

**Aufklärung verschiedener Glukoseabbauwege und
deren Einfluss auf den Wasserstoffmetabolismus im
Cyanobakterium *Synechocystis spec.* PCC 6803**

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

vorgelegt von Karoline Schreiber

Kiel

Mai 2016

Referent: Prof. Dr. Rüdiger Schulz

Korreferent: Prof. Dr. Dietrich Ober

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2016

Zum Druck genehmigt: 20.06.2016

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ANMERKUNG ZUR ZITIERWEISE	V
ZUSAMMENFASSUNG	VI
SUMMARY	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 CYANOBAKTERIEN	2
1.1.1 <i>Wachstum</i>	3
1.1.2 <i>Synechocystis spec. PCC 6803</i>	4
1.2 CYANOBAKTERIELLER WASSERSTOFFMETABOLISMUS.....	5
1.2.1 <i>Cyanobakterielle [NiFe]-Hydrogenase</i>	5
1.2.2 <i>Ferredoxin und Flavodoxin</i>	6
1.3 PHOTOWASSERSTOFFPRODUKTION	9
1.3.1 <i>Flavoproteine als Elektronensenke der Photosynthese</i>	10
1.4 FERMENTATIVE WASSERSTOFFPRODUKTION	11
1.5 GLUKOSEABBAUWEGE	12
1.5.1 <i>Embden-Meyerhof-Parnas-Weg</i>	15
1.5.2 <i>Oxidativer-Pentosephosphat-Weg</i>	16
1.5.3 <i>Entner-Doudoroff-Weg</i>	16
1.5.4 <i>Glukoseabbau in Cyanobakterien, Grünalgen und Pflanzen</i>	17
2 FRAGESTELLUNG	20
3 MATERIAL UND METHODEN	21
3.1 CHEMIKALIEN	21
3.2 ORGANISMEN UND KULTURBEDINGUNGEN.....	21
3.2.1 <i>Synechocystis spec. PCC 6803</i>	21
3.2.2 <i>Kultivierung von Synechocystis</i>	24
3.2.3 <i>Escherichia coli</i>	25
3.2.4 <i>Kultivierung von Escherichia coli</i>	25
3.3 PHYSIOLOGISCHE PARAMETER.....	26
3.3.1 <i>Bestimmung des DNA/RNA-Molekulargewichtes</i>	26
3.3.2 <i>Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen</i>	26
3.3.3 <i>Absorptionsspektren ganzer Zellen von Synechocystis</i>	26
3.3.4 <i>Bestimmung der Chlorophyllkonzentration</i>	26
3.3.5 <i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	27
3.3.6 <i>Puls-amplituden-modulierte (PAM) Chlorophyll-Fluoreszenz</i>	27
3.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	29
3.4.1 <i>Isolierung genomischer DNA aus Synechocystis</i>	29
3.4.2 <i>Polymerase Kettenreaktion (PCR)</i>	30
3.4.3 <i>Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren</i>	32
3.4.4 <i>Aufreinigung von Nukleinsäuren</i>	33
3.4.5 <i>Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen</i>	33
3.4.6 <i>Fusion von PCR Produkten</i>	33
3.4.7 <i>Ligation von DNA in verschiedene Vektoren</i>	34
3.4.8 <i>Plasmidisolierung aus Escherichia coli</i>	35
3.4.9 <i>Sequenzierung</i>	35
3.4.10 <i>Transformation</i>	36
3.4.11 <i>Southern-Blot</i>	37
3.4.12 <i>RNA Isolation aus Synechocystis</i>	40

3.4.13	<i>DNase I</i> Verdau	41
3.4.14	Reverse Transkriptase PCR	42
3.4.15	Quantitative real time PCR	42
3.5	ERSTELLUNG VON MUTANTEN.....	42
3.5.1	<i>Synechocystis</i> Mutanten	43
3.5.2	<i>Escherichia coli</i> Mutanten	43
3.6	WASSERSTOFFMESSUNGEN.....	46
3.6.1	Wasserstoffmessungen mit der Clark-Elektrode	46
3.6.2	Direkte Wasserstoffmessungen in Zellkulturen	49
3.7	PROTEINANALYSEN.....	51
3.7.1	Überexpression	51
3.7.2	Präparation von Gesamtextrakt	53
3.7.3	SDS Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE).....	54
3.7.4	Coomassie-Färbung	55
3.7.5	Silber-Färbung	55
3.7.6	Western-Blot.....	56
3.7.7	Messung der Enzymaktivität von <i>Eda</i>	58
3.8	BIOINFORMATISCHE UNTERSUCHUNGEN	59
3.8.1	Proteinstrukturanalyse	59
3.8.2	Vorhersage einer Ziellokalisierung	59
3.8.3	Verwendete Datenbanken	60
3.8.4	Verwendete Programme	60
4	ERGEBNISSE	61
4.1	AUFKLÄRUNG DER ROLLE DER FERREDOXINE IM ELEKTRONENTRANSPORTS BEI DER WASSERSTOFFPRODUKTION IN <i>SYNECHOCYSTITIS</i>	61
4.1.1	<i>Ferredoxin</i> -Mutanten	61
4.1.2	Wachstum der <i>Ferredoxin</i> -Mutanten	63
4.1.3	Pigmente	63
4.1.4	Wasserstoffmessungen	65
4.1.5	Überexpression der <i>Ferredoxine</i>	66
4.2	UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON FLAVOPROTEINEN AUF DIE PHOTOWASSERSTOFFPRODUKTION	67
4.2.1	Flavoprotein-Mutanten	67
4.2.2	Wachstum der Flavoprotein-Mutanten	70
4.2.3	Expression von <i>HoxF</i>	72
4.2.4	Oxidation des Photosystem I der <i>flv3</i> -Mutanten	73
4.2.5	Wasserstoffproduktion der Flavoprotein-Mutanten.....	74
4.3	AUFKLÄRUNG DER GLUKOSEABBAUWEGE.....	75
4.3.1	Glukoseabbau-Mutanten.....	75
4.3.2	Wachstum der Glukoseabbau-Mutanten	79
4.3.3	Messung der Enzymaktivität der <i>KDPG-Aldolase</i>	85
4.3.4	Komplementierung von Δ <i>eda</i> in <i>Synechocystis</i>	93
4.3.5	Messung der Enzymaktivität der putativen <i>KDPG-Aldolase</i> aus <i>Hordeum vulgare</i>	95
4.3.6	Bioinformatische Untersuchungen zu <i>eda</i>	99
4.3.7	Quantitative real time PCR des <i>eda</i> Gens.....	100
4.3.8	Wasserstoffmessungen	101
5	DISKUSSION	104
5.1	ELEKTRONENTRANSPORT ZUR BIDIREKTIONALEN [NIFE]-HYDROGENASE	104
5.1.1	Aufklärung der Rolle der <i>Ferredoxine</i> im Elektronentransports bei der Wasserstoffproduktion in <i>Synechocystis</i>	104
5.1.2	Einfluss der Flavoproteine auf die Photowasserstoffproduktion	107
5.2	AUFKLÄRUNG VON GLUKOSEABBAUWEGEN INS <i>SYNECHOCYSTITIS</i>	109
5.2.1	Charakterisierung des <i>ED</i> -Weg in <i>Synechocystis</i>	111

5.2.2	<i>Aktivitätsmessungen der putativen KDPG-Aldolase in Synechocystis</i>	112
5.2.3	<i>Untersuchung zur Transkription von eda in Synechocystis</i>	113
5.2.4	<i>Vorkommen und Physiologie des ED-Wegs in Cyanobakterien</i>	114
5.2.5	<i>Wasserstoffmessungen mit den Glukoseabbau-Mutanten</i>	116
5.3	VORKOMMEN DES ED-WEGS IN PFLANZEN	117
5.3.1	<i>Lokalisation von Eda</i>	118
6	REFERENZEN	119
	DANKSAGUNG	127
	ERKLÄRUNG	129
	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	130
	ANHANG	131
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	135
	TABELLENVERZEICHNIS	137

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Arginin
AgCl	Arginin Chlorid
ATP	Adenosintriphosphat
BG11	Blaualgen (Blue Green) –Medium
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
Cm	Chloramphenicol
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTP	Chloroplasten-Transitpeptid
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ED	Entner-Doudoroff-
Eda	KDPG-Aldolase
Edd	6PG-Dehydratase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Erythromycin
EMP	Embden-Meyerhoff-Parnass
<i>et al</i>	<i>et alii</i>
EtOH	Ethanol
Fdx	Ferredoxin
Fe	Eisen
Fed	Ferredoxin
FLP	Rekombinase <i>Flippase</i>
Flv	Flavoprotein
FMN	Flavinmononukeotids
FNR	Ferredoxin-NADP ⁺ -Reduktase
FRT	<i>flippase recognition target</i>
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
Gdh	Glucose-Dehydrogenase
Gk	Gluconatkinase
Gm	Gentamycin
Gnd	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
H ₂	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
HL	high Light
Hox	Hydrogenase
IEA	Internationale Energieagentur
IPCC	International Panel on Climate Change
IsiB	Flavodoxin
kb	Kilobasen
kDa	kilo Dalton
KDG	2-Keto-3-Desoxygluconat
KDPG	2-Keto-3-desoxy-6-Phosphogluconat
Km	Kanamycin
LAHG	light activated heterotrophic growth
LB	lysogeny broth
LC	low CO ₂
LDH	Laktat Dehydrogenase

M	Molar
MBP	Maltosebindeprotein
MJ	Megajoule
mTP	mitochondriales Zieleptid
NaCl	Natrium Chlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natrium Hydroxid
NiFe	Nickel-Eisen
OD	Optische Dichte
OPP	Oxidativer-Pentose-Phosphat-Weg
pA	Picoamperemeter
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAM	Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometer
PCC	Pasteur culture collection
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pfk	Phosphofruktokinase
PFOR	Pyruvat-Flavodoxin/Ferredoxin-Oxidoreduktase
Pgi	Glucosephosphat-Isomerase
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
Pta	Phosphotransacetylase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rotations per minute
Rubisco	Ribulose-bisphosphate carboxylase/ oxygenase
RuBP	Ribulose 1,5-Bisphosphat
S	Schwefel
SDS	sodium dodecyl sulfate
SP	Signalpeptid
Spec	Spectinomycin
<i>spec.</i>	Spezies
Taq	Thermophilus aquaticus
TBS	Tris-buffered saline
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	Tris-buffered saline + Tween
U	Unit
V	Volt
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
Zwf	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Anmerkung zur Zitierweise

Ein Großteil meiner Ergebnisse wurde im Artikel „The Entner-Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants“ (Chen & Schreiber *et. al* 2016) veröffentlicht. Xi Chen und ich teilen uns die Erstautorenschaft. Um deutlich zu machen, ob beim Zitieren des oben genannten Artikels, die im Text erwähnten Ergebnisse aus dieser Arbeit stammen oder von anderen Mitautoren erhoben wurden, ist neben dem Zitat der jeweilige Wissenschaftler zusätzlich genannt.

Zusammenfassung

Das Cyanobakterium *Synechocystis spec.* PCC 6803 produziert Photowasserstoff im Licht und fermentativen Wasserstoff im Dunkeln. Im Licht ist die Photowasserstoffproduktion direkt mit dem photosynthetischen Elektronentransport verbunden. In vorangegangenen Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass am Photosystem I (PSI) Ferredoxine als direkte Elektronenüberträger zur Hydrogenase fungieren. Dies wurde bisher jedoch nur für die pflanzlichen Ferredoxine mit einem [2Fe-2S]-Cluster gezeigt. In dieser Arbeit lag der Fokus auf zwei bakteriellen Ferredoxinen mit einem [4Fe-4S]-Cluster: Fdx7 (SlI0662) und Fdx9 (Slr2095). Für Fdx7 konnte kein Einfluss auf die Wasserstoffproduktion nachgewiesen werden, im Gegensatz zu Fdx9. Hier zeigten sich Veränderungen in der Wasserstoffproduktion. Die Mutante in der *fdx9* ausgeschaltet wurde zeigte eine geringere Photowasserstoffproduktion im Vergleich zum Wildtyp. Der genaue Einfluss muss jedoch weiter untersucht werden.

In dieser Arbeit wurden ebenfalls die Flavoproteine *flv2/4* und *flv3* deletiert, die eine wichtige Rolle im photosynthetischen Elektronentransport spielen. Es konnte gezeigt werden, dass der Flavoproteindimer Flv2/4 in Konkurrenz mit der Hydrogenase um Elektronen steht und die Photowasserstoffproduktion in $\Delta flv2/4$ im Gegensatz zum Wildtyp und zu $\Delta flv3$ entsprechend erhöht ist.

Fermentativer Wasserstoff wird im Dunkeln auf Kosten des Abbaus von Glykogen bzw. Glukose erzeugt. Bisher waren zwei Glukoseabbauwege in *Synechocystis* bekannt, der Embden-Meyerhoff-Parnass- (EMP, oder Glykolyse) und der Oxidativer-Pentose-Phosphat- (OPP) Weg. Um untersuchen zu können welcher Weg für die fermentative Wasserstoffproduktion von Bedeutung ist, sollte der zentrale Kohlenstoffmetabolismus genauer analysiert werden. Eine vorangegangene Arbeit unserer Arbeitsgruppe ließ vermuten, dass es neben dem EMP- und OPP-Weg noch einen weiteren, bisher unbekanntem Glukoseabbauweg in *Synechocystis* geben könnte: den Entner-Doudoroff- (ED) Weg. Über Sequenzvergleiche wurden die für den ED-Weg essentiellen Gene, *slI0107* als potentielle KDPG-Aldolase (Eda) und *slr0452* als potentielle 6-P-Glukonat-Dehydratase (Edd) identifiziert. In dieser Arbeit konnte die potentielle KDPG-Aldolase (Eda) komplett und *edd* teilweise aus dem Genom von *Synechocystis* deletiert werden. Beide Mutanten zeigten einen ausgeprägten Phänotyp im Wachstum unter mixotrophen Bedingungen (im Dauerlicht unter Zugabe von Glukose). Die potentielle KDPG-Aldolase aus *Synechocystis* wurde in *Synechocystis* überexprimiert und isoliert. Das Enzym setzte KDPG mit einem K_M -Wert von 0,095 zu Pyruvat um. Der Wachstumsphänotyp der *eda*-Mutante, ließ sich durch eine Überexpression der KDPG-Aldolase aus *Synechocystis* und aus *E. coli* komplementieren. Zusammengenommen, weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass der Entner-Doudoroff-Weg in *Synechocystis* abläuft und hier als Glukoseabbauweg lange übersehen wurde.

