

**Regulation der bidirektionalen NiFe-
Hydrogenase im Cyanobakterium
Synechocystis sp. PCC 6803**

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

vorgelegt von

Kirstin Gutekunst

Kiel

2006

Referent/in:.....

Korreferent/in:.....

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Zum Druck genehmigt: Kiel,.....

Der Dekan

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1

1.1	HYDROGENASEN IN FRÜHEN LEBEWESEN	1
1.2	PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG VON HYDROGENASEN IN REZENTEN LEBEWESEN ..	2
1.3	KLASSIFIKATION DER HYDROGENASEN	2
1.4	HYDROGENASEN IN CYANOBAKTERIEN	3
1.5	STRUKTURELLER AUFBAU DER NiFe-HYDROGENASEN	3
1.6	REIFUNG DER NiFe-HYDROGENASE	5
1.7	GENETISCHE ORGANISATION DER BIDIREKTIONALEN NiFe-HYDROGENASE IN CYANOBAKTERIEN	6
1.8	PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG VON HYDROGENASEN IN CYANOBAKTERIEN	7
1.9	REGULATION DER BIDIREKTIONALEN NiFe-HYDROGENASE IN CYANOBAKTERIEN	8
1.10	TRANSKRPTIONELLE REGULATION IN CYANOBAKTERIEN	8
1.11	PROMOTOREN IN CYANOBAKTERIEN	10
1.12	DER UNTERSUCHUNGSORGANISMUS	11

2 ZIELSETZUNG 13

2.1	ÜBERGEORDNETE ZIELSETZUNG BZW. ANWENDUNGSORIENTIERTE ASPEKTE DER FORSCHUNG AN HYDROGENASEN IN CYANOBAKTERIEN	13
2.2	ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	14

3 MATERIAL UND METHODEN 15

3.1	ORGANISMEN UND KULTURBEDINGUNGEN	15
3.1.1	<i>Kultivierung von Synechocystis</i>	15
3.1.2	<i>Kultivierung von Escherichia coli</i>	16
3.2	PHYSIOLOGISCHE PARAMETER	17
3.2.1	<i>Bestimmung der optischen Dichte</i>	17
3.2.2	<i>Bestimmung des Chlorophyllgehalts</i>	17
3.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	18
3.3.1	<i>Phenol-Chloroform-Extraktion</i>	18
3.3.2	<i>Ethanol-fällung</i>	18
3.3.3	<i>Isolierung von RNA</i>	18
3.3.4	<i>Isolierung von genomischer DNA</i>	19
3.3.5	<i>Plasmidisolierung aus Escherichia coli</i>	19
3.3.6	<i>Polymerase Kettenreaktion (PCR)</i>	19

3.3.7	<i>Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren</i>	20
3.3.8	<i>Ligation</i>	21
3.3.9	<i>Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen</i>	21
3.3.10	<i>PCR-Fusion</i>	21
3.3.11	<i>Transformation von Synechocystis</i>	22
3.3.12	<i>Transformation von Escherichia coli</i>	23
3.3.13	<i>Sequenzanalyse</i>	23
3.3.14	<i>Reverse Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)</i>	24
3.3.15	<i>Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes über 5`Racc (rapid amplification of cDNA ends)</i>	27
3.3.16	<i>Präparation von Proteingestamtextrakt</i>	29
3.3.17	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	29
3.3.18	<i>Überexpression der Transkriptionsfaktoren LexA und NtcA</i>	30
3.3.19	<i>SDS-Polyacrylamid-Gradientengel mit Harnstoff</i>	31
3.3.20	<i>Färbung von Proteinen im SDS-Gel</i>	32
3.3.21	<i>Gelretardierungsexperiment</i>	32
3.3.22	<i>Isolierung von DNA-Bindeproteinen</i>	36
3.4	PHYSIOLOGISCHE METHODEN	39
3.4.1	<i>Lumineszenzmessungen</i>	39
3.4.2	<i>Hydrogenasemessungen</i>	39
4	ERGEBNISSE	41
4.1	HYDROGENASEAKTIVITÄT VERSCHIEDENER SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803 STÄMME	41
4.2	NICKELHAUSHALT DES MOSKAUER WILDTYPS IM VERGLEICH ZUM LABOREIGENEN SYNECHOCYSTIS STAMM	42
4.3	EINFLUSS ABIOTISCHER FAKTOREN AUF DIE REGULATION DER BIDIREKTIONALE HYDROGENASE	46
4.3.1	<i>Einfluss von Nickel auf die Hydrogenase</i>	46
4.3.2	<i>Einfluss von Eisen auf die Hydrogenase</i>	46
4.3.3	<i>Einfluss von Stickstoff auf die Hydrogenase</i>	47
4.4	HYDROGENASEAKTIVITÄT AUSGESUCHTER HISTIDINKINASEN-MUTANTEN	48
4.5	CHARAKTERISIERUNG DES PROMOTORS DER HYDROGENASEGENE	50
4.5.1	<i>Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des hox Operons</i>	51
4.5.2	<i>Identifikation von Proteinbindestellen im Promoter des hox Operons</i>	52

4.5.3	<i>Identifikation des im hox Promotor bindenden Transkriptionsfaktors.....</i>	60
4.5.4	<i>Schleifenbildung des hox-Promotors.....</i>	69
4.6	CHARAKTERISIERUNG EINER MERODIPOLOIDEN NtCA- UND LEXA-MUTANTE....	70
5	DISKUSSION	73
5.1	HYDROGENASEAKTIVITÄT VERSCHIEDENER SYNECHOCYSTITIS SP. PCC 6803 STÄMME	73
5.2	EINFLUSS VON EISEN AUF DIE HYDROGENASE.....	74
5.3	EINFLUSS VON STICKSTOFF AUF DIE HYDROGENASE	75
5.4	HYDROGENASEAKTIVITÄT DER HIK7 MUTANTE	77
5.5	CHARAKTERISIERUNG DES PROMOTORS DER HYDROGENASEGENE	77
5.5.1	<i>LexA-Bindestellen im hox-Promotor</i>	78
5.5.2	<i>Schleifenbildung des hox-Promotors.....</i>	80
5.5.3	<i>Der untranslatierte Bereich des hox-Promotors</i>	84
5.5.4	<i>NtcA-Konsensusmotive im hox-Promotor</i>	85
5.6	FUNKTION VON LEXA.....	85
6	AUSBLICK	87
7	ZUSAMMENFASSUNG	88
8	SUMMARY	91
9	LITERATUR	94

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA
Chl	Chlorophyll
CSPD	
DCMU	3-(3', 4'-dichlorphenyl)- 1,1-dimethylurea
ddUTP	Didesoxy-Uridintriphosphat
Dig	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5' - Triphosphat
DNase	Desoxyribonuklease
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>glnA</i>	Gen für Glutaminsynthetase Typ I
<i>hox</i>	Gen für bidirektionale Hydrogenase
<i>hup</i>	Gen für aufnehmende Hydrogenase
<i>hyp</i>	Gen für pleiotrop auf die Hydrogenase wirkende Proteine
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KB	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Nährmedium nach Luria Bertani
<i>Lux</i>	Gen für Luziferase
min	Minute
MV	Methylviologen
mRNA	Boten-RNA
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCC	Pasteur Kultursammlung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>

Abkürzungsverzeichnis

PS	Photosystem
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
s/sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp	Spezie
TAP	Tabak Saure Pyrophosphatase
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borsäure/EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N' N'-Tetramethylethylendiamid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheit („unit“)
UV	ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
x-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-b-D-galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 *Hydrogenasen in frühen Lebewesen*

Vor über 4,5 Milliarden Jahren entstand durch Ausgasung des noch flüssigen Erdmantels die Uratmosphäre. Es dominierten die Gase Methan, Ammoniak, Schwefelwasserstoff und Wasserstoff. In dem damals herrschenden anaeroben Milieu könnte die Nutzung von Wasserstoff mittels primitiver Hydrogenasen eine der ersten Reaktionen gewesen sein, durch die frühzeitliche Organismen Energie erhielten. Hydrogenasen sind Oxidoreduktasen, die sowohl die Oxidation von Wasserstoff als auch die Reduktion von Protonen zu Wasserstoff katalysieren.



Neben seiner Bedeutung als Energielieferant frühen Lebens, könnte Wasserstoff auch die treibende Kraft für die Entstehung der ersten Eukaryontenzelle gewesen sein. Dies wird in zwei unabhängig voneinander aufgestellten Hypothesen, der Wasserstoff-Hypothese (Martin und Müller 1998) und der Syntrophie-Hypothese (Moreira und Lopez-Garcia 1998) postuliert. Während die von Margulis (1970) aufgestellte Endosymbiontentheorie davon ausgeht, dass eine Ureukaryontenzelle ein aerobes Bakterium bzw. ein Cyanobakterium endocytotisch aufgenommen hat, vermuten die Autoren der Wasserstoff- und Syntrophie-Hypothese, dass Eukaryonten aus einer Symbiose zwischen einem wasserstoffbedürftigen Archaeobakterium und einem wasserstoffproduzierenden Proteobakterium hervorgegangen sind. In der Wasserstoff-Hypothese wird vermutet, dass es sich bei dem Wasserstoffproduzenten um ein α -Proteobakterium handelte, während die Autoren der Syntrophie-Hypothese davon ausgehen, dass ein δ -Proteobacterium den Wasserstoff der frühen Symbiose lieferte. Anders als die Endosymbiontentheorie, die den ursprünglichen Gewinn für den Wirt nicht erklären kann - denn kein Bakterium ist in der Lage, ATP in sein Medium abzugeben - (Smith und Szathmary 1995) liefern Wasserstoff- und Syntrophie-Hypothese Erklärungen für die metabolischen Prozesse, die zur heutigen Eukaryontenzelle geführt haben könnten.

Eine weitere Entdeckung, die die Wasserstoff- bzw. Syntrophie-Hypothese unterstützt, ist die weite Verbreitung von hydrogenaseähnlichen Genen in rezenten Eukaryonten. Während ursprünglich davon ausgegangen wurde, dass sich Hydrogenasen nur in wenigen

Bakterien und einigen anaeroben wasserstoffproduzierenden Eukaryonten finden, hat sich inzwischen herausgestellt, dass auch höhere Eukaryonten, darunter auch das menschliche Genom, über hydrogenaseähnliche Gene verfügen (Horner et al. 2000). Eine Produktion von Wasserstoff konnte jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt in keinem höheren Eukaryonten nachgewiesen werden und die Funktion der entsprechenden Proteine ist in den überwiegenden Fällen nicht aufgeklärt. Für das Verständnis der frühen Evolution von Eukaryonten könnte jedoch das Wissen über die Verbreitung und Funktion von Hydrogenasen in rezenten Organismen einen wertvollen Beitrag liefern.

1.2 Physiologische Bedeutung von Hydrogenasen in rezenten Lebewesen

In rezenten Lebewesen spielen Hydrogenasen in vielen verschiedenen stoffwechselphysiologischen Zusammenhängen eine Rolle.

Einige Bakterien produzieren kleine Mengen von Wasserstoff, um das Redoxgleichgewicht ihrer Gärungsreaktionen aufrechtzuerhalten. Darüber hinaus kann Wasserstoff zur Bereitstellung von Stoffwechselenergie als Elektronendonator sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen genutzt werden (z.B. Knallgasbakterien, Methanogene, Sulfatreduzierer). Bei der Fixierung von atmosphärischem Stickstoff durch Cyanobakterien entsteht als Nebenprodukt Wasserstoff, der von einer aufnehmenden Hydrogenase oxidiert und dessen Elektronen so zurück in den Energiestoffwechsel gespeist werden können. Auch in den Plastiden einiger Algen finden sich Hydrogenasen, die für das Überdauern anaerober Verhältnisse von Bedeutung sind. Wenn Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor in den Mitochondrien fehlt, werden Reduktionsäquivalente durch die Produktion von Wasserstoff verbraucht. Einige anaerobe eukaryotische Mikroorganismen enthalten anstelle von Mitochondrien Hydrogenosomen, in denen das aus fermentativen Prozessen anfallende Pyruvat unter ATP-Gewinn zu Wasserstoff, Kohlendioxid und Acetat abgebaut wird.

1.3 Klassifikation der Hydrogenasen

Hydrogenasen lassen sich anhand des Metallgehalts ihrer aktiven Zentren klassifizieren. Neben Nur-Eisen, NiFeSe- und NiFe-Hydrogenasen wurden auch metallfreie Hydrogenasen beschrieben. Entgegen ihres Namens wurde jedoch gezeigt, dass die metallfreien Hydrogenasen ebenfalls ein Eisen innerhalb eines Kofaktors enthalten

(Buurman et al. 2000, Lyon et al. 2004). Nur-Eisen- und NiFe-Hydrogenasen zählen zu den weit häufigsten Hydrogenasen. Während Nur-Eisen-Hydrogenasen in Eubakterien und Eukaryonten zu finden sind, treten NiFe-Hydrogenasen in Archaeobakterien und Eubakterien auf (Vignais et al. 2001). Sequenz- und Strukturanalysen haben ergeben, dass die drei verschiedenen Hydrogenaseformen zu drei phylogenetisch getrennten Klassen gehören.

Unabhängig vom Metallgehalt ihrer aktiven Zentren werden Hydrogenasen entsprechend ihrer Reaktionsrichtung *in vivo* in Wasserstoff aufnehmende (uptake), bidirektionale und Wasserstoff produzierende Hydrogenasen unterteilt.

1.4 Hydrogenasen in Cyanobakterien

Phototrophe Cyanobakterien, zu denen der in dieser Arbeit untersuchte Organismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 gehört, sind eine evolutionär alte Gruppe, die fossilen Funden zufolge erstmals vor etwa 3,5 Milliarden Jahren auftrat. Es handelt sich um zur oxygenen Photosynthese befähigte Prokaryonten, die im Präkambrium zur Sauerstoffanreicherung der Atmosphäre beitrugen und aus deren Vorläufern sich der Endosymbiontentheorie zufolge die Plastiden von Pflanzen entwickelt haben. In allen bis heute untersuchten Cyanobakterien konnten ausschließlich aufnehmende und bidirektionale NiFe-Hydrogenasen nachgewiesen werden (Tamagnini et al. 2002).

Der in dieser Arbeit untersuchte Organismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 besitzt eine bidirektionale NiFe-Hydrogenase

1.5 Struktureller Aufbau der NiFe-Hydrogenasen

NiFe-Hydrogenasen sind aus mindestens zwei Untereinheiten aufgebaut, wobei die kleine Untereinheit mehrere FeS-Cluster zur Übertragung von Elektronen trägt und die große Untereinheit das aktive Zentrum enthält. Röntgen-Kristallstrukturen von NiFe-Hydrogenasen aus *Desulfovibrio gigas* (Volbeda et al. 1995), *Desulfovibrio vulgaris* (Higuchi et al. 1997) und *Desulfovibrio desulfuricans* (Matias et al. 2001) zeigten, dass beide Untereinheiten über eine große Kontaktfläche miteinander interagieren und ein globuläres Heterodimer bilden (Abb. 1).

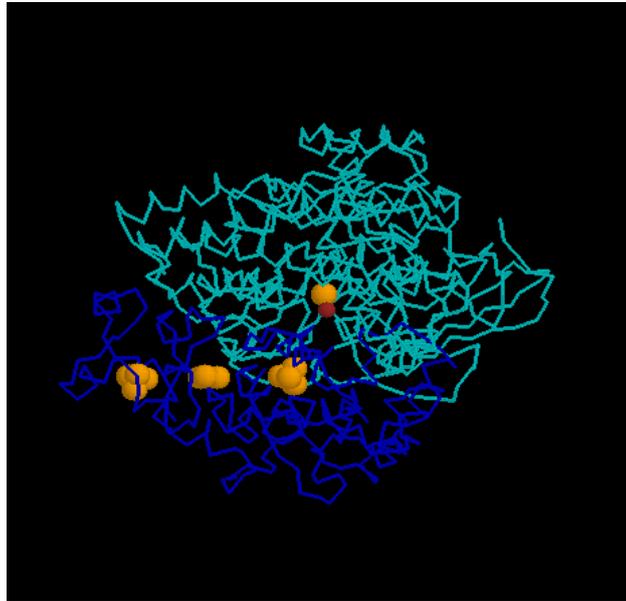


Abbildung 1: Röntgenkristallstruktur der NiFe-Hydrogenase aus *Desulfovibrio desulfuricans*. Die Abbildung wurde mit Rasmol auf Grundlage des Datenbankeintrags 1FRF der Proteindatenbank ([http:// www.pdb.org](http://www.pdb.org)) erstellt. Die große Untereinheit ist hellblau, die kleine Untereinheit dunkelblau gezeigt. In der großen Untereinheit befindet sich das aktive NiFe-Zentrum. Gezeigt sind außerdem die FeS-Cluster der kleinen Untereinheit.

Es wird angenommen, dass der Wasserstoff das aktive Zentrum über einen hydrophoben Tunnel erreicht (Montet et al. 1997) und dass konservierte, vom aktiven Zentrum zur Moleküloberfläche spannde Histidin- und Glutamatreste für den Transfer von Protonen verantwortlich sind. In die Elektronenübertragung vom aktiven Zentrum zu den jeweiligen Redoxpartnern sind die FeS-Cluster der kleinen Untereinheit involviert.

Im aktiven Zentrum sind ein Nickel- und ein Eisenatom durch vier konservierte Cysteinyliganden mit dem Protein verbunden (Volbeda et al. 1995). Das Eisen besitzt zusätzlich zwei CN- und einen CO-Liganden und ist mit dem Nickelatom über zwei Thiolate verbunden (Abb. 2).

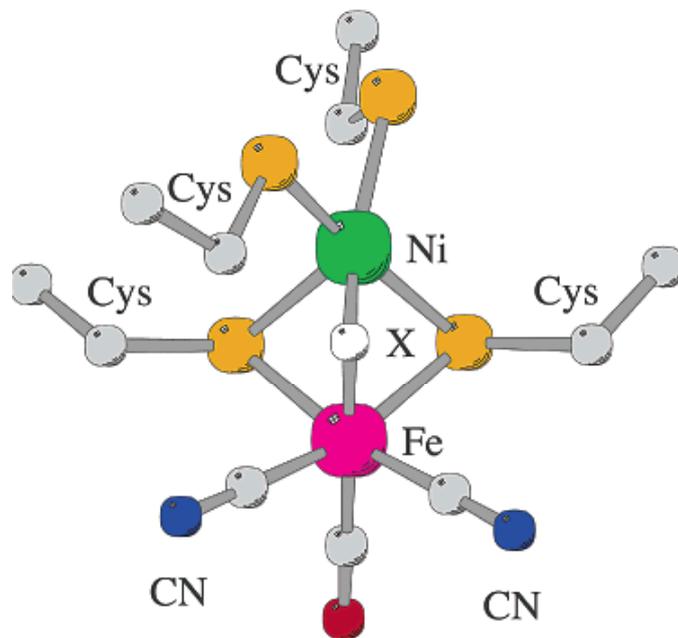


Abbildung 2: Struktureller Aufbau des aktiven Zentrums der bidirektionalen NiFe-Hydrogenase (verändert nach Förster et al. 2003).

1.6 Reifung der NiFe-Hydrogenase

Die Reifung der großen Untereinheit der NiFe-Hydrogenasen erfolgt über Hilfsproteine (akzessorische Proteine), die von den *hyp*-Genen (für hydrogenase pleiotropic) kodiert werden. Während über die Hydrogenasereifung in Cyanobakterien nur wenig bekannt ist, ist die Assemblierung der großen Untereinheit von NiFe-Hydrogenasen in *E.coli* detailliert untersucht worden (Blokesch et al. 2002). Hier finden sich die Gene *hypABCDE* in einem Operon, während *hypF* zusammen mit einem Gen unbekannter Funktion angeordnet ist. Für den letzten Schritt der Enzymreifung bedarf es zusätzlich einer spezifischen Endopeptidase.

Es wird angenommen, dass HypF und HypE einen Komplex bilden, mit Carbamoylphosphat (CP) reagieren und an der Synthese der Liganden des aktiven Zentrums Cyanid (CN) und eventuell auch CO beteiligt sind (Reismann et al 2003). HypE überträgt die Liganden vermutlich auf einen Komplex, der aus den Proteinen HypC und HypD besteht. Hier erfolgt die Bindung eines Eisenatoms, welches anschließend auf die große Untereinheit der Hydrogenase übertragen wird (Blokesch et al. 2002). Der

Nickeleinbau erfolgt erst nach dem Eiseneinbau und wird von den akzessorischen Proteinen HypA und HypB bewerkstelligt (Rossmann et al. 1994, Olson et al. 2001). In einem letzten Schritt spaltet die Endopeptidase HydD die C-terminalen 32 Aminosäuren vom Vorläuferprotein ab, was vermutlich zu einer Konformationsänderung und einer Verlagerung des aktiven Zentrums ins Innere des Enzyms führt (Fritsche et al. 1999).

In *Synechocystis* sind die *hyp*-Gene (*hyp A1, A2, B1, B2, C, D, E, F*) über das gesamte Genom verstreut, wobei jeweils zwei Homologe von *hypA* und *hypB* vorhanden sind. Eine Deletion der akzessorischen Gene *hypA1, B1, C, D, E, F* führt zu Mutanten ohne Hydrogenaseaktivität (Hoffman et al. unveröffentlicht). Die Homologen HypA2 und HypB2 scheinen jedoch nicht in die Hydrogenasereifung involviert zu sein, da ihre Deletion keine Auswirkung auf die Enzymaktivität hat. Für HypA1 und HypB1 wurde zudem nachgewiesen, dass sie, wie ihre Homologen in *E.coli*, ebenfalls an der Nickelinsertion ins aktive Zentrum der Hydrogenase beteiligt sind. Die Prozessierung des Vorläuferproteins der großen Untereinheit der Hydrogenase erfolgt in *Synechocystis* durch die Endopeptidase HoxW (Hoffman et al. unveröffentlicht).

1.7 Genetische Organisation der bidirektionalen NiFe-Hydrogenase in Cyanobakterien

Das globuläre Heterodimer aus kleiner (HoxY) und großer (HoxH) Untereinheit der bidirektionalen NiFe-Hydrogenase steht in Kontakt zu einer Diaphorase (HoxFU), welche den Elektronenaustausch zwischen Hydrogenase und NAD(P) vermittelt. Eine dritte Diaphorase Untereinheit (HoxE) konnte in *Anabaena* PCC 7120, *Synechococcus* PCC 6803 (*Anacystis nidulans*) und *Synechocystis* nachgewiesen werden.

Die Hydrogenasegene *hoxEFUYH* sind in *Synechocystis* in einem einzigen Operon angeordnet (Appel und Schulz 1996) (Abb. 3).

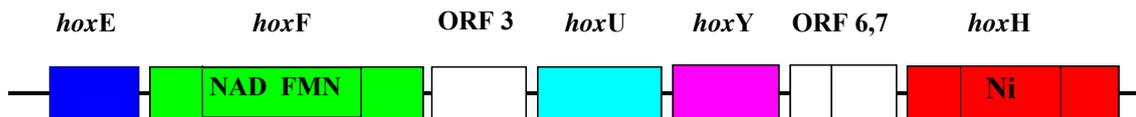


Abbildung 3: Anordnung der Hydrogenasegene *hoxEFUYH* in *Synechocystis* (verändert nach Appel und Schulz 1996).

In den Cyanobakterien *Anabaena* sp. PCC 7120 und *Synechococcus* sp. PCC 6301 verteilen sich die Hydrogenasegene auf zwei Gencluster mit einer Region von 8,8 kb bzw. 16 kb zwischen den Genen *hoxF* und *hoxU*. In *Synechococcus* sp. PCC 6301 befindet sich stromabwärts von *hoxH* ein zusätzlicher Leserahmen *hoxW*, der vermutlich eine Protease kodiert (Boison et al. 1998). In *Synechococcus* sp. PCC 7942 wird die Transkription der *hox* Gene von drei Promotoren reguliert, die sich stromaufwärts von *hoxE*, *hoxU* und *hoxW* befinden (Boison et al. 2000, Schmitz et al. 2001). In *Synechocystis* und *Anabaena variabilis* wurde hingegen jeweils ein einziges *hox* Transkript gefunden (S. Phunpruch, Dissertation 1999, Boison et al. 2000).

Es wird vermutet, dass die bidirektionale Hydrogenase an die NADPH-Dehydrogenase (Komplex I) gekoppelt ist, da die Diaphoraseuntereinheiten HoxEFU starke Homologien zu den NuoEFG Proteinen in *Escherichia coli* zeigen, die in diesem Organismus einen Teil des Komplexes I bilden und in Cyanobakterien fehlen. Die Hydrogenase könnte die Funktion der in Cyanobakterien fehlenden Untereinheiten ersetzen und HoxEFU könnten gleichzeitig vom Komplex I und der bidirektionalen Hydrogenase genutzt werden (Appel und Schulz 1996, Schmitz und Bothe 1996).

1.8 Physiologische Bedeutung von Hydrogenasen in Cyanobakterien

Aufnehmende Hydrogenasen finden sich ausschließlich in stickstofffixierenden Cyanobakterien. Sie nehmen den bei der Reduktion des Stickstoffs als Nebenprodukt anfallenden Wasserstoff auf und speisen die Elektronen zurück in den Energiestoffwechsel.

Die physiologische Funktion der bidirektionalen Hydrogenase ist in Cyanobakterien noch immer nicht vollständig geklärt. Es wurde gezeigt, dass sie ein wichtiges Enzym unter anaeroben Bedingungen in Gärungsreaktionen und zur Oxidation von Reduktionsäquivalenten sein kann (Van der Oost und Cox 1987, Stal und Mozelaar 1997). Desweiteren wurde vermutet, dass sie Wasserstoff oxidieren und Elektronen in die Atmungskette einspeisen kann (Kentemich et al. 1991, Schmitz et al. 1995).

Für das in dieser Arbeit untersuchte Cyanobakterium *Synechocystis* konnte gezeigt werden, dass die Hydrogenase unter Stressbedingungen als Ventil für Elektronen aus der Lichtreaktion der Photosynthese arbeitet (Appel und Schulz 1998, Appel et al. 2000, Cournac et al. 2004). Insbesondere bei der Anpassung an höhere Lichtintensitäten, speichert die Hydrogenase vorübergehend überschüssige Elektronen in Form von

Wasserstoff und verhindert so einen Stau in der Elektronentransportkette und die damit verbundene Schädigung der Photosysteme. Unter natürlichen Bedingungen ist ein Schutz der Photosysteme vor Elektronenstau wichtig, da planktisch lebende Cyanobakterien wie *Synechocystis* durch das windbedingte Durchmischen der Wassersäule innerhalb kürzester Zeit aus dunkleren Tiefen an die lichtdurchflutete Oberfläche gewirbelt werden können, wodurch es zu einer übermäßigen Anregung des Photosystems II kommen kann. Die vorübergehende Produktion von Wasserstoff kann hier ein wichtiger Schutz sein. Sobald sich die Redoxverhältnisse in der Photosynthesemembran wieder entspannt haben, können die Elektronen in die Elektronentransportkette der Photosynthese zurückgespeist werden (Appel et al. 2000, Cournac et al. 2004).

1.9 Regulation der bidirektionalen NiFe-Hydrogenase in Cyanobakterien

Über die Regulation der bidirektionalen Hydrogenase in Cyanobakterien ist noch immer wenig bekannt. Unter normalen Wachstumsbedingungen ist die Aktivität des Enzyms gering. In *Synechococcus* sp. PCC 7942 und *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde beobachtet, dass die Genexpression der bidirektionalen Hydrogenase eine circadiane Rhythmik aufweist (Schmitz et al. 2001, Kucho et al. 2005). Die Enzymaktivität wird allgemein durch Sauerstoff reversibel gehemmt. Mehrere Heterocysten-formende Cyanobakterien und auch das unizelluläre Cyanobakterium *Synechococcus* sp. PCC 6301 zeigen eine gesteigerte Hydrogenaseaktivität unter mikroaeroben oder anaeroben Verhältnissen (Houchins 1984, Kentemich et al. 1989, Serebriakova et al. 1994). Für *Chroococcidiopsis thermalis* und *Gloeocapsa alpicola* wurde eine gesteigerte Enzymaktivität unter Stickstoffmangel gezeigt (Almon et al. 1988, Sheremetieva et al. 2002).

Über die Regulation der bidirektionalen Hydrogenase in Cyanobakterien auf transkriptioneller Ebene liegen kaum Daten vor. In *Gloeocapsa alpicola* wurden die Transkriptmengen von *hoxH* und *hoxY* über semiquantitative RT-PCR unter Stickstoffmangel bestimmt. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen Transkriptmenge und Enzymaktivität gefunden werden (Sheremetieva et al. 2002).

1.10 Transkriptionelle Regulation in Cyanobakterien

Die Integration von externen oder intrazellulären Signalen in die transkriptionelle Regulation erfolgt in Cyanobakterien häufig über Zwei-Komponenten-Systeme, dem

zentralen Signaltransduktionssystem in Prokaryoten (Parkinson 1993). Es besteht im einfachsten Fall aus zwei Proteinen: einer Histidinkinase und einem Regulator (engl.: response regulator).

Die Genome vollständig sequenzierter Eubakterien haben gezeigt, dass Cyanobakterien vergleichsweise viele Zwei-Komponenten-Systemen besitzen (West und Stock 2001). Im Genom von *Synechocystis* finden sich 43 Gene, die Histidinkinasen und 40 Gene, die für Regulatoren kodieren (Mizuno et al. 1996). Das Cyanobakterium *Anabaena* sp. PCC7120 verfügt sogar über 195 Gene, die für Zwei-Komponenten-Systeme kodieren (Kaneko et al. 2001). In einem Versuch, die Kälteperzeption in *Synechocystis* aufzuklären, wurden systematisch alle Histidinkinasen und Regulatoren deletiert (Suzuki et al. 2000). Mithilfe der entsprechenden Mutanten konnte die Funktion mehrerer Zwei-Komponenten-Systeme aufgeklärt werden. Dazu gehören unter anderem Signaltransduktionswege als Antwort auf Lichtstress (Schwarz und Grossman 1998), Phosphatmangel (Hirani et al. 2001, Suzuki et al. 2004), Kältestress (Suzuki et al. 2000, 2001), Salzstress (Marin et al. 2003) und Hitzeschock (Suzuki et al. 2005).

Der Signaltransduktionsweg von Zwei-Komponenten-Systemen beginnt mit der Wahrnehmung des Signals durch die Rezeptor-Domäne der Histidinkinase. Als Reaktion autophosphoryliert ein konservierter Histidinrest. Diese Phosphatgruppe wird auf einen Aspartatrest des Regulators übertragen, wodurch die Effektor-Domäne aktiviert wird. Die aktivierte Effektor-Domäne bindet entweder direkt im Promotorbereich des Zielgens oder es findet eine Interaktion mit anderen Proteinen eines Signaltransduktionsweges statt (Stock et al. 2000). Zwei-Komponenten-Systeme können auch über die Expressionsregulation von Sigma-Faktoren und anderen Transkriptionsfaktoren externe Signale an die Zelle weiterleiten und so die Expression von einer Vielfalt von Genen beeinflussen.

Die Regulation von zwei NiFe-Hydrogenasen über ein Zwei-Komponenten-System konnte im Proteobakterium *Cupriavidus necator* (früher *Ralstonia eutropha* und *Alcaligenes eutrophus*) detailliert aufgeklärt werden. Beide Hydrogenasen ermöglichen es *C. necator* auf Wasserstoff zu wachsen. Die Expression der Enzyme wird durch eine dritte NiFe-Hydrogenase reguliert, die als Wasserstoff-Sensor mit der Histidinkinase HoxJ interagiert. HoxJ kommuniziert über Phosphorylierung/Dephosphorylierung mit dem Regulator HoxA und kontrolliert so die Transkription der Hydrogenasegene (Lenz und Friedrich 1998, Buhrke et al. 2004). Ein ähnlicher Signaltransduktionsweg wurde auch für *Rhodobacter capsulatus* beschrieben (Dischert et al. 1999, Vignais et al. 2005).

1.11 Promotoren in Cyanobakterien

Cyanobakterielle Promotoren unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht von enterobakteriellen Promotoren. In *in vivo* Experimenten wurde zwar beobachtet, dass *E.coli* Promotoren in Cyanobakterien aktiv sein können (Li and Golden 1993) und dass einige cyanobakterielle Promotoren in *E.coli* transkribiert werden (Mazouni et al 2003), *in vitro* Experimente haben jedoch wiederholt gezeigt, dass weder die Transkription von enterobakteriellen Promotoren durch cyanobakterielle RNA-Polymerasen noch die Transkription von cyanobakteriellen Promotoren durch enterobakterielle RNA-Polymerasen präzise initiiert wird (Schneider et al. 1987, Schyns et al. 1998). Die Ursache könnte in strukturellen Unterschieden zwischen beiden RNA-Polymerasen liegen. Cyanobakterielle RNA Polymerasen ($\alpha_2\beta\gamma\beta'\sigma$) besitzen im Vergleich zur enterobakteriellen Form ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) eine zusätzliche γ Untereinheit. Das Homologe der enterobakteriellen β' Untereinheit ist in Cyanobakterien in die β' und γ Untereinheiten gespalten (Bergslund and Haselkorn 1991, Houmard 1994, Link 1996). Dies könnte Protein-Protein und/oder DNA-Protein Wechselwirkungen beeinflussen (Schyns et al. 1998) und strukturelle Differenzen zwischen enterobakteriellen und cyanobakteriellen Promotoren erklären.

Während die Konsensussequenz der -10 Box (TATAAT), die typisch für enterobakterielle Promotoren vom σ^{70} Typ ist, in Cyanobakterien oft gut konserviert ist, fehlt die -35 Box (TTGACA) häufig (Curtis und Martin 1994). Da die -10 und -35 Boxen vom σ^{70} Faktor der RNA-Polymerase erkannt werden und da Cyanobakterien andere Sigma Faktoren als Enterobakterien besitzen, sind die Unterschiede bezüglich der Konsensussequenzen im Promotorbereich nicht wirklich erstaunlich.

Im Transkriptionsgeschehen assoziiert der Sigma-Faktor mit der RNA-Polymerase und interagiert spezifisch mit den entsprechenden DNA Sequenzen. Sobald die RNA Polymerase fest mit dem Promotor assoziiert ist und einige Nukleotide transkribiert sind, verlässt der Sigma Faktor die RNA Polymerase und kann mit anderen RNA-Polymerasen interagieren. Die Zelle besitzt verschiedene Sigma Faktoren, die jeweils nur mit spezifischen Konsensussequenzen in Wechselwirkung treten.

