in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Dr. Wolfgang Lubitz (MPI für Bioanorganische Chemie, Mülheim an der Ruhr) lieferten zunächst unschlüssige Ergebnisse. Die Daten mehrerer Mößbauer-Spektroskopien des gereinigten Ycf34-Proteins bestätigen hingegen die Präsenz eine [4Fe-4S]-Zentrum hin. Teilweise waren die bestimmten Konzentrationen an Eisen und Schwefel zu gering (mündliche Kommunikation). Es muss davon ausgegangen werden, dass die Assemblierung des Eisen-Schwefel-Zentrums nicht quantitativ erfolgt. Zudem wurde der Cluster während der Prozedur teilweise zerstört, wie aus einigen Messungen ersichtlich (Abbildung 21). Darüber hinaus führt die proteolytische Abspaltung des GST-tags und die Verwendung des selbigen zu einem nicht nativen N-Terminus des Ycf34-Proteins. Dieser könnte mit möglichen post-translationalen Modifikationen des ersten Formyl-Methionins interferieren (Drath *et al.*, 2009). So führen post-translationalen Modifikationen dazu, dass die α -Aminogruppe eines neuen, N-terminalen Tyrosins als sechster Ligand für die Koordination des *c*-Häms im Apo-Cytochrom *f* Protein der Chloroplasten von *Brassica rapa* subsp. *rapa* (Speiserübe) und von *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlamydomonas*) fungiert (Martinez *et al.*, 1994; Baymann *et al.*, 1999). Die Entdeckung, dass das Protein ein [4Fe-4S]-Zentrum besitzt, rückt eine mögliche Rolle von Ycf34 im Elektronentransport oder eine Redoxfunktion in den Fokus. Nach bisherigem Kenntnisstand besitzt das Ycf34 keine Homologie zu irgendeinem der bekannten Proteine mit Eisen-Schwefel-Cluster, wie Ferredoxine oder Rubredoxine. Proteine mit Eisen-Schwefel-Zentren können auch sensorische und regulative Funktion besitzen (Beinert und Kiley, 1999; Wang *et al.*, 2004b) oder katalysieren enzymatische Reaktionen und binden Substrate (Beinert und Kiley, 1999; Carroll *et al.*, 2005). Theoretische Vorhersagen und Modellierungen der sekundären Struktur von Ycf34 weisen auf eine Faltung hin, die an Teile der Thio-redoxin-Struktur angelehnt ist; sie sind aber mit einer Aussagewahrscheinlichkeit von nur 40% nicht

aussagekräftig genug (Kelley und Sternberg, 2009). Eine Funktion im Elektronentransport ist wahrscheinlich, aber zu nächst als spekulativ zu betrachten.

3.1.5 Veränderungen des photosynthetischen Elektronenflusses in *ycf34*-Zellen

Interessanterweise demonstriert die *Synechocystis* Δ *petC1* Rieske Mutante einen ganz ähnlichen Phänotyp wie *ycf34*-Zellen. Das Verhältnis von Phycocyanin zu Allophycocyanin ist reduziert (Tsunoyama *et al.*, 2009). Die Sauerstofffreisetzungsrates sind darüber hinaus aufgrund einer verminderten Abundanz von PS II und dem Cytochrom-*b₆f*-Komplex in der Mutante reduziert (Schneider *et al.*, 2004). Aufgrund der ähnlichen Phänotypen wurde die photosynthetische Aktivität von WT und *ycf34*-Zellen, die unter verschiedenen Lichtintensitäten wuchsen, durch die Messung der Sauerstofffreisetzungsrates und die Analyse der P₇₀₀-Kinetik untersucht. Diese Messungen offenbaren einen eingeschränkten Elektronentransport zwischen dem PQ-Pool und dem PS I, wenn *ycf34*-Zellen unter sehr geringen Lichtintensitäten wuchsen. Der Cytochrom-*b₆f*-Komplex ist möglicherweise mit dem *ycf34*-Phänotyp beteiligt. Es sind zahlreiche Mutationen der nicht-essentiellen Untereinheiten PetL, PetM (Schneider *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2007) oder assoziierten PetP-Komponente (Volkmer *et al.*, 2007) des Cytochrom-*b₆f*-Komplexes bekannt. Mutanten dieser Untereinheiten sind ebenso wie die Δ *petC1* Rieske Mutante durch die Einschränkung des Elektronentransports gekennzeichnet. Ycf34 könnte direkt oder indirekt mit dem Komplex interagieren. Erste Untersuchungen zur Assemblierung und Stabilität des Gesamtkomplexes (siehe Abbildung 16) konnten aber eine Beteiligung des Ycf34-Proteins an diesen Prozessen ausschließen. Es erscheint jedoch ratsam, diese Untersuchungen noch weiter zu vertiefen und auch die Akkumulation der akzessorischen Untereinheiten zu analysieren.

Eine Wechselwirkung von Ycf34 und dem Cytochrom-*b₆f*-Komplex bietet aber keine Lösung für die Frage, warum der Elektronenfluss zwischen PQ-Pool und PS I in *ycf34*-Zellen nur unter extrem schwachen Lichtintensitäten beeinträchtigt ist. Offensichtlich ist die postulierte Interaktion nur unter den spezifischen Schwachlichtbedingungen von Bedeutung für die Zellen. Normalerweise vergrößern Cyanobakterien die Größe ihrer Lichtsammelantenne indirekt proportional zur Intensität des Lichts und erhöhen damit die Absorptionskapazität der Lichtsammelkomplexe um den Mangel an Photonen zu kompensieren (Grossman *et al.*, 1993). Findet dieser Anpassungsprozess nicht statt, können weniger Photonen absorbiert werden. Die *ycf34*-Mutante besitzt weniger Phycocyanin und Allophycocyanin wenn sie bei geringsten Lichtintensitäten wuchs als unter mittleren. Konsequenterweise müssen diese Zellen einen großen Nachteil haben, ausreichend Licht zu absorbieren, da ihre

Lichtsammelkomplexe kleiner sind als erforderlich. Im Widerspruch dazu konnte eine verminderte Expression des *cpcBACD*-Operons gezeigt werden. Der Redox-Status des PQ-Pools und die Belegung der Bindestelle Q_0 haben neben den schon genannten Faktoren einen Einfluss auf die Transkription des Operons (Alfonso *et al.*, 2000). Die Transkription zahlreicher Gene wie *psbA2* (PS II D1_m-Protein) oder *ntcA* (*nitrogen control gene A*, globaler Stickstoffregulator) unterliegen unter anderem der Kontrolle des Redox-Status in *Synechocystis*-Zellen (Alfonso *et al.*, 2000; Alfonso *et al.*, 2001). Zudem führen Veränderungen des Redox-Status des PQ-Pools zu einer differentiellen Regulation der Gene von PS I und PS II. Die Reduktion des PQ-Pools erhöht die Transkriptmenge von *psaE* (PS I Untereinheit IV), die Oxidation des Pools zu einer Akkumulation der *psbA2* mRNA (El Bissati und Kirilovsky, 2001). Jede Beeinträchtigung des Elektronenflusses durch den Cytochrom-*b₆f*-Komplex führt zu einem PQ-Pool, der stärker reduziert ist (Schneider *et al.*, 2004; Volkmer *et al.*, 2007; Tsunoyama *et al.*, 2009). Der Redox-Status des PQ-Pools hängt aber auch von der Intensität des Lichts ab. Je niedriger die Intensität, desto mehr Plastochinol PQH₂ liegt innerhalb des PQ-Pools vor; bei Dunkelheit liegen etwa 57% in der reduzierten Form vor (Howitt *et al.*, 2001). Eine vollständige (Über)Reduktion des PQ-Pool wird nur bei Dunkelheit und in *Synechocystis*-Zellen erreicht, deren terminale Cytochrom *c* Oxidase inaktiviert wurde (Cooley und Vermaas, 2001). Dieser Zusammenhang sollte auch bei einem eingeschränkten Fluss von Elektronen durch den Cytochrom-*b₆f*-Komplex gelten. Bei mittlerer Intensität des Wachstumslichts kann das PS I in der *ycf34*-Mutante den PQ-Pool via Cytochrom-*b₆f*-Komplex in ausreichendem Maße oxidieren; die redox-abhängige Expression von Genen in WT und Mutante sollte gleich sein. Sind dagegen Photonen nur begrenzt verfügbar, reicht die PS I-Aktivität möglicherweise nicht mehr aus, um den reduzierten PQH₂-Pool zu oxidieren und um damit den verminderten Fluss durch den Cytochrom-*b₆f*-Komplex in der *ycf34*-Mutante zu kompensieren. Denselben Effekt verursacht die Inaktivierung des Rieske Proteins PetC1 (*ΔpetC1*) in *Synechocystis* bereits bei normalen Lichtintensitäten. Der PQ-Pool liegt somit überwiegend in der reduzierten PQH₂-Form vor, was zur Aktivierung einer regulatorischen Signaltransduktionskaskade führt. Als Konsequenz führt die verminderte Transkription des *cpcBACD*-Operons zu kleineren Phycobilisomen, was die energetische Unausgewogenheit der Zellen verschärft.

Der genaue Mechanismus der Signaltransduktion ist nicht aufgeklärt. So identifizierten Li und Sherman (2000) die Proteine RppA (*sll0797*) und RppB (*sll0798*), die ein Zweikomponentensystem (*two component regulatory system*) bilden, welches redox-abhängig die Transkription von PS I und PS II-Genen regulieren soll. Lopez-Maury *et al.* (2002)

zeigten ebenfalls, dass diese beiden Genprodukte in der Tat ein Zweikomponentensystem bilden; jedoch eine andere Funktion haben als von Li und Sherman dargestellt. Die Genprodukte NrsR (*sll0797*) und NrsS (*sll0798*) sind in die Detektion von Nickel involviert und steuern die Nickel-abhängige Expression des benachbarten *nrsBACD*-Operons, einem Teil des Resistenzgenclusters für Nickel, Zink und Kobalt in *Synechocystis*. Darüber hinaus berichteten Nakamura und Hihara (2006) sowie Horiuchi *et al.* (2010) über den Transkriptionsregulator PedR (*ssl0564*, LuxR-Typ), der durch Interaktion mit Thioredoxin eine Transkription von Genen in Abhängigkeit des photosynthetischen Elektronenflusses ermöglicht. Die Thioredoxin vermittelte Reduktion einer intermolekularen Disulfidbrücke im PedR-Protein führt zur Inaktivierung des Transkriptionsregulators. Diese Daten liefern Anhaltspunkte für mögliche Hypothesen zur Funktion von Ycf34. Das Protein könnte selber ein Transkriptionsfaktor sein oder direkt mit einem interagiert. Eine oder mehrere intermolekulare Disulfidbrücken können über die Cysteinreste von Ycf34 vermittelt werden und damit eine redoxabhängige Dimersierung analog zum PedR-Protein ermöglichen. Ob Ycf34 fähig ist, Nukleinsäuren zu binden, müsste ebenso experimentell analysiert werden wie Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren. Die Analyse der Aminosäuresequenz liefert hierzu keine Anhaltspunkte. Mikroarray-Analysen könnten ebenso dazu beitragen, detaillierten Einblick in die Funktionsweise von Ycf34 zu erhalten. Dazu müsste die Transkriptome von WT und *ycf34*-Mutante unter mittleren und extrem schwachen Lichtbedingungen miteinander verglichen werden. Möglicherweise ist ein Vergleich der Mutante unter beiden Bedingungen ausreichend, um primäre und sekundäre Effekte besser unterscheiden zu können.

3.2 *Synechocystis ycf59* und *ycf54*

3.2.1 Die oxidative Cyclase

Das Genom von *Synechocystis* enthält die beiden hypothetischen Chloroplasten-Leserahmen *sll1214* und *sll1874*, die jeweils für eine Isoform der oxidativen Magnesium-Protoporphyrin XI monomethylester Cyclase kodieren. Beide Proteine katalysieren zweifelsohne die Bildung des fünften Ringes von Mg-Porphyrinen. Das CycI-Protein fungiert dabei als alleiniges Enzym unter aeroben Bedingungen. Die Verminderung der zellulären Abundanz von CycI führt zur Akkumulation des Substrates MgProtoME, einem verringerten Chlorophyll-Gehalt und einem retardierten Wachstum unter aeroben Bedingungen. Minamizaki *et al.* (2008) konnten eine vollständige Segregation der *cycI*-Mutation durch Wachstum unter mikroanaeroben Bedingungen zeigen. Unter diesen Bedingungen wird die Isoform CycII exprimiert, die die Funktion von CycI ersetzen kann. Peter und Kollegen (2009) war dies hier nicht möglich. Ursachen für diese Diskrepanz sind in der Verwendung von verschiedenen WT-Stämmen und in den unterschiedlichen mikroanaeroben bzw. anaeroben Bedingungen in beiden Laboren zu suchen. Diese Widersprüchlichkeit bietet aber Anhaltspunkte für weiterführende Experimente zur Klärung der Fragestellung, wie eine vollständige Inaktivierung von *cycI* möglich ist. Eine erneute Sequenzierung der jeweiligen *cycI*-Mutantenstämme unter Verwendung modernen Hochdurchsatz-Sequenzierungstechniken und der Vergleich der Nukleotidabfolge könnten einzelne Basenaustausche in Promotoren und anderen regulativen Sequenzen aufdecken, die zu einer veränderten Transkription führen. Ebenso könnten damit Aminosäureaustausche in Proteinen aufgezeigt werden, die in Enzymen der Tetrapyrrol-Biosynthese zu Abweichungen führen: z.B. Affinitäten zum Substrat erhöht oder vermindert; die Bindung von Intermediaten verstärkt oder allosterische Regulationsmechanismen alterniert. So sind zahlreiche Pseudorevertanten bekannt, die die vollständige Inaktivierung von essentiellen Genen erlauben (Tichy und Vermaas, 2000; Wu *et al.*, 2001; Kufryk und Vermaas, 2003).

Die vollständige Inaktivierung von *cycII* demonstrierte keine Veränderungen des Chlorophyll-Gehalts oder Anhäufungen von Substraten unter aeroben Konditionen. Interessanterweise können Δ *cycII*-Zellen unter anaeroben Bedingungen wachsen; Die Akkumulation von MgProtoME in diesem Stamm ist jedoch ein Indiz dafür, dass CycI unter diesen Bedingungen nicht adäquat funktioniert oder eine geringere Aktivität aufgrund der verminderten Sauerstoffkonzentration hat. Ein geringes Sauerstoffniveau induziert die Transkription des *cycII*-Gens (Minamizaki *et al.*, 2008; Peter *et al.*, 2009). Der genaue Mechanismus war bis

vor Kurzem nicht vollständig verstanden. Aoki und Mitarbeiter konnten kürzlich jedoch zeigen (Aoki *et al.*, 2011), dass der Transkriptionsregulator ChlR (*sll1512*) vom Mar-Typ notwendig ist, um die Gene *cycII*, *hemN* und *ho2* (*sll1874-sll1876*) unter anaeroben Bedingungen zu induzieren. Dies erlaubt die effiziente Synthese von Chlorophyll und Häm unter allen Bedingungen. Die Expression von zwei Isoformen ein und desselben Enzyms in Abhängigkeit von Umweltfaktoren ist weitverbreitet in photosynthetischen Organismen. Der gemeinsame Teil der Tetrapyrrol-Biosynthese enthält zahlreiche Schritte, die abhängig vom Sauerstoffgehalt durch zwei verschiedene Enzyme katalysiert werden. Die *Synechocystis*-Gene *hemN* (*sll1876*) und *hemF* (*sll1185*) kodieren die anaerobe bzw. aerobe Coproporphyrinogen III Oxidase (Goto *et al.*, 2010), die Gene *ho2* (*sll1875*) und *ho1* (*sll1184*) für die anaerobe bzw. aerobe Hämoxygenase (Aoki *et al.*, 2011), wobei die Sauerstoff-unabhängigen Enzyme nur unter mikro-oxischen Bedingungen transkribiert werden. Ähnliche regulative Mechanismen, nur in Abhängigkeit von Kupfer, wurden für die oxidative Cyclase von *Chlamydomonas* beschrieben (Moseley *et al.*, 2000; Moseley *et al.*, 2002). Generell ist die Expression von Isoformen unter verschiedenen Bedingungen nicht nur auf Enzyme beschränkt. Die Isoformen des D1-Proteins des PS II werden etwa in Abhängigkeit von Sauerstoff oder der Quantität des Lichtes exprimiert. Durch mikroanaerobe Bedingungen wird die Transkription von *psbA1* (*slr1181*) aktiviert und D1' wird synthetisiert (Summerfield *et al.*, 2008), hohe Lichtintensitäten induzieren eine verstärkte Transkription von *psbA2* (*slr1311*) und besonders *psbA3* (*sll1867*) und erlauben so hohe Syntheseraten des D1_m-Protein (PsbA2 und PsbA3), wenn dieses durch hohe Intensitäten geschädigt wird und ausgetauscht werden muss (Mulo *et al.*, 2009).

Die funktionelle Redundanz sollte durch Komplementierung der jeweiligen Cyclase-Mutation (*cycI* und Δ *cycII*) untersucht werden. Die Quantifizierung der Mg-Porphyrine und Absorptionsspektren der komplementierten Stämme *cycI/FLAG-cycI*, *cycI/FLAG-cycII* sowie Δ *cycII/FLAG-cycII* lassen den Schluss zu, dass nur die zusätzliche Expression des homologen Proteins die Folgen der partiellen bzw. vollständigen Inaktivierung von *cycI* und *cycII* kompensiert. Der MgProtoME-Gehalt in *cycI/FLAG-cycI*-Zellen liegt auf dem Niveau des WT, sowohl bei hohen wie bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen. Der *cycI*-Phänotyp ließ sich nicht vollständig durch die zusätzliche Expression von FLAG-CycII kompensieren, egal unter welchen Bedingungen. Da beide Isoformen sich nicht vollständig gegenseitig ersetzen können, muss man davon ausgehen, dass beide Enzyme unterschiedlich zur Cyclisierungsreaktion unter den getesteten Bedingungen beitragen. Die genaue Stöchiometrie von CycI und CycII scheint daher unter mikroanaeroben Bedingungen relevant zu sein.

3.2.2 Ycf54, die fehlende Untereinheit der oxidativen Cyclase

Der genetische Locus *slr1780* von *Synechocystis* ist bereits der dritte hypothetische Chloroplasten-Leserahmen, dessen Genprodukt eine essentielle Funktion innerhalb der Tetrapyrrol-Biosynthese einnimmt. Das Ycf53-Protein von *Synechocystis* ist das cyanobakterielle Homolog des pflanzlichen GUN4-Proteins (Wilde *et al.*, 2004; Sobotka *et al.*, 2008), ein regulatorisches Protein, welches die Aktivität der Magnesiumchelatasase stimuliert und Protoporphyrin XI sowie Mg-Protoporphyrin XI bindet. Seine Inaktivierung resultiert in einer reduzierten Aktivität der Magnesium- und Ferrochelatasase (Sobotka *et al.*, 2008) und in der 5-10x fachen intrazellulären Akkumulation von Protoporphyrin IX. Dieses geringe Toleranzniveau wird von einer massiven Exkretion von Protoporphyrin IX ins Medium begleitet. Das Ycf59-Protein ist das *acsF*-Ortholog in *Synechocystis* mit zwei Genkopien, *cycI* (*sll1214*) und *cycII* (*sll1874*) (Peter *et al.*, 2009). Beide Gene kodieren eine der postulierten Untereinheit der oxidativen Cyclase, deren Expression jedoch differentiell reguliert wird, abhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit. Während das *ycf53*-Gen für *Synechocystis* entbehrlich ist, besitzt *ycf59* essentiellen Charakter. Eine vollständige Segregation des mutierten, endogenen Locus ist nicht möglich. Diese Beobachtung trifft auch für den dritten hypothetischen Chloroplasten-Leserahmen *ycf54* zu.

Die Genome aller autotrophen Organismen, die oxygene Photosynthese betreiben, enthalten dieses Gen. Die phylogenetische Verbreitung impliziert eine wichtige Funktion innerhalb der Photosynthese. Versuche mittels photoautotropher oder mixotropher Wachstumsbedingungen eine vollständige Segregation der *ycf54*-Mutation in *Synechocystis* zu erreichen, schlugen fehl und zeigen, dass das Gen essentiell ist. Zahlreiche Gene, die Proteine der photosynthetischen Komplexe PS I, PS II und der Phycobilisomen kodieren, konnten in anderen Untersuchungen vollständig inaktiviert werden (Jansson *et al.*, 1987; Yu und Vermaas, 1990; Smart *et al.*, 1991; Smart und McIntosh, 1993; Ajlani und Vernotte, 1998; Ughy und Ajlani, 2004). Entsprechende Mutanten von *Synechocystis* können aufgrund der fakultativen Mixotrophie bei zusätzlicher Gabe von Zuckern wachsen (Vermaas *et al.*, 1986; Williams und Lester Packer, 1988; Anderson und McIntosh, 1991). Deshalb ist es nicht klar, warum einige Gene des Chlorophyll-Metabolismus nicht vollständig ausgeschaltet werden können. Es wäre denkbar, dass die teilweise Inaktivierung solcher Gene zur schwerwiegenden Störungen der Regulation des Gesamtstoffwechselweges führen. Diese wiederum könnten sich dann aufgrund der Vernetzung des Metabolismus negativ auf die Vitalität der Zellen auswirken.

Die partielle Inaktivierung von *ycf54* verursacht eine starke Anreicherung von MgProtoME, dem Substrat der oxidativen Cyclase, wie in der *cycI/ycf59*⁻ Mutante unter Schwachlichtbedingungen in Standard-BG11-Medium. Bei gleichen Wachstumsbedingungen tolerieren beide Stämme, *ycf54* und *cycI*, jedoch relative hohe Menge des Intermediates. Die Expression eines FLAG-Ycf54-Proteins im genetischen Hintergrund der *ycf54*-Mutation führt zu einer vollständigen Reduktion des MgProtoME-Gehalts in den Zellen und deutet damit auf eine vollständige Komplementierung der *ycf54*-Mutation im Reaktionsschritt der Cyclisierung hin. Die funktionelle Komplementierung führt jedoch zu keiner vollständigen Segregation der endogenen *ycf54*-Mutation; ein höherer Grad wird aber erreicht (vergl. Abbildung 26 und Abbildung 29). Einhergehend mit der Komplementierung auf Ebene der Substratakkumulation verursacht die Expression von FLAG-Ycf54 aber weitere, unvorhergesehene Effekte; die Reduktion der Chlorophyll und Phycocyanin-Gehalte in *ycf54*/FLAG-*ycf54*-Zellen. Diese atypische Änderung findet sich auch in WT-Zellen wieder, deren zellulärer Gehalt an Ycf54-Protein durch die Überproduktion von FLAG-Ycf54 erhöht wurde (Daten nicht gezeigt). Die Überproduktion von Ycf54 muss noch weitere Effekte unbekannter Art haben. Die Analysen des Transkriptoms von *Synechocystis* demonstrieren, dass das *ycf54*-Gen nur schwach transkribiert wird im Vergleich zum *cycI*-Gen. Diverse Untersuchungen zur differentiellen Regulation der Genexpression durch Umweltfaktoren wie hohe Lichtintensitäten, CO₂ oder O₂-Mangel zeigen vergleichbare Muster der Expression von *ycf54* und *cycI* (Hihara *et al.*, 2001; Eisenhut *et al.*, 2007; Summerfield *et al.*, 2008; Mitschke *et al.*, 2011). Sollten Ycf54 und CycI in einem stöchiometrischen Verhältnis vorliegen, so muss das Ycf54-Protein sehr stabil sein. Wenn das Protein seiner Transkription entsprechend nur in geringen Mengen in der Zelle vorkommt, dann könnte die ektopische Expression von Ycf54 andere Funktionen der Zelle stören.

Die immunologische Analyse von *ycf54*-Extrakten offenbarten Veränderungen in der Abundanz von Proteinen der Tetrapyrrol-Biosynthese und der photosynthetischen Komplexe. Die Menge an Cyclase-Protein und Ferrochelatase ist reduziert (Abbildung 28A); ein Bild vergleichbar mit der *cycI*-Mutante, die eine maximale Reduktion der CycI-Abundanz von 25% toleriert (Peter *et al.*, 2009). Als Konsequenz der verminderten Verfügbarkeit von Chlorophyll sind auch Proteine des PS I in ihrer Menge reduziert. Der Großteil der Chlorophyll-Moleküle einer *Synechocystis*-Zelle ist mit dem PS I assoziiert (Murakami und Fujita, 1988). Die beobachtete geringe Toleranz gegenüber verminderten Gehalten von CycI und Ycf54 steht im Einklang mit der Notwendigkeit, eine Akkumulation der photoreaktiven Tetrapyrrol-Intermediate zu verhindern. Die unterschiedlichen Grade der Toleranz gegenüber

der Anhäufung von Porphyrin und Mg-Porphyrin-Intermediate hängen von der Photoreaktivität der selbigen ab, von der Tatsache ob sie frei oder als Aggregate vorliegen, an Proteine gebunden sind oder aus der Zelle geschleust werden können (Mochizuki *et al.*, 2010).

3.2.3 Interaktion von Ycf54 und Ycf59, der oxidativen Cyclase

Frühere Studien zur Protein-Protein-Interaktion in *Synechocystis* lieferten keinerlei Hinweise auf eine Interaktion zwischen beiden Proteinen Ycf54 und CycI (Sato *et al.*, 2007). Die Untersuchungen basieren auf der *yeast two hybrid*-Methode (Fields und Song, 1989) und liefern für das *ycf54*-Genprodukt keinerlei positive Resultate. Nur für das CycI-Protein wurden mögliche Partner gefunden; davon zwei mit hoher Wahrscheinlichkeit (Kategorie A), die anderen mit geringer (Kategorie C und D). Eines der Proteine, Sll0814, ist eine 2-Methyl-6-Phytylbenzoquinon Methyltransferase und fungiert innerhalb der Tocopherol-Biosynthese (Shintani *et al.*, 2002). Eine *sll0814*-Mutante zeigt keine phänotypischen Änderungen in Bezug auf die Biosynthese von Chlorophyll. Das andere Protein, Slr1300, hat Ähnlichkeit mit einer 2-Octaprenyl-6-Methoxyphenol Hydroxylase, einem Enzym der Ubiquinon-Biosynthese.

Die beiden CycI-Isoformen ähneln mit Monooxygenasen verwandten Proteinen; beide besitzen ein Bindemotiv für Eisen in der katalytischen Domäne (Berthold und Stenmark, 2003). Weitere Untereinheiten der Cyclase wurden postuliert, die für die Reduktion der Oxygenase zuständig sind oder die die Assemblierung und Integrität des Komplexes bewerkstelligen. Versuche mithilfe von FLAG-CycI potentielle Untereinheiten der Cyclase bzw. sonstige interagierende Proteine zu identifizieren führten zu keinem verwertbaren Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Mögliche Ursachen hierfür könnten aus der Verwendung des FLAG-tags folgen. Dieser kann die Hydrophobizität des Cyclase-Proteins vermindern und damit eine veränderte Lokalisation bewirken oder einen negativen Einfluss auf Protein-Protein-Wechselwirkungen haben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch erstmalig eine physikalische Interaktion von Ycf54 und CycI konnte durch Ko-Immunpräzipitationsversuche demonstriert werden. Die Verifikation der Identität der durch Immunoblot-Analysen gefundenen Proteine mittels Massenspektrometrie steht aber noch aus.

