

**Physiologie der bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenase  
im Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803  
unter oxischen Bedingungen**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel**

**vorgelegt von**

**Heinrich Michael Burgstaller**

**Kiel**

**Februar 2017**

Erster Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Schulz

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Bilger

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 03. 2017

Zum Druck genehmigt: 27. 03. 2017

Die Dekanin  
Prof. Dr. Natascha Oppelt

**Warum produzieren Cyanobakterien Wasserstoff?**

**Weil sie es können!**

**(Frank Lindemann)**

# Abkürzungsverzeichnis

Arg: Arginin

ADP: Adenosindiphosphat

ATP: Adenosintriphosphat

asRNA: Antisense-RNA

bp: Basenpaare

BG11: Standard Medium für Cyanobakterien

Cm: Chloramphenicol

CM: Cytoplasmamembran

Cm<sup>r</sup>: Chloramphenicol Resistenz

Cox: Cytochrom *c* Oxidase

Cyd: Chinol Oxidase

DNA: Desoxyribonukleinsäure

E: Einstein, = 1 Mol Lichtquanten

*E. coli*: *Escherichia coli*

ED: Entner-Doudoroff Weg

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

EMP: Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glykolyse)

et al.: et alii oder et aliae, und andere

Fd: Ferredoxin

Flv: Flavoprotein

FNR: Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase

g: mittlere Erdbeschleunigung

GAP: Glycerinaldehyd-3-phosphat

gDNA: genomische DNA

Glc: Glucose

Gm: Gentamycin

Gm<sup>r</sup>: Gentamycin Resistenz

ICM: Intracytoplasma- oder Thylakoidmembran(en)

kb: Kilobasenpaare, 1000 Basenpaare

Km: Kanamycin

Km<sup>r</sup>: Kanamycin Resistenz

LB: Standardmedium für *E. coli* (lysogeny broth)

M: Molar

n: Anzahl der Versuche

NADH: Nicotinamidadenindinukleotid

NADPH: Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

NaOH: Natriumhydroxid

NiFe: Nickel-Eisen

OCP: Orange Carotenoid Protein

OD: Optische Dichte; dahinter Wert in nm.

ORF: Open Reading Frame / Offener Leserahmen

OPP: Oxidativer Pentosephosphatweg

PCR: Polymerase Kettenreaktion

PDH: Pyruvatdehydrogenase

PFOR: Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase

PSI: Photosystem I

PSII: Photosystem II

qPCR: Quantitative Polymerase Kettenreaktion

RNA: Ribonukleinsäure

rpm: Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)

RTO: Respiratorische Terminale Oxidase

RuBisCO : Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase

SDS: Natrium (Natrium) dodecylsulfat

STABW: Standardabweichung

WT: Wildtyp (in dieser Arbeit ist der Wildtypstamm von *Synechocystis* sp. PCC6803 gemeint)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Cyanobakterien	1
1.1.1 Definition	2
1.1.2 Unterteilung	2
1.2 Genetik der Cyanobakterien	3
1.2.1 Genomgrößen	3
1.2.2 Multicopy Chromosome	3
1.2.3 Gentechnische Manipulation	4
1.2.4 Antisense-RNA	5
1.3 Bioenergetik der Cyanobakterien	7
1.3.1 Photosynthese	8
1.3.2 Zellatmung und fermentativer Zuckerabbau	10
1.4 Hydrogenasen	12
1.4.1 Geschichtliche Betrachtung der Hydrogenasen	13
1.4.2 Arten von Hydrogenasen und deren Funktionen	14
1.4.3 Sauerstoff und Hydrogenasen	15
1.4.4 Cyanobakterielle Hydrogenasen	17
1.4.5 Mixotrophe Verhältnisse und Zusammenhang mit der Hydrogenase	20
1.4.6 Mixotrophe Bedingungen im Labor: BG11 <sub>0</sub> AG Medium	21
1.4.7 Weitere Elektronensenken	23
<b>2 Fragestellung</b>	<b>25</b>
<b>3 Material</b>	<b>26</b>
3.1 Bakterienstämme	26
3.1.1 Cyanobakterien-Stämme	26
3.1.2 <i>Escherichia coli</i> Stamm	28
3.2 Medien für <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	28
3.2.1 BG11	28
3.2.2 BG11G	29
3.2.3 BG11 <sub>0</sub> A	29
3.2.4 BG11 <sub>0</sub> AG	29
3.2.5 Antibiotika für <i>Synechocystis</i>	30
3.3 Medien für <i>Escherichia coli</i>	30
3.3.1 LB Medium	30
3.3.2 Antibiotika für <i>E. coli</i>	31
3.4 Puffer und Lösungen	31

3.5	Primer: .....	32
3.5.1	Primer für qPCR: .....	32
3.5.2	Primer für Fusion PCR .....	33
3.5.3	Sequenzierprimer .....	33
3.6	Plasmide: .....	34
3.6.1	pJET1.2 .....	34
3.6.2	pVZ321 .....	34
3.6.3	pVZas1 .....	35
3.6.4	pVZas3 .....	35
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>36</b>
4.1	Kultivierung von <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 .....	36
4.1.1	Kultivierung auf Agarplatten .....	36
4.1.2	Kultivierung als 50 ml Flüssig-Schüttelkultur .....	36
4.1.3	Kultivierung in Kniese Röhren (200 – 250 ml) .....	36
4.1.4	Lagerung als Gefrierkulturen .....	37
4.2	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	37
4.2.1	Flüssigkulturen .....	37
4.2.2	Kultivierung auf Agarplatten .....	37
4.2.3	Lagerung als Gefrierkulturen .....	38
4.3	Messung des Carotinoidgehaltes in <i>Synechocystis</i> .....	38
4.4	Messung des Chlorophyllgehaltes in <i>Synechocystis</i> .....	39
4.5	Wasserstoff- und Sauerstoffmessungen mittels Unisense Mikrosensoren .....	40
4.6	Wasserstoffmessungen mittels Silber-Platin-Elektrode (Clark-Elektrode) .....	42
4.7	Herstellung der <i>Synechocystis</i> (Antisense-)Mutantenstämme .....	44
4.7.1	Präparation cyanobakterieller Gesamt-DNA .....	44
4.7.2	Bestimmung der Nukleinsäure Konzentration mittels Nanodrop Spektralphotometer .....	46
4.7.3	Polymerase Kettenreaktion .....	46
4.7.4	Agarose Gelelektrophorese .....	47
4.7.5	DNA-Gelextraktion .....	48
4.7.6	Fusion PCR .....	50
4.7.7	Ligation in pJet1.2 .....	51
4.7.8	Transformation in <i>E. coli</i> .....	52
4.7.9	Plasmidpräparation .....	53
4.7.10	Kontrolle auf Richtigkeit des Inserts (Sequenzierung) .....	54
4.7.11	Restriktionsverdau .....	55
4.7.12	Ligation in pVZ321 .....	55
4.7.13	Transformation in <i>Synechocystis</i> .....	56

4.8	RNA Extraktion aus <i>Synechocystis</i> PCC 6803 bis Quantitative Real Time PCR	57
4.8.1	RNA Extraktion aus <i>Synechocystis</i> PCC 6803	57
4.8.2	Denaturierendes Agarosegel	59
4.8.3	DNase Verdau	60
4.8.4	Reverse Transkription:	62
4.8.5	Quantitative Real Time PCR (qPCR):	62
4.8.6	Bestimmung der Primer Effizienz	66
4.8.7	Auswahl des Referenzgens	67
4.8.8	Ermittlung der Korrekturfaktoren zum direkten Vergleich verschiedener Transkripte in einer Probe	68
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>70</b>
5.1	Wachstumskurven des <i>Synechocystis</i> Wildtyps, verschiedener $\Delta hox$ und $\Delta flv24$ Mutanten bei unterschiedlichen Bedingungen	70
5.1.1	Zellen in BG11 Medium und Schwach- bzw. Starklicht	71
5.1.2	Zellen in BG11 <sub>0</sub> AG Medium und Schwach- bzw. Starklicht	73
5.1.3	Zellen in BG11 <sub>0</sub> AG Medium + DCMU	74
5.1.4	Wachstum anderer $\Delta hox$ Mutanten in BG11 <sub>0</sub> AG Medium	75
5.1.5	Wachstum des Wildtyps und der $\Delta hoxH$ Mutante in BG11, BG11G, BG11 <sub>0</sub> A und BG11 <sub>0</sub> AG Medien	77
5.1.6	Wachstum des Wildtyps und der $\Delta lexA$ Mutante in BG11 und BG11 <sub>0</sub> AG Medien	79
5.2	Carotinoidmessungen unter Stressbedingungen	80
5.2.1	Carotinoidmessung des Wildtyps und der $\Delta hoxH$ Mutante in BG11, BG11G, BG11 <sub>0</sub> A und BG11 <sub>0</sub> AG Medien	81
5.2.2	Carotinoidmessung des Wildtyps und der $\Delta hoxH$ Mutante bei zwei verschiedenen Lichtintensitäten	82
5.3	qPCR	83
5.3.1	qPCR des <i>hoxH</i> Gens im WT in BG11, BG11G, BG11 <sub>0</sub> A und BG11 <sub>0</sub> AG	83
5.3.2	qPCR der <i>hox</i> Gene im WT in BG11 und BG11 <sub>0</sub> AG	86
5.3.3	qPCR der <i>hox</i> Gene im WT pVZ321 und den Antisense Mutanten AS1 und AS3	88
5.4	Wasserstoffmessungen	93
5.4.1	Wasserstoffmessungen in <i>Synechocystis</i> WT in verschiedenen Medien	93
5.4.2	Wasserstoffmessungen bei Licht und Anwesenheit von Sauerstoff	96
5.4.3	Wasserstoffmessungen in den Antisense Mutanten A1 und A3.	97
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>98</b>
6.1	Untersuchungen der Antisense-RNA as-sll1223	98
6.2	Wachstumsphänotyp der $\Delta hox$ Mutanten bei oxidischen, mixotrophen und nitratlimitierten Bedingungen	99



6.2.1	Ausschluss eines Artefaktes beim Wachstumsphänotyp der $\Delta hoxH$ Mutante .....	101
6.2.2	Funktion der Hydrogenase unter oxischen, mixotrophen und nitratlimitierten Bedingungen .....	104
6.2.3	Die Funktion der Hydrogenase unter oxischen, mixotrophen, nitratlimitierten Bedingungen lässt sich vor allem der Hydrogenaseuntereinheit zuordnen .....	111
6.2.4	Die Funktion der Hydrogenase, die den Wildtypen unter oxischen, mixotrophen, nitratlimitierten Bedingungen wachsen lässt, zeigt sich nicht in der Produktion von Wasserstoff .....	112
6.2.5	Rückschlüsse auf die Funktion der Hydrogenase in der Natur .....	113
6.2.6	Schlussfolgerung .....	114
6.3	Ausblick .....	114
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>116</b>
	<b>Summary</b>	<b>118</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>120</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>123</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>124</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>141</b>
7.1	Diagramme Carotinoidmessungen .....	141
7.2	Diagramme qPCR .....	142
7.3	Diagramme Wasserstoffmessungen .....	143
7.4	Tabellen Wasserstoffsättigung und Sauerstoffsättigung .....	145

# 1 Einleitung

## 1.1 Cyanobakterien

Cyanobakterien sind die einzig bekannten Bakterien die oxygene Photosynthese betreiben. Sie waren außerdem die ersten Organismen der Erde, die Sauerstoff produziert haben, was durch die Vereinigung des Photosystems I (PSI) und Photosystems II (PSII) und der Spaltung von Wasser ermöglicht wurde (Allen und Martin 2007; Hohmann-Marriott und Blankenship 2011). Als erste Organismen, die in größerem Maßstab Sauerstoff produziert haben, sind sie für die Entstehung einer Sauerstoffatmosphäre auf der Erde verantwortlich (Dismukes et al. 2001). Da nach der Endosymbiontentheorie die pflanzlichen Chloroplasten, welche ebenfalls Sauerstoff während der Photosynthese produzieren, einen cyanobakteriellen Ursprung haben (Margulis 1970; Reyes-Prieto et al. 2007), kann man sagen, dass Cyanobakterien entscheidend an dem heute in der Atmosphäre vorhandenen Sauerstoff, der hauptsächlich von Algen, Pflanzen und Cyanobakterien produziert wurde und wird (Whitmarsh und Govindjee 1999), beteiligt waren und sind. Außerdem stellten die frühen Cyanobakterien den Lebewesen mit der Produktion von Sauerstoff ein Molekül zur Verfügung, das bei der aeroben Atmung genutzt werden kann und bei dessen Reduktion so viel Energie frei wird, dass komplexeres Leben erst möglich wurde (Catling et al. 2005). Man kann also behaupten, dass ohne Cyanobakterien das Bild dieser Erde zum heutigen Zeitpunkt ein ganz anderes wäre.

Da Cyanobakterien zum Leben nichts Weiteres brauchen als Licht, CO<sub>2</sub> (z.B. aus der Luft) und preislich günstige anorganische Medien, eignen sie sich hervorragend zur kostensparenden Produktion verschiedenster Metabolite für wirtschaftliche Zwecke. So beschäftigt sich die Forschung mit der Nutzung von Cyanobakterien als Lieferanten für Wasserstoff (Wünschiers und Schulz 1998), Ethanol (Dexter et al. 2015) und verschiedenster anderer Stoffe wie beispielsweise n-Butanol, Isobutanol oder Isopren (Machado und Atsumi 2012). Diese Stoffe können teilweise direkt, teilweise nach chemischer Umwandlung als Biokraftstoffe verwendet werden. Durch ihr enormes Potenzial können Cyanobakterien heutzutage bei der Forschung nach alternativen Energiequellen und deren Herstellung für die Menschheit behilflich sein.

### 1.1.1 Definition

**Cyanobakterien sind oxygene photosynthetisierende Prokaryoten, die zwei Photosysteme (PSI und PSII) besitzen und H<sub>2</sub>O als Reduktionsmittel in der Photosynthese nutzen.** (Gerrity 2001)

Die einzige bisher bekannte Ausnahme von dieser Definition ist das Cyanobakterium *UCYN-A*. Diesem Bakterium fehlt das Photosystem II, weshalb es auch nicht in der Lage ist, O<sub>2</sub> zu produzieren (Zehr et al. 2008).

Alle bekannten Cyanobakterien sind fähig, photoautotroph zu leben. Zusätzlich existieren verschiedene fakultativ photo- oder chemoheterotrophe Cyanobakterien.

### 1.1.2 Unterteilung

Cyanobakterien sind eine monophyletische Gruppe, die alle bekannten oxygenen photosynthetisierenden Prokaryoten umfasst. Während *Gloeobacter* die einzige bekannte Gattung ist, die keine Thylakoidmembran (auch Intracytoplasmamembran ICM genannt) besitzt (Rippka et al. 1974; Rexroth et al. 2011; Mareš et al. 2013)), sind bei allen anderen Cyanobakterien die Photosysteme PSI und PSII in dieser Membran lokalisiert. Diese Cyanobakterien wurden aufgrund morphologischer Merkmale in fünf Sektionen unterteilt (Rippka et al. 1979; Gerrity 2001):

- Sektion I: Einzellige Cyanobakterien, die sich entweder durch Knospung oder durch Zweiteilung, bei der zwei gleich große Zellen entstehen, reproduzieren. Beispiele sind *Synechocystis* PCC6803 (folgend *Synechocystis*) oder *Synechococcus* PCC7942.
- Sektion II: Einzellige Cyanobakterien, die sich ausschließlich oder zumindest an manchen Stellen ihres Lebenszyklus durch multiple Spaltung der Ursprungszelle in kleine, kugelförmige Zellen (Baeocyten) reproduzieren. Ein Beispiel ist *Pleurocapsa* PCC7319.
- Sektion III: Filamentöse Cyanobakterien, die sich durch Zweiteilung der einzelnen Zellen in einer Linie reproduzieren und ausschließlich aus vegetativen Zellen bestehen. Beispiele sind *Arthrospira* (ehemals *Spirulina*) PCC7345 oder *Oscillatoria* PCC7515.

- Sektion IV: Filamentöse Cyanobakterien, die sich durch Zweiteilung der einzelnen Zellen in einer Linie reproduzieren und zu Zelldifferenzierungen befähigt sind. Vorkommende Zelltypen sind Heterocysten (bei allen), Akineten oder Hormogonien. Beispiele sind *Nostoc* (ehemals *Anabena*) PCC7120 oder *Anabena* PCC7122.
- Sektion V: Filamentöse Cyanobakterien, die sich in verschiedene Richtungen teilen, wodurch Verzweigungen entstehen und die zu Zelldifferenzierungen befähigt sind (Zelltypen siehe Sektion IV). Beispiele sind *Fischerella* PCC7115 oder *Chlorogloeopsis* PCC6912.

## 1.2 Genetik der Cyanobakterien

### 1.2.1 Genomgrößen

Die Genomgröße der bisher totalsequenzierten Cyanobakterien variiert zwischen 1.624.310 bp (*Prochlorococcus marinus* GP2, 1884 ORFs, keine Plasmide (Biller et al. 2014)) und 9.059.191 bp (*Nostoc punctiforme* ATCC29133, 6794 ORFs, 5 Plasmide, Chromosomgröße: 8.234.322 bp mit 6191 ORFs (Fujisawa et al. 2014)). Das größte nicht fertig sequenzierte Cyanobakteriengenom hat ca. 11,58 Mio. bp (*Calothrix* PCC7103 (Shih et al. 2013)). Mit 12.356 Proteinen ist *Scytonema hofmanni* PCC7110 der bis jetzt bekannte genreichste Prokaryot (Dagan et al. 2013).

Die Genomgröße des in dieser Arbeit beforschten Cyanobakteriums *Synechocystis* beträgt 3.956.957 bp mit 3725 ORFs. Das Genom beinhaltet ein „multicopy“ Chromosom mit einer Größe von 3.573.471 bp mit 3317 ORFs und 7 Plasmiden mit Größen zwischen 119.895 bp mit 132 ORFs und 2,345 bp mit 3 ORFs. *Synechocystis* war nach *Haemophilus influenzae* und *Mycoplasma genitalium* der dritte totalsequenzierte Organismus und der erste totalsequenzierte photosynthetisierende Organismus (Kaneko et al. 1996).

### 1.2.2 Multicopy Chromosome

Wenigstens einige Cyanobakterien besitzen ein „multicopy“ Chromosom – das heißt, dass pro Zelle mehrere Kopien des gleichen Chromosoms vorliegen. Für *Anabaena cylindrica* wurde diese

Polyploidie bereits in den 70er Jahren beschrieben (Simon 1977). Anhand der DNA-Masse pro vegetativer Zelle und dem gemessenen Molekulargewicht des Chromosoms berechnete R. Simon 25 Chromosomenkopien während der späten logarithmischen Phase. Für *Synechocystis* wurden mit zwei unterschiedlichen Methoden zwei stark voneinander abweichende Chromosomenkopienanzahlen berechnet. Mittels kolorimetrischen und spektralphotometrischen Daten wurde eine Kopienzahl von 12 Chromosomen pro Zelle in der linearen Wachstumsphase berechnet (Labarre et al. 1989), Mittels qPCR-Daten wurden 42 Chromosomenkopien berechnet (Griese et al. 2011). Griese et al. halten Unterschiede in den Wildtypstämmen, die sich über den Zeitraum von über 20 Jahren ergeben haben, für die wahrscheinlichste Erklärung der abweichenden Kopienzahlen. Unabhängig von der genauen Kopienzahl muss bei Klonierungen von DNA Stücken in das Chromosom eines polyploiden Cyanobakteriums bedacht werden, dass eine geglückte Insertion (nachgewiesen z.B. durch Antibiotikaresistenz) nicht bedeutet, dass alle Chromosomen mutiert sind und die Zellen nicht homozygot für die Mutation sein müssen. Homozygotie muss daher erst durch PCR und/oder Southern Blot nachgewiesen werden. Bis inklusive der Publikation von Griese et al. wurde gezeigt, dass bedeutend mehr Stämme oligo- oder polyploid als monoploid sind. Somit erscheint Oligo- bzw. Polyploidie in Cyanobakterien als eine weit verbreitete Eigenschaft.

### **1.2.3 Gentechnische Manipulation**

Das große Interesse der Wissenschaft an Cyanobakterien erklärt sich auch dadurch, dass die meisten Cyanobakterien einfach genetisch zu manipulieren sind. Durch diese Eigenschaft können unter anderem Gene in das Genom eingeführt werden, die die Bakterien dazu befähigen, wirtschaftlich interessante Stoffe zu produzieren, die normalerweise nicht zu ihren Metaboliten zählen würden. Zu den zur genetischen Manipulation genutzten Methoden gehören Transformation (siehe Kapitel 4.7.13, Seite 56), Konjugation (Wolk et al. 1984) und Elektroporation (Thiel und Poo 1989). Die natürliche Kompetenz zur Transformation, die auch in dieser Arbeit zur genetischen Manipulation von *Synechocystis* ausgenutzt wurde, wurde erstmals in *Synechococcus* PCC7943 gezeigt (Shestakov und Khyen 1970). Später wurde natürliche Kompetenz zur Transformation auch in *Synechococcus* PCC7942 (Grigorieva und Shestakov 1976) und *Synechocystis* (Thiel 1994) beschrieben.

### 1.2.4 Antisense-RNA

Antisense-RNAs (asRNAs) gehören zu den sRNAs (kleine regulatorische RNAs). Das sind RNAs, die nicht weiter in ein Protein übersetzt werden, dafür aber direkt oder indirekt regulatorische Funktionen übernehmen.

In dieser Arbeit wurden unter anderem Untersuchungen zur asRNA as-sll1223 angestellt; aus diesem Grund werden hier Arten und Funktionen von asRNAs vorgestellt, die in Bakterien bekannt sind.

Es gibt drei bekannte Arten von sRNAs (Thomason und Storz 2010):

- cis-codierte sRNAs, die am gleichen Ort wie ihre Ziel-mRNA, aber am komplementären Strang codiert sind und somit vollkommen komplementär zu ihrer Ziel-mRNA sind
- trans-codierte sRNAs, die an einem anderen Ort codiert sind und häufig für verschiedene mRNAs regulatorisch wirken, mit denen sie nicht zu 100 Prozent komplementär sein müssen
- sRNAs, die an ein Protein binden und durch diese Bindung eine regulatorische Funktion erfüllen

In vielen Publikationen wird nur bei cis-codierter sRNA von Antisense-RNA gesprochen, während in anderen Artikeln aber auch die Begriffe cis- bzw. trans-codierte Antisense-RNA verwendet werden (Vergleiche z.B. (Thomason und Storz 2010) mit (Li et al. 2008))

Eine Möglichkeit für asRNAs regulatorisch zu wirken, ergibt sich durch Bindung an ihre komplementäre mRNA. Die Regulation selbst erfolgt hierbei zum Beispiel:

- durch Entstehung einer Terminator- oder Antiterminator Struktur für die Transkription bei Bindung von asRNA an die mRNA; Beispiele wären die Regulation von *icsA* in *Shigella flexneri* (Giangrossi et al. 2010) oder des Eisen Transport Biosynthese Operon in *Vibrio anguillarum* (Stork et al. 2007)
- durch Herabsetzung der Stabilität der mRNA bei der Bildung von doppelsträngiger RNA, was möglicherweise zur Spaltung der RNA durch Endonukleasen führt (Georg und Hess 2011); Beispiele wären die Regulation von *isiA* in *Synechocystis* (Dühning et al. 2006) oder das regulatorische Zusammenwirken der asRNA GadA mit RNase E in *E. coli* (Opdyke et al. 2004; Takada et al. 2007)

- durch Blockieren der Translation, z.B. durch Bindung an die Shine-Dalgarno-Sequenz durch trans-codierte sRNA und möglicherweise auch cis-codierte asRNA (Thomason und Storz 2010). Beispiele wären die asRNA SymR in *E. coli* (Kawano et al. 2007) oder die  $\alpha$ -furA asRNA im Cyanobakterium *Anabaena* sp. PCC7120 (Hernández et al. 2006)

Eine weitere Möglichkeit ist, dass nicht die asRNA selbst, sondern ihre Transkription zu einer Regulation führt, zum Beispiel

- durch Kollision von zwei transkribierenden RNA-Polymerasen, nämlich der für die mRNA und der für die asRNA, die zur Beendigung oder Verzögerung der Transkription führt (Crampton et al. 2006); ein Beispiel wäre die Regulation des ubiGmccBA Operons in *Clostridium acetobutylicum* (André et al. 2008)
- durch Promoter-Okklusion, wenn ein Promoter durch die RNA-Polymerase, die gerade die asRNA transkribiert, blockiert wird (Palmer et al. 2009)
- durch Kollision einer asRNA transkribierenden RNA-Polymerase mit einer am offenen Komplex der DNA gebundenen noch nicht transkribierenden RNA-Polymerase, was zur Dissoziation der noch nicht transkribierenden RNA-Polymerase führt (Sitting-duck interference) (Palmer et al. 2009; Georg und Hess 2011).

Die erste Antisense-RNA in Cyanobakterien wurde bereits 1987 in *Calothrix* sp. PCC7601 entdeckt (Csiszar et al. 1987). In letzter Zeit wurden in Cyanobakterien immer mehr asRNAs entdeckt, die regulierend auf verschiedenste Gene (wie housekeeping Gene, regulatorische Gene oder metabolische Gene) wirken, z.B. die asRNA IsrR in *Synechocystis* (Dühring et al. 2006), die asRNA  $\alpha$ -furA in *Anabaena* sp. PCC7120 (Mulikidjanian et al. 2006) oder 24 in *Prochlorococcus* MED4 gefundene asRNAs (Steglich et al. 2008). Eine Übersicht gibt Georg et al. 2009; weitere 1112 potentielle asRNAs wurden in *Synechocystis* gefunden (Mitschke et al. 2011). Eine Extrapolation der bisher entdeckten asRNAs führt zum Schluss, dass ungefähr 10 % aller Gene von *Synechocystis* durch die Regulation von asRNAs beeinflusst sind (Georg et al. 2009).

In dieser Arbeit wurden unter anderem Untersuchungen an der asRNA as-sll1223 vorgenommen, die bei der Suche nach Transkriptionsstartpunkten durch RNA Sequenzierung in *Synechocystis* entdeckt wurde (Mitschke et al. 2011). Diese asRNA überlappt auf DNA-Ebene mit dem ORF *sll1222* und den ersten sechs Basen des Hydrogenase Gens *hoxU* (siehe Abbildung 1.4, Seite 19) und hat eine Länge von 96 bp. Falls diese asRNA, wie es ihre Position auf dem Genom vermuten

lassen könnte, regulatorisch auf die Expression der Hydrogenase wirkt, handelt es sich wahrscheinlich um eine cis-codierte sRNA.

### 1.3 Bioenergetik der Cyanobakterien

Cyanobakterien besitzen drei verschiedene, zumindest in *Synechocystis* physisch voneinander getrennte (Liberton et al. 2006; Schneider et al. 2007) Membranen: die äußere Membran, die Cytoplasmamembran (CM) und die Intracytoplasmamembran(en) (auch Thylakoidmembran(en) genannt) (ICM) (siehe Abbildung 1.1, Seite 8). Die einzig bekannte Ausnahme ist *Gloeobacter* sp., ein Cyanobakterium, das keine ICM besitzt (Rippka et al. 1974). Die CM und die ICM sind die bioenergetisch aktiven Membranen: Die ICM beherbergt die zwei Photosysteme (Ausnahme ist das Cyanobakterium *UCYN-A*, welches nur PSI besitzt (Zehr et al. 2008)) und eine oder mehrere Atmungsketten (Schmetterer und Pils 2004). Die CM beherbergt eine oder mehrere Atmungsketten, aber keine Photosysteme (mit Ausnahme von *Gloeobacter* sp.) (Rippka et al. 1974; Schmetterer und Pils 2004).

Neben der oxygenen Photosynthese sind Cyanobakterien auch in der Lage zu atmen. Bei der endogenen Atmung kann Glycogen mittels drei verschiedenen in Cyanobakterien bekannten Wegen – dem Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glykolyse), dem Oxidativen Pentosephosphatweg und dem Entner-Doudoroff Weg - abgebaut und Elektronen in die membrangebundene Atmungskette eingeleitet werden (Chen et al. 2016). Einige Cyanobakterien sind in der Lage, für die Atmung exogene Substrate wie Glucose, Fructose oder Saccharose aufzunehmen und zu verwenden (Rippka et al. 1979).

Eine Besonderheit der Cyanobakterien ist, dass bei ihnen die Photosynthese und die Zellatmung an der gleichen Membran, der ICM, stattfinden und dass dafür teilweise sogar die gleichen Komponenten (z.B. Plastochinon Pool oder Cytochrom  $b_6f$  Komplex) verwendet werden (Schmetterer und Pils 2004).

Manche Cyanobakterien können anoxische Photosynthese betreiben, wobei sie  $H_2S$  als Elektronendonator für die Reduktion von  $CO_2$  verwenden (Gerrity 2001).

Ein weiteres Enzym von bioenergetischer Bedeutung ist die Hydrogenase, welcher einleitend das Kapitel 1.4 und weiterführend diese ganze Arbeit gewidmet ist.



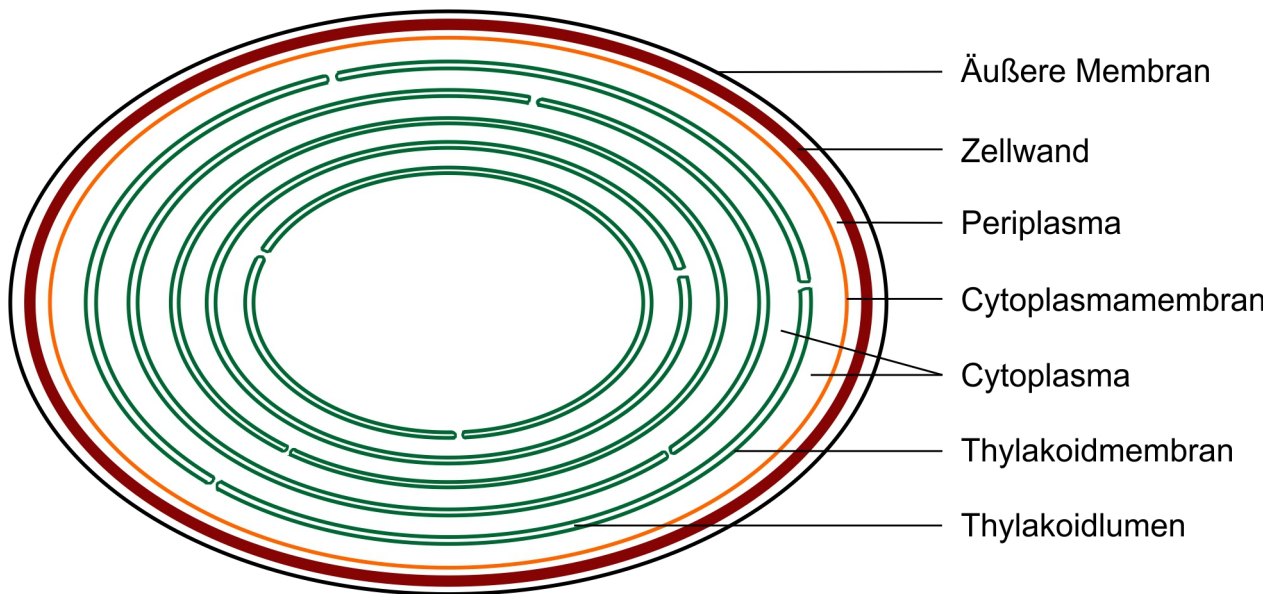


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Cyanobakteriums mit Fokus auf die Membransysteme. Die Darstellung ist einer Grafik von Vermaas 2001 nachempfunden.

Da sowohl die Photosynthese als auch die Zellatmung reduziertes Ferredoxin liefern (siehe Abbildung 1.2, Seite 10 und Abbildung 1.3, Seite 12), das als Elektronendonator für die Hydrogenase fungiert (Gutekunst et al. 2014), werden beide Wege in den folgenden zwei Kapiteln (1.3.1 und 1.3.2) näher erläutert.

Für eine Übersicht des vermuteten Elektronentransports der Photosynthese siehe Abbildung 1.2, Seite 10. Eine Übersicht des vermuteten Elektronentransports der Zellatmung bietet Abbildung 1.3, Seite 12.

### 1.3.1 Photosynthese

Während verschiedene Bakterien Photosynthese betreiben (Stämme der Chlorobien (Grüne Schwefelbakterien), Firmicutes, Proteobakterien und Chloroflexi (Grüne Nichtschwefelbakterien)) (Mulkidjanian et al. 2008), besitzen Cyanobakterien als einzige bis jetzt gefundene Prokaryoten beide Photosysteme und sind somit als einzige Bakterien in der Lage, oxygene Photosynthese zu betreiben (Allen und Martin 2007; Hohmann-Marriott und Blankenship 2011). Ausnahmen sind das Cyanobakterium *UCYN-A* das kein Photosystem II besitzt und folglich keinen Sauerstoff durch Photosynthese produzieren kann (Zehr et al. 2008) und die Heterocystenzellen der Cyanobakterien

der Sektionen IV und V, die zwar Proteine des Photosystems II besitzen, aber keinen Sauerstoff produzieren (Wolk et al. 1994; Kumar et al. 2010).

Für evolutionäre Betrachtungen stellt sich die Frage, ob Photosystem I und Photosystem II unabhängig voneinander entstanden sind und sich per lateralem Gentransfer in einem (Vorläufer-) Cyanobakterium zusammen gefunden haben (Xiong et al. 2000) oder ob, wie mit neueren Hinweisen untermauert, beide Photosysteme in einem ausgestorbenen anoxygenen Bakterium, das in einer Verwandtschaftslinie mit den Cyanobakterien steht, entstanden sind, wobei sich Photosystem II wahrscheinlich aus dem Photosystem I durch Genduplikation und Mutation entwickelt hat (Mulkidjanian et al. 2006). Alle anderen photosynthetisierenden Bakterien sollen demnach das eine oder andere Photosystem wieder verloren haben oder es per lateralem Gentransfer nie erhalten haben.

Neben der oxygenen Photosynthese sind einige Cyanobakterienstämme auch fähig, anoxygene Photosynthese mit  $\text{H}_2\text{S}$  als Elektronendonator für das Photosystem I zu betreiben (Bronstein et al. 2000).

Bei der oxygenen Photosynthese spaltet das PSII mit Hilfe von Lichtenergie  $\text{H}_2\text{O}$  und reduziert mit den aus dem Wasser gewonnen Elektronen den Plastochinonpool (Vermaas 2001). Die Elektronen werden entlang des steigenden Redoxpotentials weiter zum Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex, zu Cytochrom *c<sub>553</sub>* oder Plastocyanin und zu PSI weitergegeben, wobei der Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex die frei werdende Energie nutzt, um Protonen über die Membran zu pumpen, wobei wiederum ein chemiosmotisches Potential generiert wird. Dieser Protonengradient wird genutzt, um aus ADP ATP zu erzeugen, wodurch ein Teil der Energie, die bei der Weitergabe der Elektronen entsteht, konserviert werden kann.

Das Chlorophyll im Reaktionszentrum von PSI wird von Plastocyanin oder Cytochrom *c<sub>553</sub>* (auch als Cytochrom *c<sub>6</sub>* benannt) reduziert und kann mit Hilfe von Lichtenergie Ferredoxin reduzieren. An dieser Stelle gibt es nun vier wichtige Wege, wie die Elektronen weitergegeben werden:

- $\text{NADP}^+$  wird mit Hilfe der Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase (FNR) zu NADPH reduziert, welches dann z.B. im Calvin-Benson Zyklus zur Reduktion bzw. Fixierung von  $\text{CO}_2$  genutzt wird.
- Die Elektronen werden in den Zyklischen Elektronentransport eingeleitet: Ausgehend von Ferredoxin können Elektronen über mindestens vier Enzymkomplexe, auf direktem Weg über die Ferredoxin-Chinon-Reduktase (FQR) oder die Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase

(FNR), sowie auf indirektem Weg über die Succinat-Dehydrogenase (SDH) oder die NAD(P)H-Dehydrogenase (NDH-1) und deren Substrate an den Plastochinonpool weitergeleitet werden (Yeremenko et al. 2005).

- Die Elektronen werden von Ferredoxin an die Nitrat Reduktase und die Nitrit Reduktase weitergeleitet, die zusammen Nitrat zu Ammonium reduzieren (Flores et al. 2005).
- Die Elektronen werden von Ferredoxin aus direkt an die Hydrogenase weitergegeben, wo 2 Protonen zu H<sub>2</sub> reduziert werden (Gutekunst et al. 2014).

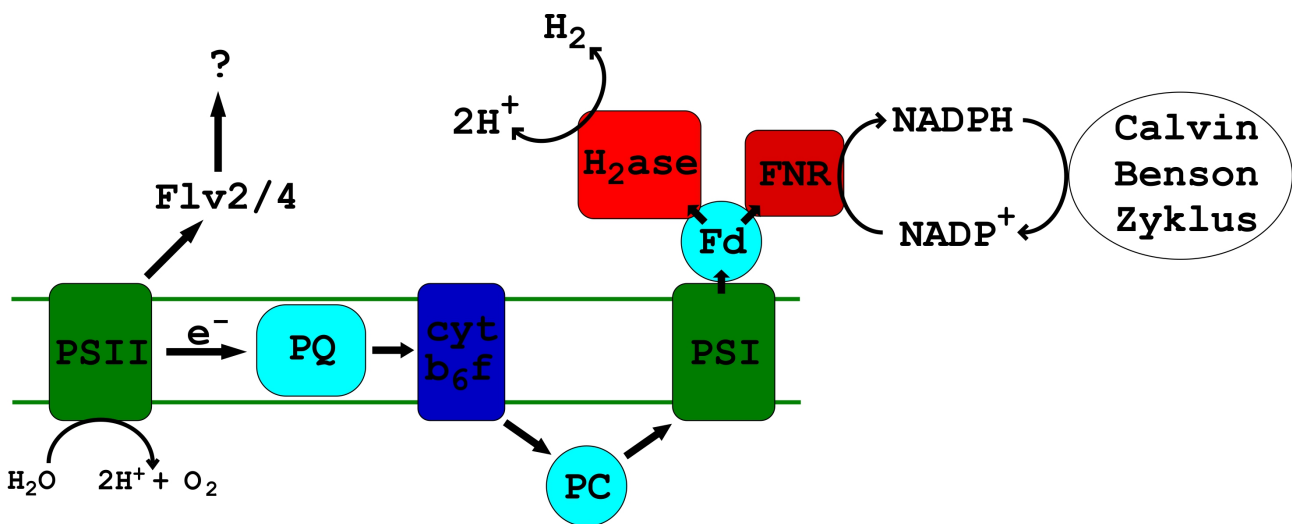


Abbildung 1.2: Schematische hypothetische Darstellung der linearen Photosynthese und der Belieferung der Hydrogenase mit Elektronen aus der Photosynthese

### 1.3.2 Zellatmung und fermentativer Zuckerabbau

Die Zellatmung bzw. der fermentative Zuckerabbau der Cyanobakterien beginnt mit dem Abbau von mit Hilfe der Photosynthese aufgebautem Glycogen oder exogenen Zuckern wie Glucose, Fruktose oder Saccharose (Rippka et al. 1979). Hierzu sind drei Wege bekannt: Der Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glykolyse), der Oxidativen Pentosephosphatweg (OPP) und der Entner-Doudoroff Weg (ED) (Chen et al. 2016). Der Abbau von Kohlenhydraten kann bei allen drei Wegen zu Pyruvat führen. Pyruvat wird entweder mittels der Pyruvatdehydrogenase (PDH) (De Kok et al. 1998) oder fermentativ mittels der sauerstoffsensitiven Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR) (Leach und Carr 1971; Neuer und Bothe 1982; McNeely et al. 2011) zu Acetyl-CoA oxidiert, welches in den Zitronensäurezyklus eingeleitet wird. Der cyanobakterielle Zitronensäurezyklus

wurde früher „unvollständig“ genannt, da ihm das Enzym 2-Oxoglutarat Dehydrogenase fehlt; trotzdem sind Cyanobakterien über einen alternativen Weg in der Lage, 2-Oxoglutarat in Succinat umzuwandeln (Cooley et al. 2000; Zhang und Bryant 2011). Um Elektronen in die Atmungskette einzuleiten, werden die Enzyme Succinat-Dehydrogenase (SDH) wie auch die NAD(P)H-Dehydrogenasen (NDH-1 und NDH-2) mit den jeweiligen Substraten Succinat bzw. NAD(P)H genutzt. Außerdem könnte H<sub>2</sub> mittels Hydrogenasen als Elektronendonator für die Atmungskette dienen (Cournac et al. 2004; Schmetterer und Pils 2004).

In den meisten Cyanobakterien finden sich zwei voneinander unabhängige Atmungsketten, eine in der Cytoplasmamembran, eine in der Thylakoidmembran (Schmetterer und Pils 2004). In der Thylakoidmembran werden die Elektronen mittels der oben erwähnten Enzyme an den Plastochinonpool geliefert und gehen von dort über den Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex an Plastocyanin oder Cytochrom *c<sub>553</sub>*. Diese liefern die Elektronen an die Respiratorischen Terminalen Oxidasen (RTOs) (in *Synechocystis* die Cytochrom *c* Oxidase Cox (Lea-Smith et al. 2013)) welche O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O reduzieren. Die Atmungsketten, welche sich an der Thylakoidmembran befinden, nutzen hierbei auch die selben Komponenten, den Plastochinonpool, den Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex, Plastocyanin und Cytochrom *c<sub>553</sub>*, wie die photosynthetische Elektronentransportkette. Ein alternativer Weg leitet Elektronen vom Plastochinonpool zur Chinoloxidase (Cyd) (Ermakova et al. 2016), die wahrscheinlich die Funktion eines Elektronenventils hat (Schmetterer und Pils 2004). Die Elektronentransportkette der Cytoplasmamembran unterscheidet sich von der Elektronentransportkette der Thylakoidmembran einerseits dadurch, dass sie, da hier keine Photosynthese stattfindet, nicht die selben Komponenten wie die Photosynthese nutzt, andererseits gibt es hier nur die NDH-2 als NAD(P)H-Dehydrogenase, keinen Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex und die Elektronen werden direkt vom Plastochinonpool an die RTO ARTO und vielleicht Cyd geliefert (Lea-Smith et al. 2013).

Zusammenhänge zwischen der Zellatmung bzw. dem fermentativen Zuckerabbau und der Hydrogenase sind die oben erwähnte mögliche Einspeisung von Elektronen aus H<sub>2</sub> in die Atmungskette (Cournac et al. 2004; Schmetterer und Pils 2004), sowie der Weg von Elektronen von der PFOR über Ferredoxin zur Hydrogenase (Gutekunst et al. 2014), welcher auch in dieser Arbeit untersucht wurde. Des Weiteren reduzieren mindestens die RTOs Cox und Cyd unter bestimmten Bedingungen auch während photosynthetischer Aktivität Sauerstoff (Ermakova et al. 2016) und können somit auch photosynthetischen Elektronenstress abbauen, wie es, wie in dieser Arbeit dargestellt, auch für die Hydrogenase denkbar wäre.

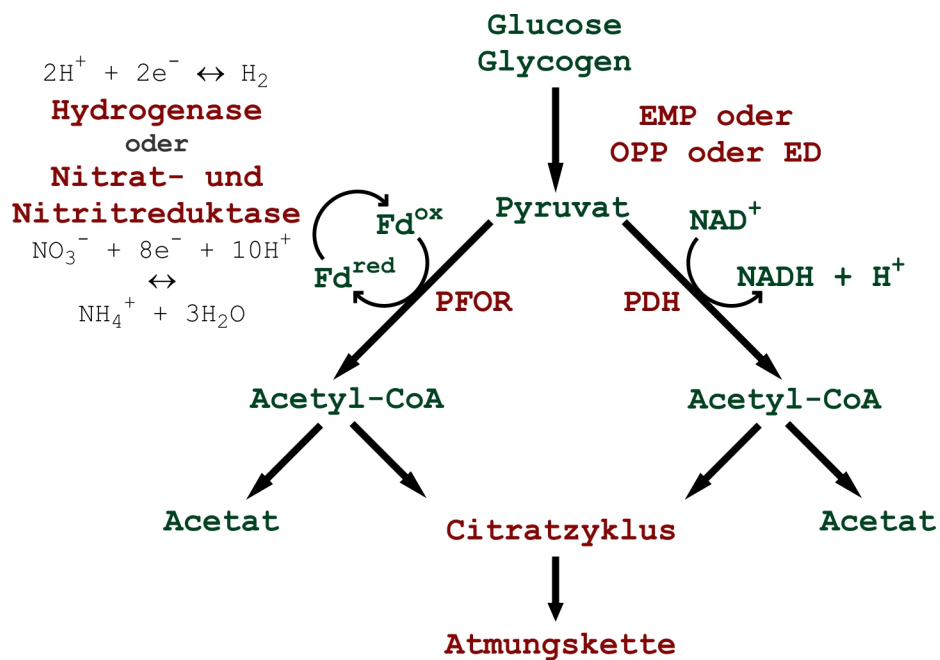


Abbildung 1.3: Ausschnitt aus der Zellatmung und fermentativem Zuckerabbau; rot: Enzyme oder Abbauwege, grün: Moleküle des Stoffwechsels

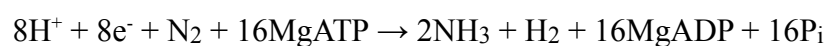
## 1.4 Hydrogenasen

Die von Hydrogenasen katalysierte Reaktion



kann von verschiedenen Hydrogenasen in die wasserstoffproduzierende, in die wasserstoffkonsumierende oder in beide Richtungen betrieben werden.

Außer den Hydrogenasen produzieren in manchen Cyanobakterien auch Nitrogenasen während ihrer eigentlichen Funktion, der Fixierung von molekularem Stickstoff, Wasserstoff:



Diese Reaktion ist nur in die wasserstoffproduzierende Richtung möglich (Bothe et al. 2010).

Hydrogenasen wurden hauptsächlich in Archaeen und Bakterien, aber auch in Eukaryoten, nämlich in Chloroplasten von einigen Algen und Hydrogenosomen von einigen Protozoen und anaeroben einzelligen Pilzen, gefunden (Vignais und Billoud 2007).

#### **1.4.1 Geschichtliche Betrachtung der Hydrogenasen**

Die Erde besaß zur Zeit, in der wahrscheinlich die ersten Lebewesen auftauchten, eine Atmosphäre mit einer relativ hohen Wasserstoffkonzentration (Tian et al. 2005). Daher ist es denkbar, dass zu dieser Zeit auch die ersten Hydrogenasen entstanden sind, damit die damals lebenden Zellen Wasserstoff als Energiequelle, z.B. zur Reduktion von CO, nutzen konnten (Vignais und Billoud 2007).

Nach der Wasserstoff-Hypothese (Martin und Muller 1998) bzw. der Syntrophie-Hypothese (Moreira und Lopez-Garcia 1998) führte die Symbiose zwischen einem wasserstoffabhängigem methanogenen Archaeon und einem wasserstoffproduzierenden Bakterium (in der Wasserstoff-Hypothese ein  $\alpha$ -Proteobakterium, in der Syntrophie-Hypothese ein  $\delta$ -Proteobakterium, wobei neuere Genom- und Proteomanalysen auf ein  $\alpha$ -Proteobakterium als Vorfahre der Mitochondrien hinweisen (Atteia et al. 2009; Thiergart et al. 2012) ) zur Entstehung der ersten eukaryotischen Zelle.

Außerdem wird vermutet, dass das [NiFe] Reaktionszentrum zur Chinon reduzierenden Untereinheit des Komplex I der Atmungskette evolvierte (Dupuis et al. 2001) und der Komplex I und die heutige membrangebundene [NiFe]-Hydrogenase (Klasse 4, siehe Klassifizierung der Hydrogenasen, Seite 15) einen gemeinsamen Vorfahren hatten (Mathiesen und Hägerhäll 2003).

Heute kommt Wasserstoff in der Atmosphäre nur noch als Spurenelement vor. In kleineren Ökosystemen werden aber durchaus relevante Mengen von Wasserstoff produziert (z.B. während Fermentationsprozessen von Clostridien), um dann wiederum von anderen Prokaryoten (z.B. methanogenen Archaeen oder Sulfat reduzierenden Bakterien) als Energiequelle bzw. Reduktionsmittel, aufgenommen zu werden (Vignais und Billoud 2007; Gutekunst und Schulz (in press)) .

### 1.4.2 Arten von Hydrogenasen und deren Funktionen

Hydrogenasen können nach den Metallen in ihren Reaktionszentren klassifiziert werden; diese Klassifizierung ergab sich bei phylogenetischen Untersuchungen, bei denen auch klar wurde, dass die so gefundenen 3 Klassen auch phylogenetisch unterschiedlich sind (Wu und Mandrand 1993; Vignais und Billoud 2007):

- Die [FeFe]-Hydrogenasen
- die [NiFe]-Hydrogenasen
- und die [Fe]-Hydrogenasen (früher metallfreie Hydrogenasen genannt)

[FeFe]- und [NiFe]-Hydrogenasen sind Eisen-Schwefel Proteine mit zwei Metall-Atomen in ihrem Reaktionszentrum; entweder zwei Eisenatome oder ein Eisenatom und ein Nickelatom. Die [Fe]-Hydrogenasen besitzen zwei Eisenatome, aber keinen Eisen-Schwefel-Cluster in ihrem Reaktionszentrum.

Während [FeFe]-Hydrogenasen meistens zur Reduktion von Protonen dienen, um die oxidierte Form von Elektronenträgern während des anaeroben Metabolismus wiederherzustellen, dienen [NiFe]-Hydrogenasen meistens zur Oxidation von  $H_2$ , um Elektronen für den Metabolismus zur Verfügung zu stellen (Peters et al. 2015). Andererseits wurde gezeigt, dass das Reaktionsgleichgewicht der bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenase von Cyanobakterien eher auf Seiten der  $H_2$  Produktion liegt (McIntosh et al. 2011). Diese Entdeckung lässt den Schluss zu und unterstützt die These, dass die bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenasen von Cyanobakterien auch als Elektronenventil für ihren Metabolismus dienen könnten (Appel et al. 2000; Cournac et al. 2004). Die [Fe]-Hydrogenasen der methanogenen Archaeen oxidieren  $H_2$ , um ein Hydrid auf Methenyltetrahydromethanopterin zu übertragen, um Ethylentetrahydromethanopterin herzustellen (Peters et al. 2015).

In Eukaryoten wurden bisher ausschließlich [FeFe]-Hydrogenasen gefunden, während in Cyanobakterien bisher ausschließlich [NiFe]-Hydrogenasen gefunden wurden; andere Bakterien besitzen [NiFe]-Hydrogenasen oder [FeFe]-Hydrogenasen oder beides; in Archaeen wurden bisher ausschließlich [NiFe]- und [Fe]-Hydrogenasen gefunden; [Fe]-Hydrogenasen wurden bisher ausschließlich in methanogenen Archaeen gefunden (Vignais und Billoud 2007).

Die [NiFe]-Hydrogenasen werden wiederum anhand von Sequenzvergleichen phylogenetisch in vier Klassen unterteilt, wobei aber alle Klassen einen monophyletischen Ursprung haben (Vignais et al. 2001; Vignais und Billoud 2007) :

Klasse 1: Membrangebundene Aufnahme-Hydrogenasen

Klasse 2: 2a: Aufnahme-Hydrogenasen der Cyanobakterien

2b: Wasserstoff-Sensor-Hydrogenasen

Klasse 3: 3a: F<sub>420</sub> reduzierende Hydrogenasen

3b: NADP reduzierende Hydrogenasen

3c: MV reduzierende Hydrogenasen

3d: NADP/NAD reduzierende bidirektionale Hydrogenasen (z.B. in Cyanobakterien)

Klasse 4: Energie-konvertierende-membranassoziierte H<sub>2</sub> produzierende Hydrogenasen

Eine weitere Möglichkeit der Klassifizierung der Hydrogenasen ist eine Einteilung nach ihrer Reaktionsrichtung (Vignais und Billoud 2007):

- H<sub>2</sub> oxidierende / aufnehmende Hydrogenasen („Uptake“ Hydrogenasen)
- H<sub>2</sub> produzierende Hydrogenasen
- bidirektionale Hydrogenasen

### **1.4.3 Sauerstoff und Hydrogenasen**

Die meisten bekannten Hydrogenasen können ihre Funktion bei Anwesenheit von Sauerstoff nicht ausüben. [FeFe]-Hydrogenasen werden von Sauerstoff irreversibel, „Standard“ [NiFe]-Hydrogenasen reversibel inaktiviert (Cracknell et al. 2009; Stripp et al. 2009). Bei [FeFe]-Hydrogenasen zerstört O<sub>2</sub> irreversibel den [4Fe-FS] Cluster des aktiven Zentrums und verhindert somit die weitere Funktionalität der Hydrogenase (Stripp et al. 2009); bei „Standard“ [NiFe]-Hydrogenasen wird bei Anwesenheit von Sauerstoff eine Oxo-, Peroxo- oder Hydroxogruppe gebildet, die reversibel zwischen dem Nickel- und dem Eisenatom bindet und eine irreversible Bindung von O<sub>2</sub> verhindert; während dieser Bindung ist die Hydrogenase zwar inaktiv, kann aber durch Reduktion wieder aktiviert werden (Volbeda et al. 2002; Ghirardi et al. 2007; Cracknell et al. 2009; McIntosh et al. 2011).



Es sind aber auch Organismen bekannt, die in Anwesenheit von Sauerstoff aktive Hydrogenasen besitzen. Ihre Aktivität kann durch Ausschluss von Sauerstoff erreicht werden: Entweder wird Sauerstoff vom Inneren der Zellen selbst ausreichend ferngehalten (wie z.B. bei den Heterocystenzellen von Cyanobakterien (Kumar et al. 2010)) oder es werden der Hydrogenase mikrooxische Bereiche zur Verfügung gestellt (wie z.B. in *Chlamydomonas reinhardtii* (Liran et al. 2016)). Außerdem sind [NiFe]-Hydrogenasen bekannt (H<sub>2</sub>-Sensor-Hydrogenasen und verschiedene Membrangebundene Aufnahme-Hydrogenasen, z.B. von *Aquifex aeolicus*, *Rhodobacter capsulatus* oder *Ralstonia eutropha*), bei denen Sauerstoff von Elektronen, die von der Hydrogenase zur Verfügung gestellt werden, reduziert wird und / oder es einen hydrophoben Kanal zum Reaktionszentrum der Hydrogenase gibt, der als Sauerstofffilter wirkt (Volbeda et al. 2002; Fontecilla-Camps et al. 2007; Cracknell et al. 2009; Pandelia et al. 2011). Teilweise wird hier von einer Oxidasefunktion der Hydrogenase gesprochen (Armstrong et al. 2009; Cracknell et al. 2009).

Des Weiteren sind einige Algen und Cyanobakterien in der Lage, für kurze Zeit nach Start der Photosynthese Wasserstoff (Photowasserstoff) zu produzieren (Kessler 1973; Appel et al. 2000). Diese Wasserstoffproduktion dient wahrscheinlich als Elektronenventil, um auf den anfänglichen Elektronenüberschuss nach dunklen anaeroben Phasen zu reagieren, bevor die Zellen lichtadaptiert sind (Appel et al. 2000; Cournac et al. 2004).

Ein eventueller Effekt von Nitratmangel auf die Photowasserstoffproduktion wurde in dieser Arbeit untersucht (Ergebnisteil Kapitel 5.4.2, Seite 96, und Diskussion Kapitel 6.2.2, Seite 104 ff.).

Die Sauerstoffsensitivität bzw. Sauerstofftoleranz der Hydrogenasen ist für die Erforschung der Möglichkeiten von biotechnologischer Wasserstoffherstellung von großer Bedeutung. Wäre es möglich, Hydrogenasen in Anwesenheit von höheren Sauerstoffkonzentrationen aktiv zu halten, könnten Elektronen aus der Photosynthese direkt und auf Dauer zur Produktion von Wasserstoff genutzt werden; dies könnte die Menge an produziertem Wasserstoff in einen für wirtschaftliche Interessen relevanten Bereich erhöhen.

