

**Untersuchungen zur Biosynthese  
und Funktion von Tocopherol und Plastochinon im  
Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803**

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

vorgelegt von  
**Ninja Backasch**  
Kiel  
2008

*Meiner Schwester*

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Die Biosynthese der Tocochochromanole.....	1
1.2	Die Plastochinonbiosynthese .....	4
1.3	Die Bedeutung der 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxyge-nase.....	6
1.4	Funktionen des Plastochinons .....	6
1.5	Funktionen der Tocopherole .....	7
1.5.1	Stabilisierung der Membranen .....	7
1.5.2	Antioxidans.....	8
1.5.3	Weitere Funktionen des $\alpha$ -Tocopherols .....	9
1.6	Lichtstress .....	10
1.7	Cyanobakterien als Modellorganismus.....	10
1.8	Zielsetzung .....	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1	Chemikalien und Enzyme.....	13
2.2	Organismen und Anzucht.....	13
2.2.1.	Kultivierung von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 .....	13
2.3	Allgemeine Methoden.....	14
2.3.1	Isolierung von genomischer DNA.....	14
2.3.2	Phenol-Chloroform-Extraktion .....	15
2.3.3	Ethanol-fällung .....	15
2.3.4	Polymerase-Kettenreaktion .....	15
2.3.5	Ligation .....	16
2.3.6	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	17
2.3.7	Präparation von Pasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	18
2.3.8	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	18
2.3.9	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	18
2.3.10	Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente .....	18
2.3.11	Fusions-Polymerase-Kettenreaktion (Fusions-PCR).....	19
2.3.12	Transformation von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 .....	20
2.4	Physiologische Parameter.....	21
2.4.1	Optische Dichte.....	21

2.4.2	Chlorophyllgehalt .....	21
2.4.3	Tocopherolgehalt .....	21
2.4.3.1	Gefriertrocknung .....	21
2.4.3.2	Acetonextraktion .....	21
2.4.3.3	HPLC-Messung.....	22
2.4.4	Sauerstoffproduktion .....	22
2.4.5	PAM-Messungen.....	23
2.5	Proteinbiochemie.....	23
2.5.1	Präparation von Gesamtprotein-Extrakten .....	23
2.5.2	Proteinbestimmung nach Bradford .....	24
2.5.3	Proteinbestimmung nach Peterson .....	24
2.5.4	Acetonfällung von Proteinen .....	25
2.5.5	SDS-Gelelektrophorese von Proteinen .....	25
2.5.6	Silberfärbung von Proteinen im SDS-Gel.....	26
2.5.7	Coomassiefärbung von Proteinen im SDS-Gel .....	26
2.5.8	Immunoblot von Proteinen – Western Blot.....	26
2.6	Membranisolierung.....	28
2.6.1	Dichtegradientenzentrifugation.....	28
2.6.2	Zwei-Phasen Membranisolierung.....	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
3.1	Experimente zum hypothetischen Plastochinonbiosyn-theseweg .....	35
3.1.1	Deletionsmutanten möglicher beteiligter Gene.....	36
3.1.1.1	Konstruktion der Deletionsmutante $\Delta slI0418$ .....	37
3.1.1.2	Phänotyp der Deletionsmutante $\Delta slI0418$ .....	38
3.1.1.3	Deletionsmutanten weiterer Gene.....	40
3.2	Einflüsse auf den Tocopherolgehalt im Wildtyp.....	42
3.2.1	Tocopherol und Licht.....	42
3.2.2	Tocopherol und Glucose .....	43
3.2.3	Tocopherol und Kohlendioxid.....	44
3.3	Phänotyp der <i>hpd</i> -Mutante $\Delta slr0090$ .....	44
3.3.1	Effizienz des Photosystems II (PS II) .....	45
3.3.2	Aktivität des Photosystems II .....	46
3.3.3	Stabilität des D1-Proteins des Photosystems II.....	47

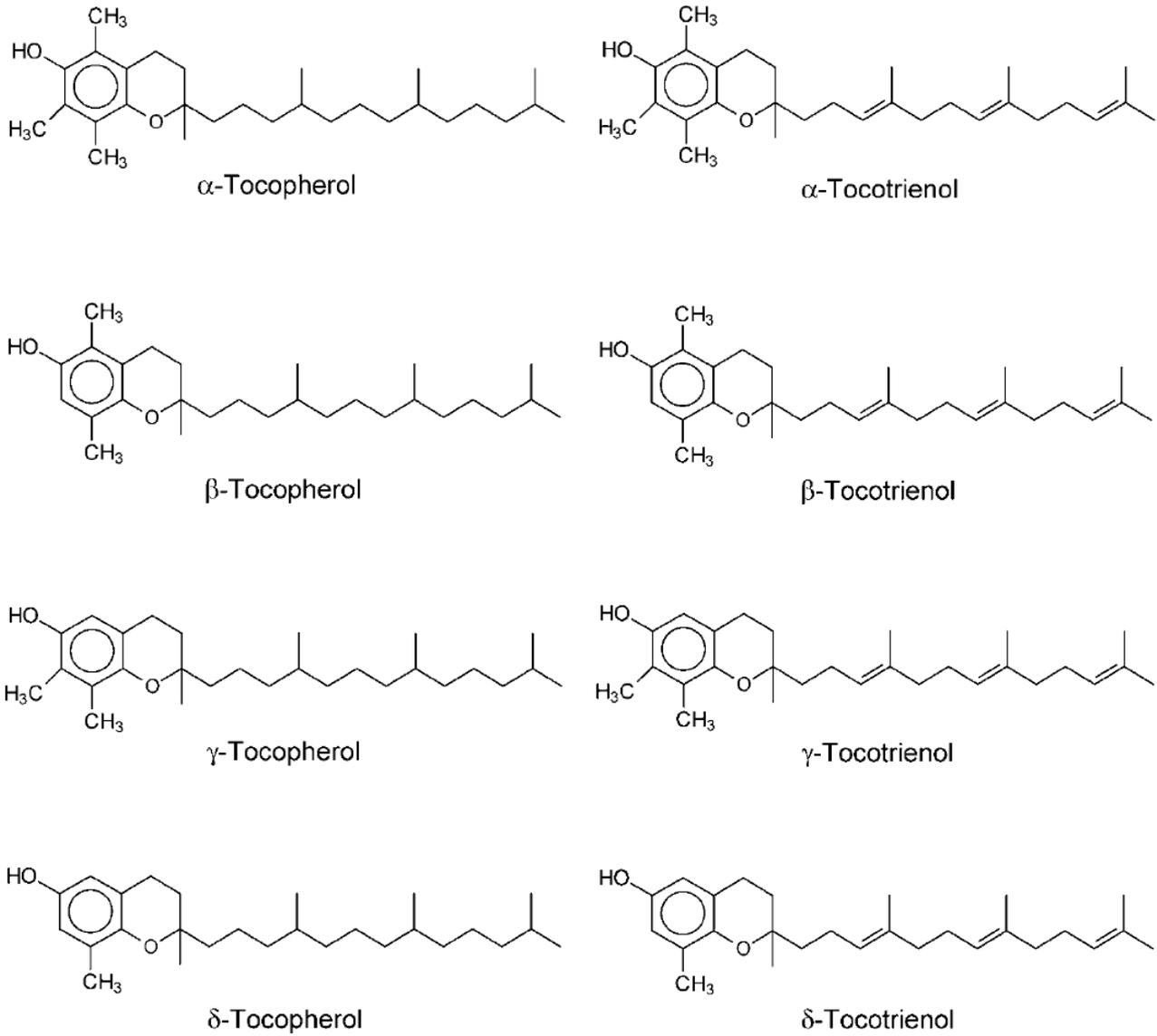
3.4	Membranpräparation .....	51
3.4.1	Lokalisierung der $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase .....	51
3.4.2	Lokalisierung der Methyltransferase SLL0418 .....	54
3.4.3	HPLC-Analyse der Membranfraktionen .....	56
3.5	Datenbankrechercheergebnisse .....	57
3.5.1	Orthologe der Tocopherolbiosynthesegene .....	57
3.5.2	Gene in Tocopherol synthetisierenden Cyanobakterien .....	59
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>62</b>
4.1	Plastochinon .....	62
4.1.1	Die Methyltransferase SLL0418 .....	62
4.1.2	Die Prenyltransferase SLR0926 .....	63
4.2	Bestimmende Faktoren des Tocopherolgehaltes .....	64
4.2.1	Tocopherol und Licht .....	64
4.2.2	Tocopherol und Glucose .....	65
4.2.3	Tocopherol und Kohlendioxid .....	65
4.3	Funktionen des Tocopherols in Cyanobakterien .....	66
4.3.1	Funktionalität des Photosystems II .....	66
4.3.2	Photoinhibition des Photosystems II .....	67
4.3.3	Neues Modell des Mechanismus der Lichtschädigung am PS II .....	69
4.4	Lokalisierung der Tocopherolbiosynthese .....	71
4.5	Ausblick .....	73
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>87</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	87
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>90</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>91</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>92</b>

# 1 Einleitung

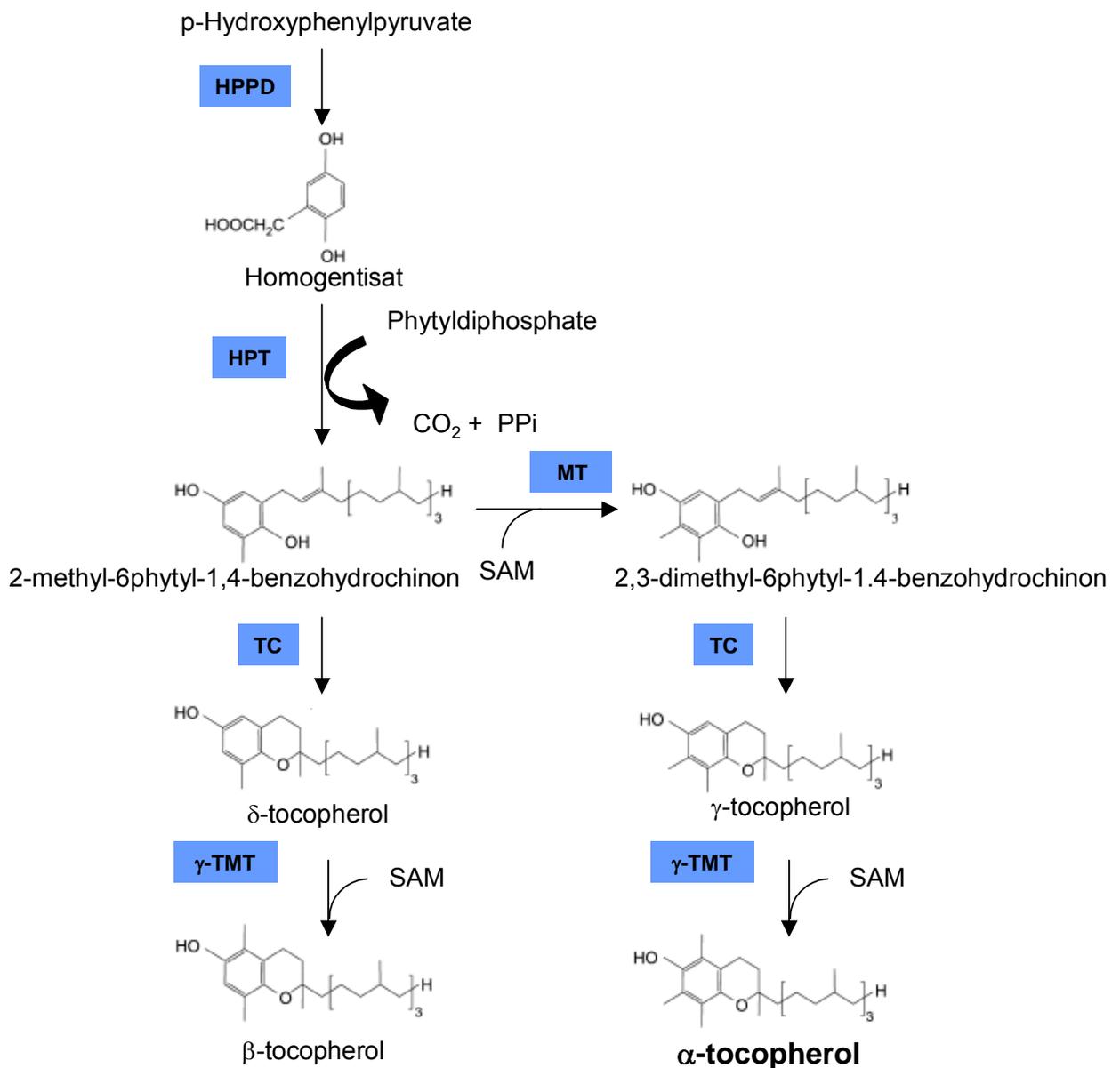
Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und insbesondere antioxidativ wirksame Verbindungen stehen in den letzten Jahren im Mittelpunkt des Interesses einer fächerübergreifenden Forschung. Molekularbiologische Hochdurchsatztechnologien in Verbindung mit biochemischen und physiologischen Daten ermöglichten einen Einblick in die Synthese und Funktion dieser biologisch aktiven Verbindungen im synthetisierenden Organismus und treffendere Beurteilung der Bedeutung sowohl für den pflanzlichen als auch den humanen Stoffwechsel. Die Tocopherole stellen eine der größten Fraktionen dieser Verbindungsgruppe in der pflanzlichen Zelle. Obschon die grundlegende Bedeutung des Vitamin E in der menschlichen Ernährung bereits seit langem bekannt ist, besteht ein Dissens im Hinblick auf die zu empfehlende Aufnahmemenge oder gegebenenfalls die Höhe der Supplementierung. Im Hinblick auf die Synthese in photosynthetischen Organismen ist der Stoffwechselweg des Tocopherols bekannt. Die zugänglichen Mutanten bieten die Möglichkeit, die Funktion des Tocopherols in der photosynthetisch aktiven Zelle aufzuklären.

## 1.1 Die Biosynthese der Tocochromanole

Hinter der Bezeichnung Vitamin E verbergen sich acht strukturell verschiedene Tocochromanole. Das Grundgerüst dieser Verbindungen bilden ein aromatisches Chromanolringsystem und eine aliphatische Seitenkette. Ist die Seitenkette des Moleküls gesättigt, spricht man von einem Tocopherol. Sind drei Doppelbindungen vorhanden, handelt es sich um ein Tocotrienol. Des Weiteren werden anhand der Anzahl und Position der am aromatischen Ring vorhandenen Methylgruppen  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherol unterschieden. Nach dem gleichen Prinzip werden 4 Tocotrienole klassifiziert (Abb. 1.1.). In Pflanzen und Cyanobakterien stellt das  $\alpha$ -Tocopherol die größte Fraktion dieser als Vitamin E bezeichneten amphiphilen Molekülgruppe.



**Abbildung 1.1:** Strukturformeln der acht unter dem Begriff Vitamin E zusammengefassten Moleküle



**Abbildung 1.2:** Biosynthese der Tocopherole. Die katalysierenden Enzyme sind mit blau unterlegt. HPPD (4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase), HPT (Homogentisat-Phytyltransferase), MT (Methyltransferase), TC (Tocopherol-Cyclase),  $\gamma$ -TMT ( $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase), SAM (S-Adenosyl-Methionin).

Die mehrstufige Biosynthese der Tocopherole in Cyanobakterien ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Durch Transaminierung von Tyrosin entstandenes 4-Hydroxyphenylpyruvat (HPP) wird von dem Enzym 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPPD) zu Homogentisat umgesetzt. Die Kondensation eines Phytidiphosphates (PDP) mit Homogentisat vermittelt das Enzym Homogentisat-Phytyltransferase (HPT) (Soll, 1987; Collakova und DellaPenna, 2001; Schledz et al., 2001; Savidge et al., 2002). PDP entstammt der Reduktion des Geranylgeranyl-

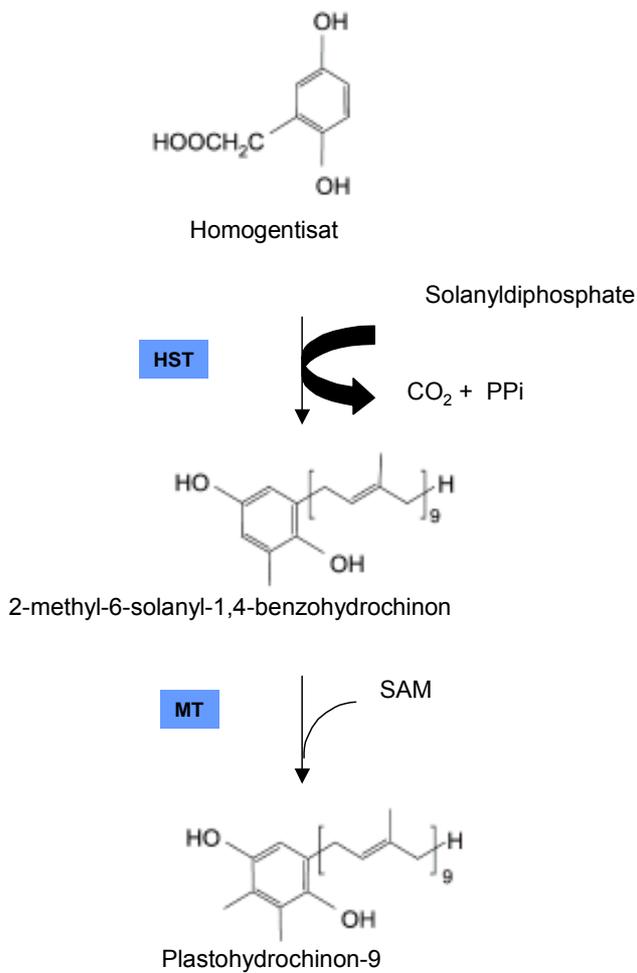
diphosphats (GGDP) durch Geranylgeranyl-diphosphat-Reduktase (GGDR) (Soll et al., 1980). Das durch Kondensation entstandene 2-Methyl-6-phytyl-1,4-benzohydrochinon (MPBQ) kann mittels einer MPBQ-Methyltransferase und S-Adenosyl-Methionin (SAM) zu 2,3-Dimethyl-6-phytyl-1,4-benzohydrochinon (DMPBQ) methyliert werden (Soll, 1987; Shintani et al., 2002). Das Enzym Tocopherol-Cyclase katalysiert die Cyclisierung von MPBQ bzw. DMPBQ zu  $\delta$ - bzw.  $\gamma$ -Tocopherol (Soll et al., 1985; Arango und Heise, 1998; Porfirova et al., 2002; Sattler et al., 2003). Der letzte Schritt der Biosynthese des Tocopherols läuft über die  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase ( $\gamma$ -TMT). Die Methylierung des  $\delta$ - und des  $\gamma$ -Tocopherols unter Beteiligung von SAM führt zur Entstehung von  $\beta$ - und  $\alpha$ -Tocopherol (Soll et al., 1980; d'Harlingue und Camara, 1985; Shintani und DellaPenna, 1998). Die Regulation der Biosynthese des Tocopherols ist noch nicht abschließend aufgeklärt. Bisher wird davon ausgegangen, dass die Bildung von Homogentisat (Qi et al., 2005) und auch die Kondensation des Homogentisats mit PDP (Collakova und DellaPenna, 2003) die Synthese limitieren.

Im Verlauf der Biosynthese der Tocotrienole wird statt Phytyl-diphosphat Geranylgeranyl-diphosphat (GGDP) mit Homogentisat kondensiert. Das für die Biosynthese der Tocotrienole spezifische Enzym Homogentisat-Geranylgeranyl-Transferase (HGGT) katalysiert diesen Schritt. Des Weiteren wird von einem der Biosynthese der Tocopherole entsprechenden Verlauf ausgegangen (Cahoon et al., 2003; Dörmann, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Enzyme der Tocopherolbiosynthese auch Geranylgeranyl-benzohydrochinone als Substrate nutzen können (Soll und Schultz, 1979). Eine Ausnahme scheinen aus Pflanzen stammende HPTs zu bilden, da sie offenbar spezifisch mit Phytyl-diphosphat reagieren. Währenddessen nutzen cyanobakterielle HPTs mit geringerer Effizienz auch GGDP als Substrat (Collakova und DellaPenna, 2001).

## 1.2 Die Plastochinonbiosynthese

In Abb. 1.3 ist die Biosynthese des essentiellen Elektronenüberträgers Plastochinon dargestellt. Der aromatische Kopf des Moleküls wird wie in der Synthese des Tocopherols vom Homogentisat gebildet. Die Kondensation des Homogentisats mit Solanyl-diphosphat wird durch die Solanyl-diphosphat spezifische Prenyltransferase Homogentisat-Solanyl-Transferase katalysiert (Norris et al., 1998; Collakova und

DellaPenna, 2001). SAM liefert die Methylgruppe, die an der gleichen Stelle wie beim MPBQ mittels einer Methyltransferase in das aromatische Ringsystem eingebracht wird. Die betreffende Methyltransferase vermittelt ebenfalls den ersten Methylierungsschritt in der Biosynthese des Tocopherols (Cheng et al., 2003; Motohashi et al., 2003).



**Abbildung 1.3:** Biosynthese von Plastohydrochinon-9. Die katalysierenden Enzyme sind blau unterlegt. HST (Homogentisat-Solanyl-Transferase), MT (Methyltransferase), SAM (S-Adenosyl-Methionin).

### **1.3 Die Bedeutung der 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase**

Das Enzym 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPPD, E.C. 1.13.11.27.) gehört der Klasse der Oxygenasen an. Im Gegensatz zu Monooxygenasen übertragen Dioxygenasen zwei Sauerstoffatome auf die als Substrat fungierende organische Verbindung. Die HPPD ist ein Nicht-Häm-Eisen(II)-Protein und gehört zur Gruppe der von 2-Oxosäuren abhängigen Dioxygenasen. Neben molekularem Sauerstoff ist eine 2-Oxosäure nötig, damit in Gegenwart des Substrats Aktivität erzielt wird. Dabei muss die 2-Oxosäure kovalent an das Substrat gebunden sein und nicht als zusätzlicher Ligand vorliegen. Darin unterscheidet sich die HPPD von anderen von 2-Oxosäuren abhängigen Dioxygenasen. Des Weiteren ist Ascorbat als Cofaktor essentiell (Jefford und Cadby, 1981; Que und Ho, 1996). Das Enzym kann sowohl in photoautotrophen als auch heterotrophen Organismen nachgewiesen werden, wobei es unterschiedliche Funktionen erfüllen kann. Im Stoffwechsel des Menschen, im tierischen Organismus und in Bakterien wie z.B. *Pseudomonas* und *Streptomyces* ist das Enzym am Abbau der Aminosäure Tyrosin beteiligt. Am Ende des Abbaus katalysiert die HPPD die Umsetzung des 4-Hydroxyphenylpyruvats zu Homogentisat (Lindstedt et al., 1982; Rüetschi et al., 1992; Denoya et al., 1994). Das Fehlen der HPPD aufgrund eines Enzymdefekts führt beim Menschen zu schwerwiegenden Erkrankungen (Tomoeda et al., 2000; Moran, 2005). Im photosynthetischen Organismus nimmt das Enzym eine Schlüsselposition in der Biosynthese der Tocopherole und des Plastochinons (Polyprenylchinonbiosynthese) ein, da Homogentisat den aromatischen Kopf der Polyprenylchinone liefert. Die HPPD katalysiert demnach den ersten Schritt sowohl der Tocopherol-, als auch der Plastochinonbiosynthese. Eine Deletion des entsprechenden Gens in Arabidopsis ist letal (Norris et al., 1995).

### **1.4 Funktionen des Plastochinons**

Plastochinon ist essentieller Teil der Elektronentransportkette im Ablauf der Photosynthese. Ein kovalent am D2-Protein des Photosystems II (PS II) gebundenes Plastochinonmolekül  $Q_A$  nimmt bei Lichteinstrahlung im Verlauf einer schnellen Reaktion ein Elektron von einem Phäophytinmolekül entgegen. Das entstandene

Semichinonradikal  $Q_A^-$  reduziert während der Reaktion mit einer langsameren Kinetik ein zweites freies, nicht kovalent gebundenes Chinon  $Q_B$ . In aufeinanderfolgenden Reaktionen werden zwei Elektronen sowie zwei Protonen auf  $Q_B$  übertragen, welches hiermit zu einem Hydrochinon reduziert wird. Das Hydrochinonmolekül diffundiert zurück in den Plastochinonpool, und von dort gegebenenfalls zum Cytochrom- $b_6/f$ -Komplex (Aro et al., 1993). Eine weitere Funktion ergibt sich aus dieser Reduktion des Plastochinons bzw. Oxidation des Hydrochinons im Verlauf der Photosynthese. Dem Redoxstatus des Plastochinonpools wird die Funktion eines Redoxsensors innerhalb der Zelle zugeschrieben. So hängt beispielsweise die als „*state transition*“ bezeichnete Verteilung der Phycobilisomen auf die Photosysteme I und II vom Redoxstatus des Pools ab (Mullineaux und Allen, 1990; Mao et al., 2002). Auch die Genexpression der Zelle wird auf diesem Wege reguliert (Pfannschmidt et al., 1999; Pfannschmidt 2002; Adamiec et al., 2008).

## 1.5 Funktionen der Tocopherole

Obwohl Tocochromanole ausschließlich von photosynthetisch aktiven Organismen synthetisiert werden, stammen die meisten Fakten zur Funktion dieser Substanzgruppe aus Studien an tierischen Organismen oder künstlichen Membranen. Tocochromanole reagieren mit Lipidperoxidradikalen und können auf diese Weise Membranlipide (vor allem mehrfach ungesättigte) vor Oxidation schützen. Des weiteren „*quenchen*“ Tocochromanole reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bzw. reagieren mit diesen.

### 1.5.1 Stabilisierung der Membranen

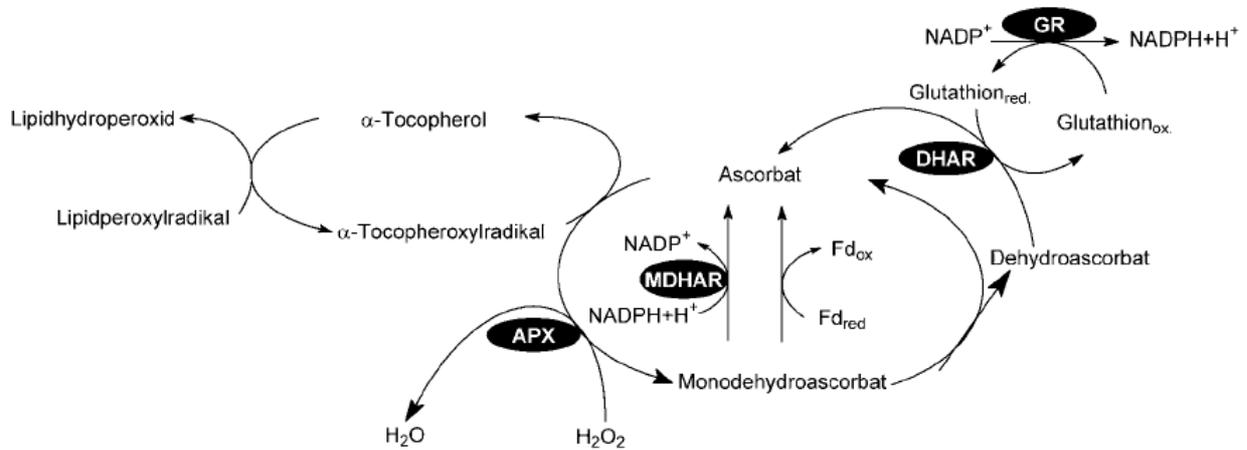
Da der hydrophobe Anteil der Tocochromanole überwiegt, sind diese in die Membranen eingelagert. Dabei verankert die Isoprenoidseitenkette das Molekül in der Lipiddoppelschicht, während der aromatische Kopf Richtung Grenzschicht zwischen Lipiden und wässriger Phase orientiert ist (Niki et al., 1985; Kagan und Quinn, 1988). Durch Hydrolyse entstandene Lysophospholipide und freie Fettsäuren können Komplexe mit Tocochromanolen bilden. Da diese Komplexe sich stöchiometrisch 1:1 ausbilden, wird auf diesem Weg die Balance zwischen hydrophoben und hydrophilen Tendenzen innerhalb der Membran gewahrt. Die

detergentienartige Wirkung der hydrolytischen Produkte, die die Stabilität der Membran gefährden, ist somit negiert (Wang und Quinn, 1999). Tocochromanole bilden ebenso Komplexe mit Lipoxygenasen, wodurch diese in ihrer Aktivität blockiert sind (Grossmann und Waksman, 1984). Die Diskrepanz zwischen einigen Beobachtungen in Modellmembransystemen und den vermuteten biologischen Funktionen der Tocochromanole Bedarf weiterer Aufklärung (Wang und Quinn, 1999).