Etlche enzymatische Schritte der Tetrapyrrol-Biosynthese beinhalten hochreaktive oder instabile Intermediate. Es erscheint daher sinnvoll, die empfindlichen Substrate, Intermediate und Produkte von der Umgebung abzuschirmen, wie bereits von Shlyk (1971) für die

Biosynthese von Chlorophyll postuliert wurde. Möglich wird dies durch Interaktion von aufeinanderfolgenden Enzymen, die somit ein direktes Durchreichen der Substrate (*substrate channelling*) erlauben (Huang *et al.*, 2001). So interagieren die beiden ersten Enzyme der Häm-Biosynthese, die Glutamyl-tRNA-Reduktase (HemA) und Glutamat-1-Semialdehyd 2,1-Aminomutase (HemL), in *E. coli* und *Chlamydomonas* miteinander und schützen das instabile Intermediat in ihrem Enzymkomplex (Lüer *et al.*, 2005; Nogaj und Beale, 2005). *Substrat channelling* wurde ebenso für den enzymatischen Komplex der Magnesiumchelatase des anoxygenen phototrophen Bakteriums *Rhodobacter capsulatus* postuliert (Sawicki und Willows, 2010). Die Kristallstruktur der Tabak Protoporphyrinogen IX Oxidase suggeriert eine Komplexbildung mit der vorhergehenden Coproporphyrinogen III Oxidase und der nachfolgenden Ferrochelatase (Koch *et al.*, 2004). Eine solche Protein-Protein-Interaktion von Enzymen der Tetrapyrrol-Biosynthese konnte für die Protoporphyrinogen IX Oxidase und Ferrochelatase des thermophilen Cyanobakteriums *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 bestätigt werden (Masoumi *et al.*, 2008). Eine entsprechende Interaktion für das *Synechocystis*-Homolog der Protoporphyrinogen IX Oxidase (*slr1790/hemY*) wurde postuliert (Kato *et al.*, 2010). Die Aminosäuresequenz des Ycf54-Proteins liefert keine Anhaltspunkte wie Bindestellen für NAD(P)H oder FAD für die Eigenschaften einer Reduktase. Ebenso lassen sich aus der Kristallstruktur des *Anabaena*-Homologs keine Rückschlüsse auf die Funktion ziehen. Ausgehend von der Lokalisation des Ycf54-Proteins in der Thylakoidmembran und dem Fehlen von Anhaltspunkten einer zugewiesenen Funktion lassen sich Hypothesen zur Funktion aufstellen. Das Ycf54-Protein könnte eine unbekannte Art von Reduktase sein, die keine Homologie zu bestehenden Typen hat. Ebenso möglich wäre eine Rolle als Bindeprotein für eines der Intermediate der Cyclase-Reaktion oder eine Rolle vergleichbar mit dem akzessorischen Protein der Ferrochelatase Gun4/Ycf53. Eine dritte Möglichkeit wäre die Koordination von Protein-Protein-Interaktion zwischen den Cyclase-Proteinen und/ oder zwischen der Cyclase und den vorstehenden bzw. nachfolgenden Enzymen innerhalb des Tetrapyrrol-Biosynthesewegs durch das hier beschriebene und Ycf54-Protein.

4. Material und Methoden

4.1 Material

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte und Reagenzien werden im folgenden Kapitel beschrieben. Allgemeine Labor- und Verbrauchsmaterialien wie z.B. Glasgefäße, Reaktionsgefäße, Petrischalen, Pipettenspitzen und Folien sind nicht gesondert aufgeführt.

4.1.1 Chemikalien

Die zur Durchführung der beschriebenen Arbeiten im Labor verwendeten Chemikalien wurden bei den folgenden, in Tabelle 11 aufgeführten, Lieferanten bezogen.

Tabelle 11: Lieferanten von Chemikalien und Gebrauchslösungen

| Lieferant | Adresse |
|---|--|
| Carl Roth GmbH + Co. KG (Carl Roth) | Schoemperlenstrasse 3-5, 76185 Karlsruhe |
| Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Sigma-Aldrich) | Eschenstrasse 5, 82024 Taufkirchen bei München |
| Serva Electrophoresis GmbH (Serva) | Carl-Benz-Str . 7, 69115 Heidelberg |
| AppliChem GmbH (AppliChem) | Ottoweg 4, 64291 Darmstadt |
| Molekula GmbH | Karl-Weinmair-Str. 5, 80807 München |

4.1.1.1 Radiochemikalien

Die Firma Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig) lieferte die folgenden, in dieser Arbeit verwendeten Radionukleotide:

[$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP, spezifische Aktivität 6000 Ci/mmol

[$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP, spezifische Aktivität: 6000 Ci/mmol

4.1.2 Größenstandards

Die für die Elektrophorese von Nukleinsäuren und Proteinen eingesetzten Größenstandards zur Abschätzung der molekularen Masse sind in der Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Größenstandards für die Elektrophorese

| Standard | Hersteller |
|--|--|
| Proteinstandards | |
| <i>Page Ruler Prestained Protein Ladder</i> | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot (Fermentas) |
| <i>Protein Marker VI (10 – 245) prestained</i> | AppliChem |
| DNA-Standards | |
| λ -ClaI | |
| <i>GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder</i> | Fermentas |
| RNA-Standards | |
| <i>RiboRuler High Range RNA Ladder</i> | Fermentas |
| <i>RiboRuler Low Range RNA Ladder</i> | Fermentas |

4.1.3 Antikörper

Für die immunologische Detektion von Proteinen mithilfe der Western Blot Methodik (siehe Abschnitt 4.2.4.10) wurden die in Tabelle 13 aufgeführten Antikörper verwendet.

Tabelle 13: Verwendete Antikörper

| Antikörper | Eigenschaften | Verdünnung | Quelle |
|------------------------|--|------------------------|--|
| anti-FLAG-HRP-Konjugat | Maus-IgG, monoklonaler Primärantikörper M2 gerichtet gegen das FLAG-Epitop, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) | 1:3000 bzw. 1:10000 | Sigma-Aldrich |
| anti-FLAG-AP-Konjugat | Maus-IgG, monoklonaler Primärantikörper M2 gerichtet gegen das FLAG-Epitop, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (AP), Ca ²⁺ unabhängig | 1:5000 | Sigma-Aldrich |
| anti-Crd1 | Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen <i>Arabidopsis thaliana</i> CHL27 | 1:2500 | Agrisera AB, Vännäs, Schweden (Agrisera) |
| anti-HemH | Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen die <i>Synechocystis</i> Ferrochelatase HemH | 1:3000 | Pineda - Antikörper Service, Berlin |
| anti-ChlM | Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen die <i>Synechocystis</i> MgProto-Methyltransferase ChlM | 1:5000 | Hunter, C.N., University of Sheffield, Sheffield, UK |
| anti-PsaC | Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen ein in allen PsaC-Proteinen vorkommendes Peptid | 1:3000 | Agrisera |
| anti-PsaL | Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper | 1:3000 | Chitnis P.R., Iowa |

| Antikörper | Eigenschaften | Verdünnung | Quelle |
|-----------------------------|--|------------|--|
| | gerichtet gegen die <i>Synechocystis</i> PS I Untereinheit PsaL | | State University, Ames, USA |
| anti-PsbA | Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen die <i>Synechocystis</i> PS II Untereinheit PsbA | 1:3000 | Chitnis P.R., Iowa State University, Ames, USA |
| anti-AtpB | Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen die β -Untereinheit AtpB der <i>Synechocystis</i> F ₀ F ₁ -ATP-Synthase | 1:5000 | Irrgang K.D., Beuth-Hochschule für Technik, Berlin |
| anti-Cytf | Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen die -Cytochrom <i>f</i> Untereinheit des <i>Synechocystis</i> Cytochrom- <i>b₆f</i> -Komplexes | 1:5000 | Rögner M., Ruhr-Universität Bochum, Bochum |
| anti-Kaninchen-HRP-Konjugat | Ziegen-IgG, Sekundärantikörper gerichtet gegen die invariablen Ketten von Kaninchen-IgG, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) | 1:50000 | Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA |

4.1.4 Plasmide

Die Tabelle 14 listet alle grundlegenden Plasmide, auf denen die in dieser Arbeit generierten Konstrukte basieren. Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide werden in den Abschnitten 4.2.2.16, 4.2.2.18 und 4.2.2.19 beschrieben.

Tabelle 14: Verwendete Plasmid

| Vektor | Bezeichnung | Referenz |
|--|--|-----------------------------------|
| pJET1.2/ <i>blunt</i> <i>Cloning Vector</i> | <i>blunt</i> -Klonierungsvektor; Amp ^R ; 2974 bp | Fermentas |
| pGEM-T easy <i>Vector Systems</i> | TA-Klonierungsvektor; Amp ^R ; 3015 bp | Promega, Mannheim |
| pCR2.1-TOPO | TA-Klonierungsvektor; Amp ^R , Km ^R ; 3931 bp | Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| pGEX-6P-1 | Vektor zur heterologen Expression von Proteinen mit aminoterminalen GST- <i>tag</i> in <i>E. coli</i> ; 4984 bp | GE Healthcare, Freiburg |
| pSK9 | Vektor zur ektopischen Expression von Proteinen und ncRNAs in <i>Synechocystis</i> ; 5'-terminale Promotorfusion <i>PpetJ</i> ; Amp ^R , Cm ^R ; 6267 bp | S. Zinchenko, unveröffentlicht |
| pVZ321 | Mobilisierbarer <i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression in <i>Synechocystis</i> ; IncQ, <i>mob</i> ⁺ , Km ^R , Cm ^R ; 9231 bp | Zinchenko <i>et al.</i> (1999) |
| pUR-FLAG | pVZ321-Derivat; 5'-terminale Promotorfusion <i>PpetJ</i> und 3xFLAG- <i>tag</i> ; Km ^R , Sm ^R ; 9670bp | U. Ruppert, unveröffentlicht |
| RP4 | Helferplasmid für konjugativen Transfer von pVZ321-Derivaten in <i>Synechocystis</i> ; Amp ^R , Km ^R , Tet ^R ; Größe: 60099 bp | Haase <i>et al.</i> (1995) |

4.1.5 Enzyme

Die Tabelle 15 listet alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Reaktions-*Kits*. Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden ausschließlich von der Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) bezogen und sind nicht gesondert beschrieben. Die Verwendung der Enzyme erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung der jeweils mitgelieferten Reaktionspuffer.

Tabelle 15: Eingesetzte Enzyme und Reaktions-*Kits*

| Enzym | Hersteller |
|---|--|
| Fast-AP (<i>alkaline phosphatase</i>) | Fermentas |
| <i>Turbo</i> -DNase | Ambion, Austin, USA (Ambion) |
| Lysozym | Carl Roth |
| <i>CloneJET PCR Cloning Kit</i> | Fermentas |
| T4-DNA-Ligase | Fermentas |
| RNase A | Qiagen, Hilden (Qiagen) |
| RNase H | Fermentas |
| T4-RNA-Ligase | Epicentre Biotechnologies, Madison, USA (Epicentre) |
| <i>Tobacco acid pyrophosphatase</i> | Epicentre |
| <i>Superscript III Reverse Transcriptase</i> | Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| <i>Phusion High Fidelity DNA-Polymerase</i> | Finnzymes Oy, Vantaa, Finnland |
| Proteinase K | Fermentas |
| <i>Amersham Rediprime™ II DNA Labeling System</i> | GE Healthcare |
| <i>DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II</i> | Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim (Roche) |
| <i>RiboLock RNase Inhibitor</i> | Fermentas |
| <i>MAXIscript Kit</i> | Ambion |

4.1.6 Synthetische Oligonukleotide

Synthetische DNA- und RNA-Oligonukleotide wurden von den Herstellern Eurofins MWG Operon (Ebersberg), Sigma Aldrich (Taufkirchen) und BioMolekula (Kranzberg) bezogen. Zu Herstellung der jeweiligen Stammlösungen (Konzentration: 10 µM) wurde die DNA bzw. RNA nach Angaben des Herstellers in MQ-H₂O gelöst. Die Sequenz sowie besondere Merkmale der Oligonukleotide sind in der Tabelle 16 und Tabelle 17 hervorgehoben.

Tabelle 16: Synthetische DNA-Oligonukleotide (Primer)

| Bezeichnung | Sequenz (5'- ... -3') | Verwendungszweck | Funktionelle Elemente |
|-------------------------|--|--|---|
| <i>ycf34</i> -fw | TTTGCCCCGGTTCAAGAT | Klonierung <i>ycf34</i> , Kolonie-PCR | |
| <i>ycf34</i> -rev | AACCGTCCAAGGGGAAGATA | Klonierung <i>ycf34</i> , Kolonie-PCR | |
| NdeI- <i>ycf34</i> -fw | GCCTCATATGTTGTATTTGTGTGAACTGCC | Klonierung pSK9-FLAG- <i>ycf34</i> | <u>Unterstrichen:</u> NdeI-Erkennungssequenz |
| <i>ycf34</i> -BglII-rev | GAACAGATCTCTAGGTGGGGACTAATTCAT | Klonierung pSK9-FLAG- <i>ycf34</i> | <u>Unterstrichen:</u> BglII-Erkennungssequenz |
| BamHI- <i>ycf34</i> -fw | GGATCCTGTATTTGTGTGAACTGC | Klonierung pGEX-6P- <i>ycf34</i> | <u>Unterstrichen:</u> BamHI-Erkennungssequenz |
| <i>ycf34</i> -NotI-rev | ATGCGGCCGCGTTTCGCTGT | Klonierung pGEX-6P- <i>ycf34</i> | <u>Unterstrichen:</u> NotI-Erkennungssequenz |
| <i>ycf34</i> -seq-fw | CATGTGTATTTGTGTGAACTGCC | Kolonie-PCR, dsDNA-Sonde | |
| <i>ycf34</i> -seq-rev | GCTAGGTGGGGACTAATTCATTG | Kolonie-PCR, dsDNA-Sonde | |
| FLAG-fw | <u>TATGGATTATAAAGATCATGATGGCGATTATAAAGATCATGAT</u> <u>ATTGATTATAAAGATGATGATGATAAAGG</u> | Klonierung pSK9-FLAG- <i>ycf34</i> | <u>Unterstrichen:</u> 5'-TA Überhang, <i>Kursiv:</i> kodierende Sequenz des 3xFLAG-tags |
| FLAG-rev | <u>TACCTTTATCATCATCATCTTTATAATCAATATCATGATCTTA</u> <u>TAATCGCCATCATGATCTTTATAATCCA</u> | Klonierung pSK9-FLAG- <i>ycf34</i> | <u>Unterstrichen:</u> 5'-TA Überhang, <i>Kursiv:</i> kodierende Sequenz des 3xFLAG-tags |
| TerOOP-fw | GATCTAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTTATTA | Klonierung pSK9-FLAG- <i>ycf34</i> | |
| TerOOP-rev | GATCTAATAAAAAACGCCCGGCGGCAACCGAGCGTTA | Klonierung pSK9-FLAG- <i>ycf34</i> | |
| pSK9-F1 | TTTGTCATCCTCGACTGTGC | Kolonie-PCR | |
| pSK9-R | GGTCAAAGTTCAGCTTTCCT | Kolonie-PCR | |
| pSK9-ORF-fw | CTCCATAATACCTTCGCGTC | Kolonie-PCR | |
| pUR-rev | CTCCAGATGTATGCTCTTCTGCTC | Kolonie-PCR | |
| Flag-test fw | GATTATAAAGATCATGATGGC | Kolonie-PCR | |
| Flag-test rev | CCATCATGATCTTTATAATCC | Kolonie-PCR | |
| pGEX-fw | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG | Kolonie-PCR, Sequenzierung von GST-Fusionen in pGEX-6P-1 | |
| pGEX-rev | CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG | Kolonie-PCR, Sequenzierung von | |

Material und Methoden

| Bezeichnung | Sequenz (5'- ... -3') | Verwendungszweck | Funktionelle Elemente |
|-----------------------------|---|---|--|
| | | GST-Fusionen | |
| pJET1.2-fw | CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC | Kolonie-PCR | |
| pJET1.2-rev | AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG | Kolonie-PCR | |
| ycf54-seg-fw | GAAAGTTGGGCATTGACGAC | Kolonie-PCR | |
| sll1681-rev | GTGTTTCCCTCAAGTTTGTCCG | Kolonie-PCR | |
| BamHI-TerOOP-PstI | <u>GATCCAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATTCTGC</u> <u>A</u> | Vektorkonstruktion pUR | <u>Unterstrichen und kursiv:</u> kompatibles Ende für BamHI und PstI |
| TerOOP-reverse | GAATAAAAAACGCCCGGCGGCAACCGAGCGTTG | Vektorkonstruktion pUR | |
| SallI-P _{petJ} -fw | <u>GTCGACTACGCCCGGTAGTGATC</u> | Vektorkonstruktion pUR | <u>Unterstrichen:</u> SallI-Erkennungssequenz |
| EcoRI-FLAG-rev | <u>GAATTC</u> TTTATCATCATCAAATA | Vektorkonstruktion pUR | <u>Unterstrichen:</u> EcoRI-Erkennungssequenz |
| EcoRI-ycf54-fw: | <u>GAATTCGCTACCTATTATTATGCTTTGGC</u> | Klonierung pUR-FLAG-ycf54, Kolonie-PCR | <u>Unterstrichen:</u> EcoRI-Erkennungssequenz |
| BamHI-ycf54-rev: | GT <u>GGATCC</u> GATTGACCTTAGCTATG | Klonierung pUR-FLAG-ycf54, Kolonie-PCR | <u>Unterstrichen:</u> BamHI-Erkennungssequenz |
| ssr1425-rev1 | CTAGGTGGGGACTAATTCATTGG | 5'-RACE von ycf34 | |
| ssr1425-rev2 | GCGTAAACGGCTCCATTTGC | 5'-RACE von ycf34 | |
| linker-R1 | TGATCCAACCGACGCGAC | 5'-RACE | |
| linker-R2 | ACCGACGCGACAAGCTAATGC | 5'-RACE | |
| cpcA-int-fw | CCCCAGCTGGTATGTTGAAG | in vitro-Transkription | |
| T7-cpcC2-int-rev | <u>TAATACGACTCACTATAGGGCCGGTACTTCCGACAGA</u> <u>G</u> | in vitro-Transkription | <u>Unterstrichen:</u> T7-Promotorsequenz |
| glnA-fw | AAAACGAATTGGGCATCAAG | in vitro-Transkription | |
| T7-glnA-rev | <u>TAATACGACTCACTATAGGGGGT</u> TAGTGAAGCCAACAA | in vitro-Transkription | <u>Unterstrichen:</u> T7-Promotorsequenz |
| ndhF3-fw | CGGGGCTAGGGATGCGTTTT | dsDNA-Sonde | |
| ndhF3-rev | ACGACGGCTCCAAAGACCAC | dsDNA-Sonde | |

| Bezeichnung | Sequenz (5'- ... -3') | Verwendungszweck | Funktionelle Elemente |
|-------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| 16S-fw | AAGTCATCATGCCCCTTAC | dsDNA-Sonde | |
| 16S-rev | ATGGGATCCGCTTACTCTC | dsDNA-Sonde | |
| 5S-Oligo | CTTGGCATCGGACTATTGTGCCGT | Oligonukleotid-Sonde (5S rRNA) | |

Tabelle 17: Synthetische RNA-Oligonukleotide (Primer)

| Bezeichnung | Sequenz (5'- ... -3') | Verwendungszweck | Funktionelle Elemente |
|---------------|--|------------------|------------------------------------|
| 5'-RNA-Linker | GUGAUCCAACCGACGCGACAAGCUAAUGCAAGANN <u>N</u> | 5'RACE | <u>Unterstrichen:</u> wobble bases |

4.1.7 Sonstige Materialien

Die Tabelle 18 listet sonstige Materialien wie Säulen, Membranen und Filter, die in der Arbeit zur Anwendung kamen.

Tabelle 18: Filter, Membranen und Säulenwerkstoff

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|---|
| Membranen und Porenfilter | |
| Filterpapier | Carl Roth |
| Protran - Nitrocellulose Membran | Schleicher & Schell, Dassel |
| Roti-Nylon Plus Membran | Carl Roth |
| Roti-Labo Spritzenfilter (0,22 und 0,45 µm Porengröße) | Carl Roth |
| <i>Poly Prep Columns</i> für die Chromatographie (30 µm Porengrößen) | Bio-Rad Laboratories GmbH, München (BioRad) |
| <i>Vivaspin centrifugal filtration</i> | Sartorius Stedim Biotech, Aubagne Cedex, France |
| Säulenmaterial | |
| <i>Anti-FLAG M2 affinity gel</i> | Sigma-Aldrich |
| <i>Glutathione-Sepharose 4B columns</i> | Macherey-Nagel, Düren |
| <i>HiLoad 26/600 Superdex prep grade Columns</i> | BioRad |
| <i>QIAquick PCR/ Gel Purification Kit</i> | Qiagen |
| <i>QIAEX II Gel Extraction Kit</i> | Qiagen |
| <i>illustra MicroSpin G-50</i> | GE Healthcare |
| Glasperlen, 0,1-0,11 mm | Sartorius, Göttingen |
| Glasperlen, 0,25-0,5 mm | Carl Roth |

4.1.8 Technische Laborgeräte

Die Tabelle 19 listet alle verwendeten technischen Geräte und Gerätschaften auf.

Tabelle 19: Geräteliste

| Gerät | Gerätetyp | Hersteller |
|--------------------------------------|---|--|
| Flachbettschüttler | | GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel |
| Gasmischapparatur | red-y smart | Vögtlin Instruments AG, Aesch, Schweiz |
| Geldokumentationssystem | DeVision G | Decon Science Tec GmbH (Decon) |
| Horizontale Gelelektrophorese-Kammer | PerfectBlue Gelsystem S,M,L und L Revolution | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen (PEQLAB) |
| Hybridisierungsöfen | PerfectBlot, OV1 Standard | PEQLAB Biometra GmbH, Göttingen (Biometra) |

Material und Methoden

| | | |
|---|--|---|
| <u>Kühlzentrifugen:</u> | | |
| Rotor: | Universal 320R | Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen (Hettich); |
| Rotor: | Universal 420R | Hettich; |
| Rotor: SS34, GSA, F12S | RC 6Plus | Sorvall, DuPont, Bad Homburg (Sorvall) |
| Laborwaagen | ? | |
| Lichtstärkenmessgerät | LI190 <i>quantum sensor</i> LI250A <i>light meter</i> | LI-COR Environmental – GmbH, Bad Homburg |
| Magnetrührer | MR-Hei standard | Heidolph Instruments GmbH, Schwabach |
| PCR-Thermocycler | CFX96/C1000 T-Personal Gradient | BioRad; Biometra |
| Phospho Imager | Personal Molecular Imager | BioRad |
| Rotationsschüttler | Multi Bio RS-24 | PEQLAB |
| <i>Semi-dry-Blotting-</i> Apparatur | <i>Perfect Blue</i> <i>Semi-Dry M</i> | PEQLAB |
| <u>Spannungsquellen:</u> | | |
| Horizontale Elektrophorese | EV222 | PEQLAB; |
| Vertikale Elektrophorese | PowerPac universal | BioRad; |
| Elektro- <i>Blotting</i> | EV321 | PEQLAB |
| Spektrfluorimeter | Aminco-Bowman Serie AB2 | Spectronic Unicam, Leeds, Großbritannien |
| <u>Spektrophotometer:</u> | | |
| | UV-2401PC <i>Novaspec III</i> NanoDrop ND-1000 | Shimadzu, Kyoto, Japan; (Shimadzu) GE Healthcare; PEQLAB |
| Sterilarbeitsbank | HeraSafe | Heraeus, Hanau (Heraeus) |
| Tank-Blot-Apparatur | Mini Trans-Blot <i>cell</i> Maxi-Nass-Blot | BioRad; Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg (neoLab) |
| Thermo mixer | PocketBloc | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf |
| Thermoblock | TB1 | Biometra |
| Tischzentrifuge | Biofuge Pico | Heraeus |
| temperierbare Tischzentrifugen | Biofuge Fresco | Heraeus |
| Ultrazentrifuge | Sorvall Discovery 90 | Sorvall |
| UV-Quervernetzer | UV-Stratalinker 1800 | Agilent Technologies GmbH, Waldbronn |
| UV-Transilluminator | MD-25 | Wealtec Europe, Cambridge, Großbritannien |
| Vertikale Gelelektrophorese- Kammern | MiniPROTEAN tetra Cell PROTEAN II xi Cell | BioRad |

| | | |
|-----------|-----------|---|
| Vortexer | Paramix 3 | JULABO Labortechnik GmbH, Eisenbahnstrasse 45 Seelbach |
| Zellmühle | Typ MM200 | Retsch, Haan (Retsch) |

4.1.9 Datenbanken und Software

Im Rahmen dieser Arbeit kamen verschiedene Computerprogramme und Datenbanken zur Anwendung. Sie unterstützten die Bearbeitung und Analysen von Sequenzdaten, die *in silico* Vorhersage von Proteineigenschaften sowie die densitometrische Analyse von Detektionssignalen. Die Tabelle 20 listet diese auf.

Tabelle 20: Datenbanken und Software

| Software | Internet-Adresse/ Referenz | Anwendung |
|--------------------------|--|--|
| Artemis | Rutherford <i>et al.</i> (2000) | Visualisierung von Genomen und deren Annotation |
| ChromasLite | http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html | Analyse von Sequenzierungsdaten |
| ClustalW2 | Larkin <i>et al.</i> (2007) | Multiple Sequenzvergleiche |
| CyanoBase | http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase (Nakao <i>et al.</i> , 2010) | Sequenzdatenbank für Cyanobakterien |
| DoubleDigest | http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest/?country_code=DE | Datenbank zur Auswahl der Puffer von Restriktionsendonukleasen |
| ExPASy | http://expasy.org/proteomics | Bioinformatisches Portal für Proteine |
| GenBank | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/ | Sequenzdatenbank für DNA-Sequenzen |
| JalView | Waterhouse <i>et al.</i> (2009) | Editor für Multiple Sequenzvergleiche |
| Multalin | http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin.html | Multiple Sequenzvergleiche |
| NCBI-BLAST | http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (Altschul <i>et al.</i> , 1990) | Homologiesuche für DNA- und Protein-Sequenzen |
| OligoCalc | Kibbe <i>et al.</i> (2007) | Analyse und Eigenschaften von Primern |
| Phyre2 | http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index Kelley und Sternberg (2009) | Strukturvorhersage für Proteine |
| Protein Molecular Weight | http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html | Berechnung des theoretischen Molekulargewichts von Proteinen |
| Quantity One | BioRad | Densitometrische Analyse von Detektionssignalen |
| TM calculator | https://www.finnzymes.fi/tm_determination.html | Analyse und Eigenschaften von Primern spezifisch für die <i>Phusion</i> DNA-Polymerase |

| Software | Internet-Adresse/ Referenz | Anwendung |
|-----------|---|---|
| UniProtKB | http://www.uniprot.org/ | Molekularbiologische Datenbank für Proteine, Domänen und Familien |

4.1.10 Medien, Puffer und Stammlösungen

Die spezifische Zusammensetzung von Medien, Puffern und Lösungen sind in den jeweiligen Beschreibungen der Methoden in den nachfolgenden Abschnitten deklariert. Wässrige Lösungen wurden generell unter Verwendung von ddH₂O bzw. MQ-H₂O hergestellt. DEPC behandeltes MQ-H₂O zur Inaktivierung von Ribonukleasen wurde für Lösungen verwendet, die mit Arbeiten mit RNA im Zusammenhang stehen. Wurden andere Lösungsmittel als die zuvor genannten verwendet, so ist dies separat gekennzeichnet. Die Sterilisation durch heißen Dampf oder Filtration ist entsprechend vermerkt.