Datenbankrecherchen unserer Arbeitsgruppe hatten ergeben, dass potentielle Gene für das Schlüsselenzym des ED-Weges (die KDPG-Aldolase) und *edd* auch in Pflanzengenomen weit verbreitet sind. Aus diesem Grund wurde die potentielle KDPG-Aldolase aus Gerste (*Hordeum vulgare*) in *E. coli* überexprimiert und isoliert. Sie setzte KDPG mit einem K_M -Wert von 0,35 zu Pyruvat um. Gerste verfügt damit wie *Synechocystis* über eine funktionelle KDPG -Aldolase.

Erste Wasserstoffmessungen mit verschiedenen Mutanten, in denen entweder der ED-, der EMP- oder der OPP-Weg unterbrochen war, zeigte, dass insbesondere der OPP-Weg eine Rolle für die fermentative Wasserstoffproduktion spielen könnte. Da diese Mutante unter den gegebenen Bedingungen nicht gut wuchs, kann die verminderte fermentative Wasserstoffproduktion jedoch auch eine indirekte Folge auf das Ausschalten des OPP-Weges sein. In einem Experiment zeigte die Mutante mit deletiertem ED-Weg eine stark gesteigerte fermentative Wasserstoffproduktion.

Summary

The cyanobacterium *Synechocystis spec.* PCC 6803 produces photohydrogen in the light and fermentative hydrogen in the dark. Photohydrogen production is directly linked to the photosynthetic electron transport. Previous studies of our working group showed that ferredoxin that is reduced at photosystem I (PSI) acts as a direct electron carrier to the hydrogenase. However, this was only shown for a plant-type ferredoxin with a [2Fe-2S]-Cluster. This study focuses on two bacterial-type ferredoxins with a [4Fe-4S]-Cluster: Fdx7 (SlI0662) and Fdx9 (Slr2095). While hydrogen production was affected in the Fdx9 deletion mutant, no such influence could be detected upon deletion of Fdx7. In comparison to the wild-type, the Fdx9 deletion mutant showed less photohydrogen production. However, the exact influence has to be further investigated.

In this work the flavoproteins Flv2/4 and Flv3, which are relevant to photosynthetic electron transport, were deleted. It was shown that the flavoproteindimer FLV2/4 competes with the hydrogenase for electrons and that photohydrogen production is correspondingly increased in $\Delta flv24$ compared to the wild-type and $\Delta flv3$.

Fermentative hydrogen is produced in the dark at the expense of glycogen respectively glucose. So far, two ways of glucose degradation were known in *Synechocystis*, the EMP- (Embden-Meyerhof-Parnas, or glycolysis) and OPP- (oxidative pentose-phosphate) pathway. To investigate which pathway is of importance for fermentative hydrogen production, the central carbon metabolism was examined in detail.

A previous study of our group indicated, that a previously unknown way of glucose degradation might exist in *Synechocystis* beside the EMP and OPP pathways: the Entner-Doudoroff- (ED) pathway. Genes essential for the ED-pathway were identified via databank searches: *slI0107* as potential KDPG-aldolase (*eda*) and *slr0452* as potential 6-P-gluconate dehydratase (*edd*).

In this work we were able to delete the potential KDPG-aldolase (*eda*) completely and *edd* partially from the genome of *Synechocystis*. Both mutants showed a distinct phenotype in growth under mixotrophic conditions (continuous light with the addition of glucose). The potential KDPG aldolase from *Synechocystis* was overexpressed and purified from *Synechocystis*. The enzyme turned KDPG to pyruvate with a K_M -value of 0.095. The growth phenotype of the *eda* mutant could be complemented with an overexpression of KDPG-aldolase from *Synechocystis* and *E. coli*. These results indicate that the Enter-Doudoroff-way exists in *Synechocystis* and has been previously long overlooked as a pathway of glucose degradation.

Database search in our working group had shown that potential genes for the key enzyme of the ED-pathway (the KDPG-aldolase) and *Edd* are widespread in plant genomes as well. For this reason, the potential KDPG-aldolase was overexpressed from barley (*Hordeum vulgare*) in *E. coli* and purified.

It turned KDPG to pyruvate with a K_M -value of 0.35. Thus, like *Synechocystis*, barley has a functional KDPG-aldolase.

First hydrogen measurements with different mutants in which either the ED-, the EMP- or the OPP-pathway was interrupted, showed that particularly the OPP-pathway could play a role for the fermentative hydrogen production.

However, as the mutant did not grow well under the conditions given, the reduced fermentative hydrogen production may also be an indirect consequence of the elimination of the OPP pathway. In one of the experiments, the mutant with deleted ED-path showed a greatly increased fermentative hydrogen production.

1 Einleitung

Die weltweit zu beobachtende Expansion der Wirtschaft zieht einen stetig wachsenden Energiebedarf nach sich. So wurden im Jahr 2012 weltweit 570 Exajoule verbraucht. Mindestens 80% dieser verbrauchten Energie stammten dabei aus fossilen Brennstoffen (Entwicklung 2014/Bericht des Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit Entwicklung). Auch wenn in Deutschland der Energieverbrauch im Vergleich zu anderen Ländern in den letzten Jahren stagnierte, ist ein Umdenken unumgänglich. Im Welt-Energie-Ausblick (World Energy Outlook 2014) prognostiziert die Internationale Energieagentur (IEA) bis zum Jahr 2040 eine Steigerung des weltweiten Energiebedarfs um 37 Prozent. Der Großteil dieser Energie wird weiterhin aus nicht regenerativen fossilen Brennstoffen gewonnen, daher ist es notwendig, Alternativen zu finden.

Ein weiteres Problem bei der Nutzung fossiler Energieträger stellt der unvermeidliche Ausstoß an CO₂ dar. Die atmosphärische Konzentration des emittierten Kohlendioxids hat inzwischen ihren höchsten Wert seit 800.000 Jahren erreicht (Lüthi *et al.* 2008). Aus diesem Grund werden alternative Energieträger wie Solarenergie, Windkraft und Biomasse immer wichtiger. Erneuerbare Energieträger wurden vor allem in Bezug auf Leistung und Wirtschaftlichkeit weiterentwickelt und haben für die zukünftige Energieversorgung essentielle Bedeutung. Im aktuellen IPCC-Bericht (International Panel on Climate Change Synthesis Report 2015) beschäftigt sich der letzte Abschnitt vor allem mit dem Umgang und der Bewältigung des Klimawandels und fordert dort eine Abkehr von fossilen Brennstoffen. Es wurde nachgewiesen, dass nur ein starker Rückgang des Verbrauchs von fossilen Brennstoffen den Klimawandel begrenzen kann (McGlade & Ekins 2015). Diese Forderung ist laut IPCC durchaus realisierbar: Ein solcher Verzicht würde das Wirtschaftswachstum um nur ca. 0,06% bis 2030 bremsen (Climate Change Synthesis Report 2014).

Wasserstoff (H₂) ist ein attraktiver alternativer Energieträger. Er besitzt den höchsten spezifischen Energiegehalt aller Energieträger (142 MJ/kg) und stellt zudem, in Wasser gebunden, eine nahezu unerschöpfliche Ressource dar. Wasserstoff kann in Brennstoffzellen oder Verbrennungsmotoren mit Sauerstoff zu reinem Wasser umgesetzt werden. Die bei der Umsetzung freiwerdende Energie kann technisch genutzt werden.

Auch wenn bei der Nutzung von H₂ nur Wasser als Nebenprodukt anfällt, beruhen jedoch sämtliche derzeit genutzten Verfahren zur Gewinnung von Wasserstoff auf fossilen Brennstoffen, das heißt, die CO₂ Emission wurde nur vom Nutzungsort zum Produktionsort verschoben. Um die CO₂ Emission effektiv zu senken, ist die Entwicklung einer CO₂-neutralen Wasserstoffproduktion unumgänglich. Daher ist die Forschung an Mikroorganismen als potentiellen Wasserstoffproduzenten sehr stark in den Fokus gerückt. Es gibt viele verschiedene Mikroorganismen, die in der Lage sind, Wasserstoff zu produzieren und aufzunehmen.

Jedoch nur Cyanobakterien und einige Grünalgen können dies mittels Lichtenergie, CO₂ und Wasser. Das Cyanobakterium *Synechocystis spec.* PCC 6803, das im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ist in der Lage, Wasserstoff zu produzieren. Dieser entsteht entweder in Form von Photowasserstoff, als direktes Nebenprodukt der Photosynthese oder während des Abbaus von Kohlenstoffverbindungen, die photosynthetisch gebildet wurden (fermentativer Wasserstoff).

Das Enzym, das die reversible Oxidation von Wasserstoff katalysiert ($H_2 \leftrightarrow 2H^+ + 2e^-$), ist die bidirektionale [NiFe]-Hydrogenase.

Photowasserstoff wird nur für wenige Minuten in einem kurzen Übergangsstadium produziert, während die fermentative H₂-Produktion über mehrere Stunden ablaufen kann. Cyanobakterien fixieren am Tag über die Photosynthese CO₂, das in verschiedene Kohlenstoffverbindungen eingebaut wird. Als Speicherstoff für die Nacht wird kohlenstoffhaltiges Glykogen synthetisiert. Diese Speicher werden nachts zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels metabolisiert und dienen als Elektronendonatoren für die fermentative Wasserstoffproduktion. Die fermentative Wasserstoffproduktion von natürlichen Cyanobakterienkulturen ist für eine biotechnologische Nutzung jedoch zu gering. Um diese gezielt erhöhen zu können, sind detaillierte Kenntnisse zum Kohlenstoffmetabolismus notwendig, da dieser die fermentative Wasserstoffproduktion unterhält. Glykogen wird zunächst zu Glucose abgebaut und weiter zu Pyruvat oxidiert. Erst kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass insbesondere die Decarboxylierung des Pyruvats zu AcetylCoA eng mit der Produktion von Wasserstoff unter fermentativen Bedingungen verknüpft ist (Gutekunst *et al.* 2014).

1.1 Cyanobakterien

Cyanobakterien sind Prokaryoten aus der Gruppe der Cyanophyta und zählen zur Domäne der Bacteria. Sie bestehen aus ca. 150 Gattungen mit 2000 Arten und weisen eine große Strukturvielfalt auf (Stanier & Bazine 1977; Schopf 2000). Cyanobakterien stellen eine morphologisch heterogene Gruppe mit einzelligen, fadenförmigen und kolonialen Formen dar. Man unterscheidet anhand ihrer Morphologie fünf Untergruppen : Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales und Stigonematales (Rippka *et al.* 1979). Die Vorfahren der heutigen Cyanobakterien generierten ihre Energie über oxygene Photosynthese. Sie gelten als die ersten Organismen auf der Erde, die in der Lage waren, Wasser als Elektronenquelle für die Photosynthese zu nutzen (Schopf 1993; 2006). Die daraus resultierende Anreicherung der Erdatmosphäre mit Sauerstoff ermöglichte schließlich die Entwicklung des terrestrischen Lebens, wie wir es heute kennen (Blankenship & Hartman 1998; Catling & Claire 2005). Cyanobakterien kommen in vielen verschiedenen Lebensräumen vor, es gibt Vertreter im Süß-, Salz- und Brackwasser (Stal & Moezelaar 1997).

Man findet sie in terrestrischen Habitaten, in hypersalinen Gewässern, heißen Quellen oder in Symbiosen mit Pflanzen, Pilzen oder Tieren (Whitton & Potts 2007). Gemäß der Endosymbiontentheorie gelten Cyanobakterien als Ursprung der Plastiden der Algen und Pflanzen (Sagan 1967; Douglas 1994). Pflanzliche Zellen sind laut Theorie durch die Symbiose zwischen einem Cyanobakterium und einer eukaryontischen Wirtszelle entstanden (Falkowski *et al.* 2004). Der Photosyntheseapparat der heutigen Pflanzen ist in Struktur und Funktion dem der Cyanobakterien sehr ähnlich. Chlorophyll a ist das Haupt-Pigment für die Photosynthese der Cyanobakterien und mit wenigen Ausnahmen das einzige vorhandene Chlorophyll in den Zellen (Whitton & Potts 2007; Swingley *et al.* 2008). Zusätzlich zum Chlorophyll können Cyanobakterien weitere spezifische Pigmente wie Phycocyanin, Allophycocyanin und Phycoerythrin enthalten. Diese spezifischen Pigmente befinden sich in den Phycobilisomen, die Bestandteile der Lichtsammelkomplexe sind. Sie sind mit der Thylakoidmembran verbunden und ermöglichen die Nutzung von geringen Lichtintensitäten. Durch die unterschiedlichen Absorptionsspektren der verschiedenen Pigmente können Cyanobakterien die Grünlücke des Chlorophylls nutzen (McConnell *et al.* 2002; DeRuyter & Fromme 2008). Die Pigmentzusammensetzung wird von der Lichtintensität und der Lichtqualität beeinflusst, so ist der Anteil an Chlorophyll und Phycocyanin bei höheren Weißlichtintensitäten verringert (Stanier & Bazine 1977). Angepasst an ihre Umgebung besitzen Cyanobakterien flexible Stoffwechselwege, die es ihnen ermöglichen unter autotrophen, fermentativen oder mixotrophen Bedingungen zu wachsen bzw. zu überleben (Yang *et al.* 2002; Eiler 2006). Einige Stämme von Cyanobakterien, wie *Synechocystis spec.* PCC 6803 und *Synechococcus spec.* PCC 7002, sind natürlich kompetent und somit leicht durch exogene DNA transformierbar (Shestakov & Khyen 1970; Grigorieva & Shestakov 1982; Koksharova & Wolk 2002).