Die enterobakteriellen σ Faktoren lassen sich drei Gruppen zuordnen, wobei die erste Gruppe den essentiellen σ^{70} Faktor, die zweite den nicht essentiellen σ^{38} Faktor und die dritte Gruppe fünf alternative σ Faktoren enthält. Die alternativen Sigma Faktoren unterscheiden sich strukturell stark von den Sigma Faktoren aus den ersten beiden Gruppen und regulieren die Transkription spezieller Regulons.

Anders als in Enterobakterien findet man in Cyanobakterien häufig mehrere Sigma Faktoren der zweiten Gruppe. Es wird vermutet, dass diese den Cyanobakterien helfen, sich stark variablen Bedingungen besser anzupassen (Brahamsha and Haselkorn 1992, Gruber and Bryant 1998). In allen bisher untersuchten Cyanobakterien konnte kein Homologes zum alternativen σ^{54} Faktor aus *E.coli* gefunden werden. Promotoren, die von RNA Polymerasen mit assoziiertem σ^{70} Faktor erkannt werden, werden durch Repressoren oder Aktivatoren reguliert, die in der Nähe der RNA-Polymerase Bindestelle binden. Promotoren, deren Transkription hingegen von σ^{54} Faktoren abhängig ist, werden von Enhancern reguliert, die in größeren Abständen an die DNA binden und mit der RNA Polymerase durch die Ausbildung von DNA Schleifen kommunizieren (Su et al. 1990). Obwohl in Cyanobakterien Homologe zum σ^{54} Faktor fehlen, wurden einige Promotoren beschrieben, deren Transkription positiv durch Sequenzen weit stromaufwärts beeinflusst wird (Mazouni et al. 1998, 2003).

1.12 Der Untersuchungsorganismus

Diese Arbeit wurde am einzelligen Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 durchgeführt (Anderson und McIntosh 1991). Es handelt sich um einen Süßwasserorganismus, der sich natürlich durch exogene DNA transformieren lässt (Grigorieva und Shestakov 1982). Wie alle Cyanobakterien ist *Synechocystis* zur oxygenen Photosynthese befähigt. Der in dieser Arbeit untersuchte Stamm wächst außerdem bei 15 minütiger Belichtung pro Tag heterotroph auf Glukose (Anderson und McIntosh 1991). *Synechocystis* ist das erste phototrophe Lebewesen und der vierte Organismus überhaupt, dessen Gesamtsequenz bestimmt wurde (Kaneko et al. 1996). Es besitzt ein zirkuläres Genom von 3573470 bp mit 3168 offenen Leserahmen.

Für molekularbiologische Untersuchungen wurde *Synechocystis* 1968 in Oakland, Kalifornien als „Berkley Stamm 6803“ aus Süßwasser isoliert. Aus diesem Stamm haben sich im Laufe der Jahre vier Unterstämme entwickelt, die in der Annahme, dass sie völlig identisch seien unter ein und demselben Namen *Synechocystis* sp. PCC 6803 zusammengefasst wurden (Rippka und Herdmann 1992). Inzwischen hat sich jedoch herausgestellt, dass sich die Stämme genetisch und phänotypisch unterscheiden (Ikeuchi und Tabata 2001). Es wird vermutet, dass diese Unterschiede auf Spontanmutationen, teilweise ausgelöst durch die Aktivität von Transposons (Okamoto et al. 1999) oder den unter verschiedenen Kulturbedingungen auftretenden Selektionsdruck zurückgehen. Da die

Unterstämmen isoliert voneinander in verschiedenen Laboren kultiviert wurden, konnten sich diese Unterschiede über die Jahre manifestieren.

2 Zielsetzung

2.1 Übergeordnete Zielsetzung bzw. anwendungsorientierte Aspekte der Forschung an Hydrogenasen in Cyanobakterien

Die Fragestellung nach der Regulation der bidirektionalen NiFe-Hydrogenase im Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde zum einen durch das Interesse an der Beantwortung grundlegender Fragen motiviert. Darüber hinaus spielten anwendungsorientierte Aspekte eine Rolle und hier in erster Linie der Wunsch, die Bemühungen um eine photobiologische Wasserstoffproduktion zu unterstützen. Wasserstoff gilt als ein vielversprechender Energieträger der Zukunft. Mit 142 MJ/kg besitzt er den höchsten spezifischen Energiegehalt aller Energieträger. Sowohl in Brennstoffzellen als auch in Verbrennungsmotoren reagiert Wasserstoff unter Energiefreisetzung mit Sauerstoff zu reinem Wasser, was ihn zu einer äußerst umweltverträglichen Energiequelle macht.

Problematisch ist zur Zeit vor allem die Gewinnung von Wasserstoff. Großtechnische Verfahren, wie die Wasserelektrolyse, also die Spaltung von Wasser zu Sauerstoff und Wasserstoff oder das Kvaerner-Verfahren, bei dem Kohlenwasserstoffe in Reinstkohle und Wasserstoff getrennt werden, sind energetisch so aufwendig, dass die Energieausbeute nur gering ist. Die Wasserstoffgewinnung aus fossilen Quellen hat den Nachteil, dass Kohlendioxid emittiert wird. Energetisch sinnvoll und umweltverträglich ist die biologische Wasserstoffgewinnung. Prinzipiell stehen zwei Verfahren zur Verfügung: die anaerobe Vergärung von Biomasse durch Mikroorganismen oder das Auffangen von Wasserstoff, der von Algen und Cyanobakterien als Nebenprodukt der Photosynthese gebildet wird.

Bedenkt man, dass die Sonne mit einer jährlich auf die Erdoberfläche eintreffenden Energiemenge von 39×10^{24} J die weitaus größte regenerative Ressource ist und nur ein Zehntausendstel dieser Energiemenge ausreichen würde, um den Weltprimärenergiebedarf zu decken, erscheint die photobiologische Wasserstoffgewinnung als besonders attraktiv.

Ziel einer Großzahl von Projekten, die sich mit Hydrogenasen befassen, ist es daher, Möglichkeiten aufzudecken, die Wasserstoffproduktion der untersuchten Organismen zu erhöhen, um Wasserstoff als umweltfreundlichen Energieträger zur Verfügung zu stellen.

Für dieses Vorhaben ist die Aufklärung der Funktion und Regulation von Hydrogenasen in den entsprechenden Organismen grundlegend.

2.2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Regulation der bidirektionalen NiFe-Hydrogenase in *Synechocystis* sp. PCC 6803 zu untersuchen. Von physiologischen Messungen werden Hinweise auf externe Faktoren erwartet, welche die Enzym- und Promotoraktivität beeinflussen. Um nach Signaltransduktionswegen zu suchen, soll eine Auswahl von Histidinkinasemutanten untersucht werden. Der Schwerpunkt der Arbeit liegt auf der Aufklärung der transkriptionellen Regulation der Hydrogenase und der Charakterisierung des Promotors. Neben der Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes soll die Struktur des Promotors unter Verwendung eines Reportergensystems mit den Genen *luxAB* aufgeklärt werden. Es soll außerdem geprüft werden, ob das Ablesen der Hydrogenasegene von Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Diese sollen charakterisiert und ihre Wirkung auf die Hydrogenase *in vivo* gezeigt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Organismen und Kulturbedingungen

3.1.1 Kultivierung von *Synechocystis*

Die Untersuchungen erfolgten am einzelligen Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Anderson und McIntosh 1991).

Als Schüttelkultur wurde *Synechocystis* in 50 ml BG-11 Flüssigmedium (Rippka et al. 1979) auf einem Schüttler (GFL Shaker 3020) bei 100 rpm in der Klimakammer angezogen. In der Klimakammer herrschte eine Temperatur von 28°C und eine Lichtintensität von 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Mutanten wurden in Medien kultiviert, denen das entsprechende Antibiotikum (Chlorampenicol: 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Gentamycin: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oder 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Kanamycin: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Spectinomycin: 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugesetzt worden war.

Für Hydrogenasemessungen wurde *Synechocystis* in Kulturröhren mit 250 ml BG-11 Flüssigmedium angezogen, die in einer Kniese-Anlage (Kniese, Marburg, Deutschland) kontinuierlich mit Luft begast wurden.

Neben der Anzucht in Flüssigmedium wurde *Synechocystis* auf Agarplatten (Medium + 15g/l Bacto-Agar) ausplattiert und in der Klimakammer kultiviert.

Für Gefrierkulturen wurden 500 μl Kultur mit 250 μl 80% Glycerin (v/v) versetzt und bei -80°C gelagert.

Die Medien setzten sich wie folgt zusammen:

100 x BG-11:		1000 x Spurenelementmix:	
1,76 M	NaNO_3	46,3 mM	H_3BO_3
30,4 mM	$\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4,15 mM	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
24,5 mM	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,61 mM	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
3,12 mM	Zitronensäure	0,77 mM	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
279 μM	Na_2EDTA	0,32 mM	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
10 % (v/v)	1000 x Spurenelementmix	0,17mM	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

1000 x Na₂CO₃:

188,7 mM Na₂CO₃

1000 x K₂HPO₄:

175,11 mM K₂HPO₄

200 x TES:

2 M TES, pH 8

1000 x FeNH₄-Citrat :

22,8 mM FeNH₄-Citrat

1 Liter BG-11-Medium:

10 ml 100 x BG-11

5 ml 200 x TES

1 ml 1000 x Na₂CO₃

1 ml 1000 x K₂HPO₄

1 ml 1000 x FeNH₄-Citrat

ad 1 Liter H₂O

BG-11-Agarplatten:

BG-11-Medium+15 g/l Bacto-Agar

3.1.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E.coli*) wurde über Nacht in 3 ml LB-Medium bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator (4400 Innova Incubator Shaker/ New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland) bei 180 rpm angezogen. Dem Medium wurden die entsprechenden Antibiotika (Chlorampenicol: 25 µg/ml, Gentamycin: 10 µg/ml, Kanamycin: 50µg/ml, Spectinomycin: 20 µg/ml) zugesetzt.

Transformanden wurden zunächst auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Petrischalen (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) mit Parafilm geschlossen und im Kühlschrank bei 4°C verwahrt.

Für Gefrierkulturen wurden 500 µl Kultur mit 250 µl 80 % Glycerin (v/v) versetzt und bei -80°C gelagert.

Das Medium setzte sich wie folgt zusammen:

1 Liter LB-Medium:

10 g Bacto-Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

ad 1 Liter H₂O

Für Agarplatten wurde dem LB-Medium 15 g/l Bacto Agar zugefügt.

3.2 *Physiologische Parameter*

3.2.1 *Bestimmung der optischen Dichte*

Die optische Dichte der Zellkulturen wurde direkt am Photometer (MPS-2000; Shimadzu, Kyoto, Japan) bei 730 nm gemessen. Als Referenz diente BG-11 Medium.

3.2.2 *Bestimmung des Chlorophyllgehalts*

Der Chlorophyllgehalt von Zellkulturen wurde nach Lichtenthaler (1987) bestimmt. 1 ml Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bei Kulturen mit einer OD_{730} über 0,5 wurde ein entsprechend kleineres Volumen abgenommen. Die Zellen wurden 10 min bei 13 000 rpm pelletiert (Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen. Um das Chlorophyll zu lösen, wurde 1 ml Methanol zum Pellet gegeben. Die Proben wurden zur Extraktion über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Ansätze 10 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die Extinktion der Überstände wurde im Photometer (MPS-2000; Shimadzu, Kyoto, Japan) bei 665 nm, 665,5 nm, 666 nm, 666,5 nm und 750 nm gemessen. Als Referenz diente Methanol. Zur Berechnung der Chlorophyllkonzentration wurde der höchste gemessene Wert x zwischen 665 nm und 666,5 nm verwendet. Der bei 750 nm gemessene Wert y entstand durch Verunreinigungen mit Zellpartikeln und wurde folglich zur Streuungskorrektur vom Wert x subtrahiert.

Nach Lichtenthaler (1987) ergab sich der Chlorophyllgehalt nach folgender Formel:
Chlorophyll a [$\mu\text{g/ml}$] = $(x-y) / 0,0809$

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die nukleinsäurehaltigen Ansätze wurden mit dem vierfachen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, geschüttelt und 5 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert (Centrikon T-124, Kontron Instruments, Watford, UK). Es bildeten sich drei Phasen, wobei die oberste wässrige Phase die Nukleinsäuren enthielt. Die oberste Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis nahezu keine Interphase aus v.a. gefällten Proteinen mehr erkennbar war. Es schlossen sich zwei Extraktionsschritte mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) an. Die DNA oder RNA wurde mit Ethanol aus der wässrigen Phase gefällt.

3.3.2 Ethanolfällung

Zur Fällung von DNA bzw. RNA wurde den entsprechenden Ansätzen 1/10 ihres Volumens an 3M Natriumacetat-Lösung (DNA: pH 4,8; RNA: pH 6,5) zugegeben. Die Proben wurden mit 2,5 Volumen 100 % igem Ethanol (-20°C) versetzt und für 15 min bei -80°C gekühlt. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei -9 °C und 13000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Nukleinsäuren mit 70 % igem (v/v) Ethanol gewaschen. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet. Die DNA bzw. RNA wurde in TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM N₂-EDTA x H₂O, pH 8,0) aufgenommen.

3.3.3 Isolierung von RNA

RNA wurde verändert nach dem Protokoll von Golden et al. (1987) isoliert. *Synechocystis* Zellkulturen wurden zunächst 10 min bei Raumtemperatur und 8000 rpm pelletiert (Centrikon T-124, Kontron Instruments, Watford, UK). Zum Aufbrechen wurde den Zellen ein vierfaches Volumen des Pellets an Breakpuffer (TE 50/100: 32 ml; Triton X-100: 0,15 ml; N-Lauroylsarcosin-Lösung (25 % w/v): 0,6 ml; SDS-Lösung (20 % w/v): 0,6 ml) zugesetzt und das Pellet darin resuspendiert. Die Zellen wurden mit dem vierfachen Volumen Glasperlen (0,5 mm) und Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und die Mischung im Kühlraum 3 x 3 min gevortext. Zwischendurch wurden die Ansätze auf Eis gekühlt. Glasperlen und Zellbruchstücke wurden in einem nachfolgenden

Zentrifugationsschritt (2 min bei 4°C und 13000 rpm in Eppendorf Centrifuge 5804R; Eppendorf, Deutschland) entfernt. Es folgten eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine Ethanolfällung. Das Pellet wurde in TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM N₂-EDTA x H₂O, pH 8,0) aufgenommen. Um den DNA-Anteil im Ansatz zu reduzieren, wurde der Probe 5M LiCl-Lösung zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 1,5 h bei -20 °C. Um ein Gefrieren der Lösung zu verhindern, wurde die Probe alle 30 min geschüttelt. Anschließend wurde die gefällte RNA bei -9°C für 30 min und 13000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet in H₂O resuspendiert. Die Lithium-Chlorid-Fällung wurde wiederholt und das Pellet wiederum in H₂O aufgenommen.

3.3.4 Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung von genomischer DNA wurden Zellen mit einer sterilen Impföse von einer Agarplatte in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zum Aufbruch der Zellen wurden diese in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM N₂-EDTA x H₂O, pH 8,0) resuspendiert und mit 2 µl SDS (10 %), 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und Glasperlen (0,5 mm) versetzt. Die Mischung wurde 3 x 10 sec gevortext und anschließend 10 min bei Raumtemperatur und 10000 rpm zentrifugiert. Der wässrige nukleinsäurehaltige Überstand wurde abgenommen. Es folgten eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine Ethanolfällung. Die gefällte DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen.

3.3.5 Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*

Plasmide aus *E.coli* wurden aus Übernachtskulturen unter Verwendung des NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert.

3.3.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (Saiki et al. 1988) kann ein gewünschtes DNA-Fragment gezielt vervielfältigt werden. Nach Denaturierung der zu amplifizierenden doppelsträngigen DNA bei 95°C, hybridisiert je ein Oligonukleotid an jeden Strang der denaturierten DNA. Die Temperatur ist dabei abhängig von den eingesetzten Oligonukleotiden. Sie begrenzen den zu amplifizierenden Abschnitt und dienen als Primer für die DNA-Synthese, die bei 72°C mit der hitzestabilen Taq-Polymerase erfolgt.

In dieser Arbeit wurde das folgende Standardtemperaturprogramm in einem PTC-200 Gradienten Cycler (MJ Research, Watertown, USA) verwendet:

Denaturierung:	95°C	1 min	} 30-40 Zyklen
Denaturierung:	95°C	30 s	
Annealing:	40°C-70°C	1 min	
Extension:	72°C	1-7 min	
	72°C	10 min	
	20°C	∞	

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50µl angesetzt und enthielten die folgenden Komponenten:

- 10 x Puffer
- 1,5 mM MgCl₂
- 10 pmol dNTPs
- 10 ng genomische DNA
- 25 pmol Primer 1
- 25 pmol Primer 2
- 1,25 units Taq-Polymerase

Die Taq-Polymerase, der Puffer und die MgCl₂ –Lösung wurden von MBI Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland), die dNTPs von Boehringer-Mannheim (Mannheim, Deutschland) und die Primer von Sigma (Steinheim, Deutschland) bezogen.

Zur Konstruktion von Mutanten wurden die vervielfältigten DNA Abschnitte oftmals durch die verwendeten Primer mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen am 5'-und 3'-Ende ausgestattet.

3.3.7 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zu analytischen und präparativen Zwecken wurden Desoxyribonukleinsäuren (DNA) gelelektrophoretisch in Agarosegelen nach Sambrock et al. (1989) aufgetrennt.

Die Elektrophorese erfolgte in Gelkammern (Biometra, Göttingen, Deutschland), die an eine High Voltage Pack P30 Spannungsquelle (Biometra, Göttingen, Deutschland) angeschlossen waren. Zur Quantifizierung von DNA und zur Bestimmung des DNA-Molekulargewichts wurde als Standard λ-DNA/HindIII Marker (MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Zu präparativen Zwecken wurden die entsprechenden DNA-

Banden mit dem Skalpell aus dem Gel geschnitten und unter Verwendung des Nucleo Trap Kit (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers eluiert.

3.3.8 Ligation

Die Ligation von DNA in den TOPO-Vektor erfolgte unter Verwendung des TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Groningen, Niederlande) nach Herstellerangaben. DNA, die nicht mit der Taq-Polymerase synthetisiert worden war und demnach nicht über die für die Klonierung in den Topo-Vektor notwendigen 3' Adenosin Überhänge verfügte, wurde im Vorfeld mit diesen versehen. Die PCR-Produkte wurden in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit 1,8 µl MgCl₂ (25 mM), 2,4 µl dNTPs (2,5 mM), 2,5 units Taq-Polymerase und dem entsprechenden Puffer versetzt. Die Addition der Adenosin Überhänge erfolgte bei 72° für 15 min in einem Thermocycler (MJ Research PTC-150 Mini Cycler, Watertown, USA).

Für Ligationen in den Promotortestvektor pILA wurde die zu ligierende DNA in einem Verhältnis von 1:3 und 1:1 in einem Gesamtvolumen von 20 µl zu je 100 ng Vektor zugesetzt. Die T4-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) wurde nach Herstellerangaben verwendet. Die Ligation erfolgte in einem Thermocycler (MJ Research PTC-150 Mini Cycler, Watertown, USA) über Nacht. Die Ansätze wurden für 30 sec auf 10°C temperiert. Anschließend wurde die Temperatur mit 0,13°C/sec bis auf eine Temperatur von 20 °C erhöht. Es folgte eine Temperierung der Proben auf 30 °C für 30 sec gefolgt von einer Abkühlung mit 0,13°C/sec bis auf -20°C. Dieser Zyklus wurde 160 mal durchlaufen. Im Anschluss wurde die T4-Ligase im Heizblock für 20 min bei 65 °C inaktiviert.

3.3.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Verwendung von Restriktionsendonukleasen zur sequenzspezifischen Spaltung von DNA erfolgte jeweils nach Angaben des Herstellers. Soweit nicht anders vorgegeben, wurden die Ansätze bei 37°C im Wärmeschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) für mindestens 1h inkubiert.

3.3.10 PCR-Fusion

Das Ausschalten von Genen über die PCR-Fusion erfolgte nach Chenchik et al. (1996). Zunächst wurden stromab- und stromaufwärts liegende Fragmente des Gens über eine PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer fügten an die zur Genmitte liegenden Enden der Fragmente jeweils Sequenzen von etwa 20 Nukleotiden an, die mit der 5'- bzw. 3'-

Sequenz einer Antibiotika-Resistenzkassette übereinstimmten. Die Antibiotika-Resistenzkassette wurde über eine PCR aus einem Plasmid amplifiziert. Alle drei zu fusionierenden PCR-Produkte wurden im molaren Verhältnis 1:1:1 in drei Ansätzen mit einem DNA-Gesamt-Gehalt von 20 ng, 50 ng und 100 ng eingesetzt. Die Fusion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl durch Zusatz von 0,8 units Pfu-DNA-Polymerase, dem entsprechenden Puffer und 4 µl dNTPs (2,5 mM) in einem PTC-200 Gradienten Cycler (MJ Research, Watertown, USA) nach folgendem Temperaturprogramm:

Denaturierung:	95 °C	1 min	
Denaturierung:	95 °C	30 sec	} 30 Zyklen
Annealing:	60 °C	5 min	
Elongation:	68 °C	25 min	
	20 °C	∞	

Die fusionierten DNA-Fragmente wurden in einer nachfolgenden PCR durch die außen liegenden Primer amplifiziert, in einen Vektor kloniert, sequenziert und für die Transformation von *Synechocystis* eingesetzt.

3.3.11 Transformation von *Synechocystis*

Synechocystis ist unter physiologischen Bedingungen in der Lage, exogene DNA zu binden, ins Cytoplasma zu schleusen und in sein Chromosom zu integrieren (Grigorieva und Shestakov 1982, Yura et al. 1999, Yoshihara et al. 2001, 2002). Da die natürliche Transformierbarkeit teilungsfähiger Zellen besonders hoch ist, wurden Kulturen in ihrer frühen exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Zu diesem Zweck wurde eine Kulturröhre mit einem Volumen von 250 ml am Tag 1 aus einer Vorkultur angeimpft und auf eine OD₇₃₀ von 0,02 eingestellt. An Tag 3 wurde ein Aliquot dieser Röhre zum Animpfen einer neuen Kulturröhre auf eine OD₇₃₀ von 0,15 verwendet. An Tag 4 wurde ein Aliquot der Probe mikroskopiert, um sicher zu stellen, dass sich die Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase befand. Je 125 ml der Zellen wurden 10 min bei 25°C und 5000 rpm sedimentiert (Centikon T-124, Kontron Instruments, Watford, UK) und in einem Volumen von 300µl resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 6-18 µg DNA für 4 h im Wasserbad bei 30 °C im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden alle 30 min geschwenkt. Autoklavierte Nitrocellulosefilter wurden auf BG-11 Agarplatten ohne

Antibiotikum ausgelegt und 90 µl der transformierten Zellen darauf ausgestrichen. Die Zellen wurden zwei Tage in der Klimakammer bei 28°C und 50 µE/m²sec inkubiert. Anschließend wurden die Nirocellulosefilter auf BG-11 Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum umgesetzt. Nach zwei Wochen wurden Einzelkolonien auf Platten ohne Filter ausgestrichen. Da *Synechocystis* bis zu 12 Kopien seines Genoms besitzt (Labarre et al. 1989), wurden die Mutanten nach Einzelkoloniebildung zur Segregation 6-8 mal auf neue BG-11 Agarplatten mit Antibiotikum überimpft. Anschließend wurde die DNA der Mutanten isoliert und ihre Segregation über PCR überprüft.

3.3.12 Transformation von *Escherichia coli*

Die Transformation in *E.coli* erfolgte in kompetenten TOP 10 Zellen (Invitrogen, Groningen, Niederlande). Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen, wobei jedoch halbe Ansätze verwendet wurden. Alternativ wurden kompetente DH5α Zellen transformiert. 1-10 µl eines Ligationsansatzes wurden mit 100 µl kompetenten Zellen versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C. Die transformierten Zellen wurden erneut für 2 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 900 µl LB-Medium versetzt. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator (4400 Innova Incubator Shaker; New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland) bei 80 rpm inkubiert. Im Anschluß wurden die Transformanden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Die Petrischalen wurden am folgenden Tag mit Parafilm umwickelt und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

3.3.13 Sequenzanalyse

Sequenziert wurde nach der Kettenabbruchmethode mit Didesoxynucleotiden nach Sanger et al. (1977). Die zu sequenzierenden PCR-Produkte wurden in den pCRII-Topo Vektor (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ligiert. Als Sequenzierprimer dienten die fluoreszentmarkierten (IRD 800) Oligonukleotide M13 reverse und/oder M13 forward (MWG, Ebersberg, Deutschland). In der Sequenzreaktion wurde, analog zur PCR, ein Zyklus aus Denaturierung, Primerannealing und DNA-Synthese durchlaufen (cycle sequencing). Die Reaktionen wurde mit dem Cycle Reader Auto DNA Sequencing Kit (MBI, Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland) nach Herstellerangaben in einem Thermocycler (PTC-200 Gradienten Cycler, MJ Research, Watertown, USA) durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte nach folgendem Temperaturprogramm:

Denaturierung: 95°C	1 min		
Denaturierung: 95°C	30 sec	}	29 Zyklen
Annealing: 60°C	30 sec		
Extension: 70°C	1 min		
Denaturierung : 95°C	10 sec	}	10 Zyklen
Extension: 70°C	30 sec		
	20°C	∞	

Unmittelbar vor dem Auftragen wurden die Proben 3 min bei 70°C denaturiert und auf Eis gestellt. Die Sequenzreaktionen wurden in einem 6%igen (w/v) 0,25mm dicken Polyacrylamidgel aufgetrennt, das zwischen zwei Glasplatten gegossen wurde und die folgende Zusammensetzung hatte:

Harnstoff	21 g	10x TBE long run Puffer (pH 8,3):	
Aqua bidest.	28 ml	Tris	162,33 g
10xTBE long run	5 ml	Borsäure	27,82 g
Rapid Gel XL sol 40% (w/v)	7,5 ml	EDTA	9,31 g
DMSO	0,5 ml	ad 1 l Aqua bidest	

Das Gemisch wurde auf einer Heizplatte erwärmt, bis sich der Harnstoff gelöst hatte und anschließend steril filtriert (Sterilfilter: 0,2 µm Porengröße, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) um restliche Kristalle zu entfernen. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 350µl einer 10%igen (w/v) APS-Lösung und 50 µl TEMED gestartet. Die Lösung wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde es in den Sequenzierer LiCor DNA-Sequencer Long Readir 4200 (MWG, Ebersberg, Deutschland) eingebaut. Als Laufpuffer diente 1x TBE long run Puffer. Es wurden 1,2 µl der Proben aufgetragen. Das Gel lief über Nacht bei einer Spannung von 1500 V/cm.

Die Auswertung erfolgte mit den Programmen Image Manipulation und BaseImgIR (MWG, Ebersberg, Deutschland).

3.3.14 Reverse Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Mit der Reversen Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion lässt sich die Transkription eines Gens über die Detektion der entsprechenden mRNA nachweisen. Zunächst wird Gesamt-RNA isoliert und diese mit einem genspezifischen Primer und dem Enzym

Reverse Transkriptase inkubiert, um die zu untersuchende RNA in einzelsträngige cDNA umzuschreiben. Da sich die cDNA mengenmäßig nur schwer nachweisen lässt, wird der Ansatz zur Vervielfältigung in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Als Kontrolle dient jeweils ein Ansatz ohne Reverser Transkriptase. Wird das entsprechende Gen nicht transkribiert, erhält man in beiden Ansätzen kein PCR-Produkt. Wird das Gen hingegen abgelesen, erhält man nur in der Reaktion mit Enzym ein entsprechendes Produkt.

Da es schwierig ist, bei der Isolierung von RNA eine Verunreinigung des Ansatzes durch DNA zu vermeiden, geringste Mengen von DNA in der PCR-Reaktion jedoch zu Signalen führen können, wurde in dieser Arbeit eine nach Cobley et al. (2002) modifizierte RT-PCR mit sogenannten tag-erweiterten Primern verwendet (Abb. 4).

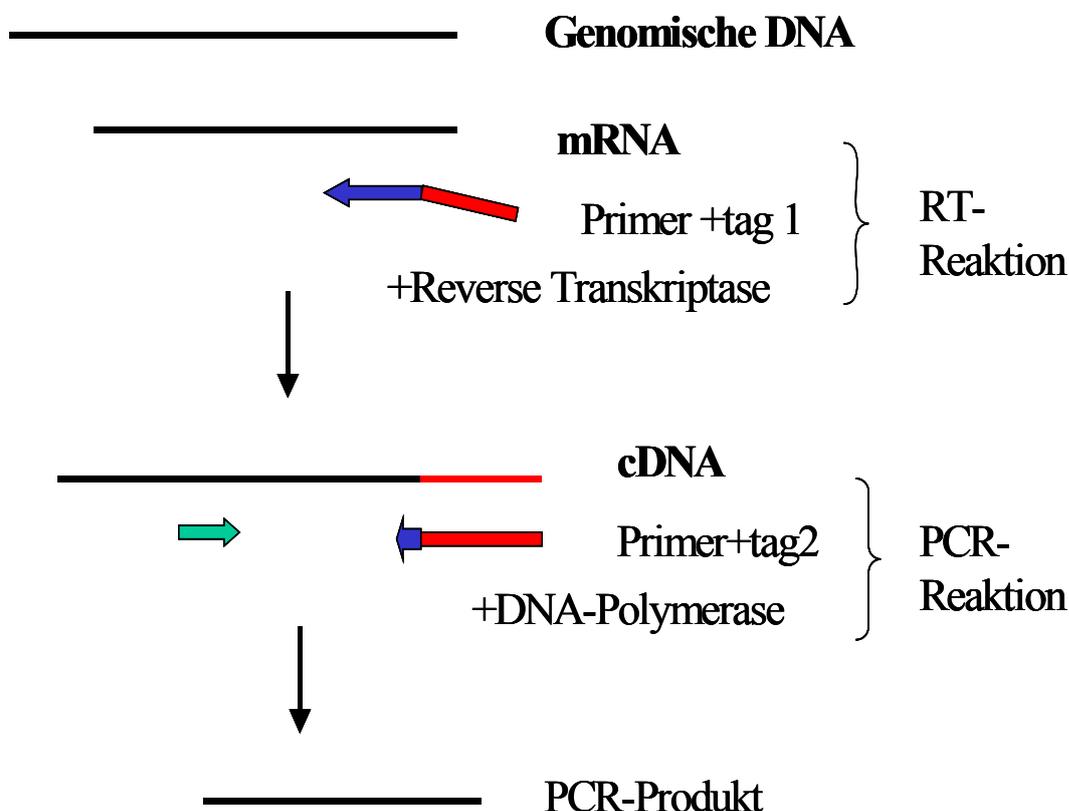


Abbildung 4: RT-PCR mit tag-erweiterten Primern nach Cobley et al. (2002): In die RT-Reaktion wird ein Primer eingesetzt, der mit einem Anhängsel (tag) versehen ist. Es handelt sich dabei um eine Sequenz, die keine Entsprechung im Genom des untersuchten Organismus hat. Diese Sequenz wird in der RT-Reaktion in den cDNA Strang eingebaut. In die PCR-Reaktion wird neben dem genspezifischen Primer ein Primer eingesetzt, dessen Sequenz nur zu einem kurzen Stück der mRNA bzw. der genomischen DNA homolog ist, aber eine lange Sequenz besitzt, die mit dem Anhängsel der cDNA hybridisiert. Auf diese Art und Weise wird die Gefahr einer Amplifikation von genomischer DNA in der PCR-Reaktion minimiert.

In die RT-Reaktion wurden Primer mit einer Länge von 28-32 bp eingesetzt, wobei die letzten 16-19 Nukleotide mit der entsprechenden RNA hybridisierten, die 13 Nukleotide am 5'Ende jedoch eine Sequenz ohne Entsprechung im Genom von *Synechocystis* waren, so dass diese Sequenz ans jeweilige 5'Ende der synthetisierten cDNA angehängt wurde. In der folgenden PCR-Reaktion wurde neben dem genspezifischen Primer ein Oligonukleotid von 21 bp eingesetzt, wobei nur 8 Nukleotide mit der genomischen DNA hybridisierten und 13 Nukleotide mit der angehängten Sequenz übereinstimmten. Auf diese Art und Weise konnte eine Vervielfältigung von DNA-Verunreinigungen in der PCR-Reaktion ausgeschlossen werden. Eine Kontrollreaktion ohne Reverse Transkriptase wurde trotzdem durchgeführt.

Um den Anteil der DNA-Verunreinigung zu reduzieren, wurde die isolierte RNA mit DNase verdaut. 1 µg RNA wurde mit 20 U RNase-freier DNase (DNase I, RNase free, Roche, Mannheim, Deutschland) und 4 U RNase Inhibitor (MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland) in 5 x Firststrand-Puffer (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland) bei 37°C für 15 min in einem Thermocycler (MJ Research PTC-200 Gradient Cycler, Watertown, USA) inkubiert. Anschließend wurde die DNase 10 min bei 65°C inaktiviert und der Ansatz sofort auf Eis gekühlt. Es folgten eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolfällung.

In der RT-Reaktion wurden 500 ng RNA mit 5 pmol Primer (tag 1) und 200 nM dNTPs für 5 min bei 65°C inkubiert. Die Reaktion wurde auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 5 x Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 40 U RNase Inhibitor zugefügt. Nach einer Inkubation von 2 min bei 42°C wurden 200 U Superscript II (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben. In der Kontrollreaktion wurde die Reverse Transkriptase durch Wasser ersetzt. Die Reverse Transkription erfolgte bei 42°C für 50 min. Die Reaktion wurde durch eine 15 minütige Inkubation bei 70°C gestoppt. Der Ansatz wurde auf Eis gekühlt, mit 3 U RNaseH (Roche, Mannheim, Deutschland) versetzt und 20 min bei 37°C inkubiert. Die RT-Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Ein Aliquot von 2 µl wurde als Matrize in die nachfolgende PCR mit dem jeweiligen tag-spezifischen Primer (tag 2) und dem genspezifischen Gegenprimer eingesetzt.

3.3.15 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes über 5`Race (rapid amplification of cDNA ends)

Da mehrere Versuche, den Transkriptionsstartpunkt über die herkömmliche Primer-Extension-Analyse zu bestimmen wegen der geringen Transkriptionsrate des Hydrogenaseoperons keine befriedigenden Ergebnisse brachten, wurde dieser mit Hilfe der sensitiveren 5`Race nach Bensin et al. (1996) identifiziert (Abb. 5).