### 1.5.2 Antioxidans

Neben der membranstabilisierenden Funktion ist die als Antioxidans die am besten belegte. Tocochromanole können Kettenreaktionen unter Beteiligung freier Radikale unterbrechen (Tappel, 1962; Kamal-Eldin und Appelqvist, 1996). Die größte antioxidative Wirkung wird dem  $\alpha$ -Tocopherol zugeschrieben. Um die Autooxidation der Lipide zu unterbrechen, überträgt das  $\alpha$ -Tocopherol das Wasserstoffproton der phenolischen Hydroxylgruppe an ein Lipidperoxyradikal. Dabei entsteht zunächst durch Öffnung des Chromalringsystems ein Alkylradikal, welches zu einem Hydroxylalkylchinon ( $\alpha$ -Tocochinon) oxidiert wird. Das als Zwischenprodukt anfallende Tocopheroxyradikal ist dabei resonanzstabilisiert (Kamal-Eldin und Appelqvist, 1996). Eindeutig nachgewiesen wurde weiterhin, dass  $\alpha$ -Tocopherol Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) durch Energietransfer physikalisch deaktivieren kann (Fahrenholtz et al., 1974). Dabei löscht („*quencht*“)  $\alpha$ -Tocopherol den Anregungszustand von 40-120 Molekülen Singulett-Sauerstoff, bevor das Tocochromanol selbst zerfällt (Fahrenholtz et al., 1974; Kamal-Eldin und Appelqvist, 1996).  $\alpha$ -Tocopherol gibt zunächst unter Bildung eines „*charge transfer exciplex*“ ein Elektron an Singulett-Sauerstoff ab. Darauf folgt ein „*intersystem crossing*“ und die Auflösung des Komplexes in  $\alpha$ -Tocopherol und Triplett Sauerstoff (Yamauchi und Matsushita, 1977; Thomas und Foote, 1978). Die zweite Möglichkeit der Entschärfung des Singulett-Sauerstoffs besteht in einer chemischen Reaktion mit  $\alpha$ -Tocopherol unter Bildung eines Hydroperoxids (Neely et al., 1988). Durch Spaltung des Chromanolringes entstehen aus dem Hydroperoxid Parachinon und Parachinonepoxid. Die Rate der chemischen Löschung des Singulett-Sauerstoffs beträgt jedoch lediglich 1 % der physikalischen Möglichkeit (Kaiser et al. 1990). Die Regeneration des  $\alpha$ -Tocopherols verläuft über Ascorbat (Abb. 1.4), wobei Glutathion

wiederum das gebildete Monodehydroascorbat zu Ascorbat regeneriert (Fryer, 1992; Noctor und Foyer, 1998).



**Abbildung 1.4:** Regeneration des  $\alpha$ -Tocopheroxyradikals. APX (Ascorbat-Peroxidase), MDHAR (Monodehydroascorbat-Reduktase, DHAR (Dehydroascorbat-Reduktase), GR (Glutathion-Reduktase).

### 1.5.3 Weitere Funktionen des $\alpha$ -Tocopherols

Zunehmend wird die Möglichkeit der Beteiligung des  $\alpha$ -Tocopherols an der Signaltransduktion diskutiert (Munné-Bosch und Alegre, 2002; Munné-Bosch, 2005). Für die tierische Zelle sind nicht-antioxidative Funktionen bereits hinreichend belegt (Azzi und Stocker, 2000; Azzi, 2007). Beispielsweise hemmt  $\alpha$ -Tocopherol eine Protein-Kinase C, erhöht die Aktivität der Phosphoprotein-Phosphatase-2A und hat Einfluss auf die Expression des  $\alpha$ -Tropomyosin-Gens (Brigelius-Flohé und Traber, 1999). Als nicht-antioxidative Funktionen werden eine Beteiligung an der Regulation des primären Kohlenhydratstoffwechsels (Russin et al., 1996; Hofius et al., 2004; Maeda et al., 2006) und die Wirkung als eine Art Auffanglager für Phytol aus dem Chlorophyllabbau im Verlauf der Seneszenz diskutiert (Ischebeck et al., 2006; Dörman, 2007).

## 1.6 Lichtstress

Übersteigt die Energie durch Lichteinstrahlung die Kapazitäten der Photosynthese, kann dies zu oxidativem Stress in der Zelle führen. Greifen die primären Schutzmechanismen wie strahlungslose Wärmedissipation oder Regulation der Antennengröße nicht mehr, dann kommt es zu Schäden am Photosyntheseapparat (Anderson und Andersson, 1988; Demmig-Adams und Adams, 1992; Aro et al., 1993; Horton et al., 1994). Wenn Schäden an den Photosystemen nicht mehr zu vermeiden sind, wird das D1-Protein im Reaktionszentrum des Photosystems II (PS II) oxidiert. Dieser Prozess wird Lichtschädigung genannt und führt zu einer Verringerung der Netto-Photosyntheseleistung, ist jedoch reversibel (Powles, 1984; Aro et al., 1993). Das D1-Protein verfügt über einen schnellen Turnover und kann im PS II ersetzt werden, ohne dass dieses zerfällt. Der Zustand der Photoinhibition tritt ein, wenn die Lichtschädigung die Neusynthese des D1-Proteins überflügelt. Insbesondere in Kombination mit anderen Stressoren, wie Kühle, kann Lichtstress zu Photoinhibition führen (Demmig-Adams und Adams, 1992).

Untersuchungen in *Chlamydomonas reinhardtii* haben gezeigt, dass  $\alpha$ -Tocopherol das D1-Protein im PS II unter Starklichtstress schützen kann, indem es Singulett-Sauerstoff „quencht“ (Trebst et al. 2002). Transgene Tabakpflanzen mit verringertem Tocopherolgehalt waren Lichtstress gegenüber empfindlicher (Grasses et al. 2001). Das gleiche galt bei niedrigen Temperaturen in Kombination mit Lichtstress für *Arabidopsis thaliana* (Havaux et al. 2005).

## 1.7 Cyanobakterien als Modellorganismus

Im verwendeten Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Anderson und McIntosh, 1991) konnte lediglich  $\alpha$ -Tocopherol nachgewiesen werden (Dähnhardt et al., 2002), so dass nur ein Tocochromanol mit den untersuchten Effekten in Verbindung gebracht werden kann. Im Gegensatz zur Situation in Höheren Pflanzen verfügen Cyanobakterien über einen alternativen Syntheseweg des Plastochinons, sodass eine Manipulation der Biosynthese des Tocopherols keine Auswirkung auf den Plastochinonpool hat (Dähnhardt et al. 2002). Neben diesen speziellen Besonderheiten tragen auch allgemeinere Eigenschaften zur Eignung des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 für die folgenden Untersuchungen bei. Das Bakterium verfügt über eine schnelle Vermehrungsrate, das Genom ist

durchsequenziert (Kaneko et al., 1996) und im Internet frei zugänglich. Es handelt sich um einen Süßwasserorganismus, der sich natürlich durch extrazellulär angebotene DNA transformieren lässt (Grigorieva und Shestakov 1982). Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, relativ einfach Insertions- und Deletionsmutanten herzustellen. Zudem existieren Cyanobakterien, die kein Tocopherol synthetisieren, womit ein direkter Vergleich von Tocopherol synthetisierenden Cyanobakterien mit Tocopherol freien Organismen der gleichen Gattung möglich ist.

## 1.8 Zielsetzung

Die Ziele der vorliegenden Arbeit sind zum einen, die Untersuchung des von der HPPD unabhängigen Weges der Cyanobakterien Plastochinon zu synthetisieren und zum anderen die Hinterfragung der Funktion von  $\alpha$ -Tocopherol in *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Dazu sollen über Deletionsmutagenese Mutanten erzeugt werden, in denen Gene eines postulierten alternativen Plastochinonbiosyntheseweges ausgeschaltet sind. Anhand der Phänotypen der Mutanten sollte dann abgeschätzt werden können, ob die betroffenen Gene für Proteine kodieren, die mit der Plastochinonbiosynthese korreliert sind.

Zur Aufklärung der Funktion von  $\alpha$ -Tocopherol in Cyanobakterien sollen zunächst Kulturbedingungen gefunden werden, die den Gehalt an  $\alpha$ -Tocopherol im Untersuchungsorganismus beeinflussen. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sollen dann genutzt werden, der Tocopherol defizienten  $\Delta$ -*hpd*-Mutante einen Phänotyp zuzuordnen zu können. Mit Hilfe des Phänotypes sollen dann Aussagen zur Funktion des Tocopherols in *Synechocystis* sp. PCC 6803 getroffen werden.

Experimente zur Trennung der Membranfraktionen des Cyanobakteriums sollen dazu dienen, die Tocopherolbiosynthese innerhalb des Organismus zu lokalisieren.

Datenbankrecherchen sollen eingesetzt werden, um Unterschiede in der genetischen Ausstattung verschiedener Cyanobakterien zu identifizieren. Dabei steht der Vergleich der Genome von Tocopherol synthetisierenden Cyanobakterien mit solchen, die kein Tocopherol synthetisieren, im Vordergrund.

## 2 Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt sind die Methoden und Materialien aufgeführt, die im Verlauf der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen.

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien waren, soweit nicht anderweitig vermerkt, von reiner Qualität und wurden von den Firmen Amersham Biosciences (Braunschweig), Biorad (München) Fisher Scientific (Düsseldorf), Invitrogen (Karlsruhe), Macherey und Nagel GmbH & Co KG (Düren), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), und Sigma (München) bezogen. Die verwendeten Enzyme wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Alle Lösungen wurden mit Wasser angesetzt, das durch die Seradest Anlage SD 2000 (USF Elga Seral, Ransbach-Baumbach) aufbereitet wurde.

### 2.2 Organismen und Anzucht

Zur Erlangung der vorliegenden Ergebnisse diente das einzellige Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 als zu untersuchender Organismus (Anderson und McIntosh, 1991).

#### 2.2.1. Kultivierung von *Synechocystis* sp. PCC 6803

Die Anzucht des Cyanobakteriums erfolgte unter autotrophen Bedingungen. Ausplattiert wurde auf Agarplatten, die 15 g Bacto Agar pro Liter BG-11 Medium (Rippka et al., 1979) enthielten. Diese wurden in der Klimakammer bei einer Temperatur von 28 °C und einer Lichtintensität von 50  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  gelagert. Als Vorkulturen dienten Schüttelkulturen à 50 ml BG-11 Medium in Erlenmeyerkolben, die in der Klimakammer auf einem Schüttler (GFL Shaker 3020) bei 100 rpm angezogen wurden. Für die durchgeführten Messungen wurde *Synechocystis* sp. PCC 6803 in Kulturröhren à 250 ml angezogen. Diese wurden in einer Kniese-Anlage (Kniese, Marburg, Deutschland) kontinuierlich mit Luft durchmischt. Bei Bedarf größerer Zellmengen wurde das Bakterium in 5 l-Flaschen angezogen, die

wiederum mit Hilfe von Pumpen beständig mit Luft durchflossen wurden. Zur dauerhaften Lagerung der Organismen wurden Gefrierkulturen hergestellt. Dabei wurden 500 µl ankonzentrierter Bakteriensuspension mit 250 µl 80 % Glycerin (v/v) versetzt und bei -80°C gelagert. Die Anzucht von Mutanten erforderte die Zugabe des entsprechenden Antibiotikums zum Medium.

### Zusammensetzung des BG-11 Mediums:

NaNO <sub>3</sub>	17,6 mM
MgSO <sub>4</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,304 mM
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,245 mM
Zitronensäure	31,2 µM
Na <sub>2</sub> EDTA	2,79 µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	46,3 µM
MnCl <sub>2</sub> * 4H <sub>2</sub> O	4,15 µM
NaMoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,61 µM
ZnSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O	0,77 µM
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	0,32 µM
NaCO <sub>3</sub>	188,7 µM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	175,1 µM
TES, pH 8	10 mM
FeNH <sub>4</sub> -Citrat	22,8 µm

### Agarplatten:

15 g Bacto Agar/l BG-11 Medium

## 2.3 Allgemeine Methoden

### 2.3.1 Isolierung von genomischer DNA

Zellen von Agarplatte wurden in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA\*H<sub>2</sub>O, pH 8,0) resuspendiert und mit 100 µl kaltem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1), 2 µl SDS (10 % w/v) und Glasperlen (∅ 0,5 mm) vermischt. Anschließend wurde 3 x 10 sec auf dem Vortexer geschüttelt und 2 min bei RT und 10620 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und eine Phenol-Chloroform-Extraktion sowie eine Ethanol-fällung abgeschlossen.

### 2.3.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Der wässrige Nucleinsäurehaltige Überstand nach dem Zellaufbruch wurde mit 100 µl kaltem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1) vermischt und 2 min bei RT und 10620 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem Überstand wiederholt, bis sich keine oder nur noch eine schwache Interphase ausbildete. Es folgten zwei Extraktionsschritte mit kaltem Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1). Im Anschluss wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt.

### 2.3.3 Ethanol-fällung

Nach der Phenol-Chloroform-Extraktion wurde der Überstand mit einem Zehntel des Volumens an 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) versetzt. Die Fällung der DNA erfolgte durch die Zugabe des 2,5-fachen Volumens eiskaltem Ethanol (100 %) und der Lagerung der Proben bei -20 °C für mindestens 2 Stunden oder bei -80 °C für 15 min. Die DNA wurde durch Zentrifugation für 15 min bei -9 °C und 17950 g pelletiert und mit 1000 µl eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nachdem die Proben für 5 min bei RT und 15700 g zentrifugiert wurden, wurde der Überstand verworfen und die Proben bei 37 °C getrocknet. Die Aufnahme der DNA erfolgte in 20 µl TE-Puffer durch wiederholtes Pipettieren oder Lösen über Nacht bei 4 °C.

### 2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde verändert nach Saiki (1985;1988) mit folgendem Standardansatz von 50 µl durchgeführt:

- 22,75 µl H<sub>2</sub>O
- 5 µl template DNA (2 ng genomische DNA/µl)
- 5 µl 10 x PCR-Puffer
- 3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 4 µl dNTPs (2,5 mM)
- 5 µl Primer 1 (5 pmol/µl)
- 5 µl Primer 2 (5 pmol/µl)
- 0,25 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

Der verwendete 10 x PCR-Puffer, die Taq-Polymerase und die Magnesiumchlorid-Lösung ( $MgCl_2$ ) stammen von MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), die dNTPs von Boehringer-Mannheim (Mannheim, Deutschland) und die Primer von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland). Die PCR-Reaktion wurde in einem PTC-200 Gradienten Cycler (MJ Research, Watertown, USA) nach unten stehendem Standardprogramm gefahren:

95 °C	1 min
95 °C	30 sec
X °C	1 min
72 °C	Y min
30-40 mal zurück zu Schritt 2	
72 °C	10 min
20 °C	$\infty$

Die Anmelztemperatur X wurde vom Datenblatt der Primer von der Firma Sigma-Aldrich übernommen. Die Verlängerungszeit Y richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Abschnitts. Pro 1000 Basenpaaren wurde eine Zeit von 1 min programmiert. Durch die Wahl der Primer konnten die synthetisierten DNA-Abschnitte an beiden Enden mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen versehen werden, um spätere Klonierungsschritte zu vereinfachen.

### 2.3.5 Ligation

Es wurden entweder PCR-Produkte direkt in die Ligation eingesetzt oder zuvor über ein präparatives Agarosegel und das Nucleo Trap Kit (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland) gereinigt. Als Klonierungsvektor wurde der pGem-T-Vektor nach Herstellerangaben genutzt. PCR-Produkte die nicht mit der Taq-Polymerase synthetisiert wurden, mussten zunächst mit 3' Adenosin Überhängen versehen werden. Dies erfolgte über folgenden Ansatz:

20 µl PCR-Produkt  
2,3 µl H<sub>2</sub>O  
3 µl 10 x PCR-Puffer  
1,8 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
2,4 µl dNTPs (2,5 mM)  
0,5 µl Taq-Polymerase

Die Reaktion wurde bei 72 °C für 15 min im Thermocycler (MJ Research PTC-150 Mini Cycler, Watertown, USA) durchgeführt.

Die Ligation erfolgte in allen Fällen über Nacht im Thermocycler (MJ Research PTC-150 Mini Cycler, Watertown, USA) und folgender Programmierung:

10 °C        30 sec  
auf 20 °C    in 0,4 °C Schritten alle 3 sec  
30 °C        30 sec  
auf – 20 °C in 0,4 °C Schritten alle 3 sec  
160 mal zurück zu Schritt 1

Abschließend wurde die Ligase 20 min bei 65 °C denaturiert.

### **2.3.6 Transformation von *Escherichia coli***

100 µl einer Zellsuspension kompetenter DH5α-*Escherichia coli* wurden vorsichtig mit 1-10 µl eines Ligationsansatzes (siehe 2.3.5) vermischt und 30 min auf Eis gestellt. Der Hitzeschock erfolgte für 60 sec bei 42 °C. Nach weiteren 2 min auf Eis erfolgte die Zugabe von 900 µl LB-Medium. Die Zellen wurden anschließend 1 h bei 37 °C und 80 rpm inkubiert (4400 Innova Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland). Auf LB-Agarplatten ausgestrichen wurde der Ansatz über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) gelagert und am darauffolgenden Tag nach ausreichendem Wachstum der Transformanden auf 4 °C umgesetzt.

### **2.3.7 Präparation von Pasmid-DNA aus *Escherichia coli***

Plasmide wurden aus 3 ml Bakteriensuspension isoliert. Es wurde das NucleoSpin Pasmid Kit (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

### **2.3.8 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren**

Die Auftrennung von DNA zu analytischen und präparativen Zwecken in Agarosegelen erfolgte nach der von Sambrook et al. (1989) beschriebenen Methode. Als Größenmarker und zur Quantifizierung der DNA wurde der  $\lambda$ -DNA/HindIII Marker (MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Die Elektrophorese wurde in Gelkammern (Biometra, Göttingen, Deutschland) unter Verwendung einer High Voltage Pack P30 Spannungsquelle (Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Vor der präparativen Verwendung wurden die gewünschten DNA-Banden aus dem Agarosegel heraus geschnitten und mittels des Nucleo Trap Kit (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers eluiert.

### **2.3.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Zur sequensspezifischen Hydrolyse von DNA wurden Restriktionsendonukleasen nach den Angaben des Herstellers (MBI Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland) verwendet.

### **2.3.10 Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente**

Der Sequenzanalyse lag die PCR-basierte Kettenabbruchmethode mit Didesoxynucleotiden nach Sanger et al. (1977) zugrunde. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben mit dem Cycle Reader Auto DNA Sequencing Kit (MBI, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) unter Verwendung fluoreszenzmarkierter (IRD 800) Oligonukleotide in einem Thermocycler (PTC-200 Gradienten Cycler, MJ Research, Watertown, USA) durchgeführt. Zur Auftrennung nach der Sequenzierungsreaktion wurde ein 0,25 mm dickes 6%iges (w/v) Polyacrylamidgel verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in einem LiCor DNA-Sequencer Long Readir 4200 (MWG, Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 1xTBE long run Puffer verwendet. 1,2  $\mu$ l Probe wurden bei einer Spannung von

50 V/cm aufgetrennt, die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Programme Image Manipulation und BaselmglR (MWG, Ebersberg, Deutschland).

<u>6 %iges Polyacrylamidgel</u>		<u>10xTBE long run Puffer (pH 8,3)</u>	
Harnstoff	21 g	Tris	162,33 g
H <sub>2</sub> O	28 ml	Borsäure	27,82 g
10xTBE long run	5 ml	EDTA	9,31 g
Rapid Gel XL sol 40 % (w/v)	7,5 ml	ad 1 l H <sub>2</sub> O	
DMSO	0,5 ml		

### 2.3.11 Fusions-Polymerase-Kettenreaktion (Fusions-PCR)

Zur Deletion von Genen des Genoms des Bakteriums wurden DNA-Konstrukte über die Fusions-PCR hergestellt. Zunächst wurden PCR-Produkte synthetisiert, die Bereichen von circa 300 bp stromauf- und stromabwärts des Gens homolog waren. Dabei wurden die Primer so konstruiert, dass an das Ende des jeweiligen PCR-Produkts, welches an das auszuschaltende Gel angrenzte, 20 bp angehängt wurden, die dem 5'- bzw. 3'- Ende einer gewählten Antibiotikum-Resistenzkassette entsprachen. Die Antibiotikum-Resistenzkassette wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen aus einem Plasmid geschnitten, die entsprechende DNA-Bande über eine Agarosegel-Elektrophorese und anschließender Gelelution gereinigt. In der folgenden PCR wirkten die Überhänge der PCR-Produkte als Primer. Die PCR-Produkte und die Antibiotikum-Resistenzkassette wurden in einem Verhältnis von 1:1:1 in die Fusions-PCR eingesetzt. Es wurden 3 verschiedenen Ansätze durchgeführt, wobei der Gehalt an gesamter DNA 20, 50 und 100 ng betrug. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler (PTC-200 Gradienten Cyler, MJ Research, Watertown, USA) durchgeführt.

<u>Fusions-PCR-Gemisch</u>		<u>Temperaturverlauf</u>	
DNA	20-100 ng	95 °C	1 min
Pfu-Polymerase	0,4 µl	95 °C	30 sec
Puffer (10x)	5 µl	60 °C	5 min
dNTPs (2,5 mM)	4 µl	68 °C	25 min
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl	30 x zurück zu Schritt 2	

Im Anschluss an die Fusions-PCR erfolgte eine Reamplifikation der Fusionsprodukte in einer herkömmlichen PCR-Reaktion mit den äußeren Primern der ursprünglich hergestellten PCR-Produkte. Dabei wurde die Fusions-PCR-Reaktion jeweils in einer 1:100, einer 1:1000 und einer 1:10000 Verdünnung eingesetzt. Zur weiteren Verwendung wurde das Fusionsprodukt über ein präparatives Agarosegel und anschließende Elution aufgereinigt. Es folgten die Ligation in einen Vektor, die Sequenzanalyse und schließlich die Transformation in *Synechocystis* sp. PCC 6803.

### **2.3.12 Transformation von *Synechocystis* sp. PCC 6803**

Für die Transformation von *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurden Zellen in der frühen exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Dazu wurden 250 ml Kulturröhren angeimpft und am nächsten Tag mit frischem BG-11 Medium auf eine optische Dichte von 0,15 verdünnt. Am dritten Tag wurde unter dem Mikroskop anhand der Zellteilungsaktivität kontrolliert, ob sich die Zellen in der frühen exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die OD sollte bei circa 0,3 gelegen haben. Die Zellen wurden 10 min bei RT und 3200 g zentrifugiert und in 1 ml frischem BG-11 Medium aufgenommen. 300 µl der Suspension wurden mit 6 µg DNA (in maximal 10 µl gelöst) versetzt und 3 h bei 30 °C im Wasserbad dunkel inkubiert. BG-11 Agarplatten wurden mit einer sterilen Nitrocellulosemembran belegt und 90 µl der Zellsuspension darauf ausgestrichen. Je Transformation wurden auf diese Weise 3 Platten hergestellt. Nach 2 Tagen wurde die Nitrocellulosemembran auf BG-11 Agarplatten überführt, die das der verwendeten Resistenzkassette entsprechende Antibiotikum enthielten. Nach 2-4 Wochen konnten Einzelkolonien gepickt werden und auf BG-11-Agarplatten mit Antibiotikum ausgestrichen. Zur vollständigen Segregation wurden die Transformanten 4-6 mal auf frische Platten überimpft. Die Transformation wurde mittels PCR oder Southern Blot überprüft.

## **2.4 Physiologische Parameter**

### **2.4.1 Optische Dichte**

Die optische Dichte der Zellsuspension wurde am Photometer (MPS-2000, Shimadzu, Kyoto, Japan) bei 750 nm gegen BG11-Medium gemessen.

### **2.4.2 Chlorophyllgehalt**

Die Bestimmung des Chlorophyllgehalts der Zellen erfolgte nach Lichtenthaler (1987). Je nach optischer Dichte der Kulturen wurde ein Aliquot von 0,1 – 1 ml abgenommen und 10 min bei 15700 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml Methanol aufgenommen und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Proben 10 min bei 17950 g zentrifugiert und die Extinktion am Photometer (MPS-2000, Shimadzu, Kyoto, Japan) bei 665 nm, 665,5 nm, 666 nm, 666,5 nm und 750 nm gegen Methanol als Referenz bestimmt. Der bei 750 nm gemessene Wert (x) dient zur Streuungskorrektur, der höchste Wert zwischen 665 und 666,5 nm (y) wird zur Berechnung der Chlorophyll Konzentration herangezogen. Die Werte wurden in folgende Gleichung eingesetzt:  $(y-x)/0,0809$ .

### **2.4.3 Tocopherolgehalt**

#### **2.4.3.1 Gefriertrocknung**

Zellen der späten exponentiellen Wachstumsphase wurden geerntet und über Nacht gefriergetrocknet (Gefrieretrockner der Firma Christ, Osterode/Harz).

#### **2.4.3.2 Acetonextraktion**

20 mg der gefriergetrockneten Probe wurden mit 200 µl Aceton versetzt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Am folgenden Tag wurde der Ansatz 10 min bei 5000 g und RT zentrifugiert, der Überstand abgenommen. Anschließend wurde 5x mit 200 µl Aceton reextrahiert. Die vereinigten Überstände wurden wiederum für 10 min bei 5000 g und RT zentrifugiert, der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Flüssigkeit wurde unter N<sub>2</sub>-Begasung verdampft, der Rückstand in

200 µl n-Heptan aufgenommen. Bis zur HPLC-Untersuchung wurde der Extrakt bei -20 °C gelagert.