4.1.11 Mikroorganismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende *Escherichia coli* Stämme verwendet:

- DH5 α :** Genotyp: F-, ϕ 80*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *sdR17*(r_k^- , m_k^+), *phoA*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, λ -
Referenz: Hanahan *et al.* (1983)
Verwendung: Klonierungen
- BL21 (DE3):** Genotyp: F-, *ompT*, *hdsSB* ($r_B^-m_B^-$), *gal*
Referenz: Studier und Moffat (1986)
Verwendung: Expression von *Synechocystis*-Ycf34
- GM2163:** Genotyp: F- *dam-13::Tn9* (Cm^r), *dcm-6*, *hdsR2* ($r_k^-m_k^+$), *leuB6*, *hisG4*, *thi-1*, *araC14*, *lacY1*, *galK2*, *galT22*, *xylA5*, *mtl-1*, *rpsL136* (Str^r), *fhuA31*, *tsx-78*, *glnV44*, *mcrA mcrB1*
Referenz: Palmer und Marinus (1994)
Verwendung: Klonierungen mit Restriktionsendonukleasen, die Sensitivität gegenüber der Methylierung von DNA zeigen
- J53 (RP4):** Genotyp: R+, *met*, *pro* (RP4: *Amp*, *Tc*, *Km*, *Tra+*, *IncP*)
Referenz: Clowes und Rowley (1954)

Folgende *Synechocystis*-Stämme wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

***Synechocystis* sp. PCC 6803:**

Synechocystis sp. PCC 6803 ist ein gram-negative, einzelliges, nicht-diazotrophes, fakultativ heterotrophes Cyanobakterium der Ordnung *Chroococcales*. Die Größe des chromosomalen Genoms umfasst 3,57 Megabasen und 3317 annotierte offene Leserahmen (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/Synechocystis>; 25.07.2012). Der hauptsächlich in dieser Arbeit benutzte WT-Stamm wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Sergey V. Shestakov (Lehrstuhl für Genetik, Staatliche Universität Moskau, Russland) zur Verfügung gestellt. Dieser Stamm besitzt eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme exogener DNA durch Typ 4 Pili und zeigt phototaktische Motilität. Ein anderer WT-Stamm ohne phototaktische Motilität und weiteren spezifischen Besonderheiten (Kaneko *et al.*, 1996; Tajima *et al.*, 2011) wurde von Prof. Ikeuchi von der (Universität Tokio, Japan) bezogen.

Zu Beginn dieser Arbeit standen folgende Mutanten zur Verfügung:

cycI

Generiert durch Danny Jeske (2006, AG Wilde) durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzgen-Kassette in den genomischen Locus *sll1214* (*cycI*, *chlAI*) über eine einzelne Schnittstelle der Restriktionsendonuklease SmaI. Diese Mutante ist nicht vollständig segregiert.

ΔcycII

Generiert durch Danny Jeske (2006, AG Wilde) durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzgen-Kassette in den genomischen Locus *sll1874* (*cycII*, *chlAII*) über zwei Schnittstellen der Restriktionsendonuklease BsaBI bei gleichzeitiger Deletion eines Teils der kodierenden Sequenz. Diese Mutante ist vollständig segregiert.

cycI/FLAG-cycI

Generiert durch Dr. Ulf Dühning (2007, AG Wilde) durch Transformation von *Synechocystis cycI*-Zellen mit dem Plasmid pSK9-FLAG-*cycI*. Dieses ermöglicht die ektopische Expression des CycI-Proteins als N-terminale Fusion mit einem 3xFLAG-tag unter Kontrolle des Promotors des Cytochrom C₅₅₃-Gens *petJ* (genomischer Locus *sll1796*), welcher durch Kupfermangel im Medium induziert wird. Das FLAG-*cycI*-Konstrukt integriert über homologe Rekombination in die intergenische Region zwischen den Genen *slr1597* (*chromosome partitioning* ATPase) und *sll1514* (16,6 kDa *small heat shock protein*). Das zugrundeliegende Plasmid pSK9 wurde freundlicherweise von S. Zinchenko (Staatliche Universität Moskau, Russland) zur Verfügung gestellt.

cycI/FLAG-cycII

Generiert durch Dr. Ulf Dühring (2007, AG Wilde) durch Transformation von *Synechocystis cycI*-Zellen mit dem Plasmid pSK9-FLAG-*cycII*, welches die ektopische Expression des CycII-Proteins als N-terminale Fusion mit einem 3xFLAG-*tag* unter Kontrolle des Promotors *PpetJ* ermöglicht.

ΔcycII/FLAG-cycII

Generiert durch Dr. Ulf Dühring (2007, AG Wilde) durch Transformation von *Synechocystis ΔcycII*-Zellen mit dem Plasmid pSK9-FLAG-*cycII*, welches die ektopische Expression des 3xFLAG-CycII-Proteins als amino-terminale Fusion unter Kontrolle des Promotors *PpetJ* ermöglicht.

ycf54

Generiert im Labor von Prof. Teruo Ogawa (Japan) durch Insertion einer Erythromycin-Resistenzgen-Kassette in den genomischen Locus *slr1780* (*ycf54*) über artifiziell erzeugte Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen BamHI und HindIII.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mutanten von *Synechocystis* erstellt, deren grundlegende Konstruktion in den Abschnitten 2.1.3, 2.2.1 und 2.2.3 genauer beschrieben sind.

4.2 Methoden

4.2.1 Allgemeine und physiologische Methoden

4.2.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) erfolgte aerob unter Standardbedingungen (Sambrook und Russell, 2001) in einem modifizierten LB- (*lysogeny broth*) Medium (Lennox, 1955). *E. coli*-Kulturen wurden bei 37°C entweder als Flüssigkultur im Schüttelinkubator bei 200 rpm oder auf einem LB-Agar-Festmedium in einem Anzuchtraum angezogen.

Die Selektion resistenter bzw. entsprechend transformierter Bakterien erfolgte durch die Zugabe der jeweiligen Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen zu den Medien: Ampicillin (Amp; 100 µg ml⁻¹), Chloramphenicol (Cm; 25 µg ml⁻¹), Kanamycin (Km; 20 µg ml⁻¹) und Streptomycin (Strp; 20 µg ml⁻¹).

- **LB-Medium** (Lennox), Roth, autoklaviert
- **LB-Agar** (Lennox), Roth, autoklaviert
- **Amp-Stammlösung**: 100 mg ml⁻¹ in 50 % (v/v) Ethanol
- **Cm-Stammlösung**: 25 mg ml⁻¹ in 96% (v/v) Ethanol
- **Km-Stammlösung**: 20 mg ml⁻¹, sterilfiltriert
- **Strp-Stammlösung**: 20 mg ml⁻¹, sterilfiltriert

4.2.1.1 Allgemeine Kultivierung von *Synechocystis*

Die Anzucht von *Synechocystis* erfolgte photoautotroph in BG11-Medium (Rippka *et al.*, 1979) bei 30 °C, sofern nicht anders vermerkt. Für die Stammhaltung wurden die in Abschnitt 4.1.11 aufgeführten *Synechocystis*-Stämme unter sterilen Bedingungen auf BG11-Medium ausgestrichen, welches mit 0,75 % (w/v) Bacto-Agar (Difco, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) verfestigt wurde, und bei 28 °C und kontinuierlicher Belichtung (Weißlicht, ~55 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Philips TLD Super80/840) kultiviert. Je ein Aliquot der generierten Mutanten wurde für die Langzeitkonservierung steril in 1 ml Kryo-Medium resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Anzucht von *Synechocystis*-Flüssigkulturen erfolgte in 100-200 ml Erlenmeyerkolben auf einem Flachbettschüttler (~150 rpm) oder in Glasfermentoren, bei kontinuierlicher Begasung mit steriler Raumluft oder Gasgemischen. Solche Flüssigkulturen wurden kontinuierlich mit Weißlicht (Philips TLD Super80/840) der folgenden Intensitäten bestrahlt: ~50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (mittlere Lichtintensität, ML), <20 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (schwache Lichtintensität, LL), >150 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (starke Lichtintensität, HL) oder $\leq 5 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (extrem schwache Lichtintensität, eLL). Die Messung der Lichtintensitäten erfolgte mittels des Sensors 190SA (LI-COR, Bad Homburg). Zur Selektion von Mutanten wurden den Medien die jeweiligen Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen hinzugefügt: Cm (7 $\mu\text{g ml}^{-1}$), Erythromycin (Ery; 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$), Km (80 $\mu\text{g ml}^{-1}$) und Strp (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

Abweichende Kultivierungsbedingungen im Rahmen der Analyse des Wachstums sowie zur Untersuchung weiterer physiologischer Parameter sind in den entsprechenden Abschnitten beschrieben.

1 x BG11-Kulturmedium

| | |
|--|-----------------------|
| 100 x BG11 | 10 ml l ⁻¹ |
| Na ₂ CO ₃ | 1 ml l ⁻¹ |
| K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O | 1 ml l ⁻¹ |
| Ammonium Eisen(III)-citrat | 1 ml l ⁻¹ |
| Spurenelemente-Mix | 1 ml l ⁻¹ |
| TES-Puffer (pH 8,0) | 10 ml l ⁻¹ |

100 x BG11, autoklaviert

| | |
|--|--------------------------|
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 3,6 g l ⁻¹ |
| Zitronensäure | 0,6 g l ⁻¹ |
| NaNO ₃ | 149,58 g l ⁻¹ |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 7,49 g l ⁻¹ |
| 0,25 M Na ₂ -EDTA (pH 8) | 0,56 ml l ⁻¹ |

Spurenelemente-Mix, sterilfiltriert

| | |
|--|-------------------------|
| H ₃ BO ₃ | 2,86 g l ⁻¹ |
| MnCl ₂ x 4 H ₂ O | 1,81 g l ⁻¹ |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,222 g l ⁻¹ |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 0,390 g l ⁻¹ |
| Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O | 0,049 g l ⁻¹ |
| CuSO ₄ x 5 H ₂ O | 0,079 g l ⁻¹ |

Weitere Stammlösungen für BG11, sterilfiltriert

| | |
|--|------------------------|
| Na ₂ CO ₃ | 20 mg ml ⁻¹ |
| Ammonium Eisen(III)-citrat | 6 mg ml ⁻¹ |
| K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O | 30 mg ml ⁻¹ |
| TES-Puffer (pH 8,0) | 1 M |

| | |
|-------------------|---|
| Kryo-BG11-Medium: | 0,5 x BG11; 8% (v/v) DMSO |
| Cm-Stammlösung: | 7 mg ml ⁻¹ in 96% (v/v) Ethanol |
| Ery-Stammlösung: | 20 mg ml ⁻¹ in 96% (v/v) Ethanol |
| Km-Stammlösung: | 40 mg ml ⁻¹ |
| Strp-Stammlösung: | 20 mg ml ⁻¹ |

4.2.1.2 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Flüssigkulturen erfolgte mithilfe eines Spektralphotometers (*Novaspec III Visible Spectrophotometer*, GE Healthcare; UV-2401PC, Shimadzu) bei einer Wellenlänge von 600 nm für *E. coli* bzw. 750 nm für *Synechocystis* in Plastikkuvetten. Als Referenz diente das jeweilige Anzuchtmedium.

4.2.1.1 Absorptionsspektren ganzer Zellen von *Synechocystis*

Absorptionsspektren von *Synechocystis*-Kulturen wurden an ganzen Zellen in BG11-Flüssigkulturen und bei RT im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 750 nm mit einem Spektralphotometer (UV-2401PC, Shimadzu) in Plastikkuvetten gemessen. Vor den Messungen wurde eine Basislinie gegen Luft aufgenommen. Wenn angezeigt, wurde eine integrierende Sphäre nach Ulbricht (1920) verwendet, um stark streuende Proben zu analysieren.

4.2.1.3 77K Fluoreszenzemissionsspektroskopie ganzer Zellen von *Synechocystis*

Die Fluoreszenzemissionsspektren von WT- und *ycf34*-Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei 77 K unter Verwendung gleicher Zellmenge ($OD_{730nm} = 0,2$) mit 2 μ M Rhodamin als interner Standard in einem Aminco-Bowman Serie AB2 Spektrofluorimeter (Spectronic Unicam, Großbritannien) aufgenommen. Zur spezifischen Anregung von Chlorophyll *a* wurde eine Anregungswellenlänge von 435 nm verwendet. Für die spezifische Anregung von Phycocyanin eine Anregungswellenlänge (λ_{ex}) von 590 nm, wobei ein *cut-off* Filter mit 620 nm zum Ausschluss des Anregungslichtes zum Einsatz kam. Die Spektren wurden auf das Maximum der Fluoreszenzemission von Rhodamin (573 nm) normiert, wenn Chlorophyll angeregt wurde oder auf die Emission von PS I (725 nm), wenn Phycocyanin angeregt wurde. Diese Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Roman Sobotka am Institut für Phototrophe Mikroorganismen (Třeboň, Tschechische Republik) durchgeführt.

4.2.1.4 Bestimmung der Pigmentzusammensetzung von *Synechocystis*

Die Bestimmung des Chlorophyllgehalts von ganzen Zellen erfolgte durch Extraktion mit 90% (v/v) Methanol, die Bestimmung des Chlorophyllgehalts von Zellextrakten (siehe 4.2.4.1) durch Extraktion mit 80% (v/v) Aceton. Die Berechnung der Menge an Chlorophyll

erfolgte aus den Absorptionsspektren der Extrakte gegen das entsprechende Lösungsmittel über folgende Formeln (MacKinney, 1941):

$$\begin{aligned} \text{Lösungsmittel 90\% (v/v) Methanol:} \quad \text{Chlorophyll } [\mu\text{g ml}^{-1}] &= \frac{\text{Verdünnungsfaktor} \cdot A_{\text{Chl}/665\text{nm}} \cdot 1000}{82} \\ \text{Lösungsmittel 80\% (v/v) Aceton:} \quad \text{Chlorophyll } [\mu\text{g ml}^{-1}] &= \frac{\text{Verdünnungsfaktor} \cdot A_{\text{Chl}/665\text{nm}} \cdot 1000}{86,86} \end{aligned}$$

Die Bestimmung des Phycocyanin- und Allophycocyanin-Gehalts (APC) erfolgte aus den Absorptionsspektren der löslichen Proteinfraction von Zellextrakten nach den unten genannten Formeln (de Marsac *et al.*, 1988):

$$\begin{aligned} \text{Phycocyanin } [\text{mg ml}^{-1}] &= \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \frac{[A_{\text{PC}/620\text{nm}} - (A_{\text{APC}/650\text{nm}} \cdot 0,7)]}{7,83} \\ \text{Allophycocyanin } [\text{mg ml}^{-1}] &= \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \frac{[A_{\text{APC}/650\text{nm}} - (A_{\text{PC}/620\text{nm}} \cdot 0,19)]}{5,65} \end{aligned}$$

Der Gesamtmenge an Protein von ganzen Zellen oder von Extrakten wurde durch eine modifizierte Variante der Lowry-Methode (Bensadoun und Weinstein, 1976) bestimmt und für die Normalisierung der Pigmentbestimmungen verwendet.

4.2.1.5 Quantifizierung von Intermediaten der Chlorophyll-Biosynthese

Die Bestimmung der zellulären Gehalte an Porphyrinen und Mg-Porphyrinen erfolgte von Zellen aus der exponentiellen Phase des Wachstums. Je zehn Milliliter solcher Kulturen wurden durch Zentrifugation (4°C, 6000 × g, 10min) geerntet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die Porphyrine wurden wie bei Peter *et al.* (2009) extrahiert und durch HPLC analysiert. Die dabei entstandenen Eluate wurden über ihre Fluoreszenz detektiert, wobei folgende Anregungs- (λ_{ex}) und Emissionswellenlängen (λ_{em}) zur Anwendung kamen (Tabelle 21):

Tabelle 21: Anregungs- und Emissionswellenlängen ausgewählter Magnesiumporphyrine

| Porphyrin/Chlorophyllvorstufe | λ_{ex} [nm] | λ_{em} [nm] |
|--|----------------------------|----------------------------|
| Protoporphyrin IX (Proto) | 405 | 625 |
| Mg-Protoporphyrin IX (MgProto) | 420 | 625 |
| Mg-Protoporphyrin IX monomethylester (MgProtoME) | 420 | 625 |

Die Porphyrine und Magnesiumporphyrine wurden durch die Verwendung von entsprechenden Standards (Frontier Scientific, Logan, USA) identifiziert und quantifiziert. Die Messung der Porphyrine und Chlorophyllvorstufen erfolgte in Zusammenarbeit mit der AG Pflanzenphysiologie am Institut für Biologie der Humboldt Universität Berlin.

4.2.1.6 Messung der Syntheserate von δ -Aminolävulinsäure

Die Messung der Synthesekapazität von δ -Aminolävulinsäure in *Synechocystis* WT und *ycf54*-Zellen erfolgte in Entsprechung zu Peter *et al.* (2009), ebenfalls in Zusammenarbeit mit der AG Pflanzenphysiologie am Institut für Biologie der Humboldt Universität Berlin.

4.2.1.7 Messungen der Sauerstofffreisetzung von *Synechocystis*

Die Sauerstofffreisetzung wurde von Zellkulturen in der exponentiellen Wachstumsphase ermittelt, die unter den angegebenen Bedingungen kultiviert wurden. Die Zellkulturen wurden auf einen einheitlichen Chlorophyllgehalt von $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ verdünnt. Die Messung erfolgte bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ unter gesättigter Weißlichtillumination (KL 2500, Schott, Mainz, $150 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), welches einen Rotglasfilter passierte. Die Veränderung der emittierten Fluoreszenz eines sauerstoffabhängigen Fluorophors wurde in einem entsprechenden Sauerstoffsensor mit Fiberglasoptik (PreSens, Regensburg) erfasst und die Sauerstofffreisetzungsrates durch die mitgelieferte Software berechnet. Die Intensität des Fluoreszenzsignals bei vollständiger Sauerstoffsättigung nach intensiver Luftdurchmischung von 5 ml Wasser und am Nullpunkt der Sauerstoffkonzentration nach Zugabe von Natriumdithionit dienten der Kalibrierung des Sensors. Die Messung der Sauerstofffreisetzung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Gábor Bernát am Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen der Ruhr-Universität Bochum.

4.2.1.8 Kinetik der P_{700} Oxidation, Re-Reduktion und PS I-Lichtkennlinien

Die Kinetik der P_{700} Oxidation und Re-Reduktion wurde mithilfe eines Dual-PAM 100 Systems (Heinz Walz GmbH, Effeltrich) aufgenommen. Der Durchschnitt von je drei Einzelmessungen wurde gemittelt. Eine vollständige Oxidation des P_{700} wurde durch einen sättigenden Lichtblitz (30 ms , $10000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) erreicht. Die weiteren P_{700} Zustände, wie *steady state* (P), Maximum (P_m , P_m') und Null (P_o) wurden bei definierten Lichtintensitäten bestimmt. Auf Basis dieser Zustände wurden die Quantenausbeuten der photochemischen Energiekonversion im PS I [Y(I)] und die der nicht-photochemischen Dissipation von Energie aufgrund von Donorlimitation im PS I [Y(ND)] (Klughammer und Schreiber, 1994) von der Dual-PAM-Software berechnet (Klughammer und Schreiber, 2008). Dazu wurden die Intensität des aktinischen Lichts nach jeweils 30 s Anpassungszeit schrittweise von 0 bis $850 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ mit logarithmisch erhöht. Diese Messungen erfolgten ebenfalls in Zusammenarbeit mit Dr. Gábor Bernát am Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen der Ruhr-Universität Bochum.

4.2.1.9 Wachstumsanalysen von *Synechocystis*

Für die Aufnahme von Wachstumskurven wurden Zellen von *Synechocystis* WT und ausgewählten Mutanten in Fermentoren mit Luft bzw. 5% (v/v) CO_2 begast. Die Kulturen

wurden kontinuierlich belichtet. Die optische Dichte wurde bestimmt. Die Vorkultur erfolgte unter mittleren Lichtintensitäten (ML). Um phänotypische Effekte durch die Zugabe von Antibiotika zu vermeiden, wurden diese während der Wachstumsversuche dem Medium nicht zugesetzt. Zur Analyse des Wachstums wurden die Vorkulturen nach dem Erreichen einer optischen Dichte $OD_{750\text{ nm}} = 0,6-0,7$ auf 0,1 verdünnt. Anschließend wurden die Kulturen mit eLL oder ML belichtet.

4.2.1.10 Bestimmungen der Wachstumsraten

Zur Bestimmung der Wachstumsraten wurde die OD bei 750 nm über einen bestimmten Zeitraum protokolliert, wobei sich die Häufigkeit der Zeitpunkte an den Verdopplungszeiten der Zellen orientierte. Die Wachstumsrate innerhalb des exponentiellen Wachstums bestimmt sich dabei aus dem natürlichen Logarithmus der OD gegen die Zeit.

4.2.1.11 Degradation und *de novo*-Synthese der Phycobilisomen

Für die Kultivierung von WT und Mutanten unter Stickstoffmangel und gesättigten Bedingungen, die zum Abbau und zum Aufbau der akzessorischen Lichtsammelkomplexe, den Phycobilisomen führen, wuchsen die Vorkulturen in BG11-Medium und einer Beleuchtungsintensität von $25\ \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$. Die Zellen wurden dreimal mit BG11₀, ohne Natriumnitrat, gewaschen und auf eine $OD_{750\text{ nm}}$ von 0,4 verdünnt. Die Zellen wuchsen für weitere 24 Stunden in diesem Medium, wurden durch Zentrifugation gesammelt, in BG11 resuspendiert (17.6 mM Natriumnitrat als Stickstoffquelle) und für weitere 24 Stunden kultiviert. Absorptionsspektren von ganzen Zellen wurden jede Stunde in einem Spektrophotometer (UV2401-PC, Shimadzu), ausgestattet mit einer Ulbricht-Kugel zur Verminderung von Streuung, aufgezeichnet. Das Verhältnis von Phycocyanin zu Chlorophyll *a* wurde aus den Absorptionsspektren nach der folgenden Formel bestimmt (Myers *et al.*, 1980):

$$\frac{\text{PC}}{\text{Chl } a} = \frac{(1,0162 \cdot A_{\text{PC}}) - (0,2162 \cdot A_{\text{Chl}})}{(1,0162 \cdot A_{\text{Chl}}) - (0,063 \cdot A_{\text{PC}})}$$

4.2.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1 Spezifische DNA-Amplifikationen mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1986) wurde zur *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten aus dem Genom von *Synechocystis* sowie von Plasmid-DNA verwendet. Die *Phusion High Fidelity* DNA Polymerase (Finnzymes Oy) wurde aufgrund ihrer Korrekturlesefunktion (*proof-reading*) verwendet, um eine Synthese möglichst fehlerfreier PCR-Produkte für anschließende Klonierungen zu ermöglichen. Für weitere Anwendungen

wie analytische Kolonie-PCR, die Generierung von hochspezifischen Sonden und RACE kam dieselbe Polymerase aufgrund ihrer Prozessivität und Robustheit gegenüber Inhibierung der PCR zum Einsatz. Die PCR-Bedingungen wurden nach Herstellerangaben, den berechneten Schmelztemperaturen (Programm *TM-calculator*, Tabelle 20) für die jeweiligen Primerpaare und der Länge des Endprodukts ausgewählt. Als Matrize dienten genomische DNA, Plasmid-DNA oder aufgeschlossenes Zellmaterial (Kolonie-PCR).

4.2.2.2 Reinigung von PCR-Produkten

Spezifische PCR-Produkte wurden direkt mithilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* oder des *QIAEX II Gel Extraction Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt. Im Falle einer artifiziellen Amplifikation unspezifischer, zusätzlicher PCR-Produkte erfolgte zunächst eine elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel und anschließender Elution des gewünschten DNA-Fragments (siehe Abschnitt 4.2.2.14).

4.2.2.3 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die analytische und präparative Spaltung von DNA im Zusammenhang mit Klonierungsexperimenten erfolgte unter Einsatz verschiedener Restriktionsendonukleasen (Fermentas). Im Regelfall wurden 10 U pro eingesetztem μg DNA in einem Reaktionsvolumen von 50 μl verwendet. Die Spaltungen erfolgten in den mitgelieferten Puffern und gemäß Herstellerangaben (Programm *DoubleDigest*, Tabelle 20).

4.2.2.4 Generierung von 3'-Adenosin-Einzelstrangüberhängen

Vor der Verwendung von TA-Klonierungen (*pGEM-T-easy Vector System I*, Promega) wurden an PCR-Produkte mit glatten Enden (*blunt ends*), mit der *Phusion High Fidelity DNA Polymerase* (Finnzymes Oy) amplifizierte DNA-Fragmente, zusätzliche 3'-Adenosin-Einzelstrangüberhänge enzymatisch erzeugt (*A-tailing*). Dabei wurde ein definiertes Volumen des gereinigten DNA-Fragments mit 1 x *DreamTaq*-Puffer (Fermentas), 0,2 mM dATP und 5 U *DreamTaq*-Polymerase (Fermentas) in einem Reaktionsvolumen von 20 μl für 30 min bei 72 °C im Thermoblock inkubiert.

4.2.2.5 Intermolekulare Ligation von DNA-Molekülen

Die Ligation von DNA-Molekülen erfolgte mit 25 ng der in linearisierter Form vorliegenden Plasmid-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:5 mit der *Insert*-DNA. Der Reaktionsansatz mit 20 μl Gesamtvolumen enthielt daneben 1x T4 DNA-Ligase-Puffer und 1 Weiss *unit* T4 DNA-Ligase (Fermentas oder NEB). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C oder für 30 Minuten bei RT. Der vollständige Ligationsansatz wurde für die Transformation von chemisch kompetenten Zellen des *E. coli* Stammes DH5 α verwendet. Bei Verwendung der

Klonierungssysteme *pJET1.2/blunt Cloning Vector* oder *pGEM-T easy Vector Systems* wurde nach dem Protokoll des jeweiligen Herstellers verfahren.