1.1.1 Wachstum

Cyanobakterien kommen in verschiedenen Habitaten vor und sind in der Lage, ihr Wachstum an die jeweiligen Bedingungen anzupassen. Im Normalfall wachsen sie autotroph und generieren mittels oxygener Photosynthese die für das Wachstum benötigte Energie. Sie sind jedoch auch in der Lage, unter heterotrophen- und fermentativen Bedingungen zu leben, wobei sie entweder schwaches Licht oder Lichtpulse für ihr Überleben benötigen (Anderson & McIntosh 1991). Für Wachstum ohne Licht benötigen Cyanobakterien eine zusätzliche Kohlenstoffquelle. Durch Zugabe einer zusätzlichen Kohlenstoffquelle sind einige Arten in der Lage, ihr Wachstum im Licht unter mixotrophen Bedingungen zu erhöhen. Das gilt beispielsweise für das in dieser Arbeit untersuchte Cyanobakterium *Synechocystis spec.* PCC 6803 (Yang *et al.* 2002). Die Fähigkeit zwischen einer phototrophen und einer mixotrophen Lebensweise wechseln zu können, stellt einen Selektionsvorteil gegenüber rein photo- und heterotrophen Organismen dar (Tittel *et al.* 2003).

1.1.2 *Synechocystis spec. PCC 6803*

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Cyanobakterium handelt es sich um *Synechocystis spec. PCC 6803* (im Weiteren *Synechocystis*). Der verwendete Stamm ist der vollständig sequenzierte glukosetoleranten "Kazusa" (GT) Stamm (Kaneko *et al.* 1996). *Synechocystis* ist ein einzelliges Cyanobakterium und gehört zur Ordnung der *Chroococcales*. Er hat seinen Ursprung in dem 1968 aus einem Süßwassersee in Oakland, Kalifornien isolierten Stamm. Dieser wurde in die Pasteur Culture Collection (PCC) aufgenommen und sein Genom als der erste Organismus mit oxygener Photosynthese bereits 1996 vollständig entschlüsselt (<http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>). Das Genom hat eine Größe von insgesamt 3573471 bp, enthält 3317 offene Leserahmen (ORFs) und einen GC-Gehalt von 47,7% (Kaneko *et al.* 1996). *Synechocystis* ist ein in der Wissenschaft häufig genutzter Modellorganismus, der sich unter anderem durch die Fähigkeit auszeichnet, Fremd-DNA mittels homologer Rekombination ins eigene Genom zu integrieren (Shestakov & Khyen 1970; Grigorieva & Shestakov 1982; Koksharova & Wolk 2002). Die Zellen sind in der Lage unter verschiedenen extremen Bedingungen zu überleben und sich anzupassen, so können sie beispielsweise eine bis zu 1,2 molare NaCl-Konzentration im Medium tolerieren (Reed & Stewart 1985). *Synechocystis* ist hochpolyploid, die in der Literatur angegebenen Werte bezüglich der Anzahl der Genomkopien schwanken jedoch extrem. Nach neueren Untersuchungen hält der Wildtyp-Stamm etwa 218 Genomkopien in der exponentiellen und 58 Genomkopien in der stationären Wachstumsphase (Griese *et al.* 2011). Dies sind die höchsten bisher gemessenen Zahlen für alle Cyanobakterien und sie weichen deutlich von den bereits früher gemessenen Werten von 12 Genomkopien für den "Kazusa" Stamm ab (Labarre *et al.* 1989). Wo die tatsächliche Anzahl liegt und welcher der Werte genauer ist, lässt sich schwer bestimmen. Es wurde aber gezeigt, dass für *Synechocystis* Unterschiede in den einzelnen Laborstämmen bestehen und dass der Ploidiegrad in den Wachstumsphasen unterschiedlich ist (Griese *et al.* 2011). *Synechocystis* ist in der Lage sowohl phototroph mittels oxygener Photosynthese, mixotroph als auch photoheterotroph zu wachsen, sofern eine geeignete Kohlenstoffquelle wie beispielsweise Glukose vorhanden ist (Rippka *et al.* 1979; Williams 1988). Wie bei vielen anderen Bakterien führt die Fermentation zum Abbau gespeicherter Energiereserven. Die Stoffwechselwege, über die diese Produkte entstehen, sind bisher noch nicht ausreichend charakterisiert (McNeely *et al.* 2011). Je nach Lichtintensität und Substratverfügbarkeit während der Wachstumsphase werden Zellstoffwechsel und Proteinexpression beeinflusst (Gill *et al.* 2002; Kurian *et al.* 2006).

1.2 Cyanobakterieller Wasserstoffmetabolismus

Um Biowasserstoff aus Cyanobakterien zukünftig als neue Energiequelle nutzen zu können, muss dessen Produktion wirtschaftlich effizient sein. Viele Cyanobakterien sind in der Lage, Wasserstoff zu erzeugen, wenn ein Überschuss an Reduktionsmitteln in den Zellen vorhanden ist (Appel *et al.* 2000; Cournac *et al.* 2004). *Spirulina platensis* kann beispielsweise unter anaeroben Bedingungen $1 \mu\text{mol H}_2 / 12 \text{ h} / \text{mg}$ Zelltrockengewicht produzieren (Aoyama *et al.* 1997). Die Tatsache, dass die H_2 -Produktion bei vielen Cyanobakterien ausschließlich unter anaeroben Bedingungen stattfindet, stellt einen Nachteil für die wirtschaftliche Nutzbarkeit dar. Die Ursache dafür ist in den verschiedenen, für die Produktion genutzten Enzymen der Cyanobakterien zu finden. Cyanobakterien nutzen zwei Gruppen von Enzymen zur Wasserstoffproduktion: Nitrogenasen und Hydrogenasen. Nitrogenasen werden in stickstofffixierenden Cyanobakterien gefunden und katalysieren Wasserstoff als Nebenprodukt der Stickstofffixierung.

1.2.1 Cyanobakterielle [NiFe]-Hydrogenase

Synechocystis besitzt als nicht stickstofffixierendes Cyanobakterium keine Nitrogenase, sondern nur eine, nach ihrem binuklearem Nickel-Eisenzentrum benannte, [NiFe]-Hydrogenase.

Bei der Hydrogenase handelt es sich um ein Metalloproteinkomplex, der die reversible Oxidation von Wasserstoff katalysiert. Hydrogenasen können entweder als Elektronenventile im photosynthetischen Elektronentransport dienen (Appel *et al.* 2000; Cournac *et al.* 2004) oder eine regulatorische Funktion bei der Fermentation übernehmen (Van der Oost *et al.* 1989).

In Cyanobakterien gibt es verschiedene [NiFe]-Hydrogenasen, eine H_2 -oxidierende Form und eine bidirektionale Hydrogenase (Tamagnini *et al.* 2007), erstere wird vor allem in diazotrophen Cyanobakterien gefunden (Tamagnini *et al.* 2000).

Bei der bidirektionale [NiFe]-Hydrogenase handelt es sich um einen Enzymkomplex, der sowohl die Oxidation von Wasserstoff als auch die Reduktion von Protonen zu Wasserstoff katalysieren kann. Der Komplex ist in Abbildung 1 skizziert, er besteht aus der Hydrogenase (HoxYH) und einer Diaphorase (HoxEFU) (Schmitz *et al.* 2002). *Synechocystis* besitzt als nicht stickstofffixierendes Cyanobakterium eine bidirektionale [NiFe]-Hydrogenase, deren Gene (*hoxEFUYH*) in einem Operon angeordnet sind (Gutekunst *et al.* 2005).

Die physiologische Rolle der bidirektionalen Hydrogenase in *Synechocystis* ist noch nicht vollständig geklärt. Es wurde nachgewiesen, dass die Hydrogenase essentiell für das Wachstum unter mixotrophen Bedingungen ist, in einem Medium, in dem Nitrat durch eine bereits reduzierte Stickstoffquelle (Arginin) ersetzt wurde (Gutekunst *et al.* 2014).

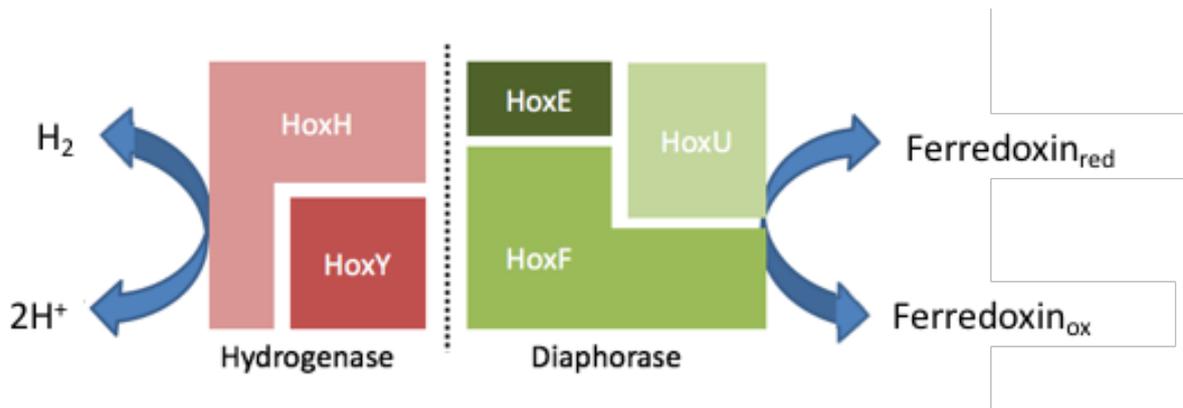


Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenase, verändert nach (Tamagnini *et al.* 2007).

Es ist bekannt, dass die Hydrogenase als Elektronenventil fungieren kann und zu Beginn der Beleuchtung dunkeladaptierter Zellen Wasserstoff produziert (Appel *et al.* 2000). Die Expression der Hydrogenase in *Synechocystis* variiert unter verschiedenen Umweltbedingungen, ist jedoch immer nachweisbar (Gutekunst *et al.* 2005). Um zu verhindern, dass die Hydrogenase dauerhaft aktiv ist, wird sie auf mehreren Ebenen reguliert. Auf expressioneller Ebene erfolgt die Regulation beispielsweise über den Transkriptionsaktivator LexA (Gutekunst *et al.* 2005). Die Hydrogenase kann über die Verfügbarkeit der Metalle, die zur Bildung der Hydrogenase notwendig sind, reguliert werden (Gutekunst *et al.* 2006). Ebenso hängt die Aktivität von der Sauerstoffkonzentration in der Zelle ab. Die Hydrogenase ist, trotz Expression unter anaeroben und aeroben Bedingungen, in Gegenwart von Sauerstoff inaktiv (Cournac *et al.* 2002; 2004). Für Jahrzehnte wurde angenommen, dass die bidirektionale [NiFe]-Hydrogenase in *Synechocystis* von NAD(P)H reduziert wird (Schmitz *et al.* 2002). Wir konnten in unserer Arbeitsgruppe jedoch kürzlich *in vivo* und *in vitro* zeigen, dass reduziertes Ferredoxin und reduziertes Flavodoxin als Elektronendonatoren für das Enzym fungieren (Gutekunst *et al.* 2014).

1.2.2 Ferredoxin und Flavodoxin

Ferredoxine (Fed oder Fdx) kommen in vielen verschiedenen Organismen vor, wohingegen Flavodoxine nur in wenigen Bakterien und Algen zu finden sind (Zurbriggen *et al.* 2007). Das allgegenwärtige Vorkommen von Ferredoxinen, unter anderem auch in ursprünglichen, fermentativen Bakterien und Archaea zeigt auf, dass diese Proteine bereits in sehr frühen Stadien der Entwicklung entstanden sind (Sticht & Rösch 1998). Es handelt sich dabei um lösliche Eisen-Schwefelhaltige Proteine, die als Elektronenüberträger in verschiedenen Stoffwechselwegen eine Rolle spielen. Aufgrund der Eisen-Schwefel (Fe-S) Zentren sind Ferredoxine unter aeroben Bedingungen im Allgemeinen anfällig für oxidativen Stress, da durch Sauerstoff das [Fe-S]-Cluster in eine instabile Form umgewandelt werden kann und zersetzt wird (Imlay 2006).

Ferredoxine werden nach Art ihres Eisen-Schwefel Zentrums ([2Fe-2S], [3Fe-4S] und [4Fe-4S]) und nach den Organismen, in denen sie zum ersten Mal klassifiziert wurden, unterschieden (Sticht & Rösch 1998). Vergleiche der Aminosäuresequenzen von Ferredoxinen aus verschiedenen Organismen lassen darauf schließen, dass sie einen gemeinsamen Vorfahren haben (Matsubara *et al.* 1979). Proteine mit einem [2Fe-2S] Cluster werden in pflanzliche- und bakterielle Ferredoxine unterteilt. Sie unterscheiden sich vor allem anhand der Aminosäuren, die sie umgeben (Sticht & Rösch 1998).

Pflanzliche [2Fe-2S]-Ferredoxine sind in Cyanobakterien, Algen und Pflanzen bereits gut charakterisiert. In Algen und Pflanzen sind sie hauptsächlich in den Chloroplasten lokalisiert (Winkler *et al.* 2010), weshalb sie auch Chloroplasten-Ferredoxine genannt werden. In höheren Pflanzen wurden die verschiedenen Isoformen der [2Fe-2S]-Ferredoxine aber bereits in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen und zeigten funktionelle Unterschiede (Hase *et al.* 1991).

Das am besten charakterisierte Ferredoxin ist das Ferredoxin1 (Fed1). Es spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Aufnahme von Elektronen vom Photosystem I (im Weiteren PSI), von wo aus sie die Elektronen auf mehrere Biosynthese- und Regulationswege verteilen (Arnon 1988; Knaff 1996). Sie haben aber auch andere wichtige Funktionen außerhalb des photosynthetischen Elektronentransports, wie beispielsweise bei der Reduktion von Nitrit zu Ammoniak (Shiji 1977; Sticht & Rösch 1998). Die Redoxpotentiale von pflanzlichen [2Fe-2S]-Ferredoxinen liegen zwischen -305 und -455 mV (Cammack *et al.* 1977). Sie sind gegenüber bakteriellen Ferredoxinen weniger anfällig für Schäden durch Sauerstoff (Imlay 2006). Bakterielle [2Fe-2S]-Ferredoxine wurden zunächst im Archaeon *Halobacterium halobium* als Elektronenüberträger von α -Ketosäuren beschrieben (Kerscher *et al.* 1976). Sie ähneln dem pflanzlichen Typ in Struktur und Größe und ihr Redoxpotential liegt bei -340 bis -350 mV (Werber & Mevarech 1978), sind aber im Gegensatz zu den pflanzlichen sensitiv gegenüber Sauerstoff (Imlay 2006).

