

DER NDH-1-KOMPLEX VON *SYNECHOCYSTIS* PCC 6803

Modularer Aufbau und physiologische Relevanz



DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

BJÖRN FORBERICH

Kiel 2011

Referent: Prof. Dr. Rüdiger Schulz

Korreferentin: Prof. Dr. Karin Krupinska

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2011

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 02.02.2011

Der Dekan

FÜR OMA ILSE

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
1 SUMMARY	2
2 EINLEITUNG	4
2.1 DER RESPIRATORISCHE ELEKTRONENTRANSPORTWEG	5
2.2 DER PHOTOSYNTHETISCHE ELEKTRONENTRANSPORTWEG.....	6
2.3 NADPH-OXIDOREDUKTASEN	7
2.4 NDH-1: STRUKTUR UND FUNKTION DES BAKTERIELLEN MINIMALKOMPLEXES	9
2.5 NDH-1 IN CYANOBAKTERIEN: ZUNAHME DER KOMPLEXITÄT	13
2.5.1 <i>NDH-1 in Cyanobakterien: Modularer Aufbau</i>	<i>15</i>
2.5.2 <i>NDH-1 in Cyanobakterien: Multiple Funktionen</i>	<i>17</i>
2.5.3 <i>Einbindung in die Elektronentransportwege.....</i>	<i>17</i>
2.5.4 <i>Verbindung des NDH-1 mit dem Wasserstoffmetabolismus.....</i>	<i>19</i>
2.6 DER NDH-1-KOMPLEX IN PLASTIDEN UND MITOCHONDRIEN	20
2.7 NDH-1 IN CYANOBAKTERIEN UND PLASTIDEN: A TREE OF GREEN LIFE	21
3 ZIELSETZUNG	23
4 MATERIAL UND METHODEN	24
4.1 VERWENDETE GERÄTE.....	24
4.2 CHEMIKALIEN UND ENZYME	25
4.3 ORGANISMEN UND IHRE ANZUCHT	25
4.3.1 <i>Kultivierung von Synechocystis sp. PCC 6803.....</i>	<i>26</i>
4.3.2 <i>BG-11 Medium.....</i>	<i>26</i>
4.3.3 <i>LB-Medium</i>	<i>28</i>
4.4 HERSTELLUNG VON MUTANTEN VON SYNECHOCYSTIS PCC 6803	28
4.4.1 <i>Oligonucleotide</i>	<i>28</i>
4.4.2 <i>Isolierung genomischer DNA</i>	<i>28</i>
4.4.3 <i>Native Agarose-Gelelektrophorese</i>	<i>29</i>
4.4.4 <i>DNA-Molekulargewichtsstandards</i>	<i>30</i>
4.4.5 <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	<i>30</i>
4.4.6 <i>Aufreinigung der PCR-Produkte.....</i>	<i>31</i>
4.4.7 <i>Restriktionsverdau.....</i>	<i>31</i>
4.4.8 <i>Ligation in den TOPO® -Vektor.....</i>	<i>32</i>
4.4.9 <i>Transformation in E. coli</i>	<i>32</i>
4.4.10 <i>Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli.....</i>	<i>33</i>
4.4.11 <i>Transformation von Synechocystis.....</i>	<i>33</i>
4.4.12 <i>Southern-Blot.....</i>	<i>33</i>
4.4.13 <i>Hybridisierung</i>	<i>34</i>
4.5 PHYSIOLOGISCHE METHODEN.....	36
4.5.1 <i>Messung der optischen Dichte</i>	<i>36</i>
4.5.2 <i>Bestimmung der Chlorophyllkonzentration</i>	<i>37</i>
4.5.3 <i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	<i>37</i>
4.6 POLAROGRAPHISCHE MESSUNGEN	38
4.6.1 <i>Wasserstoffmessung mit der Clark-Elektrode.....</i>	<i>38</i>
4.6.2 <i>Hydrogenase-Aktivität (Bidirektionale Hydrogenase).....</i>	<i>39</i>

4.6.3	Atmungsmessungen mit der Clark-Sauerstoffelektrode	39
4.6.4	Sauerstoffkurven im Licht und im dunkelroten Licht.....	39
4.7	FLUORESCENZMESSUNG AM PAM-FLUOROMETER	40
4.7.1	Post-illumination increase in chlorophyll-fluorescence (PIIF).....	41
4.7.2	Ermittlung der HWZ von PS I und der Kapazität der CET	42
4.7.3	Die HWZ von PS I unter DR-Bedingungen.....	43
4.7.4	Bestimmung des Oxidationsgrades des PS I.....	44
4.7.5	P700-Lichtkurven am Dual-PAM	45
4.7.6	Messung der Cytochrom-bd-Chinoloxidase.....	45
4.8	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	46
4.8.1	Zellaufbruch für Membrantrennung	47
4.8.2	Membrantrennung	47
4.8.3	Zellaufbruch und Isolierung von Gesamtmembranen für BN-Gele	48
4.8.4	Probenvorbereitung (BN-PAGE)	49
4.8.5	Blue-Native PAGE	50
4.8.6	Zellaufbruch und Membranisolierung für In-Gel-Aktivitätsfärbungen	51
4.8.7	Probenvorbereitung für In-Gel-Aktivitätsfärbungen	51
4.8.8	Native PAGE (Davis)	52
4.8.9	Native Tris-PAGE.....	52
4.8.10	Clear-Native-PAGE.....	53
4.8.11	In-Gel-Aktivitätsfärbung der NADPH-Dehydrogenase	53
4.8.12	In-Gel-Aktivitätsfärbung der Carboanhydrase	54
4.8.13	Denaturierende SDS-PAGE	54
4.8.14	Silberfärbung von Proteinen im Gel	55
4.8.15	Western-Blot	56
4.8.16	Strippen einer Western-Blot-Membran.....	57
4.9.	ELEKTRONENMIKROSKOPIE UND IMMUNGOLD-MARKIERUNG	57
4.10	BIOINFORMATISCHE UNTERSUCHUNGEN	58
5	ERGEBNISSE	60
5.1	LOKALISIERUNGSSTUDIEN ZUM NDH-1-KOMPLEX	60
5.1.1	Membranisolierung und Charakterisierung	60
5.1.2	Lokalisierung mittels Immungold-Markierung.....	64
5.2	HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON NDHD-MUTANTEN	68
5.2.1	Herstellung der Mutante D234 und D1234	68
5.2.2	Charakterisierung von NDH-1-Mutanten durch Wachstumskurven	70
5.3	PROTEINBIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN DER NDHD-MUTANTEN	73
5.3.1	Modulare Zusammensetzung des NDH-1.....	73
5.3.2	Einfluss der CO ₂ -Verfügbarkeit auf den NDH-1	78
5.3.3	In-Gel-Aktivitätsmessungen	79
5.4	PHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER NDHD-MUTANTEN	86
5.4.1	Auswirkungen auf den Wasserstoffmetabolismus.....	87
5.4.2	Auswirkungen auf die Respiration.....	88
5.4.3	Auswirkungen auf die Photosynthese	88
5.4.4	Der PIIF-Effekt.....	91
5.4.5	Einfluss auf den zyklischen Elektronentransport.....	93

5.4.6 P700-Lichtkurven am Dual-PAM	96
5.4.7 Aktivität der Cytochrom-bd-Chinioxidase	97
5.5 UNTERSUCHUNGEN ZUR KOPFGRUPPE	99
5.6 DIE VERBREITUNG DES NDH-1	101
5.6.1 Stammbaumanalysen der cyanobakteriellen NdhD-Untereinheiten	104
5.6.2 Stammbaumanalysen der NdhD- und NdhF-Untereinheiten	106
6 DISKUSSION	110
6.1 DIE SUBZELLULÄRE LOKALISIERUNG DER NDH-1-KOMPLEXE	110
6.2 DIE BEDEUTUNG DER NDHD-UNTEREINHEITEN FÜR DIE NDH-1-KOMPLEXE	113
6.2.1 Analysen zur modularen Zusammensetzung	115
6.2.2 Auswirkungen der CO ₂ -Verfügbarkeit	117
6.3 AKTIVITÄT DER NDH-1-KOMPLEXE UND DIE FEHLENDE KOPFGRUPPE	118
6.3.1 Identifizierung aktiver NDH-1-Komplexe	119
6.3.2 Mögliche Regulierung der NDH-1-Aktivität über die Struktur	120
6.3.3 Mögliche Regulierung über unterschiedliche Kopfgruppen	122
6.4 ÜBERSICHT DER NDH-1-KOMPLEXE VON SYNECHOCYSTIS	124
6.5 EVOLUTIONÄRE RÜCKSCHLÜSSE	126
7 AUSBLICK	130
LITERATURVERZEICHNIS	131
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	152
ANHANG	155
DANKSAGUNG	158
LEBENS LAUF	159
ERKLÄRUNG	160

1 Zusammenfassung

Die unter dem Begriff NDH-1-Komplex zusammengefassten NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktasen von *Synechocystis* PCC 6803 entsprechen funktionell und im Aufbau dem Respirations-Komplex I aus Bakterien (NUO) und sind verwandt mit dem Komplex I in Mitochondrien und dem NDH-1-Komplex aus Plastiden. Der bakterielle wie auch der mitochondriale Komplex I sind Bestandteil der Atmungskette. Der plastidäre NDH-1 ist sowohl am zyklischen Elektronentransport der Photosynthese als auch an der Chlororespiration beteiligt. Die cyanobakteriellen NDH-1-Komplexe nehmen eine Sonderstellung ein, da sie neben dem respiratorischen und dem photosynthetischen Elektronentransport auch noch an der CO₂-Fixierung teilnehmen. Diese unterschiedlichen Funktionen werden durch einen modularen Aufbau ermöglicht, der zu unterschiedlichen NDH-1-Komplexen führt (S, M, L und MS). Ob es sich dabei unter anderem um Zwischenprodukte oder Zerfallsprodukte dieses labilen Komplexes handelt, ist noch offen. Die Erweiterung des NDH-1M zum NDH-1L-Komplex geschieht durch die Anlagerung der Untereinheiten NdhD und NdhF an dem membranständigen Teil. Von den NdhD- und NdhF-Untereinheiten sind im Genom von *Synechocystis* und der meisten Cyanobakterien mehrere Homologe vorhanden, die in bestimmten paarweisen Kombinationen eingesetzt werden und so die funktionelle Vielfalt ermöglichen. Die Beteiligung der Untereinheiten NdhD3 und NdhD4 an der CO₂-Fixierung wurde bereits beschrieben. Die Lokalisierung dieser unterschiedlichen NDH-1-Komplexe gehört aber neben der genauen Funktionsweise und den immer noch nicht identifizierten NAD(P)H-reduzierenden Untereinheiten zu den offenen Fragen der Forschung am NDH-1-Komplex.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Bedeutung der verschiedenen NdhD-Untereinheiten (mit Fokus auf NdhD1 und NdhD2) für die Lokalisierung der NDH-1-Komplexe in Thylakoid- oder Plasmamembran und der ausgeübten physiologischen Funktion durchgeführt. Lokalisierungsstudien mit isolierten Membranen und Immungold-Analysen zeigten, dass die NDH-1-Komplexe (M und L) überwiegend in der Thylakoidmembran, in Spuren aber auch als NDH-1M in der Plasmamembran vorhanden sind.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden noch erforderliche *ndhD*-Mutanten hergestellt und charakterisiert, um gezielt das NdhD1, das zusammen mit dem NdhF1 und dem NDH-1M den NDH-1L bildet, zu untersuchen. Von diesen besitzt die D1234-Mutante keine der vier NdhD-Untereinheiten mehr. Western-Blot-Analysen nach nativer Proteinauftrennung im BN-Gel zeigten, dass die D1234-Mutante die erste beschriebene *Synechocystis*-Mutante ist, die nur noch den NDH-1M-Komplex assembliert. Mit dieser Methode und den neuen selbst hergestellten Mutanten gelang es erstmals, die unterschiedlichen NDH-1L- und NDH-1MS-Komplexe im BN-Gel eindeutig zu identifizieren.

Dass der NDH-1M-Komplex auch aktiv und (wenn auch stark eingeschränkt) an der Reduktion des PQ-Pools beteiligt ist, konnte u.a. durch Messung der Reaktionsgeschwindigkeiten vom PS I mit dem Dual-PAM belegt werden. Bei dieser Mutante fällt auch die Akzeptorseiten-Limitierung des PS I geringer aus als in einer ebenfalls untersuchten Mutante ohne NDH-1-Komplex, d.h. der NDH-1M kann im geringen Umfang NADP^+ als Elektronenakzeptor des PS I bereitstellen.

Wachstumskurven von verschiedenen NDH-1-Mutanten machten deutlich, dass für ein ungestörtes photoautotrophes als auch mixotrophes Wachstum der NDH-1M alleine nicht ausreichend ist. Erst wenn durch das NdhD1 der NDH-1L-Komplex gebildet werden kann, ist ein dem WT vergleichbares Wachstum möglich. Dies gilt mit leichten Einschränkungen auch für das NdhD2 (Bestandteil des NDH-1L').

Phylogenetische Analysen ergaben zudem, dass die Verwandtschaft der als NdhD5 und NdhD6 annotierten Proteine zu den übrigen NdhD-Untereinheiten (NdhD1-NdhD4) so gering ausfällt, dass diese beiden wohl keine redundante Funktion ausüben können. Somit können sie aus dem Kreis der potentiellen NdhD-Untereinheiten ausgeschlossen werden und wurden nicht weiter analysiert.

1 Summary

In *Synechocystis* PCC 6803 many NAD(P)H:quinone oxidoreductases are grouped under the umbrella term NDH-1-complex. They correspond functionally and structurally to the complex I of bacteria and are related to the complex I of mitochondria and the NDH-1-complex of plastids. Both the bacterial and the mitochondrial complex I take part in the respiratory chain. The plastidal NDH-1 is involved in chlororespiration and additionally in the cyclic electron transport of photosynthesis. The cyanobacterial NDH-1-complexes are unique because they participate in both respiration and photosynthesis and moreover in the fixation of carbon dioxide. These different functions were enabled by a modular assembly which leads to different NDH-1-complexes (S, M, L and MS). Whether these are intermediates or caused by decay is still a matter of debate. The NDH-1M can be enlarged to NDH-1L by the addition of the peripheral subunits NdhD and NdhF to the membranous part. *Synechocystis* and most other cyanobacteria have several homologues of these subunits in their genome, which are combined in defined pairs permitting the functional diversity. The participation of NdhD3 and NdhD4 in fixation of carbon dioxide was previously characterized, but the precise localization, the operation modes of the different complexes and the still unknown NAD(P)H oxidizing subunits remain open questions.

In this study the relevance of different NdhD-subunits (with focus on NdhD1 and NdhD2) for the localization of the NDH-1 (L and MS) in thylakoids and plasma membrane were analyzed and

their physiological function was characterized. Studies of localization with isolated membranes and immunogold assays showed that NDH-1 (M and L) appear predominantly in the thylakoids while traces of NDH-1M were observed in the plasma membrane.

In the course of this thesis, several required *ndhD*-mutants were constructed and characterized to study NdhD1 in particular. This subunit composes the NDH-1L together with the NdhF1 and NDH-1M. The new quadruple-mutant D1234 lacks all four NdhD-subunits. Western blot analyzes after blue-native electrophoresis of membranous proteins confirmed, that the D1234 is the first described mutant of *Synechocystis* which exhibits only NDH-1M. This method combined with the new self-produced mutants allowed to identify the complexes NDH-1L and NDH-1MS in the blue native gel for the first time.

The still assembled NDH-1M was shown to be active in the reduction of the PQ-pool, although with poor reaction rates. This was chiefly established with calculations of the reaction rate of PS I, measured with the Dual-PAM. The acceptor limitation of PS I in this mutant was shown to be less than a mutant without the NDH-1-complex, caused by the weak provision of NADP⁺ by the NDH-1M as an electron acceptor of PS I.

Growth curves of different NDH-1-mutants illustrate the insufficiency of NDH-1M for photoautotroph or mixotroph growth. Growth rates comparable to the wild type are only possible with NDH-1L, with involvement of NdhD1. This is also valid – with some reservations – for NDH-1L' (with participation of NdhD2).

Phylogenetic analysis showed that the relationship between the NdhD5 and NdhD6 subunits with the other NdhD homologues (NdhD1-NdhD4) is weaker than the relationship within this group, so the potential for these two subunits to provide a redundant functionality of the other four seems to be marginal. Hence they could be excluded from the group of potentially NdhD subunits and were not investigated further.

2 Einleitung

Die Naturgesetze lassen keine Wahl: „Das Leben ist die Lösung eines Problems, dass die Natur nicht anders lösen konnte“ (HAROLD MOROWITZ, US-Biophysiker), gemeint ist das Energiepotential zwischen natürlich vorkommenden Stoffen, z.B. molekularem Wasserstoff und Kohlenstoff. Im Streben nach einem energieärmeren Zustand des gesamten Systems entstand demnach das Leben, das so z.B. die Katalysierung der Oxidation von Wasserstoff und Kohlenstoff zu Kohlenwasserstoffen ermöglichte. Diese Umwandlung von chemischer Energie in biologisch nutzbare ist Voraussetzung für autotrophes Leben. Die grundlegenden Reaktionen zur Energiegewinnung sind Elektronen- und Protonenübertragungen. Elektronen werden durch Elektronentransportmechanismen mittels Proteinkomplexen entlang biologischer Membranen auf Elektronenakzeptoren übertragen. Dies ist gleichzeitig mit der Bildung von Stoffgradienten, zumeist Protonen, verbunden. Im Fall von Protonen handelt es sich dabei um das elektrochemische Potential $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$, es treibt ATPasen zur Energiegewinnung an (MITCHELL 1961) und ermöglicht auch den Transport von Stoffen in oder aus den Zellen heraus. Freiwerdende Protonen werden gleichzeitig mit Elektronen in Reduktionsäquivalenten, meist NADH oder NADPH, gespeichert und können dann zur Reduktion von z.B. Kohlenstoffverbindungen eingesetzt werden.

Zu den wichtigsten energieliefernden Reaktionen gehört zum einen die anabole Reaktion der Photosynthese als auch zum anderen die oxidative Phosphorylierung (Respiration). Bei der Photosynthese wird Lichtenergie in Photosystemen in chemisch nutzbare Energie für die Assimilation von Kohlenstoffdioxid im Calvin-Benson-Bassham-Zyklus umgewandelt (CALVIN UND BENSON 1949). Erst mit der Nutzung von Wasser als Elektronendonator der Photosynthese und damit der Freisetzung von molekularem Sauerstoff vor ca. 2,4 Mrd. Jahren (BEKKER ET AL. 2004) wurde die Entstehung komplexen Lebens möglich. Bei der Atmung werden Reduktionsäquivalente in Energie in Form von ATP umgewandelt. Der durch die oxygene Photosynthese freigesetzte Sauerstoff dient dabei als finaler Elektronenakzeptor. In der photoautotrophen Bakterienzelle laufen diese beiden Reaktionen in der Plasmamembran ab. Die meisten Cyanobakterien haben jedoch ein weiteres Membransystem, die Thylakoide, die den Reaktionsraum für die Photosynthese darstellen und über die Oberflächenvergrößerung die Photosyntheserate erhöhen. Auch der überwiegende Teil der Respiration findet in den Thylakoiden statt (SCHMETTERER 1994, SCHULTZE ET AL. 2009).

In höheren Organismen sind diese beiden Reaktionssysteme (Photosynthese und Respiration) in unterschiedlichen Organellen lokalisiert, den Chloroplasten und den Mitochondrien. Nach der Endosymbiontentheorie (MARGULIS 1971) hat eine ursprüngliche eukaryotische Zelle Vorläufer

heutiger Cyanobakterien und α -Proteobakterien aufgenommen und integriert (RAVEN 1970). Dadurch gelangten die Stoffwechselforgänge der Photosynthese und der Respiration in die eukaryotische Zelle. Trotz vieler Unterschiede dieser beiden grundlegenden Reaktionen sind aufgrund ähnlicher chemischer Vorgänge einige Komponenten bei beiden involviert. Dazu gehört u.a. die NAD(P)H-Dehydrogenase.

2.1 Der respiratorische Elektronentransportweg

In den Mitochondrien, die sich aus phagozytierten α -Proteobakterien ableiten, laufen die respiratorischen Elektronentransporte an der inneren Membran ab. Diese entspricht – nach der Endosymbiontentheorie – der Plasmamembran der aufgenommenen Bakterien. Vier wichtige Proteinkomplexe sind am Elektronentransport beteiligt (HATEFI ET AL. 1961):

- Die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I), eine NADH-Dehydrogenase, ist der Haupteintrittspunkt für Elektronen in die Atmungskette. Sie oxidiert NADH und überträgt die Elektronen über interne Eisen-Schwefel-Cluster auf Ubichinon, wobei auf der Intermembranseite Protonen freigesetzt und gleichzeitig über einen noch nicht bekannten Weg Protonen durch die Membran in den Intermembranraum geschleust werden (RAGAN UND RACKER 1973). Die Stöchiometrie beträgt $4 \text{ H}^+ / 2 \text{ e}^-$ (WIKSTRÖM 1984). Neueste Ergebnisse geben aber Hinweise auf einen Mechanismus, der ähnlich einem Motor mit einer „Kurbelwelle“ aus einer langen Proteinhelix eine Konformationsänderung über den Komplex zu den „Pleuelstangen“ überträgt, die aus kurzen Helices bestehen und zum Protonentransport über die Membran dienen (EFREMOV ET AL. 2010, OHNISHI 2010, siehe auch Abbildung 51).
- Die Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) ist gleichzeitig Bestandteil des Citratzyklus (Krebs- oder TCA-Zyklus) und katalysiert die (reversible) Umwandlung von Succinat zu Fumarat. Dieser Enzymkomplex ist membrangebunden und trägt als redoxaktive Gruppe ein FAD und mehrere [Fe-S]-Cluster. Die entstehenden Elektronen werden auf Ubichinon übertragen und tragen zur Reduzierung des Chinonpools bei.
- Die Ubichinon-Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III) überträgt Elektronen von reduziertem Ubichinon auf Cytochrom c. Als elektronenübertragende Einheiten sind ein [2Fe-2S]-Cluster, zwei Häm b (eingebettet in Cytochrom b) und ein Häm c1 (eingebettet in Cytochrom c) beteiligt, weshalb dieser Komplex auch Cytochrom-bc₁-Komplex genannt wird. In Cyanobakterien und daraus abgeleitet den Chloroplasten heißt der funktionsanaloge Komplex aufgrund unterschiedlicher Cytochrome Cytochrom-b₆f-Komplex. Über den sogenannten Q-Zyklus werden pro 2 Elektronen 4 Protonen über die Membran geschleust (Chobot et al. 2008, MITCHELL 1975a,b).

- Die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) oxidiert das vom Komplex III reduzierte Cytochrom c, überträgt die Elektronen auf molekularen Sauerstoff und trägt dabei mit 2 Protonen pro Elektron zum Protonengradienten bei. Der Komplex besitzt als elektronenübertragende Gruppen ein Häm a (eingebettet in Cytochrom a), ein benachbarten Komplex aus zwei Kupferionen (Cu_A) – koordiniert durch 2 Cysteine – und ein Häm a_3 (eingebettet in Cytochrom a_3), das mit einem Kupferion Cu_B ein spingekoppeltes binukleares Zentrum bildet.
- Aus dem von Komplex I, Komplex IV und dem Q-Zyklus am Komplex III aufgebauten Protonengradienten schöpft die ATPase (auch als Komplex V bezeichnet) die Energie, ATP herzustellen. Dies wird als oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) bezeichnet.

2.2 Der photosynthetische Elektronentransportweg

Der lineare Elektronentransport (LET) der Photosynthese in Cyanobakterien und Chloroplasten wird durch beide Photosysteme, PS I und PS II, angeregt (Abbildung 1 B). Dabei wird ein Protonengradient über der Thylakoidmembran aufgebaut, der zur Bildung von ATP über ATPasen verwendet wird. Am Ende der Transportkette steht das Reduktionsäquivalent NADPH. Das PS II ist vom sogenannten Chinon-Typ. Durch die Lichtreaktion wird das angeregte Elektron auf ein Chinon (Plastochinon) übertragen, die auffüllende Reduktion erfolgt durch den wasserspaltenden Apparat. Die reduzierten Plastochinone des Plastochinonpools (PQ) werden am Cyt- b_6f -Komplex oxidiert, dieser verstärkt dabei aktiv den Protonengradienten über der Membran. Über Plastocyanin, einem löslichen Elektronencarrier, werden durch Lichtreaktionen oxidierte PS I Zentren reduziert. Die Elektronen vom PS I werden an die FNR (Ferredoxin:NADP⁺-Reduktase) übertragen. Bei Cyanobakterien sitzt mindestens ein Typ der zwei vorhandenen Isoformen der FNR an den Phycobilisomen, den Antennen der Photosysteme (KORN ET AL. 2009). Auch als mögliche Kopfgruppe des NDH-1 ist die FNR im Gespräch (GUEDENEY ET AL. 1996, QUILES UND CUELLO 1998). Das von der FNR reduzierte NADPH wird sowohl im Calvin-Benson-Bassham-Zyklus zur CO₂-Fixierung benötigt als auch für den zyklischen Elektronentransport (CET).

Bei diesem Elektronentransportweg ist die Produktion von ATP durch den Aufbau eines Protonengradienten von der Erzeugung der Reduktionsäquivalente abgekoppelt. Die Elektronen werden über Ferredoxin oder NADPH wieder in den PQ-Pool eingespeist und werden über den Cyt- b_6f -Komplex wieder zu PS I gebracht (Abbildung 1 A). Das NADPH kann über den NDH-1 oxidiert werden. Über welche Wege das Ferredoxin die Elektronen an den PQ-Pool abgibt, ist nicht bekannt. Das Enzym, das diese Funktion ausübt, wurde noch nicht gefunden, es wird hypothetisch als Ferredoxin-Chinon-Reduktase (FQR) bezeichnet (MOSS UND BENDALL 1984, BENDALL UND MANASSE 1995). Eine große Bedeutung besitzt der CET in den Chloroplasten der C4-

Pflanzen. Aufgrund der energieverbrauchenden Vorfixierung von CO_2 haben diese einen höheren Energiebedarf gegenüber den C3-Pflanzen. Diese Energie wird durch den CET geliefert (ASADA ET AL. 1993). In C-4-Pflanzen findet er vor allem in den Chloroplasten der Bündelscheidellen statt (MUNEKAGE ET AL. 2010, TAKABAYASHI ET AL. 2005). In Chloroplasten sind mindestens zwei CETs vorhanden. An einem sind die Proteine PGR5 (*Proton gradient regulation*, MUNEKAGE ET AL. 2002) und PGRL1 (DALCORO ET AL. 2008) beteiligt. Dieser Weg wird auch als NDH-1-unabhängiger oder Antimycin-A-sensitiver Weg bezeichnet, da er durch diesen Stoff inhibiert werden kann (JOËT ET AL 2001, MIYAKE ET AL 1995). In *Synechocystis* wurde mit dem ORF (*ssr2016*) ein Homolog zum PGR5 aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert (YEREMENKO ET AL. 2005), der Antimycin-A-sensitiver Weg spielt dort aber nur eine untergeordnete Rolle (YEREMENKO ET AL. 2005). Der andere Weg verläuft, wie bereits beschrieben, über den NDH-1-Komplex (SHIKANAI ET AL. 1998).

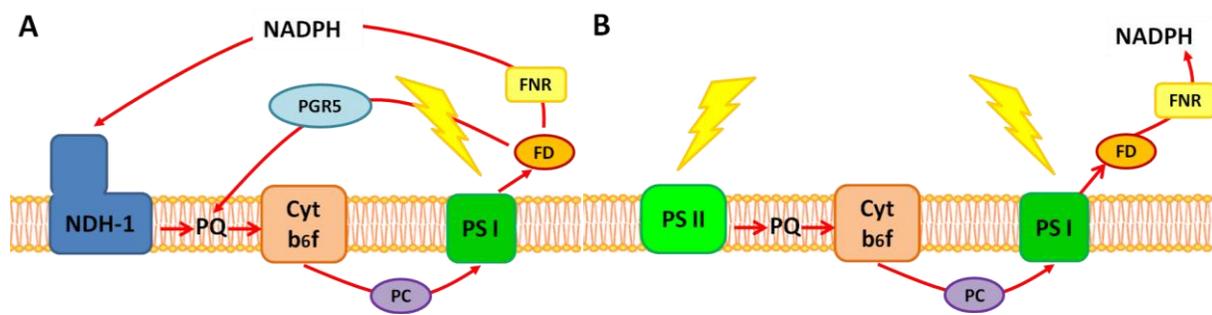


Abbildung 1: Einfaches Schema der Photosynthese. A: Zyklischer Elektronentransport mit NADPH- und PGR5-abhängigem Weg. B: Linearer Elektronentransport. FD = Ferredoxin, PC = Plastocyanin, PQ = Plastochinonpool, FNR = Ferredoxin:NADP⁺ Reduktase, NDH-1 = NADPH-Dehydrogenase.

2.3 NADPH-Oxidoreduktasen

Eine wichtige Funktion sowohl in der Photosynthese als auch in der Respiration haben NAD(P)H-Dehydrogenasen. Sie katalysieren die in erster Linie nicht reversibel ablaufende Reduktion von Reduktionsäquivalenten NAD(P)H. Dabei wird eine Energie von 0,4 eV frei. Die Elektronen werden über (nicht-)kovalent gebundene Cofaktoren (Eisen-Schwefel-Cluster und FMN/FAD) an Chinone weitergeleitet, die zu Semi- oder Hydrochinonen reduziert werden. Bei Vorhandensein einer protonenmotorischen Kraft kann diese Reaktion allerdings umgekehrt ablaufen (HERTER ET AL. 1998).

Es gibt verschiedene Typen von NAD(P)H-Dehydrogenasen, die die bei der Reaktion freiwerdende Energie unterschiedlich nutzen (Tabelle 1). Als Gemeinsamkeit besitzen alle

wenigstens ein FAD oder FMN als redoxaktiven Kofaktor, es handelt sich folglich um Flavoenzyme.

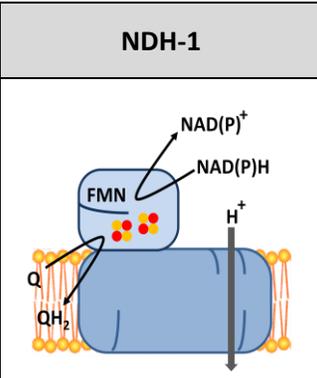
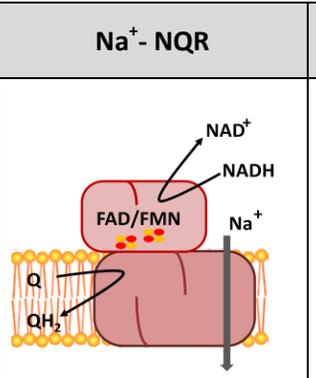
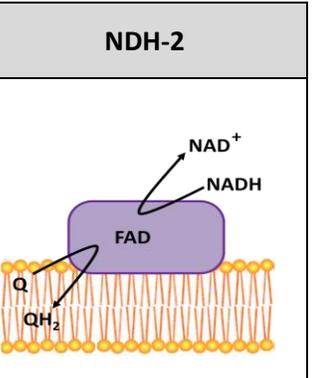
➤ Die NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktasen kommen in Bakterien und den Organellen vor. Die Benennung des Komplexes und der dazugehörigen Untereinheiten ist z.T. historisch bedingt und variiert je nach beherbergendem Organismus und den verwendeten Reaktionspartnern. Die NADH-Ubichinon Oxidoreduktase (NUO) aus *E. coli* ist der NAD(P)H-Dehydrogenase (NDH-1) in Cyanobakterien homolog. In *Thermus thermophilus* trägt sie die Bezeichnung NQO (*NADH:quinone-oxidoreductase*). Die bei der Oxidation von NAD(P)H freiwerdende Energie wird verwendet, um einen Protonengradienten über der Membran aufzubauen (RAGAN UND RACKER 1973). In Bakterien befindet sich dieser Komplex in der Plasmamembran und trägt dort die Bezeichnung NUO, NQO oder NDH-1. In Cyanobakterien und abgeleitet davon in den Thylakoiden der Chloroplasten wird dieser Komplex mit NDH-1 bezeichnet. In Mitochondrien ist dieser Komplex als Komplex I an der Atmungskette beteiligt.

Die Bezeichnung NAD(P)H-Ubichinon-Oxidoreduktase (NUO) berücksichtigt nicht, dass bei vielen Bakterien statt Ubichinon andere Chinone als Akzeptoren wirken, wie z.B. Menachinon, Plastochinon, Chlorobiumchinon, Demethylmenachinon und andere (COLLINS ET AL. 1981) sowie Methanophenazin in einigen Archaea (ABKEN ET AL. 1998). In Mitochondrien von z.B. *Ascaris suum* wird Rhodochinon an Komplex I und II reduziert (ERABI ET AL. 1975). Im Folgenden werden die NAD(P)H-Ubichinon-Oxidoreduktasen daher der Einfachheit halber mit NDH-1 bezeichnet.

➤ Die freiwerdende Energie kann auch dazu genutzt werden, Natriumionen über die Membran zu transportieren. Das dazugehörige Enzym, die Na⁺-NQR (*Na⁺-translocating NADH:quinone-reductase*) wurde zuerst in dem marinen Bakterium *Vibrio alginolyticus* gefunden (UNEMOTO ET AL. 1977). Hierbei handelt es sich um einen zu dem Komplex I analogen, aber nicht homologen Enzymkomplex aus sechs Untereinheiten, die zumeist in einem Operon kodiert sind (NAKAYAMA ET AL. 1998).

➤ Bei der NADH-Dehydrogenase vom Typ 2 (NDH-2, auch alternative NADH-Dehydrogenase genannt), wird die freiwerdende Energie nur als Wärme freigesetzt. Sie besteht aus nur einer Untereinheit (MELO ET AL. 2004). Die NDH-2 besitzt wohl nur sensorische Funktion und kommt hauptsächlich in Bakterien vor (YOUNG ET AL. 1981). Im Genom von *Synechocystis* sind drei potentielle ORFs bekannt (slr0851, slr1743 und slr1484), die je für eine NDH-2 kodieren (HOWITT ET AL. 1999). Erst 2008 wurde dieses Enzym auch in Chloroplasten von *A. thaliana* (CARRIE 2008) und *Chlamydomonas reinhardtii* (JANS ET AL. 2008) beschrieben. In Mitochondrien von einigen Hefen (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*), die keinen Komplex I besitzen, ist sie das einzige Enzym, das Elektronen aus Reduktionsäquivalenten in die Atmungskette einschleust (OHNISHI ET AL. 1966).

Tabelle 1: Respiratorische NAD(P)H-Dehydrogenasen. Modellhafte Schemata über Aufbau, Vorkommen und die vorhandenen prosthetischen Gruppen. Die Zahl der Untereinheiten bezieht sich auf bakterielle Komplexe.

	NDH-1	Na ⁺ -NQR	NDH-2
			
Name	NAD(P)H-Dehydrogenase	Na ⁺ -NADH:Chinon-reductase	NADH-Dehydrogenase Typ 2
Funktion	Reduktion Chinonpool, Ionentransport	Reduktion Chinonpool, Ionentransport	Reduktion Chinonpool, Redoxsensor?
Ionenpumpe	H ⁺	Na ⁺	-
Kofaktoren	FMN 2[2Fe-2S] 6-7[4Fe-4S]	FAD, FMN 1[2Fe-2S]	FAD oder FMN
Untereinheiten	(13-14)	5-6	1
Vorkommen	Bakterien, Chloroplasten, Mitochondrien	Bakterien	(Archae-)Bakterien, Chloroplasten, Mitochondrien

2.4 NDH-1: Struktur und Funktion des bakteriellen Minimalkomplexes

Als NAD(P)H-Dehydrogenasen arbeitende Enzymkomplexe befinden sich sowohl in Bakterien (NUO oder NDH-1) als auch in Organellen der eukaryotischen Zelle, den Plastiden (NDH-1) und Mitochondrien (Komplex I). Diese Komplexe sind evolutionär miteinander verbunden, unterscheiden sich aber in der Zahl der beteiligten Untereinheiten und z.T. auch in der Funktion. Das Wissen über diesen Komplex ist in vielen Bereichen sehr beschränkt. Wegen seiner Labilität entzieht sich der Komplex vielen proteinbiochemischen Untersuchungen.

Der NDH-1 der Bakterien bildet einen sogenannten Minimal-Komplex, bestehend aus nur 14 Untereinheiten (Tabelle 2). Zu den meisten finden sich Homologe in den eukaryotischen Komplexen. Dort erfährt der NDH-1 dann sowohl in der Komplexität, der Zahl der Untereinheiten, als auch in der ausgeübten Funktion eine bedeutende Erweiterung. Denn je höherentwickelter der den NDH-1-Komplex beherbergende Organismus ist, desto komplexer ist

dieser aufgebaut. Deshalb wird zum leichteren Verständnis der grundlegende Aufbau und die Funktion zuerst am Beispiel des bakteriellen NDH-1 erklärt.

Der NDH-1-Komplex in der Plasmamembran von Bakterien ist aus 14 Untereinheiten der *nuo*-Genprodukte (*nuoA-nuoN*) zusammengesetzt. Diese befinden sich meist alle in einem Operon. Bei *E. coli* sind die Gene der Untereinheiten *nuoC* und *nuoD* zu einem Gen fusioniert (WEIDNER ET AL. 1993). Die Gene für die Untereinheiten NuoL, NuoM und NuoN sind einander sehr ähnlich und sind wohl auf eine mehrfache Genduplikation zurückzuführen (FEARNLEY UND WALKER 1992, KIKUNO UND MIYATA 1985). Dies und die Ähnlichkeit verschiedener Untereinheiten lassen den Schluss zu, dass es sich bei dem NDH-1 ursprünglich um ein Assemblierungsprodukt bereits existierender funktionaler Module handelt (FRIEDRICH UND WEISS 1997), die den Elektronentransfer mit Protonentransport koppeln konnten.

Tabelle 2: Bezeichnung der Untereinheiten des NUO-Komplexes von *E. coli* (⁺ = Fusionsprotein), des NDH-1-Komplexes von *Synechocystis* PCC6803 und *Thermus thermophilus* und des mitochondrialen Komplex I von *Bos taurus* und *Arabidopsis thaliana* (* kennzeichnet mitochondrial kodiert), der Lage (m = membranständig, p = peripher) und der Funktion bzw. enthaltene Kofaktoren (z.B. Koordinierung der Eisen-Schwefel-Cluster N1-N7 oder Chinon-Bindung (Q)).

<i>E.coli</i>	<i>Synechocystis</i>	<i>T.thermophilus</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>A. thaliana</i>	Lage	Funktion / Kofaktoren
NuoA	NdhC	Nqo7	ND3*	Nad3*	m	
NuoB	NdhK	Nqo6	20K (PSST)	PSST	p	N2, Q-Bindung
NuoC ⁺	NdhJ	Nqo5	30K	Nad9*	p	
NuoD ⁺	NdhH	Nqo4	49K (ND7)	Nad7*	p	
NuoE	(?)	Nqo2	24K	24K	p	N1a
NuoF	(?)	Nqo1	51K	51K	p	FMN, N3
NuoG	(?)	Nqo3	75K	75K	p	N1b, N4/N5, (N7)
NuoH	NdhA	Nqo8	ND1*	Nad1*	m	
NuoI	NdhI	Nqo9	23K (TYKY)	TYKY	p	N6a/N6b
NuoJ	NdhG	Nqo10	ND6*	Nad6*	m	
NuoK	NdhE	Nqo11	ND4L*	Nad4l*	m	
NuoL	NdhF	Nqo12	ND5*	Nad5*	m	
NuoM	NdhD	Nqo13	ND4*	Nad4*	m	
NuoN	NdhB	Nqo14	ND2*	Nad2*	m	
-	-	Nqo15	-	-	p	
-	NdhL	-	-	-	p	
-	NdhM	-	B13	-	p	
-	NdhN	-	-	-	p	
-	NdhO	-	-	-	p	

Die den Hydrogenasen ähnlichen Untereinheiten (NuoB und NuoD), ein Elektronenübertragendes Ferredoxin-ähnliches Protein (NuoI) und Kationentransportmodule (NuoM) ergeben zusammen mit Proteinen (bisher unbekannter Funktion) einen Komplex mit den beschriebenen Fertigkeiten (Oxidation von NAD(P)H, Reduzierung von Chinone und Bildung eines Protonengradienten).

In *Thermus thermophilus* wurde eine fünfzehnte Untereinheit des NQO-Komplexes, Nqo15, entdeckt. Das entsprechende Gen, *nqo15*, ist separat vom *nqo*-Operon kodiert (HINCHLIFFE ET AL. 2006). Diese Untereinheit besitzt kein Homolog im mitochondrialen Komplex, ist also eine rein bakterielle Erweiterung des Minimal-Komplexes.

Der gesamte Komplex besitzt eine Größe von ca. 550 kDa (LEIF ET AL. 1995). „Single particle“ Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop zeigen für isolierte NDH-1-Komplexe aus Bakterien (*Thermus thermophilus*, *Aquifex aeolicus* und *E. coli*) wie auch aus Pilzen (*Yarrowia lipolytica* und *Neurospora crassa*) und Tieren (*Bos taurus*) eine L-förmige Struktur (Übersicht: CLASON ET AL. 2009). Der NDH-1 lässt sich demnach in einen hydrophoben Teil, der in einer Membran eingebettet ist, und in einen hydrophilen, peripheren Teil untergliedern (FRIEDRICH UND BÖTTCHER 2004). Der periphere Teil, der in das wässrige Cytosol oder in die Matrix hineinragt, trägt sowohl als Kopfgruppe den NAD(P)H-reduzierenden Komplex als auch sämtliche redoxaktiven Gruppen, ein FMN (RAO ET AL. 1963) und mehrere [Fe-S]-Cluster (Abbildung 2 A, C). Die Route, die die Elektronen durch den NDH-1 oder Komplex I nehmen, ist noch nicht vollends aufgeklärt. Entgegen der ursprünglichen Annahme werden die Elektronen nicht direkt in den membranständigen Teil geschleust, wo sie das Chinon reduzieren. Vielmehr wird das zu reduzierende Chinon über eine hydrophobe Tasche aus der Membran in den peripheren Teil verbracht und dort vom Cluster N2 reduziert (SAZANOV ET AL. 2006). Es sind verschiedene Transportwege für die Elektronen denkbar (Abbildung 2 B). Angenommen wird die Reduktion des nichtkovalent gebundenen FMN durch das NAD(P)H. Die Elektronen werden dann über die Eisen-Schwefel-Cluster N3 – N1b – N4 – N5 – N6a – N6b – N2 auf das Chinon übertragen (SAZANOV ET AL. 2006). Die beteiligten [Fe-S]-Cluster unterscheiden sich dabei in [2Fe-2S]-Cluster (N1a und N1b) und [4Fe-4S]-Cluster (N2, N3, N4, N5, N6a/b und N7). Koordiniert sind die Cluster durch konservierte Cysteinreste. Auf ihrem Weg durch die [Fe-S]-Cluster nehmen die Elektronen nicht den direkten Weg, sondern springen durch die genannte Redoxkette vor und zurück (RANSAC ET AL. 2010). Die Rolle des Clusters N7 ist nicht geklärt, sowohl die Lage als auch das Redoxpotential sprechen ihm keine aktive Rolle zu. Außerdem ist er nicht bei allen bisher untersuchten Organismen vorhanden (UHLMANN UND FRIEDRICH 2005)

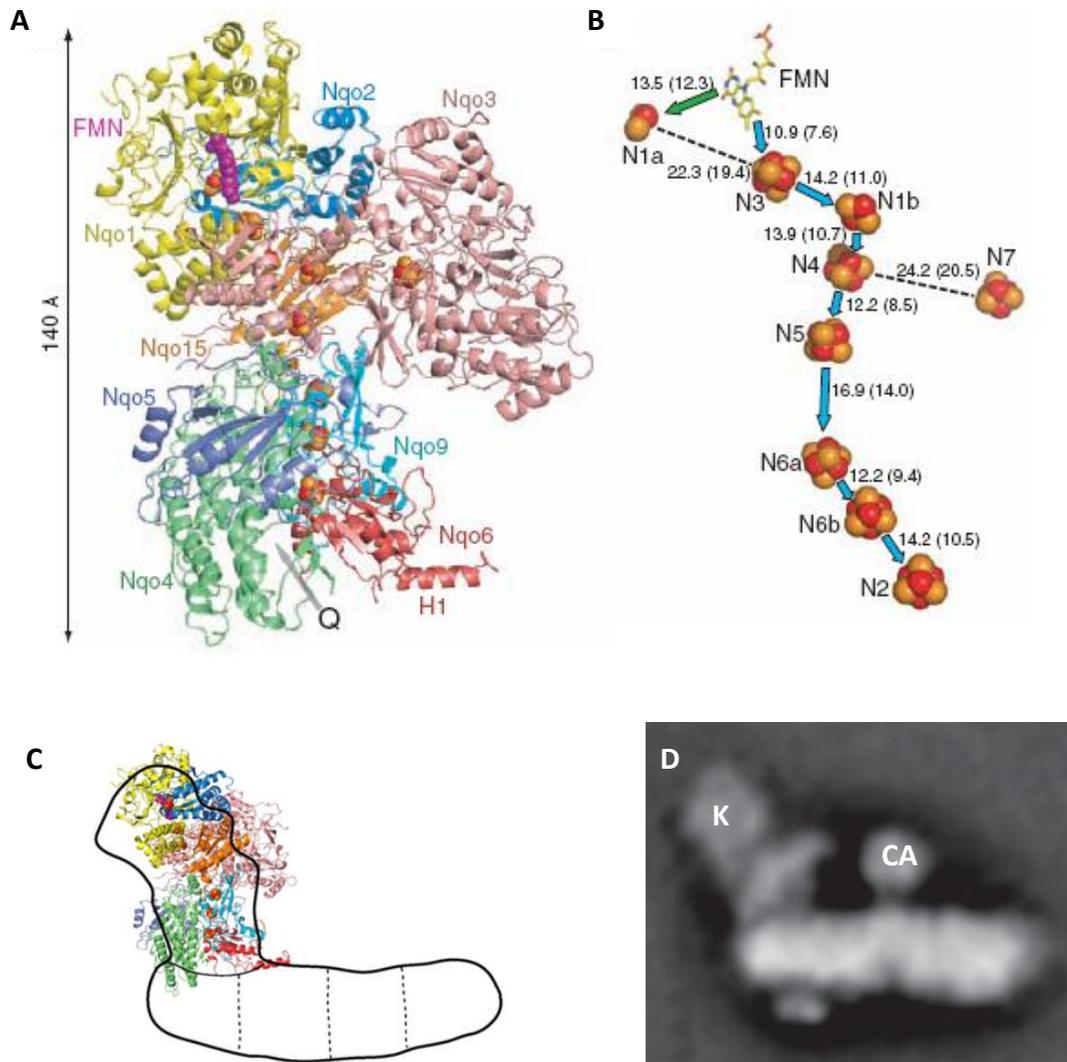


Abbildung 2: Aufbau der hydrophilen Domäne von Komplex I aus *Thermus thermophilus*. A: Seitenansicht, unterhalb derer sich die membranständige Domäne in Richtung der Helix H1 fortsetzen würde. Beschreibung der Untereinheiten siehe Tabelle 2. Die mögliche Chinon-Bindestelle ist mit Q bezeichnet. B: Anordnung der Eisen-Schwefel-Cluster mit Abständen der Kerne in Ångström (in Klammern: Abstände der Ecken). Der Hauptweg des Elektronentransportes ist mit blauen Pfeilen gekennzeichnet (aus SAZANOV ET AL. 2006). C: Überlagerung der peripheren Domäne von *T. thermophilus* mit Modell des NDH-1 aus *E. coli* (BARANOVA ET AL. 2007a). D: *Single-particle* EM-Aufnahme des mitochondrialen Komplex I aus *A. thaliana* (DUDKINA ET AL. 2005) mit NADH-reduzierender Kopfgruppe (K) und dorsalem Carboanhydrase-Komplex (CA).

Auch die Funktion des Clusters N1a ist noch nicht vollends bekannt, er scheint aber die Halbwertszeit der Flavosemichinone zu verringern (RANSAC ET AL. 2010). Wahrscheinlich dient er als „Zwischenspeicher“ für ein Elektron, während das zweite von NAD(P)H abgegebene Elektron die Route zu dem Chinon nimmt (SLED ET AL. 1994). Ob und wie dieser Elektronentransport mit der Funktion als Protonenpumpe verbunden ist, ist noch nicht geklärt.

Diskutiert werden weitreichende Konformationsänderungen der membranständigen Untereinheiten (BRANDT ET AL. 2003), eine direkte Kopplung des Elektronentransportes mit der Protonentranslokalisierung (BRANDT 1997, DEGLI ESPOSTI UND GHELLI 1994) oder ein Zusammenspiel aus beiden (FRIEDRICH 2001). Auch ein Transport durch Kanäle, die über den Redoxzustand der Chinone gesteuert werden, wurde vorgeschlagen (OHNISHI UND SALERNO 2005). Neue Strukturdaten lassen auf eine Kombination dieser Möglichkeiten schließen (Efremov et al. 2010, siehe 2.1).

Der Transport von positiv geladenen Ionen erfolgt durch die membranständigen Untereinheiten. Diese sind mit über 54 Transmembranhelices in der Membran verankert. Das ist auch der Grund, warum diese Untereinheiten für die meisten Untersuchungsmethoden schlecht zugänglich sind. Die membranständigen Untereinheiten enthalten selbst keine prosthetischen Gruppen. Allerdings lassen spektroskopische Untersuchungen mit UV/Vis und FTIR vermuten, dass eine chinoide Struktur, vielleicht eine modifizierte Aminosäure, vorhanden ist (SCHULTE ET AL. 1998). Ob der bakterielle Komplex I neben Protonen auch Natriumionen transportieren kann, wird kontrovers diskutiert (GEMPERLI ET AL. 2002, KREBS ET AL. 1999).

2.5 NDH-1 in Cyanobakterien: Zunahme der Komplexität

Der NDH-1-Komplex der Bakterien befindet sich in der Plasmamembran. Bei Cyanobakterien, die ein Thylakoidsystem entwickelt haben, hat sich die Position in diese photosynthetisch aktiven Membranen verlagert (OHKAWA ET AL. 2001). Ob auch in der Plasmamembran ein funktioneller NDH-1-Komplex oder vielleicht nur Vorstufen vorkommen, ist noch nicht abschließend geklärt und ist auch Bestandteil dieser Arbeit. Mit Proteomic-Analysen der Plasmamembran (HUANG ET AL. 2002, ZHANG ET AL. 2009) konnten dort keine NDH-1-Untereinheiten identifiziert werden. Ältere enzymatische Untersuchungen (MOLITOR UND PESCHEK 1985) zeigen aber respiratorische Aktivität in isolierter Plasmamembran. In Cyanobakterien erfährt der NDH-1 in der Komplexität, in der Zahl der Untereinheiten und damit verbunden auch in der ausgeübten Funktion eine Erweiterung. Diese Erweiterung führt dazu, dass es unterschiedlich zusammengesetzte Komplexe gibt, die aber alle unter dem Begriff NDH-1 zusammengefasst werden. Der dem bakteriellen Aufbau entsprechende NDH-1-Komplex besteht aus mindestens 15 Untereinheiten (NdhA-NdhO), davon sind 11 Untereinheiten (NdhA-NdhK) homolog zu den Untereinheiten in *E. coli*. Im Genom von Cyanobakterien als auch im Plastom der Chromatophoren von *Paulinella chromatophora* (NOWACK ET AL. 2008) sind von den *ndhD*- und *ndhF*-Genen mehrere Paraloge vorhanden (KANEKO ET AL. 1996). Von den anderen Untereinheiten existieren nur *single-copy*-Gene, die z.T. in Operons vorliegen (*ndhAIGE*, *ndhCJK*). In *Synechocystis* sind vier *ndhD*-Gene

(*ndhD1-ndhD4*) und drei *ndhF*-Gene (*ndhF1*, *ndhF3* und *ndhF4*) vorhanden, deren Bezeichnung sich aus den gemeinsamen Genclustern ableiten (Abbildung 3). Die als *ndhD5* und *ndhD6* annotierten Gene (*slr2007* und *slr2009*) weisen nur eine geringe Sequenzähnlichkeit mit den übrigen *ndhD*-Genen auf (OHKAWA ET AL. 2000). Die Ähnlichkeit beruht auf konservierten Transmembranbereichen, die auch für Kationentransporter wie MrpA und MrpD des Kationen-Antiporterkomplexes und EchA (Energy-converting Hydrogenase) charakteristisch sind (TORRES-BACETE ET AL. 2007). Weiterhin existiert von dem *ndhK*-Gen (kodiert auf dem Chromosom) ein kryptisches Homolog auf einem der Plasmide (*ndhK2*), das aber im WT nicht transkribiert wird (STEINMÜLLER ET AL. 1991).

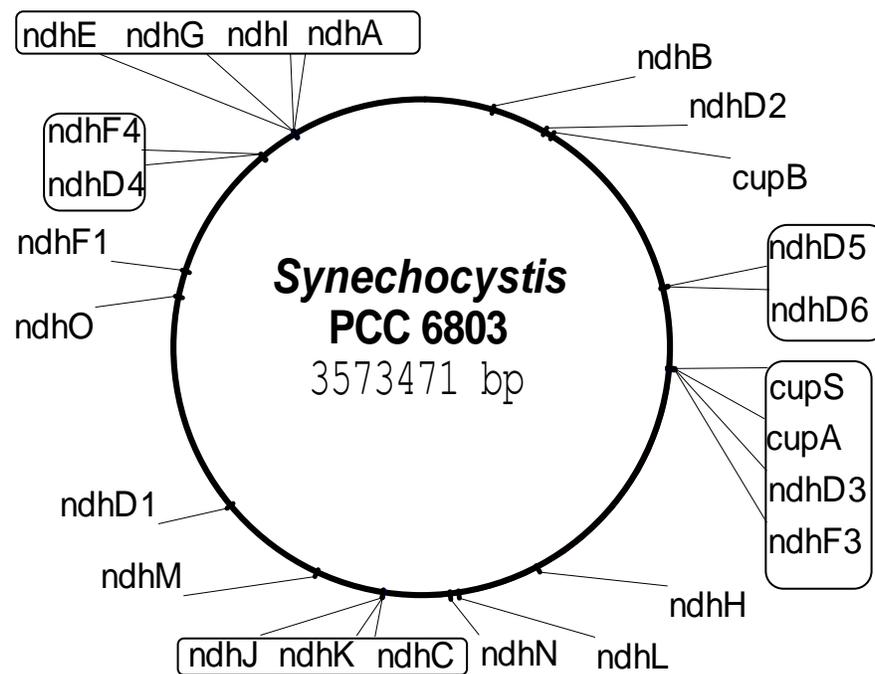


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Chromosoms von *Synechocystis* PCC 6803. Die Positionen der NDH-1-Gene sind markiert (nach KANEKO ET AL. 1996). Die *cup*-Gene kodieren für Carboanhydrase-ähnliche Untereinheiten, die an der CO₂-Fixierung beteiligt sind. Operons sind mit Rahmen gekennzeichnet.

Die NADH-umsetzende Kopfgruppe, die bei *E. coli* aus drei Untereinheiten (NuoE, NuoF und NuoG), bei *Thermus thermophilus* aus Nqo1, Nqo2 und Nqo3 (Abbildung 2) besteht, ist darin noch nicht enthalten. Anders als der bakterielle, plasmamembranständige NDH-1, der NADH umsetzt, benutzt der cyanobakterielle NDH-1 bevorzugt NADPH als Substrat (MATTHIJS ET AL. 1984, SANDMAN UND MALKIN 1983). Aus welchen NAD(P)H-umsetzenden Untereinheiten die Kopfgruppe in Cyanobakterien (und auch in Chloroplasten) besteht, ist nicht bekannt. Es gibt Hinweise, dass z.B. in Chloroplasten die Ferredoxin-NAD(P)H-Reduktase (FNR) oder in

Cyanobakterien die [Ni-Fe]-Hydrogenase diese Funktion übernehmen könnten (APPEL UND SCHULZ 1996, GUEDENEY ET AL. 1996). Dieses wird aber bis heute kontrovers diskutiert (BOISON ET AL. 1999). Als Erweiterung des bakteriellen Minimal-Komplexes wurden in Cyanobakterien vier weitere Untereinheiten (NdhL, NdhM, NdhN und NdhO) identifiziert (OGAWA 1992, BATTCHIKOVA ET AL. 2005, PROMMEENATE ET AL. 2004). Diese sind auf dem membranständigen Teil lokalisiert (BIRUNGI ET AL. 2010, Abbildung 4). Homologe Untereinheiten dazu sind auch im plastidären NDH-1 vorhanden (RUMEAU ET AL. 2005). Hinzu kommen noch 1-2 Untereinheiten, die eine Carboanhydrase-ähnliche Funktion ausüben (CupA und CupS oder CupB, MAEDA ET AL. 2002). Diese kommen in plastidären NDH-1-Komplexen nicht vor (Abbildung 2 D).

2.5.1 NDH-1 in Cyanobakterien: Modularer Aufbau

Die NDH-1-Komplexe sind in Cyanobakterien sowohl an der Respiration und dem zyklischen Elektronentransport in der Photosynthese (MI ET AL. 1992) als auch an der CO₂-Fixierung beteiligt (OGAWA 1991, FIGGE ET AL. 2001, BATTCHIKOVA UND ARO 2007). Verantwortlich dafür sind unterschiedlich zusammengesetzte NDH-1-Komplexe, die sich in der distalen membranständigen Domäne unterscheiden. Diese wird aus den Untereinheiten NdhD und NdhF gebildet (BARANOVA ET AL. 2007b). Sowohl die genetische Anordnung (Abbildung 3) als auch Mutationsstudien legen jeweils die Kombination von NdhD1 mit NdhF1, NdhD2 mit NdhF1, NdhD3 mit NdhF3 und NdhD4 mit NdhF4 nahe (FIGGE ET AL. 2001, KLUGHAMMER ET AL. 1999, MI ET AL. 1992, 1995; OHKAWA ET AL. 2000). Die Benennung dieser Komplexe ist nicht einheitlich, die NDH-1-Komplexe mit diesen Kombinationen der NdhD- und NdhF-Untereinheiten wurden NDH-1₁, NDH-1₂, NDH-1₃ und NDH-1₄ bezeichnet (BADGER ET AL. 2006), in neueren Veröffentlichungen hat sich aber die Annotierung nach BATTCHIKOVA ET AL. (2010a) durchgesetzt: NDH-1L, NDH-1L', NDH-1MS und NDH-1MS'. Für die NDH-1MS- und NDH-1MS'-Komplexe konnte gezeigt werden, dass sie am CCM (*carbon concentrating mechanism*) beteiligt sind (KLUGHAMMER ET AL. 1999, Zhang et al. 2004). Dem NDH-1L und dem NDH-1L' wurde bisher eine Beteiligung am CET und an der Respiration nachgewiesen (OHKAWA ET AL. 2000). Basierend auf dem modularen Zusammenbau zeigen native proteinbiochemische Untersuchungen NDH-1-Komplexe von unterschiedlicher Größe (Abbildung 4, HERRANEN ET AL. 2004, ZHANG ET AL. 2004). Der kleinere Komplex wird als NDH-1M (medium) bezeichnet. Ihm fehlen die distalen Untereinheiten NdhD und NdhF, im Gegensatz zum höhermolekularen Komplex, NDH-1L (large). Der NDH-1L₃ (NDH-1M mit NdhD3 und NdhF3) bildet zusammen mit dem NDH-1S (small), an dem die Cup-Untereinheiten (CupA und CupS) gekoppelt sind, den NDH-1MS. Dieser entspricht in der Form dem Komplex I aus den Mitochondrien und wird als eigentlicher aktiver Komplex diskutiert (FOLEA ET AL. 2008, ZHANG ET

AL. 2005). Ähnlich aufgebaut ist der NDH-1MS' aus dem NDH-1L₄ mit CupB (Abbildung 4, BATTCHIKOVA ET AL. 2010b, XU ET AL. 2008). Carboanhydrase-ähnliche Untereinheiten wurden mittels „single particle“-TEM-Aufnahmen am Komplex I in Mitochondrien von Pflanzen gefunden (SUNDERHAUS ET AL. 2006). Ein entsprechender Nachweis dieser Untereinheiten an einem cyanobakteriellen NDH-1 ist bisher nur bei *Thermosynechococcus elongatus* gelungen (ARTENI ET AL. 2005, 2006, FOLEA ET AL. 2008). In *Synechocystis* konnte mit dieser Methode bisher kein U-förmiger NDH-1MS entdeckt werden. Dies gelang nur mittels Western-Blot (XU ET AL. 2008) und FRET (JI ET AL. 2007) durch YFP-Fusion mit CupA und CupS (BIRUNGI ET AL. 2010).

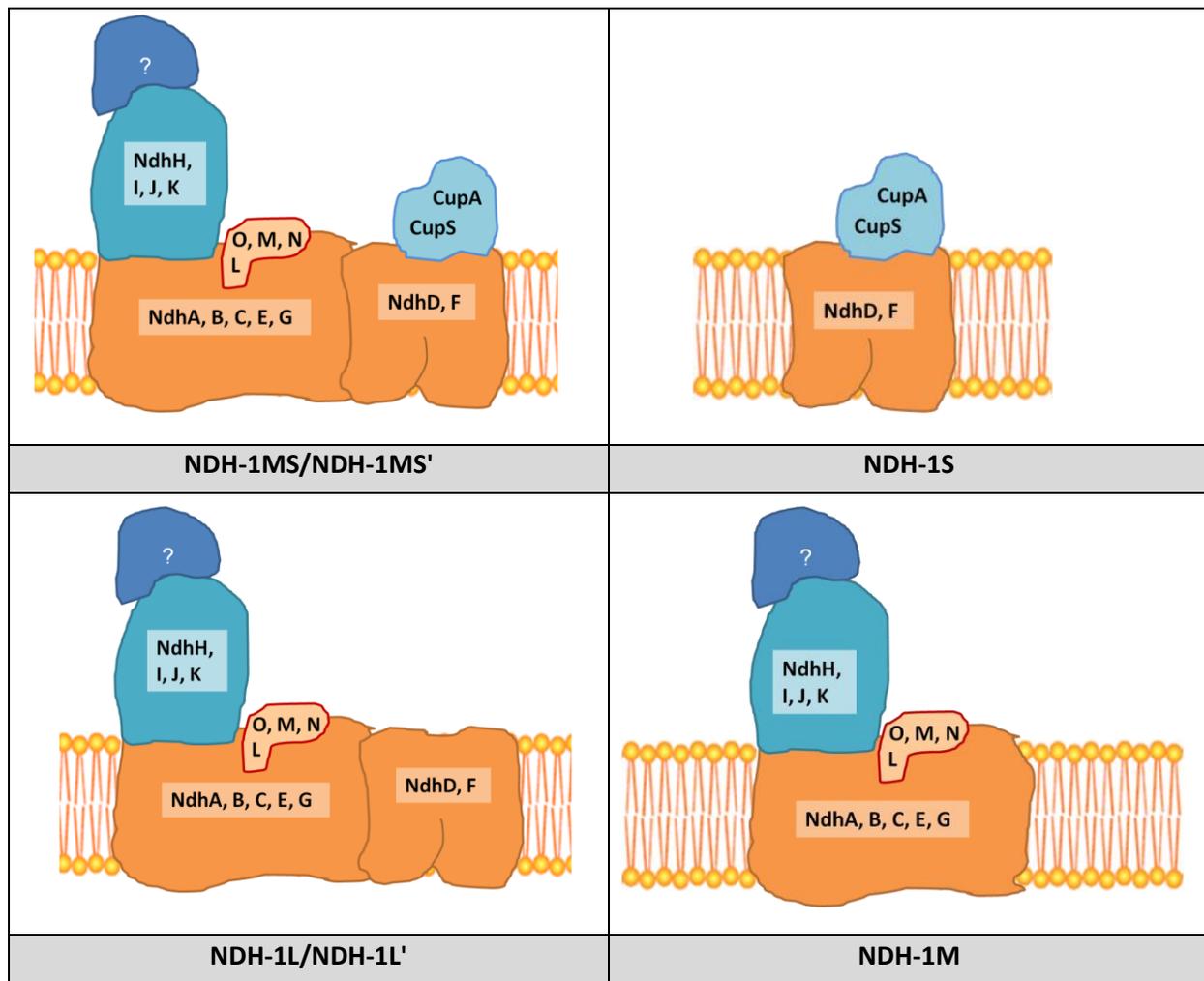


Abbildung 4: Modularer Aufbau der NDH-1-Komplexe in *Synechocystis* (nach BATTCHIKOVA ET AL. 2010a): Komplex NDH-1S (small), NDH-1M (medium), NDH-1L (large) und NDH-1MS mit Carboanhydrase-ähnlichen Untereinheiten (Cup). Der NDH-1L besteht aus dem NDH-1M und den Untereinheiten NdhD1 und NdhF1, während am NDH-1L' die Untereinheiten NdhD2 und NdhF1 beteiligt sind. Der NDH-1MS beinhaltet die Untereinheiten NdhD3, NdhF3, CupA und CupS. Am NDH-1MS' sind die Untereinheiten NdhD4, NdhF4 und CupB beteiligt (nicht gezeigt). Die Untereinheiten NdhL, -M, -N und -O bilden die OPS-Domäne (*oxygenic photosynthesis specific*).

2.5.2 NDH-1 in Cyanobakterien: Multiple Funktionen

Die Untersuchungen der unterschiedlichen Funktionen des NDH-1 von *Synechocystis* beruhen fast alle auf physiologischen Messungen mit der $\Delta ndhB$ -Deletionsmutante M55 (OGAWA 1990, 1991). Diese wichtige Mutante wird im Folgenden als *ndhB* bezeichnet. Bei dieser ist in den Membranen kein NDH-1L und NDH-1M mehr nachweisbar. Sie zeigt sowohl eine Beeinträchtigung der Reduktionszeit des P700 im Licht als auch der Respiration im Dunkeln (MI ET AL. 1992). Auch das Wachstum bei niedrigem CO_2 -Angebot ist durch das Fehlen des NDH-1MS und NDH-1MS' (siehe 2.5.1) eingeschränkt (OGAWA 1991).