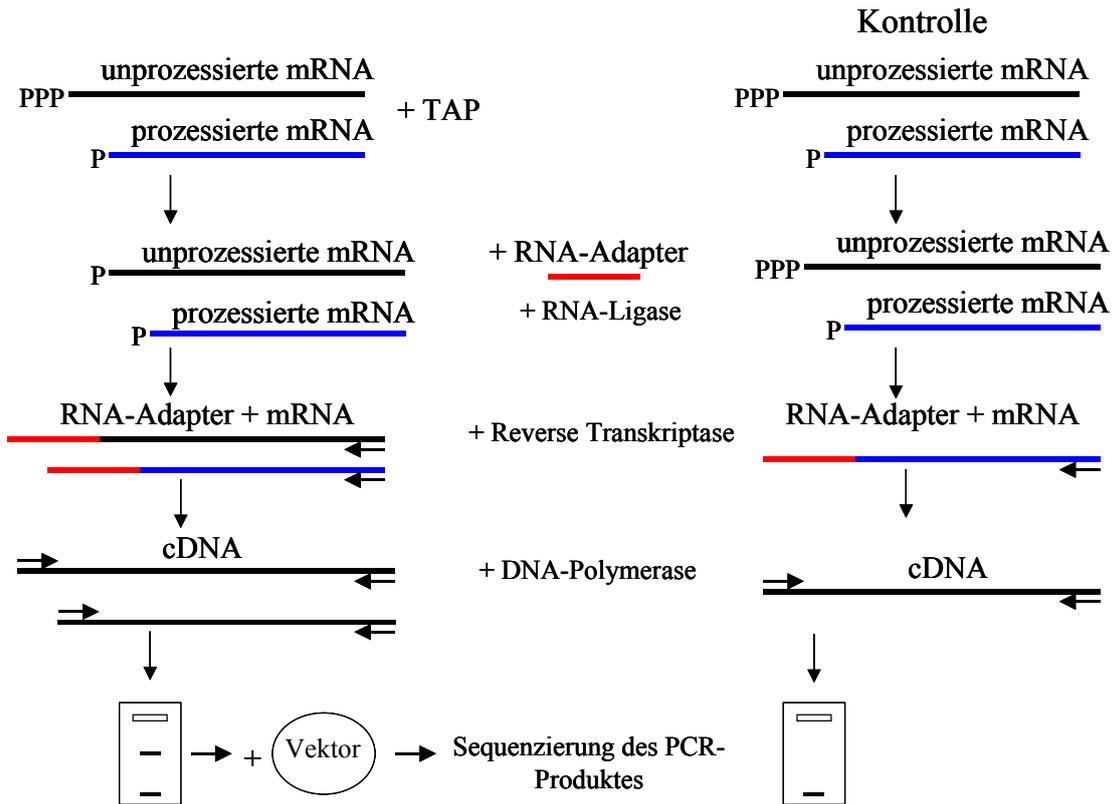


Abbildung 5: 5`Race (rapid amplification of cDNA ends) nach Bensin et al. (1996):

Um zwischen prozessierter und unprozessierter mRNA differenzieren zu können werden zwei Reaktionen angesetzt. Einer Reaktion wird Pyrophosphatase (TAP) zugesetzt, welche die Triphosphat, die sich ausschließlich am 5`Ende unprozessierter mRNA befinden, entfernt. In der Kontrolle wird das Enzym weggelassen. In einer folgenden Reaktion wird ein RNA-Adapter an die mRNA ligiert, wobei dies nur bei prozessierter mRNA bzw. bei unprozessierter mRNA deren Triphosphat zuvor entfernt wurde, gelingt. Den Reaktionen wird ein mRNA-spezifischer Primer sowie Reverse Transkriptase zugesetzt und die RNA-Adapter + mRNA-Konstrukte werden in cDNA umgeschrieben. Da durch den Adapter die Sequenzen zu beiden Seiten des Transkriptionsstartpunktes bekannt sind, lassen sich die cDNAs über eine PCR amplifizieren. Die PCR-Produkte werden in einem hochprozentigen Gel aufgetrennt. Banden, die ausschließlich in der Reaktion mit zugesetzter Pyrophosphatase auftreten, müssen von unprozessierter mRNA stammen. Diese PCR-Produkte werden isoliert, in einen Vektor ligiert und sequenziert. Das Nukleotid, welches auf den Adapter folgt, ist der Transkriptionsstartpunkt.

An das 5'Ende der mRNA wird ein RNA-Adapter mit bekannter Sequenz ligiert und das RNA-Adapter-Konstrukt durch reverse Transkription in eine cDNA umgeschrieben. Die Sensitivität der Methode beruht darauf, dass durch den Adapter die Sequenz zu beiden Seiten des Transkriptionsstartpunktes bekannt ist, was eine Amplifikation der entstandenen cDNA durch PCR ermöglicht. Das PCR-Produkt wird anschließend in einen Vektor ligiert und sequenziert. Der Transkriptionsstartpunkt ist das Nukleotid, welches in der Sequenz auf den RNA-Adapter folgt.

Neben der größeren Sensitivität dieser Methode gegenüber der herkömmlichen Primer-Extension-Analyse, erlaubt die 5'Race zudem zwischen prozessierter und unprozessierter mRNA zu differenzieren. Unprozessierte mRNA trägt am 5'Ende im Gegensatz zu prozessierter mRNA ein Triphosphat. Der RNA-Adapter lässt sich nur an prozessierte mRNA bzw. an unprozessierte mRNA, deren Triphosphat zuvor von einer Pyrophosphatase entfernt wurde, ligieren. Um zwischen prozessierter und unprozessierter mRNA unterscheiden zu können, werden jeweils zwei Reaktionen angesetzt. In einem Ansatz wird die RNA vor der Ligation mit dem RNA-Adapter mit einer Pyrophosphatase verdaut, im Kontrollansatz wird das Enzym weggelassen. Demnach ligiert der RNA-Adapter im ersten Ansatz sowohl an die unprozessierte als auch an die prozessierte mRNA, wohingegen im Kontrollansatz nur eine Ligation an prozessierte RNA möglich ist. Nach Amplifikation der RNA-Adapter-Konstrukte, werden beide Ansätze in einem hochprozentigen Agarosegel aufgetrennt. Sollten prozessierte Formen der mRNA im Ansatz vorhanden sein, finden sich zwei bis mehrere Banden in der Reaktion mit Pyrophosphatase und entsprechend bei einem Transkriptionsstartpunkt eine Bande weniger in der Kontrollreaktion. Wird die untersuchte mRNA in der Zelle nicht prozessiert, treten keine Banden im Kontrollansatz auf. Zur Bestimmung des tatsächlichen Transkriptionsstartpunktes wird nur die Bande, die ausschließlich im ersten Ansatz vorhanden ist, aus dem Gel isoliert, in einen Vektor ligiert und sequenziert.

Die RNA wurde isoliert und mit DNase I verdaut wie bereits für die RT-Reaktion beschrieben. Als Pyrophosphatase wurde TAP (tabacco acid pyrophosphatase) verwendet. 15 µg RNA wurden mit 25 U TAP (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) für 60 min bei 37°C in einem Volumen von 50 µl verdaut. In der Kontrollreaktion fehlte das Enzym. Anschließend wurde die RNA mit Ethanol (100 %) und 3M Natrium Acetat (pH: 6,5) gefällt. Die RNA wurde in einem kleinen Volumen aufgenommen, mit 500 pmol 5'RNA-Adapter (GAAUUCCUGAGAACGAACACUAGAAGA) versetzt 5 min bei 95°C inkubiert und auf Eis gestellt. Es wurden 50 U T4 RNA Ligase zugegeben. Die Ligation

erfolgte bei 17°C für 12h. Die RNA-Adapter-Konstrukte wurden anschließend einmal mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und zweimal mit Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert. Für die RT-Reaktion wurden 5 µg RNA+Adapter mit 2 pmol genspezifischem Primer (GCTTTATGCAGGATTTCAATG) in einem Volumen von 10 µl für 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. RT Puffer, 10 mM dNTPs, 8 U RNase Inhibitor und 0,2 M DTT wurden in einem Gesamtvolumen von 19 µl zugegeben. Die Reaktion wurde für 2 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden 200 U Superscript (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben und der Ansatz für 50 min bei 42°C und für 15 min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 3 U RNase H wurde die Reaktion für 20 min bei 37°C inkubiert und auf Eis gestellt. 1µl RT-Reaktion wurde in die folgende PCR-Reaktion mit einem genspezifischen Primer (AGGGCATCCTGATTAAATTG) und dem adapterspezifischen Primer (TTCCTGTAGAACGAACACTAG) eingesetzt. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Volumen von 50 µl mit 1 U Taq Polymerase bei einer Annealingtemperatur von 60°C. Die PCR Produkte wurden auf einem 3%igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt. PCR Produkte, die ausschließlich im TAP behandelten Ansatz vorhanden waren, wurden aus dem Gel isoliert, in den pCRII-Topo Vektor (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ligiert und sequenziert. Das Nukleotid, welches in der Sequenz auf den Adapter folgte, war der Transkriptionsstartpunkt.

3.3.16 Präparation von Proteingestamtextrakt

Die Zellen wurden in Kaliumphosphat-Puffer (20mM KPi, pH 7,8) mit einem Proteinase-Inhibitor-Cocktail (Sigma, Steinheim, Deutschland) und Glasperlen (0,17-0,18 mm) aufgebrochen. Die Zellen wurden 3 x 2 min gevortext und zwischendurch auf Eis gekühlt. Die Proben wurden bei 4°C für 1 min bei 2800 rpm pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt. Die Mischung aus Glasperlen und aufgebrochenen Zellen wurde erneut mit Kaliumphosphat-Puffer gewaschen und pelletiert. Die Überstände wurden vereinigt und bei 4°C für 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde ohne Glasperlen abgenommen. Verbleibende Zellreste wurden bei 4°C für 15 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Der blaue Überstand wurde als Proteingestamtextrakt verwendet.

3.3.17 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1979) mit Coomassie Brilliant Blau, welches unspezifisch an Proteine bindet und eine konzentrationsabhängige

Extinktionsverschiebung bei 595 nm bewirkt. Zunächst wurde eine Kalibrierungsreihe mit Rinderserum Albumin (BSA) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) (0 µg, 2 µg, 5 µg, 8 µg, 10 µg, 15 µg, 20 µg) und Bradford Dye (Bio-Rad Protein-Assay Dye Reagent Concentrate, Bio Rad, Bad Soden, Deutschland) erstellt. Das Rinderserum Albumin wurde 10 min mit dem Farbstoff inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm mit einem Photometer (UV-2501PC, Shimadzu, Kyoto, Japan) gemessen. Mit den zu quantifizierenden Proteinlösungen wurde ebenso verfahren. Die jeweiligen Proteinkonzentrationen wurden anhand der aufgestellten Eichkurve bestimmt.

3.3.18 Überexpression der Transkriptionsfaktoren LexA und NtcA

Die LexA-Bindedomäne (Position im Genom: lexAs: 1319066-1319333) sowie die gesamten Leserahmen von LexA (Position im Genom: lexAl: 1318717-1319333) und NtcA (1590045-1589379) wurden über eine PCR mit Primern, die mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen ausgestattet waren, aus dem Genom von *Synechocystis* amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in den pCRII-Topo Vektor (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ligiert und sequenziert. Die LexA-Bindedomäne und der gesamte Leserahmen von LexA wurden mit NdeI und BamHI, das NtcA mit NdeI und EcoRI aus den jeweiligen Vektoren geschnitten und in den pET5a Vektor (Promega, Mannheim, Deutschland) ligiert. Die entstandenen Plasmide sowie ein leerer pET5a Vektor wurden in den *E. coli* Stamm *BL21(DE3) pLysS* transformiert. Die Mutanten wurden bei 37°C in LB-Medium mit einer Konzentration von 100 µg Ampicillin pro ml angezogen. Die Synthese von NtcA und beiden LexA-Formen wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,8 durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden nach 4 h geerntet. Zur Analyse wurden Aliquots auf ein SDS Gel (24%) (w/v) aufgetragen. Der Zellaufbruch induzierter Stämme erfolgte analog zur Gewinnung des Proteinrohextrakts von *Synechocystis*.

3.3.19 SDS-Polyacrylamid-Gradientengel mit Harnstoff

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte nach Laemmli (1970).

Für ein Midigel der Größe 80 x 80 mm wurden folgende Mengen verwendet.

Trenngel:	8%ig (w/v)	25%ig (w/v)
TrisHCl (1,5M; pH 8,8)	1890 µl	1890µl
Harnstoff	2,96 g	2,96 g
Acrylamid (40%) (w/v)	1200 µl	3750 µl
H ₂ O	2550 µl	14 µl
SDS (10%) (w/v)	328,96 µl	328,96 µl
APS (10%) (w/v)	18,68 µl	18,68 µl
TEMED	2,8 µl	2,8 µl

Sammelgel:

Tris HCl (1M, pH 6,8)	504 µl
Harnstoff	1,45 g
Acrylamid (30%) (w/v)	810 µl
H ₂ O	1495,5 µl
SDS (10%) (w/v)	162 µl
APS (10 %) (w/v)	20,25 µl
TEMED	2 µl

Die drei Lösungen wurden auf Eis angesetzt. Das 8%ige (w/v) und das 25%ige (w/v) Trenngel wurden in die beiden Kammern eines Gradientenmischers (Eigenbau) gefüllt und über einen Schlauch zwischen zwei Glasplatten gepumpt. Das Trenngel wurde mit n-Butanol überschichtet, um eine gerade obere Kante zu erhalten. Nachdem es auspolymerisiert war, wurde das Butanol verworfen. Das Sammelgel wurde über das Trenngel geschichtet und der Kamm eingesetzt. Das auspolymerisierte Gradientengel wurde über Nacht im Kühlraum verwahrt. Die Proben wurden mit einem Vol. zweifach konzentriertem Auftragsproteinprobenpuffer (138 mM TrisHCl, pH 6,8; 6 M Harnstoff; 25,5 % (v/v) Glycerin; 4,3 % (w/v) SDS) versetzt und für 10 min bei 95°C erhitzt. Die

Gelkammern wurden mit Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 0,192 M Glycin, 0,1% (w/v) SDS) befüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im Kühlraum bei 4°C.

3.3.20 Färbung von Proteinen im SDS-Gel

Abhängig von der aufgetragenen Proteinmenge wurde entweder mit Coomassie-Brilliant-Blau oder bei geringeren Proteinmengen mit Silbernitrat nach Blum et al. (1987) gefärbt.

Für die Coomassie-Färbung wurden die Acrylamidgele nach der Elektrophorese über Nacht in die Färbelösung (Coomassie Brilliant Blue, 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol) gelegt. Am folgenden Tag wurde überschüssiger Farbstoff aus dem Gel mit einem Entfärber (10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol) durch mehrmaliges Waschen entfernt.

Das Prinzip der Silberfärbung beruht darauf, dass die Proteine im Gel in einer Silbernitratlösung inkubiert werden. Silber-Ionen werden dabei von den Proteinen gebunden, reduziert und in Silberkeime umgewandelt. Durch die Zugabe von Reduktionsmitteln werden alle Silber-Ionen im Gel zu metallischem Silber reduziert, was in der Nähe der Silberkeime und damit dort, wo sich die Proteine befinden, schneller passiert. Damit sich nicht das gesamte Gel verfärbt, wird die Reaktion mit Essigsäure gestoppt, sobald die Proteinbanden deutlich sichtbar sind.

3.3.21 Gelretardierungsexperiment

Proteinbindestellen auf der DNA können über Gelretardierungsexperimente gefunden werden. Die zu untersuchende DNA wird zunächst markiert und anschließend mit Proteinextrakt inkubiert. Bei vorhandenen Proteinbindestellen bilden sich DNA-Protein-Komplexe, die in Polyacrylamidgelen über ihr verzögertes Laufverhalten identifiziert werden können.

Die Gelretardierungsexperimente wurden unter Verwendung eines DIG Gel Shift kits (Roche, Mannheim, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Die entsprechenden Oligonukleotide wurden von Sigma (Steinheim, Deutschland) bezogen. Auf eine radioaktive Markierung der DNA wurde zugunsten einer Markierung mit Digoxigenin (DIG), einem Steroid-Hapten aus Digitalis Pflanzen, verzichtet. Die Detektion derart markierter DNA erfolgte über eine enzymgekoppelte Antigen-Antikörper-Reaktion. Zunächst wurden mittels Terminaler Transferase DIG-markierte Didesoxyuridintriphosphate (DIG ddUTP) an die 3'Hydroxylenden der zu untersuchenden DNA geknüpft. Die markierten Oligonukleotide wurden auf einer Nylonmembran fixiert

und mit einem Digoxigenin-Antikörper, der an eine Alkalische Phosphatase gekoppelt war, inkubiert. Die immobilisierte Alkalische Phosphatase konnte durch eine Fotoreaktion mit CSDP nachgewiesen werden, in der CSDP enzymatisch dephosphoryliert wurde, was zur Bildung eines Dioxetan-Phenolat-Anions führte. Dieses zerfiel und emittierte Licht bei 466 nm, das mit einem Röntgenfilm detektiert wurde.

Für jeden zu untersuchenden DNA-Abschnitt wurden zwei einzelsträngige Oligonukleotide - Strang und Gegenstrang – in einem molaren Verhältnis von 1:1 in TEN-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl, pH 8) gemischt. Der Ansatz wurde im Heizblock bei 95°C für 10 min inkubiert. Der Heizblock mit den Proben wurde aus dem Gerät gehoben und bei Raumtemperatur in etwa 2 h auf 15-25 °C abgekühlt. Die doppelsträngigen Oligonukleotide wurden mit TEN-Puffer auf eine Konzentration von 100 ng/µl verdünnt.

100 ng doppelsträngige Oligonukleotide wurden unter Zugabe von autoklaviertem H₂O in einem Gesamtvolumen von 10 µl in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Der Ansatz wurde auf Eis gestellt und mit 4 µl fünffachem Markierungspuffer (1 M K-Cacodylate; 0,125 M Tris-HCl; 1,25 mg BSA; pH 6,6), 4 µl CoCl₂-Lösung (25 mM CoCl₂), 1 µl DIG-ddUTP-Lösung (1 mM Digoxigenin-11-ddUTP) und 1 µl Terminaler Transferase (400 U/µl) versetzt. Die Mischung wurde in einem PTC-200 Gradienten Cycler (MJ Research, Watertown, USA) 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl EDTA (0,2 M, pH 8) gestoppt. Dem Ansatz wurden 3 µl autoklaviertes H₂O zugefügt, um ein Endvolumen von 25 µl und eine Oligonukleotid-Konzentration von 4 ng/µl zu erhalten.

Die Markierungseffizienz der Reaktion wurde im Vergleich zu einem bereits markierten Kontroll-Oligonukleotid aus dem Kit überprüft. Dazu wurden Verdünnungsreihen des eigenhändig markierten Oligonukleotids und des Kontroll-Oligonukleotids hergestellt. Unter Verwendung von TEN-Puffer wurden Konzentrationen von 0,4 ng/µl, 0,04 ng/µl, 0,004 ng/µl, und 0,0004 ng/µl eingestellt. Je 1 µl der entsprechenden Konzentrationen, sowie 1 µl aus dem unverdünnten Ansatz (4 ng/µl) wurden auf eine Nylonmembran (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland) pipettiert. Die DNA wurde im Stratalinker (Stratagene, LaJolla, CA, USA) auf der Membran fixiert. Anschließend wurde die Membran in eine Plastikschiene gelegt und auf dem Schüttler 2 min in Waschpuffer (0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5) gewaschen. Die Membran wurde 30 min in Blocking-Puffer (Waschpuffer mit 1 % Blocking Reagenz) inkubiert und anschließend 30 min in Antikörper-Lösung (Waschpuffer mit 0,3% (v/v) Tween 20 und Antikörper 1:10.000) geschüttelt. Es folgten zwei 15 minütige Inkubationen in Waschpuffer mit 0,3% Tween

(v/v). Anschließend wurde die Membran 5 min in Detektionspuffer (0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl; pH 9,5) geschüttelt. 1 ml Detektionspuffer wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 10 µl CSPD (10 mg/ml) versetzt. Die Membran wurde mit Pinzetten auf einen aufgeschnittenen Gefrierbeutel gelegt und die CSPD-Lösung darauf pipettiert. Der Gefrierbeutel wurde geschlossen und die CSPD-Lösung durch Ausstreichen mit einem Glasröhrchen unter Vermeidung von Luftblasen gleichmäßig auf der Membran verteilt. Anschließend wurde die Membran im Gefrierbeutel 5 min durch Abdeckung dunkel inkubiert. Die Membran wurde anschließend in einen neuen Gefrierbeutel gelegt und zugeschweißt. Die Außenseite des Gefrierbeutels wurde mit 70 % igem Ethanol gesäubert. Es folgte eine 10 minütige Inkubation bei 37°C im Wärmeschrank. Anschließend wurde die eingeschweißte Membran in eine Expositionskassette gelegt. Ein Röntgenfilm wurde etwa 20 min. belichtet und entwickelt. In der Regel zeigten die eigenhändig markierten Oligonukleotide stärkere Signale als das Kontroll-Oligonukleotid. Die markierten Oligonukleotide konnten anschließend für die Gelretardierungsexperimente verwendet werden.

Am Vortag der Experimente wurden 6 % ige Polyacrylamidgele (12 cm x 11 cm x 1 mm) mit 12 Taschen gegossen:

Für ein Gel wurden folgende Mengen verwendet:

1 ml	10 x TBE (890 mM Tris; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA; pH 8)
4 ml	30% Acrylamid (w/v)
14,78 ml	H ₂ O
20 µl	TEMED
200 µl	APS (10%) (w/v)

Nachdem die Gele auspolymerisiert waren, wurden sie in feuchte Tücher und Folie eingeschlagen und über Nacht im Kühlraum (4°C) verwahrt.

Die Gele wurden am folgenden Tag im Kühlraum (4°C) mit 0,5 TBE-Puffer in die Elektrophoreskammern gestellt. Es erfolgte ein Vorlaufen der Gele bei 96 V/ cm. In der Zwischenzeit wurden die Proben auf Eis angesetzt. Es wurde jeweils eine Kontrollreaktion ohne Protein (A), eine Reaktion mit Protein (B), sowie eine Kompetitionsreaktion (C) mit Protein und einem 125-fachen Überschuss an unmarkiertem Oligonukleotid angesetzt. Die Ansätze hatten die folgende Zusammensetzung:

Material und Methoden

	A (-Protein)	B (+Protein)	C (+Protein+Kompetitor)
Bindepuffer	4*	4	4
Poly [d(I-C)] (1 µg/µl)	3	3	3
Polylysin (0,1 µg/µl)	1	1	1
Dig-markiertes Oligo (4ng/µl)	1	1	1
Unmakriertes Oligo(100ng/µl)	-	-	5
Protein (9 µg/µl)	-	1	1
TEN-Puffer	5	5	-
KPi-Puffer (20 mM; pH 7,8)	1	-	-
H ₂ O	5	5	5
Summe	20	20	20

* Angaben in µl

Die Proben wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Jeder Probe wurden 5 µl Bromphenolblau zugesetzt. Die Ansätze wurden kurz gemischt und zügig auf das Gel aufgetragen. Die Proben wurden in ca. 2,5 h bei 112 V/cm aufgetrennt. Bei größeren Laufgeschwindigkeiten kam es zum Schmieren der Proben. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele aus der Apparatur genommen. Bei Raumtemperatur wurde eine Glasplatte mit einem Spatel vorsichtig entfernt. Das Gel blieb auf der unteren Glasplatte haften. Die Geltaschen wurden mit einem Skalpell entfernt. Zum Blotten wurde eine trockene Nylonmembran direkt auf das Gel gelegt. Es folgten 3 Whatmanfilter und die abgenommene Glasplatte, auf die ein Gewicht von etwa 1 kg gestellt wurde. Nach 1 h wurde die Membran vom Gel entfernt und die DNA darauf im Stratalinker (Stratagene, LaJolla, CA, USA) fixiert. Die Membran wurde entweder

zwischen zwei Whatmanfiltern im Kühlschrank (4°C) über Nacht verwahrt oder direkt detektiert. Die Detektion erfolgte wie bereits für die Überprüfung der Markierungseffizienz beschrieben. Die Röntgenfilme wurden zwischen 40 min bis max. 48 h belichtet.

3.3.22 Isolierung von DNA-Bindeproteinen

DNA-Bindeproteine des Hydrogenasepromoters wurden unter Verwendung des DNA-binding Protein Purification Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) und der Oligonukleotide 1 und 2 isoliert. Zunächst wurden nach einem self-priming Prinzip Konkatamere synthetisiert (Abb. 6).

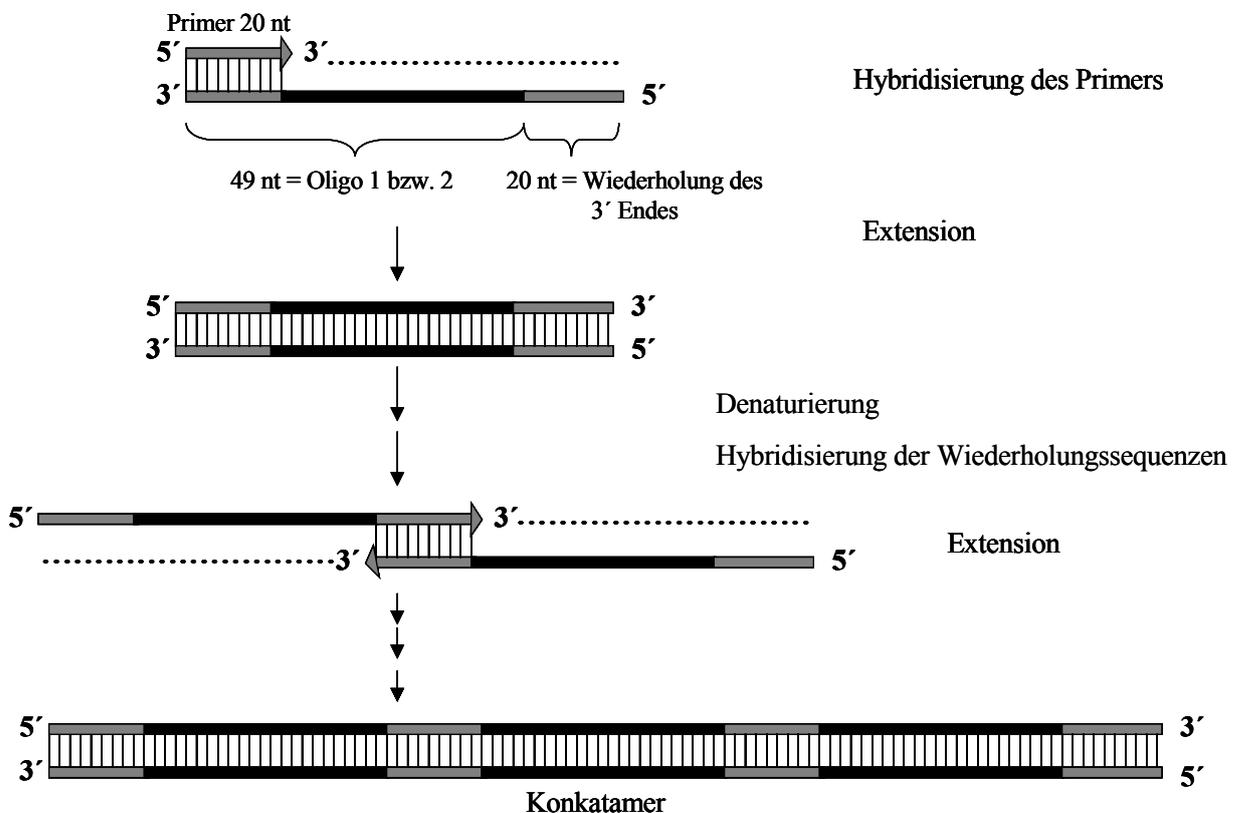


Abbildung 6: Prinzip der self-priming PCR. In eine PCR-Reaktion werden ein Oligonukleotid mit einer Sequenz am 5' Ende, die eine Wiederholung der ersten Nucleotide des eigenen 3' Endes ist, sowie ein Primer, der mit dieser Wiederholungssequenz übereinstimmt, eingesetzt. Im Verlauf der Polymerasekettenreaktion hybridisieren die Wiederholungsssequenzen verschiedener DNA-Stränge miteinander und synthetisieren in mehreren Zyklen lange Oligonukleotidketten, sogenannte Konkatomere.

Dazu wurden in ihrer Sequenz modifizierte Oligonukleotide bestellt. An das 5' Ende der Sequenz von Oligonukleotid 1 bzw. 2 wurde eine Wiederholung der 20 ersten Nucleotide vom 3' Ende gehängt, so dass Oligonukleotide mit der Proteinbindestelle und einem am 3'-

und 5'Ende identischen Abschnitt entstanden. Zusätzlich wurde ein Primer, welcher der Wiederholungssequenz entsprach, bestellt. Der kurze Primer diente im ersten Zyklus zum Starten der PCR. In den folgenden Zyklen hybridisierten die Wiederholungssequenzen der Oligonukleotide entsprechend des self-priming Prinzips miteinander, so dass lange DNA-Ketten, sogenannte Konkamate, mit mehreren Proteinbindestellen entstanden. Diese wurden an ein kurzes Oligonukleotid ligiert, das seinerseits über ein Biotin am 3'Ende mit einem Streptavidin markierten Magnetkügelchen verbunden war (Abb. 7).

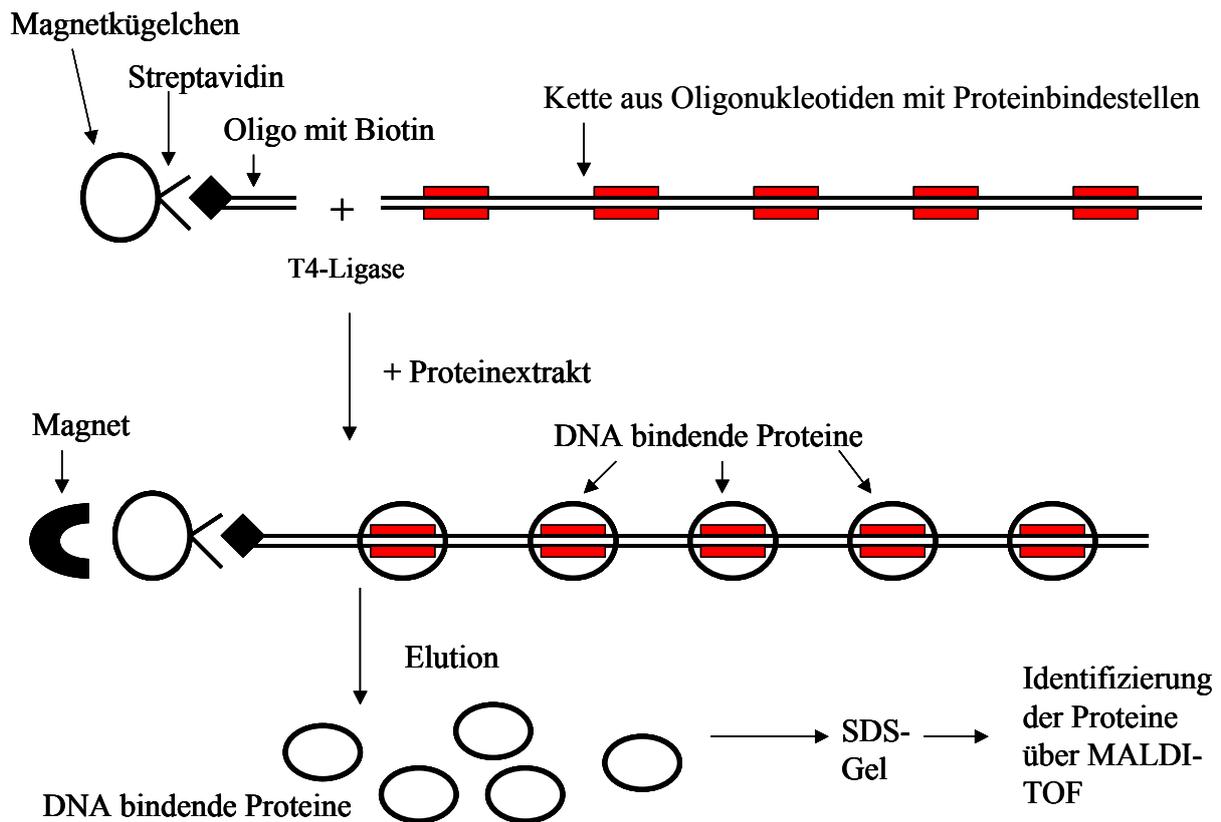


Abbildung 7: Isolierung der DNA-bindenden Proteine. Die Konkamate werden an ein Oligonukleotid ligiert, das seinerseits über Biotin und Streptavidin mit einem Magnetkügelchen verbunden ist. Die Konstrukte aus Oligonukleotidkette und Magnetkügelchen werden mit Protein inkubiert. Mit Hilfe eines Magneten wird das Konkatamer mit daran gebundenen Proteinen aus der Lösung isoliert. Nach mehreren Waschschritten wird das DNA-bindende Protein eluiert, auf ein SDS-Gel aufgetragen und über MALDI-TOFF identifiziert (verändert nach Anleitung des DNA-binding Protein Purification Kit von Roche, Mannheim, Deutschland).

Die Konstrukte aus Konkatamer mit Proteinbindestellen und Magnetkügelchen wurde nach Herstellerangaben mit verschiedenen Proteinextrakten inkubiert. Nach mehreren Waschschritten, die dazu dienten, unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurden

die spezifisch bindenden Proteine mit einem Elutionspuffer von der DNA gelöst. Zur Entsalzung wurde das erhaltene Proteineluat in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert, in deren Deckel zuvor ein Loch geschnitten wurde, so dass nur noch der Rand des Deckels zum Schließen übrig blieb. Eine Dialysemembran (Spectra Por, MWCO: 3,500) wurde über das Reaktionsgefäß gespannt, der gelochte Deckel darüber geschlossen und das Gefäß auf den Kopf gedreht, so dass das Proteineluat auf die Membran gelangte. Die so präparierten Reaktionsgefäße wurden kopfüber in einen Schwimmer gehängt und das Proteineluat für 2 h in einem entsprechenden Puffer (30 mM Tris; 0,2 mM EDTA; 0,2 M NaCl; pH 8) dialysiert. Nach 2 h wurden die Reaktionsgefäße gedreht und die Proteineluate darin gesammelt. Es folgte eine 80%ige (v/v) Acetonfällung bei -20°C über Nacht. Anschließend wurden die Proben bei 4°C für 10 min und 12000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Die Proteinpellets wurden zur weiteren Analyse in je 2,5 μl H_2O resuspendiert und anschließend mit 2,5 μl 2 x Auftragsproteinprobenpuffer (138 mM TrisHCl, pH 6,8; 6 M Harnstoff; 25,5 % (v/v) Glycerin; 4,3 % (w/v) SDS) versetzt. Die Proben wurden im Heizblock bei 95°C 10 min denaturiert und sofort auf Eis gelagert. Zur weiteren Analyse wurden die Proben auf ein SDS-Gradientengel (8-25 % (w/v)) mit Harnstoff (siehe 3.3.19) aufgetragen und im Kühlraum (4°C) bei 10 mA/Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden silbergefärbt (siehe 3.3.20), aus dem Gel geschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse gegeben.