Ferredoxine, die zwei [4Fe-4S]-, bzw. ein [4Fe-4S]- und ein [3Fe-4S]-Cluster pro Monomer besitzen, wurden zuerst in *Rhodobacter capsulatus* beschrieben (Jouanneau *et al.* 1990). Der Zusammenschluss mehrerer [Fe-S]-Cluster in einem Monomer, scheint durch Genduplikation im Laufe der Evolution entstanden zu sein (Meyer 1988), die großen [Fe-S]-Cluster sind stärker anfällig für oxidativen Stress und werden schnell instabil in Gegenwart von Sauerstoff (Imlay 2006). Die Literatur über die Redoxpotentiale dieser Ferredoxintypen variieren sehr stark. Es gibt unter ihnen so genannte „*high-potential*“ Ferredoxine (HiPIPs), die ein hohes Redoxpotential haben und vor allem im fermentativen Elektronentransport wirken (Sticht & Rösch 1998). Durch ihre Form sind sie in der Lage zwischen den beiden Oxidationsstadien $[4Fe-4S]^{2+}$ und $[4Fe-4S]^{3+}$ zu wechseln, ohne sich zu zersetzen (Imlay 2006).

Es wurden Werte zwischen -280 mV für ein Ferredoxin aus *Bacillus stearothermophilus* (Jensen *et al.* 1994) und -645 mV für ein Ferredoxin aus *Azotobacter vinelandii* (Langen *et al.* 1992) gemessen.

Welches Ferredoxin unter welchen Bedingungen eine Rolle spielt ist, bis auf Fed1 in vielen Fällen noch nicht aufgeklärt.

Ferredoxine unterscheiden sich in der Toleranz gegenüber Sauerstoff, bakterielle Ferredoxine gelten gegenüber den pflanzlichen Ferredoxinen, als weniger resistent gegenüber Sauerstoff (Adman *et al.* 1973). Dies liegt vermutlich an einer evolutionären Anpassung an den Übergang von der anoxygenen- zur oxygenen Photosynthese. Die größeren sauerstoff-sensitiven [4Fe-4S]-Cluster mussten vor Sauerstoff geschützt werden, so haben sich die pflanzlichen, Sauerstoff unempfindlicheren Ferredoxine mit den [2Fe-2S]-Clustern entwickelt (Golbeck 2007).

Es gibt jedoch auch pflanzliche Ferredoxine, die unter anaeroben Bedingungen eine Rolle spielen; In der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* wurde ein anaerob induziertes Ferredoxin (Fdx5) identifiziert, weshalb ihm eine Rolle in der Wasserstoffherzeugung oder dem fermentativen Metabolismus nachgesagt wird (Winkler *et al.* 2010).

Ferredoxine mit einem [3Fe-4S]-, oder einem [4Fe-4S]-Cluster sind neben der Photosynthese auch an anderen Redoxprozessen, wie der Stickstoffassimilation und der Biosynthese von Glutamat und Chlorophyll beteiligt (Hanke & Mulo 2013). Wir konnten zeigen, dass Ferredoxin in *Synechocystis* als direkter Elektronenüberträger der Hydrogenase dient (Gutekunst *et al.* 2014). *Synechocystis* besitzt neun Gene, die für verschiedene Ferredoxine kodieren: *fed1* (*ssl0020*), *fed2* (*sll1382*), *fed3* (*slr1828*), *fed4* (*slr0150*), *fed5* (*slr0148*), *fed6* (*ssl2559*), *fed7* (*sll0662*), *fed8* (*slr3184*) und *fed9* (*slr2059*) (Cassier-Chauvat & Chauvat 2014). Die *fed1-5* Gene kodieren für pflanzliche [2Fe-2S]-Ferredoxine, *fed6* für ein bakterielles [2Fe-2S]-Ferredoxin, *fed7* kodiert für ein [4Fe-4S]-Ferredoxin, *fed8* für ein [3Fe-4S] [4Fe-4S]-Ferredoxin und *fed9* kodiert für ein [4Fe-4S] [4Fe-4S]-Ferredoxin. Es ist bekannt, dass Ferredoxin1 (*Ssl0020*) essentiell für das Wachstum von *Synechocystis* ist und die restlichen Ferredoxine nicht in der Lage sind, dessen Funktion zu übernehmen (Poncelet *et al.* 1998). In einer neueren Untersuchung konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass neben Fed1, auch Fed2, Fed3, Fed6 und Fed8 essentiell für das Wachstum unter autotrophen Bedingungen ist (Cassier-Chauvat & Chauvat 2014). Es wird vermutet, dass Ferredoxin1, 7 und 9 eine wichtige Rolle im Schutz gegen oxidativen Stress in der Photosynthese spielen, wobei Fed9 hier spezifisch mit dem Flavoprotein3 (*Sll0550*) interagiert (Cassier-Chauvat & Chauvat 2014).

Flavodoxin (*IsiB/Sll0248*) ist ebenso wie die Ferredoxine ein Redoxprotein, es besitzt jedoch kein Eisen-Schwefelcluster im reaktiven Zentrum. Flavodoxin überträgt Elektronen mit Hilfe eines Flavinmononucleotids (FMN). Da Flavodoxin im Gegensatz zum Ferredoxin kein Eisen trägt, kann Ferredoxin unter Eisenmangel teilweise funktionell durch Flavodoxin ersetzt werden (Sandmann *et al.* 1990).

1.3 Photowasserstoffproduktion

Cyanobakterien betreiben oxygene Photosynthese. In Abbildung 2 ist eine schematische Darstellung des photosynthetischen Elektronentransports gezeigt. Vom PSI werden die Elektronen über Ferredoxin (oder Flavodoxin) auf die Ferredoxin-NADP-Reduktase transferiert, die Reduktionsäquivalente in Form von NADPH bereitstellt (Peschek *et al.* 2011). NADPH ist der letzte Akzeptor des photosynthetischen Elektronentransports. NADPH und ATP, die durch die Photosynthese erzeugt werden, fließen zu großen Teilen in den Calvin-Benson-Zyklus. Dieser dient der CO₂-Fixierung und zur nachfolgenden Erzeugung von Kohlenstoffverbindungen für den Zellaufbau. Überschüssige Kohlenstoffverbindungen werden in der Zelle in Form von Glykogen gespeichert.

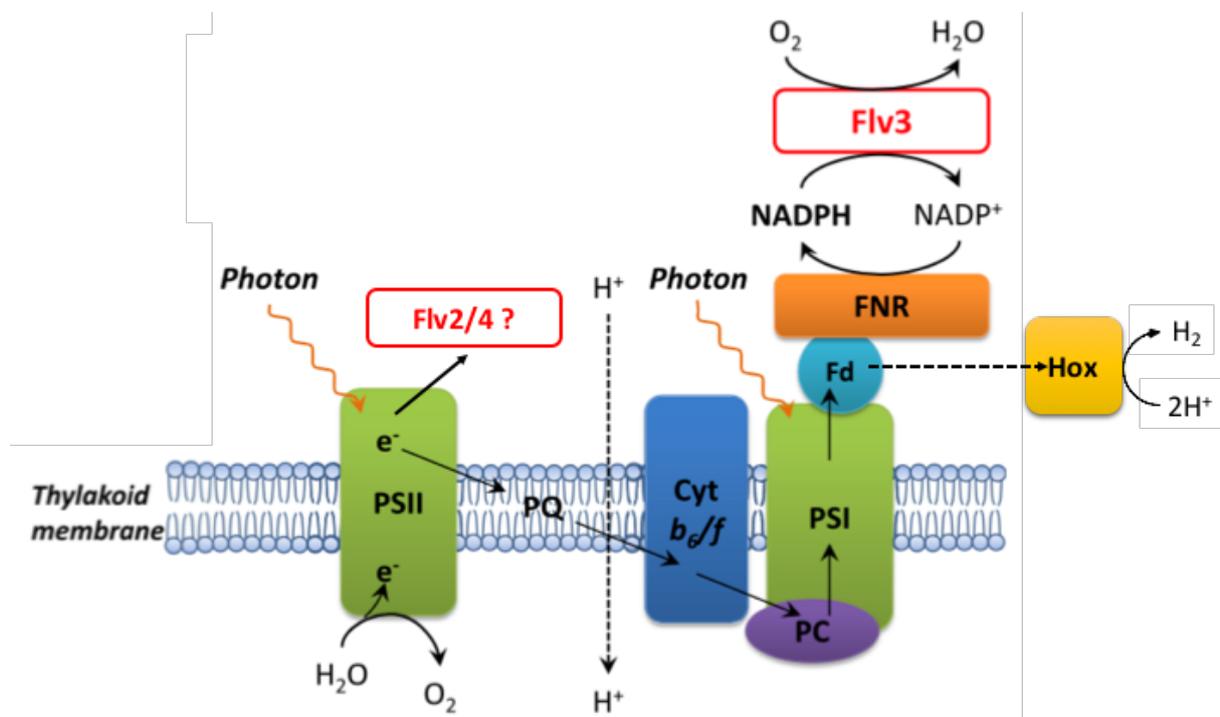


Abbildung 2: Schematische Darstellung des photosynthetischen Elektronentransports in Cyanobakterien. Verändert nach (Hasunuma *et al.* 2014; Mullineaux 2014). Flv: Flavodiiron Protein; FNR: Ferredoxin - NADP Oxidoreduktase; Hox: bidirektionale [NiFe]-Hydrogenase; PSI: Photosystem I; PSII: Photosystem II.

Im Falle eines Elektronenüberschusses im photosynthetischen Elektronentransport gibt es in *Synechocystis* verschiedene Schutzmechanismen um oxidativen Stress zu vermeiden. Ein großer Teil der überschüssigen Lichtenergie kann in Form von Wärme abgegeben werden. Durch diesen Prozess wird ein Elektronenstau verhindert. Ebenso können die Lichtsammelkomplexe dem Licht entsprechend in ihrer Anordnung und ihrer Anzahl reguliert werden (McConnell *et al.* 2002). Sind bereits zu viele Elektronen im System, können diese über verschiedene Wege entsorgt werden.

Einer dieser Wege ist der sogenannte pseudozyklische Elektronentransport, wobei überschüssige Elektronen direkt aus reduziertem Ferredoxin auf Sauerstoff und Wasser übertragen werden können (Hormann *et al.* 1993). Ebenso können Elektronen auf andere Elektronenakzeptoren wie Nitrat übertragen werden (Gutthann *et al.* 2007). In der Elektronentransportkette wirken einige Enzymkomplexe zusätzlich als Elektronenventile, welche Elektronen aus dem empfindlichen System entfernen können, damit dieses keinen Schaden nimmt. Es wurde gezeigt, dass die bidirektionale Hydrogenase, die die Reduktion von Protonen zu Wasserstoff katalysiert, als Elektronenventil in der Photosynthese eine Rolle spielt (Appel *et al.* 2000). Sie leitet überschüssige Elektronen ab und bildet dabei Photowasserstoff. Dieser kann immer dann gebildet werden, wenn dunkeladaptierte Zellen belichtet werden. Hierbei werden die Elektronen vom PSI über Ferredoxin bzw. Flavodoxin auf die Hydrogenase übertragen (Gutekunst *et al.* 2014). Der durch die Photosynthese entstehende Sauerstoff inhibiert die Hydrogenase innerhalb weniger Sekunden (Cournac *et al.* 2002). Daher wird Photowasserstoff nur für wenige Minuten in Übergangsstadien produziert.

1.3.1 Flavoproteine als Elektronensenke der Photosynthese

Neben der [NiFe]-Hydrogenase fungieren auch Flavoproteine als Elektronenventile für den photosynthetischen Elektronentransport von *Synechocystis* (Wasserfallen *et al.* 1998). Die Flavodiiron-Proteine (Fdp/Flv) sind in vielen Prokaryoten sowie in Archaen und einigen Eukaryoten zu finden (Wasserfallen *et al.* 1998). Wie beispielsweise im fakultativ anaeroben Bakterium *Clostridium acetobutylicum* (Hillmann *et al.* 2009) dienen Flavoproteine in der Zelle hauptsächlich zum Schutz vor Oxidation verschiedener Proteine. Es gibt verschiedene Gruppen von Flavoproteinen, die sich anhand der Aminosäuresequenz, ihrer Struktur und ihrer Phylogenie unterscheiden (Andersson *et al.* 2003; 2006; Vincent *et al.* 2007). Für Flavoproteinen in *E. coli* und einigen anaeroben Bakterien wie *Desulfovibrio gigas*, konnte gezeigt werden, dass sie eine Rolle im Schutz vor Stickstoffmonoxid spielen (Rodrigues *et al.* 2006). Diese Funktion konnte jedoch für cyanobakterielle Flavoproteine nicht nachgewiesen werden (Gonçalves *et al.* 2011). Die Flavoproteine der Cyanobakterien dienen vor allem dem Schutz der Photosysteme vor oxidativem Stress durch zu starker Belichtung oder zu wenig CO₂ (Gonçalves *et al.* 2011). Dies gilt auch für die Funktion der Flavoproteine in Pflanzen, ihnen wurde ein Einfluss auf die Toleranz gegenüber Salzstress und osmotischem Stress (Espinosa-Ruiz *et al.* 1999) sowie ein Zusammenhang mit Photorezeptoren, die dem Phototropismus dienen (Christie *et al.* 1998), nachgewiesen.

Cyanobakterielle Flavoproteine (Flv), auch als A-Typ oder Klasse-C bezeichnet (Zhang *et al.* 2009), besitzen in der Regel eine β -lactamase-like Domäne (mit Eisen im aktiven Zentrum), eine Flavodoxindomäne (mit einer FMN-Bindestelle) sowie eine C-terminale NAD(P)H-Flavin-Oxidoreduktase (Zang *et al.* 2007; Allahverdiyeva *et al.* 2011).

Sie sind in ihrer Struktur und der Aminosäuresequenz, den in den Chloroplasten lokalisierten Flavoproteinen der Pflanzen, Algen und Moose sehr ähnlich, daher geht man davon aus, dass Flavoproteine in höheren Organismen mit oxygener Photosynthese von den cyanobakteriellen Flv's abstammen (Gonçalves *et al.* 2011).