Die Erweiterung der NDH-1L- und NDH-1L'- Komplexe durch die Cup-Untereinheiten begründet die Ausweitung der Funktion des cyanobakteriellen NDH-1. Carboanhydrasen wandeln reversibel CO_2 in Bicarbonationen (HCO_3^-) um. Dieser Vorgang dient der CO_2 -Fixierung. Denn im Medium gelöstes CO_2 kann frei die Zellmembranen durchdringen. Das Bicarbonation ist dazu nicht in der Lage und kann nur aktiv durch Transporter in die Zellen gelangen oder sie verlassen. Einmal in die Zelle gelangtes CO_2 kann somit am Austritt gehindert werden und führt zu einer besseren Versorgung der RuBisCO mit CO_2 . Zu den NDH-1-Komplexen, die durch die Carboanhydrasen am CCM beteiligt sind, gehören der NDH-1MS und auch der NDH-1MS' (KLUGHAMMER ET AL. 1999, SHIBATA ET AL. 2001). Dabei werden die Expression der Gene des Operons *ndhD3*, *ndhF3*, *cupA* und *cupS* durch den Regulator *NdhR* bei CO_2 -Mangel induziert (FIGGE ET AL. 2001, MAEDA ET AL. 2002, WANG ET AL. 2004, WOODGER ET AL. 2007), während die Gene *ndhD4*, *ndhF4* und *cupB* konstitutiv exprimiert werden. Letztere Gene liegen in *Synechocystis* nicht in einem Operon vor, bei anderen Cyanobakterien, z.B. bei *Synechococcus* (BADGER ET AL. 2002), ist dies aber der Fall.

Neben dieser Beteiligung an der CO_2 -Fixierung ist der NDH-1-Komplex - wie bereits erwähnt - am zyklischen Elektronentransport der Photosynthese und an der Atmung/Chlororespiration (OHKAWA ET AL. 2000) beteiligt. Hierbei ist besonders der NDH-1L involviert. Unter photoheterotrophen Bedingungen ist das Wachstum der $\Delta ndhD1/D2$ -Deletionsmutante ähnlich eingeschränkt wie das der $\Delta ndhB/M55$ -Mutante (OHKAWA ET AL. 2000).

2.5.3 Einbindung in die Elektronentransportwege

In den Thylakoidmembranen von Cyanobakterien, aber auch von Chloroplasten, finden die Elektronentransporte sowohl der Respiration als auch der Photosynthese statt (Abbildung 5). Diese beiden Reaktionsmechanismen sind miteinander verwoben: So werden sowohl einige redoxaktive Komponenten als auch mehrere beteiligte Proteinkomplexe von beiden verwendet. Diese sind der Plastochinonpool, die Plastochinon-Cytochrom c Reduktase (Cyt b_6f -Komplex), die

löslichen Elektronencarrier Plastocyanin und/oder Cytochrom c_{553} und der NDH-1-Komplex (PESCHEK 1983, SCHERER 1990). Da der gesamte respiratorische und photosynthetische Elektronentransport in den Thylakoiden der Cyanobakterien über den Plastochinonpool (PQ-Pool) verläuft, kommt diesem eine entscheidene Rolle bei der Regulation beider Abläufe zu. Die Reduktion des Plastochinonpools erfolgt durch mehrere Komponenten:

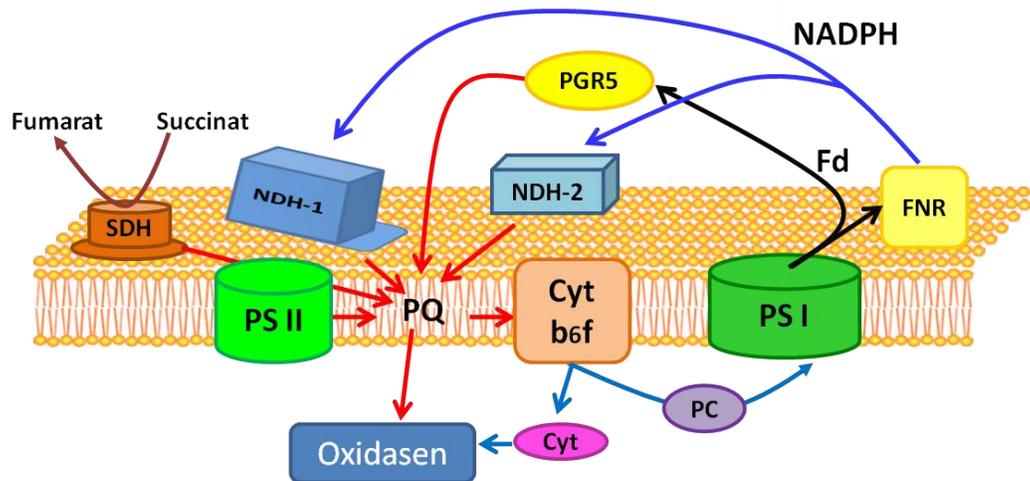


Abbildung 5: Schematische Darstellung von Teilen der respiratorischen und photosynthetischen Transportwege in der Thylakoidmembran von *Synechocystis*. SDH = Succinat-Dehydrogenase, weitere Bezeichnungen wie in Abbildung 1. Wege zur Reduktion von PQ sind rot, Beteiligungen von Ferredoxin (Fd, schwarz) und von NADPH dunkelblau eingezeichnet.

- Der NDH-1-Komplex oxidiert NADPH und schleust die Elektronen direkt in den PQ-Pool. Die Reduktionsäquivalente fallen entweder bei Licht durch die Photosynthese an oder im Dunkeln durch den Kohlenhydratstoffwechsel, den oxidativen Pentosephosphatweg.
- Die Succinat-Dehydrogenase (SDH) ist an der reversiblen Umwandlung von Succinat zu Fumarat im Krebszyklus beteiligt (KREBS UND JOHNSON 1937). Die bei der Reduktion anfallenden Elektronen werden ebenfalls direkt an Plastochinon abgegeben. In Cyanobakterien ist der Krebszyklus unterbrochen, das Gen für die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase ist nicht vorhanden (PEARCE ET AL. 1969, STANIER UND COHEN-BAZIRE 1977). Ob der Zyklus in zwei Arme gespalten oder durch ein bisher nicht bekannten Weg (COOLEY ET AL. 2000) geschlossen ist, ist noch nicht geklärt.
- Auch der NDH-2-Komplex reduziert Plastochinon (YOUNG ET AL. 1981). Der Beitrag, den dieses Enzym im Vergleich zu den anderen leistet, ist aber nur als gering einzuschätzen (HOWITT ET AL. 1999).
- Den größten Beitrag zur Reduktion leistet im Licht das PS II. Dieser lineare Elektronentransfer sorgt für eine Reduktion des durch Ladungstrennung oxidierten PS I.

In Cyanobakterien beträgt das Verhältnis von PS I zu PS II ungefähr 5 (SHEN ET AL. 1993). Dies ist vermutlich auf einen hohen Bedarf an zyklischem Elektronentransport zurückzuführen (VERMAAS 2001).

- Eine Ferredoxin-abhängige Reduktion des PQ-Pools im zyklischen Elektronentransport durch Ferredoxin wurde identifiziert, diese wird durch Antimycin A inhibiert (MOSS UND BENDALL 1984, BENDALL UND MANASSE 1995). Das beteiligte, aber bisher noch nicht identifizierte Enzym wurde Ferredoxin:Chinon-Reduktase genannt (FQR). Bei *A. thaliana* wurde eine Beteiligung von PGR5 nachgewiesen (YEREMENKO ET AL. 2005).

Oxidiert wird der PQ-Pool hauptsächlich durch den Cytochrom- b_6f -Komplex und terminale Oxidasen. Der Cytochrom- b_6f -Komplex überträgt Elektronen aus dem PQ-Pool über lösliches Plastocyanin (PC) oder lösliches Cytochrom c_6 (auch: cyt_{553}) an oxidierte Reaktionszentren des PS I und auf die Cytochrom- c -Oxidase. Bei vielen Cyanobakterien und einigen Algen sind beide Elektronencarrier vorhanden, die abhängig der Kupferverfügbarkeit gebildet werden (ZHANG ET AL. 1992). Es gibt auch Hinweise auf einen weiteren Elektronenüberträger, Cytochrom c_m (ZHANG ET AL. 1994), was allerdings kontrovers diskutiert wird (MOLINA-HEREDIA ET AL. 2002). Gleichzeitig trägt der Cytochrom- b_6f -Komplex über den sogenannten Q-Zyklus zum Aufbau eines Protonengradienten über der Membran bei (MITCHELL 1975, OSYCZKA ET AL. 2005). Eine weitere Oxidase, die Cytochrom- bd -Oxidase, überträgt Elektronen direkt aus dem PQ-Pool auf Sauerstoff (HOWITT UND VERMAAS 1998; BERRY ET AL. 2002). An dieser Chlororespiration (Nixon 2000) ist eine weitere Chinoloxidase beteiligt (PTOX, PELTIER ET AL. 2010). Die Chlororespiration findet sowohl im Licht als auch im Dunkeln statt.

2.5.4 Verbindung des NDH-1 mit dem Wasserstoffmetabolismus

Der Wasserstoffmetabolismus und die Aktivität des NDH-1-Komplexes sind eng miteinander verwoben. Diese Verbindung wurde erstmals durch die Sequenzvergleiche der NADH-umsetzenden Kopfgruppe des NDH-1-Komplexes aus *E. coli* (*nuoE*, *nuoF* und *nuoG*) mit Genen von Hydrogenasen vermutet. Sowohl einige Untereinheiten der bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenase (HoxE, HoxF und HoxU) aus dem Hydrogenase-Operon von *Synechocystis* (APPEL UND SCHULZ 1996), die lösliche Hydrogenase aus *Alcaligenes eutrophus/Ralstonia metallidurans* (PILKINGTON ET AL. 1991) als auch die Format-Hydrogenlyase aus *E. coli* (BÖHM ET AL. 1990) zeigen eine große Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz. Für *Synechocystis* gilt, dass die Diaphorase-Untereinheiten der [NiFe]-Hydrogenase die fehlende NAD(P)H-reduzierende Kopfgruppe sowohl strukturell als auch funktionell bilden könnten. Die direkte Kopplung der beiden Komplexe konnte aber bislang noch nicht gezeigt werden. Eine physiologische Verbindung beider steht

aber außer Frage: Deletionsmutanten des NDH-1-Komplexes weisen starke Einwirkungen bei der Photowasserstoffproduktion als auch der fermentativen Wasserstoffproduktion auf (COURNAC ET AL. 2004, GUTTHANN ET AL. 2007).

2.6 Der NDH-1-Komplex in Plastiden und Mitochondrien

Der bakterielle Kern des NDH-1-Komplexes besteht aus 14-15 Untereinheiten. Für den Übergang vom bakteriellen NDH-1 zum eukaryotischen Komplex I der Mitochondrien wird eine Erweiterung auf bis zu 35 Untereinheiten angenommen. Dazu gehören 20 Untereinheiten mit bakteriellen Homologen (inklusive der 14-15 Kern-Untereinheiten) und 15 neuen, rein eukaryotischen Untereinheiten (GABALDON ET AL. 2005). In pflanzlichen Mitochondrien vergrößerte sich der Komplex auf bis zu 49 Untereinheiten (*A. thaliana*, KLODMANN ET AL. 2010), davon sind 17 Untereinheiten spezifisch für Pflanzen. Die größten Komplexe im Tierreich wurde bisher in den Mitochondrien von Säugern gefunden, so z.B. bei *Bos taurus* mit 45 und beim Menschen mit 47 Untereinheiten (CARROLL ET AL. 2006).

Die Gene für die meisten Untereinheiten sind im Zellkern kodiert, nur die Gene der membranständigen Untereinheiten sind im Organellengenom, dem Chondriom, verblieben (CHOMYN 1985).

Die Funktion des mitochondrialen Komplex I als erster wichtiger Komplex zur Einspeisung von Elektronen in die Atmungskette, verbunden mit dem Protonentransport über die Membran, ist vom bakteriellen Komplex beibehalten worden. Ob zusätzlich die in pflanzlichen Mitochondrien angelagerten Carboanhydrasen (PERALES ET AL. 2005, SUNDERHAUS ET AL. 2006) eine Funktion ausüben, ist nicht bekannt (Abbildung 2 D). Der mitochondriale Komplex I bildet mit Komplex III und Komplex IV der Atmungskette einen sogenannten „OXPHOS-Superkomplex“ (EUBEL ET AL. 2003, SCHÄGGER UND PFEIFFER 2000, SUNDERHAUS ET AL. 2010). Durch die Nähe der beteiligten Komplexe wird ein reibungsloser Ablauf der oxidativen Phosphorylierung ermöglicht.

Auch in Plastiden wurde eine NAD(P)H-Dehydrogenase identifiziert (MENG ET AL. 1986, SHIMDA UND SUGIURO 1991). Der plastidäre NDH-1-Komplex besteht im Wesentlichen aus den Untereinheiten (NdhA-NdhO), die schon aus Cyanobakterien bekannt sind. Die Untereinheiten NdhD und NdhF sind den NdhD1/D2 und NdhF1 der Cyanobakterien homolog. Wie auch beim mitochondrialen Gegenstück gilt hier, dass die membranständigen Untereinheiten im Organellengenom, dem Chondriom, kodiert sind. Zusätzlich liegen dort aber auch die Gene für die anderen, Cyanobakterien-homologen Untereinheiten (*ndhA-ndhK*) vor. Wie schon erwähnt, ist die NAD(P)H-oxidierende Kopfgruppe unbekannt. Als mögliche Kandidaten werden neben der

FNR (Ferredoxin-NAD(P)H-Reduktase) auch die mitochondriale Kopfgruppe gehandelt, die – kernkodiert – über duales Targeting auch in die Plastiden gelangen könnten (QUILES ET AL. 2003). Die vier Gene *ndhL-ndhO* sind im Kerngenom kodiert (Battchikova et al. 2005, Rumeau et al. 2005). Auch bei den zusätzlich identifizierten plastidenspezifischen Untereinheiten handelt es sich generell um kernkodierte (PENG ET AL. 2010, SUORSA ET AL. 2010, TAKABAYASHI 2009). Diese neuentdeckten Untereinheiten sind vermutlich für die Bildung eines „Superkomplexes“ verantwortlich, ähnlich des OXPHOS-Superkomplexes der Mitochondrien. In Plastiden wird der Superkomplex wohl aus dem NDH-1-Komplex und PS I gebildet (Peng et al. 2008,2009, Sirpio et al. 2009). Der plastidäre NDH-1-Komplex ist wahrscheinlich sowohl im zyklischen Elektronentransport (bei Licht) als auch in der Chlororespiration im Dunkeln involviert (BENNOUN 1982, BURROWS ET AL. 1998, NIXON 2000). NDH-1-Deletionsmutanten von *Nicotiana tabacum* oder *A. thaliana* zeigen unter normalen Wachstumsbedingungen keinen auffälligen Phänotyp, allerdings scheint er für eine Adaption an Stressbedingungen wie Hitze, Trockenheit oder Starklicht notwendig zu sein (RUMEAU ET AL. 2007).

2.7 NDH-1 in Cyanobakterien und Plastiden: *A Tree of green life*

Der plastidäre NDH-1-Komplex gelangte über eine Endosymbiose in die eukaryotische Zelle. Dabei wurde ein Vorläufer heutiger Cyanobakterien von einer ursprünglichen eukaryotischen Zelle, der Protoeukaryocyte, phagozytiert (MARGULIS 1971) und zur semiautonomen Organelle, der Plastide, umgewandelt. Dies geschah vor ca. 1,5 Mrd. Jahren (YOON ET AL. 2004). Der NDH-1 befindet sich demnach in den Thylakoiden der Plastiden und spiegelt mit der heutigen Verteilung in der Gruppe der Protisten auch die Evolution der Chloroplasten wider.

Durch die wachsende Zahl an vollständig sequenzierten und annotierten Plastomen wird das Bild der Plastidenentwicklung immer deutlicher. Bisher geht man von einem einmaligen Vorgang der Chloroplastenentstehung aus. So lässt sich die Spur des NDH-1-Komplexes innerhalb der Gruppe der sogenannten Archaeplastida, zu denen die Rotalgen (Rhodophyta), die Chloroplastida (Grünalgen und Landpflanzen) und die Glaucophyta gehören, verfolgen. In den Plastiden der meisten Landpflanzen (Moose, Farne, Gymno- und Angiospermen) und einiger Grünalgen kommt der NDH-1 vor, in denen der Rotalgen und Glaucophyta nicht (MARTIN UND SABATER 2010). Viele chloroplastenhaltige Protisten haben ihre Chloroplasten aber aus diesen beiden letztgenannten Gruppen erhalten, über sekundäre oder sogar tertiäre Endosymbiose. Das einmalige Entstehen von Chloroplasten wird aber durch neuere Untersuchungen des Organismus *Paulinella chromatophora* in Frage gestellt (BODYŁ ET AL. 2007, MARIN ET AL. 2005). Die paarweise vorhandenen Chromatophore stellen ursprüngliche Plastiden dar, deren Genom das

bisher größte gefundene Plastom ist (mit über 870 kodierten Proteinen). Selbst die als ursprünglich angesehenen Plastiden der Glaukophyta, die Cyanellen, enthalten mit 150 plastidär kodierten Proteinen deutlich weniger, wenn aber auch mehr als die durchschnittlichen Plastiden der Landpflanzen (86 kodierte Proteine). Diese wurden, auch aufgrund einer Peptidoglykanschicht, die zwischen den Hüllmembranen liegt und die auf die Peptidoglykanschicht der Cyanobakterien zurückgeführt wird, bisher als die ursprünglichsten Plastiden angesehen (HERDMAN UND STANIER 1977, JAYNES UND VERNON 1982). Die Reduktion des Cyanellengenoms schließt aber auch die Gene des plastidären NDH-1-Komplexes mit ein. Im Plastom von *P. chromatophora* dagegen ist dieser Komplex noch enthalten und umfasst sogar cyanobakterielle Genanordnungen wie den Cluster *ndhD3*, *ndhF3* und *cupA/B*.

Mit der Entdeckung der *energy-converting-Hydrogenase* (ECH-Hydrogenase) in *Methanosarcina barkeri*, einer Ferredoxin-oxidierenden und Wasserstoff-produzierenden [NiFe]-Hydrogenase, wurde auch in der Domäne der Archaea ein ähnlich modular aufgebauter Enzymkomplex identifiziert (HEDDERICH 2004, KÜNKELE ET AL. 1998). Es wird vermutet, dass dieser in der Lage ist, direkt einen Gradienten aus Protonen oder Natriumionen aufzubauen, allerdings überträgt er keine Elektronen auf Chinone. Auch die $F_{420}H_2$:Methanophenazin-Oxidoreduktase aus *Methanosarcina mazei* (BÄUMER ET AL. 2000) besteht aus 11 Untereinheiten, die zu dem bakteriellen Kern des NDH-1-Komplexes homolog sind. Zusätzlich sind zwei Untereinheiten vorhanden, die als Kofaktoren ein FAD und mehrere [Fe-S]-Cluster tragen und als $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase fungieren (FRIEDRICH UND SCHEIDE, 2000). Dieser Komplex ist auch bei *Archaeoglobus fulgidus* für den Aufbau eines Protonengradienten über der Plasmamembran verantwortlich (KUNOW ET AL. 1994). Die Verwendung von schon existierenden Modulen zum Aufbau einer funktionellen NAD(P)H-Dehydrogenase ergibt sich wohl aus der grundlegenden Notwendigkeit, diesen Reaktionsweg auszufüllen ohne neue Systeme zu erfinden. Die weite Verbreitung des NDH-1 zeigt die fundamentale Bedeutung der NAD(P)H-Dehydrogenasen und der homologen Enzymkomplexe für den lebenden Organismus.

3 Zielsetzung

In *Synechocystis* PCC 6803 - wie in anderen Cyanobakterien auch - liegt der NDH-1-Komplex in verschieden großen Subtypen vor. Von zwei Untereinheiten (NdhD und NdhF) sind im Genom mehrere Homologe vorhanden (4 - 6 annotierte *ndhD*-Gene und 3 *ndhF*-Gene). Diese sind in unterschiedlicher Kombination am Aufbau des NDH-1-Komplexes beteiligt. Für diese verschiedenen assemblierten NDH-1-Komplexe ist eine unterschiedliche physiologische Funktion (Einbindung in Respiration, zyklischen Elektronentransport und CO₂-Fixierung) beschrieben. Auch eine unterschiedliche Lokalisierung der verschiedenen Komplexe (in Plasma- oder Thylakoidmembran) wird diskutiert.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den unterschiedlichen Aufbau, die Lokalisierung, die unterschiedlichen Funktionen und die Relevanz der unterschiedlichen Komplexe für bestimmte Energie-Stoffwechselfvorgänge zu untersuchen.

Der NDH-1-Komplex von *Synechocystis* ist sehr labil, auch mit nativen Proteomic-Methoden konnte bisher noch kein vollständiger Komplex isoliert werden. Deshalb sollen in dieser Arbeit neben proteinbiochemischer Methoden vor allem nichtinvasive physiologische Untersuchungen durchgeführt werden.

Der Fokus soll dabei auf den *ndhD*-Genen liegen, dafür sollen mehrere *ndhD*-Mutanten analysiert werden. Der Schwerpunkt soll dabei auf das NdhD1 und das NdhD2 gelegt werden. Noch benötigte Mutanten, in denen kein oder nur noch ein *ndhD*-Gen vorhanden ist, sollen im Rahmen der Arbeit hergestellt und charakterisiert werden. Eine Analyse des NDH-1M-Komplexes, der kein NdhD und NdhF mehr besitzt, wird durch diese Mutanten erstmals ermöglicht. Die Frage, ob es sich bei dem NDH-1M um ein Assemblierungs-Zwischenprodukt oder ein Artefakt handelt, soll mit den erhaltenen Aussagen über Aktivität und Funktionsweise beantwortet werden. Zusätzlich soll durch Mutantanalyse ein möglicher Kandidat für die bisher unbekannte NADPH-oxidierende Kopfgruppe untersucht werden.

Anhand von phylogenetischen Analysen sollen nicht nur die Annotierung der NdhD- und NdhF-Untereinheiten von *Synechocystis* und anderen Cyanobakterien überprüft, sondern auch Informationen über mögliche funktionell redundante Homologe erhalten werden. Durch die berechneten Stammbäume kann die Verwandtschaft der cyanobakteriellen zu den plastidären Untereinheiten bestimmt werden, womit Rückschlüsse auf die Funktion dieses Komplexes in Plastiden gezogen werden können.

4 Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt sind die Materialien und Methoden aufgeführt, die im Verlauf der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen. Alle verwendeten Geräte, Gefäße und hitzestabile Lösungen wurden, soweit es nötig war, autoklaviert (20 Minuten bei 121 °C). Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm). Das für die Medien und Lösungen eingesetzte deionisierte Wasser (Aqua bidest.) wurde durch eine Seradest Anlage SD2000 (jetzt ELGA Berkefeld GmbH, Celle) hergestellt und wird im Folgenden mit H₂O bezeichnet. Glasperlen wurden bei 180 °C für 2 h sterilisiert.

4.1 Verwendete Geräte

Tischzentrifuge für 1,5 ml oder 2,0 ml Reaktionsgefäße:

Centrifuge 5415 D von Eppendorf (Hamburg): Rotor F-45-24-11, max. 13200 rpm

Kühlzentrifuge für 1,5 ml oder 2,0 ml Reaktionsgefäße oder Sarstedt-Tubes :

Centrifuge 5804 R von Eppendorf (Hamburg) mit Rotor F-45-30-11 für 1,5 ml bzw. 2,0 ml Gefäße, max. 14000 rpm, Rotor F-34-6-38 für 15 ml bzw. 50 ml Tubes, max. 12000 rpm

Zentrifuge Centrikon T-124 (Kontron Instruments, Watford, UK) mit Rotor A6.14 für Becher à 250 ml

Ultrazentrifuge Centrikon T-1065 (Kontron Instruments, Watford, UK) mit Ausschwingrotor TFT 28.38 oder Festwinkelrotor TFT 70.38

Photometer: Zweistrahl-Photometer UV-2501PC von Shimadzu (Kyoto, Japan)

Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometer (PAM):

PAM 101 (Walz, Effeltrich) mit dem Zusatzmodul für die Verwendung von Flüssigproben in Küvetten (ED-101 US/M, SCHREIBER 1994). Für aktinisches Licht bzw. Sättigungsblitze wurden Schott KI 1500-Lampen (Schott bzw. Walz, Effeltrich) benutzt.

Dual-PAM (Walz, Effeltrich) zum gleichzeitigen Messen von PS I und PS II, ebenfalls mit ED-101 US/M-Zusatzmodul

Spannungsquellen:

Standard Power Pack P25, Biometra, Göttingen

4.2 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien besitzen, wenn nicht anders angegeben, den Reinheitsgrad „pa“ („pro analysis“). Sie wurden von den Firmen Difco (Kansas City, USA), Fluka (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München) bezogen.

Wasserstoff (Reinheit 5.0) und Stickstoff (Reinheit 2.8) wurden von Messer (Sulzbach) und Air Liquide Deutschland (Krefeld) bezogen. Die eingesetzten Antibiotika stammten von Amersham Bioscience (Freiburg) und Roth (Karlsruhe).

4.3 Organismen und ihre Anzucht

Alle in dieser Arbeit durchgeführten molekularbiologischen und physiologischen Experimente wurden mit dem einzelligen Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 durchgeführt. Einige benötigte Mutanten (ndhB/M55 und ndhD134) wurden im Vorfeld freundlicherweise von Dr. T. Ogawa, Professor Emeritus der Nagoya Universität bereitgestellt. Andere wurden in der Arbeitsgruppe in vorangegangenen Arbeiten hergestellt oder im Verlauf dieser Arbeit selbst angefertigt (D234 und D1234, siehe 5.2.1). Eine Liste aller verwendeten Mutanten befindet sich im Anhang (Tabelle 13), die wichtigsten sind in Tabelle 3 annotiert.

Tabelle 3: Liste der wichtigsten verwendeten Mutanten von *Synechocystis* PCC 6803 mit Auflistung der ausgeschalteten Gene und der eingefügten Resistenzkassetten (C Chloramphenicol, E Erythromycin, G Gentamycin, H Hygromycin, K Kanamycin, S Spectinomycin).

Bezeichnung der Mutante	ausgeschaltetes Gen	Genname	Resistenz
cyd	<i>slr 1379, slr 1380</i>	Cyt. bd-Oxidase	E
apc	<i>slr 2067, slr 1986, ssr 3383</i>	Allophycocyanin	C
ndhB/m55	<i>sll 0223</i>	ndhB	K
D1	<i>slr0331</i>	ndhD1	K
D2	<i>slr1291</i>	ndhD2	C
D12	<i>slr0331, slr1291</i>	ndhD1/D2	K C
D34	<i>sll1733, sll0027</i>	ndhD3/D4	K S
D134	<i>slr0331, sll1733, sll0027</i>	ndhD1/D3/d4	K S H
D234	<i>slr1291, sll1733, sll0027</i>	ndhD2/D3/D4	K S C
D1234	<i>slr0331, slr1291, sll1733, sll0027</i>	ndhD1/D2/D3/D4	K S C H
F1	<i>slr0844</i>	ndhF1	G

Synechocystis PCC 6803 wurde 1968 aus Süßwasser isoliert. Es gehört der Ordnung der *Chroococcales* und der Gattung *Synechocystis* an. Es ist ein gramnegatives Bakterium, es kann photoautotroph wachsen, gehört aber zu den nicht-stickstofffixierenden Arten. Der im Labor verwendete Stamm ist in der Lage, unter LAHG-Bedingungen (*light activated heterotrophic growth*) zu wachsen (ANDERSON UND MCINTOSH 1991). Seine herausragende Eignung für molekularbiologische Untersuchungen beruht auf seiner leichten Transformierbarkeit, da durch seine natürliche Kompetenz leicht Fremd-DNA aufgenommen und homolog rekombiniert wird (WILLIAMS 1988). Das Genom von *Synechocystis* PCC 6803 wurde 1996 veröffentlicht (KANEKO ET AL. 1996). Es war das erste durchsequenzierte Genom von einem photoautotrophen Organismus.

4.3.1 Kultivierung von *Synechocystis* sp. PCC 6803

Die Anzucht der *Synechocystis*-Kulturen erfolgte unter photoautotrophen Bedingungen im BG-11-Medium (verändert nach RIPPKA ET AL. 1979). Für eine ständige Verfügbarkeit wurden die Kulturen auf BG-11-Agarplatten ausplattiert (siehe 4.3.2). Deren Lagerung erfolgte in einer Klimakammer bei einer Temperatur von 28 °C und einer Lichtintensität von $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Als Vorkulturen wurden Schüttelkulturen von 50 ml BG-11-Medium (siehe 4.3.2) in 100 ml Erlenmeyerkolben verwendet, die unter sterilen Bedingungen von Agarplatten aus angeimpft wurden. Diese wurden in der Klimakammer auf einem Schüttler (Shaker 3020, GFL, Burgwedel) bei 100 rpm bei einer Lichtintensität von $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kultiviert. Die Kulturen für die eigentlichen Messungen wurden in Kulturröhren mit 250 ml BG-11-Medium angezogen. Diese Röhren wurden in einer Kniese-Anlage (Kniese, Marburg) kontinuierlich mit steriler Druckluft durchmischt und ebenfalls mit einer Lichtintensität von $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ beleuchtet. Für eine dauerhafte Lagerung der Organismen wurden Gefrierkulturen hergestellt. Dazu wurde in sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen 500 μl ankonzentrierte Cyanobakteriensuspension aus einer Schüttelkultur mit 250 μl 80 % Glycerin (v/v) versetzt und bei -80 °C gelagert.

4.3.2 BG-11 Medium

Pro Liter BG-11-Medium wurden 10 ml 100x BG-11, 5 ml 200x TES, 1 ml 1000x Na_2CO_3 und 1 ml 1000x K_2HPO_4 auf 1 Liter mit H_2O aufgefüllt und autoklaviert. Danach wurden 1 ml 1000x FeNH_4 -Citrat steril hinzugeben. Für ein heterotrophes oder mixotrophes Kulturwachstum wurde dem BG-11-Medium 10 mM Glucose (aus einer 2 M Stammlösung) zugefügt.

100x BG-11:	1,76 M NaNO ₃ (150 g auf 1l) 30,4 mM MgSO ₄ * 6 H ₂ O (6,9 g auf 1l) 24,5 mM CaCl ₂ * 2 H ₂ O (3,6 g auf 1l) 3,12 mM Zitronensäure (0,6 g auf 1l) 279 µM Na ₂ EDTA* 2 H ₂ O (0,104 g auf 1l) 1000x Trace metal mix (100 ml auf 1l)
1000x Trace metal mix:	46,3 mM H ₃ BO ₃ (2,86 g auf 1l) 4,15 mM MnCl ₂ *4 H ₂ O (1,81 g auf 1l) 1,61 mM NaMoO ₄ *2 H ₂ O (0,39 g auf 1l) 0,32 mM CuSO ₄ *5 H ₂ O (0,079 g auf 1l) 0,77 mM ZnSO ₄ *7 H ₂ O (0,222 g auf 1l) 0,17 mM Co(NO ₃) ₂ *6 H ₂ O (0,0494 g auf 1l)
1000x Na₂CO₃:	188,7 mM Na ₂ CO ₃ (2 g auf 100 ml, steril filtriert)
1000x K₂HPO₄:	175,11 mM K ₂ HPO ₄ (3,05 g auf 100 ml, autoklaviert)
1000x FeNH₄-Citrat:	22,8 mM FeNH ₄ -Citrat (0,6 g auf 100 ml, steril filtriert)
200x TES:	5 M TES (114,59 g auf 100 ml, mit 10 N NaOH auf pH 8 eingestellt und steril filtriert.)

Zur Herstellung von BG-11-Agarplatten wurden pro Liter BG-11 15 g Bacto Agar (Difco, Detroit, USA) und 1 ml einer 1 M Natriumthiosulfat-Lösung zugefügt und mitautoklaviert. Die Zugabe der Antibiotika erfolgte nach Abkühlung auf ca. 60 °C.

Zur Segregation der Mutanten wurde dem Medium der Flüssigkulturen sowie der Agarplatten zusätzlich das notwendige Antibiotikum in folgenden Konzentrationen zugegeben:

Chloramphenicol	25 µg/ml (Stammlösung 25 mg/ml)
Erythromycin	25 µg/ml (Stammlösung 25 mg/ml)
Gentamycin	5 µg/ml (Stammlösung 25 mg/ml)
Kanamycin	50 µg/ml (Stammlösung 25 mg/ml)
Spectinomycin	20 µg/ml (Stammlösung 25 mg/ml)
Streptomycin	2 µg/ml (Stammlösung 25 mg/ml)

4.3.3 LB-Medium

Als Medium für *E. coli* wurde das LB-Medium (*lysogeny broth*) verwendet (BERTANI 1951). Bei der Herstellung der LB-Agar-Platten wurden pro Liter LB-Medium 15 g Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) hinzugefügt und mitautoklaviert.

Für LB-Agarplatten mit Antibiotikum wurde nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60 °C das benötigte Antibiotikum (siehe 4.3.2) zu der gewünschten Endkonzentration hinzugefügt.

LB-Medium: NaCl (10 g/l)
Bacto-Trypton (5 g/l)
Hefe-Extrakt (5 g/l)

4.4 Herstellung von Mutanten von *Synechocystis* PCC 6803

4.4.1 Oligonucleotide

Die Oligonucleotide, die als Primer für PCR oder zur Amplifizierung von Konstrukten für die Transformation verwendet wurden, wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim) synthetisiert. Für die Amplifikation des DNA-Fragmentes der D2-Mutante zur Herstellung der D234- und D1234-Mutante und anschließender Segregationskontrolle mittels Southern-Blot wurden folgende Primer verwendet (bzw. zur Kontrolle der *sll0217-sll0219*-Mutante):

ndhD2-out1: TTCCTTGCCAGATGGGTA **ndhD2-out2:** TTCCGCAATTTGCACGTAGG

sll0217-out1: CCACAAAGTTTTCTATGGTTAC **sll0217-out2:** CTTAGTAGTGGTTGCCAGTTT

4.4.2 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA von *Synechocystis* wurde aus ca. fünf Tage alten Zellkulturen isoliert, die sich zu diesem Zeitpunkt in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Maximal 250 ml Kultur wurde für 10 Minuten bei 3200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 200 µl TE-Puffer resuspendiert, in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und 200 µl sterile Glasperlen (0,18 mm Durchmesser) hinzugegeben. Anschließend wurden 4 µl einer 10%igen SDS-Lösung (w/v) und 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zugefügt. Durch dreimaliges Vortexen für jeweils 10 s wurden die Zellen aufgebrochen. Nach Zentrifugation (10500 g, 10 min) bildeten sich zwei Phasen. In der unteren phenolischen Phase sind unpolare Proteine und Zellmembranen gelöst. In der oberen wässrigen Phase befindet sich die DNA. Diese wurde abgenommen, mit 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) überschichtet und für

10 Minuten zentrifugiert. Die obere Phase wurde noch je zweimal mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) überschichtet und nach Zentrifugation in ein neues Gefäß überführt. Durch Zugabe von 1/10 Vol Na-Acetat (3 M, pH 4,8), anschließend vorsichtigem Mischen und Zugabe von 2,5 Vol Ethanol (100 %, -20 °C) wurde die DNA schließlich aus der Lösung gefällt. Dies geschah entweder für 15 min bei -80 °C oder für mindestens 2 h bei -20 °C. Die gefällte DNA wurde durch einen Zentrifugationsschritt von 15 min bei 18000 g und -9 °C pelletiert. Darauf folgte ein Waschschrift durch Zugabe von 1 ml Ethanol (70 %, -20 °C) und Zentrifugation für 5 min bei 18000 g und Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet für mindestens 10 min in der SpeedVac getrocknet. Gelöst wurde die DNA in 20 µl TE-Puffer (pH 7,4) über Nacht bei 4 °C.

TE-Puffer (pH 7,4): 10 mM Tris
 1 mM Na₂EDTA* 2 H₂O

4.4.3 Native Agarose-Gelelektrophorese

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese wurden die isolierte genomische DNA (siehe 4.4.2), die PCR-Produkte (siehe 4.4.5), die Gel-Eluate (siehe 4.4.6) und die Restriktionsverdauung (siehe 4.4.7) unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Sie erfolgte in Gelkammern (Biometra, Göttingen), die an eine High Voltage Pack P30 Spannungsquelle (Biometra, Göttingen) angeschlossen waren, bei ca. 170 V (7,7 V/cm) in 1x TBE-Puffer. Die Gele enthielten 0,8 % (w/v) Agarose und wurden aus 1,2 g Agarose (Seakem LE Bio-Whittaker Molecular Applications, Rockland, USA) und 150 ml 1x TBE-Puffer hergestellt, die in einer Mikrowelle aufgeköcht wurden. Nach Herunterkühlen auf ca. 60 °C wurden 10 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugefügt (0,001 % (w/v)). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 5x Probenpuffer versetzt. Ausgewertet wurden die Gele mit einem UV-Transilluminator (TF 20 M Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich), der UV-Licht von 312 nm abstrahlt und mit einer Videodokumentationsanlage (Alpha Imager 2200, Biozym, Hess. Oldendorf). Bei präparativen Gelen wurde die Leistung des UV-Transilluminators auf 70 % reduziert und die Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten.

5x Probenpuffer: 50% (v/v) Glycerin
 50% (v/v) 1x TBE
 0,2 mg/ml Bromphenolblau

10x TBE-Puffer (pH 8,3): Tris (108,0 g auf 1 l)
 Borsäure (55,0 g auf 1 l)
 Na₂EDTA* 2 H₂O (9,3 g auf 1 l)

4.4.4 DNA-Molekulargewichtsstandards

Zur Bestimmung des DNA-Molekulargewichts in der nativen Gelelektrophorese (siehe 4.4.3) wurde ein λ -DNA/HindIII-Marker (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Dadurch konnte in dem mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel nicht nur die Größe, sondern auch die Konzentration der DNA-Fragmente durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten bestimmt werden (Tabelle 4).

Tabelle 4 Fragmentgrößen des λ -DNA/HindIII-Markers (in bp) mit den zugehörigen DNA-Mengen in μg bei Einsatz von 1 μg (=10 μl) λ -DNA für den direkten Mengenvergleich in einem Agarosegel.

bp	ng DNA
23130	477
9416	194
6557	135
4361	90
2322	47
2027	42
564	12
125	2

4.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde nach SAIKI ET AL. (1985, 1988) durchgeführt. Folgender Standard-Reaktionsansatz wurde verwendet:

PCR:	H ₂ O	22,75 μl
	DNA-Lösung	5 μl
	10x PCR-Puffer (ohne Mg)	5 μl
	MgCl ₂ (25 mM)	3 μl
	dNTP-Lösung (2,5 mM)	4 μl
	Primer forward (5 pmol/ μl)	5 μl
	Primer reverse (5 pmol/ μl)	5 μl
	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ μl)	0,5 μl

Die DNA-Lösung wurde so angesetzt, dass ein Ansatz entweder 10 ng genomische oder 0,1 ng Plasmid-DNA enthielt. Die *Taq*-Polymerase, der Puffer und die MgCl₂-Lösung stammten von der

Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot). Die dNTP-Lösung wurde von der Firma Boehringer-Mannheim (Mannheim) bezogen. Die PCR-Reaktionen wurden in 200 µl Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) in einem PTC-200 Gradienten Cyler (MJ Research, Watertown, USA) durchgeführt. Für die PCR-Reaktion wurde folgendes Standard-Programm benutzt:

PCR-Zyklus: 95 °C 1 min
 95 °C 0,5 min
 X °C 1 min
 72 °C Y min
 20 °C ∞


 35-40 Zyklen

Die Temperatur X, die Annealingtemperatur, wurde mit dem Programm Oligodos (MBI, St. Leon-Rot) für die Primer ermittelt. Die Elongationszeit Y richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes. Pro 1000 bp wurde eine Elongationszeit von 1 min angesetzt. Als Minimalwert wurde 1 min gewählt. Das Ergebnis der PCR-Reaktion wurde anschließend mit einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe 4.4.3) überprüft.

4.4.6 Aufreinigung der PCR-Produkte

Um die PCR-Produkte aus 4.4.5 für eine Ligation aufzureinigen, wurden sie auf ein präparatives Gel aufgetragen. Die Gelkammer wurde dafür mit frischem 1x TBE-Puffer befüllt, wodurch eine optimale Pufferung gewährleistet wurde. Nach dem Gellauf wurde auf dem Transilluminator die entsprechende Bande aus dem Gel herausgeschnitten und das PCR-Produkt aus dem Gel extrahiert. Dafür wurde das NucleoTrap Kit (Macherey-Nagel, Düren) mit dem Protokoll 4.2 („Protocol for DNA extraction from agarose gels using NucleoTrap Kit“) verwendet. Die Konzentration der Eluate wurde über die Agarose-Gelelektrophorese (siehe 4.4.3 und 4.4.4) bestimmt.

4.4.7 Restriktionsverdau

Für den sequenzspezifischen Verdau von genomischer DNA (siehe 4.4.2) oder Plasmid-DNA (siehe 4.4.10) wurden die entsprechende Menge der DNA-Lösung mit der benötigten Typ II Restriktionsendonuclease (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Bei genomischer DNA wurde zu der benötigten Menge an DNA 1 µl Restriktionsenzym (10 U) und 1/10 des Volumens an 10x Enzypuffer hinzugegeben. Für den Verdau von Plasmid-DNA wurde bei 20 µl Gesamtvolumen 2 µl Plasmid-DNA, 0,1 µl (1 U) Restriktionsendonuclease und 2 µl 10x Puffer

zugegeben und mit H₂O aufgefüllt. Die Ansätze wurden für mindestens eine Stunde bei 37 °C in einem Wärmeschrank (Heraeus, Hanau) inkubiert. Der Verdau genomischer DNA erfolgte über Nacht. Anschließend wurden die Verdaue auf ein Agarosegel gegen eine ungeschnittene Kontrolle aufgetragen.

4.4.8 Ligation in den TOPO®-Vektor

Die gereinigten PCR-Produkte (siehe 4.4.6) wurden in den Vektor pCR2.1- TOPO® (Invitrogen, Karlsruhe) unter Verwendung des TOPO® TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben kloniert, allerdings wurde jeweils nur ein halber Ansatz angesetzt. Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur.

Der TOPO®-Vektor liegt linearisiert und mit 3' Thymidin (T)-Überhang vor. Die *Taq*-Polymerase, die für die PCR verwendet wurde (siehe 4.4.5), hat eine Template-unabhängige terminale Transferase-Aktivität, die bewirkt, dass PCR-Produkte am Ende der Elongation einen 3' Adenosin (A)-Überhang erhalten. Somit kann ein PCR-Produkt problemlos mit dem Vektor ligieren.

Der TOPO®-Vektor besitzt an jedem 3'-Ende eine kovalent gebundene Topoisomerase I aus dem *Vaccina* Virus, die das PCR-Produkt in den Vektor ligiert (SHUMAN 1994).

4.4.9 Transformation in *E. coli*

Zu dem Ligationsansatz aus 4.4.8 wurden 25 µl kompetente *E. coli*-Zellen (TOP 10, Invitrogen, Karlsruhe) gegeben. Die anschließende Inkubation für 30 min erfolgte auf Eis. Danach wurde der Ansatz für 30 s auf 42 °C erhitzt, um die *E. coli*-Zellen einem Hitzeschock auszusetzen. Anschließend wurden sie wieder auf Eis heruntergekühlt. Nach Zugabe von 125 µl SOC-Medium (RT, Invitrogen, Karlsruhe) wurden die Ansätze für 1 h bei 37 °C und 170 rpm auf einem Schüttler (Innova™ 4400, New Brunswick Scientific, Nürtingen) inkubiert. Anschließend wurden die *E. coli*-Transformationen auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Diese enthielten das Antibiotikum Kanamycin (50 µg/ml Endkonzentration), da der TOPO®-Vektor eine Kanamycin-Resistenzkassette beinhaltet. So können nur die Zellen auf der Platte überleben, die den Vektor aufgenommen haben. Auf diese Platten wurden zuvor 40 µl einer X-Gal-Lösung (40 mg/ml) verstrichen, um eine Blauweiß-Selektion vornehmen zu können. Die Agarplatten wurden über Nacht im Wärmeschrank (Heraeus, Hanau) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Agarplatten mit Parafilm (Nescofilm, Bando-Chemical, Kobe, Japan) versiegelt und bei 4 °C gelagert.

4.4.10 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die näher zu untersuchenden weißen Kolonien der Transformation (siehe aus 4.4.9) wurden einzeln gepickt und jeweils in ein Reagenzglas (Schott Duran, Mainz) überführt, das 3 ml LB-Medium und 3 µl des Antibiotikums Kanamycin enthielt. Diese wurden mit einer Aluminiumkappe verschlossen und bei 37 °C bei 120 rpm in einem Inkubator (Innova™ 4400, New Brunswick Scientific, Nürtingen) über Nacht geschüttelt. Von allen Übernachtskulturen wurden anschließend Gefrierkulturen hergestellt (siehe 4.3.1). Zur Präparation der Plasmid-DNA aus den Übernachtskulturen wurde das NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die Präparation fand nach dem Protokoll 5.1 („*Isolation of plasmid DNA from E. coli*“) des Herstellers statt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 35 µl sterilem H₂O aufgenommen.

4.4.11 Transformation von *Synechocystis*

Synechocystis ist in der Lage, spontan fremde DNA aufzunehmen und durch homologe Rekombination in das Genom einzubauen (GRIGORIEVA UND SHESTAKOW 1982, KUFRYK ET AL. 2002). Dies gelingt am effizientesten, wenn sich die Zellen im exponentiellen Wachstum befinden (ZANG 2007). Deshalb wurde am Vortag eine Kulturröhre aus einer Vorkultur auf eine OD₇₅₀ von 0,15 angeimpft. Die Zellen wurden für 10 min bei 3200 g und Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml frischem BG-11-Medium resuspendiert. Für eine Transformation wurden 300 µl der Suspension mit 10-18 µg Plasmid-DNA versetzt und der Ansatz für 4 h in einem Wasserbad bei 30 °C in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) im Dunkeln inkubiert. Alle 30 min erfolgte eine leichte Durchmischung durch Invertieren der Gefäße. Nach der Inkubation wurden jeweils 100 µl des Transformationsansatzes auf BG-11-Agarplatten (ohne Antibiotikum) ausgestrichen, auf denen zurecht-geschnittene Nitrocellulosefilter lagen. Die Platten wurden für 2 Tage in der Klimakammer bei 28 °C und 50 µE m⁻² s⁻¹ inkubiert. Anschließend wurden die Nitrocellulosefilter auf BG-11-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum überführt. Nach ca. zwei Wochen erschienen Einzelkolonien, die einzeln auf neue BG-11-Platten ausgestrichen wurden. Nach 6-8maligem Überimpfen wurde genomische DNA der neu hergestellten Mutanten isoliert und auf erfolgreiche Segregation überprüft.

4.4.12 Southern-Blot

Um zu überprüfen, ob die Resistenzkassette für Chloramphenicol in das *ndhD2*-Gen (bzw. die Gentamycin-Kassette in das *sll0217-sll0219*-Operon) eingebaut wurde, wurde eine Southern-Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurde eine Digoxigenin-markierte Sonde verwendet. Diese

Sonde wurde mit einer PCR (siehe 4.4.5) bei einer Annealingtemperatur von 50 °C hergestellt, dafür wurden Digoxigenin-markierte Desoxynukleotide aus dem PCR DIG-Probe Synthesis Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim) verwendet. Die Plasmid-Präparationen aus Abschnitt 4.4.10 wurden dazu auf eine 5 pg DNA/ μ l-Lösung herunter verdünnt. Als Template-DNA für die PCR wurden 4 μ l (20 pg) und in einem zweiten Ansatz 10 μ l (50 pg) eingesetzt. Als Primer dienten die Oligonucleotide ndhD2-F und ndhD2-R bzw. sll0217-F und sll0217-R (siehe 4.4.1), von denen jeweils 5 μ l verwendet wurden. Für die PCR wurden 5 μ l DIG-gelabelte dNTPs und entsprechend weniger H₂O eingesetzt. Anschließend an die PCR wurde eine Probe (2 μ l) auf ein Agarosegel aufgetragen, um die Konzentration der Sonde zu bestimmen. Für das Agarosegel, das als Ausgang für den Southern Blot dienen sollte, wurde genomische DNA (min. 100 ng) über Nacht mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten (siehe 4.4.7). Am nächsten Tag wurde die verdaut DNA auf ein großes Agarosegel aufgetragen. Als Größenstandard wurden 10 μ l λ -Marker eingesetzt, dem 1 μ l DIG-markierter DNA-Molecular-Weight Marker II (Boehringer Mannheim, Mannheim) hinzugefügt wurde. An das Gel wurde eine Spannung von 100 V (4,5 V/cm) angelegt. Nach dem Lauf des Gels wurde dieses auf dem UV-Transilluminator fotografiert und anschließend zweimal für 20 min im basischen Denaturierungspuffer auf dem Schüttler bei niedriger Drehzahl und Raumtemperatur inkubiert. Der Puffer wurde zwischenzeitlich gewechselt. Anschließend wurden die Gele zweimal 15 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in Neutralisierungspuffer inkubiert. Dieser Puffer wurde auch hier zwischenzeitlich gewechselt. Danach wurde die DNA mittels Kapillarblotting auf eine Nylonmembran (Porablot NY amp, Macherey-Nagel, Düren) übertragen. Als Transferpuffer diente 20 x SSC-Puffer. Als kapillare Brücke dienten Filterpapierstreifen (GB002 Gel-Blotting Paper, Schleicher und Schuell, Dassel), die auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und mit 2 x SSC getränkt wurden. Der Vorgang des Blottens dauerte ca. 18 h.

Als Positivkontrolle konnte 1 μ l einer 1:1000-Verdünnung der Plasmid-DNA, die das gesuchte Fragment enthielt und die schon zur Herstellung der DIG-markierten Sonde verwendet wurde, auf ein separates Membranstück aufgetragen werden. Diese wurde im Folgenden wie die geblottete Membran behandelt. Die DNA wurde anschließend mit einem UV-Crosslinker (UV Stratalinker 1800 von Stratagene, Heidelberg) auf der Membran fixiert. Dafür wurde das Programm „Auto Cross Link“ verwendet.

4.4.13 Hybridisierung

Die Membran mit der aufgeblotteten und kovalent gebundenen DNA (siehe 4.4.12) wurde in einer Hybridisierungsröhre (Biometra, Göttingen) mit 30 ml Vorhybridisierungspuffer für 1 h bei

68 °C im Hybridisierungssofen (OV2 von Biometra, Göttingen) inkubiert. Danach wurde der Vorhybridisierungspuffer gewechselt und dem neuen Puffer die Digoxigenin-markierte Sonde in einer Endkonzentration von 20 ng Sonden-DNA pro Milliliter Hybridisierungspuffer zugesetzt. Die Sonde wurde zuvor 10 min bei 100 °C denaturiert, um Einzelstränge zu erhalten und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68 °C im Hybridisierungssofen. Darauf folgten mehrere Wasch- und Inkubationsschritte:

2 x 5 min	2x SSC-Lösung mit 0,1% (w/v) SDS, RT
2 x 15 min	0,5x SSC mit 0,1% (w/v) SDS, Stringenzwaschung, 68 °C
1 min	Puffer 1, RT
60 min	Puffer 2 ohne Antikörper, RT
30 min	Puffer 2 mit anti-DIG-Antikörper, RT
2 x 15 min	Puffer 1 mit Tween, RT
1 min	Puffer 3

Der eingesetzte Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, Boehringer Mannheim) wurde 1:10 000 in Puffer 2 verdünnt. Nachdem die Membran in Puffer 3 äquilibriert wurde, wurde sie mit der DNA-gebundenen Seite nach oben in einen aufgeschnittenen Gefrierbeutel gelegt und mit einer Mischung aus 3 ml Puffer 3 und 30 µl CDP-Star (Boehringer Mannheim, Mannheim) überschichtet. CDP-Star ist das Substrat für die alkaline Phosphatase, die am anti-DIG-Antikörper kovalent gebunden ist. Nach 5 min Dunkelinkubation wurde die Membran in einen neuen Gefrierbeutel eingeschweißt und in einer Expositionskassette mit der DNA-tragenden Seite nach oben befestigt. Ein Röntgenfilm (X-OMAT AR-Film XAR-5, Kodak, Stuttgart) wurde in einer Dunkelkammer darauf platziert. Durch die entstehende Lumineszenz an der Phosphatase wurde er belichtet, die Expositionsdauer betrug mindestens 1 h. Zur Entwicklung wurde der Film 5 min in Entwickler-Lösung, danach kurz in Wasser und schließlich 5 min in Fixierer-Lösung geschwenkt. Anschließend wurde der Film mindestens 20 min gewässert und dann getrocknet.

Denaturierungspuffer (pH 7,4):	0,5 M NaOH (20 g auf 1 l) 1,5 M NaCl (88 g auf 1 l)
Neutralisierungspuffer:	0,5 M Tris (60,6 g auf 1 l) 3,0 M NaCl (176 g auf 1 l)
Blocking-Lösung:	10 % w/v Blocking-Reagenz (Boehringer Mannheim, Mannheim) in Puffer 1

20x SSC (pH 7,0):	0,3 M Na ₂ -Citrat * 2 H ₂ O (88,2 g auf 1 l) 3 M NaCl (176 g auf 1 l)
Puffer 1 (pH 7,5):	0,1 M Maleinsäure (11,6 g auf 1 l) 0,15 M NaCl (8,8 g auf 1 l) 0,2 M NaOH (8,0 g auf 1 l)
Puffer 1 mit Tween:	0,3% (v/v) Tween 20 (Serva, Heidelberg) in Puffer 1
Puffer 2:	Blocking-Lösung (10 % v/v) Puffer 1 (90 % v/v)
Puffer 3:	0,1 M Tris (12,1 g auf 1 l) 0,1 M NaCl (5,8 g auf 1 l)
(Vor-) Hybridisierungspuffer:	20x SSC (25 % v/v) Blocking-Lösung (10 % v/v) N-Lauroylsarcosin (0,1 % w/v) SDS (0,02 % w/v)

Die Lösungen für Entwickler und Fixierer stammten von der Firma Tetenal (Norderstedt):

Entwickler:	Roentoroll HC (25 % v/v) Röntgenentwickler Part 1 (12,5 % v/v) Röntgenentwickler Part 2 (2,5 % v/v)
Fixierer:	Superfix Part 1 (20 % v/v) Superfix Part 2 (5 % v/v)

4.5 Physiologische Methoden

4.5.1 Messung der optischen Dichte

Die Dichte der Cyanobakterienkulturen wurde mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 750 nm gegen reines BG-11-Medium gemessen. Bei 750 nm absorbieren die in den Zellen vorhandenen Pigmente nicht. Das Licht wird nur von den Zellwandbestandteilen gestreut und kann so als Maß für die Zelldichte der Kultur verwendet werden.

4.5.2 Bestimmung der Chlorophyllkonzentration

Eine weitere Bezugsgröße der Ergebnisse neben der optischen Dichte ist der Chlorophyllgehalt der Cyanobakterienkulturen und der Membranfraktionen. Um diesen zu bestimmen, wurden 1 ml aus einer Kultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gefüllt und die Zellen bei 2700 g (RT, 5 min) in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml Methanol überschichtet und über Nacht bei 4 °C gelagert. Bei einer Membranprobe und auch bei einer Messung von Kulturen in einem laufenden Versuch wurde 2-10 µl der Membranlösung oder der ankonzentrierten Kulturlösung in 990 µl bzw. 998 µl Methanol gelöst und für 2 min auf einem Vortexer geschüttelt. Um eine Phaeophytinbildung zu verhindern, bei der das Chlorophyllmolekül durch freiwerdende Säuren das zentrale Mg-Ion verliert, wurde jeweils eine Spatelspitze Magnesiumhydroxid-carbonat ($\text{MgCO}_3\text{Mg(OH)}_2$) zur Pufferung hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellbestandteile bei 20800 g (RT, 5 min) abzentrifugiert. Vom Überstand, der das gelöste Chlorophyll enthielt, wurde im Photometer bei den Wellenlängen 665,0 nm, 665,5 nm, 666,0 nm und 666,5 nm die Extinktion gegenüber reinem Methanol gemessen und ggf. mit Methanol verdünnt, um im linearen Bereich des Gerätes zu bleiben. Der Wert, der bei 750 nm gemessen wurde, entsprach der Verunreinigung mit Zellmaterial und wurde von den anderen Werten subtrahiert. Die Chlorophyllkonzentration wurde nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz mit einem molaren Absorptionskoeffizient für Chlorophyll von $\epsilon = 0,0809$ (LICHTENTHALER 1987) bestimmt:

$$(\max [E_{665,0 \text{ nm}} \text{ bis } E_{666,5 \text{ nm}}] - E_{750 \text{ nm}}) / 0,0809 = \text{Chl. in } \mu\text{g/ml}$$

4.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt von Membranfraktionen wurde nach PETERSON (1977) bestimmt, einer Erweiterung der Lowry-Methode (LOWRY ET AL. 1951) speziell für Membranproteine. Von den zu testenden Proben wurden jeweils 2-5 µl eingesetzt. Diese wurden mit H₂O auf 0,5 ml aufgefüllt und mit 0,5 ml frisch angesetzter Lösung A versetzt, kurz gemischt und 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde 0,25 ml Lösung B hinzugegeben und ebenfalls kurz gemischt. Nach 30 Minuten bei RT konnte die Extinktion im Photometer bei 750 nm gegenüber H₂O gemessen werden. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer BSA-Standardreihe mittels einer Kalibrierungskurve bestimmt.

Lösung A: CTC : 0,8 M NaOH : 10 % SDS : H₂O (1:1:1:1)

Lösung B: Folin (Roth, Karlsruhe) : H₂O (1:5)

CTC: CuSO₄ (0,1 % w/v)
Natrium-Kalium-Tartrat (0,2 % w/v)
Na₂CO₃ (10 % w/v)

4.6 Polarographische Messungen

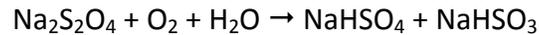
Der NDH-1-Komplex der Cyanobakterien ist sowohl an der Respiration als auch an der Photosynthese beteiligt. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit besteht deshalb in der Untersuchung der Produktion und des Verbrauchs von Sauerstoff unter verschiedenen physiologischen Bedingungen. Auch einen Einfluss auf die Wasserstoffproduktion wird dem NDH-1 zugeschrieben. Eine Möglichkeit, die Konzentration dieser Gase in der Kulturflüssigkeit von den verwendeten Kulturen zu messen, ist die Polarographie.

4.6.1 Wasserstoffmessung mit der Clark-Elektrode

Die Wasserstoffkonzentration in einer Cyanobakterienkultur wurde mit einer Sauerstoff-Elektrode vom Clark-Typ (DW1 Liquid, Hansatech, Norfolk, UK) gemessen. Diese wurde umgekehrt polarisiert mit einer Silber-Kathode und einer Platin-Anode betrieben (WANG ET AL. 1971). Zwischen den Elektroden befindet sich eine gesättigte 3 M Kaliumchlorid-Lösung. Die zu messende Kultur ist von der Elektrode durch eine Teflonmembran (YSI Membrane Kit Standard, Yellow Springs, USA) getrennt. Der Reaktionsraum, der mit einem Magnetrührer durchmischt wird, ist durch einen temperierten Wassermantel auf 30 °C geheizt. Mit einer Schaltbox (Werkstatt des FB Biologie der Philipps-Universität, Marburg) wurde von der Platin- zur Silberelektrode eine Polarisationsspannung von +0,6 V angelegt (WANG ET AL. 1971, JONES UND BISHOP 1976). Die Silberkathode musste im Gegensatz zu einer Sauerstoff-Elektrode vorher oxidiert werden. Dies geschah an einer Vorrichtung (Werkstatt Uni-Marburg), an der ein Strom von 0,3 mA durch die Silberelektrode geleitet wird. Befindet sich Wasserstoff in der Lösung, wird dieser an der Platin-Anode oxidiert, an der Silber-Kathode findet eine Reduktion der zuvor oxidierten Silberatome statt. Auf eine Änderung der Wasserstoffkonzentration reagiert die Elektrode mit einer Stromänderung, die der Konzentrationsänderung proportional ist. Die Stromänderung wurde durch einen Einkanalschreiber (ABB S-120, Goerz AG, Wien) gegen die Zeit aufgezeichnet. Die Kalibrierung der Wasserstoffelektrode erfolgte mit 900 µl H₂O und 100 µl mit H₂ gesättigtem Wasser (30 °C). Unter diesen Bedingungen enthält Wasser 77,4 nmol H₂/ml.

4.6.2 Hydrogenase-Aktivität (Bidirektionale Hydrogenase)

Für die Messung der vorhandenen bidirektionalen Hydrogenase in einer Lösung wurde von einer Cyanobakterienkultur ein Volumen entsprechend 20 µg Chlorophyll mit BG-11 auf 850 µl Volumen aufgefüllt. Mit einer Hamilton-Spritze wurden 100 µl Natrium-Dithionit-Lösung (100 mM) und 50 µl Methylviologen (100 mM) zugefügt. Dithionit disproportioniert in Lösung, wodurch der Sauerstoff aus der Lösung in der Reaktionskammer entfernt wird:



Zusätzlich wird auch das Methylviologen (1,1-Dimethyl-4,4-bipyridinium-dichlorid) reduziert, das als Elektronendonator für die bidirektionale Hydrogenase dient (ABELES 1964, SCHLEGEL UND SCHNEIDER 1978). Gleichzeitig konkurriert es am PS I mit Ferredoxin als Elektronenakzeptor.

4.6.3 Atmungsmessungen mit der Clark-Sauerstoffelektrode

Die Atmung im Dunkeln wurde mit der Clark-Sauerstoffelektrode (DW2/2 Liquid, Hansatech Inst, Norfolk, UK) gemessen. Anders als bei der Wasserstoffelektrode (siehe 4.6.1) wurde durch die angelegte Spannung von +0,8 V die Platinelektrode als Kathode und die Silberelektrode als Anode betrieben. Die Polarisierungsspannung und auch die Ausgabe des Stromsignals für den angeschlossenen Schreiber erfolgte durch den Oxygraph (Electrode control unit, Hansatech). Für die Messung wurde von einer Cyanobakterienkultur ein Volumen entsprechend 20 µg Chlorophyll mit BG-11 auf 990 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 10 µl einer 2M Glucoselösung erfolgte eine Inkubation für 5 min im Dunkeln. Für eine optimale Sauerstoffversorgung wurde die Probe in der Reaktionskammer unterdessen mit Luft durchströmt. Die Kalibrierung erfolgte mit 1 ml sauerstoffgesättigtem Wasser (30 °C). Durch Zugabe von einer Spatelspitze Natrium-Dithionit wurde der vorhandene Sauerstoff wieder entfernt (siehe 4.6.2). Da 1 ml Wasser bei 30 °C 0,245 µmol Sauerstoff enthält, lässt sich aus der Differenz der beiden Werte auf dem Schreiberpapier die Sauerstoffkonzentration in der Reaktionskammer ausrechnen.

4.6.4 Sauerstoffkurven im Licht und im dunkelroten Licht

Mit der Sauerstoffelektrode kann auch die O₂-Produktion während der Photosynthese gemessen werden. Dazu wird über einen flexiblen Lichtwellenleiter Licht von einer Lichtquelle (Schott KI 1500, Walz, Effeltrich) in die abgedunkelte Reaktionskammer der Clark-Elektrode geleitet. Durch Gabe steigender Lichtintensitäten kann der Lichtkompensationspunkt bestimmt werden, an dem die Sauerstoffproduktion den respiratorischen Sauerstoffverzehr aufwiegt. Nach einer Dunkelinkubation von 5 min wurde für jeweils 3 min Licht einer Intensität von 8; 12;

16; 22,5; 30,5; 39 und 55 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ eingestrahlt. Diese Werte ergaben sich aus den Voreinstellungsmöglichkeiten der Lichtquelle und der verwendeten Filter. Wurde zusätzlich dunkelrotes Licht (DR-Lichtquelle des PAM 101 mit maximaler Intensität) eingestrahlt, konnte damit speziell das PS I angeregt werden. Für die Messung wurde eine *Synechocystis*-Kultur entsprechend 50 μg Chlorophyll eingesetzt, zusätzlich wurde 10 μl einer 2%igen (w/v) Natriumhydrogencarbonat-lösung zugegeben, um eine optimale CO_2 -Versorgung während des Experiments zu gewährleisten. Zur Steigerung der Atmung wurden den Kulturen 10 mM Glucose zugegeben. Von jeder Mutante wurden vier Messreihen durchgeführt, jeweils zwei mit und ohne Glukose und jeder dieser Behandlungen jeweils mit und ohne zusätzliches dunkelrotes Licht.

4.7 Fluoreszenzmessung am PAM-Fluorometer

Mit einem Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometer (PAM) können nichtinvasiv verschiedene Vorgänge im photosynthetischen Elektronentransport untersucht werden (SCHREIBER 1983, SCHREIBER ET AL. 1986). Dabei wird Chlorophyll durch Licht angeregt, diese Anregungsenergie kann nur in photochemische Arbeit, in Wärme und in Fluoreszenz freigesetzt werden. Das PAM liefert nicht nur diese Anregungsenergie, sondern kann auch die entstehende Fluoreszenz messen. Da die Fluoreszenz in direkter Verbindung mit der photochemischen Arbeit steht, kann mittels des PAM die Photosyntheseleistung und -effizienz von photoautotrophen Organismen bestimmt werden. Fluoreszenz entsteht hauptsächlich am Chlorophyll a im PS II (KRAUSE UND WEIS 1991), die Chlorophyllfluoreszenz vom PS I ist unter physiologischen Zuständen zu gering, um gemessen zu werden. Mit dem Dual-PAM kann trotzdem der Zustand des PS I untersucht werden, gemessen wird dabei nicht die Fluoreszenz, sondern die Absorptionsänderung des P700 bei einer Wellenlänge von 830 nm und 870 nm (SCHREIBER ET AL. 1988).