#### 1.4.4 Cyanobakterielle Hydrogenasen

In Cyanobakterien sind drei Enzyme bekannt, die eine Hydrogenaseaktivität haben (Khanna und Lindblad 2015):

- Die Nitrogenase, welche Wasserstoff als Nebenprodukt herstellt.
- Die „Aufnahme-“Hydrogenase, die Wasserstoff oxidiert und Elektronen an den Plastochinonpool liefert und bisher nur in N<sub>2</sub> fixierenden Cyanobakterien gefunden wurde.
- Die bidirektionale-Hydrogenase, die sowohl Wasserstoff oxidieren, als auch Protonen zu Wasserstoff reduzieren kann.

Die zwei „wirklichen“ Hydrogenasen, die Aufnahme-Hydrogenase und die bidirektionale-Hydrogenase, sind [NiFe]-Hydrogenasen. Folgend wird nur noch auf die bidirektionale [NiFe]-Hydrogenase eingegangen, die auch in dieser Arbeit untersucht wurde und die einzige in *Synechocystis* vorkommende Hydrogenase ist (Appel und Schulz 1998).

#### Funktionen der bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenase

Da der Reaktionsweg der bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenase umkehrbar ist, kann von mindestens zwei unterschiedlichen Funktionen dieser Hydrogenase ausgegangen werden:

Bei der Oxidation (Aufnahme) von Wasserstoff werden Elektronen wahrscheinlich auch in die Photosynthese eingeleitet, da mit der Aufnahme von H<sub>2</sub> auch eine Abnahme von CO<sub>2</sub> beobachtet werden konnte (Cournac et al. 2004); auch wäre es denkbar, dass Elektronen von H<sub>2</sub> für die Zellatmung verwendet werden (Cournac et al. 2004; Schmetterer und Pils 2004).

Bei der Reduktion von Protonen zu Wasserstoff werden Elektronen aus dem Metabolismus entfernt und die Hydrogenase kann in diesem Zusammenhang die Funktion eines Elektronenventils übernehmen:

Diese Funktion kommt unter anaeroben Bedingungen in Dunkelheit zu tragen, wenn durch fermentative Prozesse ein Elektronenüberschuss herrscht (Stal und Moezelaar 1997).

Außerdem ist diese Funktion auch nach erstem Kontakt mit Licht, während die Zellen noch dunkeladaptiert sind, von Wichtigkeit, um dem reduzierten Zustand der Elektronentransportketten

entgegen zu wirken; hierbei entsteht der so genannte Photowasserstoff (Appel et al. 2000; Cournac et al. 2004).

Abgesehen davon ist es, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, wahrscheinlich, dass die Hydrogenase unter oxischen Bedingungen (siehe Kapitel 1.4.5, Seite 20) noch eine weitere Funktion erfüllt, die zwar mit der Oxidation von Ferredoxin bzw. dem Abbau von Elektronenstress, nicht aber mit der Produktion von Wasserstoff in Zusammenhang steht (siehe Diskussion Kapitel 6.2.4, Seite 112).

### Genetik der bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenase

Die bidirektionale [NiFe]-Hydrogenase wird von den Genen *hoxE*, *hoxF*, *hoxU*, *hoxY* und *hoxH* codiert. Dabei codieren die Gene *hoxE*, *hoxF* und *hoxU* die Diaphoraseuntereinheit und die Gene *hoxY* und *hoxH* die Hydrogenaseuntereinheit (Vignais und Billoud 2007). Des Weiteren sind in dem Zusammenhang das Gen *hoxW*, das die Endopeptidase für die Hydrogenase codiert, sowie die *hyp* Gene, die Proteine, die für die Reifung der Hydrogenase notwendig sind, codieren, zu nennen (Hoffmann et al. 2006; Vignais und Billoud 2007).

In den bisher auf Cyanobase (Nakao, Okamoto et al. 2010) veröffentlichten Totalsequenzierungen sind die Gene *hoxE* und *hoxF* einerseits, sowie die Gene *hoxU*, *hoxY* und *hoxH* andererseits immer in relativer Nähe zueinander. Es gibt Cyanobakterien, in denen *hoxEF* und *hoxUYH* relativ große Abstände zwischen einander haben, wie z.B. *Synechococcus elongatus* PCC7942 mit einem Abstand von ~336 kb (Nakao et al. 2010).

In *Synechocystis* finden sich die Hydrogenase codierenden Gene in der Reihenfolge *hoxEFUYH*. Zwischen *hoxF* und *hoxU* befindet sich der ORF des hypothetischen Proteins *sll1222* und die DNA der Antisense-RNA *as-sll1223* (Nakao et al. 2010; Mitschke et al. 2011). Die DNA der Antisense-RNA *as-sll1223* überlappt mit *sll1222* und *hoxU*. Zwischen *hoxY* und *hoxH* liegen die ORFs der hypothetischen Proteine *sll1225* und *sll2420*. Die Hydrogenasegene werden in einer Einheit mit einem Promoter transkribiert (Gutekunst et al. 2005; Oliveira und Lindblad 2005). In Zusammenhang mit den *hox* Genen stehen zwei LexA Bindungsstellen ca. 600 bis 700 bp. vor dem ATG des *hoxE* Gens. LexA wirkt für die *hox* Gene als Transkriptionsaktivator (Gutekunst et al. 2005). Eine Karte der Hydrogenasegene findet sich in Abbildung 1.4.

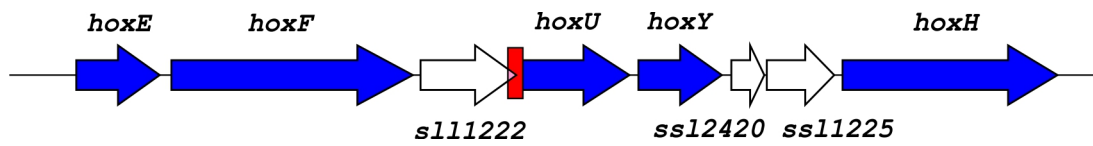


Abbildung 1.4: Karte der Hydrogenasegene. Blau: Gene, die die Hydrogenase codieren; rot: die DNA der Antisense-RNA as-s11223, weiß: ORFs der hypothetischen Proteine. Die Längen der Gene und ORFs sind in ihren relativen auf die Anzahl der Basenpaare bezogenen Längen zueinander dargestellt. Die Grundlagen für diese Karte liefern die Internet Datensammlung Cyanobase (Nakao et al. 2010) und die Publikationen von Appel und Schulz (1996) sowie Mitschke et al. (2011).

### Aufbau des bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenaseenzym und Funktionen der Untereinheiten

Die bidirektionale [NiFe]-Hydrogenase ist ein Heteropentamer und besteht aus den fünf Proteinen HoxE, HoxF, HoxU, HoxY und HoxH (Appel und Schulz 1996; Vignais und Billoud 2007). HoxEFU bilden die Diaphoraseuntereinheit, die bei der Produktion von Wasserstoff Ferredoxin oxidiert (Gutekunst, Chen et al. 2014) und die Elektronen an die Hydrogenaseuntereinheit, bestehend aus HoxYH, weiterleitet. Die Hydrogenaseuntereinheit reduziert Protonen, wobei H<sub>2</sub> entsteht. Außerdem ist die Hydrogenase in der Lage, diesen Weg umgekehrt zu verfolgen, also H<sub>2</sub> zu oxidieren, um dem Metabolismus Elektronen zur Verfügung zu stellen (siehe Abbildung 1.5).

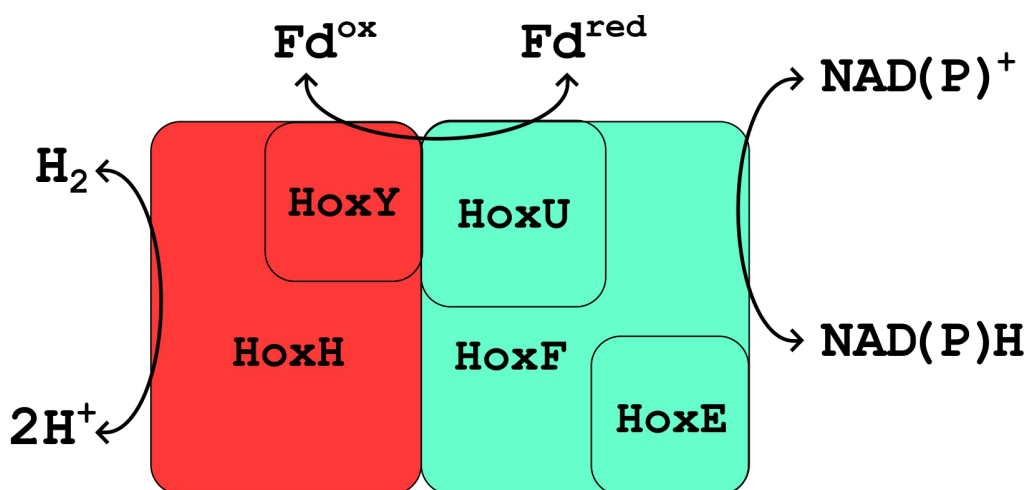


Abbildung 1.5: Grafische Darstellung der Hydrogenase mit ihren Untereinheiten; rot: Hydrogenaseuntereinheit; türkis: Diaphoraseuntereinheit

Das aktive Zentrum der Hydrogenase, das die Reaktion  $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$  katalysiert und sich in HoxH befindet, beinhaltet die zwei namengebenden Nickel- und Eisenatome (Appel und Schulz 1996). Die Metallatome sind durch Disulfidbrücken mit dem Protein verbunden (Volbeda et al. 1995). In den Proteinen HoxY, HoxU und HoxF befinden sich Fe-S Cluster mit unterschiedlich vielen Eisen- und Schwefelatomen, die beim Elektronentransfer innerhalb der Hydrogenase eine Rolle spielen könnten (Volbeda et al. 1995; Tamagnini et al. 2002). HoxE ist für die Bindung an die Membran verantwortlich, könnte aber auch eine Rolle im Elektronentransfer spielen (Schmitz et al. 2002; Burroughs et al. 2014).

Die Proteine HoxF und HoxU der Diaphoraseuntereinheit weisen starke Homologien mit Proteinen des Komplex I (NADH-Dehydrogenase der Atmungskette) in *E. coli* auf, die aber in Cyanobakterien fehlen. Daher wird angenommen, dass diese Proteine ebenfalls eine Rolle in der Zellatmung spielen (Appel und Schulz 1996).

#### **1.4.5 Mixotrophe Verhältnisse und Zusammenhang mit der Hydrogenase**

Mixotrophe Verhältnisse werden in diesem Zusammenhang Bedingungen genannt, bei denen Cyanobakterien Energie sowohl mittels Sonnenlicht als auch mittels exogenem Zucker zur Verfügung steht.

In der Natur finden Cyanobakterien mixotrophe Verhältnisse vor allem in der späten Phase von Algenblüten beziehungsweise in nährstoffreichen küstennahen Gewässern vor (Barz et al. 2010; Teeling et al. 2012). Algenblüten treten periodisch auf und dauern Tage bis Wochen (Anderson et al. 2002; Duan et al. 2009; Teeling et al. 2012). Somit muss davon ausgegangen werden, dass sich Organismen, die in Algenblüten anzutreffen sind, auch an diese Bedingungen anpassen können.

Dass den Organismen in Algenblüten verschiedene Zucker zur Verfügung stehen und diese auch genutzt werden, zeigen Untersuchungen, bei denen in Algenblüten verschiedenste Enzyme, die für die Aufnahme oder den Abbau von Zucker zuständig sind, gefunden wurden. Hierzu zählen glycolytische Exoenzyme, Zuckertransporter oder Glycosid Hydrolasen (Teeling et al. 2012). Abgesehen davon, dass beim Abbau von Zucker Elektronen frei werden, wird der Calvin-Benson Zyklus bei Anwesenheit von Zucker herunterreguliert (Oesterhelt et al. 2007; Narainsamy et al. 2013), womit den Organismen eine Möglichkeit fehlt, Elektronen, die bei der Photosynthese frei

werden, zu verbrauchen. Somit kann es potentiell zu einem Elektronenüberschuss kommen bzw. reduziertes Ferredoxin nicht in ausreichendem Maß oxidiert werden (Gutekunst et al. 2014).

Ein weiteres Merkmal von Algenblüten ist, dass es dort wenig Nitrat, dafür aber mehr organische Stickstoffverbindungen gibt (Wetz und Wheeler 2004). Die Nitratreduktase ist ein Enzym, das Elektronen von reduziertem Ferredoxin auf Nitrat überträgt, wobei Nitrit entsteht, welches von der Nitritreduktase zu Ammonium reduziert wird, welches wiederum zum Aufbau von Aminosäuren verwendet wird (Flores et al. 2005). Mit dem Fehlen des Substrats für die Nitratreduktase fehlt den Organismen also eine weitere Möglichkeit, Elektronen zu verbrauchen bzw. reduziertes Ferredoxin zu oxidieren..

Nitratmangel und Anwesenheit von Zucker sprechen daher für die Wichtigkeit von bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenasen als Elektronenventil; daher wäre unter diesen Bedingungen der Besitz einer Hydrogenase für Organismen ein Vorteil (Gutekunst et al. 2014). Dass bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenasen eine wichtige Rolle bei mixotrophen Bedingungen zukommt, zeigen ebenfalls Untersuchungen, bei denen in Wasserproben aus küstennahen Gewässern und Seen (also Gewässern, in denen mixotrophe Bedingungen herrschen können) Gene, die für bidirektionale [NiFe]-Hydrogenasen codieren, gefunden werden konnten, während Wasserproben aus dem offenen Ozean frei von diesen Genen waren (Barz et al. 2010).

#### **1.4.6 Mixotrophe Bedingungen im Labor: BG11<sub>0</sub>AG Medium**

Um im Labor mixotrophe Bedingungen zu erzeugen, die denen in einer Algenblüte ähneln, werden die Zellen beleuchtet und dem Medium wird Glucose sowie Arginin anstelle von Nitrat zugefügt. Dieses Vorgehen ist sinnvoll, da einige Cyanobakterien Glucose aufnehmen können (Beauclerk und Smith 1978), mit Glucose als Kohlenstoffquelle wachsen können (Rippka et al. 1979) und der verwendete Stamm einen Glucosetransporter besitzt und Glucose verstoffwechseln kann (Schmetterer 1990). Das Zufügen von Arginin, anstelle von dem normalerweise im Medium für *Synechocystis* verwendeten Nitrat, entspricht der in Algenblüten von Wetz und Wheeler 2004 festgestellten Bedingung „Nitratmangel bei Anwesenheit von organischem Stickstoff“. Ausserdem konnte in verschiedenen natürlichen Gewässern Arginin nachgewiesen werden (Repeta 2015) und Argininaufnahme und Wachstum auf Arginin bei verschiedenen Algen (Flynn und Butler 1986) und Cyanobakterien (u.a. *Synechocystis*) (Montesinos et al. 1997) gezeigt werden.

Die wahrscheinlichen, für diese Arbeit wichtigen Effekte von BG11<sub>0</sub>AG Medium auf die Zellen sind folgende:

Durch den Nitratmangel fehlt den Bakterien die Möglichkeit, Elektronen von reduziertem Ferredoxin über die Nitratreduktase an Nitrat zu übertragen. Arginin, das anstelle von Nitrat als Stickstoffquelle dient, ist ein Molekül, das nicht weiter reduziert werden kann. Es kann daher von den Zellen nicht wie Nitrat für den Abbau eines Elektronenüberschusses verwendet werden.

Zieht man den kompletten Weg der Reduktion von  $\text{NO}_3^-$  zu  $\text{NH}_4^+$  durch die Nitrat- und die Nitritreduktase in Rechnung, fehlt den Zellen die Möglichkeit, 8 Elektronen pro Endakzeptor abzugeben bzw. 8 reduzierte Ferredoxine zu oxidieren (Flores et al. 2005).

Durch die Zugabe von Arginin werden bei dessen Abbau Elektronen frei, welche wahrscheinlich unter verschiedenen Bedingungen großteils oder teilweise in die Elektronentransportkette eingeleitet werden (Schriek et al. 2007; Schriek et al. 2008). Bei photosynthetischem Elektronenstress und Arginin als einziger Stickstoffquelle ist dieser Abbauweg nur noch eingeschränkt möglich und Arginin wird hauptsächlich im aus Arginin und Asparaginsäure bestehenden Speichermolekül Cyanophycin eingelagert und steht für den Stoffwechsel nicht mehr zur Verfügung (Schriek et al. 2008); dieser Umstand zeigt sich bei  $\geq 200 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  Lichtintensität in BG11<sub>0</sub>A Medium (siehe Seite 29) in einem Phänotyp von *Synechocystis*, der die Merkmale von Zellen mit Stickstoffmangel aufweist (Stephan et al. 2000; Schriek et al. 2008). Bei BG11<sub>0</sub>AG Medium könnte die Zugabe von Glucose, durch die Herunterregulierung des Calvin-Benson Zyklus bei Anwesenheit von Glucose (Oesterhelt et al. 2007), auch bei Standardbeleuchtung ( $60 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), zu einem ähnlich hohem Elektronenstress und einem Phänotyp mit Stickstoffmangel führen.

Durch die Zugabe von Glucose wird eines der wichtigsten Enzyme des Calvin-Benson Zyklus, die Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO), herunterreguliert (Oesterhelt et al. 2007) und der Calvin-Benson Zyklus gehemmt (Narainsamy et al. 2013). Dadurch verschlechtert sich für die Zellen die Möglichkeit, Elektronen aus den Elektronentransportketten über die Fixierung von  $\text{CO}_2$  an einen temporären Endakzeptor abzugeben. Können die Zellen den Calvin-Benson Zyklus nicht mehr nutzen, um Elektronen auf  $\text{CO}_2$  zu übertragen, um Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) herzustellen, fehlt den Zellen die Möglichkeit, 12 Elektronen pro GAP aus der Elektronentransportkette zu schleusen bzw. 12 oxidierte Ferredoxine zu regenerieren.

Die Hydrogenase bietet unter diesen Bedingungen einen der letzten theoretisch möglichen Wege um Elektronenstress abzubauen bzw. Elektronen von Ferredoxin an einen temporären Endakzeptor abzugeben, nämlich durch die Reduktion von Protonen zu Wasserstoff. Dass die Hydrogenase unter diesen Bedingungen wirklich als Elektronensenke so wichtig ist, dass sie essentiell wird, wurde von Gutekunst et al. 2014 gezeigt.

Weitere Enzyme, die Elektronenstress durch Reduktion von Elektronenendakzeptoren mindern können, aber unter diesen Bedingungen aus noch unbekanntem Gründen nicht oder zu wenig als Elektronensenken fungieren, sind im folgenden Kapitel gelistet.

#### 1.4.7 Weitere Elektronensenken

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, können die Nitrat- und Nitritreduktase, der Calvin-Benson Zyklus und die Hydrogenase als Elektronensenken fungieren. Da in dieser Arbeit die Hydrogenase unter Dauerbeleuchtung untersucht wurde, sind folgend drei Enzyme beschrieben, die im Zusammenhang mit der Photosynthese die Funktion von Elektronensenken übernehmen können:

- Die Flavoproteine Flv2 und Flv4 (Cyanobase Gennummern *sll0219* und *sll0217* (Nakao et al. 2010; Zhang et al. 2012)) fungieren als Heterodimer bei Elektronenstress als Elektronenakzeptoren für Elektronen von PSII (Zhang et al. 2012); es ist aber umstritten, was wiederum der Elektronenakzeptor für Flv2/4 ist, bzw. ob Flv2/4 unter bestimmten Bedingungen in der Lage ist, Sauerstoff zu reduzieren (Zhang et al. 2012; Shimakawa et al. 2015)
- Die Flavoproteine Flv1 und Flv3 (Cyanobase Gennummern *sll1521* und *sll0550* (Nakao et al. 2010; Zhang et al. 2012)) fungieren in der Photoreduktion von Sauerstoff zu Wasser in einer Mehler-ähnlichen Reaktion, bei der aber im Gegensatz zur eukaryotischen Mehler Reaktion keine reaktiven Sauerstoffspezies entstehen (Helman et al. 2003). Elektronen für diese Reaktion kommen von NADPH, welches durch die Photosynthese reduziert wird (Vincente et al. 2002). Flv1 und Flv3 kommen als Homo- oder als Heterodimere vor (Mustila et al. 2016). Umstritten ist jedoch, ob Homo- und Heterodimere die Mehler-ähnliche Reaktion durchführen können (Hasunuma et al. 2014) oder ob dies nur dem Heterodimer möglich ist (Mustila et al. 2016).



- Die Respiratorischen Terminalen Oxidasen Cox (Cytochrom *c* Oxidase) und Cyd (Chinol Oxidase) können unter bestimmten Bedingungen auch während photosynthetischer Aktivität Sauerstoff reduzieren (Ermakova et al. 2016). Da beide Oxidasen in der Thylakoidmembran lokalisiert sind (Peschek et al. 1988; Howitt und Vermaas 1998; Berry et al. 2002; Lea-Smith et al. 2013), sich die Atmungskette und die photosynthetische Elektronentransportkette verschiedene Komponenten teilen (Mullineaux 2014) und ihre Aktivität bei Stressbedingungen im photosynthetischen Elektronentransport gemessen wurde (Ermakova et al. 2016), ist es wahrscheinlich, dass sie Elektronen aus der Wasserspaltung für die Reduktion von Sauerstoff verwenden können und damit wiederum, zumindest unter bestimmten Bedingungen, als elektronenstressmindernde Elektronensenken fungieren könnten.

## 2 Fragestellung

Die bidirektionale [NiFe]-Hydrogenase gilt als sauerstoffsensitiv und ihre bisher bekannten Funktionen sollten während der Anwesenheit von Sauerstoff nicht stattfinden (Cracknell et al. 2009; McIntosh et al. 2011). In dieser Arbeitsgruppe wurde ein Wachstumsphänotyp (kein Wachstum) einer Hydrogenase Knockout-Mutante ( $\Delta hoxH$ ) des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC6803 unter mixotrophen, nitratlimitierten Bedingungen in einem Tag / Nacht Rhythmus entdeckt; unter diesen Bedingungen ist die Hydrogenase wahrscheinlich essentiell, da sie den wegen des Mediums generierten erhöhten Elektronenstress und damit vielleicht verbundenen metabolischen Stickstoffmangel (siehe Kapitel 1.4.6, Seite 21 f. bzw. Schriek et al. 2008) und den Mangel an oxidiertem Ferredoxin (Gutekunst et al. 2014) mindern kann. Dieser Wachstumsphänotyp wurde daraufhin auch bei Dauerlicht beobachtet. Da bei Dauerlicht und Begasung der Zellen mit Luft andauernd Sauerstoff anwesend sein sollte und die Hydrogenase als sauerstoffsensitiv gilt, ist ein Phänotyp einer Hydrogenase Mutante unter diesen Bedingungen überraschend.

Daher soll in dieser Arbeit als erstes untersucht werden, ob es sich bei dem Phänotyp um kein Artefakt, z.B. aufgrund unbekannter Eigenschaften dieser  $\Delta hoxH$  Einzelmutante, handelt. Des Weiteren soll gezeigt werden, ob der Phänotyp wirklich unter oxischen Bedingungen auftritt und ob die Zellen unter diesen Bedingungen Sauerstoff produzieren. Außerdem sollen, falls gezeigt werden kann, dass es sich bei dem Phänotyp um kein Artefakt handelt und es sich wirklich um oxische Bedingungen handelt, Hinweise gefunden werden, ob die Hydrogenase den Zellen auch unter diesen oxischen Bedingungen zur Minderung von Elektronenstress dient. Es soll auch geklärt werden, ob die Hydrogenase- oder die Diaphoraseuntereinheit der [NiFe]-Hydrogenase (hauptsächlich) für den Phänotyp verantwortlich ist. Schlussendlich soll noch geklärt werden, ob die Hydrogenase, während sie diese zu untersuchende Funktion ausführt, Wasserstoff produziert.

Eine zweite Fragestellung betrifft die Antisense-RNA *as-sll1223*, deren DNA zwischen den Hydrogenasegenen *hoxF* und *hoxU* liegt (Mitschke et al. 2011). Da in anderen Untersuchungen gezeigt wurde, dass es unter bestimmten Bedingungen zu einer unterschiedlichen Transkriptionen der Gene stromaufwärts (*hoxEF*) und stromabwärts (*hoxUYH*) der Region, auf der die Antisense-RNA codiert ist, kommt (Kiss et al. 2009), soll mittels Antisense-RNA und Anti-antisense-RNA Überexpressionsmutanten untersucht werden, ob die Antisense-RNA im Zusammenhang mit der unterschiedlichen Transkription steht.

## 3 Material

Für die Herstellung aller Medien und Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, H<sub>2</sub>O verwendet, das mit einer Seadest Anlage RD 2000 (USF Elga Seral, Ransbach-Baumbach) gereinigt und deionisiert wurde. Die verwendeten Chemikalien stammten, wenn nicht anders angegeben von den Firmen Merck (Darmstadt, DE), Roth (Karlsruhe, DE) und Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)

### 3.1 Bakterienstämme

#### 3.1.1 Cyanobakterien-Stämme

##### ***Synechocystis* sp. PCC6803**

Bei diesem Stamm handelt es sich um ein einzelliges Cyanobakterium, das sich durch Zweiteilung reproduziert. Somit ist *Synechocystis* sp. PCC6803 (ab hier nur noch *Synechocystis*) der Sektion I der Cyanobakteriengruppen nach R. Rippka zuzuordnen (Rippka et al. 1979). *Synechocystis* wird meistens als Süßwasserbakterium benannt, kann aber auch in Salzwasser wachsen (Iijima et al. 2015). Der Stamm ist wegen seiner natürlichen Kompetenz durch Transformation genetisch leicht veränderbar und wird daher als Modellorganismus verwendet. *Synechocystis* war der erste total sequenzierte, autotrophe, photosynthetisierende Organismus und somit auch das erste total sequenzierte Cyanobakterium, insgesamt der dritte total sequenzierte Organismus überhaupt (Kaneko et al. 1996). Der hier verwendete Stamm ist befähigt, Glucose aufzunehmen und mit deren Hilfe unter LAHG (light activated heterotrophic growth) Bedingungen zu wachsen (Anderson und McIntosh 1991).

##### **Mutantenstämme von *Synechocystis***

Alle für diese Arbeit verwendeten Mutanten, die teilweise im Zuge dieser Arbeit entstanden, teilweise schon vorher in dieser Gruppe (Appel et al. 2000; Gutekunst et al. 2005; Forberich 2011) erschaffen wurden, sind in der folgenden Tabelle 3.1 als Übersicht aufgelistet.

Zusätzlich erfolgt hier eine genauere Beschreibung der in dieser Arbeit entstandenen Mutanten:

- AS1: Diese Bakterien tragen das in dieser Arbeit konstruierte Plasmid pVZas1 (siehe Kapitel 3.6.3, Seite 35) und exprimieren somit die Antisense-RNA *as-sll1223* (Mitschke et al. 2011) konstitutiv. Die Selektion auf Bakterien, die den Plasmid trugen, erfolgte durch Kultivierung auf Kanamycin. Der Nachweis der erhöhten Transkription von *as-sll1223* erfolgte durch qPCR (siehe Kapitel 5.3.3, Seite 88).
- AS3: Diese Bakterien tragen das in dieser Arbeit konstruierte Plasmid pVZas3 (siehe Kapitel 3.6.4, Seite 35) und exprimieren somit die *as-sll1223* RNA in entgegengesetzter Richtung, was somit einer anti-anti-sense RNA entspricht und ab hier *aas-sll1223* RNA benannt wird. Die Expression erfolgt ebenfalls konstitutiv. Die Selektion erfolgt wiederum durch Kultivierung auf Kanamycin.
- WT pVZ321: Diese Bakterien tragen das leere Plasmid pVZ321 (siehe Kapitel 3.6.2, Seite 34), das zur Konstruktion der Plasmide pVZas1 und pVZas3 verwendet wurde. Diese Mutante diente als dem Wildtyp ähnlichen Vergleichsstamm. Die Selektion erfolgte auf Kanamycin und Chloramphenicol.

Name	betroffene(r) ORF(s)	betroffene(s) Protein(e)	Resistenz	Referenz
AS1	<i>as-sll1223</i> (a)		Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
AS3	<i>aas-sll1223</i> (b)		Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
<i>Δflv24</i>	<i>sll0219, sll0218, sll0217</i>	Flavoproteine 2 und 4	Gm <sup>r</sup>	(Forberich 2011)
<i>Δflv24ΔhoxH</i>	<i>sll0219, sll0218, sll0217, sll1226</i>	Flavoproteine 2 und 4 und große Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase	Gm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	(Forberich 2011)
<i>ΔhoxEFUYH</i>	<i>sll1220, sll1221, sll1222, sll1223, sll1224, sll2420, sll1225, sll1226</i>	[NiFe]-Hydrogenase	Km <sup>r</sup>	(Appel et al. 2000)
<i>ΔhoxEFU</i>	<i>sll1220, sll1221, sll1222, sll1223,</i>	Diaphoraseuntereinheit der [NiFe]-Hydrogenase	Km <sup>r</sup>	(Appel et al. 2000)
<i>ΔhoxH</i>	<i>sll1226</i>	große Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase	Km <sup>r</sup>	(Appel et al. 2000)
<i>ΔlexA</i>	<i>sll1626</i>	LexA	Gm <sup>r</sup>	(Gutekunst et al. 2005)
WT pVZ321			Km <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	diese Arbeit

Tabelle 3.1: Mutantenstämme *Synechocystis*, alphabetisch geordnet. Die Benennung der Open Reading Frames (ORFs) ist analog zur Nomenklatur von Cyanobase (Nakao et al. 2010), mit Ausnahme des ORFs *as-sll1223* (a), dessen Benennung und Beschreibung von J. Mitschke (Mitschke et al. 2011) erfolgte. (b) Die Sequenz *aas-sll1223* ist dieselbe, aber umgedrehte Sequenz wie *as-sll1223*; das Produkt entspricht somit der anti-anti-sense RNA von *as-sll1223*.

### 3.1.2 *Escherichia coli* Stamm

- DH5 $\alpha$

Genotyp: F<sup>-</sup>, *endA1*, *hsdR17* (*r<sub>k</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>k</sub>*<sup>+</sup>), *supE44*, *thi-1*,  $\lambda$ <sup>-</sup>, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*,  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15 (Bethesda-Research-Laboratories 1986)

## 3.2 Medien für *Synechocystis* sp. PCC6803

Für die Kultivierung von *Synechocystis* sp. PCC6803 wurden vier verschiedene Flüssigmedien benutzt, deren Basis das von Rosemarie Rippka entwickelte BG11-Medium (Rippka et al. 1979) ist. Die für die Versuche ausschlaggebenden Verschiedenheiten sind in Tabelle 3.2 dargestellt:

	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [17,6 mM]	Arginin [5 mM]	Glucose [10 mM]
BG11	+	-	-
BG11G	+	-	+
BG11 <sub>0</sub> A	-	+	-
BG11 <sub>0</sub> AG	-	+	+

Tabelle 3.2: Übersicht Medien für *Synechocystis* sp. PCC6803

### 3.2.1 BG11

Das BG11 Medium wurde aus sechs verschiedenen Stammlösungen und H<sub>2</sub>O zusammengemischt und autoklaviert:

BG11-100x (10 ml / l):

NaNO <sub>3</sub>	1,76	M
MgSO <sub>4</sub>	30,40	mM
CaCl <sub>2</sub>	24,50	mM
Citronensäure	3,12	mM
Na <sub>2</sub> EDTA	0,279	mM
1000x Spurenelemente	10 %	(v / v)

1000x Spurenelemente:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	46,3	mM
MnCl <sub>2</sub>	4,15	mM
NaMoO <sub>4</sub>	1,61	mM
ZnSO <sub>4</sub>	0,77	mM
CuSO <sub>4</sub>	0,32	mM
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,17	mM

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 ml / l): 175,11 mM

---

<u>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 ml / l):</u>	188,70	mM	
<u>TES (5 ml / l):</u>	2,00	M	(auf pH 8 mit KOH)
<u>FeNH<sub>4</sub> Citrat (1 ml / l):</u>	22,80	mM	Zugabe bei Kultivierung in Flüssigmedium erst steril nach dem Autoklavieren.

Nur bei Kultivierung auf Agarplatten:

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1 ml / l): 1,00 M

Zur Kultivierung auf Agarplatten wurden dem Medium außerdem vor dem Autoklavieren 15 g / l Bacto-Agar (BD) hinzugefügt. Antibiotika (siehe Kapitel 3.2.5) wurden steril vor dem Gießen der Agarplatten hinzugefügt.

### 3.2.2 BG11G

Das BG11G Medium ist mit dem BG11 Medium, bis auf die sterile Zugabe von 10 mM Glucose (5 ml / l einer 2 M Stammlösung) nach dem Autoklavieren, identisch.

### 3.2.3 BG11<sub>0</sub>A

Das BG11<sub>0</sub>A Medium ist mit dem BG11 Medium identisch, bis auf den Austausch von NaNO<sub>3</sub> mit NaCl (gleiche Molarität für gleichen Salzgehalt) und die sterile Addition von 5 mM Arginin (10 ml / l einer 0,5 M Stammlösung) als Stickstoffquelle nach dem Autoklavieren.

### 3.2.4 BG11<sub>0</sub>AG

Das BG11<sub>0</sub>AG Medium ist mit dem BG11<sub>0</sub>A Medium, bis auf die sterile Zugabe von 10 mM Glucose (5 ml / l einer 2 M Stammlösung) nach dem Autoklavieren, identisch.

### 3.2.5 Antibiotika für *Synechocystis*

Für *Synechocystis* Mutanten wurden die in Tabelle 3.3 dargestellten Antibiotika verwendet:

Antibiotikum	Abkürzung	Stammlösung	Endkonzentration
Chloramphenicol	Cm	20 mg / ml	20 µg / ml
Gentamycin	Gm	10 mg / ml	10 µg / ml
Kanamycin	Km	50 mg / ml	50 µg / ml

Tabelle 3.3: Antibiotikakonzentrationen für *Synechocystis*

## 3.3 Medien für *Escherichia coli*

### 3.3.1 LB Medium

*Escherichia coli* (ab hier *E. coli*) wurde, bis auf wenige Ausnahmen, in dem für die Kultivierung von *E. coli* üblichen LB Medium angezogen. (Laut Giuseppe Bertani, dem Erfinder des LB Mediums, gibt es viele Falschinterpretationen seiner Abkürzung LB, wie z.B. Luria broth, Lennox broth oder Luria-Bertani Medium. Seiner Aussage nach, steht LB für „lysogeny broth“ (Bertani 2004).)

LB Medium:    Hefeextrakt    5    g / l  
                   Trypton            10    g / l  
                   NaCl                10    g / l  
                   H<sub>2</sub>O        ad    1    l

Die Zutaten wurden in Glasgefäßen eingewogen, mit destilliertem H<sub>2</sub>O auf das entsprechende Volumen gebracht und autoklaviert.

Bei Verwendung des LB Mediums für Agarplatten wurden zusätzlich 15 g / l Bacto-Agar eingewogen und mit autoklaviert. Antibiotika wurden vor dem Gießen der Agarplatten steril hinzugefügt.

### 3.3.2 Antibiotika für *E. coli*

Für *E. coli* Mutanten wurden die in Tabelle 3.4 dargestellten Antibiotika verwendet:

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg / ml	100 µg / ml
Gentamycin	10 mg / ml	10 µg / ml
Kanamycin	50 mg / ml	50 µg / ml

Tabelle 3.4: Antibiotikakonzentrationen für *E. coli*

### 3.4 Puffer und Lösungen

**Break Buffer:** 32 ml TE 50/100 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM EDTA)  
 150 µl Triton X-100  
 600 µl 25 % (w / v) Natrium lauroylsarcosine  
 20 % (w / v) Natrium dodecylsulfat  
 autoklavieren

**Ladepuffer:** 50 ml Glycerin  
 50 ml TBE-Puffer 1x  
 20 mg Bromphenolblau

**TE-Puffer:** 10 mM Tris/HCl pH 7,4  
 1 mM NaEDTA  
 ad 1 l H<sub>2</sub>O  
 autoklavieren

**TBE-Puffer 10x:** 890 mM Tris  
 890 mM Borsäure  
 40 mM Na<sub>2</sub>-EDTA·2H<sub>2</sub>O  
 ad 1 l H<sub>2</sub>O  
 autoklavieren

**10X MOPS:** 200 mM MOPS  
 50 mM Na Acetat  
 1 mM EDTA  
 ad 1 l H<sub>2</sub>O  
 pH 7,0 mit NaOH einstellen  
 autoklavieren (max. 20 min)



### 3.5 Primer:

Die in dieser Arbeit als Primer verwendeten Oligonukleotide stammen von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, DE). Die Oligonukleotide wurden als Lyophilisat zugesendet und im Labor in Wasser gelöst. Für die Primer, die später in der qPCR verwendet wurden, wurde „ROTIPURAN® Low organic Water“ (Roth, Karlsruhe, DE) verwendet; für alle anderen Primer wurde mit der Seadest RD 2000 Anlage aufgereinigtes und autoklaviertes Wasser verwendet.

Die Sequenzen aller Primer sind in 5' → 3' Richtung angegeben.

#### 3.5.1 Primer für qPCR:

Alle Primer für die qPCR wurden mit Hilfe des Internet Onlineprogramms „Primer3“ ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) erstellt. Dabei wurden folgende Parameter verwendet:

product size:      min. 80 bp      opt. 87 bp      max. 94 bp

primer tm:          min. 59 °C      opt. 60 °C      max. 61 °C

GC %: 40 – 60 %

max. self complementarity: 6

max. 3' self complementarity: 3

GC Clamp: 1

<b>hoxE_89f:</b>	<b>TTTTGGCTACCTGGAAGAGG</b>	(20 bp)
<b>hoxE_89r:</b>	<b>AAAAAGTCGCCACTCCAAAC</b>	(20 bp)
<b>hoxF_84f:</b>	<b>TTTTGCCCTCACAGGAAAAG</b>	(20 bp)
<b>hoxF_84r:</b>	<b>ATTCCTCCACCACTTGTCG</b>	(20 bp)
<b>hoxU_93f:</b>	<b>CGAAGGCAATCATGTCTGTG</b>	(20 bp)
<b>hoxU_93r:</b>	<b>AATCGGCTGTGATCCATACC</b>	(20 bp)
<b>hoxY_92f:</b>	<b>CGGCTGTCATATGTCCTTCC</b>	(20 bp)
<b>hoxY_92r:</b>	<b>GATCAGAACCAACGGGACTG</b>	(20 bp)
<b>hoxH_88f:</b>	<b>GGACAGTGATCCCGCTACTC</b>	(20 bp)

hoxH_88r:	AAATTGCCGTAACCGAATACC	(21 bp)
sll1222_84f:	CGCTCAACGGAAATGATACC	(20 bp)
sll1222_84r:	TATCCCCCACATGGCAAG	(18 bp)
as-sll1223_100f2:	CCAAACGAATCATGGAGAAG	(20 bp)
as-sll1223_100r2:	TGGCCAAAAACTCCTTTG	(18 bp)
16S_91f:	AAGTCATCATGCCCTTACG	(20 bp)
16S_91r:	ATGGGATTCGCTTACTCTCG	(20 bp)
rnpB_80_f:	TGACCACTGAAAAGGGTAAGG	(21 bp)
rnpB_80_r:	GGGTTTACCGAGCCAGTACC	(20 bp)

### 3.5.2 Primer für Fusion PCR

5sll1223rnpB:	GGCCAATGTCTTTTTTCTAGTGTGCCATTG	(30 bp)
5assll1223rnpB:	CGTGTTTTTTGCTTTTTTCTAGTGTGCCATTG	(31 bp)
5rnpB:	<u>GTCGACTTCAATGCGGTCCAATA</u>	(23 bp)
3rnpBsll1223:	CTAGAAAAAAGACATTGGCCAAAAACTCC	(29 bp)
3rnpBassll1223:	CTAGAAAAAGCAAAAAACACGCCAAACGAATCAT	(34 bp)
3sll1223:	<u>CTGCAGGAATCTTTAGTTTTACCTGG</u>	(26 bp)
term3assll1223:	<u>CTGCAGGGAATAAAAAACGCCCGGCGGCAACCGAGCG</u> TTAGACATTGGCCAAAAACTCCTTG	(62 bp)

Die für die Klonierung eingefügten Restriktionsschnittstellen (siehe Kapitel 4.7.6, Seite 50) sind durch Unterstriche markiert.

### 3.5.3 Sequenzierprimer

pJET1.2 forward:	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	(23 bp)
pJET1.2 reverse:	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	(24 bp)
pVZ321-fwd:	TACCATGCTCAGAAAAGGCTTAAC	(24 bp)
pVZ321-rev:	CCTTGCCATCACGACTGTG	(20 bp)

### 3.6 Plasmide:

#### 3.6.1 pJET1.2

pJet1.2 (siehe Abbildung 3.1) ist ein 2974 bp großer Klonierungsvektor aus dem „CloneJET PCR Cloning Kit“ (ThermoFisher Scientific, Braunschweig, DE). Der Vektor wird linear geliefert. An den Enden, die für blunt-end Klonierungen geeignet sind, befindet sich eine Multi Cloning Site (MCS), um ein Insert wieder herauszuschneiden zu können, sowie das „lethal gene“ *eco47IR*, das nach Ringschluss positive Selektion von Rekombinanten ermöglicht. *rep* ist das für die Replikation in *E. coli* notwendige Replikon aus dem Plasmid pMB1. Der Vektor trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette.

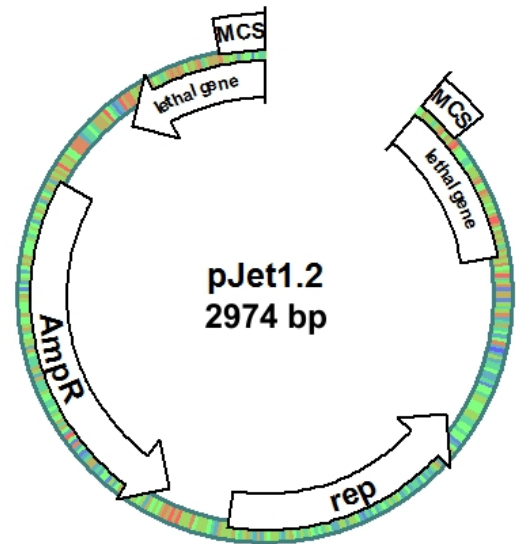


Abbildung 3.1: pJet1.2: Eingezeichnet sind die ORFs sowie die für die Klonierung wichtige Multi Cloning Site (MCS)

#### 3.6.2 pVZ321

Bei dem Plasmid handelt es sich um einen 9231 bp großen, in *E. coli* sowie in *Synechocystis* autonom replizierenden shuttle-Vektor (Zinchenko et al. 1999). Durch diese Eigenschaft ist es möglich, ein in das Plasmid kloniertes Gen zu exprimieren, ohne dass dieses in das bakterielle Genom integriert werden muss. Die Selektion kann auf Kanamycin und / oder auf Chloramphenicol erfolgen. Die in dieser Arbeit verwendeten Schnittstellen *SalI* und *PstI* befinden sich stromauf- bzw. stromabwärts der Chloramphenicol-Resistenzkassette, welche durch Klonierung mit Hilfe dieser Restriktions-schnittstellen herausgeschnitten wird (siehe

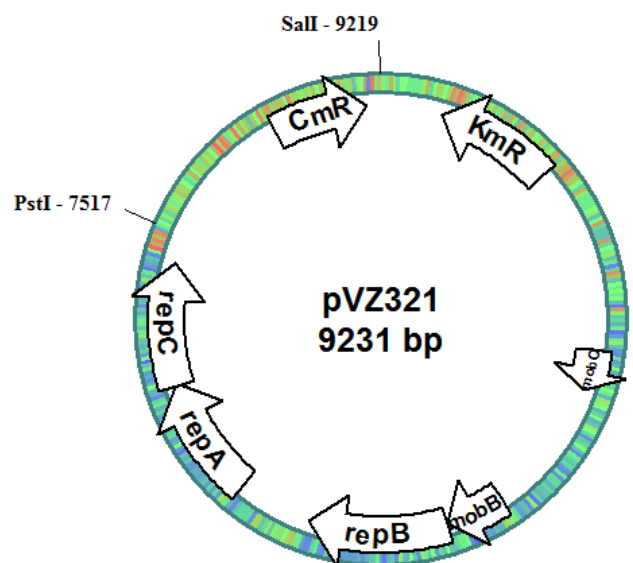


Abbildung 3.2: pVZ321: Eingezeichnet sind die ORFs sowie die zwei für diese Arbeit wichtigen Restriktionsschnittstellen

Abbildung 3.2). Das Plasmid wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Annegret Wilde, Molekulare Genetik, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, zur Verfügung gestellt.

### 3.6.3 pVZas1

Bei dem Plasmid pVZas1 wurde der *rnpB* Promotor sowie die *as-sll1223* Sequenz in der Antisense-RNA Richtung zwischen *PstI* und *SalI* von pVZ321 kloniert. Dadurch verlor das Plasmid seine Chloramphenicol-Resistenzkassette und Selektion ist nur noch über Kanamycin möglich. Der *rnpB* Promotor führt zu einer konstitutiven Expression der *as-sll1223* RNA (siehe Abbildung 5.22, Seite 88).

### 3.6.4 pVZas3

Bei dem Plasmid pVZas3 wurde der *rnpB* Promotor sowie die *as-sll1223* Sequenz in der Anti-Antisense-RNA Richtung (also gedreht im Vergleich zu pVZas1) zwischen *PstI* und *SalI* von pVZ321 kloniert. Der *rnpB* Promotor führt zu einer konstitutiven Expression der *aas-sll1223* RNA.

## 4 Methoden

### 4.1 Kultivierung von *Synechocystis* sp. PCC6803

Die Kultivierung von *Synechocystis* sp. PCC6803 (ab hier *Synechocystis*) erfolgte immer in den unter 3.2 (Seite 28) beschriebenen Medien. Für die Anzucht der Starterkulturen wurde immer BG11, entweder flüssig oder als Agarmedium, verwendet.

#### 4.1.1 Kultivierung auf Agarplatten

Für eine permanente Verfügbarkeit des Wildtyp Stammes sowie der verschiedenen Mutanten wurden die Stämme durchgehend auf Agarplatten kultiviert. Die Kulturen wurden einmal pro Monat auf frische Agarplatten übertragen. Die Kultivierung erfolgte in einer Klimakammer mit Deckenbeleuchtung bei 28 °C, 60 % Luftfeuchtigkeit und einer Lichtintensität (Quantenstromdichte) von ca. 20 bis 32  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

#### 4.1.2 Kultivierung als 50 ml Flüssig-Schüttelkultur

Für die Vorkulturen wurden 50 ml Flüssig-Schüttelkulturen verwendet. Hierzu wurden autoklavierte, mit Aluminiumfolie verschlossene 100 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml BG11 und gegebenenfalls dem/n entsprechendem/n Antibiotikum/Antibiotika befüllt. Das Medium wurde mit einer Impföse mit Bakterien von einer Agarplatte angeimpft. Die angeimpften Kolben kamen vor der Weiterverwendung für mehrere Tage (maximal für eine Woche) auf einen Schüttler (Shaker 3020, GFL, Burgwedel) mit 100 rpm in einer Klimakammer mit 28 °C, 60 % Luftfeuchtigkeit und einer Lichtintensität von ca. 35 bis 40  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

#### 4.1.3 Kultivierung in Kniese Röhren (200 – 250 ml)

Kniese Röhren sind Glasröhren mit einem Durchmesser von 4 cm und einer Möglichkeit zur Begasung von unten. Die Röhren wurden mit im entsprechendem Medium gewaschenen Zellen aus

den Vorkulturen angeimpft und in Kniese Apparaturen (Kniese, Marburg, DE) inkubiert. In den Kniese Apparaturen standen die Röhren in einem 28 °C warmen Wasserbad mit seitlicher Beleuchtung (Lichtintensität je nach Experiment verschieden) und Begasung mit steriler Druckluft.

#### **4.1.4 Lagerung als Gefrierkulturen**

Um die Stämme für lange Zeit zu erhalten, wurden Gefrierkulturen angelegt. Dazu wurde entweder eine 50 ml Flüssig-Schüttelkultur abzentrifugiert und das Pellet in 500 µl BG11 Medium wieder aufgenommen oder es wurden Zellen von einer Agarplatte abgekratzt und in 500 µl BG11 Medium suspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde mit 250 µl 80 % Glycerin (v / v) in einem 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen gemischt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C. Mit dieser Methode sind ausreichend Zellen über mindestens mehrere Jahrzehnte haltbar, um davon frische Kulturen auf Agarplatten anzulegen.

## **4.2 Kultivierung von *Escherichia coli***

### **4.2.1 Flüssigkulturen**

*E. coli* wurde zur Plasmidisolierung entweder als 3 ml Kultur in Anzuchtröhrchen (bei High Copy Plasmiden) oder als 10 ml Kultur in Erlenmeyerkolben (bei Low Copy Plasmiden) angezogen. Die Anzucht erfolgte dabei in LB-Medium (Kapitel 3.3.1, Seite 30) und ständigem Schütteln in einem New Brunswick™ Innova® 44 Inkubationsschüttler (Eppendorf, Hamburg, DE) bei 37 °C und 180 rpm in einem Zeitraum von 12 bis 17 h.

### **4.2.2 Kultivierung auf Agarplatten**

Um *E. coli* auf Agarplatten zu kultivieren, wurden die Platten über Nacht in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau, DE) bei 37 °C inkubiert. Um Platten länger zu lagern, wurden sie mit Nescofilm (Karlan, Phoenix, USA) verschlossen und bei 4 °C bis zu mehreren Monaten lang gelagert.

### 4.2.3 Lagerung als Gefrierkulturen

Für das Anlegen von *E. coli* Gefrierkulturen wurden 500 µl Flüssigkultur (über Nacht gewachsen wie unter 4.2.1 beschrieben) mit 250 µl 80 % Glycerin (v / v) gemischt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert. Mit dieser Methode sind ausreichend Zellen über mindestens mehrere Jahrzehnte haltbar, um davon frische Kulturen auf Agarplatten anzulegen.

## 4.3 Messung des Carotinoidgehaltes in *Synechocystis*

Die Messung des Carotinoidgehaltes in *Synechocystis* wurde in Anlehnung an das Protokoll von T. Zavřel et al. (Zavřel et al. 2015) durchgeführt. Alle Messungen wurden als Triplikate angelegt.

1. Ein Milliliter der Cyanobakterienkultur ( $OD_{750} = 1$ ) wurde in einem 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen bei 14000 rpm (20817 g) für 7 Minuten in einer Eppendorf Zentrifuge 5804 R geerntet und pelletiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig abgenommen.
2. Ein Milliliter Methanol (4 °C) wurde den Zellen hinzugefügt und die Probe wurde durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert.
3. Die Probe wurde für Lichtschutz in Aluminiumfolie gewickelt und für 20 min bei 4 °C zur Pigmentextraktion inkubiert.
4. Die unlöslichen Zellrückstände wurden in der Eppendorfszentrifuge bei 14000 rpm (20817 g) und 4 °C für 7 min pelletiert.
5. Der Überstand wurde daraufhin in eine Glasküvette (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, DE) transferiert und die optischen Dichten bei 470 nm und 720 nm in einem Spektralphotometer (Shimadzu UV-2501 PC, Kyoto, Japan) gemessen. Als Leerreferenz wurde Methanol verwendet.
6. Die Berechnung der Carotinoidkonzentration erfolgte entsprechend dem Protokoll, basierend auf der von A. R. Wellburn (Wellburn 1994) veröffentlichten Formel, abgeändert von Zavřel *et al.* für Organismen, die Chlorophyll *a*, aber keine anderen Chlorophylle beinhalten:

$$\text{Carotinoide } [\mu\text{g} / \text{ml}] = [1000 \cdot (\text{OD}_{470} - \text{OD}_{720}) - 2,86 \cdot (\text{Chl}_a [\mu\text{g} / \text{ml}])] / 221$$

Die hierzu benötigte Chlorophyllkonzentration wurde dem Protokoll entsprechend nach Ritchie (2006) berechnet:

$$\text{Chl}_a [\mu\text{g} / \text{ml}] = 12,9447 \cdot (\text{OD}_{665} - \text{OD}_{720})$$

#### 4.4 Messung des Chlorophyllgehaltes in *Synechocystis*

Die Messung des Chlorophyllgehaltes in *Synechocystis* wurde in Anlehnung an den Artikel von H. K. Lichtenthaler (Lichtenthaler 1987) durchgeführt. Alle Messungen wurden als Triplikate angelegt.

1. Ein Milliliter der Cyanobakteriensuspension ( $\text{OD}_{750}$  nicht über 0,5, ansonsten entsprechend verdünnt) wurde für 10 min bei 14000 rpm (20817 g) in einer Eppendorf Zentrifuge 5804 R geerntet und pelletiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig abgenommen.
2. Ein Milliliter Methanol wurde dem Pellet hinzugefügt. Die Probe wurde dann 3 min gevortext.
3. Die Probe wurde nochmals 10 min bei 14000 rpm (20817 g) zentrifugiert und dann direkt gemessen.
4. Gemessen wurden jeweils die Wellenlängen 750 nm, 665,0 nm, 665,5 nm, 666 nm und 666,5 nm. Als Referenz wurde Methanol bei 750 nm gemessen. 750 nm diente als Streuungskorrektur für in der Probe verbliebene Zellreste. Für die Berechnung wurde jeweils der höchste Wert der Messungen zwischen 665 bis 666,5 nm verwendet:

$$\text{Chl}_a [\mu\text{g}/\text{ml}] = (\text{Maximum der Werte } 665 \text{ bis } 666,5 \text{ nm} - \text{OD}_{750}) / 0,0809$$



## 4.5 Wasserstoff- und Sauerstoffmessungen mittels Unisense Mikrosensoren

Vor Beginn der Messungen wurden die Sensoren (H<sub>2</sub>-500 bzw. O<sub>2</sub>-500 Mikrosensoren, Unisense, Aarhus, DK) mit dem Multimeter (Unisense 4-Channel Microsensor Multimeter) verbunden und mit einer Spannung von +800 mV (H<sub>2</sub>-Sensoren) bzw. -800 mV (O<sub>2</sub>-Sensoren) präpolarisiert. Die Präpolarisation wurde so lange vorgenommen, bis die gemessenen mV der Sensoren über einen Zeitraum von mindestens 30 min konstant waren.

Im Anschluss wurden die Sensoren kalibriert:

Für die Kalibrierung der Sensoren mussten pro Sensor zwei bekannte Konzentrationen des im Medium gelösten Wasser- bzw. Sauerstoffs den von den Sensoren gemessenen mV zugewiesen werden. Das Programm „Unisense Sensor Trace Basic“ (Version 3.2.5), mit dem auch die weiteren Messungen gemacht wurden, legte dann eine Eichgerade durch die Punkte (es wird von einem linearen Verlauf ausgegangen), womit während der Messung die gemessenen mV in  $\mu\text{mol} / \text{l}$  umgerechnet werden. Die Kalibrierung wurde möglichst bei der Temperatur durchgeführt, bei der auch die spätere Messung gemacht wurde.

Kalibrierung der O<sub>2</sub>-Sensoren:

Konzentration 0  $\mu\text{mol O}_2$ : Das Medium wurde so lange mit N<sub>2</sub> begast, bis die gemessenen mV über 3 Minuten konstant waren, dann wurde die Konzentration von 0  $\mu\text{mol} / \text{l O}_2$  den gemessenen mV zugewiesen.