Das in dieser Arbeit untersuchte Cyanobakterium *Synechocystis* besitzt vier verschiedene Flavoproteine Flv1-4 (sll1521, sll0219, sll0550 und sll0217). Flv1 und Flv3 bilden zusammen ein Heterodimer (Flv1/3), das Elektronen am PSI von NADPH auf Sauerstoff überträgt (Helman *et al.* 2003; Allahverdiyeva *et al.* 2011). Dieser Prozess wird *Mehler-like* Reaktion genannt, da die überschüssigen Elektronen, ähnlich wie bei Pflanzen auf Sauerstoff übertragen werden. Anders als bei der Mehler Reaktion der Pflanzen entsteht bei der Übertragung der Elektronen auf O₂ durch Flv1/3 keine reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Helman *et al.* 2003). Bei Wachstum unter fluktuierendem Licht zeigte sich, dass das Dimer Flv1/3 essentiell ist (Allahverdiyeva *et al.* 2011). Es bildet hier eine unverzichtbare Elektronensenke, die das PSI vor oxidativen Schäden schützt (Allahverdiyeva *et al.* 2013). Beim Wachstum unter CO₂-limitierenden Bedingungen werden mehr als 50% der in der Photosynthese erzeugten Elektronen mithilfe der *Mehler-like* Reaktion über Flv1/3 abgeleitet (Allahverdiyeva *et al.* 2011). Flv2 und Flv4 spielen eine wichtige Rolle im Schutz des Photosystem II (im Weiteren PSII) (Zhang *et al.* 2009; 2012). Flv2 und Flv4 bilden ein Heterodimer (Flv2/4), das vorwiegend im Cytoplasma lokalisiert ist (Zhang *et al.* 2012) und eine wichtige Rolle im Schutz des PSII spielt (Zhang *et al.* 2009; 2012). Unter Stressbedingungen werden bis zu 30% der Elektronen über Flv2/4 aus dem Elektronentransport abgeleitet (Zhang *et al.* 2012). Es konnte bisher nicht gezeigt werden, an welchen Akzeptor die Elektronen von Flv2/4 weitergeleitet werden. Bekannt ist jedoch, dass Flv2/4 als Elektronensenke an der Akzeptorseite des PSII agiert und den Plastoquinonpool im oxidierten Zustand halten kann (Bersanini *et al.* 2014). Eine Überexpression des *flv2-4* Operons resultierte in einer beschleunigten Elektronenübertragungsrate am PSII und höherer Widerstandsfähigkeit gegenüber Photoinhibition des PSII (Chukhutsina *et al.* 2015). Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Expression des Operons bei geringerer CO₂ Konzentration und unter Lichtstress erhöht ist (Zhang *et al.* 2009).

1.4 Fermentative Wasserstoffproduktion

In *Synechocystis* wird Wasserstoff hauptsächlich unter fermentativen Bedingungen (Van der Oost *et al.* 1989) bei der Oxidation von Kohlenhydraten im Dunkeln produziert (Troschina *et al.* 2002). Unter diesen Bedingungen werden die Glykogenspeicher der Zelle, die im Licht photosynthetisch aufgebaut wurden, zunächst zu Glukose abgebaut. Im Anschluss werden diese über glykolytische Wege zu Pyruvat oxidiert, dabei ist die fermentative Wasserstoffproduktion an die Reduktion von

Ferredoxin/Flavodoxin durch die Pyruvat-Flavodoxin/Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR) gekoppelt (Gutekunst *et al.* 2014).

In Abbildung 3 ist der Elektronentransport von der Glukose zur Hydrogenase unter fermentativen Bedingungen dargestellt. Die rot dargestellten Pfeile symbolisieren den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (EMP) (s.1.5.1) und die blauen Pfeile den Oxidative-Pentosephosphat-Weg (OPP) (s.1.5.2). Über beide Wege wird Pyruvat synthetisiert. Die PFOR katalysiert die Decarboxylierung von Pyruvat und überträgt dabei Elektronen auf Ferredoxin bzw. Flavodoxin, das seinerseits die Hydrogenase reduziert und damit zur Produktion von Wasserstoff führt (Gutekunst *et al.* 2014). Die Wasserstoffproduktion unter fermentativen Bedingungen ist damit eng mit dem Glukosestoffwechsel der Cyanobakterien verbunden.

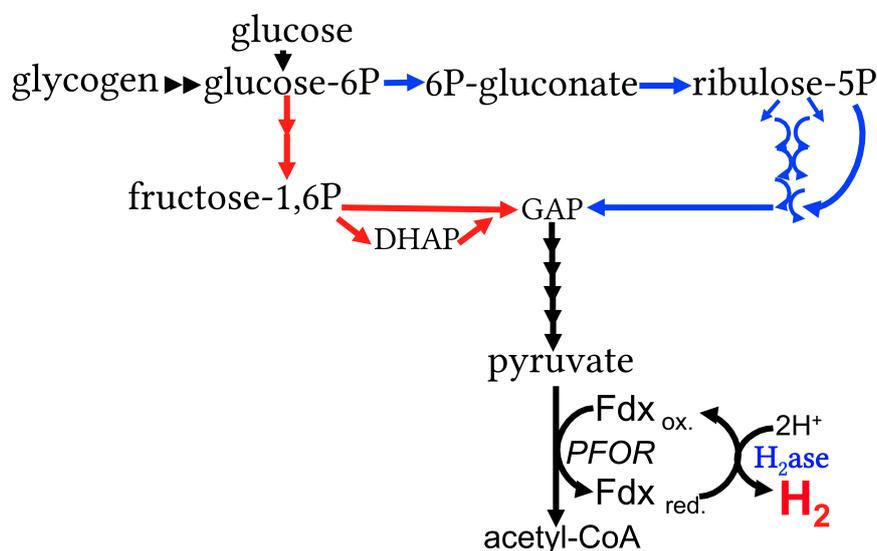


Abbildung 3: Schematische Abbildung zum Zusammenhang zwischen Glukosestoffwechsel und Wasserstoffproduktion unter fermentativen Bedingungen (verändert nach Chen *et al.* 2016). Die Elektronen zur Bildung von H₂ stammen letztlich aus der Glukose bzw. dem Glykogen. In rot dargestellt ist der Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (EMP) und in blau der Oxidative-Pentosephosphat-Weg (OPP).

1.5 Glukoseabbauwege

Der Abbau von Glukose ist für den Energie- und Baustoffwechsel von zentraler Bedeutung. Die zentralen Stoffwechselwege zur Oxidation von Zuckern führen zur Bildung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP), das unter Bildung von ATP weiter zu Pyruvat umgesetzt werden kann. Das entstandene Pyruvat kann unter fermentativen Bedingungen über Acetyl-CoA weiter zu Acetat abgebaut werden (s. Abbildung 3). In Gegenwart von Sauerstoff kann Acetyl-CoA alternativ in den Zitratzyklus eingespeist werden.

Da der Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (EMP-Weg, oder Glykolyse) in Eukaryonten weit verbreitet ist, wird er als der am häufigsten vorkommende Glukoseabbauweg wahrgenommen. Es sind daneben jedoch auch eine Vielzahl anderer Wege vorhanden, die sich funktionell ersetzen können (Romano & Conway 1996). Nicht alle zuckerabbauenden Organismen nutzen den EMP-Weg, die Abbauwege sind divers. Die am weitesten verbreiteten glykolytischen Wege in Prokaryonten sind neben dem EMP-Weg, der Oxidative-Pentosephosphat-Weg (OPP) und der Entner-Doudoroff-Weg (ED) (Flamholz *et al.* 2013). In Abbildung 4 sind der Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (EMP) in rot und der Entner Doudoroff-Weg (ED) in grün dargestellt (Flamholz *et al.* 2013).

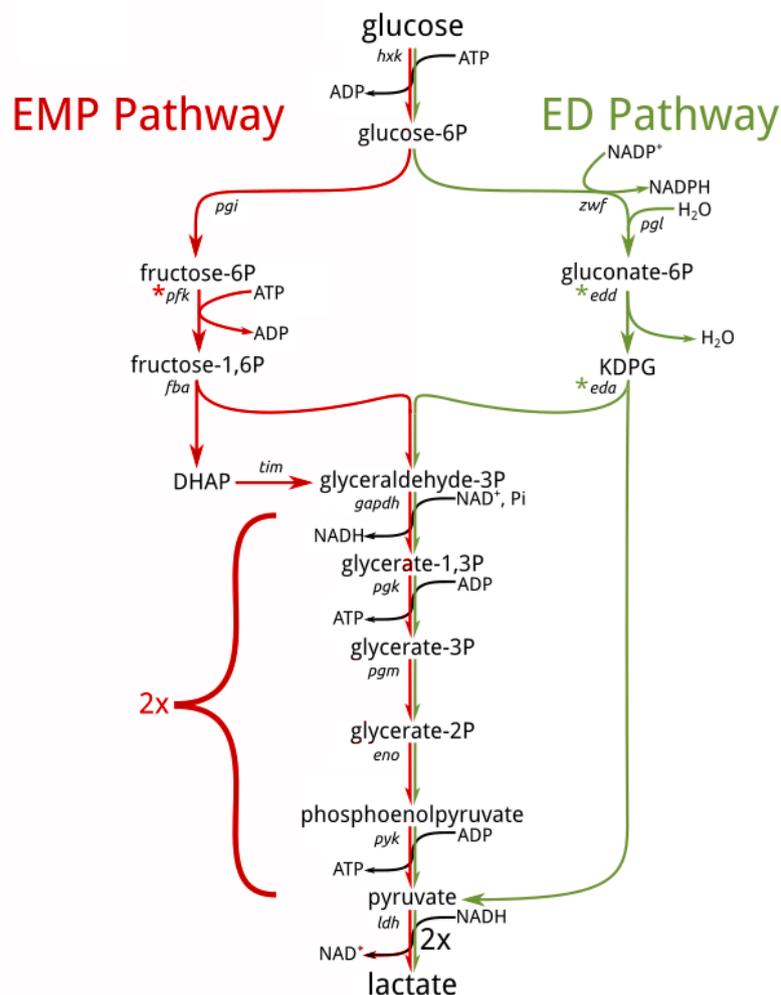


Abbildung 4: A) Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (EMP) in rot und der Entner Doudoroff-Weg (ED) in grün (Flamholz *et al.* 2013).

Der Abbau von Glukose zu Glukose-6-Phosphat verläuft in beiden Fällen mit einer Hexokinase unter Verbrauch von ATP. Der untere Teil -der Abbau vom GAP zum Lactat - erfolgt ebenfalls gleich.

In Abbildung 5 ist der obere Teil des Oxidativen-Pentosephosphat-Wegs (OPP) - bis zur Bildung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) - dargestellt (Australian Society of Plant Scientists). Der weitere Abbau erfolgt genau wie bei dem EMP- und ED-Weg (Abbildung 4).

Welcher der Wege in den einzelnen Organismen jeweils genutzt wird hängt von den jeweiligen Umweltbedingungen ab.

Viele Organismen können Sauerstoff als Elektronenakzeptor nutzen und so die organischen Verbindungen vollständig zu CO₂ oxidieren. Die drei glykolytischen Wege (EMP-, OPP- und ED-Weg) generieren beim Zuckerabbau hin zum Pyruvat unterschiedlich viel ATP, NADH und NADPH (Bar-Even *et al.* 2012). Die jeweiligen Renditen an ATP, NADH und NADPH der einzelnen Wege sind in Tabelle 1 dargestellt.

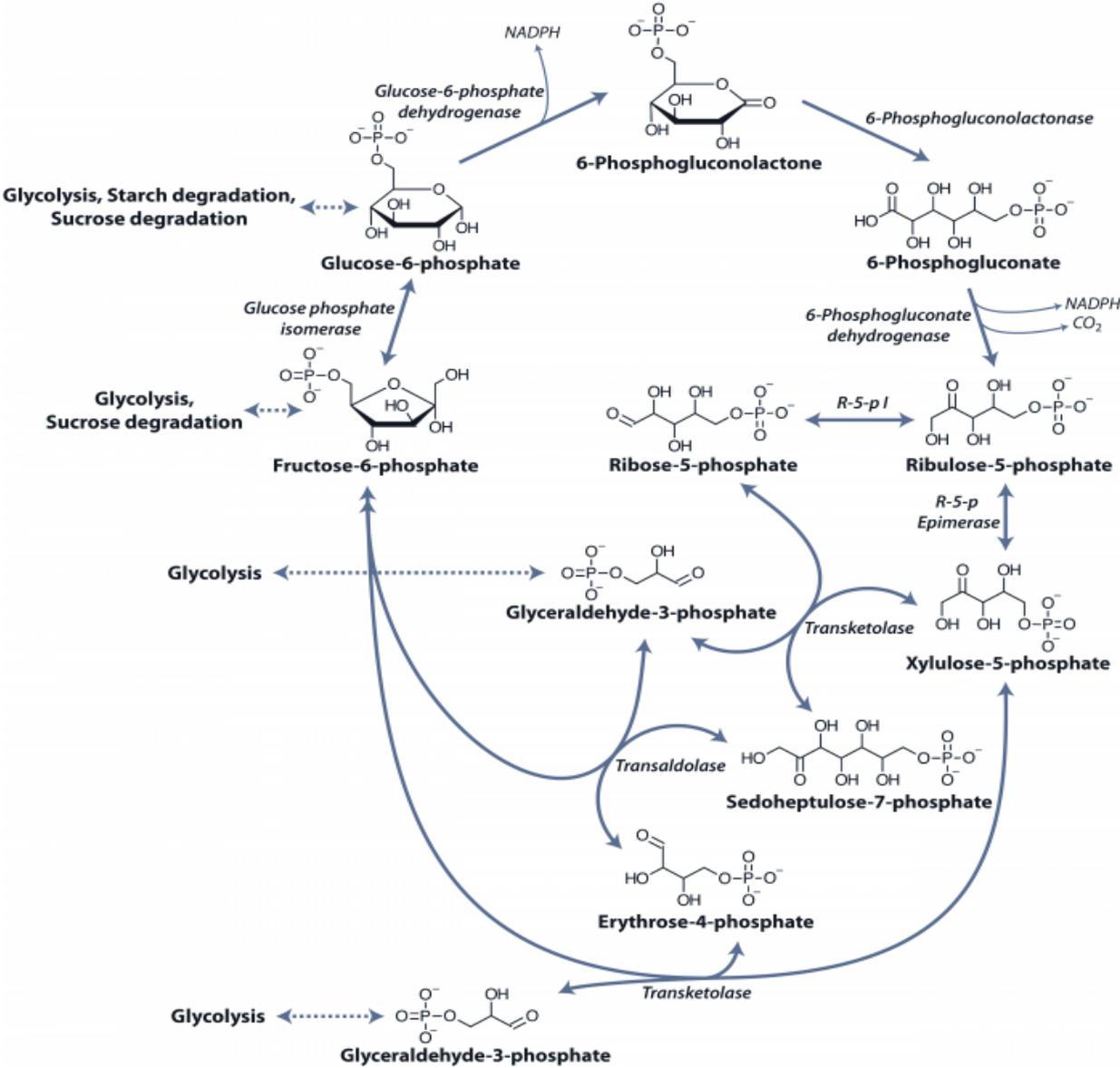


Abbildung 5: Oxidativer-Pentosephosphat-Weg (OPP) (Australian Society of Plant Scientists, von: Nicolas Taylor & Harvey Millar: <http://plantsinaction.science.uq.edu.au> / © Australian Society of Plant Scientists, New Zealand Society of Plant Biologists, and New Zealand Institute of Agricultural and Horticultural Science 2010).