### 2.4.3.3 HPLC-Messung

20 µl der Lösung aus 2.4.3.2. wurden in die HPLC eingespritzt (Dähnhardt et al., 2002). Zur Auswertung der Chromatogramme wurde die Class VP Software (Shimadzu, Kyoto, Japan) eingesetzt. Die Auftrennung der Vitamin E Derivate erfolgte mittels einer 510 HPLC-Pumpe (Waters, Milford, USA), einem SIL-10ADVP Autosampler (Shimadzu, Kyoto, Japan) und einer LiChrospher<sup>®</sup> Si60 (5 µm) HPLC-Säule (Merck, Darmstadt, Deutschland). Zur Detektion wurde ein RF-10AXL Fluoreszenz-Detektor bei einer Emissions-Wellenlänge von 328 nm eingesetzt. Die Flussrate betrug 1 ml/min mit n-Heptan/2-Propanol (99,5:0,5 (v/v)) als Lösungsmittel.  $\alpha$ -Tocopherol wurde durch Vergleichen mit externen Tocopherol-Standards (Merck, Darmstadt, Germany) identifiziert. Zur Analyse von Plastochinon wurden ein 484 Absorptions-Detektor (Waters, Milford, USA), ein SPD-M10AvP Photodioden-Array-Detektor (Shimadzu, Kyoto, Japan) und eine LiChrosorb<sup>®</sup> Si100 (5µm) Säule (VDS-Optilab, Berlin, Deutschland) eingesetzt. Die Flussrate betrug 1ml/min mit n-Heptan/2-Propanol (99,95:0,05 (v/v)) als Lösungsmittel. Die Absorption bei 254 nm wurde gemessen und Plastochinon über das Absorptionsspektrum identifiziert. Zusätzlich wurde Decyl-Plastochinon (Sigma, St. Louis, USA) als Standard eingesetzt. Die Tocopherol und Plastochinon Mengen werden als Peakfläche/mg Lyophilisat angegeben.

### 2.4.4 Sauerstoffproduktion

Als weiteres Maß der Funktionalität des PS II wurde die Sauerstoffproduktion einer Zellsuspension mit einem Chlorophyllgehalt von 2 µg/ml vor und nach einem Lichtstress von 30 min und 2000 µE/m<sup>2</sup>/s festgehalten. Gemessen wurde in einer auf 28 °C temperierten Sauerstoffelektrode (Hansatech Inst. Norfolk, UK), die zuvor mittels Natriumdithionit kalibriert worden war. Aufgenommen wurde die maximale Sauerstoffproduktion unter Lichtsättigungsbedingungen.

### 2.4.5 PAM-Messungen

Für die Messungen mit dem Pulse Amplitude Modulation Fluorometer wurde jeweils 1 ml einer Zellsuspension mit einem Chlorophyllgehalt von 2 µg/ml verwendet. Eingesetzt wurden ein PAM 101 (Walz, Effeltrich, Deutschland) mit einem Küvettenzusatzmodul ED-101 US/M für Flüssigproben (Walz, Effeltrich, Deutschland). Als aktinische Lichtquelle bzw. Sättigungs-Blitzlampe wurden Schott KL 1500-Lampen (Schott bzw. Walz, Effeltrich, Deutschland) benutzt. Vor jeder Messung wurde die Zellsuspension in der Küvette 5 min dunkel inkubiert. Als Lichtstress wurden 270 µE/m<sup>2</sup>/s eingestrahlt. Alle 10 Minuten wurde ein Sättigungsblitz gegeben, um den Genty-Koeffizienten ( $(F_m' - F')/F_m'$ ) bestimmen zu können. Diese variable Fluoreszenz dient als Maß für die Anzahl der reaktionsfähigen PS II-Zentren.

## 2.5 Proteinbiochemie

### 2.5.1 Präparation von Gesamtprotein-Extrakten

50-250 ml Zellsuspension wurden 10 min bei RT und 3200 g zentrifugiert und in 450 µl Kaliumphosphat-Puffer (20mM, pH 7,8) aufgenommen. Es wurden Glasperlen (Ø 0,17-0,18 mm) hinzugegeben, bis über den Perlen noch ca. 2 mm Flüssigkeit standen. Das Gemisch wurde 3 x 2 min und 1 x 1 min auf dem Vortex gemischt und zwischen den einzelnen Schritten auf Eis gekühlt. Im Anschluss wurden die Proben ununterbrochen gekühlt und eine min bei 876 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Zu den Glasperlen wurden 400 µl Kaliumphosphat-Puffer pipettiert und kurz gemischt. Die Probe wurde erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis die Glasperlen weitestgehend entfärbt waren. Die vereinigten Überstände wurden 10 min bei 1328 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde als Gesamthomogenat eingefroren oder 15 min bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert, um Membranen und lösliches Protein zu trennen. Das Membranpellet wurde gegebenenfalls in Kaliumphosphat-Puffer resuspendiert.

### 2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1979) erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau, welches unspezifisch an Proteine bindet und eine konzentrationsabhängige Extinktionsänderung 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, 15µg, 20 µg) und Bradford Dye (Bio-Rad Protein-Assay Dye Reagent Concentrate, Bio Rad, Bad Soden) 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.

### 2.5.3 Proteinbestimmung nach Peterson

Für den Peterson Protein Essay (Peterson, 1977) wurden von den zu testenden Proben jeweils 2,5 bzw. 5 µl eingesetzt. Diese Proben wurden nun mit Wasser auf 0,5 ml aufgefüllt und mit 0,5 ml Lösung I versetzt. Nach kurzem Vortexen folgte eine 10 minütige Inkubation. Dann wurde 0,25 ml Lösung II zupipettiert. Die Proben wurden erneut gevortext und für 30 min inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei  $\lambda = 750$  nm am Photometer (Shimadzu UV-2501 PC). Beim Leerwert wurde die zu messende Protein-Probe durch Wasser ersetzt.

Die Proteinkonzentration wurde anhand einer BSA (0,02 % (w/v)) Standardreihe über eine Kalibrierungskurve bestimmt.

#### Lösung I:

CTC : 0.8 M NaOH : 10% SDS (w/v): H<sub>2</sub>O (1:1:1:1)

#### CTC:

0,1%CuSO<sub>4</sub> (w/v)

0,2%NaK Tartrat (w/v)

10%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (w/v)

#### 2. Lösung B:

Folin (Roth) : H<sub>2</sub>O (1:5)

### 2.5.4 Acetonfällung von Proteinen

Die benötigte Menge Proteinextrakt bzw. Membransuspension wurde mit der 4-fachen Menge Aceton versetzt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Am nächsten Tag wurde die Probe für 15 min bei 15700 g und 0 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in SDS-Gel Auftragspuffer (siehe Probenpuffer 2.5.5) aufgenommen.

### 2.5.5 SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verändert nach Laemmli (1970) gemäß ihrer Molmasse aufgetrennt. Die Mini-Gele (8,5 \* 6,5 cm) setzten sich wie folgt zusammen:

	<u>10 %iges Trenngel:</u>	<u>6 %iges Sammelgel:</u>
Tris-HCl	3,45 ml (1,5 M, pH 8,8)	935 µl (1 M, pH 6,8)
Harnstoff	5,4 g	2,69 g
Acrylamid/Bis	5 ml (30 % (v/v)/0,8 % (v/v))	1,49 ml (30 % (v/v)/0,8 % (v/v))
H <sub>2</sub> O bidest.	2,16 ml	2,91 ml
SDS	300 µl (20 % (w/v))	150 µl (20 % (w/v))
TEMED	7,5 µl	7,5 µl
APS	40 µl (10 % (w/v))	40 µl (10 % (w/v))
	<hr/>	<hr/>
	15 ml	7,5 ml

#### 10 x Elektrophoresepuffer:

Tris	0,25 M
Glycin	1,92 M
SDS	1 % (w/v)

#### Probenpuffer:

SDS	10% (w/v)
1,4-Dithiothreitol	20 % (w/v)
Saccharose	35 % (w/v)
Bromphenolblau	0,025 % (w/v)
Tris (pH 6,8)	275 mM

Für die Gelelektrophorese wurde zum Einlaufen der Proben in das 1 mm dicke Gel eine Stromstärke von 5 mA pro Gel angelegt und später auf 10 mA erhöht. Die Proben wurden 1: 1 mit Probenpuffer gemischt, für 10 min bei 95 °C erhitzt und dann zusammen mit dem See Blue Plus Pre-Stained Standard-Marker (Invitrogen, Karlsruhe) oder dem Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) auf das Gel aufgetragen.

### **2.5.6 Silberfärbung von Proteinen im SDS-Gel**

Das Gel wurde nach Blum et al. (1987) 1,5 h im Fixierer (30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig) geschüttelt. Daraufhin folgten jeweils zwei Waschschriffe von je 15 min in 20 % (v/v) Ethanol bzw. H<sub>2</sub>O. Zur Reduktion der Proteine wurde 1,5 min mit Thiosulfat-Lösung (0,02 % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (w/v)) inkubiert. Anschließend wurde 2 x 20 sec mit H<sub>2</sub>O gewaschen bevor das Gel für 30 min in Silbernitratlösung (2 g AgNO<sub>3</sub>/l) geschüttelt wurde. Es folgten 2 Waschschriffe zu je 10 sec mit H<sub>2</sub>O. Zur Entwicklung der Banden wurde das Gel für 3-5 min in einer Lösung aus Natriumcarbonat (30 g/l), Formaldehyd (700 µl/l) und Thiosulfat (10 mg/l) geschwenkt. Abschließend wurde das Gel für 1 min im Stoppreagenz belassen (50 g Tris Base/l, 25 ml/l).

### **2.5.7 Coomassiefärbung von Proteinen im SDS-Gel**

Das Acrylamidgel wurde über Nacht in der Coomassie-Färbelösung (Coomassie Brilliant Blue, 10 % (v/v) Eisessig, 40 % (v/v) Methanol) geschwenkt. Am nächsten Tag wurde der überschüssige Farbstoff durch mehrfaches Waschen in der Entfärbelösung (10 % (v/v) Eisessig, 40 % (v/v) Methanol) aus dem Gel entfernt.

### **2.5.8 Immunoblot von Proteinen – Western Blot**

Es wurden sechs Whatman Filterpapiere (Schleicher und Schnell, Dassel) sowie eine Porablot-NCP Membran (Macherey Nagel, Düren) auf die Größe des zu blottenden Gels zurechtgeschnitten. Die Filterpapiere, das Gel und die Membran wurden kurz in Western Blot Transferpuffer geschwenkt. Der Aufbau der Blotapparatur sah bei unten angeordnetem Pluspol folgendermaßen aus:

- 3 Whatmanpaper
- Gel
- NCP Membran
- 3 Whatmanpaper

Es wurde eine Stromstärke von  $0,7 \text{ mA/cm}^2$  für 30 min angelegt.

### Western-Blot-Transferpuffer:

2,93 g Glycerin

5,81 g Tris

0,375 g SDS

200 ml Methanol

mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest auf 1 l auffüllen

Die Membran wurde kurz in 1x TBS gewaschen. Zum Absättigen der Membran wurde sie dann für 1 h in 1x TBS mit 5 % (w/v) Milchpulver (Biorad Blotting Grade Blocker Non Fat Dry Milk) leicht geschüttelt. Danach wurde die Membran 2x 5 min in TTBS gewaschen. Der primäre Antikörper in TTBS mit 1 % (w/v) Milchpulver wurde hinzugegeben und mit der Membran über Nacht geschüttelt. Die primären Antikörper waren 1:1000 verdünnt. Am nächsten Tag wurde die Membran 5x 5 min mit TTBS gewaschen und für 1 h mit dem sekundären Antikörper (HRP-Antikörper-Konjugat) inkubiert. Der sekundäre Antikörper war in einem Verhältnis 1:10000 in einer TTBS Lösung mit 1 % Milchpulver (w/v) verdünnt. Anschließend wurde die Membran wieder 5x 5 min in TTBS gewaschen und 2x 5 min in TBS.

Danach folgte die Inkubation mit der Substratlösung. Diese war ein 1:1 Gemisch aus Lösung I und Lösung II. Nach der Inkubationszeit wurde die Membran in eine neue Folie eingeschweißt und die Luftblasen weggestrichen. Die Detektion der Chemolumineszenz auf einem unbelichteten Film (Hyperfilm ECL High performance chemiluminescence film, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) geschah in der Dunkelkammer. Die Expositionszeit wurde je nach Antikörper bzw. Signalintensität bestimmt. Teilweise lag sie zwischen 1-30 sec aber auch bei 10-15 min. Für die Filmentwicklung wurde der Film 5 min im Entwickler, danach kurz im Wasserbad und zum Schluss, bis der Film klar war, im Fixierer geschwenkt.

5x TBS:

2,5 mM NaCl

100 mM Tris (pH 7,5)

TTBS:

1x TBS mit 0,05 % Tween-20 (v/v)

Lösung I (pH 8,5):

2,5  $\mu$ M Luminol (3- Aminophtalhydrazid)

400  $\mu$ M p-Coumarsäure

100 mM Tris pH 8,5

Lösung II (pH 8,5):

5,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

100 mM Tris pH 8,5

Entwickler (Roentoroll HC, 3-teilig):

500 ml Part 1

50 ml Part 2

50 ml Part 3

mit H<sub>2</sub>O bidest auf 2 l auffüllen

Fixierer (Superfix MRP, 2-teilig):

400 ml Part 1

100 ml Part 2

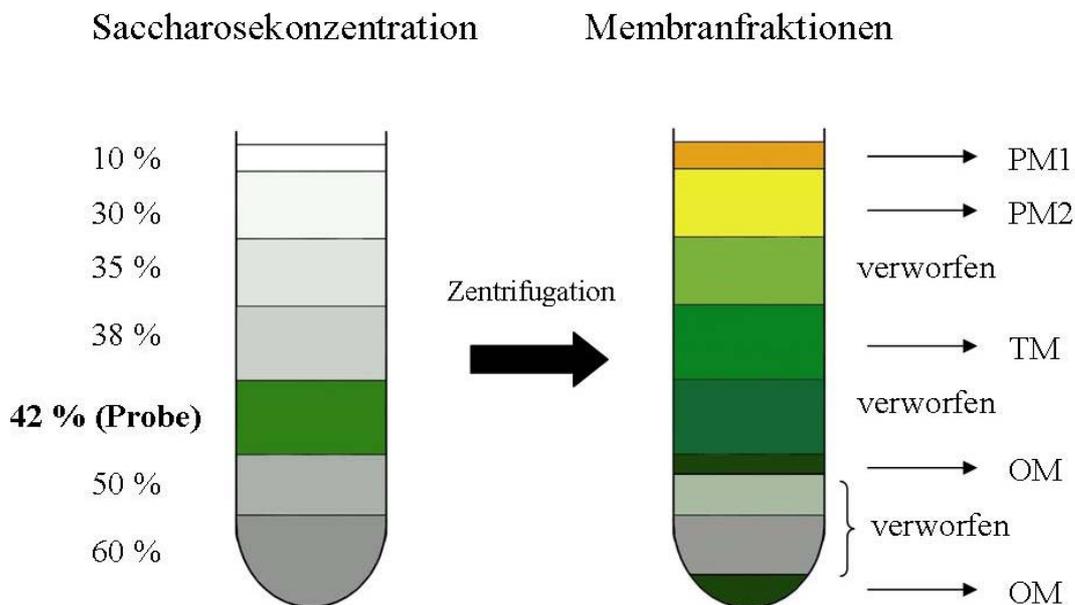
mit H<sub>2</sub>O bidest auf 2 l auffüllen

## 2.6 Membranisolierung

### 2.6.1 Dichtegradientenzentrifugation

Der Saccharosegradient wurde nach Norling et al. 1998 verwendet (Abb. 2.1). Um eine Auftrennung in die verschiedenen Membranfraktionen vorzunehmen wurden die jeweiligen Kulturen (2 l Kulturvolumen) wie in 2.2.1 beschrieben bis zu einer OD von eins kultiviert und dann wie in 2.5.1 aufgebrochen sowie die Gesamtmembranen isoliert. Die resultierenden Membranpellets wurden so in Kaliumphosphat-Puffer (KPi-Puffer) aufgenommen und homogenisiert, dass nicht mehr als 8 g Membran-Homogenisat resultierten. In diesem Homogenisat wurden dann 0,724 g Saccharose

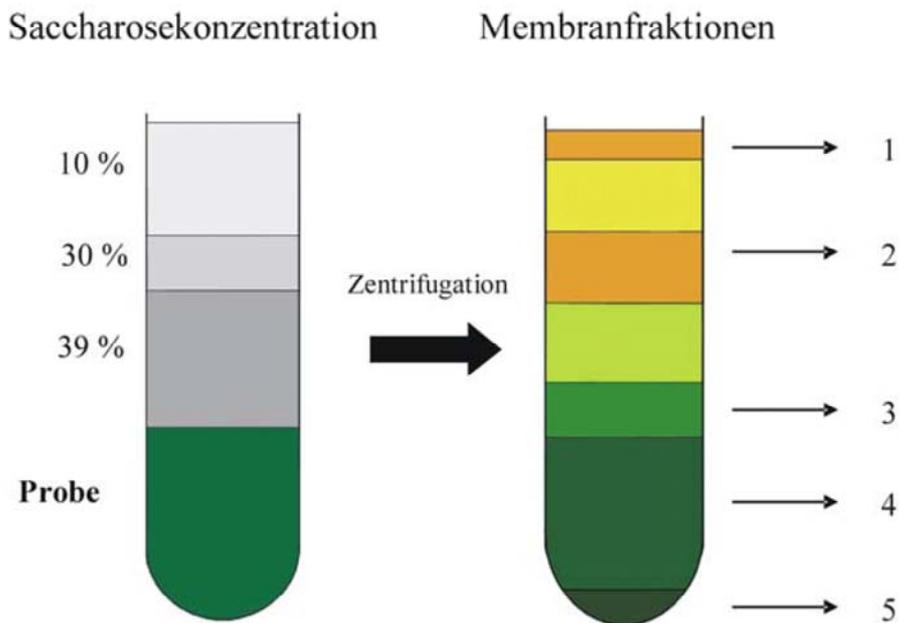
pro g Homogenisat gelöst. Der Saccharosegradient wurde folgendermaßen präpariert: 5 ml 60 % (w/v), 5 ml 50 % (w/v), 6 ml fertige Probe, 6 ml 38 % (w/v), 6 ml 35 % (w/v), 5 ml 30 % (w/v) und 1,7 ml 10 % (w/v) Saccharoselösung wurden vorsichtig überschichtet. Der Gradient wurde dann für 12-15 h bei 25000 rpm und 4 °C in der Ultrazentrifuge Centrikon T-1065 mit dem Rotor TFT 28.38 zentrifugiert. Die Membranfraktionen wurden nun vorsichtig vom Gradienten (Abb. 2.1) abgenommen und getrennt weiterverarbeitet.



**Abbildung 2.1:** Schema der Dichtgradientenzentrifugation PM1 = Plasmamembran (rein), PM2 = Plasmamembran (leicht verunreinigt) TM = Thylakoidmembran (verunreinigt), OM = Außenmembran (verunreinigt) (Norling et al., 1998; Helbig, 2005)

Alle Fraktionen wurden vor einer weiteren Reinigung bzw. direkten Verwendung (nur PM1) 3-5-fach mit KPi-Puffer verdünnt und 40 min bei 12000 g in der Ultrazentrifuge Centrikon T-1065 mit dem Rotor TFT 70.38, 4°C zentrifugiert, um die Saccharose zu entfernen. Um die Fraktionen zu reinigen und saubere Thylakoid bzw. Plasmamembranen zu erhalten, wurden die Pellets nach der Zentrifugation in möglichst wenig 0,25M Saccharose/5mM KPi-Puffer resuspendiert und homogenisiert. Es dürfen nicht mehr als 7,5 g Probe pro Fraktion resultieren. Die Proben wurden dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert. Die verunreinigten Fraktionen (PM2, TM, OM) wurden dann mit einem wässrigen Zwei-Phasen Gemisch aus Polyethylenglycol und Dextran weiter gereinigt (siehe 2.1.5)

Der 2. Saccharosegradient wurde nach Murata und Omata, 1983 verwendet (Abb. 2.2). Die Kulturen wurden hierfür auch bis zu einer OD von 1 angezogen, aber dann anders weiterbehandelt. Die aus 2 l Kultur geernteten Zellpellets wurden in 50 ml Puffer A resuspendiert und bei 3000 g 5 min zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge 5804R). Die Pellets wurde dann wieder in 50 ml Puffer A aufgenommen, erneut zentrifugiert und in 100 ml Lysis-Puffer resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension für 2 h in einem 250 ml Erlenmeyer-Kolben bei 30 °C im Licht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch eine erneute Zentrifugation bei 3000 g für 5 min, pelletiert. Es folgen zwei Waschschriffe mit Puffer B, in dem das Zellpellet danach auch aufgenommen wurde (20 ml). Es wurden 200 µl DNaseI (1 U/ µl) hinzugegeben und die Zellsuspension durch zwei French Press (French Pressure Cell Press von SIM Aminco Spectronic Instruments ; Jessup, Maryland) Durchgänge (1200 psi) aufgebrochen. Das Zellhomogenat wurde dann bei 5000 g und 4°C 10 min zentrifugiert, und der Überstand mit 15 ml 90 % (w/v) Saccharoselösung versetzt. Nun wurde der Gradient wie folgt präpariert: 15 ml Probe wurden mit 10 ml 39 % (w/v), 3ml 30 % (w/v) und 10 ml 10 % (w/v) Saccharoselösung überschichtet. Der Gradient wurde dann bei 27000 rpm, 4 °C über Nacht zentrifugiert (Ultrazentrifuge Centrikon T-1065 mit dem Rotor TFT 28.38). Die Fraktionen wurden dann abgenommen mit Puffer C verdünnt und bei 120000 g mit dem Rotor TFT 70.38 1 h zentrifugiert und damit die Membranen pelletiert. Die Pellets wurden dann in Puffer C wieder resuspendiert.



**Abbildung 2.2:** Schema der Dichtgradientenzentrifugation nach Omata und Murata, 1983. 1 = unbekannt, 2 = Plasmamembran, 3 = Thylakoidmembran, 4 = Fraktion mit Rotfluoreszenz, 5 = Außenmembran mit Zellwänden (Pellet) (Helbig, 2005).

Puffer A:

5 mM HEPES, 1mM PMSF

Puffer B:

20 mM HEPES, 600 mM Saccharose, 1 mM PMSF

Puffer C:

20 mM HEPES

Lysis-Puffer:

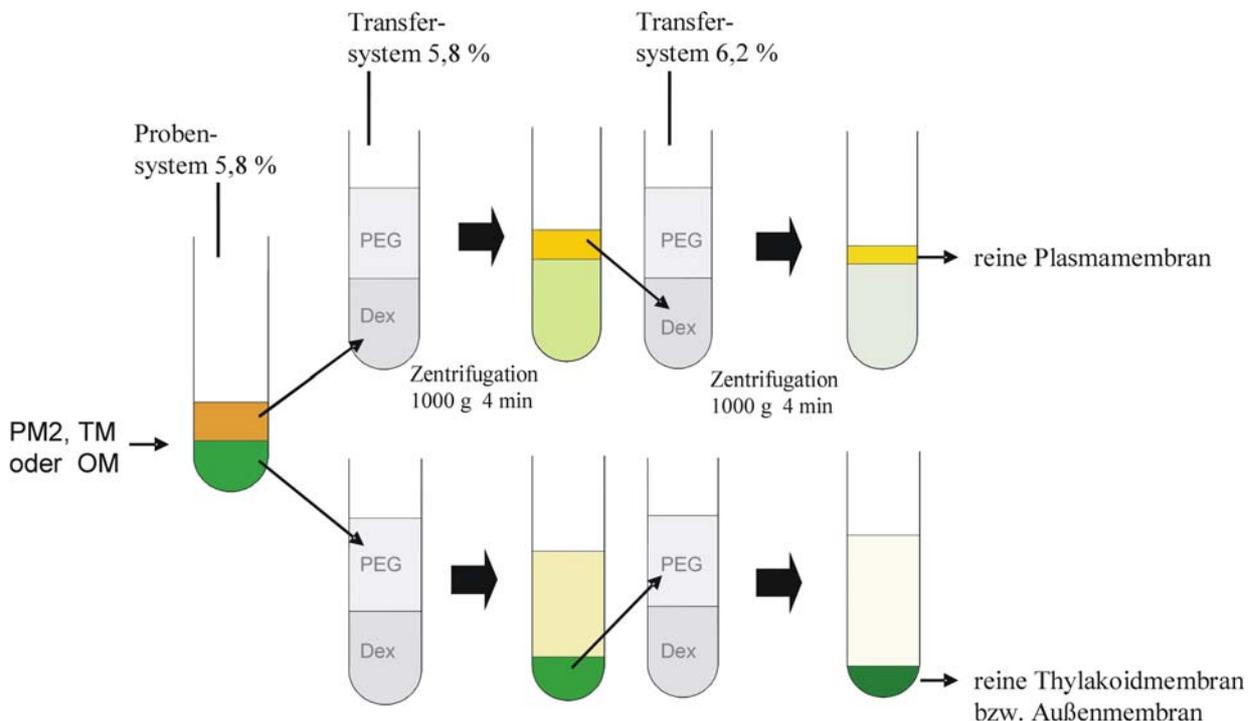
10 mM HEPES, 600 mM Saccharose, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2,5 mg/ ml Lysozym

Saccharoselösungen:

90 % (w/v) bzw. 39% (w/v) bzw. 30 % (w/v) bzw. 10 % (w/v) Saccharose in 20 mM HEPES mit 0,2 mM PMSF

## 2.6.2 Zwei-Phasen Membranisolierung

Die Durchführung erfolgte nach der Methode von Larsson 1985 und Norling et al. 1998 (Abb. 2.3). Pro zu reinigender Membranfraktion wurden ein 20 g-Probensystem und zwei bis drei 40 g-Transfersysteme (5,8 % (v/v)) sowie ein bis zwei 40 g-Transfersysteme (6,2 % (v/v)) in 50 ml Sarstedt Röhrchen hergestellt.



**Abbildung 2.3:** Schema der Zwei-Phasen Membrantrennung PEG = Polyethylenglycolhaltig, Dex = Dextranhaltig, In der unteren Phase reichern sich die Thylakoid-, in der oberen die Plasmamembran an. Die dünnen Pfeile geben an, mit welcher Phase des neuen Transfersystems die entsprechende Fraktion versetzt wurde. Die extrahierten Verunreinigungen wurden verworfen (Norling et al., 1998; Helbig, 2005).

Die Fraktion wurde nun auf ein 20 g-Probensystem gegeben. Probensystem und Transfersysteme wurden auf Eis in den Kühlraum gestellt. Wenn die Lösungen 2 – 3 °C erreicht hatten wurden die Röhrchen mit Impuls 35x über Kopf geschüttelt. Die Separation der zwei Phasen wurde durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5804R; Eppendorf, Hamburg) bei 1500 g und 0 °C für 4 min erreicht. Im Probensystem reichern sich nun die Thylakoide in der unteren, Dextranhaltigen Phase an. In der oberen PEG-reichen Phase reichern sich die Plasmamembranvesikel an. Auf die Thylakoidhaltige untere Phase des Probensystems wurde nun die obere Phase eines 5,8 % (v/v) Transfersystems gegeben. Nachdem die

Polymergemische wieder auf 2 - 3 °C gekühlt wurden, konnten durch Schütteln und zentrifugieren (wie oben) die Phasen wieder getrennt werden. Die Thylakoide hatten sich nach der Zentrifugation wieder in der unteren Phase angereichert, während die Plasmamembran in der oberen Phase verblieb. Diese konnte wieder abgenommen werden und die Thylakoidphase ein weiteres Mal mit der oberen Phase eines Transfersystems gewaschen werden. Diese Schritte wurden zwei- bis dreimal mit 5,8 % (v/v) Transfersystemen und ein- bis zweimal mit 6,2 % (v/v) Transfersystemen wiederholt, bis die obere Phase keine erkennbaren Verunreinigungen durch Plasmamembrananteile mehr aufwies. Bei der Reinigung der Außenmembran wurde genauso verfahren, wobei sich auch hier die Außenmembran in der unteren Phase anreicherte.