Konzentration gelöster O<sub>2</sub> aus Luft im Medium: Das Medium wurde so lange mit Raumluft begast, bis die gemessenen mV über 3 Minuten konstant waren. Dann wurde die O<sub>2</sub> Konzentration aus der Tabelle „gelöster Luftsauerstoff in wässriger Lösung“ (siehe Tabelle 7.2, Anhang) bei entsprechendem Salzgehalt und Temperatur abgelesen und in der Einheit  $\mu\text{mol} / \text{l}$  den gemessenen mV zugewiesen.

Kalibrierung der H<sub>2</sub>-Sensoren:

Konzentration 0  $\mu\text{mol H}_2$ : Das Medium wurde so lange mit N<sub>2</sub> begast, bis die gemessenen mV über 3 Minuten konstant waren, dann wurde die Konzentration von 0  $\mu\text{mol} / \text{l H}_2$  den gemessenen mV zugewiesen.

Konzentration 10 % gesättigte H<sub>2</sub> Lösung: 30 ml des Mediums wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen für 10 min begast. Das Zentrifugenröhrchen war dabei mit einem

Gummideckel verschlossen, durch den zwei Kanülen geführt wurden. Durch eine langen Kanüle, die mit der H<sub>2</sub> Flasche verbunden war und bis an den Boden des Zentrifugenröhrchens reichte, wurde das Gas eingeleitet; eine kurze Kanüle diente als Gasauslass. Das so mit H<sub>2</sub> gesättigte Medium wurde in einem Becherglas mit 270 ml Medium vereint und kurz mit einem Rührfisch gemischt. Dann wurde die H<sub>2</sub> Konzentration der Tabelle „*Wasserstoffsättigung von Wasser bei verschiedenen Salzgehalten und Temperaturen*“ (siehe Tabelle 7.1, Anhang) bei entsprechendem Salzgehalt und Temperatur abgelesen und in der Einheit  $\mu\text{mol} / \text{l}$  den gemessenen mV zugewiesen.

Messungen:

Für die Messungen wurden die mit 70 % Alkohol gereinigten und mit destilliertem Wasser gespülten Sensoren in Knieseröhren mit Cyanobakteriensuspension gehängt. Die Knieseröhren wurden mit Wattestopfen verschlossen. Dabei wurde das Sensorkabel zwischen Wattestopfen und Glaswand der Röhre nach außen geführt. Es wurde darauf geachtet, dass die Sensoren bei den verschiedenen Messungen gleich tief in die Bakteriensuspension eintauchten.

Die Reinheit der Kulturen wurde täglich mikroskopisch überprüft. Dazu wurde 1 ml Suspension mit einer sterilen Glaspipette entnommen, in einem Mikrozentrifugenröhrchen durch Zentrifugation ankonzentriert und unter dem Mikroskop auf Kontaminationen untersucht.

- Fermentative Messungen:

Die Zellen wurden in einem 12 h hell / 12 h dunkel Rhythmus gehalten. Während der Lichtphase wurden die Zellen mit Raumluft begast. Zu jeder Dunkelphase wurden die Zellen für 15 min mit N<sub>2</sub> im Dunkeln begast, um allen Zellen gleichzeitig eine anaerobe Umgebung zu bieten. Da die Zellen in verschiedenen Medien (besonders in glucosehaltigen bzw. glucosefreien Medien) verschieden stark atmen, wäre ohne N<sub>2</sub> Begasung der Zeitpunkt, zu dem die Medien sauerstofffrei sein würden, sehr unterschiedlich und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse würde durch diese Unterschiede leiden.

Während der Lichtphase wurde alle 300 s ein Messwert gespeichert, während der Dunkelphase alle 60 s.

- Photowasserstoffmessungen:

Vorbereitung der Zellen: Die Zellkulturen wurden in Kniese Röhren 1 Woche bei ca.  $50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  Dauerbeleuchtung zu einer OD<sub>750</sub> von ca. 3 wachsen gelassen. Die OD<sub>750</sub> wurde mit einem Spektralphotometer (Shimadzu UV-2501 PC, Kyoto, Japan) bestimmt und

es wurde berechnet, welches Volumen Zellsuspension notwendig war, um 50 ml Zellsuspension mit einer  $OD_{750}$  von 2 zu erhalten. Die Zellen wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert (Raumtemperatur, 8 min, 9000 rpm bzw. 10324 g, Eppendorf Zentrifuge 5804 R, Rotor F34-6-38), das Pellet einmal mit dem Medium, das für die Messung verwendet werden sollte, gewaschen und dann mit dem entsprechenden Medium auf 50 ml gebracht.

Vor der eigentlichen Messung wurden die Zellen für 15 min im Dunkeln mit  $N_2$  begast und dann ohne Begasung für weitere 45 min im Dunkeln gehalten. Für die Photowasserstoffmessung wurden die Zellen mit einer LED-Lampe (Photon Systems Instruments, SL3500-W-D, Brno, CZ) mit  $1000 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$  beleuchtet. Während der Photowasserstoffmessung wurde alle 0,5 s ein Messwert gespeichert. Als Negativkontrolle wurde zu einer Zellkultur 50  $\mu l$  DCMU (in DMSO 10 mM) 3 min vor Belichtung hinzugegeben.

#### Auswertung:

Die Daten wurden von „Sensor Trace Basic“ im Dateiformat .xls ausgegeben und mit dem Programm „Libre Office Calc“ (Version: 5.0.4.2) ausgewertet. Jeder Messpunkt bestand dabei aus einem Wert für die Gaskonzentration [ $\mu mol / l$ ] und einem dazugehörigen Zeitpunkt [Stunden nach Messbeginn]. Mit diesen Werten konnte die maximale  $H_2$  Produktionsrate [ $\mu mol / l / h / OD_{750}$ ] durch die Steigung der  $H_2$  Kurve sowie die maximale Konzentration an  $H_2$  im Medium [ $\mu mol / l / OD_{750}$ ] berechnet werden.

## 4.6 Wasserstoffmessungen mittels Silber-Platin-Elektrode (Clark-Elektrode)

Zur Bestimmung der Hydrogenaseaktivität wurde die Wasserstoffentwicklung mittels einer Silber-Platin-Elektrode (DW 1 Liquid Clark Electrode; Hansatech Inst., Norfolk, UK) mit einer Polarisationsspannung von -600 mV gemessen. Das Signal der Elektrode wurde dabei über eine Verstärkerbox (Werkstatt Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg, Deutschland) an den Schreiber (SE-120, ABB Goerz, ABB Metrawatt, Nürnberg, Deutschland) weitergeleitet. Die Elektrode war direkt unter dem durch ein Wasserbad auf 30 °C temperierten Reaktionsraum angebracht und mit diesem über eine Teflonmembran (YSI Membrane Kit Standard, Yellow Springs, Ohio, USA) verbunden.

### Kalibrierung:

Zur Kalibrierung der Elektrode wurde das Wasserbad, dessen Wasser den Reaktionsraum umfließt, auf 30 °C erwärmt und darin Wasser in einem Fläschchen temperiert und mit Wasserstoffgas gesättigt. Der Reaktionsraum wurde mit 900 µl Wasser und 100 µl wasserstoffgesättigtem Wasser befüllt und die Ausschlaghöhe des Schreibers notiert. Dieser Schreiberausschlag entsprach einer Wasserstoffkonzentration von 76,2 µmol / l (10 % Sättigung bei 30 °C, siehe Tabelle 7.1, Anhang Seite 145).

### Messung der Hydrogenaseaktivität:

Mit der vorliegenden Methode (verändert nach (Wang et al. 1971)) kann die relative Menge an vorhandener funktionstüchtiger Hydrogenase gemessen werden.

Alle Schritte fanden mit schwacher Beleuchtung mit grünem Licht statt. Es wurden 850 µl der zu testenden Bakteriensuspension in den Reaktionsraum mit drehendem Magnetrührstab pipettiert. Der Reaktionsraum wurde mit einem Stopfen verschlossen und durch eine kleine Öffnung im Stopfen wurde mit Hamilton Spritzen (Hamilton Germany GmbH, Planegg-Martinsried, Deutschland) 50 µl Methylviologen [100 mM] und 100 µl NaS<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [100 mM] zur Suspension hinzugefügt. Hierbei diente Methylviologen als künstlicher Elektronendonator für die Hydrogenase und NaS<sub>2</sub>O<sub>4</sub> als Reduktionsmittel für Methylviologen und den im Medium vorhandenen Sauerstoff.

Die Aktivität der Hydrogenase, die in µmol H<sub>2</sub> / l Zellsuspension ausgedrückt wird, ergibt sich aus der maximalen Steigung der vom Schreiber aufgezeichneten Kurve, dem Ergebnis der Kalibrierung und der Schreiberparameter:

$$\frac{\text{Steigung} \cdot 76,2 \mu\text{mol} \cdot \text{Schreibergeschwindigkeit (cm / min)} \cdot \text{Verdünnung der Suspension}}{\text{Kalibrierungshöhe} \cdot \text{Verstärkung des Schreibers}}$$

### Vorbehandlung der Zellen:

Vor der Messung wurde die Zellsuspension auf eine OD<sub>750</sub> von 2 eingestellt. 9 ml der Zellsuspension wurde in braune Glasfläschchen (10 ml Gesamtvolumen) gefüllt, im Dunkeln 70 µl Glucose [2 M] und 10 µl Enzymmix (40 U Glucose Oxidase, 50 U Katalase) hinzugefügt und das Fläschchen luftdicht verschlossen. Daraufhin wurden die Fläschchen für 17 h im Dunkeln bei 28 °C geschüttelt und danach gemessen.

## 4.7 Herstellung der *Synechocystis* (Antisense-)Mutantenstämme

Im Zuge dieser Arbeit wurden drei Mutantenstämme aus dem *Synechocystis* Wildtyp Stamm erzeugt. Diese wurden AS1, AS2 und WT pVZ321 benannt und sind auf Seite 26 sowie in Tabelle 3.1 (Seite 27) näher beschrieben. Während der Stamm WT pVZ321 das unveränderte Plasmid pVZ321 (Seite 34) trägt und als einzige Herstellungsschritte die Plasmidpräparation (Kapitel 4.7.9, Seite 53) und die Transformation (Kapitel 4.7.13, Seite 56) des Plasmides erfuhr, wurden die Mutanten AS1 und AS2 mit allen in diesem Kapitel 4.7 beschriebenen Methoden hergestellt.

Erst wurde aus *Synechocystis* genomische DNA isoliert (4.7.1). Diese wurde in einer Polymerase Kettenreaktion eingesetzt, um die gewünschten DNA Fragmente zu amplifizieren (4.7.3). Die Fragmente wurden dann per Agarose Gelelektrophorese (4.7.4) und Gelextraktion (4.7.5) aufgereinigt und in einer Fusion PCR (4.7.6) eingesetzt. Die so gewonnen DNA Stücke wurden in den Vektor pJet1.2 ligiert (4.7.7) und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert (4.7.8). Dort wurden die Plasmide von *E. coli* amplifiziert und dann mittels Plasmidpräparation aufgereinigt (4.7.9). Die gewünschten Fragmente wurden mit Restriktionsenzymen aus dem Plasmid geschnitten (4.7.11) und in den Shuttle-Vektor pVZ321 ligiert (4.7.12). Der Vektor wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert, amplifiziert, aufgereinigt und dann in *Synechocystis* transformiert (4.7.13):

### 4.7.1 Präparation cyanobakterieller Gesamt-DNA

Die in dieser Arbeit durchgeführten Schritte zur DNA Präparation basieren auf einer Methode, die für das filamentöse Cyanobakterium *Nostoc* sp. PCC7120 entwickelt (Cai und Wolk 1990) und von Georg Schmetterer für einzellige Cyanobakterien modifiziert wurde (Schmetterer 2008). Die Methode wurde an die Gegebenheiten im Labor angepasst und liefert DNA, bestehend aus chromosomaler sowie Plasmid-DNA:

1. Anzucht einer 50 ml Kultur (wie beschrieben in Kapitel 4.1, Seite 36).
2. Die Kultur wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen transferiert und abzentrifugiert (10 min, 9000 rpm bzw. 10324 g, Eppendorf Zentrifuge 5804 R, Rotor F34-6-38).
3. Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet durch Vortexen im restlichen Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen transferiert, das Röhrchen mit TE-Puffer aufgefüllt und für 10 min bei Raumtemperatur und 14000 rpm (20817 g, Eppendorf Zentrifuge 5804 R, Rotor F45-30-11) abzentrifugiert.

4. Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet durch Vortexen in 400 µl TE-Puffer resuspendiert.
5. Zur Zellsuspension wurden ca. 150 µl Glaskugeln (0,5 mm Durchmesser, Hitze-sterilisiert für min. 2 h bei 180 °C) hinzugefügt.
6. Zugabe von 20 µl 10 % w / v SDS.
7. Zugabe von 450 µl Phenol/Chloroform (1:1, v / v).
8. Die Proben wurden 1 min gevortext, 1 min auf Eis gekühlt und diese Schritte zehnmal wiederholt.
9. Die Probe wurde für 15 min bei 4 °C und 14000 rpm (20817 g, Eppendorf Zentrifuge 5804 R, Rotor F45-30-11) zentrifugiert, der wässrige Überstand wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen transferiert und das alte Röhrchen mit der restlichen Phenolphase entsorgt.
10. Phenol Extraktion: Der Reihe nach wurde die Probe mit
  - Phenol
  - Phenol/Chloroform (1:1, v / v)
  - Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v / v)
  - Chloroformextrahiert. Dabei wurde zum wässrigen Überstand aus dem vorherigen Schritt 400 µl des jeweiligen Extraktionsmittels gegeben, die Phasen durch Vortexen gemischt und die Probe für 3 min bei 4 °C und 14000 rpm (20817 g, Eppendorf Zentrifuge 5804 R, Rotor F45-30-11) zentrifugiert. Der Überstand (bei den ersten zwei Schritten wurde die weiße Interphase, falls vorhanden, mit dem Überstand mitgenommen) wurde nach der Zentrifugation in neue Mikrozentrifugenröhrchen transferiert.
11. Die wässrige Phase wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und mit einem 1/10 Volumen Natrium Acetat (3 M, pH 5,6 – 6,5) gemischt. Ein 2,5 faches Volumen Ethanol (99,8 %, vergällt, -20 °C) wurde hinzugefügt und das Röhrchen vorsichtig mehrmals invertiert. Die Probe wurde für min. 15 min bei -20 °C inkubiert, um möglichst viel DNA ausfallen zu lassen.
12. Die DNA wurde durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 14000 rpm (20817 g, Eppendorf Zentrifuge 5804 R, Rotor F45-30-11) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet einmal mit 20 °C kaltem 70 % Ethanol gewaschen.
13. Der Überstand wurde abdekantiert, die Probe kurz zentrifugiert, der restliche Überstand abpipettiert und das Pellet für 5 min in einem Vakuum Konzentratoren getrocknet.

14. Das Pellet wurde in 50  $\mu\text{l}$  TE-Puffer gelöst und die DNA Konzentration mit einem Nanodrop Spektralphotometer (NanoDrop 2000, ThermoFisher Scientific, Braunschweig, DE) ermittelt (siehe Kapitel 4.7.2).

#### 4.7.2 Bestimmung der Nukleinsäure Konzentration mittels Nanodrop Spektralphotometer

Zur Bestimmung der Nukleinsäure Konzentrationen von Proben wurde ein Nanodrop Spektralphotometer (NanoDrop 2000, ThermoFisher Scientific, Braunschweig, DE) verwendet. 2,5  $\mu\text{l}$  der Probe wurden auf den Probenträger des Geräts pipettiert, die Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum von RNA und DNA) gemessen und mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes in eine Konzentrationsangabe ( $\text{ng} / \mu\text{l}$ ) umgerechnet. Zur Bestimmung der Reinheit wurde zusätzlich das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm zu 280 nm (Absorption durch Proteine und Phenol) sowie bei 260 nm zu 230 nm (Absorption durch Phenol, EDTA und Kohlenhydraten) ermittelt. Bei Verhältnissen zwischen 1,8 und 2,2 wurde die Probe als „rein“ angesehen und weiter verarbeitet.

#### 4.7.3 Polymerase Kettenreaktion

In diesem ersten PCR Schritt wurden die Fragmente „*rnpB*-Promoter“, „*as-sll1223*“ und „*aas-sll1223*“ mit den entsprechenden Primern (siehe Abbildung 4.1, Seite 50 bzw. Primersequenzen in Kapitel 3.5.2, Seite 33) amplifiziert. Bei dieser PCR wurden die Restriktionsschnittstellen (in der Primersequenz mit Unterstrichen markiert) für die Klonierung, sowie die Überhänge für die Fusion PCR mittels der Primer hinzugefügt. Für die Reaktion wurde die „*Pfu* DNA Polymerase, recombinant“ von Fermentas (jetzt ThermoFisher Scientific, Braunschweig, DE) verwendet. Jede Reaktion wurde wie folgend in 0,2 ml PCR-Tubes in 50  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen angesetzt:

gDNA:	10	ng
Primer forward:	5	$\mu\text{l}$ ( $\triangleq$ 25 pmol)
Primer reverse:	5	$\mu\text{l}$ ( $\triangleq$ 25 pmol)
10x <i>Pfu</i> Buffer:	5	$\mu\text{l}$
dNTPs:	4	$\mu\text{l}$ ( $\triangleq$ 10 pmol)
<i>Pfu</i> -Polymerase:	0,5	$\mu\text{l}$ ( $\triangleq$ 1,25 U)
H <sub>2</sub> O:	ad 50	$\mu\text{l}$

Die PCR-Tubes wurden für die Polymerase Kettenreaktion in einen Thermocycler (DNA Engine, Peltier Thermal Cycler PTC-200, BIO RAD, München, DE) mit folgenden Einstellungen gegeben:

		5 min	94 °C
30 Zyklen	Denaturierung	30 s	94 °C
	Annealing	40 s	57 °C
	Elongation	60 s	72 °C
		10 min	72 °C
		∞	04 °C

#### 4.7.4 Agarose Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA (für spätere Gelelution, präparative Gele) oder für analytische Zwecke wurde die Agarose Gelelektrophorese durchgeführt.

Die Gelelektrophorese lässt sich in drei Schritte gliedern:

##### Herstellung des Agarose Gels

Agarose ist ein Polysaccharid, das bei 90-95 °C schmilzt und bei 30-45 °C geliert. Die Temperaturen sind abhängig von der Agarose Konzentration, die wiederum die Effizienz der Auftrennung bestimmt (Sambrook und Russel 2001). So wurde entsprechend der Literaturangabe für DNA Stücke zwischen 80 bp und 500 bp eine Konzentration von 2.0 % w / w und für Stücke darüber eine Konzentration von 0.8 % w / w gewählt.

Die entsprechende Menge Agarose (LE Agarose, Biozym, Hessisch Oldendorf, DE) wurde in einen Kolben eingewogen und 150 ml TBE-Puffer (Kapitel 3.4, Seite 31) hinzugefügt. Die Mischung wurde in einem Mikrowellenherd so lange unter gelegentlichem Schwenken erhitzt, bis die Agarose geschmolzen war. Unter andauerndem Schwenken wurde unter dem Abzug 15 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg / ml) hinzugefügt (Endkonzentration von 0,001 mg / ml). Dann wurde die flüssige Agarose in einen an den Enden abgedichteten Gelschlitten mit einem eingesetzten Kamm gegossen und so lange abkühlen gelassen, bis das Gel fest war.



## **Beladen des Gels und Start der Auftrennung**

Der Gelschlitten wurde in die Gelkammer (Biometra, Göttingen, DE) gespannt und mit TBE-Puffer überlagert, so dass der Puffer das Gel ca. 1-2 mm bedeckte. Der Kamm wurde vorsichtig entfernt.

Die Proben wurden mit 10x Ladepuffer (Kapitel 3.4, Seite 31) versetzt und in die durch den Gelkamm entstandenen Taschen geladen. Bei jedem Gel wurde außerdem als Positivkontrolle, sowie zur Abschätzung der Länge der DNA Stücke mindestens ein DNA-Marker (z.B. Lambda DNA *Hind*III Marker, ThermoFisher Scientific, Braunschweig, DE) oder eine DNA-Ladder (z.B. GeneRuler 100bp Ladder, ThermoFisher Scientific, Braunschweig, DE) aufgetragen.

Für die Auftrennung wurde die Gelkammer geschlossen und mit Hilfe einer Spannungsquelle (High Voltage Pack P30, Biometra, Göttingen, DE) eine Spannung von 180 V (entspricht 7,7 V / cm) angelegt. Die Auftrennung wurde mindestens 20 min oder maximal, bis die Bromphenolblau-Front kurz vor dem Ende des Gels angelangt war, durchgeführt.

## **Auswertung bzw. Ausschneiden der DNA**

Um die DNA sichtbar zu machen, wurde das Gel auf einen UV-Transilluminator (TF 20 M Vilber Lourmat, Torcy, FR) gelegt und mit UV-Licht (Emissionsmaximum bei 312 nm) von unten bestrahlt. Das Gel wurde für analytische Zwecke photographiert (Alpha Imager 2200, Biozym, Hessisch Oldendorf, DE). Für präparative Zwecke wurden Gelstücke mit DNA Banden aus dem Gel geschnitten. Um die DNA möglichst wenig mit UV-Licht in Berührung zu bringen, wurde das Gel so weit an den Rand des UV-Transilluminators gelegt, dass gerade so viel UV-Licht das Gel beleuchtete, dass die Fluoreszenz des Ethidiumbromids noch sichtbar war. Die Banden wurden mit einem mit 70 % Ethanol und destilliertem Wasser gereinigten Skalpell möglichst genau ausgeschnitten.

### **4.7.5 DNA-Gelextraktion**

Durch DNA-Gelextraktion und die vorgeschaltete DNA auftrennende Gelelektrophorese (Kapitel 4.7.4) ist es möglich, eine von DNA Stücken anderer Größe freie DNA zu erhalten. Für die Gelextraktion wurde das „High Pure PCR Product Purification Kit“ von Roche (Basel, CH)

verwendet. Für die Durchführung wurde das zugehörige Protokoll mit wenigen Modifikationen befolgt:

- Das aus dem Gel ausgeschnittene Stück wurde in ein gewogenes 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen transferiert und das Gewicht des Gelstücks bestimmt.
- Pro 100 mg Gel wurden 300 µl Binding Buffer hinzugefügt.
- Das Gel wurde so lange mit zwischenzeitlichem Vortexen bei 56 °C inkubiert, bis kein Gelstück mehr sichtbar war. Dann wurden 150 µl Isopropanol pro 100 mg Gel hinzugefügt und noch einmal gevortext.
- Die im Kit enthaltenen Silica-Membran-Säulchen (High Pure Filter Tube) wurden in die Auffangröhrchen (Collection Tube) gesteckt und max. 700 µl Probe auf die Silica-Membran pipettiert. Die Röhrchen wurden daraufhin für 60 s bei Raumtemperatur und 13200 rpm (16100 g, Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D, Rotor F45-24-11, wie auch die folgenden Zentrifugationsschritte) zentrifugiert, die Flüssigkeit im Auffangröhrchen wurde verworfen und der Schritt eventuell wiederholt, bis die Probe verbraucht war. Dieser Schritt diente der Bindung der DNA an die Silica-Membran.
- 500 µl Wash Buffer wurden auf das Säulchen geladen und dieses im Auffangröhrchen steckend für 60 s bei Raumtemperatur und 13200 rpm zentrifugiert. Die Flüssigkeit im Auffangröhrchen wurde verworfen. Dieser Waschschrift wurde nochmals mit 200 µl Wash Buffer wiederholt.
- Für die DNA-Elution wurden das Silica-Membran-Säulchen in ein frisches Mikrozentrifugenröhrchen gesteckt und 20 µl Elution Buffer direkt auf die Membran pipettiert. Die Probe wurde für 3 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann für 1 min bei 13200 rpm abzentrifugiert. Die DNA Lösung im Mikrozentrifugenröhrchen wurde bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert.

#### 4.7.6 Fusion PCR

Mit Hilfe der Fusion PCR können zwei Fragmente mit überlappenden Enden zusammengefügt werden und in einem einzigen Klonierungsschritt in ein Plasmid eingefügt werden. In diesen Experimenten bestand die Überlappung jeweils aus den ersten 20 bp der Sequenz der *as-sll1223* bzw. *aas-sll1223* DNA. Die 20 bp wurden bei der vorhergegangenen PCR durch die verwendeten Primer der *rnpB*-Promoter-Sequenz angefügt (Kapitel 4.7.3, Seite 46). Für die Folgeklonierung in pVZ321 wurden die Schnittstellen *Sall* und *PstI* mit überhängenden Primern eingefügt. Die Sequenzen der Primer sind in Kapitel 3.5.2, Seite 33 beschrieben. Eine Übersicht der Fusion findet sich in Abbildung 4.1.

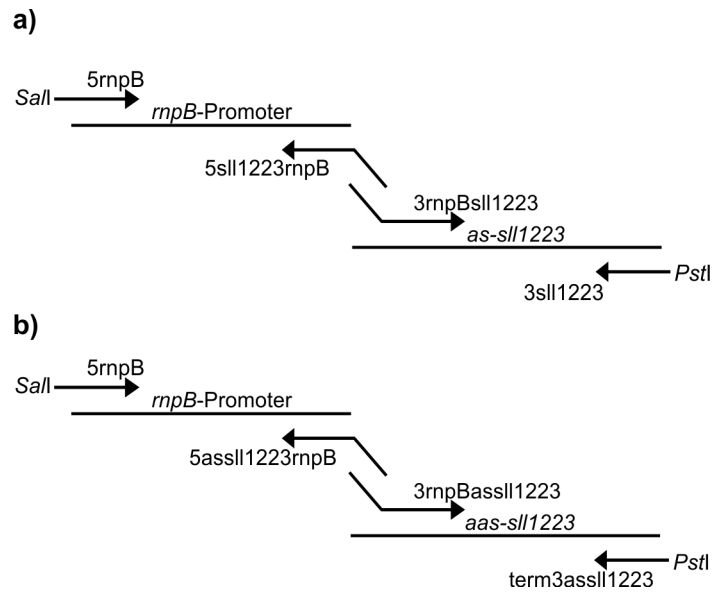


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Fusion-PCR. Eingezeichnet und beschriftet sind die zu amplifizierenden Fragmente, die Primer sowie die für die Folgeklonierung benötigten Restriktionschnittstellen. a) Fusion für die Mutante AS1 b) Fusion für die Mutante AS3

Für die Fusion PCR wurden gleiche molare Mengen an DNA Fragmenten verwendet. Die absolute Menge an DNA wurde durch Nanodrop Messung (siehe Kapitel 4.7.2, Seite 46) bestimmt; auf die molare Menge konnte daraufhin durch Kenntnis der Länge der Fragmente geschlossen werden. Da in der Fusion PCR die überlappenden Enden der Fragmente die Funktion der Primer übernehmen, wurden in dem Reaktionsansatz keine Primer verwendet:

Jede Reaktion wurde wie folgend in 0,2 ml PCR-Tubes in 50  $\mu$ l Gesamtvolumen angesetzt:

Fragment 1 + Fragment 2:	äquimolare Mengen, zusammen $\approx$ 100 ng
10x <i>Pfu</i> Buffer:	5 $\mu$ l
dNTPs:	10 pmol
<i>Pfu</i> -Polymerase:	0,5 $\mu$ l ( $\hat{=}$ 1,25 U)
H <sub>2</sub> O:	ad 50 $\mu$ l

Die PCR-Tubes wurden für die Fusion PCR in einen Thermocycler (DNA Engine, Peltier Thermal Cycler PTC-200, BIO RAD, München, DE) mit folgenden Einstellungen gegeben:

		5 min	95 °C
40 Zyklen	Denaturierung	30 s	95 °C
	Annealing	60 s	53 °C
	Elongation	60 s	72 °C
		10 min	72 °C
		∞	04 °C

Nach der Fusion PCR wurde direkt eine weitere PCR zur Amplifizierung der fusionierten Fragmente nachgeschaltet, um diese sicher in ausreichender Menge für die nachfolgende Ligation vorhanden zu haben. Die PCR wurde mit 25 pmol der am Fusionsprodukt außen liegenden Primern (siehe Abbildung 4.1, Seite 50), 1 µl der Probe aus dem Fusion PCR Schritt und ansonsten mit gleichen Parametern (Mengen, Ingredienzien sowie PCR-Cycler Programmierung) wie die Fusion PCR durchgeführt. Die Amplifikation des gewünschten Fusionsprodukt wurde mittels Agarose Gel Elektrophorese kontrolliert.

#### 4.7.7 Ligation in pJet1.2

Die in der vorherigen PCR amplifizierte DNA konnte direkt in den für blunt-end Klonierungen geeigneten Vektor pJet1.2 ligiert werden, da die für die PCR verwendete *Pfu*-Polymerase blunt-end Amplifikate erzeugt. Zur Klonierung wurde das „CloneJET PCR Cloning Kit“ von Fermentas (jetzt ThermoFisher Scientific, Braunschweig, DE) verwendet. Die weiteren Arbeitsschritte wurden entsprechend der dem Kit beiliegenden Herstellerangaben durchgeführt:

Die Reaktion wurde auf Eis wie folgend in 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen in 20 µl Gesamtvolumen angesetzt:

PCR Produkt	1	µl (bzw. ≈ 0,15 pmol)
2x Reaction Buffer	10	µl
pJet1.2	1	µl ( ≈ 0,05 pmol)
T4 DNA Ligase	1	µl ( ≈ 5 Weiss Units)
H <sub>2</sub> O (aus dem Kit)	7	µl

Der Ansatz wurde kurz gevortext, für wenige Sekunden an zentrifugiert und für 5 min bei 22 °C inkubiert.

Dass der Weg über das Plasmid pJet1.2 gewählt wurde und nicht direkt in pVZ321 kloniert wurde, hatte den Grund, dass der für die Klonierung bestimmte Locus zwischen den Schnittstellen *SalI* und *PstI* gelegen war. Zwar hatten die Fragmente an ihren Enden auch diese durch Primer eingeführten Schnittstellen, was es theoretisch möglich machen würde, die Fragmente wie auch pVZ321 mit *SalI* und *PstI* zu schneiden und so die Fragmente direkt in pVZ321 zu ligieren. Praktisch ist dies aber nicht geglückt, da Restriktionsendonukleasen am Ende von DNA Stücken nur schlecht bis gar nicht schneiden.

Der Ligationsmix wurde daraufhin sofort für die Transformation verwendet.

#### **4.7.8 Transformation in *E. coli***

Die Transformation wurde mit dem Ligationsmix (siehe Kapitel 4.7.7 „Ligation in pJet1.2“ bzw. 4.7.12 „Ligation in pVZ321“) und kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen (siehe Kapitel 3.1.2, Seite 28) durchgeführt. Dazu wurde die Hitzeschock Methode verwendet:

- Die Zellen (100  $\mu$ l) wurden auf Eis aufgetaut, dann wurde 5  $\mu$ l Ligationsmix hinzugefügt und der Ligationsmix mit der Zellsuspension durch Rühren mit der Pipettenspitze vermischt.
- Die Zellen und der Ligationsmix wurden 30 min auf Eis stehen gelassen.
- Die Mikrozentrifugenröhrchen mit den Zellen wurden für 90 s in einen auf 42 °C vorgeheizten Wärmeblock gegeben (Hitzeschock-Transformation) und dann sofort wieder für 2 min auf Eis gestellt.
- Den Zellen wurde 900  $\mu$ l LB-Medium zugefügt. Dann wurden die Röhrchen mit den Zellen für 1 h bei 37 °C und 180 rpm in einem Inkubationsschüttler (Innova 44, New Brunswick, Eppendorf, Hamburg, DE) inkubiert.
- Die Zellen wurden dann in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum (Ampicillin (100  $\mu$ g / ml) bei Transformation mit pJet1.2 bzw. Kanamycin (50  $\mu$ g / ml) bei Transformation mit pVZ321) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen (Wärmeschrank, Heraeus, Hanau, DE). Bei den mit pJet1.2 + Insert transformierten Zellen sollten theoretisch alle auf den Platten wachsende Kolonien ein

Insert im Plasmid besitzen, da mit Ringschluss ohne Insert das letale Gen *eco47IR* aktiv werden sollte. Bei den mit pVZ321 + Insert transformierten Zellen sollten ebenfalls theoretisch alle wachsenden Kolonien das gewünschte Insert besitzen, da das Plasmid vorher mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten wurde, was keinen Ringschluss zulassen sollte, dieser aber für die Replikation des Plasmids und somit für die Ausbildung der Kanamycinresistenz notwendig ist.

- Es wurden 5 Einzelzellkolonien gepickt und Anzuchttröhrchen mit 5 ml LB Medium und Ampicillin (100 µg / ml) angeimpft. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm in einem Inkubationsschüttler (Innova 44, New Brunswick, Eppendorf, Hamburg, DE) inkubiert.
- Von der Zellsuspension wurden 500 µl für die Präparation einer Gefrierkultur (Kapitel 4.2.3, Seite 38) verwendet. Aus 3 ml wurden Plasmide präpariert.

#### 4.7.9 Plasmidpräparation

Für die Plasmidpräparation wurde das „Plasmid DNA Purification“ Kit von MACHEREY-NAGEL (Düren, DE) verwendet. Die hier beschriebenen Arbeitsschritte, die bis auf wenige Änderungen dem im Kit enthaltenen Protokoll entsprechen, wurden für die Präparation des pJet1.2 Vektors mit Insert durchgeführt. Für die Präparation des low copy Plasmids pVZ321 (mit bzw. ohne Insert) wurde das gleiche Protokoll verwendet, es wurden aber insgesamt 10 ml Zellsuspension verwendet und das Volumen der Puffer A1, A2 und A3 wurde verdoppelt.

- 3 ml *E. coli* Zellsuspension wurden in 2 Zentrifugationsschritten (13200 rpm / 16100 g, Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D, Rotor F45-24-11, wie auch die folgenden Zentrifugationsschritte) à 60 s in einem 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen pelletiert.
- Das Pellet wurde durch Vortexen in 250 µl Puffer A1 (4 °C) aufgenommen.
- Es wurden 250 µl Puffer A2 hinzugefügt und mit dem restlichen Inhalt durch achtmaliges Invertieren vermischt. Die Probe wurde darauf 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Es wurden 300 µl Puffer A3 hinzugefügt und mit dem restlichen Inhalt durch achtmaliges Invertieren vermischt. Darauf wurde die Probe für 15 min bei 16100 g zentrifugiert.
- Die im Kit enthaltene „NucleoSpin® Plasmid column“ (Silica Membran Säulchen) wurde in das „Collecting Tube“ gesteckt und der Überstand wurde in das Säulchen pipettiert. Das mit

dem Auffangröhrchen verbundene Säulchen wurde dann für 1 min bei 11200 rpm (11500 g) zentrifugiert und darauf der Durchfluss im Auffangröhrchen verworfen.

- Im folgenden Waschschrift wurde erst 500 µl Puffer AW (50 °C) in das mit dem Auffangröhrchen verbundene Säulchen pipettiert, 1 min bei 11200 rpm (11500 g) zentrifugiert, der Durchfluss verworfen, dann 600 µl Puffer A4 in das Säulchen pipettiert, 1 min bei 11200 rpm (11500 g) zentrifugiert und der Durchfluss wiederum verworfen.
- Um die Membran zu trocknen, wurde das Säulchen im Auffangröhrchen für 2 min bei 11200 rpm (11500 g) zentrifugiert.
- Das Säulchen wurde in ein steriles 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen gesteckt, 50 µl Puffer AE (70 °C) wurde direkt auf die Silica Membran pipettiert und die Probe für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf wurde das Säulchen im Mikrozentrifugenröhrchen für 1 min bei 11200 rpm (11500 g) zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt die aufgereinigte Plasmid DNA.

Die aufgereinigten Plasmide wurden daraufhin auf die richtige Sequenz des Inserts kontrolliert (4.7.10). Die pJet1.2 Vektoren mit Insert wurden dann, als Vorbereitung für die Ligation in pVZ321, einem Restriktionsverdau unterzogen (4.7.11); die pVZ321 Vektoren mit Insert (pVZas1 bzw. pVZas3) wurden in *Synechocystis* transformiert (4.7.13).

#### **4.7.10 Kontrolle auf Richtigkeit des Inserts (Sequenzierung)**

Die Sequenzierung der DNA erfolgte durch das Institut für klinische Molekularbiologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein mit der Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1977). Für die Sequenzierungen wurden die präparierten Plasmide (Kapitel 4.7.9) mit den entsprechenden Sequenzierprimern (Kapitel 3.5.3, Seite 33) in 0,2 ml PCR Tubes oder 96-Well Mikroplatten gemischt und zur Sequenzierung abgegeben. Die Mengen und Konzentrationen waren dabei: 3µl Plasmid (ca. 100 ng); 1 µl je Primer [4,8 µM]. Falls die Plasmid-DNA zu wenig konzentriert war, wurde sie mit Hilfe eines Vakuum Konzentrators entsprechend eingedampft.

Die Ergebnisse wurden als \*.ab1 Sequenz-Chromatogramm Dateien zurück geschickt und dann mit dem Sequenzprogramm „Chromas lite 2.1.1“ (Chromas Lite Technelysium Pty Ltd, Australia) ausgewertet und im FASTA Format exportiert. So konnte kontrolliert werden, ob die Plasmide ein Insert trugen und wenn ja, ob es das gewünschte Insert war und dieses fehlerfrei war.

#### 4.7.11 Restriktionsverdau

Um die in *E. coli* DH5 $\alpha$  im Plasmid pJet1.2 vermehrten Fragmente in den Shuttle Vektor pVZ321 zu klonieren, mussten mit den gleichen Restriktionsenzymen die Fragmente aus pJet1.2 geschnitten und der Vektor pVZ321 geöffnet werden. Hierzu wurden die Enzyme *SalI* und *PstI* (ThermoFisher Scientific, Braunschweig, DE) verwendet. Die entsprechenden Schnittstellen finden sich in pVZ321 stromaufwärts und stromabwärts der Chloramphenicol-Resistenzkassette (siehe Abbildung 3.2, Seite 34); bei den Fragmenten wurden sie während der PCR (Kapitel 4.7.3, Seite 46) mit Hilfe der Primer (Kapitel 3.5.2, Seite 33; Schnittstellen sind durch Unterstriche markiert) eingebracht. Da die zwei verwendeten Restriktionsenzyme *SalI* und *PstI* beide gut im Buffer O (ThermoFisher Scientific, Braunschweig, DE) funktionieren, wurde die Restriktion seriell ohne zwischenzeitiges Umpuffern durchgeführt:

Plasmid DNA	1	$\mu\text{g}$ (in max. 16 $\mu\text{l}$ )
10X Buffer O	2	$\mu\text{l}$
<i>SalI</i>	1	$\mu\text{l}$ ( $\cong$ 10 U)
H <sub>2</sub> O	ad 19	$\mu\text{l}$

Der Ansatz wurde in einem 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen zusammen pipettiert und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach Zugabe von

<i>PstI</i>	1	$\mu\text{l}$ ( $\cong$ 10 U)
-------------	---	-------------------------------

und nochmalige Inkubation für 2 h bei 37 °C. Die restriktionsverdaute DNA wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, die Banden mit richtiger Größe wurden nach der Elektrophorese aus dem Gel geschnitten und die DNA wurde aus dem Gel eluiert (Kapitel 4.7.4 und 4.7.5, Seite 47 ff.). Die Konzentration der durch Gelelution gereinigten DNA wurde per Nanodrop Spektralphotometer (NanoDrop 2000, ThermoFisher Scientific, Braunschweig, DE) bestimmt (siehe Kapitel 4.7.2, Seite 46).

#### 4.7.12 Ligation in pVZ321

Für die Ligation in pVZ321 wurde die T4 Ligase (ThermoFisher Scientific, Braunschweig, DE) verwendet. Der Vektor pVZ321 (siehe Kapitel 3.6.2, Seite 34) wurde vorher aus einer Über-Nacht-Kultur *E. coli* präpariert (siehe Kapitel 4.2.1, Seite 37 für Anzucht von *E. coli*, bzw. Kapitel 4.7.9,



Seite 53 für Plasmidpräparation). Es wurde darauf geachtet, dass Insert und Plasmid in einem molaren Verhältnis von ungefähr 3 : 1 zueinander standen.

Es wurde dabei folgender Reaktionsansatz verwendet:

pVZ321	85	ng
Insert	15	ng
10X T4 Buffer	2,0	µl
T4 Ligase	1,0	µl ( $\approx$ 5 Weiss Units)
H <sub>2</sub> O	ad 20,0	µl

Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert.

#### 4.7.13 Transformation in *Synechocystis*

Vor der Transformation in *Synechocystis* wurden die Plasmide pVZ321 + Insert zur Vermehrung und Verifikation des Tragens des gewünschten Inserts in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert (siehe Kapitel 4.7.8, Seite 52), präpariert (siehe Kapitel 4.7.9, Seite 53) und sequenziert (siehe Kapitel 4.7.10, Seite 54).

*Synechocystis* ist natürlich kompetent für Transformationen. Die Transformation wurde entsprechend dem Protokoll „Transformation von *Synechocystis* sp. PCC 6803“ (Schmetterer 2008) mit wenigen Anpassungen an die Gegebenheiten durchgeführt:

- 1,5 ml einer *Synechocystis* Flüssig-Schüttelkultur (50 ml Kultur im Erlenmeyerkolben, siehe Kapitel 4.1.2, Seite 36) in der exponentiellen Wachstumsphase wurden steril entnommen und in ein autoklaviertes 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen transferiert. Die Zellen wurden für 10 min bei Raumtemperatur und 13200 rpm (16100 g, Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D, Rotor F45-24-11, wie auch die folgenden Zentrifugationsschritte) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen durch Vortexen in 1 ml BG11 resuspendiert.
- 100 µl dieser Suspension wurden entnommen, um in einer 1 : 10 Verdünnung die optische Dichte bei 750 nm (OD<sub>750</sub>) zu messen. Die ursprüngliche Zellsuspension wurde daraufhin so verdünnt (mit BG11) oder ankonzentriert (in einem weiteren Zentrifugationsschritt), dass sie auf eine OD<sub>750</sub> von 2,5 gebracht wurde.
- Pro Transformationsansatz wurden 150 µl Zellsuspension in ein steriles 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1 - 2 µl (ca. 0,5 – 1 µg) der Plasmid-DNA vermischt.

- Die Zellen wurden daraufhin im Dauerlicht (ca.  $30 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) im liegenden Zentrifugenröhrchen ohne Schütteln für 20 h inkubiert.
- Nach 20 h wurden die Zellen, die sich über Nacht abgesetzt hatten, durch Vortexen resuspendiert und 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension mit einem Drigalski Spatel auf einem autoklavierten, auf einer Agarplatte ohne Antibiotika liegendem Nitrocellulosefilter ausplattiert.
- Die Agarplatte wurde für zwei Tage in der Klimakammer unter normalen Kulturbedingungen (siehe Kapitel 4.1.1, Seite 36) inkubiert. Das Filter wurde mit einer sterilisierten Pinzette auf eine Agarplatte mit Kanamycin (50  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) transferiert und weiter in der Klimakammer inkubiert. Nach ca. 1 Woche waren Einzelzellkolonien sichtbar.

Es wurden Einzelzellkolonien gepickt und zur höheren Zellausbeute auf eigene Agarplatten mit Kanamycin ausgestrichen. Als die Zellen angewachsen waren, wurden mit ihnen 50 ml Flüssigkulturen angelegt. Von den Flüssigkulturen wurde ein Teil zu Gefrierkulturen weiterverarbeitet (siehe Kapitel 4.1.4, Seite 37), der Rest wurde für eine Gesamt DNA Präparation (siehe Kapitel 4.7.1, Seite 44) verwendet. Mit der Gesamt DNA wurde *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert (siehe Kapitel 4.7.8, Seite 52). Mit LB-Agarplatten mit Kanamycin (50  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) konnte auf die Anwesenheit des Plasmids pVZ321 bzw. dessen Derivaten selektiert werden. Die Plasmide wurden aus *E. coli* DH5 $\alpha$  präpariert (siehe Kapitel 4.7.9, Seite 53) und sequenziert (siehe Kapitel 4.7.10, Seite 54) um letztendlich zu verifizieren, dass die als Gefrierkulturen gelagerten und für die weiteren Experimente verwendeten *Synechocystis* Stämme das gewünschte Plasmid tragen.

## 4.8 RNA Extraktion aus *Synechocystis* PCC 6803 bis Quantitative Real Time PCR

### 4.8.1 RNA Extraktion aus *Synechocystis* PCC 6803

1. Zur Zellernte wurden 250 ml Zentrifugenbecher bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  vorgekühlt. In die leeren Zentrifugenbecher wurden 40 ml autoklaviertes  $\text{H}_2\text{O}$ , das in 50 ml Zentrifugenröhrchen eingefroren war, zugefügt. Zu den festgelegten Zeitpunkten wurden die Zellen in die Zentrifugenbecher überführt und für 5 min bei  $2 \text{ }^\circ\text{C}$  und 10000 rpm (15344 g, Beckman Coulter – Avanti J-26 XP, Rotor JA-14) pelletiert. Der Überstand wurde abdekantiert und die Zellen in einem Volumen von

maximal 2 ml Überstand aufgenommen und in ein 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden abermals pelletiert (2 min bei 2 °C und 14000 rpm, 20817 g, Eppendorf Zentrifuge 5804 R, Rotor F45-30-11), der Überstand verworfen und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Bis zu den weiteren Extraktionsschritten wurden die Zellen bei -80 °C gelagert.

2. Ein vierfaches Volumen (in Relation zum Zellpellet) an Glaskugeln (0,5 mm; min. 8 h bei 180 °C sterilisiert) sowie ein vierfaches Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) wurden in ein 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen gefüllt und auf Eis gestellt.

3. Die Zellen wurden in einem vierfachen Volumen Break Buffer (siehe Seite 31) aufgetaut und resuspendiert. Diese Suspension wurde in das Mikrozentrifugenröhrchen mit Glaskugeln und Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol überführt und weiterhin auf Eis gehalten.

4. Im Kühlraum (6 °C) wurden die Zellen zehnmal für eine Minute gevortext, mit Pausen auf Eis von mindestens einer Minute. Danach wurden die Zellen für 3 min bei 2 °C und 14000 rpm zentrifugiert.

5. Die wässrige obere Phase mit den Nukleinsäuren wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und dabei das Volumen gemessen. Dasselbe Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol wurde hinzugefügt, das Röhrchen gevortext und dann für 3 min bei 2 °C und 14000 rpm (20817 g, Eppendorf Zentrifuge 5804 R, Rotor F45-30-11) zentrifugiert. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis keine weiße Interphase mehr sichtbar war, mindestens jedoch dreimal.

6. Die wässrige obere Phase wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt, das Volumen gemessen und dasselbe Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24 : 1) hinzugefügt. Das Röhrchen wurde gevortext, geschüttelt und dann für 2 min bei 2 °C und 14000 rpm (20817 g, Eppendorf Zentrifuge 5804 R, Rotor F45-30-11) zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt.

7. Die wässrige Phase wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und mit einem 1 / 10 Volumen Natrium Acetat (3 M, pH 5,6 – 6,5) gemischt. Ein 2,5 faches Volumen Ethanol (99,8 %, vergällt, -20 °C) wurde hinzugefügt und das Röhrchen vorsichtig mehrmals invertiert. Die Probe wurde daraufhin für mindestens eine Stunde bei -20 °C inkubiert, meistens jedoch über Nacht.

8. Die Probe wurde für 10 min bei -9 °C und 14000 rpm (20817 g, Eppendorf Zentrifuge 5804 R, Rotor F45-30-11) pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet einmal mit -20 °C kaltem 70 % Ethanol gewaschen.
9. Das Pellet wurde möglichst kurz in einem Vakuum Konzentrator getrocknet, bis keine Flüssigkeit mehr sichtbar und kein Alkoholgeruch mehr wahrnehmbar war. Dann wurde das Pellet in 200 µl TE-Puffer (siehe Seite 31) gelöst.
10. Die Probe wurde mit 200 µl wässriger LiCl-Lösung (5 M) gemischt und bei -20 °C für mindestens 1,5 h inkubiert. Alle 15 bis 20 min wurde das Röhrchen geschüttelt, um Einfrieren der Probe zu verhindern.
11. Die in LiCl ausgefallenen Bestandteile wurden für 30 min bei -9 °C und 14000 rpm (20817 g, Eppendorf Zentrifuge 5804 R, Rotor F45-30-11) pelletiert und der Überstand verworfen.
12. Das Pellet wurde in 200 µl TE-Puffer gelöst und die Schritte 10 und 11 einmal wiederholt.
13. Das Pellet wurde in einem möglichst kleinem Volumen (20 – 50 µl) nukleasefreiem Wasser (BioScience-Grade, Nuklease-frei, autoklaviert, DEPC-behandeltes Wasser; Roth, Karlsruhe, DE) gelöst und die Qualität der RNA mittels eines denaturierenden Agarose Gels kontrolliert. Die Qualität der RNA wurde als ausreichend betrachtet, wenn die drei Banden der ribosomalen RNA (23S rRNA, 16S rRNA und 5S rRNA) deutlich sichtbar waren. Entweder wurde die RNA dann gleich weiter verarbeitet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

#### **4.8.2 Denaturierendes Agarosegel**

Denaturierende Agarosegele werden zur Auftrennung und Analyse von RNA verwendet. Da der Ladepuffer (2X RNA Loading Dye, ThermoFisher Scientific, Braunschweig, DE) Formamid, und das Gel Formaldehyd enthält, werden innerhalb der RNA Basenpaarungen und somit Sekundärstrukturen verhindert. Als Puffer wird bei den denaturierenden Agarosegelen MOPS-Puffer (siehe 3.4, Seite 31) verwendet. Als Gelkammer und Spannungsquelle wurden die in Kapitel 4.7.4, Seite 47 ff. bereits beschriebenen Geräte verwendet.

Herstellung eines denaturierenden Agarosegels:

Die Gelkammer wird inklusive des Schlitten und der Kämme vor Gebrauch für 30 min in 0,1 M NaOH Lösung inkubiert um RNasen zu denaturieren. Darauf wurde zweimal mit zweifach autoklaviertem H<sub>2</sub>O gespült.

In einem autoklavierten 500 ml Erlenmeyerkolben wurden

Agarose	1,8	g ( $\hat{=}$ 1,2 % w / v )
H <sub>2</sub> O (2x autoklaviert)	110	ml

gemischt. In einem Mikrowellenherd wurde die Agarose zum Schmelzen gebracht. Nach kurzem Abkühlen der Mischung wurden unter dem Abzug

10X MOPS	15	ml
Formaldehyd	25	ml

mit sterilen Pipetten hinzugefügt. Da der für die Proben verwendete Ladepuffer bereits Ethidiumbromid enthält, konnte auf eine Färbung des Gels mit Ethidiumbromid verzichtet werden.

Das Gel wurde dann in den in der Gelkammer eingespannten, um 90° gedrehten Schlitten gegossen. Während das Gel aushärtete, wurden die Proben vorbereitet. Die Probe, sowie die Ribo Ruler High Range RNA Ladder (ThermoFisher Scientific, Braunschweig, DE) wurden 1 : 1 (z.B. 2 µl RNA und 2 µl Ladepuffer) mit dem Ladepuffer in einem 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen vermischt. Die Proben wurden dann gemäß der Herstellerangaben der Ribo Ruler High Range RNA Ladder für 10 min bei 70 °C inkubiert und danach sofort auf Eis abgekühlt. Das Gel wurde beladen und Strom mit einer Spannung von 100 V (  $\hat{=}$  4,3 V / cm ) angelegt.

Das Gel wurde daraufhin wie in Kapitel 4.7.4, Seite 48 beschrieben ausgewertet.

### **4.8.3 DNase Verdau**

Um die Menge an für die DNase Reaktion einzusetzender Probe zu ermitteln, wurde der ungefähre Nukleinsäuregehalt der Probe mit einem Nanodrop Spektralphotometer (NanoDrop 2000, ThermoFisher Scientific, Braunschweig, DE) gemessen (siehe Kapitel 4.7.2, Seite 46). Die Enzyme und Puffer der DNase I Reaktion stammten von der Firma ThermoFisher Scientific (Braunschweig, DE).

Die Reaktion wurde wie folgend angesetzt:

DNase I Reaktion (in 0,2 ml PCR Röhrchen)

RNA	1	µg
10X DNase Buffer	2	µl
DNase I	2	µl ( $\Delta$ 2 U)
H <sub>2</sub> O	ad 16	µl

Der Ansatz wurde durch Auf- und Abpipettieren gemischt und für 2 h bei 37 °C im PCR Cycler mit beheiztem Deckel inkubiert.

Am Ende der Inkubation wurden 2 µl EDTA (50 mM) hinzugefügt, gemischt und für 10 min bei 65 °C inkubiert, um die DNase zu inaktivieren.

Um zu kontrollieren, ob die DNase Reaktion erfolgreich war, wurde die Probe mittels PCR und Agarose Gel (2 % Agarose in TBE-Puffer, siehe Seite 31) auf nachweisbare DNA getestet. Für die Kontroll-PCR wurde der „PCR Master Mix (2X)“ (ThermoFisher Scientific, Braunschweig, DE), der eine *Taq* Polymerase enthielt, verwendet.

Als Primer wurden die in Kapitel 3.5.1, Seite 32 gelisteten *rnpB\_80\_f* und *rnpB\_80\_r* Oligonukleotide verwendet. Die Primer binden an das *rnpB* Gen, das die Untereinheit B der RNase P kodiert, bzw. in diesem Experiment an dessen cDNA. *rnpB* ist ein vielfach für PCRs verwendetes „housekeeping gene“.

Der Ansatz wurde entsprechend nach Herstellerangaben, aber in (in passenden Relationen) verkleinerten Volumina zubereitet:

2X One <i>Taq</i> Mix	6,2	µl ( $\Delta$ 0,31 U)
Primer <i>rnpB_80_f</i> [2µM]	2,9	µl ( $\Delta$ 5,8 pmol)
Primer <i>rnpB_80_r</i> [2µM]	2,9	µl ( $\Delta$ 5,8 pmol)
DNase verdaute Probe		
bzw. WT gDNA (+ Kontrolle)		
bzw. H <sub>2</sub> O (- Kontrolle)	0,5	µl

Das Programm im Thermocycler wurde analog den Angaben in Kapitel 4.7.3 „Polymerase Kettenreaktion“ (Seite 46) gewählt, wobei hier für die Annealing Phase 54 °C und 45 s und für die Elongationsphase 72 °C und 45 s gewählt wurde. Insgesamt wurden 30 Zyklen durchgeführt. Die Auswertung der PCR mittels Agarose Gelelektrophorese geschahen entsprechend den Angaben in Kapitel 4.7.4, Seite 47 ff.

#### **4.8.4 Reverse Transkription:**

Nach erfolgreichem DNase Verdau wurde die aufgereinigte RNA mittels dem Enzym Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde das „High Capacity RNA-to-cDNA™ Kit“ (Applied Biosystems, Warrington, UK), das die MuLV Reverse Transkriptase enthält, verwendet. Die Reaktion wurde dem mitgelieferten Protokoll entsprechend wie folgend in 0,2 ml PCR Rörchen angesetzt:

RNA	9	µl
2X RT Buffer Mix	10	µl
20X RT Enzyme Mix	1	µl

Gleichzeitig wurde zur Kontrolle, ob in der RNA noch genomische DNA nachweisbar war, eine RT-Reaktion ohne RT Enzyme Mix angesetzt:

RNA	0,9	µl
2X RT Buffer Mix	1,0	µl
H <sub>2</sub> O	0,1	µl

Die Reaktionsansätze wurden im Thermocycler für 60 min bei 37 °C, darauf für 5 min bei 95 °C inkubiert.

Nach der Reaktion wurde die Probe mit ROTIPURAN® Low organic Water (Roth, Karlsruhe) im Verhältnis 1:200 verdünnt und bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

#### **4.8.5 Quantitative Real Time PCR (qPCR):**

Mit der qPCR und der zur Datenauswertung gewählten  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode und deren Abwandlung kann eine quantitative Aussage über die relative Menge an Transkripten des Zielgens (oder der Zielgene) zum Zeitpunkt der Probennahme gemacht werden. Die Relativität der Mengen bezieht

sich dabei in dieser Arbeit entweder auf die RNA eines Gens unter verschiedenen Bedingungen oder auf die RNAs verschiedener Gene unter einer Bedingung.