Sollte nur die Fluoreszenz von Chlorophyll a, also die Vorgänge am PS II, bestimmt werden, wurde das PAM-101 mit den Modulen 102/103 (Walz, Effeltrich) benutzt. Sollte der Zustand von PS I untersucht werden, wurde das Dual-PAM 100 (Walz, Effeltrich) verwendet.

Da die Cyanobakterien in Suspension gemessen wurden, wurde entweder die optische Einheit ED-101US/MD verwendet, die eine 2 ml Küvette (Durchmesser 1 cm) beinhaltet oder es wurde eine flache Quarzküvette eingesetzt. Die Quarzküvette wurde direkt flach zwischen den Emitter und den Detektor des Dual-PAM 100 geklemmt. Die eingesetzten Lösungen konnten in dieser Küvette mit einem Plastikspatel durchmischt werden. Für die Messung am PAM 101 wurde eine Chlorophyllkonzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ in der 2 ml Küvette verwendet (CAMPBELL ET AL. 1998). Für die Untersuchungen des PS I am Dual-Pam wurden entweder in der schmalen Quarzküvette

50 - 100 μg Chlorophyll oder 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 2 ml Küvette eingesetzt. Wenn nicht anders angegeben, wurde für das PAM 101 mit den Modulen 102 und 103 standardmäßig folgende Einstellungen am Gerät gewählt:

PAM 101 – Messlicht:	Intensität:	7
	Verstärkung (Gain):	6
	Dämpfung (Damp):	6
	Frequenz:	1,6 kHz
PAM 102 – akt. Licht:	Intensität:	10 ($\triangleq 50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
PAM 103 – Sättigungsblitz:	Dauer:	1000 ms

Die Aufzeichnung der Messwerte des PAM 101 erfolgte mit der Software DA-100 (Vers. 3.00, Walz, Effeltrich). Die erhaltenen Rohdaten wurden dazu mit dem Programm „Doascii“ in Excel-kompatible Daten konvertiert. Gesteuert wurde das Dual-PAM über die Software Dual-PAM v. 1.9 (Walz, Effeltrich).

4.7.1 *Post-illumination increase in chlorophyll-fluorescence (PIIF)*

Ein länger bekanntes und noch immer nicht vollständig verstandenes Phänomen wird als *post-illumination increase in chlorophyll-fluorescence* (PIIF) bezeichnet. Entdeckt wurde es zuerst durch Fluoreszenzmessungen an Blättern (ASADA ET AL. 1993, Mano et al. 1995, ENDO ET AL. 1998). Wird direkt an einem Blatt mit dem PAM-Fluorometer die PSII-Fluoreszenz gemessen, wobei aktinisches Licht für mindestens 120 s eingestrahlt wird, kommt es nach Abschalten des aktinischen Lichtes nach dem zu erwartendem Abfall der Fluoreszenz zu einem erneuten kurzfristigen Anstieg (innerhalb 30 s), der kurzzeitig die Intensität vor Ausschalten des aktinischen Lichts erreichen kann (Abbildung 6). Dieser Effekt ist auch bei Cyanobakterien messbar. Eine Temperaturabhängigkeit konnte ebenfalls gezeigt werden (MI ET AL. 1997), diese wird auf die Fluidität der Membranen und somit auf die Beweglichkeit des PQ zurückgeführt. Sowohl bei NDH-1-Mutanten von Pflanzen als auch von Cyanobakterien ist dieser Effekt verringert oder fehlt ganz. Deshalb wird diese Methode als schnelle und einfache Möglichkeit verwendet, neue Untereinheiten des NDH-1-Komplexes zu suchen (GOTOH ET AL., 2010, Munshi et al. 2005, 2006, TAKABAYASHI ET AL 2009, YABUTA ET AL. 2010, WANG UND PORTIS 2007). Das Messprotokoll zur Ermittlung des PIIF-Effektes (Abbildung 6) galt sowohl am PAM 101 als auch am Dual-PAM:

Das Messlicht wurde für 20 s eingeschaltet, danach folgte ein Sättigungsblitz (SP) zur Ermittlung von F_m . Für 180 s wurde aktinisches Licht ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) eingestrahlt, gefolgt von einem SP (zur F_m' -Bestimmung). Anschließend wurde das Licht ausgeschaltet und der PIIF-Effekt ermittelt.

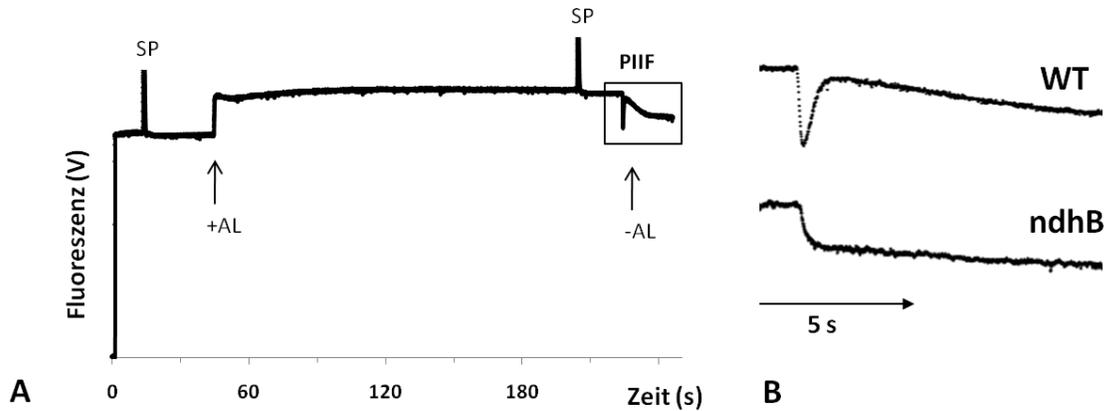


Abbildung 6: Der PIIF-Effekt (*post illumination increase of fluorescence*) wird mit dem PAM-Fluorometer gemessen (A), nachdem das aktinische Licht (AL, 180 s, $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) abgeschaltet wird. Durch Gabe von Sättigungsblitzen (SP) kann F_m und F_m' errechnet werden. Der PIIF-Effekt aus A (schwarzer Kasten) ist vergrößert dargestellt (B), sowohl von einer Kultur *Synechocystis* WT als auch der *ndhB*-Mutante.

4.7.2 Ermittlung der HWZ von PS I und der Kapazität der CET

Zur Bestimmung der Aktivität des PS I wurde die Halbwertszeit der Reduzierung des Reaktionszentrums des PS I nach vorheriger vollständiger Oxidation durch Gabe eines Sättigungsblitzes (SP) ermittelt. Dazu wurden Proben der Cyanobakterienkulturen in bekannter Konzentration (siehe 4.7) mit dem Dual-PAM untersucht. Nach einer Dunkelinkubation von 5 min wurde die Aufzeichnung mit der Dual-PAM Software gestartet, das verwendete Trigger-Programm steuerte die dreimalige Gabe eines Sättigungsblitzes im Abstand von jeweils 30 s (Abbildung 7).

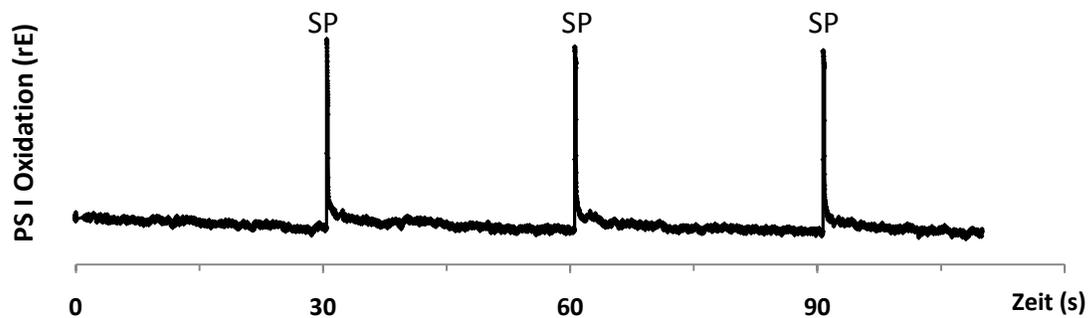


Abbildung 7: Messprotokoll zur Bestimmung der Halbwertszeit (HWZ) des PS I, gemessen mit dem Dual-PAM und der zugehörigen Software. Eine *Synechocystis*-Kultur ($\approx 50 \mu\text{g}$ Chlorophyll) wurde 5 min dunkelinkubiert, anschließend wurde drei Mal im Abstand von 30 s ein Sättigungsblitz (SP, 200 ms, $10000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) gegeben.

Die Aufnahme der Messwerte erfolgte alle 6 ms, der SP hatte eine Dauer von 200 ms und eine Stärke von $10000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Anschließend wurde der Abfall des Oxidationszustandes des PS I nach Ende der Sättigungsblitze analysiert. Dazu wurden die Messwerte, die 300 ms auf ein Ende

eines SP folgten, mittels Regressionsanalyse (SigmaPlot) untersucht (Abbildung 8). Die Regressionsanalyse erfolgte unter Annahme eines exponentiellen Abfalls mit einer Exponentialfunktion, Gleichung mit 3 Parametern: $y = y_0 + a e^{-\lambda x}$, wobei x für Zeit in s und λ für eine Geschwindigkeit ($\frac{1}{s}$) steht. Die Halbwertszeit errechnet sich aus $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}$. Die Güte der Regression ergibt sich aus dem Bestimmtheitsmaß R^2 . Das Konfidenzintervall beschreibt bei vorgegebener Wahrscheinlichkeit (95 %) die wahre Lage der Regressionskurve.

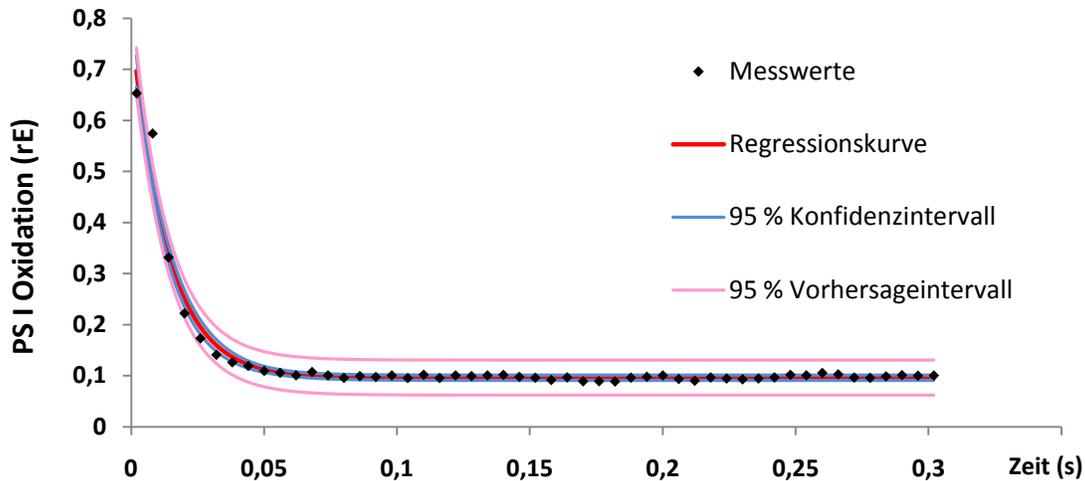


Abbildung 8: Regressionsanalyse zur Bestimmung der HWZ des PS I. Ausgehend von Dual-PAM-Messungen von *Synechocystis*-Kulturen (siehe Abbildung 7) wurde die Regressionskurve der Reduktion des PS I sowie das Konfidenz- und Vorhersageintervall im Zeitraum von 0,3 s nach SP- bzw. MT-Blitz berechnet.

Das Vorhersageintervall beschreibt die Bandbreite von zukünftigen Messwerten (ebenfalls mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 %). Für die vorliegenden Berechnungen wurden, wenn nicht anders angegeben, nur Werte mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 > 0,9$ verwendet. Durch Zugabe des Inhibitors DCMU (20 μ M) konnte der Einfluss des PS II ausgeschaltet werden.

4.7.3 Die HWZ von PS I unter DR-Bedingungen

Der Einfluss von dunkelrotem Licht (DR) auf die HWZ des PS I wurde ebenfalls mit dem Dual-PAM untersucht (Abbildung 9 A). Dazu wurden wechselnde Stärken von dunkelrotem Licht (Voreinstellung Dual-PAM) eingestrahlt, nach Abschalten dieses Lichtes wurde das PS I, das durch das DR-Licht oxidiert wurde, wieder reduziert (Abbildung 9 B). Die HWZ dieser Reaktion wurde entsprechend Abschnitt 4.7.2 ermittelt.

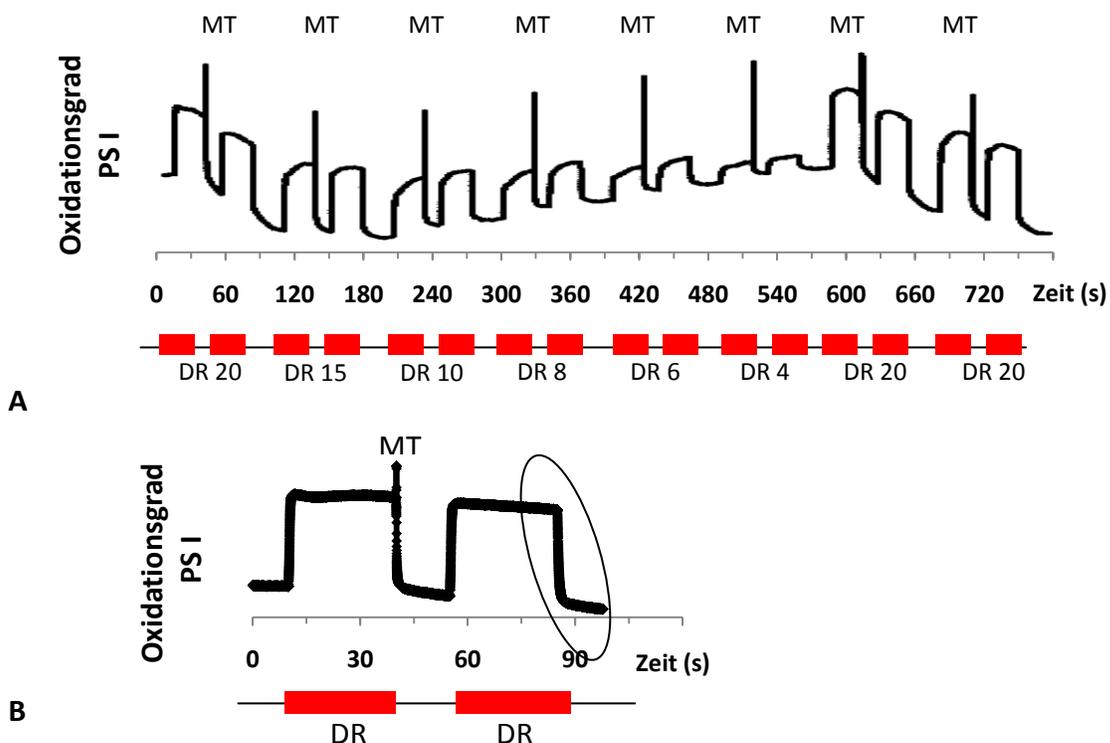


Abbildung 9: Beispielhafte Messung zur Untersuchung des PS I mit dem Dual-PAM. Mit dem Trigger-Programm wurden 8 Messzyklen mit wechselnder Belichtungsstärke von dunkelrotem Licht (DR) festgelegt (A). In jedem Zyklus wurde mit Gabe eines *multiple-turnover*-Blitzes (MT) das DR-Licht ausgeschaltet (B). Die HWZ des PS I wurde nach Abschalten des DR-Lichtes (ovale Markierung) bestimmt (siehe 4.7.2).

4.7.4 Bestimmung des Oxidationsgrades des PS I

Der Oxidationsgrad des PS I kann mit dem Dual-PAM bestimmt werden. Durch zusätzliche Einstrahlung von dunkelrotem Licht (DR), das verstärkt das PS I anregt, wird der zyklische Elektronentransport angeregt. Durch Lichtabsorption sind immer einige Reaktionszentren des PS I oxidiert. Sättigungsblitze wie auch *multiple-turnover*-Blitze (MT) führen dazu, dass kurzfristig sämtliche Reaktionszentren (PS I wie PS II) oxidiert (geschlossen) sind. Wird also zusätzlich zu diesem Licht noch ein MT gegeben, kann der Anteil an noch nicht oxidiertem PS I ermittelt werden. Hieraus lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob z.B. eine donorseitige Limitierung vorliegt, d.h. ob der PQ-Pool durch die herrschenden Umstände in einem sehr oxidierten Zustand ist. Ausgehend von den Messreihen aus Abschnitt 4.7.3 wurden bei jedem Messzyklus der Oxidierungsgrad des PS I bei gegebenem DR-Licht ($P700_{DR}$) und der Oxidierungsgrad bei einem MT ($P700_{tot}$) bestimmt und das Verhältnis davon berechnet (Abbildung 10).

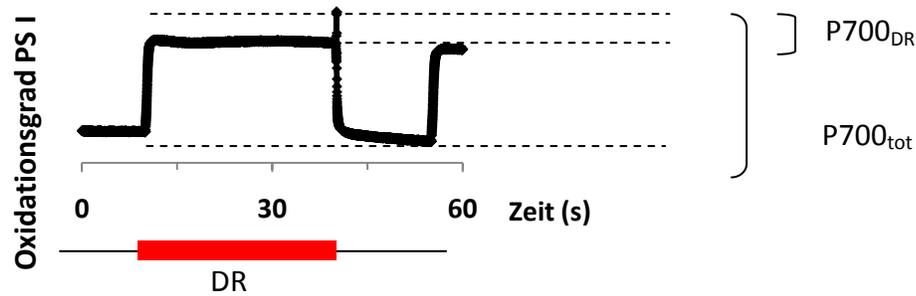


Abbildung 10: Messprotokoll zur Ermittlung des Oxidationsgrades des PS I mit dem Dual-PAM anhand der Messreihen aus Abbildung 9. Dabei wurden einer *Synechocystis*-Kultur zusätzlich zum aktinischen Licht dunkelrotes Licht (DR) von unterschiedlichen Intensitäten für 30 s eingestrahlt. Mit Gabe eines *multiple-turnover*-Blitzes (MT) wurde das dunkelrote Licht für 15 s unterbrochen. Der Anteil des bei gegebenem dunkelrotem Licht durch einen MT-Blitz noch oxidierbaren PS I ($P700_{FR}$) wurde zum gesamt vorhandenen PS I ($P700_{tot}$) ins Verhältnis gesetzt.

4.7.5 P700-Lichtkurven am Dual-PAM

Zur Bestimmung verschiedener Parameter des PS I wurden Lichtkurven gemessen, deren Parametereinstellung von der Dual-PAM-Software vorgegeben war. Nach Dunkelinkubation wurden die Kultur mit steigenden Lichtmengen beleuchtet (bis $832 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). Aus den Messwerten berechnete die Software für das PS I die nichtphotochemischen Quantenausbeuten, die als Wärmedissipation frei werden: Die nichtphotochemische Quantenausbeute $Y(ND)$, die der Donorseitenlimitierung entspricht, die nichtphotochemische Quantenausbeute $Y(NA)$, die der Akzeptorseitenlimitierung entspricht und aus diesen beiden die photochemische Quantenausbeute des PS I: $Y(I) = 1 - Y(ND) - Y(NA)$.

4.7.6 Messung der Cytochrom-bd-Chinioxidase

In *Synechocystis* stellt die Chinioxidase (Cytochrom-bd-Oxidase) neben dem Cytochrom- b_6f -Komplex wahrscheinlich die einzige Möglichkeit dar, den Plastochinonpool zu oxidieren (HOWITT UND VERMAAS 1998, PILS ET AL. 1997, PILS UND SCHMETTERER 2001). Die Aktivität dieses Enzms wurde mit dem PAM 101 gemessen (GUTTHANN ET AL. 2007). Dazu wurde in die 2 ml-Küvette eine *Synechocystis*-Kultur mit einer Chlorophyllkonzentration von $2,5 \mu g$ Chlorophyll/ml gegeben. Die Probe wurde für 5 min im Dunkeln inkubiert, anschließend wurde das Messlicht angeschaltet und ein Sättigungsblitz (SP) gegeben, um die Fluoreszenz F_0 zu bestimmen. Anschließend wurde das aktinische Licht eingeschaltet ($54 \mu E m^{-2} s^{-1}$). Ein SP wurde zur Ermittlung von F_m' gegeben,

anschließend wurde 20 μM DBMIB (4 μl einer 10 mM Stammlösung) und 10 mM Ascorbat (10 μl einer 2 M Stammlösung) hinzugegeben. Dies wurde zur Reduktion des DBMIB benötigt, im reduzierten Zustand kann es als kompetitiver Inhibitor in der Plastochinon-Bindungstasche des Cytochrom- b_6/f -Komplexes binden. Nach Gabe des DBMIB wurde über einen Zeitraum von 3 Minuten im Abstand von 30 s Sättigungsblitze gegeben (Abbildung 11). Die Aktivität der Cytochrom-bd-Oxidase errechnet sich aus dem Genty-Koeffizienten, der Quantenausbeute des PS II: $F_v/F_m = (F_m' - F')/F_m'$ (GENTY ET AL. 1989). Dabei entspricht F_v (variable Fluoreszenz) der Differenz der Fluoreszenz bei Belichtung (F') und der maximalen Fluoreszenz bei einem Sättigungsblitz im Licht (F_m'). Für die Ermittlung des Genty-Koeffizienten wurde die maximale Fluoreszenz (F_m') bei dem ersten Sättigungsblitz (SP) nach Gabe des DBMIB (ca. 40 s nach Zugabe) verwendet. F' wurde aus den Werten vor dem SP gemittelt. Ohne Cytochrom-bd-Chinoloxidase kann bei inhibiertem Cytochrom- b_6/f -Komplex der Plastochinonpool nicht oxidiert werden, was sich bei der PAM-Messung durch eine maximale Fluoreszenz (=minimale Quantenausbeute) widerspiegeln würde (BERRY ET AL. 2002). Wird folglich nach der Zugabe von reduziertem DBMIB eine positive PS II-Quantenausbeute gemessen, so kann dieses nur auf die Aktivität einer Chinoloxidase zurückgeführt werden.

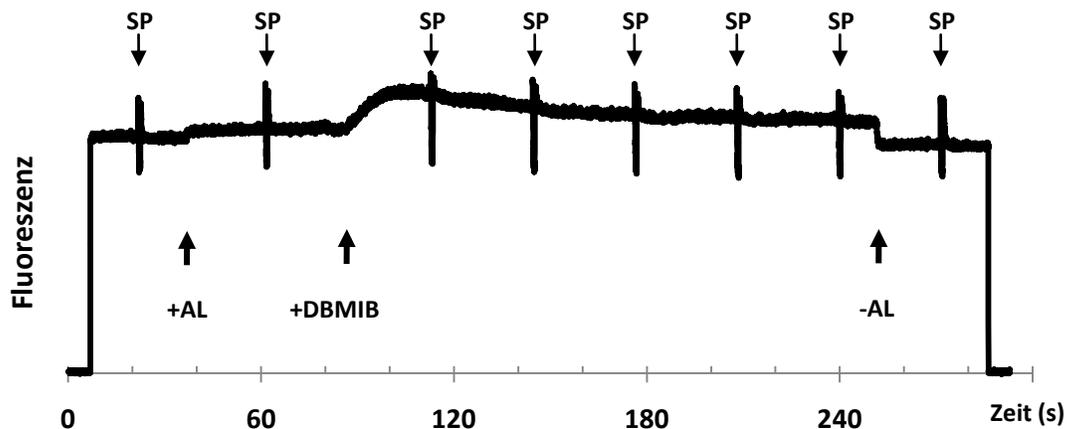


Abbildung 11: Messprotokoll zur Ermittlung der Aktivität der Cytochrom-bd-Oxidase mit dem PAM 101. Nach Dunkelinkubation einer *Synechocystis*-Kultur wurde aktinisches Licht (AL) eingestrahlt. Die Pfeile oben zeigen die Gabe von Sättigungsblitzen (SP) an, mithilfe dieser konnten die maximalen Fluoreszenzen F_0' und F_m' errechnet werden. Die Pfeile unter der Kurve zeigen die Gabe von Licht und dem Inhibitor DBMIB an.

4.8 Proteinbiochemische Methoden

Um die Lokalisierung und die Zusammensetzung des NDH-1-Komplexes zu untersuchen, mussten Membranen aus *Synechocystis* isoliert werden, diese wurden z.T. in verschiedene Membranfraktionen getrennt. Die Membranproteine wurden nach Auftrennung in unterschiedlichen nativen Gelsystemen durch Western-Blot und Aktivitätsfärbungen untersucht.

4.8.1 Zellaufbruch für Membrantrennung

Um Membranen in Plasma-, Thylakoid- und äußere Membran zu trennen, erfolgte der Zellaufbruch nicht durch Glasperlen, sondern mit der French Press (French Pressure Cell Press, SIM Aminco Spectronic Instruments, Jessup, USA) aufgebrochen (MURATA UND OMATA 1983). Es wurden bis zu 2 l Kulturen bis zu einer OD von 1 angezogen und geerntet. Die Zellpellets wurden zweimal mit 30 ml Puffer A gewaschen (3 200 g, 5 min). Anschließend wurden sie in 100 ml Lysis-Puffer resuspendiert und für 2 h in einem 250 ml Erlenmeyer-Kolben bei 30 °C im Licht inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit Puffer B, in dem das Zellpellet danach auch aufgenommen wurde (20 ml). Zu der Zellsuspension wurden 200 µl DNaseI (1 U/ µl) hinzugegeben. Nach diesem Schritt konnte die Zellsuspension entweder bei -20 °C eingefroren oder nach Kühlung auf Eis durch 3 Durchgänge mit der French Press bei 1 200 psi aufgebrochen werden.

Puffer A: 5 mM HEPES (pH 8,0)
1 mM PMSF, gelöst in Ethanol

Puffer B: 20 mM HEPES (pH 8,0)
600 mM Saccharose
1 mM PMSF, gelöst in Ethanol

Lysis-Puffer: 10 mM HEPES (pH 8,0)
600 mM Saccharose
50 mM NaCl
5 mM Na₂EDTA* 2 H₂O
2 mM β-Mercaptoethanol
2,5 mg/ml Lysozym

4.8.2 Membrantrennung

Die Trennung der Membranen erfolgte in einem Saccharose-Dichtegradienten, der über der Probe aufgeschichtet wurde. Nach dem Zellaufbruch wurde das Zellhomogenat für 10 min bei 3200 g und 4 °C zentrifugiert. 15 ml des Überstandes wurden mit 15 ml 90%iger Saccharoselösung versetzt. Der Gradient wurde wie folgt präpariert: 15 ml Probe wurden mit 10 ml 39%iger, 3ml 30%iger und 8 ml 10%iger Saccharoselösung überschichtet (Abbildung 12 links). Der Gradient wurde dann bei 100000 g und 4 °C in einem Ausschwingrotor über Nacht zentrifugiert.

Die Fraktionen, die die Plasma- und die Thylakoidmembranen enthielten (Abbildung 12 rechts), wurden von oben mit einer Glaspipette abgenommen, mit Puffer C verdünnt und bei 20000 g in

einem Festwinkelrotor für 1 h zentrifugiert. Die Membranpellets wurden in Puffer C (ca. 200 μ l) resuspendiert.

Puffer C: 20 mM HEPES (pH 8,0)

Saccharoselösungen: 90 %, 39 %, 30 % bzw. 10 % (w/v) Saccharose in Puffer C
0,2 mM PMSF

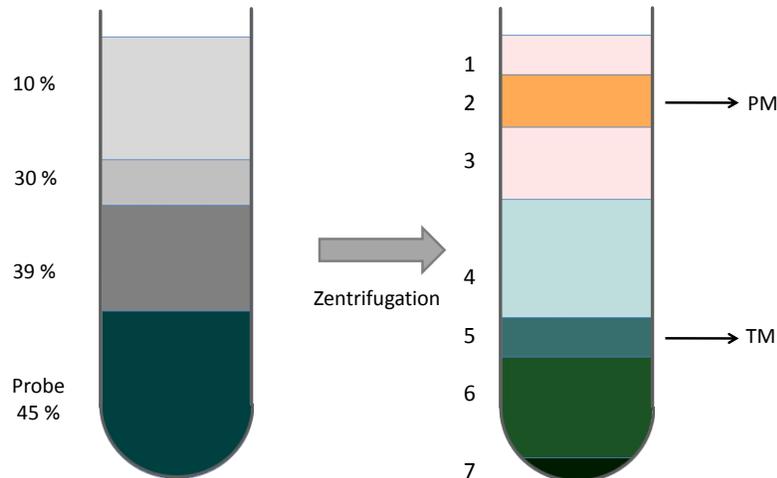


Abbildung 12: Membranisolierung von *Synechocystis*: Saccharosegradient vor und nach der Zentrifugation. Die Probe wurde mit Saccharoselösungen absteigender Konzentration überschichtet. Nach der Zentrifugation waren sieben Fraktionen sichtbar: Fraktion 2 enthält die Plasmamembran, Fraktion 5 die Thylakoidmembran (und Fraktion 7 die äußere Membran).

4.8.3 Zellaufbruch und Isolierung von Gesamtmembranen für BN-Gele

Um Gesamtmembranen von *Synechocystis* zu gewinnen, wurde die Methode nach NORLING ET AL. (1998) angewandt. Dazu wurden Zellen aus 250 ml Kultur abzentrifugiert (5 min, 3 500 g, RT) und das Zellpellet in 1 ml KP_i -Puffer (20 mM, pH 7,5) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 2650 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 300 μ l KP_i -Puffer gelöst. Anschließend wurden sovieler gewaschene und durch Erhitzen (180 °C für 2 h) sterilisierte Glasperlen (Durchmesser 0,17 - 0,18 mm) zugeben, bis etwa 2 mm Flüssigkeit über den Perlen verblieb. Diese Ansätze wurden auf Eis gekühlt. Der Aufbruch erfolgte mechanisch durch Vortexen (5 x 30 sec), wobei die Proben zwischendurch auf Eis gekühlt wurden. Die Ansätze wurden anschließend für 1 min zentrifugiert (800 g, 4 °C), der Überstand über den Glasperlen wurde abgenommen und in ein neues

Reaktionsgefäß überführt. Zu den Glasperlen wurde 250 µl frischer KP_i -Puffer gegeben und kurz gevortext. Nach erneutem Zentrifugieren (1 min bei 800 g, 4°C) wurde wieder der Überstand abgenommen. Dies wurde drei Mal durchgeführt, bis sich die zwischen den Glasperlen verbleibende Lösung deutlich entfärbte. Die vereinigten Überstände wurden 10 min bei 1300 g und 4 °C zentrifugiert. Der nun von Zellbruchstücken und Glasperlen befreite Überstand wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 20800 g und 4 °C zentrifugiert, um die Membranen zu sedimentieren. Der durch Phycobilisomen blau gefärbte Überstand wurde entfernt und das Membranpellet in 200 µl KP_i mit Saccharose resuspendiert.

KP_i -Puffer: 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5

KP_i mit Saccharose: 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit 250 mM Saccharose

4.8.4 Probenvorbereitung (BN-PAGE)

Um Proteinkomplexe in ihrer nativen Form in einem Polyacrylamidgel aufzutrennen, wurden Blau-Native (BN) Gele verwendet. Dazu wurde jeweils ein Volumen des Membranextraktes entsprechend 6 µg Chlorophyll eingesetzt. Um eine Denaturierung der Proteine zu vermeiden, wurden alle Zentrifugationsschritte bei 4 °C durchgeführt und die Proben zwischendurch auf Eis gelagert. Die Proben wurden mit dem 2,5fachen Volumen Waschpuffer in einem 2 ml Reaktionsgefäß vermischt und für 10 min bei 20800 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Membranpellet in 5 µl 25BTH20G resuspendiert. Anschließend wurden 5 µl der Solubilisierungslösung hinzugegeben und die Proben für 50 min auf Eis inkubiert. Dabei wurden sie alle 10 min leicht mit dem Vortexer gemischt. Anschließend wurden sie 4 min bei 20800 g und 4 °C zentrifugiert. Das Membranpellet wurde resuspendiert und für 20 min bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation (15 min, 20800 g und 4 °C) wurden die Membranen sedimentiert. Die herausgelösten Proteine im Überstand wurden abgenommen, mit 1/10 Volumen BN-Probenpuffer versehen und auf das BN-Gel aufgetragen.

50BTH40G (50 ml): 50 mM BisTris, pH7,0 (0,523 g auf 50 ml)

40 % (w/v) Glycerin (20 g auf 50 ml)

25BTH20G: 50BTH40G 1:1 mit H₂O verdünnt

Waschpuffer (50 ml): 330 mM Sorbitol (3,005 g auf 50 ml)

50 mM BisTris, pH 7,0 (0,523 g auf 50 ml)

Solubilisierungslösung:	50BTH40G (50 % (v/v)) DNase (1 U/ μ l, 10 % (v/v)) n-Dodecylmaltosid (3 % (w/v)) MgCl ₂ (1M, 2 % (v/v))
BN-Probenpuffer:	Serva G (5 % (w/v)) 2x BisTris ACA (50 % (v/v)) Saccharose (30 % (v/v)) 10 mM Na ₂ EDTA* 2 H ₂ O
2x BisTris ACA:	200 mM BisTris pH 7,0 (2,092 g auf 50 ml) 1 M 6-Aminocaprinsäure (6,559 g auf 50 ml)

4.8.5 Blue-Native PAGE

Mit dem blau-nativen Gelsystem (SCHÄGGER UND JAGOW 1991) können Membranproteinkomplexe nativ elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Proteine werden zuvor durch milde Detergenzien wie n-Dodecylmaltosid (Dodecyl- β -D-maltosid) oder Digitonin aus der Membran gelöst. Für eine bessere Auftrennung wurde ein linearer Acrylamidgradient von 5 % - 12,5 % verwendet. Die Gele wurden in einer Anlage von Hoefer (Hoefer Mighty small SE 245 Dual gel caster, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) gegossen, wobei die 5%ige und die 12,5%ige Gellösung in einen Gradientenmischer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) vermischt wurden.

	Trenngel (5 %)	Trenngel (12.5 %)	Sammelgel (4 %)
48 % / 1,5 % AA/BA	0,212 ml	0,530 ml	0,121 ml
3x Gelpuffer	0,7 ml	0,7 ml	0,5 ml
75 % Glycerin	0,14 ml	0,56 ml	-
H₂O	1,028 ml	0,290 ml	0,860 ml
TEMED	2 μ l	2 μ l	3 μ l
5 % APS	11 μ l	11 μ l	16 μ l
Gesamtvolumen	2,1 ml	2,1 ml	1,5 ml

Für den Lauf wurde in das obere Pufferreservoir zunächst ein Kathodenpuffer mit 0,01 % ServaG (Serva, Heidelberg) gefüllt, der nach der Hälfte des Laufs durch ungefärbten Kathodenpuffer ersetzt wurde. Zum Einlaufen in das Sammelgel wurde eine Spannung von 50 V angelegt, danach wurde die Spannung auf bis zu 150 V erhöht.

3x Gelpuffer:	150 mM BisTris (pH 7,0) 1,5 M 6-Aminocaprinsäure
10x Kathodenpuffer:	0,5 M Tricin, 150 mM BisTris (pH 7,5) für 1x Kathodenpuffer mit 0,01 % Serva G versetzen
10x Anodenpuffer:	0,5 M BisTris (pH 7,0)

4.8.6 Zellaufbruch und Membranisolierung für In-Gel-Aktivitätsfärbungen

Um Membranproteine für eine In-Gel-Aktivitätsfärbung zu erhalten, wurden Gesamtmembranen nach dem abgewandelten Protokoll von NORLING ET AL. 1998 isoliert: Die Zellen wurden mit Medium A gewaschen und vor dem Aufbruch in Medium B resuspendiert. Der Aufbruch erfolgte durch kürzere Impulse mit dem Vortexer (5 x 10 s). Der Überstand wurde abgenommen und für 5 min bei 4 °C und 2650 g zentrifugiert, um Zelltrümmer und Glasperlen zu entfernen. Anschließend wurde eine Chlorophyllbestimmung (siehe 4.5.2) durchgeführt.

Medium A: 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.5
1 mM MgCl₂, 10 mM NaCl

Medium B: Medium A + 25 % (v/v) Glycerin
0,2 mM PMSF, gelöst in Ethanol

4.8.7 Probenvorbereitung für In-Gel-Aktivitätsfärbungen

Die Membranpräparationen (siehe 4.8.6) wurden entweder in Puffer B auf die gewünschte Konzentration verdünnt und mit 1,5 % (w/v) n-Dodecylmaltosid als Detergenz vermischt oder das Detergenz wurde direkt in die Membranpräparation gegeben. Die Proben wurden für 60 min auf Eis auf einem Schüttler inkubiert und auf das native Gel (Davis-Gel oder CN-Gel) aufgetragen. Dem Größenstandard (HMW-Marker), im selben Puffer verdünnt, wurde etwas Ponceau S beigemischt, um die Lauffront sichtbar zu machen.

4.8.8 Native PAGE (Davis)

Um Proteine nativ aufzutrennen und anschließend eine Aktivitätsfärbung der NAD(P)H-Dehydrogenasen vornehmen zu können, wurde statt des BN-Gels ein anderes natives Gel (DAVIS 1964) verwendet. Dieses enthält weder im Gel noch im Laufpuffer Substanzen, die den Proteinen eine zusätzliche Ladung verschaffen (z.B. Coomassie im BN-Gel). Die Proteine werden nur aufgrund der Eigenladung getrennt. Diese Methode ist schonender für die Proteine, allerdings wandern so Proteine mit einem basischen isoelektrischen Punkt nicht in das Gel ein. Zur Färbung vom NDH-1-Komplex ist das Davis-Gel wie auch das folgende Tris-Gel (siehe 4.8.9) und das *clear-native*-Gel (4.8.10) besser geeignet. Es wurden Apparaturen für „Midi-long“ Gele von Biometra (Göttingen) verwendet. Zur besseren Auftrennung wurde auch hier ein Acrylamid-Gradient verwendet (5 % - 15 %). Der Gellauf erfolgte bei einer voreingestellten Spannung von 50 V bei einer Temperatur von 6 °C (im Kühlraum).

	Trenngel (5 %) (7,5 ml)	Trenngel (15 %) (7,5 ml)	Sammelgel (2,5 %) (7,5 ml)
30 % /0,8 % AA/BA	1,25 ml	3,75 ml	-
10 %/2,5 % AA/BA	-	-	1,875 ml
Puffer Trenngel	2 ml	2 ml	-
Puffer Sammelgel	-	-	1 ml
75 % Glycerin	0,2 ml	1,725 ml	-
H₂O	4,025 ml	-	4,575
TEMED	5 µl	5 µl	7,5 µl
10 % APS	20 µl	20 µl	40 µl

Puffer Trenngel: 18,3 g Tris (1,5 M) und 24 ml 1M HCL auf 100 ml, ergibt ca. pH 8,8

Puffer Sammelgel: 5,96 g Tris (0,5 M) und 24 ml 1M HCl auf 100 ml

Laufpuffer 10x Davies: 6 g/l Tris und 28,8 g/l Glycin

4.8.9 Native Tris-PAGE

Eine abgewandelte Form des nativen Davis-Gels (OOYABU ET AL. 2008) wurde ebenfalls verwendet, um NDH-1-Aktivitätsfärbungen durchzuführen. Die Gelzusammensetzung entspricht der aus 4.8.8, allerdings wurde der Gelpuffer dahingehend geändert, dass die Endkonzentration im Gel 5 mM Tris und 38 mM Glycin betrug.

4.8.10 Clear-Native-PAGE

Eine weitere Methode zur nativen Auftrennung von Proteinen in einem Polyacrylamidgel ist die Verwendung von *clear-native*-Gelen (CN-Gel, WITTIG ET AL. 2007). Das CN-Gel entspricht dem BN-Gel, mit dem Unterschied, dass weder dem Probenpuffer noch dem Kathodenpuffer Coomassie oder andere Substanzen zugegeben werden, die die Ladung der Proteine beeinflussen. Somit wandern die Proteine nur aufgrund ihrer Eigenladung in das Gel ein. Dies führt dazu, dass Proteine mit einem isoelektrischem Punkt unter pH 7 nicht aufgetrennt werden können, da diese in den Kathodenpuffertank wandern. Im Kathodenpuffer befindet sich Natriumdesoxycholat (NaDOC), ein leichtes Detergenz. Für eine bessere Auftrennung wurde auch dieses Gel mit einem Acrylamidgradienten von 5 % -15 % gegossen. Der Gellauf erfolgte bei einer 50 V. Aufgrund der geringen Ionenstärke des Puffersystems fließt bei dieser Spannung nur ein geringer Strom, der Gellauf erfolgte deshalb über Nacht in einem Kühlraum (6 °C).

	Trenngel (5 %) (6,5 ml)	Trenngel (12,5 %) (6,5 ml)	Sammelgel (4 %) (6,5 ml)
48 % /1,5 % AA/BA	0,66 ml	1,64 ml	0,53 ml
3x Gelpuffer	2,17 ml	2,17 ml	2,17 ml
75 % Glycerin	0,43 ml	1,73 ml	-
H₂O	3,2 ml	0,92 ml	3,72 ml
TEMED	6 µl	6 µl	12 µl
5 % APS	34 µl	34 µl	68 µl

Anodenpuffer (pH 7,0): 25 mM Imidazol

Kathodenpuffer (pH 7,0): 50 mM Tricin
7,5 mM Imidazol
0,05 % (w/v) NaDOC

4.8.11 In-Gel-Aktivitätsfärbung der NADPH-Dehydrogenase

Der NDH-1-Komplex kann nativ im Gel elektrophoretisch aufgetrennt und durch eine Farb-reaktion nachgewiesen werden. Dazu wurde nach der Elektrophorese (siehe 4.8.8 und 4.8.10) das Gel für 10 min in 20 mM Tris-HCL (pH 7,5) bei RT inkubiert und anschließend in 20 mM Tris-HCL (pH 7,5) mit 0,1 % (w/v) NBT zum Färben überführt. Nach 10 min wurden 1 mM NADPH hinzugegeben und so lange inkubiert, bis violett-gefärbte Formazan-Banden (reduziertes NBT)

zu sehen waren. Nach ausreichend intensiver Färbung wurde die Färbelösung gegen H₂O getauscht. Sollte die Färbung für längere Zeit konserviert werden, wurde das Gel in Fixierer (siehe 4.8.14) gelegt.

4.8.12 In-Gel-Aktivitätsfärbung der Carboanhydrase

Die an dem NDH-1MS beteiligten Untereinheiten CupA und CupB besitzen Sequenzähnlichkeiten mit Carboanhydrasen. Das Enzym Carboanhydrase, das reversibel CO₂ in Bicarbonat umwandelt, kann ebenfalls nach einer nativen gelelektrophoretischen Auftrennung nachgewiesen werden. Dazu wurde das Gel in Puffer (z.B. 20 mM Tris, pH 8) inkubiert, das einige Tropfen Bromthymolblau enthielt (Gálvez et al. 2000, Tashian 1969). Anschließend wurde das Gel mit etwas Trockeneis in einen luftdichten Behälter gelegt. Durch die lokale Umsetzung von CO₂ zu HCO₃⁻ kommt es zu einer pH-Änderung und somit zu einem Farbumschlag von Blau zu Gelb.

4.8.13 Denaturierende SDS-PAGE

Die denaturierende Auftrennung von Proteinen erfolgte in einem SDS-Polyacrylamidgel mit Harnstoff nach LAEMMLI (1970). Es wurde ein 14%iges (w/v) Trenngel verwendet. Die Proteinproben wurden 1:1 mit dem SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 10 min denaturiert (TS-100 Thermo-Shaker, Peqlab, Erlangen). Die Auftrennung erfolgte bei 20-30 mA bei Raumtemperatur, da Harnstoff bei Temperaturen unter 15 °C auskristallisieren kann. Es wurden Multigel-Long-Gele mit einer Größe von 120 x 125 x 1 mm (Biometra, Göttingen) benutzt. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde der Marker „Prestained-Protein-Ladder“ (10-180 kD, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

	Trenngel (14 %) (33 ml)	Sammelgel (6 %) (15 ml)
Tris 1,5 M, pH 8,8	7,6 ml	-
Tris 1 M, pH 6,8	-	1,87 ml
Harnstoff	11,9 g	5,38 g
Acrylamid/Bis (30%, 0,8%)	15,5 ml	2,98 ml
SDS (20%)	660 µl	300 µl
H₂O	249 µl	5,82 ml
TEMED	11,2 µl	15 µl
10 % APS	74,8 µl	75 µl

10 x Puffer nach Laemmli (1970): 0,25 M Tris (pH 6,8)
1,92 M Glycin
1 % (w/v) SDS

SDS-Probenpuffer: 100 mM Tris (pH 6,8)
20 mM DTT
20 % (w/v) Glycerin
10 % (w/v) SDS
0,04 % (w/v) Bromphenolblau

4.8.14 Silberfärbung von Proteinen im Gel

In einem Polyacrylamidgel aufgetrennte Proteine können durch eine Silberfärbung nachgewiesen werden. Dabei binden Silberionen an anionische Aminosäurereste (Asparaginsäure, Glutaminsäure und Cystein) und werden anschließend reduziert. Die Nachweisgrenze liegt bei unter 10 ng/Bande. Basierend auf der Methode nach BLUM ET AL. (1987) wurde das Gel für mindestens 1,5 h in Fixierlösung geschwenkt, so dass die Proteine im Gel denaturierten und dadurch fixiert wurden. Darauf folgten zwei Waschschrte in 20 % (v/v) Ethanol bzw. H₂O für je 15 min. Durch Zugabe der Thiosulfatlösung für 90 s wurden die Proteine reduziert. Gleichzeitig führt das Thiosulfat zu einer Verringerung des Hintergrundes, indem es unspezifische Silberanlagerungen verhindert. Nach zwei kurzen Waschschrten für je 20 s in H₂O wurde das Gel für 30 min in der Silbernitratlösung inkubiert. Es folgten zwei kurze Waschschrte für je 10 s in H₂O. Durch Zugabe des Entwicklers wurden die gebundenen Silberionen durch Formaldehyd zu Silberatomen reduziert, was zur Anfärbung der Proteine führt. Reichte die Intensität der Proteinfärbung aus, wurde das gefärbte Gel für 1 min in Stopplösung überführt und anschließend in H₂O aufbewahrt.

Fixierlösung: 30 % (v/v) EtOH, 10 % (v/v) Essigsäure

Thiosulfatlösung: 200 mg/l Na₂S₂O₃ * 5 H₂O

Silbernitratlösung: 2 g/l AgNO₃

Entwickler: 30 g/l Na₂CO₃, 700 µl/l Formaldehyd, 10 mg/l Na₂S₂O₃ * 5 H₂O

Stopplösung: 50 g/l Tris, 25 ml/l Essigsäure

4.8.15 Western-Blot

Die nach Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden auf einer Nitrocellulosemembran (Nitrocellulose Transfer Membrane, Porengröße 0,1 µm, Whatman GmbH, Dassel) immobilisiert. Dafür wurden pro Gel sechs Whatman Filterpapiere (Schleicher und Schuell, Dassel) sowie die Membran auf die Größe des zu blottenden Gels zurecht-geschnitten. Die Filterpapiere, die Membran und das Gel wurden kurz im Transferpuffer äquilibriert. Dann wurden auf die Anodenplatte der Blottapparatur (Fast Blot B34, Biometra, Göttingen) drei Lagen Filterpapier, dann die Membran und anschließend das Polyacrylamidgel sowie – der Kathode zugewandt – wieder drei Lagen Filterpapier geschichtet. Für den Proteintransfer wurde für 30 Minuten eine Stromstärke von 0,8 mA/cm² angelegt. Nach Immobilisierung der Proteine wurde die Membran kurz in TBS und anschließend zur Blockierung unspezifischer Bindestellen in Blockierungslösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Reste der Blockierungslösung wurden durch zweimaliges Waschen à 5 min mit TTBS entfernt. Der Primärantikörper (Tabelle 5), gelöst in TTBS mit 1 % Blocking-Reagenz, wurde über Nacht zu der Membran gegeben. Es folgten 4 Waschschrte à 5 min mit TTBS. Der Nachweis des primären Antikörpers und somit des entsprechenden Proteins erfolgte mit Hilfe eines Sekundärantikörpers, an dem eine Peroxidase gekoppelt ist (Anti Rabbit IgG horseradish peroxidase linked whole antibody, Amersham, Freiburg). Die Membran wurde für zwei Stunden mit dem Sekundärantikörper inkubiert und wieder gewaschen (4x 5 min mit TTBS, 2x 5 min mit TBS). Anschließend erfolgte der Nachweis des Protein-Antikörper-Komplexes mit Hilfe einer ECL-Substratlösung (*enhanced chemiluminescence*, Lösung I und II zu gleichen Teilen gemischt), die für 5 min auf die Membran gegeben wurde. Die Membran wurde in eine Folie gelegt, eingeschweißt und die Peroxidaseaktivität durch Auflegen eines Films (Hyperfilm ECL High performance chemiluminescence film, Amersham, Freiburg) detektiert. Der belichtete Film wurde in Entwickler gelegt, bis deutlich erkennbare Banden erschienen, kurz gewässert und dann für 5 min fixiert.

Tabelle 5: Liste der für Immunoblots verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
NdhK	1:5 000	anti-rabbit	1:20 000
NdhJ	1:500 o. 1:1 000	anti-rabbit	„
CP47	1:1 000	anti-rabbit	„
Nrta	1:1 000	anti-rabbit	„

Transferpuffer:	2,93 g/l Glycin, 5,81 g/l Tris, 0,375 g/l SDS, 20 % (v/v) Methanol
5x TBS:	146,12 g/l NaCl, 12,12 g/l Tris (pH 7,5)
1x TTBS:	1x TBS mit 0,05 % (v/v) Tween-20
Blockierungslösung:	1x TBS mit 5 % (w/v) Blockingreagenz (Blotting grade blocker nonfat dry milk, Biorad München)
Detektionslösung I:	2,6 µM Luminol (3-Aminophthalhydrazid), 400 µM p-Coumarsiure, 100 mM Tris (pH 8,5)
Detektionslösung II:	0,075 % (v/v) H ₂ O ₂ , 100 mM Tris (pH 8,5)

4.8.16 Strippen einer Western-Blot-Membran

Wurde die Membran für weitere Western-Blot-Analysen verwendet, mussten nicht nur die Detektionslösungen, sondern auch die gebundenen primären und sekundären Antikörper von der Membran entfernt werden. Dafür wurde die Membran für maximal 8 min in Stripplösung geschwenkt, anschließend kurz in 1x TBS äquilibriert und neu mit Blockinglösung behandelt.

Stripplösung: 0,4 M NaOH, 0,1 % SDS

4.9. Elektronenmikroskopie und Immungold-Markierung

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *Synechocystis*-Zellen wurde das Transmissions-Elektronenmikroskop (Philips 208 S, Hamburg) der Zentralen Mikroskopie verwendet. Zellen von *Synechocystis* Wildtyp und verschiedenen NDH-1-Mutanten (D1, D2, D1D2, F1 und B) wurden als Auftragsarbeit von der Zentralen Mikroskopie (ZM) HPF-fixiert (high pressure fixation) und in Lowicryl HM20 eingebettet. Die davon angefertigten Ultradünnschnitte wurden auf Nickel-Grids gelegt. Für die Immungold-Markierung, die vom Prinzip einem Western-Blot (siehe 4.8.15) entspricht, wurden die Grids mit der beschichteten Seite nach unten auf Tropfen der folgenden Lösungen gelegt, die auf Parafilm aufgebracht wurden: Zuerst wurden die Grids für 90 min bei RT auf Blockierungslösung gelegt. Anschließend wurden sie über Nacht mit der Primärantikörperlösung (NDH-K-Antikörper 1:10 in 1x TTBS) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Grids 6 x für 5 min in 1x TTBS gewaschen und 1x 5min erneut in Blockierungslösung gelegt. Als Sekundärantikörper wurde ein Anti-Rabbit-Antikörper verwendet, an den 15 nm große Goldpartikel gebunden waren. Er wurde 1:50 verdünnt in Blockinglösung für 60 min eingesetzt,

danach wurde 6 x 5 min mit TTBS gewaschen und anschließend einmal mit H₂O gespült. Es folgte eine Nachkontrastierung mit Uranylacetat (5 % in H₂O) für 10 min.

Blockierungslösung: 1x TTBS mit 0,1 % BSA, sterilfiltriert

4.10 Bioinformatische Untersuchungen

Für die Berechnung der Stammbäume der ndhD- und ndhF-Untereinheiten wurden zunächst die entsprechenden Sequenzen der cynobakteriellen Untereinheiten aus der Cyanobase und die der plastidären Untereinheiten aus der Datenbank der komplett sequenzierten Plastome bei NCBI zusammengetragen und mit ClustalW ein Alignment durchgeführt. Inhomogene Bereiche, die viele Lücken enthielten, sowie Anfang und Ende der Sequenzen wurden in Bioedit manuell beschnitten. Die Berechnung der Stammbäume erfolgte mit der PHYLIP-Programmsammlung. Durch Bootstrapping wurden mit dem Programm Seqboot je 1000 Bootstraps erstellt, anschließend wurden die Distanzen mit Protdist berechnet. Mit Proml wurde die Verwandtschaft anhand der Maximum-Likelihood-Methode (ML) für 100 Bootstraps berechnet und mit Protpars anhand der Maximum-Parsimony-Methode (MP) für 1000 Bootstraps. Das Programm Fitch errechnet mittels des Fitch-Margoliash-Algorithmus (FM, Fitch und Margoliash 1967) die Distanzen (für 1000 Bootstraps). Als Outgroup fungierten NdhD-Untereinheiten von *Synechocystis* PCC 6803 und *Nostoc punctiforme* PCC 73102 im NdhF-Stammbaum und NdhF-Untereinheiten von *Synechocystis* PCC 6803 und *Nostoc punctiforme* im NdhD-Stammbaum. Für den NdhD-Stammbaum der verschiedenen Paraloge des NdhD-Gens wurden zusätzlich neben dem NdhB von *Synechocystis* die ähnlichen Transporter MrpA und MrpD von *Bacillus subtilis* und EchA von *Desulfovibrio gigas* als Outgroup verwendet. Die graphische Darstellung der Stammbäume erfolgte mit dem Program ATV und dessen Nachfolger Archeopteryx.

Verwendete Datenbanken:

Cyanobase (NAKAMURA ET AL. 1998): <http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/>

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Verwendete Programme:

Archeopteryx 0.957 beta: <http://www.phylosoft.org/archaeopteryx/>

ATV (A tree viewer 1.92.1, ZMASEK UND EDDY 2001):

<http://www.softpedia.com/developer/Washington-University-School-of-Medicine-25191.html>

Blast (ALTSCHUL ET AL. 1997): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>

Bioedit 7.0.9 (HALL 1999): <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>

ClustalW (THOMPSON ET AL. 1994): <http://align.genome.jp/>

PHYLP 3.63 (Phylogeny Inference Package, FELSENSTEIN 2005):

<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/getme.html>

5 Ergebnisse

5.1 Lokalisierungsstudien zum NDH-1-Komplex

Synechocystis besitzt wie fast alle Cyanobakterien ein Thylakoidmembransystem, in dem die an der Photosynthese beteiligten Proteinkomplexe verankert sind. Auch die Respiration findet hauptsächlich dort statt. In der Plasmamembran laufen nur wenige Elektronentransportreaktionen ab (Schultze et al. 2009). Sind jedoch keine Thylakoidmembranen vorhanden, wie z.B. in dem Cyanobakterium *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, so befinden sich die Elektronentransportketten der Atmung und Photosynthese in der Plasmamembran. Neben dem Fehlen der Thylakoidmembranen ist in dem Genom von *Gloeobacter* das Gen für die NDH-1-Untereinheit NdhD2 nicht vorhanden. Ob diese beiden Vorgänge direkt miteinander verbunden sind und im Rückschluss die Untereinheit NdhD2 für den NDH-1-Komplex in der Thylakoidmembran benötigt wird, soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

5.1.1 Membranisolierung und Charakterisierung

Für die Lokalisierungsstudien sind nach einer Isolierung von Membranen die Auftrennung in Plasma-, Thylakoid- und äußere Membran notwendig. Hierfür gibt es in der Literatur zwei beschriebene Systeme. Bei beiden werden die Zellen nach Inkubation in Lysispuffer durch dreimaliges Passieren durch die French-Press bei 1200 psi aufgebrochen. Anschließend werden die Membranen entweder durch Dichtegradientenzentrifugation (Flotieren in einem Saccharosegradienten) in die drei verschiedenen Membranen getrennt (MURATA UND OMATA 1983) oder die Membranen werden zunächst in einem wässrigen Zwei-Phasen-System mit PEG und Dextran in zwei Fraktionen geteilt. Die daraus gewonnenen Membranen werden dann in einen Saccharosegradienten eingeschichtet (NORLING ET AL. 1994, 1998). Die Ausbeute an Plasmamembran ist bei dieser Methode aber sehr gering, weshalb für die folgenden Untersuchungen die Methode nach MURATA UND OMATA (1983) verwendet wurde.

Zum Nachweis der Reinheit der Membranen bietet sich ein Western Blot mit Antikörpern gegen Proteine an, für die die Lokalisierung aus der Literatur bekannt ist. Für die äußere Membran eignet sich dafür das synToc75 (*sll1227*), ein Membranprotein, das homolog zum Toc75 (Translocon of the outer chloroplast membrane, 75 kDa) aus dem Protein-Import-Apparat der äußeren Chloroplastenmembran ist (HUANG ET AL. 2004). Ein spezifisches Protein für die Plasmamembran ist das NrtA (*sll1450*), eine Untereinheit des hochaffinen Nitrat-ABC-Transporters (nitrate transport protein). Zur Identifizierung der Thylakoidmembranen eignen sich Proteine aus dem Photosyntheseapparat, wie z.B. das CP43 (*sll0851*, PsbC) oder CP47

(*slr0906*, PsbB). Dabei ist aber generell zu beachten, dass Teile der Photosysteme bereits in der Plasmamembran zusammengesetzt werden und erst dann in die Thylakoidmembran überführt werden (ZAK ET AL. 2001).

Vom Wildtyp und den NDH-1-Mutanten D1, D2, D12, F1, bei denen eine oder mehrere NDH-1-Untereinheiten ausgeschaltet sind, wurden Gesamtmembranen gewonnen (siehe 4.8.1), die durch Dichtegradientenzentrifugation nach Murata und Omata (1983) in die Plasma-, Thylakoid- und äußere Membran getrennt wurden (siehe 4.8.2). Der Proteingehalt der verschiedenen Fraktionen wurde nach PETERSEN ET AL. (1977) ermittelt (siehe 4.5.3). Die Trennung von Thylakoid- und Plasmamembran kann optisch nachgewiesen werden. Die chlorophyllhaltigen Proteinkomplexe färben die Thylakoidmembranfraktion dunkelgrün, während die Plasmamembran durch Carotinoide eine orange Färbung erhält. Im Zweikanal-Absorptionsphotometer wurden von methanolischen Extrakten beider Fraktionen ein Spektrum (200 nm – 800 nm) aufgenommen (Abbildung 13).

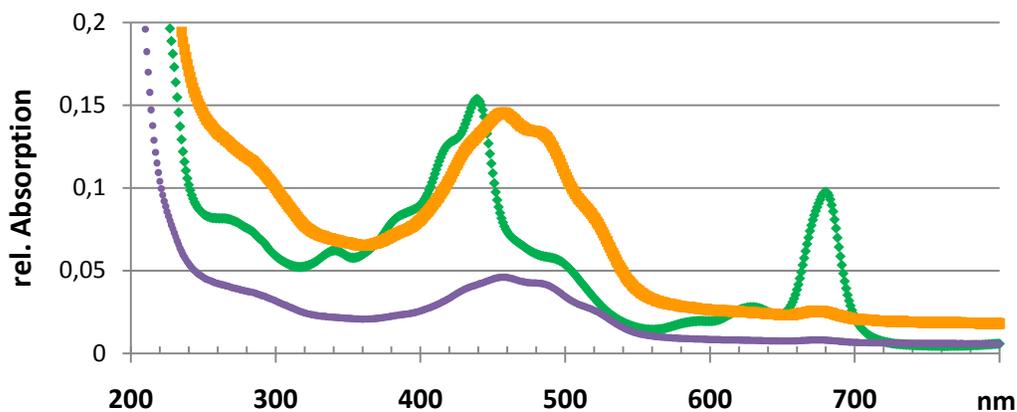


Abbildung 13: Absorptionsspektrum (200 – 800 nm) von isolierter Thylakoidmembran (grün) und Plasmamembran (orange) von *Synechocystis* WT. Zusätzlich dargestellt ist die Kurve der Plasmamembran, normiert auf 790 nm der Thylakoidmembran (violett).

In der Thylakoidmembranfraktion sind die beiden Absorptionsmaxima von freiem Chlorophyll a deutlich sichtbar (bei ca. 436 nm und bei 678 nm), der Sattel bei 490 nm wird durch die Absorption von Carotinoiden hervorgerufen. In der Plasmamembranfraktion treten keine der Absorptionsmaxima von Chlorophyll auf, nur der von den Carotinoiden bei 490 nm (AGARWAL ET AL. 2010). Nach Auftrennung von Membranproteinen in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel konnte durch Western Blot (siehe 4.8.15) die Reinheit der erhaltenen Membranen überprüft werden (Abbildung 14). Von der Plasmamembranfraktion (PM) wurde dabei eine größere Proteinmenge aufgetragen, da die Silberfärbung von aufgetrennten Membranproteinen auf einen geringeren Proteinanteil in der PM hindeutet (Abbildung 15).

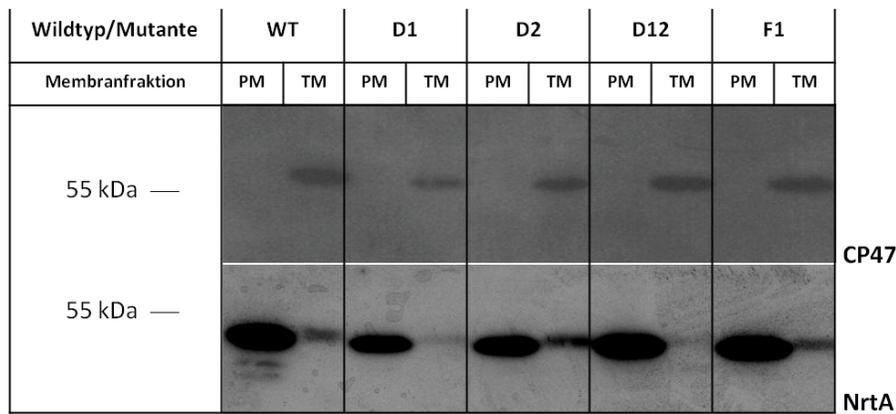


Abbildung 14: Immunoblots zur Kontrolle der Reinheit von isolierten Thylakoid (TM)- und Plasmamembranfraktionen (PM) von *Synechocystis* WT und den NDH-1-Mutanten D1, D2, D12 und F1 nach Auftrennung durch SDS-PAGE. Für den anti-NrtA-Blot wurden Membranen entsprechend 20 µg Protein (Plasmamembran) und 2,5 µg Protein (Thylakoidmembran) aufgetragen, für den anti-CP47-Blot jeweils die vierfache Menge.

Der Western-Blot zeigt, dass in den Plasmamembranfraktionen trotz größerer aufgetragenen Mengen kein CP47-Protein nachgewiesen werden kann. In den Thylakoidmembranfraktionen ist aber NrtA-Protein aus der Plasmamembran vorhanden. Dies spricht für eine leichte Verunreinigung. Der Grad der Verunreinigungen ist bei den verschiedenen Mutanten unterschiedlich, aufgrund der schwachen Signalstärke im Western-Blot aber als gering einzuschätzen. Gleiche Mengen an Membranproteinen der beiden Fraktionen wurden in einem SDS-Gel (siehe 4.8.13) aufgetrennt und anschließend mit einer Silberfärbung angefärbt (siehe 4.8.14). Das klar voneinander unterscheidbare Bandenmuster verdeutlicht ebenfalls eine Trennung der beiden Membranfraktionen (Abbildung 15).



Abbildung 15: Silbergefärbte SDS-Page von aufgetrennten Membranproteinen (jeweils 10 µg) aus Thylakoidmembranen (TM) und Plasmamembranen (PM) von *Synechocystis* WT und NDH-Mutanten. In der linken Spur befindet sich der Proteinmarker.

Diese Methode kann auch zum Abschätzen einer gleichmäßigen Beladung innerhalb der Fraktionen genutzt werden. Ein Vergleich von verschiedenen Fraktionen gestaltet sich schwierig, da die Intensitäten unterschiedlicher Banden miteinander verglichen werden müssen (siehe oben). Zur Quantifizierung ist die Silberfärbung – wie andere Proteinbestimmungsmethoden auch – nicht geeignet, da die Färbungen meist mit bestimmten Aminosäuren reagieren und somit von der Proteinzusammensetzung abhängen. Um die Membranfraktionen auf das Vorhandensein von NDH-1-Komplexen zu untersuchen, wurden Membranproteine mit dem Detergenz n-Dodecylmaltosid extrahiert (siehe 4.8.4) und auf ein BN-Gel aufgetragen (siehe 4.8.5). Nach der elektrophoretischen Trennung erfolgte ein Western Blot, bei dem zur Proteindetektion ein Antikörper gegen die NdhK-Untereinheit verwendet wurde (Abbildung 16). In den Spuren der Kontrolle (ndhB-Mutante) sind weder in der Plasmamembran noch in der Thylakoidmembran Banden zu erkennen. Diese Mutante besitzt keinen intakten NDH-1-Komplex (OGAWA 1991), durch das Fehlen der NdhB-Untereinheit ist die Assemblierung der membranständigen Untereinheiten gestört (Abbildung 16). Die in der ndhB-Mutante noch vorhandenen NDH-1S-Komplexe sind mit dem verwendeten NdhK-Antikörper nicht nachweisbar (ZHANG ET AL. 2004), denn diese Untereinheit befindet sich im peripheren Arm der NDH-1-Komplexe NDH-1M und NDH-1L.