4.2.2.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Proben erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger und Coulson, 1975) mit gen-, plasmid- bzw. vektor-spezifischen Primern (siehe Tabelle 16). Die Sequenzierungen wurden von den folgenden Firmen durchgeführt:

Tabelle 22: Beauftragte Firmen zur Sequenzierung von DNA-Proben

| Firma | Adresse |
|---------------------|---|
| DLMBC | Institut für Biologie, HU Berlin |
| IFZ Sequenzierlabor | Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, JLU Giessen |
| AGOWA LGC Genomics | LGC Genomics GmbH, Berlin |
| Eurofins MWG Operon | Sequencing Department, Ebersberg |

4.2.2.7 Isolation von Plasmid-DNA aus Zellen von *E.coli*

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Dabei wurden Zellen aus 4 ml Übernachtskultur durch Zentrifugation (4°C, 3000 × g, 10 min) sedimentiert und in 350 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis wurden der Suspension 350 µl Puffer P2 hinzugefügt und gemischt. Die alkalische Lyse wurde nach 2 Minuten durch Zugabe von 350 µl Puffer P3 gestoppt und die Suspension für weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer, Proteine und chromosomale DNA wurden durch Zentrifugation (4°C, 21100 × g, 15 min) sedimentiert, der Überstand zur weiteren Verwendung überführt und die vorherige Zentrifugation wiederholt. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde durch Zugabe von 0,7 Volumen 2-Propanol gefällt und durch Zentrifugation sedimentiert (4°C, 21100 × g, 15 min). Die sedimentierte Plasmid-DNA wurde mit 400 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen, für 15 Minuten bei RT getrocknet und in 50 µl MQ-H₂O resuspendiert.

- P1: 50 mM TRIS/HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 µg ml⁻¹ RNase A
- P2: 200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS
- P3: 3M Kaliumacetat (pH 5,5)

4.2.2.8 Isolation der Gesamt-DNA aus *Synechocystis*

Zur Isolation der Gesamt-DNA aus *Synechocystis* (Franche und Damerval, 1988) wurden 50 ml einer spätlogarithmischen Flüssigkultur (OD_{750nm} = ~ 1,2) durch Zentrifugation (4°C, 6000 × g, 10 min) sedimentiert. Die Zellen wurde zweimal mit 10 ml TE-Puffer gewaschen und

anschließend das Zellpellet in 1 ml TE+S-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für den folgenden Zellaufschluss zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend mit 5 mg ml⁻¹ Lysozym, 100 mM EDTA und RNase A (0,1 µg; Qiagen) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von Proteinase K (3 U; Qiagen) und SDS (Endkonzentration: 2% (w/v)) wurde das Zelllysate über Nacht bei 60°C inkubiert. Für die Extraktion der genomischen DNA wurde dem Ansatz ein Volumen Phenol/Chloroform zugefügt und sorgfältig gemischt. Die wässrige Phase wurde nach Separation durch Zentrifugation (4°C, 21100 × g, 10 min) vorsichtig entfernt und erneut durch Zugabe von einem Volumen Phenol/Chloroform extrahiert. Eventuelle Phenolreste wurden durch Zugabe von einem Volumen Chloroform und erneuter Zentrifugation beseitigt. Die in der wässrigen Phase enthaltene DNA wurde durch Beifügung von 0,7 Volumen 2-Propanol gefällt und durch Zentrifugation (4°C, 21100 × g, 30 min) sedimentiert. Die präzipitierte DNA wurde anschließend mit einem ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen, die DNA für eine Stunde bei RT getrocknet und in 100 µl MQ-H₂O resuspendiert.

- TE-Puffer: 10 mM TRIS/HCl (pH 8,0); 1mM EDTA
- TE+S-Puffer: 50 mM TRIS/HCl (pH 8,0); 1mM EDTA; 25% (w/v) Saccharose
- Phenol/Chloroform: 1 Vol. Phenol (in TE-Puffer äquilibriert; pH 7,5-8,0);
1 Vol. Chloroform

4.2.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von DNA oder RNA in wässrigen Lösungen erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm mit Hilfe des *NanoDrop* ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometers (PEQLAB). Das jeweilige Volumen der zu vermessenden Lösung betrug 1,5 µl. Neben der Konzentration der DNA bzw. RNA in der Lösung wurde die Qualität der Nukleinsäuren anhand des Verhältnisses der Absorption bei OD_{260nm} und OD_{280nm} bestimmt, wobei optimale Werte zwischen 1,8 und 2,0 liegen). MQ-H₂O wurde als Referenz verwendet.

4.2.2.10 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Präparation von chemisch kompetenten Zellen von *E. coli* erfolgte unter Verwendung von Kalziumchlorid (Hanahan, 1983). Zunächst wurden 5 ml SOB-Medium mit dem zu transformierenden *E. coli*-Stamm beimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. 100 ml frisches SOB-Medium wurde mit 2% dieser Übernachtskultur inokuliert und bei RT und 180 rpm bis zu einer OD_{660nm} von 0,4 inkubiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine Sedimentation der Zelle (4°C, 1000 × g, 15 min). Die Zellen wurden in 15 ml vorgekühlter CCMB-Lösung resuspendiert, für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert und erneut sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 4 ml der eiskalten CCMB-Lösung resuspendiert,

Aliquots à 200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Kompetenz der Zellen wurde durch Transformation mit 20 pg pUC18 Plasmid überprüft.

- CCMB-Lösung: 80 mM CaCl₂*2H₂O; 20 mM MnCl₂*4H₂O; 10 mM MgCl*6H₂O;
10 mM Kaliumacetat; 10% (v/v) Glycerol
- SOB-Medium: 2% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl;
2,5 mM KCl; 10 mM MgCl*6H₂O; 10 mM MgSO₄*7H₂O

4.2.2.11 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Zur Transformation von zweckdienlichen Wirtszellen mit Plasmid-DNA kamen chemisch kompetente Zellen des Stammes *E. coli* Dh5α, BL21 (DE3) sowie GM2163 zum Einsatz. In allen Fällen erfolgte die Transformation nach der Methodik des Hitzeschocks (Mandel und Higa, 1970). Tiefgefrorene kompetente Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut, der jeweilige Ligationsansatz mit der Zellsuspension vorsichtig vermischt und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgte der Hitzeschock für 90 sec in einem Wasserbad bei 42°C und mit anschließender Inkubation für fünf Minuten auf Eis. Der Zellsuspension wurden 800 µl SOC-Medium (RT, ohne Antibiotika) hinzugefügt und die Kultur für 60 min (spätere Selektion auf Amp-Resistenz) bzw. 120 min (spätere Selektion auf Km-, Cm- oder Strp-Resistenz) bei 37°C und 200 rpm regeneriert. 50-100 µl der jeweiligen Kultur wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die LB-Platten enthielten je nach Bedarf die entsprechenden Antibiotika (siehe 4.2.1.1) als Selektionsmarker. Transformanten wurden entweder über Kolonie-PCR oder durch Restriktionsanalyse isolierter Plasmid-DNA analysiert. Im Fall des Einsatz von TA-Klonierungssystemen enthielten die LB-Agarplatten zusätzlich jeweils 40 µl IPTG und X-Gal (pro 25 ml LB-Agar), um den Erfolg der Ligation durch Blau-Weiß-Selektion zu überprüfen (Ullmann *et al.*, 1967).

- SOC-Medium: SOB-Medium; 20 mM Glukose
- IPTG: 20 mg ml⁻¹ in MQ-H₂O
- X-GAL: 20 mg ml⁻¹ in DMF

4.2.2.12 Transformation von *Synechocystis*

Zur Transformation von *Synechocystis* (Grigorieva und Shestakov, 1982) wurden Zellen aus 10 ml einer exponentiell wachsenden Flüssigkultur durch Zentrifugation (10 min, 1500 g, RT) sedimentiert und in ca. 200 µl Restmedium aufgenommen. Darauf folgte eine dreistündige Inkubation der Zellsuspension mit 1 µg der zu transferierenden Plasmid-DNA bei kontinuierlicher Belichtung (Weißlicht, ~50-60 µmol Photonen m⁻² s⁻¹) und RT. Danach wurden die Zellen auf verfestigtem BG11-Medium (1 % (w/v) Bacto-Agar) ausgestrichen und

bei 30 °C und einer mittleren Lichtintensität von $\sim 50 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ inkubiert. Nach 24 h wurden 400 μl Km-Lösung einseitig unter die Agarplatte gegeben, um einen Konzentrationsgradienten innerhalb derselben zu erzeugen. Resistente Transformanten wurden mehrfach vereinzelt auf frisches BG11-Festmedium mit schrittweise ansteigender Km-Konzentration von maximal 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ überimpft. Bei der Verwendung von Chloramphenicol als Selektionsmarker erfolgte die Zugabe von 400 μl einer Cm-Lösung nach 48h. Die maximale Cm-Konzentration der nachfolgenden Selektionsschritte betrug 14 Cm $\mu\text{g ml}^{-1}$.

- Cm-Lösung: 1,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Chloramphenicol
- Km-Lösung: 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin

4.2.2.13 Konjugation von *Synechocystis*

Für den konjugativen Transfer von Plasmid-DNA in *Synechocystis*-Zellen kam die Methode der „Drei-Eltern-Kreuzung“ (*triparental mating*) zum Einsatz. Als *Cargo*-Plasmid kam der in *Synechocystis* autonom replizierende *shuttle*-Vektor pUR-FLAG-ycf54 (siehe Tabelle 14) zum Einsatz, wobei der *E. coli*-Stamm DH5 α als Donor-Wirt Verwendung fand. Das Plasmid RP4 im Stamm *E. coli* J53 diente hierbei als Helferplasmid. Je 250 μl einer Übernachtskultur der Stämme *E. coli* J53 (RP4) und *E. coli* DH5 α pUR-FLAG-ycf54 (siehe Abschnitte 4.1.11 und 4.2.2.19) wurden zunächst in 10 ml frisches LB-Medium überführt und für 2,5 h bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Die Kulturen wurden daraufhin sedimentiert (RT, 1000 $\times g$, 5 min), in 1 ml LB-Medium resuspendiert und beide Stämme anschließend vereint. Nach erneuter Zentrifugation wurde das beide Stämme enthaltene Sediment in 100 μl LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 30 °C inkubiert. Zu dieser Zellsuspension wurden anschließend 1,9 ml einer *Synechocystis*-Kultur ($\text{OD}_{750\text{nm}} = 0,6-0,8$) gegeben und anschließend sedimentiert (RT, 1000 $\times g$, 5 min). Das resultierende Sediment wurde in 30 μl BG11-Medium aufgenommen. Der Konjugationsansatz wurde anschließend auf einen sterilen HATF-Filter übertragen, welcher einer BG11-Agarplatte mit 5 % LB-Medium (ohne Antibiotikum) auflag. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit BG11-Medium von dem Filter abgespült und auf BG11-Festmedium mit 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Ery-Lösung überführt. Nach etwa 10 Tagen wurden resistente Klone zur Vereinzlung auf BG11-Festmedium (0,75 % Agar) mit je 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Ery und Strp überimpft.

4.2.2.14 Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese und Extraktion von DNA

Die Auftrennung von DNA-Molekülen innerhalb eines elektrischen Feldes in Agarosegelen erfolgte nach Sambrook & Russel (2001). Dabei kamen in Abhängigkeit der aufzutrennenden

DNA-Fragmente Gele mit einem Agarosegehalt von 0,7-2% (w/v) zum Einsatz. Zur späteren Visualisierung der Nukleinsäuren erfolgte eine Zugabe von $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ethidiumbromid (EtBr). Es wurde ausschließlich 0,5x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) verwendet, die Proben wurden vor der Elektrophorese mit 1 x DNA-Ladepuffer versetzt. Die DNA-Moleküle wurden mit 3-5 V cm^{-1} Elektrodenabstand separiert. Im Anschluss erfolgte die Visualisierung der DNA-Fragmente durch eine Bestrahlung mit UV-Licht in einem System zur Geldokumentation (DeVision G, Decon Science Tec GmbH). Banden, die DNA-Fragmente für eine spätere Extraktion enthielten, wurden mit einem Skalpell aus der Gelmatrix geschnitten. Die Abschätzung der Größe der separierten DNA-Moleküle erfolgte über parallel mitgeführte Größenstandards (siehe Tabelle 12). Die Elution der ausgeschnittenen DNA-Fragmente erfolgte mithilfe des *QIAquick PCR Purification Kits*, oder des *QIAEX II Gel Extraction Kits* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

- 10x TBE-Puffer: Rotiphorese 10x TBE Buffer, Carl Roth GmbH
- 6x DNA-Ladepuffer: 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol;
30% (v/v) Glycerol

4.2.2.15 Southern Blot-Analyse

Diese Analysetechnik (Southern, 1975) wird zum Nachweis spezifischer, genomischer DNA-Abschnitte verwendet; in dieser Arbeit der Nachweis der Insertion einer Km-Resistenzgen-Kassette in das *Synechocystis ycf34*-Gen (*genetischer Locus ssr1425*). Dazu wurden $2 \mu\text{g}$ der genomischen DNA von *Synechocystis* WT und *ycf34* Stamm mit dem Restriktionsenzym HpaI geschnitten und die resultierenden DNA-Fragmente durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese in einem Agarosegel separiert. Anschließend wurde das Gel für 15 min in Depurinierungslösung geschwenkt. Nach einer 25-minütigen Inkubation in Denaturierungslösung wurde das Gel für weitere 25 min in Neutralisierungslösung geschwenkt. Die separierten DNA-Fragmente wurden über Nacht per Kapillartransfer (Sambrook und Russell, 2001) unter Verwendung von 10 x SSC-Puffer auf eine *Roti-Nylon-plus*-Nylonmembran (Carl Roth) transferiert. Nach dem Transfer der DNA-Fragmente über Nacht wurde die Membran 5 min in 2 x SSC gespült und die DNA durch UV-Licht (120 mJ, UV-Stratalinker 1800, Stratagene) mit der Nylonmembran quervernetzt. Die Prähybridisierung und Hybridisierung der Membran erfolgte innerhalb eines Glasrohres in einem Rotationsofen (Biometra) unter Verwendung des mitgelieferten Hybridisierungspuffers des *DIG High Prime DNA Labeling and Detection-Kits* (Roche). Dazu wurde die Membran bei 42°C mit 10 ml *DIG easy hyb*-Puffer für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die DIG-UTP markierte DNA-Sonde gegen den offenen Leserahmen *ycf34* hinzugefügt und die DNA

über Nacht hybridisiert, wobei sich die Hybridisierungstemperatur von 45°C nach folgender Formel berechnet:

$$T_{\text{opt}} \text{ in } ^\circ\text{C} = \left\{ 49,82 + 0,41 * (\% \text{ GC-Gehalt}) - \frac{600}{\text{Länge in nt}} \right\} - 22,5^\circ\text{C}$$

Anschließend wurde ungebundene und unspezifisch gebundene Sonde durch mehrere Waschschrte entfernt. Die Detektion der Sonde erfolgte immunologisch über Antikörper, gerichtet gegen Digoxigenin, und Chemilumineszenz. Dazu wurde die Membran zweimal für 5 min mit Waschlösung I bei 65°C und zweimal für 15 min mit Waschlösung II bei 65°C gespült. im Folgenden wurde die Membran mehrmals kurz mit *DIG washing*-Puffer benetzt, für 30 min in *DIG blocking*-Lösung und danach 30 min in *DIG antibody*-Lösung inkubiert. Ungebundener und unspezifisch gebundener anti-Digoxigenin-AP-Antikörper wurde durch zweimaliges Spülen der Membran in *DIG-washing*-Puffer für 15 min entfernt. Nach einer fünf-minütigen Äquilibration der Membran in *DIG-detection*-Puffer wurde das *DIG-CSPD*-Substrat auf die Membran aufgebracht und selbige damit für 5 min inkubiert. Überschüssiges Substrat wurde entfernt, die Membran für 10 min bei 37°C gelagert und anschließend die Chemilumineszenz mit Hilfe eines Röntgenfilmes nachgewiesen.

- Depurinierungspuffer: 0,25 M HCL
- Denaturierungspuffer: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
- Neutralisierungspuffer: 1 M Tris/HCl (pH 7,5); 1,5 M NaCl
- 10 x SSC: 1,5 M NaCl; 0,15 M Na₃-Citrat
- Waschlösung I: 2 x SSC; 0,5 % (w/v) SDS
- Waschlösung II: 0,1x SSC; 0,1 % (w/v) SDS
- *DIG-washing*-Puffer: 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5;
0,3% (v/v) Tween 20
- *DIG blocking*-Lösung: 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5;
10% (v/v) 10x *DIG-blocking solution*
- *DIG antibody*-Lösung: *DIG blocking*-Lösung,
anti-Digoxigenin-AP-Antikörper 1:10000
- *DIG-Detection*-Puffer: 0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl; pH 9,5

4.2.2.16 Konstruktion des Plasmids pGEX-ycf34 zur heterologen Expression von GST-Ycf34 in *E. coli*

Für die Expression des rekombinanten GST-Ycf34-Fusionsproteins in *E.coli* wurde der offene Leserahmen *ycf34* (*ssr1425*) unter Verwendung von genomischer DNA und des Primerpaares BamHI-*ycf34*-fw und *ycf34*-NotI-rev (siehe Tabelle 16) als 301 bp langes DNA-Fragment amplifiziert und zur Zwischenklonierung in die *multiple cloning site* (MCS) des

pJET1.2/*blunt cloning vectors* (Fermentas) ligiert. Der resultierende Vektor pJET-BamHI-ycf34-NotI wurde mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und NotI geschnitten, die DNA-Fragmente in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt, das notwendige BamHI-ycf34-NotI DNA-Fragment ausgeschnitten und eluiert. Das BamHI-ycf34-NotI DNA-Fragment wurde anschließend in die mit BamHI und NotI geschnittene MCS des pGEX-6P-1 Expressionsvektors (GE Healthcare) ligiert. Der Insertionsort von *ycf34* liegt stromabwärts *in frame* des 3'-Endes des *gst*-Gens, direkt hinter der Erkennungssequenz der *PreScission*-Protease. Die Richtigkeit des Konstrukts pGEX-ycf34 wurde durch Sequenzierung der Plasmid-DNA überprüft.

4.2.2.17 Zielgerichtete Mutagenese von Ycf34 zur heterologen Expression von GST-Ycf34 in *E.coli*

Für die zielgerichtete Mutagenese der Cystein-Aminosäurereste von Ycf34 wurden synthetische DNA-Fragmente bestellt (MWG Eurofins Operon, Ebersberg), die die kodierende Sequenz von *Synechocystis* Ycf34 enthielten, exklusive des Startkodons ATG. Anstelle dessen wurde die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease BamHI am 5'-Ende sowie die Erkennungssequenz von NotI am 3'-Ende des Fragmentes integriert. Jedes der DNA-Fragmente enthielt eine einzelne zielgerichtete Mutation zum Austausch der einzelne Cysteinseitenketten (kodiert durch die Basentriplets TGT oder TGC) zu Serin (kodiert durch das Basentriplets TCC) an den Positionen 2, 4, 7, 13 und 61 ausgehend von der originalen kodierenden Sequenz in *Synechocystis*. Die entsprechenden mutierten Konstrukte wurden aus dem Zwischenklonierungsplasmid pCR2.1-TOPO (Life Technologies) mit BamHI und NotI geschnitten und weiter analog zum Abschnitt zuvor verfahren. Die resultierenden Klone pGEX-ycf34-CxS wurden durch Sequenzierung der Plasmid-DNA auf ihre Richtigkeit überprüft.

4.2.2.18 Generierung des Plasmids pSK9-FLAG-ycf34

Für die funktionelle Komplementierung der *ycf34*-Mutante von *Synechocystis* wurde die kodierende Sequenz des offenen Leserahmens *ycf34* (genomischer Locus *ssr1425*) mithilfe der Primer NdeI-ycf34-fw und BglII-ycf34-rev (siehe Tabelle 16) und genomischer DNA von *Synechocystis* als 266 bp langes DNA-Fragment amplifiziert, gereinigt und anschließend in die MCS des pJET1.2/*blunt cloning vectors* (Fermentas) ligiert. Aus diesem Plasmid wurde das DNA-Fragment mit NdeI und BglII geschnitten, gereinigt und in das Plasmid pSK9 (S. Zinchenko, Staatliche Universität Moskau, Russland) ligiert, welches mit denselben Restriktionsendonukleasen geschnitten wurde. Die Oligonukleotide 3xFLAG-fw und 3xFLAG-rev (siehe Tabelle 16), welche das 3xFLAG-Epitop (Einhauer und Jungbauer, 2001)

(Met-Asp-Tyr-Lys-Asp-His-Asp-Gly-Asp-Tyr-Lys-Asp-His-Asp-Ile-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) mit artifiziiellen TA-Überhängen an den 5'-Enden kodieren, wurden hybridisiert und in den mit NdeI linearisierten Vektor pSK9-*ycf34* ligiert. Analog dazu wurden die Oligonukleotide TerOOP-fw und TerOOP-rev (siehe Tabelle 16), die den Transkriptionsterminator *oop* des Phagen Lambda mit zusätzlichen GATC-Überhängen den 5'-Enden kodieren, hybridisiert und in den mit BglII linearisierten Vektor pSK9-FLAG-*ycf34* ligiert. Der resultierende Vektor pSK9-FLAG-*ycf34* wurde für die Transformation von *Synechocystis* WT- und *ycf34*-Zellen verwendet und erlaubt die Expression des *Synechocystis* Ycf34-Proteins als amino-terminale Fusion mit dem 3xFLAG-tag unter Kontrolle des Promotors P_{petJ} (Cytochrom *c553*, genomischer Locus *sll1796*). Die Expression erfolgt dabei ektopisch von einem neutralen Ort innerhalb des Genoms von *Synechocystis* zwischen den offenen Leserahmen *slr1597* (*chromosome partitioning* ATPase) und *sll1514* (16,6 kDa Hitzeschockprotein).

4.2.2.19 Generierung des Plasmids pUR-FLAG-*ycf54*

Für die funktionelle Komplementierung der *Synechocystis ycf54*-Mutante wurde zunächst der offene Leserahmen *ycf54* inklusive eines 58 bp langen 3'-Überhanges (genomischer Locus *slr1780*) unter Verwendung genomischer DNA von *Synechocystis* und der Primer EcoRI-*ycf54*-fw und BamHI-*ycf54*-rev (siehe Tabelle 16) als 387 bp langes DNA-Fragment amplifiziert, gereinigt und in die MCS des pJET1.2/*blunt cloning vectors* (Fermentas) ligiert. Aus dieser MCS wurde das DNA-Fragment mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI geschnitten, entsprechend gereinigt und in das mit denselben Restriktionsendonukleasen geschnittene Plasmid pUR ligiert. Das Plasmid pUR-FLAG ist ein Derivat des konjugativen *shuttle*-Vektors pVZ321, das wie folgt generiert wurde. Der Vektor pSK9-FLAG-*ycf34* (siehe 4.2.2.18) diente als Vorlage für die Amplifikation der Promotorregion des *petJ*-Gens zusammen mit einem 3xFLAG-tag (zur Detektion des rekombinanten Proteins) mithilfe der Primer SallI-P_{petJ}-fw und EcoRI-FLAG-rev. Dieses DNA-Fragment wurde in einen mit SallI und EcoRI geschnittenen pVZ321 Vektor ligiert. Die Chloramphenicol-Resistenzgenkassette (*cat*) wurde gegen eine Streptomycin-Resistenzgenkassette (*aadA*) mithilfe der Restriktionsendonukleasen KpnI und EcoRI ausgetauscht. Im Anschluss daran wurde direkt hinter die FLAG-tag-Sequenz *in frame* das EcoRI-*ycf54*-BamHI DNA-Fragment über die entsprechenden Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI ligiert. Die Oligonukleotide BamHI-TerOOP-PstI und TerOOP-reverse (siehe Tabelle 16), die den Transkriptionsterminator *oop* des Phagen Lambda mit einem zusätzlichen GATC-Überhang am 5'-Ende und einem zusätzlichen TGCA-Überhang am 3'-Ende kodieren, wurden hybridisiert und in den mit BglII und PstI

linearisierten Vektor pUR-*ycf54* ligiert. Das resultierende konjugative Plasmid pUR-FLAG-*ycf54* wurde durch “Drei-Eltern-Kreuzung” in Zellen von *Synechocystis* WT und *ycf54*-Mutante transferiert. Exkonjuganten wurden auf BG11-Festmedium mit 10 µg ml⁻¹ Strp selektioniert, welches im Fall der *ycf54*-Mutante zusätzlich noch 20 µg ml⁻¹ Ery enthielt.

4.2.3 Methoden zur Analyse von Ribonukleinsäuren

4.2.3.1 Isolation der Gesamt-RNA von *Synechocystis*

Zur Isolation der Gesamt-RNA wurden exponentiell wachsende Zellen aus circa 25 ml *Synechocystis*-Flüssigkultur mit einem Volumen Eis vermengt und die Zellen sedimentiert (4°C, 3000 × g, 7 min). Das Eis-Medium-Gemisch wurde vorsichtig dekantiert, die Zellen in dem verbleibenden Flüssigkeitsresten resuspendiert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (4°C, 6000 × g, 1 min). Im Anschluss wurden die sedimentierten Zellen in 1 ml PGTX (Pinto *et al.*, 2009) resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterführung der Isolation bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden anschließend für 5 min bei 95°C lysiert und auf Eis für 5 min inkubiert. Nach der Zugabe von 100 µl eiskaltem 1-Brom-3-Chlorpropan wurde die Suspension sorgfältig gemischt (30 Sekunden) und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Trennung der Phasen erfolgte durch Zentrifugation (4°C, 21100 × g, 15 min). Nach dem Überführen der wässrigen, oberen Phase in ein neues Reaktionsgefäß erfolgte eine weitere Extraktion mit einem Volumen 1-Brom-3-Chlorpropan unter den entsprechenden Bedingungen. Die RNA in der resultierenden wässrigen Phase wurde mit einem Volumen 2-Propanol über Nacht bei -20°C präzipitiert und durch Zentrifugation sedimentiert (4°C, 21100 × g, 30 min). Die sedimentierte RNA wurde mit 70 % (v/v) eiskaltem Ethanol gewaschen und erneut sedimentiert (4°C, 21000 × g, 10 min). Die pelletierte RNA wurde für 10-15 min bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet, in 35 µl MQ-Wasser resuspendiert und bei -20°C gelagert.