3.4 *Physiologische Methoden*

3.4.1 *Lumineszenzmessungen*

Der Hydrogenasepromotor wurde mit Hilfe eines Reportergensystems charakterisiert. Als Reportergene dienten die Gene *luxA* und *luxB* aus dem Bakterium *Vibrio harveyi*, die für eine Luziferase kodieren. Die Luziferase katalysiert die Oxidation von FMNH₂ und einem Aldehyd. Als Produkte fallen oxidiertes Flavin (FMN), die zum Aldehyd korrespondierende Fettsäure und blau-grünes Licht (493 nm) an. Während FMNH₂ dem Zellstoffwechsel entnommen wird, muß das Aldehyd extern in Form von n-Decanal zugegeben werden. Alternativ kann das Aldehyd von den Zellen synthetisiert werden, wenn man diese mit den Genen *luxC*, *luxD* und *luxE* transformiert, die für eine Reduktase, eine Transferase und eine Synthetase kodieren. Von den *Synechocystis* Mutanten ohne *luxCDE* Gene wurden 900 µl Zellkultur (OD₇₃₀: 1) mit 100 µl n-Decanal (10mM in Methanol) für 5 min inkubiert. Da die Applikation von n-Decanal bei längerer Einwirkung lysierend auf die Zellen wirkt (Blouin et al. 1996) wurden die Proben nicht länger als 10 min inkubiert. Die Lumineszenz der *Synechocystis* Mutanten mit *luxCDE* Genen konnte direkt in einem selbstgebauten Luminometer (Christoph Plieth) gemessen werden. Die Küvette war in einem lichtundurchlässigen Gehäuse vor einem Chemiluminometer (PMT 9829 A, Electron Tubes Ltd., Ruislip, UK) befestigt. Die Lumineszenzwerte wurden über einen Zeitraum von 30 s integriert.

3.4.2 *Hydrogenasemessungen*

Die Hydrogenaseaktivität wurde an einer Silber-Platin-Elektrode (DW 1 Liquid Clark Electrode; Hansatech Inst., Norfolk, UK) mit einer Polarisationsspannung von -600 mV gemessen. Zwischen Silber-Anode und Platin-Kathode wurde eine 3 M Kaliumchlorid-Lösung pipettiert. Die Elektrode stand über eine Teflonmembran (YSI Membrane Kit Standard, Yellow Springs, Ohio, USA) mit dem Reaktionsraum und der darin enthaltenen Zellkultur in Verbindung. Der Reaktionsraum befand sich in einem Wassermantel, der durch ein Wasserbad auf 30 °C temperiert wurde. Signale der Elektrode wurden über eine Verstärkerbox (Werkstatt Fachbereich Biologie der Phillips-Universität Marburg, Deutschland) an einen Schreiber (SE-120, ABB Goerz, ABB Metrawatt, Nürnberg, Deutschland) weitergeleitet.

Gemessen wurde die Menge an vorhandener funktionstüchtiger Hydrogenase. Der Zellkultur wurde Methylviologen, das in reduzierter Form als künstlicher Elektronendonordient und so die Wasserstoffbildung der Hydrogenase induziert, zugegeben. Um das

Methylviologen zu reduzieren und den Sauerstoff aus der Kultur zu entfernen, wurde Natriumdithionit zupipettiert.

Zur Eichung der Elektrode wurden im Reaktionsraum 900 μl Wasser mit 100 μl wasserstoffgesättigtem Wasser versetzt, was einer Wasserstoffkonzentration von 77,4 nmol/ml entspricht. Für die Hydrogenaseaktivitätsmessung wurden 850 μl Zellkultur mit 50 μl einer 100 mM Methylviologen-Lösung und 100 μl einer 100 mM Natriumdithionit-Lösung im Reaktionsraum gemischt. Die Wasserstoffproduktion wurde vom Schreiber aufgezeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Hydrogenaseaktivität verschiedener *Synechocystis* sp. PCC 6803

Stämme

Es wurden drei *Synechocystis* Wildtyp Stämme aus verschiedenen Laboren und unser laboreigener Wildtyp untersucht, um zu überprüfen, ob die Stämme Unterschiede hinsichtlich ihrer Hydrogenaseaktivitäten aufweisen. Neben dem laboreigenen Stamm Kiel (Anderson und McIntosh 1991) wurde ein Wildtyp aus Moskau, der aus dem Labor von Herrn Shestakov stammt, ein Wildtyp aus Japan, aus dem Labor von Herrn Murata und ein Wildtyp aus Rostock von Herrn Hagemann untersucht. Der japanische Wildtyp zeigte eine um ein Drittel gegenüber dem laboreigenen Stamm erhöhte Enzymaktivität, während die Hydrogenaseaktivität des Rostocker Wildtyps etwa um die Hälfte reduziert war. Die Hydrogenaseaktivität des Moskauer Wildtyps betrug nur noch etwa 1/28 der Enzymaktivität des laboreigenen Stammes (Abb. 8).

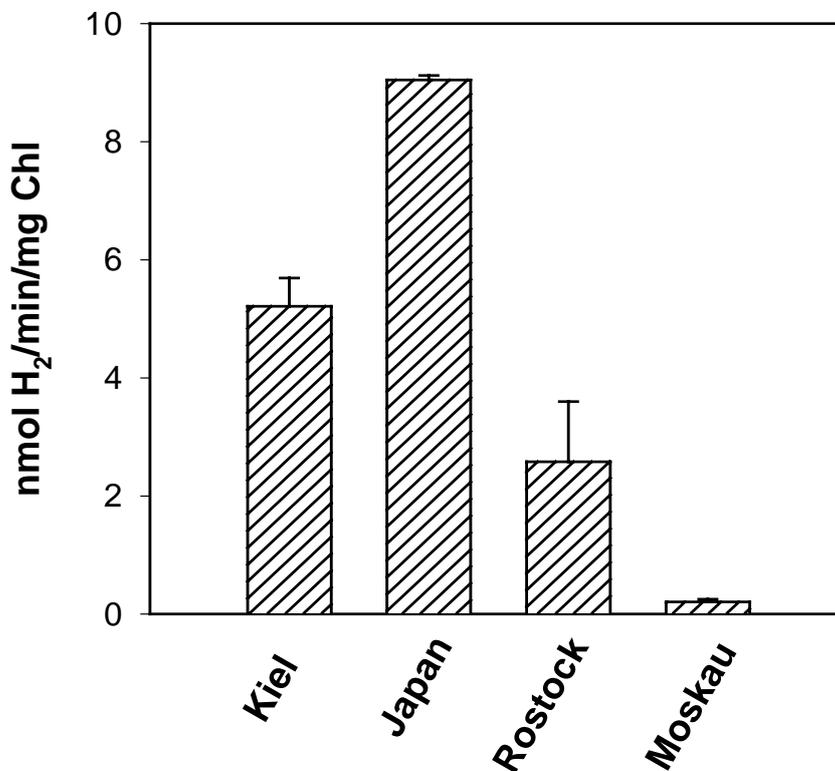


Abbildung 8: Hydrogenaseaktivität verschiedener *Synechocystis* sp. PCC 6803 Stämme

In der Hoffnung, über die Aufklärung des Phänotyps des Moskauer Wildtyps Einblicke in die Regulation der Hydrogenase zu erhalten, wurde dieser Stamm gemeinsam mit dem laboreigenen Stamm genauer untersucht.

Zunächst wurde eine RT-PCR durchgeführt, die zeigte, dass *hoxH* im Moskauer Wildtyp transkribiert wird (Abb. 9, Tab. 1). Da das Hydrogenase-Operon in einem einzigen Transkript abgelesen wird (S. Phunpruch, Dissertation 1999) kann davon ausgegangen werden, dass alle Hydrogenasegene im Moskauer Wildtyp transkribiert werden.

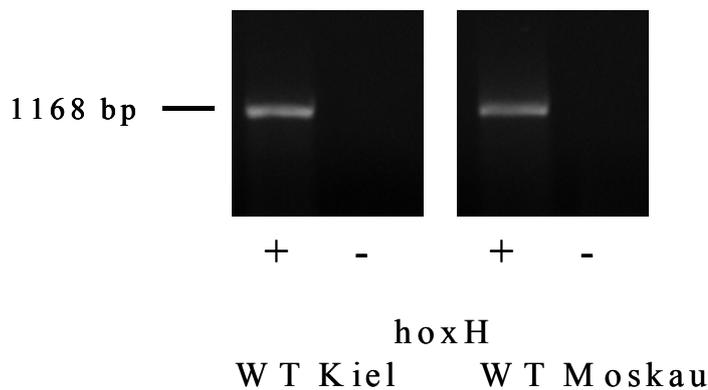


Abbildung 9: Agarosegele mit RT-PCR-Produkten von *hoxH* des laboreigenen Wildtyps Kiel und des Moskauer Wildtyps. Es wurde jeweils eine Kontrolle ohne reverse Transkriptase (-) sowie die Reaktion mit reverser Transkriptase (+) durchgeführt.

4.2 Nickelhaushalt des Moskauer Wildtyps im Vergleich zum laboreigenen *Synechocystis* Stamm

Da vermutet wurde, dass die Nickelaufnahme des Moskauer Wildtyps gestört sein könnte, wurde dieser zusammen mit unserem laboreigenen Wildtyp unter verschiedenen Magnesium- und Nickelkonzentrationen angezogen. Der Nickeltransport kann in Mikroorganismen spezifisch über Nickeltransporter oder unspezifisch über Magnesiumtransporter erfolgen (Eitinger und Mandrand-Berthelot 2000). Da Magnesium ein kompetitiver Inhibitor des unspezifischen Nickeltransports ist, wurde es im Medium reduziert. Beide *Synechocystis* Stämme wurden zunächst für eine Woche in BG-11 Medium angezogen, anschließend sedimentiert und in dem jeweils neuen Medien

gewaschen und resuspendiert. Die Kulturen wurden über Nacht im jeweiligen Medium inkubiert.

Magnesium wurde in zwei Konzentrationen (0,01 mM, 0,1 mM) zugesetzt und mit drei verschiedenen Nickelkonzentrationen (0,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M) kombiniert.

Die Hydrogenaseaktivität des laboreigenen Wildtyps wurde durch die verschiedenen Magnesium- und Nickelkonzentrationen nur unwesentlich beeinflusst (Abb. 10). Die Enzymaktivität war bei einer Nickelkonzentration von 10 μ M (Mg: 0,01 mM) gegenüber einer Nickelkonzentration von 0,5 μ M (Mg: 0,01 mM) um das 1,6 fache reduziert. Bei höherer Magnesiumkonzentration (0,1 mM) blieb die Hydrogenaseaktivität des laboreigenen Wildtyps durch steigende Nickelkonzentrationen unbeeinflusst.

Die Hydrogenaseaktivität des Moskauer Wildtyps konnte hingegen durch die Zugabe von höheren Nickelkonzentrationen signifikant gesteigert werden, wobei der Effekt wie erwartet bei niedrigeren Magnesiumkonzentrationen stärker auftrat (Abb. 10).

Zellen, die mit 10 μ M Nickel (Mg: 0,01 mM) angezogen wurden, zeigten eine 7fach gesteigerte Hydrogenaseaktivität gegenüber Kulturen, denen nur 0,5 μ M Nickel (Mg: 0,01 mM) zugesetzt wurden. Obwohl die Hydrogenaseaktivität des Moskauer Wildtyps durch den Zusatz von Nickel signifikant zunahm, erreichte dieser nicht die Enzymaktivität des laboreigenen Wildtyps.

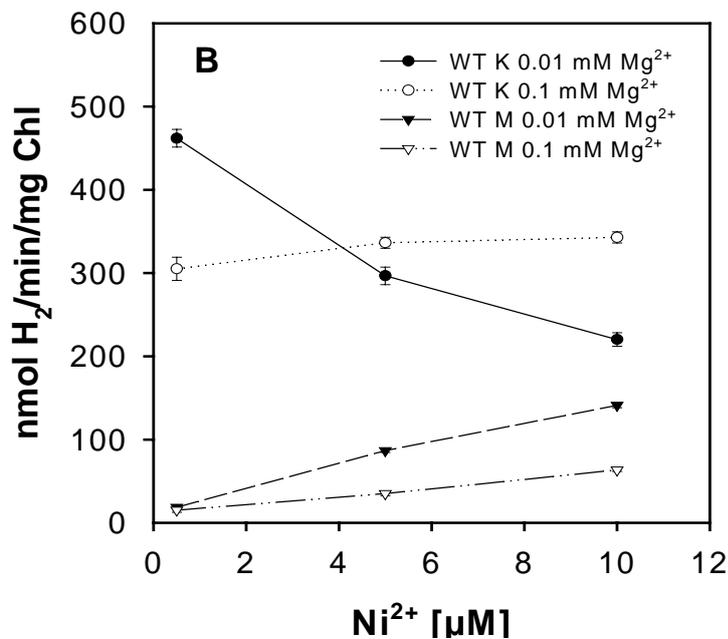


Abbildung 10: Hydrogenaseaktivität von Kulturen mit verschiedenen Magnesium- und Nickelkonzentrationen. Die oberen Kurven zeigen die Aktivität des laboreigenen Wildtyps K während die unteren Kurven Messungen des Moskauer Wildtyps M zeigen.

Zur Zeit der hier beschriebenen Experimente wurde vermutet, dass die *hypB* Gene in *Synechocystis* entsprechend den Verhältnissen in *E.coli* (Rossmann et al. 1994, Olson et al. 2001) in den Einbau von Nickel ins aktive Zentrum der Hydrogenase involviert wären, was sich für eines der Gene später bestätigte (Hoffmann et al., unveröffentlicht). Anders als in *E.coli* finden sich im Genom von *Synechocystis* jedoch zwei Kopien des *hypB* Gens. Es war nicht bekannt, ob beide Gene in *Synechocystis* aktiv sind. Über RT-PCR wurde gezeigt, dass beide Gene sowohl im laboreigenen Wildtyp als auch im Moskauer Wildtyp transkribiert werden (Abb 11, Tab. 1).

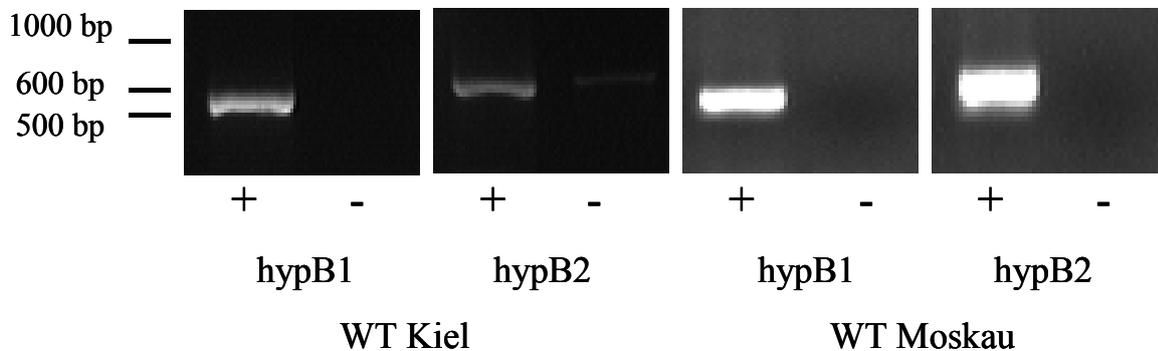


Abbildung 11: Agarosegele mit RT-PCR-Produkten von *hypB1* und *hypB2* des laboreigenen Wildtyps Kiel und des Moskauer Wildtyps. Es wurde jeweils eine Kontrolle ohne reverse Transkriptase (-) sowie die Reaktion mit reverser Transkriptase (+) durchgeführt.

Um weiter nach einem spezifischen Nickeltransporter in *Synechocystis* zu suchen, wurde das Gen *slr0796* in unserem Wildtyp ausgeschaltet. Das Gen ist Teil eines Nickelresistenz Operons, dessen Transkription von einem Zweikomponenten-System aus Histidinkinase und Regulator beeinflusst wird, die auf die interzelluläre Nickelkonzentration reagieren (Lozez-Maury et al. 2002). Slr0796 besitzt 14 Histidinreste, die in die Bindung von Nickel involviert sind (Garcia-Dominguez et al. 2000). Sequenzanalysen (TMHMM; www.abs.dtu.dk) ergaben außerdem, dass das Protein zehn Transmembranhelices enthält, weshalb eine Funktion als Nickeltransporter denkbar war. Die stromaufwärts und stromabwärts gelegenen Regionen des Gens wurden aus dem Wildtyp und die Spektinomycinkassette aus dem Plasmid pHP45Ω amplifiziert und miteinander fusioniert (Tab. 1). Anschließend wurde *Synechocystis* mit dem Fusionsprodukt transformiert. Die Mutante zeigte jedoch eine normale Hydrogenaseaktivität, was schließen ließ, dass es sich

bei Slr0796 nicht wie von uns vermutet, um den spezifischen Nickeltransporter in *Synechocystis* handelt (Daten nicht gezeigt). Die Untersuchungen bezüglich des Nickeltransports in *Synechocystis* wurden im folgenden von einem anderen Mitglied unserer Arbeitsgruppe weitergeführt.

Der Einfluss von Nickelmangel auf die Enzym- und Promotoraktivität der Hydrogenase wurde wie unter 4.3.1 dargestellt, weiter untersucht.

Tabelle 1: Primer für RT-PCR und die Konstruktion der Δ slr0796 Mutante. Die Positionen im Genom sind entsprechend des Datenbankeintrags www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html angegeben.

<u>Primer</u>	<u>Gen</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Position</u>
og46-57tag1kg	sll1226	<u>AGACCGTGTGCGT</u> TTGCGAATGTAGTGTTTGGC	1672231-1672250
og46-57tag2kg	sll1226	<u>AGACCGTGTGCGT</u> TTGCGAATGT	1672231-1672240
prim L1	sll1226	GTGGAGTATCGGGGTTTTGA	1673387-1673368
hypB1-tag1	sll1432	<u>AGACCGTGTGCGA</u> GTTGCCATTGATCCAAA	1907805-1907821
hypB1-tag2	sll1432	<u>AGACCGTGTGCGA</u> GTTGCCATT	1907805-1907814
hypB1	sll1432	CGGTTGTAGTGC GGTTGGAA	1908607-1908588
hypB2-tag1	sll1079	<u>AGACCGTGTGCGA</u> AACTATCATCGGTACTTTA	798855-798873
hypB2-tag2	sll1079	<u>AGACCGTGTGCGA</u> AACTATCA	798855-798862
hypB2	sll1079	AAGTGAGTTAAAAATGGCGGTT	799362-799341
Slr1kg	slr0796	CCAATTACAACAGGGAAATATCG	3055546-3055568
Slr2kg	slr0796	TTGGCACCCAGCCTGCGCGA CCCATTGTGGGGGTTTTGG	3055818-3055801
Slr3kg	slr0796	TGCTCAATCAATCACCGGATCCCCT GCACTAAAGACAAGT	3057211-3057228
Slr4kg	slr0796	TTTTGGCACCATGACCATTG	3057540-3057521
SpRkg		GGGATCCGGTGATTGATTGAGCAAGC	
Spkg		TCGCGCAGGCTGGGTGCCAA	

4.3 *Einfluss abiotischer Faktoren auf die Regulation der bidirektionale Hydrogenase*

Um abiotische Faktoren zu finden, welche in die Regulation der bidirektionalen Hydrogenase in *Synechocystis* involviert sind, wurden Kulturen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen angezogen. Neben dem *Synechocystis* Wildtyp wurde eine Mutante untersucht, die mit einem Promotor-Test-Vektor transformiert war, in welchem der Promotor der Hydrogenase-Gene vor die Reporter-Gene *luxA* und *luxB* ligiert war (Promotorkonstrukt 11 Abb. 17 siehe Abschnitt 4.5.2). Die Mutante enthielt zudem die Gene *luxCDE*, wodurch sie in der Lage war, das für die Lumineszenzreaktion notwendige Aldehyd endogen zu synthetisieren. Die entsprechende Mutante war damit autonom biolumineszent. Über die Messung der jeweiligen Lumineszenzintensität konnte die Promotoraktivität *in vivo* untersucht werden.

Hydrogenase- und Promotoraktivität wurden jeweils parallel gemessen.

Während die Messungen der Hydrogenaseaktivität Hinweise auf die Menge funktionstüchtigen Enzyms lieferten, ließen die Lumineszenzdaten Rückschlüsse über transkriptionelle Vorgänge zu.

Es wurde der Einfluss von Nickel, Eisen und Stickstoff untersucht.

4.3.1 *Einfluss von Nickel auf die Hydrogenase*

Im aktiven Zentrum der bidirektionalen Hydrogenase findet sich ein Nickelion. Der Einfluss von Nickelmangel auf die Aktivität und Transkription der Hydrogenase wurde untersucht, indem den Kulturmedien verschiedene Konzentrationen an NTA (50 μM , 250 μM , 500 μM , 1000 μM) zugesetzt wurden. NTA ist ein Chelatbildner, der Nickel komplexiert und es damit den Kulturen entzieht (Eitinger et al. 1997).

Die Zugabe von NTA hatte keinen Einfluss auf Hydrogenase- und Promotoraktivität (Daten nicht gezeigt).

4.3.2 *Einfluss von Eisen auf die Hydrogenase*

Synechocystis benötigt zum Aufbau einer funktionstüchtigen Hydrogenase etwa 26-27 Eisenatome (Appel und Schulz 1996). Um die Auswirkungen von Eisenmangel auf die Hydrogenaseaktivität und die Transkription des *hox*-Operons zu untersuchen, wurde *Synechocystis* in eisenfreiem BG-11 Medium mit Zusatz von 0,22 bis 22,6 μM Fe^{3+} kultiviert. Die Hydrogenaseaktivität nahm mit sinkenden Eisenkonzentrationen ab (Abb. 12). Kulturen, mit höheren Eisenkonzentrationen zeigten eine Enzymaktivität von etwa

550 nmol H₂/ mg Chl/ min. Enthielt das Medium nur noch 0,22 µM Fe³⁺ war keine Hydrogenaseaktivität mehr messbar. Die Promotoraktivität, gemessen als Lumineszenz, verhielt sich gegenläufig zur Enzymaktivität (Abb. 12). In Kulturen mit Konzentrationen von 0,22 µM Fe³⁺ wurden zehnfach erhöhte Lumineszenzsignale gegenüber solchen, die mit ausreichend Eisen versorgt waren, gemessen.

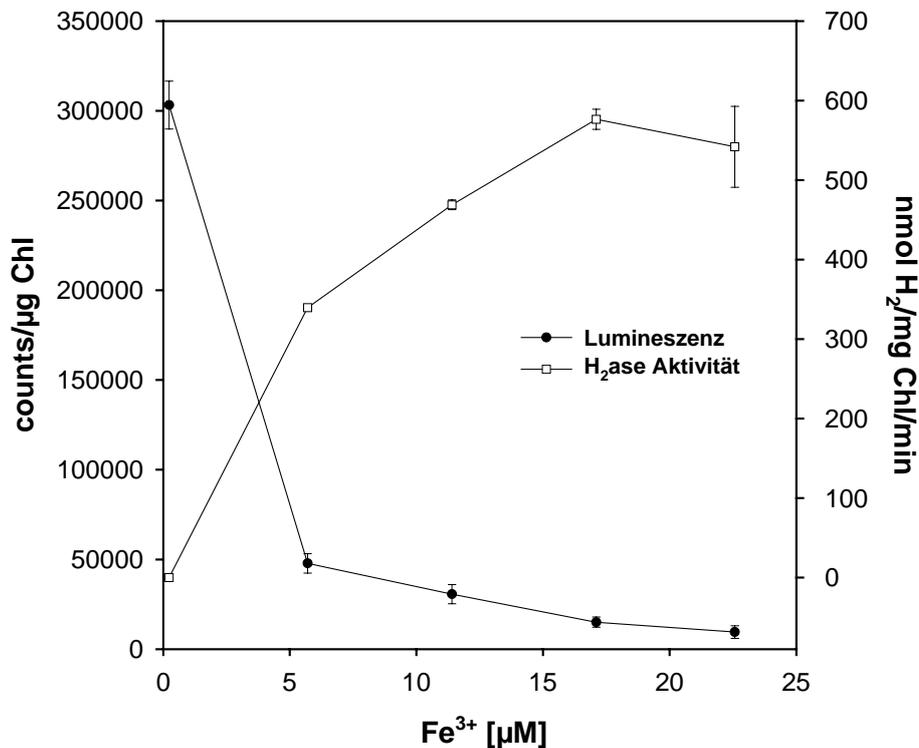


Abbildung 12: Hydrogenase- und Promotoraktivität (gemessen als Lumineszenz) von Kulturen, die mit verschiedenen Eisenkonzentrationen angezogen wurden.

4.3.3 Einfluss von Stickstoff auf die Hydrogenase

Synechocystis ist nicht in der Lage, atmosphärischen Stickstoff (N₂) zu assimilieren. Als Stickstoffquelle kann Ammonium (NH₄⁺) aus dem Medium aufgenommen und in die Kohlenstoffverbindungen 2-Oxoglutarat eingebaut werden. Alternativ wird Nitrat (NO₃⁻) in die Zellen transportiert und unter Verbrauch von 8 Elektronen über Nitrit (NO₂⁻) zu einem Molekül Ammonium reduziert.

Der *Synechocystis* Wildtyp und die Mutante wurden unter Stickstoffmangelbedingungen sowie mit verschiedenen Stickstoffquellen kultiviert, um zu untersuchen, ob Stickstoff einen regulatorischen Einfluss auf die Hydrogenase hat.

Die Organismen wurden eine Woche in Kulturröhren mit BG-11 Medium, das als Stickstoffquelle Nitrat enthielt, angezogen. Anschließend wurden die Kulturen

sedimentiert, dreimal mit dem entsprechend neuen Medium gewaschen und erneut in BG-11 Medium, mit Nitrat als Stickstoffquelle, BG-11₀ Medium mit Ammonium als Stickstoffquelle sowie BG-11₀ Medium ohne Stickstoffquelle kultiviert. Hydrogenase- und Promotoraktivität wurden über 8 h alle 2 h und anschließend in einem vierstündigen Rhythmus über insgesamt 48 h gemessen.

Weder die Enzymaktivität noch die Promotoraktivität wurden durch das Angebot der Stickstoffquellen bzw. durch den Mangel an Stickstoff beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

4.4 *Hydrogenaseaktivität ausgesuchter Histidinkinasen-Mutanten*

Um Hinweise darauf zu erhalten, welche Umwelteinflüsse oder zellulären Signale in die Regulation der Hydrogenase involviert sein könnten, wurden verschiedene Histidinkinase-Mutanten untersucht. *Synechocystis* besitzt in seinem Genom 43 Gene, die für Histidinkinasen kodieren. In einem Versuch, die Kälteperzeption in *Synechocystis* aufzuklären, wurden alle Gene, die für Histidinkinasen kodieren, systematisch ausgeschaltet (Suzuki et al. 2000). Die Hydrogenaseaktivität einer Auswahl dieser Histidinkinase-Mutanten wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Vier Mutanten (*hik1*, *hik3*, *hik7*, *hik27*) wurden ausgewählt, weil die deletierten Histidinkinasen starke Homologien zu der Histidinkinase HoxJ des Proteobakteriums *Cupriavidus necator* aufweisen, welche in diesem Organismus die Expression von zwei NiFe-Hydrogenasen reguliert (Lenz und Friedrich 1998, Buhrke et al. 2004).

Da gezeigt wurde, dass die bidirektionale Hydrogenase in *Synechocystis* die Photosysteme unter Lichtstressbedingungen schützt, indem es überschüssige Elektronen vorübergehend in Form von Wasserstoff speichert (Appel und Schulz 1998, Appel et al. 2000, Cournac et al. 2004), ist eine Regulation des Enzyms über die Redoxverhältnisse der Zelle denkbar. Deshalb wurden auch Mutanten untersucht, denen Histidinkinasen fehlen, von denen angenommen wird, dass sie die Redoxverhältnisse der Zelle perzeptieren wie Hik30 (Li and Sherman 2000) und Hik14 und Hik22, die homolog zu ArcA, einem Redoxsensor aus *E.coli*, sind (Georgellis et al. 2001, Malpica et al. 2004).

Die Hydrogenaseaktivität von insgesamt sieben Histidinkinase-Mutanten (*hik1*, *hik3*, *hik7*, *hik14*, *hik22*, *hik27*, *hik30*) ist in Abbildung 13 gezeigt.

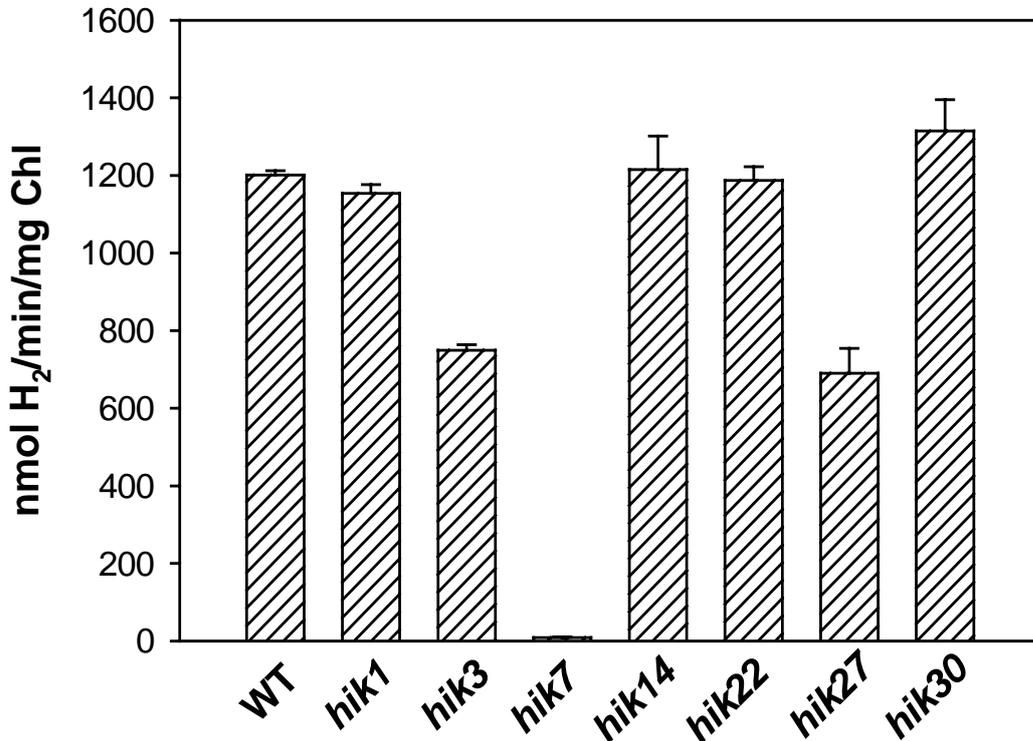


Abbildung 13: Hydrogenaseaktivität verschiedener Histidinkinasevarianten

Die Mutanten *hik1*, *hik14*, *hik22* und *hik30* zeigten keinen Phänotyp bezüglich ihrer Hydrogenaseaktivität. Die Enzymaktivitäten von *hik3* und *hik27* waren auf 2/3 der Hydrogenaseaktivität des Wildtyps reduziert und die Mutante *hik7* zeigte überhaupt keine Enzymaktivität.

Um zu prüfen, ob Hik7 die Transkription der Hydrogenasegene beeinflusst, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Ein Transkript von *hoxH* ließ sich in der entsprechenden Mutante nachweisen (Abb. 14). Da alle *hox*-Gene in *Synechocystis* gemeinsam transkribiert werden, kann davon ausgegangen werden, dass der Phänotyp der *hik7* Mutante nicht auf eine fehlende Transkription der Hydrogenasegene zurückgeht.

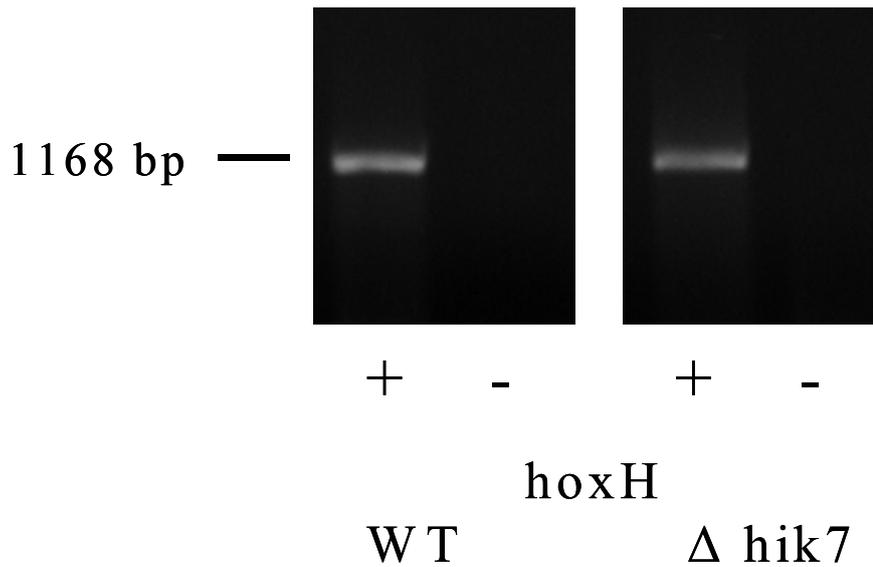


Abbildung 14: Agarosegele mit RT-PCR-Produkten von *hoxH* des Wildtyps und der *hik7* Mutante. Es wurde jeweils eine Kontrolle ohne reverse Transkriptase (-) sowie die Reaktion mit reverser Transkriptase (+) durchgeführt.