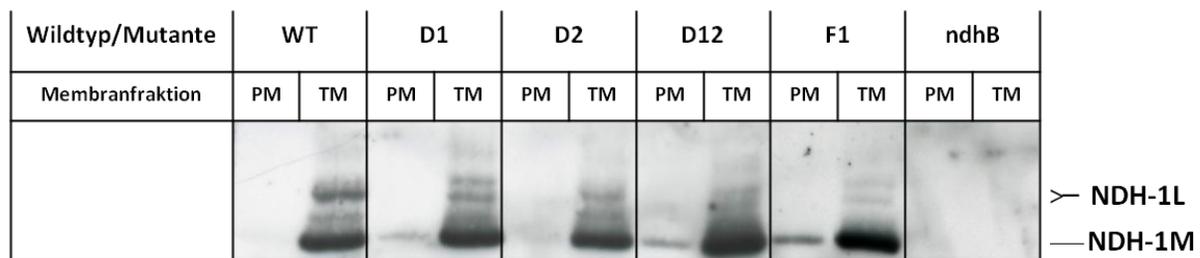


Abbildung 16: Western-Blot von Plasma- (PM) und Thylakoidmembran (TM) von *Synechocystis* WT und verschiedenen NDH-1-Mutanten. Auf das BN-Gel wurden eine Menge entsprechend 6 µg Chlorophyll (ca. 50 µg Protein) aufgetragen. Für die Immunreaktion wurde der Primärantikörper gegen NdhK eingesetzt, nachgewiesen werden NDH-1M und mehrere NDH-1L-Komplexe.

In den Spuren der Plasmamembran sind beim WT und den NDH-1-Mutanten (D1, D2, D12, F1 und ndhB) keine bis sehr schwache Signale zu erkennen. Diese befinden sich auf der Höhe, die dem NDH-1M-Komplex entspricht (HERRANEN ET AL. 2004, ZHANG ET AL. 2004). In der Thylakoidmembran ist jeweils eine starke Bande, die dem NDH-1M-Komplex entspricht, zu erkennen. Oberhalb dieser sind eine bis mehrere Banden zu finden. Diese Banden repräsentieren noch näher zu charakterisierenden NDH-1L-Komplexe (ZHANG ET AL. 2004).

5.1.2 Lokalisierung mittels Immungold-Markierung

Eine weitere Methode, die subzelluläre Verteilung von Proteinen zu untersuchen, ist die Immungoldmarkierung. Dabei werden Ultra-Dünnschnitte mit spezifischen Antikörpern inkubiert, gegen die sekundäre Antikörper eingesetzt werden, die mit Goldpartikeln assoziiert sind. Im Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) sind diese elektronendichten Partikel leicht zu identifizieren. Um den NDH-1-Komplex zu lokalisieren, wurden Ultra-Dünnschnitte von *Synechocystis* WT, der *ndhB*-Mutante als Kontrolle (siehe 5.1.1) und verschiedenen *ndh*-Mutanten (D1, D2, D12 und F1) untersucht. Dazu wurden Zellen in Lowicryl HM20 eingebettet und im Ultramikrotom geschnitten. Diese Schnitte wurden auf Nickel-Grids gelegt und anschließend mit dem Antikörper gegen NdhK immundekoriert. Durch Verwendung von Sekundäntikörpern, die den Primäntikörper binden und gleichzeitig mit einem Goldpartikel assoziiert sind, kann im Transelektronenmikroskop ein Nachweis der NDH-1-Untereinheit NdhK erfolgen (Abbildung 17). Mit dem NdhK-Primäntikörper ist die Detektion des NDH-1M und NDH-1L möglich (Abbildung 16). Von den gefertigten Bildern vom WT und den Mutanten (D1, D2, D12, F1 und *ndhB*) wurden zur quantitativen Auswertung die Flächenanteile der jeweiligen Membransysteme (PM und TM) und des Cytosols bestimmt (Tabelle 6).

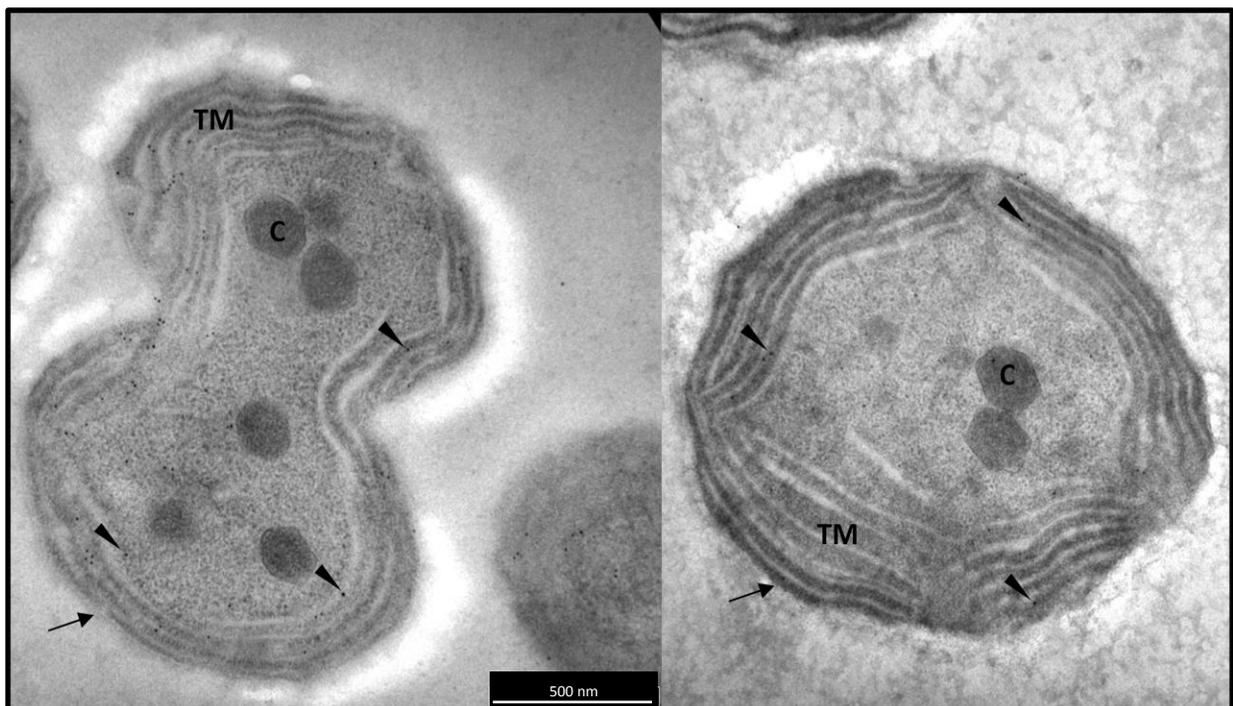


Abbildung 17: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Synechocystis* (WT links, im Stadium der Zellteilung, und *ndhB*-Mutante rechts). Zu erkennen sind die Goldpartikel (schwarze Pfeilspitzen) der Immungoldfärbung (Primäntikörper gegen NDH-K). Neben den Thylakoidmembranen (TM) sind die Plasmamembran (schwarzer Pfeil) und Carboxysomen (C) zu sehen (Maßstab 500 nm). Fotos: In Zusammenarbeit mit der ZM.

Hierzu wurde das Programm DatInf Measure (DatInf GmbH, Tübingen) verwendet. Mit diesem wurden die zusammenhängenden Bereiche eingegrenzt, denen ein Goldpartikel zugesprochen wurde. Nach Auswertung aller Fotos (n=43) ergibt sich für den Bereich des Thylakoidmembransystems ein prozentualer Anteil von ca. 50 %. Das Cytosol nimmt ca. 41 % der Fläche ein, die Plasmamembran bzw. vielmehr der Bereich, der ihr bei der Markierung zugesprochen wird, etwas mehr als 9 %.

Tabelle 6: Mittlerer prozentualer Anteil der Flächen des Cytosols (Cyt) und der Membransysteme (TM = Thylakoidmembran, PM = Plasmamembran) von Dünnschnitten von *Synechocystis*-Zellen (WT und NDH-1-Mutanten, n=43).

	TM	PM	Cyt
Fläche in %	50,6 ± 9,5	9,3 ± 0,8	41,1 ± 8,3

Anschließend wurde die Anzahl der Goldpartikel pro Zelle (Tabelle 7) und pro Flächenteilbereich (Abbildung 18) ausgezählt, wozu Helligkeit und Kontrast des jeweiligen Bildes angepasst wurden. Die Zahl der Goldpartikel pro Zellenquerschnitt schwankt beim WT und den NDH-1-Mutanten D2, D12 und F1 um den WT-Wert von 46, bei der D1-Mutante ist dieser Wert erhöht (70) und bei der Negativkontrolle *ndhB* beträgt er nur ca. 15. Dass bei dieser Kontrolle trotzdem Goldmarkierungen zu finden sind, kann durch unspezifische Anlagerungen des primären oder sekundären Antikörpers bedingt sein, die an Membranen binden. Unspezifische Anlagerungen der Antikörper auf der Dünnschnittmatrix wurden nicht beobachtet.

Tabelle 7: Gesamtzahl der Goldpartikel aus der Immungoldfärbung (primärer NdhK-Antikörper) von Dünnschnitten von *Synechocystis*-Zellen (WT und verschiedene NDH-1-Mutanten) unter Angabe der ausgewerteten markierten Zellen (n).

	WT (n=9)	D1 (n=8)	D2 (n=6)	D12 (n=7)	F1 (n=6)	<i>ndhB</i> (n=7)
# Goldpartikel	46,0 ± 14,5	70,6 ± 14,6	43,3 ± 6,8	52,1 ± 11,3	52,0 ± 10,4	14,6 ± 8,8

Die Verteilung der Goldmarkierungen auf die jeweiligen Fraktionen zeigt, dass bei den Dünnschnitten vom Wildtyp und von den *ndhD*-Mutanten und der *ndhF1*-Mutante pro Zelle 35 bis 40 Goldpartikel im Bereich der Thylakoidmembran (TM) zu finden sind (Abbildung 18), nur bei der D1-Mutante ist die Anzahl mit 57 erhöht. In der *ndhB*-Mutante, die als Kontrolle dient, ist die Zahl um den Faktor 4 geringer. Auch in der Plasmamembran und im Cytosol sind in der *ndhB*-Mutante deutlich weniger Goldpartikel zu erkennen (Abbildung 18).

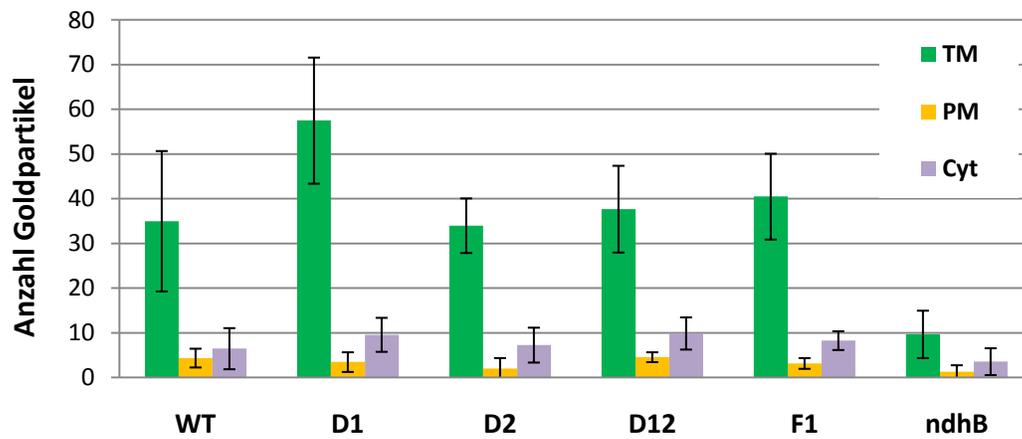


Abbildung 18: Anzahl der Goldpartikel (pro Zelle) aus der Immungoldfärbung (primärer NdhK-Antikörper) von Dünnschnitten von *Synechocystis*-Zellen (WT und verschiedene NDH-1-Mutanten) in den Fraktionen Thylakoidmembran (TM), Plasmamembran (PM) und Cytosol (Cyt).

Die prozentuale Verteilung der Goldpartikel auf die drei Fraktionen (TM, PM und Cyt) weist bei allen untersuchten Mutanten ein ähnliches Muster wie beim Wildtyp auf (Abbildung 19), ebenso in der Kontrolle (ndhB). So liegen ca. 70 % der vorhandenen Goldmarkierungen in den Thylakoiden.

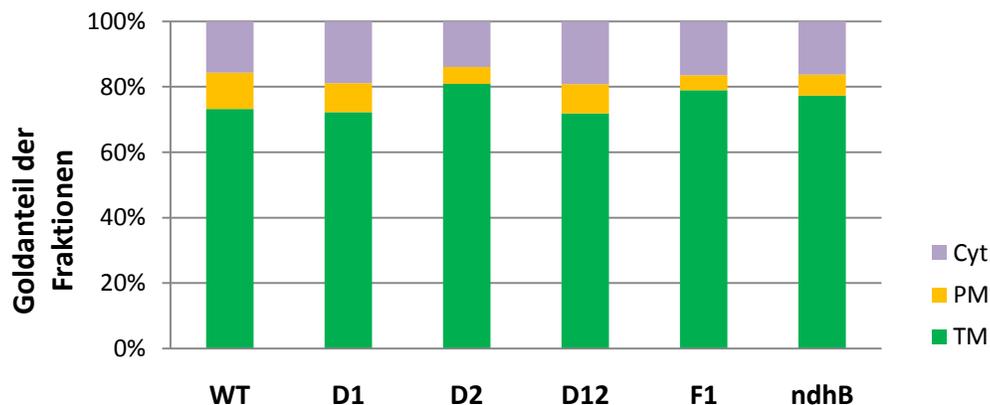


Abbildung 19: Immungoldfärbung (NdhK-Antikörper) von Dünnschnitten von WT und NDH-1-Mutanten von *Synechocystis*: Durchschnittliche prozentuale Verteilung der Goldpartikel auf die Fraktionen Thylakoidmembran (TM), Plasmamembran (PM) und Cytosol (Cyt).

Um einschätzen zu können, ob die häufigere Markierung spezifisch für die Thylakoidmembranen ist oder nur der größeren Fläche pro Zellquerschnitt geschuldet ist, wurde zusätzlich die Anzahl der Goldmarkierungen – bezogen auf den prozentualen Anteil der jeweiligen Flächen – ausgerechnet und grafisch dargestellt (Abbildung 20). Trotz der geringen Anzahl von Goldpartikeln an der Plasmamembran ist aufgrund der kleinen Fläche, die diese einnimmt, der Wert der Goldpartikel pro PM-Fläche ähnlich hoch wie der der Thylakoidmembran.

Der Wert für das Cytoplasma ist beim Wildtyp und den Mutanten ähnlich gering. Die statistische Auswertung anhand des Student-Newman-Keuls-Tests zeigt, dass die Zahl der Goldpartikel in der Thylakoidmembran der *ndhB*-Mutante signifikant geringer ist als in denen der anderen untersuchten Kulturen. In der D1-Mutante ist der Wert signifikant größer als bei den übrigen.

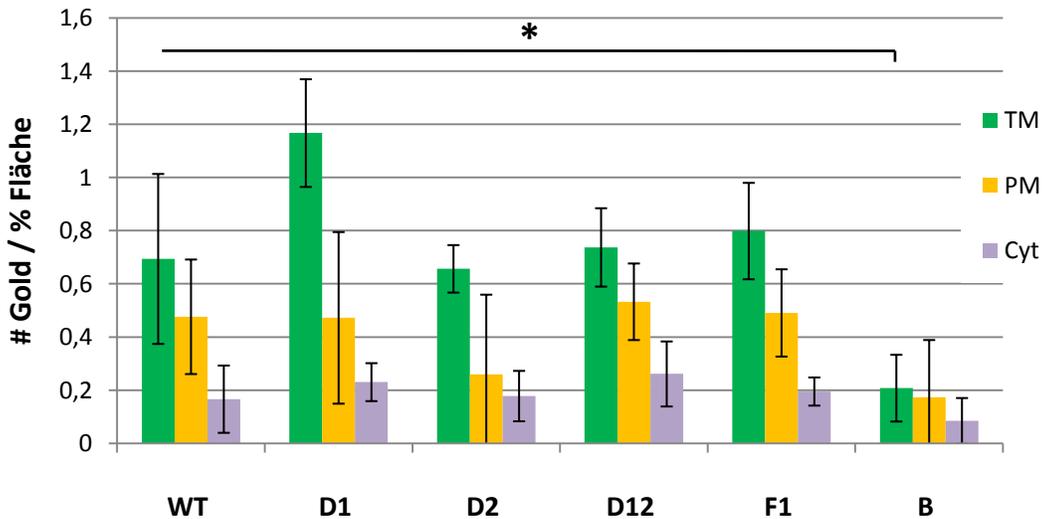


Abbildung 20: Zahl der Goldpartikel pro Flächeneinheit (Thylakoidmembran TM, Plasmamembran PM und Cytosol Cyt) bei Immungoldmarkierten Dünnschnitten von *Synechocystis*-Zellen (WT und NDH-1-Mutanten, NdhK-Antikörper). Dargestellt ist der Mittelwert aus n Querschnitten (siehe Tabelle 7), *: $p < 0.01$.

Bei WT und den Mutanten D2, D12 und F1 ist kein signifikanter Unterschied in der Thylakoidmembran feststellbar. Für die Plasmamembran und das Cytoplasma lassen sich keine statistischen Aussagen treffen, da die Unterschiede untereinander zu gering sind, was auch auf den hohen Standardabweichungen beruht. Ein Vergleich Thylakoidmembran zu Plasmamembran ergibt signifikante Unterschiede nur bei den Mutanten D1 und D2. Die Immungold-Untersuchungen ergeben kein deutliches Bild der Verteilung des NDH-1-Komplexes. Es zeigt sich, dass Membranen – Plasma- wie Thylakoidmembran – generell mit Goldpartikeln markiert werden, dies ist auch bei der Negativkontrolle *ndhB* der Fall.

Mit der durchgeführten Lokalisierungsstudie konnte gezeigt werden, dass bei der gewählten Methode der Membrantrennung eine saubere Plasmamembranfraktion erhalten werden konnte (siehe 5.1.1). Die Thylakoidmembranfraktion ist jedoch leicht mit Plasmamembran verunreinigt, da dort das NrtA-Protein nachgewiesen wurde (Abbildung 14). Das Vorkommen des NDH-1M-Komplexes in einigen Plasmamembranfraktionen (Abbildung 16) lässt sich folglich nicht mit dieser Verunreinigung erklären. Dies steht im Einklang mit der Immungoldmarkierung. Mit dieser konnte ebenfalls in der Plasmamembran die NdhK-Untereinheit nachgewiesen werden (Abbildung 20), was für das Vorhandensein des NDH-1M oder NDH-1L spricht.

5.2 Herstellung und Charakterisierung von NdhD-Mutanten

Im Genom von *Synechocystis* und vieler anderer Cyanobakterien sind von der NdhD-Untereinheit 4-6 Homologe (NdhD1 – NdhD6) kodiert. Die NdhD5 und NdhD6 fallen aufgrund der Übereinstimmung der Aminosäuresequenz heraus, was nachfolgend durch Stammbaumanalysen gezeigt wird (siehe 5.6.1). Die Funktionsweise der NdhD-Untereinheiten innerhalb des NDH-1-Komplexes wird dieselbe sein, allerdings werden für bestimmte physiologische Funktionen (Respiration, CO₂-Fixierung) NDH-1-Komplexe mit unterschiedlicher Zusammensetzung der Untereinheiten assembliert (siehe Einleitung). Für eine genauere Untersuchung der verschiedenen NdhD-Untereinheiten wurden *Synechocystis*-Mutanten verwendet, deren *ndhD*-Gene einzeln und in Kombination ausgeschaltet wurden, um sie in physiologischen Untersuchungen charakterisieren zu können. Bei den Einzelmutanten (D1, D2, D3 und D4), Doppelmутanten (D12 und D34) und der Dreifachmutante (D134) konnte auf bereits charakterisierte Mutanten aus der Kultursammlung der AG Schulz zurückgegriffen werden oder wurde freundlicherweise aus einer weiteren Mutantensammlung (Dr. T. Ogawa, Professor Emeritus der Nagoya Universität) zur Verfügung gestellt. Zwei zusätzliche Mutanten wurden für die Untersuchungen noch benötigt und wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt: die Dreifachmutante D234 und die Vierfachmutante D1234. Mit der D234-Mutante wurde die Untersuchung der Funktion der NdhD1-Untereinheit ermöglicht. Durch das Ausschalten der Untereinheiten NdhD2, NdhD3 und NdhD4 wurde eine mögliche Komplementation untereinander ausgeschlossen.

5.2.1 Herstellung der Mutante D234 und D1234

Die Mutante D234 wurde ausgehend von den Mutanten D2 und D34 hergestellt. Dazu wurde mittels PCR (siehe 4.4.5) aus der genomischen DNA der D2-Mutante (siehe 4.4.2) der Abschnitt im Bereich des *ndhD2* amplifiziert, der auch die Resistenzkassette für Chloramphenicol beinhaltet. Diese wurde bei der Herstellung der Deletionsmutante D2 eingebracht. Der amplifizierte DNA-Abschnitt wurde anschließend in den TOPO[®]-Vektor kloniert (siehe 4.4.8), mit dem wiederum *E.coli*-Zellen transformiert wurden (siehe 4.4.9). Nach erfolgreicher Selektion auf LB-Platten wurde von einer positiven *E. coli*-Kolonie eine Übernachtskultur hergestellt und anschließend die Plasmid-DNA isoliert (siehe 4.4.10). Diese DNA wurde zur Transformation von *Synechocystis*-Zellen verwendet, als Empfänger diente die D34-Mutante. Zur Kontrolle der Segregation der Transformanten wurde aus mehreren Kolonien genomische DNA isoliert (siehe 4.4.2) und eine PCR mit denselben Primern, die schon zur Mutantenherstellung verwendet wurden, durchgeführt (siehe 4.4.5). Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt

(siehe 4.4.3). Mit den verwendeten Primern konnte beim WT und bei drei untersuchten Mutanten jeweils ein Produkt amplifiziert werden (nicht gezeigt). Die Bande in der Spur vom WT befand sich nur leicht unterhalb der Höhe der Banden in den Spuren der Mutanten. Der geringe Größenunterschied des amplifizierten Produkts ist darauf zurückzuführen, dass die eingefügte Resistenzkassette, das Gen Chloramphenicol-Acetyltransferase (*cat*), eine Größe von 659 kb hat, der aus dem *ndhD2* deletierte Bereich jedoch eine Größe von 520 kb aufweist.

Die Herstellung der D1234-Mutante erfolgte auf Basis der D134-Mutante, in die wie schon zur Herstellung der D234-Mutante das Konstrukt eingefügt wurde, das eine Resistenzkassette für Chloramphenicol im *ndhD2* beinhaltet. Zur Kontrolle der Segregation wurde von drei D1234-Kolonien – wie auch für zwei D234-Mutanten – ein Southern-Blot durchgeführt (Abbildung 21). Dazu wurde nach mehrmaligem Überimpfen der Transformanten auf Agarplatten mit Selektionsmedium (siehe 4.3.2) Zellen direkt von den Platten geerntet und genomische DNA aus diesen extrahiert (siehe 4.4.2). Jeweils 100 µg DNA wurden mit dem Restriktionsenzym HindIII verdaut (siehe 4.4.7) und auf ein Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 4.4.3) und ein Southern-Blot durchgeführt (siehe 4.4.12). Die verwendete Sonde war gegen den Abschnitt aus dem *ndhD2* gerichtet, der bei der Herstellung der Mutanten durch die Resistenzkassette ersetzt wurde (siehe 4.4.13).

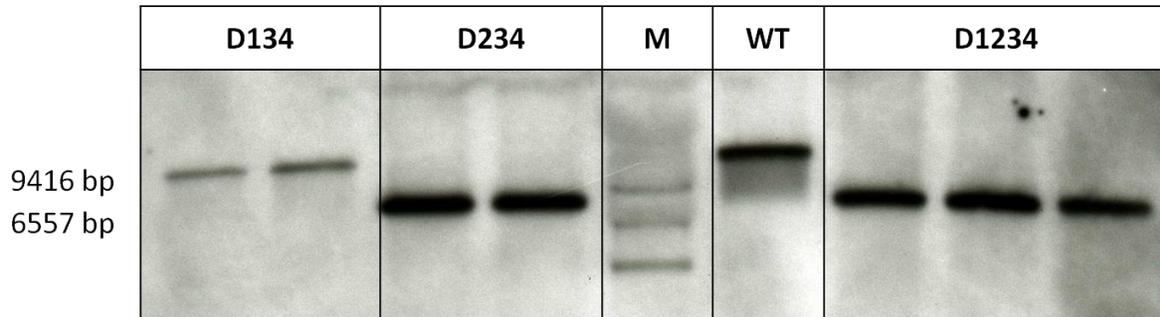


Abbildung 21: Southern-Blot zur Segregationskontrolle der verschiedenen Transformationsansätze der Mutanten von *Synechocystis*, bei denen drei bzw. vier der vier vorhandenen NdhD-Untereinheiten (NdhD1-NdhD4) durch Einfügen einer Resistenzkassette deletiert wurden. Die Hybridisierung wurde mit einer Dig-markierten Sonde, komplementär zu einem Bereich des *ndhD2*, durchgeführt. Aufgetragen wurden jeweils 100 µg DNA, verdaut mit HindIII. *Synechocystis* Wildtyp (WT) zur Kontrolle und DIG-markierter λ-Marker (M) als Größenvergleich.

Bei allen untersuchten Transformanten und dem WT ist jeweils nur eine Bande zu erkennen. Die Bande in der WT-Kontrolle befindet sich auf derselben Höhe wie die der D134-Dreifachmutante, beide enthalten ein unverändertes *ndhD2*-Gen. Die Bande der Dreifachmutanten D234 befindet sich ebenso wie die Bande der D1234-Mutanten auf derselben Höhe, allerdings sind diese Banden deutlich weiter in das Gel hineingelaufen als bei der D134 und beim WT. Das kürzere

DNA-Fragment entsteht durch die HindIII-Schnittstelle in der Resistenzkassette. Auf der Höhe der WT-Bande sind bei der D234 und der Vierfachmutante keine Banden zu erkennen. Dies bedeutet, die Mutanten sind aussegregiert, d.h. in allen Chromosomen-Kopien der polyploiden *Synechocystis*-Zellen (bis zu 12 Kopien, LABARRE ET AL. 1989) ist das *ndhD2*-Gen ausgeschaltet.

5.2.2 Charakterisierung von NDH-1-Mutanten durch Wachstumskurven

Um den Einfluss der verschiedenen NdhD-Untereinheiten auf die Photosynthese und die Respiration zu untersuchen, wurde das Wachstum der beiden neuen Mutanten (siehe 5.2.1) unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Dazu wurden in drei unabhängigen Ansätzen jeweils von jeder zu untersuchenden Kultur drei Kulturröhren mit 250 ml BG-11-Medium (siehe 4.3.2) aus einer Starterkultur angeimpft. Von jeder Kultur wurde zu je einer der drei Röhren zusätzlich 10 mM Glucose zugefügt, um das mixotrophe Wachstum zu untersuchen. Einer weiteren Röhre wurden 10 mM Glucose und 10 μ M DCMU zugefügt, um bei dem mixotropen Wachstum den linearen Elektronentransport der Photosynthese auszuschalten. In der dritten Röhre wuchs die Kultur photoautotroph. Täglich wurde über einen Zeitraum von 11 Tagen die optische Dichte (siehe 4.5.1) ermittelt. Zur Übersicht wurden 8 Tage nach Versuchsbeginn jeweils eine Probe auf eine Multiwell-Platte abgefüllt und eingescannt (Abbildung 22). Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die meisten Kulturen schon in der stationären Phase. In der Kontrolle zeigen alle Kulturen eine gleichmäßige Dichte, nur die Dreifachmutante D134 und die Vierfachmutante D1234 ist nicht so dicht gewachsen. Durch Zugabe von Glucose wurde die Kulturdichte bei den meisten Mutanten gesteigert, nur bei der D12 und der D1234 ist dieser Effekt schwach.

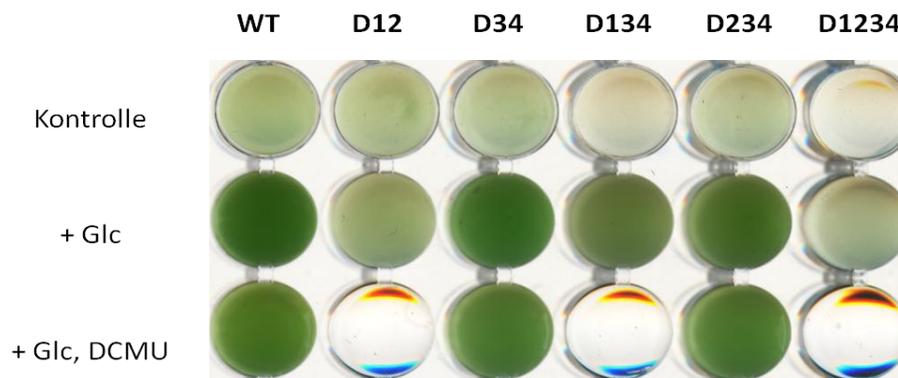


Abbildung 22: Ergebnis der Wachstumsuntersuchung von *Synechocystis* WT und verschiedenen NdhD-Mutanten. Die Kulturen wurden entweder zusätzlich mit 10 mM Glucose (+Glc) oder mit 10 mM Glucose und 10 μ M DCMU angezogen. Die Proben wurden nach 8 Tagen genommen und auf eine Multiwellplatte aufgetragen.

Wird zusätzlich zur Glucose auch DCMU hinzugegeben, sind von den untersuchten Kulturen nur drei in der Lage, zu wachsen: Neben dem WT schafft das nur die D34 und die D234.

Die genauere Betrachtung zeigt, dass sich in normalem BG-11-Medium das Wachstum der meisten NDH-1-Mutanten nicht vom WT unterscheidet (Abbildung 23). Einzig die Vierfachmutante D1234 zeigt ein deutlich verringertes Wachstum.

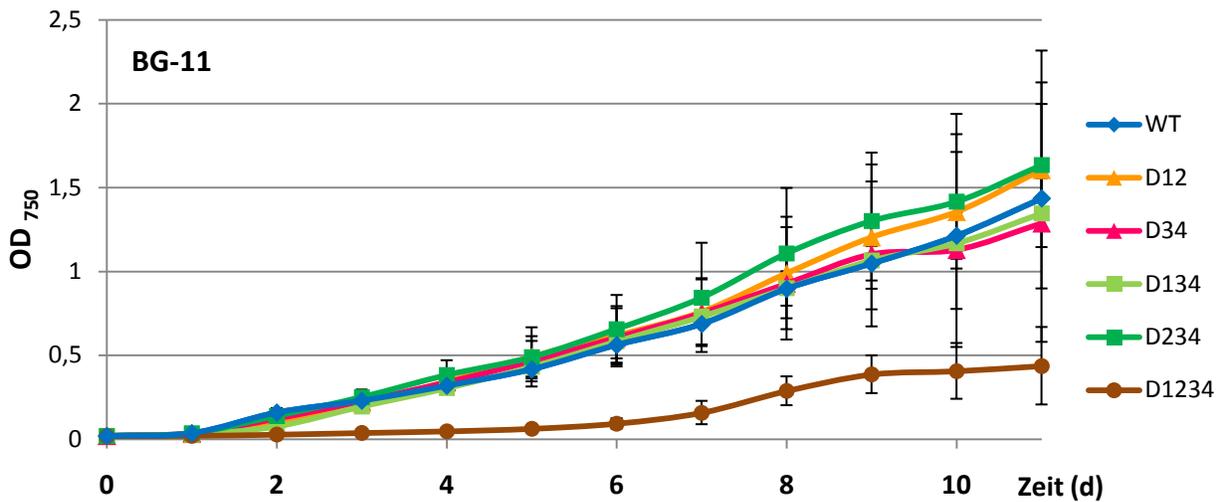


Abbildung 23: Wachstum von *Synechocystis* WT und verschiedenen NDH-1-Mutanten in BG-11-Medium, bestimmt durch Absorption bei 750 nm. Die Standardabweichung bezieht sich auf drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Dies verbindet sie mit der *ndhB*-Mutante, die ebenfalls ein deutlich langsames Wachstum aufweist. Die *nhB*-Mutante neigt aber in großem Maße zur Verklumpung und entzieht sich so einer quantitativen Messung im Photometer (Daten nicht gezeigt). Durch Zugabe von Glucose wird ein mixotrophes Wachstum ermöglicht. Dies führt beim WT und auch bei den anderen untersuchten Mutanten zu einer deutlich erhöhten Wachstumsrate (Abbildung 24). Wie auch unter Normalbedingungen zeigt die D1234-Mutante ein deutlich geringeres Wachstum als die anderen untersuchten Kulturen. Erst nach 8 Tagen ohne messbares Wachstum kommt es zu einem Anstieg. Im Vergleich zum WT braucht die Dreifachmutante D134 drei Tage länger, um sich auf diese Bedingungen einzustellen. Sie erreicht nach neun Tagen aber fast die gleiche Dichte wie der WT, der dieses Niveau aber schon drei Tage früher erlangt. Die Doppelmutante D12 hält die ersten 6 Tage mit dem WT mit, danach allerdings reduziert sich die Dichte um fast die Hälfte. Bis auf die D12 und die D1234 befinden sich alle untersuchten Mutanten und der WT nach sechs bis neun Tagen in der stationären Phase.

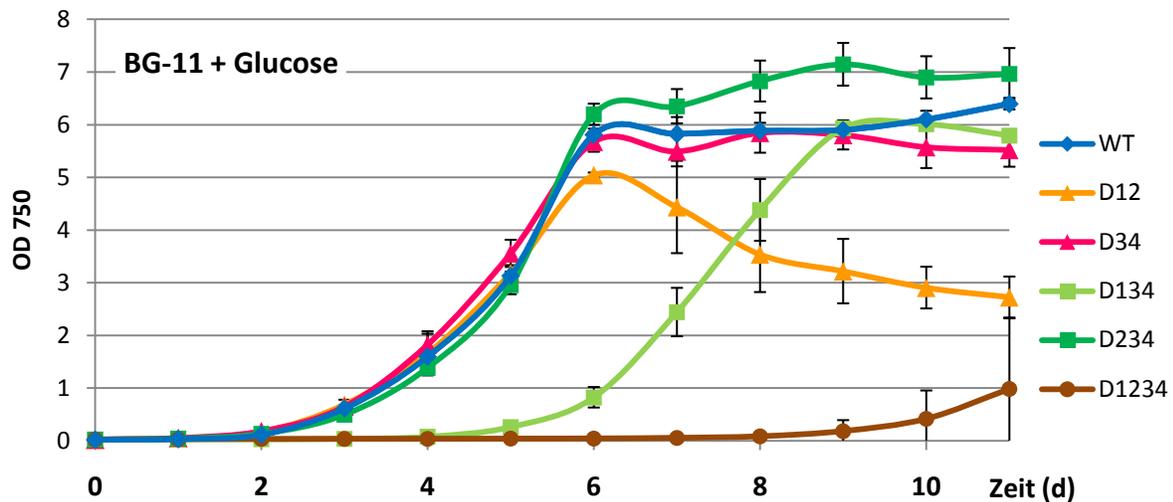


Abbildung 24: Wachstum von *Synechocystis* WT und verschiedenen NDH-1-Mutanten in BG-11-Medium mit 10 mM Glucose, bestimmt durch Absorption bei 750 nm. Die Standardabweichung bezieht sich auf drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Um den Einfluss des NDH-1-Komplexes auf den Stoffwechsel genauer zu untersuchen, wurde dem Medium neben Glucose zusätzlich DCMU hinzugegeben (Abbildung 25). Durch die extern zugeführte Glucose wird die Atmungsrate (im Dunkeln) der Cyanobakterien erhöht (BENSCHOP ET AL. 2003), was mit einer starken Genexpression vieler *ndh*-Gene einhergeht (LEE ET AL. 2007), der zyklische Elektronentransport hingegen wird verringert (MA UND MI 2008). Durch das DCMU kann nicht mehr der lineare, sondern nur noch der zyklische Elektronentransport ablaufen.

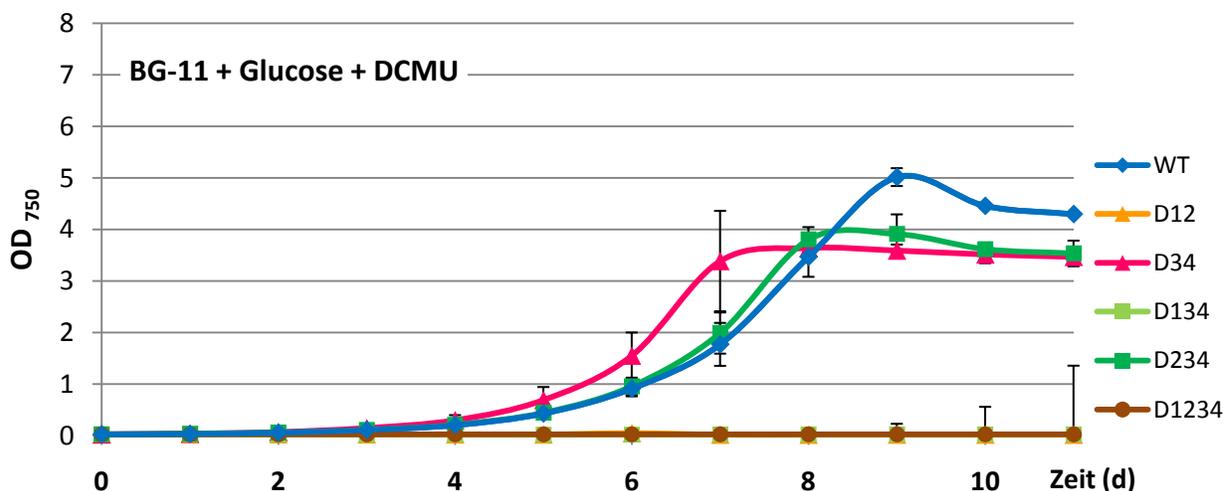


Abbildung 25: Wachstum von *Synechocystis* WT und verschiedener NDH-1-Mutanten in BG-11-Medium mit 10 mM Glucose und 10 μ M DCMU, bestimmt durch Absorption bei 750 nm. Die Standardabweichung bezieht sich auf drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Die NDH-1-Mutanten, die sowohl in der Atmung als auch im zyklischen ET gehemmt sind, sollten unter diesen Bedingungen deutlich schlechter wachsen können als andere.

Zu diesen Mutanten gehören die D12, die D134 und wie auch schon bei den beiden anderen untersuchten Wachstumsbedingungen die Vierfachmutante D1234. Nur der WT und die D34 und die D234 sind zu einem Wachstum fähig, sie brauchen aber mindestens einen Tag länger, um sich auf die Wachstumsbedingungen einzustellen. Die maximale Dichte wird nach 7-8 Tagen erreicht, sie liegt zwischen 3,5 und 5 (Abbildung 25). Ohne Zugabe von DCMU wird eine maximale Dichte von 7 erreicht (Abbildung 24), unter photoautotrophen Wachstumsbedingungen eine von 1,5 (Abbildung 23). Die Wachstumsversuche, die mit den neuen Mutanten vorgenommen wurden, zeigen deutlich, dass das Ausschalten von NDH-1-Untereinheiten einen Einfluss auf das Wachstum unter verschiedenen Bedingungen hat. Die Vierfachmutante D1234 ist unter allen untersuchten Bedingungen deutlich in ihrem Wachstum gehemmt. Eine Anpassung an mixotrophe Bedingungen ist ihr kaum möglich. Die Doppelmutante D12 und die Dreifachmutante D134, beides Mutanten ohne NdhD1-Untereinheit, zeigen im mixotrophen Wachstum entweder Schwierigkeiten beim Aufrechterhalten der Populationsdichte (D12) bzw. eine längere Anpassungszeit (lag-Phase) vor dem Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase (D134).

5.3 Proteinbiochemische Untersuchungen der NdhD-Mutanten

Die neuen NDH-1-Mutanten, die D234 und die D1234, zeigten in den Wachstumsversuchen unter allen untersuchten Bedingungen z.T. deutliche Auffälligkeiten wie das stark verringerte Wachstum der Vierfachmutante (siehe 5.2.2). Inwieweit diese physiologischen Beobachtungen mit dem Aufbau und damit den unterschiedlichen Funktionen der verschiedenen NDH-1-Komplexe einhergehen, wird im Folgenden untersucht.

5.3.1 Modulare Zusammensetzung des NDH-1

Für die Untersuchung der Zusammensetzung des NDH-1-Komplexes eignet sich die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Bei dieser bleiben je nach gewählter Solubilisierung die Untereinheiten der verschiedenen Proteinkomplexe zusammen, zudem können hydrophobe Proteinkomplexe aus der Membran herausgelöst werden. Für die folgenden Untersuchungen wurde als Standard-Detergenz n-Dodecylmaltosid verwendet. Vergleiche mit dem ebenfalls einsetzbaren Digitonin zeigten keine Vorteile in Anwendungsfreundlichkeit und Ergebnissen gegenüber n-Dodecylmaltosid. Von den Membranproben wurde jeweils eine Menge

entsprechend 6 μg Chlorophyll eingesetzt. Die solubilisierten Proteinkomplexe wurden in der blau-nativen Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Den Proteinen wurde durch den Farbstoff Coomassie eine negative Ladung ähnlich dem SDS bei der SDS-PAGE beigefügt, wodurch eine spannungsbedingte Auftrennung erfolgen konnte. Nach der Auftrennung sind die Photosysteme als grüne Banden deutlich im sonst blau gefärbten Gel zu erkennen (Abbildung 26 A). Das Photosystem I und das Photosystem II können sowohl als Monomere als auch als Dimere auftreten, das Photosystem I bildet sogar Trimere und weitere Superkomplexe (HERRANEN ET AL. 2004, KUBOTA ET AL. 2009).

Nach Western-Blot mit einem Antikörper gegen die NdhK-Untereinheit (siehe auch 5.1.1) sind mehrere Banden erkennbar (Abbildung 26 B). Die NdhK-Untereinheit befindet sich im peripheren Teil sowohl des NDH-1M- als auch des NDH-1L-Komplexes. Eine deutliche Bande (M), die unterhalb der 440 kDa Bande des Markers läuft, entspricht dem NDH-1M-Komplex. Dieser beinhaltet die peripheren Untereinheiten und die membranständigen Untereinheiten, bis auf NdhD und NdhF (ZHANG ET AL. 2004). Diese Bande befindet sich auf Höhe der Photosystem-Monomere. Weitere deutliche Banden entsprechen dem NDH-1L (L_a und L_b), der die dem NDH-1M fehlenden Untereinheiten NdhD und NdhF enthält (ZHANG ET AL. 2004).

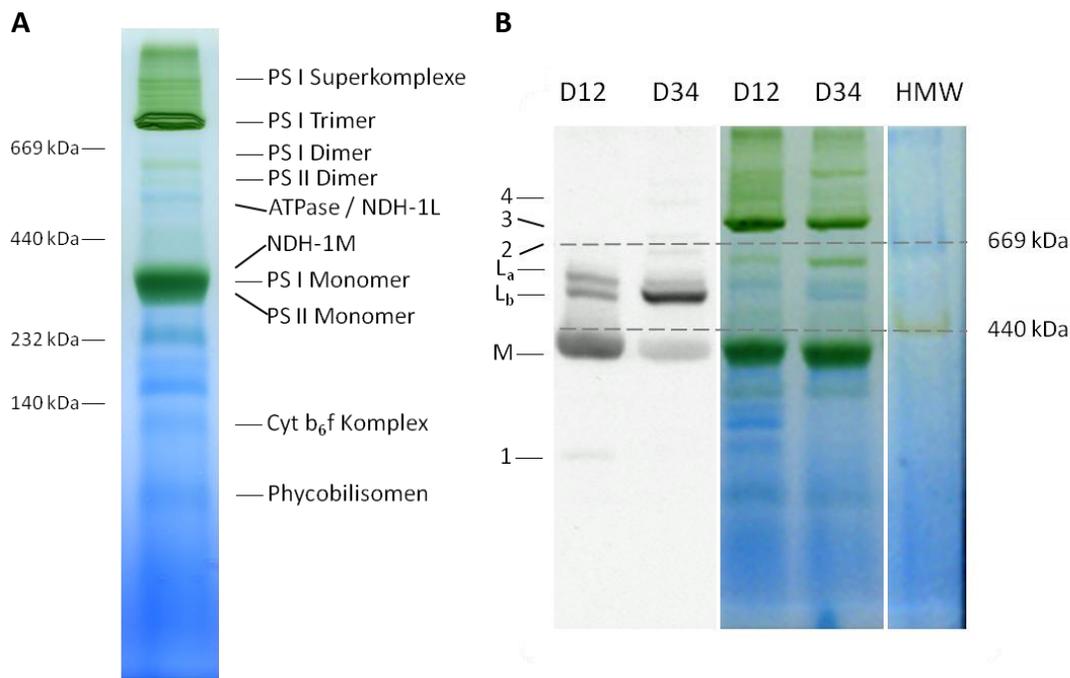


Abbildung 26: Auftrennung von Gesamtmembranen von *Synechocystis* mittels BN-Page. A: Gesamtmembran von *Synechocystis* WT, die Beschreibung der Proteinkomplexe erfolgte nach HERRANEN ET AL. 2004 und ZHANG ET AL. 2004. B: Nach Western-Blot von aufgetrennten Gesamtmembranen der *Synechocystis*-Mutanten D12 und D34 sind verschiedene Proteinkomplexe mit dem NdhK-Antikörper detektierbar (mit BN-Gel und HMW-Marker zum Vergleich). Dazu gehören der NDH-1M (M), zwei NDH-1L (L_a und L_b) und andere (1-4). Aufgetragen wurden jeweils Gesamtmembranen entsprechend 6 μg Chlorophyll.

Ob es sich bei der oberen der beiden Banden, L_a , um eine Variante des NDH-1L-Komplexes handelt, oder sogar schon um den NDH-1MS-Komplex, kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht bestimmt werden. Bei der D34-Mutante befindet sich die Bande, die dem NDH-1L entspricht, zwischen den Banden L_a und L_b (siehe auch Abbildung 28). Zudem sind zusätzliche Banden zu erkennen (Banden 1-4). Für eine Größenabschätzung der Banden wird der mitgelaufene HMW-Marker herangezogen, dessen 669 kDa und rötliche 440 kDa Bande deutlich erkennbar sind. Die kleineren Banden von 232 kDa und 140 kDa sind nur nach einer Coomassie-Färbung sichtbar (nicht abgebildet). Der Logarithmus der Molekulargewichte (MW), aufgetragen gegen die relative Laufstrecke, ergibt die Kalibrierungsgerade (Abbildung 27 A). Anhand dieser lässt sich direkt die Größe der Banden berechnen (Abbildung 27 B), da man von einem linearen Zusammenhang von $\log(\text{MW})$ und der Laufstrecke in diesem Größenbereich ausgehen kann, auch bei einem Gel mit linearem Gradienten wie dem verwendeten BN-Gel.

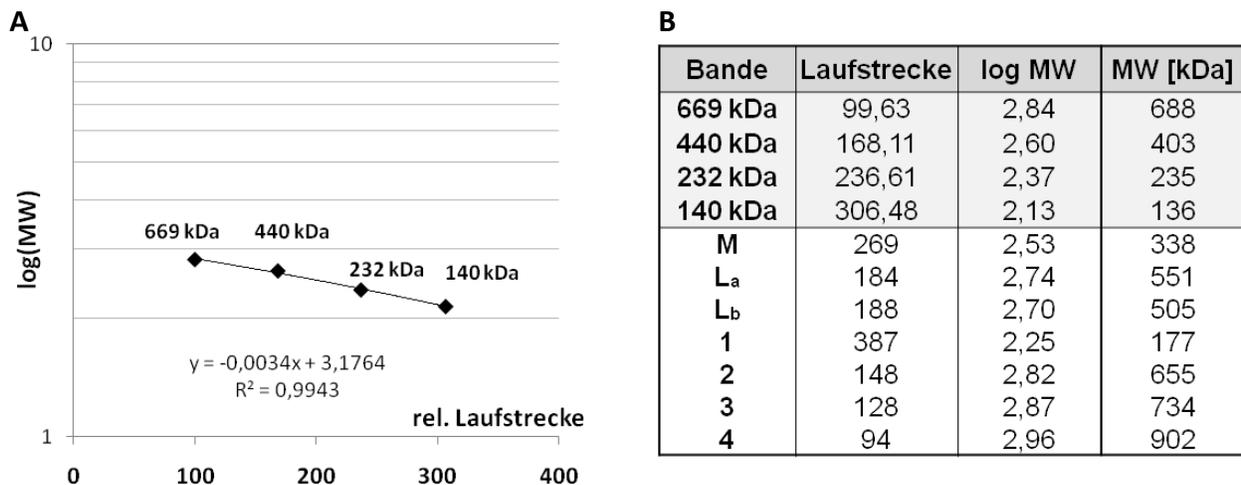


Abbildung 27: Ermittlung der Größe der Proteinbanden aus dem BN-Gel aus Abbildung 26. A: Neben solubilisierten Proteinen aus Gesamtmembranen (NDH-1-Mutanten von *Synechocystis*) wurde der HMW-Marker aufgetrennt. B: Aus der relativen Laufstrecke der Banden ergibt sich über die Regressionsgerade die jeweilige Bandengröße.

Aus der Berechnung ergibt sich für den NDH-1M-Komplex ein Molekulargewicht von ca. 338 kDa und für den NDH-1L ein MW von 505 - 551 kDa. Die Größe der weiteren Banden variiert von 177 kDa (Bande 1) bis 902 kDa (Bande 4). Vergleicht man diese Ergebnisse mit den berechneten Werten, die sich aus der Summe der jeweiligen Untereinheiten ergeben (Tabelle 8), erkennt man eine Differenz der jeweiligen Komplexe aus dem Gel mit den errechneten (Tabelle 9), die zwischen 25 und 50 kDa beträgt. Dies kann auf die noch unbekannte Kopfgruppe (oder Teile dieser) zurückzuführen sein, die durch das Solubilisieren während der Probenvorbereitung nicht vom Komplex abgelöst wurden.

Tabelle 8: Molekulargewichte der verschiedenen NDH-1-Komplexe aus *Synechocystis*. Variationen ergeben sich aus der unterschiedlichen Zusammenstellung der NdhD- und NdhF-Untereinheiten und der Carboanhydrase-ähnlichen Untereinheiten (Cup).

		NDH-1S ₁	S ₂	NDH-1M	NDH-1L ₁ (L)	L ₂ (L')	L ₃	L ₄	NDH-1MS	MS'
NDH-1M	312,7			312,7	312,7	312,7	312,7	312,7	312,7	312,7
NdhD1	57,5				57,5					
NdhD2	61					61,0				
NdhD3	54,3	54,3	54,3				54,3		54,3	
NdhD4	55,2							55,2		55,2
NdhF1	74,4				74,4	74,4				
NdhF3	66,6	66,6	66,6				66,6		66,6	
NdhF4	69,4							69,4		69,4
CupA	50	50,0							50,0	
CupB	43,4									43,4
CupS	14,1	14,1							14,1	
	Σ	185	120,9	312,7	444,6	448,1	433,6	437,3	497,7	480,7

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Carboanhydrase-ähnlichen Untereinheiten (CupA, -S und -B) oder andere abgelöst worden sind. Die NDH-1S-Komplexe lassen sich mit dem verwendeten Antikörper durch Western-Blot nicht nachweisen, da diese Komplexe nicht die periphere Untereinheit NdhK besitzen. Die Größenunterschiede der verschiedenen NDH-1-Komplexe untereinander lassen sich sowohl aus den beteiligten Untereinheiten als auch aus den berechneten Werten aus dem BN-Gel errechnen (Tabelle 9). Der Größenzuwachs von dem NDH-1M zum NDH-1L beträgt 132 kDa (entsprechend NdhD1 und NdhF1).

Tabelle 9: Molekulargewichte der verschiedenen NDH-1-Komplexe (M, L und MS) aus *Synechocystis* (links). Die Werte ergeben sich aus den Massen der beteiligten Untereinheiten (braun unterlegt) und aus den berechneten Werten aus dem BN-Gel aus Abbildung 27 B (blau unterlegt). Die sich ergebene Differenz könnte durch der unbekanntes NADPH-umsetzende Kopfgruppe erklärt werden. Rechts sind die rechnerischen und aus dem Gel abgeleiteten Differenzen der Komplexe untereinander dargestellt (selbes Farbschema).

Größe (kDa)	aus UEs ohne Kopf	aus Gel	Differenzen = Kopf ?	Differenzen MS - L	Differenzen MS - M	Differenzen L - M
NDH-1M	312,7	338	25	53	185	132
NDH-1L	444,6	505	60			
NDH-1MS	497,7	551	53	46	213	167

Die Berechnung anhand des BN-Gels ergibt 167 kDa. Es gibt also eine Differenz zwischen dem berechneten und dem gemessenen Wert von 35 kDa. Für die Membranuntersuchungen im BN-Gel standen neben dem NdhK-Antikörper auch ein NdhJ-Antikörper zur Verfügung. Beide Untereinheiten, NdhK und NdhJ, befinden sich in dem peripheren Bereich des NDH-1. Das Bild nach Western-Blot sollte also vergleichbar aussehen, wenn durch die Solubilisierung keine der beiden Untereinheiten herausgelöst wurden.

Das Bandenmuster der beiden Western-Blots zeigt sowohl beim Wildtyp als auch bei den übrigen NDH-1-Mutanten eine große Übereinstimmung (Abbildung 28). Die Spuren im BN-Gel zeugen von einer gleichmäßigen Beladung des Gels, die Banden der Photosysteme (entsprechend Abbildung 26) sind deutlich erkennbar und besitzen eine ähnliche Stärke.

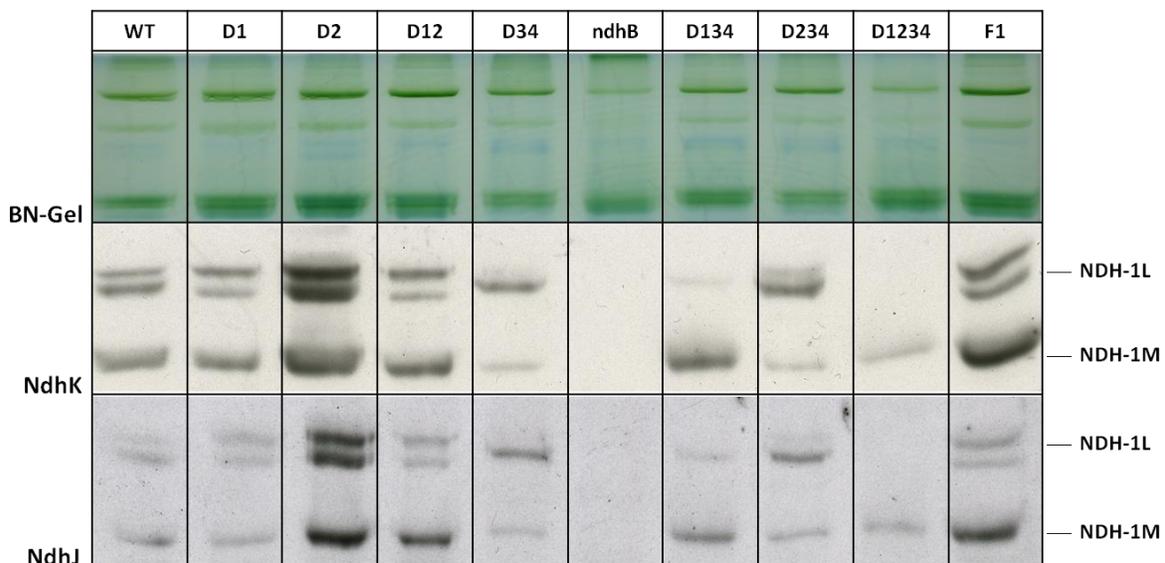


Abbildung 28: Western-Blot von solubilisierten Gesamtmembranen (entsprechend je 6 μg Chlorophyll) aus *Synechocystis* WT und NDH-1-Mutanten, aufgetrennt in einem BN-Gel (Ausschnitt, oben). Verwendet wurden ein NdhK-Antikörper (Mitte) und ein NdhJ-Antikörper (unten).

In der Spur der Mutante *ndhB* sind durch den NdhK- und den NdhJ-Antikörper keine NDH-1-Komplexe nachweisbar, es ist also kein NDH-1M oder NDH-1L vorhanden. Diese Mutante kann aufgrund des Fehlens der NdhB-Untereinheit keinen stabilen NDH-1-Komplex assemblieren (BATTCHIKOVA ET AL. 2005) und dient als Negativkontrolle. In allen anderen Spuren ist ein NDH-1M sichtbar. Bei der D34-Mutante ist nur ein NDH-1L erkennbar, ebenso bei der D134-Mutante. Bei den NdhD-Einfachmutanten D1 und D2, der Doppelmutante D12 und der Dreifachmutante D234 sind zwei NDH-1L-Banden (L_a und L_b). Das Muster der F1-Mutante entspricht dem der D12-Mutante. In der Spur der Vierfach-Mutante D1234 ist kein L-Komplex detektierbar, hier konnte nur der NDH-1M nachgewiesen werden. Die einzelne NDH-1L-Bande in der Spur der

Doppelmutante D34 und der Dreifachmutante D134 befindet sich auf der Höhe der L_b-Bande. Eine Mengenabschätzung anhand von Western-Blots ist schwierig und kann mit großen Fehlern behaftet sein, trotzdem scheint die Menge an NDH-1M in einigen Mutanten deutlich geringer zu sein als in anderen. Diese Unterschiede sind zudem bei beiden Western-Blots vorhanden. So ist in der Spur von der D34-Mutante und der daraus abgeleiteten D234-Mutante ein im Vergleich geringes Signal des NDH-1M sichtbar. Bei der D134-Mutante, deren NDH-1L-Komplex nur durch die NdhD2-Untereinheit aufgebaut wird, ist nur ein sehr schwaches Signal der einzelnen NDH-1L-Bande (L_b) zu sehen.

5.3.2 Einfluss der CO₂-Verfügbarkeit auf den NDH-1

Die NDH-1MS-Komplexe NDH-1MS und NDH-1MS' (siehe Tabelle 8), die die Carboanhydrase-ähnlichen Untereinheiten CupA und CupS bzw. CupB tragen, sind Bestandteil des CCM (*carbon concentrating mechanism*). Während der NDH-1MS' in geringer Konzentration konstitutiv exprimiert wird, wird die Expression des NDH-1MS bei CO₂-Mangel induziert (MAEDA ET AL. 2002). Werden Cyanobakterien-Kulturen bei der Anzucht mit Luft begast, werden die verschiedenen Komponenten des CCM induziert (WOODGER ET AL. 2005). Wird der CO₂-Anteil der Luft auf 2 % erhöht, so ist die CO₂-Versorgung für die Photosynthese ausreichend und die induzierbaren CCM-Systeme werden wieder herunter geregelt. Dies geschieht sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene, was durch Microarray-Analysen und Western-Blots gezeigt werden konnte (MCGINN ET AL. 2004, WANG ET AL. 2004). Eigene proteinbiochemische Analysen zeigen ein genaueres Bild der Veränderungen durch Verbesserung der CO₂-Versorgung (Abbildung 29). Western-Blots mit dem Antikörper gegen die NdhK-Untereinheit machen deutlich, dass bei Anzucht mit Luft, die mit 2 % CO₂ (HC = high CO₂) angereichert ist, das Bandenmuster gegenüber nur mit Luft angezogenen Kulturen (LC = low CO₂) z.T. stark abweicht. Eine genaue Mengenabschätzung durch den Western-Blot unterliegt aber einem gewissen Fehler: Beim WT und den *ndhD*-Einfach- und -Doppelmutanten nimmt die Menge an NDH-1M in den HC-Kulturen im Vergleich zu den LC-Kulturen stark ab. Bei den Dreifach-Mutanten und der Vierfachmutante tritt dies nicht auf, hier bleibt die Menge an NDH-1M auf demselben Niveau. Auch der NDH-1L-Komplex erfährt bei einigen Kulturen große Änderungen. Beim WT nimmt die Menge der unteren NDH-1L-Bande in den HC-Kulturen im Vergleich zu den LC-Kulturen ab, die obere NDH-1L-Bande verschwindet ganz. Dasselbe Verhalten tritt auch bei der D2-Mutante auf. In der Spur der D1-Mutante unter HC-Bedingungen ist kein NDH-1-Komplex mehr erkennbar.

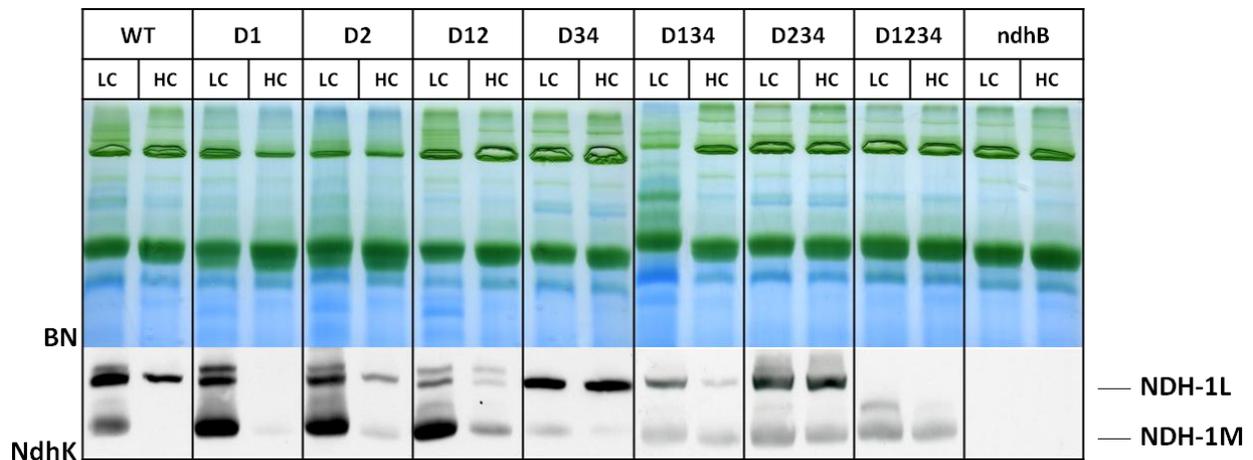


Abbildung 29: Western-Blot von solubilisierten Gesamtmembranen (entsprechend je 6 μg Chlorophyll) aus *Synechocystis* WT und NDH-1-Mutanten, aufgetrennt in BN-Gelen (oben, die linken 10 Spuren und die rechten 8 Spuren gehören jeweils zu einem Gel). Kulturen wurden mit Luft (LC) oder Luft mit 2 % CO_2 (HC) begast. Verwendet wurden ein NdhK-Antikörper (unten).

Bei der Doppelmutante D12 nimmt die Menge an NDH-1L ab, allerdings sind weiterhin beide L-Banden vorhanden. In der Spur der D34-Mutante ist unter beiden Bedingungen nur eine L-Bande erkennbar, die in ihrer Intensität gleich bleibt. Dies gilt auch für die Dreifachmutante D134, unter Normalbedingungen ist – wie auch in Abbildung 28 – nur die untere L-Bande sichtbar. Deren Stärke nimmt aber von LC- zu HC-Bedingungen ab. Die D234-Mutante weist keine deutlichen Unterschiede zwischen beiden Kulturbedingungen auf, die Vierfachmutante D1234 zeigt keine NDH-1L-Bande, unter LC-Bedingungen ist aber eine Bande zwischen dem M- und dem L-Komplex erkennbar, die bei der HC-Kultur nicht auftaucht. Bei der ndhB-Mutante, die als Kontrolle dient, ist bei beiden Spuren (LC und HC) kein NdhK-Protein nachweisbar.

Die Untersuchung der Gesamtmembranen mittels BN-Gel-Analyse und Western-Blot zeigt für die neuen Mutanten, dass bei der Vierfachmutante D1234 kein NDH-1L-Komplex mehr nachweisbar ist, nur der M-Komplex wurde mit dem NdhK-Antikörper identifiziert.