Die Reaktion wurde mit „Power SYBR® Green PCR Master Mix“ (Applied Biosystems, Warrington, UK) in 0,1 ml PCR-Tubes (Kisker, Steinfurt, DE) angesetzt. Die Reaktion wurde daraufhin im PCR Cycler „Rotor-Gene® Q“ (Qiagen, Hilden, DE) und dem Computerprogramm „Rotor-Gene® Q Software“ (Version 2.0.2) durchgeführt.

Die Reaktion wurde wie folgend angesetzt:

Power SYBR® Green PCR Master Mix	7,5	µl
Primer forward [2 µM]	1,5	µl ( ≙ 3 pmol)
Primer reverse [2 µM]	1,5	µl ( ≙ 3 pmol)
cDNA (Verdünnung 1:200)		
bzw. RT- Sample (Verdünnung 1:200)		
bzw. H <sub>2</sub> O	4,5	µl

Aus dem Power SYBR® Green PCR Master Mix sowie den forward und reverse Primern wurden Master Mixe angesetzt, die dann in die einzelnen Röhrchen pipettiert wurden (je 10,5 µl). Daraufhin wurde die cDNA bzw. RT- Sample bzw. H<sub>2</sub>O einzeln in die Röhrchen pipettiert (je 4,5 µl).

Jede Probe mit dem jeweiligen Primer wurde als Triplikat eingesetzt, um die technische Reproduzierbarkeit zu überprüfen und zu gewährleisten.

Die Abwesenheit von genomischer DNA wurde durch Einsetzen der RT- Proben kontrolliert. Die Reinheit der Primer und des Master Mix wurde durch Negativkontrollen mit Wasser überprüft.

Das Temperaturprogramm wurde entsprechend der Empfehlung des Herstellers (Applied Biosystems, User Manual - Power SYBR® Green PCR Master Mix and Power SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit, 2011) wie folgend gewählt:

Schritt	Temperatur	Dauer (s)	
Taq Aktivierung	95 °C	600	
Denaturierung	95 °C	15	40 Zyklen
Annealing & Elongation	60 °C	60	
Schmelzkurve	50 – 95 °C		



Während der qPCR nimmt das Gerät und das Programm die Fluoreszenzstärke der einzelnen Proben für jeden Zyklus in den Datensatz auf. Dies resultiert in einer Kurve pro Probe, die sich durch die normalisierte Fluoreszenzstärke auf der Y-Achse und der Zyklenzahl auf der X-Achse definiert. Abbildung 4.2 zeigt ein Beispiel für ein Fluoreszenz-Kurvendiagramm.

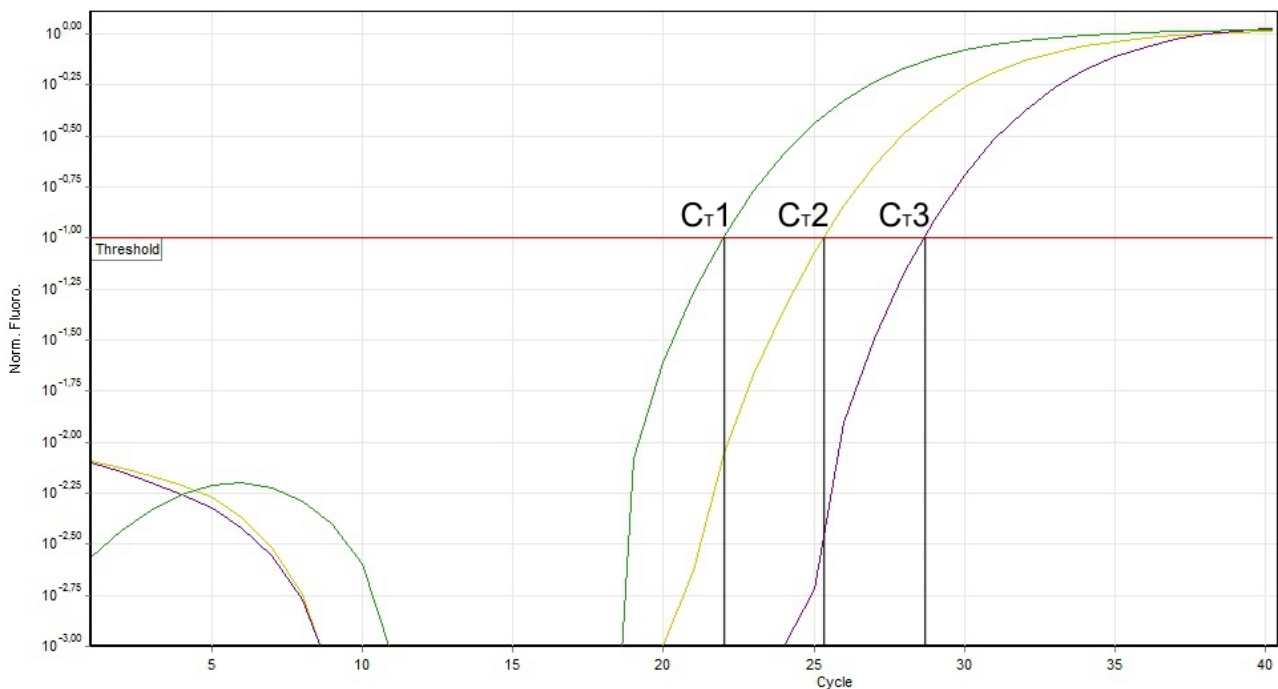


Abbildung 4.2: Beispiel Real Time Fluoreszenzkurven einer Verdünnungsreihe gescherter genomischer DNA, wie sie für die Primer Effizienzbestimmungen verwendet wurde. Zu sehen sind drei Kurven für Verdünnungsstufen 1 : 30, 1 : 300 und 1 : 3000, der zur X-Achse parallel verlaufende Threshold, der die Y-Achse bei der normalisierten Fluoreszenz von  $10^{-1}$  schneidet sowie für dieses Bild eingezeichnete Verbindungslinien zwischen den  $C_T$ -Punkten und der X-Achse. Für die  $C_T$ -Punkte ergeben sich somit die Werte:  $C_{T1} = 21,97$ ,  $C_{T2} = 25,29$  und  $C_{T3} = 28,64$ .

Diagramm exportiert aus „Rotor-Gene® Q Software“ (Version 2.0.2), nachträglich verändert.

### Der $C_T$ Wert:

Zur Datenauswertung musste für jede Probe ein  $C_T$  Wert bestimmt werden. Der  $C_T$  Wert (Crossing Threshold) ist jener Wert der X-Achse, bei dem die Kurve den horizontal verlaufenden Schwellwert (Threshold) schneidet. Der Schwellwert wurde so festgelegt, dass er sich im Bereich der exponentiellen Steigung der Kurven befindet und zwar dort, wo alle Kurven möglichst parallel zueinander sind. Des weiteren wurde der Schwellwert für alle Experimente zur besseren Vergleichbarkeit gleich gewählt, nämlich bei der normalisierten Fluoreszenz von  $10^{-1}$ .

### Datenauswertung mittels der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode

Zur Berechnung der Verhältnisse der verschiedenen cDNAs wurde die  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode (Livak und Schmittgen 2001) gewählt, die eine relative Quantifizierung der Transkripte der Zielgene unter zwei Bedingungen mit der Möglichkeit der Normalisierung über ein gewähltes Referenzgen (siehe Kapitel 4.8.7, Seite 67) zulässt. Die Normalisierung über das Referenzgen (früher in dem Zusammenhang auch „House Keeping Gene“ genannt) hat den Vorteil, dass unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen oder Effizienzen der Reversen Transkriptase ausgeglichen werden. Dies setzt natürlich die Wahl eines Referenzgens voraus, dessen Transkription nicht oder kaum von den verschiedenen Bedingungen beeinflusst wird.

$$\text{Verhältnis (Bedingung 2 : Bedingung 1)} = \frac{2^{(C_T \text{ Zielgen Bedingung 1} - C_T \text{ Zielgen Bedingung 2})}}{2^{(C_T \text{ Referenzgen Bedingung 1} - C_T \text{ Referenzgen Bedingung 2})}}$$

Das Verhältnis gibt die Relation der Transkriptmenge des Zielgens unter Bedingung 2 zur Transkriptmenge des Zielgens unter Bedingung 1 zum Zeitpunkt der Probennahme an.  $C_T$  steht für „crossing threshold“, also den mit der Rotor-Gene® Q Software für jede Probe bzw. Kurve ermittelten Vergleichswert (siehe oben). Die Formel setzt eine Verdoppelung der DNA Menge in jedem Zyklus voraus, was durch die Wahl der Primer und deren Kontrolle über die Bestimmung der Primer Effizienz (siehe Kapitel 4.8.6, Seite 66) auch annähernd gewährleistet wird.

Mit Hilfe der Formel bzw. deren Ableitung ist es auch möglich, verschiedene Gene unter einer Bedingung, also aus einer Probe stammend, zu vergleichen. Da es bei dem Vergleich verschiedener Gene aus einer Probe keiner Normalisierung über Referenzgene bedarf bzw. der Nenner der Formel bei Verwendung von nur einer Probe gleich 1 wird,

$$2^{(C_T \text{ Referenzgen Bedingung 1} - C_T \text{ Referenzgen Bedingung 1})} = 2^0 = 1$$

ist es möglich, mit folgender abgeleiteter Formel das Verhältnis zwischen den Transkripten von zwei verschiedenen Genen innerhalb einer Probe zu berechnen:

$$\text{Verhältnis (Bedingung 2 : Bedingung 1)} = 2^{(C_T \text{ Zielgen Bedingung 1} - C_T \text{ Zielgen Bedingung 2})}$$

#### 4.8.6 Bestimmung der Primer Effizienz

Da die Berechnungen mit der hier angegebenen  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode (Livak und Schmittgen 2001) von einer Verdoppelung der DNA pro PCR Zyklus ausgehen, ist es wichtig, dass die Effizienz der Primer möglichst gleich und nahe der maximalen Effizienz von 2 ist. Die hier gewählte Methode der Effizienzbestimmung funktioniert mit der Erstellung einer Standardkurve aus einer Verdünnungsreihe, aus deren Steigung die qPCR-Effizienz bestimmt werden kann (Pfaffl 2004).

Es wurden Konzentrationen gewählt, die  $C_T$  Werte lieferten, die im für die Experimente erwarteten Bereich lagen. Dabei wurden drei Verdünnungen gewählt, die innerhalb eines Faktors von 100 lagen. Ein Beispiel einer Standardkurve mit drei Verdünnungen bietet Abbildung 4.3.

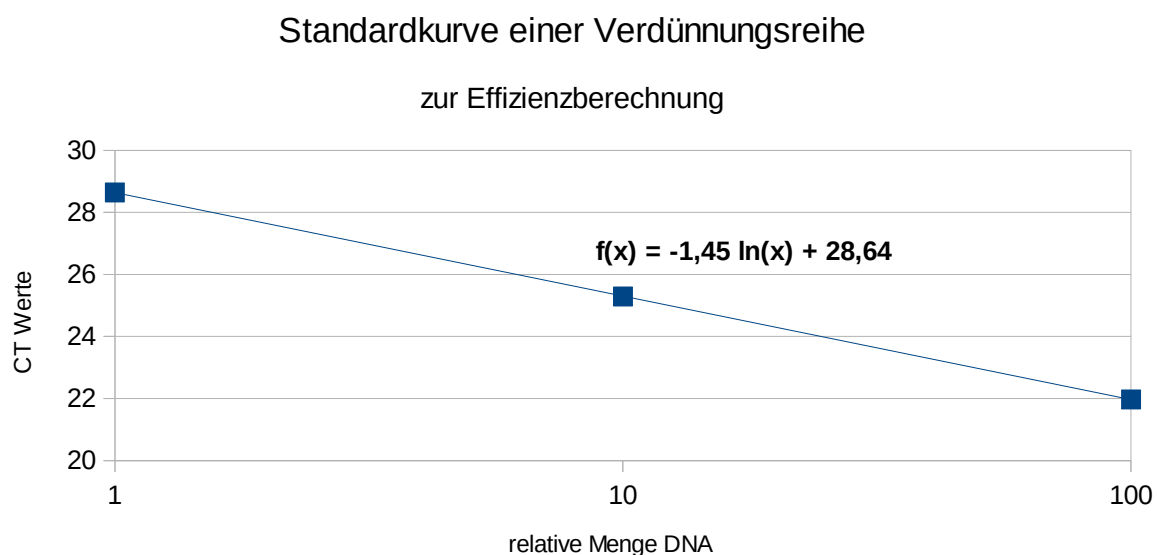


Abbildung 4.3: Beispielhafte Standardkurve einer Verdünnungsreihe zur Primer Effizienzberechnung.

Mittels des Libre Office Tabellenkalkulationsprogrammes „Calc“ (Version: 5.0.4.2) konnte anhand der  $C_T$  Werte die Standardkurve erstellt und deren Steigung, basierend auf dem natürlichen Logarithmus, berechnet werden.

Die Effizienz errechnet sich nach folgender Formel (Pfaffl 2004):

$$E = 10^{(-1 / \text{Steigung})}$$

Die Formel geht dabei von einer Steigungsberechnung, basierend auf dem dekadischen Logarithmus ( $\log_{10}$ ), aus, während Calc zur Steigungsberechnung den natürlichen Logarithmus ( $\ln$ ) verwendet.

Daher wurde die von Calc ausgegebene Steigung noch wie folgend umgerechnet:

$$\text{Steigung}_{(\text{nach } \log_{10})} = \frac{\text{Steigung}_{(\text{nach } \ln)}}{\log(e)}$$

Die in der Formel vorkommende „Steigung<sub>(nach ln)</sub>“ bezeichnet die von Calc berechnete Steigung, „e“ ist die Eulersche Zahl (auf drei Nachkommastellen gerundet: 2,718), „Steigung<sub>(nach log<sub>10</sub>)</sub>“ kann dann direkt in der Effizienzformel verwendet werden.

Eine Effizienz von 2 heißt, dass es zu der maximal möglichen Verdoppelung der DNA pro Zyklus kommt, während eine Effizienz von 1 überhaupt keine Vermehrung der DNA Stücke bedeutet. Es wurde bei jedem Primer darauf geachtet, dass die Effizienz über 1,9 lag.

#### 4.8.7 Auswahl des Referenzgens

Zur Auswahl des geeigneten Referenzgens wurde erst eine Literatursuche nach für *Synechocystis* untersuchten Referenzgenen unternommen. Aufgrund der Analyse von (Pinto et al. 2012) wurden die Gene *rrn16Sa* (codiert für die 16S rRNA), *rnpB* (codiert für die Untereinheit B der Rnase P) und *secA* (codiert für die SecA Untereinheit der Präprotein Translokase) in die engere Auswahl genommen.

Für die Eignung als Referenzgen für die Experimente in dieser Arbeit wurde die Transkription dieser Gene bei Inkubation der Bakterien in den Medien BG11 und BG11<sub>0</sub>AG (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.4, Seite 28 f.) an drei aufeinander folgenden Tagen miteinander verglichen. Hierzu wurden, wie beschrieben, die RNA extrahiert und per qPCR die C<sub>T</sub> Werte ermittelt (Kapitel 4.8, Seite 57 ff.). Um auf die Varianz der Transkription unter den verschiedenen Bedingungen und Zeitpunkten zu schließen (bei einem idealen Referenzgen wäre die Varianz 0), wurde von den C<sub>T</sub> Werten eines Gens zu den verschiedenen Zeitpunkten und Bedingungen ein Mittelwert genommen und die Abweichungen von diesem Mittelwert bestimmt (siehe Abbildung 4.4).

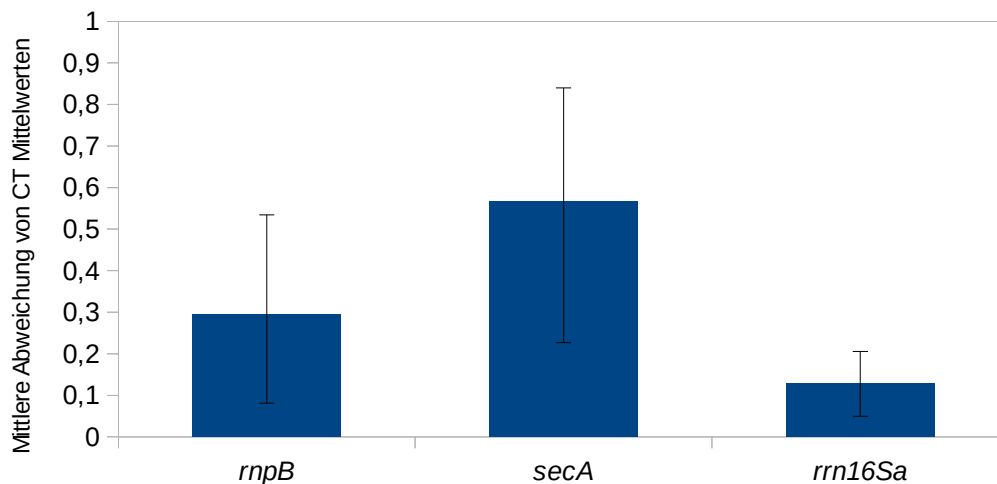


Abbildung 4.4 Die mittlere Abweichung der CTs von den verschiedenen Bedingungen und Zeitpunkten zu den CT-Mittelwerten der Referenzkandidaten *rnpB*, *secA* und *rrn16Sa*. Die eingezeichneten Fehlerbalken sind minimal/maximal Balken.  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW

Durch diese Auswertung konnte festgestellt werden, dass unter den getesteten Bedingungen und Zeiten die *rrn16Sa* Transkription die geringste Varianz hatte. Während *secA* eine mittlere Abweichung vom CT-Mittelwert von 0,57 zeigte (das entspräche einer Verfälschung des mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode errechneten Verhältnis von 0,48), zeigte *rrn16Sa* mit 0,13 die geringste mittlere Abweichung vom CT-Mittelwert (das entspräche einer Verfälschung des Verhältnisses von 0,09). Für die qPCR-Experimente in dieser Arbeit wurde daher *rrn16Sa* als Referenzgen gewählt.

#### 4.8.8 Ermittlung der Korrekturfaktoren zum direkten Vergleich verschiedener Transkripte in einer Probe

Die Effizienz der Amplifikation, die durch die Primer bedingt wird (Primereffizienz), spielt gerade beim Vergleich verschiedener Transkripte – also beim Vergleich von Amplifikationen mit verschiedenen Primern – eine große Rolle. Daher wurde die Effizienz der Amplifikation innerhalb der *hox* Gene sowie des ORF *sll1222* und der Antisense-RNA *as-sll1223* geprüft und daraus Korrekturfaktoren für die Berechnung der relativen Transkriptmenge errechnet. Das Genom von *Synechocystis* ist sequenziert und daher ist es bekannt, dass jedes dieser für diese Arbeit relevanten Gene nur einmal pro Chromosom vorkommt. Somit kann durch die Verwendung gescherter genomischer DNA ein direkter Vergleich der Amplifikationseffizienz und eine Berechnung von Korrekturfaktoren vorgenommen werden.

Es wurden drei aus verschiedenen Extraktionen stammende DNAs auf ungefähr 5 ng /  $\mu$ l (mit Hilfe einer Nanodrop Messung, siehe Kapitel 4.7.2, Seite 46) verdünnt und dann durch zehnmaliges Aufziehen und druckvollem Entleeren mit einer sterilen 1 ml Spritze und einer 30 G x 1/2 " Kanüle (0,3 x 12 mm) geschert (Griffin und Griffin 1993). Die DNA wurde daraufhin weiter auf ungefähr 11 bis 1100 pg /  $\mu$ l verdünnt, um bei der qPCR auf für die *hox* Gene erwartete  $C_T$  Werte zu kommen (siehe Abbildung 4.5).

Mit dieser DNA und den in dieser Arbeit verwendeten Primern für die *hox* Gene, *sll1222* und *as-sll1223* wurde daraufhin eine qPCR durchgeführt (Kapitel 4.8.5, Seite 62 ff.) und die scheinbaren relativen Mengen an DNA berechnet (siehe Abbildung 4.6)

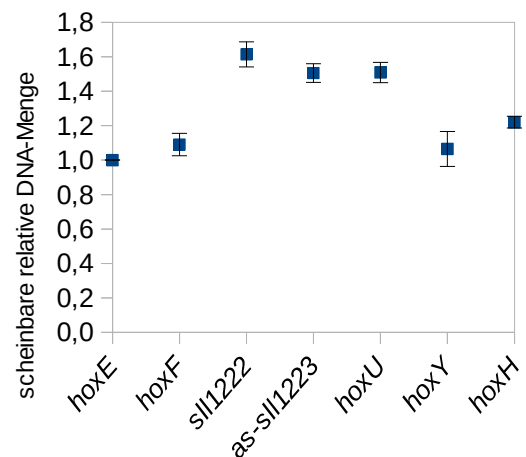
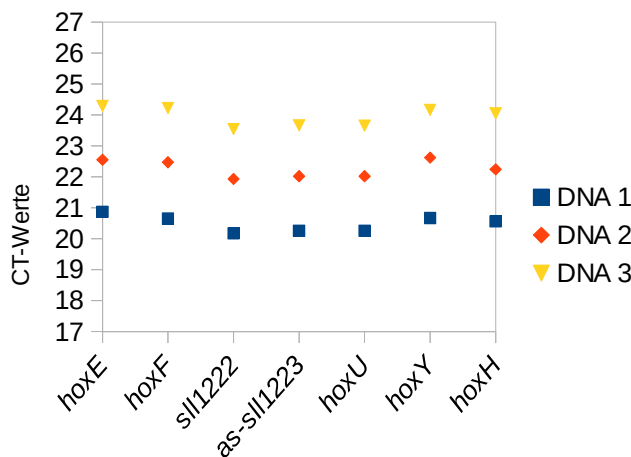


Abbildung 4.5:  $C_T$  Werte von Verdünnungen gescherter genomischer DNA. DNA1: 1100 pg /  $\mu$ l, DNA2: 110 pg /  $\mu$ l, DNA3: 11 pg /  $\mu$ l

Abbildung 4.6: Gemittelte kalkulierte DNA-Mengen der verschiedenen Gene und ORFs relativ zur Menge an *hoxE* (= 1)

Anhand der DNA Mengen, die alle relativ zur als 1 gesetzten Menge an *hoxE* errechnet wurden, konnten durch Division von 1 (*hoxE*) durch die relativen anderen DNA-Mengen die entsprechenden Korrekturfaktoren (siehe Tabelle 4.1) kalkuliert werden:

<i>hoxE</i> :	1,00	<i>hoxU</i> :	0,66
<i>hoxF</i> :	0,92	<i>hoxY</i> :	0,94
<i>sll1222</i> :	0,62	<i>hoxH</i> :	0,82
<i>as-sll1223</i> :	0,66		

Tabelle 4.1: Korrekturfaktoren für die Berechnung der relativen Transkription der *hox* Gene, *sll1222* und *as-sll1223* bei Vergleich innerhalb einer Probe.

## 5 Ergebnisse

Alle Datensätze und Abbildungen ergeben sich, wenn nicht anders angegeben, aus drei voneinander unabhängigen Messreihen bzw. Experimenten.

### 5.1 Wachstumskurven des *Synechocystis* Wildtyps, verschiedener $\Delta hox$ und $\Delta flv24$ Mutanten bei unterschiedlichen Bedingungen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass *Synechocystis*  $\Delta hoxH$  einen Wachstumsphänotyp, nämlich kein Wachstum, im nitratlosen Medium BG11<sub>0</sub>AG (+ Glc, + Arg) in einem Tag- / Nachtzyklus hatte (Gutekunst et al. 2014), konnte beobachtet werden, dass dieser Phänotyp in dem Medium auch bei 24 h Dauerbeleuchtung ( $60 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) Bestand hatte (siehe Abbildung 5.1). Da bei Dauerbeleuchtung und Begasung mit Luft von aeroben Bedingungen ausgegangen werden muss und bekannt ist, dass die [NiFe]-Hydrogenase  $\text{O}_2$  sensitiv ist (McIntosh et al. 2011), ist ein Phänotyp der  $\Delta hoxH$  Mutante unter diesen Bedingungen überraschend. Daher sollte untersucht werden, ob es sich bei der Beobachtung um ein Artefakt oder einen sekundären Effekt handelt oder ob tatsächlich das Fehlen der Hydrogenase für den Wachstumsphänotyp der Mutante verantwortlich ist.

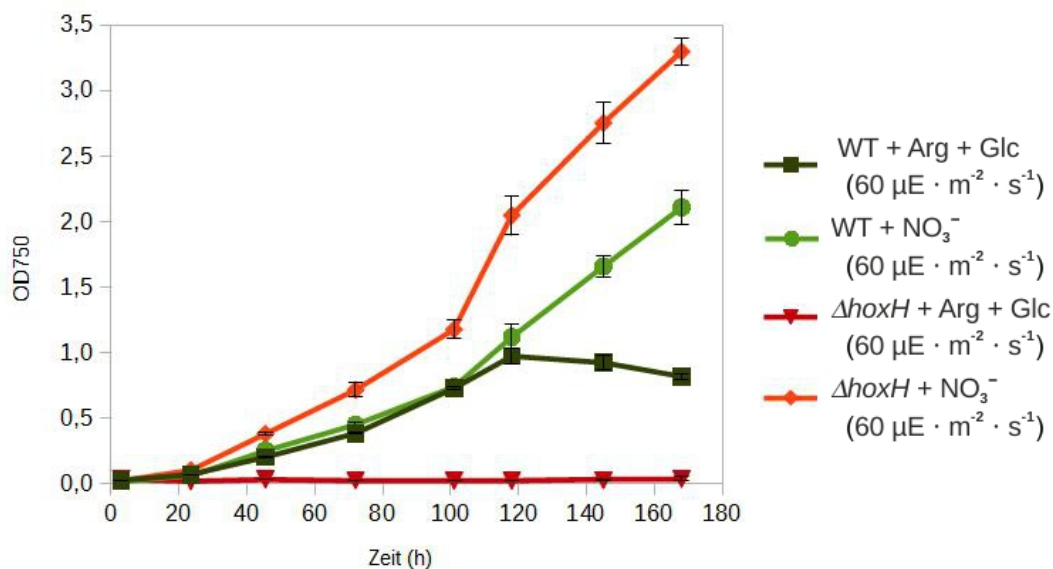


Abbildung 5.1: Wachstumskurve WT und  $\Delta hoxH$  bei  $60 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  Dauerlicht und zwei Bedingungen (+ Arg + Glc = BG11<sub>0</sub>AG; +  $\text{NO}_3^-$  = BG11);  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW

Unter Dauerbeleuchtung und in BG11<sub>0</sub>AG Medium brach nun, im Gegensatz zum Tag- / Nachtzyklus, auch das Wachstum des WT nach ca. 120 h ab. Beide Stämme wuchsen mit Nitrat (BG11-Medium) problemlos. Die optische Dichte der *ΔhoxH* Mutante in BG11 bei 750 nm war bei diesen Messungen höher als die des WT; dieses Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Zellvolumen der *ΔhoxH* Mutante größer ist, als das des Wildtyps (persönliche Mitteilung nach Beobachtung mit Mikroskop K. Gutekunst).

Da vermutet wurde, dass der Phänotyp auf Grund eines für die Zellen nicht mehr tolerierbar hohen Elektronendrucks zustande kommt (siehe Kapitel 1.4.6, Seite 21 f.), wurde das Wachstum der Zellen mit den gleichen Medien, aber mit einer höheren Lichtintensität (höherer Elektronendruck) bzw. einer niedrigeren Lichtintensität (weniger Elektronendruck) untersucht. Genauere Beschreibungen der Medien siehe Kapitel 3.2, Seite 28 f.; Beschreibungen der verwendeten Lichtintensitäten siehe Tabelle 5.1.

### 5.1.1 Zellen in BG11 Medium und Schwach- bzw. Starklicht

Schwachlicht	$20 \pm 5 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
Standardlicht	$60 \pm 5 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
Starklicht	$200 \pm 10 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

Tabelle 5.1: Benennung der in der Arbeit verwendeten Lichtintensitäten.

Um zu sehen, ob die Erhöhung des Elektronendrucks durch die Lichtintensität auch in BG11 Medium zu einem schlechterem oder keinem Wachstum bei der *ΔhoxH* Mutante führt (wie in BG11<sub>0</sub>AG), wurden Wachstumsversuche mit verschiedenen Zelltypen in BG11 (+ NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) und Schwachlicht bzw. Starklicht durchgeführt (Abbildungen 5.2 - 5.4). Während die *ΔhoxH* Mutante in BG11 und Starklicht wider Erwarten höhere optische Dichten hat als der Wildtyp (Abbildung 5.2), sind die OD<sub>750</sub>-Werte in BG11 und Schwachlicht ungefähr gleich (Abbildung 5.3). Insgesamt wachsen die Zellen bei Starklicht schneller als bei Schwachlicht.

Mit den Zellen dieser Messreihen wurden außerdem Carotinoideextraktionen durchgeführt, deren Ergebnisse in Kapitel 5.2.2, Seite 82 zu finden sind.



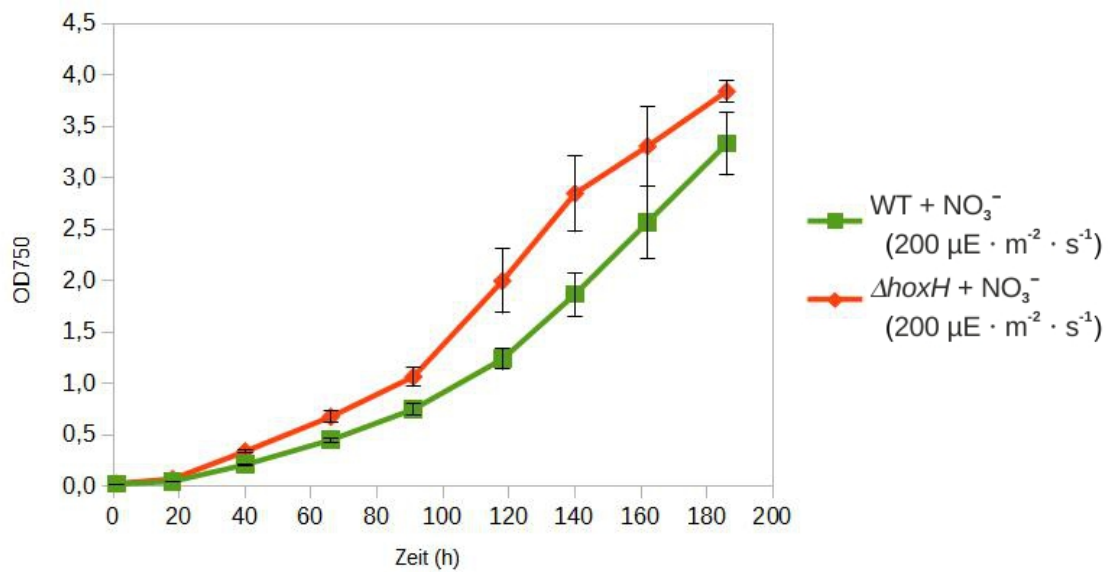


Abbildung 5.2: Wachstumskurve WT und  $\Delta hoxH$  bei durchgehendem Starklicht in BG11 (+  $NO_3^-$ )

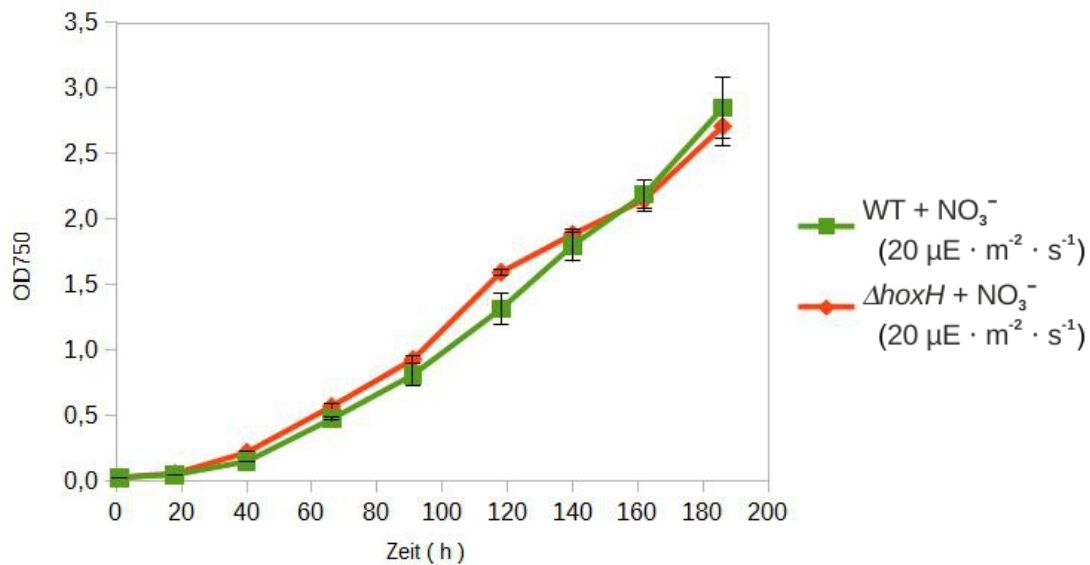


Abbildung 5.3: Wachstumskurve WT und  $\Delta hoxH$  durchgehendem Schwachlicht in BG11 (+  $NO_3^-$ )

Wegen der unerwarteten höheren optischen Dichten der  $\Delta hoxH$  Mutante in BG11 und Starklicht wurde ein weiteres Schwachlicht / Starklicht Experiment mit der  $\Delta flv24$  Mutante und der  $\Delta flv24\Delta hoxH$  Doppelmutante (siehe Tabelle 3.1, Seite 27) durchgeführt (Abbildung 5.4). Die Flavoproteine Flv2 und Flv4 gelten als Elektronenakzeptoren der Photosynthese (Zhang et al. 2012; Bersanini et al. 2014) (siehe auch Einleitung Kapitel 1.4.7, Seite 23) und könnten somit in Zusammenhang mit der Photosynthese eine ähnliche Funktion wie die Hydrogenase ausüben bzw. deren Fehlen kompensieren.

Es zeigte sich, dass die Doppelmutante, deren Wachstum bei Starklicht anfänglich mit dem Wachstum des WT bzw. der  $\Delta flv24$  Einzelmutante vergleichbar war (siehe Abbildung 5.2 und 5.4), nach 144 – 164 h erst schlechter wächst als die verglichenen Kulturen und das Wachstum ab 185 – 209 h stagniert. Somit konnte ein weiterer Wachstumsphänotyp einer Hydrogenasemutante gefunden werden.

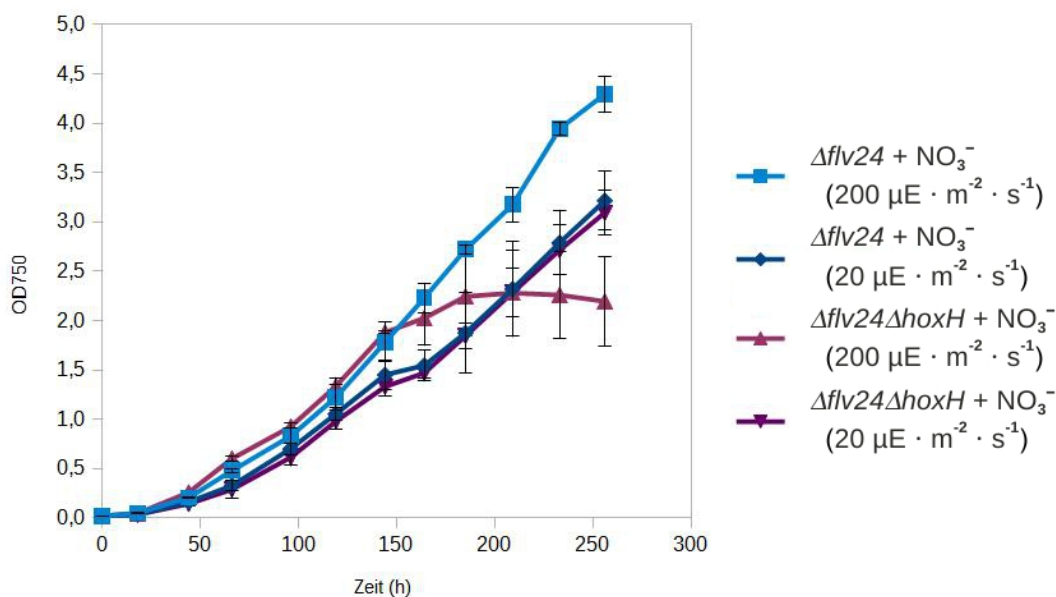


Abbildung 5.4: Wachstumskurve der Mutanten  $\Delta flv24$  und  $\Delta flv24\Delta hoxH$  bei Schwach- und Starklicht in BG11 (+  $NO_3^-$ );  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW

### 5.1.2 Zellen in BG11<sub>0</sub>AG Medium und Schwach- bzw. Starklicht

Um zu testen, ob die  $\Delta hoxH$  Mutante in BG11<sub>0</sub>AG Medium durch eine Verringerung des Elektronendrucks „gerettet“ werden kann, also um einen Hinweis zu bekommen, ob der Phänotyp auf Grund des hohen Elektronendrucks in dem BG11<sub>0</sub>AG Medium zustande kommt, wurden Wachstumsversuche mit dem WT und der  $\Delta hoxH$  Mutante in BG11<sub>0</sub>AG Medium und Schwach- bzw. Starklicht durchgeführt.

Während der Wildtyp bei Starklicht sowie bei Schwachlicht ein vergleichbares Wachstum zeigt, weist die  $\Delta hoxH$  Mutante bei Starklicht kein Wachstum, bei Schwachlicht aber ein geringes Wachstum auf (siehe Abbildung 5.5 bzw. Abbildung 5.6).

Eine Verringerung des Elektronendrucks ist für das Wachstum der  $\Delta hoxH$  Mutante auf BG11<sub>0</sub>AG Medium wie erwartet förderlich.

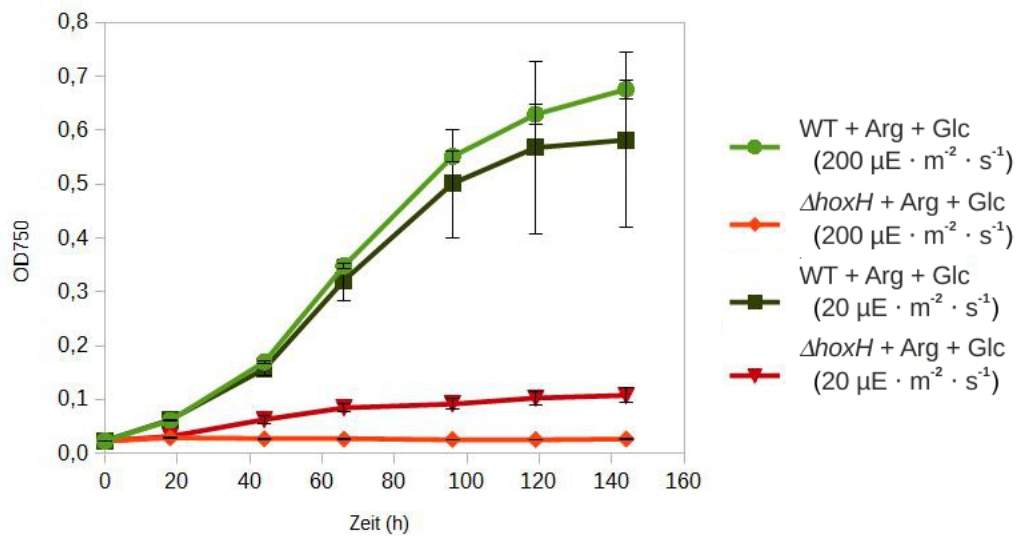


Abbildung 5.5: Wachstumskurve von WT und der  $\Delta hoxH$  Mutante bei Schwach- bzw. Starklicht in BG11<sub>0</sub>AG Medium (+Arg, +Glc);  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW

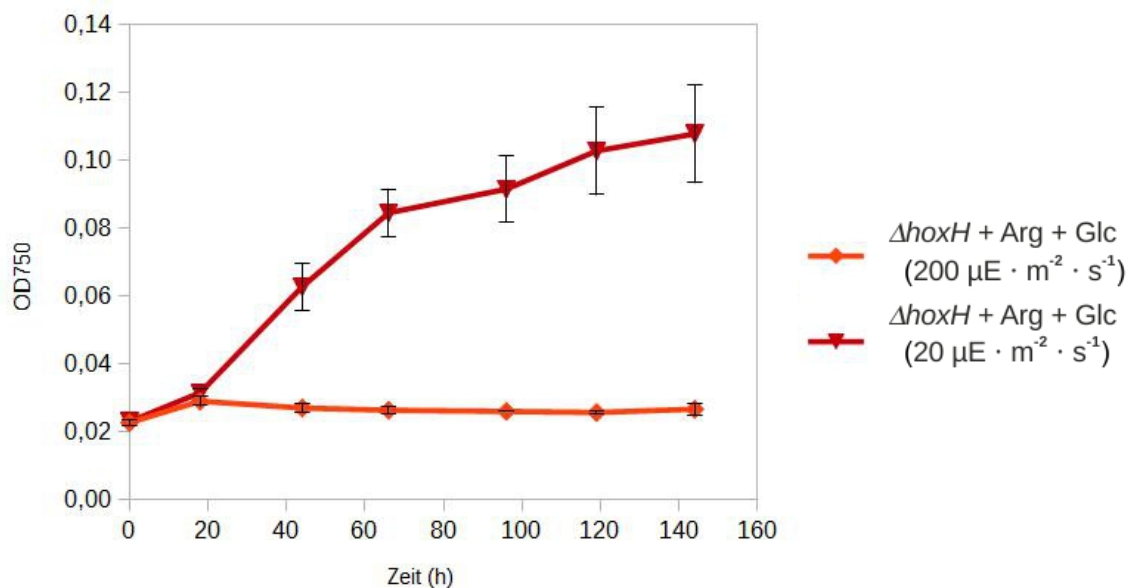


Abbildung 5.6: Wachstumskurve der  $\Delta hoxH$  Mutante bei Schwach- bzw. Starklicht in BG11<sub>0</sub>AG Medium (+Arg, +Glc). Diese Abbildung entspricht einer Vergrößerung eines Teils der Abbildung 5.5 zur besseren Darstellung des Unterschieds im Wachstum der  $\Delta hoxH$  Mutante.  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW

### 5.1.3 Zellen in BG11<sub>0</sub>AG Medium + DCMU

Um den Elektronendruck, der durch die Wasserspaltung der Photosynthese auf die Zellen wirkt, abzuschalten, wurde dem Medium DCMU (3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylurea) (Handelsname als Herbizid ist Diuron) zu einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  hinzugefügt.

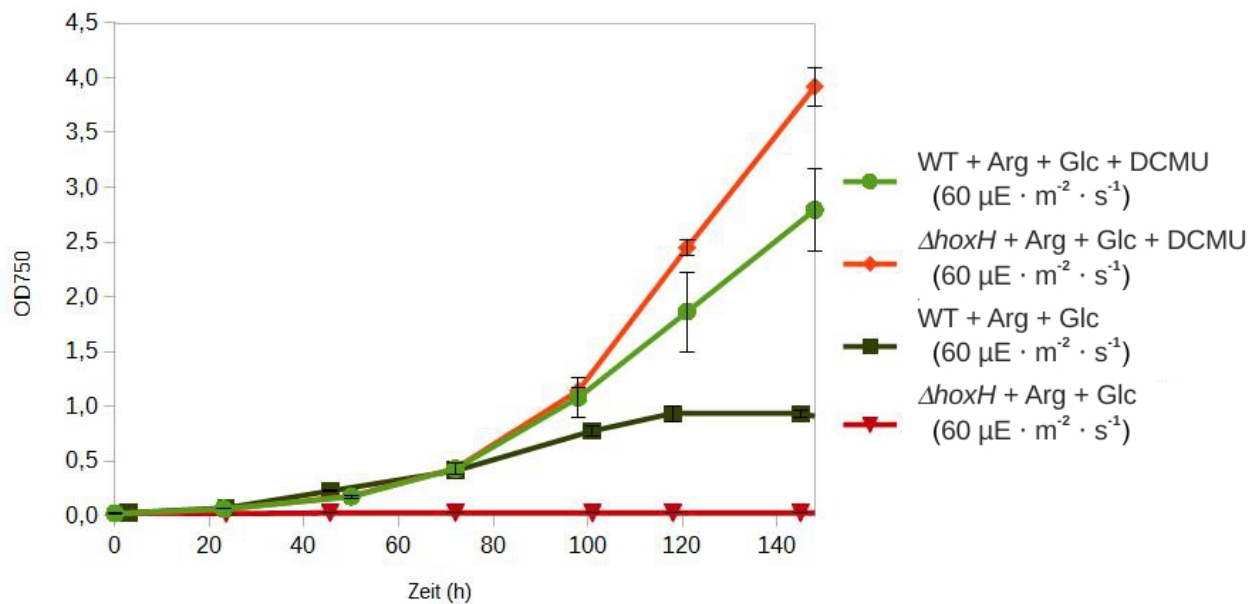


Abbildung 5.7: Wachstumskurven WT und  $\Delta hoxH$  Mutante in BG11<sub>0</sub>AG (+ Arg, + Glc) mit und ohne DCMU [10 $\mu\text{M}$ ] bei Standardlicht.  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW

DCMU ändert das Redoxpotential der PSII Untereinheit B und verhindert damit den Elektronentransport von PSII Richtung Chinonpool (Pfister und Arntzen 1979), was den Elektronendruck auf die Zellen verringert. Wie erwartet, führt die Zugabe von DCMU zum BG11<sub>0</sub>AG Medium zu einem verbesserten Wachstum, sowohl von WT als auch der  $\Delta hoxH$  Mutante (Abbildung 5.7).

#### 5.1.4 Wachstum anderer $\Delta hox$ Mutanten in BG11<sub>0</sub>AG Medium

Um festzustellen, ob der Phänotyp „kein Wachstum in BG11<sub>0</sub>AG Medium“ auf die  $\Delta hoxH$  Mutante, also die Hydrogenaseuntereinheit der bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenase, beschränkt ist, wurden weitere Wachstumsexperimente mit der  $\Delta hoxEFUYH$  Mutante (Fehlen aller Hydrogenase Gene) und der  $\Delta hoxEFU$  Mutante (Fehlen der Gene der Diaphoraseuntereinheit) durchgeführt (Abbildung 5.8). Hierbei zeigte sich, dass die  $\Delta hoxEFUYH$  Mutante bei den drei verschiedenen Lichtintensitäten das gleiche Wachstum wie die  $\Delta hoxH$  Mutante aufweist (vgl. Abbildungen 5.5 und 5.6). Dagegen weist die  $\Delta hoxEFU$  Mutante im BG11<sub>0</sub>AG Medium ein stark von der Lichtintensität abhängiges Wachstum auf. Während die  $\Delta hoxEFU$  Mutante bei Starklicht ähnlich schlecht wächst wie die  $\Delta hoxH$  bzw. die  $\Delta hoxEFUYH$  Mutanten, verbessert sich das Wachstum bei abnehmender Lichtintensität und ist bei Schwachlicht sogar nur noch etwas schwächer als das des Wildtyps. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte bedacht werden, dass die Deletion der  $hoxEFU$  Gene auch

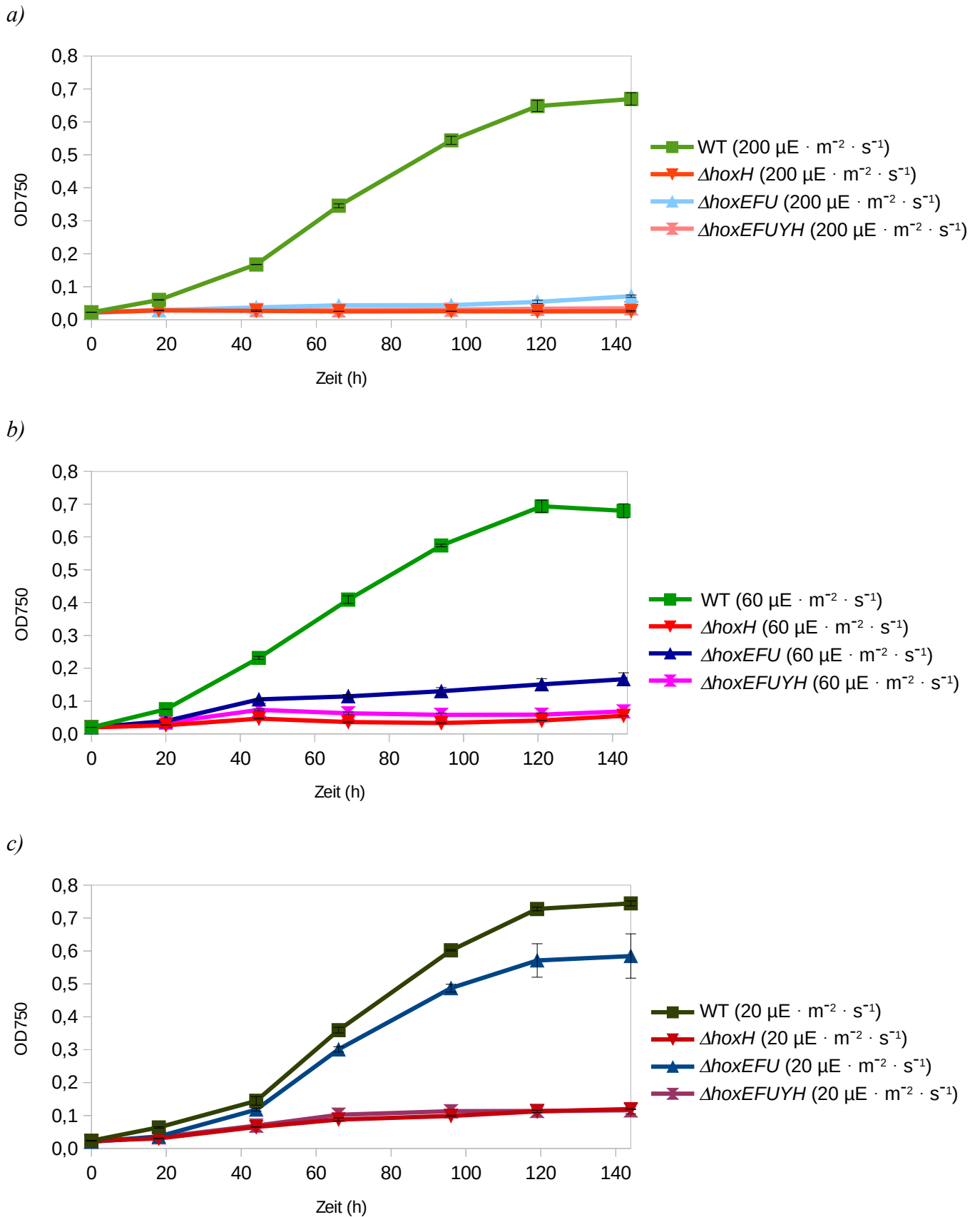


Abbildung 5.8: Wachstumskurven verschiedener  $\Delta\text{hox}$  Mutanten in  $\text{BG11}_0\text{AG}$  Medium (+ Arg, + Glc).  
 a) bei Starklicht; b) bei Standardlicht; c) bei Schwachlicht.  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW

zu einer verringerten Expression der Gene *hoxYH*, die für die Hydrogenaseuntereinheit codieren, führt (Eckert et al. 2012). Es könnte also durchaus sein, dass ohne diesen Effekt, das Wachstum der *ΔhoxEFU* Mutante deutlich stärker wäre.

Bei Zugabe von 10 μM DCMU wurde, wie schon bei WT und der *ΔhoxH* Mutante beobachtet (siehe Abbildung 5.7), auch bei der *ΔhoxEFUYH* sowie bei der *ΔhoxEFU* Mutante ein verbessertes Wachstum erreicht (Abbildung 5.9).

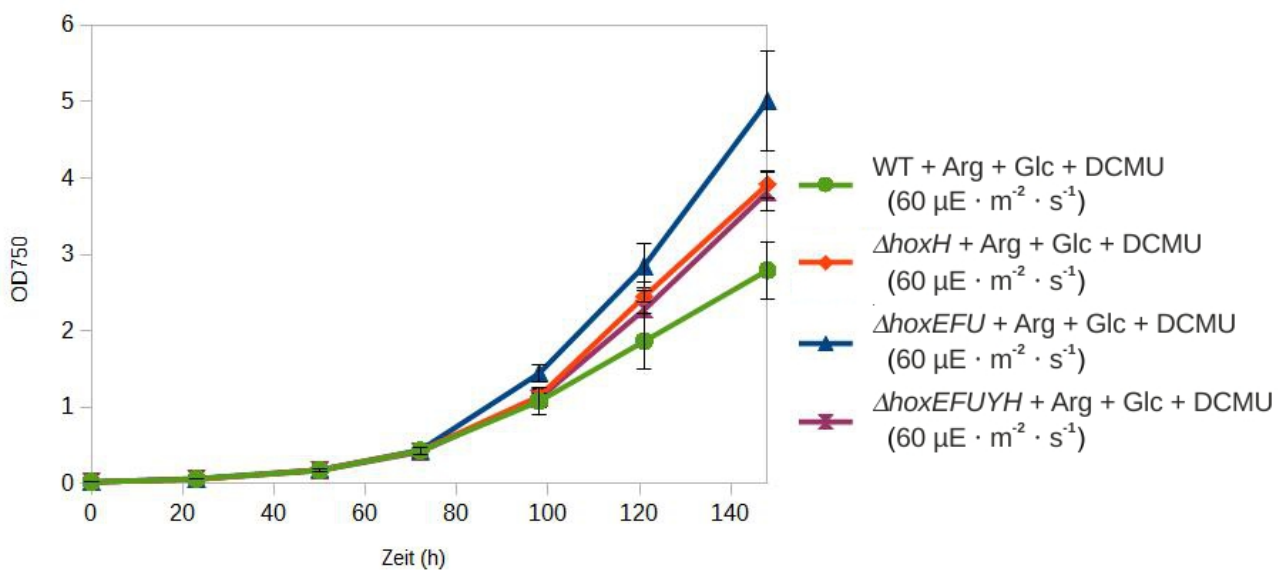


Abbildung 5.9: Verschiedene *Δhox* Mutanten in BG11<sub>0</sub>AG Medium + DCMU [10μM] und Standardlicht. Die Kurven für WT + Arg + Glc + DCMU sowie *ΔhoxH* + Arg + Glc + DCMU, die bereits in Abbildung 5.7 dargestellt wurden sind zur besseren Vergleichbarkeit an dieser Stelle noch einmal wiedergegeben.  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW

### 5.1.5 Wachstum des Wildtyps und der *ΔhoxH* Mutante in BG11, BG11G, BG11<sub>0</sub>A und BG11<sub>0</sub>AG Medien

Um feststellen zu können, welchen Beitrag die zwei Parameter, die die Medien BG11 und BG11<sub>0</sub>AG unterscheiden (nämlich + Glc bzw. + Arg - NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), zum Phänotyp „kein Wachstum in BG11<sub>0</sub>AG Medium“ der *Δhox* Mutante liefern, wurden Wachstumsexperimente in allen vier Medien bei Standardlicht parallel durchgeführt (Abbildung 5.10). Es konnte gezeigt werden, dass der genannte Phänotyp nur im BG11<sub>0</sub>AG Medium (+ Arg + Glc) in Erscheinung tritt. Während die gemessenen optischen Dichten von WT und der *ΔhoxH* Mutante in BG11G (+ NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + Glc) sehr

ähnlich waren, war die optische Dichte der  $\Delta hoxH$  Mutante in BG11<sub>0</sub>A (+ Arg) sogar größer als die des WT, was, wie schon erwähnt, aber auch an einem größeren Zellvolumen der  $\Delta hoxH$  Mutante liegen könnte.