Um die Polymere aus der Probe zu entfernen, wurde die Lösung 4 - 6-fach mit 2-Phasen Puffer verdünnt und 40 min bei 12000 g in der Ultrazentrifuge Centrikon T-1065 mit dem Rotor TFT 70.38 und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Membranpellet in einem möglichst kleinen Volumen des 2-Phasenpuffers resuspendiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

### 1 M Sacharose/20 mM KPi-Puffer:

171,15 g Saccharose mit 20 mM Kaliumphosphat-Puffer auf 500 ml auffüllen

### 2-Phasenpuffer:

0,25 M Sacharose/5 mM KPi-Puffer

### 20 % Dextran (w/w):

In ein 2 l Becherglas wurden 220 g Dextran T-500 auf 780 ml H<sub>2</sub>O eingewogen. Um das Dextran zu lösen, ließ man es über Nacht bei 4°C rühren. Von der Lösung wurden dann exakt 5g abgenommen und in einem Messkolben auf 50 ml mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Zwei solche Proben wurden hergestellt. Der Drehwinkel (a) dieser Proben wurde dann in einem Polarimeter bestimmt. Die Dextrankonzentration wurde dann mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Konz. \% Dex (w/w)} = \frac{a \times 50 \times 100}{199 \times \text{Gewicht (g)}}$$

Gewicht steht dabei für die abgenommene Probe. In diesem Fall 5 g. Über das Gewicht der gesamten Dextranlösung konnte nun die Menge an H<sub>2</sub>O berechnet werden, die nötig war um die Dextrankonzentration auf genau 20 % (w/w) zu bringen. Nach der entsprechenden Verdünnung wurde die Lösung vorsichtig gerührt und bei -20 °C eingefroren.

### PEG:

400 g Polyethylenglycol 3350 mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

### Proben- und Transfersysteme:

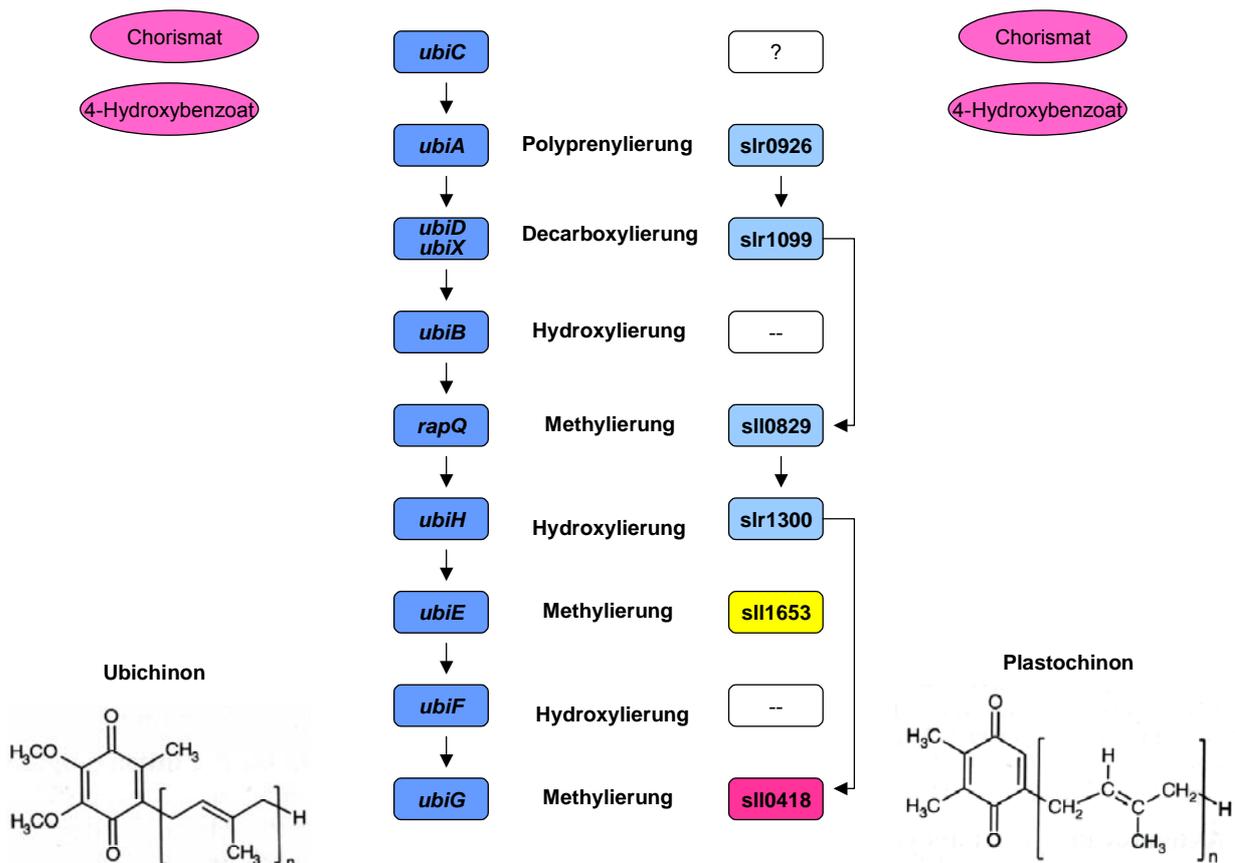
	20% Dex	40 % PEG	H <sub>2</sub> O	1 M Sacharose/ 20 mM KP <sub>i</sub> - Puffer	Membranprobe in 2-Phasen Puffer
20 g Proben- system (5,8 %)	5,8 g	2,9 g	0,675 g	3,125 g	7,5 g
40 g Transfer- system (5,8 %)	11,6 g	5,8 g	12,6 g	10 g	
40 g Transfer- system (6,2 %)	12,4 g	6,2 g	11,4 g	10 g	

### 3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel, die Plastochinon- und vor allem die Tocopherolbiosynthese sowie die Funktion des Tocopherols des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 zu untersuchen. Das erste Kapitel zeigt Untersuchungen zur Überprüfung eines Modells des in Cyanobakterien vorhandenen unbekanntem alternativen Plastochinonbiosyntheseweges (Dähnhardt et al., 2002) mittels Deletionsmutanten. In Kapitel zwei wird gezeigt, inwieweit abiotische Faktoren den Tocopherolgehalt des Wildtypes beeinflussen, während Kapitel drei die Folgen eines Tocopherolmangels anhand des Phänotypes der  $\Delta hpd$ -Mutante beschreibt. Mit Hilfe der Technik der Membranfraktionierung wird in Kapitel vier eine Lokalisierung der Tocopherolbiosynthese innerhalb der Zelle angestrebt. Die Ergebnisse verschiedener Datenbankrecherchen werden in Kapitel 5 zusammen gefasst.

#### 3.1 Experimente zum hypothetischen Plastochinonbiosyntheseweg

Anhand von Sequenzvergleichen mit den Genen, die in *Escherichia coli* für die Enzyme des Ubichinonbiosyntheseweges kodieren, wurden Gene von *Synechocystis* sp. PCC 6803 zu einem hypothetischen alternativen Plastochinonbiosyntheseweg zusammengefügt (Abb. 3.1). Bei der Synthese des Ubichinons sind lediglich zwei zusätzliche Hydroxylierungs- und ein zusätzlicher Methylierungsschritt nötig. In der Datenbank Cyanobase (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/cyano.html>) werden die betreffenden Gene zum Teil bereits aufgrund der Homologie mit entsprechenden Namen belegt, so wird beispielsweise *slr0926* als *ubiA* bezeichnet.



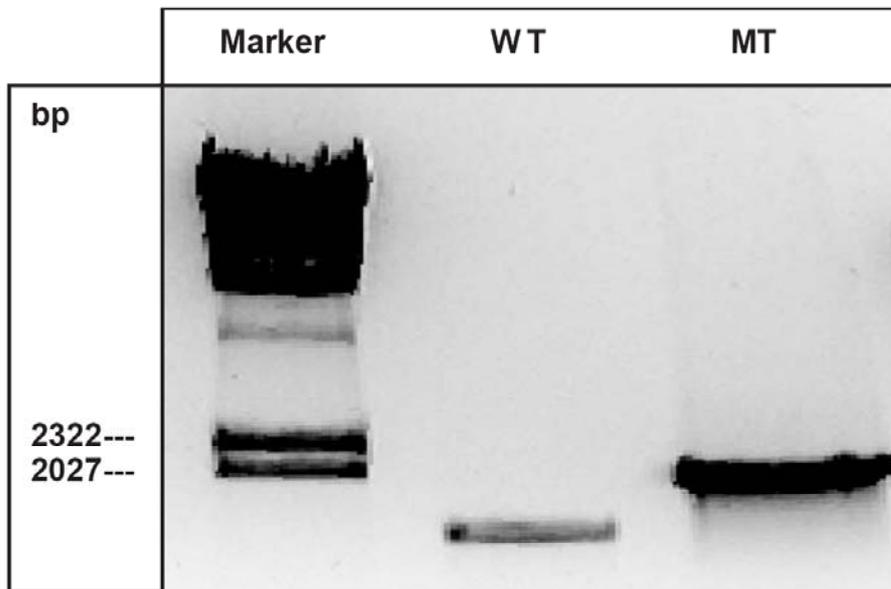
**Abbildung 3.1:** Hypothetischer alternativer Plastochinonbiosyntheseweg. Ausgangssubstrate sind rot und oval unterlegt. Die in *Escherichia coli* kodierenden Gene sind blau unterlegt, die in *Synechocystis* sp. PCC 6803 gefundenen Homologe sind hellblau unterlegt. Gene, die Homologien aufwiesen, jedoch vermutlich nicht beteiligt sind, sind gelb unterlegt. *sll0418* wurde rot unterlegt, da es keine Homologie zu *ubiG* aufweist, jedoch als Kandidatengen gilt (Dähnhardt et al., 2002).

### 3.1.1 Deletionsmutanten möglicher beteiligter Gene

Zur Prüfung der Hypothese wurden Deletionsmutanten der einzelnen Gene in *Synechocystis* sp. PCC 6803 angefertigt. Sollte der alternative Plastochinonbiosyntheseweg durch die Mutation betroffen sein, kann ein deutlicher Phänotyp erwartet werden (Norris et al., 1995). Die Konstruktion der Mutanten wird exemplarisch an der Methyltransferase SLL0418 dargestellt.

### 3.1.1.1 Konstruktion der Deletionsmutante $\Delta sll0418$

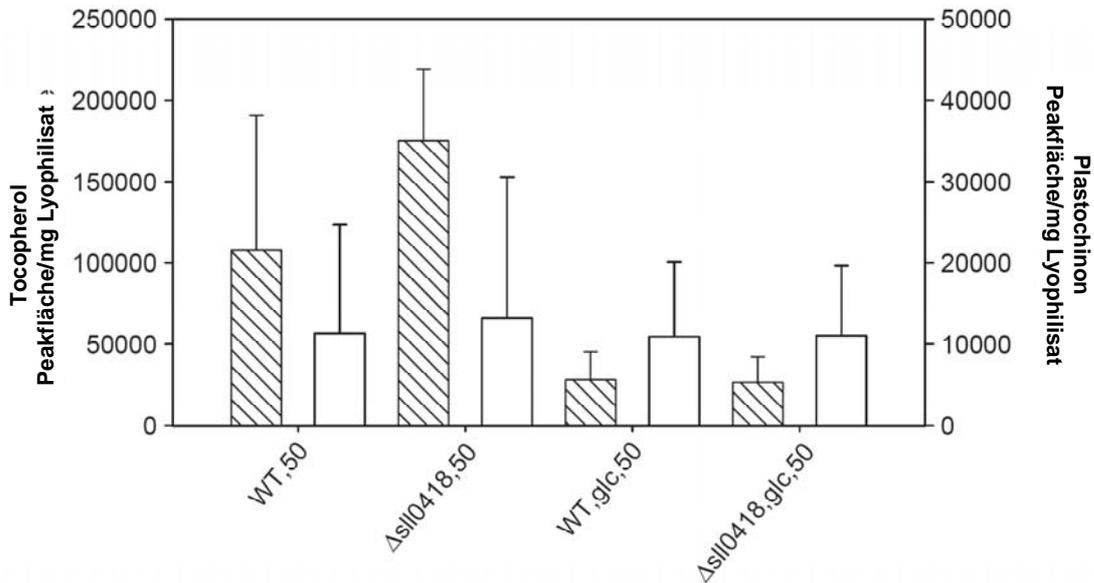
Das eine Methyltransferase kodierende Gen *sll0418* gilt als Kandidatengen für den letzten Methylierungsschritt in der Plastochinonbiosynthese, sowie für den Methylierungsschritt zwischen dem  $\alpha$ - und dem  $\beta$ - Zweig des Tocopherolbiosyntheseweges (Dähnhardt et al., 2002; Shintani et al., 2002; Cheng et al., 2003). Das Konstrukt zur Deletion des Gens wurde mit Hilfe der Fusions-PCR hergestellt (siehe 2.3.1.1). Als Antibiotikumkassette wurde das Chloramphenicol-Resistenzgen des pKS-CAT (pBluescript SK mit *SspI*-*NaeI* Fragment des pBR322 inklusive Chloramphenicol Kasette in die *EcoRV* Schnittstelle eingefügt) verwendet. Das Resistenzgen wurde mit *PstI* und *HindIII* aus dem Vektor herausgeschnitten und in die Fusions-PCR eingesetzt. Die Fusions-PCR ergab ein Produkt von 2024 bp Länge, welches in den pGEM-T (Promega, Madison, USA) kloniert und anschließend sequenziert wurde. Das Plasmid wurde für die Transformation von *Synechocystis* sp. PCC 6803 eingesetzt, und im Zuge der homologen Rekombination ersetzte das Resistenzgen den offenen Leserahmen *sll0418*. Um die Resistenz in allen 8-12 Genomkopien des Bakteriums durchzusetzen, erfolgte die Segregation rekombinanter Stämme durch das Ausstreichen von Zellen einzelner Kolonien auf mit dem Antibiotikum versetzten BG-11-Agarplatten. Dieser Vorgang erfolgte sechsmal, die Konzentration des Antibiotikums betrug 20  $\mu\text{g/ml}$  Agar. Die Überprüfung der Segregation erfolgte per PCR-Analyse (Abb. 3.2).



**Abbildung 3.2:** PCR-Analyse des Wildtyps und der  $\Delta sll0418$  Mutante. Als Template dienten DNA des Wildtyps bzw. der Mutante. Es ergaben sich beim Wildtyp eine 1607 bp Bande und bei der Mutante ein 2024 bp PCR-Produkt. In der Mutante wurde keine Wildtyp Genkopie nachgewiesen. WT = Wildtyp, MT = Mutante, bp = Basenpaare.

### 3.1.1.2 Phänotyp der Deletionsmutante $\Delta sll0418$

Die Mutante zeigte keinerlei offensichtliche phänotypische Unterschiede zum Wildtyp, was bei einer Störung der Plastochinonbiosynthese zu erwarten gewesen wäre. Nähere Untersuchungen erfolgten jedoch, da die Mutation unter photomixotrophen Bedingungen als letal und Veränderungen im Tocopherol- und Plastochinongehalt beschrieben wurden (Shintani et al., 2002; Cheng et al., 2003). Diese Ergebnisse konnten nicht bestätigt werden. Die im Verlauf dieser Arbeit erzeugte homoploide Mutante  $\Delta sll0418$  unterscheidet sich weder im Wachstum (Tab. 1) noch im Gehalt an Tocopherol und Plastochinon signifikant vom Wildtyp (Abb. 3.3).



**Abbildung 3.3:** HPLC Analyse des Tocopherol (schraffiert) und des Plastochinon (weiß) Gehaltes von Wildtyp und Mutanten Zellen. Die Anzucht erfolgte photoautotroph sowie photomixotroph unter 50  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ . glc = Glucose (n.s., n = 9).

**Tabelle 1:** Wachstumsdaten des Wildtyps und der Mutante bei Anzucht unter 50  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  und mit oder ohne Zugabe von 10 mM Glucose (glc).

	OD 2. Tag	Chl/OD 2. Tag $\mu\text{g}/\text{OD}$	OD 5. Tag	Chl/OD 5. Tag $\mu/\text{OD}$
WT, 50	0,06 +/- 0,0015	3,38 +/- 0,26	1,4 +/- 0,04	4,42 +/- 0,05
$\Delta\text{sll0418}$ , 50	0,03 +/- 0,0005	3,05 +/- 0,02	1,2 +/- 0,03	4,94 +/- 0,18
WT, glc, 50	0,04 +/- 0,0005	2,39 +/- 0,06	3,6 +/- 0,06	4,75 +/- 0,06
$\Delta\text{sll0418}$ , glc, 50	0,03 +/- 0,000	2,32 +/- 0,03	3,2 +/- 0,06	4,75 +/- 0,03

Die optische Dichte wurde bei 750 nm gemessen. Den Daten liegen Dreifachbestimmungen zweier jeweils unabhängiger Kulturen zugrunde. WT = Wildtyp, OD = optische Dichte, Chl = Chlorophyll, glc = Glucose.

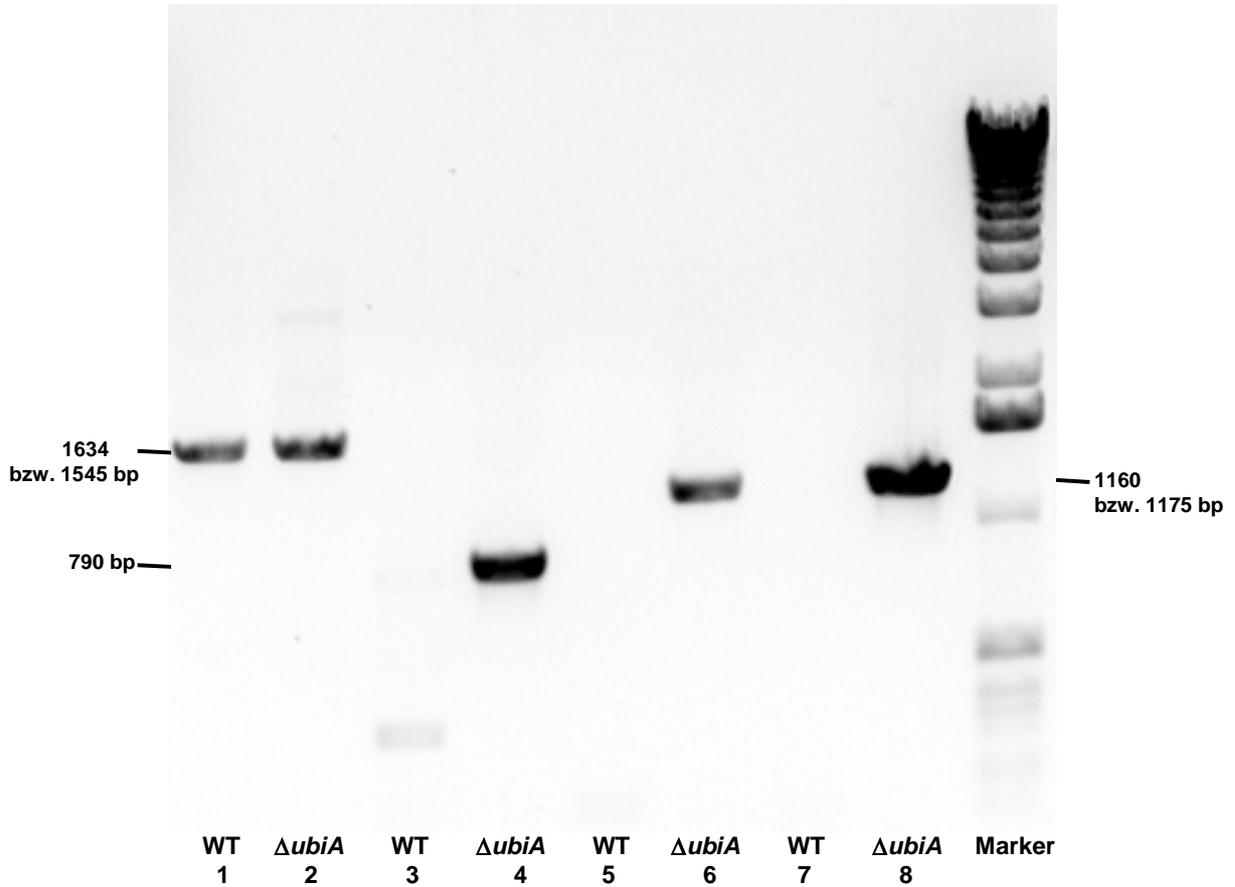
### 3.1.1.3 Deletionsmutanten weiterer Gene

Nach dem gleichen Prinzip der Deletion mit Hilfe eines eine Antibiotika-Resistenz enthaltenden Fusionsprodukts wurden die Mutanten  $\Delta slr0926$ ,  $\Delta slr1099$ ,  $\Delta slr1300$ ,  $\Delta slI0829$  und die Doppelmutante  $\Delta slI0418/\Delta slI0829$  angefertigt (Tab.2). Keine der Mutanten zeigte zunächst auf Agarplatte einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp oder starb bereits während der Selektion.

**Tabelle 2:** Übersicht der in Bezug auf den hypothetischen alternativen Plastochinonbiosyntheseweg erzeugten Deletionsmutanten.

	<b>Konstrukt</b>	<b>Resistenz</b>	<b>Phänotyp</b>	<b>PCR-Test</b>
$\Delta slr0926$	Fusions-PCR	Gentamycin	nein	heteroploid
$\Delta slr1099$	Fusions-PCR	Gentamycin	nein	homoploid
$\Delta slI0829$	Fusions-PCR	Gentamycin	nein	homoploid
$\Delta slr1300$	Fusions-PCR	Gentamycin	nein	homoploid
$\Delta slI0418/\Delta slI0829$	Fusions-PCR	Chloramphenicol/Gentamycin	nein	homoploid

Bei Anzucht in Flüssigkultur jedoch zeigte sich, dass die Mutante der hypothetischen Prenyltransferase  $\Delta slI0926$  nur auf einem Fünftel der in den Agarplatten eingesetzten Antibiotikakonzentration wuchs. Bei einer den Agarplatten entsprechenden Konzentration starben die Zellen ab. Dies deutete auf eine nicht erfolgte Durchsetzung der Mutation hin. Mittels PCR konnte der Verdacht auf Heteroploidie der Mutante bekräftigt werden, die Resistenzkassette wurde korrekt inseriert (Abb. 3.4). Dass die Wildtypkopie des Gens *slr0926* nicht vollständig durch das Resistenzgen ersetzt werden kann, ohne dass die Zellen sterben, legt eine essentielle Funktion des kodierten Proteins nahe. Wenn SLR0926 einen entscheidenden Schritt in der Plastochinonbiosynthese katalysiert, wäre ein Absterben der Zellen bei Ausschalten des Gens pausibel. Experimente mit dem Ziel, der Mutante das Wildtypgen unter der Kontrolle eines temperaturabhängigen Promotors zuzuführen, die ursprüngliche Mutation durchzusetzen (homoploide  $\Delta slI0926$ ) und anschließend den Promotor auszuschalten, um einen Phänotyp zu provozieren, führten zu keinem Ergebnis.



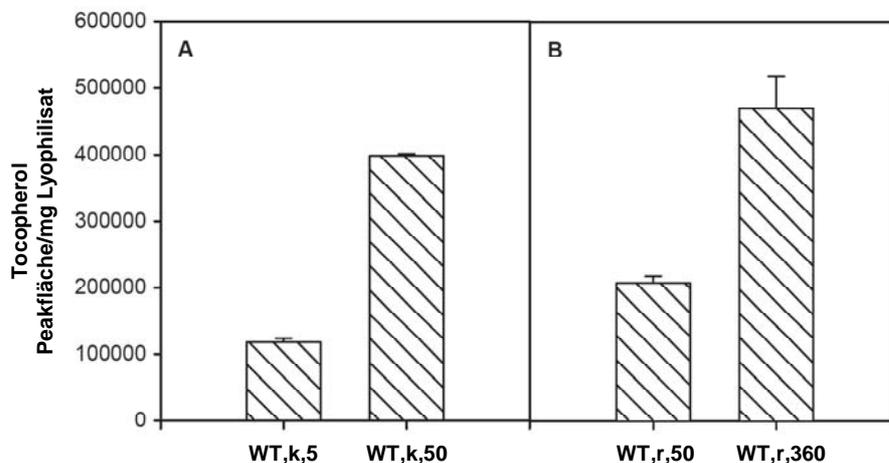
**Abbildung 3.4:** PCR-Analyse des Wildtyps und der  $\Delta slr0926$  Mutante. Als Template dienten DNA des Wildtyps bzw. der Mutante. In Spur 1 und 2 ist zu sehen, dass der übliche Test keinen Unterschied zeigt, da Gen und Resistenzkassette in der Länge zu ähnlich sind. Spur 3 und 4 zeigt den Nachweis der Resistenzkassette in der Mutante. Spuren 5-8 weisen Teile des Fusionsproduktes in der Mutante zur Kontrolle der korrekten Position der Resistenzkassette nach.  $\Delta ubiA = \Delta slr0926$ , WT = Wildtyp.

## 3.2 Einflüsse auf den Tocopherolgehalt im Wildtyp

Zum besseren Verständnis der Funktion von Tocopherol im Stoffwechsel von *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde zunächst nach Faktoren gesucht, die den Gehalt an Tocopherol in der Zelle beeinflussen.

### 3.2.1 Tocopherol und Licht

*Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde in 50 ml Kulturkolben und 250 ml Kulturröhren in BG-11 angezogen. Dabei wurden die Röhren mit Luft durchströmt und die Erlenmeyerkolben auf einem Laborschüttler (GFL Shaker 3020) platziert. Die Kolben wurden entweder unter 5 oder unter 50  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  angezogen, bei den Röhren wurden 50 und 360  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  eingesetzt. Nach der Ernte wurden die Zellen auf ihren Tocopherolgehalt untersucht (siehe 2.4.3.). Sowohl das Kolben- als auch das Röhrenexperiment ergaben höhere Tocopherolgehalte für die Zellen, die unter der jeweils höheren Lichtintensität angezogen wurden (Abb.3.5).



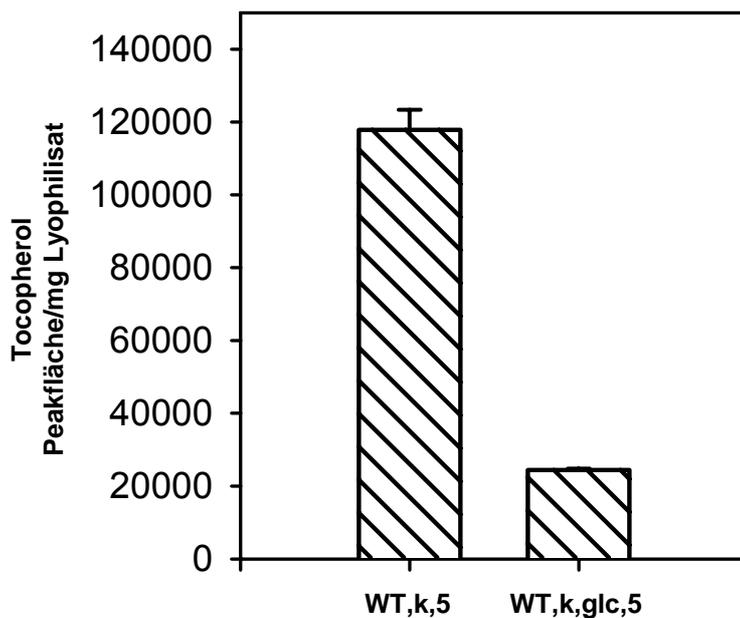
**Abbildung 3.5:** HPLC-Analyse des Tocopherolgehaltes des Wildtyps. Die Zellen wurden photoautotroph bei 5, 50 bzw. 360  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  und entweder in Kulturkolben (A) oder Kulturröhren (B) angezogen. WT = Wildtyp, k = Kolben, r = Röhren ( $p < 0,05$ ;  $n = 9$ ).