5.3.3 In-Gel-Aktivitätsmessungen

Proteinkomplexe können durch native Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Werden dabei die Bedingungen so schonend gewählt, dass Enzyme ihre Aktivität behalten, können diese durch eine Aktivitätsfärbung direkt im Gel nachgewiesen werden. Für Proteinkomplexe der Atmungskette aus Mitochondrien (Komplex I-IV) wurde dies mittels BN-Gele erfolgreich durchgeführt (JUNG ET AL. 2000, WITTIG ET AL. 2007). Für den NDH-1 aus Cyanobakterien ist diese

Methode nur eingeschränkt möglich, da der NDH-1-Komplex die Auftrennung im BN-Gel nicht nativ übersteht. Die NAD(P)H-umsetzende Kopfgruppe ist unter diesen Bedingungen nicht mehr assoziiert, und kann deshalb nicht nachgewiesen werden. Unter den mildereren Bedingungen einer Gelelektrophorese im Davis-System (DAVIS 1964 oder leicht abgewandelt OYABU ET AL. 2008) oder einer *clear-native* Gelelektrophorese (CN, WITTIG ET AL. 2007) kann eine NADPH-umsetzende Aktivität gezeigt werden (MA ET AL. 2006, MA UND MI 2008, OYABU ET AL. 2008). Der Nachweis erfolgt durch eine Reaktion mit NBT, auf das Elektronen von NADPH übertragen werden und das nach Reduktion einen violetten Formazan-Niederschlag bildet (siehe 4.8.11).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einem bisher noch nicht veröffentlichten Umfang untersucht, inwieweit sich die verschiedenen nativen Gelsysteme zum Nachweis des aktiven NDH-1-Komplexes eignen. In Verbindung mit Western-Blots wurden die Aktivitätsbanden näher charakterisiert. Dabei wurde jeweils ein „Midi-Long“-Gel mit 13 Taschen verwendet und mit zwei identischen Ansätzen von maximal sechs verschiedenen Proben beladen. Diese Ansätze wurden getrennt von einer Marker-Spur, innerhalb derer das Gel nach dem Gellauf geteilt wurde. Eine Hälfte wurde gefärbt, die andere wurde für den Western-Blot verwendet. Die eingescannten Ergebnisse wurden hinterher mit einem Grafikprogramm übereinandergelegt, um die Lage der Banden vergleichen zu können.

Neben *Synechocystis* WT (LC- und HC-Probe) wurden als NDH-1-freie Negativkontrolle die *ndhB*-Mutante (ebenfalls eine LC- und HC-Probe) verwendet, weiterhin die NDH-1L-freie D1234-Mutante (LC-Probe) und die Δapc -Mutante, deren Phycobilisomen ohne Allophycocyanin aufgebaut werden (LC-Probe). Es wurden Gesamtmembranen isoliert (siehe 4.8.6) und die Proteine daraus mit dem Detergenz n-Dodecylmaltosid solubilisiert (siehe 4.8.7). Nachdem bestätigend festgestellt wurde, dass in BN-Gelen der NDH-1-Komplex nicht anfärbbar ist (nicht gezeigt), wurden zwei weitere native Gelsysteme miteinander verglichen: das Davis-Gel (siehe 4.8.8) und ein Tris/Glycin Gel (siehe 4.8.9) nach OYABU ET AL. (2008). Hierzu wurden Membranen von WT und der *ndhB*-Mutante (jeweils LC- und HC-Kultur) verwendet und – parallel zur Aktivitätsfärbung – ein Western-Blot mit dem NdhK-Antikörper durchgeführt (Abbildung 30).

Im nativen Gel (Abbildung 30 links) wurden deutlich die Photosysteme (grüne Banden, gekennzeichnet mit schwarzen Pfeilen) von den Phycobilisomen (blaue Banden, gekennzeichnet mit schwarzen Dreiecken) getrennt. Bei diesen als Phycobilisomen bezeichneten Banden handelt es sich vermutlich um stabile Zerfallsprodukte der eigentlichen Phycobilisomen, die als ganzer Komplex zu groß wären, um in das Gel einzuwandern. Zwischen den verschiedenen Spuren im nativen Gel sind keine deutlichen Unterschiede feststellbar. Bei der Aktivitätsfärbung (Abbildung 30 Mitte) sind violett gefärbte Banden im Bereich der unteren beiden Phycobilisomenspuren zu erkennen. Bei den LC-Kulturen ist die Färbung deutlicher erkennbar als bei den HC-Kulturen. In

der Spur ndhB-LC ist oberhalb der Photosysteme eine schwächere Aktivitätsbande zu sehen. In dieser Spur ist generell eine diffuse Färbung über weite Bereiche vorhanden. In beiden Spuren der ndhB sind zwischen Photosystemen und der mittleren Phycobilisomenbande gefärbte Banden zu erkennen, die bei dem WT nicht vorkommen.

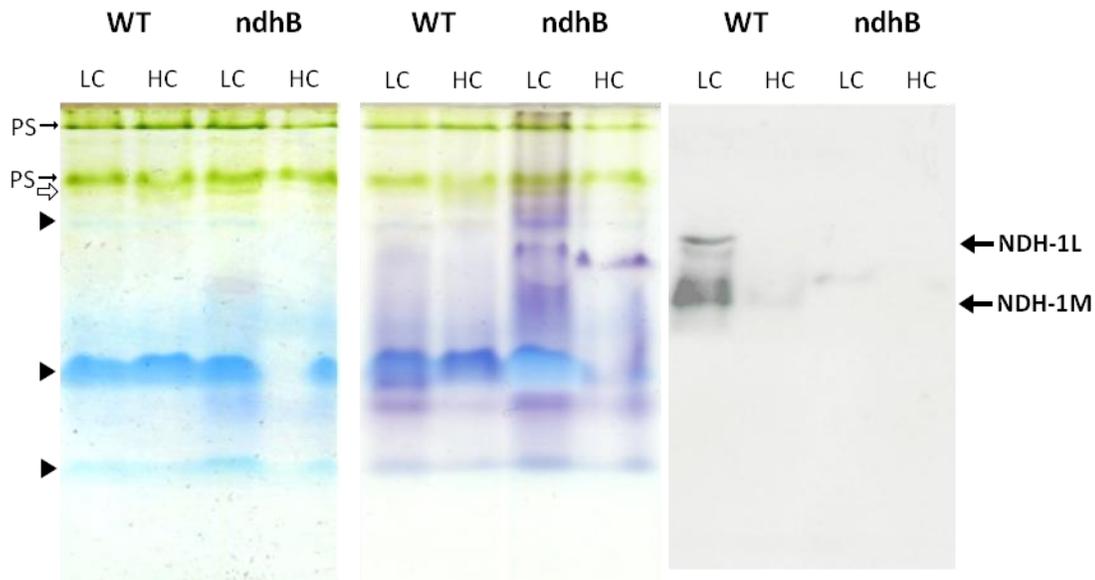


Abbildung 30: In-Gel-Aktivitätsfärbung eines Davis-Gels (DAVIS 1964). In dem nativen Gel wurden Membranpräparationen entsprechend 12 μg Chlorophyll von *Synechocystis* WT und ndhB (gewachsen unter HC- und LC-Bedingungen) aufgetrennt (links). Eine NBT-NADPH-Aktivitätsfärbung wurde durchgeführt (Mitte) und anschließend ein Western-Blot mit einem AK gegen die NdhK-Untereinheit (rechts). Der schwarzumrandete Pfeil markiert die 440 kDa-Bande des HMW-Markers, schwarze Dreiecke die Phycobilisomen und schwarze Pfeile die Photosysteme (PS). Zudem sind im Western-Blot die Banden des NDH-1L und NDH-1M markiert.

Diese sind aber nicht auf den NDH-1 zurückzuführen, was auch der Vergleich mit dem Western-Blot zeigt (Abbildung 30 rechts). Deutliche Banden sind im Western-Blot durch den NdhK-Antikörper nur in der Spur WT-LC nachweisbar, das Muster spiegelt das schon aus den BN-Gelen bekannte (siehe 5.3.1) wieder, der NDH-1M und der höhermolekulare NDH-1L sind deutlich zu identifizieren. In der HC-Spur des WT ist nur die untere (NDH-1M) der beiden Banden schwach erkennbar, verglichen mit Abbildung 29 ein gegensätzliches Bild: In dem BN-Gel verschwindet der M-Komplex bei einem „Shift“ von LC- zu HC-Bedingungen. In der Spur ndhB-LC ist eine schwache Bande erkennbar, die zwischen der vermeintlichen M- und L-Bande des WT liegt. Da im BN-System bei der ndhB nie Banden erkennbar sind (ZHANG ET AL. 2004), muss diese Bande von einer Kreuzreaktion des Antikörpers abstammen. Hinweise hierauf geben auch die weiteren Experimente mit nativen Gelsystemen. Übereinstimmungen von Banden der Aktivitätsfärbung mit Banden des Western-Blots lassen sich aber unter diesen Bedingungen nicht finden. Ein ähnliches Bild wie bei dem Davis-System (Abbildung 30) ergibt sich auch bei Verwendung des

Tris/Glycin-Gelsystems (Abbildung 31). Nach Gellauf sind auch hier die grünen Banden der Photosysteme (schwarze Pfeile) und die blauen der Phycobilisomen (schwarze Dreiecke) erkennbar, allerdings ist die Zahl der distinkten Banden deutlich geringer als beim Davis-Gel. Dafür zeigt die Aktivitätsfärbung klar voneinander abgegrenzte Banden (Abbildung 31 Mitte). Auf Höhe der hochmolekularen Phycobilisomen (oberes schwarze Dreieck) ist eine Färbung deutlich erkennbar. Unterschiede in der Intensität bestehen jeweils zwischen den LC- und HC-Spuren, bei den mit 2 % CO₂ angezogenen Kulturen ist die Aktivität verringert. In beiden Spuren der *ndhB*-Mutante befindet sich unterhalb dieser Aktivitätsbande eine weitere, die bei den WT-Spuren nicht zu finden ist. Im Gegensatz dazu ist in den WT-Spuren (auf Höhe des mittleren schwarzen Dreiecks) eine Bande vorhanden, die bei der *ndhB*-Mutante fehlt. Der Western-Blot mit dem NdhK-Antikörper zeigt ein ähnliches Bild wie beim Davis-Gel:

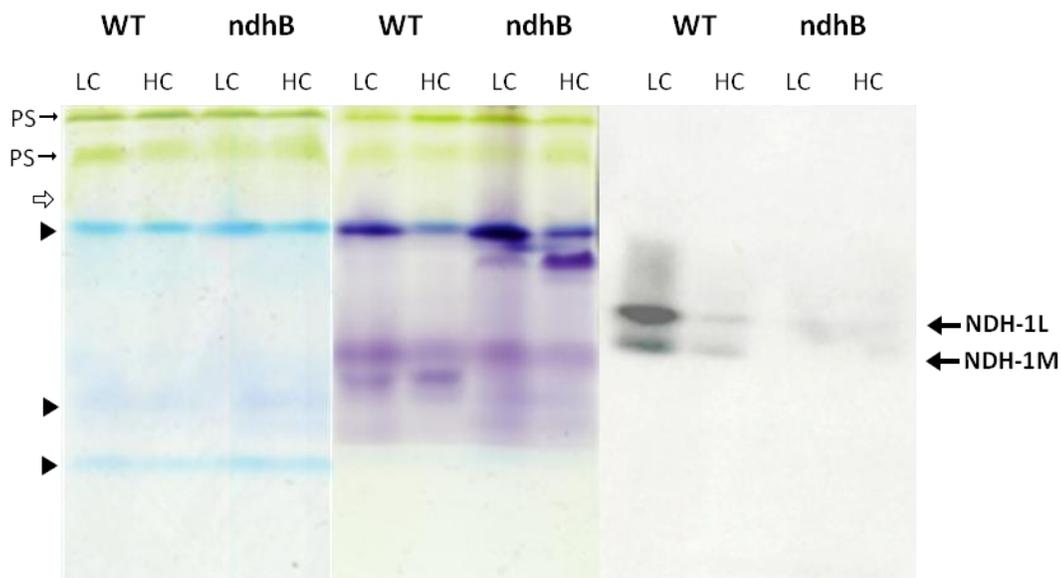


Abbildung 31: In-Gel-Aktivitätsfärbung eines Tris/Glycin-Gels nach OYABU ET AL. 2008. In dem nativen Gel wurden Membranpräparationen entsprechend 12 µg Chlorophyll von *Synechocystis* WT und *ndhB* (gewachsen unter HC- und LC-Bedingungen) aufgetrennt (links). Eine NBT-NADPH-Aktivitätsfärbung wurde durchgeführt (Mitte) und anschließend ein Western-Blot mit dem NdhK-Antikörper (rechts). Der schwarzumrandete Pfeil markiert die 440 kDa-Bande des HMW-Markers, schwarze Dreiecke die Phycobilisomen und schwarze Pfeile die Photosysteme (PS). Im Western-Blot die Banden des NDH-1L und NDH-1M markiert.

Deutliche Banden sind auch hier nur in der WT-LC-Spur zu erkennen, dabei können der NDH-1M und der NDH-1L voneinander unterschieden werden. In der WT-HC-Spur ist dieses Muster auch erkennbar, wenngleich deutlich schwächer. Auch bei diesem Gelsystem sind in den Spuren der *ndhB* sehr schwache Signale zu sehen. Ein direkter Vergleich der Aktivitätsbanden mit den Signalen des Western-Blots zeigt auch hier keine Übereinstimmung. In dem Bereich, wo im

Western-Blot die hochmolekularen NDH-1-Komplexe vorzufinden sind, ist keine Aktivitätsfärbung sichtbar. Auch die zusätzlichen Aktivitätsbanden in den Spuren der *ndhB*-Mutante lassen sich nicht mit den Signalen des Western-Blots zur Deckung bringen.

Mit diesen beiden Gelsystemen, dem Davis-Gel und dem Tris/Glycin-Gel, wurden keine NADPH-Dehydrogenase-Aktivitätsbanden mit gleichzeitiger Detektion durch den NdhK-Antikörper erhalten. Zusätzlich waren aber viele Aktivitätsbanden vorhanden, die nicht von dem NdhK-Antikörper detektiert werden konnten. Diese Banden wurden also nicht durch den NDH-1, sondern durch andere NADPH-umsetzenden membranständigen Enzyme in den Membranpräparationen verursacht. Zu diesen zählt die Ferredoxin:NADP⁺-Reduktase (FNR). Sie katalysiert die Reduktion von NADP⁺ im letzten Schritt des linearen Elektronentransports. In *Synechocystis* sind zwei Isoformen vorhanden, die beide dem *petH*-Gen entstammen. Die kürzere Form, der eine N-terminale Domäne von 9 kDa fehlt (VAN THOR ET AL. 1999, 2000), wird aufgrund einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) gebildet (THOMAS ET AL. 2006). Diese Domäne ist homolog zu dem Phycocyanin-assoziierten Linkerpeptid CpcD (VAN THOR ET AL. 1998) und dient dazu, die größere Form der FNR an den Phycobilisomen zu verankern. Deshalb wurde im weiteren Verlauf nicht nur ein zusätzliches natives Gelsystem herangezogen, das *clear-native* Gel (CN-Gel, siehe 4.8.10), sondern neben den bisherigen Membranproben aus WT und der *ndhB*-Mutante (jeweils LC- und HC-Kulturen) auch die Vierfachmutante D1234 und die Δ *apc*-Mutante eingesetzt. Bei der Δ *apc* wurde das Gen für Allophycocyanin (APC) ausgeschaltet, dessen Produkt den Kern der Phycobilisomen bildet. Ohne den APC-Anker können keine Phycobilisomen gebildet werden, an die die FNR gebunden vorliegt. Für eine Mutante mit einem eingeschränkten Phycobilisomenaufbau ist also mit einem differenzierten Ergebnis bei der Aktivitätsfärbung zu rechnen, wenn die an den Phycobilisomen gebundene FNR für die Aktivitätsbanden verantwortlich ist. Ein Knockout des FNR-Gens *petH* ist letal, weshalb keine Δ *petH*-Mutante zur Untersuchung zur Verfügung steht. Ein Vergleich der in dem CN-Gel aufgetrennten Membranproteine (Abbildung 32) von der Δ *apc* mit dem WT und verschiedenen NDH-1-Mutanten zeigt aber ein weitgehend übereinstimmendes Bild.

Die Unterschiede bestehen eher in den Wachstumsbedingungen (LC und HC) als in den Mutationen. Untersucht wurden der WT und die *ndhB*-Mutante, jeweils aus einer LC- und eine HC-Kultur, und die Vierfachmutante D1234 und die Δ *apc*, jeweils aus einer LC-Kultur. In dem CN-Gel sind nach der Proteinauftrennung deutlich die grün gefärbten Photosysteme (schwarze Pfeile) und zwei deutliche blaue Phycobilisomenbanden zu erkennen (siehe Abbildung 32 links, schwarze Dreiecke). Das blaue Bandenmuster der Phycobilisomen der Δ *apc*-Mutante (LC) unterscheidet sich nicht von denen des WT (LC), der *ndhB* (LC) und der Vierfachmutante (LC). Einzig die HC-Mutanten (WT und *ndhB*) weisen in der oberen Phycobilisomenbande eine

Abnahme im Vergleich zu den LC-Kulturen auf. Bei der Aktivitätsfärbung (Abbildung 32 Mitte) ist die höchstmolekulare gefärbte Bande auf genau der Höhe dieser Phycobilisomenbande zu erkennen (oberes schwarzes Dreieck), die Stärke fällt bei den HC-Kulturen und der Δapc ab.

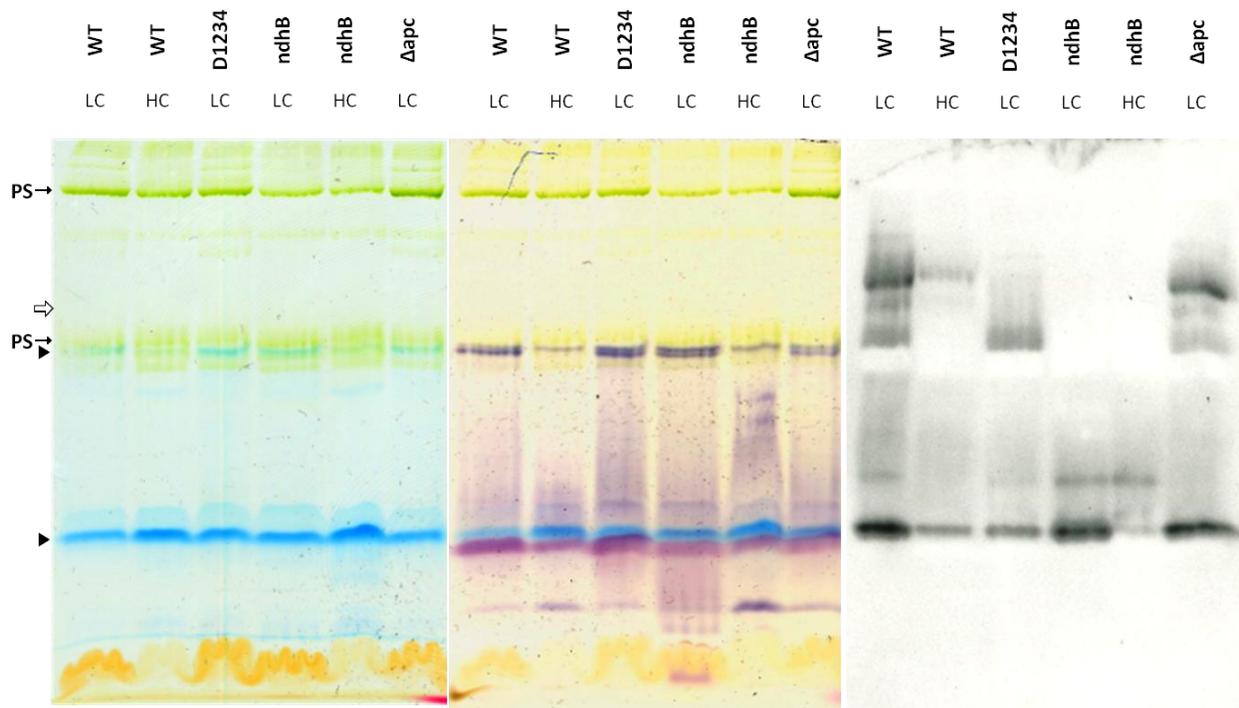


Abbildung 32: In-Gel-Aktivitätsfärbung eines clear-native Gels (CN-Gel). Aufgetragen wurden isolierte Gesamtmembranen entsprechend 12 μg Chlorophyll. Neben Wildtyp (WT) wurde die D1234, die *ndhB* und die Δapc -Mutante untersucht, die entweder mit Luft (LC) oder mit 2 % CO_2 angereicherter Luft (HC) begast wurden. Links ist das CN-Gel nach der Elektrophorese, in der Mitte die NBT-NADPH-Aktivitätsfärbung und rechts ein Western-Blot mit einem AK gegen die NdhK-Untereinheit abgebildet. Der schwarzumrandete Pfeil markiert die 440 kDa-Bande des HMW-Markers, schwarze Dreiecke die Phycobilisomen und schwarze Pfeile die Photosysteme (PS).

Weitere Aktivitätsbanden sind oberhalb und genau unterhalb der unteren markierten Phycobilisomenbande zu erkennen. Im niedermolekularen Bereich, kurz oberhalb der Lauffront, die durch einen orangefarbenen Bereich, wahrscheinlich Carotinoide, gekennzeichnet ist, sind ebenfalls schwache Aktivitätsbanden zu erkennen, am deutlichsten bei beiden HC-Kulturen. In dem Bereich zwischen den beiden Phycobilisomenbanden, die in Abbildung 32 mit schwarzen Dreiecken gekennzeichnet sind, liegt ein Bereich mit indistinkter Aktivitätsfärbung, nur bei der *ndhB* (HC) sind hier Banden zu erkennen.

Der Western-Blot mit dem Antikörper gegen die NdhK-Untereinheit (siehe Abbildung 32 rechts) zeigt im hochmolekularen Bereich oberhalb der oberen Phycobilisomenbande ein Bandenmuster, wie es aus den Analysen mit dem BN-Gel (siehe 5.3.1), dem Davis-Gel (Abbildung 30) und dem Tris-Gel (Abbildung 31) bekannt ist. Auf der Höhe knapp unterhalb der

440 kDa-Bande des HMW-Markers ist bei den LC-Kulturen von WT, D1234 und Δapc eine Bande zu erkennen, die dem NDH-1M entspricht. Oberhalb dieser befindet sich bei beiden WT-Spuren (LC und HC) und bei der Δapc eine Bande, die dem NDH-1L entspricht, und die bei der Vierfachmutante D1234 – wie auch im BN-Gel – fehlt. Unterhalb der NDH-1-Bande, im Bereich der Photosysteme und Phycobilisomen, tritt in allen Spuren ein sogenanntes *negative-staining* auf: Die Membran ist so mit Proteinen abgesättigt, dass an dieser Stelle keine Antikörper unspezifisch binden können, die die leichte Hintergrundaktivität bilden. Im Bereich der unteren deutlich blauen Phycobilisomenbande ist in allen Spuren mindestens eine deutliche Bande zu finden, auch in den Spuren der *ndhB*. Dies spricht für eine Kreuzreaktion mit einem Bestandteil z.B. der Phycobilisomen, in diesem niedermolekularen Bereich sind aber keine Proteinkomplexe wie den NDH-1 oder Fragmente davon zu finden. Kreuzreaktionen im niedermolekularen Bereich treten selten auch in BN-Analysen auf, jedoch nicht bei der Negativkontrolle *ndhB* (nicht gezeigt).

Um die Hypothese zu überprüfen, dass die FNR, gekoppelt an die Phycobilisomen, für bestimmte Aktivitätsbanden verantwortlich ist, wurde der obige Versuch wiederholt. Der dazugehörige Western-Blot wurde aber mit einem Antikörper, der gegen die FNR gerichtet ist, durchgeführt (Abbildung 33).

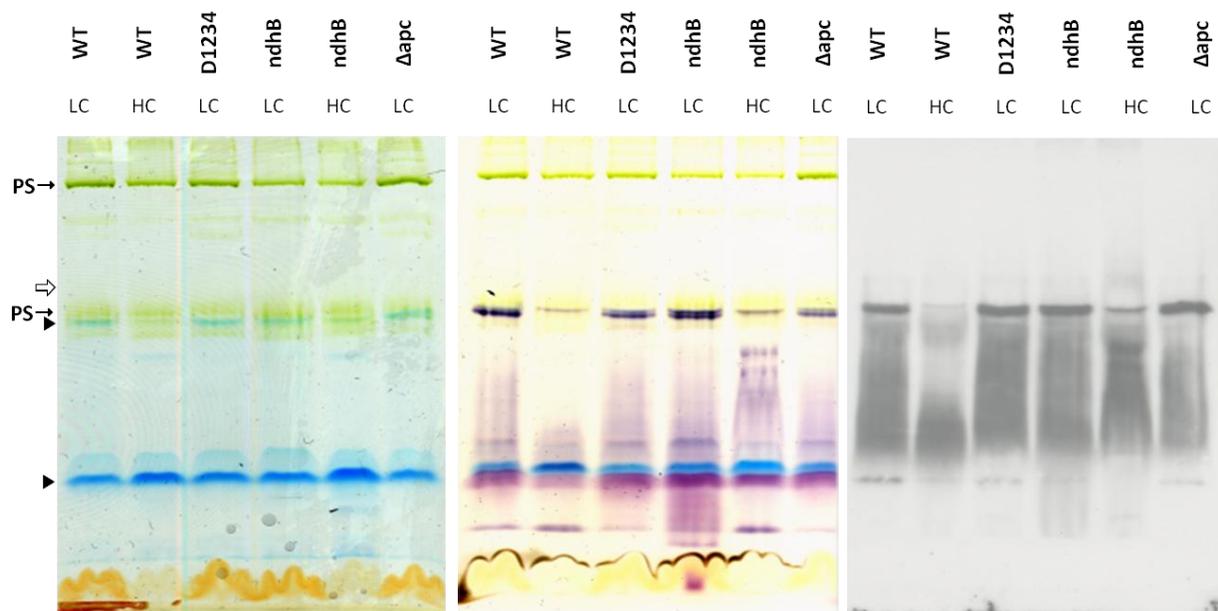


Abbildung 33: In-Gel-Aktivitätsfärbung eines clear-native Gels (CN-Gel). Aufgetragen wurden isolierte Gesamtmembranen entsprechend 12 μg Chlorophyll. Neben Wildtyp (WT) wurde die D1234, die *ndhB* und die Δapc -Mutante untersucht, die entweder mit Luft (LC) oder mit 2 % CO_2 angereicherter Luft (HC) begast wurden. Links ist das CN-Gel nach der Elektrophorese, in der Mitte die NBT-NADPH-Aktivitätsfärbung und rechts ein Western-Blot mit einem AK gegen die FNR (Ferredoxin:NADP⁺-Reduktase) abgebildet. Der schwarzumrandete Pfeil markiert die 440 kDa-Bande des HMW-Markers, schwarze Dreiecke die Phycobilisomen und schwarze Pfeile die Photosysteme (PS).

Die Ergebnisse des Gels und der Aktivitätsfärbung entsprechen dem aus Abbildung 32. Der Western-Blot zeigt deutlich, dass die Aktivitätsbanden, die auf Höhe der oberen markierten Phycobilisomenbande liegt, der FNR zuzuschreiben sind. In den HC-Spuren von WT und *ndhB*, in denen nur eine geringe Aktivität in diesem Bereich zu sehen ist, ist auch das Signal im Western-Blot geringer. Auch der diffus angefärbte Bereich zwischen den beiden markierten Phycobilisomen-Banden ist im Western-Blot als deutlich angefärbter Schmier wiederzufinden. Die in Abbildung 32 und Abbildung 33 vorhandenen Aktivitätsbanden in der *ndhB*-HC-Spur können auch im FNR-Western-Blot identifiziert werden. Die angefärbten Banden im niedermolekularen Bereich kurz vor der orange angefärbten Lauffront hingegen sind im Western-Blot nicht wiederzufinden und somit wohl auf andere Enzyme zurückzuführen.

Als weiteres wurde versucht, im Gel eine Aktivitätsfärbung von Carboanhydrasen durchzuführen (siehe 4.8.12). An den hochmolekularen NDH-1MS-Komplex sind zwei Untereinheiten peripher angekoppelt (CupA und CupB), die eine hohe Sequenzähnlichkeit mit Carboanhydrasen aufweisen und die für die Beteiligung des NDH-1 an der CO₂-Fixierung verantwortlich sein könnten. Dies gelang aber nicht, weder mit dem Davis-System noch mit dem CN-System (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von den getesteten nativen Gelsystemen – dem Davis-Gel, dem Tris/Glycin-Gel und dem CN-Gel – letzteres am besten für die Auftrennung von Membranen für eine anschließende NADPH-Aktivitätsfärbung geeignet ist. Wie die Western-Blots mit dem FNR- und dem NdhK-Antikörper aber gezeigt haben, war es nicht möglich, eine Übereinstimmung zwischen der Lage einer Aktivitätsbande und einem NDH-1-Signal im Western-Blot zu finden. Dies spiegelt sich auch in dem homogenen Muster der Aktivitätsfärbung wieder, das auch in der D1234-Mutante (ohne NDH-1L) und der *ndhB*-Mutante (ohne NDH-1L und NDH-1M) vorhanden ist.

5.4 Physiologische Untersuchungen der *NdhD*-Mutanten

Der NDH-1-Komplex ist ein Schnittpunkt zwischen den Elektronentransportrouten der Respiration und des zyklischen Elektronentransports der Photosynthese, zudem ist er auch in den Wasserstoffmetabolismus involviert. Die Funktion und die physiologische Relevanz dieses Komplexes, begründet auf seine modulare Zusammensetzung, werden im Folgenden durch die physiologischen Untersuchungen von NDH-1-Mutanten, vor allem der verschiedenen und z.T. neu konstruierten *NdhD*-Mutanten analysiert.

5.4.1 Auswirkungen auf den Wasserstoffmetabolismus

Eine Verbindung zwischen dem NDH-1-Komplex und dem Wasserstoffmetabolismus wurde schon früh aufgrund Sequenzähnlichkeiten einiger beteiligter Untereinheiten angenommen (siehe 2.5.4). Eine direkte Beziehung ließ eine Untersuchung der Photo-Wasserstoffproduktion von *Synechocystis* WT und verschiedener Mutanten, darunter die *ndhB*-Mutante ohne funktionellen NDH-1-Komplex, vermuten (COURNAC ET AL. 2004, GUTTHANN ET AL. 2007). Unter gleichen Bedingungen konnte die *ndhB*-Mutante viel länger und in größerem Maße als der WT Photowasserstoff produzieren. Um Hinweise auf die vorhandene Menge an aktiver Hydrogenase zu erhalten, bietet sich die Messung der Wasserstoffproduktion in der H₂-Elektrode (siehe 4.6.2) an, dabei wird durch Dithionit reduziertes Methylviologen als Elektronendonator eingesetzt. Die vorhandene Hydrogenase unterliegt damit keiner Limitierung auf der Donorseite, die produzierte H₂-Menge dient somit direkt als Maß für das Vorkommen an aktiver Hydrogenase. Neben dem WT wurden verschiedene NDH-1-Mutanten untersucht, darunter auch die im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Dreifachmutante D234 und die Vierfachmutante D1234 (Abbildung 34). Verglichen mit dem Wildtyp zeigen viele NDH-1-Mutanten eine leicht bis deutlich erhöhte H₂-Produktionsrate. Bei der D34 liegt der Wert fast doppelt so hoch wie beim WT (3,5 $\mu\text{mol H}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$ gegenüber 2 $\mu\text{mol H}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$). Die Hydrogenaseaktivität der *ndhB*-Mutante, die keinen NDH-1 mehr besitzt, liegt auf ähnlichem Niveau wie die der D234 und der D1234 und erreicht nur die Hälfte des Wertes des WT.

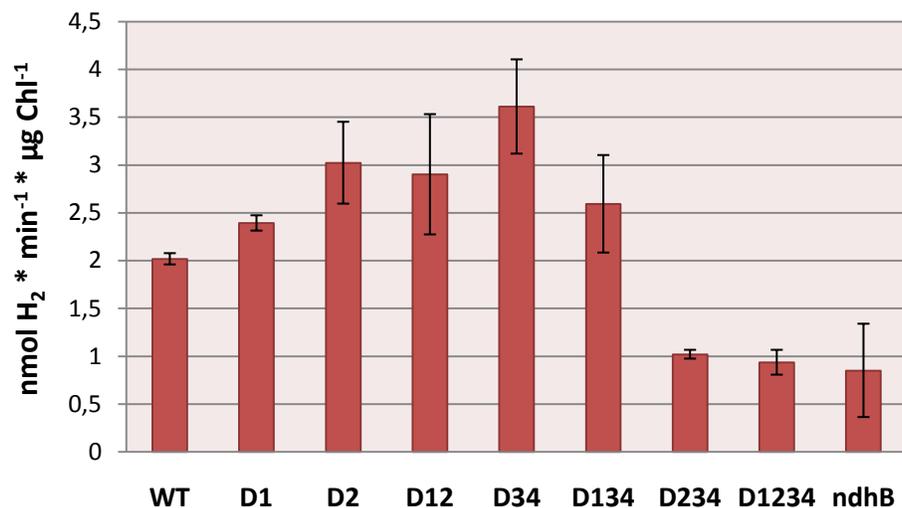


Abbildung 34: Hydrogenaseaktivität von *Synechoystis* WT und verschiedener NDH-1-Mutanten, mit reduziertem Methylviologen als Elektronendonator. Die Messwerte repräsentieren jeweils Doppelbestimmungen von drei unabhängigen Experimenten.

5.4.2 Auswirkungen auf die Respiration

Der NDH-1-Komplex spielt auch im respiratorischen Elektronentransport eine wichtige Rolle. Wenn unter heterotrophen Wachstumsbedingungen, z.B. im Dunkeln oder in einer zu dichten Kultur, keine Energiegewinnung durch die Photosynthese erfolgen kann, schaltet der Organismus auf respiratorischen Stoffwechsel um. Reduktionsäquivalente werden reduziert und die Elektronen über die Atmungskette auf molekularen Sauerstoff übertragen. Dabei wird über der jeweiligen Membran ein Protonengradient aufgebaut, der über die ATPase zur Energiegewinnung abgebaut wird. Der NDH-1-Komplex gehört neben dem NDH-2 zu den Enzymkomplexen, die die Reduktion von NADPH als ersten Schritt der Atmungskette katalysieren. Das respiratorische Potential der verschiedenen NDH-1-Mutanten wurde in der Sauerstoffelektrode untersucht (Abbildung 35, siehe auch 4.6.3). Durch Inkubieren im Dunkeln und durch Zugabe von 10 mM Glucose zu dem Medium wurde die Umstellung des Stoffwechsels auf die Atmung unterstützt. Unter diesen Bedingungen weisen viele NDH-1-Mutanten eine deutliche Änderung der Atmungsrate gegenüber dem WT auf. Eine geringere Atmungsrate besitzen die Mutanten D12, D1234 und *ndhB*, für letztere ist dies bereits veröffentlicht (OGAWA 1991). Deutlich gesteigert ist die Respirationsrate bei der D234-Mutante.

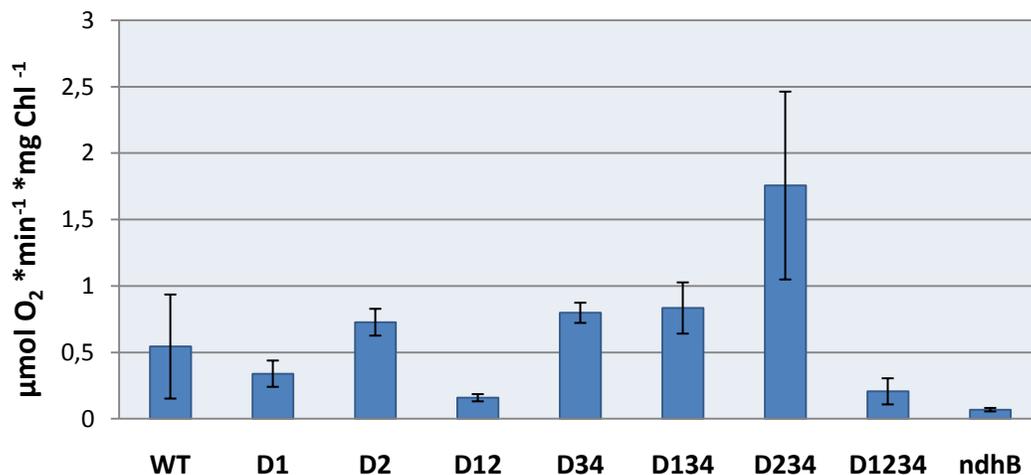


Abbildung 35: Respiration im Dunkeln von *Synechocystis* WT und verschiedener NDH-1-Mutanten. Der Sauerstoffumsatz wurde in einer abgedunkelten Clark-Elektrode unter Zugabe von 10 mM Glucose bestimmt. Die Messwerte wurden zur Verdeutlichung ins Positive gekehrt, sie repräsentieren jeweils Doppelbestimmungen von zwei unabhängigen Experimenten.

5.4.3 Auswirkungen auf die Photosynthese

Der NDH-1-Komplex ist sowohl am zyklischen Elektronentransport als auch an der Atmung beteiligt, deshalb konnte mit folgendem Experiment der Einfluss der verschiedenen NdhD-

Untereinheiten auf die Aktivität des NDH-1 untersucht werden: Mit der Sauerstoffelektrode wurde die O₂-Konzentration einer Kultur bei steigender Lichtintensitäten bestimmt (siehe 4.6.4). Dabei wurde durch Zuführung von Glucose die Respiration erhöht, durch zusätzliche Einstrahlung von dunkelrotem Licht (DR) wurde der zyklische Elektronentransport angeregt, da dieses Licht vor allem vom PS I aufgenommen wird. Der CET steht damit in Konkurrenz zur Respiration. Diese Art von Messungen wurde von jeder Mutante mindestens in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt, stellvertretend abgebildet sind die Ergebnisse einer Messung (Abbildung 36).

Ausgehend vom WT zeigt sich, dass mit steigender Belichtung die Sauerstoffkonzentration im Medium annähernd linear ansteigt. Ab einer bestimmten Lichtstärke gleichen sich der respiratorische Sauerstoffverbrauch und die photosynthetische Sauerstoffproduktion aus, der Lichtkompensationspunkt ist erreicht. Durch zusätzliche Gabe von dunkelrotem Licht (DR-Kurve) kann keine deutliche Änderung der Sauerstoffkurve erzielt werden. Unterhalb des Lichtkompensationspunktes liegt sie leicht über der Weißlicht-Kurve (WL), bei stärkeren Lichtintensitäten etwas unterhalb. Der Lichtkompensationspunkt wird bei einer leicht verringerten Lichtintensität erreicht. Durch Gabe von Glucose (Glc-Kurven) werden durch respiratorische Vorgänge die Sauerstoffkurven ins Negative verschoben, die Lichtkompensationspunkte werden erst bei höheren Lichtintensitäten erreicht. Bei steigender Lichtintensität werden die Unterschiede zwischen den Kurven mit und ohne Glucose geringer. Bei allen Mutanten wird wie beim WT durch die zugefügte Glucose die Sauerstoffkurve deutlich nach unten verschoben. Nur bei der *ndhB*-Mutante heben sich unter allen untersuchten Bedingungen die Sauerstoffproduktion und die Atmung auf oder finden gar nicht statt. Bei den Doppelmutanten D12 und D34 und der Vierfachmutante D1234 führt dies dazu, dass der Lichtkompensationspunkt mit den verwendeten Lichtstärken (bis 55 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPF) nicht erreicht wurde (Abbildung 36, siehe auch Abbildung 37). Bei der D34 würde aber durch eine größere Lichtmenge der Kompensationspunkt erreicht werden, was aufgrund des Anstiegs der Sauerstoffkurven extrapoliert werden kann. Bei den anderen Mutanten verlaufen die Kurven mit einer sehr geringen Steigung (*ndhB*) oder z.T. parallel zur X-Achse (D12, D1234). Die unterschiedliche Bedeutung der Untereinheiten D1 und D2 für die Aktivität des NDH-1 wird bei den Dreifachmutanten deutlich. Bei der D234, die noch die *NdhD1*-Untereinheit besitzt, kann nach Zuführung von Glucose der Bereich der Sauerstoffproduktion bei geringeren Lichtintensitäten erreicht werden als bei der D134, die noch die *NdhD2*-Untereinheit besitzt. Die Kurven der *NdhF1*-Mutante (F1) entsprechen denen der D12-Mutante. Wie bereits oben erwähnt, ist ein deutliches Unterscheidungskriterium für die photosynthetische Aktivität der Lichtkompensationspunkt, die Lichtmenge, ab der die photosynthetische O₂-Produktion den respiratorischen Sauerstoffverbrauch überwiegt (Abbildung 37).

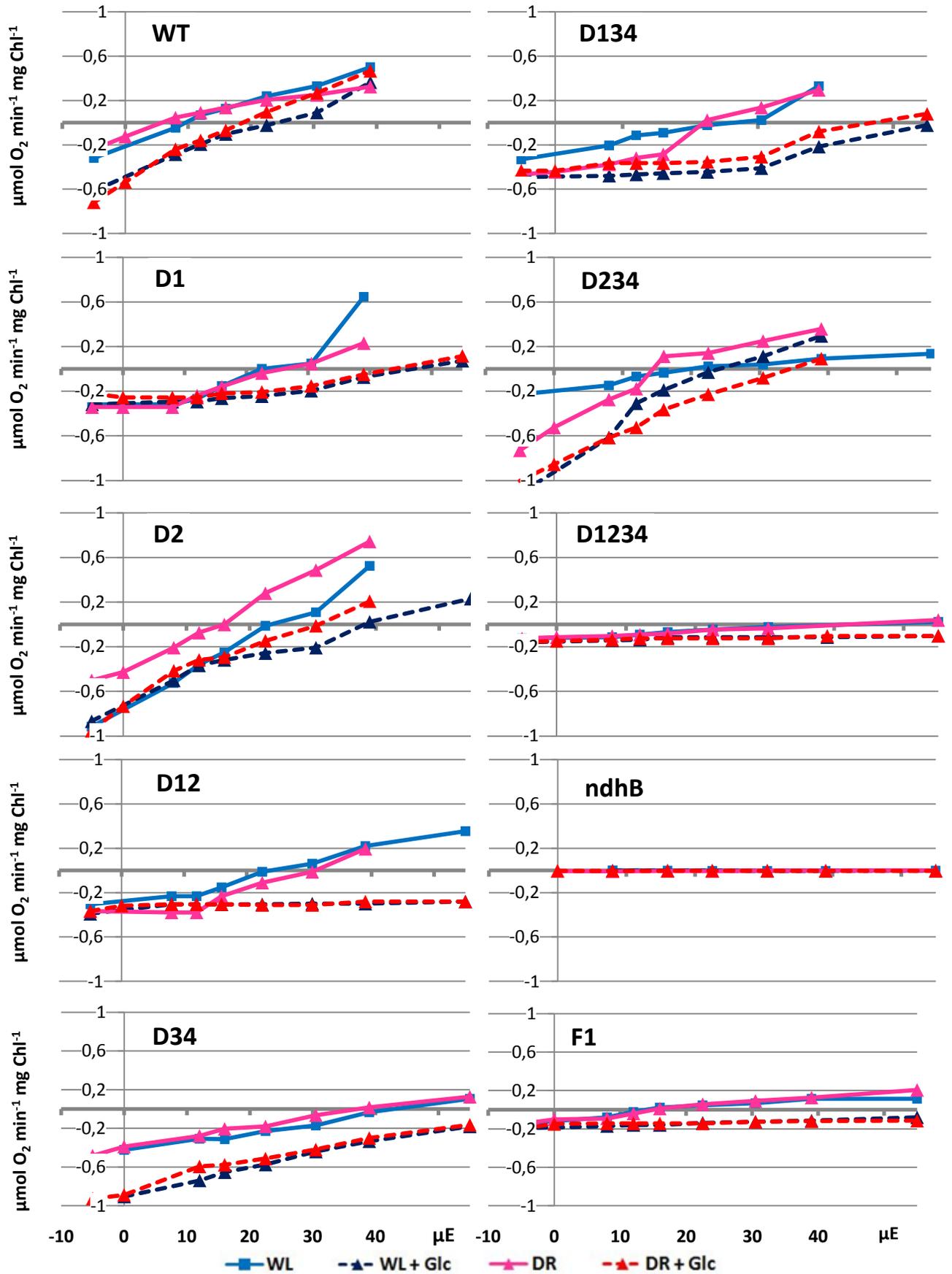


Abbildung 36: Messung der Respirations- und Photosyntheseleistung. Bestimmt wurde der Sauerstoffgehalt in Kulturen von *Synechocystis* WT und verschiedener NDH-1-Mutanten bei steigender Beleuchtung (bis $55 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPF). Die Kulturen wurden entweder nur mit Weißlicht (WL, blaue Linien) beleuchtet oder mit Weißlicht und zusätzlichem dunkelrotem Licht (DR, rote Linien). Zur Steigerung der Atmung wurde den Kulturen zusätzlich 10 mM Glucose (Glc) zugefügt (unterbrochene Linien). Die Werte im negativen Bereich der Y-Achse ergeben sich aus Dunkel-Inkubation ($-5 \mu\text{E}$) und Dunkel-Inkubation mit DR-Licht ($0 \mu\text{E}$). Zur besseren Übersicht wurde von jeweils bis zu 4 unabhängigen Messungen eine Einzelmessung abgebildet.

Wie bereits beschrieben, schaffen es einige Mutanten nicht, innerhalb dieses Spektrums den Lichtkompensationspunkt zu erreichen, wenn sie zuvor mit Glucose inkubiert worden sind. Zu diesen Mutanten gehören die D12, die D34 und die D1234. Sie haben einen Lichtkompensationspunkt für die Messungen ohne Glucose, der deutlich über dem der WT-Messungen mit Glucose liegt.

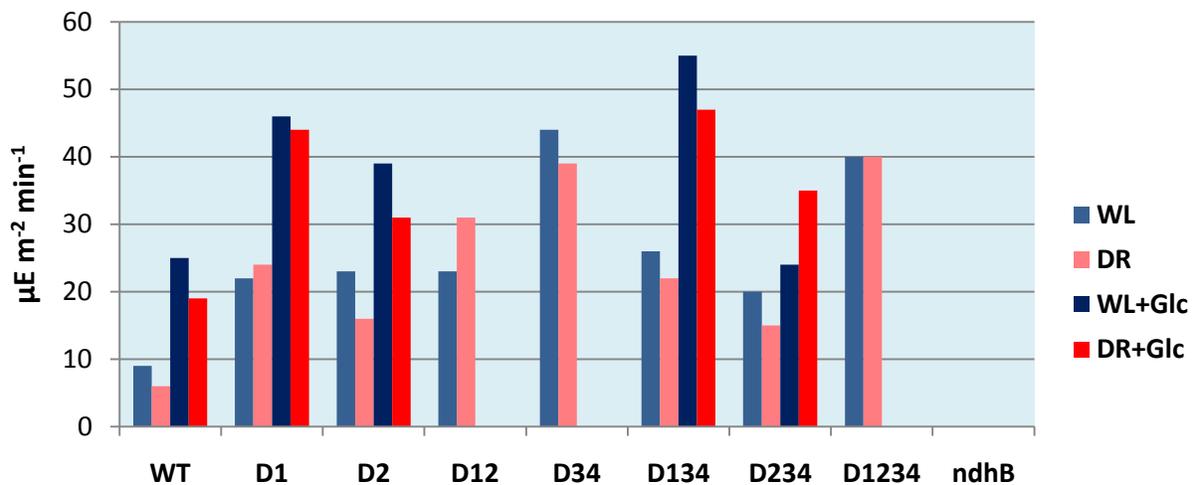


Abbildung 37: Lichtkompensationspunkte von *Synechocystis* WT und verschiedener NDH-1-Mutanten, bestimmt aus den Messreihen aus Abbildung 36. Die Kulturen wurden entweder nur mit Weißlicht (WL) beleuchtet oder mit Weißlicht und zusätzlichem dunkelrotem Licht (DR). Zur Steigerung der Atmung wurde den Kulturen zusätzlich 10 mM Glucose (Glc) zugefügt.

5.4.4 Der PIIF-Effekt

Das Phänomen des *post-illumination increase in chlorophyll-fluorescence* (PIIF) wurde in Pflanzen entdeckt, ist aber auch bei Cyanobakterien festzustellen (ASADA ET AL. 1993, Mano et al. 1995, ENDO ET AL. 1998). Werden Blätter oder Cyanobakterien-Kulturen für mindestens 3 min mit aktinischem Licht bestrahlt, kann nach Beenden dieser Belichtung mit dem PAM-Fluorometer nach einem schnellen Abfall der Fluoreszenz ein kurzfristiger Anstieg dieser gemessen werden. Der PIIF-Effekt kann durch drei Prozesse beschrieben werden (RYU ET AL. 2003b): Abfall der Fluoreszenz auf Werte von F_0 (Q_A , der erste gebundene Chinon-Akzeptor, ist oxidiert), gefolgt

von einem kurzen Anstieg (Q_A wird wieder reduziert). Anschließend stellt sich ein stationärer Zustand durch Oxidation von Q_A ein, die Fluoreszenz fällt auf F_0 ab. Da mit Abschalten des aktinischen Lichts – abgesehen von dem sehr schwachen Messlicht – kein weiteres Licht mehr eingestrahlt wird, muss die Anregungsenergie für die Fluoreszenzabstrahlung aus einer anderen Quelle stammen. Es handelt sich also um eine nichtphotochemische Reduktion des PQ-Pools. Angenommen wird ein Rückstau am PS II, ausgelöst durch Reduzierung des PQ-Pools durch stromale Donoren im Dunkeln (ASADA ET AL. 1993). Dadurch wird Q_A reduziert. Dies führt zu den oben genannten Effekten. Bei verschiedenen Mutanten ist dies aber nicht mehr nachweisbar, dazu gehört die *ndhB*-Mutante von *Synechocystis* (Abbildung 38, RYU ET AL. 2003a) sowie die $\Delta ndhB$ -Mutanten verschiedener untersuchter Pflanzen (JOËT ET AL. 2001, SHIKANAI ET AL. 1998). Bei den untersuchten *Synechocystis*-NDH-1-Mutanten wird der Einfluss des NDH-1-Komplexes auf den Redoxzustand des PQ-Pools deutlich (Abbildung 38).

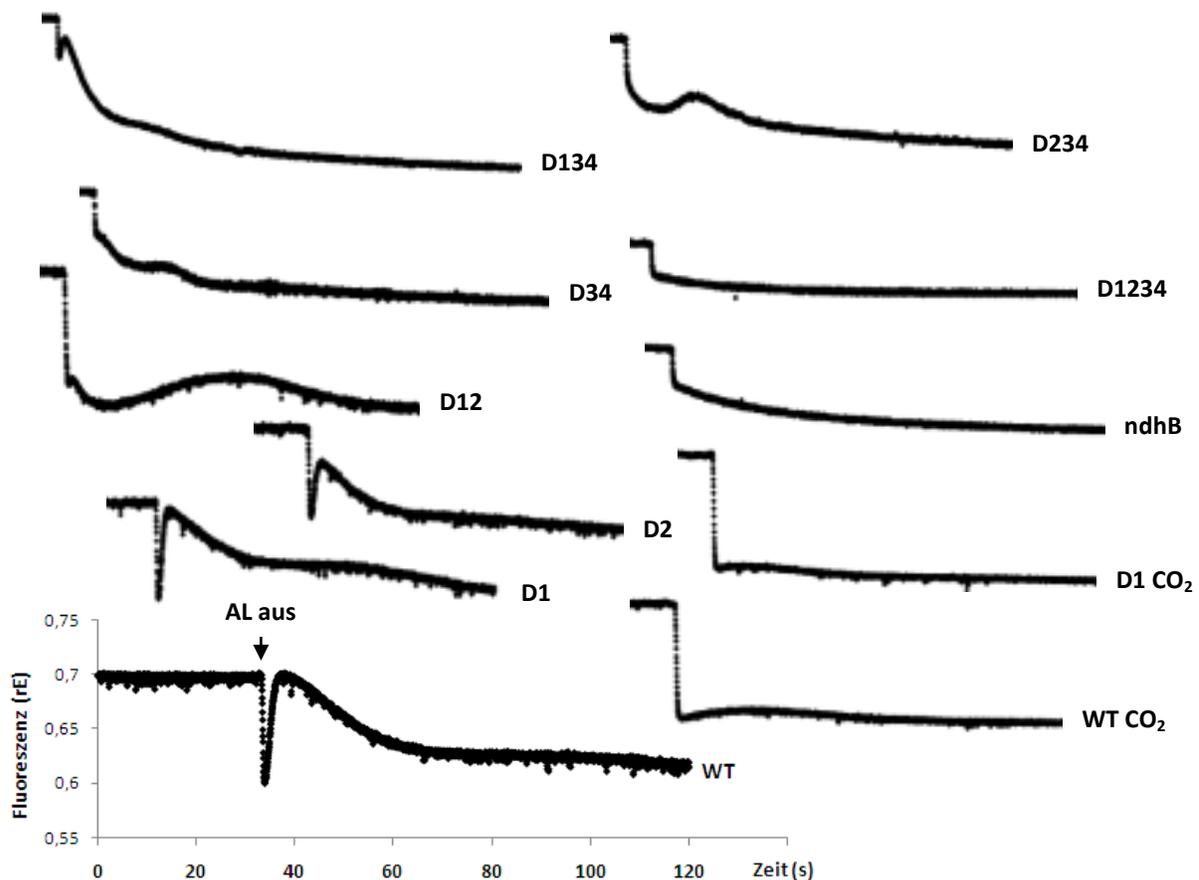


Abbildung 38: Effekt des *post-illumination increase in chlorophyll fluorescence* (PIIF). Nach einer Belichtungsdauer (PAR) von 3 min (siehe Abbildung 6) führt ein Abschalten des aktinischen Lichtes (Pfeil) zu einem kurzfristigen Anstieg der Chlorophyllfluoreszenz, gemessen mit dem PAM-Fluorometer. Untersucht wurden *Synechocystis* WT und verschiedene NDH-1-Mutanten, z.T. mit 2 % CO₂ angezogen. Für alle gelten die gleichen Koordinaten.

Wie bereits erwähnt zeigt die *ndhB*-Mutante keinen PIIF-Effekt mehr, dies gilt auch für die Vierfachmutante D1234. Verglichen mit dem WT, der einen deutlichen PIIF-Effekt aufweist (im Anstieg wird der Ausgangswert F' erreicht), ist dieser bei der Einfachmutante D1 nur leicht, bei der D2 um fast 50 % reduziert.

Die Doppelmutanten D12 und D34 zeigen ein abweichendes Bild: Nach einem schnellen Anstieg um maximal 20 % fällt die Fluoreszenz ab, um in einem erneuten Anstieg von deutlich längerer Dauer dasselbe Fluoreszenzniveau zu erreichen wie bei dem vorherigen Anstieg. Bei der Dreifachmutante D134 kommt es nur zu einem kurzen Anstieg der Fluoreszenz, bei der D234 fällt die Fluoreszenz ohne einem kurzen Anstieg direkt ab, es kommt aber – wie bei den Doppelmutanten – zu dem zweiten längerdauernden Anstieg, allerdings in deutlich verminderter Intensität.

Wurden die Kulturen zuvor mit 2 % CO_2 angezogen, konnte weder beim WT noch bei den anderen untersuchten NDH-1-Mutanten ein PIIF-Effekt gemessen werden (siehe stellvertretend WT und D1 in Abbildung 38).

5.4.5 Einfluss auf den zyklischen Elektronentransport

Der zyklische Elektronentransport (CET) trägt sowohl dem erhöhten ATP/NADPH-Verhältnis der CO_2 -Fixierung durch den Calvin-Benson-Bassham-Zyklus Rechnung als auch dem erhöhten ATP-Verbrauch bei C4-Pflanzen (MI ET AL. 1992, OHKAWA ET AL. 2000, SHIKANAI 2007). Damit mehr ATP gebildet werden kann, muss der PQ-Pool nicht nur durch das PS II, sondern auch durch andere Komponenten (NDH-1, Pgr5-Weg) verstärkt reduziert werden, damit für das PS I keine Donorseiten-Limitierung vorliegt. Die Akzeptorseitenlimitierung wird dadurch verhindert, dass NADPH durch eben diese Reaktionen wieder oxidiert wird (am NDH-1) und als NADP^+ wieder zur Verfügung steht. Zusätzlich wird die Anregungsenergie gezielt an das PS I geleitet. Dies wird durch Umlagerung von Antennen (LHC II in Pflanzen und Phycobilisomen in Cyanobakterien) erreicht, der sogenannte *state change* (MAO 2002). Reguliert wird die Umlagerung über den Oxidationsgrad des PQ-Pools (MAO et al. 2002, MEUNIER ET AL. 1997, MULLINEAUX UND ALLEN 1986). Bei hohem Oxidationsgrad wird State 1 (Anregung von PS II), bei hohem Reduktionsgrad State 2 (Anregung von PS I) induziert. Im Dunkeln wird bei Cyanobakterien der State 2 eingenommen, in Algen und Pflanzen State 1 (PAPAGEORIOU ET AL. 2007).

Wird als Anregungslicht dunkelrotes Licht verwendet, so wird verstärkt PS I angeregt und somit der CET betrieben. Bei zu hohem Oxidationsgrad wird dann allerdings die Anregungsenergie auf PS II übertragen (State 1). Durch Zugabe von DCMU kann sichergestellt werden, dass der PQ-Pool nicht durch PS II reduziert wird. Dies passiert bei Gabe von dunkelrotem Licht zwar nur in

geringem Maße, kann aber nicht ausgeschlossen werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit am PS I, als Maß für den zyklischen Elektronentransport, hängt dabei nicht nur von der Anregung durch Lichtenergie ab, sondern wird dabei auch durch die Verfügbarkeit an reduziertem Plastochinon bestimmt und durch das Vorkommen von oxidierten Elektronen-Akzeptoren (Fd, NADP⁺). Diese Faktoren werden auch durch die Aktivität des NDH-1 beeinflusst. Von *Synechocystis*-WT und verschiedenen NDH-1-Mutanten wurden deshalb die Halbwertszeiten (HWZ) der Reduktion des PS I von dunkeladaptierten Kulturen nach Zugabe von DCMU bestimmt (Abbildung 39, siehe 4.7.2). Zusätzlich wurde die HWZ des PS I nach unterschiedlich starker dunkelroter Belichtung (DR) untersucht (Abbildung 40, siehe 4.7.3). Das Verhältnis des bei dieser dunkelroten Belichtung durch einen MT-Blitz noch oxidierbaren PS I zum gesamten PS I wurde ebenfalls ermittelt (Abbildung 41, siehe 4.7.4).

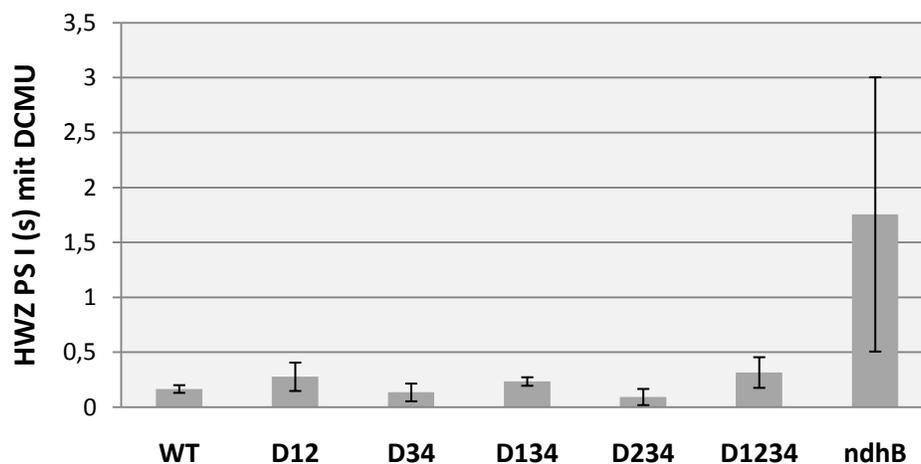


Abbildung 39: Bestimmung der HWZ des PS I von *Synechocystis* WT und verschiedenen NDH-1-Mutanten nach Dunkelinkubation mit DCMU (20 μ M) und Oxidation durch einen Sättigungsblitz, gemessen mit dem Dual-PAM. Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte von mindestens 3 unabhängigen Messungen.

Die Untersuchung an dunkeladaptierten Kulturen (Abbildung 39) zeigt eine deutlich längere HWZ der *ndhB*-Mutante, verglichen mit dem WT. Dies ist bereits in der Literatur beschrieben (IVANOV ET AL. 2007, MI ET AL. 1992, ZHANG ET AL. 2004). Während sich die D34-Mutante auf dem Niveau des WTs befindet, besitzt die D12 eine leicht verlängerte HWZ, ebenso wie die D134-Mutante. Die D234 hingegen kann ihr PS I etwas schneller reduzieren als der WT.

Die Vierfachmutante D1234 besitzt eine langsamere HWZ als der WT, vergleichbar mit der D12. Die hohen Schwankungen bei der *ndhB*-Mutante erklären sich aus Schwierigkeiten bei der Regressionsanalyse, die z.T. lineare Abnahme mit einer exponentiellen Funktion zu beschreiben (siehe 4.7.2).

Bei der Analyse von lichtadaptierten Kulturen ergibt sich ein differenziertes Bild (Abbildung 40): Während die HWZ des WT bei steigender DR-Belichtung auf demselben Niveau bleibt wie bei dunkeladaptierten Kulturen (Abbildung 39), verlängert sich die Halbwertszeit der *ndhB*-Mutante erheblich (MI ET AL. 1992). Die HWZ der Vierfachmutante verlängert sich im lichtadaptierten Zustand ebenfalls deutlich. Im dunkeladaptierten Zustand war die HWZ nur etwas länger als beim WT (Abbildung 39). Die Reduktionsgeschwindigkeit der Vierfachmutante ist vergleichbar mit der von dunkeladaptierten *ndhB*-Kulturen. Die D234, die dunkeladaptiert schneller reagierte (Abbildung 39), kann unter DR-Bedingungen ihre PS I Zentren langsamer reduzieren als der WT und die meisten anderen Mutanten (Abbildung 40) und befindet sich auf dem Niveau der D12-Mutante.

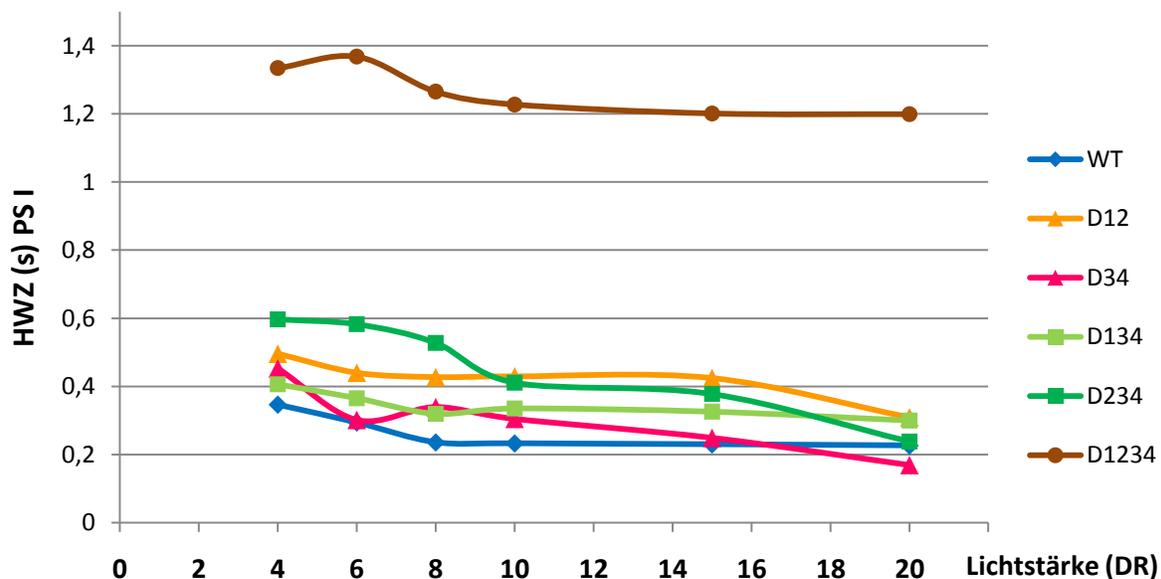


Abbildung 40: Bestimmung der HWZ des PS I mit dem Dual-PAM. Untersucht wurden die Reduktionsgeschwindigkeit nach unterschiedlich starker DR-Belichtung von *Synechocystis*-WT und verschiedenen NDH-1-Mutanten. Die Messpunkte entsprechen Mittelwerten aus 3-5 unabhängigen Messungen. Wegen der besseren Übersicht sind die Standardabweichungen nicht eingetragen. Die ebenfalls mitgemessene *ndhB*-Mutante besitzt eine HWZ > 4.

Das eingestrahlte DR-Licht wurde am PS I in photochemische Arbeit umgewandelt. Dabei kommt es im Reaktionszentrum (RZ) zur Ladungstrennung. Der primäre Elektronenakzeptor wird reduziert und kann in diesem Zustand durch das RZ nicht weiter reduziert werden, das PS I ist „geschlossen“. Abhängig von der eingestrahlichten Lichtmenge ist immer ein bestimmter Prozentsatz an PS I „geschlossen“. Die noch verbleibenden „offenen“ Reaktionszentren können durch einen zusätzlichen Blitz „geschlossen“ werden. Der Anteil dieser noch „schließbaren“ Reaktionszentren wurde beim WT und den NDH-1-Mutanten untersucht (Abbildung 41).

Die ndhB-Mutante, deren oxidierte Reaktionszentren nur sehr langsam wieder reduziert werden können (siehe Abbildung 39 und Abbildung 40), besitzt auch bei geringen DR-Lichtstärken kaum noch offene Reaktionszentren. Dies gilt auch für die D1234-Mutante. Die Reaktionszentren der D12-Mutante sind bei den verwendeten Lichtmengen zu 45-75 % „geschlossen“, der WT und die D34-Mutante besitzen dagegen mehr „offene“ Reaktionszentren.

Dies bestätigt die für diese drei Mutanten (WT, D12 und D34) bereits veröffentlichten Ergebnisse (OHKAWA ET AL. 2000). Die D234-Mutante, die nur noch die NdhD1-Untereinheit besitzt, weist von allen untersuchten Kulturen den größten Anteil an „offenen“ Reaktionszentren auf.