4.2.3.2 Denaturierende elektrophoretische Auftrennung von RNA in Formaldehyd-Agarosegelen und Kapillar-Blotting

RNA-Moleküle wurden in 1,3 %igen Agarosegelen mit 1,85 % Formaldehyd und in 1 x MEN-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden die RNA-Proben mit einem Volumen 2 x RNA-Ladepuffer+ (mit EtBr) versetzt, für 10 min bei 65 °C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und (ggf. zusammen mit einem Längenstandard; siehe Tabelle 12) auf das Agarosegel geladen. Die Elektrophorese fand bei konstanter Spannung von 4 V cm⁻¹ Elektrodenabstand in einer horizontalen Elektrophoreseapparatur statt. Anschließend wurden die aufgetrennten RNA-Moleküle mithilfe des Kapillartransfers auf eine *Roti-Nylon-plus*-Nylonmembran (Carl Roth) transferiert (siehe 4.2.2.15) und diese durch Bestrahlung mit UV-

Licht-Bestrahlung (120 mJ, UV-Stratalinker 1800, Stratagene) mit der Nylonmembran quervernetzt.

- **10 x MEN-Puffer:** 200 mM MOPS; 50 mM Na-Acetat; 10 mM EDTA (pH 7,0)
- **2 x RNA-Ladepuffer+:** 95 % (v/v) Formamid (deionisiert); 0,025 % (v/v) SDS, 0,5 mM EDTA; 0,1 % (w/v) Xylencyanol; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 0,4 % (v/v) EtBr

4.2.3.3 Denaturierende elektrophoretische Auftrennung von RNA in Harnstoff-Polyacrylamidgelen und Elektro-*Blotting*

RNA-Moleküle wurden in 10 %igen Harnstoff-Polyacrylamidgelen in vertikalen Elektrophorese-Kammern (Protean II Xi, BioRad) aufgetrennt. Die RNA-Proben wurden mit je einem Volumen 2 x RNA-Ladepuffer- (ohne EtBr) versetzt, für 10 min bei 65 °C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und (ggf. zusammen mit einem Längenstandard; siehe Tabelle 12) auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 90 min h bei einer konstanten Spannung von 50 V in 1 x TBE-Puffer, anschließend wurde die Elektrophorese bei 130 V über Nacht fortgesetzt. Im Anschluss daran wurde das Gel für 30 min in Ethidiumbromid (EtBr)-Färbelösung geschwenkt und anschließend für 10 min in 0,5 x TBE-Puffer gewaschen und mit einem Geldokumentationssystem (DeVision G, Decon) dokumentiert. Die RNA wurde durch Elektrotransfer unter Verwendung einer *SEDEC M*-Einheit (*Perfect Blue Semi-Dry SEDEC M*, PEQLAB) auf eine *Roti-Nylon-plus*-Nylonmembran (Carl Roth) transferiert. Der Transfer erfolgte für 90 min in 0,5 x TBE-Puffer bei RT und einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA cm⁻². Die RNA wurde wie im Abschnitt zuvor beschrieben mit der Nylonmembran quervernetzt. Zur Kontrolle des gleichmäßigen Transfers wurde die Membran mithilfe des Geldokumentationssystems (s.o.) analysiert.

- **10% Polyacrylamid-Lösung:** 10% (v/v) Rotiphorese Gel 40 (19 % T/ 1 % C) Acrylamid/Bisacrylamid (Roth); 8,3 M Harnstoff; 1 x TBE; 0,8% (v/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED
- **2 x RNA-Ladepuffer-:** 95 % (v/v) Formamid (deionisiert); 0,025 % (v/v) SDS, 0,5 mM EDTA; 0,1 % (w/v) Xylencyanol; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
- **EtBr-Färbelösung:** 0,5 x TBE; 0,3 µg ml⁻¹ EtBr

4.2.3.4 Herstellung radioaktiv markierter Sonden für *Northern Blot*-Hybridisierungen

Die Synthese von strangspezifischen RNA-Sonden erfolgte per *in vitro*-Transkription in Anwesenheit von [³²P]-UTP unter Verwendung des *MAXIScript T7 in vitro transcription Kits* (Ambion) nach Angaben des Herstellers. Als Vorlage dienten genspezifische PCR-

Fragmente denen mittels Erweiterung der Primer (siehe Tabelle 16) 3`-terminale T7-Promotor-Sequenzen hinzugefügt wurden. Die Matrize wurde nach dem Ende der *in vitro*-Transkription durch einen 15-minütigen DNase-Verdau (derselbe Kit) bei 37°C entfernt.

Die Synthese von genspezifischen DNA-Sonden erfolgte in Anwesenheit von [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP unter Verwendung des *Amersham Rediprime™ II DNA Labeling System* (GE Healthcare) nach Herstellerangaben. Als Matrize dienten PCR-Fragmente, die mithilfe genspezifischer Primer (siehe Tabelle 16) per PCR generiert wurden.

4.2.3.5 Northern Blot-Analysen

Die *Northern Blot*-Hybridisierungen erfolgten mit Church-Puffer⁺ analog zu Abschnitt 4.2.2.15, jedoch variierten die verwendeten Hybridisierungstemperaturen in Abhängigkeit der jeweils benutzten, radioaktiv markierten Sonde.

Doppelsträngige DNA-Sonden:

Die verwendete Temperatur errechnet sich nach der nachstehenden Formel:

$$T_{\text{opt}} \text{ in } ^\circ\text{C} = \left\{ 49,82 + 0,41 * (\% \text{ GC-Gehalt}) - \frac{600}{\text{Länge in nt}} \right\} - 22,5^\circ\text{C}$$

Einzelsträngige RNA-Sonden: 68°C

Das sequenzielle Waschen der Membran mit steigender Stringenz erfolgte nach folgendem Schema:

1. 15 min RT, Waschlösung I
2. 15 min 68°C, Waschlösung III
3. 5 min 68°C, Waschlösung IV

Die Detektion und nachfolgende Analyse der radioaktiven Hybridisierungssignale erfolgte mithilfe des *Personal Molecular Imager FX Systems* und dem Programm *Quantity One* Version 4.6.3 (beides BioRad).

- Church-Puffer⁺: 0,25 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7,2); 1mM EDTA; 7% (w/v) SDS; 250mM NaCl; 50% (v/v) deionisiertes Formamid
- Waschlösung I: 2 x SSC; 0,5 % (w/v) SDS
- Waschlösung III: 2 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS
- Waschlösung IV: 0,1 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS

4.2.3.6 Determination von Transkriptenden - 5'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*)

Die Bestimmung des 5'-Endes des Transkripts von *Synechocystis ycf34* erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Bensing et al. (1996) (Bensing *et al.*, 1996). Dazu wurden die Spuren genomischer DNA aus 10 µg Gesamt-RNA von *Synechocystis* durch Behandlung mit 2U TURBO DNase (Ambion) für 2 Stunden bei 37°C entfernt. Anschließend wurde die RNA mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, mit 3 Volumen Ethanol/3M Natriumacetat (pH 5,2) (30:1) über Nacht bei -20°C präzipitiert und in MQ-Wasser gelöst. 2 µg der DNase-behandelten Gesamt-RNA wurden verwendet, um die 5'-Triphosphate primärer RNA-Transkripte durch Behandlung mit 10 U TAP (*tobacco acid pyrophosphatase*, Epicentre Biotechnologies) für 1 h bei 37 °C unter Zusatz von 10 U RNase-Inhibitor (Fermentas) in 5'-Monophosphate umgewandelt (+TAP). Als Kontrolle dienen identische Ansätze ohne entsprechende TAP-Behandlung (-TAP). Die so behandelte RNA wurde erneut extrahiert, präzipitiert und in MQ-Wasser gelöst. Darauffolgend wurden die jeweiligen (+TAP) und (-TAP)-RNAs mit 10 pmol des 5'-RNA-Linkers (siehe Tabelle 17), 5 U T4 RNA-Ligase (Epicentre Biotechnologies), 1mM ATP und 20 U RNase-Inhibitor (Fermentas GmbH) im mitgelieferten Puffer für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Zyklus aus Extraktion, Präzipitation und Lösen der RNA wie oben beschrieben. Die in MQ-Wasser gelöste RNA wurde anschließend unter Verwendung des *Superscript III RT Kits* (Invitrogen) sowie des genspezifischen revers-Primers *ssr1425-rev1* (siehe Tabelle 16) nach Angaben des Herstellers für 1h bei 55°C in cDNA revers transkribiert. Anschließend wurde die eingesetzte RNA durch 1U RNase H (Fermentas) degradiert. Die synthetisierte cDNA wurde in einer ersten PCR in 30 Zyklen mit dem 5'-RNA-Adapter-spezifischen Primer linker-R1 (siehe Tabelle 16) und dem genspezifischen Primer *ssr1425-rev1* in 20 µl Reaktionsansätzen amplifiziert. Eine weitere PCR (*nested PCR*) wurde unter denselben Bedingungen mit 2 µl des ersten PCR-Ansatzes als Matrize durchgeführt. Als *nested*-Primer kamen der 5'-RNA-Adapter-spezifische Primer linker-R2 und der genspezifische Primer *ssr1425-rev2* (siehe Tabelle 16) zum Einsatz. Die Reaktionsbedingungen waren jeweils:

- 3 min 98° C
 - jeweils 30 x mal
- 30 sec 98 °C
- 10 sec 64 °C für die erste PCR bzw. 68°C für die *nested PCR* 30 Zyklen
- 10 sec 72 °C
 -
- abschließend 10 min 72 °C

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden per Agarose-Gelelektrophorese analysiert, aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt und in den Vektor pJET1.2 ligiert. Die resultierenden (+TAP)-Ligationsprodukte wurden in den *E. coli* Stamm DH5 α transferiert und die pJET-Konstrukte mithilfe des Primers pJET1.2-fw sequenziert (siehe Tabelle 16).

4.2.4 Biochemische Methoden

4.2.4.1 Ernte und Aufschluss von *Synechocystis*-Zellen

Die Ernte von *Synechocystis*-Zellen aus Flüssigkulturen erfolgte für 10 min bei $6000 \times g$ und 4°C . Die Sedimente wurden einmal mit Extraktionspuffer⁺ gewaschen und erneut sedimentiert. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Für den Zellaufschluss wurden die geernteten Zellen im Verhältnis 1:4 (Pelletvolumen zu Puffervolumen) in Extraktionspuffer⁺ resuspendiert und mit 0,8 Volumen Glasperlen (0,1-0,11 und 0,25-0,5 mm) versetzt. Gegebenenfalls wurde die Zellsuspension vorher zu je 1 ml auf mehrere 2 ml Reaktionsgefäße verteilt. Der Zellaufschluss erfolgte in einer Zelmühle (Typ MM2, Retsch) bei 4°C und 30 Hz für 10 Minuten. Die Glasperlen, Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation (4°C , $1000 \times g$, 5 min) sedimentiert. Der Überstand (Gesamtextrakt) wurde abgenommen und das Sediment ggf. erneut mit demselben Volumen Extraktionspuffer⁺ resuspendiert und die Extraktion wiederholt. Die vereinigten Gesamtextrakte wurden entweder bei -20°C gelagert oder durch Zentrifugation (4°C , $21100 \times g$, 30 min) in lösliche Zellbestandteile und unlösliche Membranbestandteile getrennt und gesammelt.

- Extraktionspuffer⁺: 50 mM HEPES/NaOH (pH 7,0); 5 mM MgCl₂; 25 mM CaCl₂; 10% (v/v) Glycerol

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den gewonnenen Extrakten erfolgte durch eine modifizierte Variante der Lowry-Methode (Bensadoun und Weinstein, 1976).

4.2.4.2 Isolation der Phycobilisomen von *Synechocystis*

Die Isolation der intakten Phycobilisomen erfolgte bei Raumtemperatur über Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation aus 50-100 ml einer *Synechocystis*-Flüssigkultur. Zunächst wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (RT, $6000 \times g$, 10 min) und das Sediment in 0,5 ml Isolationspuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß transferiert und die Zellen erneut sedimentiert (RT, $6000 \times g$, 10 min). Anschließend wurden die Zellen erneut in 0,75 ml Isolationspuffer gelöst und mit 1 Volumen Glasperlen (0,1-0,11 und 0,25-0,5 mm) vermischt. Der Zellaufschluss erfolgte in einer

Zellmühle (Typ MM2, Retsch) bei RT und 30 Hz für 10 Minuten. Die Glasperlen, Zelltrümmer und nicht aufgeschlossenen Zellen wurden durch Zentrifugation (RT, $16000 \times g$, 15 min) entfernt. Der resultierende Überstand wurde abgenommen und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Anschließend folgte eine 10-minütige Extraktion mit Triton X-100 (Endkonzentration 2 % (v/v)), gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt (RT, $6000 \times g$, 15 min). Der Überstand wurde zur weiteren Isolation der Phycobilisomen auf einen diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten mit folgender Zusammensetzung übertragen:

- Von Oben nach Unten:
 1. 1,8 ml 0,50 M
 2. 2,8 ml 0,75 M
 3. 2,8 ml 1,00 M
 4. 2,8 ml 1,50 M Saccharose in Isolationspuffer

Die anschließende Dichtegradienten-Ultrazentrifugation erfolgte in einem SW41Ti Rotor bei 18°C und $106000 \times g$ für 16 h (Sorvall Discovery 90, Sorvall, DuPont, Bad Homburg). Intakte Phycobilisomen sind als blaues Band deutlich im Gradienten zu erkennen. Der Gradient wurde in Aliquotes à 750 μl fraktioniert und diese bis zur weiteren Verwendung bei RT im Dunklen gelagert.

- Isolationspuffer: 0,75 M $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH7,0)

4.2.4.3 Isolation der Thylakoidmembranen von *Synechocystis*

Die Thylakoidmembranen von *Synechocystis* wurden aus dem Gesamtextrakt durch Zentrifugation (4°C , $21000 \times g$, 1 h) gewonnen. Die Membranen wurden in Extraktionspuffer⁺ resuspendiert und auf eine Proteinkonzentration von 10 mg ml^{-1} verdünnt. Die membrangebundenen Proteinkomplexe wurden mit n-Dodecyl- β -D-Maltosid (β -DM) in einem Detergenz zu Protein-Verhältnis von 2:1 für 1 h bei 4°C und im Dunkeln solubilisiert. Nicht-solubilisierter Membranproteinkomplexe wurden durch Zentrifugation entfernt (4°C , $30000 \times g$, 30 min). Die solubilisierten Membranproteinkomplexe wurden anschließend auf einen diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten mit folgender Zusammensetzung übertragen:

- Von Oben nach Unten:
 1. 2 ml 0,292 M
 2. 2 ml 0,438 M
 3. 2 ml 0,585 M
 4. 2 ml 0,730 M
 5. 2 ml 0,876 M Saccharose in Extraktionspuffer

Die anschließende Dichtegradienten-Ultrazentrifugation erfolgte in einem SW41Ti Rotor bei 4°C und $160000 \times g$ für 16 h (Sorvall Discovery 90, Sorvall, DuPont, Bad Homburg). Die Membranproteinkomplexe sind als farbige Bänder im Gradienten zu erkennen. Der Gradient wurde in Aliquotes à 750 µl fraktioniert und diese bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

- Extraktionspuffer: 50 mM HEPES/NaOH (pH 7,0); 5 mM MgCl₂; 25 mM CaCl₂; 0,04% (w/v) β-DM

4.2.4.4 Co-Immunopräzipitation von FLAG-Fusionsproteinen

Für die Expression von FLAG-Fusionsproteinen wurden Zellen der entsprechenden *Synechocystis*-Mutanten in BG11-Medium ohne Kupfer für mindestens 7 Tage kultiviert, um eine ausreichende Expressionsausbeute zu erreichen. Die Zellen wurde durch Zentrifugation (4°C, $6000 \times g$, 15 min) sedimentiert, in FLAG-Puffer gelöst und erneut sedimentiert (4°C, $6000 \times g$, 15 min). Bis zur weiteren Verwendung wurde das Zellpellet bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden mit FLAG-Puffer (Volumenverhältnis 1:4) resuspendiert und mit 0,8 Volumen Glasperlen (0,1-0,11 und 0,25-0,5 mm) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte analog zu Abschnitt 4.2.4.1, wobei das Glasperlensediment zweimal mit FLAG-Puffer extrahiert wurde. Der Gesamtextrakt wurde anschließend mit n-Dodecyl-β-D-Maltosid im Chlorophyll-Detergenz-Verhältnis 1:20 bei 4°C für 90 min im Dunkeln solubilisiert. Nicht-solubilierte Bestandteile wurden durch Zentrifugation (4°C, $25000 \times g$, 30 min) entfernt. Daneben wurden 150 µl der anti-FLAG-M2 Affinitätsmatrix (Sigma-Aldrich) mit FLAG-Wasch-Puffer äquilibriert, in Chromatographiesäulen gebettet (*polyprep purification columns*, BioRad) und anschließend mit dem solubilierten Überstand für 2 h bei 10°C inkubiert. Unspezifisch gebundene Proteine wurden von der Affinitätsmatrix durch zehnmaliges Waschen mit dem 10 Matrixvolumen FLAG-Waschpuffer entfernt. Die Elution der spezifisch gebundenen Proteine erfolgte durch eine 30-minütige Denaturierung der Affinitätsmatrix in 1x SDS-Ladepuffer bei 50°C. Proteinproben der einzelnen Aufreinigungsschritte wurden zur weiterführenden

Analyse genommen, durch DOC/TCA-Fällung (siehe Abschnitt 4.2.4.7) präzipitiert und für SDS-PAGE (Abschnitt 4.2.4.8) und Immunoblot-Analysen (Abschnitt 4.2.4.10) verwendet.

- FLAG-Puffer: 50 mM HEPES/NaOH (pH 7,0); 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 25 mM CaCl₂; 1 mM ε-Aminocaprinsäure; 1 mM AEBSF; 4 mM Benzamidin-HCl; 10% (v/v) Glycerol
- FLAG-Waschpuffer: 50 mM HEPES/NaOH (pH 7,0); 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 25 mM CaCl₂; 1 mM ε-Aminocaprinsäure; 1 mM AEBSF; 4 mM Benzamidin-HCl; 0,04% (w/v) β-DM; 10% (v/v) Glycerol
- 1x SDS-Ladepuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 6,8); 10% (v/v) Glycerol; 2% (w/v) SDS; 10 mM Dithiothreitol (DTT), 0,025% (w/v) Bromphenolblau

4.2.4.5 Heterologe Expression und Reinigung des GST-Ycf34-Fusionsproteins

Für die heterologe Expression von GST-Ycf34 und seiner mutierten Varianten (siehe Abschnitte 4.2.2.16 und 4.2.2.17) wurde *E. coli* BL21-pGEX-ycf34 bzw. pGEX-ycf34-CxS in 2 Litern *terrific broth*-Medium, versetzt mit 100 µg ml⁻¹ Amp und 100 µg ml⁻¹ Eisenammoniumcitrat, bei 37°C und 140 rpm bis zu einer OD_{578nm} = 0,6-0,8 kultiviert. Nach einer Änderung der Wachstumstemperatur von 37°C zu 17°C erfolgte die Induktion der Expression des GST-Fusionsprotein durch Zugaben von 100 µM IPTG. Die Zellen wurden nach weiteren 14 h Wachstum durch Zentrifugation gesammelt (4°C, 3800 × g, 10 min) und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die gelagerten Zellen wurden in Lyse-Puffer resuspendiert und durch Passage eines *constant cell disruption system* (Constant Systems Ltd., Großbritannien) lysiert. Die unlöslichen Bestandteile und nicht aufgeschlossenen Zellen wurden durch Zentrifugation (4°C, 430000 × g, 1 h) abgetrennt und der Überstand auf eine Chromatographiesäule mit Glutathion-4B-Sepharose (Macherey-Nagel, Düren) übertragen. Alle Waschschrte und die Elution der gebundenen GST-Fusionsproteine erfolgten nach Angaben des Herstellers. Fraktionen, die GST-Fusionsproteine enthielten, wurden mit 2 *units* PreScissionTM-Protease/ mg⁻¹ Protein (GE Healthcare) im vom Hersteller empfohlenen Puffer behandelt, um spezifisch den GST-tag abzuspalten. Eine zweite Säule mit Glutathion-4B-Sepharose wurde verwendet, um das abgespaltene GST-tag zu binden und damit aus der Proteinlösung zu entfernen. Anschließend wurden Fraktionen, die das originale oder mutierte Ycf34 enthielten, konzentriert und über eine mit Lyse-Puffer äquilibrierte HiLoadTM 26/60 SuperdexTM 75-Säule (GE Healthcare) gereinigt. Diese Reinigungsschritte wurden über SDS-PAGE überwacht. Das so aufgereinigte Ycf34-Protein wurde über Vivaspin-Säulen (Sartorius Stedim Biotech, Frankreich) auf eine Konzentration von 16 mg ml⁻¹ eingengt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C unter

Stickstoffschutzatmosphäre gelagert. Diese Arbeiten wurden durch Dr. Yoshinori Hagiwara in AG Physiologie der Mikroorganismen an der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt.

- Lyse-Puffer: 25 mM TES-KOH; 100 mM KCl; 1 mM DTT; pH 7,5
- PreScission-Protease-Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 150 mM NaCl; 10 mM EDTA, 1 mM DTT; 20% (v/v) Glycerol

4.2.4.6 Analyse des GST-Ycf34-Fusionsproteins

Die Bestimmung der Proteinkonzentration des Ycf34-Proteins erfolgte über den errechneten molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{280\text{nm}}$) (Gill und von Hippel, 1989). UV/Vis-Absorptionsspektren des Ycf34-Proteins in Lyse-Puffer wurden in einem Agilent Technologies 8453 Spektrophotometer bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Anzahl der proteingebundenen Eisenatome und der labilen Schwefelatome wurde nach Denaturierung des Proteins durch Säure bestimmt (Fish, 1988). *E. coli*-Zellen, die Ycf34 für die Mößbauer-Spektroskopie produzieren wurden in Spizizen Minimalmedium kultiviert (Spizizen, 1958), welches das Isotop ^{57}Fe enthielt (1.33 mg ml^{-1}). Die Reinigung von Ycf34 erfolgte wie in Abschnitt 4.2.4.5. beschrieben mit folgender Modifikation: Alle Schritte der Aufreinigung beginnend mit der Lyse der Zellen erfolgte unter anaeroben Bedingungen in einer anaeroben Arbeitsstation. Die Arbeiten zur EPR- und Mößbauer-Spektroskopie wurden durch Dr. Edward J. Reijerse (MPI für Bioanorganische Chemie, Mülheim an der Ruhr) durchgeführt. Die Mößbauer-Spektren wurden auf einem *alternating constant acceleration* Spektrometer aufgezeichnet, wobei die minimale Linienbreite $0,24 \text{ mm s}^{-1}$ betrug (volle Breite bei halbem Maximum). Die Proben temperatur wurde entweder in einem Oxford VarioX oder einem Oxford-Mößbauer-Spectromag Kryostaten konstant gehalten. Letzteres ist System zur Erzeugung von Magnetfeldern an den Proben mit bis zu 8 Tesla Feldstärke. Die Temperaturen kann im Bereich von 1,5-250 K konstant gehalten werden. Das Feld an der Probe steht senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der γ -Strahlung. Alle Verschiebungen des Isomers beziehen sich auf metallisches Eisen bei 300 K.

4.2.4.7 Präzipitation von Proteinen

Für die SDS-PAGE- und Immunoblot-Analysen gesammelter Fraktionen aus den verschiedenen Isolationstechniken wurden die Proteine zunächst durch eine DOC (Natriumdesoxycholat) /TCA (*trichloroacetic acid*) -Fällung (Bensadoun und Weinstein, 1976) konzentriert. Dazu wurden die Proben jeweils mit MQ-H₂O auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Nach der Zugabe von 25 μl 2 % (w/v) DOC und sofortigem Mischen wurden 30 μl 40 % (v/v) TCA zugegeben, die Proteine gemischt und 15 min auf Eis präzipitiert. Die

Präzipitate wurden anschließend sedimentiert (4 °C, 16000 × g, 10 min) und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde daraufhin in 3Volumen ChuaA-Puffer (Chua und Bennoun, 1975) aufgenommen und mit 2 Volumen ChuaB-Puffer versetzt. Die Proben wurden abschließend entsprechend den Angaben in Abschnitt 4.2.4.8 für die Gelelektrophorese vorbereitet.

- ChuaA-Puffer: 0,1 M Na₂CO₃; 0,1 M DTT
- ChuaB-Puffer: 5 % (w/v) SDS; 30 % (w/v) Saccharose; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

4.2.4.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung des kontinuierlichen Tris-Tricin-Puffersystems nach Schägger & von Jagow (Schägger und von Jagow, 1987) oder des diskontinuierlichen Tris-Glycin-Puffersystem nach Laemmli (Laemmli, 1970). Dazu wurden entsprechende Proteinproben in Probenpuffer für 30 min bei 50°C inkubiert. Proteinproben, die zuvor durch DOC/TCA-Fällung konzentriert und mit denaturierendem ChuaB-Puffer behandelt wurden, wurden ebenso bei 50°C für 30 min inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden sedimentiert (4°C, 21100 × g, 3 min) und der lösliche Überstand auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Abschätzung der Molekülmasse erfolgte über parallel aufgetragene Referenzproteine (Tabelle 12). Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in verschiedenen SDS-Polyacrylamidgelen in vertikalen Elektrophorese-Kammern (MiniProtean TetraCell oder Protean II Xi, BioRad). Bei Verwendung des Tris-Tricin-Puffersystems erfolgt die Elektrophorese bei konstanter Stromstärke (20 mA pro Gel), bei Verwendung des Tris-Glycin-Puffersystems bei konstanter Spannung (100-150 V pro Gel). Im Anschluss wurden die Gele für 60 min in Fixierlösung auf einem Flachbettschüttler geschwenkt, über Nacht in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend im Wechsel mit Fixierlösung und 7 %iger Essigsäure entfärbt. Die so gefärbten Proteine wurde mithilfe eines Durchlichtscanners (CanoScan 9000F, Canon) dokumentiert. Wahlweise wurden die Proteine im Rahmen von Immunoblot-Analysen auf Nitrozellulose-Membranen transferiert (siehe Abschnitt 4.2.4.10). Bei der Verwendung der vertikalen Elektrophoresekammer Protean II Xi wurden die oben genannten Volumina und Einwaagen entsprechend angepasst.