4.5 Charakterisierung des Promotors der Hydrogenasegene

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde mittels RT-PCR gezeigt, dass die strukturellen Gene der bidirektionalen NiFe-Hydrogenase *hoxE,F,U,Y,H* in *Synechocystis* ein einziges Transkript bilden (S. Phunpruch, Dissertation 1999). Dies legte nahe, dass die *hox* Gene durch einen einzigen Promotor reguliert werden, der sich stromaufwärts von *hoxE* befindet. Um diese Vermutung zu prüfen, wurde im Vorfeld dieser Arbeit eine Mutante konstruiert, in der die ersten 90 bp stromaufwärts des Translationsstartpunktes von *hoxE* durch die Insertion einer Spektinomycin-Kassette mit flankierenden T7 Transkriptions Terminations Sequenzen deletiert wurden (C. Schwarz, unveröffentlicht). Wie erwartet, zeigte die entsprechende Mutante keine Hydrogenaseaktivität (Abb.15).

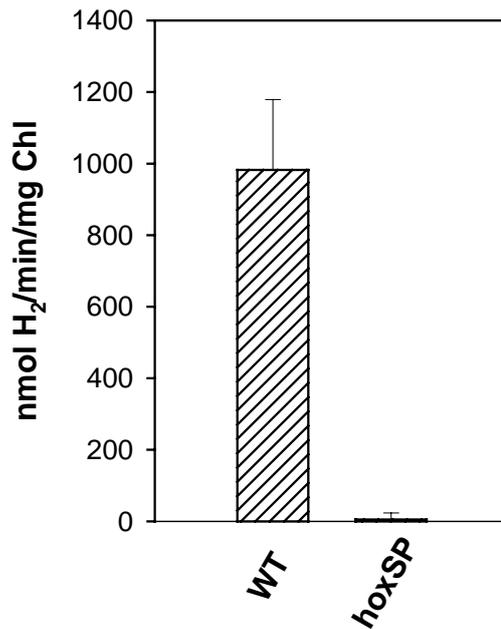
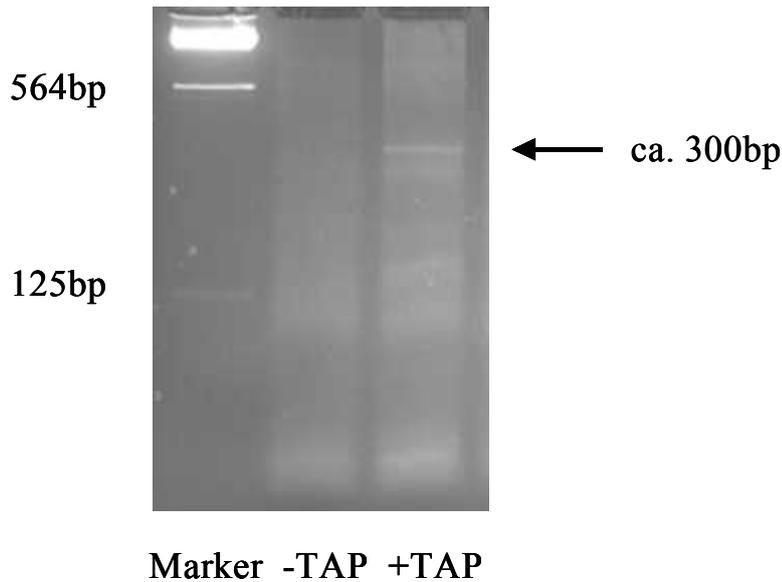


Abbildung 15: Hydrogenaseaktivität einer Mutante mit einer Deletion der ersten 90 bp stromaufwärts des Translationsstartpunktes von *hoxE* im Vergleich zum Wildtyp.

4.5.1 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des *hox* Operons

Um den Promoter des *hox* Operons weiter zu charakterisieren, wurde der Transkriptionsstartpunkt bestimmt. Primer-Extensions-Analysen schlugen wegen der geringen Transkriptmenge der *hox* Gene fehl. Daher fand eine 5'RACE-Methode nach Bensing et al. (1996) Anwendung. Neben der höheren Sensitivität erlaubt diese Methode durch die Verwendung von TAP (tobacco acid pyrophosphatase) zwischen prozessierter und unprozessierter RNA zu unterscheiden, was eine präzisere Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes ermöglicht.

Die PCR-Produkte aus der Kontrollreaktion und dem mit TAP behandelten Ansatz wurden auf einem Agarosegel analysiert. Nur Produkte, die ausschließlich in der mit TAP behandelten Reaktion auftraten und somit von unprozessierten RNAs stammten, wurden kloniert und sequenziert. Die Identifikation des Transkriptionsstartpunktes wurde in drei voneinander unabhängigen Reaktionen wiederholt. Ein PCR-Produkt von etwa 300 bp trat ausschließlich in der mit TAP behandelten Reaktion auf (Abb.16). Die Klonierung und Sequenzierung dieses Produktes ergab einen Transkriptionsstartpunkt, der sich -168 bp stromaufwärts vom Startcodon von *hoxE* befindet.



Transkriptionsstartpunkt: -168 vom ATG

TTTGCTCACTTTTAAAAGTTGATGTAACAATGAAGGCA
-35 **-10** **TS**

Abbildung 16: Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes (TS) des *hox* Operons mit 5' Race. Der Pfeil weist auf das PCR-Produkt, welches ausschließlich in der mit TAP behandelten Reaktion auftritt. Gezeigt ist außerdem die Sequenz stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes mit möglichen -10 und -35 Sequenzen.

4.5.2 Identifikation von Proteinbindestellen im Promoter des *hox* Operons

Um nach funktionellen Einheiten zu suchen, wurde der Promotor mit Hilfe eines Reportersystems untersucht. Es wurden insgesamt 16 verschiedene Promoterfragmente aus der Region stromaufwärts des *hox* Operons amplifiziert. Diese waren 143 bis 1113 Nukleotide lang und umfassten die Region +151 bp bis -962 bp relativ zum ATG von *hoxE* (Tab. 2, und 3, Abb. 17).

Tabelle 2: Primer aus dem Promotorbereich des *hox*-Operons. Die Positionen im Genom sind entsprechend des Datenbankeintrags www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html angegeben.

Primer	Sequenz	Position
Rep1	AAAGGTACCATGATAATTTATTTCTC	1679527-1679501
Rep2	AACGGTACCCAGAACCTAGTAACTA	1679255-1679231
Rep3	ACTGGTACCGGTTTGGGTGTTGTCCGTCA	1679134-1678106
Rep4	TTAGGTACCAGTGAAGCCCTTCGGCT	1679003-1678978
Rep5	ATTGGTACCTTTAGTGAATAAAGTTA	1678962-1678936

Ergebnisse

Rep7	AAT <u>GGTACCA</u> AAAATCTAGTGCAATTTA	1678883-1678857
Rep13	GTCACTAGCATATGGCTTGC	1679413-1679394
Rep14	GCAACCAACTAGAGATTCCA	1678735-1678716
Rep15	GTTGCTTAAAACAACCTT	1678842-1678825
ReprevD	AAAGGTACCTGGGCTTTATGCAGGATTT	1678432-1678441
Reprev1	GCAGGTACCATGGAAAAATCCTCAAAAAG	168555-1678583
Reprev2	TTTGGTACCGGAAAGAATTTGTGTGC	1678662-1678688
Reprev3	ATTGGTACCGCTATTAGTCGATGCA	1678716-1678742
Reprev4	AATGGTACCAACGAAAAAGTTGTTTTA	1678810-1678836
Reprev5	ATTGGTACCTTTAGTGAATAAAGTTA	1678905-1678930
Reprev6	CATGGTACCGAAGGGCTTCACTGGCAG	1678973-1678999
Reprev7	ACAGGTACCAAACCGAAAAATAGTCGCA	1679112-1679138
Reprev9	TAGGGTACCGAAGGTATTGAATCCTCA	1679365-1679391
Reprev10	TGGAAGTGATTTCTAGGGAA	1679259-1679275
Reprev11	AAAGTTGTTTTAAGCAAC	1678825-1678842
RepU3	ATTGGTACCGCTATTAGTCGATGCA	1676148-1676122
RepU4	AGAGGTACCAAAAACCTTTGAAAAT	1675657-1675683

Tabelle 3: Für die Promotorfragmente verwendeten Primer aus Tabelle 2.

<u>Promotorfragment</u>	<u>Primer</u>
1	Rep1 + ReprevD
2	Rep1 + Reprev1
3	Rep1 + Reprev2
4	Rep1 + Reprev3
10	Rep1 + Reprev9
11	Rep2 + Reprev1
12	Rep3 + Reprev1
13	Rep4 + Reprev1
14	Rep5 + Reprev1
16	Rep7 + Reprev1
23	Rep2 + Reprev3
24	Rep2 + Reprev2
25	Rep2 + Reprev7
26	Rep2 + Reprev6
27	Rep2 + Reprev5
28	Rep2 + Reprev4

In einigen Cyanobakterien besteht das *hox* Operon aus zwei Teilen mit einer intergenen Region von z.B. 16 kb (*Synechococcus*) und 8,8 kb (*Anabaena*) zwischen *hoxF* und *hoxU*. Um das Vorhandensein eines zusätzlichen Promotors stromaufwärts von *hoxU* in *Synechocystis* auszuschließen, wurde daher ein zusätzliches Fragment von 491 Nukleotiden (1675657-1676148) aus dieser Region amplifiziert (siehe Primer RepU3 und RepU4 in Tab. 2).

Die Promoterfragmente wurden in den Promoter-Test-Vektor pILA kloniert, der als Reportergene die Luziferasegene *luxA* und *luxB* aus *Vibrio harveyi* trägt (Kunert et al. 2000). Um die korrekte Integration der Fragmente in den Vektor zu bestätigen, wurden alle Konstrukte sequenziert und anschließend in eine neutrale Stelle des *Synechocystis* Chromosoms eingefügt. Als Kontrolle diente eine Mutante mit leerem pILA-Vektor.

Die Luziferase katalysiert die Oxidation von FMNH₂, welches dem Zellstoffwechsel entnommen wird und einem Aldehyd. Als Produkte entstehen oxidiertes Flavin, die zum Aldehyd korrespondierende Fettsäure und blau-grünes Licht (493 nm). Das Aldehyd kann den Zellen exogen in Form von n-Decanal zugegeben werden. Da es jedoch Hinweise gibt, dass die exogene Zugabe von n-Decanal toxisch auf die Zellen wirkt (Fernandez-Pinas and Wolk 1994, Kunert et al. 2000), wurde neben dem *Synechocystis* Wildtyp auch eine Mutante mit den Genen *luxCDE*, welche in der Lage sind, das benötigte Aldehyd endogen zu synthetisieren, mit den Promotorkonstrukten transformiert. Die Stämme zeigten weder Unterschiede in ihrer Hydrogenaseaktivität noch in der Intensität ihrer Lumineszenzsignale (Daten nicht gezeigt).

Das Promotorkonstrukt mit dem Fragment aus der Region stromaufwärts von *hoxU* zeigte keine Lumineszenz (Daten nicht gezeigt). Daraus konnte geschlossen werden, dass sich in *Synechocystis* kein zusätzlicher Promoter in diesem Bereich des *hox* Operons befindet.

Promotorkonstrukte mit Fragmenten aus der Region stromaufwärts von *hoxE*, die kürzer waren als 700 Nukleotide, zeigte keine Promoteraktivität (Abb. 17).

dass die weiter stromaufwärts gelegene Region tatsächlich die Transkription des *hox* Operons reguliert.

Um zu überprüfen, ob ein Transkriptionsfaktor in der beschriebenen Region –569 bp bis –690 bp stromaufwärts des ATGs von *hoxE* bindet, wurden Gelretardierungsexperimente mit fünf einander überlappenden Oligonukleotiden von je 49 bp durchgeführt (Abb. 19, Tab. 4).

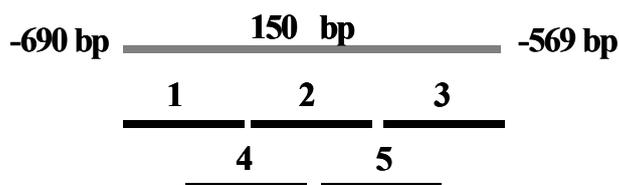


Abbildung 19: Gezeigt sind die Positionen der fünf einander überlappenden Oligonukleotide 1-5, die in die Gelretardierungsreaktionen eingesetzt wurden. Die Oligonukleotide sind jeweils 49 bp lang und umfassen die Region –569 bp bis –690 bp stromaufwärts des Translationsstartpunktes von *hoxE*.

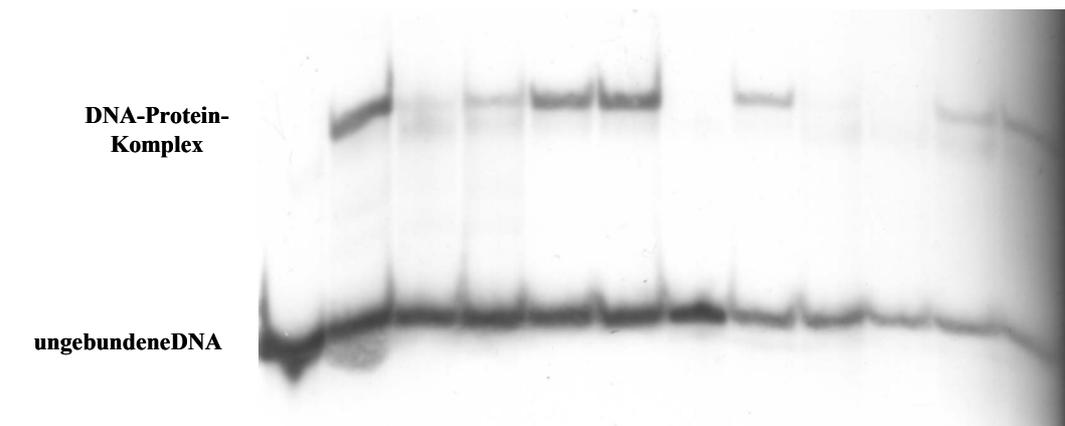
Zusätzlich wurde Oligonukleotid 6, das 98 bp aus der untranslatierten Region (-98 bp bis zum ATG von *hoxE*) umfasst, eingesetzt, um diesen Bereich nach Proteinbindestellen abzusuchen (Tab. 4).

Tabelle 4: In die Gelretardierungsexperimente eingesetzte Oligonukleotide. Die Positionen im Genom sind entsprechend des Datenbankeintrags www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html angegeben.

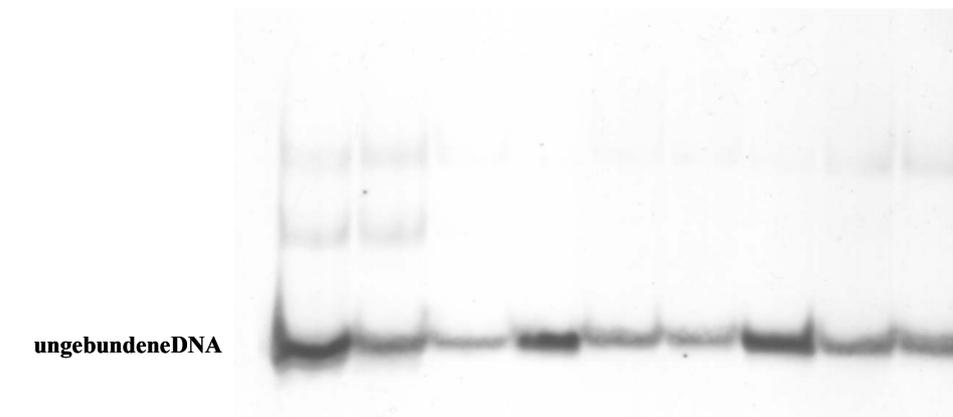
Oligo	Sequenz	Position
Oligo1	AACAACACCCAGAACCTAGTAACTAGTTCGACTTACCCT CCTTCTTCG	1679255-1679207
Oligo2	GCATGACCGGAGCTGCAAATACCTAATACAAGGTCAGTGCCTAT CTCCC	1679205-1679157
Oligo3	GGCTAGCAATTGGGGTTGCGACTATTTTCGGTTTGGGTGTTGTCC GTCA	1679154-1679106
Oligo4	AGTTCGACTTACCCTCCTTCTTCGAGCATGACCGGAGCTGCAAA TACC	1679231-1679183
Oligo5	AATACAAGGTCAGTGCCTATCTCCCATGGCTAGCAATTGGGGTTG CGAC	1679181-1679133
Oligo 6	TGAAAATCAGGCTAACTTTTCGCAATCAAATTTACCTGGTTTAGGC	

	TCTCCAATCATCTTTTATCTGCTGTATTGCTCCTTTTTGAGGATTT	
	TTCCATG	1678689-1678591
GlnA	ATGGAGCCGCAAAAAATGGTAGCGAAAAATACATTTTCTAACTAC	
	TTGA	531331-531374

Die Oligonukleotide wurden mit Digoxigenin markiert und mit einem Proteingesamtextrakt aus *Synechocystis* inkubiert. Im Ansatz mit dem 98 bp langen Oligonukleotid 6 aus der untranslatierten Region stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes zeigten sich keine retardierten Banden (Daten nicht gezeigt). In den Gelretardierungsexperimenten mit den Oligonukleotiden aus der 150 bp umfassenden Region, wurden Kompetitionsreaktionen durchgeführt, um die Spezifität von Bindungsereignissen zu überprüfen. Die fünf Oligonukleotide wurden miteinander kombiniert, indem den jeweiligen Anätzen ein 100-facher Überschuss von unmarkiertem Oligonukleotid zugesetzt wurde. Retardierte Banden zeigten sich in den Reaktionen mit Oligonukleotid 1 (-641 bis -690) und 2 (-591 bis -640) (Abb. 20). Der markierte DNA-Protein-Komplex konnte durch einen Überschuss des jeweiligen unmarkierten Oligonukleotids verdrängt werden. Interessanterweise führte auch die Zugabe eines Überschusses von unmarkiertem Oligonukleotid 2 zur Reaktion mit Oligonukleotid 1 und entsprechend von unmarkiertem Oligonukleotid 1 zur Reaktion mit Oligonukleotid 2 zu einer Verdrängung der retardierten Bande. Dies war nicht der Fall, wenn den Reaktionen ein Überschuss an unmarkierten Oligonukleotiden 3, 4 oder 5 zugesetzt wurde. Daraus konnte geschlossen werden, dass das gleiche Protein an Oligonukleotid 1 und 2 bindet.



Protein:	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Oligonukleotid:	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
Kompetitor:	-	-	1	2	3	4	-	-	2	1	3	4



Protein:	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Oligonukleotid:	3	3	3	4	4	4	5	5	5
Kompetitor:	-	-	3	-	-	4	-	-	5

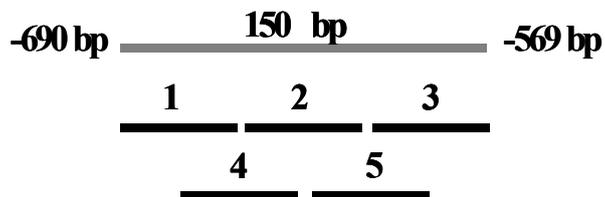


Abbildung 20: Gelretardierungsexperiment mit Oligonukleotiden aus der Region stromaufwärts von *hoxE*. Oligonukleotid 1 (-641 bp bis -690 bp stromaufwärts des ATGs von *hoxE*) und Oligonukleotid 2 (-591 bp bis -640 bp stromaufwärts des ATGs von *hoxE*) binden ein Protein aus dem Proteingestamtextrakt aus *Synechocystis*. Als Kompetitor diente ein 100-facher Überschuss an unmarkierter DNA.

4.5.3 Identifikation des im *hox* Promotor bindenden Transkriptionsfaktors

Um das Protein, welches an die Oligonukleotide 1 und 2 bindet, zu identifizieren, wurden Oligonukleotid-Ketten, sogenannte Konkatomere beider DNA-Fragmente synthetisiert und unter Verwendung eines DNA-binding purification kit (Roche, Mannheim) an Magnetkügelchen ligiert. Die Magnetkügelchen mit den daran gebundenen Oligonukleotid-Ketten wurden mit Proteingestamtextrakt aus *Synechocystis* inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde das gebundene Protein eluiert, dialysiert und auf einem SDS-Gel analysiert. Das Protein wurde aus dem Gel isoliert und zur massenspektrometrischen Analyse gegeben (Planton GmbH, Kiel). Das Protein konnte als das DNA bindende Protein LexA identifiziert werden. Interessanterweise wurde NtcA, ebenfalls ein DNA bindendes Protein, zweimal gemeinsam mit LexA isoliert. Die Oligonukleotide 1 und 2 wurden daraufhin auf Konsensussequenzen für LexA und NtcA überprüft. Auf beiden Oligonukleotiden wurden NtcA Bindestellen mit je einer abweichenden Base in der Konsensussequenz gefunden (Abb. 21 A). Ein Vergleich der Oligonukleotidsequenzen mit der cyanobakteriellen LexA Konsensussequenz, wie sie von Mazon et al. (2004) vorgeschlagen wurde, ließ auf Oligonukleotid 1 eine vollständig übereinstimmende Sequenz und auf Oligonukleotid 2 eine Sequenz mit drei abweichenden Basen von 10 erkennen (Abb. 21 B).

A

Oligo 1: AACAAACACCCAGAACCTAGTAACTAGTTCGACTTACCCTCCTTTCTTCG
 Oligo 2: GCATGACCGGAGCTGCAAATACCTAATAACAAGGTCAGTGCCTATCTCCC AT
 NtcA Konsensus: GTAN₈TACN₂₄TAN₃T

B

Oligo 1: AACAAACACCCAGAACCTAGTAACTAGTTCGACTTACCCTCCTTTCTTCG
 Oligo 2: GCATGACCGGAGCTGCAAATACCTAATAACAAGGTCAGTGCCTATCTCCC
 LexA Konsensus: RGTANNNDGTWCB

Abbildung 21: A: Unvollkommene NtcA-Konsensussequenzen auf den Oligonukleotiden 1 und 2 mit je einem abweichenden Nukleotid im Vergleich zur Konsensussequenz GTAN₈TACN₂₄TAN₃T.

B: LexA-Konsensussequenzen auf den Oligonukleotiden 1 und 2.

Unterstrichen sind die vollständig übereinstimmende LexA-Konsensussequenz auf Oligonukleotid 1 und die unvollkommene LexA-Konsensussequenz auf Oligonukleotid 2 mit drei abweichenden Nukleotiden in den Positionen 2, 9 und 13.

R = A, G; W = A, T; D = G, A, T; B = G, T, C

Da NtcA direkt mit der RNA-Polymerase wechselwirkt und normalerweise dicht am Transkriptionsstartpunkt bindet (Herrero et al. 2004), wurde die Region stromabwärts der gefundenen Bindestellen (-340 bis -540 bp stromabwärts vom ATG von *hoxE*) auf Transkriptionsstartpunkte überprüft. Es konnten jedoch keine zusätzlichen Initiationsstellen in der Region gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

LexA und NtcA wurden in *E. coli* überexprimiert, um zu klären ob das eine, das andere oder beide Proteine an den untersuchten Promotor binden.

LexA und *ntcA* wurden zunächst aus dem *Synechocystis* Wildtyp amplifiziert (Tab. 5).

Tabelle 5: Primer zur Amplifikation von *lexA* und *ntcA* aus *Synechocystis*. Die Positionen im Genom sind entsprechend des Datenbankeintrags www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html angegeben. Unterstrichen sind in die Primersequenzen eingefügte Restriktionsschnittstellen.

Primer	Gen	Sequenz	Position
lexA1	sll1626	CATATGGAACCTCTCACCCGAG	1319333-1319312
lexA2bam	sll1626	<u>GGATCC</u> GTTTACC CGCTTTGAGTTCG	1319066-1319091
lexA3bam	sll1626	<u>GGATCC</u> ACTCCCTGGAAATTGCGC	1318717-1318740
Ntca1	sll1423	TGAACGCATAT <u>GGATC</u> AGTCCCTAAC	1590070-1590045
Ntca2	sll1423	TCACTCGAG <u>GGC</u> ACTGGTCATAGAGG	1589354-1589379

Für *lexA* wurden zwei PCR-Produkte synthetisiert: eines enthielt den gesamten Leserahmen (*lexA*₁: 1318717-1319333) und das andere umfasste nur die DNA-Bindedomäne (*lexA*_s: 1319066-1319333) des Proteins. Alle drei PCR-Produkte wurden kloniert, sequenziert und zur Überexpression in den pET5a-Vektor ligiert. Die Synthese der Proteine wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Als Kontrolle diente jeweils ein leerer Vektor. Zur Analyse wurden Aliquots der Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen. In Abbildung 22 ist exemplarisch die Überexpression von NtcA gezeigt. Neben dem Marker wurde die Kontrolle mit leerem Vektor einmal uninduziert (K0) und einmal 4h mit IPTG induziert (K4) aufgetragen. Es folgten Aliquots der Kulturen mit Vektor und darin enthaltenem *ntcA*, wiederum einmal uninduziert (N0) und einmal 4h mit IPTG induziert (N4).

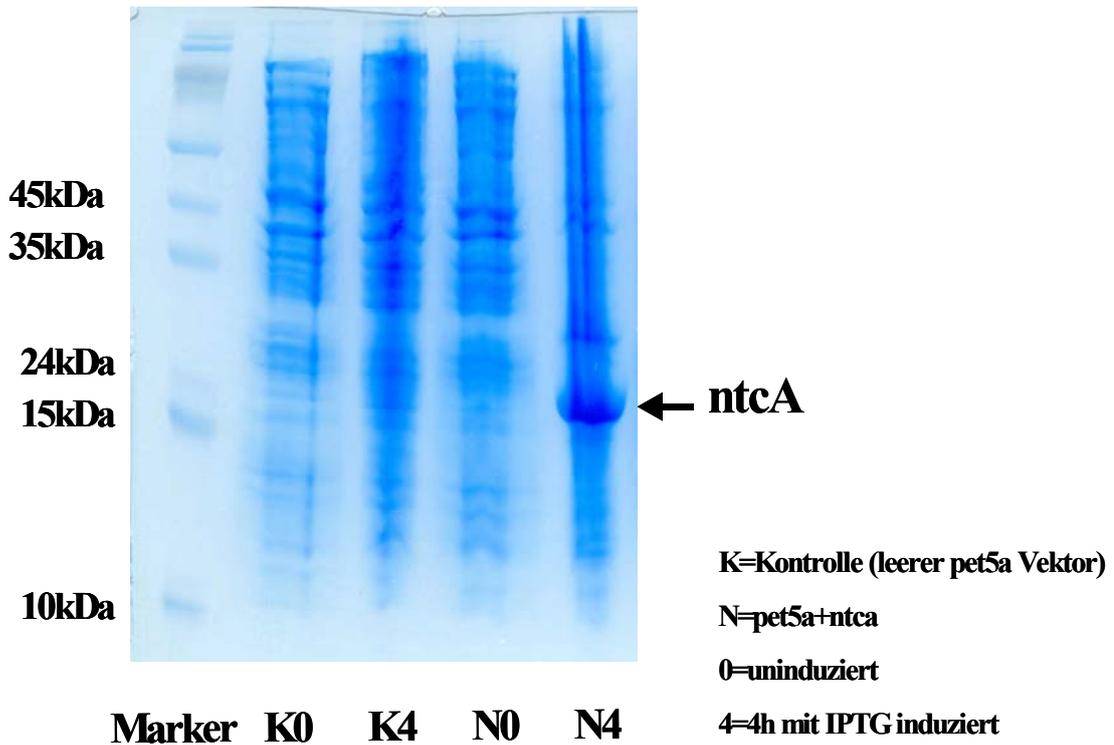
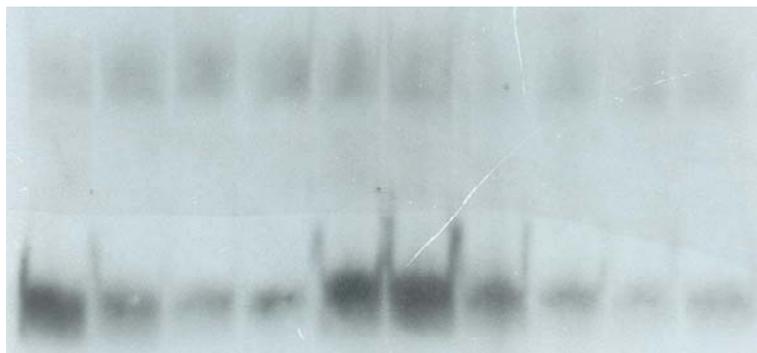


Abbildung 22: Überexpression von NtcA im pET5a-Vektor durch Induktion mit IPTG. Als Kontrolle diente ein leerer Vektor.

Die Gelretardierungsexperimente wurden mit den Oligonukleotiden 1, 2 und 3 (als Kontrolle) wiederholt. Die Oligonukleotide wurden mit Proteinextrakten aus *E. coli* Kulturen mit überexprimiertem NtcA, LexA bzw. der DNA-Bindedomäne von LexA inkubiert. In Kontrollreaktionen wurden die Oligonukleotide mit Proteinextrakten aus einer *E.coli* Kultur mit einem leeren pET5a-Vektor und aus einer *Synechocystis* Kultur versetzt. Es wurden keine retardierten Banden bei Zugabe von überexprimiertem NtcA detektiert (Abb 23). NtcA wurde den Bindereaktionen in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Darüber hinaus wurde den Ansätzen 2-Oxoglutarat (1-8 mM) zugegeben, welches die Bindeaffinität von NtcA für mehrere Promotoren erhöht (Daten nicht gezeigt) (Vazquez-Bermudez et al. 2002, Tanigawa et al. 2002, Vazquez-Bermudez et al. 2003). Auch in diesen Reaktionen konnten keine DNA-Protein-Komplexe nachgewiesen werden. Um die Bindekapazität des überexprimierten NtcAs zu überprüfen, wurde ein Oligonukleotid in eine Kontrollreaktion eingesetzt, das die NtcA-Bindestelle des *glnA* Promotors trug (Tab. 4), von dem bekannt ist, dass er von NtcA reguliert wird (Reyes et al. 1997). Da sich eine retardierte Bande in diesem Ansatz zeigte, konnte davon ausgegangen werden, dass das eingesetzte Protein bindungsfähig ist.



Protein:	-	K	N	N	N	N	-	K	N	N
Verdünnung (1:x)	-	-	-	-	10	20	-	-	-	-
Oligonukleotid:	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2
Kompetitor:	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2



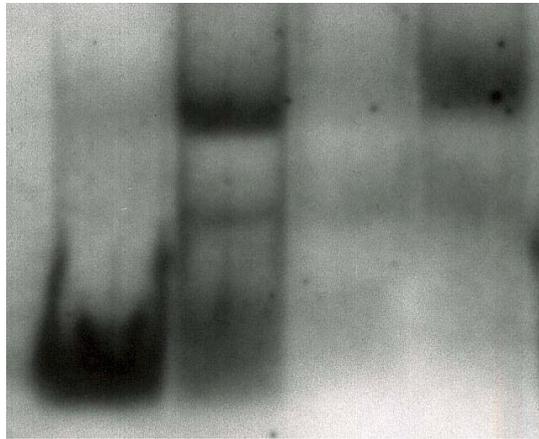
Protein:	-	K	N	N	-	K	N	N
Oligonukleotid:	3	3	3	3	g	g	g	g
Kompetitor:	-	-	-	3	-	-	-	g

Abbildung 23: Gelretardierungsexperiment mit überexprimiertem NtcA.

NtcA (N) bindet nicht an die Oligonukleotide 1, 2 und 3. Seine Funktionalität wird gezeigt durch die Bindung an das Kontroll-Oligonukleotid (g), welches die bekannte NtcA-Bindestelle des *glnA*-Promotors enthält. Als Kontrolle (K) wurde ein *E.coli*-Extrakt ohne überexprimiertem NtcA verwendet. Die Oligonukleotide wurden mit 10 µg Protein inkubiert. Der Proteinextrakt mit überexprimiertem NtcA wurde zudem in Verdünnungen von 1:10 und 1:20 eingesetzt.

Um nochmalig zu bestätigen, dass NtcA nicht an den untersuchten Promoter bindet, wurde ein Verdrängungsexperiment zwischen Oligonukleotid 1 und 2 und einem *glnA*-Promotorfragment mit bekannter NtcA-Bindestelle durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden mit einem Proteinextrakt aus *Synechocystis* inkubiert. Ein 100-facher Überschuß an unmarkiertem *glnA*-Promotorfragment als Kompetitor vermochte die retardierten

Banden nicht zu verdrängen. Daraus konnte geschlossen werden, dass NtcA nicht an die hier untersuchte Region des *hox*-Promotors bindet (Daten nur für Oligonukleotid 1 in Abb. 24 gezeigt).



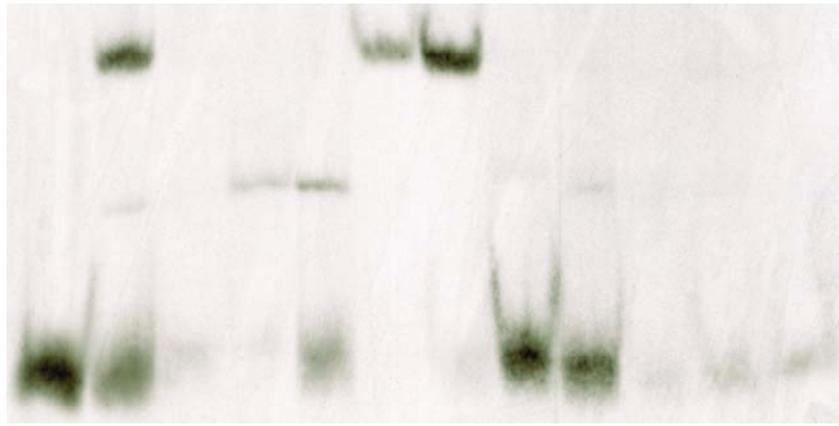
Protein:	-	WT	WT	WT
Oligonukleotid:	1	1	1	1
Kompetitor:	-	-	1	g

Abbildung 24: Verdrängungsexperiment zwischen Oligonukleotid 1 und einem *glnA*-Promotorfragment mit einer bekannten NtcA-Bindestelle. Der Einsatz von einem 100-fachen Überschuss des *glnA*-Promotorfragments (g) als Kompetitor verdrängt die retardierte Bande des Ansatzes mit WT-Protein nicht.

Wurden Oligonukleotide 1, 2 und 3 hingegen mit überexprimiertem LexA oder der überexprimierten Bindedomäne von LexA inkubiert, konnten Protein-DNA-Komplexe in den Ansätzen mit den Oligonukleotiden 1 und 2 nachgewiesen werden, was zeigte, dass zwei LexA Proteine an den *hox*-Promotor binden (Daten nur für Oligonukleotid 1 und 3 in Abb. 25 gezeigt). Die retardierte Bande, die sich im Ansatz mit dem gesamten LexA Protein zeigte, hatte im Gel das gleiche Laufverhalten, wie die retardierte Bande, die durch den Zusatz von *Synechocystis* Wildtyp Proteinextrakt entstand. Der Zusatz von der LexA Bindedomäne führte zu einem Protein-DNA-Komplex von geringerer Größe.