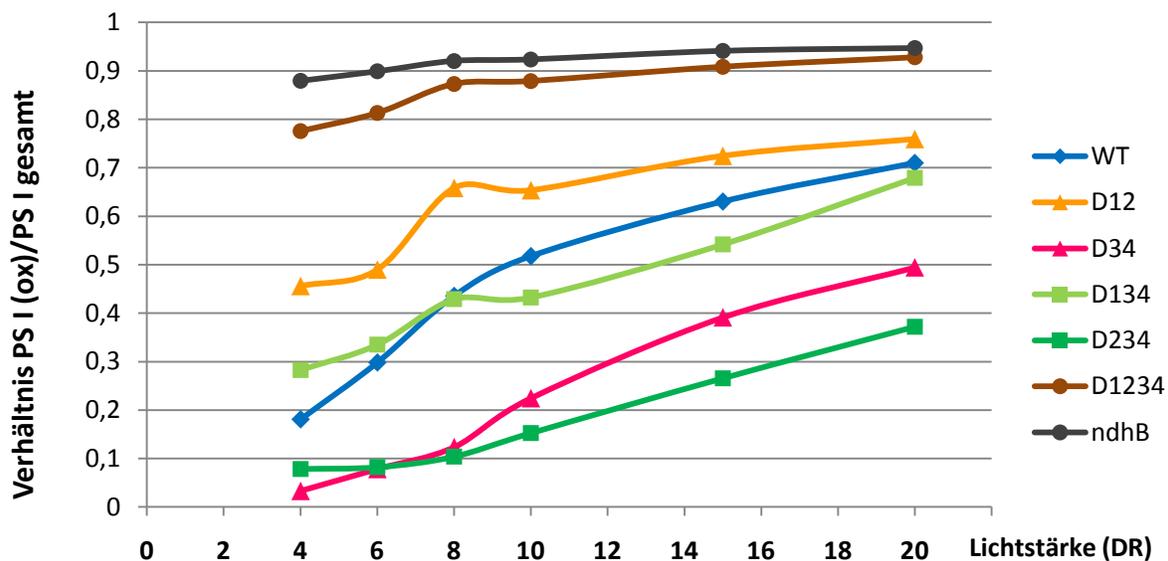


Abbildung 41: Messung des Oxidationsgrades des PS I bei *Synechocystis* WT und verschiedenen NDH-1-Mutanten mit dem Dual-PAM. Der Wert ergibt sich aus dem Verhältnis des – bei gegebener DR-Belichtung – durch einen MT-Blitz noch oxidierbaren PS I zum Gesamt-PS I. Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Messungen, wegen der besseren Übersicht sind die Standardabweichungen nicht eingetragen

5.4.6 P700-Lichtkurven am Dual-PAM

Zur genaueren Analyse der Bedeutung des NDH-1-Komplexes zur Reduktion des PQ-Pools wurden der WT, die D1234-Mutante, die nur noch den NDH-1M-Komplex assemblieren kann (siehe Abbildung 28) und die ndhB-Mutante, die keinen NDH-1 mehr besitzt, im Dual-PAM untersucht. Dazu wurden Lichtkurven aufgenommen (siehe 4.7.5). Die photochemischen Quantenausbeuten des PS I ($Y(I)$), durchgezogene Linien in Abbildung 42) nimmt beim WT bei höheren Lichtintensitäten stark ab (Photoinhibition), bis ca. $150 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ liegt die Quantenausbeute bei über 70 %. Bei der D1234-Mutante tritt schon oberhalb $15 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ eine

deutliche Beeinträchtigung der Quantenausbeute auf, ebenso bei der *ndhB*-Mutante. Bei Lichtintensitäten über $15 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ findet bei dieser Mutante am PS I keine Photochemie mehr statt. Am PS I des WT nimmt mit steigenden Lichtintensitäten die donorseitige Limitierung $Y(\text{ND})$ zu und erreicht Werte um 70 %, während die Akzeptorseiten-Limitierung $Y(\text{NA})$ über den gesamten Lichtbereich unter 10 % beträgt. Bei der D1234-Mutante liegt schon während der Dunkelinkubation eine Donorseiten-Limitierung von über 50 % vor. Mit dem Beginn der Belichtung wird diese Limitierung aber aufgehoben. Die Akzeptorseiten-Limitierung erreicht bei $60 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ schon über 50 % und steigt weiter auf über 70 % bei Starklicht. Bei der *ndhB*-Mutante findet mit Einschalten der Belichtung eine deutliche Akzeptorseiten-Limitierung statt, die Quantenausbeute $Y(\text{NA})$ erreicht 100% bei Licht um $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, erst bei höheren Lichtintensitäten sinkt dieser Wert aufgrund der Zunahme der Donorseiten-Limitierung (siehe 4.7.5) auf ca. 80 % ab.

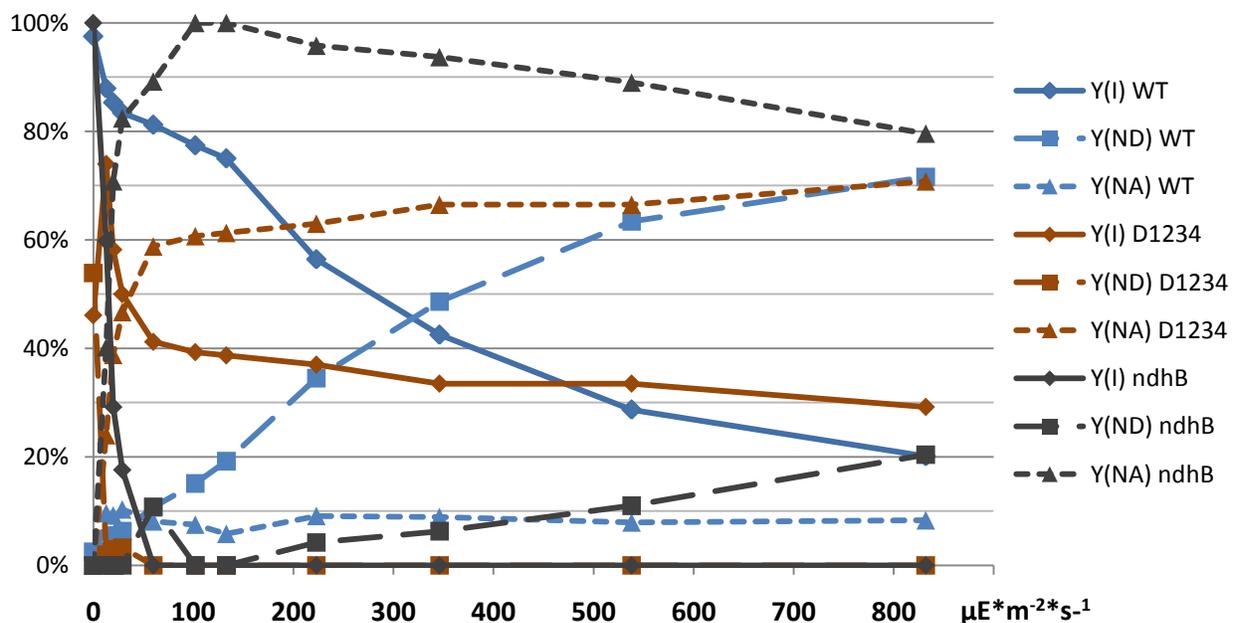


Abbildung 42: Ergebnisse der Lichtkurven von *Synechocystis* WT und der NDH-1-Mutanten D1234 und *ndhB*. Im Dual-Pam wurden bei steigender Lichtintensität die P700-Parameter Quantenausbeute des PS I, $Y(\text{I})$, die Donorseiten-Limitierung $Y(\text{ND})$ und die Akzeptorseitenlimitierung $Y(\text{NA})$ bestimmt (alle dargestellt in Prozent).

5.4.7 Aktivität der Cytochrom-bd-Chinoxidase

Der Inhibitor DBMIB konkurriert als Strukturanalogon mit Plastochinon und bindet kompetitiv in der Plastochinon-Bindungstasche des Cytochrom- b_6f -Komplexes. Dies führt dazu, dass der Plastochinonpool nicht mehr ausreichend oxidiert werden kann und immer stärker reduziert

wird. Die Oxidation kann nur noch über weitere terminale Oxidasen stattfinden. *Synechocystis* besitzt drei terminale Chinol-Oxidasen (HART ET AL. 2005, HOWITT UND VERMAAS 1998). Dies sind die Cytochrom-c-Oxidase (COX, *ctaCDE*), die Cytochrom-bd-Chinon-Reduktase (CYD, *cydAB*) und die ARTO (*alternative respiratory terminal oxidase*, *CYDII*, *ctaCDEII*), letztere besitzt vermutlich keine physiologische Relevanz (HOWITT UND VERMAAS 1998).

Der weitgehend reduzierte PQ-Pool bewirkt bei Beleuchtung eine verstärkte Fluoreszenzabstrahlung am PS II, da keine bzw. kaum photochemische Arbeit geleistet werden kann. Es liegt eine Akzeptorseitenlimitierung vor. Ist aber bei Bestrahlung eine Quantenausbeute messbar, ausgedrückt durch den Genty-Koeffizienten, ist der PQ-Pool durch eine Oxidase oxidiert worden. Die Aktivität des NDH-1-Komplexes trägt zusätzlich zur Reduktion des PQ-Pools bei, wodurch die Quantenausbeute weiter abnimmt.

Durch die Bestimmung des Genty-Koeffizienten bei verschiedenen NDH-1-Mutanten kann also indirekt die Aktivität des NDH-1-Komplexes bestimmt werden (siehe 4.7.6). Es zeigt sich, dass einige NDH-1-Mutanten eine ähnlich hohe Aktivität der Cytochrom-bd-Chinoloxidase (CYD) aufweisen wie der WT mit einem Genty-Koeffizienten von 0,082 (Abbildung 43). Dazu gehören die D234 (0,077), die *ndhB* (0,068) und auch noch die D1234 (0,061) Die CYD-Mutante besitzt den geringsten Genty-Koeffizienten (0,018), die D2-Mutante (0,026) zeigt aber auch einen signifikant geringeren Genty-Koeffizienten als die übrigen NDH-1-Mutanten.

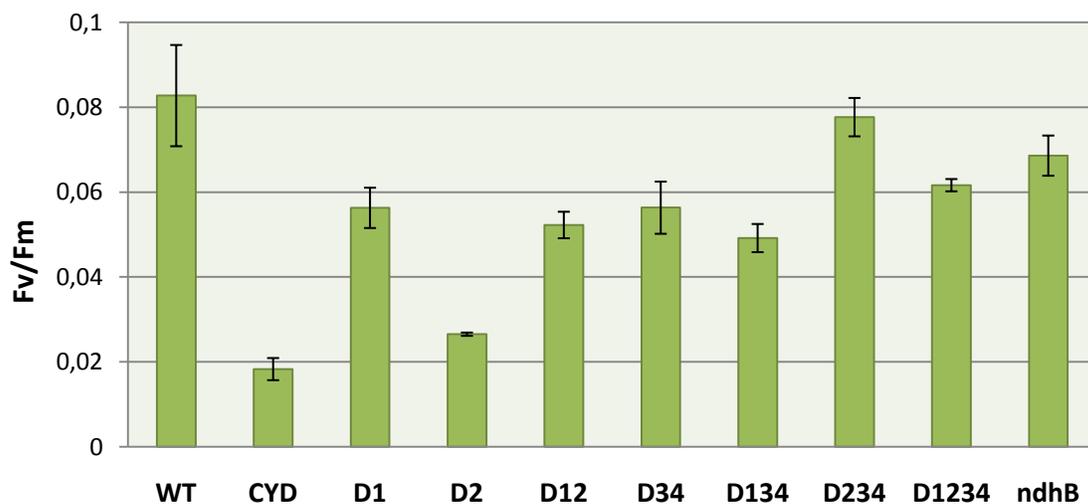


Abbildung 43: Der Genty-Koeffizient F_v/F_m als Maß der Aktivität der Cytochrom-bd-Chinoloxidase (CYD) bei *Synechocystis* WT, verschiedenen NDH-1-Mutanten und der Cytochrom-bd-Chinoloxidase-Mutante CYD. Zur Messung wurden 20 μ M DBMIB und 10 mM Ascorbat zugegeben. Von jeder Kultur wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt.

5.5 Untersuchungen zur Kopfgruppe

Wie bereits erwähnt, gehört die Identifizierung der NADPH-oxidierenden Kopfgruppe zu einer der wichtigsten offenen Fragen der NDH-1-Forschung. Viele Proteine standen oder stehen im Verdacht, Elektronen vom NADPH an den NDH-1 übertragen zu können, dazu gehören die bidirektionale Hydrogenase, die FNR, eine zu der F_{420} -Dehydrogenase der $F_{420}H_2$:Methanophenazin Oxidoreduktase homologe Untereinheit von *Synechocystis* (*slr1923*) (PROMMEENATE ET AL. 2004) sowie die Flavoproteine Flv2 (*sll0219*) und Flv4 (*sll0217*), letztere weisen die benötigten Bindestellen für FMN und [Fe-S]-Cluster auf (HELMAN ET AL. 2003, VICENTE ET AL. 2002) und deren Gene befinden sich in einem Operon. Diese beiden Flavoproteine bilden mit dem hypothetischen Protein *sll0218* ein Operon (4115 bp). In der Arbeitsgruppe wurde als Vorarbeit Knockoutmutanten hergestellt, bei denen dieses Operon durch eine Gentamycin-Resistenzkassette ersetzt wurde. Dies erfolgte im WT und in der Δ hoxE-H-Mutante, deren Hydrogenase-Operon deletiert wurde (siehe Tabelle 13). Diese Mutante wurde ausgewählt, um einen möglichen synergistischen oder komplementativen Einfluss der Hydrogenase zu untersuchen. Die Überprüfung der Segregation wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Southern-Blot (siehe 4.4.12) durchgeführt (Abbildung 44), dazu wurde eine Sonde mit den Primern erstellt, die auch zur Herstellung des Fusionskonstruktes einer Δ sll0217-Einzelmutante verwendet worden sind (siehe 4.4.1).

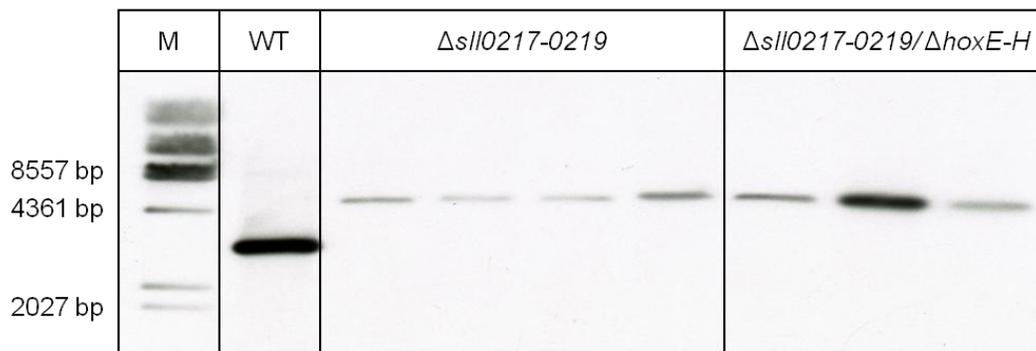


Abbildung 44: Southern-Blot zur Segregationskontrolle der verschiedenen Transformationsansätze der Flavoprotein-Mutanten von *Synechocystis* WT und der Δ hoxE-H-Mutante, deren Hydrogenase-Operon deletiert wurde. Das Flavoprotein-Operon *sll0217-sll0218-sll0219* wurde durch Einfügen einer Resistenzkassette (Gentamycin) deletiert. Die Hybridisierung wurde mit einer Dig-markierten Sonde, komplementär zu einem Bereich von *sll0217*, durchgeführt. Aufgetragen wurden jeweils 100 µg DNA, verdaut mit HindIII. *Synechocystis* Wildtyp (WT) zur Kontrolle und DIG-markierter λ -Marker (M) als Größenvergleich.

Der Southern-Blot zeigt, dass bei den untersuchten Δ sll0217-0219-Transformanten des WT und der Δ hoxE-H durch die Sonde ein Fragment größer 4300 bp detektiert wird, beim WT befindet sich der Abschnitt des *sll0217* (komplementär zur Sonde) in einem Fragment von ca. 3000 bp

Länge. Da in keiner der Spuren mehr als eine Bande zu erkennen ist, ist von einer korrekten Segregation dieser Mutanten auszugehen.

Von diesen Mutanten wurden im Anschluss die Wasserstoffproduktion (Abbildung 45 A) und die Dunkelatmung (Abbildung 45 B) bestimmt, um eine Verbindung dieser Untereinheiten zum NDH-1 zu untersuchen. Zusätzlich wurde wie auch schon zuvor mit den NdhD-Mutanten (siehe Abbildung 43) die Aktivität der Cytochrom-bd-Chinoloxidase bestimmt, um Rückschlüsse auf die Reduktion des PQ-Pools durch den NDH-1 zu ziehen (Abbildung 45 C).

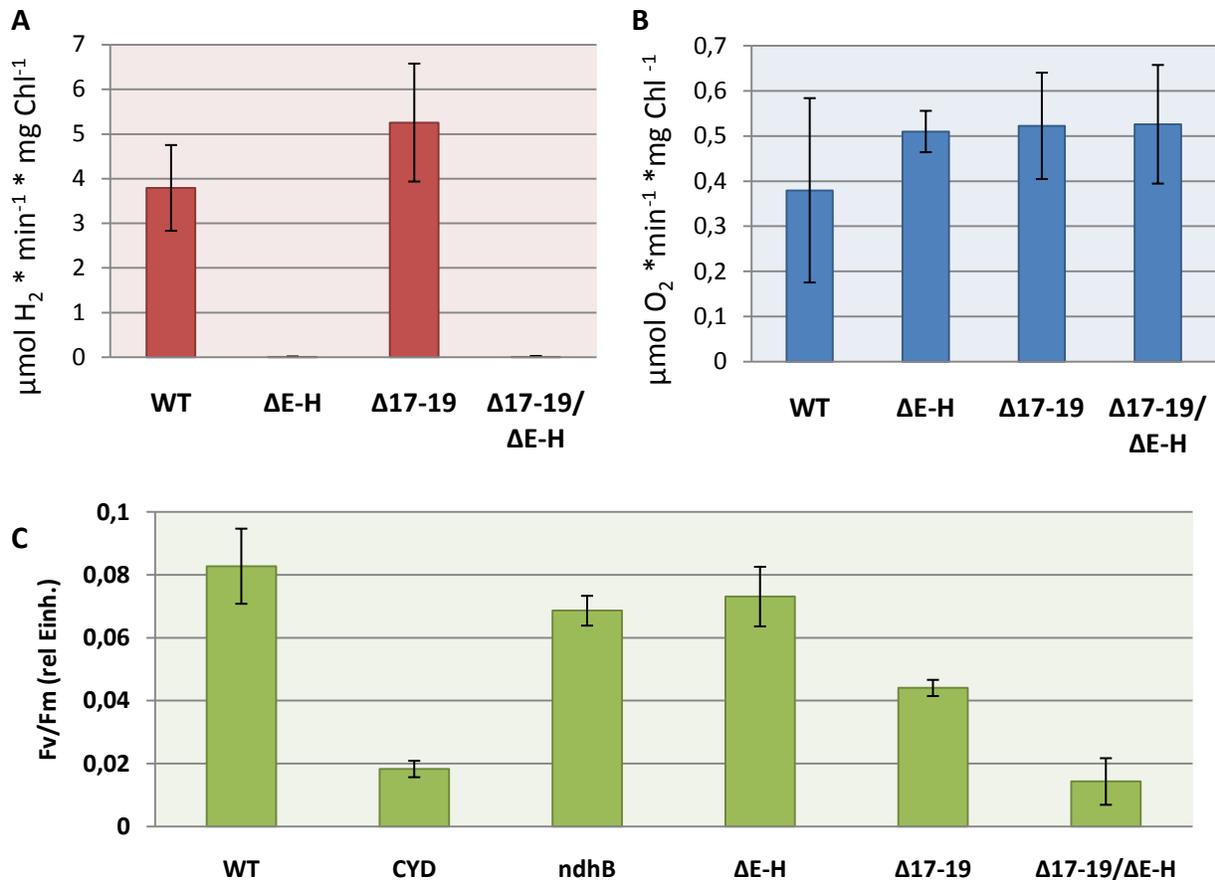


Abbildung 45: Analysen von *Synechocystis*-Mutanten zur Identifizierung der NADPH-oxidierenden Kopfgruppe des NDH-1-Komplexes. Untersucht wurden die Mutanten $\Delta hoxE-H$ ($\Delta E-H$), $\Delta sll0217-sll0219$ ($\Delta 17-19$), $\Delta sll0217-sll0219/\Delta hoxE-H$ ($\Delta 17-19/\Delta E-H$). Gemessen wurde die Aktivität der bidirektionalen Hydrogenase nach Zugabe von reduziertem Methylviologen als Elektronendonator (A), die Atmung im Dunkeln unter Zugabe von 10 mM Glucose (B, Werte wurden ins Positive gespiegelt) und die Aktivität der Cyt-bd-Oxidase unter Zugabe von 20 μM DBMIB und 10 mM Ascorbat (C). Die Aktivität der Cyt-bd-Oxidase wurde auch bei der *ndhB*-Mutante und der Cytochrom-bd-Oxidase-Mutante (CYD) gemessen. Abgebildet sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen von mindestens zwei unabhängigen Messungen.

Die $\Delta hoxE-H$ -Mutanten konnten aufgrund des deletierten Hydrogenase-Operons keine Hydrogenase mehr synthetisieren und somit auch keinen Wasserstoff mehr produzieren. Die $\Delta sll0217-0219$ -Mutante weist dagegen eine leicht erhöhte Wasserstoffproduktion gegenüber

dem WT auf. Die Respirationsraten im Dunkeln sind bei allen untersuchten Mutanten etwas höher als beim WT, unterscheiden sich aber nicht untereinander. Die Aktivität der Cytochrombd-Oxidase der Hydrogenasemutante $\Delta hoxE-H$ entspricht der der *ndhB*-Mutante und ist nicht signifikant geringer als die des WT. Beide Flavoprotein-Mutanten weisen aber eine deutlich geringere Aktivität auf, die der Hydrogenase-Flavoprotein-Doppelmutante befindet sich auf dem Niveau der CYD-Mutante.

5.6 Die Verbreitung des NDH-1

Neben der funktionellen Analyse des cyanobakteriellen NDH-1-Komplexes und der zellulären Lokalisierung soll die Verbreitung dieses Komplexes unter evolutionärem Aspekt analysiert werden. Auch in Plastiden von vielen Pflanzen ist ein NDH-1-Komplex vorhanden (MENG ET AL. 1986). Die Gene für die membranständigen und vielen peripheren Untereinheiten sind dabei im Plastom kodiert (MARTÍN M UND SABATER B 2010). Die Herkunft dieses Komplexes ist in der Endosymbiose eines Cyanobakteriums begründet (MARGULIS 1971). Mit der Vielzahl an sequenzierten und veröffentlichten Plastomen (197, Stand 2010) wird es möglich, die Verbreitung des plastidären NDH-1-Komplexes von Cyanobakterien ausgehend durch den Teil des Stammbaums des Lebens, der Plastiden besitzt, zu verfolgen.

Die vom National Center of Biotechnology Information (NCBI) im Internet veröffentlichten und annotierten Plastome wurden auf das Vorhandensein von NDH-1-Genen untersucht, die Gene *ndhA-ndhK*. Deren Produkte stellen den bakteriellen Kern des NDH-1-Komplex dar, allerdings fehlen wie auch bei den Cyanobakterien die Gene für die NAD(P)H-umsetzende Kopfgruppe, die bei den Bakterien und Mitochondrien aus drei Untereinheiten gebildet wird (siehe Tabelle 2). Der Fokus der Plastomforschung lag eher im Bereich der Nutzpflanzen, es wurden vermehrt Kulturpflanzen aus dem Bereich der Mono- und Dikotyledonen untersucht. Erst in jüngster Zeit wurden verstärkt Plastome aus dem Bereich der Protisten sequenziert, einzelliges Plankton, deren Plastiden z.T. keine photosynthetische Funktion mehr ausüben. Abgesehen von zwei Grünalgen aus der Klasse der Prasinophyceae und einer Amöbe (*Paulinella chromatophora*) wurden in dieser Gruppe bisher keine weiteren Plastome mit NDH-1-Genen identifiziert (Abbildung 46) weder bei den Rotalgen noch bei den Glaucophyta mit ihren ursprünglichen Plastiden, den Cyanellen. Diese beiden werden zusammen mit den *Chloroplastida*, zu denen die Grünalgen (Chlorophyta) gehören, in die Gruppe der Archaeplastida gestellt (ADL ET AL. 2005). Sie besitzen Plastiden mit zwei Hüllmembranen, die aus der primären Endosymbiose hervorgehen. Die Plastiden vieler Gruppen weisen aber drei oder vier Hüllmembranen auf, diese gehen auf verschiedene Vorgänge der sekundären Endosymbiose zurück. Dabei wurde von einer

eukaryotischen Zelle eine weitere Zelle aufgenommen, die bereits eine Plastide besaß. Diese aufgenommene Zelle wurde zur sekundären Plastide reduziert. Die systematische Einteilung dieser durch sekundäre Endosymbiose entstandenen Organismen ist nicht entgültig geklärt und unterliegt auch durch neue phylogenetische Analysen einem stetigem Wandel (ADL ET AL. 2005). In einigen Gruppen sind auch sekundäre Plastiden vom Grünalgentyp vorhanden, z.B. bei Euglena und Chlorarachniophyta. In der großen Gruppe der Chromalveolata, die sekundäre Plastiden vom Rotalgentyp besitzen, sind – wie auch in den Schwestertaxa, den Excavata und Rhizaria – keine NDH-1-Gene im Plastom vorhanden.

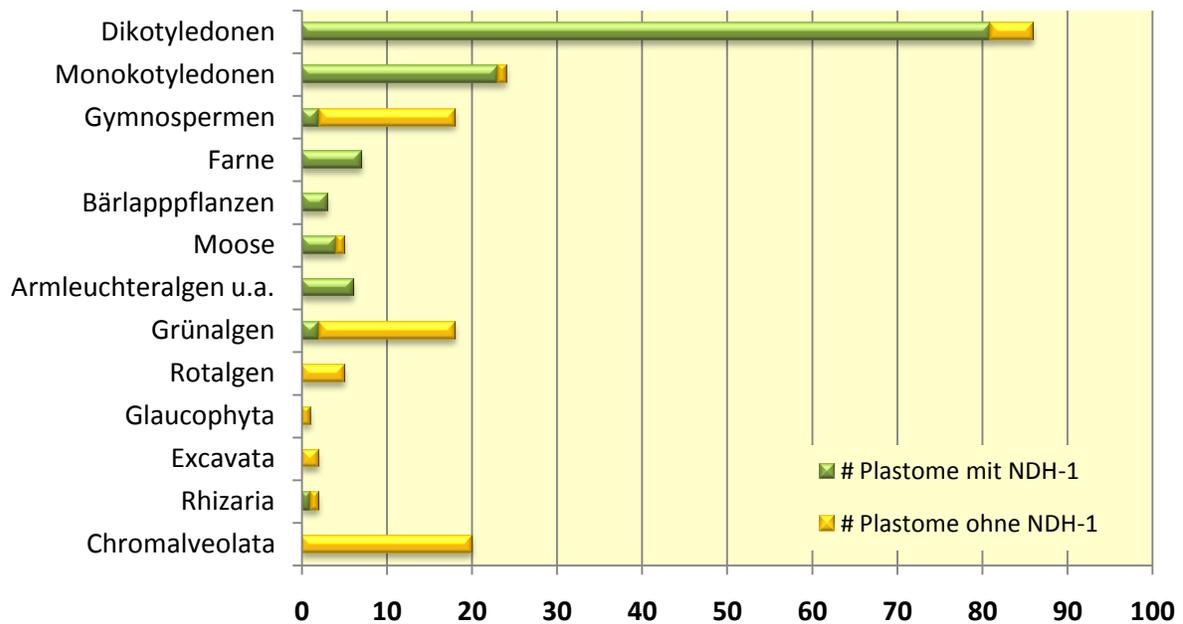


Abbildung 46: Die Verteilung des NDH-1-Komplexes in Plastiden von plastidentragenden Einzellern, Algen und Pflanzen. Untersucht wurden die bisher sequenzierten und annotierten Plastome auf das Vorhandensein der Gene *ndhA-ndhK*. Unter den Armleuchteralgen sind auch Jochalgen und *Mesostigma viride* zusammengefasst.

Eine Besonderheit unter den Rhizaria stellt die Cercozoe *Paulinella chromatophora* dar. Deren namengebende jeweils paarig vorhandenen Chromatophoren wurden schon von ihrem Entdecker R. Lauterborn (1895) als andersartig herausgestellt: Diese Chromatophoren stellen vermutlich Plastiden dar, die nicht auf die primäre Endosymbiose zurückzuführen sind, die zu den Chloroplasten der Archaeplastida führte. Vielmehr handelt es sich um eine weitere primäre Endosymbiose, die vor erheblich kürzerer Zeit stattfand (YOON ET AL. 2009) und deren hervorgegangene Plastiden noch keiner so starken Plastom-Reduktion unterlagen (BODYŁ ET AL 2007, MELKONIAN UND MOLLENHAUER 2005). In dem Plastom dieser als Chromatophoren bezeichneten Plastiden befindet sich nicht nur der komplette Satz an NDH-1-Genen (*ndhA-*

ndhK), sondern von den Untereinheiten *ndhD* und *ndhF* existieren wie bei den Cyanobakterien auch mehrere Homologe.

In der Gruppe der Chloroplastida, die alle Plastiden vom Grünalgentyp (Chloroplasten) enthalten, findet der Übergang von Algen zu Landpflanzen statt. Während bei den Grünalgen (Chlorophyta), wie oben erwähnt, nur einige bisher untersuchte Plastome die NDH-1-Gene enthalten (in der Klasse der Prasinophyceae), ist bei *Mesostigma viride*, deren Klasse (Mesostigmatophyceae) an die Basis der Chloroplastida gestellt wird, das komplette Set an NDH-1-Genen vorhanden. Dies gilt ebenso für die höher entwickelten Algen, die Jochalgen und Armlauchteralgen (Charales). Bei allen bisher untersuchten Moosen (mit Ausnahme einer parasitischen Art) und Farnen wurden die NDH-1-Gene identifiziert. Dies gilt auch für die Schwestergruppe der Farne, die Bärlappgewächse.

Zu den Gymnospermen mit plastidären NDH-1-Genen gehören ein Palmfarn und eine Zypresse. Letztere gehört zusammen mit den Kieferngewächsen (Pinaceae) zu der Ordnung der Koniferen (Koniferales). Aus der Familie der Kieferngewächse wurden neun 9 verschiedene *Pinus*-Arten sequenziert, die jedoch keine plastidären NDH-1-Gene bzw. nur ein *ndhB*-Pseudogen ($\Psi ndhB$) enthalten. Auch in den drei Plastomen aus der Ordnung der *Gnetales* konnten keine NDH-1-Gene bzw. nur das $\Psi ndhB$ identifiziert werden.

Der Großteil der sequenzierten Plastome stammt von den Mono- und Dikotyledonen (110 von 197). Von diesen weisen die meisten die Gene *ndhA-ndhK* auf. Schon in der basalsten Gattung der Monokotyledonen, den Kalmusartigen (Acorales), sind diese Gene in den beiden sequenzierten Plastomen vorhanden. Bei den Monokotyledonen fehlen einer Orchidee (*Phalaenopsis aphrodite*) diese Gene. Dikotyledonen ohne plastidär-kodierten NDH-1-Komplex sind der Wurzelparasit Sommerwurz und die parasitisch lebenden *Cuscuta*-Arten, die jedoch z.T. das $\Psi ndhB$ enthalten.

In allen Plastomen mit NDH-1-Genen (*ndhA-ndhK*) ist das *ndhB*-Gen häufig doppelt vorhanden, es befindet sich dann in den Inverted-Repeat-Regionen (IR) des zirkulären Plastoms. Im Stammbaum der plastidenbesitzenden Organismen tritt dieses Phänomen zum ersten Mal bei dem Hornmoos *Anthoceros formosae* auf und findet sich auch bei einigen Farnen und einigen Gymnospermen wieder. Bei den Mono- und Dikotyledonen ist dies aber die Regel, mit Ausnahme der Leguminosen, deren Plastome keine Inverted-Repeats aufweisen. Bei den Mono- und Dikotyledonen sind manchmal neben dem *ndhB* auch andere Gene in die IR-Region verlagert worden. Dazu gehören das *ndhH* und seltener das *ndhA*, *ndhF* und *ndhG*.

Während bei fast allen Landpflanzen die Gene *ndhA-ndhK* im Plastom kodiert sind, mit wenigen Ausnahmen von parasitisch lebenden Pflanzen und der Ordnung der Kieferngewächse, sind die Plastiden der meisten einzelligen wasserlebenden Organismen frei von den NDH-1-Genen. Nur

in zwei Plastomen aus der Gruppe der Prasinophyceae, die eine basale Stellung der Grünalgen bei Aufspaltung der Archaeplastida einnehmen (ARCHIBALD 2009), sind die NDH-1-Gene vorhanden.

5.6.1 Stammbaumanalysen der cyanobakteriellen NdhD-Untereinheiten

Bei vielen bisher untersuchten Cyanobakterien wurden von den NdhD- und NdhF-Untereinheiten mehrere Paraloge gefunden: *Synechocystis* besitzt 4-6 *ndhD*- und 3 *ndhF*-Gene. Ähnliches gilt auch für die Cercozoae *Paulinella chromatophora*. Diese hat in einer weiteren primären Endosymbiose ein Cyanobakterium aus der *Synechococcus*-Gruppe aufgenommen (YOON ET AL. 2006). Das Genom dieser Endosymbionten ist noch nicht so stark reduziert wie die Plastome, es beinhaltet noch 3 *ndhD*- und 2 *ndhF*-Gene. Diese Untereinheiten begründen in Cyanobakterien den modularen Aufbau des NDH-1-Komplexes mit den unterschiedlichen physiologischen Funktionen, die bei *Paulinella* auch ausgeübt werden könnten. Deshalb ist es von großem Interesse, die Verwandtschaften der NdhD- und NdhF-Untereinheiten zu ergründen. Dies könnte einen Teil dazu beitragen, weitere Einsichten in die Entstehung der Plastiden, ausgehend von der Endosymbiose von Cyanobakterien, zu erlangen. Dabei befindet sich die Aufspaltung der plastidentragenden Organismen in die Archaeplastida und die Herkunft der sekundären und tertiären Plastiden der *Chromalveolata* im Fokus. Die Evolution der Landpflanzen, die zum überwiegenden Teil noch einen plastidären NDH-1-Komplex mit plastidär kodierten Genen besitzen, kann zurück zu dem Punkt nachverfolgt werden, wo sich Grünalgen und ursprüngliche Pflanzen getrennt haben. Allerdings besteht hier noch ein großer Bedarf an der Plastom-Sequenzierung weiterer Grünalgen, Chromalveolaten und anderer plastidenbesitzender Einzeller.

Untersucht wurden zunächst die NdhD-Untereinheiten von *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (identisch mit *N. punctiforme* PCC 73102), *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, *Paulinella chromatophora*. Als Vergleich dienten die sechs NdhD-Untereinheiten aus *Synechocystis* (Abbildung 47). Die NdhD-Untereinheiten entstanden wahrscheinlich genauso wie die NdhF- und NdhB-Untereinheiten aus einer mehrfachen Genduplikation eines gemeinsamen Vorläufers (FEARNLEY UND WALKER 1992, KIKUNO UND MIYATA 1985), weshalb sich diese (NdhF und NdhB) als „Outgroup“ anbieten. Ebenso mit einbezogen wurden Untereinheiten verwandter Membrantransporter EchA, MrpA und MrpD (TORRES-BACETE ET AL. 2007, siehe 2.5). Es wurden Stammbäume mit den Methoden Maximum Likelihood (ML), Maximum Parsimony (MP) und Fitch-Margoliash (FM) erstellt (siehe 4.10) und zu einem Stammbaum vereint. Die Annotationen der Proteine erfolgten nach Cyanobase (cyanobakterielle Proteine) bzw. NCBI. Als weiteres wurden

für die NdhD- und NdhF-Proteine aus ausgewählten Cyanobakterien, Grünalgen und weiteren Algen, Landpflanzen wie Moose, Farne, Nackt- und Bedecktsamer (*Gymnospermae* und *Magnoliopsida*) jeweils ein Stammbaum erstellt (Abbildung 48 bzw. Abbildung 49). Anhand des NdhD-Stammbaumes (Abbildung 47) wurden die Annotierungen der NdhD-Untereinheiten in Bezug auf die *Synechocystis*-Bezeichnungen (NdhD1-NdhD6) überprüft. So zeigt sich, dass die beiden Untereinheiten NdhD5 und NdhD6, die sich in einem Operon befinden, mit den anderen vier NdhD-Untereinheiten nicht so nah verwandt sind wie diese vier untereinander. NdhD5 bzw. NdhD6 sind näher mit den als Outgroup eingesetzten Untereinheiten NdhF und NdhB verwandt.

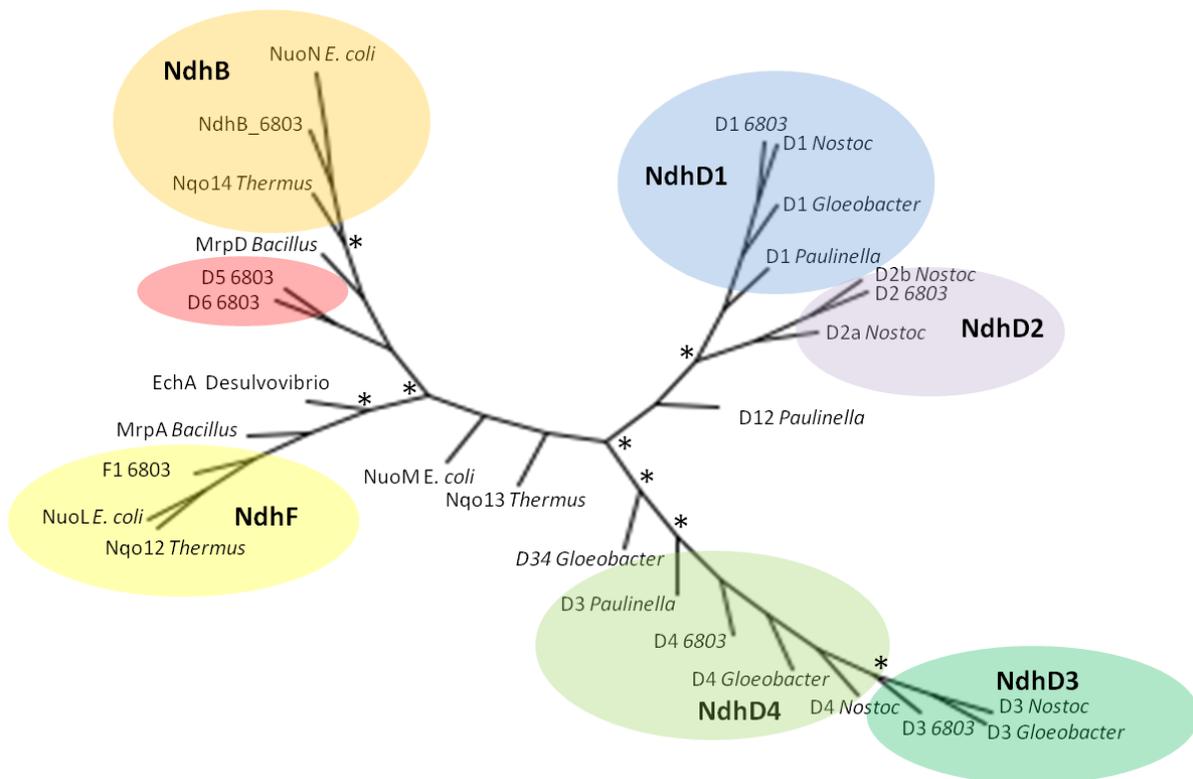


Abbildung 47: Phylogenetischer ungewurzelter Stammbaum (Überlagerung von Bäumen, die mit Maximum Parsimony, Fitch-Margolish und Maximum Likelihood erstellt wurden) von NdhD-Untereinheiten und verschiedener verwandter Transporter-Untereinheiten von Cyanobakterien, Bakterien und der Cercozoee *Paulinella chromatophora*. Sterne geben die Bestimmtheit der Abzweigungen an (min. 2x > 80 % der Bootstraps von Maximum Parsimony, Fitch-Margolish und Maximum Likelihood). *Bacillus subtilis* sp. *subtilis* (**Bacillus**): MrpA (ZP_03592950.1) und MrpD (CAB15152.3); *Desulfovibrio gigas* (**Desulfovibrio**): EchA (AAP51025.1); *Escherichia coli* (**E. coli**): NuoL (ACT39859.1), NuoM (NP_416780.1) und NuoN (NP_416779.2); *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 (**Gloeobacter**): D1 (*glr0219*), D3 (*glr1004*), D34 (*gll2536*) und D4 (*gll2082*); *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (**Nostoc**): D1 (Npun_R6182), D2a (Npun_R0529), D2b (Npun_R0955), D3 (Npun_F3688), D4 (Npun_R4289); *Paulinella chromatophora* (**Paulinella**): D1 (PCC_0320), D2 (PCC_0871) und D3 (PCC_0916); *Synechocystis* PCC 6803 (**6803**): D1, D2, D3, D4, F1, B (Genbezeichnungen: siehe Tabelle 12); *Thermus thermophilus* (**Thermus**): Nqo12 (AAA97949.1), Nqo13 (AAA97950.1) und Nqo14 (AAA97951.1).

Die NdhD-Untereinheiten von *E. coli* (NuoM) und *Thermus thermophilus* (Nqo13) bilden von der AS-Sequenz betrachtet eine Brücke zwischen den verwandten Untereinheiten NdhB und NdhF zu den cyanobakteriellen (und damit auch plastidären) NdhD-Untereinheiten.

Eine deutliche Aufspaltung der NdhD3/D4-Untereinheiten von den NdhD1/D2-Untereinheiten sowie ebenfalls eine tiefere Trennung dieser Äste in NdhD1 und NdhD2 (bzw. NdhD3 und NdhD4) sind zu erkennen. Die Trennung von NdhD3 und NdhD4 wird aber bei Bäumen, die mit dem Fitch-Margoliash-Algorithmus berechnet wurde, deutlicher. Die NdhD-Untereinheiten von *P. chromatophora* lassen sich nur bedingt in diese Kategorien einordnen: Die als NdhD1 bezeichnete Untereinheit befindet sich im Ast der cyanobakteriellen NdhD1, auch in den Stammbäumen mit plastidären NdhDs (Abbildung 48). Die NdhD2-Untereinheit von *P. chromatophora* zweigt direkt vom NdhD1/D2-Ast ab, während die NdhD3-Untereinheit von der Wurzel des NdhD3/D4-Astes abzweigt.

5.6.2 Stammbaumanalysen der NdhD- und NdhF-Untereinheiten

Zusätzlich zu den cyanobakteriellen Untereinheiten wurde auch eine Auswahl plastidärer NdhD- und NdhF-Untereinheiten phylogenetisch analysiert (siehe Tabelle 14 im Anhang). Auch hier wird die Abspaltung der NdhD3/D4-Untereinheiten von den NdhD1/D2-Untereinheiten deutlich (Abbildung 48). Am nächsten verwandt mit den plastidären NdhD-Untereinheiten der Algen und Pflanzen ist das cyanobakterielle NdhD1. Dies gilt auch für das NdhF (Abbildung 49). Hier steht das NdhF1 der Cyanobakterien an der Basis des NdhF der Plastiden. Die NdhF3- bzw. NdhF4-Untereinheiten sind deutlich voneinander und von der NdhF1-Gruppe getrennt.

Von den 16 untersuchten Grünalgen (Abbildung 46) gehören acht zu der Klasse der Prasinophyceae. Von diesen acht enthalten zwei Plastome die NDH-1-Gene. Die Klasse der Prasinophyceae zählt zu der basalsten Klasse der Grünalgen (ARCHIBALD 2009) und ist am nächsten mit der Gruppe der Charophyta verwandt, zu der neben Armeleuchter- und Jochalgen auch die Pflanzen gehören. Die Klassifizierung der Organismen in dem engen Bereich der Aufspaltung der Organismen der Streptophyta (auch Streoptophytina genannt, mit den Armeleuchteralgen und den Pflanzen) und den Chlorophyta (Grünalgen, zu denen oft auch die Prasinophyceae gezählt werden) ist nicht gesichert und erfolgt oft ohne die klassischen Rangstufen mit vielen Gruppenbezeichnungen ohne Rang. Eine Sonderstellung nimmt *Mesostigma viride* ein, die lange Zeit zu den Grünalgen gerechnet wurde, durch neuere phylogenetische Analysen wird sie aber zwischen den Chlorophyta und den Charophyta eingeordnet. Dies wird durch die in dieser Arbeit durchgeführten Stammbäume bekräftigt. Von den unter Armeleuchteralgen zusammengefassten Algen ausgehend lässt sich die Entwicklung

beider Untereinheiten über die Moose und Farne verfolgen. Die Abtrennung der Gymnospermen von den Angiospermen ist in beiden Bäumen deutlich erkennbar, ebenso die Auftrennung von Mono- und Dikotyledonen. Eine Ausnahme bildet allerdings die Familie der Kalmusgewächse (Acoraceae).

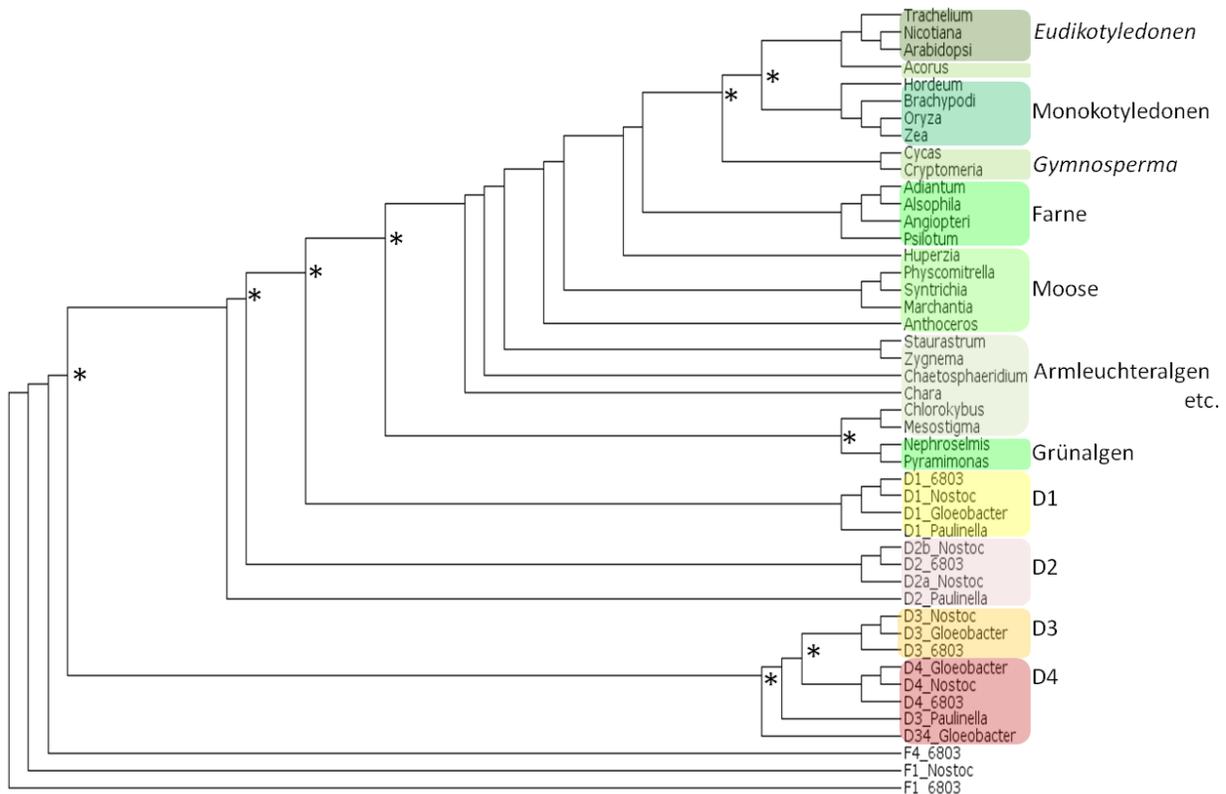


Abbildung 48: Phylogenetischer Stammbaum von den NdhD-Untereinheiten und verschiedenen verwandten Transporter-Untereinheiten von Cyanobakterien, Bakterien und der Cercozoe *Paulinella chromatophora*. Sterne (*) geben die Bestimmtheit der Abzweigungen an (> 70 % der Bootstraps von Maximum Parsimony, Maximum Likelihood und Fitch-Margoliash). Untersucht wurden folgende bakterielle Untereinheiten: *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 (**Gloeobacter**): D1 (*glr0219*), D3 (*glr1004*), D34 (*gll2536*) und D4 (*gll2082*); *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (**Nostoc**): D1 (Npun_R6182), D21 (Npun_R0529), D22 (Npun_R0955), D3 (Npun_F3688), D4 (Npun_R4289); *Synechocystis* PCC 6803 (**6803**): D1, D2, D3, D4: Genbezeichnungen: siehe Tabelle 12). Weiterhin wurden auch NdhD-Untereinheiten, kodiert in den Plastomen folgender Organismen, untersucht: *Acorus americanus* (YP_001586231.1), *Adiantum capillus-veneris* (NP_848110.3), *Alsophila spinulosa* (YP_002970695.1), *Angiopteris evecta* (YP_001023751.1), *Anthoceros formosae* (NP_777464.1), *Arabidopsis thaliana* (NP_051109.2), *Brachypodium distachyon* (YP_002000535.1), *Chaetosphaeridium globosum* (NP_683852.1), *Chara vulgaris* (YP_635798.1), *Chlorokybus atmophyticus* (YP_001019158.1), *Cryptomeria japonica* (YP_001806697.1), *Cycas taitungensis* (YP_001312266.1), *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* (YP_874702.1), *Huperzia lucidula* (YP_209567.2), *Marchantia polymorpha* (NP_039348.1), *Mesostigma viride* (NP_038432.1), *Nephroselmis olivacea* (NP_050918.1), *Nicotiana tabacum* (NP_054557.2), *Oryza sativa* (NP_039444.1), *Paulinella chromatophora* (**Paulinella**): D1 (PCC_0320), D2 (PCC_0871) und D3 (PCC_0916); *Physcomitrella patens* ssp. *patens* (NP_904238.1), *Psilotum nudum* (BAB84274.1), *Pyramimonas parkeae* (YP_002600963.1), *Staurastrum punctulatum* (YP_636368.1), *Syntrichia ruralis* (YP_002586971.1), *Trachelium caeruleum* (YP_001718709.1), *Zea mays* (NP_043087.1), *Zygnema circumcarinatum* (YP_636507.1). Als Outgroup wurden die NdhF-Untereinheiten von *Synechocystis* (F1 und F4) und von *N. punctiforme* (F1: Npun_R6185) verwendet.

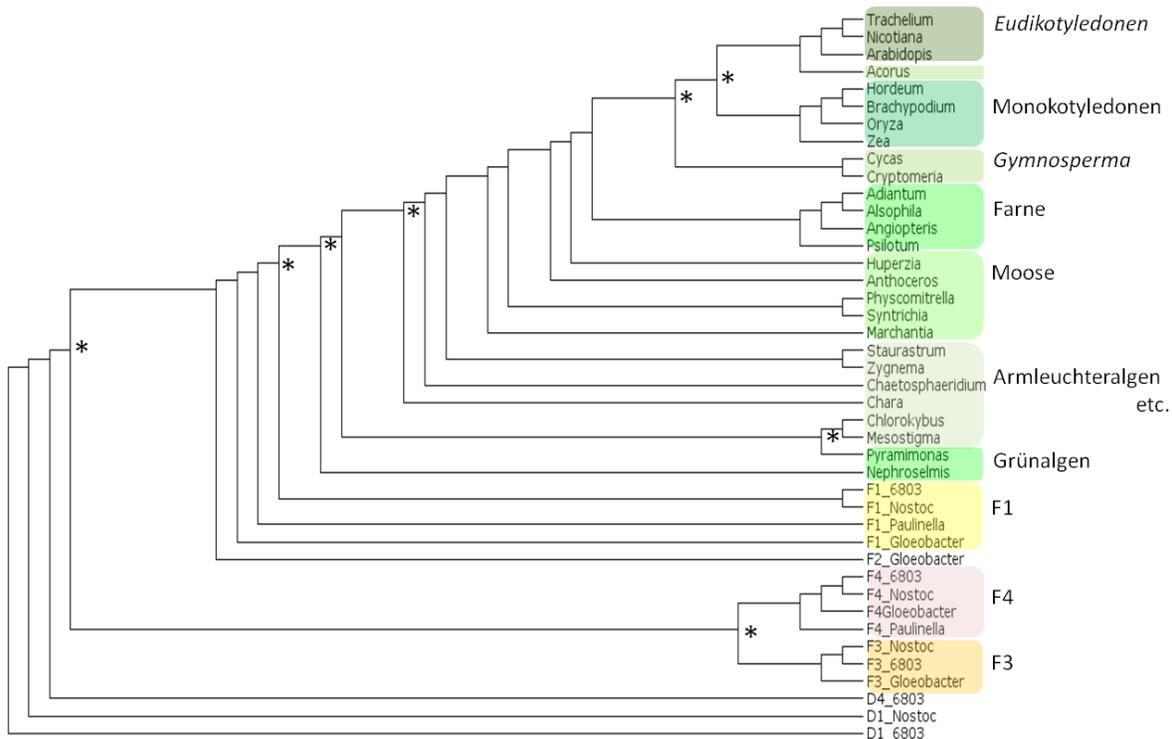


Abbildung 49: Phylogenetischer Stammbaum von den NdhF-Untereinheiten und verschiedenen verwandten Transporter-Untereinheiten von Cyanobakterien, Bakterien und der Cercozoe *Paulinella chromatophora*. Sterne (*) geben die Bestimmtheit der Abzweigungen an (> 70 % der Bootstraps von Maximum Parsimony, Maximum Likelihood und Fitch-Margoliash). Untersucht wurden folgende bakterielle Untereinheiten: *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 (**Gloeobacter**): F1 (*glr0218*), F2 (*glr2599*), F3 (*glr1003*) und F4 (*gll2083*); *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (**Nostoc**): F1 (Npun_R6185), F3 (Npun_F3686), F4 (Npun_R4290); *Synechocystis* PCC 6803 (**6803**): F1, F3, F4, Genbezeichnungen: siehe Tabelle 12). Weiterhin wurden auch NdhD-Untereinheiten, kodiert in den Plastomen folgender Organismen, untersucht: *Acorus americanus* (YP_001586228.1), *Adiantum capillus-veneris* (NP_848106.3), *Alsophila spinulosa* (YP_002970691.1), *Angiopteris evecta* (YP_001023747.1), *Anthoceros formosae* (NP_777459.1), *Arabidopsis thaliana* (NP_051106.1), *Brachypodium distachyon* (YP_002000532.1), *Chaetosphaeridium globosum* (NP_683848.1), *Chara vulgaris* (YP_635794.1), *Chlorokybus atmophyticus* (YP_001019159.1), *Cryptomeria japonica* (YP_001806706.1), *Cycas taitungensis* (YP_001312262.1), *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* (YP_874699.1), *Huperzia lucidula* (YP_209571.1), *Marchantia polymorpha* (NP_039343.1), *Mesostigma viride* (NP_038452.1), *Nephroselmis olivacea* (NP_050919.1), *Nicotiana tabacum* (NP_054554.1), *Oryza sativa* (NP_039441.1), *Paulinella chromatophora* (**Paulinella**): F1 (PCC_0319), F4 (PCC_0915); *Physcomitrella patens* ssp. *patens* (NP_904235.1), *Psilotum nudum* (NP_569681.1), *Pyramimonas parkeae* (YP_002600967.1), *Staurastrum punctulatum* (YP_636370.1), *Syntrichia ruralis* (YP_002586974.1), *Trachelium caeruleum* (YP_001718706.1), *Zea mays* (NP_043084.1), *Zygnema circumcarinatum* (YP_636547.1). Als Outgroup wurden die NdhD-Untereinheiten von *Synechocystis* (D1 und D4) und von *N. punctiforme* (D1: Npun_R6182) verwendet.

Diese stellt die basalste Gruppe der Monokotyledonen dar. Die NDH-1-Untereinheiten NdhD und NdhF von ihrem Vertreter *Acorus calamus* sind näher mit den Untereinheiten der Magnoliopsida (und dort der Eudikotyledonen) verwandt als mit den anderen Gymnospermen und den Monokotyledonen.

Zusammenfassend lässt sich die Verwandtschaft der plastidären NdhD- und NdhF-Untereinheiten zu den cyanobakteriellen NdhD1 bzw. NdhF1 belegen. Weiterhin kann nun – ausgehend von der Annotierung der NdhD- und NdhF-Untereinheiten von *Synechocystis* – die Zuordnung und eine Neubenennung dieser Untereinheiten (NdhD und NdhF) von *N. punctiforme*, *G. violaceus* und *P. chromatophora* diskutiert werden.

6 Diskussion

Die unter dem Sammelbegriff NDH-1 zusammengefassten Komplexe von *Synechocystis* PCC 6803 gehören zu der Klasse der Oxidoreduktasen mit NAD(P)H als Elektronendonator und unterschiedlichen Chinonen als Elektronenakzeptoren (EC 1.6.5.3). Während bei den homologen Komplexen der Bakterien und Mitochondrien NADH als Elektronendonator dient (YAGI ET AL. 1998), ist es bei dem cyanobakteriellen und dem verwandten plastidären Komplex nicht abschließend geklärt, ob neben NADPH nicht doch NADH verwendet wird (BIGGINS 1969, MATSUO ET AL. 1998, DENG ET AL. 2003). Neben der offenen Substratfrage liegen weitere wichtige Parameter des cyanobakteriellen NDH-1-Komplexes im Dunkeln: Die Lokalisierung in den Membranen ist nicht eindeutig bekannt. Neueste Ergebnisse in *A. thaliana* lassen aber nicht nur eine Kolo-kalisierung sondern eine direkte Bindung des NDH-1 mit dem PS I vermuten (PENG ET AL. 2008, 2009 und SIRPIO ET AL. 2009).

Das Vorkommen aller durch unterschiedliche Kombination der Untereinheiten möglichen verschiedenen NDH-1-Komplexe in den vorhandenen Membransystemen konnte auch mit neuesten Proteomics-Analysen nicht eindeutig belegt werden. Das größte Fragezeichen der NDH-1-Forschung liegt aber auf der bei Cyanobakterien und Plastiden fehlenden NAD(P)H-umsetzenden Kopfgruppe. In Bakterien wird diese aus den Untereinheiten NuoE, NuoF und NuoG gebildet.

Mit den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden wichtige Fragen zur Lokalisierung und der Funktion der unterschiedlichen NDH-1-Komplexe sowie zur fehlenden NADPH-reduzierenden Kopfgruppe untersucht.

6.1 Die subzelluläre Lokalisierung der NDH-1-Komplexe

Die Lokalisierung der NDH-1-Komplexe in Cyanobakterien ist bis heute eine offene Frage der NDH-1-Forschung. Eine unterschiedliche Verteilung der verschiedenen Komplexe auf Plasma- und Thylakoidmembran wurde postuliert, konnten aber nie eindeutig belegt werden.

Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Lokalisierung lassen sich z.T. auf die unterschiedlichen Methoden der Membranisolierung und -trennung zurückführen. Neben der in dieser Arbeit angewandten Methode (siehe 4.8.1 und 4.8.2) wird oft auch das System der Zwei-Phasen-Trennung (NORLING ET AL. 1998) verwendet. Mittels letzterem erhält man bis zu 10 verschiedene Fraktionen, die selektiv durch Western-Blot mit membranspezifischen Antikörpern ausgewählt werden. Ob dabei eine falsche oder zu selektive Auswahl getroffen wird, kann nicht ausgeschlossen werden. Dazu kommt, dass die Interaktion der PM mit der TM (LIBERTON ET AL.

2006) und ein Austausch zwischen diesen beiden Membransystemen immer noch Gegenstand der aktuellen Forschung sind. Für die Photosysteme konnte gezeigt werden, dass sich die Vorstufen bereits in der Plasmamembran assemblieren (ZAK ET AL. 2001). Nach dem Transport in die Thylakoidmembran werden dort die aktiven Komplexe zusammengesetzt. Wahrscheinlich findet dieser Transport über Vesikel statt, die sich aus der Plasmamembran abschnüren und durch Lücken in den Thylakoidmembranschichten wandern können (NEVO ET AL. 2007). Die Gültigkeit der Aussagen bezieht sich jedoch auf das Zwei-Phasen-System zur Trennung der dort untersuchten Membranen.

Bei den eigenen Untersuchungen zur Lokalisierung wurde deshalb auf ein anderes etabliertes System der Membrantrennung (MURATA UND OMATA 1983) zurückgegriffen. Die isolierten Membranfraktionen wurden sowohl mit einer photometrischen Analyse (Abbildung 13) als auch mit Western-Blot auf ihre Reinheit überprüft (siehe 5.1.1, Abbildung 14), unter dem Vorbehalt, dass durch oben genannten Membranaustausch vielleicht keine reinen Membranen erhalten werden können. Die Untersuchung mit beiden Methoden ergab, dass die Plasmamembran sauber, die Thylakoidmembran jedoch leicht mit Plasmamembran verunreinigt ist. Falls die Antikörper zur Kontrolle der Reinheit der beiden Fraktionen aber deutlich unspezifischer sind als der zur Identifizierung der NDH-1-Komplexe verwendete NdhK-Antikörper, könnte durch letzteren eine doch vorhandene Verunreinigung der PM nachgewiesen werden.

Untersuchungen zur Lokalisierung der NDH-1-Komplexe mittels Western-Blot (mit dem Primärantikörper gegen die NDH-1-Untereinheit NdhK) zeigten in mehreren untersuchten PM-Fraktionen deutliche Signale, deren Höhe dem NDH-1M entsprechen (Abbildung 16). Ob dies für ein Vorkommen eines (aktiven) NDH-1M in der Plasmamembran spricht oder ob es sich um eine Assemblierungs-Zwischenstufe von einem unfertigen NDH-1M in der PM zu einem aktiven NDH-1L in der TM handelt, konnte nicht eindeutig belegt werden. Mit dieser Methode wurde aber kein NDH-1L oder NDH-1L' in der PM nachgewiesen, eine differenzierte Verteilung dieser beiden Komplexe auf beide Membranen kann also ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse ergänzen das Bild der Membran-Lokalisierung der NDH-1-Komplexe in Cyanobakterien. In Cyanobakterien mit Thylakoidmembransystem wie *Synechocystis* wurde für die NDH-1-Komplexe ursprünglich eine Verteilung in beiden Membranen (Thylakoid- und Plasmamembran) beschrieben (BERGER ET AL. 1991, PIEULLE ET AL. 2000), ebenso in *Anacystis nidulans* (DWORSKY ET AL. 1995). Eine Lokalisierung von NDH-1-Komplexen nur in der TM von *Synechocystis* wurde von OGAWA (1992) und OHKAWA ET AL. (2001, 2002) ermittelt, die NDH-1-Untereinheiten NdhJ, NdhK, NdhD3 und NdhF3 wurden von ZHANG ET AL. (2004) ebenfalls ausschließlich in der TM identifiziert. Dies gilt auch für die CupB-Untereinheit des NDH-1MS' (XU ET AL. 2008). Bei *Nostoc (Anabaena)* PCC 7120 wurden NDH-1-Komplexe hingegen nur in isolierter Plasmamembran

gefunden (HOWITT ET AL. 1993). Auch eine unterschiedliche Lokalisierung der verschiedenen NDH-1-Komplexe, abhängig von ihrer Zusammensetzung oder Funktion, wird angenommen. Für den NDH-1MS' eines *Synechococcus*-Stammes konnte eine Insensitivität gegenüber einer Behandlung mit DMCU gezeigt werden, daher wurde eine Lokalisierung dieses Komplexes in der PM postuliert (MAEDA ET AL. 2002). In Cyanobakterien ohne internes Thylakoidmembransystem (*G. violaceus*) befinden sich die NDH-1-Komplexe zwangsläufig in der Plasmamembran (PM), während der plastidäre NDH-1 in der Thylakoidmembran identifiziert wurde.

Für eine genauere Analyse der intrazellulären Lokalisierung wurde auf die Immungold-Markierung des NDH-1 zurückgegriffen. Ein weiterer Nachweis *in vivo* sollte mit GFP-Fusionskonstrukten erfolgen. Beide Methoden kommen ohne Membranisolierungen und den damit verbundenen Fehlerquellen aus. Bei der Immungoldmarkierung zeigte sich, dass auch in der Negativkontrolle (ndhB-Mutante) Goldpartikel sichtbar waren, allerdings um den Faktor 3 bis 5 weniger als bei dem WT und den anderen untersuchten NDH-1-Mutanten (siehe Tabelle 7). Eine unspezifische Markierung der Matrix der Dünnschnitte konnte ausgeschlossen werden. Ob es sich aber um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Zellfläche oder an Membranen handelt, wurde durch eine ausführliche Analyse untersucht.

Es wurde deutlich, dass sich bei der Negativkontrolle (ndhB-Mutante) die Markierungsraten der beiden Membranen und des Cytosols auf ähnlichem Niveau befinden, welches der Cytosol-Markierung des WT und der übrigen Mutanten entspricht (siehe Abbildung 20) und als Fehler dieser Methode gewertet werden muss. Der Anteil der markierten NDH-1-Komplexe in der Thylakoidmembran und der Plasmamembran in der ndhB-Mutante ist deutlich geringer als beim WT und der anderen NDH-1-Mutanten, was dem Ergebnis der Western-Blot-Analyse entspricht. Genaue Aussagen sind – bedingt durch die hohen Standardabweichungen – schwierig zu treffen, weitere Untersuchungen mit deutlich mehr Dünnschnitten könnten hier zur Genauigkeit beitragen. Es sollten dann auch zusätzlich die Mutanten D34, D134 und D234 analysiert werden, um eine spezifische Verteilung des NDH-L und des NDH-L' auf die Membransysteme (siehe oben) auszuschließen.