Tabelle 23: SDS-Polyacrylamidgelle nach Schägger & von Jagow

| | | 4% Sammelgel | 10% Trenngel | 16% Trenngel | 16% Trenngel mit 6M Harnstoff |
|---------------------|------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------------------------|
| AB-3 Mix | (ml) | 0,166 | 1 | 1,66 | 1,66 |
| 3x Gelpuffer | (ml) | 0,5 | 1,66 | 1,66 | 1,66 |
| 50% (v/v) Glycerol | (g) | 1,33 | 0,5 | 0,5 | - |
| | [ml] | | [0,8] | [0,8] | |
| Harnstoff | (g) | | - | - | 1,8 |
| MQ-H ₂ O | (ml) | | 1,54 | 0,88 | 0,3 |
| finales Volumen | | 2 | 5 | | |
| TEMED | (μ l) | 1,5 | 2,5 | 1,66 | 1,66 |
| 10% (w/v) APS | (μ l) | 15 | 25 | 16,6 | 16,6 |

- 3x Gelpuffer: 3M Tris (pH 8,45); 0,3 % (w/v) SDS
- AB3-Mix: 50 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (49,5 % T/ 3 % C)
- APS-Stammlösung: 10 % (w/v) APS in MQ-H₂O
- Kathoden-Laufpuffer: 100 mM Tricin; 100 mM Tris (pH 8,25); 0,1 % (w/v) SDS
- Anoden-Laufpuffer: 100 mM Tris/HCl (pH 8,9)
- 4x SDS-Ladepuffer: 250 mM Tris-HCl (pH 6,8); 40% (v/v) Glycerol; 8% (w/v) SDS; 40 mM DTT; 0,025% (w/v) Bromphenolblau

Tabelle 24: SDS-Polyacrylamidgelle nach Laemmli

| | | 7,5% Trenngel | 10% Trenngel | 12% Trenngel | 15% Trenngel |
|---------------------|------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Acrylamid-Lösung | (ml) | 1,25 | 1,67 | 2,00 | 2,505 |
| Trenngel-Puffer | (ml) | 1,25 | | | |
| MQ-H ₂ O | (ml) | 2,42 | 2,0 | 1,675 | 1,17 |
| Endvolumen | (ml) | 5 | | | |
| TEMED | (μ l) | 5 | | | |
| 10% (w/v) APS | (μ l) | 50 | | | |

Tabelle 25: SDS-Polyacrylamidgelle nach Laemmli

| | | 4% Sammelgel |
|---------------------|------------|-----------------|
| Acrylamid-Lösung | (ml) | 0,195 |
| Sammelgel-Puffer | (ml) | 0,375 |
| MQ-H ₂ O | (ml) | 0,915 |
| Endvolumen | (ml) | 1,5 |
| TEMED | (μ l) | 1,5 |
| 10% (w/v) APS | (μ l) | 15 |

- Trenngelpuffer: 1.5M Tris/HCl (pH 8,8); 0,4 % (w/v) SDS
- Sammelgelpuffer: 0.5M Tris/HCl (pH 6,8); 0,4 % (w/v) SDS
- Acrylamid-Lösung: 30 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29 % T/ 1 % C)
- SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl; 192 mM Glycin (pH 8,3); 0,1 % (w/v) SDS

- Coomassie-Färbelösung: 0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva);
40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure
- Fixier-Lösung: 50 % (v/v) Ethanol (vergällt); 10 % (v/v) Essigsäure

4.2.4.9 Clear native-Polyacrylamidgelelektrophorese (CN-PAGE) von Membranproteinkomplexen

CN-PAGE ist eine Modifikation der *blue-native*-PAGE nach Schägger (Schägger *et al.*, 1994). Dabei wird Coomassie als Ladungsträger im Kathodenpuffer durch Natriumdesoxycholat und β -DM (beides 0,05% (w/v)) ersetzt. Die Gewinnung der Thylakoidmembranen erfolgte analog zu Abschnitt 4.2.4.1 und 4.2.4.3, jedoch unter Verwendung von Nativ-Puffer. Membranproteinkomplexe äquivalent zu 8 μ g Chlorophyll wurden mit 1% β -DM (w/v) für 1 h bei 4°C und im Dunkeln solubilisiert. Nicht-solubilierte Membranproteinkomplexe wurden durch Zentrifugation entfernt (4°C, 30000 \times g, 30 min). Die Überstände wurden anschließend in einem 4,5-14% Gradienten-Polyacrylamidgel elektrophoretisch bei 4°C im Dunkeln unter nativen Bedingungen getrennt. Die Auftrennung erfolgte mit 11 mA bei konstanter Spannung von 500V in einer vertikalen Elektrophorese-Kammer (Protean II Xi, BioRad). Die Gele wurden dokumentiert und anschließend mit Coomassie gefärbt (siehe Abschnitt 4.2.4.8). Die Zuordnung der Komplexe erfolgt in übereinstimmend mit Herranen (Herranen *et al.*, 2004).

Tabelle 26: Clear-native-Polyacrylamidgele nach Schägger

| | | 4.5% Trenngel | 14% Trenngel | 4% Sammelgel |
|---------------------|---------|------------------|-----------------|-----------------|
| AB-Mix | ml | 0,77 | 4,8 | 0,8 |
| 6x Gelpuffer | ml | 1,4 | 2,8 | 1,7 |
| Glycerol | g | | 3,2 | |
| MQ-H ₂ O | ml | 6,4 | 6,7 | 7,4 |
| Endvolumen | ml | 8,5 | 17 | 10 |
| TEMED | μ l | 3,5 | 7,0 | 10 |
| 10% (w/v) APS | μ l | 19 | 38 | 80 |

- Nativ-Puffer: 25mM MES/NaOH (pH 6,5); 10mM MgCl₂; 10 mM CaCl₂;
25% (v/v) Glycerol
- 6x Gelpuffer: 3M ϵ -Aminocaprinsäure; 300 mM Bis-Tris/HCl (pH 7)
- AB-Mix: 50 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (50 % T/ 1,33 % C)
- APS-Stammlösung: 10 % (w/v) APS in MQ-H₂O
- Kathoden-Laufpuffer: 50 mM Tricin; 10 mM Bis-Tris/HCl (pH 7); 0,05 % (w/v) β -DM;
0,05 % (w/v) Natriumdesoxycholat
- Anoden-Laufpuffer: 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7)

4.2.4.10 Immunoblot-Analysen

Per SDS-PAGE separierte Proteine und Proteingemische wurden im Vorfeld immunologischer Nachweise auf Nitrozellulosemembranen transferiert, Dabei erfolgte der elektrophoretische Transfer mit Hilfe des kontinuierlichen Tris-Glycin-Puffersystems (Bjerrum und Schäfer-Nielsen, 1987) unter Verwendung einer Tank-Blot-Einheit (Mini Trans-Blot *cell*, BioRad oder Maxi-Nass-Blot, neoLab), Das Polyacrylamidgel, die gleichgroßen Filterpapiere sowie die entsprechend große Nitrozellulosemembran wurden hierfür 5 min in Blotpuffer äquilibriert, Der Aufbau des Tank-Blot-Systems erfolgte nach Herstellerangaben. Der Transfer wurde für 90 min bei einer konstanten Stromstärke von $6,5 \text{ mA cm}^{-2}$ Gelfläche durchgeführt, Bei Verwendung des größeren Systems wurde die Stromstärke auf 2 mA cm^{-2} Gelfläche reduziert, Die Transfereffizienz wurde durch eine reversible Protein-Färbung mit Ponceau-Rot verifiziert, Die Blockade der unspezifischen Bindungsstellen für Proteine auf der Nitrozellulosematrix erfolgte durch einstündige Inkubation bei RT in Blockierlösung, Nach dreimaligem Waschen à 10 min mit TBS-T wurde die Membran über Nacht mit dem primären Antikörper bei 4°C auf einem Orbitalschüttler inkubiert, Bei Verwendung von primären Antikörpern mit konjugierten Enzymen zum direkten Nachweis erfolgte die immunologische Detektion nach zweimaligem Waschen à 5 min mit TBS-T, Andernfalls erfolgte nach drei kurzen Waschschritten die Inkubation mit dem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper für 3 bei RT, Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen à 10 min mit TBS-T bei RT entfernt, Die Detektion erfolgt über den Nachweis der Chemilumineszenz der Meerrettich-Peroxidase-Reaktion mithilfe des *CheLuminate-HRP PicoDetect Extended*-Kits (AppliChem) oder des chromogenen Niederschlags der alkalischen Phosphatase (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphat p-Toluidinsalz und Nitro-Blau Tetrazoliumchlorid), Die Dokumentation erfolgte über ein Chemilumineszenz-Detektions-System (Fusion SL, PEQLAB) oder Röntgenfilme,

- Blotpuffer: 48 mM Tris/HCl, (pH 9,2); 39 mM Glycin; 20% (w/v) Methanol; 0,0375% (w/v) SDS
- Ponceau-Lösung: 2 % (w/v) Ponceau S in 30 % (w/v) TCA
- TBS-T: 100 mM Tris/HCl, (pH7,5); 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20
- Blockierlösung: 5% (w/v) Milchpulver in TBS-

Zusammenfassung

Konservierten Chloroplasten-Leserahmen und ihren cyanobakteriellen Homologen wurden in zahlreichen Analysen wichtige, bisher unbekannte Funktionen innerhalb der Photosynthese und ihr assoziierten Prozessen zugeordnet. In der vorliegenden Arbeit werden funktionelle Untersuchungen zu drei dieser Chloroplasten-Leserahmen vorgestellt. Hierfür wurde das einzellige Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 verwendet, ein Modellorganismus für die Erforschung der oxygenen Photosynthese. Die Inaktivierung des *ycf34*-Gens führt in diesem Organismus zu einer Verminderung des photosynthetischen Elektronentransports, insbesondere bei niedriger Lichteinstrahlung. Mithilfe biophysikalischer Untersuchungen konnte eine Veränderung des Elektronentransports durch den Cytochrom-*b₆f*-Komplex bestimmt werden, die vermutlich zu einer verminderten Transkription des *cpcBAC2CID*-Operons führt. Dieses Operon kodiert strukturelle Einheiten der cyanobakteriellen Lichtsammelkomplexe, deren verminderte Abundanz und veränderte Komposition in *ycf34*-Zellen einen Wachstumsdefekt bei geringen Beleuchtungsintensitäten verursacht. Die biochemische Charakterisierung und spektroskopische Untersuchungen des rekombinant hergestellten Ycf34-Proteins identifizierten einen [4Fe-4S]-Cluster im Ycf34-Protein. Das membrangebundene Ycf34-Protein ist ein neues, bisher unbekanntes Eisen-Schwefel-Protein, welches mit Komponenten des photosynthetischen Elektronentransports in der Thylakoidmembran assoziiert.

In dieser Arbeit wurden auch die Funktionen der beiden Proteine CycI und CycII untersucht. Sie sind Isoformen einer der Untereinheiten der oxidativen Magnesium-Protoporphyrin XI monomethylester (MgProtoME) Cyclase, einem Enzymkomplex der Chlorophyll-Biosynthese. Beide Isoformen werden ebenfalls von zwei konservierten hypothetischen Chloroplasten-Leserahmen kodiert, *ycf59*. Das CycI-Protein ist die hauptsächlich unter Standardbedingungen agierende oxidative Cyclase, während das CycII-Protein erst bei Sauerstoffmangel produziert wird und dann zusammen mit CycI operiert. Außerdem sollte eine noch immer unbekannte, weitere Untereinheit der oxidativen MgProtoME-Cyclase identifiziert werden. Physiologische Untersuchungen von Mutanten des konservierten hypothetischen Chloroplasten-Leserahmen *ycf54* deuten auf eine Funktion des Ycf54-Proteins in der von der Cyclase katalysierten Reaktion. Co-Immunopräzipitationen demonstrierten eine physikalische Interaktion zwischen den Proteinen Ycf54 und Ycf59, und erlauben damit den Schluss, dass das *ycf54*-Gen eine der fehlenden Untereinheiten der oxidativen Cyclase kodiert. Unterschiede und Gemeinsamkeiten zu den plastidären Homologen werden diskutiert.

Abstract

Conserved chloroplast open reading frames and their cyanobacterial homologues have been assigned to important functions in photosynthesis and associated processes in several analyses. In the present work, functional of three of these chloroplast open reading frames are presented. For this purpose the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 was used, a model organism for investigations of oxygenic photosynthesis. The inactivation of the *ycf34* gene results in an impairment of the photosynthetic electron transport in this organism, particularly under light limitation. Using biophysical studies we detected a change in the electron transport through the cytochrome-*b₆f*-complex, which presumably leads to a reduced transcription of the *cpcBAC2CID* operon. This operon encodes structural units of the cyanobacterial light-harvesting complexes. The reduced abundance and altered composition of the peripheral antennae in *ycf34* mutant cells cause a severe growth defect under low intensities of light. The biochemical characterization and spectroscopic studies of the recombinant Ycf34 protein identified an [4Fe-4S] cluster in the Ycf34 protein. The membrane-bound protein Ycf34 is a new, previously unknown iron-sulphur protein migrating together with components of the photosynthetic electron transport within the thylakoid membranes during density gradient centrifugation.

This work also investigated the interaction of two proteins CycI and CycII. They are both isoforms of one of the subunits of the oxidative magnesium protoporphyrin XI monomethyl ester (MgProtoME) cyclase, an enzyme complex of chlorophyll biosynthesis. The cyclase catalyzes the cyclisation of the fifth ring within the chlorophyll molecule. Both isoforms are encoded by *ycf59*, two other conserved hypothetical chloroplast open reading frames. The CycI protein is the sole oxidative cyclase acting under standard conditions, while the CycII protein is induced under anaerobic conditions and then operates together with the CycI protein. Moreover, a still unknown subunit of the oxidative MgProtoME cyclase should be identified. Physiological studies of mutants of the conserved hypothetical chloroplast open reading frame *ycf54* indicate an essential function of the Ycf54 protein in the reaction catalysed by the cyclase. Co-immunoprecipitations demonstrated a physical interaction between the proteins Ycf54 and Ycf59, and thus allow us to conclude that the *ycf54* gene encodes one of the missing subunits of the oxidative cyclase. Differences and similarities to plastid homologues are discussed.

Literatur

- Abdallah, F., F. Salamini und D. Leister** (2000). "A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of *Arabidopsis*." Trends Plant Sci **5**(4): 141-142.
- Adhikari, N. D., J. E. Froehlich, D. D. Strand, S. M. Buck, D. M. Kramer und R. M. Larkin** (2011). "GUN4-porphyrin complexes bind the ChlH/GUN5 subunit of Mg-Chelatase and promote chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis*." Plant Cell Physiol **23**(4): 1449-1467.
- Aguirre von Wobeser, E., B. W. Ibelings, J. Bok, V. Krasikov, J. Huisman und H. C. Matthijs** (2011). "Concerted changes in gene expression and cell physiology of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 during transitions between nitrogen and light-limited growth." Plant Physiol **155**(3): 1445-1457.
- Ajlani, G. und C. Vernotte** (1998). "Construction and characterization of a phycobiliprotein-less mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803." Plant Mol Biol **37**(3): 577-580.
- Alfonso, M., I. Perewoska und D. Kirilovsky** (2000). "Redox control of *psbA* gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Involvement of the cytochrome *b₆f* complex." Plant Physiol **122**(2): 505-516.
- Alfonso, M., I. Perewoska und D. Kirilovsky** (2001). "Redox control of *ntcA* gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Nitrogen availability and electron transport regulate the levels of the NtcA protein." Plant Physiol **125**(2): 969-981.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers und D. J. Lipman** (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-410.
- Amunts, A., O. Drory und N. Nelson** (2007). "The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution." Nature **447**(7140): 58-63.
- Anderson, S. L. und L. McIntosh** (1991). "Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process." J Bacteriol **173**(9): 2761-2767.
- Aoki, R., T. Goto und Y. Fujita** (2011). "A heme oxygenase isoform is essential for aerobic growth in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: modes of differential operation of two isoforms/enzymes to adapt to low oxygen environments in cyanobacteria." Plant Cell Physiol **52**(10): 1744-1756.
- Arteni, A. A., G. Ajlani und E. J. Boekema** (2009). "Structural organisation of phycobilisomes from *Synechocystis* sp. strain PCC6803 and their interaction with the membrane." Biochim Biophys Acta **1787**(4): 272-279.
- Ashby, M. K. und C. W. Mullineaux** (1999). "Cyanobacterial *ycf27* gene products regulate energy transfer from phycobilisomes to photosystems I and II." FEMS Microbiol Lett **181**(2): 253-260.
- Baier, K., S. Nicklisch, C. Grundner, J. Reinecke und W. Lockau** (2001). "Expression of two *nblA*-homologous genes is required for phycobilisome degradation in nitrogen-starved *Synechocystis* sp. PCC6803." FEMS Microbiol Lett **195**(1): 35-39.
- Baniulis, D., E. Yamashita, J. P. Whitelegge, A. I. Zatsman, M. P. Hendrich, S. S. Hasan, C. M. Ryan und W. A. Cramer** (2009). "Structure-function, stability, and chemical modification of the cyanobacterial cytochrome *b₆f* complex from *Nostoc* sp. PCC 7120." J Biol Chem **284**(15): 9861-9869.
- Baniulis, D., E. Yamashita, H. Zhang, S. S. Hasan und W. A. Cramer** (2008). "Structure-function of the cytochrome *b₆f* complex." Photochem Photobiol **84**(6): 1349-1358.
- Battchikova, N. und E. M. Aro** (2007). "Cyanobacterial NDH-1 complexes: multiplicity in function and subunit composition." Physiol Plant **131**(1): 22-32.
- Battchikova, N., M. Eisenhut und E. M. Aro** (2011). "Cyanobacterial NDH-1 complexes: novel insights and remaining puzzles." Biochim Biophys Acta **1807**(8): 935-944.
- Battersby, A. R.** (2000). "Tetrapyrroles: the pigments of life." Nat Prod Rep **17**(6): 507-526.
- Baymann, F., F. Zito, R. Kuras, L. Minai, W. Nitschke und F. A. Wollman** (1999). "Functional characterization of *Chlamydomonas* mutants defective in cytochrome *f* maturation." J Biol Chem **274**(33): 22957-22967.
- Beale, S. I.** (1993). "Biosynthesis of phycobilins." Chemical Reviews **93**(2): 785-802.
- Beale, S. I.** (1999). "Enzymes of chlorophyll biosynthesis." Photosynth Res **60**(1): 43-73.
-

-
- Beinert, H.** (1983). "Semi-micro methods for analysis of labile sulfide and of labile sulfide plus sulfane sulfur in unusually stable iron-sulfur proteins." *Anal Biochem* **131**(2): 373-378.
- Beinert, H. und P. J. Kiley** (1999). "Fe-S proteins in sensing and regulatory functions." *Curr Opin Chem Biol* **3**(2): 152-157.
- Bensadoun, A. und D. Weinstein** (1976). "Assay of proteins in the presence of interfering materials." *Anal Biochem* **70**(1): 241-250.
- Bensing, B. A., B. J. Meyer und G. M. Dunny** (1996). "Sensitive detection of bacterial transcription initiation sites and differentiation from RNA processing sites in the pheromone-induced plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(15): 7794-7799.
- Bentley, W. E., N. Mirjalili, D. C. Andersen, R. H. Davis und D. S. Kompala** (1990). "Plasmid-encoded protein: the principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria." *Biotechnol Bioeng* **35**(7): 668-681.
- Bernát, G., M. Rögner, G. A. Peschek, C. Obinger und G. Renger** (2011). Center of the cyanobacterial electron transport network: The cytochrome *b₆f* complex. Bioenergetic processes of cyanobacteria, Springer Netherlands: 573-606.
- Berthold, D. A. und P. Stenmark** (2003). "Membrane-bound diiron carboxylate proteins." *Annu Rev Plant Biol* **54**: 497-517.
- Bhalerao, R. P. und P. Gustafsson** (1994). "Factors influencing the phycobilisome rod composition of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942: Effects of reduced phycocyanin content, lack of rod-linkers, and over-expression of the rod-terminating linker." *Physiol Plant* **90**(1): 187-197.
- Birnboim, H. C. und J. Doly** (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-1523.
- Bishop, C. L., S. Ulas, E. Baena-Gonzalez, E. M. Aro, S. Purton, J. H. Nugent und P. Maenpaa** (2007). "The PsbZ subunit of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803 modulates electron flow through the photosynthetic electron transfer chain." *Photosynth Res* **93**(1-3): 139-147.
- Bjerrum, O. J. und C. Schäfer-Nielsen** (1987). "Electrophoresis '86. Proceedings of the Fifth Meeting of the International Electrophoresis Society, London 1986. Editor: M. J. Dunn, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1986, pp. 765." *ELECTROPHORESIS* **8**(1): 75-75.
- Bogorad, L.** (1958a). "The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. I. Uroporphyrin I." *J Biol Chem* **233**(2): 501-509.
- Bogorad, L.** (1958b). "The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. II. Uroporphyrin III." *J Biol Chem* **233**(2): 510-515.
- Bollivar, D. W.** (2006). "Recent advances in chlorophyll biosynthesis." *Photosynth Res* **90**(2): 173-194.
- Bollivar, D. W. und S. I. Beale** (1996). "The chlorophyll biosynthetic enzyme Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester (oxidative) cyclase (characterization and partial purification from *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechocystis* sp. PCC 6803)." *Plant Physiol* **112**(1): 105-114.
- Bollivar, D. W., J. Y. Suzuki, J. T. Beatty, J. M. Dobrowolski und C. E. Bauer** (1994). "Directed mutational analysis of bacteriochlorophyll *a* biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus*." *J Mol Biol* **237**(5): 622-640.
- Boudreau, E., Y. Takahashi, C. Lemieux, M. Turmel und J. D. Rochaix** (1997). "The chloroplast *ycf3* and *ycf4* open reading frames of *Chlamydomonas reinhardtii* are required for the accumulation of the photosystem I complex." *EMBO J* **16**(20): 6095-6104.
- Boynton, T. O., L. E. Daugherty, T. A. Dailey und H. A. Dailey** (2009). "Identification of *Escherichia coli* HemG as a novel, menadione-dependent flavodoxin with protoporphyrinogen oxidase activity." *Biochemistry* **48**(29): 6705-6711.
- Brasier, M. D., O. R. Green, A. P. Jephcoat, A. K. Kleppe, M. J. Van Kranendonk, J. F. Lindsay, A. Steele und N. V. Grassineau** (2002). "Questioning the evidence for Earth's oldest fossils." *Nature* **416**(6876): 76-81.
- Bröcker, M. J., S. Schomburg, D. W. Heinz, D. Jahn, W. D. Schubert und J. Moser** (2010). "Crystal structure of the nitrogenase-like dark operative protochlorophyllide oxidoreductase catalytic complex (ChlN/ChlB)₂." *J Biol Chem* **285**(35): 27336-27345.
-

-
- Bullerjahn, G. S. und A. F. Post** (1993). "The prochlorophytes: are they more than just chlorophyll *a/b*-containing cyanobacteria?" Crit Rev Microbiol **19**(1): 43-59.
- Campbell, D., V. Hurry, A. K. Clarke, P. Gustafsson und G. Oquist** (1998). "Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation." Microbiol Mol Biol Rev **62**(3): 667-683.
- Carmel, D., P. Mulo, N. Battchikova und E. M. Aro** (2011). "Membrane attachment of Slr0006 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is determined by divalent ions." Photosynth Res **108**(2-3): 241-245.
- Carroll, K. S., H. Gao, H. Chen, J. A. Leary und C. R. Bertozzi** (2005). "Investigation of the iron-sulfur cluster in *Mycobacterium tuberculosis* APS reductase: implications for substrate binding and catalysis." Biochemistry **44**(44): 14647-14657.
- Cattolico, R. A., M. A. Jacobs, Y. Zhou, J. Chang, M. Duplessis, T. Lybrand, J. McKay, H. C. Ong, E. Sims und G. Rocap** (2008). "Chloroplast genome sequencing analysis of *Heterosigma akashiwo* CCMP452 (West Atlantic) and NIES293 (West Pacific) strains." BMC Genomics **9**: 211.
- Cavalier-Smith, T.** (2000). "Membrane heredity and early chloroplast evolution." Trends Plant Sci **5**(4): 174-182.
- Chen, M., M. Schliep, R. D. Willows, Z. L. Cai, B. A. Neilan und H. Scheer** (2010). "A red-shifted chlorophyll." Science **329**(5997): 1318-1319.
- Chew, A. G. und D. A. Bryant** (2007). "Chlorophyll biosynthesis in bacteria: the origins of structural and functional diversity." Annu Rev Microbiol **61**: 113-129.
- Chitnis, V. P. und P. R. Chitnis** (1993). "PsaL subunit is required for the formation of photosystem I trimers in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." FEBS Lett **336**(2): 330-334.
- Chua, N. H. und P. Bennoun** (1975). "Thylakoid membrane polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii*: wild-type and mutant strains deficient in photosystem II reaction center." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(6): 2175-2179.
- Clowes, R. C. und D. Rowley** (1954). "Some observations on linkage effects in genetic recombination in *Escherichia coli* K-12." J Gen Microbiol **11**(2): 250-260.
- Cooley, J. W. und W. F. Vermaas** (2001). "Succinate dehydrogenase and other respiratory pathways in thylakoid membranes of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: capacity comparisons and physiological function." J Bacteriol **183**(14): 4251-4258.
- Cornah, J. E., M. J. Terry und A. G. Smith** (2003). "Green or red: what stops the traffic in the tetrapyrrole pathway?" Trends Plant Sci **8**(5): 224-230.
- Cramer, W. A., S. S. Hasan und E. Yamashita** (2012). "The Q cycle of cytochrome *bc* complexes: a structure perspective." Biochim Biophys Acta **1807**(7): 788-802.
- Cramer, W. A., J. Yan, H. Zhang, G. Kurisu und J. L. Smith** (2005). "Structure of the cytochrome *b₆f* complex: new prosthetic groups, Q-space, and the 'hors d'oeuvres hypothesis' for assembly of the complex." Photosynth Res **85**(1): 133-143.
- Davies, R. C. und A. Neuberger** (1979a). "Control of 5-aminolaevulinate synthetase activity in *Rhodospseudomonas spheroides*. Binding of pyridoxal phosphate to 5-aminolaevulinate synthetase." Biochem J **177**(2): 661-671.
- Davies, R. C. und A. Neuberger** (1979b). "Control of 5-aminolaevulinate synthetase activity in *Rhodospseudomonas spheroides*. Purification and properties of the high-activity form of the enzyme." Biochem J **177**(2): 649-659.
- De Las Rivas, J., M. Balsera und J. Barber** (2004). "Evolution of oxygenic photosynthesis: genome-wide analysis of the OEC extrinsic proteins." Trends Plant Sci **9**(1): 18-25.
- de Lorimier, R. M., R. L. Smith und S. E. Stevens** (1992). "Regulation of phycobilisome structure and gene expression by light intensity." Plant Physiol **98**(3): 1003-1010.
- de Marsac, N. T., J. Houmard und A. N. G. Lester Packer** (1988). Complementary chromatic adaptation: Physiological conditions and action spectra. Methods in Enzymology, Academic Press. **Volume 167**: 318-328.
- Dismukes, G. C., V. V. Klimov, S. V. Baranov, Y. N. Kozlov, J. DasGupta und A. Tyrishkin** (2001). "The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2170-2175.
-