Die Tatsache, dass bei Anzucht in Kulturkolben der Lichteffect auf den Tocopherolgehalt bereits bei niedrigeren Intensitäten zu beobachten ist, als bei Kultivierung in

Röhren, lässt sich auf den additiven Effekt des geringeren Kohlendioxidgehalts (siehe 3.2.3. ) zurückführen.

### 3.2.2 Tocopherol und Glucose

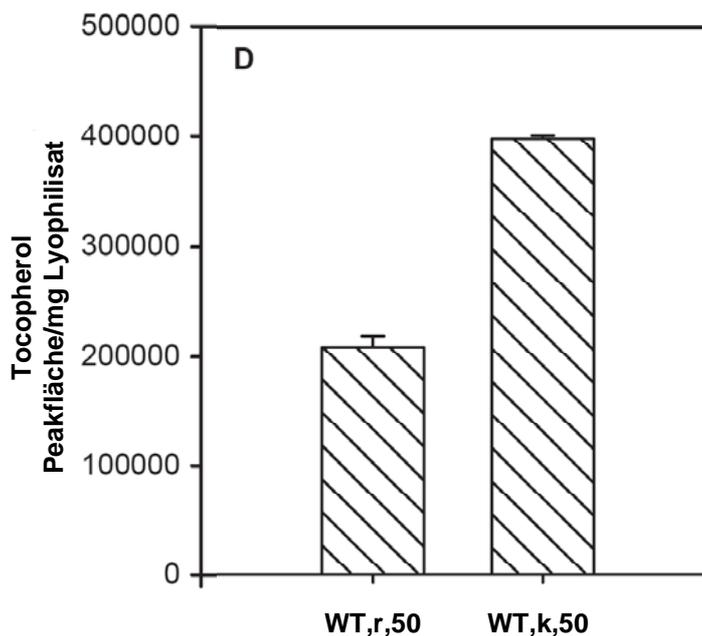
Wildtypzellen wurden bei gleicher Lichtintensität unter photoautotrophen und photomixotrophen Bedingungen angezogen. Dabei wurden den photomixotroph wachsenden Kulturen 10 mM Glucose zugesetzt, die Lichtintensität betrug  $5 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ . Die Anzucht erfolgte in 50 ml Kulturkolben, die wiederum auf einem Schüttler (GFL Shaker 3020) durchmischt wurden. Nach der Ernte erfolgte eine HPLC-Bestimmung des Tocopherolgehaltes (siehe 2.4.3.). Die unter photomixotrophen Bedingungen angezogenen Zellen zeigten niedrigere Tocopherolgehalte, als die unter phototrophen Bedingungen kultivierten (Abb. 3.6).



**Abbildung 3.6:** HPLC-Analyse des Tocopherolgehaltes des Wildtyps. Die Zellen wurden in Kulturkolben unter  $5 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  entweder photoautotroph oder photomixotroph angezogen. WT = Wildtyp, k = Kolben, glc = Glucose (10 mM) ( $p < 0,05$ ;  $n = 9$ ).

### 3.2.3 Tocopherol und Kohlendioxid

Zur Bestimmung des Einflusses der Kohlendioxidversorgung auf den Tocopherolgehalt in Wildtypzellen, wurde *Synechocystis* sp. PCC 6803 in Kulturkolben auf dem Laborschüttler (GFL Shaker 3020) und in belüfteten Kulturröhren bei gleicher Lichtintensität von  $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  angezogen. Nach der Ernte erfolgte eine HPLC-Bestimmung des Tocopherolgehaltes (siehe 2.4.3.). In den aus den Kulturkolben stammenden Zellen wurden höhere Tocopherolgehalte nachgewiesen (Abb. 3.7). Eine im Vergleich zu den durchlüfteten Kulturröhren schlechtere Kohlendioxidversorgung führte in diesem Experiment zu höheren Tocopherolgehalten in der Zelle.



**Abbildung 3.7:** HPLC-Analyse des Tocopherolgehaltes des Wildtyps. Die Zellen wurden unter  $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  entweder in Kolben oder in Röhren angezogen. WT = Wildtyp, k = Kolben, r = Röhren ( $p < 0,05$ ;  $n = 9$ ).

### 3.3 Phänotyp der *hpd*-Mutante $\Delta\text{slr0090}$

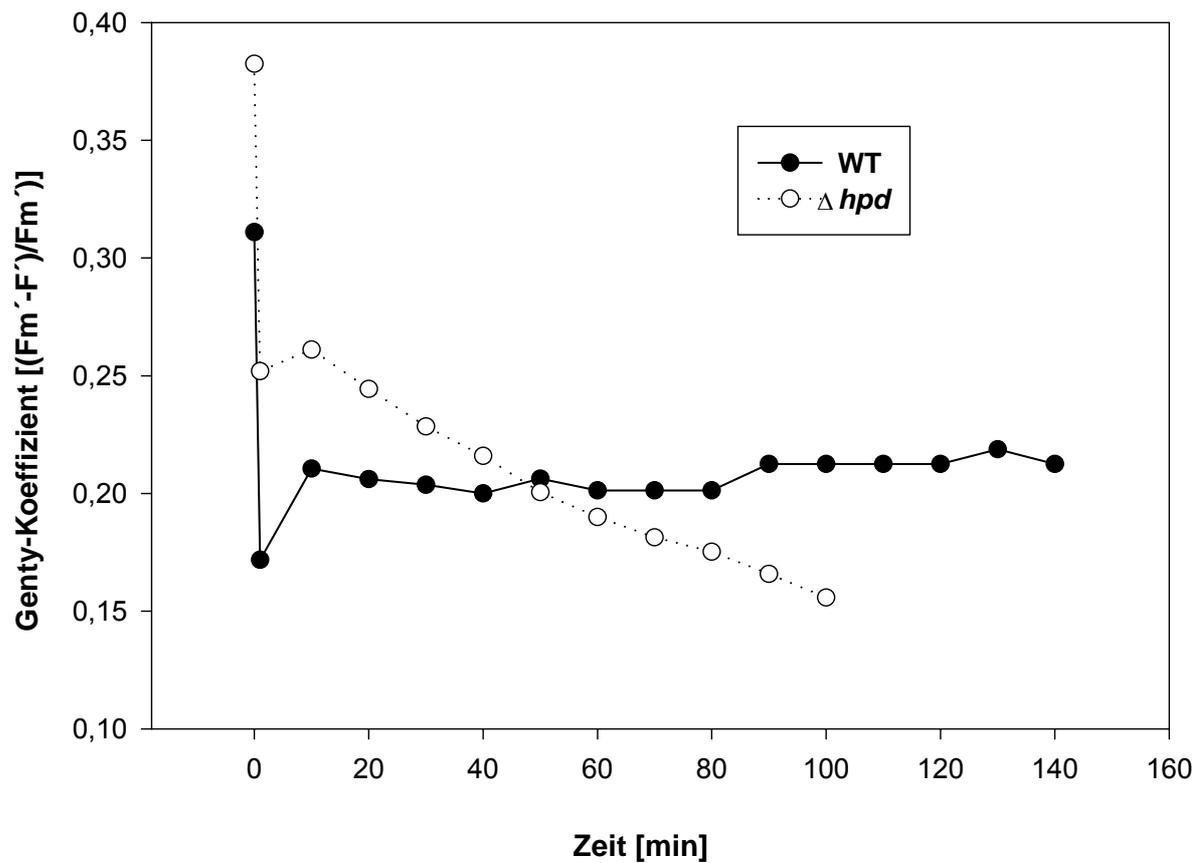
Im Vorfeld dieser Arbeit wurde eine Mutante erzeugt, in der das Gen, das für die HPPD, ein Schlüsselenzym der Tocopherolbiosynthese, kodiert, ausgeschaltet ist. Erste Experimente zeigten, dass die Mutante zwar kein Tocopherol mehr synthetisiert, der Plastochinongehalt jedoch dem im Wildtyp gleicht. Das Cyanobakterium verfügt offensichtlich über einen alternativen Weg, Plastochinon unabhängig von der HPPD zu synthetisieren (Dähnhardt et al., 2002). Darin unterscheidet sich *Synechocystis* sp. PCC 6803 von Höheren Pflanzen. Die Deletion

der HPPD ist bei Höheren Pflanzen letal (Norris et al., 1995). Die Möglichkeit den Effekt der Abwesenheit von Tocopherol zu untersuchen, ohne dass der Stoffwechsel des Plastochinons in Mitleidenschaft gezogen wird, macht *Synechocystis* sp. PCC 6803 zum idealen Modellorganismus.

### 3.3.1 Effizienz des Photosystems II (PS II)

Da die beobachteten Effekte auf den Tocopherolgehalt im Wildtyp alle mit dem Photosystem II in Verbindung gebracht werden können (siehe Diskussion), konzentrierte sich die Arbeit folgenden auf das PS II.

Zur Bestimmung der reaktionsfähigen PS II-Zentren unter Lichtstress wurden Fluoreszenzmessungen des Genty-Koeffizienten mit dem PAM durchgeführt (siehe 2.4.5). Der Genty-Koeffizient diente somit als Maß für die Effizienz des Photosystems II unter Lichtstress in Wildtyp und Mutante. Abgebildet ist eine Einzelmessung (Abb. 3.8), da aus technischen Gründen die Zeitachse jeder Messung differiert. Die Messreihen konnten jedoch mehrfach reproduziert werden. Die Kulturen wurden in belüfteten 250 ml Kulturröhren bis zu einer optischen Dichte (bei 750 nm,  $OD_{750}$ ) von ca. 0,3 bei  $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  angezogen. Anschließend erfolgte eine Chlorophyllbestimmung und eine Einstellung auf die gewünschte Chlorophyllkonzentration von  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  Zellsuspension. Es zeigte sich, dass die Funktion des PS II in der Mutante bei hohen Lichtintensitäten über die Zeit weniger stabil ist als im Wildtyp.

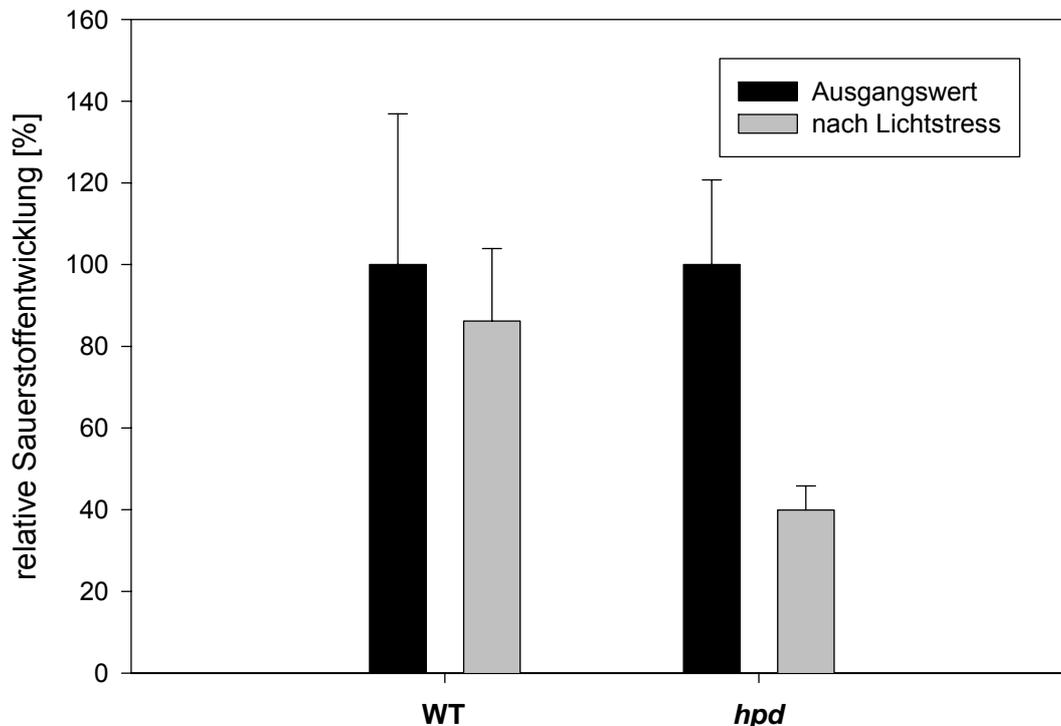


**Abbildung 3.8:** Fluoreszenz-Messungen zur PS II-Effizienz von Wildtyp und Mutante bei  $270 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ . Anzucht der Kulturen bei  $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ . WT = Wildtyp,  $\Delta hpd = \Delta slr0090$ .

### 3.3.2 Aktivität des Photosystems II

Als weiteren Parameter zur Bestimmung der Aktivität des PS II wurde die maximale Sauerstoffproduktion unter Lichtsättigungsbedingungen gemessen (siehe 2.4.4). Dazu wurden die Zellen von Wildtyp und Mutante in belüfteten Kulturröhren bei  $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  bis zu einer OD von ca. 0,3 angezogen. Es folgte eine Chlorophyllbestimmung und Einstellung des Chlorophyllgehaltes auf  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  Zellsuspension. Die Messung erfolgte bevor und nachdem die jeweilige Probe einer Lichtintensität von  $2000 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  ausgesetzt wurde. Die Lichtintensität wurde im Vergleich zu den PAM-Messungen aus rein praktischen Gründen hochgesetzt, um die Messungen zu beschleunigen. Als Ergebnis zeigte sich, dass die Sauerstoffproduktion als Maß für die Aktivität des PS II in der Mutante im Lichtstress weniger stabil ist, als im Wildtyp

(Abb. 3.9). Die Messungen des Wildtyps vor und nach dem Reiz zeigten keine signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 3.9:** Relative Sauerstoffentwicklung in der Probe vor und nach der Einstrahlung von  $2000 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  als Lichtstress. Anzucht der Kulturen bei  $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ . WT = Wildtyp, *hpd* =  $\Delta\text{slr0090}$  (WT: n.s., *hpd*:  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ).

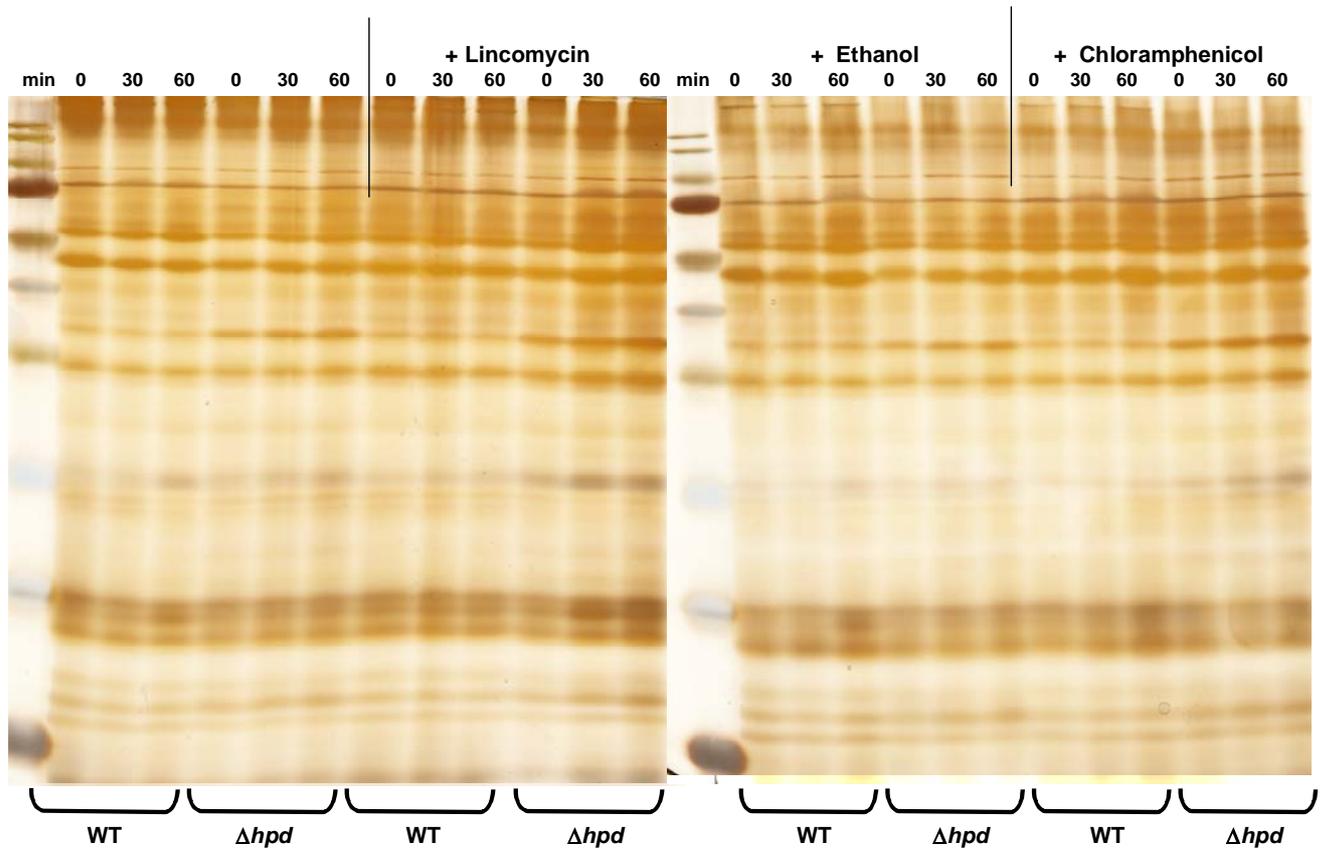
### 3.3.3 Stabilität des D1-Proteins des Photosystems II

Der Turnover des D1-Proteins des Photosystems II gilt als Teil des antioxidativen Systems im Stoffwechsel photosynthetisch aktiver Organismen. Durch oxidativen Stress verursachte Primärschäden des PS II treten in der Regel am D1-Protein auf. Durch einen raschen Austausch des D1-Proteins im Zuge des D1-Turnovers, wird die schnelle Regenerierung des PS II mit möglichst geringen Aktivitätsverlusten sichergestellt (Aro et al., 1993, 2005; Trebst et al., 2002).

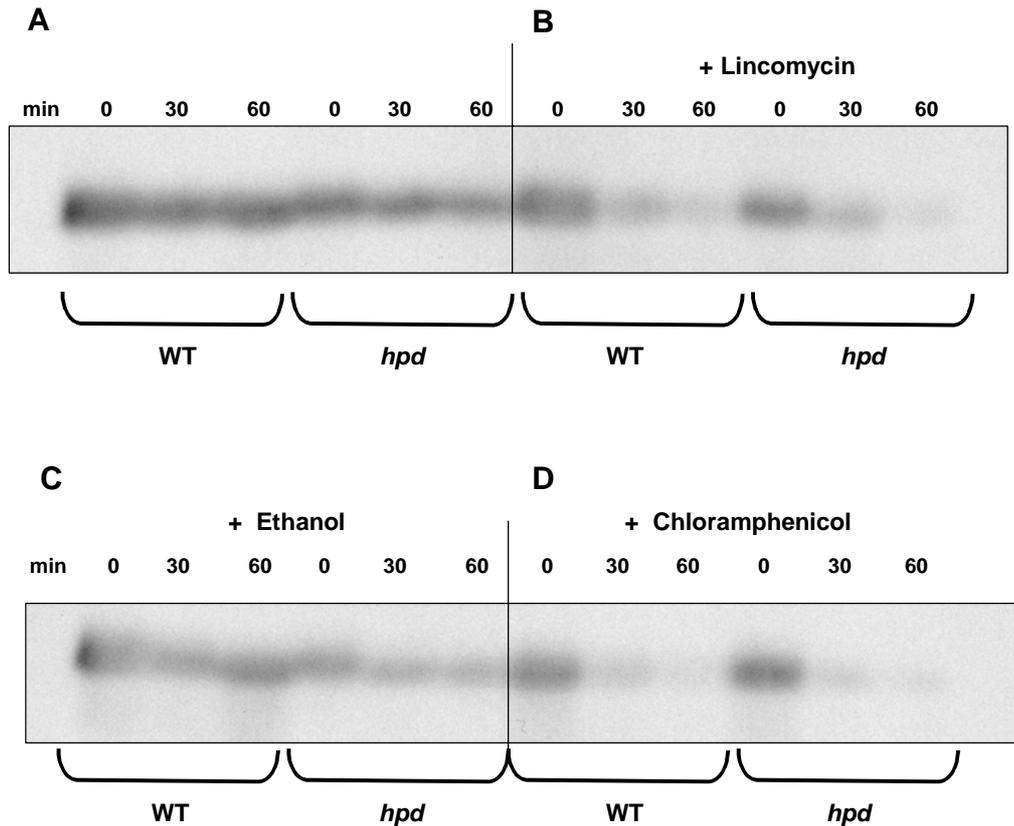
Da im Verlauf der Arbeit festgestellt werden konnte, dass die Stabilität des PS II der  $\Delta\text{hpd}$ -Mutante im Lichtstress herabgesetzt ist, lag es nahe, die Stabilität des D1-Proteins in Mutante und Wildtyp zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden Zellen des Wildtyps und der Mutante unter  $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  in belüfteten Kulturröhren bis zu einer OD von ca. 0,3 angezogen. Anschließend erfolgte eine Chlorophyllbestimmung und die Einstellung der Kultur auf den erwünschten Chlorophyllgehalt von  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  Zellsuspension. Die Probenahme für die Detektion des D1-Proteins erfolgte vor und 30 sowie 60 min nach dem Lichtstress. Der Stress wurde durch eine Lichtintensität von  $2000 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  erzeugt. Um nicht allein eine Aussage über die Menge des vorhandenen Proteins, sondern auch über seinen Turnover treffen zu können, wurde die Reihe zusätzlich mit den die Translation hemmenden Zusätzen Lincomycin ( $200 \mu\text{g}/\text{ml}$  Zellsuspension) und Chloramphenicol ( $200 \mu\text{g}/\text{ml}$  Zellsuspension) durchgeführt. Da diese in Ethanol gelöst wurden, wurde einer Reihe als Kontrolle Ethanol in entsprechender Konzentration zugesetzt. Dies ergab insgesamt 4 Probenreihen. Die Proben wurden abzentrifugiert und der Gesamtproteinextrakt präpariert (siehe 2.5.1). Die Bestimmung der Proteinmenge im Extrakt erfolgte nach Bradford (siehe 2.5.2). Anschließend wurden 4 SDS-Gele mit den Proben beschickt, davon wurden zwei zur Detektion des D1-Proteins verwendet, und zwei wurden zur Kontrolle der Beladung silbergefärbt (siehe 2.5.6). Je Spur des Gels wurden  $20 \mu\text{g}$  Protein eingesetzt. Die Silberfärbung zeigt sehr ausgeglichene Probenmengen der Spuren (Abb. 3.10).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.10:** Silbergefärbte SDS-Gele zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge. Je Spur wurden 20  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen. WT = Wildtyp,  $\Delta hpd$  =  $\Delta hpd$ -Mutante.



**Abbildung 3.11:** Immunoblot gegen das D1-Protein des PS II mit einem Molekulargewicht von  $\sim 40$  kDa. Anzucht der Kulturen bei  $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ . Anschließend Stressexposition bei einer Lichtintensität von  $2000 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  für 0, 30 bzw 60 Minuten unter Zugabe von Lincomycin (B), Ethanol (C), Chloramphenicol (D), bzw. ohne Hemmstoff (A). WT = Wildtyp,  $\Delta hpd$  =  $\Delta hpd$ -Mutante, min = Minuten.

Der Immunoblot zeigt, dass das D1-Protein des Photosystems II in der Mutante unter Starklichtbedingungen weniger stabil ist als im Wildtyp (Abb. 3.11A). Bei Zugabe eines Hemmstoffes der Translation gleicht die Situation in der Mutante der im Wildtyp (Abb. 3.11B, 3.11D). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass das Lösungsmittel Ethanol keinen Einfluss auf das Ergebnis des Experiments hatte (Abb. 3.11C).

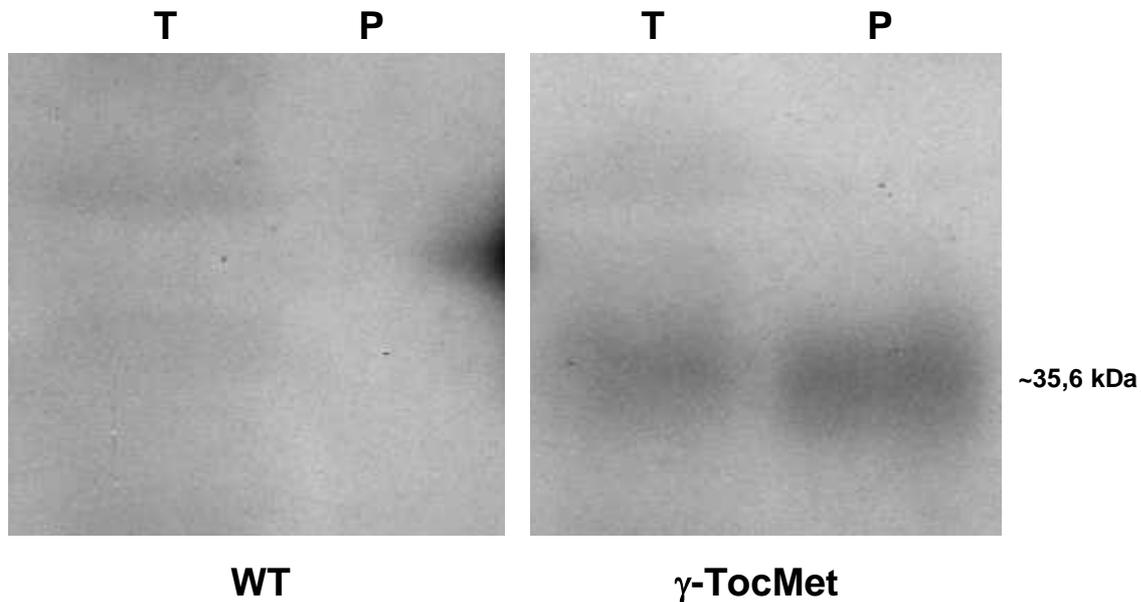
### 3.4 Membranpräparation

Die Ergebnisse der Detektion des D1-Proteins zeigten, daß sich der Turnover des Proteins in Wildtyp und Mutante unterscheidet. Die Tatsache, dass sich das aktive Photosystem II in der Thylakoidmembran befindet, die Assemblierung und Reparatur jedoch in der Plasmamembran stattfindet (Zak et al., 2001), legte die Frage nach der Lokalisierung der Tocopherolbiosynthese im Membransystem des Cyanobakteriums nahe.

#### 3.4.1 Lokalisierung der $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden His-tag-Mutanten erzeugt, die an jeweils einem der identifizierten Enzyme der Tocopherolbiosynthese 6 zusätzliche Histidinreste tragen. Dies gelang für die Enzyme SLL0418 (mögliche Methyltransferase zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zweig), SLR0089 ( $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase), SLR0090 (HPPD) und SLR1736 (Tocopherol-Cyclase) (Diplomarbeit Andreas Helbig, 2005). Im Verlauf der vorliegenden Arbeit konnten die an die SLR0089 angehängten Histidinreste mit Hilfe eines gegen diese gerichteten Antikörpers im Immunoblot detektiert werden. In Kombination mit der Membranfraktionierung war somit die Lokalisierung der  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase in den Membranen möglich.