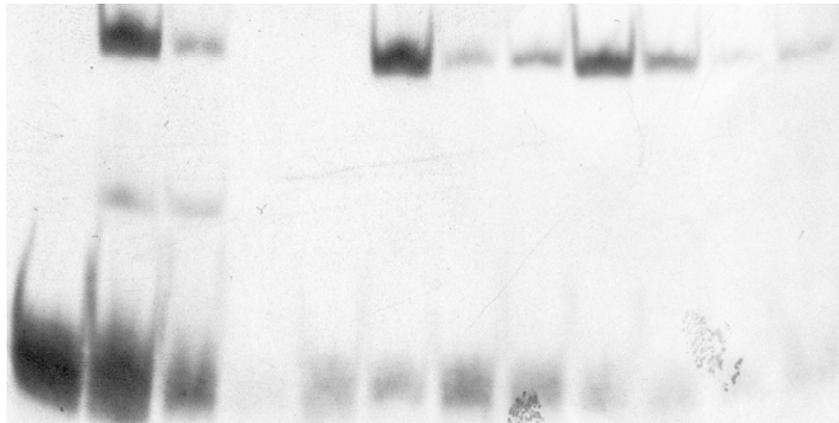
Um zu überprüfen, ob NtcA in der Lage ist, koordiniert mit LexA an den Promotor zu binden, wurden beide Proteine in eine Bindereaktion eingesetzt. Weder in Kombination mit dem gesamten LexA noch in Kombination mit der LexA Bindedomäne konnte ein DNA-Protein-Superkomplex nachgewiesen werden (Abb. 25).

A



Protein:	-	WT	K	LS	LS	LL	LL	-	WT	K	LS	LL
Verdünnung (1:x)	-	-	-	-	10	-	10	-	-	-	-	-
Oligonukleotid:	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3

B



Protein:	-	WT	WT	K	N	LL	LL	LL	LL	LN	LN	LN
Oligonukleotid:	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Kompetitor:	-	-	1	-	-	-	1	2	3	-	1	2

Abbildung 25: Gelretardierungsexperiment mit *Synechocystis* WT-Extrakt, überexprimiertem LexA und NtcA.

A: Die Oligonukleotide 1 und 3 wurden mit *Synechocystis* Proteinextrakt (WT), einem *E.coli* Extrakt ohne überexprimiertem Protein (K), der Bindedomäne von LexA (LS) und dem gesamten LexA-Protein (LL) inkubiert. Es wurde jeweils 10 µg Protein eingesetzt. Die Proteinextrakte mit überexprimiertem LexA (S und L) wurden zudem in einer Verdünnung von 1:10 zugegeben.

B: Oligonukleotid 1 wurde mit *Synechocystis* Extrakt (WT), einem *E.coli* Extrakt ohne überexprimiertem Protein (K), überexprimiertem NtcA (N), LexA (L) und einer Kombination aus LexA und NtcA (LN) inkubiert. Es wurden verschiedene Kompetitoren eingesetzt, um die Spezifität der Bindungsereignisse zu zeigen.

Da parallel zu den hier beschriebenen Arbeiten von einer schwedischen Gruppe eine weitere LexA-Bindestelle im 141 Nukleotide umfassenden Promotorbereich –196 bp bis –337 bp relativ zum ATG von *hoxE* entdeckt wurde (Oliveira und Lindblad 2005), wurden 10 weitere PCR-Produkte, die Oligonukleotide 7-16, die den gesamten Promotorbereich (abgesehen von den bereits untersuchten Regionen) abdeckten, synthetisiert, mit Digoxygenin markiert und in Gelretardierungsreaktionen eingesetzt (Abb. 26, Tab. 6).

Tabelle 6: Für die Synthese der Oligonukleotide 7-16 verwendete Primer aus Tabelle 2.

<u>Oligonukleotid</u>	<u>Primer</u>
7	Rep1 + Reprev9
8	Rep13 + Reprev10
9	Rep3 + Reprev6
10	Rep4 + Reprev5
11	Rep5 + Reprev4
12	Rep5 + Reprev11
13	Rep7 + Reprev11
14	Rep7 + Reprev3
15	Rep15 + Reprev3
16	Rep14 + Reprev1

Die PCR-Produkte wurden mit Proteingesamtextrakt aus *Synechocystis* inkubiert. DNA-Protein-Komplexe konnten in den Ansätzen mit den Oligonukleotiden 11, 12, 13 und 14 detektiert werden. Die Bindung eines Proteins in der von der schwedischen Gruppe angegebenen Region konnte damit bestätigt und der proteinbindende Promotorbereich durch Einsatz des Oligonukleotids 13 weiter auf die 60 Nukleotide umfassende Region –257 bp bis –317 bp relativ zum ATG von *hoxE* eingegrenzt werden (Abb. 26 und Abb. 28).

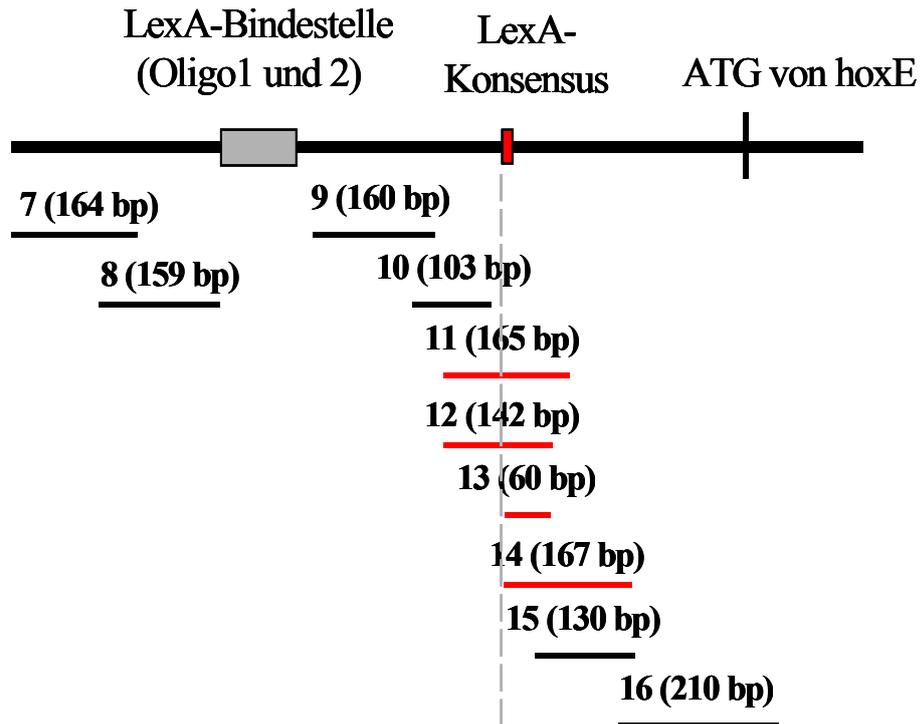


Abbildung 26: Positionen der Oligonukleotide 7-16 im Promotorbereich.

Zur Orientierung sind die Positionen der Oligonukleotide 1 und 2 mit den LexA-Bindestellen, das ATG von *hoxE*, sowie eine in der untersuchten Region gefundene LexA-Konsensussequenz gezeigt. Oligonukleotide, die im Gelretardierungsexperiment Komplexe bildeten, sind rot markiert.

Eine Suche nach der cyanobakteriellen LexA-Konsensussequenz (Mazon et al. 2004) lieferte einen Abschnitt, der abgesehen von vier Abweichungen in den Positionen 2, 3, 11 und 13 mit dieser übereinstimmte (Abb. 26 und Abb. 27) und auf allen Oligonukleotiden (11, 12, 13 und 14), die retardierte Banden zeigten, vorhanden war.

AAAATCTAGTGCA

LexA-Konsensus: RGTANNNDGTWCB

Abbildung 27: LexA-Konsensussequenz in der Position -309 bp bis -297 bp relativ zum ATG von *hoxE*. Abweichungen finden sich in den Positionen 2, 3, 11 und 13. R = A, G; W = A, T; D = G, A, T; B = G, T, C

Abgesehen von der beschriebenen Bindestelle konnten keine weiteren Proteinbindestellen im gesamten Promotor detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 28 sind für den Promotor wichtige Bereiche zusammengefasst.

4.5.4 Schleifenbildung des *hox*-Promotors

Damit die beiden weiter stromaufwärts bindenden LexA-Proteine das Ablesen der Hydrogenasegene regulieren können, wäre es denkbar, dass die zwischen Bindestellen und Transkriptionsstart liegende DNA eine Schleife ausbildet (Abb 29).

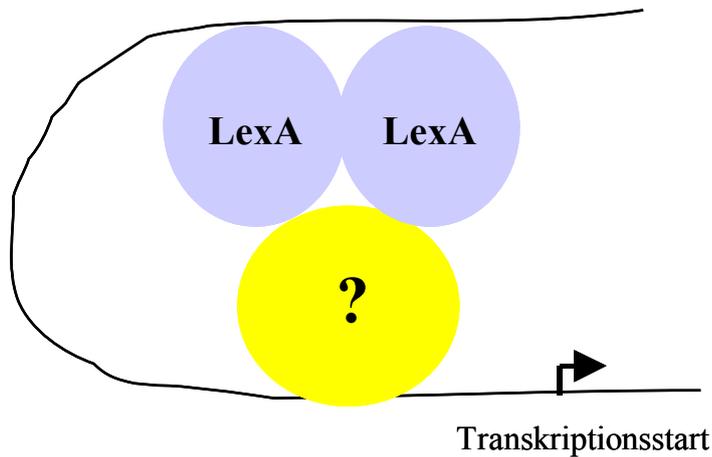


Abbildung 29: Hypothetisches Modell, das zeigt, wie LexA unter Ausbildung einer DNA-Schleife mit anderen Faktoren, die in der Nähe des Transkriptionsstarts binden, interagieren könnte.

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob der *hox*-Promotor unter Ausbildung einer Schleife aktiviert wird, wurden zwei Promotorfragmente mit 5 bzw. 10 deletierten Nukleotiden zwischen den LexA-Bindestellen und dem Bereich des Transkriptionsstarts konstruiert (Primer siehe Rep 2 und Reprév 1 aus Tab. 2 sowie Primer aus Tab. 7). Die Abschnitte umfassten jeweils die 700 Nukleotide des Promotorfragments 11 (siehe Abb. 17). Für jede Mutante wurden jeweils zwei einander um 40 Nukleotide überlappende PCR-Produkte synthetisiert, wobei über die entsprechenden Primer 5 bzw. 10 Nukleotide in der überlappenden Region deletiert wurden. Die beiden PCR-Produkte wurden anschließend miteinander fusioniert. Die Promotorfragmente wurden in den pILA-Vektor vor die Reporterene *luxAB* kloniert. Anschließend wurde die Lumineszenz der entsprechenden Mutanten gemessen.

Durch die Entfernung von fünf Nukleotiden, was etwa einer halben helikalen Windung entspricht, sollte die Interaktion von einander vormals in der Schleife zugewandten Interaktionspartner erschwert werden. Eine Deletion von 10 Nukleotiden, also die Entfernung einer ganzen helikalen Windung, sollte hingegen die Position der Interaktionspartner zueinander nicht verändern. Entsprechend zeigten erste Messungen, dass die Promotoraktivität nach der Deletion von 5 Nukleotiden auf 1/5 der Aktivität

reduziert ist. Die Deletion von 10 Nukleotiden hatte hingegen keine Auswirkungen auf die Promotoraktivität.

Tabelle 7: Primer zur Konstruktion von zwei Mutanten mit Deletionen von 5 bzw. 10 Nukleotiden im Promotor des Hydrogenaseoperons. Die Nukleotide, zwischen denen die Deletionen eingefügt wurden, sind unterstrichen. Die Positionen im Genom sind entsprechend des Datenbankeintrags www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html angegeben.

Primer	Sequenz	Position
D51kg	CGAGCTGTTTCTTTCTAAATTCGTTTGTTTC TCAGTTCATCGCTCAGATG	1679108-1679054
D52kg	ATGAACTGAGAAACAAACGAAATTTAGAAA GAAACAGCTCGGTTTTACCTC	1679098-1679044
D101kg	AAAACCGAGCTGTTTCTTTCTCGTTTGTTT CTCAGTTCATCGCTCAGATG	1679108-1679048
D102kg	ATGAACTGAGAAACAAACGAGAAAGAAA CAGCTCGGTTTTACCTCTCTTG	1679108-1679049

4.6 Charakterisierung einer merodiploiden *NtcA*- und *LexA*-Mutante

Um zu untersuchen, ob *NtcA* und/oder *LexA* die Expression der bidirektionalen Hydrogenase in *Synechocystis in vivo* beeinflussen, wurden entsprechende Deletionsmutanten konstruiert. Das Chromosom von *Synechocystis* liegt in den Zellen in mehreren Kopien vor. Es ist nicht möglich *ntcA* und *lexA* aus jeder dieser Kopien zu entfernen, da beide Transkriptionsfaktoren essentiell für das Überleben dieses Organismus sind (Garcia-Dominguez et al. 2000, Domain et al. 2004). Daher wurden merodiploide Mutanten analysiert. Die merodiploide *ntcA*-Mutante wurde im Vorfeld dieser Arbeit durch die Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette in den Leserahmen von *ntcA* konstruiert (C. Schwarz, unveröffentlicht). *LexA* wurde durch die Fusion der stromaufwärts- und stromabwärts gelegenen Regionen des Leserahmens mit einer Gentamycin Resistenzkassette deletiert.

Um zu prüfen, ob *NtcA* und/oder *LexA* die bidirektionale Hydrogenase in *Synechocystis* regulieren, wurde die Hydrogenaseaktivität beider Mutaten gemessen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Gelretardierungsexperimente zeigte die merodiploide *ntcA*-Mutante keinen Phänotyp bezüglich ihrer Hydrogenaseaktivität, während die

Hydrogenaseaktivität der merodiploiden *lexA*-Mutante gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert war. Dies bestätigt, dass LexA die bidirektionale Hydrogenase in *Synechocystis* als Transkriptionsfaktor reguliert (Abb. 30).

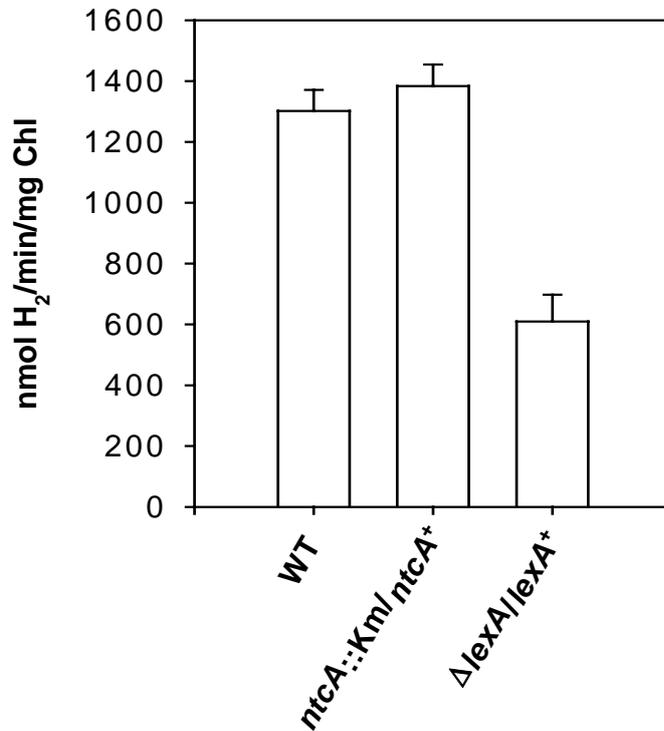


Abbildung 30: Hydrogenaseaktivitäten einer merodiploiden NtcA- und LexA-Mutante.

LexA wurde ebenfalls in der Reporter-genmutante, die das Promotorkonstrukt 11 enthielt (siehe Abb. 17) deletiert, um den Einfluß von LexA auf die Transkription des *hox*-Operons zu untersuchen. Wie erwartet, zeigte die merodiploide LexA-Mutante eine signifikant verminderte Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 31).

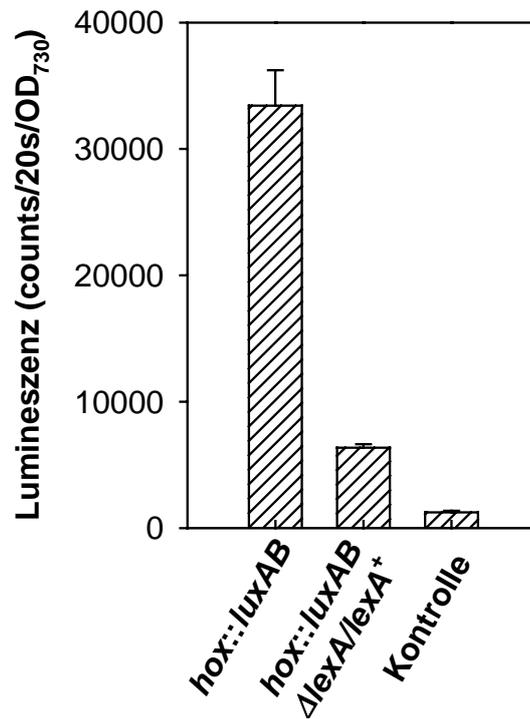


Abbildung 31: Promotoraktivität des Wildtyps und der LexA-Mutante gemessen als Lumineszenz. Als Kontrolle diente ein Wildtyp, der mit einem leeren Reporter-gen-Vektor transformiert wurde.

Anders als in *E.coli*, wo LexA als Repressor Teil des SOS Regulons ist (Walker 1984), reguliert LexA die Hydrogenase in *Synechocytis* demzufolge als Aktivator.

5 Diskussion

5.1 *Hydrogenaseaktivität verschiedener Synechocystis sp. PCC 6803*

Stämme

Synechocystis sp. PCC 6803 wurde 1968 für molekularbiologische Untersuchungen in Oakland, Kalifornien als "Berkley Stamm 6803" aus Süßwasser isoliert. Seitdem wurde der Organismus in verschiedenen Laboren kultiviert. Über die Jahre haben sich, ausgelöst durch voneinander abweichende Kulturbedingungen und durch spontane Mutationen, wie Leserahmenverschiebungen, Deletionen oder Insertionen von Transposons, Unterstämme entwickelt, die sich genetisch und phänotypisch unterscheiden, in der Literatur aber unter ein und demselben Namen *Synechocystis* sp. PCC 6803 beschrieben werden (Ikeuchi und Tabata 2001). Da nur ein einziger Klon von *Synechocystis* vollständig sequenziert wurde (Kaneko et al. 1996), können keine genauen Angaben über Unterschiede verschiedener Laborstämme gemacht werden. Die vier in dieser Arbeit untersuchten *Synechocystis* Stämme zeigen auch bezüglich ihrer Hydrogenaseaktivität Unterschiede (Abb. 8). Die geringe Enzymaktivität des Moskauer Wildtyps scheint auf Abweichungen im Nickelhaushalt zurückzugehen. Während die Hydrogenaseaktivität unseres laboreigenen Wildtyps (Anderson und McIntosh 1991) kaum eine Reaktion auf die Zugabe von Nickel zeigt, läßt sich die Enzymaktivität des Moskauer Wildtyps durch externe Nickelgaben besonders dann steigern, wenn die Magnesiumkonzentration im Medium gering ist (Abb. 10). Dies spricht dafür, dass im Moskauer Wildtyp ein spezifischer Nickeltransporter deletiert sein könnte, da die Zellen bei geringen Magnesiumkonzentrationen im Medium in der Lage sind, Nickel unspezifisch über den Magnesiumtransporter aufzunehmen (Eitinger et al. 2000). Unter physiologischen Bedingungen liegt die Konzentration von Magnesium drei Zehnerpotenzen über der Nickelkonzentration, so dass eine unspezifische Aufnahme von Nickel über Magnesiumtransporter unter natürlichen Bedingungen kompetitiv inhibiert wird. Dass *Synechocystis* einen effektiven Nickeltransporter besitzen muss, zeigt auch das Scheitern des Versuchs, die Hydrogenaseaktivität durch Zugabe von NTA, welches Nickel mit hoher Affinität komplexiert, zu beeinflussen (siehe Abschnitt 4.3.1). Wäre jedoch im Moskauer Wildtyp allein ein fehlender Nickeltransporter für die geringe Hydrogenaseaktivität verantwortlich, so hätte es durch das Einschleusen von Nickel über den Magnesiumtransporter möglich sein müssen, die Hydrogenaseaktivität des Moskauer

Wildtyps bis auf ein Niveau zu steigern, das etwa dem unseres laboreigenen Stammes entspräche. So wurde gezeigt, dass das Ausschalten des spezifischen Nickeltransporters HoxN in *Alcaligenes eutrophus* in einer Mutante resultierte, die nicht mehr in der Lage ist, Wasserstoff als Energiequelle zu nutzen. Wird dem Medium jedoch Nickel zugegeben oder die Magnesiumkonzentration reduziert, kann *Alcaligenes eutrophus* wieder auf Wasserstoff wachsen (Eitinger und Friedrich 1991). Ähnliches wurde auch für *E.coli* gezeigt, wo die Hydrogenaseaktivität nach Deletion des spezifischen Nickeltransporters Nik stark reduziert ist. Durch Zugabe von Nickel oder einer Reduktion der Magnesiumkonzentration kann die Enzymaktivität wieder auf Wildtyp Niveau gebracht werden (Wu et al. 1989). Es ist daher anzunehmen, dass weitere Unterschiede zwischen unserem laboreigenen Wildtyp und dem Moskauer Wildtyp, die eventuell den Nickeltransport, seine Speicherung oder die Integration von Nickel ins aktive Zentrum der Hydrogenase betreffen, bestehen. Auch Unterschiede auf transkriptioneller Ebene können nicht ausgeschlossen werden. Zwar wurde über RT-PCR nachgewiesen, dass das Hydrogenaseoperon und die Gene *hypB1* und *hypB2* transkribiert werden, die Methode lässt jedoch keine quantitativen Aussagen zu.

Es muss davon ausgegangen werden, dass eine Reihe von genetischen und phänotypischen Abweichungen zwischen verschiedenen *Synechocystis* Stämmen noch unentdeckt sind. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten betonen, wie wichtig es ist, auf die untersuchten Stämme zu achten, wenn Ergebnisse verschiedener Gruppen diskutiert werden. Die natürliche Transformierbarkeit und leichte molekularbiologische Handhabung dieses Organismus, welche *Synechocystis* zu einem so attraktiven Untersuchungsmodell gemacht haben, birgt, wie hier gezeigt, gleichzeitig die Gefahr, dass sich verschiedene von einander isolierte Laborstämme stark auseinander entwickeln. Es wirft sich die Frage auf, wann dieser Mikroevolution Rechnung getragen werden muss, indem die verschiedenen Laborstämme unter eigenen Namen untersucht und diskutiert werden sollten.

5.2 Einfluss von Eisen auf die Hydrogenase

Die Hydrogenaseaktivität nimmt mit sinkender Eisenkonzentrationen ab, bei einer Konzentration von $0,22 \mu\text{M Fe}^{3+}$ im Medium ist keine Enzymaktivität mehr messbar (Abb. 12). Cyanobakterien haben eine Reihe von Strategien entwickelt, um sich an Eisenmangelsituationen anzupassen. In ausgedehnten Ozeanregionen, den sogenannten „high nutrient and low chlorophyll“ Gebieten, tritt Eisen als wachstumslimitierender

Faktor auf und bedingt eine geringe Phytoplanktonproduktion (Behrenfeld und Kolber 1999). Cyanobakterien gehören in diesen Gebieten zu den dominierenden Arten (La Roche et al. 1999). Es wurde gezeigt, dass sie die Menge eisenhaltiger Proteine bei Eisenmangel reduzieren (Straus 1994) und teilweise durch funktionell entsprechende eisenfreie Moleküle ersetzen (Sandmann et al. 1990, La Roche et al. 1999). Auch die Menge an eisenhaltigen Komponenten, die in den photosynthetischen Elektronentransport involviert sind, wird unter Eisenmangel reduziert. Dies hat unter anderem zur Folge, dass vermehrt Sauerstoffradikale entstehen, die in den Zellen zu oxidativem Stress führen. Die Wechselbeziehung zwischen Eisenmangel und den Redoxverhältnissen zeigt sich auch in der Expressionsregulation von Genen. In *Synechococcus* wurde gezeigt, dass die Transkription von einer Reihe von Genen, deren Expression bei Eisenmangel steigt auch durch oxidativen Stress aktiviert wird (Yousef et al. 2003). Es wird vermutet, dass redox-sensitive Komponenten des photosynthetischen Elektronentransports eine Vielzahl metabolischer Prozesse unter Eisenmangel regulieren könnten (Michel und Pistorius 2004). Die gesteigerte Promotoraktivität der Hydrogenasegene bei Eisenmangel (Abb. 12) könnte daher entweder durch einen einfachen Rückkopplungs-Mechanismus reguliert sein, der versucht, das fehlende Enzym zu ersetzen, alternativ könnte diese Aktivierung aber auch über die veränderten Redoxverhältnisse in der Zelle gesteuert werden.

5.3 Einfluss von Stickstoff auf die Hydrogenase

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde für die Cyanobakterien *Chroococcidiopsis thermalis* und *Gloeocapsa alpicola* eine gesteigerte Enzymaktivität ihrer bidirektionalen Hydrogenasen unter Stickstoffmangel gezeigt (Almon et al. 1988, Sheremetieva et al. 2002). Dies ließ vermuten, dass NtcA die Transkription der Hydrogenase in Cyanobakterien regulieren könnte. NtcA ist ein in Cyanobakterien hoch konservierter und weitverbreiteter Transkriptionsfaktor, der die Expression sämtlicher Gene, die in den Stickstoffmetabolismus involviert sind, reguliert (Herrero et al. 2001). Cyanobakterien, die in der Lage sind, atmosphärischen Stickstoff mit Hilfe der Nitrogenase zu verwerten, besitzen eine aufnehmende Hydrogenase, die den bei der Stickstoffassimilation als Nebenprodukt anfallenden Wasserstoff aufnimmt. Es konnte gezeigt werden, dass NtcA an die Promotoren der aufnehmenden Hydrogenasen der Cyanobakterien *Gloeotheca* und *Lyngbya* bindet und dass die entsprechenden Gene nur unter Stickstoffmangel transkribiert werden (Oliveira et al. 2004, Leitao et al. 2005).

Die physiologische Bedeutung der in *Synechocystis* untersuchten bidirektionalen Hydrogenase, ist jedoch eine gänzlich andere als die der aufnehmenden Hydrogenasen. Wie bereits erwähnt, spielt sie eine wichtige Rolle als Elektronenventil unter reduzierenden Bedingungen (Appel und Schulz 1998, Appel et al. 2000, Cournac et al. 2004). Über die Redoxverhältnisse der Zelle wäre ein Einfluss der Stickstoffverfügbarkeit auf die Aktivität der bidirektionalen Hydrogenase denkbar. Da bei der Reduktion von Nitrat zu Ammonium 8 Elektronen pro Molekül Ammonium verbraucht werden, könnte auch diese Reaktion den Zellen helfen, überschüssige Reduktionsäquivalente zu verbrauchen. In dem fädigen Cyanobakterium *Anabaena* sp. PCC 7120 wurde beobachtet, dass die Wasserstoffaufnahme bei Nitratzugabe steigt (Houchins und Burris 1981). Damit übereinstimmend wurde für *Synechocystis* gezeigt, dass bei Ausschalten der Nitratreduktase weniger Wasserstoff aufgenommen wird (M. Egert, unveröffentlicht). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Elektronen für die Nitratreduktion von der bidirektionalen Hydrogenase bereit gestellt werden können. Belichtet man dunkeladaptierte Zellen mit Licht, so produzieren diese kurzzeitig Photowasserstoff, um überschüssige Reduktionäquivalente zu verbrauchen und so die Elektronentransportkette der Photosynthese zu entlasten. Sobald die Zellen sich an die Lichtverhältnisse adaptiert haben, wird dieser Wasserstoff wieder aufgenommen. In *Synechocystis* wurde beobachtet, dass Zellen, deren Nitratreduktase blockiert war, mehr Photowasserstoff bildeten (M. Egert, unveröffentlicht). Dies bestätigt die Vernetzung von Stickstoff- und Wasserstoffmetabolismus und die Funktion beider Stoffwechselwege als Elektronenventil unter reduzierenden Bedingungen. Die Messung der Hydrogenaseaktivität unter Verwendung von Methylviologen und Natriumdithionit erlaubt nur Aussagen über die Menge an vorhandenem funktionstüchtigen Enzym. Vergleichende Messungen von Zellen mit gehemmter und ungehemmter Nitratreduktase zeigten keine Differenzen bezüglich ihrer Hydrogenaseaktivität (M. Egert, unveröffentlicht). Damit übereinstimmend, konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Einfluss der angebotenen Stickstoffquelle auf die Hydrogenaseaktivität beobachtet werden. Auch die Promotoraktivität blieb unbeeinflusst. Die Hydrogenase scheint daher unabhängig von der Stickstoffverfügbarkeit exprimiert zu werden. Der Einfluss des Stickstoffangebots auf Wasserstoffaufnahme und Photowasserstoffproduktion liegt demnach weder auf transkriptioneller noch auf translationaler Ebene. Die Menge an Enzym scheint kein limitierender Faktor zu sein. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass die angebotene Stickstoffquelle nur einen indirekten Einfluss auf Wasserstoffaufnahme und Photowasserstoffproduktion hat, indem sie darüber

entscheidet, ob der Zelle im Falle eines Überschusses an Reduktionsäquivalenten mit der Nitratreduktion ein zweites Elektronenventil zur Verfügung steht.

5.4 *Hydrogenaseaktivität der hik7 Mutante*

Die Deletionsmutante *hik7* hat keine Hydrogenaseaktivität. Es wurde gezeigt, dass Hik7 (slI0337) mit dem Regulator Rre29 (slr0081) interagiert und dem Pho-Regulon in *Synechocystis* Phosphatmangel signalisiert (Hirani et al. 2001). Der Regulator bindet an eine konservierte Pho Box, die sich stromaufwärts von Genen befindet, die bei Phosphatmangel induziert werden und in die Aufnahme von Phosphat involviert sind (Suzuki et al. 2004). Entsprechend ist die Expression dieser Gene in der *hik7* Mutante vermindert. Microarray Analysen mit der *hik7* Mutante zeigten außerdem eine im Vergleich zum Wildtyp geringere Expression von *hypA1* (Suzuki et al. 2004). HypA1 ist eines von sieben akzessorischen Proteinen der Hydrogenase und ist in *Synechocystis* in die Insertion von Nickel ins aktive Zentrum des Enzyms involviert (Hoffmann et al. unveröffentlicht). Die Deletion von *hypA1* resultiert in einer Mutante, die keine Hydrogenaseaktivität mehr aufweist (Hoffmann et al. unveröffentlicht).

Es kann daher spekuliert werden, dass die fehlende Hydrogenaseaktivität der *hik7* Mutante auf einer unvollständigen Reifung des Enzyms beruht, die wiederum auf eine verminderte Expression von *hypA1* zurückgeht.

5.5 *Charakterisierung des Promotors der Hydrogenasegene*

Die Transkription der Hydrogenasegene wird von einem Promotor reguliert, der stromaufwärts von *hoxE* liegt und etwa 700 Nukleotide umfaßt. Es wurde kein zusätzlicher Promotor stromaufwärts von *hoxU* gefunden, wie für *Synechococcus* sp. PCC 7942 beschrieben, dessen *hox* Gene in zwei Clustern *hoxEF* und *hoxUYHWhypAB* organisiert sind, die von drei Promotoren, die stromaufwärts von *hoxE*, *hoxU* und *hoxW* liegen, reguliert werden (Boison et al. 2000, Schmitz et al. 2001). Die Transkription in *Synechocystis* ähnelt damit eher der Situation in *Anabaena variabilis*, wo gezeigt wurde, dass alle *hox* Gene (*FUYH*) ein polyzistronisches Transkript bilden (Boison et al. 2000).

Der Transkriptionsstartpunkt befindet sich -168 Nukleotide stromaufwärts des ATGs von *hoxE*. Zehn Nukleotide stromaufwärts des Startpunktes befindet sich die Sequenz TGTAAC und 32 Nukleotide stromaufwärts der Initiationsstelle die Sequenz TTGCTC (Abb. 16). Ob diese Sequenzen als -10 und -35 Box fungieren, bedarf weiterer Untersuchungen. Sequenzvergleiche haben gezeigt, dass cyanobakterielle Promotoren oft ein gut konserviertes -10 Hexamer ähnlich der Konsensussequenz (5'-TATAAT-3') von

σ^{70} Promotoren aus *E. coli* besitzen, während die -35 Box (5'-TTGACA-3') fehlt (Curtis und Martin 1994).

Da Cyanobakterien andere Sigma-Faktoren als Enterobakterien besitzen (Imamura et al. 2003, Asayama et al. 2004) und diese für die Erkennung der Boxen verantwortlich sind, sind weitere Untersuchungen notwendig, um Konsensussequenzen cyanobakterieller Promotoren zu bestimmen.

Promotorkonstrukte zeigten unter Verwendung der Reportergene *luxAB*, dass der Promotor des Hydrogenaseoperons nur funktionstüchtig ist, wenn er sowohl die ersten 107 Nukleotide aus dem untranslatierten Bereich von -97 bis $+10$ relativ zum Translationsstartpunkt als auch die Bindestellen für zwei LexA Proteine weiter stromaufwärts (circa -600 bis -700 bp stromaufwärts des ATGs von *hoxE*) enthält (Abb. 17 und Abb. 18). Der untersuchte Promotor benötigt demnach Sequenzen, die stromaufwärts der mutmaßlichen -35 Box liegen und weicht damit von typischen σ^{70} Promotoren ab. Er ähnelt vielmehr Promotoren des σ^{54} Typs, die durch Proteine aktiviert werden müssen, die weit stromaufwärts der Initiationsstelle binden. Es wäre daher von Interesse herauszufinden, welcher Sigma-Faktor an den Promotor der Hydrogenasegene bindet, da Homologe zu σ^{54} aus *E. coli* in Cyanobakterien fehlen.