Für die Fusionsmethode wurden *Synechocystis*-Mutanten erzeugt, die Fusionskonstrukte von GFP mit verschiedenen NDH-1-Untereinheiten (NdhD1, NdhD2, NdhF1 und NdhJ) enthalten. Der GFP-Nachweis sollte im CLS-Mikroskop erfolgen. Dieser Ansatz führte leider zu keinem Ergebnis, da Probleme entweder mit der Fusionierung oder im weiteren Verlauf mit der Segregation der Mutanten auftraten.

6.2 Die Bedeutung der NdhD-Untereinheiten für die NDH-1-Komplexe

Durch Kombination der verschiedenen NdhD- und NdhF-Untereinheiten entstehen unterschiedlich zusammengesetzte NDH-1-Komplexe. Um den funktionellen Einfluß der NdhD-Untereinheiten – vor allem von NdhD1 und NdhD2 – genauer zu charakterisieren, wurden weitere Mutanten benötigt. Die D134-Mutante, die nur noch die NdhD2-Untereinheit enthält, also nur den NDH-1L' assemblieren kann, konnte aus einer anderen Kultursammlung bezogen werden. Die D234-Mutante, die mit der NdhD1-Untereinheit den NDH-1L aufbauen kann, sowie die D1234, die keinen NDH-1L-Komplex mehr besitzen kann, wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt (siehe 5.2) und deren Segregation überprüft (siehe Abbildung 21). Nach Untersuchung der Wachstumsparameter erfolgten proteinbiochemische und physiologische Analysen. Unter normalen photoautotrophen Wachstumsbedingungen (BG-11-Medium, $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) wies nur die D1234 ein deutlich verzögertes Wachstum auf (siehe Abbildung 23). Durch Zugabe von Glucose wurde der photoautotrophe Stoffwechsel auf einen mixotrophen umgestellt. Bei *Synechocystis* geht dies mit keiner signifikanten Expressionsänderung der NDH-1-Untereinheiten einher, nur NdhD1, NdhD2 und NdhF1 werden verstärkt exprimiert (LEE ET AL. 2007).

Auch unter den mixotrophen Bedingungen (BG-11-Medium mit 10 mM Glucose, $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) konnte die D1234-Mutante kaum wachsen. Im Vergleich zum WT zeigte auch die D134 ein verzögertes Wachstum (siehe Abbildung 24). Die D12-Mutante wächst zu Beginn mit ähnlicher Geschwindigkeit wie der WT. In der stationären Phase kann die Dichte der Kultur aber nicht konstant gehalten werden und verringert sich um 50 %.

Wird beim mixotrophen Wachstum der lineare Elektronentransport durch Gabe von DCMU unterbrochen, sind nur noch der WT, die D34 und die D234 in der Lage zu wachsen. Mutanten ohne NdhD1-Untereinheit sind dazu nicht mehr fähig. Demnach ist nur der NDH-1L-Komplex (mit Beteiligung der NdhD1-Untereinheit) in der Lage, unter diesen Bedingungen den PQ-Pool über Respiration oder CET ausreichend zu reduzieren. Die Bedeutung des NdhD1 für die Atmung zeigen auch die Atmungsmessungen (siehe Abbildung 36). Die Mutanten D1, D12 und D1234 wiesen eine deutlich reduzierte Atmungsrate im Vergleich zum WT auf, wobei der Effekt des Wegfalls der NdhD1-Untereinheit bei der D1-Mutante nicht so stark ausfällt und wohl eine geringfügige Kompensation durch die NdhD2-Untereinheit stattfindet. Die D134-Mutante atmet ähnlich wie die D34 leicht über dem Niveau des WT. Auch hier wird vielleicht durch das noch vorhandene NdhD2, das stärker als das NdhD1 reguliert wird (siehe Tabelle 10), eine Steigerung der Atmungsrate möglich. Die ndhB-Mutante atmet noch weniger als die oben genannten Mutanten.

Tabelle 10: Übersicht über bisher veröffentlichte Untersuchungen zur Genexpression von *Synechocystis*, durchgeführt mittels Microarray-Analysen (MA) oder Northern-Blot (NB). Das Expressionsmuster von NDH-1-Untereinheiten und verschiedener Systeme, die im Zusammenhang mit dem NDH-1 stehen können, ist mit Pfeilen dargestellt (HCO_3^- -Transporter BicA, SbtA und Bct1 (*cmp*), Flavoproteine Flv2 (*slI0219*) und Flv4 (*slI0217*) und carboxysomale Proteine (*ccm*). Als Bezugswert dient die unbehandelte Kultur. Untersucht wurden die Auswirkungen von CO_2 -Mangel, Hypoxie, Lichtstress (PAR) und osmotischer Stress (Salz). Bei letzterem wurde der Einfluß von Salzen auf zusätzlichen Lichtstress analysiert, Symbole in Klammern entsprechen Lichtstress ohne Salz.

	Untersucher Parameter	↓ CO_2	↓ CO_2	↑ PAR	↓ O_2	↑ pH	↑ PAR ↑ Salz
		MA	MA	MA	MA	MA	NB
	Publikation	Eisenhut et al. 2007	Wang et al. 2003	Hihara et al. 2001	Summerfield et al. 2008	Summerfield et al. 2008	Allakhverdiev et al. 2002
	Gene						
NDH-1	<i>ndhD1</i>	→				↓	
	<i>ndhD2</i>	↘	↗	↑↑		↑	(↑↑) →
	<i>ndhR</i>	↑↑	↑				
	<i>ndhD3</i>	↑↑	↑↑	↑↑	↓↓	↑↑	(↑↑) →
	<i>ndhF3</i>	↑↑	↑↑	↑↑	↓↓	↑↑	(↑↑) →
	<i>cupA</i>	↑↑	↑↑	↑	↓↓	↑↑	(↑↑) →
	<i>cupB</i>	↘				↓	
	<i>ndhD4</i>	↘				↗	
	<i>ndhF4</i>	↘				↗	
Carboxysomen	<i>ccm</i>	↘			↓		(↑↑) →
HCO_3^- -Transporter	<i>cmp/sbt/bic</i>	↑↑	↑↑		↓↓	↑↑	
Hydrogenase	<i>hox</i>	↘	↓	↑	↑↑	↓	
Photosynthese	<i>psa/psb</i>	↑	→		↑↑		
TCA-Zyklus		↘				↓	
Flavoproteine	<i>flv2, flv4</i>	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↓	

Der NDH-1M-Komplex, der von den Mutanten D12 und D1234 noch assembliert werden kann, aber der *ndhB*-Mutante fehlt, trägt anscheinend – im geringen Umfang – zur Respiration bei. Die starke Atmung bei der D234 unterstreicht, dass der NDH-1L (mit den Untereinheiten *NdhD1* und *NdhF1*) der NDH-1-Komplex ist, der den größten Beitrag zur Respiration leistet. So zeigt auch eine *NdhF1*-Knockoutmutante von *Synechococcus* 7002 eine deutlich reduzierte Respirationsrate (SCHLUCHTER ET AL. 1993) wie auch die F1-Mutante von *Synechocystis* (BERNÁT ET AL. 2010). Die *Synechocystis*-Mutante D12 zeigt ebenfalls eine geringe Atmung (Abbildung 35, OHKAWA ET AL. 2000).

Ein Vergleich der mixotrophen Wachstumskurven mit den Messungen des Lichtkompensationspunktes mit Glucose (Abbildung 36 und Abbildung 37) zeigt, dass die D12-Mutante, die ein im Anfangsstadium fast uneingeschränktes Wachstum zeigt, nicht in den positiven Bereich der Sauerstoffbilanz gelangt. Bei dieser Mutante ist die Photosynthese am PS I eingeschränkt, was durch die lange HWZ der Re-Reduktion des PS I deutlich wird (siehe Abbildung 39), die PS-I-Zentren liegen vermehrt im oxidierten Zustand vor (Abbildung 41). Dass diese Mutante im mixotrophen Milieu keine Probleme hat zu wachsen, kann vielleicht auf die ausreichende Versorgung des Calvin-Zyklus mit CO₂, ankonzentriert mit den noch vorhandenen NDH-1MS und NDH-1MS', zurückgeführt werden.

6.2.1 Analysen zur modularen Zusammensetzung

Für die native Untersuchung der Zusammensetzung von NDH-1-Komplexen hat sich die Auftrennung im BN-Gel etabliert. Die Identifizierung von einzelnen Untereinheiten und Komplexen erfolgt dann mit Western-Blot und spezifischen Antikörpern. Für die in dieser Arbeit ausgeführten Untersuchungen standen Antikörper gegen die *NdhK*- und *NdhJ*-Untereinheiten zur Verfügung. Da sich sowohl das *NdhK* als auch das *NdhJ* im peripheren Teil des NDH-1-Komplexes befinden (siehe Abbildung 4), ist mit diesen beiden Antikörpern ein Nachweis der Komplexe NDH-1M, NDH-1L (bzw. NDH-1L') und NDH-1MS (bzw. NDH-1MS') möglich. Aufgrund der besseren Sensitivität (siehe Tabelle 5) wurde hauptsächlich der *NdhK*-Antikörper verwendet. Die NDH-1-Proteinkomplexe, die aus Gesamtmembranen im BN-Gel aufgetrennt wurden, können nach Western-Blot mit diesem Antikörper nachgewiesen werden (siehe Abbildung 26). Neben der Bande, die dem NDH-1M entspricht, sind auch mehrere höhermolekulare Banden sichtbar, die dem NDH-1L oder NDH-1MS zugesprochen werden können. Für den NDH-1M ergibt sich aus dem Gel eine Größe von 338 kDa und für zwei näher zu charakterisierende Banden (*L_a* und *L_b*) 505 kDa bzw. 551 kDa (siehe Abbildung 27). Dies steht im Einklang zu anderen bisher veröffentlichten Daten zur BN-Analyse vom NDH-1. PROMMEENATE ET AL. (2004)

konnten z.B. einen His-Tag-tragenden NDH-1 aus *Synechocystis* isolieren. Für den NDH-1M errechneten sie eine Größe von 330 kDa, für den NDH-1L eine von 460 kDa. Die Unterschiede zu den Ergebnissen aus Abbildung 27 und Tabelle 9 (338 kDa bzw. 505 kDa) lassen sich mit der generellen Abschätzungsungenauigkeit dieser Methoden erklären. Die Differenz der Größe der NDH-1L-Komplexe aus den eigenen BN-Analysen zu den veröffentlichten kann sich aber auch aus einer oder mehreren Untereinheiten erklären, die diese Komplexe zusätzlichen enthalten. Diese Differenz kann vielleicht auch durch die NdhA-Untereinheit (40,5 kDa) entstehen, die leicht vom NDH-1 dissoziieren kann (EFREMOV ET AL. 2010) oder durch die gebundenen oder fehlenden Cup-Einheiten.

Der Größenunterschied der als L_a und L_b bezeichneten Banden aus Abbildung 26 von 46 kDa (Tabelle 9) entspricht etwa der Differenz von NDH-1L zu NDH-1MS. Ob die höhermolekulare L_a -Bande dem NDH-1MS entspricht, kann mithilfe der D34-Mutante überprüft werden, da diese keinen NDH-1MS (bzw. NDH-1MS') mehr assemblieren kann. In den Spuren der D34 in Abbildung 26, Abbildung 28 und Abbildung 29 wird deutlich, dass die als L_a bezeichnete Bande fehlt oder zumindest deutlich reduziert ist. Auch bei den Dreifachmutanten D134 und D234, die diese Komplexe (NDH-1MS bzw. NDH-1MS') ebenfalls nicht bilden können, fehlt die Bande L_a fast vollständig. Dies spricht dafür, dass es sich bei der Bande L_a in Abbildung 26 um den NDH-1MS (oder NDH-1MS') handelt. Die untere der beiden Banden, L_b , wird von dem NDH-1L (bzw. NDH-1L') gebildet. Diese Bande ist bei den Mutanten D34, D134 und D234 stark ausgeprägt, diese können noch beide oder einen der NDH-1L-Komplexe bilden. Für die NDH-1L-Komplexe ist bisher nur eine Beteiligung der Untereinheiten NdhD1 und NdhF1 gezeigt worden, nicht aber von NdhD2 (BATTCHIKOVA ET AL. 2010a, KWON ET AL. 2010). Mit der D134-Mutante ist erstmals der Nachweis des NDH-1L' gelungen. In den BN-Analysen ist eine schwache Bande auf Höhe des NDH-1L (siehe Abbildung 28 und Abbildung 29) sichtbar, die nur von dem NDH-1L' stammen kann, da der NDH-1L durch die Deletion der NdhD1-Untereinheit nicht mehr gebildet werden kann. Zerfallsprodukte der NDH-1MS (bzw. NDH-1MS') können ebenfalls ausgeschlossen werden, da auch das NdhD3 und das NdhD4 ausgeschaltet wurden. Auf dieser Höhe ist aber auch in der Spur der D12-Mutante eine Bande sichtbar. Diese lässt sich wahrscheinlich auf den NDH-1MS-Komplex zurückführen, der durch die Aufreinigungs- und Auftrennungsschritte die Cup-Untereinheiten verloren hat und nun ein dem NDH-1L vergleichbares MW besitzt. Dies ist auch die Erklärung für die L_b -Bande der F1-Mutante, die wie die D12-Mutante keinen NDH-1L (bzw. NDH-1L') mehr besitzt. Das in dieser Mutante denkbare Zwischenprodukt, ein NDH-1M mit NdhD1 (bzw. NdhD2) ohne NdhF1, ist im Gel nicht erkennbar. Ohne das NdhF1 stellt anscheinend erst der NDH-1M einen stabilen Komplex dar.

Die Auftrennung von Membranproteinen mittels BN-Gelen mit anschließendem Western-Blot ist die geeignete Methode, die verschiedenen NDH-1-Komplexe zu identifizieren. Die durchgeführte Mutantanalyse zeigt, dass die NDH-1MS-Komplexe eindeutig von den NDH-1L-Komplexen zu unterscheiden sind (Abbildung 50).

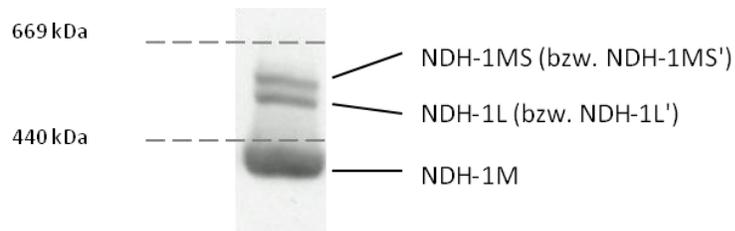


Abbildung 50: Identifizierung und Bezeichnung von NDH-1-Komplexen von *Synechocystis*. Isolierte Gesamtmembranen wurden im BN-Gel aufgetrennt und ein Western-Blot mit einem NdhK-Antikörper durchgeführt. Die Bezeichnung erfolgte anhand der Mutantanalyse (siehe Abbildung 28 und Abbildung 29).

6.2.2 Auswirkungen der CO₂-Verfügbarkeit

Die NDH-1-Komplexe NDH-1MS und NDH-1MS' gehören zu dem CO₂-konzentrierenden System vieler Cyanobakterien. Während gelöstes CO₂ die Membranen der Cyanobakterien durchdringen kann bzw. passiv über Aquaporine transportiert wird (HUB UND DE GROOT 2006, MILLER ET AL. 1988, TCHERNOV ET AL. 2001), ist dies für Bicarbonat-Ionen (HCO₃⁻) nicht möglich (SHIBATA ET AL. 2001). Deshalb sind zur Aufnahme von HCO₃⁻-Ionen drei weitere Systeme vorhanden:

- der BCT1-Transporter, ein hochaffiner HCO₃⁻-Transporter vom ABC-Typ mit den Untereinheiten CmpA-D (OMATA ET AL. 1999)
- der hochaffine Natrium-abhängige HCO₃⁻-Transporter SbtA (SHIBATA ET AL. 2002)
- der HCO₃⁻-Transporter BicA (PRICE ET AL. 2004)

Im Cytosol gelöstes CO₂ kann durch Umwandlung in Bicarbonat am Verlassen der Zelle gehindert werden. Katalysiert werden kann diese Reaktion durch Carboanhydrasen. Diese befinden sich vor allem in den Carboxysomen, wo sie den umgekehrten Schritt katalysieren und die RuBisCO mit CO₂ versorgen. An der Thylakoidmembran wird die Umwandlung in Bicarbonat durch besondere NDH-1-Komplexe durchgeführt, dem NDH-1MS und dem NDH-1MS' (KLUGHAMMER ET AL. 1999, SHIBATA ET AL. 2001). Diese beinhalten Carboanhydrase-ähnliche Untereinheiten (Cup). Am NDH-1MS ist neben dem CupA auch das CupS beteiligt. Die Funktion dieser Untereinheit ist unbekannt, eine Deletionsmutante von *Synechococcus* zeigte keinen auffälligen Phänotyp (KLUGHAMMER ET AL. 1999). Die Lokalisierung von CupS wurde bei

Synechocystis untersucht, sie befindet sich am Cup-Modul (siehe Abbildung 4, BIRUNGI ET AL. 2010, HERRANEN ET AL. 2004).

Mit den eigenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der NDH-1MS im Gegensatz zum NDH-1L unter LC-Bedingungen verstärkt exprimiert wird (siehe Abbildung 29, siehe auch BATTCHIKOVA ET AL. 2005, HERRANEN ET AL. 2004, ZHANG ET AL. 2005). Dies geschieht über den Regulator NdhR (FIGGE ET AL. 2001, MCGINN ET AL. 2003), was auch durch Microarray-Analysen gezeigt wurde (EISENHUT ET AL. 2007, WANG ET AL. 2003). Die Gene der übrigen NDH-1-Untereinheiten werden unter diesen Bedingungen ebenfalls verstärkt exprimiert. Dies weist auf die wichtige Rolle dieser Untereinheiten und der entsprechenden NDH-1-Komplexe hin. Die Expression der Untereinheiten NdhD1, NdhD2 und NdhF1 wird unter LC-Bedingungen nicht gesondert reguliert. Für die NdhF1-Untereinheit wird eine generelle Regulierung über *antisense*-RNA angenommen (GEORG ET AL. 2009).

Unter HC-Bedingungen scheint der NDH-1 keine große Bedeutung für die Reduktion des PQ-Pools zu besitzen. In HC-angezogenen Kulturen wurde kein PIIF-Effekt gemessen (DENG ET AL. 2003, siehe Abbildung 38), der auf den NDH-1 zurückzuführen ist (RYU ET AL. 2003a).

6.3 Aktivität der NDH-1-Komplexe und die fehlende Kopfgruppe

Sowohl für den plastidären als auch für die cyanobakteriellen NDH-1-Komplexe wurde angenommen, dass reduziertes Ferredoxin direkt als Elektronendonator dient (FRIEDRICH ET AL. 1995, MI ET AL. 1995). Spätere Untersuchungen gaben Hinweise darauf, dass Ferredoxin indirekt über die Ferredoxin:NADP⁺-Reduktase (FNR), die dann als Kopfgruppe dient, beteiligt ist (GUEDENEY ET AL. 1996). Die FNR (*petH*, *slr1643*) ist ein 46,6 kDa großes Protein. Aufgrund von großer Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen und der vergleichbaren Funktion wurden auch die Untereinheiten der Diaphorase der bidirektionalen NiFe-Hydrogenase (HoxE, HoxF und HoxU) mit einem Gesamtgewicht von ca. 100 kDa als mögliche Kopfgruppe des NDH-1 diskutiert (APPEL UND SCHULZ 1996, SCHMITZ UND BOTHE 1996). Eine zu der F₄₂₀-Dehydrogenase der F₄₂₀H₂:Methanophenazin Oxidoreduktase homologe Untereinheit von *Synechocystis* (*slr1923*, 44,6 kDa) wurde von PROMMEENATE ET AL. (2004) ebenfalls als mögliche Kopfgruppe ins Spiel gebracht, ebenso wie die Flavoproteine Flv2 (*slI0219*, 65 kDa) und Flv4 (*slI0217*, 64 kDa). Letztere befinden sich in einem Operon und weisen die benötigte FMN-Bindestelle und [Fe-S]-Cluster auf (HELMAN ET AL. 2003, VICENTE ET AL. 2002). Microarray-Analysen zeigen ein ähnliches Expressionsmuster der Gene von Flv2 und Flv4 wie das vieler NDH-1-Untereinheiten (EISENHUT ET AL. 2007, WANG ET AL. 2004, siehe auch Tabelle 10). In dieser Arbeit wurde deshalb die Aktivität von nativ aufgetrennten NDH-1-Komplexen untersucht (siehe 6.3.1). Durch Verwendung

unterschiedlicher Systeme wurde versucht, intakte NDH-1-Komplexe mit gebundener Kopfgruppe zu erhalten. Zusätzlich wurde mittels physiologischer Messungen von NDH-1-Mutanten die Aktivität der verschiedenen NDH-1-Komplexe *in vivo* bestimmt (siehe 6.3.2). Zusätzlich wurde an *Synechocystis*-Mutanten ohne die Flavoproteine Flv2 (*sll0219*) und Flv4 (*sll0217*) untersucht, ob diese Untereinheiten die Funktion der bisher unbekanntes NADPH-oxidierende Kopfgruppe übernehmen können.

6.3.1 Identifizierung aktiver NDH-1-Komplexe

Aus den Untersuchungen mit den BN-Gelen können die Größen der unterschiedlichen NDH-1-Komplexe errechnet werden. Für die NDH-1L-Komplexe ergibt sich ein MW von ca. 434 kDa bis 448 kDa (siehe Tabelle 8), ohne die bisher unbekanntes Kopfgruppe. Für diese ergibt sich aus dem nativen Gel eine Größe von ca. 60 kDa (siehe Tabelle 9). Dies gilt unter der Voraussetzung, dass die Kopfgruppe bei der gewählten Aufreinigungs- und Auftrennungsmethode am Komplex gebunden bleibt. Ob mit der verwendeten Isolierungs- und Auftrennmethode ein vollständiger NDH-1MS (bzw. NDH-1MS') erhalten werden kann, wurde mit In-Gel-Aktivitätsfärbungen genauer untersucht. Dazu wurden noch schonendere Auftrennungsmethoden gewählt, da es sich bei den NDH-1-Komplexen um sehr labile Multiproteinkomplexe handelt. Der NDH-1MS scheint bei *Synechocystis* leicht in die (Sub-)Komplexe NDH-1M und NDH-1S zu zerfallen (HERRANNEN ET AL. 2004), bei *T. elongatus* ist er stabiler (ZHANG ET AL. 2005). Obwohl unterschiedliche native Gelsysteme verwendet wurden, war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, mit In-Gel-Aktivitätsfärbungen (mit NADPH als Substrat, MA ET AL. 2006) in Verbindung mit Western-Blot, einen aktiven NDH-1-Komplex nachzuweisen. Sowohl mit dem Davis-Gelsystem (siehe Abbildung 30), einer Abwandlung davon (siehe Abbildung 31) als auch dem sehr schonenden CN-Gel (siehe Abbildung 32 und Abbildung 33) zeigten sich zwar gefärbte Aktivitätsbanden, diese waren jedoch auch bei der als Negativ-Kontrolle eingesetzten *ndhB*-Mutante zu finden, die keine NDH-1-Komplexe mehr besitzt (abgesehen von dem NDH-1S). Fast alle identifizierten Banden waren in der Nähe der deutlich sichtbaren Phycobilisomen zu finden, an die die FNR gekoppelt vorliegen kann. Dieses NADPH-oxidierende Enzym konnte dementsprechend mit einem Western-Blot (mit einem Ak gegen die FNR) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 33). Das Muster der Aktivitätsbanden in den LC- und HC-Spuren entspricht den Untersuchungen von LIU ET AL. (2010), die für den WT als auch der *ndhB*-Mutante eine verstärkte Expression der FNR unter LC-Bedingungen im Gegensatz zu HC-Bedingungen zeigen konnten. In bisher veröffentlichten NADPH-Aktivitätsfärbungen wurden Aktivitätsbanden zwischen den Markerbanden 232 kDa und 440 kDa als aktiver NDH-1 bezeichnet (DENG ET AL. 2003), eine

parallele Untersuchung mit der ndhB-Mutante als Negativkontrolle wurde dabei aber nicht durchgeführt. Diese Banden entsprechen jedoch den in dieser Arbeit ermittelten FNR-Banden (Abbildung 33). Da sich die FNR- und die NDH-1M-Banden im nativen Gel auf derselben Höhe befinden (Abbildung 32 und Abbildung 33), wurden bei genauerer Analyse der Banden zwangsläufig NDH-1-Untereinheiten gefunden.

Nativ aufgetrennte NDH-1-Komplexe wurden auch auf die Aktivität der Carboanhydrase untersucht. Diese wird von den Cup-Untereinheiten der Komplexe NDH-1MS und NDH-1MS' ausgeübt. CO₂, das aus Trockeneis zugeführt wurde, sollte an den Carboanhydrase-ähnlichen Untereinheiten CupA bzw. CupB zu HCO₃⁻ umgewandelt werden, was aufgrund der pH-Änderung zu einem Farbumschlag einer Indikatorlösung führen sollte (siehe 4.8.12). Diese Farbänderung wurde aber nicht beobachtet. Ob dies ein Problem bezüglich der Menge der vorhandenen NDH-1MS-Komplexe ist oder ob dies darauf zurückzuführen ist, dass die Untereinheiten CupA bzw. CupB nicht mehr am Komplex gebunden waren, lässt sich nicht beurteilen. Möglich ist auch, dass die Carboanhydrase-ähnlichen Untereinheiten CupA und CupB unter diesen Bedingungen nicht mehr aktiv sind, weil z.B. die Carboanhydrase-Funktion nur unter den physiologischen Zuständen eines aktiven NDH-1MS (bzw. NDH-1MS') ausgeübt werden kann. Die Bildung von HCO₃⁻ würde demnach durch einen lokalen Protonenmangel am NDH-1MS gefördert, durch den Transport von Protonen würde eine Art alkaline Tasche am Cup-Komplex geschaffen (KAPLAN UND REINHOLD 1999, TCHERNOV ET AL. 2001).

6.3.2 Mögliche Regulierung der NDH-1-Aktivität über die Struktur

Für eine gezielte Regulierung der Aktivitäten der NDH-1-Komplexe, die an unterschiedlichen Funktionen (Respiration, CET und CCM) beteiligt sind, sind unterschiedliche Aktivitäten der Protonen-transportierenden NdhD- und NdhF-Untereinheiten denkbar. Die Zahl der transportierten Protonen oder die Geschwindigkeit der Transportvorgänge könnte vor allem von den NdhF-Untereinheiten abhängen. Diese besitzen eine lange α -Helix, die wahrscheinlich für die Aktivität verantwortlich ist (EFREMOV ET AL. 2010, siehe Abbildung 51). Kristallstrukturanalysen bei *T. thermophilus* zeigen, dass die Transportermodule Nqo12, Nqo13 und Nqo14 (entsprechend in *Synechocystis*: NdhF, NdhD und NdhB) durch eine lange α -Helix, die vom Nqo12 gebildet wird, durchzogen werden. Jede dieser drei Untereinheiten besitzt zwei kurze α -Helices, die die Membran jeweils nur zur Hälfte durchspannen können. Durch eine Konformationsänderung von Nqo4 oder Nqo6 (entsprechend NdhH oder NdhK) bei Reduktion eines Plastochinons soll die lange Helix durch einen noch unbekanntem Mechanismus durch die drei Untereinheiten geschoben werden.

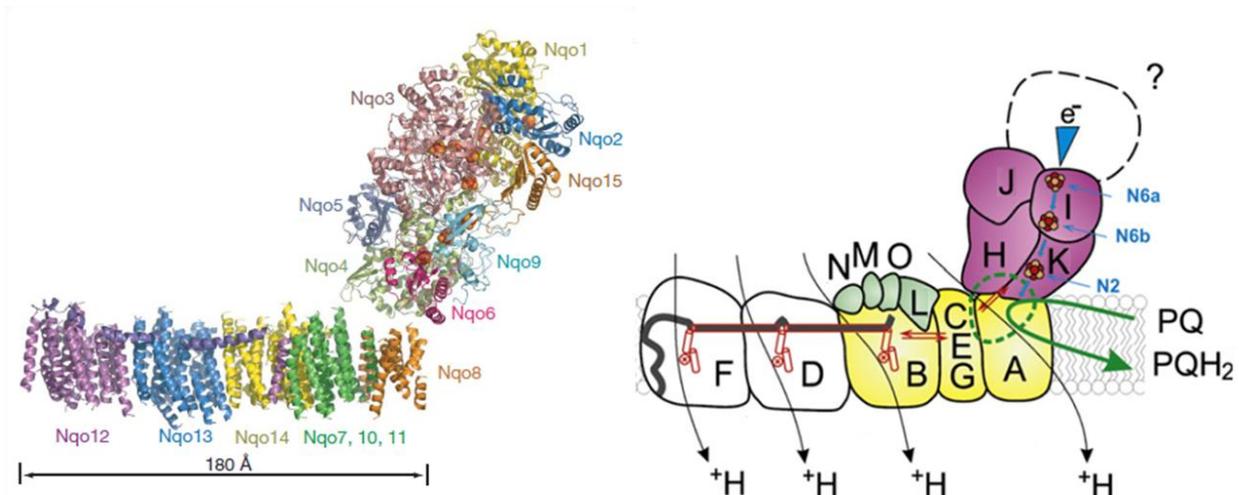


Abbildung 51: Modell des Komplex I aus *T. thermophilus*, erstellt anhand von Kristallstrukturanalysen (links, EFREMOV ET AL. 2010). Violett eingezeichnet ist die α -Helix, die von Nqo12 ausgehend auch Nqo13 und Nqo14 durchspannt. Diese soll für den Protonentransport über die Membran verantwortlich sein. Dieses Schema lässt sich auf den NDH-1 von *Synechocystis* übertragen (rechts, verändert nach BATTCHIKOVA ET AL. 2010a). Hier wird diese Helix von der NdhF-Untereinheit gebildet. Der Protonentransport über die Membran findet so an den Untereinheiten NdhB, NdhD und NdhF statt. Zusätzlich wird ein Proton bei der Reduktion des PQ über die Membran transportiert.

Dies bewirkt wiederum an den kurzen Helices eine Konformationsänderung, so dass Protonen über diese nun die gesamte Membran durchspannenden Helices transportiert werden können. Durch Wegfall des Nqo12 ist dieser Prozess nicht mehr möglich. Einzig ein Proton kann dann noch bei Reduktion eines Plastochinons durch einen nicht näher beschriebenen Mechanismus über die Membran transportiert werden. Bei dem NDH-1M kann – durch Wegfall des NdhD (entspricht Nqo13) und NdhF (entspricht Nqo12) – dementsprechend auch nur ein Proton an der PQ-Reduktionsstelle transportiert werden, was die geringe Aktivität des NDH-1M erklärt. Diese geringe Aktivität des NDH-1M wurde durch eine Analyse von PS-I-Parametern durch PAM-Analysen und Lichtkurven (siehe Abbildung 42) bestätigt. Dazu wurden Messungen mit dem WT und den Mutanten *ndhB* und D1234 herangezogen. Nach einem Sättigungsblitz während einer Dunkelinkubation kann beim WT das PS I schnell wieder reduziert werden (Abbildung 39). Dass dies zum überwiegenden Maße auf den NDH-1 zurückzuführen ist, zeigt die D1234 und noch deutlicher die *ndhB*-Mutante. Bei letzterer beträgt die HWZ der Reduktion mehrere Sekunden statt unter 0,2 s beim WT. Die D1234 braucht doppelt so lange wie der WT. Dies zeigt sich auch bei der Betrachtung des Oxidationszustandes von PS I bei DR-Belichtung (Abbildung 41). Fast alle Zentren der PS I sind bei der *ndhB* geschlossen, es werden also kaum Elektronen nachgeliefert. Bei der D1234 ist die Versorgung des PS I mit Elektronen nur leicht verbessert, was demnach auf den noch vorhandenen NDH-1M zurückzuführen ist. Am deutlichsten werden die

Unterschiede bei der Analyse der Lichtkurven (Abbildung 42). Die Quantenausbeute am PS I sinkt generell bei steigenden Lichtintensitäten (Photoinhibition). Bei der D1234 ist die Effizienz des PS I schon bei geringeren Lichtmengen deutlich verringert. Am PS I der ndhB-Mutante findet fast keine photochemische Arbeit mehr statt. Dies ist auf die Akzeptorseiten-Limitierung Y(NA) des PS I zurückzuführen. Während sie beim WT über das ganze untersuchte Spektrum bei ca. 10 % liegt, beträgt die Limitierung bei der D1234 schon bis zu 70 %, während sie bei der ndhB-Mutante zwischen 80 % und 100 % beträgt. Durch das Fehlen aktiver NDH-1-Komplexe kommt es also zu einer Akzeptorseiten-Limitierung des PS I, d.h. es stehen nicht genug oxidierte Reduktionsäquivalente zur Verfügung (NADP⁺, Fd (ox) oder Flavodoxin (ox), BOTTIN UND LAGOUTTE 1992). Bei der D1234-Mutante fällt diese Limitierung etwas geringer aus, was auf die noch vorhandene, jedoch geringe Aktivität des NDH-1M zurückgeführt werden kann.

6.3.3 Mögliche Regulierung über unterschiedliche Kopfgruppen

Eine Regulierung der unterschiedlichen NDH-1-Komplexe könnte auch durch mehrere unterschiedliche Kopfgruppen erfolgen. Bei *A. thaliana* wurde der plastidäre NDH-1, am PS I gebunden, isoliert (PENG ET AL. 2008, PENG ET AL. 2009 und SIRPIO ET AL. 2009). Für den plastidären NDH-1 wurde bisher eine Beteiligung an der Photorespiration und am CET beschrieben (BENNOUN 1982, BURROWS ET AL. 1998, NIXON 2000). Die entsprechende Funktion in *Synechocystis* wird vom NDH-1L eingenommen, eine Kolokalisierung von NDH-1-Komplexen mit dem PS I konnte in diesem Organismus bisher noch nicht gezeigt werden. Denkbar wäre aber in diesem Fall, dass entweder reduziertes Ferredoxin direkt an den [4Fe-4S]-Cluster N6a, der sich in der NdhI-Untereinheit befindet, bindet, oder dass die FNR als Kopfgruppe Elektronen auf den NDH-1L überträgt. Für die Beteiligung der NDH-1-Komplexe NDH-1L und NDH-1L' am CET spricht, dass in der D12-Mutante die HWZ der Re-Reduzierung des PS I nach vollständiger Oxidation stark verlängert ist (siehe Abbildung 39). Zudem besitzt diese Mutante – abgesehen von der ndhB- und der D1234-Mutante – am meisten geschlossene PS-I-Zentren im Licht.

Einige fädige Cyanobakterien führen die Fixierung von Luftstickstoff in speziellen Zellen, den Heterocysten, durch. In diesen herrscht ein geringer Sauerstoff-Partialdruck, da die stickstofffixierende Nitrogenase stark durch Sauerstoff inhibiert wird. Deshalb findet in diesen Zellen kaum oxygene Photosynthese statt, die Menge des PS II ist stark verringert. Die benötigte Energie wird über den CET bereitgestellt. Demzufolge müsste in diesen Zellen verstärkt der NDH-1L (bzw. NDH-1L') exprimiert sein. In Heterocysten von *N. punctiforme* wurde aber vor allem der NDH-1M identifiziert (CARDONA ET AL. 2009), allerdings wurden die Kulturen für diese Untersuchung mit CO₂-angereicherter Luft angezogen. Unter diesen Bedingungen ist bei

Synechocystis kaum noch NDH-1M zu finden (Abbildung 29). Die Untersuchung der NDH-1-Komplexe in den Membranen der Heterocysten sollte deshalb zusätzlich unter LC-Bedingungen erfolgen.

Für *Synechocystis* wie auch für Plastiden wurden bisher mehrere mögliche Elektronentransportwege des CET beschrieben. Neben dem Weg über NDH-1 wurde auch ein durch Antimycin A inhibierbarer Weg beschrieben (JOËT ET AL 2001, MIYAKE ET AL 1995). Die für diesen Weg benötigte Enzymaktivität wurde mit einer Ferredoxin:Chinon-Reduktase (FQR) beschrieben (CLELAND AND BENDALL 1992). Hierbei ist in Plastiden das Pgr5, bei *Synechocystis* das Homolog Ssr2016 beteiligt. Auch dieser CET könnte über den NDH-1 ablaufen, wenn Ferredoxin entweder direkt oder indirekt über die FNR gezielt eine Subpopulation von NDH-1-Komplexen reduziert. Dieser Teil des CET würde dann mittels Antimycin A gehemmt werden (MOSS UND BENDALL 1984). In Plastiden von Spinat ist der PIIF-Effekt deutlich mit Antimycin A inhibierbar (MANO ET AL. 1995). Dies weist auf einen NDH-1 hin, der über Ferredoxin direkt oder indirekt über die FNR am CET beteiligt ist. Bei *Synechocystis* fällt der Effekt von Antimycin A geringer aus (MI ET AL. 1995).

Als NADPH-oxidierende Kopfgruppe werden auch Flavoproteine diskutiert. Bei vielen Microarray-Analysen wurde für das Operon (*sll0217*, *sll0218* und *sll0219*) mit den beiden Flavoproteinen *sll0217* (*flv4*) und *sll0219* (*flv2*) eine deutliche differentielle Expression ermittelt (Tabelle 10), so auch bei Untersuchungen einer *Synechocystis*-Mutante ohne bidirektionale Hydrogenase (in Zusammenarbeit mit HCP Matthijs, nicht veröffentlicht). Bei dieser Mutante wird dieses Operon verstärkt exprimiert. Während die verwandten Flavoproteine Flv1 und Flv3 an der Mehler-Reaktion (Photoreduktion von O₂ am PS I, MEHLER 1951, ASADA 1999) beteiligt sind (VICENTE ET AL. 2002, HELMAN ET AL. 2003), besitzen die Flavoproteine Flv2 (*sll0219*) und Flv4 (*sll0217*) alle Voraussetzungen, um als Kopfgruppe des NDH-1 zu dienen (siehe 6.3). In einer großangelegten Interaktionsstudie mittels *Yeast two-hybrid* (Y2H) wurden aber keine eindeutigen Interaktionspartner sowohl für NDH-1-Untereinheiten wie auch für die Flavoproteine und die bidirektionale Hydrogenase gefunden (SATO ET AL. 2007). Dies kann natürlich auf eine nur schwache Interaktion von einer oder mehreren Kopfgruppen mit dem peripheren Teil der NDH-1-Komplexe zurückzuführen sein. Eigene Analysen mit Mutanten ohne Flv2 (*sll0219*) und Flv4 (*sll0217*) ergaben nur eine geringe Auswirkung der Deletion auf die Dunkelrespiration (siehe Abbildung 45). Allerdings ist bei dieser Mutante eine leichte Zunahme der Hydrogenasenaktivität gegenüber dem WT messbar (siehe Abbildung 45).

Auch dieses Enzym, die bidirektionale Hydrogenase, wird für *Synechocystis* als mögliche Kopfgruppe diskutiert (siehe oben). Die Diaphorase der bidirektionalen Hydrogenase als alleinige Kopfgruppe des NDH-1 wird aber in Frage gestellt, da bei *N. punctiforme* ATCC 29133

(auch PCC 73102) diese Untereinheiten nicht vorhanden sind (TAMAGNINI ET AL. 1997). Diese weist aber eine Respiration auf entsprechend anderer Cyanobakterien (BOISON ET AL. 1999). Die Aktivität der NDH-1-Komplexe wurde dabei aber nicht gezielt untersucht. Gegen die alleinige Beteiligung der Hydrogenase spricht auch, dass in Plastiden (generell in höheren Pflanzen) bisher keine Hydrogenase gefunden wurde. Der plastidäre NDH-1 würde demnach auf jeden Fall eine andere Kopfgruppe benötigen als die cyanobakteriellen NDH-1-Komplexe.

Bei der *ndhB*-Mutante von *Synechocystis*, die keine aktiven NDH-1-Komplexe besitzt, ist die Aktivität der Hydrogenase nach eigenen Messungen halb so groß wie beim WT, gleiches gilt für die D1234-Mutante. Bisher veröffentlichte H₂-Produktionsraten weisen bei der *ndhB*-Mutante eine noch geringere Aktivität der *ndhB*-Mutante gegenüber dem Wt auf (GUTTHANN ET AL. 2007). Hier wurde auch gezeigt, dass die *ndhB*-Mutante in der Lage ist, bei Belichtung länger Photo-wasserstoff zu produzieren. Beim WT wird die Hydrogenase schnell durch den am PS II bei Belichtung entstehenden Sauerstoff inhibiert. Dies ist bei der *ndhB*-Mutante nicht der Fall, diese Mutante weist bei steigender Belichtung keine nennenswerte Sauerstoffproduktion auf (siehe Abbildung 36). Auch die Quantenausbeute am PS I ist sehr gering, was auf eine allgemein geringe Elektronentransportrate der Photosynthese schließen lässt. Bei der untersuchten Mutante $\Delta sll0217-sll0219$ ist die Hydrogenase-Aktivität höher als beim WT (siehe Abbildung 45). Wenn sowohl Flavoproteine als auch die Hydrogenase parallel als Kopfgruppe aktiv sind, kann mit dem Wegfall der Flavoproteine die verstärkte H₂-Produktion erklärt werden. Dies kann bedeuten, dass bei Respiration im Dunkeln im WT beide Kopfgruppen aktiv sind und um den NDH-1 konkurrieren. Denkbar ist auch, dass hauptsächlich die Flavoproteine die Kopfgruppe bilden, durch den Wegfall dieser wird das überschüssige NADPH über die Hydrogenase oxidiert. Da die Sauerstoffmessungen (siehe Abbildung 45) aber keine reduzierte Dunkelrespiration gezeigt haben, ist die direkte und alleinige Beteiligung dieser beiden möglichen Kopfgruppen nicht wahrscheinlich.

6.4 Übersicht der NDH-1-Komplexe von *Synechocystis*

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit zeichnet sich folgendes Bild für die Verteilung und Funktion der NDH-1-Komplexe in *Synechocystis* ab (Abbildung 52). Der NDH-1M wird bereits in der Plasmamembran assembliert, wo er mittels Western-Blot und Immungoldfärbung nachgewiesen werden konnte. Von dort gelangt er direkt über Membrankontaktstellen oder über Vesikel in die Thylakoidmembran, wo er hauptsächlich nachweisbar ist. Für diesen Komplex (NDH-1M) konnte nur eine geringe Aktivität ermittelt werden.

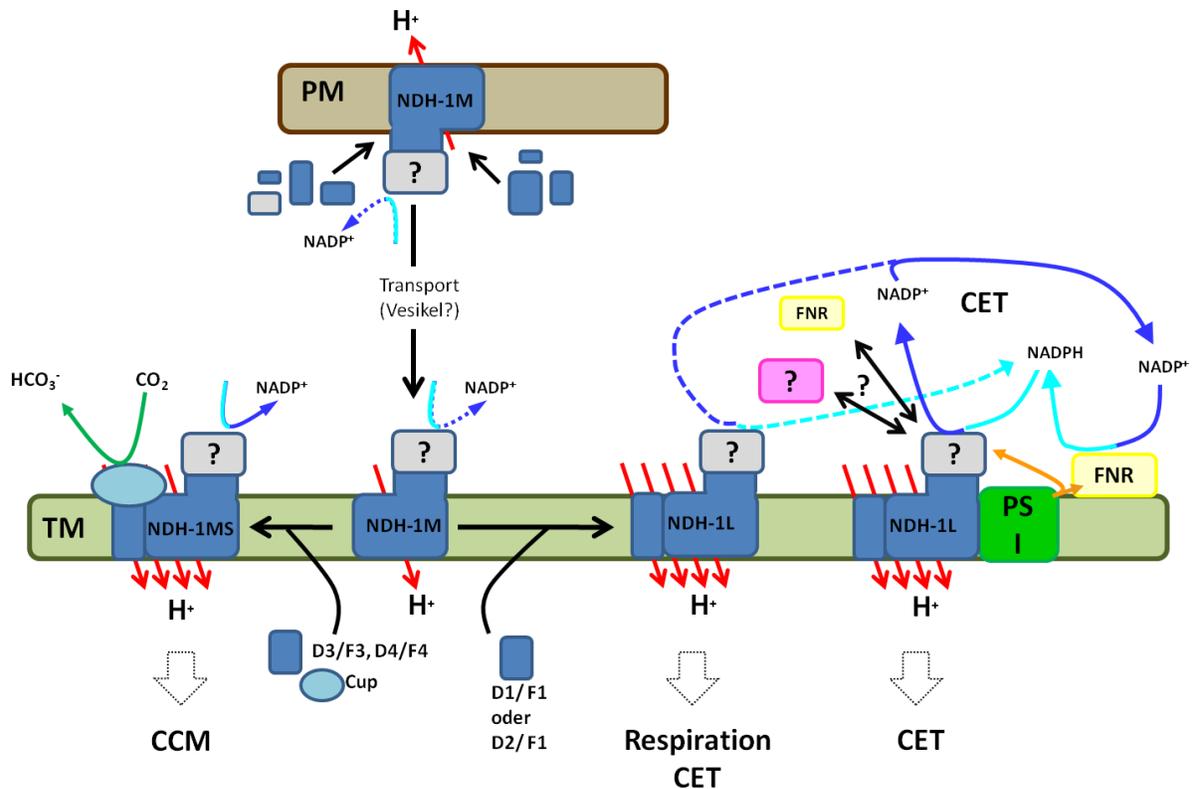


Abbildung 52: Vereinfachtes Schema zur Verteilung und Funktion der NDH-1-Komplexe in *Synechocystis*. Assembliert wird der NDH-1M in der Plasmamembran (PM), nach Transport in die Thylakoidmembran (TM) über Vesikel o.ä. wird dieser teilaktive Komplex entweder zum NDH-1MS (bzw. NDH-1MS') erweitert, der an der CO_2 -Fixierung (CCM) teilnimmt, oder zum NDH-1L (bzw. NDH-1L'), der an der Respiration oder am zyklischen Elektronentransport (CET) beteiligt ist. Die Flüsse von NADP^+ und NADPH im zyklischen Elektronentransport (CET) sind farblich markiert. Bei Kopplung des NDH-1L am PS I könnten andere Kopfgruppen, z.B. die FNR oder sogar Ferredoxin direkt (orange Pfeile) als Elektronendonoren dienen. Der NDH-1MS' ist zur besseren Übersicht nicht dargestellt.

Diese verminderte Aktivität lässt sich mit Hilfe des Modells bestätigen, das für *T. thermophilus* ermittelt wurde (EFREMOV ET AL. 2010) und auf *Synechocystis* übertragen werden kann (BATTCHIKOVA ET AL. 2010a, siehe Abbildung 51). Durch Wegfall der NdhF-Untereinheit kann der NDH-1M nur ein Proton pro oxidiertes NADPH über die Membran schleusen statt vier.

Durch Einbau weiterer Untereinheiten wird der NDH-1M zu dem NDH-1L bzw. NDH-1L' erweitert. Für diese konnte gezeigt werden, dass sie entscheidend an der Respiration und auch am zyklischen Elektronentransport beteiligt sind (Abbildung 52 unten rechts). Durch den Einbau anderer Untereinheiten wird der NDH-1MS bzw. NDH-1MS' gebildet (Abbildung 52 unten links). Die Mutantanalyse ermöglichte, dass diese NDH-1MS-Komplexe im BN-Gel von den NDH-1L-Komplexen deutlich unterscheidbar sind (siehe Abbildung 50). Die NDH-1MS-Komplexe sind nicht am CET und der Respiration beteiligt, sondern an der CO_2 -Fixierung, indem gelöstes CO_2 in HCO_3^- umwandelt wird.

Eine weitere wichtige Funktion der NDH-1-Komplexe ist die Bereitstellung von oxidierten Reduktionsäquivalenten (NADP^+) für das PS I. Schon bei geringen Lichtintensitäten führt ein Mangel davon zu einer deutlichen Akzeptorseiten-Limitierung des PS I, die bis zu einem völligen Erliegen der photochemischen Arbeit am PS I führen kann. Im Licht (HL-Bedingungen) scheint die Aktivität der NDH-1-Komplexe erhöht (MI ET AL. 2001), die Funktion dürfte hier sowohl der CET als auch die Bereitstellung von oxidierten Reduktionsäquivalenten sein.

Am aktivsten bei der Reduktion des PQ im Licht scheint der NDH-1L zu sein (KLUGHAMMER ET AL. 1999), trotzdem kommt dem NDH-1L' anscheinend eine bedeutende Rolle zu. Der NDH-1L' bzw. die beteiligte Untereinheit NdhD2 wurde bisher in keinen Proteomic-Analysen identifiziert (z.B. BATTCHIKOVA ET AL. 2010b) und galt bis zu dieser Arbeit als rein hypothetisch. In dieser Arbeit konnte er erstmals nachgewiesen werden (siehe 6.2.1). Eine Zusammenstellung von Microarray-Untersuchungen zeigt, dass das am NDH-1L' beteiligte NdhD2 bei vielen Stress-Situationen verstärkt exprimiert wird (siehe Tabelle 10), im Gegensatz zu dem NdhD1, das Bestandteil des NDH-1L ist. Eigene Untersuchungen mit Mutanten zeigten, dass der NDH-1L' bei vielen Bedingungen die Funktion des NDH-1L übernehmen kann. Dies wird deutlich durch Vergleich der Mutanten D134 (mit dem NDH-1L') und der D234 (mit dem NDH-1L). Der stark regulierte NDH-1L' kann somit vielleicht als eine Art Schutzsystem des PS I dienen. Bei Stress (Starklicht, alkalischer pH, siehe Tabelle 10) werden über den NDH-1L' dem PS I anscheinend genug Akzeptoren bereitgestellt, so dass es zu keiner Inhibierung der Photosynthese kommt.

6.5 Evolutionäre Rückschlüsse

Die verschiedenen Funktionen der cyanobakteriellen NDH-1-Komplexe lassen sich auf die Verwendung unterschiedlicher NdhD- und NdhF-Untereinheiten und möglicherweise auch unterschiedlicher Kopfgruppen zurückführen. Die ausgeübten Funktionen des plastidären NDH-1 können wahrscheinlich mit der Verwandtschaft zu bestimmten cyanobakteriellen Untereinheiten erklärt werden. Mit phylogenetischen Analysen wurde zusätzlich die Annotierung der cyanobakteriellen NdhD- und NdhF-Untereinheiten überprüft, um Homologe mit einer möglicherweise redundanten Funktion richtig einzuordnen.

Während der Komplex I der Bakterien in der Plasmamembran lokalisiert ist, befindet sich der NDH-1 der Cyanobakterien hauptsächlich in der Thylakoidmembran (siehe Abbildung 16), wie auch der plastidäre NDH-1. Die Cyanobakterien der Gattung von *Gloeobacter violaceus* (*Gloeobacter*) besitzen als einzige kein Thylakoidsystem. Die Stellung der Gattung *Gloeobacter* wird kontrovers diskutiert, entweder wird sie als Schwestergruppe aller anderen Cyanobakterien angesehen oder monophyletisch als basalste Gruppe (TOMITANI ET AL. 2006,

TURNER ET AL. 1999). Im Genom von *G. violaceus* sind je vier NdhD- und NdhF-Untereinheiten kodiert, deren Annotation bisher nicht eindeutig ist. Auch die Benennung der fünf NdhD- und drei NdhF-Untereinheiten in *N. punctiforme* ist unvollständig, dies gilt wahrscheinlich auch für die weiteren bisher sequenzierten cyanobakteriellen Genome. Ausgehend von den Untereinheiten von *Synechocystis* wurden die NdhD- und NdhF-Untereinheiten von *G. violaceus*, *N. punctiforme* und *P. chromatophora* mittels phylogenetischer Analysen (siehe 5.6.1) kategorisiert und eine neue Bezeichnung eingeführt (Tabelle 11). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die als NdhD5 und NdhD6 annotierten Untereinheiten mit den übrigen NdhD-Untereinheiten (OHKAWA ET AL. 2000, SHIBATA ET AL. 2001) nur entfernt verwandt sind (Abbildung 47). Die Verwandtschaft zum NdhF und zum NdhB ist sogar erheblich näher. Deshalb sollten diese beiden Untereinheiten aus dem Kreis der potentiellen NdhD-Untereinheiten ausgeschlossen werden und wurden deshalb in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Mit phylogenetischen Analysen (siehe Abbildung 48 und Abbildung 49) konnten auch die plastidären Untereinheiten den cyanobakteriellen Untereinheiten zugeordnet werden. Denn aus der Endosymbiose eines Cyanobakteriums (ein Vorläufer heutiger β -Cyanobakterien, BADGER UND PRICE 2003) durch eine frühe eukaryotische Zelle entwickelte sich der Endosymbiont in eine Plastide. Diese besaß mit großer Wahrscheinlichkeit noch die cyanobakteriellen NDH-1-Komplexe. Bei der Umformung der Plastide spaltete sich der plastidäre Stammbaum auf, es entstanden die Glaucophyta mit den Cyanellen, die Rhodophyta mit den Rhodoplasten und die Chlorophyta mit den Chloroplasten. Von diesen Plastidentypen besitzen – nach bisherigem Stand der Forschung – nur die Chloroplasten einiger Grünalgen und fast aller Landpflanzen einen NDH-1. Die NdhD- und NdhF-Untereinheiten der Plastiden sind am engsten mit den cyanobakteriellen NdhD1- und NdhF1-Untereinheiten verwandt (siehe Abbildung 48 und Abbildung 49). Diese Untereinheiten sind in *Synechocystis* Bestandteil des NDH-1L-Komplexes. Dieser ist am CET und der Respiration beteiligt, was die Funktionen des plastidären NDH-1 erklärt. Für diesen wurde eine Beteiligung am CET und der Chlororespiration beschrieben (BENNOUN 1982, BURROWS ET AL. 1998, NIXON 2000).

Die für die CO₂-Fixierung notwendigen NdhD3/NdhF3- und NdhD4/NdhF4-Untereinheiten sind in den bisher untersuchten Plastomen nicht kodiert, weshalb eine Funktion im CCM für den plastidären NDH-1 als unwahrscheinlich gelten muss.

Die Cercozoe *P. chromatophora* besitzt je zwei plastidenähnliche Chromatophoren. Diese sind monophyletisch verwandt mit heutigen α -Cyanobakterien, zu denen z.B. die Prochlorococcen gehören (MARIN ET AL. 2007). Im Genom dieser Chromatophoren sind wie bei den Cyanobakterien mehrere NdhD- und NdhF-Untereinheiten kodiert, darunter sind Verwandte von NdhD3 und NdhD4 und NdhF4 vorhanden.

Tabelle 11: NdhD- und NdhF-Untereinheiten von verschiedenen Cyanobakterien und *P. chromatophora*, die für die Stammbaumanalysen neben den Untereinheiten aus *Synechocystis* verwendet und entsprechend neu annotiert wurden.

Organismus	Gen-Name	alte Bezeichnung	Zugehörigkeit	neue Bezeichnung
<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC 29133/ PCC71302	Npun_R6182	D1	NdhD1	D1_Nostoc
	Npun_R0529	D2a	(NdhD1) NdhD2	D2a_Nostoc
	Npun_R0955	D2b	NdhD2	D2b_Nostoc
	Npun_F3688	D3	NdhD3	D3_Nostoc
	Npun_R4289	D4	(NdhD3) NdhD4	D4_Nostoc
	Npun_R6185	F1	NdhF1	F1_Nostoc
	Npun_F3686	F3	NdhF3	F3_Nostoc
	Npun_R4290	F4	NdhF4	F4_Nostoc
<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	<i>glr0219</i>	D1	NdhD1	D1-Gloeobacter
	<i>glr1004</i>	D3	NdhD3	D3-Gloeobacter
	<i>gll2082</i>	D4	(NdhD3) NdhD4	D4-Gloeobacter
	<i>gll2536</i>	D4	NdhD3/NdhD4	D34-Gloeobacter
	<i>glr2599</i>	F1	NdhF1	F1a-Gloeobacter
	<i>glr0218</i>	F1	NdhF1	F1b-Gloeobacter
	<i>glr1003</i>	F3	NdhF3	F3-Gloeobacter
	<i>gll2083</i>	F4	NdhF4	F4-Gloeobacter
<i>Paulinella chromatophora</i>	PCC_0320	D1	NdhD1	D1-Paulinella
	PCC_0871	D2	NdhD1/NdhD2	D12-Paulinella
	PCC_0916	D3	NdhD3/NdhD4	D34-Paulinella
	PCC_0319	F1	NdhF1	F1-Paulinella
	PCC_0915	F4	NdhF4	F4-Paulinella

Dies spricht dafür, dass in den Chromatophoren zwar der NDH-1MS', nicht aber der NDH-1MS assembliert werden kann, d.h. es kann nur das konstitutive System der CO₂-Ankonzentrierung vorhanden sein, nicht das induzierbare.

Mit der Entstehung der Plastiden – ausgenommen die Chromatophoren von *P. chromatophora* – ging der unterschiedliche modulare Aufbau der NDH-1-Komplexe, den die Cyanobakterien noch aufweisen, verloren. Damit verbunden reduzierte sich auch die Vielfalt der ausgeübten Funktionen. Der plastidäre NDH-1 beteiligt sich anscheinend nicht mehr an der CO₂-Fixierung. Dies gilt auch für die beiden Grünalgenpezies (siehe 5.6), in deren Plastom NDH-1-Untereinheiten identifiziert wurden. Die CO₂-Versorgung wird bei diesen wahrscheinlich von anderen Systemen übernommen. Es besteht sogar die Möglichkeit, dass der mitochondriale Komplex I diese Funktion übernimmt, denn dieser weist wie der cyanobakterielle NDH-1MS ebenfalls Carboanhydrase-ähnliche Untereinheiten auf (siehe Abbildung 2, KLODMANN UND BRAUN 2010).

7 Ausblick

Mit den in dieser Arbeit angefertigten und zusammengefassten Analysen zur Lokalisierung und Zusammensetzung der als NDH-1-Komplexe bezeichneten NADPH-Oxidoreduktasen von *Synechocystis* PCC 6803 wurde das Gesamtbild der cyanobakteriellen NDH-1-Komplexe weiter vervollständigt. Die Ergebnisse zeigen, dass der NDH-1M-Komplex mit großer Wahrscheinlichkeit auch in der Plasmamembran vorhanden ist. Die (jedoch geringe) Aktivität dieses Komplexes konnte durch Analyse von Mutanten gezeigt werden. Die Labilität der NDH-1-Komplexe erschwert die Untersuchung der Zusammensetzung der NDH-1-Komplexe, vor allem die Identifizierung der immer noch unbekanntes NADPH-oxidierenden Kopfgruppe. Die Lokalisierung der verschiedenen NDH-1-Komplexe in den beiden Membransystemen (Plasma- und Thylakoidmembran) konnte aufgrund der Schwierigkeiten der Membranisolierung und -trennung auch in der vorliegenden Arbeit noch nicht eindeutig geklärt werden. Die Isolierung und die Überprüfung der Reinheit von Membranen mittels Western-Blot sind generell mit Problemen behaftet, wie z.B. eine (unbeabsichtigte) selektive Ankonzentrierung von bestimmten Fraktionen. Mit Immungoldmarkierung ist eine Beurteilung der Lokalisierung eher möglich. Sie bedarf aber der Analyse einer größeren Anzahl von Bildern, als es in dieser Arbeit möglich war, um differenzierte Aussagen zuzulassen. Für eine eindeutige Analyse *in vivo* bietet sich die Kopplung von NDH-1-Untereinheiten mit Fluoreszenzmarkern (z.B. GFP) an. Zusammen mit der CLSM-Technologie wäre die Untersuchung der Verteilung der markierten NDH-1-Komplexe auf die Membranen innerhalb einer Zelle möglich. Erste Ansätze zur Kopplung von GFP an die Untereinheiten NdhD1, NdhD2, NdhF1 und NdhJ wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Es stellte sich jedoch heraus, dass alternative Kopplungsstrategien entwickelt und durchgeführt werden müssen. Dass diese Methode aber Erfolg verspricht, wurde in *single-particle*-TEM-Analysen zur Lokalisierung der Untereinheiten NdhL, -M, -N und -O innerhalb des NDH-1-Komplexes gezeigt (BIRUNGI ET AL. 2010). Eine weitere Möglichkeit für Studien der Komplex-Zusammensetzung und deren Lokalisierung ist die Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Methode (FRET). Mit dieser konnte bereits gezeigt werden, dass die Untereinheiten NdhD4 und CupB im selben Komplex benachbart vorliegen (JI ET AL. 2007).

Um den Einfluss der verschiedenen NdhD- und NdhF-Untereinheiten auf die Eigenschaft der CO₂-Konzentrierung durch den NDH-1 zu untersuchen, bieten sich Experimente mit MIMS (*Membrane inlet mass spectroscopy*) an, mit der die Konzentrationen von CO₂ und HCO₃⁻ direkt im Medium analysiert werden können.

Literaturverzeichnis

Eingangszitat: Harold Morowitz, DER SPIEGEL (2009) 24: 122.

ABELES FB (1964): Cell-free hydrogenase from *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* 39: 169-176.

ABKEN HJ, TIETZE M, BRODERSEN J, BÄUMER S, BEIFUSS U UND DEPPENMEIER U (1998): Isolation and characterization of methanophenazine and function of phenazines in membrane-bound electron transport of *Methanosarcina mazei* Gö1. *J Bacteriol* 180 (8): 2027-2032.

ADL SM, SIMPSON AG, FARMER MA, ANDERSEN RA, ANDERSON OR, BARTA JR, BOWSER SS, BRUGEROLLE G, FENSOME RA, FREDERICQ S, JAMES TY, KARPOV S, KUGRENS P, KRUG J, LANE CE, LEWIS LA, LODGE J, LYNN DH, MANN DG, MCCOURT RM, MENDOZA L, MOESTRUP O, MOZLEY-STANDRIDGE SE, NERAD TA, SHEARER CA, SMIRNOV AV, SPIEGEL FW UND TAYLOR MF (2005): The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* 52 (5): 399-451.

AGARWAL R, MATROS A, MELZER M, MOCK HP UND SAINIS JK (2010): Heterogeneity in thylakoid membrane proteomics of *Synechocystis* 6803. *J Prot* 73 (5): 976-991.

ALLAKHVERDIEV SI, NISHIYAMA Y, MIYAIRI S, YAMAMOTO H, INAGAKI N, KANESAKI Y UND MURATA N (2002): Salt stress inhibits the repair of photodamaged photosystem II by suppressing the transcription and translation of psbA genes in *Synechocystis*. *Plant Physiol* 130 (3): 1443-1453.

ANDERSON SL UND MCINTOSH L (1991): Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. *J Bacteriol* 173 (9): 2761-2767.

APPEL J UND SCHULZ R (1996): Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)H-dehydrogenase (complex I). *Biochim Biophys Acta* 1298: 141-147.

ARCHIBALD JM (2009): Green evolution, green revolution. *Science* 324: 191-192.

ARTENI AA, NOWACZYK M, LAX J, KOURIL R, RÖGNER M UND BOEKEMA EJ (2005): Single particle electron microscopy in combination with mass spectrometry to investigate novel complexes of membrane proteins. *J Struct Biol* 149 (3): 325-331.

ARTENI AA, ZHANG P, BATTCHIKOVA N, OGAWA T, ARO EM UND BOEKEMA EJ (2006): Structural characterization of NDH-1 complexes of *Thermosynechococcus elongatus* by single particle electron microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1757 (11): 1469-1475.

ASADA K, HEBER U UND SCHREIBER U (1993): Electron flow to the intersystem chain from stromal components and cyclic electron flow in maize chloroplasts, as detected in intact leaves by monitoring redox change of P700 and chlorophyll fluorescence. *Plant Cell Physiol* 34: 39-50.

ASADA K (1999): The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601-639.

BADGER MR, HANSON D UND PRICE GD (2002): Evolution and diversity of CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria. *Funct Plant Biol* 29: 161-173.

- BADGER MR UND PRICE GD (2003): CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: Molecular components, their diversity and evolution. *J Exp Bot* 54 (383): 609-622.
- BADGER MR, PRICE GD, LONG BM UND WOODGER FJ (2006): The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *J Exp Bot* 57: 249-265.
- BARANOVA EA, HOLT PJ UND SAZANOV LA (2007a): Projection structure of the membrane domain of *Escherichia coli* respiratory complex I at 8 Å resolution. *J Mol Biol* 366 (1): 140-154.
- BARANOVA EA, MORGAN DJ UND SAZANOV LA (2007b): Single particle analysis confirms distal location of subunits NuoL and NuoM in *Escherichia coli* complex I. *J Struct Biol* 159 (2): 238-242.
- BATTCHIKOVA N, ZHANG P, RUDD S, OGAWA T UND ARO EM (2005): Identification of NdhL and Ssl1690 (NdhO) in NDH-1L and NDH-1M complexes of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* 280 (4): 2587-2595.
- BATTCHIKOVA N, EISENHUT M UND ARO EM (2010a): Cyanobacterial NDH-1 complexes: Novel insights and remaining puzzles. *Biochim Biophys Acta*: Epub ahead of print doi:10.1016/j.bbabi.2010.10.017.
- BATTCHIKOVA N, VAINONEN JP, VORONTSOVA N, KERÄNEN M, CARMEL D UND ARO EM (2010b): Dynamic changes in the proteome of *Synechocystis* 6803 in response to CO₂ limitation revealed by quantitative proteomics. *Proteome Res* 9 (11): 5896-5912.
- BÄUMER S, IDE T, JACOBI C, JOHANN A, GOTTSCHALK G UND DEPPENMEIER U (2000): The F420H₂ dehydrogenase from *Methanosarcina mazei* is a Redox-driven proton pump closely related to NADH dehydrogenases. *J Biol Chem* 275 (24): 17968-17973.
- BEKKER A, HOLLAND HD, WANG PL, RUMBLE D 3RD, STEIN HJ, HANNAH JL, COETZEE LL UND BEUKES NJ (2004): Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature* 427 (6970): 117-120.
- BENDALL DS UND MANASSE RS (1995): Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochim Biophys Acta* 1229: 23-38.
- BENNOUN P (1982): Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *PNAS* 79 (14): 4352-4356.
- BENSCHOP JJ, BADGER MR UND PRICE DG (2003): Characterisation of CO₂ and HCO₃⁻ uptake in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Photosynth Res* 77 (2-3): 117-126.
- BERGER S, ELLERSIEK U UND STEINMÜLLER K (1991): Cyanobacteria contain a mitochondrial complex I-homologous NADH-dehydrogenase. *FEBS Lett* 286 (1-2): 129-132.
- BERNÁT G, APPEL J, OGAWA T UND RÖGNER M (2010): Distinct Roles of Multiple NDH-1 Complexes in the Cyanobacterial Electron Transport Network as Revealed by Kinetic Analysis of P700⁺ Reduction in Various ndh-deficient Strains of *Synechocystis* sp. PCC6803. *J Bacteriol*: Epub 00984-10v1.
- BERRY S, SCHNEIDER D, VERMAAS WF UND RÖGNER M (2002): Electron transport routes in whole cells of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: the role of the cytochrome bd-type oxidase. *Biochemistry* 41(10): 3422-3429.
- BERTANI G (1951): Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62 (3): 293-300.