Tabelle 1: Rendite des EMP-, ED- und OPP-Wegs an NADH, NADPH und ATP pro oxidiertem Glukosemolekül.

	NADH	NADPH	ATP
EMP	2	0	2
ED	1	1	1
OPP (oberer Teil)	0	2	0

Die Wahl zwischen EMP- und ED-Weg kann auf einem Kompromiss zwischen Energieausbeute (ATP) und der Synthese von im glykolytischen Weg benötigten Proteinen beruhen (Flamholz *et al.* 2013). Organismen, die unter anaeroben Bedingungen leben und damit keinen Sauerstoff zur ATP-Produktion nutzen können, verwenden zu einem größeren Anteil den EMP-Weg mit einer höheren ATP-Ausbeute. In fakultativ anaeroben Prokaryoten findet man den ED-Weg zu einem höheren Prozentsatz. Noch häufiger ist der ED-Weg bei strikten Aerobiern zu finden (Flamholz *et al.* 2013). Prokaryoten, die sowohl über den EMP- als auch den ED-Weg verfügen, können vermutlich abhängig von den jeweiligen Umweltbedingungen zwischen beiden Wegen wechseln. Der EMP-Weg ist in seiner physiologischen Bedeutung in Prokaryoten vermutlich lange überschätzt worden, da gut untersuchte Modellorganismen, die industriell oder wissenschaftlich im Fokus stehen, wie *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* und *Saccharomyces cerevisiae* v.a. den EMP-Weg nutzen (Fuhrer *et al.* 2005). Flux-Analysen mit den phylogenetisch (Firmicutes; γ -Proteobakterien, α -Proteobakterien) und metabolisch (aerob, anaerob, photoheterotroph, chemoheterotroph) distinkten Prokaryonten *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Zymomonas mobilis*, *Paracoccus versutus* und *Pseudomonas fluorescens* ergaben, dass alle untersuchten Organismen in erster Linie den ED-Weg nutzen, auch wenn einige von ihnen zusätzlich über den EMP-Weg verfügen (Fuhrer *et al.* 2005).

1.5.1 Embden-Meyerhof-Parnas-Weg

Der Embden-Meyerhof-Parnas-Weg, kurz EMP oder Glykolyse, ist in Eukaryoten weit verbreitet. Durch Genomanalysen konnte bestätigt werden, dass der EMP-Weg vor allem in anaeroben Organismen zu finden ist (Flamholz *et al.* 2013). Die meisten Enzyme des EMP-Wegs sind bidirektional und dienen entweder dem Abbau von Glukose oder arbeiten in der entgegengesetzten Richtung, der Glucogenese. Die Phosphofruktokinase (Pfk) ist einzigartig für die oxidative Richtung des EMP-Weg (Bennett *et al.* 2009) und zählt somit als Schlüsselenzym für diesen Weg.

In der Glykolyse wird ein Glukosemolekül zu zwei Molekülen Pyruvat oxidiert, wobei zwei ATP Moleküle generiert werden (Bar-Even *et al.* 2012). Der erste Schritt ist hierbei die Phosphorylierung der Glukose zu Glukose-6-Phosphat, das in Folge durch die Glucosephosphat-Isomerase (Pgi) zu Fruktose-6-Phosphat umgewandelt wird. Diese wird mittels der Phosphofruktokinase (Pfk) unter Verbrauch von ATP zu Fruktose-1,6-bisphosphat phosphoryliert.

Fruktose-1,6-Bisphosphat wird anschließend durch eine Aldolase in Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) gespalten. DHAP wird in einem weiteren Schritt über eine Triosephosphatisomerase ebenfalls zu GAP umgesetzt (s. Abbildung 4/A). Beide GAP Moleküle dienen der ATP Produktion im unteren Teil der Glykolyse.

1.5.2 Oxidativer-Pentosephosphat-Weg

Der Pentosephosphat-Weg ist in allen Pro- und Eukaryoten vorhanden (Abröhl *et al.* 2008). Mittels dieses Weges kann entweder im reduktiven Modus (Calvin-Benson-Zyklus) im Licht CO₂ fixiert oder im oxidativen Modus (OPP) Glukose abgebaut werden. Lange Zeit wurde angenommen, dass der OPP-Weg in Cyanobakterien im Licht inaktiv sei, da der CO₂-Akzeptor Ribulose-1,5-Bisphosphat (RuBP) das Schlüsselenzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Zwf) hemmt (Pelroy & Bassham 1972). Im OPP-Weg kann Glukose ebenfalls über verschiedene Zwischenprodukte zu GAP oxidiert werden, wobei NADPH gebildet wird. Die beiden ersten Reaktionsschritte werden von der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Zwf) und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (Gnd) katalysiert. Der Weg ist in Abbildung 5 dargestellt.

Der OPP-Weg dient den Zellen vor allem als Lieferant für NADPH und um Moleküle für biochemische Prozesse zu generieren (Fuhrer *et al.* 2005). Daher ist dieser Weg besonders wichtig für heterotrophe Organismen, die keinen Calvin-Benson-Zyklus besitzen, da er Vorstufen für Aminosäuren und Pentosen für die Biosynthese von Nukleinsäuren generiert.

1.5.3 Entner-Doudoroff-Weg

Der Entner-Doudoroff-Weg wurde 1952 zuerst in *Pseudomonas saccharophila* beschrieben (Entner & Doudoroff 1952) und 1967 auch in *E. coli* nachgewiesen (Eisenberg & Dobrogosz 1967). Mittlerweile ist bekannt, dass der ED-Weg weiter verbreitet ist (Conway 1992). Die beiden relevanten Enzyme für diesen Weg sind die Phosphoglukonat-Dehydratase (EDD) und die 2-Keto-3-desoxy-6-Phosphogluconat (KDPG-Aldolase/ Eda) (Flamholz *et al.* 2013). In Archaeen konnten zwei verschiedene Varianten des ED-Weg nachgewiesen werden (Verhees *et al.* 2004). Sie bilden modifizierte Formen des klassischen ED-Wegs: den semiphosphorylierenden Weg (Bilanz: 1ATP/Glukosemolekül) und den nichtphosphorylierenden (ohne Netto-ATP-Synthese) (Siebers & Schönheit 2005; Reher *et al.* 2010).

Der ED-Weg gilt vor allem als unerlässlich beim Abbau von Zuckersäuren wie Glukonat, die über den EMP-Weg nicht abgebaut werden können (Peekhaus & Conway 1998). Der Entner-Doudoroff-Weg ist in aeroben und fakultativ aeroben Organismen weit verbreitet, vermutlich aufgrund ihrer Fähigkeit ATP über andere Synthesewege zu generieren, wie beispielsweise über die oxidative Phosphorylierung (Flamholz *et al.* 2013).

Im gramnegativen Bakterium *Pseudomonas putida* wurde gezeigt, dass der EMP-Weg nicht in der Lage ist, den ED-Weg zu ersetzen. Es wurde vermutet, dass dies auf dem im ED-Weg gebildeten NADPH beruht, das wichtig zum Schutz vor oxidativem Stress ist (Chavarría *et al.* 2013).

1.5.4 Glukoseabbau in Cyanobakterien, Grünalgen und Pflanzen

Die glykolytischen Wege in Cyanobakterien wurden bisher vor allem unter heterotrophen Bedingungen untersucht (Plaxton & Podestá 2006; Jansèn *et al.* 2010), es gibt jedoch Hinweise, dass Mixotrophie (die Aufnahme von organischen Kohlenstoffen im Licht) unter phototrophen Cyanobakterien und Algen eine wichtige Rolle spielt (Zubkov *et al.* 2003; Moore 2013).

Einige Cyanobakterien sind in der Lage, Glukose aus ihrer Umwelt aufzunehmen und zu metabolisieren. Die Bedeutung des mixotrophen Wachstums unter phototrophen Cyanobakterien und Algen wurde bisher unterschätzt (Moore 2013). Es wurde gezeigt, dass die Kulturen unter Laborbedingungen ihr Wachstum verbessern können (Rippka *et al.* 1979). Die ökologische Bedeutung dieser Messungen wurde durch die Untersuchungen am marinen Cyanobakterium *Prochlorococcus spec.* aufgedeckt. *Prochlorococcus* ist in der Lage, Glukose und organischen Stickstoff aus seiner Umgebung aufzunehmen und so seine Wachstumsrate zu verbessern (Gómez-Baena *et al.* 2008; Moore 2013; Muñoz-Marín *et al.* 2013). Die Oxidation von Glukose ist jedoch unter allen Wachstumsbedingungen wichtig, da sie Moleküle für biosynthetische Prozesse sowie ATP bereitstellt. Bisher wurde davon ausgegangen, dass Cyanobakterien, Algen und Pflanzen Glukose ausschließlich über den EMP- oder den OPP-Weg abbauen (Knowles & Plaxton 2003; Plaxton & Podestá 2006; Jansèn *et al.* 2010; Johnson & Alric 2013). Aus diesem Grund sind diese beiden Wege in Cyanobakterien besonders gut untersucht. 2012 wurde jedoch entdeckt, dass die Kieselalge (*Phaeodactylum tricornutum*) die Gene für beide Schlüsselenzyme des ED-Wegs (Eda und Edd) im Genom trägt (Fabris *et al.* 2012). Die Fähigkeit, Glukose aus der Umgebung aufzunehmen und zu metabolisieren, ist für viele Organismen von Vorteil. So beträgt beispielsweise die natürliche Glukosekonzentration im offenen Meer zwischen 0,7 und 2,76 nM. Der Glukosetransporter von *Prochlorococcus* ist an diese Bedingungen angepasst (Muñoz-Marín *et al.* 2013). Diese gelösten Kohlenstoffe stammen von Ausscheidungen verschiedener mariner Organismen sowie von lysierten Zellen. 2012 wurde in einer Kieselalgenblüte die Hochregulierung glykolytischer Exoenzyme gemessen (Teeling *et al.* 2012). Diese Exoenzyme dienen der Aufspaltung von Polysacchariden in kleinere Zuckermoleküle, die die Organismen aufnehmen und für ihren eigenen Stoffwechsel nutzen können.

Neben dem Abbau von Zuckern, die aus der Umgebung aufgenommen werden, bauen Cyanobakterien, Algen und Pflanzen aber hauptsächlich die von ihnen tagsüber während der Photosynthese aufgebauten und gespeicherten, Kohlenhydrate ab (Stal & Moezelaar 1997).

Aus diesem Grund ist die Untersuchung der Abbauewege wichtig, unabhängig davon, ob die Organismen den Zucker aus der Umgebung aufnehmen können.

Es ist bekannt, dass Algen und Pflanzen ihre Glukose wie auch Cyanobakterien über den EMP- und den OPP-Weg abbauen. In Pflanzen sind beide Wege sowohl im Cytosol als auch in den Plastiden lokalisiert (Miernyk & Dennis 1982; Andriotis *et al.* 2010; Moriyama *et al.* 2014). Das Zusammenwirken beider Wege über die Kompartimente wird über Transporter in der Plastidenmembran kontrolliert (Emes & Tobin 1993). 2014 konnte in Rotalgen gezeigt werden, dass alle am EMP-Weg beteiligten Enzyme im Cytosol lokalisiert sind, ebenso wie einige dem OPP-Weg zugehörigen Enzyme (Moriyama *et al.* 2014). In Grünalgen hingegen wurden Beispiele gefunden, bei denen sämtliche Enzyme des oberen Glukoseabbaus in den Chloroplasten nachgewiesen wurden (Huppe & Turpin 1994).

In Cyanobakterien wurde gezeigt, dass die Enzymaktivitäten der Schlüsselenzyme des EMP- und des OPP-Wegs sowohl unter phototrophen als auch unter mixotrophen Wachstumsbedingungen ähnlich aktiv sind (Knowles & Plaxton 2003). Es wurde bisher angenommen, dass der OPP-Weg im Licht inaktiv sei (Pelroy & Bassham 1972), was dafür spricht, dass die Enzyme konstitutiv und unabhängig von den Wachstumsbedingungen exprimiert werden. Die Regulation erfolgt dementsprechend vermutlich auf Proteinebene (Knowles & Plaxton 2003). Der OPP-Weg gilt in Cyanobakterien als der wichtigste Weg des Glukoseabbaus während der Fermentation (Stal & Moezelaar 1997). Das wurde auch über Versuche bestätigt, in denen das Gen für das Schlüsselenzym *zwf* deletiert wurde. Die Mutanten waren nicht mehr in der Lage im Dunkeln unter heterotrophen Bedingungen zu wachsen (Jansèn *et al.* 2010). Dieses Ergebnis zeigt auch, dass der EMP-Weg nicht in der Lage ist, die Funktion des OPP-Weg zu kompensieren und der OPP-Weg im Dunkeln obligatorisch für das Wachstum von *Synechocystis* ist. Dennoch wurde auch gezeigt, dass der EMP-Weg unter heterotrophen Wachstumsbedingungen aktiv ist (Yang *et al.* 2002). Unter mixotrophen und phototrophen Bedingungen ist das Wachstum der Mutanten unverändert (Jansèn *et al.* 2010). Es wird jedoch vermutet, dass im Licht der OPP-Weg neben dem EMP-Weg ebenfalls aktiv ist. Diese Vermutung stützt sich auf die Beobachtung, dass bei *Synechocystis* unter mixotrophen Bedingungen die Metaboliten des EMP und des OPP-Weges erhöht und die des Calvin-Benson-Zyklus erniedrigt waren (Narainsamy *et al.* 2013). Der Calvin-Benson-Zyklus wird nach Zugabe von Glukose herunterreguliert (Narainsamy *et al.* 2013). In unserer Arbeitsgruppe wurden *Synechocystis* Mutanten erstellt, in denen das Schlüsselenzym des EMP-Weges (Pfk) und das Schlüsselenzym des OPP-Wegs (Zwf) ausgeschaltet wurden (Chen 2014). Diese Mutante zeigte trotz vollständiger Segregation ein erhöhtes Wachstum unter mixotrophen Bedingungen. Das ließ darauf schließen, dass *Synechocystis* einen zusätzlichen glykolytischen Weg besitzt (Chen & Schreiber *et al.* 2016).