Stromaufwärts von der LexA-Bindestelle liegt ein negatives Element, da die Lumineszenz des Promotorfragments, welches 272 Nukleotide weiter stromaufwärts reicht als das 700 Nukleotide umfassende Fragment, signifikant reduziert ist (vergleiche 11 und 2 in Abb. 18).

Negative Elemente stromaufwärts von Promotoren sind in Cyanobakterien wiederholt beschrieben worden (z.B. Li und Golden 1993).

5.5.1 LexA-Bindestellen im *hox*-Promotor

Parallel zu den hier beschriebenen LexA-Bindestellen, wurde eine weitere LexA-Bindestelle im Bereich -196 bp bis -337 bp relativ zum ATG von *hoxE* entdeckt (Oliveira und Lindblad 2005). Eigene Untersuchungen konnten den Bereich der Proteinbindestellen weiter auf die Region -257 bp bis -317 bp relativ zum ATG von *hoxE* eingrenzen (Abb. 26 und Abb. 28). Von Oliveira und Lindblad (2005) wurde vermutet, dass sich zwei Bindestellen -245 bp bis -262 bp und -278 bp bis -291 bp relativ zum ATG befinden (siehe AT-reiche Sequenzen in Abb. 32).

Da alle diese DNA-Abschnitte auch die von Oliveira und Lindblad (2005) vorgeschlagene, weiter stromaufwärtsliegende Sequenz (-278 bp bis -291 bp) umfassen, kann eine Bindung von LexA an diese nicht ausgeschlossen werden. Wegen des Fehlens eines LexA-Konsensusmotifs kann eine Bindung von LexA an diese Sequenz jedoch als unwahrscheinlich betrachtet werden. Die von Oliveira und Lindblad (2005) vermutete Bindung eines Proteins an die weiter stromabwärts gelegene Bindestelle (-245 bp bis -262 bp) konnte durch eigene Untersuchungen nicht bestätigt werden. Oligonukleotide, welche nur diese Sequenz und nicht das weiter stromaufwärts gelegene LexA-Konsensusmotif enthielten, zeigten keine retardierten Banden (siehe Oligonukleotid 15 in Abb. 26). Es wäre jedoch denkbar, dass LexA hier nur bindet, wenn die benachbarte Bindestelle vorhanden und besetzt ist.

5.5.2 Schleifenbildung des *hox*-Promoters

Der *hox*-Promotor verfügt damit über mindestens drei LexA-Bindestellen, die bezogen auf den Transkriptionsstart etwa 500 bp, 450 bp und 130 bp stromaufwärts liegen (Abb. 32). Promotorfragmente, welche die LexA-Bindestelle 130 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts samt der stromabwärts bis zum ATG reichenden Region enthalten, zeigen keine Promotoraktivität (siehe Promotorkonstrukte 12-16 in Abb. 17). Die weiter stromaufwärts liegenden LexA-Bindestellen sind folglich ebenso wie der untranslatierte Bereich essentiell für die Promotoraktivität.

Es kann vermutet werden, dass die zwischen Bindestellen und Transkriptionsstart liegende DNA eine Schleife ausbildet, damit die beiden stromaufwärts bindenden LexA-Proteine das Ablesen der Hydrogenasegene regulieren können. Wenn die Proteine unter Ausbildung einer solchen Schleife mit einem weiteren Transkriptionsfaktor (z.B. dem an Oligonukleotid 13 bindenden LexA) oder der RNA-Polymerase in Wechselwirkung treten sollten, dann wäre es entscheidend, dass sich die Interaktionspartner auf der innen liegenden Seite der Schleife befinden (siehe Abbildungen 29 und 33). Eine DNA-Windung umfasst 10,5 bp. Entfernt man zehn Nukleotide und damit eine ganze helikale Windung aus der Region zwischen beiden Interaktionspartnern, so sollte die Position der beiden Proteine zueinander in der Schleife unverändert bleiben. Werden hingegen nur fünf Nukleotide entfernt, was einer halben Windung entspricht, sollte eines der Proteine außen zu liegen kommen, wodurch eine Interaktion zwischen beiden erschwert würde. Entsprechend hatte eine Deletion von 10 Nukleotiden in einem Promotorfragment, das 700 Nukleotide umfaßt (siehe Promotorfragment 11 in Abb. 17) keine Auswirkung auf die

Promotoraktivität, während eine Deletion von 5 Nukleotiden zu einer Reduktion auf 1/5 der Aktivität führte (siehe 4.5.4). Dies unterstützt die Hypothese, dass der Hydrogenasepromotor unter Ausbildung einer Schleife aktiviert wird. Ähnliches wurde für den Arabinosepromoter in *E. coli* gezeigt, der 280 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts eine Bindestelle für einen Repressor besitzt, welcher die Transkription der entsprechenden Gene unter Ausbildung einer DNA-Scheife reprimiert. Wurden 5 oder ein ungerades Vielfaches von 5 Nukleotiden zwischen Bindestelle und Transkriptionsstart deletiert oder inseriert, war die Repression beeinträchtigt, während eine Insertion von 10 oder einem Vielfachen von 10 Nukleotiden keine Auswirkungen hatte (Dunn et al. 1984).

Wie LexA die Transkription des Hydrogenaseoperons reguliert, muss weiter untersucht werden. Als Repressor blockiert LexA die Transkription, indem es die Bindung der RNA-Polymerase an die entsprechenden Promotoren sterisch behindert (Walker 1984).

Die Transkriptionsregulation durch Aktivatoren erfolgt in der überwiegenden Anzahl der Fälle durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Transkriptionsfaktor und RNA-Polymerase. Die Interaktion kann die Rekrutierung der RNA-Polymerase für den entsprechenden Promotor erleichtern, den RNA-Polymerase-DNA-Komplex stabilisieren oder die Konformationsänderung vom geschlossenen zum offenen Transkriptionskomplex erleichtern (Wagner 2000). Alternativ können Aktivatoren über Protein-Wechselwirkungen weitere Transkriptionsfaktoren rekrutieren, die ihrerseits Kontakt mit der RNA-Polymerase aufnehmen. Einige Transkriptionsaktivatoren wirken, indem sie die Konformation des Promotors ändern und z.B. Krümmungen einfügen und so die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor erleichtern (Lloyd et al. 2001).

Ob eines der drei im Promotorbereich bindenden LexA-Proteine direkt mit der RNA-Polymerase in Wechselwirkung tritt, kann anhand der momentanen Datenlage nicht entschieden werden. Um die Transkriptionsregulation des Hydrogenaseoperons zu verstehen, wäre es hilfreich aufzuklären, wie LexA als Aktivator arbeitet. Es ist wahrscheinlich, dass die im Promotorbereich bindenden LexA-Proteine je nach Position der Bindestelle unterschiedlich auf die Transkription einwirken.

Auch für RegA, einen globalen Transkriptionsfaktor in alpha-Proteobakterien, wurden über DNase-Footprints in verschiedenen Promotoren mehrere (1 bis 6) Bindestellen gefunden (Elsen et al. 2004). In einigen Promotoren bindet RegA im Bereich -20 bis -80 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes, was eine direkte Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase erlauben sollte. In anderen Promotoren finden sich die Bindestellen

jedoch ausschließlich im Bereich –300 bis –890 bp stromaufwärts des Transkriptionstarts. Die Mechanismen, welche der Transkriptionsregulation durch RegA zugrunde liegen, scheinen daher mannigfaltig zu sein.

Für die Aktivierung des Hydrogenasepromoters durch LexA wird die Ausbildung einer DNA-Schleife postuliert, wie in Abbildung 33 dargestellt.

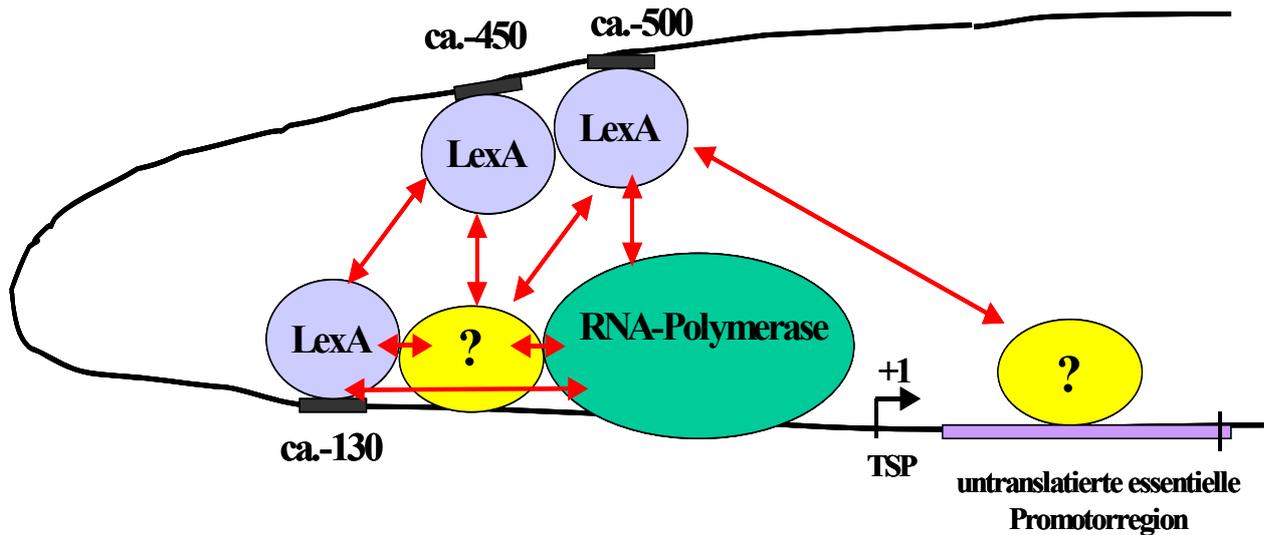


Abbildung 33: Hypothetisches Modell zur Regulation des Hydrogenasepromoters durch LexA. Die Positionen der LexA-Bindestellen sind relativ zum Transkriptionsstart (TSP) angegeben. Die roten Pfeile zeigen mögliche Interaktionen zwischen LexA, der RNA-Polymerase und eventuell weiteren Transkriptionsfaktoren (gelb).

Die Schleifenbildung könnte durch die Bindung von LexA an das Konsensusmotiv 130 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts stabilisiert werden. Die weiter stromaufwärts bindenden LexA-Proteine könnten durch die Schleifenbildung entweder selber in Kontakt zur RNA-Polymerase treten oder die Bindung des weiter stromabwärts (-130 bp relativ zum Transkriptionsstart) bindenden LexA-Proteins unterstützen. Dieses könnte seinerseits direkt mit der RNA-Polymerase in Wechselwirkung treten. Alternativ könnte das 130 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes bindende LexA weitere Transkriptionsfaktoren rekrutieren und über diese das Ablesen der Hydrogenasegene beeinflussen. So wurde in *E. coli* gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor CRP, der in einer Reihe von Promotoren direkten Kontakt zur RNA-Polymerase aufnimmt (z.B. Scott et al. 1995) im Falle des *melAB* Promotors mit einem weiteren Faktor MelR interagiert und dessen Bindung an den Promotor unterstützt. Erst MelR interagiert seinerseits mit der

RNA-Polymerase (Wade et al. 2001). Darüber hinaus wäre es denkbar, dass die weiter stromaufwärts bindenden LexA-Proteine über die Schleifenbildung mit einem zusätzlichen Transkriptionsfaktor, der im untranslatierten Bereich bindet, interagieren. Die optimale Distanz zwischen zwei Punkten auf einem DNA-Molekül, um über eine Schleifenbildung in Wechselwirkung zu treten ist etwa 3,6 mal die Persistenzlänge von 150 Basenpaaren, was etwa 500 Basenpaare ergibt (Wagner 2000) und damit mit der Distanz zwischen den LexA-Bindestellen und der Region um den Transkriptionsstart übereinstimmt.

Die Ausbildung einer Schleife im Promotorbereich mit mehreren Bindestellen für ein und das selbe Protein wurde auch für die Repression der *lac*-Gene in *E. coli* gezeigt (Oehler et al. 1990). Es wurden drei Bindestellen für den Repressor LacI gefunden. Neben einer Bindestelle nahe des Transkriptionsstarts befinden sich zwei weitere Motive 92 bp stromaufwärts und 401 bp stromabwärts. Die Deletion einer dieser zusätzlichen Motive hat kaum einen Einfluss auf die Repression der *lac*-Gene. Werden jedoch beide Bindestellen deletiert, verringert sich das Repressionsniveau um den Faktor 100. Es wurde gezeigt, dass dieser Effekt darauf zurück zu führen ist, dass der Repressor unter Ausbildung einer DNA-Schleife gleichzeitig an die Bindestelle nahe des Transkriptionsstarts und eine der Hilfsbindestellen bindet (Oehler et al. 1990). Der Promotoraktivierung der Hydrogenasegene durch die weiter stromaufwärts bindenden LexA-Proteine könnte ein ähnlicher Effekt zugrunde liegen. Promotoren, die mehrere Bindestellen für ein und denselben Transkriptionsfaktor besitzen, erlauben eine kontinuierlichere Transkription der entsprechenden Gene (Vilar und Saiz 2005). Dies liegt daran, dass der limitierende Faktor für die Aktivierung eines Promotors durch einen Transkriptionsfaktor die Zeit ist, die dieser benötigt, die entsprechenden Bindestellen zu finden und zu binden. Finden sich jedoch zwei Bindestellen im Promotor, die über eine Schleife so dicht beieinander liegen, dass der Transkriptionsfaktor an beide gleichzeitig bindet, so bleibt dieser auch dann, wenn er sich von einer Bindestelle löst, in der Nähe der freien Bindestelle. Die Zeit, welche die freie Bindestelle benötigt, um den Transkriptionsfaktor erneut zu binden, solange dieser noch mit der zweiten Bindestelle verbunden ist, ist viel kürzer als die Zeit, die ein in Lösung befindlicher Transkriptionsfaktor benötigen würde, um eine einzelne Bindestelle im Promotor zu finden (Vilar und Leibler 2003). Dies resultiert in einer kontinuierlichen Transkription der entsprechenden Gene. Für ihre Funktion als Elektronenventil wäre eine kontinuierliche Transkription der Hydrogenasegene von Vorteil, weil Zellen, die durch plötzliche Verwirbelungen der Wassersäule und dem daraus resultierenden Lichtstress in den Zellen, innerhalb von Millisekunden auf die veränderten Redoxbedingungen reagieren

müssen. Eine Regulation auf transkriptioneller Ebene wäre unter diesen Bedingungen zu langsam.

5.5.3 *Der untranslatierte Bereich des hox-Promotors*

Der untranslatierte Bereich des Hydrogenasepromotors (-97 bp bis +10 bp relativ zum ATG von *hoxE*) allein, bildet keine DNA-Protein-Komplexe, wenn er im Gelretardierungsexperiment mit Proteinextrakt inkubiert wird. Es wäre möglich, dass Proteine nur an diesen Bereich binden, wenn die LexA-Bindestellen vorhanden und besetzt sind. Alternativ könnte es sein, dass diese Region ihre funktionellen Merkmale über die Nukleotidsequenz erhält.

Regulatorische Funktionen von untranslatierten Bereichen aus Promotoren sind in Cyanobakterien wiederholt beschrieben worden. Sie können einen negativen Effekt auf die Genexpression haben, indem sie die mRNA unter ausgesuchten Bedingungen destabilisieren (Agrawal et al. 2001) oder indem sie Proteine binden, die als Repressoren wirken (Mazouni et al. 1998, Figge et al. 2001). Ein positiver Einfluss auf die Promotoraktivität wurde für die untranslatierten Bereiche der Gene *psbAII*, *psbAIII* und *psbDII* aus *Synechococcus* 7942 beschrieben, die alle das gleiche Protein binden (Bustos and Golden 1991, Li et al. 1993, 1995, Nair et al. 2000). Auch der untranslatierte Bereich des *gap2* Gens in *Synechocystis*, der ein Motif enthält, von dem angenommen wird, dass es einen Transkriptionsfaktor bindet, steigert die Aktivität des entsprechenden Promotors (Figge et al. 2000). Dies ist erstaunlich, da Aktivatoren in der Regel stromaufwärts der RNA-Polymerase-Bindestelle binden, während die stromabwärts gelegenen Bindestellen meist Repressoren binden. Die Repressoren können durch Bindung an stromabwärtsgelegene Regionen die Bindung der RNA-Polymerase an den entsprechenden Promotor oder den Transkriptionsprozess sterisch behindern. Es wurde darüber hinaus beobachtet, dass Aktivator-Bindestellen, die in die stromabwärts gelegenen Regionen verlegt wurden, weiterhin den gleichen Transkriptionsfaktor binden, dass dieser aber an dieser Stelle als Repressor wirkt (Wagner 2000). Die genaue Wirkungsweise von Aktivatoren, die in untranslatierten Bereichen stromabwärts des Transkriptionsstarts binden ist bis jetzt nicht bekannt.

5.5.4 *NtcA-Konsensusmotive im hox-Promotor*

Die NtcA Bindestellen, die auf den Oligonukleotiden, welche LexA binden, gefunden wurden (Abb. 21), scheinen kein NtcA zu binden, da sich keine DNA-Protein-Komplexe mit überexprimiertem NtcA bildeten (Abb. 23). Auch die Zugabe von verschiedenen Konzentrationen (1-8 mM) von 2-Oxoglutarat, von dem bekannt ist, dass es die Affinität von NtcA für mehrere Promotoren erhöht (Vazquez-Bermudez et al. 2002, Tanigawa et al. 2002, Vazquez-Bermudez et al. 2003), führte nicht zu retardierten Banden.

Wenn NtcA nur in Kombination mit LexA in der Lage wäre, an den untersuchten Promotorbereich zu binden, hätte ein DNA-Protein-Superkomplex im Gelretardierungsexperiment, in welches NtcA gemeinsam mit LexA eingesetzt wurde, sichtbar werden müssen. Dies war nicht der Fall (Abb. 25). Darüber hinaus war es nicht möglich, die retardierte Bande, die sich durch Zugabe von Proteinextrakt aus dem *Synechocystis* Wildtyp zeigte, mit einem Überschuss an unmarkiertem Oligonuklotid, welches die NtcA-Bindestelle des *glnA* Promotors enthielt, zu verdrängen (Abb. 24). Da die Bindeaffinität dieses Promotors für NtcA sehr hoch ist (K_d : $25 \times 10^{-9} \text{M}$) (Reyes et al. 1997), kann davon ausgegangen werden, dass NtcA nicht an die untersuchte Region des *hox*- Promotors bindet.

Damit übereinstimmend ist die Hydrogenaseaktivität der merodiploide NtcA-Mutante nicht verändert (Abb. 30).

5.6 *Funktion von LexA*

Es wurde gezeigt, dass LexA an den untersuchten Promotor bindet und die Hydrogenaseaktivität in *Synechocystis* reguliert. In *E.coli* ist LexA Teil des SOS Regulons (Walker 1984). Das SOS Regulon umfasst in *E.coli* 30 Gene, darunter *lexA* und *recA* (Fernandez de Henestrosa et al. 2000). LexA hat in diesem System die Funktion eines Repressors. Als Reaktion auf DNA-Schäden, ausgelöst durch UV-Licht oder andere Umwelteinflüsse, bindet RecA an einzelsträngige DNA und sorgt dafür, dass sich der Repressor LexA in einem autoproteolytischen Prozess selbst aus den von ihm besetzten Promotoren löst. Dies resultiert in der Expression eines ganzen Netzwerkes von Genen, das in die Reparatur von DNA involviert ist.

Es wurde kürzlich vermutet, dass das *E.coli* SOS Modell für Cyanobakterien nicht zutreffen könnte (Domain et al. 2004). Auch wenn *recA* and *lexA* ähnliche Gene in mehreren Cyanobakterien identifiziert wurden (Geoghegan et al. 1987, Murphy et al. 1987, Owtrim and Coleman 1987), könnte es sein, dass LexA nicht die gleichen Gene reguliert

wie in *E.coli*. Mazon et al. (2004) charakterisierten die Konsensussequenz für LexA im Cyanobakterium *Anabaena* sp. PCC 7120. Eine Suche nach LexA Boxen ließ erkennen, dass LexA nur einige Gene, die in *E.coli* Teil des SOS Regulons sind, reguliert. In *Synechocystis* wurde nur im Promotor von LexA selbst eine *Anabaena*-ähnliche LexA-Bindestelle gefunden (Mazon et al. 2004). Sequenzvergleiche zwischen der cyanobakteriellen LexA Konsensussequenz, wie sie von Mazon et al. (2004) vorgeschlagen wurde und den drei in dieser Arbeit stromaufwärts von *hoxE* identifizierten Bindestellen, zeigte eine vollkommene Übereinstimmung mit der weiter stromaufwärts liegenden Bindestelle, eine unvollkommene Übereinstimmung mit drei abweichenden Nukleotiden von insgesamt zehn, für die zweite und vier abweichenden Nukleotiden für die dritte Bindestelle (Abb. 21 und Abb. 27).

Microarray Analysen mit einer merodiploiden LexA-Mutante von *Synechocystis* ergaben, dass LexA in diesem Organismus nicht die typischen DNA-Reparaturgene reguliert, sondern eher für Gene, die in den Kohlenstoffmetabolismus involviert sind, wichtig sein könnte (Domain et al. 2004). In dieser Arbeit zeigte sich, dass LexA einen positiven Effekt auf die Promotoraktivität des *hox*-Operons hat und dass damit übereinstimmend die Hydrogenaseaktivität in einer merodiploiden LexA-Mutante reduziert ist (Abb. 29). LexA arbeitet demnach nicht als Repressor sondern als Transkriptionsaktivator.

Vergleiche von LexA Proteinsequenzen von verschiedenen Cyanobakterien zeigen in *Synechocystis* auffällige Unterschiede bezüglich der Reste, die in den autoproteolytischen Prozess involviert sind (Mazon et al. 2004). Da die Autoproteolyse für LexA insbesondere in seiner Funktion als Repressor von Bedeutung ist, könnte man spekulieren, ob diese Fähigkeit in *Synechocystis* teilweise oder vollständig verloren gegangen ist. Interessanterweise zeigte sich in Microarray Analysen von Domain et al. (2004), dass die Expression von Genen, welche die drei Untereinheiten NdhC, K und J aus dem Komplex I kodieren, in einer merodiploiden *lexA*-Mutante geringer exprimiert werden als im Wildtyp. Sollte es sich als richtig herausstellen, dass die bidirektionale Hydrogenase tatsächlich an den Komplex I gebunden ist (siehe 1.7), wäre eine aufeinander abgestimmte Regulation beider Einheiten vorteilhaft.

6 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Struktur des Hydrogenasepromotors haben eine Reihe von Fragen aufgeworfen.

Zunächst wäre es interessant zu prüfen, ob LexA für die Schleifenbildung des Promotors verantwortlich ist und ob weitere Proteine, wie z.B. das DNA-krümmende Protein HU, involviert sind. Desweiteren wäre es möglich, dass die Schleifenbildung durch die Sequenz des Promotors bedingt ist und nicht durch Proteine unterstützt werden muss (Coutier und Widom 2004). Dies sollte elektronenmikroskopisch aufzuklären sein, indem entsprechende Promotorfragmente mit oder ohne Zugabe von Protein betrachtet werden.

Desweiteren wäre es interessant zu untersuchen, welcher Sigma-Faktor den Promotor der *hox*-Gene erkennt. Bis jetzt ist in Prokaryoten nur von σ^{54} -Promotoren bekannt, dass sie Sequenzen benötigen, die weit stromaufwärts des Transkriptionsstarts liegen. Da ein Homolog zum σ^{54} -Faktor aus *E. coli* in Cyanobakterien jedoch fehlt, wäre es interessant über die Untersuchung von σ -Faktor-Mutanten zu erfahren, welcher σ -Faktor in die Transkription der *hox*-Gene involviert ist.

Da den verschiedenen, in Cyanobakterien vorhandenen Sigma-Faktoren bis jetzt keine Konsensusmotive im Promotor zugewiesen werden konnten, wäre eine genauere Analyse der vermuteten -10 und -35 Motive über Punktmutationen interessant.

Die Histidinkinase mutanten *hik3* und *hik27* zeigten eine verminderte Hydrogenaseaktivität. Eine genauere Untersuchung beider Mutanten könnte eventuell Hinweise auf Signaltransduktionswege liefern, welche in die Regulation der Hydrogenase in *Synechocystis* involviert sind.

Auch Untersuchungen der untranslatierten Region des Hydrogenasepromotors wären lohnenswert, da sich in Cyanobakterien wiederholt gezeigt hat, dass diese Bereiche einen positiven Einfluss auf die Transkription haben können, ohne dass der zugrunde liegende Mechanismus verstanden wurde.

Diese Arbeit hat bestätigt, dass LexA in Cyanobakterien eine andere Funktion haben kann als in anderen Prokaryoten. Desweiteren wurde LexA das erste Mal als Aktivator beschrieben. Untersuchungen, ob LexA mit anderen Transkriptionsfaktoren Komplexe bildet oder ob es an Untereinheiten der RNA-Polymerase bindet, wären hilfreich, um aufzuklären, wie LexA als Aktivator arbeitet.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der bidirektionalen NiFe-Hydrogenase in *Synechocystis* sp. PCC 6803 untersucht. Einflüsse von externen Signalen auf Enzym- und Promotoraktivität wurden *in vivo* gemessen. Um nach Signaltransduktionswegen zu suchen, welche in die Regulation der Hydrogenase involviert sein könnten, wurden mehrere Mutanten mit deletierten Histidinkinasen untersucht.

Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf der Aufklärung von transkriptionellen Vorgängen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der erste Promotor einer bidirektionalen Hydrogenase in einem Cyanobakterium charakterisiert und der erste Transkriptionsfaktor, der die Expression einer bidirektionalen Hydrogenase in einem Cyanobakterium reguliert, identifiziert.

Vier verschiedene *Synechocystis* sp. PCC 6803 Stämme wurden hinsichtlich ihrer Hydrogenaseaktivität untersucht. Die Hydrogenaseaktivität des Moskauer Wildtyps betrug etwa 1/28 der Enzymaktivität des laborreinen Stammes. Physiologische Untersuchungen wiesen darauf hin, dass Unterschiede im Nickelhaushalt und hier insbesondere im spezifischen Transport von Nickel für die abweichenden Phänotypen verantwortlich sein könnten.

Um den Einfluss von abiotischen Faktoren auf die Hydrogenase zu untersuchen, wurden Kulturen unter verschiedenen Nickel-, Eisen- und Stickstoffbedingungen angezogen. Es wurde jeweils die Enzym- und Promotoraktivität der Hydrogenase untersucht. Der eingestellte Nickelmangel hatte keine Auswirkungen auf die Hydrogenase. Unter Eisenmangel nahm die Enzymaktivität ab. Die Promotoraktivität verhielt sich gegenläufig, was durch einen einfachen Rückkopplungsmechanismus oder der unter Eisenmangel veränderten Redoxsituation in den Zellen erklärt werden könnte. Die angebotene Stickstoffquelle hatte weder einen Einfluss auf die Enzym- noch auf die Promotoraktivität der Hydrogenase.

Um Hinweise auf Signaltransduktionswege zu erhalten, wurde die Hydrogenaseaktivität von insgesamt sieben Histidinkinase-Mutanten (*hik1*, *hik3*, *hik7*, *hik14*, *hik22*, *hik27*, *hik30*) aus dem Labor von Herrn Prof. Murata (Japan) untersucht. Die Deletion von *hik7* resultierte in einer Mutante ohne Hydrogenaseaktivität. Vermutlich beruht dieser Phänotyp auf einer unvollständigen Reifung des Enzyms, da die Mutante eine verminderte

Expression von *hypA1* aufweist (Suzuki et al. 2004). HypA1 ist ein akzessorisches Protein, das in die Insertion von Nickel ins aktive Zentrum der Hydrogenase involviert ist (Hoffmann et al. unveröffentlicht).

Unter Verwendung eines Reportersystems mit den Reportergenen *luxAB* wurde gezeigt, dass die fünf Hydrogenasegene *hoxEFUYH* in *Synechocystis* von einem Promotor reguliert werden, der sich stromaufwärts von *hoxE* befindet. Der Transkriptionsstartpunkt wurde über 5' RACE auf -168 bp stromaufwärts des ATGs von *hoxE* lokalisiert. Es stellte sich heraus, dass zwei Promotorregionen essentiell für die Promotoraktivität sind. Eine Region befindet sich im untranslatierten Bereich -97 bp bis +10 bp relativ zum ATG von *hoxE*, die andere Region umfasst 121 Nukleotide und befindet sich -569 bp bis -690 bp stromaufwärts des Translationsstartpunktes. Der Promotor umfasst damit etwa 700 Nukleotide und benötigt Sequenzen die weit stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes liegen. Dies ist ungewöhnlich für Cyanobakterien, die ein kompaktes Genom besitzen.

In Gelretardierungsexperimenten zeigte sich, dass die weiter stromaufwärts gelegene Region ein Protein bindet. Obwohl in der Sequenz zwei unvollkommene NtcA-Bindestellen gefunden wurden, bildete dieses Protein keinen Komplex mit der entsprechenden DNA. Damit übereinstimmend zeigte eine merodiploide *ntcA*-Mutante eine normale Hydrogenaseaktivität.

Das in der Region bindende Protein wurde isoliert, zur massenspektrometrischen Analyse gegeben und als LexA identifiziert. Der gesamte Leserahmen von LexA und seine DNA-Bindedomäne wurden in *E.coli* überexprimiert. Beide bildeten Komplexe mit zwei DNA-Fragmenten aus der untersuchten Region. Auf den entsprechenden DNA-Abschnitten, wurden cyanobakterielle LexA-Konsensusmotive gefunden. Parallel wurde eine weitere LexA-bindende Region im Bereich -196 bp bis -337 bp relativ zum ATG von *hoxE* entdeckt (Oliveira und Lindblad 2005). Die Bindung eines Proteins in dieser Region konnte durch eigene Untersuchungen bestätigt und der bindende Bereich weiter auf die Region -257 bp bis -317 bp relativ zum ATG von *hoxE* eingengt werden.

Der Promotor besitzt damit mindestens drei LexA-Bindestellen, die sich etwa 130 bp, 450 bp und 500 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts befinden.

Es wurde vermutet, dass die beiden stromaufwärts bindenden LexA-Proteine unter Ausbildung einer DNA-Schleife mit weiteren Faktoren und/oder der RNA-Polymerase in Wechselwirkung treten könnten. Da es entscheidend wäre, dass sich die Interaktionspartner auf der innenliegenden Seite der Schleife befinden, wurde in zwei 700 Nukleotiden

umfassenden Promotorfragmenten einmal eine halbe helikale DNA-Windung (5 Nukleotide) und einmal eine ganze helikale DNA-Windung (10 Nukleotide) deletiert. Wie erwartet war die Promotoraktivität nach Deletion von 5 Nukleotiden reduziert während die Entfernung von 10 Nukleotiden keine Auswirkung hatte.

Es wurde ein hypothetisches Modell entwickelt, nachdem die weiter stromaufwärts bindenden LexA-Proteine über eine Schleifenbildung der DNA entweder mit dem weiter stromabwärts bindenden LexA-Protein, der RNA-Polymerase oder einem Transkriptionsfaktor, der eventuell in der untranslatierten Region binden könnte, interagieren.

Die Hydrogenaseaktivität einer merodiploiden *lexA*-Mutante war reduziert. Entsprechend war auch die Promotoraktivität des *hox*-Operons in einem *lexA*-reduzierten Hintergrund verringert.

LexA ist in *E.coli* ein Repressor, der als Reaktion auf DNA-Schäden die Transkription einer Reihe von Genen freigibt, welche in die Reparatur von DNA involviert sind (Walker 1984). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass LexA in Cyanobakterien eine andere Funktion haben könnte (Domain et al. 2004). Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bestätigen diesen Verdacht, zumal zum ersten Mal gezeigt wurde, dass LexA nicht nur als Repressor sondern auch als Transkriptionsaktivator wirken kann.

8 Summary

In this thesis the regulation of the bidirectional NiFe-hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 was investigated. Influences of external signals on enzyme and promoter activity were measured *in vivo*. In order to search for signaltransduction pathways involved in the regulation of the bidirectional NiFe-hydrogenase several mutants with deleted histidine kinases were studied. The point of main effort lay on investigations on the transcriptional level. In the course of this thesis the first promotor of a bidirectional hydrogenase in a cyanobacterium was characterized and the first transcriptionfactor involved in the expression of a bidirectional hydrogenase in a cyanobacterium was identified.

Four different *Synechocystis* sp. PCC 6803 substrains were investigated concerning their hydrogenase activity. One substrain showed a severely reduced enzyme activity of 1/28 compared to the substrain used in our lab. Physiological studies revealed that differences in the nickel metabolism and here especially in the specific transport of nickel could be responsible for the differing phenotypes.

In order to study the influence of abiotic factors on the regulation of the bidirectional NiFe-hydrogenase, cultures were grown under different nickel, iron, and nitrogen conditions. In each case enzyme and promoter activity were measured. The given nickel conditions had no influence on the hydrogenase. Under iron starvation the enzyme activity was reduced while the promoter activity increased. The enhanced promotor activity could be either explained by a simple feedback mechanism or be provoked by the redox stress in the cell caused under iron deficiency. The offered nitrogen source had no influence on either enzyme or promoter activity of the hydrogenase.

In order to get indications on signaltransduction pathways involved in the regulation of the hydrogenase seven histidine kinase mutants (*hik1*, *hik3*, *hik7*, *hik14*, *hik22*, *hik27*, *hik30*) from the lab of Prof. Murata (Japan) were studied. The deletion of *hik7* resulted in a mutant without hydrogenase activity. Presumably this phenotype is due to an improper maturation of the enzyme, as the mutant showed a reduced expression of *hypA1* (Suzuki et al. 2004). HypA1 is an accessory protein involved in the insertion of nickel to the active site of the hydrogenase (Hoffmann et al. unpublished).

Under application of the promoter probe vector pILA, which carries the reporter genes *luxAB*, it was shown that the five hydrogenase genes *hoxEFUYH* in *Synechocystis* are regulated by a promoter, which is situated upstream of *hoxE*. The transcription start point was located by 5'RACE at -168 bp relative to the ATG of *hoxE*.

Several promoter probe vectors carrying different promoter fragments revealed two regions to be essential for the promoter activity. One is situated in the untranslated 5' leader region - 97 bp to + 10 bp relative to the translational start of *hoxE* and the other covers 121 nucleotides and is found -569 to -690 nucleotides upstream of the ATG of *hoxE*.