- BIGGINS J (1969): Respiration in blue-green algae. *J Bacteriol* 99 (2): 570-575.
- BIRUNGI M, FOLEA M, BATTCHIKOVA N, XU M, MI H, OGAWA T, ARO EM UND BOEKEMA EJ (2010): Possibilities of subunit localization with fluorescent protein tags and electron microscopy exemplified by a cyanobacterial NDH-1 study. *Biochim Biophys Acta* 1797: 1681-1686.
- BLUM H, BEIER H UND GROSS H (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- BODYŁ A, MACKIEWICZ P UND STILLER JW (2007): The intracellular cyanobacteria of *Paulinella chromatophora*: endosymbionts or organelles? *Trends Microbiol* 15 (7): 295-296.
- BÖHM R, SAUTER M UND BÖCK A (1990): Nucleotide sequence and expression of an operon in *Escherichia coli* coding for formate hydrogenlyase components. *Mol Microbiol* 4 (2): 231-423.
- BOISON G, BOTHE H, HANSEL A UND LINDBLAD P (1999): Evidence against a common use of the diaphorase subunits by the bidirectional hydrogenase and by the respiratory complex I in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Letters* 174 (1): 159-165.
- BOTTIN H, UND LAGOUTTE B (1992): Ferredoxin and flavodoxin from the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. *Biochim Biophys Acta* 1101 (1): 48-56.
- BOXMA B, DE GRAAF RM, VAN DER STAAY GW, VAN ALEN TA, RICARD G, GABALDÓN T, VAN HOEK AH, MOON-VAN DER STAAY SY, KOOPMAN WJ, VAN HELLEMOND JJ, TIELENS AG, FRIEDRICH T, VEENHUIS M, HUYNEN MA UND HACKSTEIN JH (2005): An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature* 434 (7029): 74-79.
- BRANDT U (1997): Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim Biophys Acta* 1318: 79-91.
- BRANDT U, KERSCHER S, DROSE S, ZWICKER K UND ZICKERMANN V (2003): Proton pumping by NADH:ubiquinone oxidoreductase. A redox driven conformational change mechanism? *FEBS Letters* 545: 9-17.
- BURROWS PA, SAZANOV LA, SVAB Z, MALIGA P UND NIXON PJ (1998): Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *EMBO J* 17 (4): 868-876.
- CALVIN M UND BENSON AA (1949): The path of carbon in photosynthesis. IV: The identity and sequence of intermediates in sucrose synthesis. *Science* 109: 140-142.
- CAMPBELL D, HURRY V, CLARKE AK, GUSTAFSSON P UND ÖQUIST G (1998): Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Mic Mol Biol Rev* 62: 667-683.
- CARDONA T, BATTCHIKOVA N, ZHANG P, STENSJÖ K, ARO EM, LINDBLAD P UND MAGNUSON A (2009): Electron transfer protein complexes in the thylakoid membranes of heterocysts from the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Biochim Biophys Acta* 1787: 252-263.
- CARRIE C, MURCHA MW, KUEHN K, DUNCAN O, BARTHET M, SMITH PM, EUBEL H, MEYER E, DAY DA, MILLAR AH UND WHELAN J (2008): Type II NAD(P)H dehydrogenases are targeted to mitochondria and chloroplasts or peroxisomes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 582: 3073-3079.

- CARROLL J, FEARNLEY IM, SKEHEL JM, SHANNON RJ, HIRST J UND WALKER JE (2006): Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *J Biol Chem* 281 (43): 32724-32727.
- CLELAND RS UND BENDALL DS (1992): Photosystem I cyclic electron transport: measurement of ferredoxin-plastoquinone reductase activity. *Photosynth Res* 34: 409-418.
- CHOBOT SE, ZHANG H, MOSER CC UND DUTTON PL (2008): Breaking the Q-cycle: finding new ways to study Qo through thermodynamic manipulations. *J Bioenerg Biomembr* 40 (5): 501-507.
- CHOMYN A, MARIOTTINI P, CLEETER MW, RAGAN CI, MATSUNO-YAGI A, HATEFI Y, DOOLITTLE RF UND ATTARDI G (1985): Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. *Nature* 314 (6012): 592-597.
- CLASON T, RUIZ T, SCHÄGGER H, PENG G, ZICKERMANN V, BRANDT U, MICHEL H UND RADERMACHER M (2010): The structure of eukaryotic and prokaryotic complex I. *J Struct Biol* 169 (1): 81-88.
- COLLINS MD UND JONES D (1981): Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiol Rev.* 45(2): 316-354.
- COOLEY J, HOWITT CA UND VERMAAS WFJ (2000): Succinat:quinol oxidoreductases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: presence and function in metabolism and electron transport. *Journal of Bacteriology* 182: 714-722.
- COURNAC L, GUEDENEY G, PELTIER G UND VIGNAIS PM (2004): Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex. *J Bacteriol* 186 (6): 1737-1746.
- DALCORSO G, PESARESI P, MASIERO S, ASEVA E, SCHÜNEMANN D, FINAZZI G, JOLIOT P, BARBATO R UND LEISTER D (2008): A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*. *Cell* 132 (2): 273-285.
- DAVIS BJ (1964): Disc Electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann N Y Acad Sci* 121: 404-427.
- DEGLI ESPOSTI M UND GHELLI A (1994): The mechanism of proton and electron transport in mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta* 1187: 116-120.
- DENG Y, YE J UND MI H (2003): Effects of low CO₂ on NAD(P)H dehydrogenase, a mediator of cyclic electron transport around photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Cell Physiol* 44 (5): 534-540.
- DUDKINA NV, EUBEL H, KEEGSTRA W, BOEKEMA EJ UND BRAUN HP (2005): Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *PNAS* 102 (9): 3225-3229.
- DWORSKY A, MAYER B, REGELSBERGER G, FROMWALD S UND PESCHEK GA (1995): Functional and immunological characterization of both mitochondria-like and chloroplast-like electron-proton transport proteins in isolated and purified cyanobacterial membranes. *Bioelectrochem Bioenerg* 38: 35-43.

- EISENHUT M, VON WOBESER EA, JONAS L, SCHUBERT H, ISELINGS BW, BAUWE H, MATTHIJS HCP UND HAGEMANN M (2007): Long-term response toward inorganic carbon limitation in wild type and glycolate turnover mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803. *Plant Physiol* 144: 1946-1959.
- EFREMOV RG, BARADARAN R UND SAZANOV LA (2010): The architecture of respiratory complex I. *Nature* 465 (7297): 441-445.
- ENDO T, SHIKANAI T, SATO F UND ASADA K (1998): NAD(P)H dehydrogenase-dependent, antimycin A-sensitive electron donation to plastoquinone in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 39 (11): 1226-1231.
- ERABI T, HIGUTI T, KAKUNO T, YAMASHITA J, TANAKA M UND HORIO T (1975): Polarographic studies on ubiquinone-10 and rhodoquinone bound with chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *J Biochem* 78 (4): 795-801.
- EUBEL H, JÄNSCH L UND BRAUN HP (2003): New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol* 133 (1): 274-286.
- FEARNLEY IM UND WALKER JE (1992): Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins. *Biochim Biophys Acta* 1140 (2): 105-134.
- FEARNLEY IM, RUNSWICK MJ UND WALKER JE (1993): A homologue of the nuclear coded 49 kD subunit of bovine mitochondrial NADH-ubiquinone reductase is coded in chloroplast DNA. *EMBO J* 8: 665-672.
- FELSENSTEIN J (2005): Using the quantitative genetic threshold model for inferences between and within species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 1427-1434.
- FIGGE RM, CASSIER-CHAUVAT C, CHAUVAT F UND CERFF R (2001): Characterization and analysis of an NAD(P)H dehydrogenase transcriptional regulator critical for the survival of cyanobacteria facing inorganic carbon starvation and osmotic stress. *Mol Microbiol* 39: 455-468.
- FITCH WM UND MARGOLIASH E (1967): A method for estimating the number of invariant amino acid coding positions in a gene using cytochrome c as a model case. *Biochem Genet* 1: 65-71.
- FOLEA IM, ZHANG P, NOWACZYK MM, OGAWA T, ARO EM UND BOEKEMA EJ (2008): Single particle analysis of thylakoid proteins from *Thermosynechococcus elongatus* and *Synechocystis* 6803: localization of the CupA subunit of NDH-1. *FEBS Lett* 582 (2): 249-254.
- FRIEDRICH T, STEINMULLER K UND WEISS H (1995): The proton-pumping respiratory Complex-I of bacteria and mitochondria and its homolog in chloroplasts. *FEBS Lett* 367: 107-111.
- FRIEDRICH T UND WEISS H (1997): Modular evolution of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase and the origin of its modules. *J Theor Biol* 187 (4): 529-540.
- FRIEDRICH T UND SCHEIDE D (2000): The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *FEBS Lett* 479 (1-2): 1-5.
- FRIEDRICH T (2001): Complex I: A chimera of a redox and conformation-driven proton pump. *J Bioenergetics Biomembranes* 33 (3): 169-177.

- FRIEDRICH T UND BÖTTCHER B (2004): The gross structure of the respiratory complex I: a Lego System. *Biochim Biophys Acta* 1608 (1): 1-9.
- GABALDON T, RAINEY D UND HUYNEN MA (2005): Tracing the evolution of a large protein complex in the eukaryotes, NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Molecular Biology* 348: 857-870.
- GÁLVEZ S, HIRSCH AM, WYCOFF KL, HUNT S, LAYZELL DB, KONDOROSI A UND CRESPI M (2000): Oxygen regulation of a nodule-located carbonic anhydrase in alfalfa. *Plant Physiol* 124 (3): 1059-1068.
- GEMPERLI AC, DIMROTH P UND STEUBER J (2002): The respiratory complex I (NDH I) from *Klebsiella pneumoniae*, a sodium pump. *J Biol Chem* 277 (37): 33811-33817.
- GENTY B, BRIANTAIS JM UND BAKER NR (1989): The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 990 (1): 87-92.
- GEORG J, VOSS B, SCHOLZ I, MITSCHKE J, WILDE A UND HESS WR (2009): Evidence for a major role of antisense RNAs in cyanobacterial gene regulation. *MOL SYST BIOL* 5: 305.
- Gotoh E, Matsumoto M, Ogawa K, Kobayashi Y und Tsuyama M (2010): A qualitative analysis of the regulation of cyclic electron flow around photosystem I from the post-illumination chlorophyll fluorescence transient in *Arabidopsis*: a new platform for the in vivo investigation of the chloroplast redox state. *Photosynthesis Res* 103 (2): 111-123.
- GOULD SB, WALLER RF UND MCFADDEN GI (2008): Plastid evolution. *Annu Rev Plant Biol* 59: 491-517.
- GRIGORIEVA G UND SHESTAKOV S (1982): Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *FEMS Microbiol Lett* 13: 367-370.
- GRAY MW, LANG BF, CEDERGREN R, GOLDING GB, LEMIEUX C, SANKOFF D, TURMEL M, BROSSARD N, DELAGE E, LITTLEJOHN TG, PLANTE I, RIOUX P, SAINT-LOUIS D, ZHU Y UND BURGER G (1998): Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucleic Acids Res* 26 (4): 865-878.
- GUÉNEBAUT V, VINCENTELLI R, MILLS D, WEISS H UND LEONARD KR (1997): Three-dimensional structure of NADH-dehydrogenase from *Neurospora crassa* by electron microscopy and conical tilt reconstruction. *J Mol Biol* 265 (4): 409-418.
- GUEDENEY G, CORNEILLE S, CUINÉ S UND PELTIER G (1996): Evidence for an association of ndh B, ndh J gene products and ferredoxin-NADP-reductase as components of a chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase complex. *FEBS Lett* 378 (3): 277-280.
- GUTTHANN F, EGERT M, MARQUES A UND APPEL J (2007): Inhibition of respiration and nitrate assimilation enhances photohydrogen evolution under low oxygen concentrations in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim Biophys Acta* 1787: 161-169.
- HALL TA (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- HART SE, SCHLARB-RIDLEY BG, BENDALL DS UND HOWE CJ (2005): Terminal oxidases of cyanobacteria. *Biochem Soc Trans* 33 (4): 832-835.

- HASHIMOTO K UND SATO N (2001): Characterization of the mitochondrial nad7 gene in *Physcomitrella patens*: Similarity with angiosperm nad7 genes. *Plant Science* 160 (5): 807-815.
- HATEFI Y, HAAVIK AG UND GRIFFITHS DE (1961): Reconstitution of the electron transport system: I. Preparation and properties of the interacting enzyme complexes *Biochem Biophys Res Comm* 4 (6): 441-446.
- HEDDERICH R (2004): Energy-converting [NiFe] hydrogenases from archaea and extremophiles: ancestors of complex I. *J Bioenergetics Biomembranes* 36 (1): 65-75.
- HELMAN Y, TCHERNOV D, REINHOLD L, SHIBATA M, OGAWA T, SCHWARZ R, OHAD I UND KAPLAN A (2003): Genes encoding a-type flavoproteins are essential for photoreduction of O₂ in cyanobacteria. *Curr Biol* 13: 230-235.
- HERDMAN M UND STANIER RY (1977): Cyanelle – Chloroplast or endosymbiotic prokaryote. *FEMS Microbiol Letters* 1 (1): 7-11.
- HERRANEN M, BATTCHIKOVA N, ZHANG P, GRAF A, SIRPIÖ S, PAAKKARINEN V UND ARO EM (2004): Towards functional proteomics of membrane protein complexes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol* 134 (1): 470-481.
- HERTER SM, KORTLÜKE CM UND DREWS G (1998): Complex I of *Rhodobacter capsulatus* and its role in reverted electron transport. *Arch Microbiol* 169 (2): 98-105.
- HIHARA Y, KAMEI A, KANEHISA M, KAPLAN A UND IKEUCHI M (2001): DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. *Plant Cell* 13 (4): 793-806
- HIHARA Y, SONOIKE K, KANEHISA M UND IKEUCHI M (2003): DNA microarray analysis of redox-responsive genes in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* 185 (5): 1719-1725.
- HINCHLIFFE P, CARROLL UND SAZANOV LA (2006): Identification of a novel subunit of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry* 45: 4413-4420.
- HIRATSUKA J, SHIMADA H, WHITTIER R, ISHIBASHI T, SAKAMOTO M, MORI M, KONDO C, HONJI Y, SUN CR, MENG BY, LI YQ, KANNO A, NISHIZAWA Y, HIRAI A, SHINOZAKI K UND SUGIURA M (1989): The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol Gen Genet* 217 (2-3): 1851-1894.
- HOEK AH VAN, AKHMANOVA AS, HUYNEN MA UND HACKSTEIN JH (2000): A mitochondrial ancestry of the hydrogenosomes of *Nyctotherus ovalis*. *Mol Biol Evol* 17 (1): 202-206.
- HOWITT CA, SMITH GD UND DAY DA (1993): Cyanide-insensitive oxygen uptake and pyridine nucleotide dehydrogenases in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Biochim Biophys Acta Bioenergetics* 1141 (2-3): 313-320.
- HOWITT CA, WHELAN J, PRICE GD UND DAY DA (1996): Cloning, analysis and inactivation of the ndhK gene encoding a subunit of NADH quinone oxidoreductase from *Anabaena* PCC 7120. *Eur J Biochem* 240: 173-180.

HOWITT CA UND VERMAAS W (1998): Quinol and cytochrome oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 37: 17944-17951.

HOWITT CA, UDALL PK UND VERMAAS WFJ (1999): Type 2 NADH dehydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 are involved in regulation rather than respiration. *JBC* 181 (13): 3993-4003.

HUANG F, HEDMAN E, FUNK C, KIESELBACH T, SCHRÖDER WP UND NORLING B (2004): Isolation of outer membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its proteomic characterization. *Mol Cell Proteomics* 3 (6): 586-595.

HUB JS UND DE GROOT BL (2006): Does CO₂ Permeate through Aquaporin-1? *Biophysical Journal* 91 (3): 842-848.

IVANOV B, ASADA K UND EDWARDS GE (2007): Analysis of donors of electrons to photosystem I and cyclic electron flow by redox kinetics of P700 in chloroplasts of isolated bundle sheath strands of maize. *Photosynth Res* 92: 65-74.

JANS F, MIGNOLET E, HOUYOUX PA, CARDOL P, GHYSELS B, CUINÉ S, COURNAC L, PELTIER G, REMACLE C UND FRANCK F. (2008): A type II NAD(P)H dehydrogenase mediates light-independent plastoquinone reduction in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *PNAS* 105 (51): 20546-20551.

JAYNES JM UND VERNON LP (1982): The cyanelle of *Cyanophora paradoxa*: almost a cyanobacterial chloroplast. *Trends Biochem Sciences* 7 (1): 22-24.

JI D, LV W, HUANG Z, XIA A, XU M, MAB W, MI H UND OGAWA T (2007): Fluorescence resonance energy transfer imaging of CFP/YFP labeled NDH in cyanobacterium cell. *J Luminescence* 122-123: 463-466.

JOËT T, COURNAC C, HORVATH EM, MEDGYESY P UND PELTIER G (2001): Increased sensitivity of photosynthesis to antimycin A induced by inactivation of the chloroplast *ndhB* gene. Evidence for a participation of the NADH-dehydrogenase complex to cyclic electron flow around photosystem I. *Plant Phys* 125: 1919-1929.

JONES LW UND BISHOP NI (1976): Simultaneous measurements of oxygen and hydrogen exchange from the blue-green algae *Anabaena*. *Plant Physiol* 57: 659-665.

JUNG C, HIGGINS CM UND XU Z (2000): Measuring the quantity and activity of mitochondrial electron transport chain complexes in tissues of central nervous system using blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 286 (2): 214-223.

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, YAMADA M, YASUDA M UND 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.

KAPLAN A UND REINHOLD L (1999): CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 50: 539-570.

KEREN N, LIBERTON M UND PAKRASI HB (2005): Photochemical competence of assembled photosystem II core complex in cyanobacterial plasma membrane. *J Biol Chem* 280: 6548-6553.

- KIKUNO R UND MIYATA T (1985): Sequence homologies among mitochondrial DNA-coded URF2, URF4 and URF5. *FEBS Lett* 189(1): 85-88.
- KLODMANN J UND BRAUN HP (2010): Proteomic approach to characterize mitochondrial complex I from plants. *Phytochemistry* doi:10.1016/j.phytochem.2010.11.012.
- KLUGHAMMER B, SÜLTEMEYER D, BADGER MR UND PRICE GD (1999): The involvement of NAD(P)H dehydrogenase subunits, NdhD3 and NdhF3, in high-affinity CO₂ uptake in *Synechococcus* sp. PCC7002 gives evidence for multiple NDH-1 complexes with specific roles in cyanobacteria. *Mol Microbiology* 32 (6): 1305-1315.
- KORN A, AJLANI G, LAGOUTTE B, GALL A UND SÉTIF P (2009): Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase association with phycocyanin modulates its properties. *J Biol Chem* 284 (46): 31789-31797.
- KRAUSE GH UND WEIS E (1991): Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Revue of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-349.
- KREBS HA UND JOHNSON WA (1937): *The Role of Citric Acid in Intermediate Metabolism in Animal Tissues. Enzymologia* 4: 148-156.
- KREBS W, STEUBER J, GEMPERLI AC UND DIMROTH P (1999): Na⁺ translocation by the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Klebsiella pneumoniae*. *Mol Microbiol* 33 (3): 590-598.
- KUBOTA H, SAKURAI I, KATAYAMA K, MIZUSAWA N, OHASHI S, KOBAYASHI M, ZHANG P, ARO EM UND WADA H (2009): Purification and characterization of photosystem I complex from *Synechocystis* sp. PCC 6803 by expressing histidine-tagged subunits. *Biochim Biophys Acta* 1797 (1): 98-105.
- KUFIRYK GI, SACHET M, SCHMETTERER G UND VERMAAS WF (2002): Transformation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a tool for genetic mapping: optimization of efficiency. *FEMS Microbiol Lett* 206 (2): 215-219.
- KÜNDEL A, VORHOLT JA, THAUER RK UND HEDDERICH R (1998): An *Escherichia coli* hydrogenase-3-type hydrogenase in methanogenic archaea. *Eur J Biochem* 252(3): 467-476.
- KUNOW J, LINDER D, STETTER KO UND THAUER RK (1994): F420H₂: quinone oxidoreductase from *Archaeoglobus fulgidus*. Characterization of a membrane-bound multisubunit complex containing FAD and iron-sulfur clusters. *Eur J Biochem* 223 (2): 503-511.
- KWON J, OH J, PARK C, CHO K, KIM SI, KIM S, LEE S, BHAK J, NORLING B UND CHOI JS (2010): Systematic cyanobacterial membrane proteome analysis by combining acid hydrolysis and digestive enzymes with nano-liquid chromatography-Fourier transform mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1217 (3): 285-293.
- LABARRE J, CHAUVAT F UND 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 (6): 3449-3457.
- LAEMMLI UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- LAUTERBORN R (1895): Protozoenstudien II. *Paulinella chromatophora* nov. gen., nov. spec., ein beschalter Rhizopode des Süßwassers mit blaugrünen chromatophorenartigen Einschlüssen. *Z Wiss Zool* 59: 537-544.
- LEE S, RYU JY, KIM SY, JEON JH, SONG JY, CHO HT, CHOI SB, CHOI D, DE MARSAC NT UND PARK YI (2007): Transcriptional regulation of the respiratory genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 during the early response to glucose feeding. *Plant Physiol* 145 (3): 1018-1030
- LEIF H, SLED VD, OHNISHI T, WEISS H UND FRIEDRICH T (1995): Isolation and characterization of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 230 (2): 538-548.
- LICHTENTHALER HK (1987): Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- LIU YR, MA WM UND MI HL (2010): Increase of the expression and activity of ferredoxin-NADP(+) oxidoreductase in the cells adapted to low CO₂ in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Photosynthetica* 3: 417-420.
- LOWRY OH, ROSBROUGH NJ, FARR AL UND RANDALL RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 (1): 265-275.
- MA W, DENG Y, OGAWA T UND MI H (2006): Active NDH-1 Complexes from the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Plant Cell Phys* 47 (10): 1432-1436.
- MA W UND MI H (2008): Effect of exogenous glucose on the expression and activity of NADPH dehydrogenase complexes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803. *Plant Phys Biochem* 46: 775-779.
- MAEDA S, BADGER MR UND PRICE GD (2002): Novel gene products associated with NdhD3/D4-containing NDH-1 complexes are involved in photosynthetic CO₂ hydration in the cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7942. *Mol Microbiol* 43 (2): 425-435.
- MANO J, MIYAKE C, SCHREIBER U UND ASADA K (1995): Photoactivation of the Electron Flow from NADPH to Plastoquinone in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 36 (8): 1589-1598.
- MAO HB, LI GF, RUAN X, WU QY, GONG YD, ZHANG XF UND ZHAO NM (2002): The redox state of plastoquinone pools regulates state transition via cytochrome b6f complex in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Letters* 519: 82-86.
- MARGULIS L (1971): The origin of plant and animal cells. *American scientist* 59 (2): 230-235.
- MARIN B, NOWACK ECM UND MELKONIAN M (2005): A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis. *Protist* 156 (4): 425-432.
- MARIN B, NOWACK ECM, GLÖCKNER G UND MELKONIAN M (2007): The ancestor of the *Paulinella* chromatophore obtained a carboxysomal operon by horizontal gene transfer from a *Nitrococcus*-like gammaproteobacterium. *BMC Evol Biol* 7: 85.
- MARTÍN M UND SABATER B (2010): Plastid ndh genes in plant evolution. *Plant Physiol Biochem* 48 (8): 636-645.

- MATSUO M, ENDO T UND ASADA A (1998): Properties of the respiratory NAD(P)H dehydrogenase isolated from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Plant Cell Physiol* 39: 263-267.
- MATTHIJS HCP, LUDÉRUS EME, LÖFFLER HJM, CHOLTS MJC UND KRAAYENHOF R (1984): Energy metabolism in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. Participation of the thylakoid photosynthetic electron transfer chain in the dark respiration of NADPH and NADH. *Biochim Biophys Acta* 766: 29-37
- MCGINN PJ, PRICE GD, MALESZKA R UND BADGER MR (2003): Inorganic carbon limitation and light control the expression of transcripts related to the CO₂-concentrating mechanism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Plant Physiol* 132 (1): 218-229.
- MEHLER AH (1951): Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanisms of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch Biochem Biophys* 33: 65-77.
- MELKONIAN M UND MOLLENHAUER D (2005): Robert Lauterborn (1869—1952) and his *Paulinella chromatophora*. *Protist* 156: 253-262.
- MERCEDES M UND SABATER B (2010): Plastid ndh genes in plant evolution. *Plant Phys Biochem* 48 (8): 636-645.
- MELO AM, BANDEIRAS TM UND TEIXEIRA M (2004): New insights into type II NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Microbiol Mol Biol Rev* 68 (4): 603-616.
- MENG BY, MATSUBAYASHI T, WAKASUGI T, SHINOZAKI K, SUGIURA M, HIRAI A, MIKAMI T, KISHIMA Y UND KINOSHITA T (1986): Ubiquity of the genes for components of a NADH dehydrogenase in higher plant chloroplast genomes. *Plant Science* 47 (3): 181-184.
- MEUNIER PC, COLÓN-LÓPEZ MS UND SHERMAN LA (1997): Temporal changes in state transitions and photosystem organization in the unicellular, diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142. *Plant Phys* 115: 991-1000.
- MI H, ENDO T, SCHREIBER U, OGAWA T UND ASADA K (1992): Electron donation from cyclic and respiratory flows to the photosynthetic intersystem chain is mediated by pyridine nucleotide dehydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Cell Physiol* 33: 1233-1237.
- MI H, ENDO T, OGAWA T UND ASADA K (1995): Thylakoid membrane-bound, NADPH-specific pyridine nucleotide dehydrogenase complex mediated cyclic electron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol* 36: 661-668.
- MI H, YE J, WANG YI UND SHEN Y (1997): Mechanism of temperature dependence of post-illumination transient increase in chlorophyll fluorescence in cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Chinese Science Bulletin* 42: 1400-1403.
- MILLER AG, ESPIE GS UND CANVIN DT (1988): Chlorophyll a fluorescence yield as a monitor of both active CO₂ and HCO₃⁻ transport by the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. *Plant Physiol* 86 (3): 655-658.
- MITCHELL P (1961): Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191: 144-148.

- MITCHELL P (1975a): Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Lett* 56 (1): 1-6.
- MITCHELL P (1975b): The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett* 59 (2): 137-139.
- MOLINA-HEREDIA FP, BALME A, HERVÁS M, NAVARRO JA UND DE LA ROSA MA (2002): A comparative structural and functional analysis of cytochrome cM cytochrome c6 and plastocyanin from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett* 517 (1-3): 50-54.
- MOSS DA UND BENDALL DS (1984): Cyclic electron transport in chloroplasts. The Q-cycle and the site of action of antimycin. *Biochim Biophys Acta* 767: 389-395.
- MÜLLER M (1993): The hydrogenosome. *J Gen Microbiol* 139: 2879-2889.
- MULLINEAUX CW UND ALLEN JF (1986): The state 2 transition in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 can be driven by respiration electron flow into the plastoquinone pool. *FEBS Letters* 205: 155-160.
- MUNEKAGE YN, HOJO M, MEURER J, ENDO T, TASAKA M UND SHIKANAI T (2002): PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell* 110 (3): 361-371.
- MUNEKAGE YN, EYMERY F, RUMEAU D, CUIÑÉ S, OGURI M, NAKAMURA N, YOKOTA A, GENTY B UND PELTIER G (2010): Elevated expression of PGR5 and NDH-H in bundle sheath chloroplasts in C4 flaveria species. *Plant Cell Physiol* 51 (4): 664-448.
- MUNSHI MK, KOBAYASHI H UND SHIKANAI T (2005): Identification of a novel protein, CRR7, required for the stabilization of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex in *Arabidopsis*. *Plant J* 44: 1036-1044.
- MUNSHI MK, KOBAYASHI H UND SHIKANAI T (2006): Chlororespiratory reduction 6 is a novel factor required for accumulation of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141: 737-744.
- MURATA N UND OMATA T (1983): Isolation of cyanobacterial plasma membranes. *Methods in Enzymology* 167: 245-251.
- NAKAMURA Y, KANEKO T, HIROSAWA M, MIYAJIMA N UND TABATA S (1998): CyanoBase, a www database containing the complete nucleotide sequence of the genome of *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Nucleic Acids Res* 26 (1): 63-67.
- NAKAYAMA Y, HAYASHI M UND UNEMOTO T (1998): Identification of six subunits constituting Na⁺-translocating NADH-quinone reductase from the marine *Vibrio alginolyticus*. *FEBS Lett.* 422: 240-242.
- NEVO R, CHARUVI D, SHIMONI E, SCHWARZ R, KAPLAN A, OHAD I UND REICH Z (2007): Thylakoid membrane perforations and connectivity enable intracellular traffic in cyanobacteria. *EMBO J* 26: 1467-1473.
- NIXON PJ (2000): Chlororespiration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355 (1402): 1541-1547.
- NORLING B, MIRZAKHANUAN V, NILSSON F, MORRÉ DJ UND ANDERSSON B (1994): Subfractional analysis of cyanobacterial membranes and isolation of plasma membranes by aqueous polymer two-phase partitioning. *Anal Biochem* 218: 103-111.

- NORLING B, ZAK E, ANDERSSON B UND PAKRASI H (1998): 2D-isolation of pure plasma and thylakoid membranes from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett* 436: 189-192.
- NOWACK EC, MELKONIAN M UND GLÖCKNER G (2008): Chromatophore genome sequence of *Paulinella* sheds light on acquisition of photosynthesis by eukaryotes. *Curr Biol* 18 (6): 410-418.
- OGAWA T (1990): Mutants of *Synechocystis* PCC6803 defective in inorganic carbon transport. *Plant Physiol* 94 (2): 760-765.
- OGAWA T (1991): A gene homologous to the subunit-2 gene of NADH dehydrogenase is essential to inorganic carbon transport of *Synechocystis* PCC6803. *PNAS* 88 (10): 4275-4279.
- OGAWA T (1992): Identification and Characterization of the *ictA/ndhL* Gene Product Essential to Inorganic Carbon Transport of *Synechocystis* PCC6803. *Plant Physiol* 99 (4): 1604-1608.
- OHKAWA H, PAKRASI HB UND OGAWA T (2000): Two types of functionally distinct NAD(P)H dehydrogenases in *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. *JBC* 275 (41): 31630-31634.
- OHKAWA H, SONODA M, SHIBATA M UND OGAWA T (2001): Localization of NAD(P)H dehydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* 183 (16): 4938-4939.
- OHKAWA H, SONODA M, HAGINO N, SHIBATA M, PAKRASI HB UND OGAWA T (2002): Functionally distinct NAD(P)H dehydrogenases and their membrane localization in *Synechocystis* sp PCC6803. *Funct Plant Biol* 29: 195-200.
- OHNISHI T, KAWAGUCHI K UND HAGIHARA B (1966): Preparation and some properties of yeast mitochondria. *J Biol Chem* 241 (8): 1797-1806.
- OHNISHI T UND SALERNO JC (2005): Conformation-driven and semiquinone-gated proton-pump mechanism in the NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *FEBS Letters* 579: 4555-4561.
- OHNISHI T (2010): Structural biology: Piston drives a proton pump. *Nature* 465 (7297): 428-429.
- OHYAMA K, FUKUZAWA H, KOHCHI T, SHIRAI H, SANO T, SANO S, UMESONO K, SHIKI Y, TAKEUCHI M, CHANG Z, AOTA S, HACHIRO INOKUCHI H UND OZEKI H (1986): Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature*, 322: 572-574.
- OMATA T, PRICE GD, BADGER MR, OKAMURA M, GOHTA S UND OGAWA T (1999): Identification of an ATP-binding cassette transporter involved in bicarbonate uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *PNAS* 96 (23): 13571-13576.
- OYABU J, OHTSUKA M, KASHINO Y, KOIKE H UND SATOH K (2008): The expression pattern of NAD(P)H oxidases and the cyclic electron transport pathway around photosystem I of *Synechocystis* sp. PCC6803 depend on growth conditions. *Biosci Biotechnol Biochem* 72 (12): 3180-3188.
- OSYCZKA A, MOSER CC UND DUTTON PL (2005): Fixing the Q cycle. *Trends Biochem Sci* 30 (4): 176-182.
- PAPAGEORIOU GC, TISMILLI-MICHAEL M UND STAMATAKIS GC (2007): The fast and slow kinetics of chlorophyll a fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: a viewpoint. *Photosynth Res* 94: 275-290.

- PEARCE J, LEACH CK UND CARR NG (1969): The incomplete tricarboxylic acid cycle in the blue-green alga *Anabaena variabilis*. *J Gen Microbiol* 55(3): 371-378.
- PELTIER G, TOLLETER D, BILLON E UND COURNAC L (2010): Auxiliary electron transport pathways in chloroplasts of microalgae. *Photosynth Res* 106 (1-2): 19-31.
- PENG L, SHIMIZU H UND SHIKANAI T (2008): The chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex interacts with photosystem I in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 283 (50): 34873-348739.
- PENG L, FUKAO Y, FUJIWARA M, TAKAMI T UND SHIKANAI T (2009): Efficient operation of NAD(P)H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCl in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21 (11): 3623-3640.
- PENG L, CAI W UND SHIKANAI T (2010): Chloroplast stromal proteins, CRR6 and CRR7, are required for assembly of the NAD(P)H dehydrogenase subcomplex A in *Arabidopsis*. *Plant J Accepted Article* doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04240.x
- PERALES M, EUBEL H, HEINEMEYER J, COLANERI A, ZABALETA E UND BRAUN HP (2005): Disruption of a nuclear gene encoding a mitochondrial gamma carbonic anhydrase reduces complex I and supercomplex I + III₂ levels and alters mitochondrial physiology in *Arabidopsis*. *J Mol Biol* 350 (2): 263-277.
- PESCHEK GA (1983): The cytochrome f-b electron transport complex: A common link between photosynthesis and respiration in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochem J* 210: 269-272.
- PETERSON GL 1977: A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochemistry* 83: 346-356.
- PIEULLE L, GUEDENEY G, CASSIER-CHAUVAT C, JEANJEAN R, CHAUVAT F UND PELTIER G (2000): The gene encoding the NdhH subunit of type 1 NAD(P)H dehydrogenase is essential to survival of *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS Letters* 487: 272-276.
- PILKINGTON SJ, SKEHEL JM, GENNIS RB UND WALKER J (1991): Relationship between mitochondrial NADH-ubiquinone reductase and a bacterial NAD-reducing hydrogenase. *Biochemistry* 30 (8): 2166-2175.
- PILS D, GREGOR W UND SCHMETTERER G (1997): Evidence for in vivo activity of three distinct respiratory terminal oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *FEMS Microbiol Let* 152: 83-88.
- PILS D UND SCHMETTERER G (2001): Characterization of three bioenergetical active respiratory terminal oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *FEMS Letters* 203: 217-222.
- PRICE GD, WOODGER FJ, BADGER MR, HOWITT SM UND TUCKER L (2004): Identification of a SulP-type bicarbonate transporter in marine cyanobacteria. *PNAS* 101 (52): 18228-18233.
- PROMMEENATE P, LENNON AM, MARKERT C, HIPPLER M UND NIXON PJ (2004): Subunit composition of NDH-1 complexes of *Synechocystis* sp. PCC 6803: Identification of two new ndh gene products with nuclear-encoded homologues in the chloroplast Ndh complex. *J Biol Chem* 279 (27): 28165-28173.
- QUILES MJ UND CUELLO J (1998): Association of ferredoxin-NADP oxidoreductase with the chloroplastic pyridine nucleotide dehydrogenase complex in barley leaves. *Plant Physiol* 117: 235-244.

- QUILES MJ, GARCÍA A UND CUELLO J (2003): Comparison of the thylakoidal NAD(P)H dehydrogenase complex and the mitochondrial complex I separated from barley leaves by blue-native PAGE. *Plant Science* 164 (4): 541-547.
- RADERMACHER M, RUIZ T, CLASON T, BENJAMIN S, BRANDT U UND ZICKERMANN V (2006): The three-dimensional structure of complex I from *Yarrowia lipolytica*: A highly dynamic enzyme. *J Structural Biology* 154: 269-279.
- RAGAN CI UND RACKER E (1973): Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. *JBC* 248 (7): 2563-2569.
- RANSAC S, ARNAREZ C UND MAZAT JP (2010): The flitting of electrons in complex I: A stochastic approach. *Biochim Biophys Acta Bioenergetics* 1797 (6-7): 641-648.
- RAO NA, FELTON SP, HUENNEKENS FM UND MACKLER B (1963): Flavin mononucleotide: the coenzyme of reduced diphosphopyridine nucleotide dehydrogenase. *J Biol Chem* 238: 449-455.
- RAVEN PH (1970): A multiple origin for plastids and mitochondria. *Science* 169 (946): 641-646.
- RIPPKA R, DERUELLES J, WATERBURY JB, HERDMANN M UND STANIER RY (1979): Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111: 1-61.
- RUMEAU D, BÉCUWE-LINKA N, BEYLY A, LOUWAGIE M, GARIN J UND PELTIER G (2005): New subunits NDH-M, -N, and -O, encoded by nuclear genes, are essential for plastid Ndh complex functioning in higher plants. *Plant Cell* 17 (1): 219-232.
- RUMEAU D, PELTIER G UND COURNAC L (2007): Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant Cell Environ* 30 (9): 1041-1051.
- RYU JY, SUH KH, CHUNG YH, PARK YM, CHOW WS UND PARK YI (2003a): NADPH dehydrogenase-mediated respiratory electron transport in thylakoid membranes of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is inactive in the light. *Mol Cells* 15 (2): 240-244.
- RYU JY, SUH KH, CHUNG YH, PARK YM, CHOW WS UND PARK YI (2003b): Cytochrome *c* oxidase of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 protects photosynthesis from salt stress. *Mol Cells* 16 (1): 74-77.
- 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.
- SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB UND EHRLICH HA (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 489-491.
- SANDMANN G UND MALKIN R (1983): NADH and NADPH as electron donors to respiratory and photosynthetic electron transport in the blue-green alga, *Aphanocapsa*. *Biochim Biophys Acta* 725: 221-224
- SATO S, SHIMODA Y, MURAKI A, KOHARA M, NAKAMURA Y UND TABATA S (2007): A large-scale protein protein interaction analysis in *Synechocystis* sp. PCC6803. *DNA Res* 14 (5): 207-216.

- SAZANOV LA UND HINCHLIFFE P (2006): Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* 311: 1430-1436.
- SCHÄGGER H, JAGOW G VON (1991): Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199 (2): 223-231.
- SCHÄGGER H UND PFEIFFER K (2000): Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19 (8): 1777-1783.
- SCHERER S (1990): Do photosynthetic and respiratory electron transport chains share redox proteins? *Trends Biochem Sci* 15 (12): 458-462.
- SCHLEGEL HG UND SCHNEIDER K (1978): Introductory report: Distribution and physiological role of hydrogenases in microorganisms. *Hydrogenases: their catalytic activity, structure and function*. DA Bryant, Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands: 15-44.
- SCHLUCHTER WM, ZHAO J UND BRYANT DA (1993): Isolation and characterization of the *ndhF* gene of *Synechococcus* sp. strain PCC7002 and initial characterization of an interposon mutant. *J Bacteriol* 175: 3343-3352.
- SCHMETTERER G (1994): Cyanobacterial respiration. *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. DA Bryant, Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands: 409-435.
- SCHMITZ O UND BOTHE H (1996): The diaphorase subunit HoxU of the bidirectional hydrogenase as electron transferring protein in cyanobacterial respiration? *Naturwissenschaften* 83: 525-527.
- SCHREIBER U (1984): Chlorophyll fluorescence yield changes as a tool in plant physiology. 1. The measuring system. *Phot research* 4 (4): 361-373.
- SCHREIBER U, SCHLIWA U UND BILGER W (1986): Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Phot Research* 10 (1-2): 51-62.
- SCHREIBER U, KLUGHAMMER C UND NEUBAUER C (1988): Measuring P700 absorbance changes around 830 nm with a new type of pulse-modulation system. *Z Naturforschung* 43C (9-10): 686-698.
- SCHREIBER U (1994): New emitter-detector-cuvette assembly for measuring modulated chlorophyll fluorescence of highly diluted suspension in conjunction with the standard PAM fluorometer. *Z Naturforschung* 49C: 646-656.
- SCHULTE U, ABELMANN A, AMLING N, BRORS B, FRIEDRICH T, KINTSCHER L, RASMUSSEN T UND WEISS H (1998): Search for novel redox groups in mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) by diode array UV/VIS spectroscopy. *Biofactors* 8 (3-4): 177-186.
- SCHULTZE M, FORBERICH B, REXROTH S, DYCMONS NG, ROEGNER M UND APPEL J (2009): Localization of cytochrome b_6f complexes implies an incomplete respiratory chain in cytoplasmic membranes of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim Biophys Acta* 1787 (12): 1479-1485.

SHEN G, BOUSSIBA S UND VERMAAS WFJ (1993): *Synechocystis* sp. PCC 6803 strains lacking photosystem I and phycobilisome function. *Plant Cell* 5: 1853-1863.

SHIBATA M, OHKAWA H, KANEKO T, FUKUZAWA H, TABATA S, KAPLAN A UND OGAWA T (2001): Distinct constitutive and low-CO₂-induced CO₂ uptake systems in cyanobacteria: genes involved and their phylogenetic relationship with homologous genes in other organisms. *PNAS* 98 (20): 11789-11794.

SHIBATA M, KATOH H, SONODA M, OHKAWA H, SHIMOYAMA M, FUKUZAWA H, KAPLAN A UND OGAWA T (2002): Genes essential to sodium-dependent bicarbonate transport in cyanobacteria: function and phylogenetic analysis. *Biol Chem* 277 (21): 18658-18664.

SHIKANAI T, ENDO T, HASHIMOTO T, YAMADA Y, ASADA K UND YOKOTA A (1998): Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron transfer around photosystem I. *PNAS* 95: 9705-9709.

SHIKANAI T (2007): Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches. *Annu Rev Plant Biol* 58: 199-217.

SHIMDA H UND SUGIURO M (1991): Fine structural features of the chloroplast genome: comparison of the sequenced chloroplast genomes. *Nucl Acids Res.* 19: 983-995.

SHINOZAKI K, OHME M, TANAKA M, WAKASUGI T, HAYASHIDA N, MATSUBAYASHI T, ZAITA N, CHUNWONGSE J, OBOKATA J, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, OHTO C, TORAZAWA K, MENG BY, SUGITA M, DENO H, KAMOGASHIRA T, YAMADA K, KUSUDA J, TAKAIWA F, KATO A, TOHDOH N, SHIMADA H UND SUGIURA M (1986): The complete nucleotide sequence of the *tobacco* chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J* 5 (9): 2043-2049.

SHUMAN S (1994): Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 269: 32 678-32 684.

SIRPIO S, ALLAHVERDIYEVA Y, HOLMSTROM M, KHROUCHTCHOVA A, HALDRUP A, BATTCHIKOVA N UND ARO EM (2009): Novel nuclear-encoded subunits of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. *JBC* 284: 905-912.

SLED VD, RUDNITZKY NI, HATEFI Y, OHNISHI T (1994): Thermodynamic analysis of flavin in mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochemistry* 33 (33): 10069-10075.

STANIER RY UND COHEN-BAZIRE G (1977): Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annual Review of Microbiology* 31: 225-274.

STEINMÜLLER K, ELLERSIEK U UND BOGORAD L (1991): Deletion of the *psbG1* gene of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 leads to the activation of the cryptic *psbG2* gene. *Mol Gen Genet* 226 (1-2): 107-112.

SUMMERFIELD TC UND SHERMAN LA (2008): Global transcriptional response of the alkali-tolerant cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 to a pH 10 environment. *Appl Environ Microbiol* 74 (17): 5276-5284.

SUMMERFIELD TC, TOEPEL J UND SHERMAN LA (2008): Low-oxygen induction of normally cryptic *psbA* genes in cyanobacteria. *Biochemistry* 47 (49): 12939-12941.

- SUNDERHAUS S, DUDKINA NV, JÄNSCH L, KLODMANN J, HEINEMEYER J, PERALES M, ZABALETA E, BOEKEMA EJ UND BRAUN HP (2006): Carbonic anhydrase subunits form a matrix-exposed domain attached to the membrane arm of mitochondrial complex I in plants. *J Biol Chem* 281 (10): 6482-6488.
- SUNDERHAUS S, KLODMANN J, LENZ C UND BRAUN HP (2010): Supramolecular structure of the OXPHOS system in highly thermogenic tissue of *Arum maculatum*. *Plant Physiol Biochem* 48 (4): 265-272.
- SUORSA M, SIRPIÖ S, PAAKKARINEN V, KUMARI N, HOLMSTRÖM M UND ARO EM (2010): Two proteins homologous to PsbQ are novel subunits of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase. *Plant Cell Physiol* 51 (6): 877-883.
- TAKABAYASHI A, KISHINE M, ASADA K, ENDO T UND SATO F (2005): Differential use of two cyclic electron flows around photosystem I for driving CO₂-concentration mechanism in C-4 photosynthesis. *PNAS* 10 (46): 16989-16903.
- TAKABAYASHI A, ISHIKAWA N, OBAYASHI T, ISHIDA S, OBOKATA J, ENDO T UND SATO F (2009): Three novel subunits of *Arabidopsis* chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase identified by bioinformatic and reverse genetic approaches. *Plant J* 57 (2): 207-219.
- TAMAGNINI P, TROSHINA O, OXELFELT F, SALEMA R UND LINDBLAD P (1997): Hydrogenases in *Nostoc* sp. strain PCC 73102, a strain lacking a didirectional enzyme. *Appl Environ Microbiol* 63 (5): 1801-1807.
- TASHIAN RE (1969): The esterases and carbonic anhydrases in human erythrocytes. JJ Yunis, ed, *Biochemical Methods in Red Cell Genetics*. Academic Press, New York: 307–318.
- TCHERNOV D, HELMAN Y, KEREN N, LUZ B, OHAD I, REINHOLD L, OGAWA T UND KAPLAN A (2001): Passive entry of CO₂ and its energy-dependent intracellular conversion to HCO₃⁻ in cyanobacteria are driven by a photosystem I-generated ΔμH⁺. *J Biol Chem* 276: 23450-23455.
- THOMAS JC, UGHY B, LAGOUTTE B UND AJLANI G (2006): A second isoform of the ferredoxin:NADP oxidoreductase generated by an in-frame initiation of translation. *PNAS* 103 (48): 18 368-18 373.
- THOMPSON JD, HIGGINS DG UND GIBSON TJ (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- TOMITANI A, KNOLL AH, CAVANAUGH CM UND OHNO T (2006): The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *PNAS* 103 (14): 5442-5447.
- TURNER S, PRYER KM, MIAO VP UND PALMER JD (1999): Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryot Microbiol* 46 (4): 327-338.
- UHLMANN M UND FRIEDRICH T (2005): EPR signals assigned to Fe/S cluster N1c of the *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) derive from cluster N1a. *Biochemistry* 44 (5): 1653-1658.
- UNEMOTO T, HAYASHI M UND HAYASHI M (1977): Na⁺-dependent activation of NADH oxidase in membrane fractions from halophilic *Vibrio alginolyticus* and *V.costiculus*. *J Biochem* 82: 1389-1395.

- VANTHOR JJ, HELLINGWERF KJ UND MATTHIJS HC (1998): Characterization and transcriptional regulation of the *Synechocystis* PCC 6803 petH gene, encoding ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase: involvement of a novel type of divergent operator. *Plant Mol Biol* 36 (3): 353-363.
- VANTHOR JJ, GRUTERS OW, MATTHIJS HC UND HELLINGWERF KJ (1999): Localization and function of ferredoxin:NADP(+) reductase bound to the phycobilisomes of *Synechocystis*. *EMBO J* 18 (15): 4128-4136.
- VANTHOR JJ, JEANJEAN R, HAVAUX M, SJOLLEMA KA, JOSET F, HELLINGWERF KJ UND MATTHIJS HC (2000): Salt shock-inducible photosystem I cyclic electron transfer in *Synechocystis* PCC6803 relies on binding of ferredoxin:NADP(+) reductase to the thylakoid membranes via its CpcD phycobilisome-linker homologous N-terminal domain. *Biochim Biophys Acta* 1457 (3): 129-144.
- VERMAAS WFJ (2001): Photosynthesis and respiration in cyanobacteria. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, London: 245-251.
- VICENTE JB, GOMES CM, WASSERFALLEN A UND TEIXEIRA M (2002): Module fusion in an A-type flavoprotein from the cyanobacterium *Synechocystis* condenses a multiple-component pathway in a single polypeptide chain. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 82-87.
- WANG D UND PORTIS AR (2007): A novel nucleus-encoded chloroplast protein, PIFI, is involved in NAD(P)H dehydrogenase complex-mediated chlororespiratory electron transport in *Arabidopsis*. *Plant Phys* 144: 1742-1752.
- WANG HL, POSTIER BL UND BURNAP RL (2004): Alterations in global patterns of gene expression in *Synechocystis* sp PCC 6803 in response to inorganic carbon limitation and the inactivation of ndhR, a LysR family regulator. *JBC* 279: 5739-5751.
- WANG R, HEALEY FP UND MYERS J (1971): Amperometric measurement of hydrogen evolution in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* 48: 108-110.
- WEIDNER U, GEIER S, PTOCK A, FRIEDRICH T, LEIF H UND WEISS H (1993): The gene locus of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase in *Escherichia coli*. Organization of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of mitochondrial complex I. *J Mol Biol* 233: 109-122.
- WIKSTRÖM M (1984): Two protons are pumped from the mitochondrial matrix per electron transferred between NADH and ubiquinone. *FEBS Lett* 169(2): 300-304.
- WILLIAMS JGK (1988): Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods Enzymol* 167: 766-778.
- WITTIG I, KARAS M UND SCHÄGGER H (2007): High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol cell Proteomics* 6 (7): 1215-1225.
- WOODGER FJ, BADGER MR UND PRICE GD (2005): Inorganic carbon limitation induces transcripts encoding components of the CO₂-concentrating mechanism in *Synechococcus* sp. PCC7942 through a redox-independent pathway. *Plant Physiology* 133: 2069-2080.

- WOODGER FJ, BRYANT DA UND PRICE GD (2007): Transcriptional regulation of the CO₂-concentrating mechanism in a euryhaline, coastal marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. Strain PCC 7002: role of NdhR/CcmR. *J Bacteriol* 189 (9): 3335-3347.
- XU M, OGAWA T, PAKRASI HB UND MI H (2008): Identification and localization of the CupB protein involved in constitutive CO₂ uptake in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Cell Physiol* 49 (6): 994-947.
- YABUTA S, IFUKU K, TAKABAYASHI A, ISHIHARA S, IDO K, ISHIKAWA N, ENDO T UND SATO F (2010): Three PsbQ-like proteins are required for the function of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 51 (6): 866-876.
- YAGI T, YANO T, DI BERNARDO S UND MATSUNO-YAGI A (1998): Procaryotic complex I (NDH-1), an overview. *Biochim Biophys Acta* 1364: 125-133.
- YEREMENKO N, JEANJEAN R, PROMMEENATE P, KRASIKOV V, NIXON PJ, VERMAAS WF, HAVAUX M UND MATTHIJS HC (2005): Open reading frame *ssr2016* is required for antimycin A-sensitive photosystem I-driven cyclic electron flow in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* 46 (8): 1433-1436.
- YOON HS, HACKETT JD, CINIGLIA C, PINTO G UND BHATTACHARYA D (2004): A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol* 21: 809-818.
- YOON HS, REYES-PRIETO A, MELKONIAN M UND BHATTACHARYA D (2006): Minimal plastid genome evolution in the *Paulinella* endosymbiont. *Curr Biol* 16 (17): R670-R672.
- YOON HS, NAKAYAMA T, REYES-PRIETO A, ANDERSEN RA, BOO SM, ISHIDA KI UND BHATTACHARYA D (2009): A single origin of the photosynthetic organelle in different *Paulinella* lineages. *BMC Evol Biol* 9: 98.
- YOUNG IG, ROGERS BL, CAMPBELL HD, JAWOROWSKI A UND SHAW DC (1981): Nucleotide sequence coding for the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 116 (1): 165-170.
- ZAK E, NORLING B, MAITRA R, HUANG F, ANDERSSON B UND PAKRASI HB (2001): The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes. *PNAS* 98: 13443-13448.
- ZANG X, LIU B, LIU S, ARUNAKUMARA KK UND ZHANG X (2007): Optimum conditions for transformation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Microbiol* 45 (3): 241-245.
- ZHANG L, MCSPADDEN B, PAKRASI HB UND WHITMARSH J (1992): Copper-mediated regulation of cytochrome c553 and plastocyanin in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *J Biol Chem* 267 (27): 19054-19059.
- ZHANG L, PAKRASI HB UND WHITMARSH J (1994): Photoautotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in the absence of cytochrome c553 and plastocyanin. *J Biol Chem* 269 (7): 5036-5042.
- ZHANG LF, YANG HM, CUI SX, HU J, WANG J, KUANG TY, NORLING B UND HUANG F (2009): Proteomic analysis of plasma membranes of cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 in response to high pH stress. *J Proteome Res* 8 (6): 2892-2902.

ZHANG P, BATTCHIKOVA N, JANSEN T, APPEL J, OGAWA T UND ARO EM (2004): Expression and functional roles of the two distinct NDH-1 complexes and the carbon acquisition complex NdhD3/NdhF3/CupA/SII1735 in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant Cell* 16 (12): 3326-3340.

ZHANG P, BATTCHIKOVA N, PAAKKARINEN V, KATOH H, IWAI M, IKEUCHI M, PAKRASI HB, OGAWA T UND ARO EM (2005): Isolation, subunit composition and interaction of the NDH-1 complexes from *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Biochem J* 390 (2): 513-520.

ZMASEK CM UND EDDY SR (2001): ATV: display and manipulation of annotated phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17 (4): 383-384.

Abkürzungsverzeichnis

AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BN	<i>blue nativ</i> , blau nativ
bp	Basenpaare
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserum-Albumin
CET	Zyklischer Elektronentransport (<i>cyclic electron transport</i>)
Chl	Chlorophyll
CLSM	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
CN	<i>clear native</i>
Cyd	Cytochrom- <i>bd</i> -Oxidase
Cyt	Cytochrom
DBMIB	2,5-Dibromo-3-methyl-6-isopropyl-1,4-benzochinon
DCMU	3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea
DIG	Digoxigenin
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DR	dunkelrot (Licht)
DT	Dithionit
DTT	Dithiothreitol
E	Einstein ($h \cdot \nu$) = mol Photonen
EC	Enzyme Commission
F	Fluoreszenz
Fd	Ferredoxin
Fm	Fluoreszenzmaximum
F ₀	Grundfluoreszenz (dunkeladaptiert)
FNR	Ferredoxin-NADP ⁺ -Reduktase
FQR	Ferredoxin-Chinon-Reductase
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
Fv	variable Fluoreszenz
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
HC	<i>high carbon</i> (=Anzucht mit CO ₂ -angereicherter Luft)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMW	<i>high molecular weight</i>
HWZ	Halbwertszeit
KP _i	Kaliumphosphat, anorganisch

LC	<i>low carbon</i> (=Anzucht mit CO ₂ auf Luftniveau)
LHC	<i>light harvesting complex</i> (Lichtsammelkomplex)
LET	Linearer Elektronentransport (<i>linear electron transport</i>)
MT	<i>multiple turnover</i> (Blitz)
MV	Methylviologen
MW	Molekulargewicht
NaDOC	Natrium-desoxycholat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NDH-1	NAD(P)H-Dehydrogenase
NDH-2	alternative NAD(P)H-Dehydrogenase
NQR	NAD(P)H:Chinon-Reduktase, Na ⁺ transportierend
Nrta	Nitrat Transporter Untereinheit A
NUO	NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
ox.	oxidiert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	Puls Amplituden Modulation
PAR	<i>photosynthetic active radiation</i>
PCC	Pasteur Culture Collection
PEG	Polyethylenglycol
PGR	<i>proton gradient regulation</i>
PIIF	<i>post illumination increase in fluorescence</i>
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PPFD	<i>photosynthetic active photon flux density</i>
PQ	Plastochinon
psi	<i>pound per square inch</i> (Druck)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qN	nichtphotochemisches Quenching
qP	photochemisches Quenching
red.	reduziert
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
RT	Raumtemperatur
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SP	Sättigungsblitz (<i>saturation pulse</i>)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris salzig abgepuffert (<i>Tris buffered saline</i>)
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylmethyldiamin
TES	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-2-aminoethansulfonsäure
Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TTBS	TBS mit Tween
U	Units
WT	Wildtyp
Y(I)	photochemische Quantenausbeute des PS I
Y(ND)	nichtphotochemische Quantenausbeute des PS I (Donorseitenlimitierung)
Y(NA)	nichtphotochemische Quantenausbeute des PS I (Akzeptorseitenlimitierung)
Y2H	<i>Yeast two-hybrid</i>
ZM	Zentrale Mikroskopie (CAU Kiel)
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

Anhang

Tabelle 12: Bezeichnung der Gene und Größe der Untereinheiten des NDH-1-Komplexes und der beteiligten Cup-Untereinheiten von *Synechocystis* PCC 6803.

Gen	Untereinheit	Größe (kDa)
<i>sll0519</i>	NdhA	40,5
<i>sll0223</i>	NdhB	55,3
<i>slr1279</i>	NdhC	20,6
<i>slr0331</i>	NdhD1	57,5
<i>slr1291</i>	NdhD2	61,0
<i>sll1733</i>	NdhD3	54,3
<i>sll0027</i>	NdhD4	55,2
<i>slr2007</i>	NdhD5	52,1
<i>slr2009</i>	NdhD6	53,7
<i>sll0522</i>	NdhE	11,2
<i>slr0844</i>	NdhF1	74,4
<i>sll1732</i>	NdhF3	66,6
<i>sll0026</i>	NdhF4	69,4
<i>sll0521</i>	NdhG	21,5
<i>slr0261</i>	NdhH	44,3
<i>sll0520</i>	NdhI	22,1
<i>slr1281</i>	NdhJ	20,6
<i>slr1280</i>	NdhK	27,3
<i>ssr1386</i>	NdhL	9,3
<i>slr1623</i>	NdhM	14,1
<i>sll1262</i>	NdhN	17,6
<i>ssl1690</i>	NdhO	8,3
<i>sll1734</i>	CupA	50,0
<i>slr1302</i>	CupB	43,4
<i>sll1735</i>	CupS	14,1

Tabelle 13: Verwendete Mutanten von *Synechocystis* mit Bezeichnung derausgeschalteten Gene und der eingefügten Resistenzkassetten (C Chloramphenicol, E Erythromycin, G Gentamycin, H Hygromycin, K Kanamycin, S Spectinomycin).

Bezeichnung der Mutante	ausgeschaltetes Gen	Genname	Resistenz
cyd	<i>slr 1379, slr 1380</i>	Cyt. bd-Oxidase	E
Δ apc	<i>slr 2067, slr 1986, ssr 3383</i>	Allophycocyanin	C
Δ ndhB / M55	<i>sll 0223</i>	ndhB	K
D1	<i>slr0331</i>	ndhD1	K
D2	<i>slr1291</i>	ndhD2	C
D12	<i>slr0331, slr1291</i>	ndhD1/D2	K C
D34	<i>sll1733, sll0027</i>	ndhD3/D4	K S
D134	<i>slr0331, sll1733, sll0027</i>	ndhD1/D3/d4	K S H
D234	<i>slr1291, sll1733, sll0027</i>	ndhD2/D3/D4	K S C
D1234	<i>slr0331, slr1291, sll1733, sll0027</i>	ndhD1/D2/D3/D4	K S C H
Δ sll0217-0219	<i>sll0217, sll0218, sll0219</i>	sll0217, sll0218, sll0219	G
Δ hoxE-H	<i>sll1220, sll1221, sll1222, sll1223, sll1224, sll1225, sll1226</i>	hoxE, hof F, orf3, hoxU, hoxY, orf6, orf7, hoxH	K
Δ sll0217-0219/ Δ hoxE-H	<i>sll0217, sll0218, sll0219, sll1220, sll1221, sll1222, sll1223, sll1224, sll1225, sll1226</i>	sll0217, sll0218, sll0219, hoxE, hof F, orf3, hoxU, hoxY, orf6, orf7, hoxH	KG
F1	<i>slr0844</i>	ndhF1	G

Tabelle 14: Liste der für die Stammbaumanalysen für NdhD und NdhF verwendeten Organismen

Gruppe	Organismus
Cyanobakterien	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421 <i>Nostoc punctiforme</i> ATCC 29133
Cercozoa	<i>Paulinella chromatophora</i>
Chlorophyta	<i>Nephroselmis olicacea</i> <i>Pyramimonas parkae</i>
Armlauchteralgen, Jochalgen und <i>Mesostigma</i>	<i>Chaetosphaeridium globosum</i> <i>Chara vulgaris</i> <i>Chlorokybus atmophyticus</i> <i>Mesostigma viride</i> <i>Staurastrum punctulatum</i> <i>Zygnema circumcarinatum</i>
Moose	<i>Anthoceros formosae</i> <i>Huperzia lucidula</i> <i>Marchantia polymorpha</i> <i>Physcomitrella patens patens</i> <i>Syntrichia ruralis</i>
Farne	<i>Adiantum capillus-veneris</i> <i>Alsophila spinulosa</i> <i>Angiopteris evecta</i> <i>Psilotum nudum</i>
Gymnosperma	<i>Acorus calamus</i> <i>Cryptomeria japonica</i> <i>Cycas taitungensis</i>
Monokotyledonen	<i>Brachypodium distachyon</i> <i>Hordeum vulgare</i> <i>Oryza sativa</i> jap. group <i>Zea mays</i>
Eudikotyledonen	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Trachelium caeruleum</i> <i>Nicotiana tabacum</i>

Danksagung

Es ist vollbracht und am Ende möchte ich den Menschen danken, die am Zustandekommen dieser Arbeit mit beteiligt waren:

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Rüdiger Schulz für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas und für die Finanzierung dieser Arbeit bedanken. Die schönen Weihnachtsfeiern und die alljährlichen Paddelausflüge werde ich noch lange im Gedächtnis behalten.

Meinem ehemaligen Postdoc und kurzzeitigem Mitbewohner Herrn Dr. Jens Appel danke ich für die vielen Ideen und die tiefgehenden Diskussionen. Seine Begeisterung für das Thema NDH-1 war für mich stets eine große Triebkraft, die mich auch über den Großen Teich erreichte.

Unserer TA Claudia Marquardt danke ich für ihre Geduld und Hilfsbereitschaft, wenn bei mir nach längerer Abstinenz im DNA-Labor wieder Lücken auftauchten.

Herrn Dr. Martin Barz danke ich für seine Einführung in das Gebiet der phylogenetischen Analysen. Seine Freundschaft hat, wie auch die von Matthias Schultze, zur Verschönerung der Doktorandenzeit beigetragen.

Den aktiven und ehemaligen Mitarbeitern der AG Schulz (in alphabetischer Reihenfolge: Ariane, Christian, Dörte, Frauke, Kirstin, Rike, Sabine, Sandra, Sven, Torsten, Ulla und alle die ich hier vergessen habe) danke ich für das freundliche Arbeitsklima.

Herrn Dr. T. Ogawa, Professor Emeritus der Nagoya Universität, bin ich zu Dank verpflichtet für das Überlassen einiger NDH-1-Mutanten.

Der Zentralen Mikroskopie Kiel danke ich für die Arbeiten im Bereich Fixierung, Herstellung der Proben und visueller Auswertung sowie für die kompetente Einweisung in die Geräte.

Meinen Eltern danke ich für ihr Vertrauen und die langjährige und uneingeschränkte Unterstützung meines studentischen Daseins.

Zum Abschluss danke ich meiner Frau Evelyn für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihr Vertrauen, aber auch für die Unterstützung während dieser Arbeit.

Lebenslauf

NAME: Björn Forberich
Geburtsdatum: 14.06.1974
Geburtsort: Hameln
Staatsangehörigkeit: deutsch

BILDUNGSWEG: seit 2006: Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Sektion Biologie

1999 – 2005 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Hauptfach: Zellbiologie, Nebenfächer: Zoologie und Biochemie
Abschluss: Diplom-Biologe

1995 - 1999 Leibniz-Universität Hannover
Grundstudium der Meteorologie (Dipl.) ohne Abschluss

1993 Erlangung der Hochschulreife am Otto-Hahn-Gymnasium in Springe

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Betreuer – nach Inhalt und Form meine Arbeit ist. Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden und wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt.

Kiel den,

(Björn Forberich)