Es wurde vermutet, dass die Glukose über einen zusätzlichen Umweg, über die Glucose-Dehydrogenase (Gdh) und eine Gluconatkinase (Gk), abgebaut werden kann. Tatsächlich war die Mutante, in der dieser Weg zusätzlich zu den beiden anderen ausgeschaltet wurde, nicht mehr in der Lage, ihr Wachstum unter mixotrophen Bedingungen zu verbessern. Es wurden jedoch Hinweise darauf gefunden, dass *Synechocystis* nicht nur diese zusätzliche Umleitung besitzt, sondern eventuell zusätzlich den kompletten ED-Weg nutzen kann (Chen 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Kohlenstoffwechsel des Cyanobakteriums *Synechocystis sp* PCC 6803 im Detail aufgeklärt werden. Insbesondere soll untersucht werden, ob dieser Organismus über einen ED-Weg verfügt. Abschließend soll die Rolle der verschiedenen glykolytischen Wege auf die Wasserstoffproduktion untersucht werden.

2 Fragestellung

Um die Wasserstoffproduktion in Cyanobakterien genauer verstehen zu können, sollen in dieser Arbeit Prozesse, die Elektronen für Photowasserstoff oder fermentativen Wasserstoff liefern bzw. den Elektronentransfer zur Hydrogenase beeinflussen, im Modellorganismus *Synechocystis spec.* PCC 6803 genauer untersucht werden.

Zur Aufklärung des Elektronentransports zur Hydrogenase, dem Wasserstoff produzierenden Enzym, sollen verschiedene *knock-out* Mutanten charakterisiert werden. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Ferredoxin der direkte Elektronenüberträger der Hydrogenase ist. In der vorangegangenen Arbeit wurden bisher nur die pflanzlichen Ferredoxine mit einem [2Fe-2S]-Cluster und Flavodoxin mit einem [4Fe-4S]-Cluster untersucht. Daher liegt der Fokus in dieser Arbeit auf dem Einfluss der bakteriellen Ferredoxine mit einem [4Fe-4S]-Cluster auf die Wasserstoffproduktion.

Es ist bekannt, dass Flavoproteine im photosynthetischen Elektronentransport eine Rolle als Elektronenventile spielen. In dieser Arbeit soll geprüft werden, ob die Hydrogenase eventuell in Konkurrenz zu den Flavoproteinen als Elektronenventil steht. Zu diesem Zweck sollen Flavoprotein-Mutanten erstellt und genauer charakterisiert werden.

Unter fermentativen Bedingungen ist die Wasserstoffproduktion auf Kosten des Abbaus von Glukose möglich. Die Glukose stammt aus Glykogen, das am Tag als Kohlenstoffspeicher angelegt wurde. Alternativ kann die Glukose direkt aus dem Medium aufgenommen werden. In einer Vorarbeit wurde entdeckt, dass der bisherige Glukoseabbau in *Synechocystis* nicht vollständig aufgeklärt ist (Chen 2014). Aus diesem Grund sollen in dieser Arbeit die Glukoseabbauwege in *Synechocystis* detailliert aufgeklärt werden. Insbesondere soll geprüft werden, ob *Synechocystis* eventuell über einen bisher übersehenen Glukoseabbauweg, den Entner-Doudoroff-Weg, verfügt.

Abschließend soll untersucht werden, welcher der Glukoseabbauwege von Bedeutung für die fermentative Wasserstoffproduktion in *Synechocystis* ist.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Sämtliche für diese Arbeit verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim, DE), Thermo Fisher SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA), Carl Roth (Karlsruhe, DE), Biomol (Hamburg, DE), Bio-Rad (München, DE), Merck (Darmstadt, DE), Roche (Mannheim, DE) und Serva (Heidelberg, DE).

Das Wasser wurde mit einer Seadest Anlage RD 2000 (USF Elga Seral, Ransbach-Baumbach) deionisiert und bei Bedarf anschließend für 25 min autoklaviert. Es wird in der weiteren Arbeit als MilliQ bezeichnet.

3.2 Organismen und Kulturbedingungen

3.2.1 *Synechocystis spec. PCC 6803*

Die molekularbiologischen und physiologischen Experimente wurden mit dem einzelligen Cyanobakterium *Synechocystis* PCC 6803 durchgeführt. Es gehört der Ordnung der Chroococcales und der Gattung *Synechocystis* an. Bei dem im Labor verwendeten Stamm handelt es sich um ein aus Süßwasser isolierten Stamm, der in der Lage ist, unter LAHG-Bedingungen (light activated heterotrophic growth) zu wachsen und Glukose aufzunehmen (Anderson & McIntosh 1991). Der Stamm ist durch seine natürliche Kompetenz leicht zu transformieren, was ihn für molekularbiologische Untersuchungen sehr wertvoll macht. Das Genom von *Synechocystis* PCC 6803 wurde 1996 vollständig sequenziert und veröffentlicht (Kaneko *et al.* 1996).

Einige der Mutanten wurden bereits vor Beginn dieser Arbeit im Zuge der Doktorarbeiten von Herrn Dr. Xi Chen und Herrn Dr. Björn Forberich erstellt (Forberich 2011; Chen 2014). Eine Auflistung aller verwendeten *Synechocystis* Mutanten ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Verwendete *Synechocystis* Mutanten. (S.B: Southern Blot)

Name	Ausgeschaltetes Gen/ID	Protein	Resistenz	Referenz	Status
$\Delta hoxH$	<i>hoxH/ sll1226</i>	große Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase	Km	(Appel <i>et al.</i> 2000)	
$\Delta hoxE-H$	<i>hoxE-H/ sll1220-sll1226</i>	[NiFe]- Hydrogenase	Km	(Forberich 2011)	
$\Delta flv24$	<i>flv2-4/ sll0219-sll0217</i>	Flavoprotein	Gm	(Forberich 2011)	
$\Delta hoxH flv24$	<i>hoxH/ sll1226 flv2-4/</i>	große Untereinheit der [NiFe]-	Km Gm	(Forberich 2011)	

	<i>sll0219- sll0217</i>	Hydrogenase Flavoprotein			
Δ <i>hoxE-H flv24</i>	<i>hoxE-H/ sll1220- sll1226 flv2-4/ sll0219- sll0217</i>	[NiFe]-Hydrogenase Flavoprotein	Km Gm	(Forberich 2011)	
Δ <i>flv3</i>	<i>flv3/ sll0550</i>	Flavoprotein	Cm	Diese Arbeit	S.B Seite: 68
Δ <i>flv24 flv3</i>	<i>flv2-4/ sll0219- sll0217 flv3/ sll0550</i>	Flavoproteine	Gm Cm	Diese Arbeit	S.B Seite: 68 Seite: 69
Δ <i>hoxH flv3</i>	<i>hoxH/ sll1226 flv3/ sll0550</i>	große Untereinheit der [NiFe]- Hydrogenase Flavoprotein	Km Cm	Diese Arbeit	S.B Seite: 68 Seite: 69
Δ <i>hoxE-H flv3</i>	<i>hoxE-H/ sll1220- sll1226 flv3/ sll0550</i>	[NiFe]-Hydrogenase Flavoprotein	m Cm	Diese Arbeit	S.B Seite: 68
Δ <i>hoxH flv24 flv3</i>	<i>hoxH/ sll1226 flv2-4/ sll0219- sll0217 flv3/ sll0550</i>	große Untereinheit der [NiFe]- Hydrogenase Flavoproteine	Km Gm Cm	Diese Arbeit	S.B Seite: 68 Seite: 69
Δ <i>hoxE-H flv24 flv3</i>	<i>hoxE-H/ sll1220- sll1226 flv2-4/ sll0219- sll0217 flv3/ sll0550</i>	[NiFe]-Hydrogenase Flavoproteine	Km Gm Cm	Diese Arbeit	S.B Seite: 68 Seite: 69
Δ <i>fed1</i>	<i>fed9/ slr2059</i>	[4Fe-4S] Ferredoxin	Km	Diese Arbeit	PCR Seite: 62
Δ <i>fed2</i>	<i>fed7/ sll0662</i>	[4Fe-4S] Ferredoxin	Spec	Diese Arbeit	PCR Seite: 62
Δ <i>fed1 isiB</i>	<i>fed9/ slr2059 isiB/ sll0248</i>	[4Fe-4S] Ferredoxin Flavodoxin	Km Gm	Diese Arbeit	PCR Seite: 62
Δ <i>fed2 isiB</i>	<i>fed7/ sll0662 isiB/ sll0248</i>	[4Fe-4S] Ferredoxin Flavodoxin	Spec Gm	Diese Arbeit	PCR Seite: 62
Δ <i>pfkB1B2</i>	<i>pfkB1/ sll1196 pfkB2/ sll0745</i>	Phosphofruktokinase	Km Spec	(Chen 2014)	
Δ <i>zwf</i>	<i>zwf/ slr1843</i>	Glukose-6-Phosphat dehydrogenase	Cm	(Chen 2014)	
Δ <i>zwf pfkB1B2</i>	<i>zwf/ slr1843 pfkB1/ sll1196 pfkB2/ sll0745</i>	Glukose-6-Phosphat dehydrogenase phosphofruktokinase	Cm Km Spec	(Chen 2014)	
Δ <i>gdh</i>	<i>gdh/ sll1709</i>	Glukose dehydrogenase	Gm	(Chen 2014)	

<i>ΔgdhB</i>	<i>gdhB/ slr1608</i>	Glukose-dehydrogenase (periplasmatisch)	Gm	Diese Arbeit	
<i>Δgnd</i>	<i>gnd/ sll0329</i>	6-Phosphogluconat dehydrogenase	Em	Diese Arbeit	S.B Seite: 79
<i>Δgnd eda</i>	<i>gnd/ sll0329</i> <i>eda/ sll0107</i>	6-Phosphogluconat Dehydrogenase KDPG-Aldolase	Gm Em	Diese Arbeit	S.B Seite: 79 Seite: 76
<i>Δzwf pfkb1b1 gnd</i>	<i>zwf/ slr1843</i> <i>pfkB1/ sll1196</i> <i>pfkB2/ sll0745</i> <i>gnd/ sll0329</i>	Glukose-6-Phosphat dehydrogenase Phosphofruktokinase 6-Phosphogluconat dehydrogenase	Cml Km Spec Em	Diese Arbeit	S.B Seite: 79
<i>Δpfkb1b2 gnd</i>	<i>pfkB1/ sll1196</i> <i>pfkB2/ sll0745</i> <i>gnd/ sll0329</i>	Phosphofruktokinase 6-Phosphogluconat dehydrogenase	Km Spec Em	Diese Arbeit	S.B Seite: 79
<i>Δzwf pfkB1B2 gnd eda</i>	<i>zwf/ slr1843</i> <i>pfkB1/ sll1196</i> <i>pfkB2/ sll0745</i> <i>gnd/ sll0329</i> <i>eda/ sll0107</i>	Glukose-6-Phosphat dehydrogenase Phosphofruktokinase 6-Phosphogluconat dehydrogenase	Cm Km Spec Em Gm	Diese Arbeit	S.B Seite: 79
<i>Δeda</i>	<i>eda/ sll0107</i>	KDPG-Aldolase	Gm	Diese Arbeit	S.B Seite: 76
<i>Δzwf pfkB1B2 eda</i>	<i>zwf/ slr1843</i> <i>pfkB1/ sll1196</i> <i>pfkB2/ sll0745</i> <i>eda/ sll0107</i>	Glukose-6-Phosphat dehydrogenase Phosphofruktokinase KDPG-Aldolase	Cm Km Spec Gm	Diese Arbeit	S.B. Seite: 76
<i>Δedd</i>	<i>edd/ slr0452</i>	6-Phosphogluconat dehydratase	Gm	Diese Arbeit	S.B. Seite: 77
<i>Δzwf edd</i>	<i>zwf/ slr1843</i> <i>edd/ slr0452</i>	Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase 6-Phosphogluconat dehydratase	Cm Gm	Diese Arbeit	S.B. Seite: 77
<i>Δzwf pfkB1B2 edd</i>	<i>zwf/ slr1843</i> <i>pfkB1/ sll1196</i> <i>pfkB2/ sll0745</i> <i>edd/ slr0452</i>	Glukose-6-Phosphat dehydrogenase Phosphofruktokinase 6-Phosphogluconat dehydratase	Cm Km Spec Gm	Diese Arbeit	S.B. Seite: 77
<i>Δzwf pfkB1B2 gnd edd</i>	<i>zwf/ slr1843</i> <i>pfkB1/ sll1196</i> <i>pfkB2/ sll0745</i> <i>gnd/ sll0329</i> <i>edd/ slr0452</i>	Glukose-6-Phosphat dehydrogenase Phosphofruktokinase 6-Phosphogluconat Dehydrogenase 6-Phosphogluconat dehydratase	Cm Km Spec Em Gm	Diese Arbeit	S.B. Seite: 77
<i>ΔpfkB1B2 eda</i>	<i>pfkB1/ sll1196</i> <i>pfkB2/ sll0745</i> <i>eda/ sll0107</i>	Phosphofruktokinase KDPG-Aldolase	Km Spec Gm	Diese Arbeit	

3.2.2 Kultivierung von *Synechocystis*

Die Anzucht der *Synechocystis*-Kulturen erfolgte unter photoautotrophen Bedingungen in BG11-Medium (Tabelle 3). Für eine ständige Verfügbarkeit wurden die Kulturen auf BG11-Agarplatten ausplattiert (BG11 + 15 g/l Bacto-Agar + 1 ml einer 1 M Natriumthiosulfat-Lösung). Die Lagerung der Platten erfolgte in einer Klimakammer bei einer Temperatur von 28 °C und einer Lichtintensität von $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Als sogenannte Vorkulturen wurden Schüttelkulturen von 50 ml BG11-Medium (Tabelle 3) in 100 ml Erlenmeyerkolben verwendet, die unter sterilen Bedingungen inokuliert wurden. Die Vorkulturen 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 späteren Messungen wurden in Knieseröhren mit 250 ml BG11-Medium angezogen.