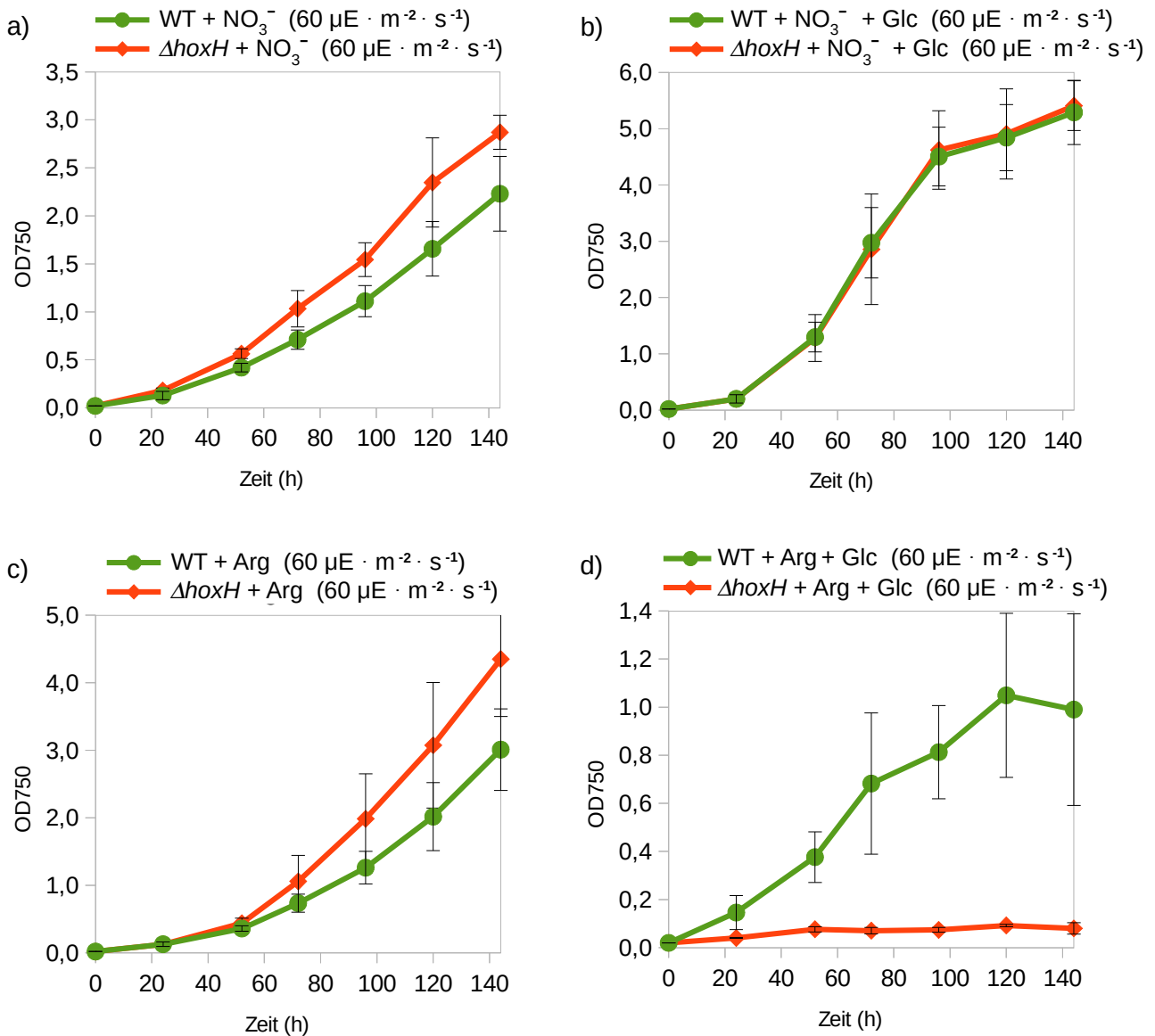


Abbildung 5.10: WT und  $\Delta hoxH$  Mutante in den Medien a) BG11 (+ $\text{NO}_3^-$ ), b) BG11G (+  $\text{NO}_3^-$  + Glc), c) BG11<sub>0</sub>A (+ Arg), d) BG11<sub>0</sub>AG (+ Arg + Glc); Lichtintensität: Standardlicht.  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW

Mit den Zellen dieser Messreihen wurden außerdem Carotinoideextraktionen durchgeführt, deren Ergebnisse in Kapitel 5.2.1, Seite 81 f. zu finden sind.

### 5.1.6 Wachstum des Wildtyps und der $\Delta lexA$ Mutante in BG11 und BG11<sub>0</sub>AG Medien

Da es sich bei LexA um einen Transkriptionsaktivator für die Hydrogenasogene handelt (siehe Kapitel 1.4.4, Seite 18), wurde mit einer  $\Delta lexA/lexA^+$  Mutante ein Wachstumsversuch bei Nitratmangel unternommen, da ein ähnlicher Phänotyp wie bei der  $\Delta hoxH$  Mutante ein weiterer Hinweis darauf wäre, dass es sich bei dem Phänotypen der  $\Delta hoxH$  Mutante um kein Artefakt handelt. Bei allen Versuchen mit der  $\Delta lexA/lexA^+$  Mutante muss allerdings bedacht werden, dass LexA für *Synechocystis* essentiell ist und es daher nicht möglich ist, eine homozygote  $\Delta lexA$  Mutante herzustellen (Domain et al. 2004).

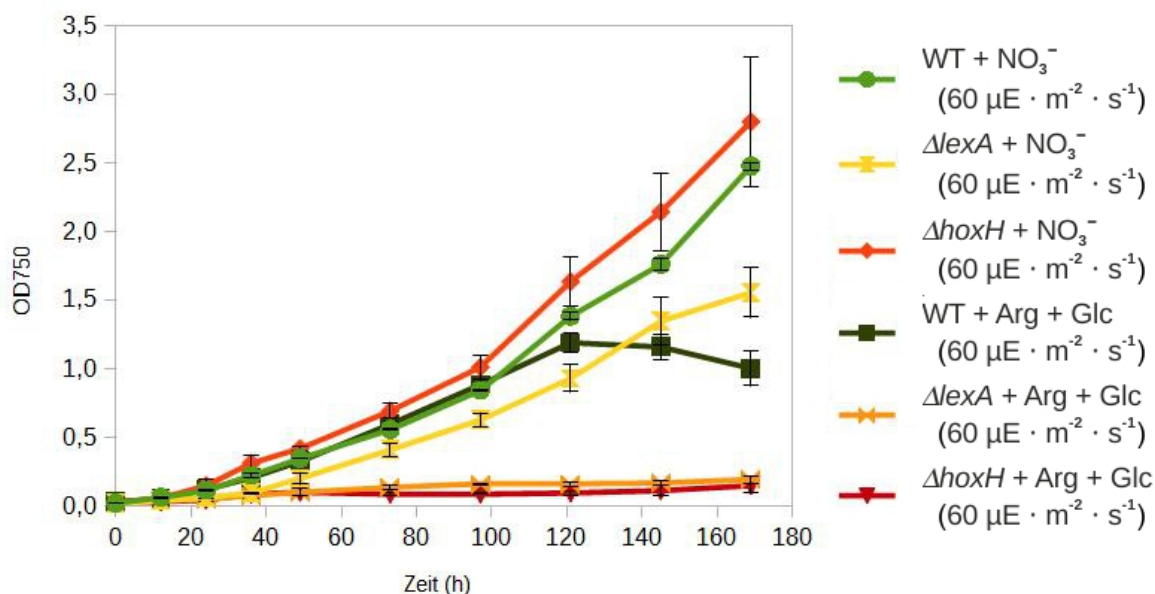


Abbildung 5.11: WT,  $\Delta lexA/lexA^+$  und  $\Delta hoxH$  Mutanten in den Medien BG11 (+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) und BG11<sub>0</sub>AG (+ Arg + Glc); Lichtintensität: Standardlicht.  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW

Die  $\Delta lexA/lexA^+$  Mutante zeigte ähnlich wie die  $\Delta hoxH$  Mutante kein Wachstum bei Nitratmangel und Zugabe von Glucose (siehe Abbildung 5.11). Bei Anwesenheit von Nitrat zeigte die  $\Delta lexA/lexA^+$  Mutante ein etwas schlechteres Wachstum wie der Wildtyp oder die  $\Delta hoxH$  Mutante; dieser Sachverhalt ist aber nicht weiter überraschend, da es sich bei LexA bekannter Weise um einen Transkriptionsfaktor für eine Reihe unterschiedlicher Gene, vor allem Gene in Zusammenhang mit der Aufnahme und Assimilation von anorganischem Kohlenstoff, in *Synechocystis* handelt (Domain et al. 2004). Bereits Domain et al. konnten Unterschiede im Wachstum zwischen WT und  $\Delta lexA/lexA^+$  Mutante bei Wachstum in Medien mit relativ wenig gelöstem anorganischem Kohlenstoff (wie z.B. mit Luft begastes BG11-Medium eines ist) zeigen.



## 5.2 Carotinoidmessungen unter Stressbedingungen

Bei den Wachstumsexperimenten mit dem Wildtypen und der  $\Delta hoxH$  Mutante bei Starklicht bzw. Schwachlicht (siehe Kapitel 5.1.1, Seite 71) fiel eine gelblichere Färbung der Bakteriensuspension Wildtyp in Starklicht, im Gegensatz zu den anderen Bakteriensuspensionen, auf (siehe Abbildung 5.12).

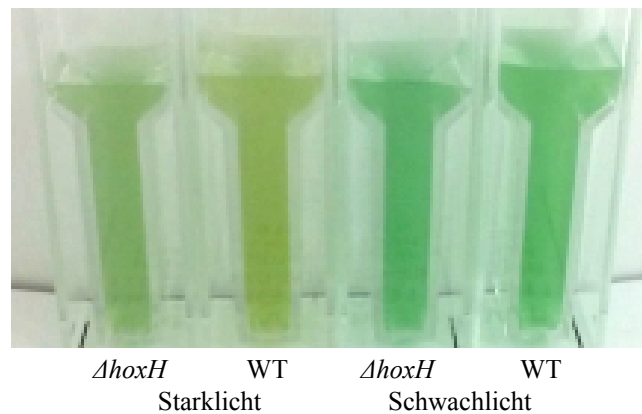


Abbildung 5.12: Suspensionen der  $\Delta hoxH$  Mutante und des Wildtypen in Stark- bzw. Schwachlicht.

Die unterschiedliche Färbung wurde daraufhin auch mittels eines Gesamtspektrums der Bakteriensuspension visualisiert (siehe Abbildung 5.13).

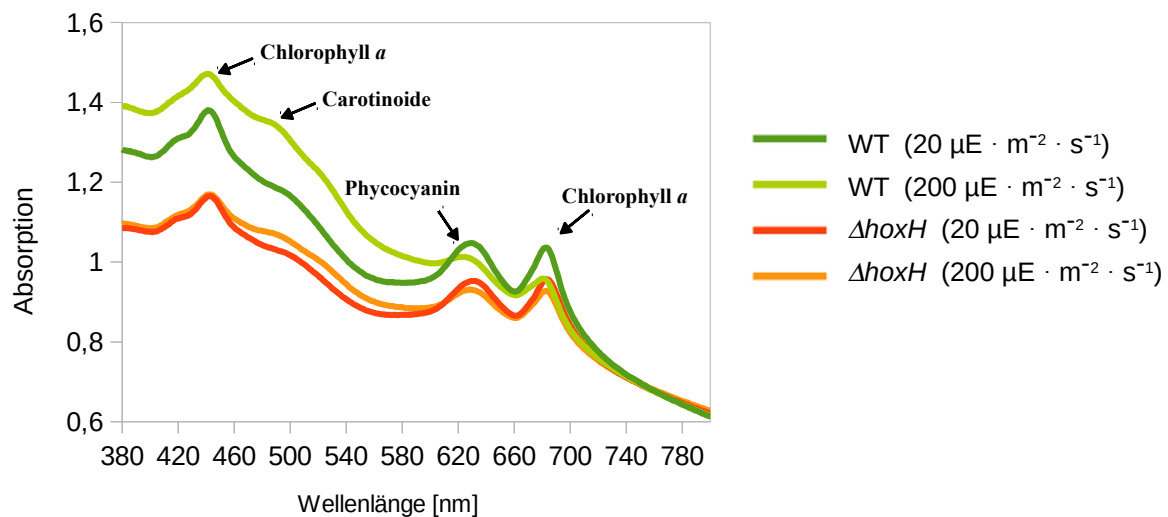


Abbildung 5.13: Gesamtspektren der  $\Delta hoxH$  Mutante und des Wildtyps in Stark- bzw. Schwachlicht. Die Dichte der Kulturen wurde auf eine  $OD_{750}$  von 0,7 eingestellt. Bei Betrachtung des Chlorophyll *a* Peaks bei 440 nm muss bedacht werden, dass dieser stark vom Carotinoid Peak überlagert und dadurch verfälscht wird. Eine bessere Aussage über den Chlorophyllgehalt gibt daher der Peak bei 685 nm.

Da ein erhöhter Carotinoidgehalt auf einen höheren Licht- bzw. Elektronenstress hinweisen kann, ein Zellsuspensionsspektrum aber keine eindeutigen Werte liefert, da sich verschiedene Farbstoffe wie Chlorophyll *a* und Carotinoide überlagern, wurde mit dem Wildtyp und der  $\Delta hoxH$  Mutante Carotinoide extrahiert und photometrische Messungen des Carotinoidgehaltes (siehe Kapitel 4.3, Seite 38 f.) durchgeführt.

Um einen Vergleich des Carotinoidgehaltes zwischen den verschiedenen Zelltypen bzw. Zellen in verschiedenen Medien zu ermöglichen, wurde der Carotinoidgehalt jeweils auf den entsprechenden Chlorophyllgehalt bezogen.

### 5.2.1 Carotinoide messung des Wildtyps und der $\Delta hoxH$ Mutante in BG11, BG11G, BG11<sub>0</sub>A und BG11<sub>0</sub>AG Medien

Um Hinweise zu bekommen, ob die vier verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Medien (BG11: + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; BG11G: + NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + Glc; BG11<sub>0</sub>A: + Arg, BG11<sub>0</sub>AG: + Arg + Glc) wirklich einen unterschiedlichen Elektronenstress bei den Zellen hervorrufen und es Unterschiede zwischen Wildtyp und der  $\Delta hoxH$  Mutante gibt, wurde der Carotinoidgehalt in diesen Medien gemessen. Hierzu wurden die Zellen der Wachstumsreihen aus Kapitel 5.1.5, Seite 77 verwendet.

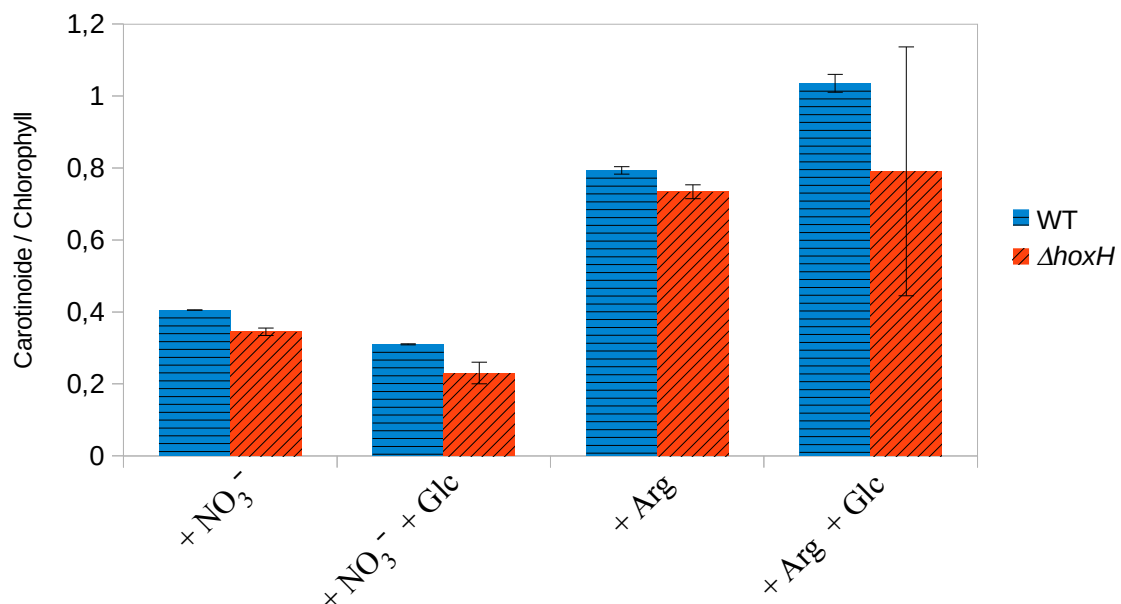


Abbildung 5.14: Carotinoidgehalt von Wildtyp bzw. der  $\Delta hoxH$  Mutante in den vier Medien BG11, BG11G, BG11<sub>0</sub>A und BG11<sub>0</sub>AG in Bezug zum Chlorophyllgehalt nach 96 h Wachstum. Lichtintensität: Standardlicht ( $60 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ).  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW

Der Carotinoidgehalt wurde zu drei Zeitpunkten gemessen: Nach 96 h Wachstum (Abbildung 5.14) und nach 72 h und 120 Wachstum (Abbildungen 7.1 und 7.2, Anhang Seite 141).

Aus den Messungen, die alle ein ähnliches Bild zeigen, wird deutlich, dass der Carotinoidgehalt der Zellen in Medien ohne Nitrat (BG11<sub>0</sub>A und BG11<sub>0</sub>AG) deutlich höher ist als in Zellen in Medien mit Nitrat (BG11 und BG11G). Stärkere Schwankungen des Carotinoidgehaltes zeigen sich bei der  $\Delta hoxH$  Mutante in BG11<sub>0</sub>AG Medium. Diese Schwankungen sind aber wahrscheinlich einerseits auf die sehr geringe Zelldichte unter diesen Bedingungen und den sich daraus ergebenden Schwierigkeiten bei der Extraktion bzw. Messung und andererseits auf den Zustand der Zellen (starker Stress und teilweise sterbend) zurückzuführen.

In keinem der Medien zeigte sich bei der  $\Delta hoxH$  Mutante ein erhöhter Carotinoidgehalt im Vergleich zum Wildtypen.

### 5.2.2 Carotinoide messung des Wildtyps und der $\Delta hoxH$ Mutante bei zwei verschiedenen Lichtintensitäten

Um auf unterschiedlichen Lichtstress in Wildtyp und  $\Delta hoxH$  Mutante schließen zu können, wurden Carotinoide messungen von Zellen vorgenommen, die bei Schwach- bzw. Starklicht (Vergleiche Tabelle 5.1: Lichtintensitäten) in BG11 Medium (+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) gewachsen sind (siehe Abbildung 5.15).

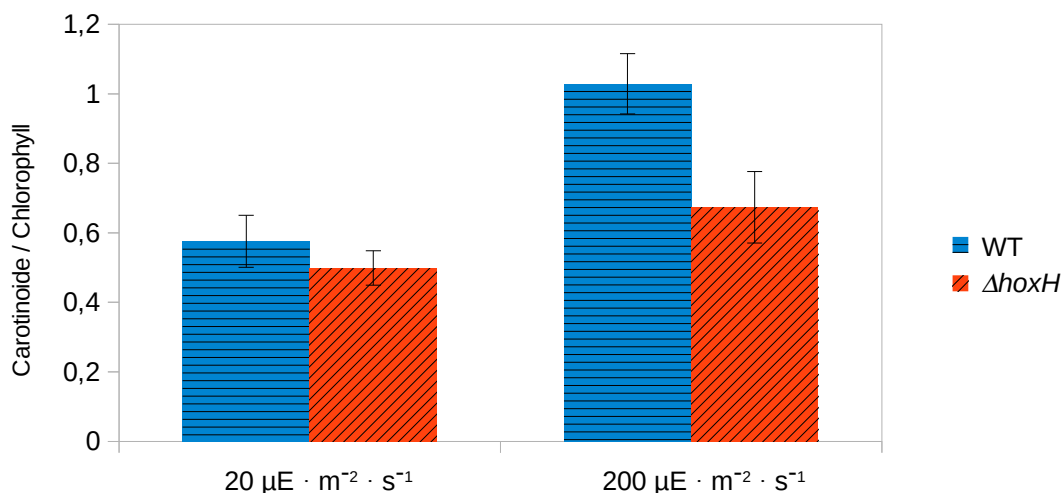


Abbildung 5.15: Carotinoidgehalt vom WT bzw. der  $\Delta hoxH$  Mutante bei Wachstum bei Schwach- bzw. Starklicht in Bezug zum Chlorophyllgehalt in BG11 (+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW

Während der Wildtyp deutlich mit erhöhtem Carotinoidgehalt auf eine höhere Lichtintensität reagiert, tut dies die  $\Delta hoxH$  Mutante weniger stark. So gibt es, im Gegensatz zu Wachstum bei Starklicht, bei Schwachlicht keinen signifikanten Unterschied im Carotinoidgehalt zwischen WT und Mutante.

## 5.3 qPCR

### 5.3.1 qPCR des *hoxH* Gens im WT in BG11, BG11G, BG11<sub>0</sub>A und BG11<sub>0</sub>AG

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem Wachstumsphänotyp der  $\Delta hoxH$  Mutante in BG11<sub>0</sub>AG Medium (siehe Kapitel 5.1 bzw. Abbildung 5.1) nicht um ein Artefakt handelt, wurde versucht eine verstärkte Notwendigkeit der Hydrogenase unter diesen Wachstumsbedingungen durch die Suche nach Unterschieden auf transkriptioneller Ebene bei Wachstum in den verschiedenen Medien (siehe Tabelle 3.2, Seite 28) nachzuweisen.

Die WT Zellen wurden in Knieseröhren, ausgehend von einer Anfangs OD<sub>750</sub> von 0,02 angezogen (siehe Kapitel 4.1.3, Seite 36). Zu fünf Zeitpunkten (nach 12, 24, 36, 48 und 72 h) wurden die Zellen geerntet und die RNA extrahiert und quantifiziert (siehe Kapitel 4.8, Seite 57 ff.). Zur Quantifizierung wurden die Primer *hoxH\_88f* und *hoxH\_88r* sowie *16S\_91f* und *16S\_91r* (siehe Kapitel 3.5.1, Seite 32) verwendet.

Die folgenden Diagramme (Abbildungen 5.16 - 5.18) stellen immer die relative Quantität der *hoxH* mRNA zum Zeitpunkt der Probennahme in den Medien BG11G, BG11<sub>0</sub>A und BG11<sub>0</sub>AG in Relation zu BG11 da. Eine relative Quantität von 1 würde somit bedeuten, dass zum Zeitpunkt der Probennahme gleich viel *hoxH* mRNA in den Zellen im entsprechenden Medium vorhanden war, wie in den Zellen in BG11. Die Fehlerbalken stellen die minimalen und maximalen Werte dar.

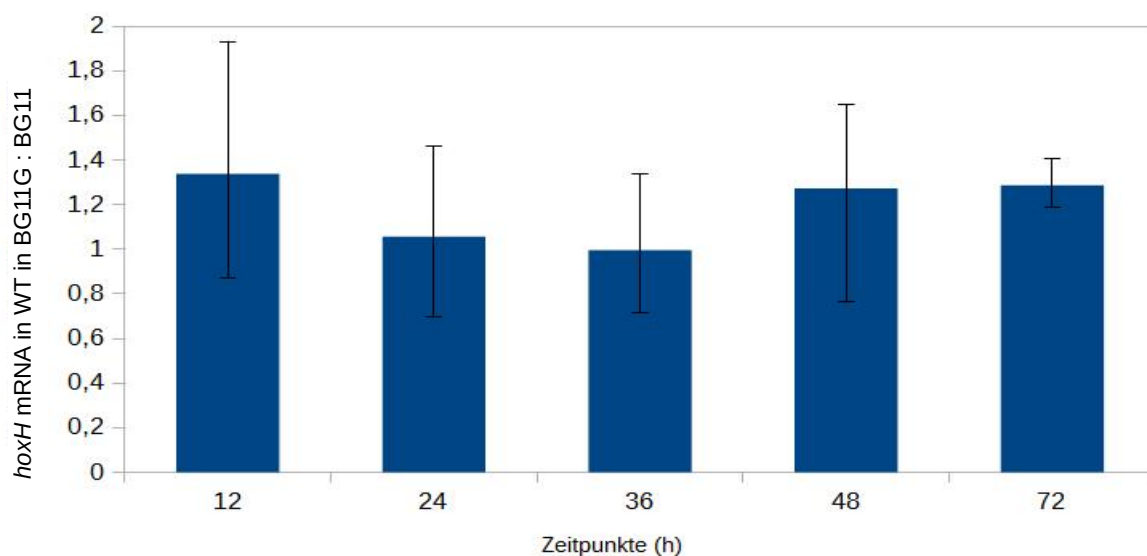


Abbildung 5.16: Verhältnis der *hoxH* mRNA im WT in BG11G (+ NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + Glc) zu BG11 (+ NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) bei Standardlicht (60 μE · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>); Referenzgen 16S rRNA. n = 3, ± min/max

In WT Zellen in BG11G Medium konnte zu den verschiedenen Zeitpunkten ungefähr gleich viel *hoxH* mRNA gemessen werden wie in WT Zellen in BG11 Medium. Alle gemittelten Verhältnisse liegen zwischen 1 und 1,3 (Abbildung 5.16).

In WT Zellen in BG11<sub>0</sub>A Medium konnte zum Zeitpunkt 24 h gemittelt ungefähr achtmal soviel *hoxH* mRNA gemessen werden wie in WT Zellen in BG11 Medium. Zum Zeitpunkt 36 h war noch ungefähr 3,6 mal und zum Zeitpunkt 48 h ungefähr 2,3 mal soviel *hoxH* mRNA in WT Zellen in BG11<sub>0</sub>A wie in WT Zellen in BG11 Medium (Abbildung 5.17).

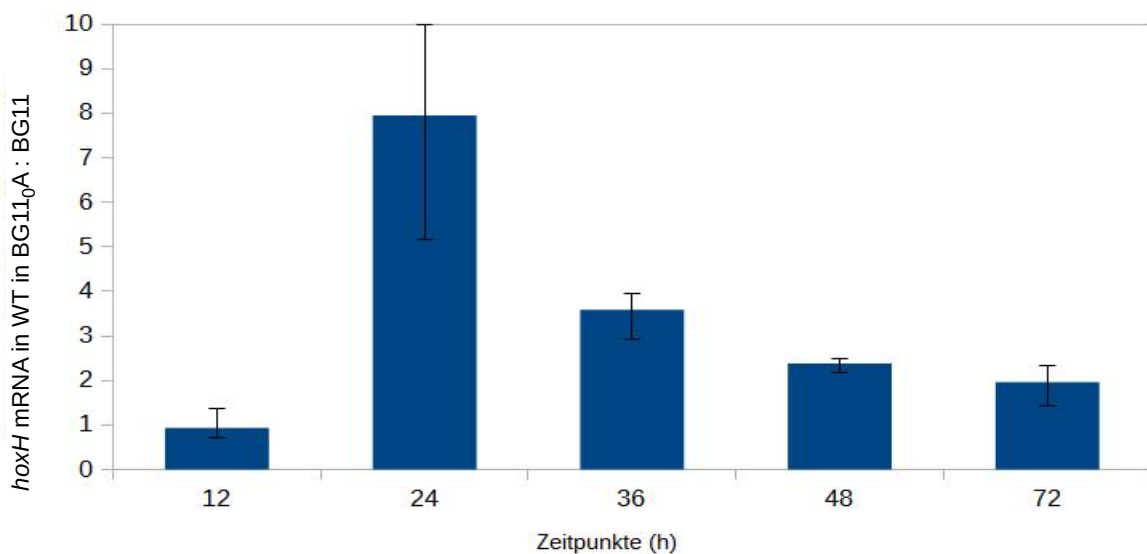


Abbildung 5.17: Verhältnis der *hoxH* mRNA im WT in BG11<sub>0</sub>A (+ Arg) zu BG11 (+ NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) bei Standardlicht (60  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ); Referenzgen 16S rRNA; n = 3,  $\pm$  min/max

In WT Zellen in BG11<sub>0</sub>AG Medium konnte das höchste Verhältnis zu WT Zellen in BG11 Medium nach 36 h mit gemittelt 4,9 gemessen werden. Zu 24 h und zu 48 h war gemittelt ungefähr 2 bzw. 2,4 mal so viel *hoxH* mRNA in den Zellen in BG11<sub>0</sub>AG Medium wie in den Zellen in BG11 Medium vorhanden (Abbildung 5.18).

Bei den Zellen in BG11<sub>0</sub>A bzw. BG11<sub>0</sub>AG konnte sich im allgemeinen ein Trend ablesen lassen, dass es erst zu einem Anstieg an Transkriptmenge kam und nach einem Höhepunkt bei 24 h bzw. 36 h zu einem Abstieg bis zu dem letzten Messzeitpunkt 72 h.

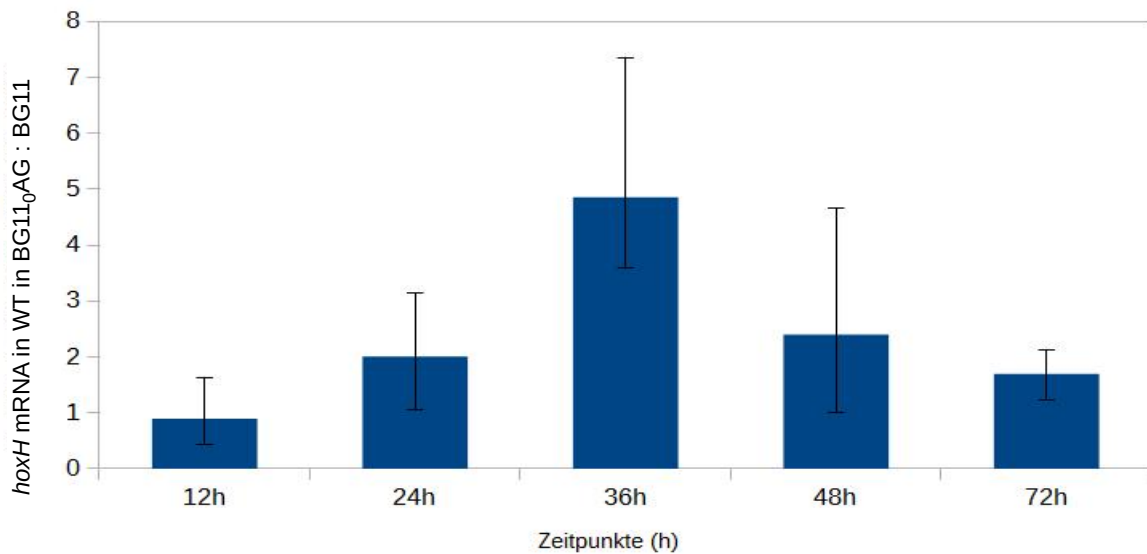


Abbildung 5.18: Verhältnis der *hoxH* mRNA im WT in BG11<sub>0</sub>AG (+ Arg + Glc) zu BG11 (+ NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) bei Standardlicht ( $60 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ); Referenzgen 16S rRNA;  $n = 3$ ,  $\pm$  min/max

Um sicher zu stellen, dass unter den verwendeten Kulturbedingungen zu den Zeitpunkten der Probennahmen dauerhaft Sauerstoff im Medium vorhanden war, wurde, wie in Kapitel 4.5, Seite 40 beschrieben, eine Sauerstoff- und eine Wasserstoffmessung über den gesamten relevanten Zeitraum durchgeführt (Abbildung 5.19).

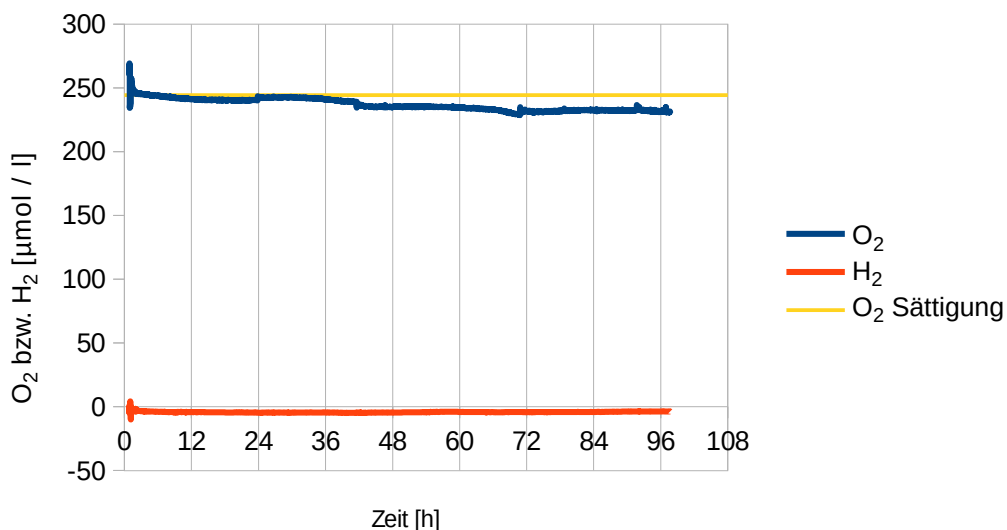


Abbildung 5.19: O<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> Messung im WT unter den für die mRNA Extraktion und qPCR verwendeten Kulturbedingungen

Hierbei zeigte sich, dass innerhalb des gemessenen Zeitraums die Sauerstoffkonzentration immer nahe der Sauerstoffsättigung bei entsprechender Temperatur lag.

### 5.3.2 qPCR der *hox* Gene im WT in BG11 und BG11<sub>0</sub>AG

Von drei zeitlich unterschiedlichen Wachstumsreihen des *Synechocystis* Wildtyps in BG11 bzw. BG11<sub>0</sub>AG Medium wurde die Transkriptmenge nach 24 h über den gesamten Bereich der *hox* Gene inklusive des ORF *sll1222* und der Antisense-RNA *as-sll1223* mittels qPCR verglichen.

Um sowohl die Transkriptmengen der einzelnen ORFs innerhalb einer Bedingung (+ NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in BG11 bzw. +Arg +Glc in BG11<sub>0</sub>AG) als auch die Transkriptmengen zwischen beiden Bedingungen vergleichen zu können, wurde sowohl mit Korrekturfaktoren gearbeitet (siehe Kapitel 4.8.8, Seite 68), wie auch die Transkriptmengen der zwei verschiedenen Bedingungen in Relation zur Transkriptmenge der jeweiligen 16S rRNA berechnet.

Während die Relationen der Transkriptmengen der einzelnen ORFs zwischen den zwei Bedingungen bei allen drei Wachstumsreihen einigermaßen konstant waren, gab es bei der Gesamttranskriptmenge, bezogen auf die 16S rRNA, größere Unterschiede zwischen den drei Wachstumsreihen. Aus diesem Grund wurde für die Darstellung der ORFs bezogen auf die 16S rRNA auf eine Grafik mit Mittelwerten aus den drei Experimenten verzichtet. Dafür finden sich in Abbildung 5.20 exemplarisch die Ergebnisse aus Wachstumsreihe 3. Im Anhang finden sich in den Abbildungen 7.3 und 7.4 (Seite 142) die Ergebnisse aus den anderen beiden Wachstumsreihen.

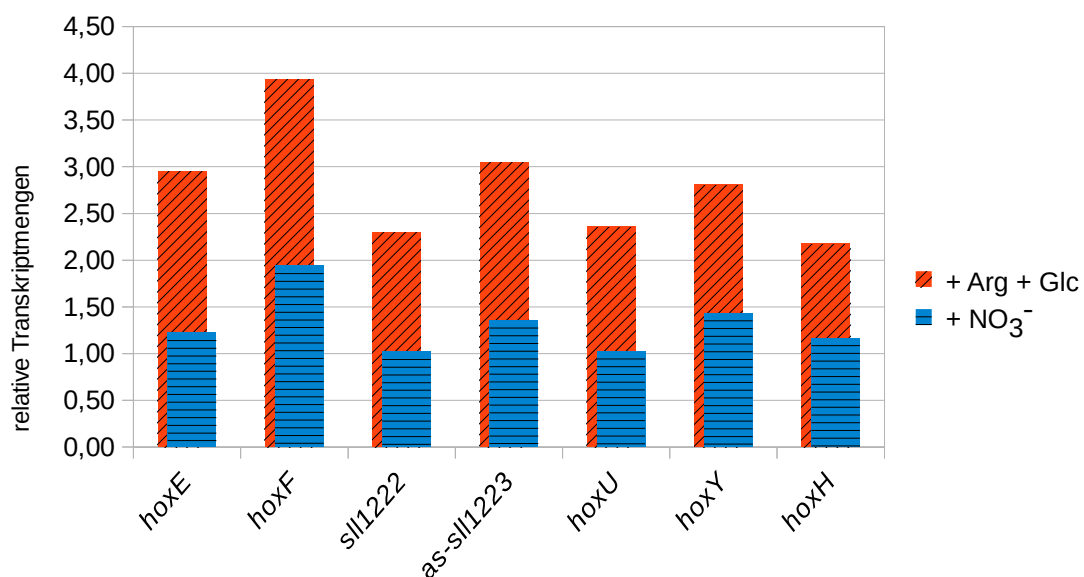


Abbildung 5.20: relative Transkriptmengen der *hox* Gene sowie *sll1222* und *as-sll1223* bezogen auf die jeweilige 16S rRNA Transkriptmenge  $\cdot 10^{-5}$ . Lichtintensität: Standardlicht ( $60 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ); (aus Wachstumsreihe 3)

Es zeigte sich, dass die messbare Transkriptmenge der einzelnen ORFs untereinander nicht gleich war. Die maximale Abweichung fand sich zwischen *hoxF* und *sll1222* in BG11<sub>0</sub>AG in Reihe 2 mit einem Faktor von 2,56 (siehe Abbildung 7.4, Seite 142). In jedem Fall war die Transkriptmenge aller ORFs in BG11<sub>0</sub>AG höher als in BG11.

Durch die Daten der qPCR wird sichtbar, dass Transkripte aller *hox* Gene, sowie *sll1222* und *as-sll1223* im BG11<sub>0</sub>AG Medium in ungefähr gleichem Maße stärker vorhanden sind als in BG11 Medium (siehe Abbildung 5.21). Auch zeigt sich anhand der Fehlerbalken, dass der Faktor zwischen nachweisbarem Transkript in BG11<sub>0</sub>AG und BG11 in Richtung Transkriptionsende unregelmäßiger wird.

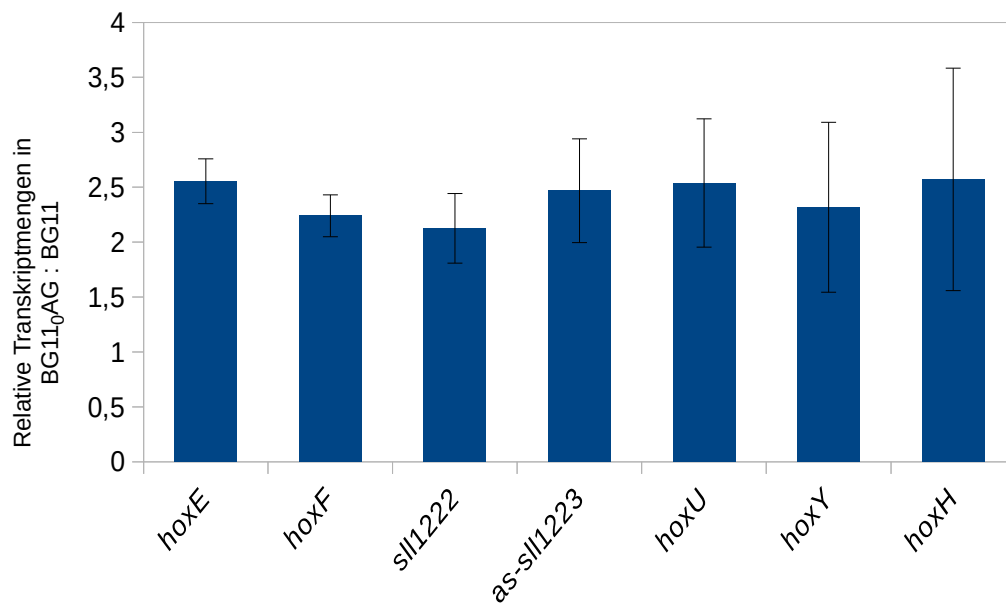


Abbildung 5.21: relative Transkriptmengen der *hox* Gene, *sll1222* und *as-sll1223* in BG11<sub>0</sub>AG Medium (+ Arg + Glc) zu BG11 Medium (+ NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Referenzgen 16S rRNA; Lichtintensität: Standardlicht (60 μE · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>). n = 3, ± STABW



### 5.3.3 qPCR der *hox* Gene im WT pVZ321 und den Antisense Mutanten AS1 und AS3

#### Überprüfung der Antisense Mutanten

Zur Überprüfung der erwarteten erhöhten Antisense Transkription in der Mutante AS1 (siehe Kapitel 3.1.1, Seite 26 f.) wurden per qPCR die relativen Transkriptmengen der *as-sll1223* DNA und der am Genom angrenzenden ORFs *sll1222* und *hoxU* im WT sowie den Mutanten ermittelt und verglichen. Durch Feststellung einer erhöhten Transkription von *as-sll1223* kann nur die Funktionalität der AS1 Mutante (Funktion: erhöhte *as-sll1223* Transkription) erwiesen werden. Da die qPCR nicht zwischen anti- und anti-anti-sense RNA unterscheiden kann, kann man bei den Ergebnissen zur AS3 Mutante (Funktion: *aas-sll1223* Transkription) nur von Indizien zur Funktionalität sprechen. Zur Herstellung der Antisense-Mutanten siehe Kapitel 4.7, Seite 44 ff..

Die Antisense Mutanten sowie der WT pVZ321 wurden in BG11 (siehe Abbildung 5.22) sowie BG11<sub>0</sub>AG (siehe Abbildung 5.23) getestet. Dabei zeigte sich, dass in beiden Medien die Transkriptmenge von *as-sll1223* relativ zu den Transkriptmengen von *sll1222* und *hoxU* bei der AS1 Mutante, in geringerem Maße bei AS3, erhöht war. Die Transkriptmenge von *as-sll1223* im WT pVZ321 war ähnlich den Transkriptmengen von *sll1222* und *hoxU*.

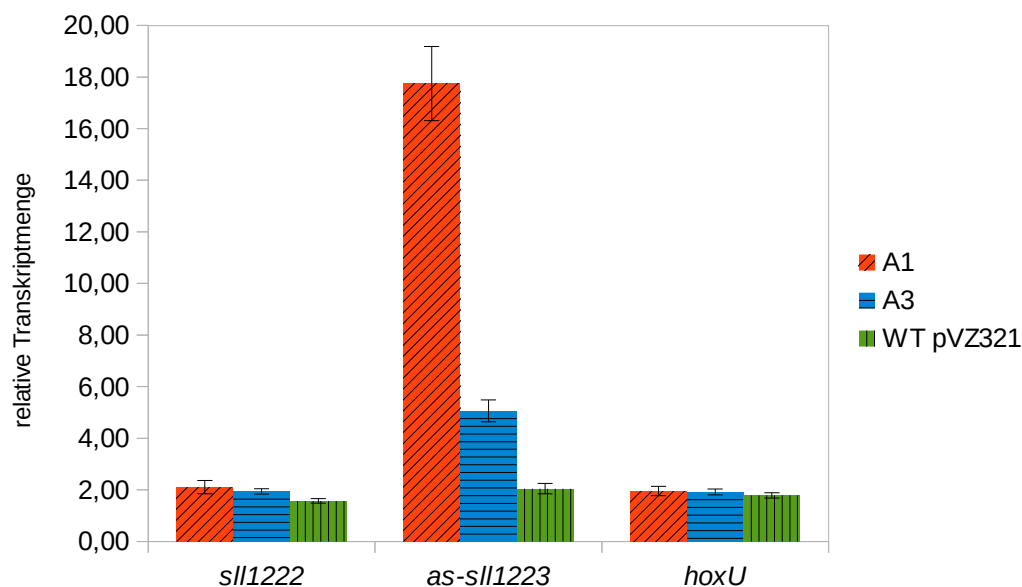


Abbildung 5.22: Überprüfung der Antisense Mutanten in BG11 Medium (+ NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) und Standardlicht (60 μE · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>). Die relativen Transkriptmengen beziehen sich jeweils auf die 16S rRNA Transkriptmenge · 10<sup>-5</sup>. n = 3, ± STABW

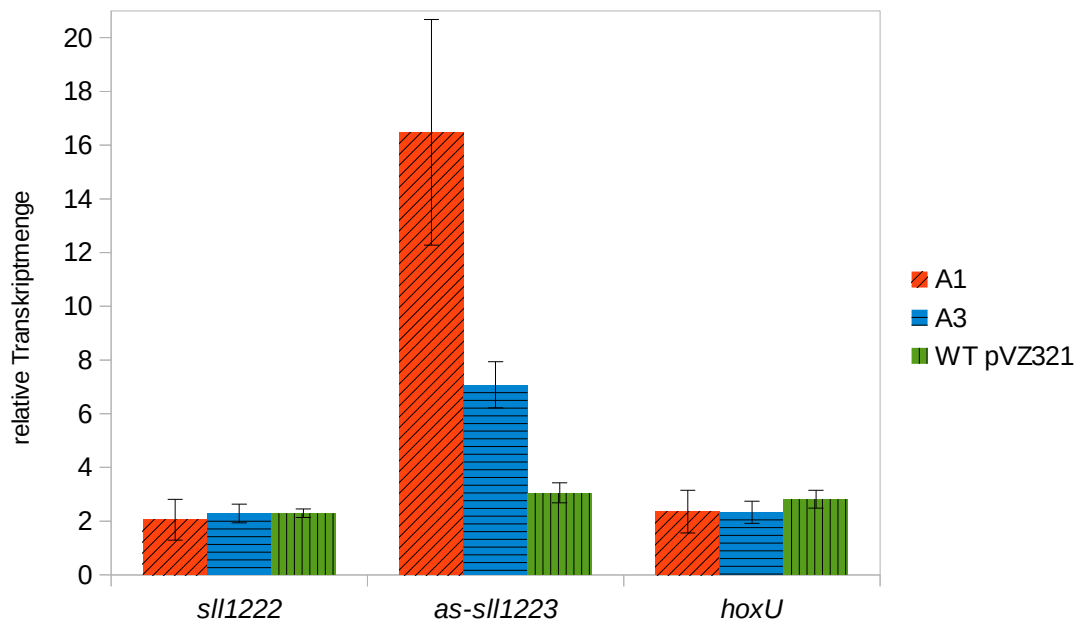


Abbildung 5.23: Überprüfung der Antisense Mutanten in  $BG11_0AG$  (+Arg +Glc) und Standardlicht ( $60 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ). Die relativen Transkriptmengen beziehen sich jeweils auf die 16S rRNA Transkriptmenge  $\cdot 10^5$ .  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW

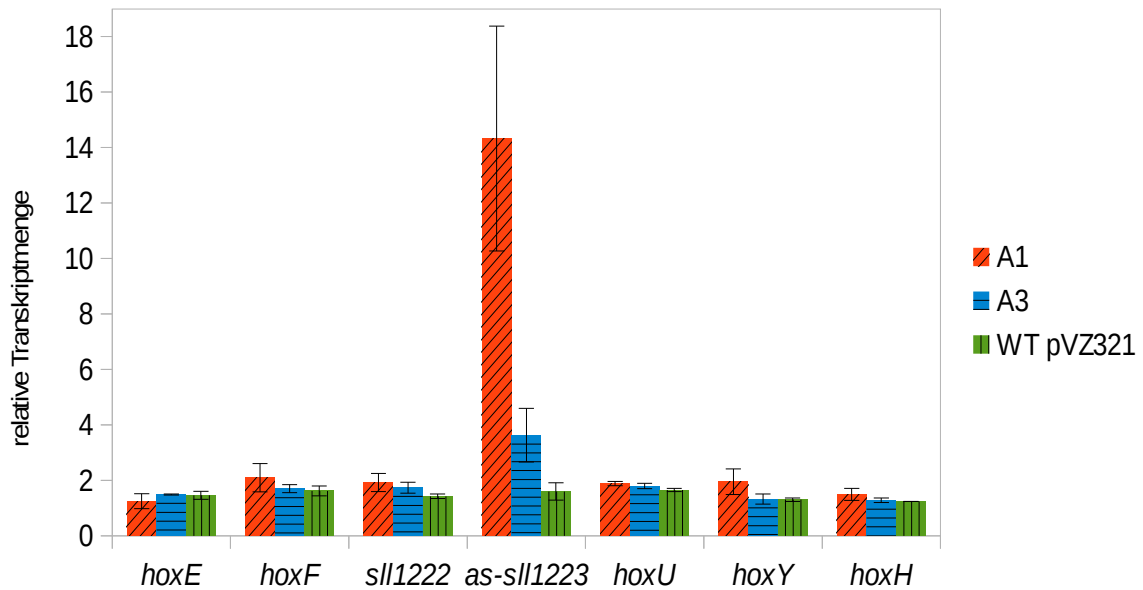
Dass in der Mutante A3 weniger *as-sll1223* bzw. *aas-sll1223* RNA gemessen werden konnte, könnte daran liegen, dass in dieser Mutante sowohl *as-sll1223* (codiert auf dem Genom) wie auch *aas-sll1223* (codiert auf dem Plasmid) erzeugt werden kann. Wie in der Einleitung beschrieben, kann die Bildung von doppelsträngiger RNA durch Antisense RNA zu deren Instabilität führen (siehe Kapitel 1.2.4, Seite 5 bzw. Georg und Hess 2011).

### qPCR der Antisense Mutanten und des WT pVZ321 in BG11 und $BG11_0AG$ Medium

Um zu überprüfen, ob eine erhöhte Expression von *as-sll1223* einen Einfluss auf die Transkription der einzelnen *hox* Gene hat, wurde die Transkriptmenge der *hox* Gene sowie *sll1222* und *as-sll1223* (bzw. *aas-sll1223*) im WT pVZ321 sowie den Antisense Mutanten A1 und A3 nach 24 h Wachstum in BG11 bzw.  $BG11_0AG$  bestimmt (siehe Abbildung 5.24).

Wie schon bei den Experimenten zur Überprüfung der Antisense Mutanten (siehe Seite 88 f.) zeigte sich in der AS1 Mutante eine erhöhte *as-sll1223* Transkription und der AS3 Mutante eine erhöhte *aas-sll1223* Transkription. Die Transkriptmengen der anderen Gene waren sowohl untereinander als auch zwischen WT pVZ321 und den Antisense Mutanten ähnlich.

a)



b)

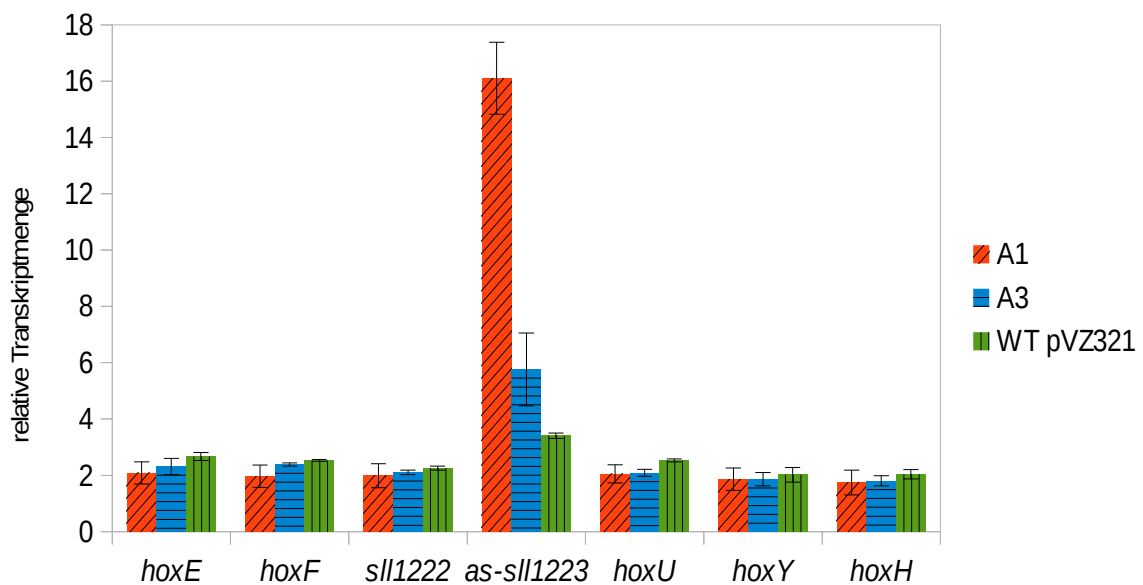


Abbildung 5.24: Relative Transkriptmengen der *hox* Gene sowie *sll1222* und *as-sll1223* im WT pVZ321 und den Antisense Mutanten AS1 und AS3 bei 24h Wachstum in (a) BG11 Medium (+ NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) bzw. (b) BG11<sub>0</sub>AG Medium (+ Arg + Glc) bei Standardlicht (60 μE · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>). Die dargestellten Transkriptmengen beziehen sich auf die 16S rRNA Transkriptmenge · 10<sup>-5</sup>. n = 3, ± STABW

## qPCR der Antisense Mutanten und des WT pVZ321 im Dunkeln und unter anoxischen Bedingungen

Um eine weitere Bedingung zu testen, unter der sich schon eine unterschiedliche Transkription der *hox* Gene gezeigt hat (Kiss et al. 2009) und um zu erfahren, ob unter dieser Bedingung eine erhöhte Transkription von *as-sll1223* Auswirkungen auf die Transkription der *hox* Gene hat, wurde eine qPCR von WT pVZ321 und der Antisense Mutanten, die 150 Minuten anoxisch im Dunkeln inkubiert waren, durchgeführt. Der Zeitpunkt 0 ( $t = 0$ ) zeigt die Transkriptmenge in den Zellen direkt vor der Behandlung der Zellen. Daraufhin wurden die Zellen 15 Minuten mit Stickstoff im Dunkeln begast, das Ausgasen von Sauerstoff mit einer Unisense Elektrode überprüft ( $O_2$ -500 Mikrosensoren, Unisense, Aarhus, DK) und dann 150 Minuten im Dunkeln stehen gelassen ( $t = 150'$ ). Daraufhin wurden die Zellen für 75 Minuten mit Luft begast und mit Standardlicht ( $60 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ) beleuchtet ( $t = +75'$ ) (siehe Abbildung 5.25).

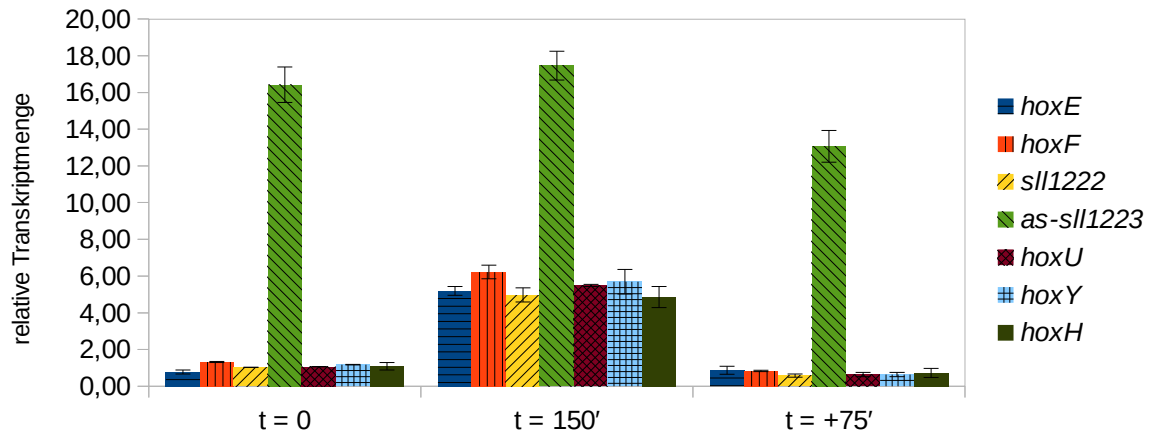
Wie schon in den vorhergehenden Experimenten zeigten die Antisense Mutanten eine im Vergleich zum WT pVZ321 erhöhte Transkription an *as-sll1223* bzw. *aas-sll1223*. Alle *hox* Gene lagen nach 150 Minuten Dunkelheit und anoxischen Bedingungen in allen Mutanten in ähnlicher Größenordnung (*hoxH*: 3,65 fach bis *hoxY*: 4,98 fach im WT pVZ321; *hoxH*: 4,47 fach bis *hoxE*: 6,73 fach in AS1; *hoxH*: 4,73 fach bis *hoxE*: 6,98 fach in AS2) höherer Transkriptmenge vor als unter photoautotrophen oxischen Bedingungen. Ein Unterschied in der Transkription innerhalb der *hox* Gene konnte weder zwischen den verschiedenen Bedingungen noch zwischen den verschiedenen Zelltypen gefunden werden.