-
- Dobáková, M., R. Sobotka, M. Tichy und J. Komenda** (2009). "Psb28 protein is involved in the biogenesis of the photosystem II inner antenna CP47 (PsbB) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." Plant Physiol **149**(2): 1076-1086.
- Drath, M., K. Baier und K. Forchhammer** (2009). "An alternative methionine aminopeptidase, MapA, is required for nitrogen starvation and high-light acclimation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." Microbiology **155**(Pt 5): 1427-1439.
- Dühning, U., K. D. Irrgang, K. Lünser, J. Kehr und A. Wilde** (2006). "Analysis of photosynthetic complexes from a cyanobacterial *ycf37* mutant." Biochim Biophys Acta **1757**(1): 3-11.
- Einhauer, A. und A. Jungbauer** (2001). "The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins." J Biochem Biophys Methods **49**(1-3): 455-465.
- Eisenhut, M., E. A. von Wobeser, L. Jonas, H. Schubert, B. W. Ibelings, H. Bauwe, H. C. Matthijs und M. Hagemann** (2007). "Long-term response toward inorganic carbon limitation in wild type and glycolate turnover mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." Plant Physiol **144**(4): 1946-1959.
- El Bissati, K. und D. Kirilovsky** (2001). "Regulation of *psbA* and *psaE* expression by light quality in *Synechocystis* sp. PCC 6803. A redox control mechanism." Plant Physiol **125**(4): 1988-2000.
- Emlyn-Jones, D., M. K. Ashby und C. W. Mullineaux** (1999). "A gene required for the regulation of photosynthetic light harvesting in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803." Mol Microbiol **33**(5): 1050-1058.
- Ermakova-Gerdes, S. und W. Vermaas** (1999). "Inactivation of the open reading frame *slr0399* in *Synechocystis* sp. PCC 6803 functionally complements mutations near the Q(A) niche of photosystem II. A possible role of Slr0399 as a chaperone for quinone binding." J Biol Chem **274**(43): 30540-30549.
- Fields, S. und O. Song** (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." Nature **340**(6230): 245-246.
- Fish, W. W.** (1988). Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. Methods in Enzymology. **158**: 357-364.
- Flint, D. H., M. H. Emptage, M. G. Finnegan, W. Fu und M. K. Johnson** (1993). "The role and properties of the iron-sulfur cluster in *Escherichia coli* dihydroxy-acid dehydratase." J Biol Chem **268**(20): 14732-14742.
- Franche, C. und T. Damerval** (1988). Tests on *nif* probes and DNA hybridizations. Methods in Enzymology. L. Packer and A. N. Glazer, Academic Press. **Volume 167**: 803-808.
- Frias, J. E., A. Merida, A. Herrero, J. Martin-Nieto und E. Flores** (1993). "General distribution of the nitrogen control gene *ntcA* in cyanobacteria." J Bacteriol **175**(17): 5710-5713.
- Garcia-Dominguez, M., J. C. Reyes 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**(5): 1192-1201.
- Garrido-Franco, M.** (2003). "Pyridoxine 5'-phosphate synthase: de novo synthesis of vitamin B₆ and beyond." Biochim Biophys Acta **1647**(1-2): 92-97.
- Gibney, B. R., S. E. Mulholland, F. Rabanal und P. L. Dutton** (1996). "Ferredoxin and ferredoxin-heme maquettes." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15041-15046.
- Gill, S. C. und P. H. von Hippel** (1989). "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." Anal Biochem **182**(2): 319-326.
- Goto, T., R. Aoki, K. Minamizaki und Y. Fujita** (2010). "Functional differentiation of two analogous coproporphyrinogen III oxidases for heme and chlorophyll biosynthesis pathways in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." Plant Cell Physiol **51**(4): 650-663.
- Gould, S. B., R. F. Waller und G. I. McFadden** (2008). "Plastid evolution." Annu Rev Plant Biol **59**: 491-517.
- Granick, S. und D. Mauzerall** (1958). "Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. II. Enzymes converting delta-aminolevulinic acid to coproporphyrinogen." J Biol Chem **232**(2): 1119-1140.
- Gray, M. W.** (1993). "Origin and evolution of organelle genomes." Curr Opin Genet Dev **3**(6): 884-890.
- Gray, M. W.** (1999). "Evolution of organellar genomes." Curr Opin Genet Dev **9**(6): 678-687.
- Green, B. R.** (2011). "Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes." Plant J **66**(1): 34-44.
-

-
- Griese, M., C. Lange und J. Soppa** (2011). "Ploidy in cyanobacteria." *FEMS Microbiol Lett* **323**(2): 124-131.
- Grigorieva, G. und S. Shestakov** (1982). "Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803." *FEMS Microbiol Lett* **13**(4): 367-370.
- Grossman, A. R., M. R. Schaefer, G. G. Chiang und J. L. Collier** (1993). "The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions." *Microbiol Rev* **57**(3): 725-749.
- Gutu, A. und D. M. Kehoe** (2012). "Emerging perspectives on the mechanisms, regulation, and distribution of light color acclimation in cyanobacteria." *Molecular plant* **5**(1): 1-13.
- Haase, J., R. Lurz, A. M. Grahn, D. H. Bamford und E. Lanka** (1995). "Bacterial conjugation mediated by plasmid RP4: RSF1010 mobilization, donor-specific phage propagation, and pilus production require the same Tra2 core components of a proposed DNA transport complex." *J Bacteriol* **177**(16): 4779-4791.
- Hallick, R. und A. Bairoch** (1994). "Proposals for the naming of chloroplast genes. III. Nomenclature for open reading frames encoded in chloroplast genomes." *Plant Mol Biol Rep* **12**(2): S29-S30.
- Hanahan, D.** (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-580.
- Hansson, M. und L. Hederstedt** (1992). "Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* *hemEHY* gene cluster, which encodes protoheme IX biosynthetic enzymes." *J Bacteriol* **174**(24): 8081-8093.
- Hart, S. E., B. G. Schlarb-Ridley, D. S. Bendall und C. J. Howe** (2005). "Terminal oxidases of cyanobacteria." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 4): 832-835.
- Heimann, S. und U. Schreiber** (1999). "Cyt *b*-559 (Fd) participating in cyclic electron transport in spinach chloroplasts: evidence for kinetic connection with the Cyt *b*_{6/f} complex." *Plant Cell Physiol* **40**(8): 818-824.
- Herranen, M., N. Battchikova, P. Zhang, A. Graf, S. Sirpio, V. Paakkarinen und E. M. Aro** (2004). "Towards functional proteomics of membrane protein complexes in *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Plant Physiol* **134**(1): 470-481.
- Hihara, Y., A. Kamei, M. Kanehisa, A. Kaplan und M. Ikeuchi** (2001). "DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light." *Plant Cell Physiol* **13**(4): 793-806.
- Hladík, J. und D. Sofrová** (1991). "Does the trimeric form of the Photosystem I reaction center of cyanobacteria in vivo exist?" *Photosynth Res* **29**(3): 171-175.
- Hohmann-Marriott, M. F. und R. E. Blankenship** (2011). "Evolution of photosynthesis." *Annu Rev Plant Biol* **62**: 515-548.
- Horiuchi, M., K. Nakamura, K. Kojima, Y. Nishiyama, W. Hatakeyama, T. Hisabori und Y. Hihara** (2010). "The PedR transcriptional regulator interacts with thioredoxin to connect photosynthesis with gene expression in cyanobacteria." *Biochem J* **431**(1): 135-140.
- Hörmann, F., J. Soll und B. Bolter** (2007). "The chloroplast protein import machinery: a review." *Methods Mol Biol* **390**: 179-193.
- Howitt, C. A., J. W. Cooley, J. T. Wiskich und W. F. Vermaas** (2001). "A strain of *Synechocystis* sp. PCC 6803 without photosynthetic oxygen evolution and respiratory oxygen consumption: implications for the study of cyclic photosynthetic electron transport." *Planta* **214**(1): 46-56.
- Huang, L., M. P. McCluskey, H. Ni und R. A. LaRossa** (2002). "Global gene expression profiles of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 in response to irradiation with UV-B and white light." *J Bacteriol* **184**(24): 6845-6858.
- Huang, X., H. M. Holden und F. M. Raushel** (2001). "Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions." *Annual review of biochemistry* **70**: 149-180.
- Hübschmann, T., A. Wilde, I. Elanskaya, S. V. Shestakov und T. Börner** (1997). "A putative cytochrome *c* biogenesis gene in *Synechocystis* sp. PCC 6803." *FEBS Lett* **408**(2): 201-205.
- Ikai, A.** (1980). "Thermostability and aliphatic index of globular proteins." *J Biochem Biophys Methods* **88**(6): 1895-1898.
- Ikeuchi, M. und S. Tabata** (2001). "*Synechocystis* sp. PCC 6803 - a useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria." *Photosynth Res* **70**(1): 73-83.
-

-
- Inoue, K., B. W. Dreyfuss, K. L. Kindle, D. B. Stern, S. Merchant und O. A. Sodeinde** (1997). "Ccs1, a nuclear gene required for the post-translational assembly of chloroplast *c*-type cytochromes." *J Biol Chem* **272**(50): 31747-31754.
- Ishikawa, M., M. Fujiwara, K. Sonoike und N. Sato** (2009). "Orthogenomics of photosynthetic organisms: bioinformatic and experimental analysis of chloroplast proteins of endosymbiont origin in *Arabidopsis* and their counterparts in *Synechocystis*." *Plant Cell Physiol* **50**(4): 773-788.
- Ishino, Y., H. Okada, M. Ikeuchi und H. Taniguchi** (2007). "Mass spectrometry-based prokaryote gene annotation." *Proteomics* **7**(22): 4053-4065.
- Islam, M. R., S. Aikawa, T. Midorikawa, Y. Kashino, K. Satoh und H. Koike** (2008). "*slr1923* of *Synechocystis* sp. PCC6803 is essential for conversion of 3,8-divinyl(proto)chlorophyll(ide) to 3-monovinyl(proto)chlorophyll(ide)." *Plant Physiol* **148**(2): 1068-1081.
- Ito, H., M. Yokono, R. Tanaka und A. Tanaka** (2008). "Identification of a novel vinyl reductase gene essential for the biosynthesis of monovinyl chlorophyll in *Synechocystis* sp. PCC6803." *J Biol Chem* **283**(14): 9002-9011.
- Jansson, C., R. J. Debus, H. D. Osiewacz, M. Gurevitz und L. McIntosh** (1987). "Construction of an obligate photoheterotrophic mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 : Inactivation of the *psbA* gene family." *Plant Physiol* **85**(4): 1021-1025.
- Jordan, P., P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger und N. Krauss** (2001). "Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution." *Nature* **411**(6840): 909-917.
- Kalla, R., R. P. Bhalerao und P. Gustafsson** (1993). "Regulation of phycobilisome rod proteins and mRNA at different light intensities in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301." *Gene* **126**(1): 77-83.
- Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirosawa, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda und S. Tabata** (1996). "Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions." *DNA Res* **3**(3): 109-136.
- Karradt, A., J. Sobanski, J. Mattow, W. Lockau und K. Baier** (2008). "NblA, a key protein of phycobilisome degradation, interacts with ClpC, a HSP100 chaperone partner of a cyanobacterial Clp protease." *J Biol Chem* **283**(47): 32394-32403.
- Kashino, Y., T. Takahashi, N. Inoue-Kashino, A. Ban, Y. Ikeda, K. Satoh und M. Sugiura** (2007). "Ycf12 is a core subunit in the photosystem II complex." *Biochim Biophys Acta* **1767**(11): 1269-1275.
- Kato, K., R. Tanaka, S. Sano, A. Tanaka und H. Hosaka** (2010). "Identification of a gene essential for protoporphyrinogen IX oxidase activity in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(38): 16649-16654.
- Katoh, A., K. S. Lee, H. Fukuzawa, K. Ohyama und T. Ogawa** (1996). "*cemA* homologue essential to CO₂ transport in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(9): 4006-4010.
- Keeling, P. J.** (2009). "Chromalveolates and the evolution of plastids by secondary endosymbiosis." *J Eukaryot Microbiol* **56**(1): 1-8.
- Kelley, L. A. und M. J. Sternberg** (2009). "Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server." *Nat Protoc* **4**(3): 363-371.
- Kibbe, W. A.** (2007). "OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator." *Nucleic Acids Res* **35**(Web Server issue): W43-46.
- Klughammer, C. und U. Schreiber** (1994). "An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700⁺-absorbance changes at 830 nm." *Planta* **192**(2): 261-268.
- Klughammer, C. und U. Schreiber** (2008). "Saturation pulse method for assessment of energy conversion in PS I." *PAM Application Notes* **1**: 11-14.
- Kobayashi, M., T. Ishizuka, M. Katayama, M. Kanehisa, M. Bhattacharyya-Pakrasi, H. B. Pakrasi und M. Ikeuchi** (2004). "Response to oxidative stress involves a novel peroxiredoxin
-

-
- gene in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Plant Cell Physiol* **45**(3): 290-299.
- Koch, M., C. Breithaupt, R. Kiefersauer, J. Freigang, R. Huber und A. Messerschmidt** (2004). "Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: a key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis." *EMBO J* **23**(8): 1720-1728.
- Komenda, J., J. Nickelsen, M. Tichy, O. Prasil, L. A. Eichacker und P. J. Nixon** (2008). "The cyanobacterial homologue of HCF136/YCF48 is a component of an early photosystem II assembly complex and is important for both the efficient assembly and repair of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803." *J Biol Chem* **283**(33): 22390-22399.
- Kufryk, G. I. und W. F. Vermaas** (2003). "Slr2013 is a novel protein regulating functional assembly of photosystem II in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." *J Bacteriol* **185**(22): 6615-6623.
- Labarre, J., F. Chauvat und P. Thuriaux** (1989). "Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803." *J Bacteriol* **171**(6): 3449-3457.
- Laemmlí, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson und D. G. Higgins** (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." *Bioinformatics* **23**(21): 2947-2948.
- Lau, R. H., M. M. MacKenzie und W. F. Doolittle** (1977). "Phycocyanin synthesis and degradation in the blue-green bacterium *Anacystis nidulans*." *J Bacteriol* **132**(3): 771-778.
- Lawrence, J. G.** (2002). "Shared strategies in gene organization among prokaryotes and eukaryotes." *Cell* **110**(4): 407-413.
- Le Corguillé, G., G. Pearson, M. Valente, C. Viegas, B. Gschloessl, E. Corre, X. Bailly, A. Peters, C. Jubin, B. Vacherie, J. M. Cock und C. Leblanc** (2009). "Plastid genomes of two brown algae, *Ectocarpus siliculosus* and *Fucus vesiculosus*: further insights on the evolution of red-algal derived plastids." *BMC Evol Biol* **9**(1): 253.
- Leeper, F. J.** (1989). "The biosynthesis of porphyrins, chlorophylls, and vitamin B12." *Nat Prod Rep* **6**(2): 171-203.
- Lennox, E. S.** (1955). "Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1." *Virology* **1**(2): 190-206.
- Lermontova, I., E. Kruse, H. P. Mock und B. Grimm** (1997). "Cloning and characterization of a plastidal and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(16): 8895-8900.
- 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**(15): 4268-4277.
- Liere, K., A. Weihe und T. Börner** (2011). "The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation." *J Plant Physiol* **168**(12): 1345-1360.
- Liu, X. und R. Curtiss, 3rd** (2009). "Nickel-inducible lysis system in *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(51): 21550-21554.
- Loll, B., J. Kern, A. Zouni, W. Saenger, J. Biesiadka und K. D. Irrgang** (2005). "The antenna system of photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* at 3.2 Å resolution." *Photosynth Res* **86**(1-2): 175-184.
- Lopez-Maury, L., A. M. Sanchez-Riego, J. C. Reyes und F. J. Florencio** (2009). "The glutathione/glutaredoxin system is essential for arsenate reduction in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." *J Bacteriol* **191**(11): 3534-3543.
- Lüer, C., S. Schauer, K. Mobius, J. Schulze, W. D. Schubert, D. W. Heinz, D. Jahn und J. Moser** (2005). "Complex formation between glutamyl-tRNA reductase and glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase in *Escherichia coli* during the initial reactions of porphyrin biosynthesis." *J Biol Chem* **280**(19): 18568-18572.
- MacColl, R.** (1998). "Cyanobacterial phycobilisomes." *J Struct Biol* **124**(2-3): 311-334.
- MacKinney, G.** (1941). "Absorption of light by chlorophyll solutions." *J Biol Chem* **140**: 315-322.
- Mandel, M. und A. Higa** (1970). "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection." *J Mol Biol* **53**(1): 159-162.
-

-
- Mant, A. und C. Robinson** (1998). "An *Arabidopsis* cDNA encodes an apparent polyprotein of two non-identical thylakoid membrane proteins that are associated with photosystem II and homologous to algal *ycf32* open reading frames." *FEBS Lett* **423**(2): 183-188.
- Mao, H. B., G. F. Li, D. H. Li, Q. Y. Wu, Y. D. Gong, X. F. Zhang und N. M. Zhao** (2003). "Effects of glycerol and high temperatures on structure and function of phycobilisomes in *Synechocystis* sp. PCC 6803." *FEBS Lett* **553**(1-2): 68-72.
- Marbouty, M., C. Saguez, C. Cassier-Chauvat und F. Chauvat** (2009). "Characterization of the FtsZ-interacting septal proteins SepF and Ftn6 in the spherical-celled cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803." *J Bacteriol* **191**(19): 6178-6185.
- Marin, B., E. C. Nowack und M. Melkonian** (2005). "A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis." *Protist* **156**(4): 425-432.
- Martin, W., T. Rujan, E. Richly, A. Hansen, S. Cornelsen, T. Lins, D. Leister, B. Stoebe, M. Hasegawa und D. Penny** (2002). "Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19): 12246-12251.
- Martin, W., B. Stoebe, V. Goremykin, S. Hapsmann, M. Hasegawa und K. V. Kowallik** (1998). "Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts." *Nature* **393**(6681): 162-165.
- Martinez, S. E., D. Huang, A. Szczepaniak, W. A. Cramer und J. L. Smith** (1994). "Crystal structure of chloroplast cytochrome *f* reveals a novel cytochrome fold and unexpected heme ligation." *Structure* **2**(2): 95-105.
- Masoumi, A., I. U. Heinemann, M. Rohde, M. Koch, M. Jahn und D. Jahn** (2008). "Complex formation between protoporphyrinogen IX oxidase and ferrochelatase during haem biosynthesis in *Thermosynechococcus elongatus*." *Microbiology* **154**(Pt 12): 3707-3714.
- Masuda, T.** (2008). "Recent overview of the Mg branch of the tetrapyrrole biosynthesis leading to chlorophylls." *Photosynth Res* **96**(2): 121-143.
- Maxwell, K. und G. N. Johnson** (2000). "Chlorophyll fluorescence - a practical guide." *J Exp Bot* **51**(345): 659-668.
- McGinn, P. J., G. D. Price, R. Maleszka und M. R. Badger** (2003). "Inorganic carbon limitation and light control the expression of transcripts related to the CO₂-concentrating mechanism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803." *Plant Physiol* **132**(1): 218-229.
- Meetam, M., N. Keren, I. Ohad und H. B. Pakrasi** (1999). "The PsbY protein is not essential for oxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Plant Physiol* **121**(4): 1267-1272.
- Mereschkowsky, C.** (1905). "Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche." *Biol Centralbl* **25**: 593-604.
- Minamizaki, K., T. Mizoguchi, T. Goto, H. Tamiaki und Y. Fujita** (2008). "Identification of two homologous genes, *chlAI* and *chlAII*, that are differentially involved in isocyclic ring formation of chlorophyll a in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." *J Biol Chem* **283**(5): 2684-2692.
- Minoda, A., A. P. Weber, K. Tanaka und S. Y. Miyagishima** (2010). "Nucleus-independent control of the rubisco operon by the plastid-encoded transcription factor Ycf30 in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*." *Plant Physiol* **154**(3): 1532-1540.
- Mitchell, P.** (1966). "Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation." *Biol Rev Camb Philos Soc* **41**(3): 445-502.
- Mitschke, J., J. Georg, I. Scholz, C. M. Sharma, D. Dienst, J. Bantscheff, B. Voss, C. Steglich, A. Wilde, J. Vogel und W. R. Hess** (2011). "An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(5): 2124-2129.
- Miyagishima, S. Y., C. P. Wolk und K. W. Osteryoung** (2005). "Identification of cyanobacterial cell division genes by comparative and mutational analyses." *Mol Microbiol* **56**(1): 126-143.
- Mizoguchi, T., Y. Kimura, T. Yoshitomi und H. Tamiaki** (2011). "The stereochemistry of chlorophyll-*c*₃ from the haptophyte *Emiliania huxleyi*: the (13⁽²⁾R)-enantiomers of chlorophylls-*c* are exclusively selected as the photosynthetically active pigments in chromophyte algae." *Biochim Biophys Acta* **1807**(11): 1467-1473.
-

-
- Mochizuki, N., R. Tanaka, B. Grimm, T. Masuda, M. Moulin, A. G. Smith, A. Tanaka und M. J. Terry (2010). "The cell biology of tetrapyrroles: a life and death struggle." Trends Plant Sci **15**(9): 488-498.
- Monod, C., Y. Takahashi, M. Goldschmidt-Clermont und J. D. Rochaix (1994). "The chloroplast *yef8* open reading frame encodes a photosystem II polypeptide which maintains photosynthetic activity under adverse growth conditions." EMBO J **13**(12): 2747-2754.
- Moseley, J. L., M. D. Page, N. P. Alder, M. Eriksson, J. Quinn, F. Soto, S. M. Theg, M. Hippler und S. Merchant (2002). "Reciprocal expression of two candidate di-iron enzymes affecting photosystem I and light-harvesting complex accumulation." Plant Cell **14**(3): 673-688.
- Moseley, J. L., J. Quinn, M. Eriksson und S. Merchant (2000). "The *CrdI* gene encodes a putative di-iron enzyme required for photosystem I accumulation in copper deficiency and hypoxia in *Chlamydomonas reinhardtii*." EMBO J **19**(10): 2139-2151.
- Müh, F., C. Glöckner, J. Hellmich und A. Zouni (2012). "Light-induced quinone reduction in photosystem II." Biochim Biophys Acta **1817**(1): 44-65.
- Mulo, P., C. Sicora und E. M. Aro (2009). "Cyanobacterial *psbA* gene family: optimization of oxygenic photosynthesis." Cell Mol Life Sci **66**(23): 3697-3710.
- Murakami, A. und Y. Fujita (1988). "Steady state of photosynthesis in cyanobacterial photosynthetic systems before and after regulation of electron transport composition: overall rate of photosynthesis and PSI/PS II composition." Plant Cell Physiol **29**(2): 305-311.
- Myers, J., J. R. Graham und R. T. Wang (1980). "Light harvesting in *Anacystis nidulans* studied in pigment mutants." Plant Physiol **66**(6): 1144-1149.
- Nakamura, K. und Y. Hihara (2006). "Photon flux density-dependent gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is regulated by a small, redox-responsive, LuxR-type regulator." J Biol Chem **281**(48): 36758-36766.
- Nakao, M., S. Okamoto, M. Kohara, T. Fujishiro, T. Fujisawa, S. Sato, S. Tabata, T. Kaneko und Y. Nakamura (2010). "CyanoBase: the cyanobacteria genome database update 2010." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D379-381.
- Nelson, N. und C. F. Yocum (2006). "Structure and function of photosystems I and II." Annu Rev Plant Biol **57**: 521-565.
- Neufeld, S., V. Zinchenko, D. P. Stephan, K. P. Bader und E. K. Pistorius (2004). "On the functional significance of the polypeptide PsbY for photosynthetic water oxidation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." Mol Genet Genomics **271**(4): 458-467.
- Nield, J. und J. Barber (2006). "Refinement of the structural model for the Photosystem II supercomplex of higher plants." Biochim Biophys Acta **1757**(5-6): 353-361.
- Nogaj, L. A. und S. I. Beale (2005). "Physical and kinetic interactions between glutamyl-tRNA reductase and glutamate-1-semialdehyde aminotransferase of *Chlamydomonas reinhardtii*." J Biol Chem **280**(26): 24301-24307.
- Nowaczyk, M. M., J. Sander, N. Grasse, K. U. Cormann, D. Rexroth, G. Bernát und M. Rägner (2010). "Dynamics of the cyanobacterial photosynthetic network: communication and modification of membrane protein complexes." Eur J Cell Biol **89**(12): 974-982.
- Ohkawa, H., G. D. Price, M. R. Badger und T. Ogawa (2000). "Mutation of *ndh* genes leads to inhibition of CO₂ uptake rather than HCO₃⁻ uptake in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." J Bacteriol **182**(9): 2591-2596.
- Ohtsuka, M., J. Oyabu, Y. Kashino, K. Satoh und H. Koike (2004). "Inactivation of *yef33* results in an altered cyclic electron transport pathway around photosystem I in *Synechocystis* sp. PCC6803." Plant Cell Physiol **45**(9): 1243-1251.
- Olson, J. M. (2006). "Photosynthesis in the Archean era." Photosynth Res **88**(2): 109-117.
- Osanai, T., S. Imamura, M. Asayama, M. Shirai, I. Suzuki, N. Murata und K. Tanaka (2006). "Nitrogen induction of sugar catabolic gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803." DNA Res **13**(5): 185-195.
- Oster, U., C. E. Bauer und W. Rudiger (1997). "Characterization of chlorophyll *a* and bacteriochlorophyll *a* synthases by heterologous expression in *Escherichia coli*." J Biol Chem **272**(15): 9671-9676.
- Ouchane, S., A. S. Steunou, M. Picaud und C. Astier (2004). "Aerobic and anaerobic Mg-protoporphyrin monomethyl ester cyclases in purple bacteria: a strategy adopted to bypass the repressive oxygen control system." J Biol Chem **279**(8): 6385-6394.
-