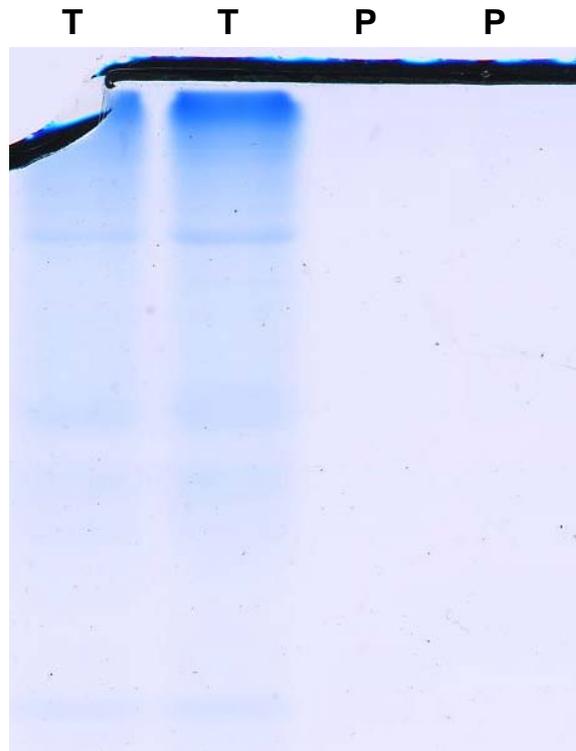
Dazu wurde die His-Tag-Mutante der SLR0089 (His-tag-SLR0089) in belüfteten 5 l-Kulturflaschen angezogen und der Membranisolierung nach Norling (1998) unterzogen (siehe 2.6). Die Proteinbestimmung der so gewonnenen Proben der Plasma- und Thylakoidmembranfraktion wurde nach Peterson durchgeführt (siehe 2.5.3). Auf das SDS-Gel für den Immunoblot wurden je Spur 100  $\mu$ g Protein der jeweiligen Membranfraktion aufgetragen. Zur Kontrolle der Gleichmäßigkeit des Proteinauftrags wurde ein SDS-Gel mit je 50  $\mu$ g Protein pro Spur beladen und anschließend coomassiegefärbt (siehe 2.5.7).



**Abbildung 3.12:** Immunoblot gegen die Histidinreste der His-tag  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Mutante. Je Spur wurden 100  $\mu$ g Protein aufgetragen, die Bande bei 35,6 kDa entspricht dem Molekulargewicht der SLR0089. WT = Wildtyp,  $\gamma$ -TocMet = His-tag  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Mutante, T = Thylakoidmembranfraktion, P = Plasmamembranfraktion.

Der Immunoblot zeigte, wie zu erwarten, kein Signal für den Wildtyp. Bei der Mutante war zu erkennen, dass das Signal in der Plasmamembranfraktion stärker ist, als in der Thylakoidmembranfraktion (Abb. 3.12).

Das coomassiegefärbte SDS-Gel (Abb. 3.13) zeigt deutlich das Problem der Proteinbestimmung nach Peterson. Die Menge Protein in der Plasmamembranfraktion wird deutlich überschätzt, sodass auf das SDS-Gel für den Immunoblot eine erheblich größere Menge Thylakoidmembranprotein als Plasmamembranprotein aufgetragen wurde. Dass das Signal trotz dieser Unverhältnismäßigkeit in der Plasmamembranfraktion stärker war, als in der Thylakoidmembranfraktion (Abb. 3.12), spricht für eine Lokalisierung der  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase in der Plasmamembran.

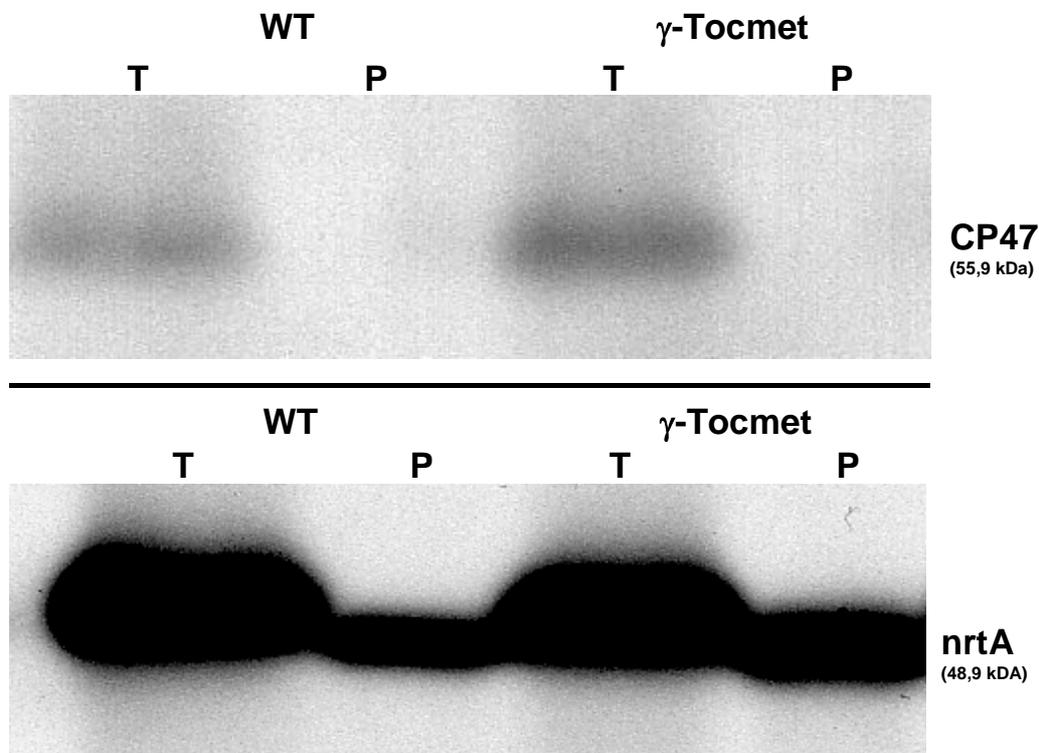


**Abbildung 3.13:** Commassiegefärbtes SDS-Gel zur Kontrolle des Proteinauftrages. Pro Spur wurden 50 µg Protein aufgetragen. T = Thylakoidmembranfraktion, P = Plasmamembranfraktion.

Zur Überprüfung der Reinheit der Membranfraktionen wurden Immunoblots gegen sogenannte Markerproteine der jeweiligen Membran durchgeführt. Dabei wurde als Marker für die Plasmamembran das am Nitrat/Nitrit-Transport beteiligte Protein *NrtA* ausgewählt, welches ausschließlich in der Plasmamembranfraktion nachweisbar sein sollte (Norling et al., 1998). Als für die Thylakoidmembran spezifisches Protein wurde CP47 ausgewählt, ein chlorophyllbindendes Protein des PS II, welches ausschließlich in der Thylakoidmembranfraktion nachweisbar sein sollte (Barber und Nield, 2002)

Die Immunoblots gegen CP47 und das durch *nrtA* kodierte Protein zeigten, dass die Plasmamembranfraktion frei von Verunreinigungen war. Die Thylakoidmembranfraktion jedoch war stark mit Plasmamembrananteilen vermischt (Abb. 3.14). Das außerordentlich starke Signal durch die Thylakoidmembranfraktion des Immunoblots gegen den eigentlich plasmamembranspezifischen Antikörper ließ sich mit dem deutlich verfälschten Proteinauftrag erklären (Abb. 3.13).

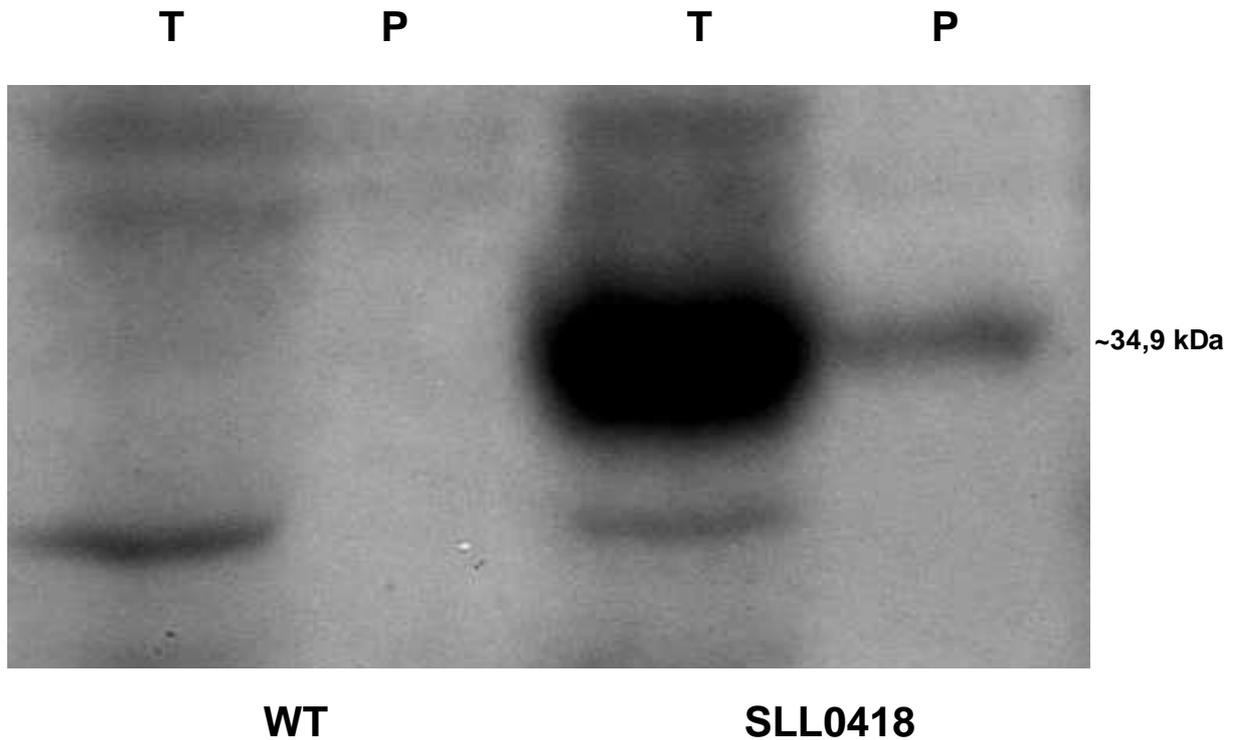
Zusammengenommen zeigten die Ergebnisse der Membranisolierung, dass die  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase in der Plasmamembran lokalisiert ist.



**Abbildung 3.14:** Immunoblots zur Kontrolle der Effizienz der Membranisolierung. Es wurden 30  $\mu$ g Protein je Spur aufgetragen. T = Thylakoidmembranfraktion, P = Plasmamembranfraktion. WT = Wildtyp,  $\gamma$ -TocMet = His-tag  $\gamma$ -Tocopherolmethyltransferase-Mutante.

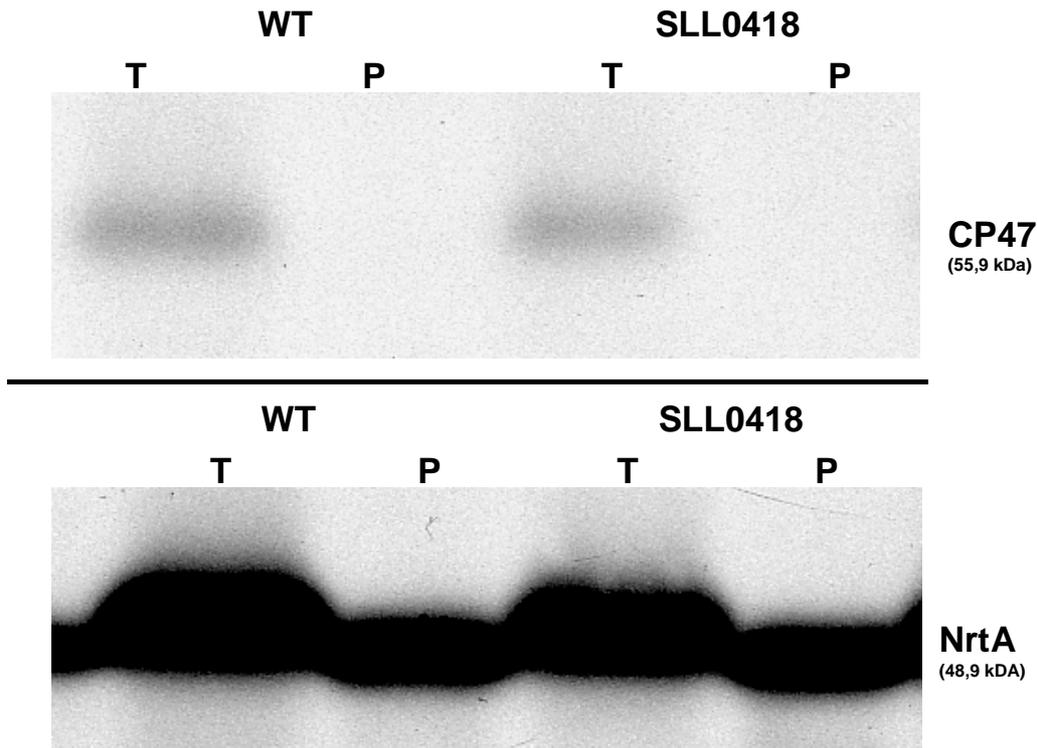
### 3.4.2 Lokalisierung der Methyltransferase SLL0418

Nach der gleichen Vorgehensweise wie für die  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase konnten auch die an die SLL0418 angehängten Histidinreste im Immunoblot nachgewiesen werden. Sowohl in der Plasmamembran-, als auch in der Thylakoidmembranfraktion konnte ein Signal im Immunoblot detektiert werden (Abb. 3.15).



**Abbildung 3.15:** Immunoblot gegen die Histidinreste der His-tag SLL0418-Mutante. Je Spur wurden 100 µg Protein aufgetragen, die Bande bei 34,9 kDa entspricht dem Molekulargewicht der SLL0418. WT = Wildtyp, SLL0418 = His-tag SLL0418-Mutante, T = Thylakoidmembranfraktion, P = Plasmamembranfraktion.

Um die Reinheit der eingesetzten Membranfraktionen zu überprüfen, wurden wiederum Immunoblots gegen die gewählten Markerproteine durchgeführt (Abb. 3.16). Die Ergebnisse zeigten, dass die Plasmamembranfraktion frei von Verunreinigungen war, die Thylakoidmembranfraktion jedoch mit Plasmamembrananteilen durchsetzt war. Das außerordentlich starke Signal durch die Thylakoidmembranfraktion des Immunoblots gegen den eigentlich plasmamembranspezifischen Antikörper ließ sich wiederum mit dem deutlich verfälschten Proteinauftrag erklären (Abb. 3.13). Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass das Enzym SLL0418 in beiden Membranfraktionen zu finden ist.



**Abbildung 3.16:** Immunoblots zur Kontrolle der Effizienz der Membranisolierung. Es wurden 30  $\mu\text{g}$  Protein je Spur aufgetragen. T = Thylakoidmembranfraktion, P = Plasmamembranfraktion. WT = Wildtyp, SLL0418 = His-tag SLL0418-Mutante

### 3.4.3 HPLC-Analyse der Membranfraktionen

Die Plasma- und die Thylakoidmembranfraktion wurden in HPLC-Analysen des Tocopherolgehaltes eingesetzt. Dabei konnte in der Thylakoidmembranfraktion kein Tocopherol nachgewiesen werden, in der Plasmamembranfraktion konnte einmalig Tocopherol nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse ließen sich jedoch nicht reproduzieren. Die zu präparierende Menge Plasmamembran war in der Folge zu gering, während die Thylakoidmembranfraktion grundsätzlich mit Plasmamembrananteilen verunreinigt war.

### 3.5 Datenbankrechercheergebnisse

Die Genome zahlreicher Cyanobakterien liegen in ihrer kompletten Sequenz frei zugänglich vor. Dadurch ergeben sich immer neue Möglichkeiten, durch Sequenzvergleiche in silicio Informationen neu zu kombinieren und zu Ergebnissen zu gelangen, die neue Ansätze für Experimente ergeben.

#### 3.5.1 Orthologe der Tocopherolbiosynthese gene

Tabelle 3 zeigt das Vorkommen homologer Sequenzen der Gene, die in *Synechocystis* sp. PCC 6803 für die an der Tocopherolbiosynthese beteiligten Enzyme und *sll0418* kodieren in anderen sequenzierten Cyanobakteriengenomen. Zur Suche nach Orthologen wurden die Proteinsequenzen der Enzyme von *Synechocystis* sp. PCC 6803 (SLR0090, SLR1736, SLR1737, SLR0089, SLL0418) herangezogen. Das Vorhandensein aller an der Synthese beteiligter Gene konnte direkt mit der Tatsache korreliert werden, dass das Cyanobakterium Tocopherol enthielt. Cyanobakterien in denen kein Tocopherol nachgewiesen wurde, besitzen auch keine Orthologe. Für *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Nostoc* sp. PCC 7120 und *Synechococcus* sp. PCC 7942 wurde der Tocopherolgehalt bestimmt, die Angaben für die anderen Cyanobakterien stammen aus der Literatur (Powls and Redfearn, 1967; Dasilva and Jensen, 1971; Mullins et al., 1986). Für *Nostoc punctiforme* und *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 konnte kein eindeutiges Ortholog zur Methyltransferase SLL0418 gefunden werden. Die beste Homologie weist die  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase der betreffenden Bakterien auf. Dies legt nahe, dass SLR0089 oder eine andere, bisher nicht identifizierte, Methyltransferase, sowohl in der Tocopherol- als auch in der Plastochinonbiosynthese das Fehlen von SLL0418 kompensieren kann.

**Tabelle 3: Tocopherolbiosynthese gene in Cyanobakterien**

a = nicht vollständig sequenzierte Genome

	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS101	<i>Nostoc punctiforme</i>	<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501 <sup>a</sup>	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	<i>Synechococcus</i> sp. WH 8102	<i>Prochlorococcus marinus</i> SS120	<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9313	<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MED4
p-Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase	SLR0090 0.0	ALL0771 3e-52	ZP_00074108 2e-53	ZP_00111768 1e-50	GLR3091 5e-45	ZP_00177629 <sup>b</sup> 4e-30	ZP_00161548 5e-50	-	-	-	-	-	-
Phytoltransferase	SLR1736 e-152	ALR3448 1e-79	ZP_00070982 4e-72	ZP_00107768 2e-79	GLL0283 1e-66	ZP_00176336 5e-78	ZP_00162961 3e-79	-	-	-	-	-	-
Cyclase	SLR1737 0.0	ALL0245 2e-95	ZP_00073283 8e-98	ZP_00111944 2e-92	GLR3089 6e-77	ZP_00179394 1e-90	ZP_00162682 4e-96	-	-	-	-	-	-
γ-Tocopherol-Methyltransferase	SLR0089 0.0	ALR1803 6e-99	ZP_00070985 2e-96	ZP_00110362 e-103	GLR3090 4e-76	ZP_00174848 8e-93	ZP_00159178 6e-99	-	-	-	-	-	-
Methyltransferase	SLL0418 0.0	ALL2121 e-143	ZP_00074879 e-140	ZP_00110362 4e-38	GLR3090 3e-36	ZP_00178156 e-109	ZP_00161272 e-112	ZP_00163341 5e-39	TLL1726 e-136	SYNW2141 2e-96	PRO1661 2e-94	PMT1785 4e-92	PMM1505 1e-82

b = partielle Sequenz

### **3.5.2 Gene in Tocopherol synthetisierenden Cyanobakterien**

Die Datenbank Biolingua (<http://www.biolinguaresearch.org/>) ermöglicht es, dass das komplette Genom eines Cyanobakteriums von dem eines anderen quasi subtrahiert wird. Auf diese Weise konnte eine Liste von Genen erstellt werden, die in Cyanobakterien vorkommen, in denen Tocopherol nachgewiesen wurde, nicht aber in solchen, die kein Tocopherol enthalten (Tab. 4). Ebenso konnten Gene identifiziert werden, die in Cyanobakterien ohne Tocopherol vorliegen, nicht jedoch in jenen, die Tocopherol synthetisieren (Tab. 5).

**Tabelle 4:** Gene exklusiv in Cyanobakterien die Tocopherol synthetisieren

<b>Gen</b>	<b>Bezeichnung in Cyanobase</b>
<i>slr7024</i>	hypothetisches Protein
<i>slr1807</i>	hypothetisches Protein
<i>slr1784</i>	Biliverdin-Reductase ( <i>bvdR</i> )
<i>slr1737</i>	hypothetisches Protein
<i>slr1736</i>	Homogentisat-Phytyltransferase
<i>slr1083</i>	hypothetisches Protein
<i>slr1077</i>	mögliche Glycosyl-Transferase
<i>slr0981</i>	hypothetisches Protein
<i>slr0976</i>	hypothetisches Protein
<i>slr0918</i>	Methionin-Aminopeptidase
<i>slr0889</i>	hypothetisches Protein
<i>slr0599</i>	Serin/Threonin-Kinase
<i>slr0535</i>	Protease
<i>slr0493</i>	Mannose-1-phosphat-Guanylyltransferase ähnlich
<i>slr0454</i>	RND multidrug efflux transporter
<i>slr0355</i>	hypothetisches Protein
<i>slr0313</i>	hypothetisches Protein
<i>slr0241</i>	hypothetisches Protein
<i>slr0240</i>	Transkriptionsfaktor
<i>slr0090</i>	4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase
<i>slr0089</i>	$\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase
<i>sll1971</i>	mögliche Hexosyl-Transferase
<i>sll1703</i>	Protease IV
<i>sll1689</i>	Gruppe 2 RNA-Polymerase Sigmafaktor SigE ( <i>sigE</i> , <i>rpoD2-V</i> )
<i>sll0721</i>	unbekanntes Protein
<i>sll0611</i>	hypothetisches Protein
<i>sll0499</i>	hypothetisches Protein

**Tabelle 5:** Gene exklusiv in Cyanobakterien die kein Tocopherol synthetisieren

<b>Gen</b>	<b>Bezeichnung in Cyanobase</b>
<i>sef1222</i>	Adenosylmethionin-8-amino-Oxononanoat-Aminotransferase
<i>sef2395</i>	unbekanntes Protein
<i>ser2624</i>	ABC-Typ Multidrug Transporter ATPase/Permease-Komponenten
<i>sef2647</i>	p-Aminobenzoat-Synthase Komponente I

## 4 Diskussion

Cyanobakterien verfügen über die Möglichkeit, Plastochinon unabhängig von der HPPD zu synthetisieren. Schaltet man das kodierende Gen im Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 aus, erweist sich diese Mutation im Gegensatz zur Situation in Höheren Pflanzen (Norris et al., 1995) als nicht letal. Die  $\Delta$ -*hpd*-Mutante ist Tocopherol defizient, der Plastochinonpool jedoch ist unverändert im Vergleich zum Wildtyp. Aus dieser Ausgangsposition heraus ergaben sich zwei Zielrichtungen. Zum einen die Aufklärung des alternativen Weges Plastochinon zu synthetisieren, zum anderen die Möglichkeit die Folgen eines Tocopherolmangels zu untersuchen, ohne dass der Plastochinonpool verändert ist.

### 4.1 Plastochinon

*Synechocystis* sp. PCC 6803 produziert kein Ubichinon. Dieses wird in der Atmungskette durch Plastochinon ersetzt. Trotzdem sind Homologe der Gene, die in *Escherichia coli* für die Ubichinonsynthese spezifisch sind, in Cyanobakterien vorhanden. Dazu zählen *slr0926* für die Prenyltransferase UbiA, welche 4-Hydroxybenzoesäure prenyliert, *slr1099* für die Carboxylase UbiX, welche die Carboxylgruppe des Produkts der von UbiA katalysierten Reaktion entfernt und *slr1300*, welches vermutlich für ein UbiH ähnliches Protein kodiert, das eine weitere Hydroxylgruppe in para Position in den aromatischen Ring einfügen könnte (Kaneko et al., 1996). Zur vollständigen Synthese des Plastochinons sind des weiteren zwei Methylierungsschritte notwendig. Als Kandidatengen für eine der Methyltransferasen wurde *sll0418* beschrieben (Dähnhardt et al., 2002)

#### 4.1.1 Die Methyltransferase SLL0418

Im Verlauf dieser Arbeit konnte erfolgreich eine homoploide Deletionsmutante  $\Delta$ *sll0418* erzeugt werden. Die Mutante zeigte keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp, der Plastochinongehalt war vergleichbar. Da beschrieben wurde, dass SLL0418 sowohl in der Plastochinon- als auch in der Tocopherolbiosynthese einen Methylierungsschritt katalysiert, und die entsprechende Deletionsmutante einen deutlichen Phänotyp mit im Vergleich zum Wildtyp um 30 % niedrigeren Tocopherol-

und um 70 % niedrigeren Plastochinongehalt aufweist (Shintani et al., 2002; Cheng et al., 2003), wurden weitere Experimente durchgeführt. Auch diese Untersuchungen brachten keinen signifikanten Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp zu Tage. Der in der Literatur beschriebene Phänotyp konnte nicht bestätigt werden. Auch die Hypothese, dass die Mutation unter photomixotrophen Kulturbedingungen letal ist (Shintani et al., 2002; Cheng et al., 2003), konnte nicht bestätigt werden. Die Varianz der Daten legt nahe, dass eine sehr hohe Anzahl biologischer Replikate nötig sein könnte, um Kultivierungseffekte ausschliessen zu können (siehe 3.1.1.2). Die Tatsache, dass die Mutante in Plastochinon- und Tocopherolgehalt keine Veränderungen zeigt, obwohl SLL0418 in beiden Synthesewegen Methylierungsschritte katalysiert (Shintani et al., 2002), lässt sich über die Suche nach Orthologen des Proteins erklären. Tabelle 3 zeigt, dass in *Nostoc punctiforme* und *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 keine eindeutigen Orthologe zu SLL0418 identifiziert werden können. Beide Organismen synthetisieren jedoch sowohl Tocopherol als auch Plastochinon. Die Abwesenheit von Orthologen mit Ausnahme der Gene, welche für die  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase kodieren, legt die Vermutung nahe, dass in den Cyanobakterien *Nostoc punctiforme* und *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 die  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase diese Methylierungsschritte an Stelle der SLL0418 vermittelt (Backasch et al., 2005). Die katalytische Promiskuität von Methyltransferasen wurde bereits an anderer Stelle beschrieben (Schubert et al., 2003).

### 4.1.2 Die Prenyltransferase SLR0926

Die durch Deletionsmutagenese erzeugte Mutante  $\Delta slr0926$  der Prenyltransferase, zeigte keinen offensichtlichen Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp. Eine Überprüfung der Mutante zeigte, dass diese heteroploid blieb (siehe 3.1.1.3). *Synechocystis* sp. PCC 6803 besitzt im Durchschnitt 8 bis 12 Genomkopien (Labarre et al., 1989). Betrifft eine Mutation eine für das Überleben essentielle Funktion, so kann die Transformation zwar erfolgreich sein und eine Resistenz des Bakteriums gegen das Selektionsmedium erreicht werden. Die Mutation lässt sich jedoch nicht in allen Kopien durchsetzen. *Synechocystis* beschreitet in diesem Falle den Mittelweg zwischen der Etablierung der Resistenz und dem Erhalt der essentiellen Genfunktion, um zu überleben. Da die  $\Delta slr0926$ -Mutante nicht ausgesegregiert werden kann, muss eine entscheidende Enzymaktivität von der Mutation betroffen sein.

Plastochinon ist essentiell. Eine endgültige Aussage über die Situation in Cyanobakterien ist nur mit Hilfe von Expressionsexperimenten möglich, da nur auf diesem Weg die Enzymaktivität direkt bestimmt werden kann (Qi et al., 2005).