Die Antisense-RNA *as-sll1223* scheint somit unter den getesteten Bedingungen

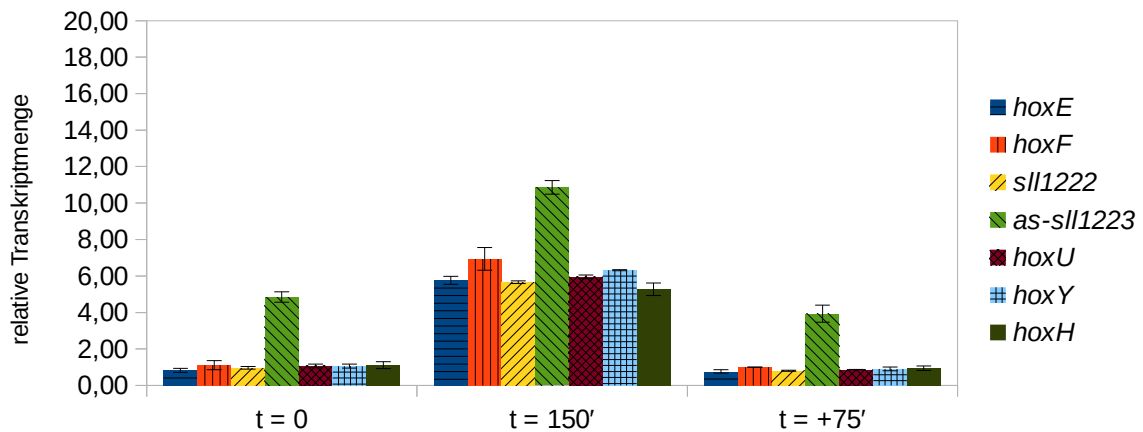
- +  $NO_3^-$ , Standardlicht ( $60 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ),
- + Arg + Glc, Standardlicht ( $60 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ),
- +  $NO_3^-$ , dunkel und anoxisch,

keinen Einfluss auf die Transkription der *hox* Gene zu haben.

a)



b)



c)

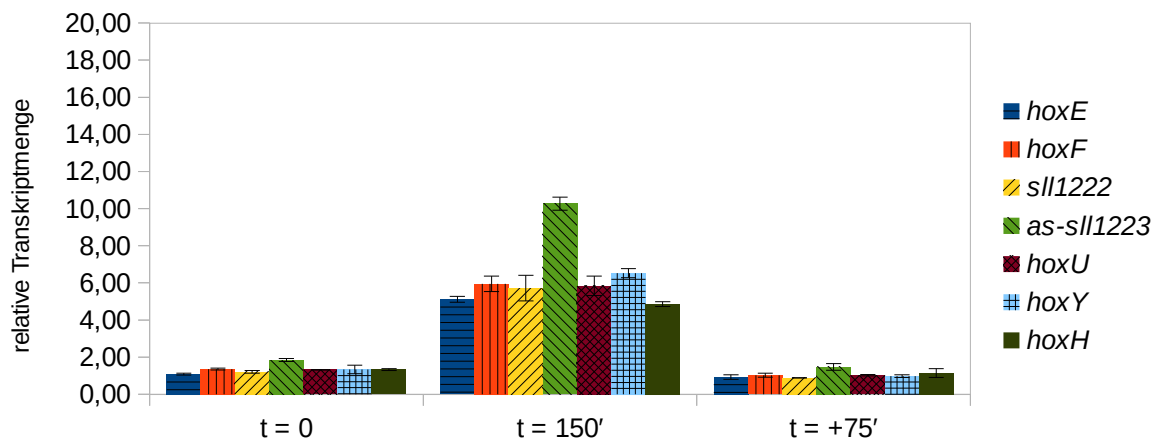


Abbildung 5.25: Relative Transkriptmengen der Antisense Mutante A1 (a), Anti-Antisense Mutante A3 (b) und WT pVZ321 (c) in BG11 Medium (+ NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) vor Behandlung (t = 0), nach 150 Minuten Dunkelheit und anoxisch (t = 150') und darauf folgender Beleuchtung und Begasung mit Luft für 75 Minuten (t = +75'); Lichtintensität: Standardlicht (60  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ); n = 3,  $\pm$  STABW

## 5.4 Wasserstoffmessungen

### 5.4.1 Wasserstoffmessungen in *Synechocystis* WT in verschiedenen Medien

Um Rückschlüsse auf die Wichtigkeit der Hydrogenase unter verschiedenen Bedingungen in *Synechocystis* ziehen zu können, wurde die Aktivität der Hydrogenase in den Medien BG11, BG11G, BG11<sub>0</sub>A und BG11<sub>0</sub>AG (siehe Tabelle 3.2, Seite 28) mit Wasserstoffsensoren (H<sub>2</sub>-500 Mikrosensoren, Unisense, Aarhus, DK) unter fermentativen Bedingungen und unmittelbar während Beleuchtung nach fermentativen Bedingungen (Photowasserstoff) gemessen (siehe Methoden, Kapitel 4.5, Seite 40 ff.).

#### Wasserstoffmessungen unter fermentativen Bedingungen

Für die Messungen unter fermentativen Bedingungen wurden drei zeitlich unabhängige Experimente mit je zwei aufeinanderfolgenden Messungen durchgeführt. Da die Wasserstoffproduktionsraten zwischen den drei Experimenten stark schwankte, werden die drei Experimente hier einzeln dargestellt (siehe Abbildungen 5.26, 5.27 und 5.28). Abbildungen der gemessenen Wasserstoffkonzentrationen im Zeitverlauf finden sich im Anhang (siehe Abbildungen 7.5, 7.6 und 7.7).

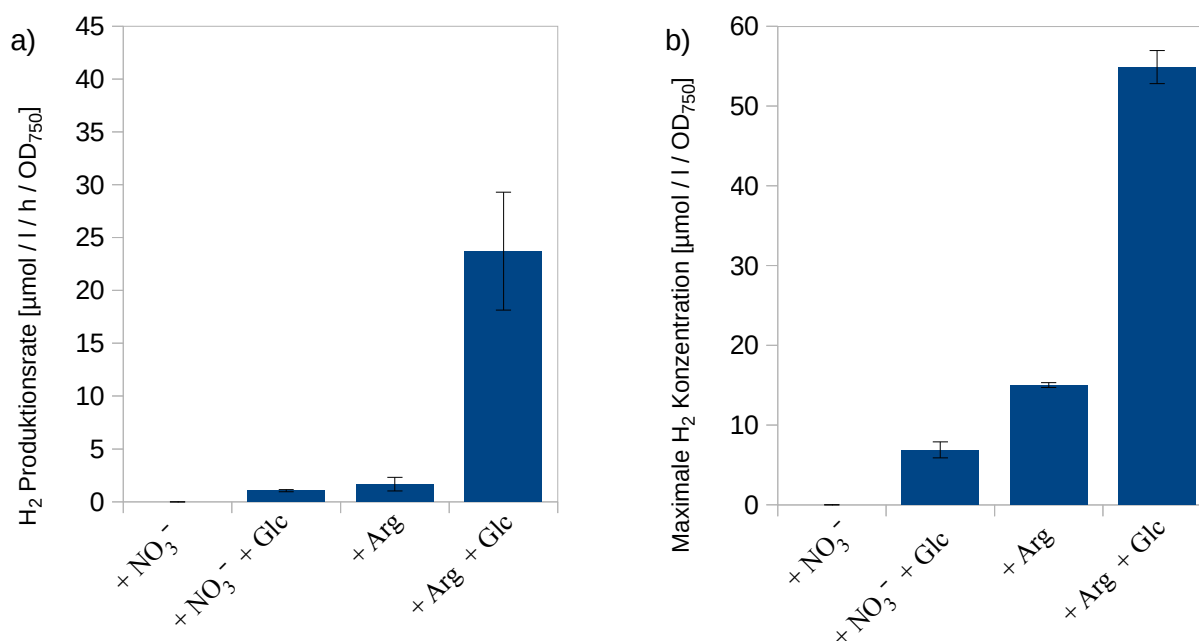


Abbildung 5.26: Experiment 1 der fermentativen Wasserstoffproduktion. a) Wasserstoffproduktionsrate; b) maximale Wasserstoffkonzentration.  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW

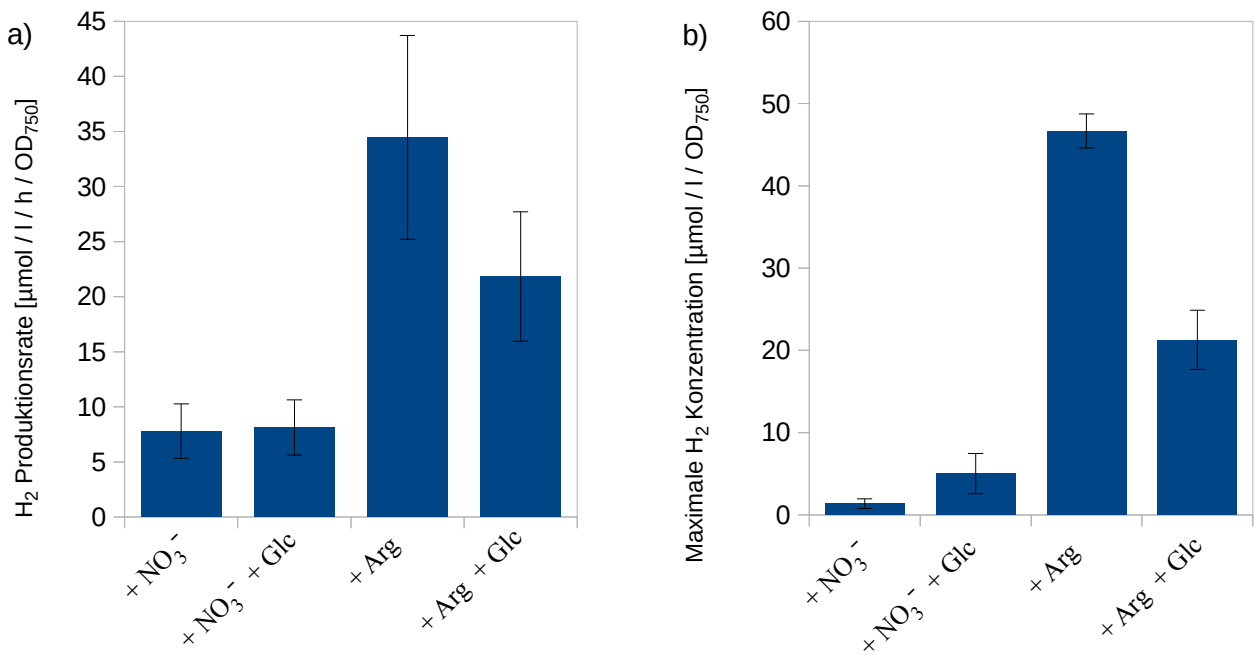


Abbildung 5.27: Experiment 2 der fermentativen Wasserstoffproduktion. a) Wasserstoffproduktionsrate; b) maximale Wasserstoffkonzentration.  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW

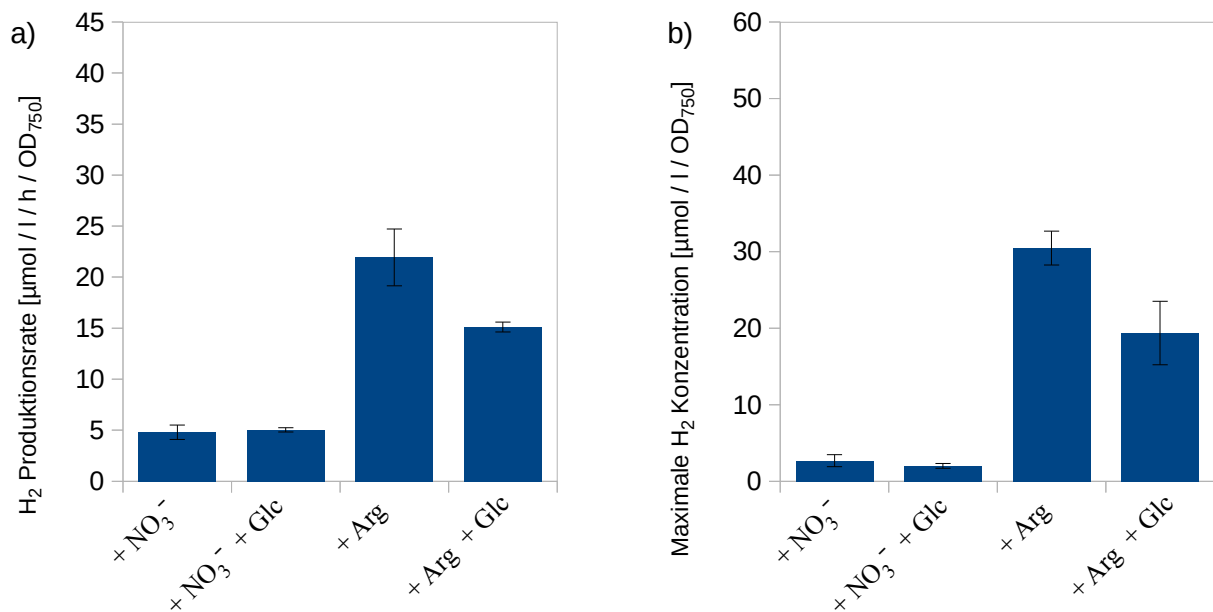


Abbildung 5.28: Experiment 3 der fermentativen Wasserstoffproduktion. a) Wasserstoffproduktionsrate; b) maximale Wasserstoffkonzentration.  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW

In Experiment 1 wurde neben den Wildtypen in den verschiedenen Medien als Negativkontrolle die Wasserstoffproduktion der  $\Delta\text{hoxH}$  Mutante in BG11<sub>0</sub>AG Medium gemessen. Wie erwartet, zeigt diese Messung eine Nulllinie (siehe Abbildung 7.5, Anhang). Für die Wildtypen in den

verschiedenen Medien lässt sich sagen, dass in jedem Experiment sowohl die Wasserstoffproduktionsrate als auch die maximale Wasserstoffkonzentration entweder in BG11<sub>0</sub>A oder in BG11<sub>0</sub>AG am höchsten war.

## Photowasserstoffmessungen

Die Photowasserstoffmessungen wurden, wie in Kapitel 4.5 (Seite 40 ff.) beschrieben, durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 5.29 dargestellt.

Die Ergebnisse der Messungen, sowohl der Produktionsraten als auch der Photowasserstoffkonzentrationen, waren sehr ähnlich und mit großen Überschneidungen bei den Fehlerbalken. Somit kann bezüglich der Photowasserstoffproduktion von keiner höheren Aktivität der Hydrogenase bei Nitratmangel (wie bei der fermentativen Wasserstoffproduktion, Seite 93 ff.) ausgegangen werden.

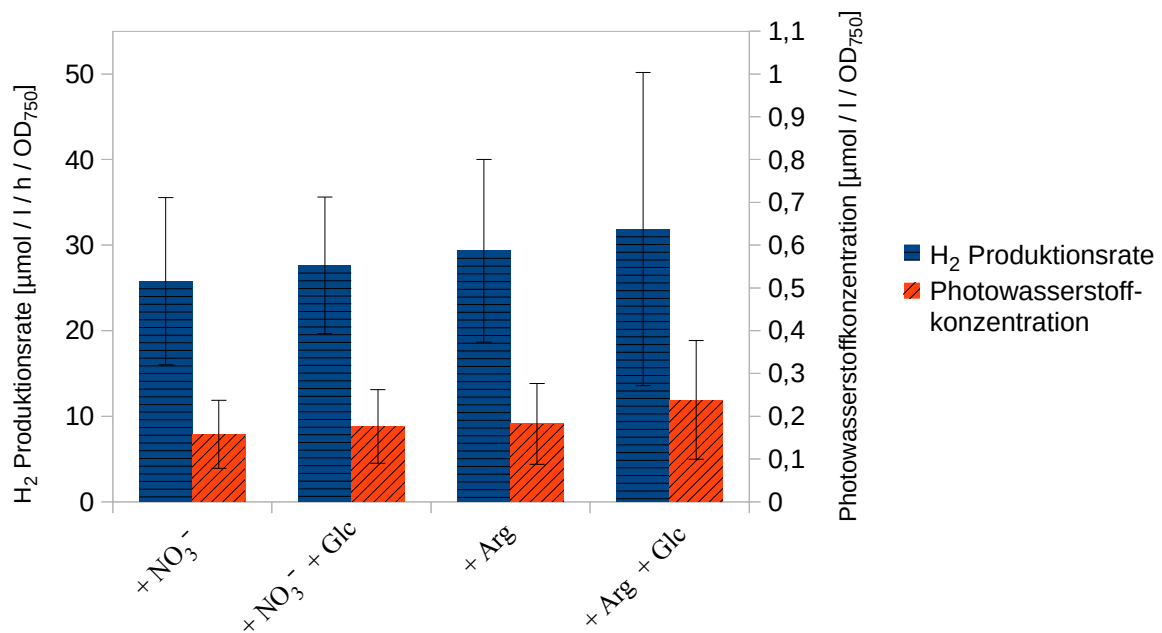


Abbildung 5.29: Messungen der Photowasserstoffproduktion dargestellt als Produktionsrate und als Photowasserstoffkonzentration. Lichtintensität:  $1000 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ;  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW



### 5.4.2 Wasserstoffmessungen bei Licht und Anwesenheit von Sauerstoff

Die Messung von Wasserstoff bei Beleuchtung, Nitratmangel, Anwesenheit von Glucose und Sauerstoff sollte Aufschluss darüber geben, ob unter diesen Bedingungen, bei denen die  $\Delta hoxH$  Mutante kein Wachstum mehr aufweist, die Hydrogenase des WT Wasserstoff produziert (Abbildung 5.30).

Der erste Teil der Messung wurde analog der fermentativen Wasserstoffmessungen (siehe Kapitel 4.5, Seite 40 ff.) durchgeführt, um zu zeigen, dass die Zellen ( $OD_{750} = 5$ ) unter anoxischen Bedingungen und Dunkelheit in der Lage waren, Wasserstoff zu produzieren (0 – 0,73 h). In diesem Zeitraum stieg die Wasserstoffkonzentration im Medium bis  $21 \mu\text{mol} / \text{l}$ . Daraufhin wurde Licht eingeschaltet und der produzierte Wasserstoff von den Zellen wieder konsumiert (0,73 – 0,85 h). Während dieser Zeit konnte keine Zunahme von Sauerstoff im Medium gemessen werden. Bei 0,85 h wurde mit steriler Raumluft begast, bis eine Sauerstoffsättigung des Mediums stattgefunden hatte (0,95 h). Daraufhin wurde die Begasung abgeschaltet. Während der Sauerstoffgehalt nun bis zu einem schwankenden Gleichgewicht zwischen Produktion, Konsum und Ausgasung anstieg, konnte keine Wasserstoffproduktion gemessen werden. Das Ergebnis konnte bei Wiederholung, auch bei verschiedenen Zelldichten reproduziert werden.

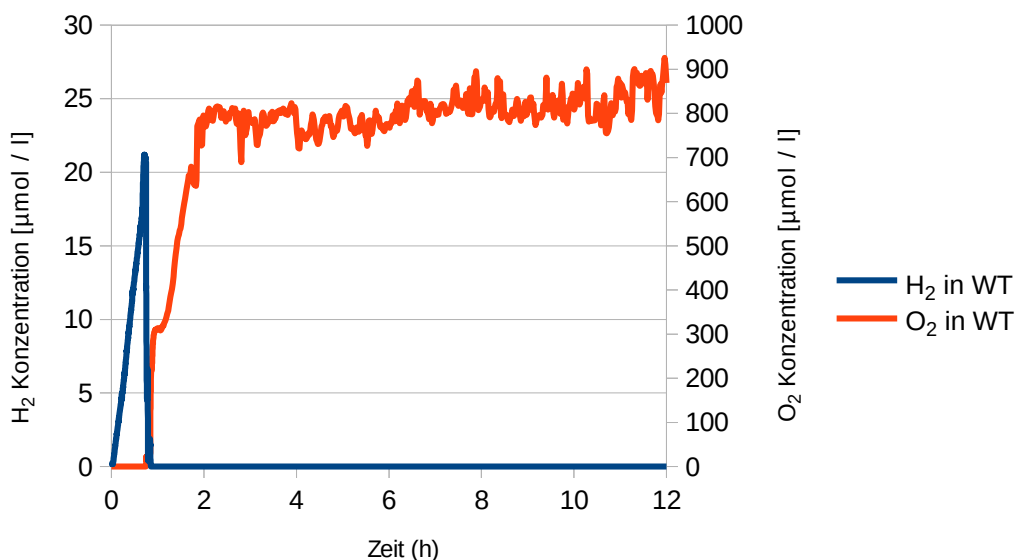


Abbildung 5.30: Wasserstoffmessung im WT bei Beleuchtung ( $60 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), Nitratmangel, Anwesenheit von Glucose und Sauerstoff

### 5.4.3 Wasserstoffmessungen in den Antisense Mutanten A1 und A3.

In drei unabhängigen Experimenten mit je drei aufeinanderfolgenden Messungen wurden die Aktivität der Hydrogenase der Mutanten A1 und A3 (Expression von *as-sll1223* (AS1) bzw. *aas-sll1223* (AS3), siehe Kapitel 3.1.1, Seite 26 f.) mittels einer Clark Elektrode und Methylviologen gemessen (siehe Kapitel 4.6, Seite 42 f.).

Da die Hydrogenaseaktivität zwischen den einzelnen Messungen stark schwankte, werden die drei Experimente hier einzeln dargestellt (siehe Abbildung 5.31).

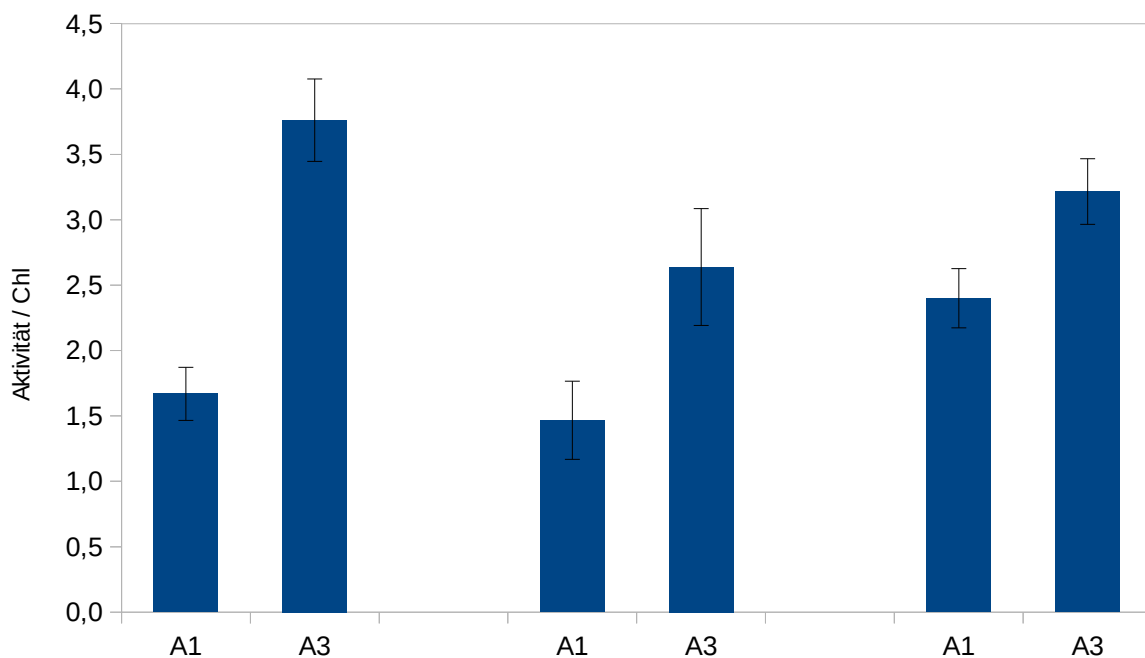


Abbildung 5.31: Aktivität der Hydrogenase relativ zum Chlorophyllgehalt in den Mutanten A1 und A3 in drei unabhängigen Experimenten.  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW

In allen drei Experimenten zeigte sich in der Antisense Mutante A1 eine geringere Hydrogenaseaktivität als in der Anti-Antisense Mutante A3. Die Faktoren schwankten zwischen den Experimenten aber relativ stark (2,25 in Experiment 1 bis 1,34 in Experiment 3).

## 6 Diskussion

### 6.1 Untersuchungen der Antisense-RNA as-sll1223

Die DNA der Antisense-RNA as-sll1223 liegt zwischen den Hydrogenase Genen *hoxEF* und *hoxUYH* (Mitschke et al. 2011) (siehe Abbildung 1.4, Seite 19). Kiss et al. 2009 zeigten eine unterschiedlich starke Transkription der Gene *hoxEF* und *hoxUYH* unter anoxischen Bedingungen. In Folge wurde angenommen, dass die Antisense-RNA wegen ihrer Lage zwischen den verschiedenen stark transkribierten Regionen unter bestimmten Bedingungen regulierend auf die Transkription wirken könnte, was in dieser Arbeit untersucht wurde.

Unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen konnte der Antisense-RNA as-sll1223 keine Funktion in der Regulation der Hydrogenase Gene nachgewiesen werden. Weder in BG11-Medium (+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (siehe Abbildung 5.24 a, Seite 90) noch in BG11<sub>0</sub>AG-Medium (+ Arg + Glc) (siehe Abbildung 5.24 b, Seite 90) konnte in der Antisense Überexpressionsmutante oder der Anti-Antisense Überexpressionsmutante eine abweichende Transkription der *hox* Gene im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden. Auch in BG11-Medium in Dunkelheit und anoxischen Bedingungen konnten keine Unterschiede in der Expression der verschiedenen Hydrogenasegene zwischen Wildtyp und den Antisense Mutanten gezeigt werden (siehe Abbildung 5.25, Seite 92, t = 150'). Auch die Transkription der Hydrogenasegene untereinander wies bei allen Experimenten im Wildtyp und den Überexpressionsmutanten keine größeren Unterschiede auf. Dies ist auch deshalb bemerkenswert, da in einer anderen Arbeit (Kiss et al. 2009) Unterschiede in der Transkription zwischen den verschiedenen Hydrogenasegenen im WT unter anoxischen dunklen Bedingungen gezeigt wurde. Die Untersuchung bei anoxischen Bedingungen in dieser Arbeit beruht methodisch auf der Arbeit von Kiss et al. mit dem Unterschied, dass hier Anoxizität mittels Begasung mit Stickstoff erreicht wurde, während bei Kiss et al. hierfür Glucose und Glucoseoxidase verwendet wurden. Dass Kiss et al. Unterschiede in der Expression fanden, könnte also an der Verwendung von Glucose (und Glucoseoxidase) liegen.

Messungen der Wasserstoffproduktionsrate der Antisense Mutante und der Anti-Antisense Mutante (siehe Abbildung 5.31, Seite 97) zeigten eine höhere Wasserstoffproduktionsrate in der Anti-Antisense Mutante. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Antisense-RNA in irgendeiner Weise die Expression der Hydrogenase vermindert. Weitere Untersuchungen bezüglich der Funktion und der Bedingungen, unter denen dies geschehen kann, wären notwendig.

## 6.2 Wachstumsphänotyp der $\Delta hox$ Mutanten bei oxischen, mixotrophen und nitratlimitierten Bedingungen

Wie gezeigt werden konnte, weist die  $\Delta hoxH$  Mutante in  $O_2$  gesättigtem (ca. 240 – 250  $\mu M O_2$ ) BG11<sub>0</sub>AG Medium (siehe Tabelle 3.2 Übersicht Medien für *Synechocystis* sp. PCC6803, Seite 28) bei Dauerbeleuchtung ein geringes (im Vergleich zum WT) bis gar kein Wachstum auf (siehe Abbildung 5.1, Seite 70, Abbildung 5.5, Seite 74 sowie Abbildung 5.19, Seite 85). Wegen dieses physiologischen Unterschiedes zum WT ist für das „nicht Wachsen“ bzw. „wenig Wachsen“ unter dieser speziellen Bedingung die Bezeichnung „Wachstumsphänotyp“ zutreffend. Diese Beobachtung konnte in den anderen drei benutzten Medien nicht gemacht werden (siehe Abbildung 5.10, Seite 78). Dieser Wachstumsphänotyp weist auf die Wichtigkeit beziehungsweise auf eine Funktion der Hydrogenase bei der hier getesteten Bedingung „ $O_2$  gesättigtes BG11<sub>0</sub>AG Medium bei Dauerbeleuchtung“ bzw. allgemeiner bei „oxischen, mixotrophen, nitratlimitierten Bedingungen“ hin.

Ein ähnlicher Phänotyp, nämlich „Kein Wachstum in BG11<sub>0</sub>AG Medium bei Hell / Dunkel Wechsel“ wurde bereits beschrieben (Gutekunst et al. 2014). Der herauszuhebende Unterschied ist, dass bei den Experimenten in dieser Arbeit Dauerbeleuchtung herrschte und somit andauernd Sauerstoff per Photosynthese produziert werden konnte und die dauerhafte Sauerstoffsättigung des Mediums auch gemessen wurde (Abbildung 5.19, Seite 85). Dies ist besonders bemerkenswert, da die bidirektionale [NiFe]-Hydrogenase von *Synechocystis* als sauerstoffsensitiv gilt und eine Inaktivierung des Enzyms (bezogen auf die Oxidation von  $H_2$ ) bereits bei Anwesenheit von 7  $\mu M$  Sauerstoff beobachtet wurde (McIntosh et al. 2011).

Theoretisch wäre es möglich, dass zwar im Medium Sauerstoff gemessen werden kann, jedoch innerhalb der Zellen keine oder nur kleine Sauerstoffkonzentrationen vorliegen, da die Zellen zum Beispiel durch Atmung mehr Sauerstoff verbrauchen, als sie durch Photosynthese produzieren. Messungen von Sauerstoff in beleuchtetem aber nicht begastem BG11<sub>0</sub>AG Medium (siehe Abbildung 5.30, Seite 96) weisen aber auf Gegenteiliges hin: Die gemessene  $O_2$ -Konzentration ist weit über der Sauerstoffsättigung (die bei ca. 250  $\mu M$  liegt, siehe Tabelle 7.2, Anhang), was darauf hinweist, dass die Zellen stark oxygen photosynthetisieren und weit mehr Sauerstoff produziert als verbraucht wird. Es ist daher sehr unwahrscheinlich, dass innerhalb der Zellen kein Sauerstoff vorhanden ist.

Wie in der Einleitung beschrieben (siehe Kapitel 1.4.6, Seite 21), werden in BG11<sub>0</sub>AG Medium RuBisCO, das Schlüsselenzym des Calvin-Benson Zyklus, herunterreguliert (Oesterhelt et al. 2007) und der Nitrat- und Nitritreduktase fehlt das Substrat. So können die Zellen zwei wichtige Wege, um reduziertes Ferredoxin zu oxidieren, nur eingeschränkt bzw. gar nicht mehr nutzen. Ferredoxine übernehmen in verschiedensten metabolischen Reaktionswegen die Aufgabe von Elektronenakzeptoren bzw. Elektronendonoren (Cassier-Chauvat und Chauvat 2014), wie z.B. in der Photosynthese (siehe Abbildung 1.2, Seite 10) oder der Zellatmung (siehe Abbildung 1.3, Seite 12). Dass der WT unter diesen Bedingungen wachsen kann, während die  $\Delta hoxH$  Mutante nicht wächst, könnte also bedeuten, dass die Hydrogenase auch bei Anwesenheit von Sauerstoff und photosynthetischer Aktivität andauernd die Funktion eines Elektronenventils übernimmt bzw. ermöglicht, dass für Zellwachstum ausreichend oxidiertes Ferredoxin zur Verfügung steht.

Bis jetzt wurden, abgesehen von dem oben erwähnten Phänotyp in BG11<sub>0</sub>AG Medium bei Tag / Nacht Rhythmus (Gutekunst et al. 2014), keine derart ausgeprägten Wachstumsphänotypen von Hydrogenase Mutanten gefunden, auch wenn gezielt danach gesucht wurde (Eckert et al. 2012; Pinto et al. 2012).

Daher ist die Entdeckung dieses Phänotyps auch für die Frage von Bedeutung, warum *Synechocystis* bzw. viele Cyanobakterien überhaupt im Besitz einer bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenase sind.

Bisherige Ergebnisse weisen der bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenase eine Bedeutung als Elektronenventil unter anaeroben fermentativen Bedingungen, also bei der Produktion von fermentativem Wasserstoff im Dunkeln (Stal und Moezelaar 1997) oder während der Adaption der Zellen von Dunkel zu Hell, also bei der Produktion von Photowasserstoff im Licht (Appel et al. 2000; Cournac et al. 2004) zu. Keine dieser Bedingungen kam bei dem in dieser Arbeit behandelten Wachstumsphänotyp vor. Da die Zellen bei 24 h Dauerlicht und O<sub>2</sub> Sättigung über mehrere Tage inkubiert wurden, konnte es nicht zur Produktion von fermentativem Wasserstoff oder Photowasserstoff kommen.

Die Beobachtung dieses Wachstumsphänotyps hatte vorerst zwei wichtige Aspekte, die weitere Untersuchungen erforderten:

- Der Wachstumsphänotyp trat bei Bedingungen auf, bei denen die Wichtigkeit oder Funktion der bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenase bisher unbekannt war.
- Der Wachstumsphänotyp der Hydrogenase Mutante tritt bei Sauerstoffsättigung auf, wo bekannt ist, dass das aktive Zentrum der bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenase bei Anwesenheit von Sauerstoff reversibel inaktiviert ist (Cracknell et al. 2009).

Diese Aspekte machten als ersten Arbeitsschritt eine Überprüfung notwendig, ob es sich um einen „echten“ Phänotypen oder um ein Artefakt handelt. In weiterer Folge sollte dann die Funktion der Hydrogenase unter oxischen, mixotrophen, nitratlimitierten Bedingungen ergründet werden.

### **6.2.1 Ausschluss eines Artefaktes beim Wachstumsphänotyp der $\Delta hoxH$ Mutante**

Um die Echtheit des Phänotyps zu bestätigen, wurden mehrere verschiedene Ansätze verfolgt:

- Wachstumsexperimente:
  - Tritt der Phänotyp auch in einer Hydrogenase Mutante auf, bei der alle Hydrogenase Gene deletiert wurden ( $\Delta hoxEFUYH$ ) oder einer Mutante mit Deletion von *lexA* ( $\Delta lexA/lexA^+$ ), einem Gen, dessen Produkt als Transkriptionsaktivator der Hydrogenase gilt (Gutekunst et al. 2005), auf?
  - Ist es, unter Beachtung der Hypothese, warum es zu dem Phänotyp kommt, möglich, die Hydrogenase Mutante(n) durch Verringerung des Elektronendrucks vor dem Phänotyp „kein Wachstum“ zu retten?
- qPCR-Experimente:
  - Eine erhöhte Transkription der *hox* Gene im WT unter den Bedingungen, bei denen in der  $\Delta hoxH$  Mutante der Wachstumsphänotyp auftritt, würde dafür sprechen, dass es sich um kein Artefakt handelt.

- Wasserstoffmessungen:
  - Sollte die Hydrogenase in BG11<sub>0</sub>AG (+ Arg + Glc) Medium wirklich von besonderer Wichtigkeit sein, sollte hier auch die fermentative Wasserstoffproduktion höher sein als im BG11 Medium.

## Wachstumsexperimente

Der Wachstumsphänotyp der  $\Delta hoxH$  Mutante konnte in ähnlich starkem Ausmaß für die  $\Delta hoxEFUYH$  Mutante und die  $\Delta lexA/lexA^+$  Mutante gezeigt werden (siehe Abbildung 5.8, Seite 76 und Abbildung 5.11, Seite 79).

Da die  $\Delta hoxEFUYH$  Mutante die Deletion von  $\Delta hoxH$  beinhaltet, war es, sofern es sich bei dem Phänotyp um kein Artefakt bezogen auf die Mutante handelt und das Fehlen von  $hoxH$  bzw. dessen Genprodukt für den Phänotyp verantwortlich ist, zu erwarten, dass es ebenfalls zu keinem Wachstum kommt.

LexA ist ein Transkriptionsaktivator für die Hydrogenase Gene (Gutekunst et al. 2005), weshalb ein Auftreten des Wachstumsphänotyps der  $\Delta hoxH$  Mutante wiederum für die Wichtigkeit der Hydrogenase unter diesen Bedingungen und gegen ein Artefakt spricht. Prinzipiell muss bei Experimenten mit der  $\Delta lexA/lexA^+$  Mutante bedacht werden, dass es sich bei der Mutante um keine homozygote  $\Delta lexA$  Mutante handelt (Gutekunst et al. 2005). LexA ist ein Transkriptionsfaktor für eine Vielzahl von Genen in *Synechocystis*. Per Microarray Analyse konnte eine Änderung der Expression bei 57 Genen bei einer  $\Delta lexA/lexA^+$  Mutante gezeigt werden; viele der Genprodukte stehen mit der Aufnahme und Assimilation von anorganischem Kohlenstoff in Zusammenhang und LexA ist für *Synechocystis* essentiell (Domain et al. 2004). Daher ist es nicht möglich, eine homozygote  $\Delta lexA$  Mutante herzustellen. Außerdem wurde per Wasserstoffmessungen gezeigt, dass in der merodiploiden Mutante eine Hydrogenaseaktivität stattfindet; diese ist allerdings deutlich geringer als die des WT (Gutekunst et al. 2005). Trotzdem konnte in den Experimenten dieser Arbeit ein eindeutiger Wachstumsphänotyp gezeigt werden. Dies spricht für die Wichtigkeit der Expression von  $hoxH$  unter diesen Bedingungen auf ausreichendem Niveau, jedenfalls einem höheren Niveau als es in der  $\Delta lexA/lexA^+$  Mutante der Fall ist. Betrachtet man also die Experimente mit der  $\Delta hoxEFUYH$  Mutante und der  $\Delta lexA/lexA^+$  Mutante gemeinsam, ist es unwahrscheinlich, dass es sich um ein Artefakt im Bezug auf die Einzelmutante  $\Delta hoxH$  handelt.

Das verwendete Medium BG11<sub>0</sub>AG soll zu einem erhöhten Elektronenstress für die Zellen führen (siehe Kapitel 1.4.6, Seite 21). Eine „Rettung“ der  $\Delta hoxH$  Mutante vor dem Phänotyp „kein

Wachstum“ durch eine Verminderung des Elektronenstressses im gleichen Medium würde zeigen, dass es sich um kein Artefakt in Zusammenhang mit dem Medium handelt. Außerdem würde eine solche „Rettung“ einen Hinweis auf die Funktion der Hydrogenase unter diesen Bedingungen geben (siehe Diskussion, Kapitel 6.2.2, Seite 104 ff.).

Die Rettung der Mutante gelang teilweise durch Senkung der Lichtintensität (siehe Abbildung 5.6, Seite 74) und vollständig durch Zugabe von DCMU (siehe Abbildung 5.7, Seite 75). Beide Methoden senken den Elektronendruck, der durch die lineare Photosynthese entsteht. Durch Senkung der Lichtintensität sollte die Zahl der Wasserspaltungsvorgänge und somit die Zahl der Elektronen, die in die Elektronentransportkette eingeleitet werden, sinken. Durch die Zugabe von DCMU wird das Redoxpotential der Untereinheit B des PSII geändert, was eine Weitergabe von Elektronen an den Chinonpool verhindert (Pfister und Arntzen 1979). Der Unterschied in der Stärke der Senkung des Elektronendrucks, nämlich „weniger Elektronen aus der linearen Photosynthese bei Senkung der Lichtintensität“ zu „gar keine Elektronen mehr aus der linearen Photosynthese bei Zugabe von DCMU“, zeigt sich auch als Unterschied im Wachstum der  $\Delta hoxH$  Mutante zwischen den zwei Methoden. Die Zugabe von DCMU führte auch bei der  $\Delta hoxEFUYH$  und der  $\Delta hoxEFU$  Mutante zu gesteigertem Wachstum (siehe Abbildung 5.9, Seite 77). Diese „Rettungen“ der  $\Delta hox$  Mutanten weisen stark darauf hin, dass es sich bei dem Wachstumsphänotyp um kein Artefakt handeln kann.

### qPCR-Experiment

Da das „nicht Wachsen“ der  $\Delta hoxH$  Mutante die Wichtigkeit der Hydrogenase unter der Bedingung „O<sub>2</sub> gesättigtes BG11<sub>0</sub>AG Medium und Dauerbeleuchtung“ zeigt, könnte im WT unter diesen Bedingungen eine erhöhte Transkription des *hoxH* Gens stattfinden. Der Nachweis einer erhöhten Transkription würde somit zeigen, dass der Wachstumsphänotyp kein Artefakt ist, sondern die Expression der Hydrogenase unter diesen Bedingungen für die Zellen wichtig ist. Dass es wirklich zu einer erhöhten Transkription kommt, wurde per reverser Transkription der mRNA und folgender qPCR einer Sequenz aus dem *hoxH* Gen (siehe Kapitel 3.5.1, Seite 32) gezeigt. Die stärkste Transkription fand 36 h nach Inkubation der Zellen unter den beschriebenen Bedingungen statt (siehe Abbildung 5.18, Seite 85) und überstieg die Transkription des *hoxH* Gens zum gleichen Zeitpunkt gemittelt um ein 4,9-faches. Das qPCR-Experiment zeigt somit auf Transkriptionsebene die besondere Wichtigkeit der Hydrogenase für die Zellen unter der Bedingung „O<sub>2</sub> gesättigtes



BG11<sub>0</sub>AG Medium und Dauerbeleuchtung“ und zeigt, dass es sich bei dem Wachstumsphänotyp der  $\Delta hoxH$  Mutante aller Wahrscheinlichkeit nach um kein Artefakt handelt.

## Wasserstoffmessungen

Bei den Wasserstoffmessungen (siehe Abbildungen 5.26 bis 5.28, Seite 94 f. bzw. Abbildungen 7.5 bis 7.7, Seite 143 f.) zeigte sich, dass eine erhöhte fermentative Wasserstoffproduktion – diese zeigt sich sowohl in der Wasserstoffproduktionsrate ( $\mu\text{mol} / \text{l} / \text{h} / \text{OD}_{750}$ ) wie auch der maximalen Wasserstoffkonzentration ( $\mu\text{mol} / \text{l} / \text{OD}_{750}$ ) – besonders im Medium BG11<sub>0</sub>AG, aber auch im Medium BG11<sub>0</sub>A vorkam. Diese zwei Medien sind jene Medien, bei denen der Nitrat- und der Nitritreduktase das Substrat fehlt, was im Gegensatz zur Herunterregulation der Expression von RuBisCO bzw. der Hemmung des Calvin-Benson Zyklus durch Anwesenheit von Glucose (Oesterhelt et al. 2007; Narainsamy et al. 2013) auch im Dunkeln in Bezug auf einen höheren Elektronenstress eine Rolle spielt (siehe Abbildung 1.3, Seite 12). Daher spricht das Ergebnis der erhöhten Wasserstoffproduktion in den Medien BG11<sub>0</sub>AG und BG11<sub>0</sub>A einerseits dafür, dass die Hydrogenase unter diesen Bedingungen bei höherem Elektronenstress als Elektronenventil fungiert und andererseits für die Wichtigkeit der Hydrogenase in BG11<sub>0</sub>AG und daher gegen ein Artefakt beim beobachteten Wachstumsphänotyp der  $\Delta hoxH$  Mutante in BG11<sub>0</sub>AG Medium.

Die Experimente, die auf vier unterschiedlichen Ansätzen gründeten, nämlich Untersuchung verschiedener Mutanten, Untersuchung der Auswirkung des Elektronendrucks auf das Wachstum, Untersuchung der *hoxH* Transkription und Untersuchung der Wasserstoffproduktion, weisen alle auf die Wichtigkeit der Hydrogenase unter der Bedingung „O<sub>2</sub> gesättigtes BG11<sub>0</sub>AG Medium und Dauerbeleuchtung“ hin und sprechen im Bezug auf den Wachstumsphänotyp gegen ein Artefakt. Somit gehen wir von einer Echtheit des Phänotyps aus.

### **6.2.2 Funktion der Hydrogenase unter oxischen, mixotrophen und nitratlimitierten Bedingungen**

Nachdem ausgeschlossen werden konnte, dass es sich bei dem Wachstumsphänotyp der  $\Delta hoxH$  Mutante „kein Wachstum in O<sub>2</sub> gesättigtes BG11<sub>0</sub>AG Medium und Dauerbeleuchtung“ um ein Artefakt handelt (siehe Kapitel 6.2.1, Seite 101 ff.), war die logische Schlussfolgerung: Die Hydrogenase hat unter oxischen, mixotrophen, nitratlimitierten Bedingung eine Funktion, die für

den Unterschied im Wachstum zwischen WT und  $\Delta hoxH$  Mutante verantwortlich ist und unter diesen Bedingungen für die Zellen essentiell ist.

Wie in der Einleitung beschrieben (siehe Kapitel 1.4.6, Seite 21), sollte in dem Medium BG11<sub>0</sub>AG, in dem der Wachstumsphänotyp der  $\Delta hoxH$  Mutante auftritt, ein erhöhter Elektronendruck (im Vergleich zum Standardmedium BG11) in den Zellen herrschen. Dieser erhöhte Elektronendruck kommt einerseits dadurch zu Stande, dass den Zellen in BG11<sub>0</sub>AG Medium das Substrat für die Nitratreduktase fehlt, die Elektronen über die Reduktion von Nitrat in Nitrit binden kann, woraus in weiterer Folge über die Nitritreduktase Elektronen in  $\text{NH}_4^+$  gebunden werden, welches für den Aufbau von Aminosäuren verwendet wird (Flores et al. 2005); bei diesem Vorgang könnten insgesamt 8 reduzierte Ferredoxine oxidiert werden.

Andererseits wird den Zellen im Medium Glucose zur Verfügung gestellt, welches von den Zellen aufgenommen werden kann (Schmetterer 1990) und innerhalb der Zellen die Expression von RuBisCO herunterreguliert (Oesterhelt et al. 2007) und den Calvin-Benson Zyklus hemmt (Narainsamy et al. 2013). Die Hemmung des Calvin-Benson Zyklus hat zur Folge, dass reduziertes Ferredoxin nur noch verringert durch die Weitergabe von Elektronen an  $\text{NADP}^+$  und dann  $\text{CO}_2$  zur Kohlenstofffixierung oxidiert werden kann. Durch die Hemmung des Calvin-Benson Zyklus geht den Zellen die Möglichkeit verloren, pro GAP 12 Elektronen zu binden und somit 12 Ferredoxine zu oxidieren.

Außerdem ist es möglich, dass wegen der Anwesenheit von Arginin und dessen Abbau weitere Elektronen in die Elektronentransportkette eingeleitet werden (Schriek et al. 2007; Schriek et al. 2008).

Dass es in BG11<sub>0</sub>AG Medium, also unter mixotrophen, nitratlimitierten Bedingungen zu einem erhöhten Elektronenstress kommt, zeigen auch in dieser Arbeit durchgeführte Carotinoidmessungen von Zellen, die in vier verschiedenen Medien, BG11 (+  $\text{NO}_3^-$ ), BG11G (+  $\text{NO}_3^-$  + Glc), BG11<sub>0</sub>A (+ Arg) und BG11<sub>0</sub>AG (+ Arg + Glc) (siehe Tabelle 3.2, Seite 28), gewachsen sind. Carotinoide wirken schützend vor photooxidativen Schäden (Hirschberg und Chamovitz 1994), weshalb ein erhöhter Elektronenstress bei Beleuchtung auch höhere Carotinoidwerte erwarten lässt. Eine besondere Rolle beim Schutz vor photooxidativem Stress spielen „Orange Carotenoid Proteins“ (OCPs), Komplexe bei denen Carotinoide mit Proteinen verbunden sind, was den hydrophoben Carotinoiden auch eine cytoplasmatische Lokalisation erlaubt; OCPs können effektiv als Energie-Quencher (durch Abgabe der Energie als Wärmeenergie) und Singulett-Sauerstoff-Quencher

fungieren (Sedoud et al. 2014; Kirilovsky und Kerfeld 2016). Dass es bei höheren Beleuchtungsstärken zu einem höheren Verhältnis Carotinoide / Chlorophyll kommt, konnte sowohl in Cyanobakterien (Lakatos et al. 2001; Schagerl und Müller 2006) wie auch in höheren Pflanzen (Gonçalves et al. 2001) gezeigt werden.

Im Vergleich zum Standardmedium BG11 zeigten sich erhöhte Carotinoidwerte beim WT in BG11<sub>0</sub>A Medium und die höchsten Werte in BG11<sub>0</sub>AG Medium. Es wurde bei diesen Experimenten ebenfalls die  $\Delta hoxH$  Mutante gemessen. Diese zeigt ebenfalls erhöhte Carotinoidwerte in BG11<sub>0</sub>A Medium. In BG11<sub>0</sub>AG Medium ist der Mittelwert aller Messungen ebenfalls erhöht, es gab aber eine sehr breite Varianz, erkennbar durch den großen Fehlerbalken. Diese Varianz ist wahrscheinlich auf die sehr geringe Zellzahl unter diesen Bedingungen und den damit einhergehenden Problemen bei der Pigmentextraktion, sowie auf den Zustand der Zellen (stark gestresst und teilweise sterbend) zurückzuführen.

Dass Zellen ohne funktionierende Hydrogenase ( $\Delta hoxH$  Mutante bzw.  $\Delta hoxEFUYH$  Mutante) unter diesen Bedingungen mit hohem Elektronenstress nicht wachsen können, während der WT mit funktionierender Hydrogenase wachsen kann, weist bereits auf die Funktion der Hydrogenase unter diesen „oxischen, mixotrophen, nitratlimitierten Bedingungen mit Dauerbeleuchtung“ als Elektronenventil hin.

### **Rettung der Hydrogenase Mutanten durch Verminderung des Elektronendrucks**

Einen weiteren Hinweis, dass die Hypothese der Hydrogenase als Elektronenventil stimmig ist, kann eine Rettung der Hydrogenase Mutanten vor dem „nicht Wachsen“ durch Verminderung des Elektronendrucks liefern. Einige der hierzu durchgeführten Experimente wurden bereits im Zusammenhang mit der Widerlegung des Phänotyps als Artefakt besprochen (siehe Kapitel 6.2.1, Seite 101).

Eine Verminderung des Elektronendrucks sollte z.B. durch die Verminderung der Lichtintensität ermöglicht werden, da es bei weniger Lichtquanten zu weniger Wasserspaltungsvorgängen am PSII kommt und somit zu weniger Elektronen, die in die Elektronentransportkette der Photosynthese eingeleitet werden.

Daher wurden Experimente mit verschiedenen Lichtintensitäten durchgeführt:

- $60 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , der Standardlichtintensität der Knieeseapparaturen, bei der der Phänotyp auch erstmals beobachtet wurde
- $20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , in dieser Arbeit auch als Schwachlicht bezeichnet und jene Lichtintensität, bei der beim WT noch Wachstum beobachtet werden konnte und die „Rettung“ der Hydrogenase Mutante versucht wurde
- $200 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , in dieser Arbeit auch als Starklicht bezeichnet und jene Lichtintensität, die aus baulichen Gründen der verwendeten Knieeseapparaturen die maximal mögliche Lichtintensität ist (siehe auch Tabelle 5.1, Seite 71)

Des Weiteren wurden noch Experimente bei  $5 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  durchgeführt. Bei dieser geringen Lichtintensität konnte aber weder beim WT noch bei den Mutanten Wachstum nachgewiesen werden, weshalb die Ergebnisse hier auch nicht dargestellt werden. Während das Wachstum des WT in BG11<sub>0</sub>AG Medium von den verwendeten Lichtintensitäten nicht stark beeinflusst wird, konnten die Hydrogenase Mutanten ( $\Delta\text{hoxH}$  bzw.  $\Delta\text{hoxEFUYH}$  Mutante) von keinem Wachstum bei 60 oder  $200 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  zu einem geringen Wachstum bei  $20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  gebracht werden (siehe Abbildung 5.5, Seite 74, Abbildung 5.6, Seite 74 und Abbildung 5.8, Seite 76).

Eine weitere Möglichkeit, den Elektronendruck zu mindern, ist das Hinzufügen von DCMU zum Medium. DCMU inhibiert den Elektronentransport vom PSII zum Plastochinonpool (Pfister und Arntzen 1979) und kann bei richtiger Konzentration den linearen photosynthetischen Elektronentransport total unterbrechen (Clavier und Boucher 1992).

Wie bei einem Zutreffen der Hypothese, dass die Hydrogenase als Elektronenventil fungiert, zu erwarten ist, konnte das Nicht-Wachsen der  $\Delta\text{hoxH}$  und der  $\Delta\text{hoxEFUYH}$  Mutante durch Zugabe von DCMU verhindert werden (siehe Abbildung 5.7, Seite 75 und Abbildung 5.9, Seite 77). Geht man davon aus, dass bei  $20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  Lichtintensität ohne DCMU mehr Elektronen über die lineare photosynthetische Elektronentransportkette bei Ferredoxin ankommen als bei Standardlicht mit DCMU, wie es auf Grund der von Clavier und Boucher 1992 beschriebenen möglichen 100 prozentigen Effektivität von DCMU auch anzunehmen ist, spiegelt sich dieser unterschiedliche Elektronendruck auch im Wachstum der Mutanten wieder:

Höchster Elektronendruck:

60 oder 200  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  Lichtintensität: Kein Wachstum der  $\Delta\text{hoxH}$  Mutante

Mittlerer Elektronendruck:

20  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  Lichtintensität: Geringes Wachstum ( $\text{OD}_{750} \approx 0,1$  nach 145 h) der  $\Delta\text{hoxH}$  Mutante

Geringster Elektronendruck:

Zugabe von DCMU: Bestes Wachstum ( $\text{OD}_{750} \approx 4$  nach 145 h) der  $\Delta\text{hoxH}$  Mutante

Die Rettung der Hydrogenase Mutanten könnte dadurch funktionieren, dass durch Zugabe von DCMU bzw. Verminderung der Lichtintensität der Elektronenstress soweit reduziert wird, dass den Zellen für ihr Wachstum ausreichend oxidiertes Ferredoxin zur Verfügung steht und / oder den Mutanten durch Verminderung des Elektronendrucks erst jetzt die Möglichkeit zur Verfügung steht, ausreichend Arginin als Stickstoffquelle abzubauen. Die letztere Alternative ist von der Beobachtung und Erklärung eines Wildtyp Phänotyps abgeleitet, der bei Lichtintensitäten von  $\geq 200 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und Arginin als einziger Stickstoffquelle Merkmale von Zellen unter Stickstoffmangel aufweist (Stephan et al. 2000; Schriek et al. 2008). Die im BG11<sub>0</sub>AG Medium zugesetzte Glucose könnte, durch die Herunterregulierung des Calvin-Benson Zyklus bei Anwesenheit von Glucose (Oesterhelt et al. 2007), zu einem ähnlich hohen Elektronenstress führen, wie er unter den von Stephan et al. 2000 beschriebenen Bedingungen herrscht und einen Phänotyp mit metabolischem Stickstoffmangel generieren (siehe hierzu auch Kapitel 1.4.6, Seite 21 f.). Während die Hydrogenase Mutanten also erst durch Reduzierung des Elektronendrucks mittels DCMU oder verringerter Lichtintensität vor metabolischem Stickstoffmangel gerettet werden, reicht im Wildtyp anscheinend die Funktion der Hydrogenase aus, um den Elektronendruck ausreichend zu mindern.