The promoter thus covers approximately 700 nucleotides and needs sequences far upstream from the transcription start point. This is unusual for cyanobacteria who possess a compact genome. It was shown in band-shift-assays that the essential promoter region situated further upstream binds a protein. Eventhough two imperfect NtcA-binding motifs were found in the respective region, this protein did not bind to the DNA. In agreement with this finding a merodiploid *ntcA*-mutant showed a normal hydrogenase activity.

The protein binding to the examined region was isolated, given to mass spectrometry and identified as LexA. The entire reading frame of *lexA* as well as its binding domain were overexpressed in *E. coli*. Both succeeded to form complexes with two DNA fragments from the examined region. Cyanobacterial LexA binding motifs were found on both sequences.

Parallel with these findings an additional LexA-binding region -196 bp to -337 bp relative to the ATG of *hoxE* was discovered (Oliveira and Lindblad 2005). The binding of a protein to the respective region could be confirmed by own investigations and the binding region could be further narrowed down to the region -257 bp to -317 bp relative to the ATG of *hoxE*.

The promoter thus harbours at least three LexA binding sites, that are situated approximately 130 bp, 450 bp, and 500 bp upstream of the transcription start point.

It was supposed that the DNA might form a loop in order to allow the LexA-proteins bound further upstream to interact with additional transcription factors and/or the RNA polymerase. As it would be essential that both interacting proteins bind on the inside of the loop, 5 nucleotides, equivalent to half a helical turn and 10 nucleotides, equivalent to a whole helical turn were deleted from two promoterfragments. As expected the deletion of 5 nucleotides resulted in a decreased promoter activity whereas the deletion of 10 nucleotides had no effect, thus confirming that the promoter might be activated by forming a loop.

The hydrogenase activity of a merodiploid *lexA* mutant was decreased. In agreement with this finding the promoter activity was lowered in a *lexA* reduced background.

In *E. coli* LexA is a repressor regulating the transcription of genes involved in DNA repair (Walker 1984). The hypothesis was put forward, that LexA might have a different function in cyanobacteria (Domain et al. 2004). The results presented in this thesis support this idea, the more so as it was demonstrated for the first time that LexA might not only function as repressor but as transcription activator.

9 Literatur

- Agrawal, G.K., Kato, H., Asayama M., and Shirai, M. (2001) An AU-box motif upstream of the SD sequence of light-dependent *psbA* transcripts confers mRNA instability in darkness in cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* **29**: 1835-1843
- Almon, H., and Böger, P. (1988) Hydrogen metabolism of the unicellular cyanobacterium *Chroococidiopsis thermalis* ATCC 29380. *FEMS Microbiol. Lett.* **49**: 445-449
- Anderson, S.L., and McIntosh, L. (1991) Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: a blue-light-requiring process. *J. Bacteriol.* **173**: 2761-67
- Appel, J., and Schulz, R. (1996) Sequence analysis of an operon of NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NADP(H)-dehydrogenase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta* **1298**: 141-147
- Appel, J., and Schulz, R. (1998) Hydrogen metabolism in organisms with oxygenic photosynthesis: hydrogenase as important regulatory devices for a proper redox poisoning? *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **47**: 1-11
- Appel, J., Phunpruch, S., and Schulz, R. (2000) The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Arch. Microbiol.* **173**: 333-338
- Asayama, M., Imamura, S., Yoshihara, S., Miyazaki, A., Yoshida, N., Sazuka, T., Kaneko, T., Ohara, O., Tabata, S., Osanai, T., Tanaka, K., Takahashi, H., and Shirai, M. (2004) SigC, the group 2 sigma factor of RNA polymerase, contributes to the late-stage gene expression and nitrogen promoter recognition in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**: 477-87
- Behrenfeld, M.J., and Kolber, Z.S. (1999) Widespread iron limitation of phytoplankton in the South Pacific Ocean. *Science* **283**: 840-843
- Bensing, B.A., Meyer, B.J., and Dunny, G.M. (1996) Sensitive detection of bacterial transcription initiation sites and differentiation from RNA processing sites in the pheromone-induced plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 7794-7799

- Bergsland, K.-J., and Haselkorn, R. (1991) Evolutionary relationships among eubacteria, cyanobacteria, and chloroplasts: evidence from the *rpoC1* gene of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **173**: 3446-3455
- Blokesch, M., Paschos, A., Theodoratou, E., Bauer, A., Hube, M., Huth, S., and Böck, A. (2002) Metal insertion into NiFe-hydrogenases. *Biochem Soc Trans* **30**: 674-680
- Blouin, K., Walker, S.G., Smit, J., and Turner, R.F.B. (1996) Characterization of in vivo reporter systems for gene expression and biosensor applications based on *luxAB* luciferase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2013-2021
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99
- Bradford, M.M. (1979) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Brahamsha, B., and Haselkorn, R. (1992) Identification of multiple RNA polymerase sigma factor homologs in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120: cloning, expression, and inactivation of the *sigB* and *sigC* genes. *J Bacteriol.* **22**: 7273-7282
- Boison, G., Schmitz, O., Schmitz, B., and Bothe, H. (1998) Unusual gene arrangement of the bidirectional hydrogenase and functional analysis of ist diaphorase subunit HoxU in respiration of the unicellular *Anacystis nidulans*. *Curr. Microbiol.* **36**: 253-258
- Boison, G., Bothe, H., and Schmitz, O. (2000) Transcriptional analysis of hydrogenase genes in the cyanobacteria *Anacystis nidulans* and *Anabaena variabilis* monitored by RT-PCR. *Curr. Microbiol.* **40**: 315-321
- Boxma, B., de Graaf, R.M., van der Staay, G.W.M., van Alen, T.A., Ricard, G., Gabaldon, T., van Hoek, A.H.A.M., Moon-van der Staay, S.J., Koopman, W.J.H., van Hellemond, J.J., Tielens, A.G.M., Friedrich, T., Veenhuis, M., Huynen, M.A., and Hackstein, J.H.P. (2005) An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature* **434**: 74-79
- Buhrke, T., Lenz, O., Porthun, A., and Friedrich, B. (2004) The H₂-sensing complex of *Ralstonia eutropha*: interaction between a regulatory NiFe-hydrogenase and a histidine protein kinase. *Mol Microbiol* **51**: 1677-1689
- Bustos, S.A., and Golden, S.S. (1991) Expression of the *psbDII* gene in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 requires sequences downstream of the transcription start site. *J. Bacteriol.* **173**: 7525-7533

- Buurman, G., Shima, S., and Thauer, R.K. (2000) The metal-free hydrogenase from methanogenic archaea: evidence for a bound cofactor. *FEBS Lett.* **485**: 200-204
- Chenchik, A., Moqadam, F. and Siebert, P. D. (1996) A new method for full-length cDNA cloning by PCR. In: A laboratory guide to RNA: isolation, analysis and synthesis (Krieg, P.A., Ed.) pp 273-321. Wiley-Liss, New York.
- Cloutier, T.E., and Widom J. (2004) Spontaneous sharp bending of double-stranded DNA. *Mol. Cell* **14**: 355-362
- Cobley, J.G., Clark, A.C., Weerasurya, S., Queseda, F.A., Xiao, J.Y., Bandrapali, N., D'Silva, I., Thounaojam, M., Oda, J.F., Sumiyoshi T., and Chu, M.H. (2002) CpeR is an activator required for expression of the phycoerythrin operon (*cpeBA*) in the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* and is encoded in the phycoerythrin linker-polypeptide operon (*cpeCDESTR*). *Mol. Microbiol.* **44**: 1517-1531
- Cournac, L., Guedeney, G., Gilles, P., and Vignais, P.M. (2004) Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803 deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex. *J. Bacteriol.* **186**: 1737-1745
- Curtis, S.E., and Martin, J.A. (1994) The transcription apparatus and the regulation of transcription initiation. In Molecular Biology of Cyanobacteria. Bryant, D.A. (ed.), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 613-639
- Dischert, W., Vignais, P.M., and Colbeau, A. (1999) The synthesis of *Rhodobacter capsulatus* HupSL hydrogenase is regulated by the two-component HupT/HupR system. *Mol Microbiol.* **34**: 995-1006.
- 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. *Mol. Microbiol.* **53**: 65-80
- Dunn, T.M., Hahn, S., Ogden, S., and Schleif, R.F. (1984) An operator at -280 base pairs that is required for repression of *araBAD* operon promoter: Addition of DNA helical turns between the operator and promoter cyclically hinders repression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 5017-5020
- Eitinger, T., and Friedrich, B. (1991) Cloning, nucleotide sequence, and heterologous expression of a high-affinity nickel transporter gene from *Alcaligenes eutrophus*. *J Biol Chem* **266**: 3222-3227
- Eitinger, T., Wolfram, L., Degen, O., and Anthon, C. (1997) A Ni²⁺ binding motif is the basis of high affinity transport of the *Alcaligenes eutrophus* nickel permease. *J. Biol. Chem.* **272**: 17139-17144

- Eitinger, T., and Mandrand-Berthelot, M.-A. (2000) : Nickel transport systems in microorganisms. *Arch Microbiol* **173**:1-9
- Elsen, S., Swem, L.R., Swem, D.L., and Bauer C.E. (2004) RegA/RegB, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* **68**: 263-279
- Embley, T.M., van der Giezen, M., Horner, D.S., Dyal, P.L., and Foster, P. (2002) Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **358**: 191-203
- Fernandez de Henetrosa, A.R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J.J., Ohmori, H., and Woodgate, R. (2000) Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **35**: 1560-1572
- Fernandez-Pinas, F., and Wolk, C.P. (1994) Expression of *luxCD-E* in *Anabaena* sp. can replace the use of exogenous aldehyde for in vivo localization of transcription by *luxAB*. *Gene* **150**: 169-174
- Figge, R.M., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., and Cerff, R. (2000) The carbon metabolism-controlled *Synechocystis gap2* gene harbours a conserved enhancer element and a Gram-opsitive-like -16 promoter box retained in some chloroplast genes. *Mol. Microbiol.* **36**: 44-54
- Figge, R.M., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., and Cerff, R. (2001) Characterization and analysis of an NAD(P)H dehydrogenase transcriptional regulator critical for the survival of cyanobacteria facing inorganic carbon starvation and osmotic stress. *Mol. Microbiol.* **39**: 455-468
- Foerster, S., Stein, M., Brecht, M., Ogata, H., Higuchi, Y., and Lubitz, W. (2003) Single crystal EPR studies of the reduced active site of NiFe-hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F.J. *Am. Chem. Soc.* **125**: 83-93
- Fritsche, E., Paschos, A., Beisel, H.G., Böck, A., and huber, R. (1999) Crystal structure of the hydrogenase maturing endopeptidase HydD from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **288**: 989-998
- Garcia-Dominguez, M., Lopez-Maury, L., Florenico, F.J., and Reyes, J.C. (2000) A gene cluster involved in metal homeostasis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Bacteriol* **182**: 1507-1514
- Garcia-Dominguez, M., Reyes, J.P., and Florencio, F.J. (2000) NtcA represses transcription of *gifA* and *gifB*, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol.* **35**: 1192-1201

- Geoghegan, C.M., and Houghton, J.A. (1987) Molecular cloning and isolation of a cyanobacterial gene which increases the UV and methyl methanesulphonate survival of *recA* strains in *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 119-126
- Georgellis, D., Kwon, O., and Lin, E.C.C.(2001) Quinones as the redox signal for the Arc two-component system of bacteria. *Science* **292**: 2314-2316
- Grigorieva, G., and Shestakov, S. (1982) Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbilo Lett* **13**: 367-370
- Gruber, T.M. and, Bryant, D.A. (1998) Characterization of the alternative sigma-factors SigD and SigE in *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. SigE is implicated in transcription of post-exponential-phase-specific genes. *Arch Microbiol.* **169**: 211-219.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A.M., and Flores, E.(2001) Nitrogen control in cyanobacteria. *J Bacteriol* **183**: 411-25
- Herrero A., Muro-Pastor, A.M., Valladares, A., and Flores, E. (2004) Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 469-487
- Higuchi, Y., Yagi, T., Yasuoka, N. (1997) Unusual ligand structure in NiFe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure* **5**: 1671-1680
- Hirani, T.A., Suzuki, I., Murata, N., Hayashi, H., and Eaton-Rye, J.J. (2001) Characterization of a two-component signal transduction system involved in the induction of alkaline phosphatase under phosphate-limiting conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol* **45**: 133-144
- Horner, D.S., Foster, P.G., and Embley, T.M. (2000) Iron hydrogenases and the evolution of anaerobic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **17**: 1695-1708
- Houchins, J.P., and Burris, R. (1981) Physiological reactions of the reversible hydrogenase from *Anabaena* 7120. *Plant Physiol* **68**: 717-721
- Houchins, J.P. (1994) The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **768**: 227-256
- Houmard, J. (1994) Gene transcription in filamentous cyanobacteria. *Microbiology* **140**: 433-441
- Ikeuchi, M., and, Tabata, S. (2001) *Synechocystis* sp. PCC 6803 – a useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria. *Photosyn Res* **70**: 73-83

- Imamura, S., Yoshihara, S., Nakano, S., Shiozaki, N., Yamada, A., Tanaka, K., Takahashi, H., Asayama, M., and Shirai, M. (2003) Purification, characterization, and gene expression of all sigma factors of RNA polymerase in a cyanobacterium. *J. Mol. Biol.* **325**: 857-872
- 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, Yanada M, Yasuda M, Tabata S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein coding regions. *DNA Res* **3**:109-136
- Kaneko T., Nakamura, Y., Wolk.C.P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takazawa, M., Yamada, M., Yasuda, M., Tabata, S. (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res.* **8**: 205-213
- Kentemich, T., Bahnweg, M., Mayer, F., and Bothe, H. (1989) Localisation of the reversible hydrogenase in cyanobacteria. *Z. Naturforsch.* **44**: 384-391
- Kentemich, T., Caspar, M., and Bothe, H. (1991) The reversible hydrogenase in *Anacystis nidulans* is a component of the cytoplasmatic membrane. *Naturwissenschaften* **78**: 559-560
- Kucho, K., Okamoto, K., Tsuchiya, Y., Nomura, S., Nango, M., Kanehisa, M., and Ishiura, M. (2005) Global analysis of circadian expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Bacteriol.* **187**: 2190-2199
- Kunert, A., Hagemann, M., and Erdmann, N. (2000) Construction of promoter probe vectors for *Synechocystis* sp. PCC 6803 using the light-emitting reporter systems *Gfp* and *LuxAB*. *Microbiol. Methods* **41**: 185-194
- 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. *J Bacteriol.* **171**: 3449-57
- La Roche, J., Mc Kay, R.M.L., and Boyd, P. (1999) Immunological and molecular probes to detect phytoplankton responses to environmental stress in nature. *Hydrobiol* **401**: 177-198

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Leitao, E., Oxelfelt, F., Oliveira, P., Moradas-Ferreira, P., and Tamagnini, P. (2005) Analysis of the hupSL operon of the nonheterocystous cyanobacterium *Lyngbya majuscula* CCAP 1446/4: regulation of transcription and expression under a light-dark regimen. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4567-76
- Lenz, O., and Friedrich, B. (1998) A novel multicomponent regulatory system mediates H₂ sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12474-12479
- Li, R., and Golden, S. (1993) Enhancer activity of light-responsive regulatory elements in the untranslated leader regions of cyanobacterial *psbA* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 11678-11682
- Li, R., Dickerson, N.S., Mueller, U.W., and Golden, S.S. (1995) Specific binding of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 proteins to the enhancer element of *psbAII* required for high light-induced expression. *J. Bacteriol.* **177**: 508-516
- Li, H., and Sherman, L.A. (2000) A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. stain PCC 6803. *J Bacteriol* **182**: 4268-4277
- Link, G. (1996) Green life: control of chloroplast gene transcription. *Bioessay* **18**: 465-471
- Lopez-Maury, L., Garcia-Dominguez, M., Florencio, F. J., and Reyes, J. C. (2002) A two-component signal transduction system involved in nickel sensing in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* **43**: 247-256
- Lloyd, G., Landini, P., and Busby, S. (2001) Activation and repression of transcription initiation in bacteria. *Essays Biochem* **37**: 17-31
- Lyon, E.J., Shima S., Buurman, G., Chowdhuri, S., Batschauer A., Steinbach, K., and Thauer, R.K. (2004) UV-A/blue light inactivation of the metal-free hydrogenase (Hmd) from methanogenic archaea. *Eur. J. Biochem.* **271**: 195-204
- Malpica, R., Franco, B., Rodriguez, C., Kwon, O., and Georgellis, D. (2004) Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 13318-13323
- Margulis, L. (1970) Origin of eukaryotic cells. Yale University Press
- Marin, K., Suzuki, I., Yamaguchi, K., Ribbeck, K., Yamamoto, H., Kanesaki, Y., Hagemann, M., and Murata, N. (2003) Identification of histidine kinases that act as sensors in the perception of salt stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PNAS* **100**: 9061-9066

- Martin, W., and Müller, M. (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**: 37-41
- Matias, P.M., Soares C.M., Saraira, C.M., Coelho, R., Morais, J., Le Gall, J., and Carrondo, M.A. (2001) NiFe hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774: gene sequencing, three dimensional structure determination and refinement at 1.8 Å and modelling studies of its interaction with the tetrahaem cytochrome C3. *J. Biol. Inorg. Chem.* **6**: 63-81
- Mazon, G., Lucena, J.M., Campoy, S., Fernandez de Henestrosa, A.R., Candau, P., and Barbe, J. (2004) LexA-binding sequences in gram-positive and cyanobacteria are closely related. *Mol. Gen. Genomics* **271**: 40-49
- Mazouni, K., Bulteau, S., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (1998) Promoter element spacing controls basal expression and light inducibility of the cyanobacterial *secA* gene. *Mol. Microbiol.* **30**: 1113-1122
- Mazouni, K., Domain, F., Chauvat, F., and Cassier-Chauvat, C. (2003) Expression and regulation of the crucial plant-like ferredoxin of cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* **49**: 1019-1029
- Michel, K.P., and Pistorius, E.K. (2004) Adaptation of the photosynthetic electron transport chain in cyanobacteria to iron deficiency: The function of IdiA and IsiA. *Physiol Plant* **120**: 36-50
- Mizuno, T., Kaneko, T., Tabata, S. (1996) Compilation of all genes encoding bacterial two-component signal transducers of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *DNA Res.* **3**: 407-414
- Montet, Y., Amara, P., Volbeda, A., Vernede, X., Hatchikian, E.C., Field, M.J., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J.C. (1997) Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 523-526
- Moreira, D., and Lopez-Garcia, P. (1998) Symbiosis between methanogenic archaea and δ proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis. *J. Mol. Evol.* **47**: 517-530
- Murphy, R.C., Bryant, D.A., Porter, R.D., and Tandeau de Marsac, N. (1987) Molecular cloning and characterization of the *recA* gene from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *J. Bacteriol.* **169**: 2739-2747
- Nair, U., Thomas, C., and Golden, S.S. (2001) Functional elements of the strong *psbAI* promoter of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J. Bacteriol.* **183**: 1740-1747

- Oehler, S., Eismann, E.R., Kramer, H., and Müller-Hill, B. (1990) The three operators of the *lac* operon cooperate in repression. *EMBO Journal* **9**: 973-979
- Okamoto, S., Ikeuchi, M., Ohmori, M. (1999) Experimental analysis of recently transposed insertion sequences in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res* **29**: 265-273
- Oliveira, P., Leitao, E., Tamagnini, P., Moradas-Ferreira, P., and Oxelfelt, F. (2004) Characterization and transcriptional analysis of hupSLW in *Gloeotheca* sp. ATCC 27152: an uptake hydrogenase from a unicellular cyanobacterium. *Microbiol.* **150**: 3647-55
- Olson, J.W. Mehta, N.S., and Maier, R.J. (2001) Requirement of nickel metabolism proteins HypA and HypB for full activity of both hydrogenase and urease in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **39**: 176-182
- Owtrim, G.W., and Coleman, J.R. (1987) Molecular cloning of a *recA*-like gene from the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Bacteriol.* **169**: 1824-1829
- Parkinson, J.S. (1993) Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* **73**: 857-871
- Phunpruch, S. (1999) Mutational and transcriptional analysis of a hydrogenase gene cluster in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, Dissertation der Philipps-Universität Marburg
- Reissmann, S., Hochleitner, E., Wang, H., Paschos, A., Lottspeich, F., Glass, R.S., and Böck, A. (2003) Taming of a poison: Biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanid ligands. *Science* **292**: 1067-1070
- Reyes J.C., Muro-Pastor M.I., and Florencio F.J. (1997) Transcription of glutamine synthetase genes (*glnA* and *glnN*) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is differently regulated in response to nitrogen availability. *J. Bacteriol.* **179**: 2678-2689
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., and Stanier, R.Y. (1979) Generic assignment, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**: 1-61
- Rippka, R. and Herdman, M. (1992) Catalogue of Strains. Pasteur Culture Collection of Cyanobacterial Strains in Axenic Culture. Vol I, Institut Pasteur, Paris
- Rossmann, R., Sauter, M., Lottspeich, F., and Böck, A. (1994) Maturation of the large subunit of *Escherichia coli* hydrogenase 3 requires nickel incorporation followed by C-terminal processing at Arg537. *Eur. J. Biochem.* **220**: 377-384
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B.,

- and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, New York
- Sandmann, G., Peleato, M.L., Fillat, M.F., Lazaro, M.C., and Gomez-Moreno, C. (1990) Consequences of the iron-dependent formation of ferredoxin and flavodoxin on photosynthesis and nitrogen fixation on *Anabaena* strains. *Photosynth Res* **26**: 119-125
- Sanger, F., Nickelsen, S., and Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* **74**: 5463-5467
- Schmitz, O., Boison, G., Hilscher, R., Hundeshabgen, B., Zimmer, W., Lottspeich, F., and Bothe, H. (1995) Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria. *Eur. J. Biochem.* **233**: 266-276
- Schmitz O., and Bothe H. (1996) The diaphorase subunit HoxU of the bidirectional hydrogenase as electron transferring protein in cyanobacterial respiration? *Naturwissenschaften* **83**: 525-527
- Schmitz, O., Boison, G., and Bothe, H. (2001) Quantitative analysis of expression of two circadian clock-controlled gene clusters coding for the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol. Microbiol.* **41**: 1409-1417
- Schneider G.J., Tumer, N.E., Richaud, C., Borbely, G., and Haselkorn, R. (1987) Purification and characterization of RNA polymerase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *JBC* **262**: 14633-14639
- Schwarz, R., and Grossman, A.R. (1998) A response regulator of cyanobacteria integrates diverse environmental signals and is critical for survival under extreme conditions. *PNAS* **95**: 11008-11013
- Schyns, G., Lin, J., Coursin, T., de Marsac, N.T., and Houmard, J. (1998) Promoter recognition by a cyanobacterial RNA polymerase: in vitro studies with *Calothrix* sp. PCC 7601 transcriptional factors RcaA and RcaD. *Plant Mol. Biol.* **36**: 649-658
- Scott, S., Busby, S., and Beacham, I. (1995) Transcriptional co-activation at the *ansB* promoters: involvement of the activating regions of CRP and FNR when bound in tandem. *Mol. Microbiol.* **18**: 521-531
- Serebriakova, L., Zorin, N.A., and Lindblad, P. (1994) Reversible hydrogenase in *Anabaena variabilis* ATCC 29413. Presence and localisation in non-N₂-fixing

- cells. *Arch. Microbiol.* **161**: 140-144
- Sheremetieva, M.E., Troshina, O.Y., Serebryakova, L.T., and Lindblad, P. (2002) Identification of *hox* genes and analysis of their transcription in the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 growing under nitrate-limiting conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **214**: 229-233
- Stal, L.J., and Moezelaar, R. (1997) Fermentation in cyanobacteria. *FEMS Microb. Reviews* **21**: 179-211
- Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Ann. Rev. Biochem.* **69**:183-215
- Straus, N.A. (1994) Iron deprivation: physiology and gene regulation. D.A. Bryant (Ed.): The molecular biology of cyanobacteria, Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, Netherlands:731-750
- Su, W., Porter, S., Kustu, S., and Echols, H. (1990) DNA-looping and enhancer activity: Association between DNA-bound NtrC activator and RNA polymerase at the bacterial *glnA* promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5504-5508
- Suzuki, I., Los, D.A., Kanesaki, Y., Mikami, K., and Murata, N. (2000) The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis*. *EMBO J.* **19**: 1327-1334
- Suzuki, I., Kanesaki, Y., Mikami, K., Kanehisa, M., and Muarta, N. (2001) Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis*. *Mol. Microbiol.* **40**: 235-244
- Suzuki, S., Ferjani, A., Suzuki, I., and Murata, N. (2004) The SphS-SphR two component system is the exclusive sensor for the induction of gene expression in response to phosphate limitation in *Synechocystis*. *J Biol Chem* **279**: 13234-13240
- Suzuki, I., Kanesaki, Y., Hayashi, H., Hall, J.J., Simon, W.J., Slabas, A.R., and Murata, N. (2005) The histidine kinase Hik34 is involved in thermotolerance by regulating the expression of heat shock genes in *Synechocystis*. *Plant Physiol.* **138**: 1409-1421
- Smith, J.M., and Szathmary, E. (1995) The major transitions in evolution. Freeman, Oxford
- Tamagnini, P., Axelsson, R, Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wünschiers, R., and Lindblad, P. (2002) Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 1-20
- Tanigawa, R., Shirokane, M., Maeda, S.S., Omata, T., Tanaka, K., and Takahashi, H. (2002) Transcriptional activation on NtcA-dependent promoters of *Synechococcus*

- sp. PCC 7942 by 2-oxoglutarat in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 4251-4255
- Van der Oost, J., and Cox, R.P. (1987) Hydrogenase activity in nitrate-grown cells of the unicellular cyanobacterium *Cyanothece* PCC 7822. *Arch. Microb.* **151**: 40-43
- Vazquez-Bermudez, M.F., Herrero, A., and Flores, E. (2002) 2-oxoglutarat increases the binding affinity of the NtcA (nitrogen control) transcription factor for the *Synechococcus glnA* promoter. *FEBS Lett.* **512**: 71-74
- Vazquez-Bermudez, M.F., Herrero, A., and Flores, E. (2003) Carbon supply and 2-oxoglutarat effects on expression of nitrate reductase and nitrogen-regulated genes in *Synechococcus* sp. PCC 7942. *FEMS Microbiol. Lett.* **221**: 155-159
- Vignais, P.M., Billoud, B., and Meyer, J. (2001) Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol. Reviews* **25**: 455-501
- Vignais, P.M., Elsen, S., and Colbeau, A. (2005) Transcriptional regulation of the uptake [NiFe]-hydrogenase genes in *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem Soc Trans.* **33**: 28-32.
- Vilar, J.M.G., and Leibler, S. (2003) DNA loop and physical constraints on transcription regulation. *J. Mol. Biol.* **331**: 981-989
- Vilar, J.M.G., and Saiz, L. (2005) DNA looping in gene regulation: from the assembly of macromolecular complexes to the control of transcriptional noise. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **15**: 136-144
- 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**: 580-587
- Wade, J.T., Belyaeva, T.A., Hyde, E.I., and Busby, S.J.W. (2001) A simple mechanism for co-dependence on two activators at an *Escherichia coli* promoter. *EMBO Journal* **20**: 7160-7167
- Wagner, R. (2000) Transcription regulation in prokaryotes. Oxford University Press
- Walker, G.C. (1984) Mutagenesis and inducible response to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol Reviews* **48**: 60-93
- West, A.H., and Stock, A.M. (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**: 369-376
- Wu, L.F., Mandrand-Berthelot, M.A., Waugh, R., Edmonds, C.J., Holt, S.E., and Boxer, D.H. (1989) Nickel deficiency gives rise to the defective hydrogenase phenotype of *hydC* and *fnr* mutants in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **3**: 1709-1718
- Yoshihara, S., Geng, X., Okamoto, S., Yura, K., Murata, T., Go, M., Ohmori, M., and

- Ikeuchi, M. (2001) Mutational analysis of genes involved in pilus structure, motility and transformation competency in the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* **42**: 63-73
- Yoshihara, S., Geng, X., and Ikeuchi, M. (2002) *pilG* Gene cluster and split *pilL* genes involved in pilus biogenesis, motility and genetic transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 2002 **43**: 513-21
- Yousef, N., Pistorius, E. K., Michel, K. P. (2003) Comparative analysis of *idiA* and *isiA* transcription under iron starvation and oxidative stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 wild-type and selected mutants. *Arch Microbiol* **180**: 471-483
- Yura, K., Toh, H., and Go, M. (1999) Putative mechanism of natural transformation as deduced from genome data. *DNA Res.* **6**: 75-82

Liste eigener Veröffentlichungen

1. 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**: 810-823
2. Gutekunst, K., Hoffmann, D., Lommer, M., Egert, M., Suzuki, I., Schulz-Friedrich, R., and Appel, J. Metal dependence and intracellular regulation of the bidirectional NiFe-hydrogenase in *Synechocystis* sp. PCC 6803
Manuskript angenommen vom *International Journal of Hydrogen Energy*
3. Hoffmann, D., Gutekunst, K., Klissenbauer, M., Schulz-Friedrich, R., and Appel J
Mutagenesis of all hydrogenase accessory genes of *Synechocystis* sp. PC 6803 - additional homologs of *hypA* and *hypB* are not active in hydrogenase maturation
Manuskript eingereicht

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Schulz-Friedrich danke ich ganz herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für seine Großzügigkeit, wenn es darum ging möglichst vielen interessierten Arbeitsgruppenmitgliedern die Teilnahme an Tagungen zu ermöglichen, für seine moralische Integrität in wissenschaftlich heiklen Situationen und für die Unterstützung und das Vertrauen, wenn es darum ging, Neues zu probieren.

Frau Prof. Dr. Karin Krupinska danke ich für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Mein größter Dank gilt Dr. Jens Appel für seine engagierte Betreuung, seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft, seine Begeisterung und Hartnäckigkeit bei jeglicher Art von Wahrheitssuche, die vielen Anregungen und die Freiheiten, die er mir ließ. Ich danke ihm für seine Offenheit, seine Kritik und Ernsthaftigkeit.

Sabine Karg und Claudia Marquardt danke ich für die vielen Hilfen im Laboralltag und für all die Kniffe und Tricks. Claudia danke ich außerdem für die Geschichten darüber, wie zeitaufwendig das Arbeiten früher war. Dies hatte immer wieder zur Folge, dass man sich plötzlich über die langweiligsten Methoden freuen konnte.

Christoph Plieth danke ich für die Einweisung in die Lumineszenzmessungen und seine Großzügigkeit bezüglich der Nutzung des Luminometers.

Kristina Lorenzen, Dörte Hoffmann und Ninja Backasch danke ich für ihr Verständnis und ihre Wärme in komplizierten Lebenslagen.

Markus Ludwig und Sven Künzel danke ich für ihren Humor, durch den viele Labortage so kurzweilig wurden. Für die nette Arbeitsatmosphäre möchte ich mich außerdem bei Diana, Matthias, Björn, Carsten, Anja, Jan, Markus, und Monika bedanken. Sandra, Martin und Melanie danke ich für die Zeit engerer Zusammenarbeit. Melanie danke ich besonders für die gemeinsamen 48 h Messungen.

Franziska Gutthahn danke ich für ihr Vertrauen, dass mir für vieles die Augen geöffnet hat. Franziska Vilmar danke ich für ihre Freundschaft, für ihr unermüdliches Interesse, ihr Verständnis, ihren Trost in schweren Phasen und die vielen gemeinsamen Abenteuer.

Meinen Eltern danke ich, dass ihnen unsere Neugierde so heilig war und Wege ins Ungewisse mit so viel Aufmunterung und Begeisterung begleitet wurden.

Christian danke ich dafür, dass er mich ermutigt hat, diese Arbeit zu beginnen.

Meinen Kindern danke ich für ihr Mitfühlen und für die vielen Fragen, durch die sich mir diese Arbeit immer wieder aus ganz eigenen Blickwinkeln zeigte. Noch viel mehr danke ich ihnen dafür, dass es sie gibt.

Der Universität Kiel und der Deutschen Studienstiftung danke ich außerdem für die unkomplizierte finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Meiner Mutter danke ich für ihr Einspringen, wenn sich plötzlich Finanzierungslücken auftaten.

Lebenslauf

Kirstin Gutekunst

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 2.12.1974
Geburtsort: Kiel
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, 4 Kinder

Ausbildung:

1981-1982 Grundschole Heide
1982-1985 Hochtorgrundschule Neustadt in Holstein
1985-1990 Kreisgymnasium Neustadt in Holstein
1990-1991 Virginia Highschool, Charlottesville, USA
1991-1992 Kreisgymnasium Neustadt in Holstein
1992-1994 Johanneum zu Lübeck
Juni 1994 Abitur
1994-1995 Medizinstudium an der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg
1995 Quereinstieg ins 2. Fachsemester Biologie an der Albert-
Ludwigs-Universität Freiburg (1 Studiensemester)
1995-2001 Biologiestudium an der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel (11 Studiensemester)
Hauptfach: Botanik, Nebenfächer: Phytopathologie und
Limnologie
2000- 2001 Diplomarbeit am Ökologiezentrum der Christian-
Albrechts-Universität zu Kiel unter der Betreuung von
Herrn Prof. Dierßen und Dr. Kai Jensen über das Thema:
Einfluss einer Streuauflage auf die Keimung und
Etablierung von ausgewählten Niedermoor-Arten
März 2001 Diplom
2002 – 2005 Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Doktorarbeit im
Botanischen Institut der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel unter der Betreuung von Herrn Prof. Schulz-
Friedrich und Dr. Jens Appel

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von der Beratung durch meine Betreuer – nach Inhalt und Form meine Arbeit ist. Diese Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Es wurden keine früheren Promotionsversuche unternommen.

Teile der vorliegenden Arbeit sind in folgenden Publikationen enthalten:

1. 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**:810-823
2. Gutekunst, K., Hoffmann, D., Lommer, M., Egert, M., Suzuki, I., Schulz-Friedrich, R., and Appel, J. Metal dependence and intracellular regulation of the bidirectional NiFe-hydrogenase in *Synechocystis* sp. PCC 6803
Manuskript angenommen vom *International Journal of Hydrogen Energy*
3. Hoffmann, D., Gutekunst, K., Klissenbauer, M., Schulz-Friedrich, R., and Appel J
Mutagenesis of all hydrogenase accessory genes of *Synechocystis* sp. PC 6803 - additional homologs of *hypA* and *hypB* are not active in hydrogenase maturation
Manuskript eingereicht

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

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt. Der Zulassung von Zuhörerinnen und Zuhörern wird nicht widersprochen.

Kiel, den 18.3.2006

(Kirstin Gutekunst)