## 4.2 Bestimmende Faktoren des Tocopherolgehaltes

Tocochromanole akkumulieren in photosynthetisch aktiven Organismen wie einigen Algen und Pflanzen und sind dort in der Thylakoidmembran bzw. den Plastoglobuli der Chloroplasten zu lokalisieren. Die Funktion der Tocopherole umfassen auf der einen Seite antioxidative Prozesse, wie den Schutz von Lipiden in photosynthetisch aktiven Membranen sowie in Samen. Darüber hinaus wurden auch nicht-antioxidative Funktionen beschrieben, wie die Einflussnahme auf den primären Kohlenhydratstoffwechsel und das Speichern von überschüssigem Phytol aus dem Chlorophyllabbau in Form von Tocopherol in Chloroplasten (Dörmann 2007).

Im Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 spielt ausschließlich  $\alpha$ -Tocopherol eine Rolle (Dähnhardt et al., 2002). Die Lokalisierung ist bisher nicht geklärt.

### 4.2.1 Tocopherol und Licht

Es ist hinreichend belegt, dass Tocopherol die Widerstandsfähigkeit von Pflanzen gegen Starklicht erhöht und ein limitierender Faktor im gegen photooxidativen Stress gerichteten antioxidativen Netzwerk ist (Grasses et al., 2001; Havaux et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass höhere Intensitäten des eingestrahlt Lichtes zu einer Erhöhung des Tocopherolgehaltes in Wildtypzellen des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 führen. Wurden die Kulturen lediglich auf einem Laborschüttler durchmischt und nicht durchlüftet, konnte dieser Effekt des Lichtes auf den Tocopherolgehalt bereits bei vergleichsweise niedrigen Intensitätsunterschieden von 5 zu 50  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  beobachtet werden (siehe 3.2.1). Dabei trug die suboptimale Versorgung mit  $\text{CO}_2$  dazu bei, dass der Einfluss des Lichtes im Vergleich zu belüfteten Kulturen bereits bei diesen geringen Unterschieden deutlich wurde (siehe 3.2.3).

#### 4.2.2 Tocopherol und Glucose

Photomixotrophe Bedingungen führen zu einer Veränderung des Redoxstatus in der Zelle. Es wurde beschrieben, dass die Zugabe von Glucose zum Medium zu reduzierenden Bedingungen führt (Alfonso et al., 2000). Die Energiebereitstellung aus der Atmung steigt und demzufolge sollte die Photosyntheseleistung herunter geregelt werden. Li und Sherman (2000) konnten ein Absinken der Menge des Transkripts des *psbA* Gens als Folge der Zugabe von Glucose nachweisen. Das bedeutet, dass entweder die Menge an Photosystem II abnahm oder der D1-Protein Turnover aufgrund des verminderten photooxidativen Stresses langsamer ablief. Der Turnover des D1-Proteins gilt als Teil des Schutzsystems gegen antioxidativen Stress (Aro et al., 1994, 2005; Trebst et al., 2002). Eine verringerte Menge an PS II bzw. ein verlangsamter Turnover des D1-Proteins verweisen auf eine geringere Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und weniger photooxidativen Stress (MacPherson et al., 1993; Telfer et al., 1994; Hideg et al., 1994;1998; Rutherford und Krieger-Liszkay, 2001; Fufezan et al., 2002). Es konnte ein Absinken des Tocopherolgehaltes in Wildtypzellen beobachtet werden, wenn die Anzucht unter photomixotropen Bedingungen stattfand. Dieser Effekt stützt die Hypothese, dass Tocopherol am Schutz vor photooxidativem Stress beteiligt ist. Das Absinken des Tocopherolgehaltes bei Zugabe von Glucose zum Medium wurde bei sehr niedrigen Lichtintensitäten von  $5 \mu\text{E}/\text{m}^2$  festgehalten (siehe 3.2.2). Bei Einstrahlung größerer Lichtmengen wie  $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  war die zu beobachtende Tendenz die gleiche, der Unterschied jedoch geringer (Daten nicht gezeigt). Es ist bekannt, dass höhere Lichtintensitäten zum Anstieg der Transkriptmenge des *psbA* führen (Mohamed and Jansson, 1989). Daher kann davon ausgegangen werden, dass bei  $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  der Einfluss des Lichtes den der Glucosegabe teilweise überdeckt.

#### 4.2.3 Tocopherol und Kohlendioxid

Ogbanna et al. (2002) haben gezeigt, dass die verfügbare Menge  $\text{CO}_2$  den Tocopherolgehalt photosynthetisch aktiver Organismen beeinflusst. Sinkt die Menge an zur Verfügung stehendem  $\text{CO}_2$ , dann steigt der Tocopherolgehalt.

Störungen der Dunkelreaktion hemmen die Photosynthese (Henkes et al., 2001; Nishiyama et al., 2006). Eine suboptimale Versorgung mit  $\text{CO}_2$  limitiert die Rate der Dunkelreaktion. Eventuelle Fluktuationen in der photosynthetischen Elektronentrans-

portkette können nicht mehr durch eine beschleunigte Dunkelreaktion abgepuffert werden. Dies führt zu einem Elektronenrückstau. Dieser wiederum verursacht eine Erhöhung des photooxidativen Stresses, was wiederum den Tocopherolgehalt in der Zelle steigen lässt.

### 4.3 Funktionen des Tocopherols in Cyanobakterien

Die Ergebnisse der Tocopherolbestimmungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Wildtypzellen des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 unter Variation der Kulturbedingungen konnten über photooxidativen Stress mit dem Photosystem II in Verbindung gebracht werden (siehe 4.2). Daher stand im weiteren Verlauf der Arbeit der Vergleich der Funktionalität des Photosystems II im Wildtyp und in der Tocopherol defizienten Mutante  $\Delta slr0090$  im Vordergrund. Mit Ausnahme des Mangels an Tocopherol konnte bis dahin kein Phänotyp für die  $\Delta hpd$ -Mutante beschrieben werden. Wachstumsrate, Gehalt an Pigmenten der Photosynthese und Organisation des Photosyntheseapparates unterschieden sich nicht vom Wildtyp (Dähnhardt et al., 2002).

#### 4.3.1 Funktionalität des Photosystems II

Die Experimente zur Effizienz des Photosystems II mittels Fluoreszenzmessungen und die zur Aktivität anhand der maximalen Sauerstoffproduktion im Licht zeigen übereinstimmend eine geringere Stabilität der Funktionalität des Photosystems II in der  $\Delta hpd$ -Mutante unter Starklicht im Vergleich zum Wildtyp (siehe 3.3.1 und 3.3.2). Der unter Starklichtbedingungen zu beobachtende photooxidative Stress resultiert aus der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wobei am Photosystems II vorrangig Singulett-Sauerstoff entsteht (Hideg et al., 2000). Eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Starklichtstress wurde bereits für transgene Tabakpflanzen mit vermindertem Tocopherolgehalt beschrieben (Tanaka et al., 1999; Grasses et al., 2001). Untersuchungen von Trebst et al. (2002) an *Chlamydomonas reinhardtii* demonstrierten, dass Tocopherol als Singulett-Sauerstoff-„Quencher“ die Funktionalität des Photosystems II schützt (Kruk et al., 2005). In Abhängigkeit von der eingestrahlten Lichtintensität stieg der Tocopherolgehalt in den Grünalgen. Wurde die Tocopherolbiosynthese mit einem Inhibitor der HPPD blockiert, konnte

keine Sauerstoffproduktion mehr nachgewiesen werden. Auch für *Arabidopsis thaliana* konnte gezeigt werden, dass Tocopherol eine wichtige Rolle für die Erhaltung der Funktionalität des Photosystems II im Starklicht spielt (Havaux et al., 2005).

Die Immunoblot-Analysen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass die Stabilität des D1-Proteins unter Starklicht in der Tocopherol defizienten Mutante im Vergleich zum Wildtyp eingeschränkt ist (siehe 3.3.3). Ein Abbau sowohl des D1- als auch des D2-Proteins im Starklicht konnte auch in *Chlamydomonas reinhardtii* Kulturen gezeigt werden, die in Anwesenheit von Inhibitoren der HPPD angezogen wurden. Des weiteren wurde beschrieben, dass dieser Effekt durch die Zugabe eines zellwandgängigen kurzkettigen Tocopherolanalogons verhindert werden kann (Trebst et al., 2002; 2004).

### **4.3.2 Photoinhibition des Photosystems II**

Weiterhin konnte im Verlauf der Analysen dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die Stabilität des D1-Proteins in Mutante und Wildtyp gleicht, wenn den Kulturen Translationshemmer zugesetzt werden (siehe 3.3.3). In der  $\Delta slr0090$ -Mutante liegt demzufolge eine Störung des D1-Turnovers und kein beschleunigter Abbau des Proteins vor.

Licht ist eine Voraussetzung für den Ablauf der Photosynthese, jedoch ebenso eine potentielle Gefahr für den Photosyntheseapparat. Werden photosynthetisch aktive Organismen hohen Lichtintensitäten ausgesetzt, führt dies häufig zu einer Hemmung der Aktivität des Photosystems II sprich der Photoinhibition des PS II (Powles, 1984; Prásil et al., 1992; Aro et al., 1993; Andersson und Aro, 2001). Zu lichtabhängigen Schäden am PS II kommt es bei Einstrahlung von Licht beliebiger Intensität, womit diese für photosynthetisch aktive Organismen unvermeidlich sind (Gombos et al., 1994; Tyystjärvi und Aro, 1996; Anderson und Chow 2002). Unter normalen Lichtbedingungen wird der Schaden durch die schnelle Reparatur des PS II kompensiert (Prásil et al., 1992; Aro et al., 1993; Andersson und Aro, 2001). Der Umfang der Lichtschädigung ist proportional zur eingestrahnten Lichtintensität (Tyystjärvi und Aro, 1996; Anderson und Chow, 2002; Park et al., 1995; Nishiyama et al., 2004), während die Reparatur ein Optimum bei einer bestimmten Intensität zeigt

(Allakhverdiev und Murata, 2004). Im Starklicht übersteigt die Geschwindigkeit der Schädigung durch das Licht die Rate der Reparatur des PS II, womit es zur Photoinhibition des Photosystems kommt.

Licht kann zusätzlich durch ROS vermittelten oxidativen Stress erzeugen. ROS entstehen unvermeidlich als Nebenprodukte der Photosynthese. Die Reduktion von Sauerstoff auf der Akzeptorseite des Photosystems I (PS I) als Resultat des photosynthetischen Elektronentransports führt zur Bildung von Sauerstoffsuperoxid ( $O_2^-$ ), welches weiterhin zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hydroxylradikalen ( $\cdot OH$ ) umgewandelt werden kann (Asada, 1999). Die Übertragung von Anregungsenergie angeregter Chlorophyllmoleküle auf Sauerstoff im Lichtsammelkomplex führt zur Bildung von Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) (Knox und Dodge, 1985; Zolla und Rinalducci, 2002). Unter normalen Bedingungen werden die verschiedenen ROS vom antioxidativen System, bestehend aus Antioxidantien wie  $\beta$ -Carotin und  $\alpha$ -Tocopherol und ROS abfangenden Enzymen wie Superoxid-Dismutase und Ascorbat-Peroxidase, auf ein unschädliches Niveau reduziert (Asada, 1999; Havaux et al., 2005). Übersteigt jedoch die Menge an absorbiertem Licht unter Starklichtbedingungen die Kapazitäten des Photosyntheseapparates, dann ist ein Anstieg der Menge an ROS und somit oxidativer Stress die Folge (Asada, 1999).

Die direkte Schädigung des PS II durch ROS wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Wird davon ausgegangen, dass ROS und dabei insbesondere Singulett-Sauerstoff die primäre Ursache für lichtvermittelte Schäden am PS II sind, können zwei Mechanismen genannt werden, der Akzeptorseiten-Mechanismus (Vass et al., 1992) und der Ladungsrekombinations-Mechanismus (Keren et al., 1997). Der Donatorenseiten-Mechanismus wiederum geht von keiner direkten Beteiligung der ROS an der Lichtschädigung des PS II aus. Eine Ansäuerung des Lumens durch den Protonentransport über die Thylakoidmembran inaktiviert dabei das Sauerstoffproduzierende System, was zur Folge hat, dass das oxidierte Chlorophyllmolekül des Reaktionszentrums  $P680^+$  eine längere Halbwertszeit erlangt und als starkes Oxidans das D1-Protein schädigt (Chen et al., 1992; Callahan et al., 1986; Theg et al., 1986; Klimov et al., 1990). Die Daten, die zur Formulierung dieser möglichen Mechanismen führten, stammen aus in vitro Studien an isolierten PS II-Komplexen bzw. isolierten Thylakoidmembranen. Daher bleibt unklar, ob diese Mechanismen in lebenden Zellen tatsächlich greifen. Hinzu kommt, dass in vitro die Fähigkeit zur

Reparatur des PS II wegfällt und der Einfluss der ROS auf die Reparatur nicht untersucht werden konnte.

Sowohl in Cyanobakterien als auch in Pflanzen wurden inzwischen jedoch in vivo Systeme etabliert, die unter Zuhilfenahme von Inhibitoren der Proteinsynthese die separate Betrachtung der Lichtschädigung des PS II und der Reparatur desselben erlauben (Gombos et al., 1994; Wada et al., 1994; Moon et al., 1995). Die Anwendung dieser Systeme zeigte, dass ROS primär über die Hemmung der Reparatur des PS II und nicht durch direkte Schädigung wirken (Nishiyama et al., 2004; Allakhverdiev und Murata, 2004; Nishiyama et al., 2001; Nishiyama et al., 2005) und dass die Lichtschädigung am PS II ein lichtabhängiger und nicht ein durch ROS initiiertes Prozess ist (Ohnishi et al., 2005; Hakala et al., 2005). Die Reparatur des PS II erfolgt in mehreren Schritten: Abbau des D1-Proteins, de novo Synthese des D1-Precursor Proteins (pre-D1), Insertion des pre-D1 in die Thylakoidmembran bei gleichzeitiger Assemblierung weiterer Komponenten des PS II, Reifung des D1-Proteins durch C-terminales Prozessieren des pre-D1 und schließlich die Assemblierung des Sauerstoffproduzierenden Systems (Prásil et al., 1992; Aro et al., 1993; Kyle et al., 1984; Ohad et al., 1984; Mattoo et al., 1989; Aro et al., 2005; Anbudurai, 1994). Demnach kann die Reparatur des PS II anhand des Turnovers des D1-Proteins verfolgt werden.

In *Synechocystis* Zellen konnte gezeigt werden, dass die Synthese des D1-Proteins durch erhöhte intrazelluläre  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $^1\text{O}_2$  Konzentrationen erheblich gehemmt wird. Der Abbau des D1-Proteins blieb hingegen unbeeinflusst (Nishiyama et al., 2004; Allakhverdiev und Murata, 2004; Nishiyama et al., 2001).

### **4.3.3 Neues Modell des Mechanismus der Lichtschädigung am PS II**

Der initiale Grad der Lichtschädigung an PS II ist absolut proportional zur Intensität des eingestrahlten Lichtes (Tyystjärvi und Aro, 1996; Anderson und Chow, 2002; Park et al., 1995; Nishiyama, 2004; Allakhverdiev und Murata, 2004; Lee et al., 2001). Diese Tatsache ist mit Hilfe der in 4.3.2 beschriebenen Mechanismen zur Lichtschädigung nicht vollständig zu erklären. Eine lineare Beziehung ergäbe sich weder aus dem Akzeptorseiten- noch aus dem Ladungsrekombinations- noch aus dem Donatorenseitenmechanismus. Des Weiteren ist die Lichtschädigung unabhängig vom Elektronentransport (Nishiyama et al., 2004; Hakala et al., 2005;

Allakhverdiev et al., 2005), während bei Zugrundelegung einer der drei Mechanismen ein Einfluss der Elektronentransportrate zu erwarten wäre. Ebenso scheitern die bisher beschriebenen Modelle an der Erklärung der in 4.3.2 dargestellten Fakten, dass die Lichtschädigung von hohen Dosen  $^1\text{O}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  unbeeinflusst bleibt (Nishiyama et al., 2004; Allakhverdiev und Murata, 2004; Nishiyama et al., 2001)

Nishiyama et al. (2006) beschreiben ein neues Modell des Mechanismus der Entstehung von Lichtschäden am PS II. Demnach verläuft die Lichtschädigung in zwei Schritten. Der primäre Schaden entsteht durch ultraviolettes (UV) und starkes blaues Licht am Sauerstoffproduzierenden System, der sekundäre durch Licht, welches von Photosynthesepigmenten am PS II absorbiert wird. Das primäre Ereignis der Lichtschädigung ist wahrscheinlich die Zerstörung des Manganclusters, womit vor allem die lineare Beziehung zwischen Lichtintensität und Schädigung und die Unabhängigkeit von der Elektronentransportrate erklärt werden könnten (Hakala et al., 2005; Zsiros et al., 2006). Die Zerstörung des Sauerstoffproduzierenden Komplexes beendet die Zufuhr von Elektronen aus Wassermolekülen Richtung  $\text{P680}^+$ , die Konzentration an  $\text{P680}^+$  steigt. Als starkes Oxidans (Klimov et al., 1979) schädigt infolgedessen  $\text{P680}^+$  das Reaktionszentrum des PS II durch Oxidation umliegender Aminosäurereste von Proteinen insbesondere des D1-Proteins. Alternativ dazu könnte die Zerstörung des Sauerstoffproduzierenden Komplexes dazu führen, dass Sauerstoffmoleküle freien Zugang zu  $\text{P680}$  Molekülen bekommen, wodurch  $^1\text{O}_2$  oder andere ROS entstehen, die wiederum das Reaktionszentrum oxidativ schädigen (Anderson, 2001; Anderson und Chow, 2002). In beiden Fällen ist der Verlust der Funktionsfähigkeit des Sauerstoffproduzierenden Komplexes der limitierende Schritt im Prozess der Lichtschädigung des PS II.

Die im Verlauf dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zum Phänotyp der  $\Delta slr0090$ -Mutante (siehe 3.3) stehen im Einklang mit diesem Modell.

#### 4.4 Lokalisierung der Tocopherolbiosynthese

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase mittels Immunoblot-Analysen in der Plasmamembran des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 nachgewiesen werden (siehe 3.4.1). Geht man davon aus, dass Tocopherol das D1-Protein des PS II vor oxidativer Schädigung schützt, würde man zunächst erwarten, die Enzyme der Tocopherolbiosynthese in der photosynthetisch aktiven Thylakoidmembran vorzufinden. Zak et al. (2001) konnten zeigen, dass die ersten Schritte der Biogenese des PS II in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in der Plasmamembran ablaufen. Die Assemblierung des Reaktionszentrums findet in der Plasmamembran statt. Nachdem das Reaktionszentrum per Membranvesikeltransport oder lateraler Verschiebung über verbundene Membranen in die Thylakoidmembran gelangt ist, wird das PS II durch regulatorische und Lichtsammeluntereinheiten komplettiert. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, eines der wenigen Cyanobakterien, deren Existenz bereits vor dem endosymbiontischen Ursprung der Chloroplasten nachgewiesen werden kann (Nelissen et al., 1995), kein klar differenziertes Thylakoidmembransystem besitzt. Beide Photosysteme sind in diesen Zellen in der Plasmamembran zu finden (Stanier und Cohen-Bazire, 1977; Rippka et al., 1974). Zellen des Cyanobakteriums *Gloeobacter violaceus* weisen eine geringe Effizienz der Photosynthese auf und sind extrem lichtempfindlich (Zak et al., 2001).

Die Tatsache, dass die Biogenese des PS II in der Plasmamembran beginnt und dass die Reaktionszentren in der Plasmamembran noch nicht in einen funktionierenden Photosyntheseapparat eingebunden sind, könnten für eine höhere Anfälligkeit des PS II gegenüber oxidativem Stress sprechen. Die Fakten zur Photosynthese des Cyanobakteriums *Gloeobacter violaceus* deuten ebenfalls in diese Richtung. In diesem Zusammenhang betrachtet, drängt sich die Annahme auf, dass Tocopherol in der Plasmamembran synthetisiert wird, um dort die neu gebildeten Reaktionszentren des PS II vor oxidativem Stress zu schützen.

Die Ergebnisse zum Phänotyp der  $\Delta hpd$ - Mutante (siehe 3.3.3), die zeigen, dass diese in der Reparatur des PS II gestört ist, fügen sich ebenso in dieses Bild.

Einzelne HPLC-Analysen der isolierten Membranfraktionen deuteten darauf hin, dass Tocopherol in der Plasmamembran nachgewiesen werden kann, nicht jedoch in der Thylakoidmembran. Dieses vorläufige Ergebnis passt zu der Lokalisierung der  $\gamma$ -

Tocopherol-Methyltransferase in der Plasmamembran und unterstützt die Hypothese, dass Tocopherol eine Rolle beim Schutz der Biogenese des PS II spielt.

Mittels Immunoblot-Analysen konnte die Methyltransferase SLL0418 sowohl in der Plasmamembran als auch in der Thylakoidmembran nachgewiesen werden. Die im Verlauf dieser Arbeit zur Deletionsmutante  $\Delta sll0418$  gewonnenen Ergebnisse (siehe 3.1.1.2) sprechen gegen eine spezifische Rolle des Enzyms in der Tocopherolbiosynthese (Backasch et al, 2005). Daher steht dieses Ergebnis nicht in direktem Widerspruch zu der Hypothese, dass Tocopherol in der Plasmamembran synthetisiert wird.

## 4.5 Ausblick

Die im Verlauf der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bilden die Grundlage für weiterführende Untersuchungen sowohl zum alternativen, HPPD unabhängigen Syntheseweg des Plastochinons in Cyanobakterien, als auch zur Funktion des  $\alpha$ -Tocopherols und dessen Syntheseort.

Es konnte gezeigt werden, dass Methyltransferasen aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 offensichtlich eine katalytische Promiskuität besitzen. Daraus ergibt sich, dass das Anfertigen von Doppel- und Dreifachmutanten nötig ist, um die Beteiligung einzelner Methyltransferasen an der Plastochinonbiosynthese zu belegen. Die im Verlauf der Arbeit erzeugte heteroploide  $\Delta$ -*slr0926*-Mutante erscheint als vielsprechender Ausgangspunkt für Expressionsexperimente zur Aufklärung der HPPD unabhängigen Synthese.

Da gezeigt werden konnte, dass das Photosystem II in der Tocopherol defizienten  $\Delta$ -*hpd*-Mutante eine geringere Effizienz und Aktivität aufweist, wären Methoden zur weiterführenden Aufschlüsselung dieser Tatsache nützlich. Hier bietet sich die Messung der Thermolumineszenz als nichtinvasive, an intakten Zellen durchführbare Methode zur Aufschlüsselung der Vorgänge im Photosystem an.

Die geglückte Lokalisierung zweier an der Tocopherolbiosynthese beteiligter Enzyme in den verschiedenen Membranen des Bakteriums sollte Anreiz dazu sein, weitere Versuche folgen zu lassen. Mit Hilfe von anderen Markierungen sollte das Interesse hier vor allem der HPPD als Schlüsselenzym der Synthese gelten.

Die dargestellten Ergebnisse der Datenbankrecherchen bieten insbesondere in Form der Liste der Gene, die ausschließlich in Cyanobakterien, die Tocopherol enthalten, nachzuweisen sind, bzw. jenen, die nur in solchen vorkommen, die kein Tocopherol bilden, die Basis für fortführende Arbeiten. Die Erzeugung und Charakterisierung von Deletionsmutanten der entsprechenden Gene erscheint in diesem Zusammenhang sinnvoll.

## 5 Zusammenfassung

Im Gegensatz zur Situation in Höheren Pflanzen ist das Enzym 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPPD) in Cyanobakterien nicht essentiell für die Plastochinon Biosynthese. Die  $\Delta hpd$ -Mutante des Organismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist nicht in der Lage, Vitamin E zu synthetisieren, der Plastochinon Pool ist jedoch unverändert. Demnach besitzen Cyanobakterien die Fähigkeit Plastochinon auf einem alternativen, von der HPPD unabhängigen Weg zu synthetisieren.

Zur Identifizierung von Faktoren, die die Tocopherolbiosynthese in Cyanobakterien beeinflussen, wurden Wildtypzellen des Organismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 unter verschiedenen Bedingungen angezogen. Variiert wurden die Belichtungsstärke, die Kohlendioxidversorgung und die Kohlenstoffquelle (photoautotrophe bzw. photomixotrophe Bedingungen). Bei hoher Lichtintensität und bei geringer CO<sub>2</sub>-Versorgung steigt die gemessene Tocopherolmenge. Photomixotrophes Wachstum führt zu geringeren Tocopherolgehalten verglichen mit photoautotrophem Wachstum. Im Zuge der Untersuchungen konnte unter photoautotrophen Bedingungen eine homoploide  $\Delta sll0418$ -Mutante erzeugt werden. Im Widerspruch zu Angaben in der Literatur ist das Ausschalten dieses Genes unter photomixotrophen Bedingungen nicht letal, und der Einfluss sowohl auf die Tocopherol- als auch auf die Plastochinonmenge in der Zelle zu vernachlässigen.

Die Tocopherol defiziente Mutante  $\Delta slr0090$ , in der die HPPD ausgeschaltet ist, zeigte eine geringere Stabilität des Photosystems II im Vergleich zum Wildtyp bei Einstrahlung hoher Lichtintensitäten. Mittels Immunoblot-Analysen wurde dargestellt, dass der D1-Protein Turnover in der  $\Delta hpd$  im Lichtstress gestört ist. Anhand mit Histidinresten markierter Mutanten konnten weitere Immunoblot-Analysen die  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase in der Plasmamembran und die SLL0418 sowohl in der Plasma- als auch in der Thylakoidmembran nachweisen.

Datenbankrecherchen ergaben einen direkten Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Orthologen der an der Synthese beteiligten Enzyme mit der Tatsache, dass das entsprechende Cyanobakterium Tocopherol enthält. Des weiteren zeigten sich Hinweise auf die katalytische Promiskuität der beteiligten Methyltransferasen. Der Vergleich vollständiger Genome von Cyanobakterien resultierte in einer Liste von Genen, die entweder ausschließlich in Tocopherol synthetisierenden oder ausschließlich in Tocopherol freien Cyanobakterien vorkommen.

## 6 Summary

In contrast to the situation in higher plants the deletion of the gene encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (*hpd*) in *Synechocystis* sp. PCC 6803 leads to a tocopherol lacking mutant without affecting the plastoquinone biosynthesis. Cyanobacteria are able to synthesize plastoquinone in an alternative way, which is independent of the enzyme HPPD.

To identify influences on tocopherol biosynthesis in cyanobacteria, wildtype cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803 were grown under several conditions. They differed towards light intensity, carbon dioxide supply and carbon source (photoautotrophic or photomixotrophic conditions). The tocopherol levels in wild type cells increase under higher light conditions and low carbon dioxide supply. Photomixotrophic growth lead to lower vitamin E amounts in cells compared to those grown photoautotrophically. It was possible to segregate a homozygous  $\Delta$ *slr0418* mutant under photoautotrophic conditions. In contrast to former suggestions in the literature the deletion of this gene is not lethal under photomixotrophic conditions and the influence on tocopherol and plastoquinone amounts is diminutive.

The tocopherol deficient mutant  $\Delta$ *slr0090*, lacking the enzyme HPPD, showed reduced stability of photosystem II compared to wildtype under high light intensities. Immunoblot-analysis demonstrated a disturbed D1-protein turnover of the  $\Delta$ *hpd* under light stress. On behalf of his-tagged mutants further immunoblot-analysis could detect the  $\gamma$ -tocopherol-methyltransferase in plasmamembrane and SLL0418 in plasma- as well as in thylakoidmembrane.