-
- Palmer, B. R. und M. G. Marinus** (1994). "The *dam* and *dcm* strains of *Escherichia coli* - a review." Gene **143**(1): 1-12.
- Partensky, F. und L. Garczarek** (2010). "*Prochlorococcus*: advantages and limits of minimalism." Ann Rev Mar Sci **2**: 305-331.
- Paumann, M., G. Regelsberger, C. Obinger und G. A. Peschek** (2005). "The bioenergetic role of dioxygen and the terminal oxidase(s) in cyanobacteria." Biochim Biophys Acta **1707**(2-3): 231-253.
- Peter, E. und B. Grimm** (2009). "GUN4 is required for posttranslational control of plant tetrapyrrole biosynthesis." Molecular plant **2**(6): 1198-1210.
- Peter, E., A. Salinas, T. Wallner, D. Jeske, D. Dienst, A. Wilde und B. Grimm** (2009). "Differential requirement of two homologous proteins encoded by *sll1214* and *sll1874* for the reaction of Mg protoporphyrin monomethylester oxidative cyclase under aerobic and micro-oxic growth conditions." Biochim Biophys Acta **1787**(12): 1458-1467.
- Peter, E., T. Wallner, A. Wilde und B. Grimm** (2011). "Comparative functional analysis of two hypothetical chloroplast open reading frames (*ycf*) involved in chlorophyll biosynthesis from *Synechocystis* sp. PCC6803 and plants." J Plant Physiol **168**(12): 1380-1386.
- Pietsch, D., G. Bernát, U. Kahmann, D. Staiger, E. K. Pistorius und K. P. Michel** (2011). "New insights into the function of the iron deficiency-induced protein C from *Synechococcus elongatus* PCC 7942." Photosynth Res **108**(2-3): 121-132.
- Pinta, V., M. Picaud, F. Reiss-Husson und C. Astier** (2002). "*Rubrivivax gelatinosus acsF* (previously *orf358*) codes for a conserved, putative binuclear-iron-cluster-containing protein involved in aerobic oxidative cyclization of Mg-protoporphyrin IX monomethylester." J Bacteriol **184**(3): 746-753.
- Pinto, F. L., A. Thapper, W. Sontheim und P. Lindblad** (2009). "Analysis of current and alternative phenol based RNA extraction methodologies for cyanobacteria." BMC Mol Biol **10**: 79.
- Porra, R. J., W. Schäfer, I. Katheder und H. Scheer** (1995). "The derivation of the oxygen atoms of the 13(1)-oxo and 3-acetyl groups of bacteriochlorophyll *a* from water in *Rhodobacter sphaeroides* cells adapting from respiratory to photosynthetic conditions: evidence for an anaerobic pathway for the formation of isocyclic ring E." FEBS Lett **371**(1): 21-24.
- Price, G. D., M. R. Badger, F. J. Woodger und B. M. Long** (2008). "Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants." J Exp Bot **59**(7): 1441-1461.
- Price, M. N., K. H. Huang, E. J. Alm und A. P. Arkin** (2005). "A novel method for accurate operon predictions in all sequenced prokaryotes." Nucleic Acids Res **33**(3): 880-892.
- Radmer, R. J. und L. Bogorad** (1967). "S-adenosyl-L-methionine-magnesium protoporphyrin methyltransferase, an enzyme in the biosynthetic pathway of chlorophyll in *Zea mays*." Plant Physiol **42**(3): 463-465.
- Reinbothe, C., M. El Bakkouri, F. Buhr, N. Muraki, J. Nomata, G. Kurisu, Y. Fujita und S. Reinbothe** (2011). "Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction." Trends Plant Sci **15**(11): 614-624.
- Reith, M. und J. Munholland** (1995). "Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome." Plant Mol Biol Rep **13**(4): 333-335.
- Rexroth, S., C. W. Mullineaux, D. Ellinger, E. Sendtko, M. Rögner und F. Koenig** (2011). "The plasma membrane of the cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* contains segregated bioenergetic domains." Plant Cell **23**(6): 2379-2390.
- Reyes, J. C. und F. J. Florencio** (1995). "Electron transport controls transcription of the glutamine synthetase gene (*glnA*) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." Plant Mol Biol **27**(4): 789-799.
- Reyes, J. C., M. I. Muro-Pastor 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**(8): 2678-2689.
- Rippka, R. und G. Cohen-Bazire** (1983). "The cyanobacteriales: a legitimate order based on the type strain *Cyanobacterium stanieri*?" Ann Microbiol (Paris) **134B**(1): 21-36.
-

-
- Rippka, R., J. Deruelles, J. B. Waterbury, M. Herdman und R. Y. Stanier** (1979). "Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria." J Gen Microbiol **111**(1): 1-61.
- Rögner, M., P. J. Nixon und B. A. Diner** (1990). "Purification and characterization of photosystem I and photosystem II core complexes from wild-type and phycocyanin-deficient strains of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803." J Biol Chem **265**(11): 6189-6196.
- Rost, B., G. Yachdav und J. Liu** (2004). "The PredictProtein server." Nucleic Acids Res **32**(Web Server issue): W321-326.
- Rutherford, K., J. Parkhill, J. Crook, T. Horsnell, P. Rice, M. A. Rajandream und B. Barrell** (2000). "Artemis: sequence visualization and annotation." Bioinformatics **16**(10): 944-945.
- Rzeznicka, K., C. J. Walker, T. Westergren, C. G. Kannangara, D. von Wettstein, S. Merchant, S. P. Gough und M. Hansson** (2005). "Xantha-I encodes a membrane subunit of the aerobic Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase involved in chlorophyll biosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(16): 5886-5891.
- Saiki, R. K., T. L. Bugawan, G. T. Horn, K. B. Mullis und H. A. Erlich** (1986). "Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes." Nature **324**(6093): 163-166.
- Sambrook, J. und D. W. Russell** (2001). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F. und A. R. Coulson** (1975). "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase." Journal of molecular biology **94**(3): 441-448.
- Sato, N., M. Ishikawa, M. Fujiwara und K. Sonoike** (2005). "Mass identification of chloroplast proteins of endosymbiont origin by phylogenetic profiling based on organism-optimized homologous protein groups." Genome Inform **16**(2): 56-68.
- Sato, S., Y. Nakamura, T. Kaneko, E. Asamizu und S. Tabata** (1999). "Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*." DNA Res **6**(5): 283-290.
- Sato, S., Y. Shimoda, A. Muraki, M. Kohara, Y. Nakamura und S. Tabata** (2007). "A large-scale protein protein interaction analysis in *Synechocystis* sp. PCC6803." DNA Res **14**(5): 207-216.
- Sato, T., S. Minagawa, E. Kojima, N. Okamoto und H. Nakamoto** (2010). "HtpG, the prokaryotic homologue of Hsp90, stabilizes a phycobilisome protein in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942." Mol Microbiol **76**(3): 576-589.
- Sawicki, A. und R. D. Willows** (2010). "BchJ and BchM interact in a 1 : 1 ratio with the magnesium chelatase BchH subunit of *Rhodobacter capsulatus*." Febs J **277**(22): 4709-4721.
- Schägger, H., W. A. Cramer und G. von Jagow** (1994). "Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis." Anal Biochem **217**(2): 220-230.
- Schägger, H. und G. von Jagow** (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal Biochem **166**(2): 368-379.
- Schmid, R. und D. Shemin** (1955). "The enzymatic formation of porphobilinogen from δ -aminolevulinic acid and its conversion to protoporphyrin." J Am Chem Soc **77**(2): 506-507.
- Schneider, D., S. Berry, P. Rich, A. Seidler und M. Rögner** (2001). "A regulatory role of the PetM subunit in a cyanobacterial cytochrome *b₆f* complex." J Biol Chem **276**(20): 16780-16785.
- Schneider, D., S. Berry, T. Volkmer, A. Seidler und M. Rögner** (2004). "PetC1 is the major Rieske iron-sulfur protein in the cytochrome *b₆f* complex of *Synechocystis* sp. PCC 6803." J Biol Chem **279**(38): 39383-39388.
- Schneider, D., S. Skrzypczak, S. Anemüller, C. L. Schmidt, A. Seidler und M. Rögner** (2002). "Heterogeneous Rieske proteins in the cytochrome *b₆f* complex of *Synechocystis* PCC6803?" J Biol Chem **277**(13): 10949-10954.
- Schneider, D., T. Volkmer und M. Rögner** (2007). "PetG and PetN, but not PetL, are essential subunits of the cytochrome *b₆f* complex from *Synechocystis* PCC 6803." Res Microbiol **158**(1): 45-50.
- Schneider, S. und U. J. Jürgens** (1991). "Cell wall and sheath constituents of the cyanobacterium *Gloeobacter violaceus*." Archives of Microbiology **156**(4): 312-318.
-

-
- Schünemann, V. und H. Winkler** (2000). "Structure and dynamics of biomolecules studied by Mössbauer spectroscopy." *Rep Pro Phys* **63**(3): 263.
- Seehra, J. S., P. M. Jordan und M. Akhtar** (1983). "Anaerobic and aerobic coproporphyrinogen III oxidases of *Rhodospseudomonas spheroides*. Mechanism and stereochemistry of vinyl group formation." *Biochem J* **209**(3): 709-718.
- Shemin, D. und C. S. Russell** (1953). " δ -aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrines und purines." *J Am Chem Soc* **75**(19): 4873-4874.
- Shen, G., W. M. Schluchter und D. A. Bryant** (2008). "Biogenesis of phycobiliproteins: I. *cpcS-I* and *cpcU* mutants of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 define a heterodimeric phycocyanobilin lyase specific for beta-phycocyanin and allophycocyanin subunits." *J Biol Chem* **283**(12): 7503-7512.
- Shen, G. und W. F. Vermaas** (1994). "Chlorophyll in a *Synechocystis* sp. PCC 6803 mutant without photosystem I and photosystem II core complexes. Evidence for peripheral antenna chlorophylls in cyanobacteria." *J Biol Chem* **269**(19): 13904-13910.
- Shintani, D. K., Z. Cheng und D. DellaPenna** (2002). "The role of 2-methyl-6-phytylbenzoquinone methyltransferase in determining tocopherol composition in *Synechocystis* sp. PCC6803." *FEBS Lett* **511**(1-3): 1-5.
- Smart, L. B., S. L. Anderson und L. McIntosh** (1991). "Targeted genetic inactivation of the photosystem I reaction center in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." *EMBO J* **10**(11): 3289-3296.
- Smart, L. B., N. R. Bowlby, S. L. Anderson, I. Sithole und L. McIntosh** (1994). "Genetic manipulation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Development of strains lacking photosystem I for the analysis of mutations in photosystem II)." *Plant Physiol* **104**(2): 349-354.
- Smart, L. B. und L. McIntosh** (1993). "Genetic inactivation of the *psaB* gene in *Synechocystis* sp. PCC 6803 disrupts assembly of photosystem I." *Plant Mol Biol* **21**(1): 177-180.
- Sobotka, R., U. Dühring, J. Komenda, E. Peter, Z. Gardian, M. Tichy, B. Grimm und A. Wilde** (2008). "Importance of the cyanobacterial Gun4 protein for chlorophyll metabolism and assembly of photosynthetic complexes." *J Biol Chem* **283**(38): 25794-25802.
- Southern, E. M.** (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." *J Mol Biol* **98**(3): 503-517.
- Spizizen, J.** (1958). "Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**(10): 1072-1078.
- Stanier, R. Y., R. Kunisawa, M. Mandel und G. Cohen-Bazire** (1971). "Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*)." *Bacteriol Rev* **35**(2): 171-205.
- Studier, F. W. und B. A. Moffatt** (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *J Mol Biol* **189**(1): 113-130.
- Summerfield, T. C., J. Toepel und L. A. Sherman** (2008). "Low-oxygen induction of normally cryptic *psbA* genes in cyanobacteria." *Biochemistry* **47**(49): 12939-12941.
- Swiatek, M., R. Kuras, A. Sokolenko, D. Higgs, J. Olive, G. Cinque, B. Muller, L. A. Eichacker, D. B. Stern, R. Bassi, R. G. Herrmann und F. A. Wollman** (2001). "The chloroplast gene *ycf9* encodes a photosystem II (PSII) core subunit, PsbZ, that participates in PSII supramolecular architecture." *Plant Cell* **13**(6): 1347-1367.
- Tajima, N., S. Sato, F. Maruyama, T. Kaneko, N. V. Sasaki, K. Kurokawa, H. Ohta, Y. Kanesaki, H. Yoshikawa, S. Tabata, M. Ikeuchi und N. Sato** (2011). "Genomic structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 strain GT-S." *DNA Res* **18**(5): 393-399.
- Tanaka, A. und R. Tanaka** (2006). "Chlorophyll metabolism." *Curr Opin Plant Biol* **9**(3): 248-255.
- Tanaka, R. und A. Tanaka** (2007). "Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants." *Annu Rev Plant Biol* **58**: 321-346.
- Thomas, J. C., B. Ughy, B. Lagoutte und G. Ajlani** (2006). "A second isoform of the ferredoxin:NADP oxidoreductase generated by an in-frame initiation of translation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(48): 18368-18373.
- Tichy, M. und W. Vermaas** (2000). "Combinatorial mutagenesis and pseudorevertant analysis to characterize regions in loop E of the CP47 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Eur J Biochem* **267**(20): 6296-6301.
-

-
- Tirichine, L. und C. Bowler** (2011). "Decoding algal genomes: tracing back the history of photosynthetic life on Earth." *Plant J* **66**(1): 45-57.
- Totley, S., M. A. Block, M. Allen, T. Westergren, C. Albrieux, H. V. Scheller, S. Merchant und P. E. Jensen** (2003). "Arabidopsis CHL27, located in both envelope and thylakoid membranes, is required for the synthesis of protochlorophyllide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26): 16119-16124.
- Tous, C., M. A. Vega-Palas und A. Vioque** (2001). "Conditional expression of RNase P in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 allows detection of precursor RNAs. Insight in the in vivo maturation pathway of transfer and other stable RNAs." *J Biol Chem* **276**(31): 29059-29066.
- Tripp, H. J., S. R. Bench, K. A. Turk, R. A. Foster, B. A. Desany, F. Niazi, J. P. Affourtit und J. P. Zehr** (2010). "Metabolic streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium." *Nature* **464**(7285): 90-94.
- Tsunoyama, Y., G. Bernát, N. G. Dyczmons, D. Schneider und M. Rögner** (2009). "Multiple Rieske proteins enable short- and long-term light adaptation of *Synechocystis* sp. PCC 6803." *J Biol Chem* **284**(41): 27875-27883.
- Ughy, B. und G. Ajlani** (2004). "Phycobilisome rod mutants in *Synechocystis* sp. strain PCC6803." *Microbiology* **150**(Pt 12): 4147-4156.
- Ulbricht, R.** (1920). *Das Kugelphotometer (Ulbricht'sche Kugel): Darstellung seiner Theorie, Ausbildung und Anwendung, unter besonderer Berücksichtigung der Fehlerquellen*. München, Berlin, R. Oldenbourg.
- Ulijasz, A. T. und R. D. Vierstra** (2011). "Phytochrome structure and photochemistry: recent advances toward a complete molecular picture." *Curr Opin Plant Biol* **14**(5): 498-506.
- Ullmann, A., F. Jacob und J. Monod** (1967). "Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*." *J Mol Biol* **24**(2): 339-343.
- van der Giezen, M.** (2005). "Endosymbiosis: past and present." *Heredity (Edinb)* **95**(5): 335-336.
- Vega-Palas, M. A., E. Flores und A. Herrero** (1992). "NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of bacterial regulators." *Mol Microbiol* **6**(13): 1853-1859.
- Vermaas, W. F., J. G. Williams, A. W. Rutherford, P. Mathis und C. J. Arntzen** (1986). "Genetically engineered mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 lacks the photosystem II chlorophyll-binding protein CP-47." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(24): 9474-9477.
- Volkmer, T., D. Schneider, G. Bernát, H. Kirchhoff, S. O. Wenk und M. Rögner** (2007). "Ssr2998 of *Synechocystis* sp. PCC 6803 is involved in regulation of cyanobacterial electron transport and associated with the cytochrome b_6f complex." *J Biol Chem* **282**(6): 3730-3737.
- Walker, C. J., P. A. Castelfranco und B. J. Whyte** (1991). "Synthesis of divinyl protochlorophyllide. Enzymological properties of the Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester oxidative cyclase system." *Biochem J* **276** (Pt 3): 691-697.
- Walker, C. J., K. E. Mansfield, I. N. Rezzano, C. M. Hanamoto, K. M. Smith und P. A. Castelfranco** (1988). "The magnesium-protoporphyrin IX (oxidative) cyclase system. Studies on the mechanism and specificity of the reaction sequence." *Biochem J* **255**(2): 685-692.
- Walker, C. J., K. E. Mansfield, K. M. Smith und P. A. Castelfranco** (1989). "Incorporation of atmospheric oxygen into the carbonyl functionality of the protochlorophyllide isocyclic ring." *Biochem J* **257**(2): 599-602.
- Wang, H. L., B. L. Postier und R. L. Burnap** (2004a). "Alterations in global patterns of gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to inorganic carbon limitation and the inactivation of *ndhR*, a LysR family regulator." *J Biol Chem* **279**(7): 5739-5751.
- Wang, T., G. Shen, R. Balasubramanian, L. McIntosh, D. A. Bryant und J. H. Golbeck** (2004b). "The *sufR* gene (*sll0088* in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803) functions as a repressor of the *sufBCDS* operon in iron-sulfur cluster biogenesis in cyanobacteria." *J Bacteriol* **186**(4): 956-967.
- Waterhouse, A. M., J. B. Procter, D. M. Martin, M. Clamp und G. J. Barton** (2009). "Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench." *Bioinformatics* **25**(9): 1189-1191.
-

-
- Wenk, S. O., D. Schneider, U. Boronowsky, C. Jager, C. Klughammer, F. L. de Weerd, H. van Roon, W. F. Vermaas, J. P. Dekker und M. Rögner (2005). "Functional implications of pigments bound to a cyanobacterial cytochrome *b₆f* complex." *Febs J* **272**(2): 582-592.
- Wilde, A., H. Härtel, T. Hübschmann, P. Hoffmann, S. V. Shestakov und T. Börner (1995). "Inactivation of a *Synechocystis* sp strain PCC 6803 gene with homology to conserved chloroplast open reading frame 184 increases the photosystem II-to-photosystem I ratio." *Plant Cell* **7**(5): 649-658.
- Wilde, A., K. Lunser, F. Ossenbühl, J. Nickelsen und T. Börner (2001). "Characterization of the cyanobacterial *ycf37*: mutation decreases the photosystem I content." *Biochem J* **357**(Pt 1): 211-216.
- Wilde, A., S. Mikolajczyk, A. Alawady, H. Lokstein und B. Grimm (2004). "The *gun4* gene is essential for cyanobacterial porphyrin metabolism." *FEBS Lett* **571**(1-3): 119-123.
- Williams, J. G. K. und A. N. G. Lester Packer (1988). Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods in Enzymology*, Academic Press. **Volume 167**: 766-778.
- Willows, R. D. (2003). "Biosynthesis of chlorophylls from protoporphyrin IX." *Nat Prod Rep* **20**(3): 327-341.
- Woese, C. R. (1987). "Bacterial evolution." *Microbiol Rev* **51**(2): 221-271.
- Wolfe, K. H., C. W. Morden und J. D. Palmer (1992). "Function and evolution of a minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(22): 10648-10652.
- Wong, Y. S. und P. A. Castelfranco (1984). "Resolution and reconstitution of Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester (oxidative) cyclase, the enzyme system responsible for the formation of the chlorophyll isocyclic ring." *Plant Physiol* **75**(3): 658-661.
- Wu, Q., J. Yu und N. Zhao (2001). "Partial recovery of light-independent chlorophyll biosynthesis in the *chlL*-deletion mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803." *IUBMB life* **51**(5): 289-293.
- Xie, Z. und S. Merchant (1996). "The plastid-encoded *ccsA* gene is required for heme attachment to chloroplast c-type cytochromes." *J Biol Chem* **271**(9): 4632-4639.
- Xu, M., G. Bernát, A. Singh, H. Mi, M. Rögner, H. B. Pakrasi und T. Ogawa (2008). "Properties of mutants of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 lacking inorganic carbon sequestration systems." *Plant Cell Physiol* **49**(11): 1672-1677.
- Xu, W., H. Tang, Y. Wang und P. R. Chitnis (2001). "Proteins of the cyanobacterial photosystem I." *Biochim Biophys Acta* **1507**(1-3): 32-40.
- Yamaguchi, K. und A. R. Subramanian (2003). "Proteomic identification of all plastid-specific ribosomal proteins in higher plant chloroplast 30S ribosomal subunit." *Eur J Biochem* **270**(2): 190-205.
- Yamanaka, G. und A. N. Glazer (1980). "Dynamic aspects of phycobilisome structure." *Archives of Microbiology* **124**(1): 39-47.
- Yamazaki, S., J. Nomata und Y. Fujita (2006). "Differential operation of dual protochlorophyllide reductases for chlorophyll biosynthesis in response to environmental oxygen levels in the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*." *Plant Physiol* **142**(3): 911-922.
- Yilmaz, M., I. Kang und S. I. Beale (2010). "Heme oxygenase 2 of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is induced under a microaerobic atmosphere and is required for microaerobic growth at high light intensity." *Photosynth Res* **103**(1): 47-59.
- Yoon, H. S., T. Nakayama, A. Reyes-Prieto, R. A. Andersen, S. M. Boo, K. Ishida und D. Bhattacharya (2009). "A single origin of the photosynthetic organelle in different *Paulinella* lineages." *BMC Evol Biol* **9**: 98.
- Yu, J. und W. F. J. Vermaas (1990). "Transcript levels and synthesis of photosystem II components in cyanobacterial mutants with inactivated photosystem II genes." *Plant Cell* **2**(4): 315-322.
- Zhang, L., H. B. Pakrasi und J. Whitmarsh (1994). "Photoautotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in the absence of cytochrome *c*₅₅₃ and plastocyanin." *J Biol Chem* **269**(7): 5036-5042.
- Zhang, Z., N. D. Pendse, K. N. Phillips, J. B. Cotner und A. Khodursky (2008). "Gene expression patterns of sulfur starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803." *BMC Genomics* **9**: 344.
- Zinchenko, V. V., I. V. Piven, V. A. Melnik und S. V. Shestakov (1999). "Vectors for the complementation analysis of cyanobacterial mutants." *Russ J Genet* **35**: 228-232.
-

Publikationsliste

Wallner, T., Y. Hagiwara, G. Bernát, R. Sobotka, E. J. Reijerse, N. Frankenberg-Dinkel und A. Wilde (2012). "Inactivation of the conserved open reading frame *ycf34* of *Synechocystis* sp. PCC 6803 interferes with the photosynthetic electron transport chain." Biochim Biophys Acta; eingereicht am 08.02.2012, in Revision

Wallner, T., A. Salinas, A. Richter, H. Lokstein, A. Wilde und B. Grimm (2012). "*Ycf54* encodes a new protein required for the Mg protoporphyrin monomethylester cyclase reaction in cyanobacteria" Plant J; eingereicht am 26.03.2012

Peter, E., T. Wallner, A. Wilde und B. Grimm (2011). "Comparative functional analysis of two hypothetical chloroplast open reading frames (*ycf*) involved in chlorophyll biosynthesis from *Synechocystis* sp. PCC6803 and plants." J Plant Physiol **168**(12): 1380-1386.

Peter, E., A. Salinas, T. Wallner, D. Jeske, D. Dienst, A. Wilde und B. Grimm (2009). "Differential requirement of two homologous proteins encoded by *sll1214* and *sll1874* for the reaction of Mg protoporphyrin monomethylester oxidative cyclase under aerobic and micro-oxic growth conditions." Biochim Biophys Acta **1787**(12): 1458-1467.

Konferenz-Poster

Wallner, T., D. Dienst, W. R. Hess und A. Wilde (2008). Yfr1 - a small regulatory RNA in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *7th European Workshops on the Molecular Biology of Cyanobacteria* (31.08-03.09.2008) in Česke Budějovice (Tschechien).

Wallner, T., E. Peter, B. Grimm, J. Kopečná und A. Wilde (2009). The function of cyanobacterial homologs of conserved chloroplast open reading frames in photosynthetic processes. *Leopoldina Symposium - Molecular Genetics of Chloroplasts and Mitochondria* (20.09-23.09.2009) in Berlin.

Wallner, T., J. Kopečná und A. Wilde (2010). Functional analyses of conserved chloroplast open reading frames: the *Synechocystis ycf34* gene. VAAM-Jahrestagung 2010 (28.03-31.03.2010) in Hannover.

Wallner, T., Y. Hagiwara, J. Kopečná, N. Frankenberg-Dinkel und A. Wilde (2011). Functional analyses of the *Synechocystis ycf34* gene product, an ortholog of a conserved chloroplast open reading frame. VAAM-Jahrestagung 2011 (27.03-31.03.2011) in Karlsruhe.

Wallner, T., J. Kopečná und A. Wilde (2011). Functional analyses of the *Synechocystis ycf34* gene product, an ortholog of a conserved chloroplast open reading frame. *ESF-EMBO-conference 2011: Molecular bioenergetics of cyanobacteria: From cells to community* (06.04-10.04.2011) in Sant Feliu de Guixols (Spanien).

Wallner, T., Y. Hagiwara, N. Frankenberg-Dinkel und A. Wilde (2011). Functional analyses of the conserved chloroplast open reading frame *ycf34* from *Synechocystis* sp. PCC6803: a new type of iron-sulfur protein. *International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors of Photosynthetic Organisms 2011* (24.07-28.07.2011) in Berlin.

Wallner, T., Y. Hagiwara, J. Kopečná, N. Frankenberg-Dinkel und A. Wilde (2011). Functional analyses of the *Synechocystis ycf34* gene product, an ortholog of a conserved chloroplast open reading frame. *7th European Workshops on the Molecular Biology of Cyanobacteria* (28.08-01.09.2011) in Naantali (Finnland).

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Annegret Wilde für das in mich gesetzte Vertrauen und ihre hervorragende Betreuung bedanken. Ihre Ratschläge, Ideen und Freude an der Wissenschaft sorgten immer wieder für frische Motivation. Sie ermöglichte mir, mit anderen Gruppen zusammen zu arbeiten, viele Facetten der Wissenschaft kennenzulernen sowie den ein oder anderen Forschungsaufenthalt in auswärtigen Laboren.

Großer Dank gilt auch allen Kooperationspartnern, ohne die diese Arbeit nicht möglich wäre. Ich danke Dr. Gabor Bernát für die zündende Idee und die Möglichkeit, schnell und unkompliziert in die Welt der Biophysik vorzudringen. Ebenso gilt mein Dank Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel und Dr. Yoshinori Hagiwara, die die Tücken des Eisen-Schwefel-Clusters meisterten, sowie Dr. Edward J. Reijerse, der den endgültigen Beweis lieferte. Mein besonderer Dank gilt allen aus Třebon, insbesondere Roman, Josef, Marketa und Jana, die tolle Gastgeber und Gäste waren und die Meister der nativen Elektrophorese sind. Großen Dank auch an die Berliner Truppe rund um Prof. Dr. Bernhard Grimm und Annabel, gemeinsame Gefährten bei der Aufklärung der Chlorophyll-Biosynthese.

Natürlich gilt mein Dank allen in unserem Labor: Besonders Ulrike für die Organisation des Labors und den Erhalt der Stammsammlung sowie ihre goldenen Hände beim Klonieren. Anja, Nils, Olga, Sven und Katja für die entspannte und schöne Atmosphäre in unserem Labor, Witziges und Urkomisches, manch gute Idee und Anregung. Für das Tolerieren meines seltsamen Musikgeschmacks und meines Wahn zur Ordnung☺ sei ohnehin gedankt.

Allen anderen Angehörigen des Instituts sei ohnehin gedankt für die Hilfsbereitschaft, das gute Arbeitsklima, den ein oder anderen Ratschlag sowie etliche vergnügliche Stunden im Pausenraum, auf dem Flur und auf Betriebsausflügen.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei allen denen bedanken, die mir geholfen haben, dieses Ziel zu erreichen:

Meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung während des Studium und der Promotion, ihre offenen Ohren und ihr Verständnis, dass ich so selten da war.

Und meiner liebsten Arbeitskollegin...Katja