Die Rettung der  $\Delta\text{hoxH}$  und  $\Delta\text{hoxEFUYH}$  Mutanten durch Verminderung des Elektronendrucks sowie die umgekehrte Korrelation zwischen Elektronendruck und Wachstum der  $\Delta\text{hox}$  Mutanten („höchster Elektronendruck und kein Wachstum“ zu „geringster Elektronendruck und bestes Wachstum“) sprechen für die Funktion der Hydrogenase als Elektronenventil.

**Herbeiführung eines weiteren Phänotyps „Kein Wachstum“ einer Hydrogenase Mutante in BG11-Medium mit erhöhtem Elektronendruck**

Ein weiterer Phänotyp „Kein Wachstum“ einer Hydrogenasemutante unter anderen Bedingungen, die ebenfalls einen erhöhten Elektronendruck in den Zellen erzeugen, würde auch ein weiterer

Hinweis auf die Funktion der Hydrogenase als Elektronenventil liefern. Um einen höheren Elektronendruck auf die Zellen auszuüben, wurden Versuche in BG11 Medium mit der Lichtintensität  $200 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  bzw. als Kontrolle  $20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , also unter photoautotrophen Bedingungen, unternommen. Die ersten Versuche mit der  $\Delta\text{hoxH}$  Mutante in BG11 führten nicht zu einem Nicht-Wachsen der  $\Delta\text{hoxH}$  Mutante (siehe Abbildung 5.2, Seite 72 und Abbildung 5.3, Seite 72). Die  $\Delta\text{hoxH}$  Mutante zeigte bei  $200 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  sogar höhere optische Dichten als der WT; dies könnte aber nicht an einer höheren Zellzahl, sondern am größeren Zellvolumen der  $\Delta\text{hoxH}$  Mutante im Vergleich zum WT liegen (persönliche Mitteilung nach Beobachtung mit Mikroskop K. Gutekunst).

Auch war die gelblichere Färbung des Wildtyps bei Starklicht im Vergleich zu den anderen Proben (WT bei Schwachlicht und  $\Delta\text{hoxH}$  Mutante bei Stark- oder Schwachlicht) (siehe Abbildung 5.12, Seite 80) ein Hinweis darauf, dass die WT Zellen größere Schwierigkeiten mit der höheren Lichtintensität hatten, als die  $\Delta\text{hoxH}$  Mutante. Eine gelbliche Färbung weist auf einen erhöhten Carotinoidgehalt hin. Da Carotinoide dafür bekannt sind, Schutz vor photooxidativen Schäden zu bieten (Hirschberg und Chamovitz 1994; Sedoud et al. 2014; Kirilovsky und Kerfeld 2016), kann ein erhöhter Carotinoidgehalt auf höheren Licht- bzw. photosynthetischen Elektronenstress hinweisen (siehe Seite 105 f.). Von den Zellen wurde daraufhin ein Gesamtspektrum aufgenommen (siehe Abbildung 5.13, Seite 80), welches wiederum einen Hinweis auf höhere Carotinoidgehalte beim WT gegeben hat. Da ein Gesamtspektrum wegen möglicher Überlagerung von Pigmentabsorptionen keine sichere Aussage über Konzentrationen macht, wurden Carotinoide und Chlorophyll einzeln nach Pigmentextraktionen gemessen (siehe Abbildung 5.15, Seite 82). Die vorherigen Hinweise, dass im WT unter Starklicht ein höherer Carotinoidgehalt als im WT unter Schwachlicht oder der  $\Delta\text{hoxH}$  Mutante unter Stark- oder Schwachlicht vorhanden ist, konnten bestätigt werden. Auch wurde sichtbar, dass die Schwankung im WT zwischen dem Carotinoidgehalt unter Stark- oder Schwachlicht größer ist, als in der  $\Delta\text{hoxH}$  Mutante. Dieses Ergebnis passt mit dem beobachteten Wachstum zusammen, widerspricht aber isoliert betrachtet der Hypothese, dass die Hydrogenase im Dauerlicht die Funktion eines Elektronenventils übernehmen kann.

Da die Flavoproteine Flv2 und Flv4 als Elektronenakzeptor der Photosynthese gelten (Zhang et al. 2012; Bersanini et al. 2014) (siehe auch Einleitung Kapitel 1.4.7, Seite 23), könnten sie, wie für die Hydrogenase hypothetisiert, dabei mitwirken, einen von der Wasserspaltung kommenden Elektronendruck abzubauen. Diese Eigenschaft der Flavoproteine 2 und 4 sowie (noch nicht publizierte) Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe aus Microarray Analysen, die zeigen, dass es in der

*ΔhoxH* Mutante zu einer im Vergleich zum WT erhöhten Expression dieser Flavoproteine kommt, können eine Erklärung dafür geben, warum das Wachstum und die Carotinoidkonzentrationen einzeln betrachtet nicht zur Hypothese passen.

Um diese Erklärung zu überprüfen und auf der Suche nach einem weiteren Phänotypen einer Hydrogenase Mutante unter erhöhtem Elektronendruck, wurden daher weitere Experimente mit einer *Δflv24ΔhoxH* Doppelmutante in BG11 Medium unternommen (siehe Abbildung 5.4, Seite 73). Die *Δflv24* und die *ΔhoxH* Einzelmutante wurden wie der WT als Kontrollen mitgeführt. Es zeigte sich, dass nur die *Δflv24ΔhoxH* Doppelmutante, und diese nur bei  $200 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , nicht aber bei  $20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , das Wachstum bei einer  $\text{OD}_{750}$  von ca. 2 abbricht.

Dass ein Phänotyp der *Δflv24ΔhoxH* Doppelmutante in Zusammenhang mit einem erhöhten Elektronendruck über die lineare Photosynthese gefunden wurde, der bei der *Δflv24* Einzelmutante nicht auftritt, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Hydrogenase unter oxidischen Bedingungen die Funktion eines Elektronenventils haben kann.

### **Untersuchung der Transkription von *hoxH* in vier verschiedenen Medien**

Um festzustellen, ob sich der unterschiedlich hohe Elektronendruck, der durch die verschiedenen Medien (BG11 (+  $\text{NO}_3^-$ ), BG11G (+  $\text{NO}_3^-$  + Glc), BG11<sub>0</sub>A (+ Arg) und BG11<sub>0</sub>AG (+ Arg + Glc) (siehe Tabelle 3.2, Seite 28)) auf die Zellen wirkt, in einer entsprechenden Transkription des *hoxH* Gens wiederfinden lässt, wurden qPCR-Untersuchungen (siehe Kapitel 4.8, Seite 57 ff.) mit WT Zellen angestellt. Dies wäre ein weiterer Hinweis auf die Richtigkeit der Hypothese der Funktion der Hydrogenase als Elektronenventil.

Die Transkriptionsanalyse zeigt, dass die relative *hoxH* Transkription zwischen BG11G und BG11 Medium keine größeren Unterschiede aufweist (siehe Abbildung 5.16, Seite 83). Eine erhöhte Transkription im Vergleich zu BG11 findet sich in den Medien BG11<sub>0</sub>A und BG11<sub>0</sub>AG. Bei Vergleich mit den auf Seite 105 diskutierten Carotinoidmessungen (siehe Abbildung 5.14, Seite 81) fällt auf, dass in diesen Medien, in denen höhere *hoxH* Konzentrationen festgestellt wurden, auch erhöhte Carotinoid / Chlorophyll Verhältnisse gemessen werden konnten. Diese Ergebnisse sind zusammen ein klarer Hinweis darauf, dass die Hydrogenase unter Bedingungen mit höherem Elektronendruck wichtig ist. Dass die höchste *hoxH* Transkription in den Zellen in BG11<sub>0</sub>A Medium aufgetreten ist und nicht in den Zellen in BG11<sub>0</sub>AG Medium, wo der höchste Elektronendruck erwartet wird (vergleiche Carotinoidmessungen sowie Hypothese zum BG11<sub>0</sub>AG

Medium, Seite 21), könnte mit dem schlechteren Zustand erklärt werden, in dem sich die Zellen in BG11<sub>0</sub>AG Medium befinden. Dass sich diese Zellen in einem schlechteren bzw. gestressteren Zustand befinden, zeigen sowohl die oben erwähnten Carotinoidmessungen wie auch die Wachstumskurven des Wildtyps in den zwei Medien (Abbildung 5.10 c) und d), Seite 78). Dieser Umstand könnte ebenfalls dafür verantwortlich sein, dass die höchste Transkription in BG11<sub>0</sub>AG 12 h später auftritt als in BG11<sub>0</sub>A.

Jedenfalls ist die erhöhte *hoxH* Transkription in den Medien, in denen hypothetisch, wie auch mittels Carotinoidmessungen gezeigt, ein höherer Elektronendruck herrscht, ein weiterer starker Hinweis dafür, dass die Hydrogenase unter oxischen, mixotrophen, nitratlimitierten Bedingungen als Elektronenventil fungiert.

### **6.2.3 Die Funktion der Hydrogenase unter oxischen, mixotrophen, nitratlimitierten Bedingungen lässt sich vor allem der Hydrogenaseuntereinheit zuordnen**

Wachstumsexperimente mit der  $\Delta$ *hoxEFU* Mutante, also jener Mutante, der die Diaphoraseuntereinheit der Hydrogenase fehlt (siehe Abbildung 1.5, Seite 19), ergaben, dass diese bei allen getesteten Lichtintensitäten besser als die  $\Delta$ *hoxH* oder die  $\Delta$ *hoxEFUYH* Mutante wächst. Dies zeigt bereits, dass der Phänotyp „kein Wachstum unter oxischen, mixotrophen, nitratlimitierten Bedingungen“ der  $\Delta$ *hoxH* und der  $\Delta$ *hoxEFUYH* Mutante besonders wegen des Fehlens der Hydrogenaseuntereinheit auftritt.

Da in einer  $\Delta$ *hoxEFU* Mutante die *hoxYH* Gene stark verringert exprimiert werden (Eckert et al. 2012), es sich also um keine „reine“ *hoxEFU* Mutante auf Expressionsebene handelt, kann davon ausgegangen werden, dass bei einer reinen Mutante ohne Beeinträchtigung der Expression der *hoxYH* Gene das Wachstum noch besser wäre. Somit kann man davon ausgehen, dass die Funktion der Hydrogenase, die das Wachstum des WTs unter oxischen, mixotrophen, nitratlimitierten Bedingungen ermöglicht, vor allem von der Hydrogenaseuntereinheit ausgeführt wird. Trotzdem gibt es keine Hinweise darauf, dass die Hydrogenaseuntereinheit ohne die Diaphoraseuntereinheit wirken kann, da bei qPCR-Experimenten gezeigt wurde, dass auch unter oxischen, mixotrophen, nitratlimitierten Bedingungen alle Hydrogenasegene ungefähr gleich stark exprimiert werden (siehe Abbildung 5.24, Seite 90)



#### **6.2.4 Die Funktion der Hydrogenase, die den Wildtypen unter oxischen, mixotrophen und nitratlimitierten Bedingungen wachsen lässt, zeigt sich nicht in der Produktion von Wasserstoff**

Wie Wasserstoffmessungen unter oxischen, mixotrophen, nitratlimitierten Bedingungen im Licht zeigen, wird kein Wasserstoff an das Medium abgegeben (siehe Abbildung 5.30, Seite 96). In dem Experiment wurde auch sichergestellt, dass die Hydrogenasen intakt waren (fermentative Wasserstoffproduktion bis 0,73 h); ebenfalls wurde die Sauerstoffkonzentration gemessen, die zeigt, dass die Zellen sehr viel mehr Sauerstoff produzieren, als sie konsumieren. Es stellt sich somit die Frage, worauf die Funktion der Hydrogenase unter oxischen, mixotrophen, nitratlimitierten Bedingungen beruht, wenn nicht auf der Produktion von Wasserstoff. Hierzu wurden in dieser Arbeit keine weiteren Untersuchungen angestellt und daher kann an dieser Stelle höchstens über Möglichkeiten spekuliert werden:

Eine Möglichkeit wäre, dass die bidirektionale [NiFe]-Hydrogenase von *Synechocystis* auch die Funktion einer Oxidase übernimmt und Sauerstoff reduziert. Die Funktion der Hydrogenase als Oxidase wird beispielsweise für die Membrangebundene Aufnahme Hydrogenase von *Ralstonia eutropha* angenommen (Armstrong et al. 2009; Cracknell et al. 2009).

Auch wäre es denkbar, dass die Hydrogenase (unter Umständen über Wasserstoff als Intermediat) Elektronen von Ferredoxin an einen anderen Elektronenakzeptor, beispielsweise  $\text{NAD(P)}^+$ , überträgt, welcher dann auf weiterem Weg den Elektronenstress der Zellen mindert. Diese Möglichkeit stellt diese eventuelle Funktion der Hydrogenase in die Nähe der Ferredoxin- $\text{NADP}^+$  Reduktase (FNR), birgt aber einen Unterschied, der die Wichtigkeit der Hydrogenase unter diesen Bedingungen erklären könnte: Cyanobakterielle und plastidische FNRs sind dafür bekannt, eine hohe Substratspezifität für  $\text{NADP}^+$  gegenüber  $\text{NAD}^+$  zu haben. So wurde für die FNR des Cyanobakteriums *Anabaena* PCC7119 eine 67000 mal höhere Spezifität zu  $\text{NADP}^+$  als zu  $\text{NAD}^+$  gemessen (Medina et al. 2001); die Spezifität der FNR von Erbsen zu  $\text{NADP}^+$  war um 36000 mal höher als zu  $\text{NAD}^+$  (Piubelli et al. 2000). Bei der Reduktion von  $\text{NADP}^+$  kann  $\text{NADH}$  sogar als Elektronendonator fungieren (Carrillo und Ceccarelli 2003). Im Gegensatz dazu bevorzugt die bidirektionale Hydrogenase  $\text{NAD}^+$  gegenüber  $\text{NADP}^+$  als Substrat, um dieses zu reduzieren (Schmitz und Bothe 1996). Die Wichtigkeit könnte also in der Produktion von  $\text{NADH}$  liegen, welches wiederum als Substrat für Elektronensenken dienen könnte, die  $\text{NADPH}$  nicht oder schlechter nutzen können (wie beispielsweise die Atmungskette in der Cytoplasmamembran (CM)

die ihre Elektronen durch den NDH-2 Komplex bekommt, der wahrscheinlich NADH, aber nicht NADPH als Elektronendonator verwendet (Howitt et al. 1999)). Es würde somit eine Alternative zu NADPH geboten, welches unter den getesteten Bedingungen nur eingeschränkt Elektronen an den von Glucose gehemmten Calvin-Benson Zyklus (Narainsamy et al. 2013) liefern und so nur eingeschränkt Elektronenstress mindern kann.

Falls die Hydrogenase unter (bestimmten) oxischen Bedingungen im Licht Ferredoxin oxidiert und NADH liefert, ein Molekül das beim photosynthetischen Elektronentransport eigentlich nicht hergestellt wird, da die FNR vor allem  $\text{NADP}^+$  zu NADPH reduziert (Medina et al. 2001; Musumeci et al. 2012), könnten weitere Elektronentransportwege und Elektronensenken mit Elektronen aus der Photosynthese bedient werden, die eigentlich, wie z.B. die Atmungskette der CM, keinen direkten Zusammenhang mit der Photosynthese haben bzw. sonst nur in der Nacht aktiv sind. Dies wäre eine Hypothese, die eine Erklärung liefert, warum die Hydrogenase unter Dauerlicht und oxischen, mixotrophen und nitratlimitierten Bedingungen essentiell ist.

Da hier nur spekulative Erklärungen gegeben werden, bedarf die Frage weiterer Untersuchungen.

### 6.2.5 Rückschlüsse auf die Funktion der Hydrogenase in der Natur

Wie in dieser Arbeit mit verschiedenen Hinweisen gezeigt, hat die Hydrogenase unter oxischen, mixotrophen und nitratlimitierten Bedingungen wahrscheinlich die Funktion eines Elektronenventils, das zum Vorhandensein der oxidierten Form von Ferredoxin in den Zellen führen bzw. den Elektronendruck in den Zellen mindern soll. Dass das Vorhandensein von oxidiertem Ferredoxin wichtig ist, zeigt sich dadurch, dass Ferredoxin in verschiedensten essentiellen metabolischen Reaktionswegen die Aufgabe eines Elektronenakzeptors bzw. Elektronendonors übernimmt (Cassier-Chauvat und Chauvat 2014). Die Gefährlichkeit eines erhöhten Elektronendrucks bei Anwesenheit von Arginin und Abwesenheit von Nitrat (wie in späten Algenblüten festgestellt (Wetz und Wheeler 2004)) zeigt sich im Auftreten von metabolischem Nitratmangel unter diesen Bedingungen (Stephan et al. 2000; Schriek et al. 2008). Wie in der Einleitung beschrieben, ähnelt das Medium BG11<sub>0</sub>AG (+ Arg + Glc –  $\text{NO}_3^-$ ) den Bedingungen, die Organismen in späteren Phasen von Algenblüten antreffen (Wetz und Wheeler 2004; Gutekunst et al. 2014) (siehe auch Kapitel 1.4.6, Seite 21). Zwar gibt es in natürlichen Algenblüten einen Tag / Nacht Rhythmus, jedoch ist es klar, dass der höchste Elektronenstress, den photosynthetisierende

Organismen in einer Algenblüte erleben, tagsüber auftritt, wenn zu dem Nitratmangel, der wahrscheinlichen Einschleusung von Elektronen in die Elektronentransportkette bei Anwesenheit von Arginin (Schriek et al. 2007; Schriek et al. 2008) und der Anwesenheit von organischen Kohlenhydraten auch noch die Einschleusung von Elektronen in die photosynthetische Elektronentransportkette über die Wasserspaltung hinzukommt. Dass die Hydrogenase den Organismen unter diesen Bedingungen auch tagsüber beim Abbau von Elektronenstress hilft, kann also als Vorteil gewertet werden. Diese Feststellung erlaubt den Rückschluss, dass dieser Vorteil bei Licht und oxischen Bedingungen ein weiter Grund, zu der von Gutekunst et al. 2014 beschriebenen Essentialität der Hydrogenase, sein kann, warum Cyanobakterien noch immer im Besitz einer Hydrogenase sind.

Warum die Zellen keine der anderen Elektronensenken wie die Flavoproteine oder die terminalen Oxidasen (weitere Erläuterungen zu diesen Elektronensenken gibt Kapitel 1.4.7, Seite 23 f.) (ausreichend) nutzen können, bleibt unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

### 6.2.6 Schlussfolgerung

Alle Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die bidirektionale [NiFe]-Hydrogenase in *Synechocystis* eine essentielle Funktion unter oxischen, mixotrophen und nitratlimitierten Bedingungen bei Dauerlicht hat. Dieses Ergebnis ist überraschend, da die Hydrogenase als sauerstoffsensitiv gilt (Cracknell et al. 2009; McIntosh et al. 2011). Die Funktion ist wahrscheinlich die eines Elektronenventils um Elektronenstress abzubauen bzw. die Bereitstellung von ausreichend oxidiertem Ferredoxin. Die Funktion wird anscheinend vor allem von der Hydrogenaseuntereinheit ausgeführt. Unklar bleibt, was unter diesen Bedingungen der Elektronenakzeptor der Hydrogenase ist, da keine Wasserstoffproduktion gemessen werden konnte.

## 6.3 Ausblick

Wie beschrieben, ist die wahrscheinliche Funktion der bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenase in *Synechocystis* die eines Elektronenventils. Dass unter oxischen, mixotrophen und nitratlimitierten Bedingungen ein erhöhter Elektronenstress vorkommt, der zur Notwendigkeit eines Elektronenventils führt, könnte einerseits am erhöhten photosynthetischen Elektronendruck liegen,

der durch die Anwesenheit von Glucose und der Abwesenheit von Nitrat verstärkt wird (siehe Kapitel 1.4.6, Seite 21 ff.). Andererseits kann auch die Anwesenheit von Arginin bzw. dessen Abbau zu erhöhtem Elektronendruck führen (Schriek et al. 2007; Schriek et al. 2008). Bei hohem photosynthetischen Elektronendruck, Anwesenheit von Arginin und Fehlen von Nitrat kann Arginin nicht oder nur noch schlecht abgebaut werden und wird statt dessen für den Aufbau des Speichermoleküls Cyanophycin verwendet (Schriek et al. 2008). So wurde bei Anwesenheit von Arginin und Lichtintensitäten von  $\geq 200 \mu\text{E}$  ein Phänotyp mit Merkmalen von Stickstoffmangel beobachtet (Stephan et al. 2000; Schriek et al. 2008). Das nicht Wachsen der  $\Delta\text{hoxH}$  Mutante könnte also auch auf Mangel von metabolisch verfügbarem Stickstoff zurückzuführen sein, z.B. wenn durch die Herunterregulierung des Calvin-Benson Zyklus bei Anwesenheit von Glucose (Oesterhelt et al. 2007) auch bei Standardlichtintensität ( $60 \mu\text{E}$ ) ein erhöhter Elektronendruck vorkommt, der den oben beschriebenen Bedingungen bei Lichtintensitäten von  $\geq 200 \mu\text{E}$  gleicht und Arginin nicht abgebaut, sondern in Cyanophycin gespeichert wird. Um dies zeigen zu können, sollte ein Vergleich der Cyanophycinmenge unter den verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen angestellt werden. Dies kann mittels eines Enzymtests bewerkstelligt werden, bei dem Cyanophycin in Arginin und Asparaginsäure gespalten wird und anschließend die Menge an Arginin bestimmt wird. Gleichzeitig sollte mittels eines PAM Fluorometers gezeigt werden, ob es in der Elektronentransportkette, wie angenommen, zu einem Elektronenstau kommt. Weiterhin bleibt die Frage offen, auf welchen Akzeptor die Hydrogenase unter mixotrophen, nitratlimitierten und oxischen Bedingungen Elektronen überträgt und somit die Funktion eines Elektronenventils ausübt. Eine Möglichkeit wäre, wie in Kapitel 6.2.4 beschrieben, dass die Hydrogenase  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  reduziert. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte das Verhältnis von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  im WT und der  $\Delta\text{hoxH}$  Mutante unter den verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen untersucht werden. Dies kann mittels  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  Assay Kits bewerkstelligt werden, die auf colorimetrischen oder fluorimetrischen Detektionsmethoden beruhen.

Die neu entdeckte Funktion der Hydrogenase unter oxischen Bedingungen, die in dieser Arbeit untersucht wurde, zeigt, dass wir noch weit von einem vollen Verständnis der Hydrogenase und ihrem Platz im Metabolismus der Cyanobakterien entfernt sind. Da Cyanobakterien nicht nur aus biologischer Sicht äußerst interessante Lebewesen sind, sondern auch das Potenzial besitzen, der Menschheit in vielerlei Dingen, wie z.B. bei der Produktion alternativer Energiequellen, dienlich zu sein, ist die Beantwortung aller offenen Fragen rund um Cyanobakterien ein sinnvolles und erstrebenswertes Ziel.

## Zusammenfassung

Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 besitzt eine bidirektionale [NiFe]-Hydrogenase, die Wasserstoff produzieren oder aufnehmen kann (Appel und Schulz 1998). Sie besteht aus einer Diaphoraseuntereinheit (codiert von *hoxE*, *hoxF* und *hoxU*) und einer Hydrogenaseuntereinheit (codiert von *hoxY* und *hoxH*) (Appel und Schulz 1996; Vignais und Billoud 2007). Wasserstoff wird entweder fermentativ im Dunkeln (Stal und Moezelaar 1997) oder direkt nach Beleuchtung (Photowasserstoff) für kurze Zeit (Appel et al. 2000; Cournac et al. 2004) produziert. Die [NiFe]-Hydrogenase gilt als sauerstoffsensitiv (Cracknell et al. 2009; McIntosh et al. 2011). Sie produziert unter oxischen Bedingungen, also z.B. bei Beleuchtung, wenn während der Photosynthese Sauerstoff produziert wird (außer dem für kurze Zeit produzierten Photowasserstoff), keinen Wasserstoff (Cracknell et al. 2009). Bei der Produktion von Wasserstoff übernimmt die Hydrogenase wahrscheinlich die Funktion eines Elektronenventils (Stal und Moezelaar 1997; Appel et al. 2000). Ein Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung einer Funktion der Hydrogenase bei Dauerbeleuchtung und unter oxischen Bedingungen, die durch das Auftreten eines Wachstumsphänotyps (kein Wachstum) einer Hydrogenase Knockout-Mutante ( $\Delta hoxH$ ) unter mixotrophen, nitratlimitierten Bedingungen bei Licht in dieser Arbeitsgruppe entdeckt wurde. Dieser Phänotyp ist überraschend, da die Hydrogenase unter oxischen Bedingungen wegen ihrer Sauerstoffsensitivität eigentlich nicht aktiv sein sollte und deshalb kein Unterschied im Wachstum zwischen dem Wildtyp und der Hydrogenase Mutante auftreten sollte. Ganz im Gegenteil ist die Hydrogenase unter diesen Bedingungen aber essentiell. Unter den Bedingungen sollte wegen des Fehlens des Substrats für die Nitrat- und Nitritreduktase, sowie wegen der Hemmung des Calvin-Benson Zyklus durch Anwesenheit von Glucose (Oesterhelt et al. 2007; Narainsamy et al. 2013), ein erhöhter Elektronendruck auftreten, der u.a. zusammen mit Arginin als einziger Stickstoffquelle zu metabolischem Stickstoffmangel führen könnte (Schriek et al. 2008), bzw. den Zellen wichtige Möglichkeiten genommen werden, Ferredoxin zu oxidieren (Gutekunst et al. 2014). Die Hydrogenase könnte also unter den beschriebenen Bedingungen für die Oxidation von Ferredoxin essentiell sein, bzw. auch unter oxischen Bedingungen eine Funktion als Elektronenventil haben.

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Phänotyp um kein Artefakt handelt und die Zellen bei Dauerbeleuchtung auch andauernd oxischen Bedingungen ausgesetzt waren. Der Ausschluss eines Artefakts fand durch verschiedene Wachstumsexperimente, qPCR-Experimente und Wasserstoffmessungen statt. So wurde gezeigt, dass es möglich ist, die Mutante durch Minderung des durch Photosynthese entstehenden Elektronendrucks vor dem Phänotyp „kein Wachstum“ zu retten. Bei Erhöhung des Elektronendrucks konnte das Wachstum bei einer Hydrogenase/Flavoprotein-2/4 Doppelmutante ab einer optischen Dichte von 2 unter

photoautotrophen Bedingungen abgebrochen werden und somit ein weiterer Wachstumsphänotyp einer Hydrogenasemutante festgestellt werden. Mit qPCR-Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Wildtyp unter mixotrophen, nitratlimitierten und oxischen Bedingungen bei Dauerbeleuchtung eine erhöhte Transkription des *hoxH* Gens, das für die Untereinheit mit dem Nickel-Eisen-Zentrum der Hydrogenase codiert, aufweist. Dieses Ergebnis weist auf eine Wichtigkeit der Hydrogenase unter diesen Bedingungen hin. Durch Wasserstoffmessungen konnte gezeigt werden, dass der Wildtyp in dem mixotrophen, nitratlimitierten Medium eine erhöhte fermentative Wasserstoffproduktion aufweist, was auf die Wichtigkeit der Hydrogenase in dem Medium hinweist. Dass der Phänotyp wirklich unter oxischen Bedingungen auftritt, konnte durch verschiedene Messungen mit Sauerstoffsensoren gezeigt werden.

Die oben beschriebenen Wachstumsexperimente weisen bereits auf die Funktion der Hydrogenase als Elektronenventil auch unter mixotrophen, nitratlimitierten und oxischen Bedingungen hin: Bei Senkung des Elektronendrucks durch Verminderung der Lichtintensität oder durch Zugabe von DCMU konnte die Hydrogenase Mutante, die bei Standard Licht kein Wachstum aufweist, wachsen. Bei Erhöhung des Elektronendrucks durch Erhöhung der Lichtintensität konnte die Hydrogenase/Flavoprotein-2/4 Doppelmutante, die bei Standard Licht wächst, ab einer optischen Dichte von 2 nicht mehr wachsen. qPCR-Messungen der *hoxH* Transkription von Zellen in vier verschiedenen Medien bei Dauerbeleuchtung zeigten, dass eine erhöhte Transkription in jenen Medien auftrat, in denen, wie auch durch Carotinoidmessungen und Chlorophyllmessungen gezeigt wurde, die Zellen einem erhöhtem Elektronenstress ausgesetzt waren. Alle diese Ergebnisse weisen auf eine Funktion der Hydrogenase als Elektronenventil, auch unter den in dieser Arbeit beschriebenen oxischen Bedingungen, hin. Durch Wachstumsexperimente mit verschiedenen Hydrogenase Mutanten ( $\Delta hoxH$ ,  $\Delta hoxEF$ ,  $\Delta hoxEFUYH$ ) konnte gezeigt werden, dass die für den Phänotyp verantwortliche Funktion vor allem bei der Hydrogenaseuntereinheit liegt. Eine unterschiedlich starke Transkription der *hox* Gene konnte weder unter diesen Bedingungen, bei denen der Phänotyp auftritt, noch unter photoautotrophen Bedingungen, weder im Wildtyp, noch in einer Antisense Überexpressionsmutante (as-sll1223, einer Antisense-RNA, deren DNA zwischen *hoxF* und *hoxU* liegt (Mitschke et al. 2011)) beobachtet werden. Somit gibt es, auch wenn die beschriebene Funktion vor allem bei der Hydrogenaseuntereinheit liegt, keine Hinweise, dass die Hydrogenaseuntereinheit im Wildtyp ohne die Diaphoraseuntereinheit funktioniert. Wasserstoffmessungen konnten zeigen, dass die Hydrogenase, während der Erfüllung dieser für die Zellen unter diesen Bedingungen essentiellen Funktion, keinen Wasserstoff produziert. Die Hydrogenase hat also eine physiologische Funktion unter oxischen Bedingungen und Licht, bei der aber kein Wasserstoff produziert wird.

## Summary

The cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 possesses a bidirectional [NiFe]-hydrogenase that produces or takes up hydrogen (Appel and Schulz 1998). The enzyme consists of a diaphorase subunit (encoded by *hoxE*, *hoxF* and *hoxU*) and a hydrogenase subunit (encoded by *hoxY* and *hoxH*) (Appel and Schulz 1996; Vignais and Billoud 2007). Hydrogen is produced fermentatively in the dark (Stal and Moezelaar 1997) or directly after a change from dark to light (photohydrogen) for a short time (Appel et al. 2000; Cournac et al. 2004). The [NiFe]-hydrogenase is considered to be sensitive to oxygen (Cracknell et al. 2009; McIntosh et al. 2011) and does not produce hydrogen under oxic conditions, for example when oxygen is produced through photosynthesis (except photohydrogen). When the enzyme produces hydrogen its proposed function is that of an electron valve (Stal and Moezelaar 1997; Appel, Phunpruch et al. 2000). A focus of this work was to investigate the function of the hydrogenase under oxic conditions and continuous light. After a growth phenotype of a hydrogenase knockout mutant ( $\Delta hoxH$ ) under mixotrophic, nitrate-limited conditions and continuous light was discovered in this workgroup, it was proposed that there could be a function of the hydrogenase under these conditions. The appearance of a phenotype under these conditions was unexpected, as the hydrogenase should not be active under these conditions due to its sensitivity to oxygen. Contrary to this opinion, the hydrogenase seems to be essential under these oxic conditions. Under nitrate-limited conditions, the absence of the substrate for the nitrate- and the nitrite reductase should lead to a higher electron pressure. Under mixotrophic conditions, the presence of glucose down-regulates the Calvin-Benson cycle (Oesterhelt et al. 2007; Narainsamy et al. 2013) which should again lead to a higher electron pressure. As ferredoxin is an electron donor to the nitrate- and the nitrite reductase as well as to the Calvin-Benson cycle, the cells are missing two important ways to oxidize reduced ferredoxin (Gutekunst et al. 2014). Additionally a high electron pressure together with arginine as sole nitrogen source could lead to nitrogen deficiency (Schriek et al. 2008). Therefore the phenotype could show that the hydrogenase is essential for the oxidation of ferredoxin under the described conditions and could have the function of an electron valve as well under oxic conditions.

In this work it was shown that the growth phenotype is no artifact and that the cells were really exposed to oxic conditions under continuous light all the time. The exclusion of an artifact was accomplished by various growth experiments, qPCR experiments, and hydrogen measurements. It was shown that it is possible to rescue the hydrogenase mutant cells from its no growth phenotype by reducing the photosynthetic electron pressure. By enhancing the photosynthetic electron pressure, the growth of a hydrogenase/ flavoprotein-2/4 double mutant could be terminated at an

optical density of 2 under photoautotrophic conditions and therefore a further growth phenotype of a hydrogenase mutant could be discovered. qPCR experiments showed an enhanced transcription of *hoxH* (the gene encoding the subunit with the nickel-ferric center responsible for the reaction  $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$ ) under nitrate-limited, mixotrophic, oxic conditions and continuous light in the wild type. This result points to the importance of the hydrogenase under these conditions. Hydrogen measurements showed an enhanced hydrogen production under fermentative, mixotrophic, nitrate-limited conditions compared to fermentative non-mixotrophic, non-nitrate-limited conditions, which points to the importance of the hydrogenase in the growth medium used. It was shown by various measurements with oxygen sensors that the phenotype really occurs under oxic conditions.

The growth experiments described above already point to the function of the hydrogenase as an electron valve under oxic, mixotrophic, nitrate-limited conditions: When the photosynthetic electron pressure was lowered by a decrease of light intensity or addition of DCMU, the hydrogenase mutant which could not grow under standard light, could grow. Vice versa, an increase of electron pressure through raising the light intensity could stop the growth of a hydrogenase/flavoprotein-2/4 double mutant, which could grow under standard light, under photoautotrophic conditions. qPCR measurements of *hoxH* transcription in four different media under continuous light showed an enhanced transcription in those media in which the cells were subjected to a higher electron pressure. The fact that the cells were subjected to a higher electron pressure was also shown by carotenoid/chlorophyll measurements. All these results point to a function of the hydrogenase as an electron valve, also under the described oxic conditions.

Growth experiments with different hydrogenase mutants ( $\Delta hoxH$ ,  $\Delta hoxEF$ ,  $\Delta hoxEFUYH$ ) show that the subunit mainly responsible for this function lies by the hydrogenase subunit (more precisely *hoxH*). A different transcription of the *hox* genes could not be shown under the conditions where the phenotype occurs, nor under photoautotrophic conditions, neither in the wild type, nor in an antisense RNA overexpression mutant (as-sll1223, an antisense RNA whose DNA lies between *hoxF* and *hoxU* (Mitschke et al. 2011)). Hence, although the described function lies mainly in the hydrogenase subunit, there is no evidence that the hydrogenase subunit works without the diaphorase subunit in the wild type. Hydrogen measurements showed that the hydrogenase does not produce hydrogen during the performance of this function, which is essential under the described oxic conditions.

In conclusion it can be said that the hydrogenase does have a physiologic function under oxic conditions and light that does not lead to evolution of hydrogen.



## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Rüdiger Schulz, meinem Doktorvater, danken. Er bot mir die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Labor durchzuführen, war immer für Gespräche offen und war auch weit über die Arbeit hinausreichend immer sehr hilfsbereit. Auch möchte ich ihm für alle seine Bemühungen danken, eine angenehme Atmosphäre im Labor zu schaffen.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Kirstin Gutekunst, die mich während der gesamten Arbeit betreut hat. Ihr umfangreiches Wissen und ihre dauernde Bereitschaft zu intellektuellen Gesprächen waren eine große Motivation, sich mit den Themen rund um Cyanobakterien zu beschäftigen. Schon bei unserem ersten Treffen, bei dem „8th European Workshop on Molecular Biology of Cyanobacteria“ in Turku, interessierte sie sich für meine bisherige Arbeit und begeisterte mich für ihre Arbeit. Auch danke ich ihr für die freundschaftliche Beziehung und Hilfe, die über die Arbeit im Labor hinausgereicht hat.

Herrn Dr. Jens Appel möchte ich für seine Hilfsbereitschaft bei der Lösung von wissenschaftlichen und technischen Problemen danken, sowie für sein inspiratives Interesse an Wissenschaft und Cyanobakterien.

Ich möchte allen meinen Kolleg\*innen danken, die meinen Weg während der Doktorarbeit begleitet haben. Dazu gehören vor allem jene Menschen, die ebenfalls im Labor von Professor Dr. Rüdiger Schulz ihre Doktorarbeit geschrieben haben oder noch schreiben und mit denen ich daher intensiveren Kontakt hatte. Dies sind Dr. Karoline Schreiber, Dr. Xi Chen, Yingying Wang und Alexander Makowka. Besonders hervorheben möchte ich Dr. Karoline Schreiber, die ihre Doktorarbeit fast zur gleichen Zeit mit mir begonnen hat, die mich durch alle Höhen und Tiefen freundschaftlich begleitet hat und die ich als meine Doktorschwester ansehe.

Vielen Dank an Frau Prof. Dr. Annegret Wilde und ihre Arbeitsgruppe Molekulare Genetik, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, für das Zurverfügungstellen des Plasmides pVZ321.

Vielen Dank an die Arbeitsgruppe Stefan Schreiber, Universitätsklinikum Kiel, für die Sequenzierungen der DNAs für die in dieser Arbeit erstellten Plasmide.

Ein kollegiales Dankeschön an die Arbeitsgruppen Bilger, Kempken, Krupinska, Ober und Sauter und ihren Leiter\*innen an der CAU Kiel für die gute und nette Zusammenarbeit.

Den Kolleginnen Marieke Göser und Hanna Campen, die im Zuge von Praktika (Marieke Göser) bzw. Masterarbeit (Hanna Campen) qPCR- und Wachstumsexperimente mit mir durchführten, möchte ich für ihren Einsatz und die gemeinsam erarbeiteten Ergebnisse, die auch in diese Arbeit einfließen, danken.

Rebecca Kirsch, die ihre Master Arbeit in unserem Labor durchgeführt hat, möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die zur Zurverfügungstellung von genomischer DNA danken.

Ich möchte den Technischen Assistentinnen Claudia Marquardt, Sandra Pusch und Sabine Karg für ihre Hilfe im Laboralltag danken. Besonderer Dank geht hierbei an Claudia Marquardt, mit der ich viel Zeit verbringen durfte und von ihrem großen molekularbiologischen Wissen profitiert habe. Ihre humorvolle und freundliche Art waren ein stetiges Licht am Laborhimmel.

Herrn Dr. Opayi Mudimu, der in der Arbeitsgruppe als Postdoktorand beschäftigt ist, möchte ich für die freundschaftliche und freigiebige Zusammenarbeit danken.

Dr. Muharrem Köten danke ich für seine Freundschaft und sein Hilfestellung bei mathematischen Fragen rund um die qPCR, die des öfteren Stunden an Zeit und literweise Bier beansprucht hat.

Des weiteren möchte ich Cornelia Herzog-Truxa und Andrea Arndt danken, die am Botanischen Institut in den Büros angestellt sind. Besonders Frau Cornelia Herzog-Truxa hat mir in vielen administrativen Belangen Hilfestellung geboten.

Ich möchte der Zentralwerkstatt der Biologie an der CAU und besonders Herrn Thomas Walter und Alina Grave danken. Sie waren bei vielen technischen Problemen eine große Hilfe und waren oftmals bereit und in der Lage für meine Arbeit wichtige Gerätschaften zu bauen.

Den Mitarbeiter\*innen des Botanischen Gartens möchte ich für die Pflege und Instandhaltung des Tropenhauses und anderer Räumlichkeiten des Botanischen Gartens danken, wo es uns des öfteren erlaubt war, Feiern abzuhalten. Außerdem genossen meine Lebensgefährtin Birgit und mein Sohn Alfred des öfteren die Schönheit und den Umfang des Botanischen Gartens, während sie auf mich warten mussten.

Ich möchte allen Mitarbeiter\*innen der Mensa 2 der CAU, wo ich unzählige Mittagessen eingenommen habe, danken. Ein Dankeschön besonders an den Küchenchef, der fast täglich ein veganes Angebot auf dem Speiseplan geboten hat.

Ein Dank auch an die Raumpfleger\*innen des Botanischen Instituts, deren Arbeit dank ihrer Sorgfalt sozusagen im Unsichtbaren geblieben ist.

Ein außerordentlicher Dank geht an meine Lebensgefährtin Birgit Maier, M.A.. Sie half mir durch alle psychischen Tiefen und feierte mit mir alle Höhen, die die Doktorarbeit mit sich gebracht hat. Sie motivierte mich oft und schaufelte mir Zeit für die Durchführung meiner Arbeit frei. Immer wenn ich wegen der Arbeit keine Zeit mit meinem Sohn Alfred verbringen konnte, wusste ich, dass er bei ihr in den besten Händen ist, die sich ein Kind und sein Vater wünschen können!

Ich danke meinem Sohn Alfred für sein Lachen, für seinen Humor, für seine Intelligenz und für seine Sturheit, die mich stolz sein lassen und mir Motivation geboten haben, die Doktorarbeit bis zum Ende durchzuführen.

Ich danke meinen Eltern Elisabeth und Dieter Burgstaller und meinem Bruder Arndt, die mir den wissenschaftlichen Weg, den ich bis hierher begangen habe, ermöglicht haben. Ich sage es euch zwar nie, aber ich schreibe es euch hier.

Ich danke Frau Amalia Perauer für ihre finanzielle Hilfe bei der Durchführung meiner Ideen.

Vielen Dank an Birgit Maier, Frank und Heinz Lindemann und Hanna Stapelfeld, die meine Arbeit auf grammatikalische und Rechtschreibfehler kontrolliert haben.

Einen großen Teil des Schreibens der Doktorarbeit konnte ich in der Jess Bar in Kiel vollbringen. Dafür möchte ich dem Chef des Lokals, Hüseyin Asik danken. Er hat mir den nötigen Platz und Strom zur Verfügung gestellt und ist für mich nicht nur Wirt, sondern auch Freund geworden.

Ich danke der Belegschaft vor und hinter dem Tresen der Jess Bar, die mir teils durch Bereitschaft für wissenschaftliche Gespräche, teils durch Ablenkung von der Wissenschaft bei meiner Doktorarbeit geholfen haben. Hierzu zähle ich besonders Hüseyin, Evelyna, Doris, Frank, Emmer, Michael (BMg) Walter, Moni, Evi, Henry, Danie, Sascha, Severin, Carola, Kai, Horst, Manu, Didi, Raad, Lala, Uli, Sandy, Britta, Wolle, Wolle, Anke, Atif, Heiner, Reiner, Uwe, Hermann, Edith, Bierwolf, Hans-Werner, Andrea, Andrea, Birte, Stefan, Maurer, Isabella, Heike, Thies, Holger, Conny, Nelly-Ann, Sven, Ela, Henner, Rolf, Rolli, Sponi, Lisa, H. W. und Hilde. Besonders möchte ich Herrn Frank (Fahradpapst) Lindemann hervorheben, der sich immer für meine Arbeit interessiert hat und der mir nicht nur einmal mit seinem logischen praktischen Denken bei Problemlösungen geholfen hat.

Ich danke meinem Freund und Bruder Dr. Mario Kofler, der mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen gebracht hat und der mit seiner Argumentation entscheidend beim Gang meines wissenschaftlichen Weges war und ist.

Ich danke Wegbereitern der Cyanobakteriologie, von Paracelsus bis C. P. Wolk und K. S. Mereschkowsky bis R. Rippka, welche für mich, zumindest in Teilen ihres Schaffens, Vorbilder in der Wissenschaft waren.

Ein außerordentlicher Dank geht an Herrn Prof. Dr. Georg Schmetterer, der in mir die Liebe zu Cyanobakterien geweckt hat. Bei ihm durfte ich meine Diplomarbeit an der Universität Wien durchführen und er ermöglichte mir die Teilnahme am „8th European Workshop on Molecular Biology of Cyanobacteria“ in Turku, bei der ich meinen Doktorvater Prof. Dr. Rüdiger Schulz und meine Betreuerin Dr. Kirstin Gutekunst kennenlernen konnte. Außerdem war und ist für mich seine Kompromisslosigkeit bei der Suche nach Wahrheit und seine Überzeugung davon, dass gute Forschung unabhängig sein muss, eine andauernde Triebfeder.

Am Ende möchte ich Kiel und seinen Bewohner\*innen danken. Danke für die schöne Zeit die ich hier während meiner Doktorarbeit verbringen durfte, danke für Freundschaften, die hoffentlich erhalten bleiben, auch wenn ich nicht mehr hier lebe, danke für Wind, Regen und das Meer. Es war sicher eine der schönsten Zeiten in meinem Leben! Ich habe Angst, dass es nie wieder so schön wird wie hier.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Betreuer – nach Inhalt und Form meine Arbeit ist.

Diese Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden.

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt.

Heinrich Michael Burgstaller

## Literaturverzeichnis

Allen, J. F. and Martin, W. (2007). "Evolutionary biology: Out of thin air." Nature **445**(7128): 610-612.

Anderson, D. M., Glibert, P. M. and Burkholder, J. M. (2002). "Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences." Estuaries **25**(4): 704-726.

Anderson, S. L. and McIntosh, L. (1991). "Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process." Journal of Bacteriology **173**(9): 2761-2767.

André, G., Even, S., Putzer, H., Burguière, P., Croux, C., Danchin, A., Martin-Verstraete, I. and Soutourina, O. (2008). "S-box and T-box riboswitches and antisense RNA control a sulfur metabolic operon of *Clostridium acetobutylicum*." Nucleic Acids Research **36**(18): 5955-5969.

Appel, J., Phunpruch, S., Steinmuller, K. and Schulz, R. (2000). "The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis." Archives of Microbiology **173**(5-6): 333-338.

Appel, J. and Schulz, R. (1996). "Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)H-dehydrogenase (complex I)." Biochimica et Biophysica Acta **1298**: 141-147.

Appel, J. and Schulz, R. (1998). "Hydrogen metabolism in organisms with oxygenic photosynthesis: hydrogenases as important regulatory devices for a proper redox poisoning?" Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **47**(1): 1-11.

Armstrong, F. A., Belsey, N. A., Cracknell, J. A., Goldet, G., Parkin, A., Reisner, E., Vincent, K. A. and Wait, A. F. (2009). "Dynamic electrochemical investigations of hydrogen oxidation and production by enzymes and implications for future technology." Chemical Society Reviews **38**(1): 36-51.

Atteia, A., Adrait, A., Brugiere, S., Tardif, M., van Lis, R., Deusch, O., Dagan, T., Kuhn, L., Gontero, B., Martin, W., Garin, J., Joyard, J. and Rolland, N. (2009). "A proteomic survey of *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria sheds new light on the metabolic plasticity of the

organelle and on the nature of the alpha-proteobacterial mitochondrial ancestor." Molecular Biology and Evolution **26**(7): 1533-1548.

Barz, M., Beimgraben, C., Staller, T., Germer, F., Opitz, F., Marquardt, C., Schwarz, C., Gutekunst, K., Vanselow, K. H., Schmitz, R., LaRoche, J., Schulz, R. and Appel, J. (2010). "Distribution Analysis of Hydrogenases in Surface Waters of Marine and Freshwater Environments." PLoS One **5**(11): e13846.

Beauclerk, A. A. D. and Smith, A. J. (1978). "Transport of d-Glucose and 3-O-Methyl-d-Glucose in the Cyanobacteria *Aphanocapsa* 6714 and Nostoc strain Mac." European Journal of Biochemistry **82**(1): 187-197.

Berry, S., Schneider, D., Vermaas, W. F. J. and Rögner, M. (2002). "Electron Transport Routes in Whole Cells of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803: The Role of the Cytochrome bd-Type Oxidase." Biochemistry **41**(10): 3422-3429.

Bersanini, L., Battchikova, N., Jokel, M., Rehman, A., Vass, I., Allahverdiyeva, Y. and Aro, E.-M. (2014). "Flavodiiron Protein Flv2/Flv4-Related Photoprotective Mechanism Dissipates Excitation Pressure of PSII in Cooperation with Phycobilisomes in Cyanobacteria." Plant Physiology **164**(2): 805-818.

Bertani, G. (2004). "Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems." Journal of Bacteriology **186**(3): 595-600.

Bethesda-Research-Laboratories (1986). "BRL pUC host: *E. coli* DH5 $\alpha$  competent cells." Focus **8**(2): 9.

Billar, S. J., Berube, P. M., Berta-Thompson, J. W., Kelly, L., Roggensack, S. E., Awad, L., Roache-Johnson, K. H., Ding, H., Giovannoni, S. J., Rocap, G., Moore, L. R. and Chisholm, S. W. (2014). "Genomes of diverse isolates of the marine cyanobacterium *Prochlorococcus*." Scientific Data **1**: 140034.

Bothe, H., Schmitz, O., Yates, M. G. and Newton, W. E. (2010). "Nitrogen Fixation and Hydrogen Metabolism in Cyanobacteria." Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR **74**(4): 529-551.

Bronstein, M., Schütz, M., Hauska, G., Padan, E. and Shahak, Y. (2000). "Cyanobacterial Sulfide-Quinone Reductase: Cloning and Heterologous Expression." Journal of Bacteriology **182**(12): 3336-3344.

Burroughs, N. J., Boehm, M., Eckert, C., Mastroianni, G., Spence, E. M., Yu, J., Nixon, P. J., Appel, J., Mullineaux, C. W. and Bryan, S. J. (2014). "Solar powered biohydrogen production requires specific localization of the hydrogenase." Energy & Environmental Science **7**(11): 3791-3800.

Cai, Y. P. and Wolk, C. P. (1990). "Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences." Journal of Bacteriology **172**(6): 3138-3145.

Carrillo, N. and Ceccarelli, E. A. (2003). "Open questions in ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase catalytic mechanism." European Journal of Biochemistry **270**(9): 1900-1915.

Cassier-Chauvat, C. and Chauvat, F. (2014). "Function and Regulation of Ferredoxins in the Cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803: Recent Advances." Life **4**(4): 666.

Catling, D. C., Glein, C. R., Zahnle, K. J. and McKay, C. P. (2005). "Why O<sub>2</sub> is required by complex life on habitable planets and the concept of planetary oxygenation time." Astrobiology **5**(3): 415-438.

Chen, X., Schreiber, K., Appel, J., Makowka, A., Fähnrich, B., Roettger, M., Hajirezaei, M. R., Sönnichsen, F. D., Schönheit, P., Martin, W. F. and Gutekunst, K. (2016). "The Entner–Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **113**(19): 5441-5446.

Clavier, C. G. J. and Boucher, G. (1992). "The use of photosynthesis inhibitor (DCMU) for in situ metabolic and primary production studies on soft bottom benthos." Hydrobiologia **246**(2): 141-145.

Cooley, J. W., Howitt, C. A. and Vermaas, W. F. J. (2000). "Succinate:Quinol Oxidoreductases in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803: Presence and Function in Metabolism and Electron Transport." Journal of Bacteriology **182**(3): 714-722.

Cournac, L., Guedeney, G., Peltier, G. and Vignais, P. M. (2004). "Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex." Journal of Bacteriology **186**(6): 1737-1746.

Cracknell, J. A., Wait, A. F., Lenz, O., Friedrich, B. and Armstrong, F. A. (2009). "A kinetic and thermodynamic understanding of O<sub>2</sub> tolerance in [NiFe]-hydrogenases." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(49): 20681-20686.

- Crampton, N., Bonass, W. A., Kirkham, J., Rivetti, C. and Thomson, N. H. (2006). "Collision events between RNA polymerases in convergent transcription studied by atomic force microscopy." Nucleic Acids Research **34**(19): 5416-5425.
- Csiszar, K., Houmard, J., Damerval, T. and Tandeau de Marsac, N. (1987). "Transcriptional analysis of the cyanobacterial *gvpABC* operon in differentiated cells: occurrence of an antisense RNA complementary to three overlapping transcripts." Gene **60**: 29-37.
- Dagan, T., Roettger, M., Stucken, K., Landan, G., Koch, R., Major, P., Gould, S. B., Goremykin, V. V., Rippka, R., Tandeau de Marsac, N., Gugger, M., Lockhart, P. J., Allen, J. F., Brune, I., Maus, I., Pühler, A. and Martin, W. F. (2013). "Genomes of Stigonematalean Cyanobacteria (Subsection V) and the Evolution of Oxygenic Photosynthesis from Prokaryotes to Plastids." Genome Biology and Evolution **5**(1): 31-44.
- De Kok, A., Hengeveld, A. F., Martin, A. and Westphal, A. H. (1998). "The pyruvate dehydrogenase multi-enzyme complex from Gram-negative bacteria." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology **1385**(2): 353-366.
- Dexter, J., Armshaw, P., Sheahan, C. and Pembroke, J. T. (2015). "The state of autotrophic ethanol production in Cyanobacteria." Journal of Applied Microbiology **119**(1): 11-24.
- Dismukes, G. C., Klimov, V. V., Baranov, S. V., Kozlov, Y. N., DasGupta, J. and Tyrshkin, A. (2001). "The origin of atmospheric oxygen on Earth: The innovation of oxygenic photosynthesis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(5): 2170-2175.
- Domain, F., Houot, L., Chauvat, F. and Cassier-Chauvat, C. (2004). "Function and regulation of the cyanobacterial genes *lexA*, *recA* and *ruvB*: LexA is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation." Molecular Microbiology **53**(1): 65-80.
- Duan, H., Ma, R., Xu, X., Kong, F., Zhang, S., Kong, W., Hao, J. and Shang, L. (2009). "Two-Decade Reconstruction of Algal Blooms in China's Lake Taihu." Environmental Science & Technology **43**(10): 3522-3528.
- Dühring, U., Axmann, I. M., Hess, W. R. and Wilde, A. (2006). "An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene *isiA*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(18): 7054-7058.
- Dupuis, A., Prieur, I. and Lunardi, J. (2001). "Toward a Characterization of the Connecting Module of Complex I." Journal of Bioenergetics and Biomembranes **33**(3): 159-168.



- Eckert, C., Boehm, M., Carrieri, D., Yu, J., Dubini, A., Nixon, P. J. and Maness, P.-C. (2012). "Genetic Analysis of the Hox Hydrogenase in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 Reveals Subunit Roles in Association, Assembly, Maturation, and Function." Journal of Biological Chemistry **287**(52): 43502-43515.
- Ermakova, M., Huokko, T., Richaud, P., Bersanini, L., Howe, C. J., Lea-Smith, D. J., Peltier, G. and Allahverdiyeva, Y. (2016). "Distinguishing the Roles of Thylakoid Respiratory Terminal Oxidases in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." Plant Physiology **171**(2): 1307-1319.
- Flores, E., Frías, J. E., Rubio, L. M. and Herrero, A. (2005). "Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria." Photosynthesis Research **83**(2): 117-133.
- Flynn, J. K. and Butler, I. (1986). "Nitrogen sources for the growth of marine microalgae: role of dissolved free amino acids " Marine Ecology Progress Series **34**: 281-304.
- Fontecilla-Camps, J. C., Volbeda, A., Cavazza, C. and Nicolet, Y. (2007). "Structure/Function Relationships of [NiFe]- and [FeFe]-Hydrogenases." Chemical Reviews **107**(10): 4273-4303.
- Forberich, B. (2011). Der NDH-1-Komplex von *Synechocystis* PCC 6803. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Fujisawa, T., Okamoto, S., Katayama, T., Nakao, M., Yoshimura, H., Kajiya-Kanegae, H., Yamamoto, S., Yano, C., Yanaka, Y., Maita, H., Kaneko, T., Tabata, S. and Nakamura, Y. (2014). "CyanoBase and RhizoBase: databases of manually curated annotations for cyanobacterial and rhizobial genomes." Nucleic Acids Research **42**(D1): D666-D670.
- Garcia, H. E. and Gordon, L. I. (1992). "Oxygen solubility in seawater: Better fitting equations." Limnology and Oceanography **37**(6): 1307-1312.
- Georg, J. and Hess, W. R. (2011). "cis-Antisense RNA, Another Level of Gene Regulation in Bacteria." Microbiology and Molecular Biology Reviews **75**(2): 286-300.
- Georg, J., Voß, B., Scholz, I., Mitschke, J., Wilde, A. and Hess, W. R. (2009). "Evidence for a major role of antisense RNAs in cyanobacterial gene regulation." Molecular Systems Biology **5**: 305-305.
- Gerrity, G. M., Ed. (2001). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume One : The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria, Springer-Verlag New York.