Databank research lead to direct correlation between existing orthologs of enzymes involved in synthesis with the fact, that the according cyanobacteria contained tocopherol. Furthermore it gave hints for the catalytic promiscuity of methyltransferases. The comparison of complete cyanobacteria genomes provided a list of genes, which exclusively exist in cyanobacteria containing tocopherol or such that does not contain tocopherol.

## 7 Literaturverzeichnis

Adamiec M, Drath M, Jackowski G (2008) Redox state of plastoquinone pool regulates expression of *Arabidopsis thaliana* genes in response to elevated irradiance. *Acta Biochem. Pol.* **55**: 161-174

Alfonso M, Perewoska I, Kirilovsky D (2000) Redox control of psbA gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Involvement of the cytochrome b6/f complex. *Plant Physiol.* **122**: 505–515

Allakhverdiev SI, Nishiyama Y, Takahashi S, Miyairi S, Suzuki I, Murata N (2005) Systematic analysis of the relation of electron transport and ATP synthesis to the photodamage and repair of photosystem II in *Synechocystis*. *Plant Physiol.* **137**: 263–273

Allakhverdiev SI, Murata N (2004) Environmental stress inhibits the synthesis de novo of D1 protein in the photodamage-repair cycle of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta* **1657**: 23–32

Anbudurai PR, Mor TS, Ohad I, Shestakov SV, Pakrasi HB (1994) The *ctpA* gene encodes the C-terminal processing protease for the D1 protein of the photosystem II reaction center complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8082–8086

Anderson JM (2001) Does functional photosystem II complex have an oxygen channel? *FEBS Lett.* **488**: 1–4

Anderson JM, Chow WS (2002) Structural and functional dynamics of plant photosystem II. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **357**: 1421–1430

Anderson JM, Andersson B (1988) The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar conversion. *Trends Biochem. Sci.* **13**: 351-355

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

Andersson B, Aro EM (2001) Photodamage and D1 protein turnover in photosystem II, in: Aro EM, Andersson B (Eds.), *Regulation of Photosynthesis*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 377–393.

Arango Y, Heise K-P (1998) Tocopherol synthesis from homogentisate in *Capsicum annuum* L. (yellow pepper) chromoplast membranes: evidence for tocopherol cyclase. *Biochem. J.* **336**: 531-533

Aro EM, Suorsa M, Rokka A, Allahverdiyeva Y, Paakkarinen V, Saleem A, Battchikova N, Rintamaki E (2005) Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *J. Exp. Bot.* **56**: 347–356

- Aro EM, McCaffery S, Anderson JM (1994) Recovery from photoinhibition in peas (*Pisum sativum* L.) acclimated to varying growth irradiances (role of D1 protein turnover). *Plant Physiol.* **104**: 1033–41
- Aro EM, Virgin I, Andersson B (1993) Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* **1143**: 113-134
- Asada K (1999) The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 601–639
- Azzi A (2007) Molecular mechanism of alpha-tocopherol action. *Free Radic. Biol. Med.* **43**: 16-21
- Azzi A, Stocker A (2000) Vitamin E: non-antioxidant roles. *Prog. Lipid Res.* **39**: 231-255
- Backasch N, Schulz-Friedrich R, Appel J (2005) Influences on tocopherol biosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Plant Physiol.* **162**: 758-766
- Barber J, Nield J (2002) Organization of transmembrane helices in photosystem II: comparison of plants and cyanobacteria. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **357**: 1329-1335
- Blum H, Beier H, Gross H (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99
- Bradford MM (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
- Brigelius-Flohé R, Traber MG (1999) Vitamin E: Function and metabolism. *FASEB* **13**: 1145-1155
- Cahoon EB, Hall SE, Ripp KG, Ganzke T, Hitz WD, Coughlan SJ (2003) Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nat. Biotechnol.* **21**: 1082-1087
- Callahan FE, Becker DW, Cheniae GM (1986) Studies on the photoinactivation of the water-oxidizing enzyme. II. Characterization of weak-light photoinhibition of PSII and its light-induced recovery. *Plant Physiol.* **82**: 261–269
- Chen GX, Kazimir J, Cheniae GM, Photoinhibition of hydroxylamineextracted photosystem II membranes: studies of the mechanism. *Biochemistry* **31**: 11072–11083
- Cheng Z, Sattler S, Maeda H, Sakuragi Y, Bryant DA, DellaPenna D (2003) Highly divergent methyltransferases catalyze a conserved reaction in tocopherol and plastoquinone synthesis in cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes. *Plant Cell* **15**: 2343-2356

- Collakova E, DellaPenna D (2001) Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**: 1113-1124
- Collakova E, DellaPenna D (2003) Homogentisate phytyltransferase is limiting for tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **131**: 632-642
- Dasilva EJ, Jensen A (1971) Content of tocopherol in some bluegreen algae. *Biochim Biophys Acta* **239**: 345–347
- Dähnhardt D, Falk J, Appel J, van der Kooij TAW, Schulz-Friedrich R, Krupinska K (2002) The hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Synechocystis* sp. PC 6803 is not required for plastoquinone biosynthesis. *FEBS Lett.* **523**: 177-181
- Demmig-Adams B, Adams III WW (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**: 599-626
- Denoya CD, Skinner DD, Morgenstern MR (1994) A *Streptomyces avermitilis* gene encoding a 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase-like protein that directs the production of homogentisic acid and an ochronotic pigment in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**: 5312-5319
- d'Harlingue A, Camara B (1985) Plastid enzymes of terpenoid biosynthesis: purification and characterization of a gamma-tocopherol methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **260**: 15200-15203
- Dörmann P (2003) Corn with enhanced antioxidant potential. *Nat. Biotechnol.* **21**: 1015-1016
- Dörmann P (2007) Functional diversity of tocochromanols in plants. *Planta* **225**: 269-276
- Fahrenholtz SR, Doleiden FH, Trozzolo AM, Lamola AA (1974) On the quenching of singlet oxygen by alpha-tocopherol. *Photochem. Photobiol.* **20**, 505-509.
- Fryer MJ (1992) The antioxidant effects of thylakoid vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol). *Plant Cell Environ.* **15**: 381-392
- Fufezan C, Rutherford AW, Krieger-Liszkay A (2002) Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II. *FEBS Lett.* **532**: 407–410
- Gombos Z, Wada H, Murata N (1994) The recovery of photosynthesis from low-temperature photoinhibition is accelerated by the unsaturation of membrane lipids: a mechanism of chilling tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8787–8791
- Grasses T, Grimm B, Korroleva O, Jahns P (2001) Loss of  $\alpha$ -tocopherol in tobacco plants with decreased geranylgeranyl reductase activity does not modify photosynthesis in optimal growth conditions but increases sensitivity to high-light stress. *Planta* **213**: 620-628

- Grigorieva G, Shestakov S (1982) Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* **13**: 367-370
- Grossmann S, Waksman EG (1984) New aspects of the inhibition of soybean lipoxygenase by  $\alpha$ -tocopherol. *Int. J. Biochem.* **16**: 281-289
- Hakala M, Tuominen I, Keränen M, Tyystjärvi T, Tyystjärvi E (2005) Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* **1706**: 68–80
- Havaux M, Eymery F, Porfirova S, Rey P, Dörmann P (2005) Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **17**: 3451-3469
- Helbig, A (2005) Charakterisierung von Membranen aus dem einzelligen Organismus *Synechocystis* sp. PCC 6803. Diplomarbeit der CAU zu Kiel
- Henkes S, Sonnewald U, Badur R, Flachmann R, Stitt M (2001) A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **13**: 535–551
- Hideg E, Vass I, Kálai T, Hideg K (2000) Singlet oxygen detection with sterically hindered amine derivatives in plants under light stress. *Methods Enzymol.* **319**: 77-85
- Hideg E, Kalai T, Hideg K, Vass I (1998) Photoinhibition of photosynthesis in vivo results in singlet oxygen production. Detection via nitroxide-induced fluorescence quenching in broad bean leaves. *Biochemistry* **37**: 11405–11411
- Hideg E, Spetea C, Vass I (1994) Singlet oxygen production in thylakoid membranes during photoinhibition as detected by ESR spectroscopy. *Photosyn. Res.* **39**:191–199
- Hofius D, Hajirezaei M-R, Geiger M, Tschiersch H, Melzer M, Sonnewald U (2004) RNAi-mediated tocopherol deficiency impairs photoassimilate export in transgenic potato plants. *Plant Physiol.* **135**:1256–1268
- Horton P, Ruban AV, Walters RG (1994) Regulation of light harvesting in green plants. *Plant Physiol.* **106**: 415-420
- Ischebeck T, Zbierzak AM, Kanwischer M, Dörmann P (2006) A salvage pathway for phytol metabolism in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **281**:2470–2477
- Jefford CW, Cadby PA (1981) Evaluation of the models for the mechanism of action of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Experientia* **37**: 1134-1137
- Kagan VE, Quinn PJ (1988) The interaction of  $\alpha$ -tocopherol and homologues with shorter hydrocarbon chains with phospholipid dispersions, a fluorescence probe study. *Eur. J. Biochem.* **171**: 661-667
- Kaiser S, Di Mascio P, Murphy ME, Sies H (1990) Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by the tocopherols. *Arch. Biochem. Biophys.* **277**: 101-108

- Kamal-Eldin A, Appelqvist LA (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* **31**: 671-701
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, 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
- Keren N, Berg A, van Kan PJM, Levanon H, Ohad I (1997) Mechanism of photosystem II photoinactivation and D1 protein degradation at low light: The role of back electron flow. *Proc.Natl. Acad. Sci.USA* **94**: 1579–1584
- Klimov VV, Shafiev MA, Allakhverdiev SI (1990) Photoinactivation of the reactivation capacity of photosystem II in pea subchloroplast particles after a complete removal of manganese. *Photosynth. Res.* **23**: 59–65
- Klimov VV, Allakhverdiev SI, Demeter S, Krasnovsky AA (1979) Photoreduction of pheophytin in the photosystem II of chloroplasts depending on the oxidation–reduction potential of the medium. *Dokl. Akad. Nauk Ukr. SSR* **249**: 227–230
- Knox JP, Dodge AD (1985) Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry* **24**: 889–896
- Kruk J, Holländer Czytko H, Oettmeier W, Trebst A (2005) Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *J. Plant Physiol.* **162**: 749-757
- Kyle DJ, Ohad I, Arntzen CJ (1984) Membrane protein damage and repair: selective loss of quinone–protein function in chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **181**: 4070–4074
- Labarre J, Chauvat F, 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**: 6449-6457
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Larsson C, Andersson B, Åkerlund, HE (1985) Partitioning of plant cells, cell walls, membranes, and organelles. In *Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems, Theory, Methods, Uses, and Applications to Biotechnology* 497-527
- Lee HY, Hong YN, Chow WS (2001) Photoinactivation of photosystem II complex and photoprotection by non-functional neighbours in *Capsicum annuum* L. leaves. *Planta* **212**: 332–342
- Li H, Sherman LA (2000) A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol.* **182**: 4268–4277

- Lichtenthaler H (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.*, 148:350-382
- Lindstedt S, Rundgren M (1982) Blue color, metal content, and substrate binding in 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain P.J. 874. *J. Biol. Chem.* **257**: 11922-11932
- Macpherson AN, Telfer A, Barber J, Truscott TG (1993) Direct detection of singlet oxygen from isolated photosystem II reaction centers. *Biochim. Biophys. Acta* **1143**: 301–309
- Maeda H, Song W, Sage TL, DellaPenna D (2006) Tocopherols play a crucial role in low-temperature adaptation and phloem loading in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**:2710–2732
- Mao HB, Li GF, Ruan X, Wu QY, Gong YD, Zhang XF, Zhao NM (2002) The redox state of plastoquinone pool regulates state transitions via cytochrome b6f complex in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* **519**: 82-86
- Mattoo AK, Marder JB, Edelman M (1989) Dynamics of the photosystem II reaction center. *Cell* **56**: 241–246
- Mohamed A, Jansson C (1989) Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant. Mol. Biol.* **13**: 693–700
- Moon BY, Higashi S, Gombos Z, Murata N, Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6219–6223
- Moran GR (2005) 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**: 117-128
- Motohashi R, Ito T, Kobayashi M, Taji T, Nagata N, Asami T, Yoshida S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2003) Functional analysis of the 37 kDa inner envelope membrane polypeptide in chloroplast biogenesis using *Ds*-tagged *Arabidopsis* pale-green mutant. *Plant J.* **34**: 719-731
- Mullineaux CW, Allen JF (1990) State 1–state 2 transitions in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 are controlled by the redox state of electron carriers between photosystems I and II. *Photosynth. Res.* **22**: 157–166
- Mullins CJ, Walton TJ, Newton RP, Beynon JH, Brenton AG, Griffiths WJ (1986) The identification of  $\delta$ -tocopherol in cyanobacteria using mass analysed ion-kinetic energy spectroscopy. *Biochem. Soc. Trans.* **14**: 969–970
- Munné-Bosch S, Alegre L (2002) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **21**: 31-57

- Munné-Bosch S (2005) Linking tocopherols with cellular signaling in plants. *New Phytol.* **166**: 363-366
- Murata N, Omata T (1983) Isolation of cyanobacterial plasma membranes. *Methods Enzymol.* **167**: 245 - 251
- Neely WC, Martin JM, Barker SA (1988) Products and relative reaction rates of the oxidation of tocopherols with singlet molecular oxygen. *Photochem. Photobiol.* **48**: 423-428
- Nelissen B, Van der Peer Y, Wilmotte A, De Wachter R (1995) An early origin of plastids within the cyanobacterial divergence is suggested by evolutionary trees based on complete 16S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* **12**: 1166-1173
- Niki E, Kawakami A, Saito M, Yamamoto Y, Tsuchiya J, Kamiya Y (1985) Effect of phytol side chain of vitamin E on its antioxidant activity. *J. Biol. Chem.* **260**: 2191-2196
- Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Murata N (2006) A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**: 742-749
- Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Murata N (2005) Inhibition of the repair of photosystem II by oxidative stress in cyanobacteria. *Photosynth. Res.* **84**: 1-7
- Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Yamamoto H, Hayashi H, Murata N (2004) Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* **43**: 11321-11330
- Nishiyama Y, Yamamoto H, Allakhverdiev SI, Inaba M, Yokota A, Murata N, (2001) Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *EMBO J.* **20**: 5587-5594
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 249-279
- Norling B, Zak E, Andersson B, Pakrasi H (1998): 2D-isolation of pure plasma and thylakoid membranes from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* **436**: 189-192
- Norris SR, Shen X, DellaPenna D (1998) Complementation of the *Arabidopsis* pds1 mutation with the gene encoding p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiol.* **117**: 1317-1323
- Norris SR, Barette TR, DellaPenna D (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell* **7**: 2139-2149
- Ogbonna JC, Ichige E, Tanaka H (2002) Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 532-538

Ohad I, Kyle DJ, Arntzen CJ (1984) Membrane protein damage and repair: removal and replacement of inactivated 32-kilodalton polypeptide in chloroplast membranes. *J. Cell Biol.* **99**: 481–485

Ohnishi N, Allakhverdiev SI, Takahashi S, Higashi S, Watanabe M, Nishiyama Y, Murata N (2005) Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. *Biochemistry* **44**: 8494–8499

Park YI, Chow WS, Anderson JM (1995) Light inactivation of functional photosystem II in leaves of peas grown in moderate light depends on photon exposure. *Planta* **196**: 401–411

Pfannschmidt T (2002) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci.* **8**: 33-41

Pfannschmidt T, Nilsson A, Allen JF (1999) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* **397**: 625-628

Porfirova S, Bergmüller E, Tropf S, Lemke R, Dörmann P (2002) Isolation of an *Arabidopsis* mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **99**: 12495-12500

Powles SB (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**: 15-44

Powls R, Redfearn ER (1967) The tocopherols of the blue-green algae. *Biochem. J.* **104**: 24c–26c.

Prásil O, Adir N, Ohad I (1992) Dynamics of photosystem II: mechanism of photoinhibition and recovery processes, in: J. Barber (Ed.), Topics in Photosynthesis, The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology, Vol. 11, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, pp. 295–348.

Que LJ, Ho RYN (1996) Dioxygen activation by enzymes with mononuclear nonheme activation sites. *Chem. Rev.* **96**: 2607-2624

Qi Q, Hao M, Ng WO, Slater SC, Baszis SR, Weiss JD, Valentin HE (2005) Application of the *Synechococcus* nirA promoter to establish an inducible expression system for engineering the *Synechocystis* tocopherol pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5678-5684

Rippka, R, and Herdman, M (1992) Catalogue of strains. pasteur culture collection of cyanobacterial strains in axenic culture. Vol I, Institut Pasteur, Paris

Rippka R, Waterbury JB, Cohen-Bazire G (1974) A cyanobacterium which lacks thylakoids. *Arch. Microbiol.* **100**: 419–436

- Rüetschi U, Odelhög B, Lindstedt S, Barros-Söderling J, Perrson B, Jörnvall H (1992) Characterization of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Eur. J. Biochem.* **205**: 459-466
- Russin WA, Evert RF, Vanderveer PJ, Sharkey TD, Briggs SP (1996) Modification of a specific class of plasmodesmata and loss of sucrose export ability in the *sucrose export defective1* maize mutant. *Plant Cell* **8**:645–658
- Rutherford AW, Krieger-Liszkay A (2001) Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 648–653
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Ehrlich HA und Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Press*, New York
- Sanger F, Nickelsen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5463-5467
- Savidge B, Weiss JD, Wong YHH, Lassner MW, Mitsky TA, Shewmaker CK, Post-Beittenmiller D, Valentin HE (2002) Isolation and characterization of homogentisate phytyltransferase genes from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **129**: 321-332
- Sattler SE, Cahoon EB, Coughlan SJ, DellaPenna D (2003) Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. *Plant Physiol.* **134**: 2184-2195
- Schledz M, Seidler A, Beyer P, Neuhaus G (2001) A novel phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 involved in tocopherol biosynthesis. *FEBS Lett.* **499**: 15-20
- Schubert HL, Blumenthal RM, Cheng X (2003) Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 329–335
- Shintani DK, Cheng Z, DellaPenna D (2002) The role of 2-methyl-6-phytylbenzoquinone methyltransferase in determining tocopherol composition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* **511**: 1-5
- Shintani DK, DellaPenna D (1998) Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science* **282**: 2098-2100
- Soll J (1987)  $\alpha$ -Tocopherol and plastoquinone synthesis in chloroplasts membranes. *Methods Enzymol.* **148**: 383-392

- Soll J, Schultz G, Joyard J, Douce R, Block MA (1985) Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **238**: 290-299
- Soll J, Kemmerling M, Schultz G (1980) Tocopherol and plastoquinone biosynthesis in spinach chloroplasts subfractions. *Arch. Biochem. Biophys.* **204**: 544-550
- Soll J, Schultz G (1979) Comparison of geranylgeranyl and phytyl substituted methylquinols in the tocopherol synthesis of spinach chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **91**: 715-720
- Stanier RY, Cohen-Bazire G (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**: 225-274
- Tanaka R, Oster U, Kruse E, Rüdiger W, Grimm B (1999) Reduced activity of geranylgeranyl reductase leads to loss of chlorophyll II and tocopherol and to partially geranylgeranylated chlorophyll II in transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for geranylgeranyl reductase. *Plant. Physiol.* **120**: 695-704
- Tappel AL, (1962) Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitam. Horm.* **20**: 493-510
- Telfer A, Bishop SM, Philipps D, Barber J (1994) Isolated photosynthetic reaction center of photosystem II as a sensitizer for the formation of singlet oxygen. Detection and quantum yield determination using a chemical trapping technique. *J. Biol. Chem.* **269**: 13244–13253
- Theg SM, Filar LJ, Dilley RA (1986) Photoinactivation of chloroplasts already inhibited on the oxidizing side of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* **849**: 104–111
- Thomas M, Foote CS (1978) Chemistry of oxygen. XXVI. Photooxygenation of phenols. *Photochem. Photobiol.* **27**: 683-693
- Tomoeda K, Awata H, Matsuura T, Matsuda I, Ploechl E, Milovac T, Boneh A, Scott R, Danks DM, Endo F (2000) Mutations in the 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase gene are responsible for tyrosinemia type III and hawkinsinuria. *Mol. Genet. Metab.* **71**: 506-510
- Trebst A, Depka B, Holländer-Czytka H (2002) A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* **516**: 156-160
- Tyystjärvi E, Aro EM (1996) The rate constant of photoinhibition, measured in lincomycin-treated leaves, is directly proportional to light intensity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 2213–2218
- Vass I, Styring S, Hundal T, Koivuniemi A, Aro EM, Andersson B (1992) The reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced QA species promote chlorophyll triplet formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1408–1412

Wada H, Gombos Z, Murata N (1994) Contribution of membrane lipids to the ability of the photosynthetic machinery to tolerate temperature stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 4273–4277

Wang X, Quinn PJ (1999) Vitamin E and its function in membranes. *Prog. Lipid Res.* **38**: 309-336

Yamauchi R, Matsushita S (1977) Quenching effect of tocopherols on the methyl linoleate photooxidation and their oxidation products. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 1425-1430

Zak E, Norling B, Maitra R, Huang F, Pakrasi HB (2001) The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **23**: 13443-13448

Zsiros O, Allakhverdiev SI, Higashi S, Watanabe W, Nishiyama Y, Murata N (2006) Very strong UV-A light temporally separates the photoinhibition of photosystem II into light-induced inactivation and repair. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**: 123–129

Zolla L, Rinalducci S (2002) Involvement of active oxygen species in degradation of light-harvesting proteins under light stresses. *Biochemistry* **41**: 14391–14402

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
APX	Ascorbat-Peroxidase
Bis	Bisacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Chl	Chlorophyll
DEX	Dextran
DHAR	Dehydroascorbat-Reduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DMPBQ	Dimethyl-6-phytyl-1,4-benzohydrochinon
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fd <sub>ox</sub>	Ferredoxin in der oxidierten Form
Fd <sub>red</sub>	Ferredoxin in der reduzierten Form
g	Zentrifugalbeschleunigung
GGDP	Geranygeranyl-diphosphat
GGDR	Geranylgeranyl-diphosphat-Reduktase
glc	Glucose
GR	Glutathion-Reduktase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HGGT	Homogentisat-Geranylgeranyl-Transferase
<i>hpd</i>	das für die 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase kodierende Gen
$\Delta hpd$	Deletionsmutante des <i>hpd</i> Gens
HPLC	Hochleistungsflüssig-Chromatographie ( <i>High-Performance-Liquid-Chromatography</i> )
HPP	4-Hydroxyphenylpyruvat

HPPD	4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase
HPT	Homogentisat-Phytyltransferase
HST	Homogentisat-Solanyl-Transferase
k	Kulturkolben
kDa	Kilodalton
KP <sub>i</sub>	Kaliumphosphat
MDHAR	Monodehydroascorbat-Reduktase
MPBQ	2-Methyl-6-phytyl-1,4-benzohydrochinon
MT	Methyltransferase
MT	Mutante
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
n.s.	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
OM	Außenmembranfraktion ( <i>outer membrane</i> )
ox.	Oxidiert
PAM	<i>Pulse Amplitude Modulation</i>
PCC	Pasteur Culture Collection
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDP	Phytyl-diphosphat
PEG	Polyethylenglycol
PM1	Plasmamembranfraktion 1
PM2	Plasmamembranfraktion 2
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
r	Kulturröhre
red.	Reduziert
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
s.	siehe
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )

Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris abgepuffert salzig ( <i>tris buffered saline</i> )
TC	Tocopherol-Cyclase
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TES	N-Tris(hydroxymethyl)-2-aminoethansulfonsäure
TM	Thylakoidmembranfraktion
$\gamma$ -TMT	$\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase
$\gamma$ -TocMet	$\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TTBS	Tris abgepuffert salzig plus Tween ( <i>tris buffered saline tween</i> )
u	Enzymeinheit ( <i>unit</i> )
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumen/Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen ( <i>weight/volume</i> )
z.B.	zum Beispiel

### **Anmerkung**

Englische Termini, für die es keine gebräuchlichen deutschen Ausdrücke gibt und die teilweise auch Eingang in die deutschsprachige Fachliteratur gefunden haben, wurden als solche beibehalten, kursiv und in Anführungszeichen gesetzt. Alle Gennamen wurden entsprechend den Konventionen kursiv und mit kleinen Buchstaben, Proteinnamen mit großen Buchstaben geschrieben.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Ninja Backasch  
Anschrift: Norddeutsche Str. 46  
24143 Kiel  
Geburtsdatum: 10.06.1973  
Geburtsort: Kiel  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulausbildung

1979 – 1983 Grundsule Süd Brunsbüttel  
1983 - 1992 Gymnasium Brunsbüttel  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulausbildung

10/1992 – 07/2002 Studium der Ökotoxikologie an der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Abschluss: Diplom

10/2002 – 09/2005 Stipendiatin des GRK 820 „Natürliche  
Antioxidantien – ihr Wirkungsspektrum in Pflanzen,  
Lebensmitteln, Tier und Mensch“.

seit 10/2002 Doktorandin in der Forschungsgruppe Physiologie  
und Biotechnologie der pflanzlichen Zelle im  
Botanischen Institut der CAU zu Kiel unter der  
Leitung von Prof. Dr. Schulz-Friedrich

### Veröffentlichung

Backasch N, Schulz-Friedrich R, Appel J (2005), Influences on tocopherol biosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Plant Physiol.* **162**:758-766

## 10 Erklärung

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

Teile dieser Arbeit sind in der folgenden Publikation enthalten:

Backasch N, Schulz-Friedrich R, Appel J (2005), Influences on tocopherol biosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Plant Physiol.* **162**:758-766

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

Kiel, den 27.05.08

(Ninja Backasch)

### 11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger Schulz-Friedrich für die Überlassung des Themas, das entgegengebrachte Vertrauen, die jederzeit gewährte Unterstützung und die wortwörtliche Interpretation des Begriffs „Doktorvater“ bedanken.

Ausdrücklich danke ich Herrn Dr. Jens Appel für die Betreuung bei der Bearbeitung des Themas sowie für seine Diskussionsbereitschaft und seine Begeisterungsfähigkeit.

Bei Prof. Dr. Karin Krupinska bedanke ich mich für ihren Enthusiasmus als Leiterin des Graduiertenkollegs 820 und ihr stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ebenso den jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Krupinska für ihre Kooperationsbereitschaft, wobei ich mich besonders bei Frau Dr. Gaby Andersen, Herrn Dr. Mario Brosch und Jens Herrmann bedanken möchte.

Ein ganz spezieller Dank gebührt Frau Dr. Dorothee Dähnhardt für die beste, didaktisch klügste und fröhlichste Einführung in die Welt der Molekularbiologie und Cyanobakterien, die man sich wünschen kann zu Beginn dieser Arbeit.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Schulz-Friedrich danke ich ausdrücklich für die herzliche Aufnahme und ihre stete Hilfsbereitschaft. Mein besonderer Dank gilt Dörte, Björn, Matthias und Martin für ihre Unterstützung und ihre Freundschaft, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Nicht zuletzt danke ich von ganzem Herzen meiner Familie, die mich stets in jeder Hinsicht unterstützt hat. Ohne ihren Rückhalt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Schließlich gilt mein Dank Gunnar für seine unfassbare Liebe und Geduld.

Referent: Prof. Dr. R. Schulz

Korreferentin: Prof. Dr. K. Krupinska

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.08

Zum Druck genehmigt: Kiel, 08.07.08

Der Dekan