- Ghirardi, M. L., Posewitz, M. C., Maness, P.-C., Dubini, A., Yu, J. and Seibert, M. (2007). "Hydrogenases and Hydrogen Photoproduction in Oxygenic Photosynthetic Organisms." Annual Review of Plant Biology **58**(1): 71-91.
- Giangrossi, M., Prosseda, G., Tran, C. N., Brandi, A., Colonna, B. and Falconi, M. (2010). "A novel antisense RNA regulates at transcriptional level the virulence gene *icsA* of *Shigella flexneri*." Nucleic Acids Research **38**(10): 3362-3375.
- Gonçalves, J. F. d. C., Marengo, R. A. and Vieira, G. (2001). "Concentration of photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence of mahogany and tonka bean under two light environments." Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal **13**: 149-157.
- Griese, M., Lange, C. and Soppa, J. (2011). "Ploidy in cyanobacteria." FEMS Microbiology Letters **323**(2): 124-131.
- Griffin, H. G. and Griffin, A. M. (1993). DNA Sequencing Protocols, Humana Press.
- Grigorieva, G. A. and Shestakov, S. V. (1976). Application of the genetic transformation method for taxonomic analysis of unicellular blue green algae. Proceedings of the 2nd International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes, University of Dundee, Scotland: 23.
- Gutekunst, K., Chen, X., Schreiber, K., Kaspar, U., Makam, S. and Appel, J. (2014). "The Bidirectional NiFe-hydrogenase in *Synechocystis* sp. PCC 6803 Is Reduced by Flavodoxin and Ferredoxin and Is Essential under Mixotrophic, Nitrate-limiting Conditions." Journal of Biological Chemistry **289**(4): 1930-1937.
- Gutekunst, K., Phunpruch, S., Schwarz, C., Schuchardt, S., Schulz-Friedrich, R. and Appel, J. (2005). "LexA regulates the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a transcription activator." Molecular Microbiology **58**(3): 810-823.
- Gutekunst, K. and Schulz, R. ((in press)). The physiology of the bidirectional NiFe-hydrogenase in cyanobacteria and the role of hydrogen throughout evolution of life. Microalgal Hydrogen Production: Achievements and Perspectives; Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences. G. Torzillo and M. Seibert.
- Hasunuma, T., Matsuda, M., Senga, Y., Aikawa, S., Toyoshima, M., Shimakawa, G., Miyake, C. and Kondo, A. (2014). "Overexpression of *flv3* improves photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 by enhancement of alternative electron flow." Biotechnology for Biofuels **7**(1): 493.

- Helman, Y., Tchernov, D., Reinhold, L., Shibata, M., Ogawa, T., Schwarz, R., Ohad, I. and Kaplan, A. (2003). "Genes Encoding A-Type Flavoproteins Are Essential for Photoreduction of O<sub>2</sub> in Cyanobacteria." Current Biology **13**(3): 230-235.
- Hernández, J. A., Muro-Pastor, A. M., Flores, E., Bes, M. T., Peleato, M. L. and Fillat, M. F. (2006). "Identification of a *furA* cis Antisense RNA in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120." Journal of Molecular Biology **355**(3): 325-334.
- Hirschberg, J. and Chamovitz, D. (1994). Carotenoids in Cyanobacteria. The Molecular Biology of Cyanobacteria. D. A. Bryant. Dordrecht, Springer Netherlands: 559-579.
- Hoffmann, D., Gutekunst, K., Klissenbauer, M., Schulz-Friedrich, R. and Appel, J. (2006). "Mutagenesis of hydrogenase accessory genes of *Synechocystis* sp. PCC 6803." FEBS Journal **273**(19): 4516-4527.
- Hohmann-Marriott, M. F. and Blankenship, R. E. (2011). "Evolution of Photosynthesis." Annual Review of Plant Biology **62**(1): 515-548.
- Howitt, C. A., Udall, P. K. and Vermaas, W. F. J. (1999). "Type 2 NADH Dehydrogenases in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 are Involved in Regulation Rather Than Respiration." Journal of Bacteriology **181**(13): 3994-4003.
- Howitt, C. A. and Vermaas, W. F. J. (1998). "Quinol and Cytochrome Oxidases in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." Biochemistry **37**(51): 17944-17951.
- Iijima, H., Nakaya, Y., Kuwahara, A., Hirai, M. Y. and Osanai, T. (2015). "Seawater cultivation of freshwater cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 drastically alters amino acid composition and glycogen metabolism." Frontiers in Microbiology **6**.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (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 Research **3**(3): 109-136.
- Kawano, M., Aravind, L. and Storz, G. (2007). "An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin." Molecular Microbiology **64**(3): 738-754.

- Kessler, E. (1973). "Effect of anaerobiosis on photosynthetic reactions and nitrogen metabolism of algae with and without hydrogenase." Archiv für Mikrobiologie **93**(2): 91-100.
- Khanna, N. and Lindblad, P. (2015). "Cyanobacterial Hydrogenases and Hydrogen Metabolism Revisited: Recent Progress and Future Prospects." International Journal of Molecular Sciences **16**(5): 10537.
- Kirilovsky, D. and Kerfeld, C. A. (2016). "Cyanobacterial photoprotection by the orange carotenoid protein." Nature Plants **2**: 16180.
- Kiss, E., Kos, P. B. and Vass, I. (2009). "Transcriptional regulation of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803." Journal of Biotechnology **142**(1): 31-37.
- Kumar, K., Mella-Herrera, R. A. and Golden, J. W. (2010). "Cyanobacterial Heterocysts." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **2**(4): a000315.
- Labarre, J., Chauvat, F. and Thuriaux, P. (1989). "Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803." Journal of Bacteriology **171**(6): 3449-3457.
- Lakatos, M., Bilger, W. and Büdel, B. (2001). "Carotenoid composition of terrestrial cyanobacteria: response to natural light conditions in open rock habitats in Venezuela." European Journal of Phycology **36**(4): 367-375.
- Lea-Smith, D. J., Ross, N., Zori, M., Bendall, D. S., Dennis, J. S., Scott, S. A., Smith, A. G. and Howe, C. J. (2013). "Thylakoid Terminal Oxidases Are Essential for the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to Survive Rapidly Changing Light Intensities." Plant Physiology **162**(1): 484-495.
- Leach, C. K. and Carr, N. G. (1971). "Pyruvate: Ferredoxin oxidoreductase and its activation by ATP in the blue-green alga *Anabaena variabilis*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **245**(1): 165-174.
- Li, J.-T., Zhang, Y., Kong, L., Liu, Q.-R. and Wei, L. (2008). "Trans-natural antisense transcripts including noncoding RNAs in 10 species: implications for expression regulation." Nucleic Acids Research **36**(15): 4833-4844.
- Liberton, M., Howard Berg, R., Heuser, J., Roth, R. and Pakrasi, H. B. (2006). "Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." Protoplasma **227**(2): 129.

- Lichtenthaler, H. K. (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology, Academic Press. **Volume 148**: 350-382.
- Liran, O., Semyatich, R., Milrad, Y., Eilenberg, H., Weiner, I. and Yacoby, I. (2016). "Microoxic Niches within the Thylakoid Stroma of Air-Grown *Chlamydomonas reinhardtii* Protect [FeFe]-Hydrogenase and Support Hydrogen Production under Fully Aerobic Environment." Plant Physiology **172**(1): 264-271.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Machado, I. M. P. and Atsumi, S. (2012). "Cyanobacterial biofuel production." Journal of Biotechnology **162**(1): 50-56.
- Mareš, J., Hrouzek, P., Kaňa, R., Ventura, S., Strunecký, O. and Komárek, J. (2013). "The Primitive Thylakoid-Less Cyanobacterium *Gloeobacter* Is a Common Rock-Dwelling Organism." PLoS One **8**(6): e66323.
- Margulis, L. (1970). Origin of Eukaryotic Cells. New Haven, Connecticut, Yale University Press.
- Martin, W. and Muller, M. (1998). "The hydrogen hypothesis for the first eukaryote." Nature **392**(6671): 37-41.
- Mathiesen, C. and Hägerhäll, C. (2003). "The 'antiporter module' of respiratory chain Complex I includes the MrpC/NuoK subunit – a revision of the modular evolution scheme." FEBS Letters **549**(1-3): 7-13.
- McIntosh, C. L., Germer, F., Schulz, R., Appel, J. and Jones, A. K. (2011). "The [NiFe]-Hydrogenase of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 Works Bidirectionally with a Bias to H<sub>2</sub> Production." Journal of the American Chemical Society **133**(29): 11308-11319.
- McNeely, K., Xu, Y., Ananyev, G., Bennette, N., Bryant, D. A. and Dismukes, G. C. (2011). "*Synechococcus* sp. Strain PCC 7002 *nifJ* Mutant Lacking Pyruvate:Ferredoxin Oxidoreductase." Applied and Environmental Microbiology **77**(7): 2435-2444.
- Medina, M., Luquita, A., Tejero, J., Hermoso, J., Mayoral, T., Sanz-Aparicio, J., Grever, K. and Gómez-Moreno, C. (2001). "Probing the Determinants of Coenzyme Specificity in Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> Reductase by Site-directed Mutagenesis." Journal of Biological Chemistry **276**(15): 11902-11912.

Millero, F. J. and Poisson, A. (1981). "International one-atmosphere equation of state of seawater." Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers **28**(6): 625-629.

Mitschke, J., Georg, J., Scholz, I., Sharma, C. M., Dienst, D., Bantscheff, J., Voß, B., Steglich, C., Wilde, A., Vogel, J. and Hess, W. R. (2011). "An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(5): 2124-2129.

Montesinos, M. L., Herrero, A. and Flores, E. (1997). "Amino acid transport in taxonomically diverse cyanobacteria and identification of two genes encoding elements of a neutral amino acid permease putatively involved in recapture of leaked hydrophobic amino acids." Journal of Bacteriology **179**(3): 853-862.

Moreira, D. and Lopez-Garcia, P. (1998). "Symbiosis between methanogenic archaea and delta-proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis." Journal of Molecular Evolution **47**(5): 517-530.

Mulkiđjanian, A. Y., Koonin, E. V., Makarova, K. S., Haselkorn, R. and Galperin, M. Y. (2008). Origin and Evolution of Photosynthesis: Clues from Genome Comparison. Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis. J. F. Allen, E. Gantt, J. H. Golbeck and B. Osmond. Dordrecht, Springer Netherlands: 1169-1175.

Mulkiđjanian, A. Y., Koonin, E. V., Makarova, K. S., Mekhedov, S. L., Sorokin, A., Wolf, Y. I., Dufresne, A., Partensky, F., Burd, H., Kaznadzey, D., Haselkorn, R. and Galperin, M. Y. (2006). "The cyanobacterial genome core and the origin of photosynthesis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(35): 13126-13131.

Mullineaux, C. W. (2014). "Co-existence of photosynthetic and respiratory activities in cyanobacterial thylakoid membranes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1837**(4): 503-511.

Mustila, H., Paananen, P., Battchikova, N., Santana-Sánchez, A., Muth-Pawlak, D., Hagemann, M., Aro, E.-M. and Allahverdiyeva, Y. (2016). "The Flavodiiron Protein Flv3 Functions as a Homo-Oligomer During Stress Acclimation and is Distinct from the Flv1/Flv3 Hetero-Oligomer Specific to the O<sub>2</sub> Photoreduction Pathway." Plant and Cell Physiology **57**(7): 1468-1483.

Musumeci, M. A., A., C. E. and L., C.-D. D. (2012). The Plant-Type Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> Reductases. Advances in Photosynthesis - Fundamental Aspects. M. Najafpour, InTech. **1**: 539-562.

- Nakao, M., Okamoto, S., Kohara, M., Fujishiro, T., Fujisawa, T., Sato, S., Tabata, S., Kaneko, T. and Nakamura, Y. (2010). "CyanoBase: the cyanobacteria genome database update 2010." Nucleic Acids Research **38**(Database issue): D379-D381.
- Narainsamy, K., Cassier-Chauvat, C., Junot, C. and Chauvat, F. (2013). "High performance analysis of the cyanobacterial metabolism via liquid chromatography coupled to a LTQ-Orbitrap mass spectrometer: evidence that glucose reprograms the whole carbon metabolism and triggers oxidative stress." Metabolomics **9**(1): 21-32.
- Neuer, G. and Bothe, H. (1982). "The pyruvate: ferredoxin oxidoreductase in heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*." Biochimica et Biophysica Acta **716**(3): 358-365.
- Oesterhelt, C., Schmäzlin, E., Schmitt, J. M. and Lokstein, H. (2007). "Regulation of photosynthesis in the unicellular acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*." The Plant Journal **51**(3): 500-511.
- Oliveira, P. and Lindblad, P. (2005). "LexA, a transcription regulator binding in the promoter region of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." FEMS Microbiology Letters **251**(1): 59-66.
- Opdyke, J. A., Kang, J.-G. and Storz, G. (2004). "GadY, a Small-RNA Regulator of Acid Response Genes in *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology **186**(20): 6698-6705.
- Palmer, A. C., Ahlgren-Berg, A., Egan, J. B., Dodd, I. B. and Shearwin, K. E. (2009). "Potent transcriptional interference by pausing of RNA polymerases over a downstream promoter." Molecular Cell **34**(5): 545-555.
- Pandelia, M.-E., Nitschke, W., Infossi, P., Giudici-Ortoni, M.-T., Bill, E. and Lubitz, W. (2011). "Characterization of a unique [FeS] cluster in the electron transfer chain of the oxygen tolerant [NiFe] hydrogenase from *Aquifex aeolicus*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(15): 6097-6102.
- Peschek, G. A., Molitor, V., Trnka, M., Wastyn, M. and Erber, W. (1988). [45] Characterization of cytochrome-*c* oxidase in isolated and purified plasma and thylakoid membranes from cyanobacteria. Methods in Enzymology, Academic Press. **Volume 167**: 437-449.
- Peters, J. W., Schut, G. J., Boyd, E. S., Mulder, D. W., Shepard, E. M., Broderick, J. B., King, P. W. and Adams, M. W. W. (2015). "[FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1853**(6): 1350-1369.

Pfaffl, M. W. (2004). "Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung." BIOSpektrum **1/04**: 92-95.

Pfister, K. and Arntzen, C. J. (1979). "The mode of Action of Photosystem II-Specific Inhibitors in Herbicide-Resistant Weed Biotypes." Zeitschrift für Naturforschung **34**(11): 996-1009.

Pinto, F., Pacheco, C. C., Ferreira, D., Moradas-Ferreira, P. and Tamagnini, P. (2012). "Selection of suitable reference genes for RT-qPCR analyses in cyanobacteria." PLoS One **7**(4): e34983-e34983.

Pinto, F., van Elburg, K. A., Pacheco, C. C., Lopo, M., Noirel, J., Montagud, A., Urchueguía, J. F., Wright, P. C. and Tamagnini, P. (2012). "Construction of a chassis for hydrogen production: physiological and molecular characterization of a *Synechocystis* sp. PCC 6803 mutant lacking a functional bidirectional hydrogenase." Microbiology **158**(2): 448-464.

Piubelli, L., Aliverti, A., Arakaki, A. K., Carrillo, N., Ceccarelli, E. A., Karplus, P. A. and Zanetti, G. (2000). "Competition between C-terminal tyrosine and nicotinamide modulates pyridine nucleotide affinity and specificity in plant ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase." Journal of Biological Chemistry **275**(14): 10472-10476.

Repeta, D. J. (2015). Chemical Characterization and Cycling of Dissolved Organic Matter. Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter (Second Edition). C. A. Carlson and D. A. Hansell. Boston, Academic Press: 21-63.

Rexroth, S., Mullineaux, C. W., Ellinger, D., Sendtko, E., Rögner, M. and Koenig, F. (2011). "The Plasma Membrane of the Cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* Contains Segregated Bioenergetic Domains." Plant Cell **23**(6): 2379-2390.

Reyes-Prieto A., Andreas P. M. Weber A. P. M. and Bhattacharya, D. (2007). "The Origin and Establishment of the Plastid in Algae and Plants." Annual Review of Genetics **41**(1): 147-168.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. and Stanier, R. Y. (1979). "Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria." Microbiology **111**(1): 1-61.

Rippka, R., Waterbury, J. and Cohen-Bazire, G. (1974). "A cyanobacterium which lacks thylakoids." Archives of Microbiology **100**(1): 419-436.

Ritchie, R. J. (2006). "Consistent Sets of Spectrophotometric Chlorophyll Equations for Acetone, Methanol and Ethanol Solvents." Photosynthesis Research **89**(1): 27-41.



Sambrook, J. and Russel, D. W. (2001). Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **74**(12): 5463-5467.

Schagerl, M. and Müller, B. (2006). "Acclimation of chlorophyll a and carotenoid levels to different irradiances in four freshwater cyanobacteria." Journal of Plant Physiology **163**(7): 709-716.

Schmetterer, G. (1990). "Sequence conservation among the glucose transporter from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and mammalian glucose transporters." Plant Molecular Biology **14**(5): 697-706.

Schmetterer, G. (2008). Molekularbiologie der Cyanobakterien; Methodenmappe für das Praktikum Molekularbiologie der Cyanobakterien, unveröffentlicht. Wien, Universität Wien.

Schmetterer, G. and Pils, D. (2004). Chapter 12: Cyanobacterial Respiration. Respiration in Archaea and Bacteria: Diversity of Prokaryotic Respiratory Systems. D. Zannoni. Dordrecht, Springer Netherlands: 261-278.

Schmitz, O., Boison, G., Salzmann, H., Bothe, H., Schütz, K., Wang, S.-h. and Happe, T. (2002). "HoxE—a subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex (HoxEFUYH) of cyanobacteria." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1554**(1–2): 66-74.

Schmitz, O. and Bothe, H. (1996). "NAD(P)<sup>+</sup>-dependent hydrogenase activity in extracts from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*." FEMS Microbiology Letters **135**(1): 97-101.

Schneider, D., Fuhrmann, E., Scholz, I., Hess, W. R. and Graumann, P. L. (2007). "Fluorescence staining of live cyanobacterial cells suggest non-stringent chromosome segregation and absence of a connection between cytoplasmic and thylakoid membranes." BMC Cell Biology **8**(1): 1-10.

Schriek, S., Aguirre-von-Wobeser, E., Nodop, A., Becker, A., Ibelings, B. W., Bok, J., Staiger, D., Matthijs, H. C. P., Pistorius, E. K. and Michel, K.-P. (2008). "Transcript profiling indicates that the absence of PsbO affects the coordination of C and N metabolism in *Synechocystis* sp. PCC 6803." Physiologia Plantarum **133**(3): 525-543.

Schriek, S., Rückert, C., Staiger, D., Pistorius, E. K. and Michel, K.-P. (2007). "Bioinformatic evaluation of L-arginine catabolic pathways in 24 cyanobacteria and transcriptional analysis of genes encoding enzymes of L-arginine catabolism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." BMC Genomics **8**(1): 437.

Sedoud, A., López-Igual, R., ur Rehman, A., Wilson, A., Perreau, F., Boulay, C., Vass, I., Krieger-Liszkay, A. and Kirilovsky, D. (2014). "The Cyanobacterial Photoactive Orange Carotenoid Protein Is an Excellent Singlet Oxygen Quencher." Plant Cell **26**(4): 1781-1791.

Shestakov, S. V. and Khyen, N. T. (1970). "Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans*." Molecular and General Genetics **107**(4): 372-375.

Shih, P. M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S. D., Fewer, D. P., Talla, E., Calteau, A., Cai, F., Tandeau de Marsac, N., Rippka, R., Herdman, M., Sivonen, K., Coursin, T., Laurent, T., Goodwin, L., Nolan, M., Davenport, K. W., Han, C. S., Rubin, E. M., Eisen, J. A., Woyke, T., Gugger, M. and Kerfeld, C. A. (2013). "Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing." Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(3): 1053-1058.

Shimakawa, G., Shaku, K., Nishi, A., Hayashi, R., Yamamoto, H., Sakamoto, K., Makino, A. and Miyake, C. (2015). "FLAVODIIRON2 and FLAVODIIRON4 Proteins Mediate an Oxygen-Dependent Alternative Electron Flow in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under CO<sub>2</sub>-Limited Conditions." Plant Physiology **167**(2): 472-480.

Simon, R. D. (1977). "Macromolecular Composition of Spores from the Filamentous Cyanobacterium *Anabaena cylindrica*." Journal of Bacteriology **129**(2): 1154-1155.

Stal, L. J. and Moezelaar, R. (1997). "Fermentation in cyanobacteria." FEMS Microbiology Reviews **21**: 179-211.

Steglich, C., Futschik, M. E., Lindell, D., Voss, B., Chisholm, S. W. and Hess, W. R. (2008). "The Challenge of Regulation in a Minimal Photoautotroph: Non-Coding RNAs in *Prochlorococcus*." PLOS Genetics **4**(8): e1000173.

Stephan, D. P., Ruppel, H. G. and Pistorius, E. K. (2000). "Interrelation between cyanophycin synthesis, L-arginine catabolism and photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." Zeitschrift für Naturforschung C **55**.

Stephan, D. P., Ruppel, H. G. and Pistorius, E. K. (2000). "Interrelation between cyanophycin synthesis, L-arginine catabolism and photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." Zeitschrift für Naturforschung C **55**(11-12): 927-942.

- Stork, M., Di Lorenzo, M., Welch, T. J. and Crosa, J. H. (2007). "Transcription Termination within the Iron Transport-Biosynthesis Operon of *Vibrio anguillarum* Requires an Antisense RNA." Journal of Bacteriology **189**(9): 3479-3488.
- Stripp, S. T., Goldet, G., Brandmayr, C., Sanganas, O., Vincent, K. A., Haumann, M., Armstrong, F. A., Happe, T. and Buchanan, B. B. (2009). "How Oxygen Attacks [FeFe] Hydrogenases from Photosynthetic Organisms." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(41): 17331-17336.
- Takada, A., Umitsuki, G., Nagai, K. and Wachi, M. (2007). "RNase E is required for induction of the glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **71**(1): 158-164.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wünschiers, R. and Lindblad, P. (2002). "Hydrogenases and Hydrogen Metabolism of Cyanobacteria." Microbiology and Molecular Biology Reviews **66**(1): 1-20.
- Teeling, H., Fuchs, B. M., Becher, D., Klockow, C., Gardebrecht, A., Bennke, C. M., Kassabgy, M., Huang, S., Mann, A. J., Waldmann, J., Weber, M., Klindworth, A., Otto, A., Lange, J., Bernhardt, J., Reinsch, C., Hecker, M., Peplies, J., Bockelmann, F. D., Callies, U., Gerdt, G., Wichels, A., Wiltshire, K. H., Glöckner, F. O., Schweder, T. and Amann, R. (2012). "Substrate-Controlled Succession of Marine Bacterioplankton Populations Induced by a Phytoplankton Bloom." Science **336**(6081): 608-611.
- Thiel, T. (1994). Genetic Analysis of Cyanobacteria. The Molecular Biology of Cyanobacteria. D. A. Bryant. Dordrecht, Springer Netherlands: 581-611.
- Thiel, T. and Poo, H. (1989). "Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation." Journal of Bacteriology **171**(10): 5743-5746.
- Thiergart, T., Landan, G., Schenk, M., Dagan, T. and Martin, W. F. (2012). "An Evolutionary Network of Genes Present in the Eukaryote Common Ancestor Polls Genomes on Eukaryotic and Mitochondrial Origin." Genome Biology and Evolution **4**(4): 466-485.
- Thomason, M. K. and Storz, G. (2010). "Bacterial antisense RNAs: How many are there and what are they doing?" Annual Review of Genetics **44**: 167-188.
- Tian, F., Toon, O. B., Pavlov, A. A. and De Sterck, H. (2005). "A Hydrogen-Rich Early Earth Atmosphere." Science **308**(5724): 1014-1017.

Vermaas, W. F. J. (2001). Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria. eLS, John Wiley & Sons, Ltd.

Vignais, P. M. and Billoud, B. (2007). "Occurrence, Classification, and Biological Function of Hydrogenases: An Overview." Chemical Reviews **107**(10): 4206-4272.

Vignais, P. M., Billoud, B. and Meyer, J. (2001). "Classification and phylogeny of hydrogenases." FEMS Microbiology Reviews **25**(4): 455-501.

Vincente, J. B., Gomes, C. M., Wasserfallen, A. and Teixeira, M. (2002). "Module fusion in A-type flavoprotein from the cyanobacterium *Synechocystis* condenses a multiple-component pathway in a single polypeptide chain." Biochemical and Biophysical Research Communications **294**.

Volbeda, A., Charon, M.-H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M. and Fontecilla-Camps, J. C. (1995). "Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*." Nature **373**(6515): 580-587.

Volbeda, A., Montet, Y., X., V., Hatchikian, E. C. and Fontecilla-Camps, J. C. (2002). "High resolution crystallographic analysis of *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase." International Journal of Hydrogen Energy **27**: 1449-1461.

Wang, R., Healey, F. P. and Myers, J. (1971). "Amperometric measurement of hydrogen evolution in *chlamydomonas*." Plant Physiology **48**(1): 108-110.

Wellburn, A. R. (1994). "The Spectral Determination of Chlorophylls *a* and *b*, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution." Journal of Plant Physiology **144**(3): 307-313.

Wetz, M. S. and Wheeler, P. A. (2004). "Response of bacteria to simulated upwelling phytoplankton blooms." Marine Ecology Progress Series **272**: 49-57.

Whitmarsh, J. and Govindjee (1999). The Photosynthetic Process. Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis. G. S. Singhal, G. Renger, S. K. Sopory, K. D. Irrgang and Govindjee. Dordrecht, Springer Netherlands: 11-51.

Wiesenburg, D. A. and Guinasso, N. L. (1979). "Equilibrium solubilities of methane, carbon monoxide, and hydrogen in water and sea water." Journal of Chemical & Engineering Data **24**(4): 356-360.

Wolk, C. P., Ernst, A. and Elhai, J. (1994). Heterocyst Metabolism and Development. The Molecular Biology of Cyanobacteria. D. A. Bryant. Dordrecht, Springer Netherlands: 769-823.

Wolk, C. P., Vonshak, A., Kehoe, P. and Elhai, J. (1984). "Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **81**(5): 1561-1565.

Wu, L.-F. and Mandrand, M. A. (1993). "Microbial hydrogenases: Primary structure, classification, signatures and phylogeny." FEMS Microbiology Reviews **10**(3-4): 243-269.

Wünschiers, R. and Schulz, R. (1998). "Photosynthese und Wasserstoff: Grundlagen und Nutzung." Biologie in unserer Zeit **3**: 7.

Xiong, J., Fischer, W. M., Inoue, K., Nakahara, M. and Bauer, C. E. (2000). "Molecular Evidence for the Early Evolution of Photosynthesis." Science **289**(5485): 1724-1730.

Yeremenko, N., Jeanjean, R., Prommeenate, P., Krasikov, V., Nixon, P. J., Vermaas, W. F. J., Havaux, M. and Matthijs, H. C. P. (2005). "Open Reading Frame *ssr2016* is Required for Antimycin A-sensitive Photosystem I-driven Cyclic Electron Flow in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." Plant and Cell Physiology **46**(8): 1433-1436.

Zavřel, T., Sinetova, M. A. and Červený, J. (2015). "Measurement of Chlorophyll *a* and Carotenoids Concentration in Cyanobacteria." Bio-protocol, <http://www.bio-protocol.org/e1467> **5**(9): e1467.

Zehr, J. P., Bench, S. R., Carter, B. J., Hewson, I., Niazi, F., Shi, T., Tripp, H. J. and Affourtit, J. P. (2008). "Globally Distributed Uncultivated Oceanic N<sub>2</sub>-Fixing Cyanobacteria Lack Oxygenic Photosystem II." Science **322**(5904): 1110-1112.

Zhang, P., Eisenhut, M., Brandt, A.-M., Carmel, D., Silén, H. M., Vass, I., Allahverdiyeva, Y., Salminen, T. A. and Aro, E.-M. (2012). "Operon *flv4-flv2* Provides Cyanobacterial Photosystem II with Flexibility of Electron Transfer." Plant Cell **24**(5): 1952-1971.

Zhang, S. and Bryant, D. A. (2011). "The Tricarboxylic Acid Cycle in Cyanobacteria." Science **334**(6062): 1551-1553.

Zinchenko, V. V., Piven, V., Melnik, V. A. and Shestakov, S. V. (1999). "Vectors for complementation analysis of mutants of cyanobacteria." Russian Journal of Genetics **35**(3): 228-232.

## 7 Anhang

### 7.1 Diagramme Carotinoidmessungen

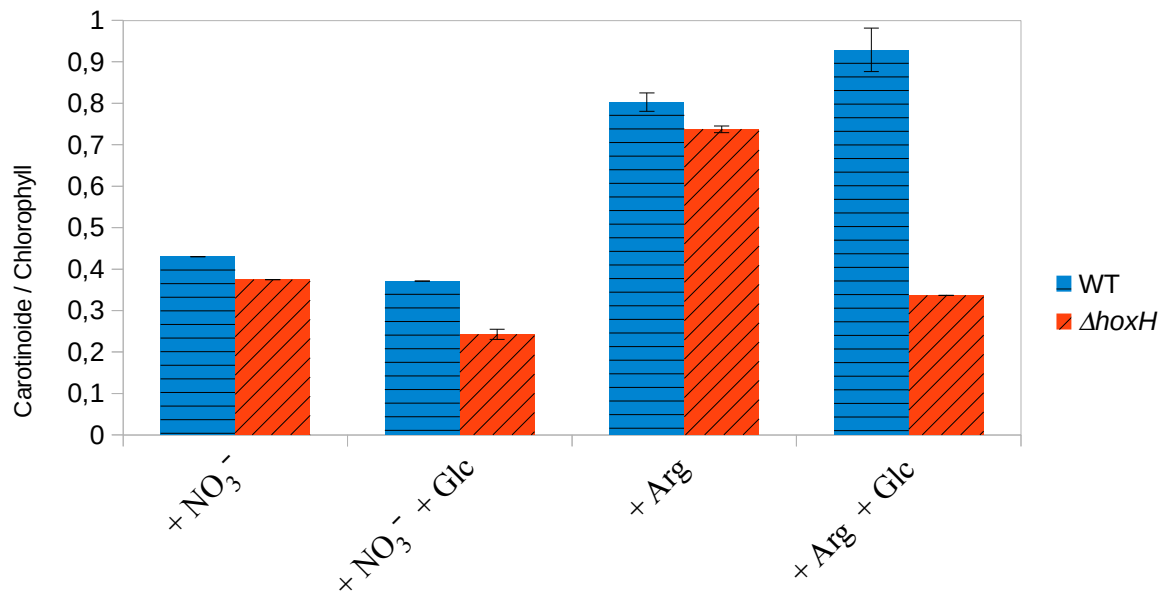


Abbildung 7.1: Carotinoidgehalt von Wildtyp bzw. der  $\Delta hoxH$  Mutante in den vier Medien BG11, BG11G, BG11<sub>0</sub>A und BG11<sub>0</sub>AG in Bezug zum Chlorophyllgehalt nach 72 h Wachstum. Lichtintensität: Standardlicht ( $60 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ );  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW

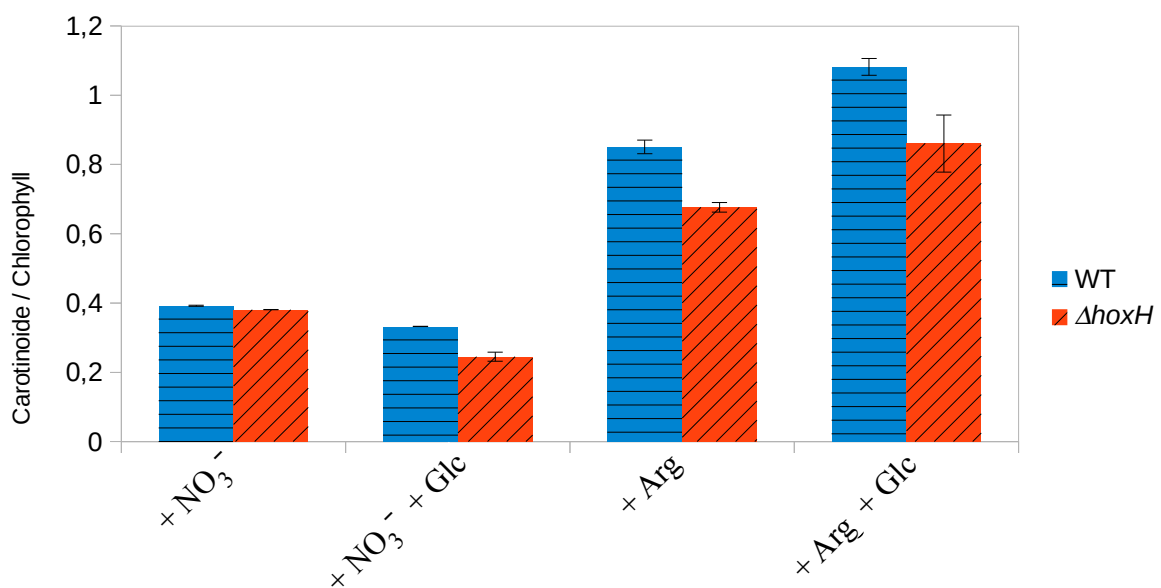


Abbildung 7.2: Carotinoidgehalt von Wildtyp bzw. der  $\Delta hoxH$  Mutante in den vier Medien BG11, BG11G, BG11<sub>0</sub>A und BG11<sub>0</sub>AG in Bezug zum Chlorophyllgehalt nach 120 h Wachstum. Lichtintensität: Standardlicht ( $60 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ );  $n = 3$ ,  $\pm$  STABW

## 7.2 Diagramme qPCR

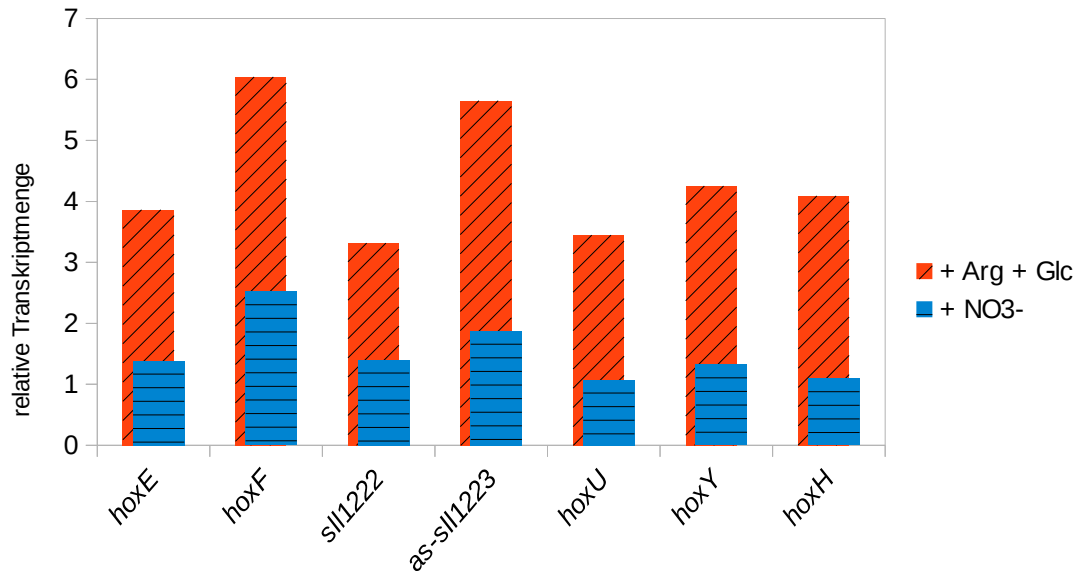


Abbildung 7.3: relative Transkriptmengen der hox Gene sowie sll1222 und as-sll1223 bezogen auf die jeweilige 16S rRNA Transkriptmenge  $\cdot 10^{-5}$ . Lichtintensität: Standardlicht ( $60 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ); (aus Wachstumsreihe 1)

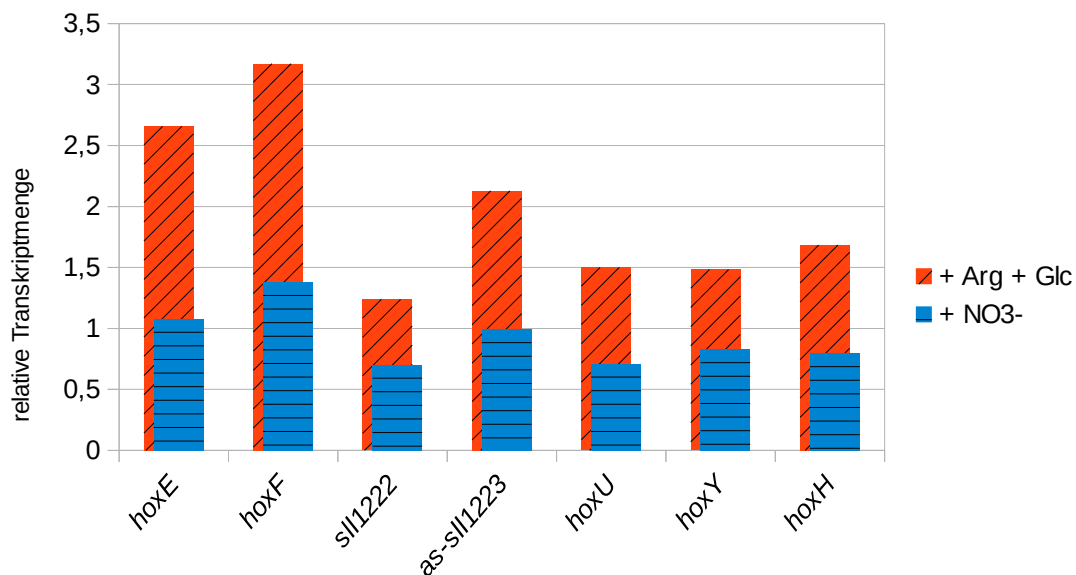


Abbildung 7.4: relative Transkriptmengen der hox Gene sowie sll1222 und as-sll1223 bezogen auf die jeweilige 16S rRNA Transkriptmenge  $\cdot 10^{-5}$ . Lichtintensität: Standardlicht ( $60 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ); (aus Wachstumsreihe 2)

### 7.3 Diagramme Wasserstoffmessungen

Die in den Abbildungen 7.5, 7.6 und 7.7 dargestellten Linien für die Sauerstoffkonzentration verlassen kurz nach Beginn und kurz vor Ende der Messung die Diagramme nach oben. Dies rührt daher, dass die Skalierung der Y-Achse so gewählt wurde, dass sie an die Wasserstoffkonzentrationen angepasst ist. Die Sauerstofflinien dienen nur der Darstellung, wann die Proben durch Dunkelheit und Stickstoffbegasung anoxisch wurden, dass sie während der Wasserstoffmessungen anoxisch waren und wann sie durch Belichtung und Luftbegasung wieder oxisch wurden. Die Sauerstoffkonzentrationen bewegen sich in der Zeit mit Beleuchtung und Luftbegasung zwischen ca. 280  $\mu\text{mol/l}$  (Sauerstoffsättigung bei Raumtemperatur) und ca. 320  $\mu\text{mol/l}$  (Übersättigung durch Photosynthese).

Dass die Sensoren in manchen Fällen leicht negative Konzentrationen gemessen haben, ist wahrscheinlich auf methodisch unvermeidbare Temperaturunterschiede zwischen der Kalibrierung der Sensoren und der Zeit in der gemessen wurde zurückzuführen.

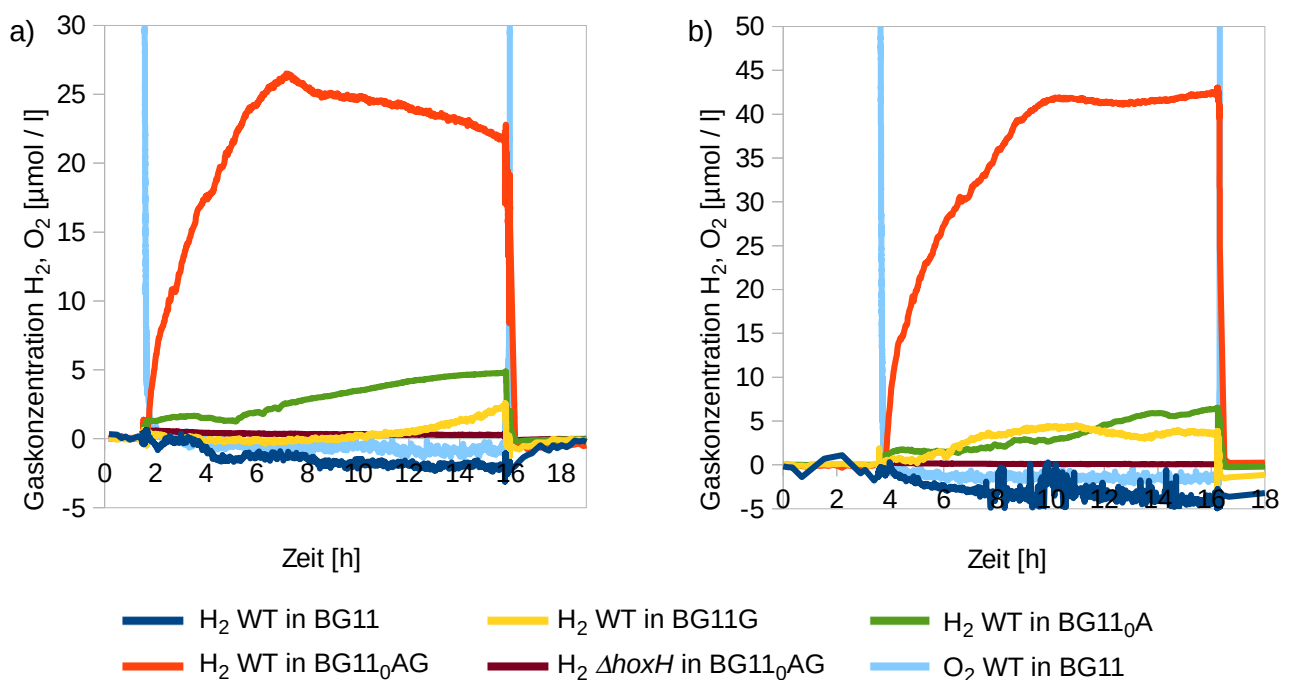


Abbildung 7.5: Fermentative Wasserstoffmessungen Experimente 1.1 (a) und 1.2 (b). Zelldichten  $\text{OD}_{750}$ : a) BG11: 0,42; BG11G: 0,51; BG11<sub>0</sub>A: 0,33; BG11<sub>0</sub>AG: 0,51; b) BG11: 0,64; BG11G: 1,03; BG11<sub>0</sub>A: 0,45; BG11<sub>0</sub>AG: 0,76



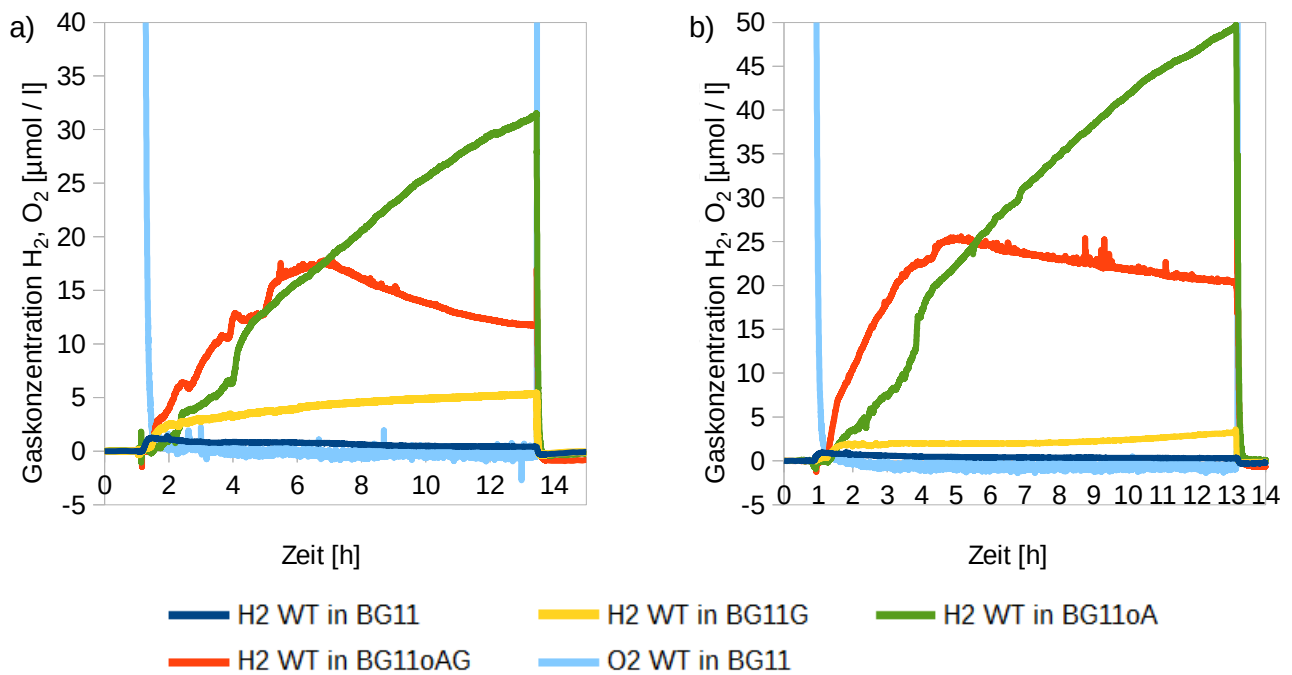


Abbildung 7.6: Fermentative Wasserstoffmessungen Experimente 2.1 (a) und 2.2 (b). Zelldichten  $OD_{750}$ : a) BG11: 0,712; BG11G: 0,716; BG11<sub>oA</sub>: 0,71; BG11<sub>oAG</sub>: 0,712; b) BG11: 1,21; BG11G: 1,31; BG11<sub>oA</sub>: 1,02; BG11<sub>oAG</sub>: 1,44

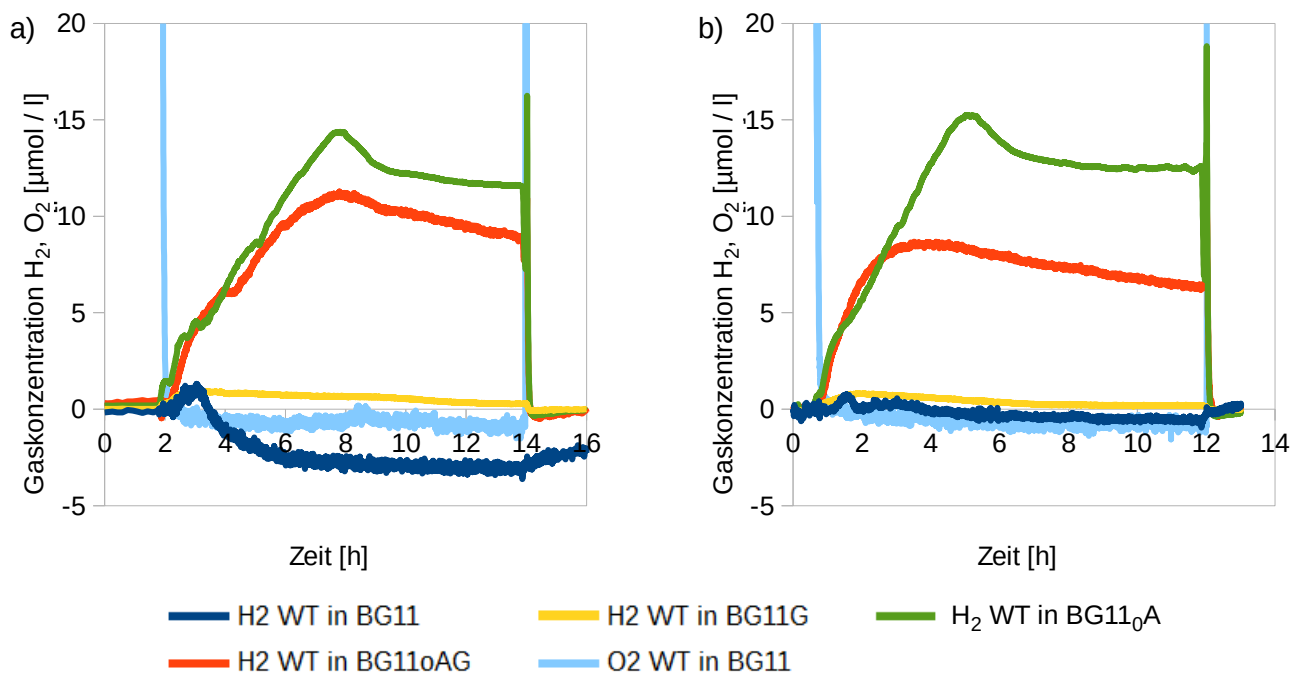


Abbildung 7.7: Fermentative Wasserstoffmessungen Experimente 3.1 (a) und 3.2 (b). Zelldichten  $OD_{750}$ : a) BG11: 0,38; BG11G: 0,43; BG11<sub>oA</sub>: 0,44; BG11<sub>oAG</sub>: 0,48; b) BG11: 0,41; BG11G: 0,48; BG11<sub>oA</sub>: 0,54; BG11<sub>oAG</sub>: 0,57

## 7.4 Tabellen Wasserstoffsättigung und Sauerstoffsättigung

Temp. °C	Salzgehalt ( 1 : 1000 )									
	0	10	20	30	32	34	36	38	40	
-2			901,34	851,79	841,96	832,59	823,21	813,84	804,46	
-1			890,18	841,52	832,14	822,77	813,84	804,46	795,54	
0	982,59	929,46	879,46	832,14	822,77	813,84	804,46	795,98	787,05	
1	969,64	917,86	869,20	822,77	813,84	804,91	795,98	787,50	778,57	
2	957,59	907,14	858,93	813,84	804,91	796,43	787,50	779,02	770,98	
3	945,54	896,43	849,55	805,36	796,43	787,95	779,91	771,43	763,39	
4	934,38	886,16	840,18	796,88	788,39	780,36	771,88	763,84	755,80	
5	923,66	876,34	831,70	789,29	780,80	772,77	764,73	756,70	748,66	
6	912,95	866,96	823,21	781,70	773,66	765,63	757,59	749,55	741,96	
8	893,30	849,11	807,14	767,41	759,38	751,79	744,20	736,61	729,46	
10	875,45	833,04	792,41	754,02	746,43	739,29	731,70	724,55	717,41	
12	858,93	817,86	779,02	741,96	734,82	727,68	720,54	713,39	706,70	
14	843,75	804,02	766,52	730,80	723,66	716,96	710,27	703,13	696,43	
16	829,46	791,52	755,36	720,54	713,84	707,14	700,45	693,75	687,50	
18	816,96	779,91	744,64	711,16	704,46	698,21	691,52	685,27	679,02	
20	805,36	769,64	735,27	702,68	695,98	689,73	683,48	677,23	671,43	
22	794,64	759,82	726,34	694,64	688,39	682,14	676,34	670,09	664,29	
24	785,27	751,34	718,75	687,50	681,70	675,45	669,64	663,84	657,59	
26	776,79	743,30	711,61	681,25	675,00	669,20	663,39	657,59	651,79	
28	768,75	736,16	704,91	675,45	669,64	663,84	658,04	652,23	646,88	
30	762,05	729,91	699,55	670,09	664,29	658,48	653,13	647,32	641,96	

Tabelle 7.1: Wasserstoffsättigung von Wasser bei verschiedenen Salzgehalten und Temperaturen in  $\mu\text{mol} / \text{l}$ . Entnommen aus dem Unisense Hydrogen sensor user manual, Version Jan. 2014; Berechnungsgrundlage: (Wiesenburg und Guinasso 1979)

<b>%o / °C</b>	<b>0.0</b>	<b>5.0</b>	<b>10.0</b>	<b>15.0</b>	<b>20.0</b>	<b>25.0</b>	<b>30.0</b>	<b>35.0</b>	<b>40.0</b>
<b>0.0</b>	456.6	398.9	352.6	314.9	283.9	257.9	235.9	217.0	200.4
<b>2.0</b>	450.4	393.6	348.1	311.1	280.6	255.0	233.3	214.7	198.3
<b>4.0</b>	444.2	388.5	343.7	307.3	277.3	252.1	230.8	212.4	196.3
<b>6.0</b>	438.1	383.3	339.4	303.6	274.0	249.3	228.3	210.2	194.3
<b>8.0</b>	432.1	378.3	335.1	299.9	270.8	246.5	225.8	207.9	192.3
<b>10.0</b>	426.1	373.3	330.8	296.2	267.6	243.7	223.3	205.7	190.3
<b>12.0</b>	420.3	368.4	326.7	292.6	264.5	240.9	220.9	203.6	188.4
<b>14.0</b>	414.5	363.5	322.5	289.1	261.4	238.2	218.5	201.4	186.5
<b>16.0</b>	408.8	358.7	318.4	285.5	258.3	235.5	216.1	199.3	184.6
<b>18.0</b>	403.2	354.0	314.4	282.1	255.3	232.8	213.7	197.2	182.7
<b>20.0</b>	397.7	349.3	310.4	278.6	252.3	230.2	211.4	195.1	180.8
<b>22.0</b>	392.2	344.7	306.5	275.2	249.3	227.6	209.1	193.0	179.0
<b>24.0</b>	386.8	340.2	302.6	271.9	246.4	225.0	206.8	191.0	177.1
<b>26.0</b>	381.5	335.7	298.7	268.5	243.5	222.5	204.5	189.0	175.3
<b>28.0</b>	376.2	331.2	294.9	265.3	240.6	219.9	202.3	187.0	173.5
<b>30.0</b>	371.0	326.9	291.2	262.0	237.8	217.4	200.1	185.0	171.7
<b>32.0</b>	365.9	322.5	287.5	258.8	235.0	215.0	197.9	183.0	170.0
<b>34.0</b>	360.9	318.3	283.9	255.7	232.2	212.5	195.7	181.1	168.2
<b>36.0</b>	355.9	314.1	280.3	252.5	229.5	210.1	193.6	179.2	166.5
<b>38.0</b>	351.0	309.9	276.7	249.5	226.8	207.7	191.4	177.3	164.8
<b>40.0</b>	346.2	305.8	273.2	246.4	224.1	205.4	189.3	175.4	163.1
<b>42.0</b>	341.4	301.8	269.4	243.4	221.5	203.1	187.3	173.6	161.5

*Tabelle 7.2: Sauerstoffsättigung von Wasser bei verschiedenen Salzgehalten und Temperaturen in  $\mu\text{mol} / \text{l}$ . Entnommen aus dem Unisense Oxygen sensor user manual, Version Jan. 2014; Berechnungsgrundlagen: (Millero und Poisson 1981; Garcia und Gordon 1992)*