Diese Röhren wurden in einer Kniese-Anlage (Kniese, Marburg) kontinuierlich mit steriler Druckluft durchmischt und mit einer Lichtintensität von ca $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ beleuchtet.

Für eine dauerhafte Lagerung der Organismen wurden Gefrierkulturen hergestellt. Dazu wurde in sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen 500 μl konzentrierte Cyanobakteriensuspension aus einer Schüttelkultur mit 250 μl 80% Glycerin (v/v) versetzt und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 3: Kulturmedien für *Synechocystis*.

Name	Rezept
BG11 Medium	17.6 mM NaNO ₃ , 0.304 mM MgSO ₄ x 6 H ₂ O, 31.2 μM citric acid, 2.79 μM Na ₂ EDTA, 46.3 μM H ₃ BO ₃ , 4.15 μM MnCl ₂ x 4 H ₂ O, 1.61 μM NaMoO ₄ x 2 H ₂ O, 188.7 μM NaCO ₃ , 175.1 μM K ₂ HPO ₄ , 0.77 μM ZnSO ₄ x 7 H ₂ O, 10 mM TES (pH 8.0), 22.8 μM FeNH ₄ -citrate, 0.32 μM CuSO ₄ x 5 H ₂ O, 5 μM NiCl ₂ (verändert nach Rippka <i>et al.</i> 1979)
BG11 ₀ Medium	BG11 Medium ohne NaNO ₃

Das BG11 Medium wurde wie in Tabelle 3 angegeben angesetzt, wobei das Eisencitrat für das Flüssigmedium erst nach dem Autoklavieren, nach Abkühlen des Mediums auf 50 °C, hinzugegeben wurde. Zur Segregation der Mutanten wurden den Medien der Flüssigkulturen sowie der Agarplatten zusätzlich das notwendige Antibiotikum zugegeben. Die Konzentrationen sind in Tabelle 4 dargestellt. Den Agarplatten wurde das Antibiotikum nach dem Autoklavieren nach Abkühlung auf ca. 60°C hinzugefügt.

Tabelle 4: Antibiotika Konzentration.

Name	Konzentration	Stammlösung
Chloramphenicol	20 $\mu\text{g/ml}$	20 mg/ml
Erythromycin	25 $\mu\text{g/ml}$	25 mg/ml
Gentamycin	5 $\mu\text{g/ml}$	10 mg/ml
Kanamycin	50 $\mu\text{g/ml}$	50 mg/ml
Spectinomycin	20 $\mu\text{g/ml}$	20 mg/ml
Apramycin	25 $\mu\text{g/ml}$	50 mg/ml

3.2.3 *Escherichia coli*

Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene Stämme von *E. coli* benutzt (Tabelle 5). Zum Klonieren sowie zum Transformieren von *Synechocystis* wurden die Top 10 Zellen aus dem TOPO® TA Cloning-Kit (Thermo Fisher SCIENTIFIC; Waltham, MA, USA) genutzt. Zur Erstellung von *E. coli knock-out* Mutanten wurde der Stamm MG1655 benutzt.

Tabelle 5: Verwendete *E. coli* Stämme.

Name	Beschreibung
Top10 (<i>E. coli</i>)	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>
K-12 MG1655 (<i>E. coli</i>)	F- <i>lambda- ilvG- rfb-50</i> <i>rph-1</i> OR:H48:K-

3.2.4 Kultivierung von *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E.coli*) wurde über Nacht in 3 ml LB-Medium (Tabelle 6) bei 37°C auf einem Schüttelinkubator (4400 Innova Incubator Shaker/ New Brunswick Scientific, Nürtingen) bei 180 rpm angezogen. Die entsprechenden Antibiotika (Tabelle 4) wurden dem Medium nach Autoklavieren und Abkühlung auf ca. 60°C zugesetzt. Transformanten wurden zunächst auf LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank (Heraeus, Hanau) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht) mit Parafilm geschlossen und im Kühlschrank bei 4°C verwahrt. Für Gefrierkulturen wurden 500 µl Kultur mit 250 µl 80% Glycerin (v/v) versetzt und bei -80°C gelagert. Alle in Tabelle 6 dargestellten Standardmedien wurden vor Verwendung frisch angesetzt, nur für das Minimal Medium wurden Stammlösungen der Vitaminlösung und der Molybdänsäurelösung wie in Tabelle 6 beschrieben vorbereitet und sterilfiltriert. Die beiden Lösungen wurden erst nach dem Autoklavieren des restlichen Mediums hinzugegeben.

Tabelle 6: Kulturmedien für *E. coli*.

Name	Rezept
LB Medium	1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt
SOB Medium	0,5% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄
SOC Medium	SOB Medium mit 20 mM Glukose
Minimal Medium	6.75 g/l NH ₄ Cl, 1.25 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1.15 g/l 1KH ₂ PO ₄ , 0.5 g/l NaCl, 0.5 g/l MgSO ₄ ·7H ₂ O, 1 ml/l Vitaminlösung und 100µl/l Molybdänsäurelösung. Die Vitaminlösung besteht aus 4.89 g/l FeCl ₃ ·6H ₂ O, 5 g/l CaCl ₂ ·2H ₂ O, 1.3 g/l MnCl ₂ ·2H ₂ O, 0.5 g/l CoCl ₂ ·6H ₂ O, 0.94 g/l ZnCl ₂ , 0.0311 g/l H ₃ BO ₄ , 0.4g/l Na-EDTA·2H ₂ O und 1.01 g/l Thiamine-HCl. Die Molybdänsäurelösung besteht aus 0.76 g/l Molybdänsäure. D-Gluconat Natriumsalz (16 .5 g/l) wurde als Kohlenstoffquelle verwendet. (Fabris <i>et al.</i> 2012)

Zur Herstellung der LB-Agar-Platten wurden pro Liter LB-Medium 15 g Bacto-Agar hinzugefügt und mitautoklaviert. Für LB-Agarplatten mit Antibiotikum wurde nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60°C das benötigte Antibiotikum (Tabelle 4) zu der gewünschten Endkonzentration hinzugefügt.

3.3 Physiologische Parameter

3.3.1 Bestimmung des DNA/RNA-Molekulargewichtes

Zur Bestimmung des DNA-Molekulargewichts genomischer DNA in der nativen Gelelektrophorese (3.4.3) wurde ein λ -DNA/HindIII-Marker (Thermo Fisher SCIENTIFIC; Waltham, MA, USA) 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.

Zur Bestimmung der Konzentration von Plasmid DNA sowie RNA wurde der NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher SCIENTIFIC; Waltham, MA, USA) verwendet. Hierzu wurden je 2,5 μ l der zu messenden Lösung aufgetragen.

3.3.2 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Flüssigkulturen erfolgte mithilfe eines Spektralphotometers (UV-2501PC; Shimadzu, Kyoto, Japan) bei einer Wellenlänge von 600 nm (*E. coli*) bzw. 750 nm (*Synechocystis*) in Plastikküvetten (Polysterol 10x4x45 mm; Sarstedt, Nümbrecht). Bei einer OD > 0,5 wurden die Zellen verdünnt. Als Referenz diente das jeweilige Anzuchtmedium.

3.3.3 Absorptionsspektren ganzer Zellen von *Synechocystis*

Absorptionsspektren von *Synechocystis*-Kulturen wurden an ganzen Zellen in BG11- Flüssigkulturen und bei RT im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 800 nm mit einem Spektralphotometer (UV-2501PC; Shimadzu, Kyoto, Japan) in Plastikküvetten (Polysterol 10x4x45 mm; Sarstedt, Nümbrecht) gemessen. BG- 11 Medium diente als Referenz. Um sicherzugehen, dass in den Proben jeweils gleich viele Zellen vorhanden waren, wurden alle Kulturen auf die gleiche Zelldichte mit einer OD₇₅₀ von 0,5 verdünnt.

3.3.4 Bestimmung der Chlorophyllkonzentration

Eine weitere Bezugsgröße der Ergebnisse neben der optischen Dichte, ist der Chlorophyllgehalt der Cyanobakterien Kulturen. Um diesen zu bestimmen, wurden drei Mal je 100 μ l abgenommen und bei Raumtemperatur (RT) mit 11363 g für 20 min zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5424 Rotor: FA-45-24-11, Eppendorf, Hamburg).

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1ml Methanol resuspendiert. Die Proben wurden für 3 min bei maximaler Geschwindigkeit auf den Labshaker gestellt, und anschließend bei RT für 3 min bei 11363 g (Eppendorf Zentrifuge 5424) pelletiert. Vom Überstand, der das gelöste Chlorophyll enthielt, wurden im Photometer bei den Wellenlängen 665,0 nm, 665,5 nm, 666,0 nm und 666,5 nm die Extinktionen 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:

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

3.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Protein-Konzentration erfolgte nach Bradford (Bradford 1976). Diese Methode beruht auf der Bindung des Trimethylmethan-Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau an Proteine im sauren Milieu. Durch den Farbstoff-Proteinkomplex verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Um diese zu berechnen, wurde zunächst eine BSA-Eichgerade erstellt. Hierzu wurden 2, 4, 6 und 8 μl der BSA-Proteinlösung (Bovine serum albumin, 200 mg/ml; Sarstedt, Nümbrecht) mit ddH₂O auf 800 μl aufgefüllt und 200 μl der Bradford-Lösung (BioRad, München) zugegeben. Als Referenz wurden 800 μl des ddH₂O und 200 μl der Bradford-Lösung gemischt. Nach 10 min konnte die Extinktion bei 595 nm gemessen werden und anhand der Eichgeraden die Proteinkonzentration berechnet werden. Es wurden immer drei Parallelbestimmungen durchgeführt. Die Bestimmung des Proteins erfolgte in der Regel dreimal mit je 1, 5 und 10 μl des Proteinextraktes.

3.3.6 Puls-amplituden-modulierte (PAM) Chlorophyll-Fluoreszenz

Zur Bestimmung der Oxidationsrate des Photosystem I in *Synechocystis* wurde ein DUAL-PAM-100 (Walz, Effeltrich) eingesetzt. 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 Form von photochemischer Arbeit, Wärme und 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 PAMs die Effizienz bestimmt werden, mit der das eingestrahlte Licht am PSII in den Elektronentransport von photoautotrophen Organismen fließt.

Fluoreszenz entsteht hauptsächlich am Chlorophyll a im PSII (Krause & Weis 1991), die Chlorophyllfluoreszenz vom PSI ist unter physiologischen Zuständen konstant und wird deshalb bei den Messungen nicht weiter beachtet.

Mit dem Dual-PAM wird der Zustand des PS I untersucht, indem man die Absorptionsänderung des PSI (P700), nach Anregung durch unterschiedliche Lichtintensitäten bei den Wellenlängen von 820 nm und 870 nm bestimmt (Schreiber *et al.* 1988).

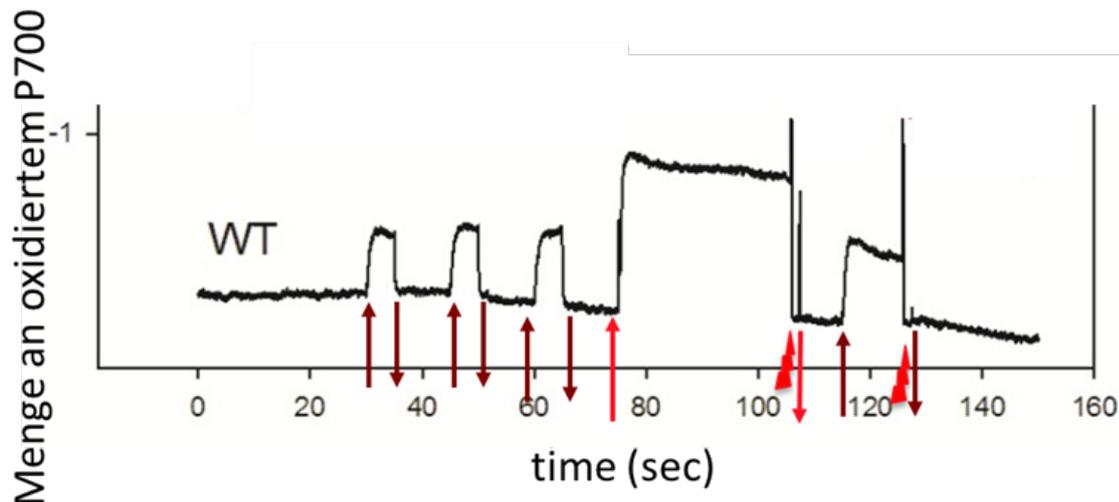


Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung einer PAM-Messung. Die dunkel roten Pfeile zeigen die Anregung des PSI bei $24,55 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und die hellroten die des PSI und des PSII bei $339 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Blitze symbolisieren einen Sättigungspuls bei $10000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Auf der y-Achse ist die Menge an oxidiertem PSI aufgetragen.

Für die Untersuchungen des PSI mittels Dual-Pam wurde 1 ml einer Kultur mit einem Chlorophyllgehalt von $10 \mu\text{g}$ in einer 2 ml Küvette eingesetzt. In Abbildung 6 ist eine Skizze des photosynthetischen Elektronentransports in Cyanobakterien dargestellt. Die roten Pfeile stellen die Anregung der einzelnen Komplexe durch das Dual-PAM dar, die Lichtintensitäten betragen für das dunkelrote Licht (FR 20) $24,55 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, das Aktinische Licht (AL 12) $339 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und für den Sättigungspuls (Puls) $10000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Durch das dunkelrote Licht wird nur das PSI angeregt, wohingegen bei dem hellroten Licht und bei dem Sättigungspuls beide Photosysteme angeregt werden. Die Einstellungen des PAM sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Messprotokoll für die Messung im Dual-PAM.

Dauer	Einstellung	Lichtintensität
30 s	dunkel	-
5 s	FR 20	$24,55 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
10 s	dunkel	-
5 s	FR 20	$24,55 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
10 s	dunkel	-
5 s	FR 20	$24,55 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

10 s	dunkel	-
30 s	AL 12	339 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
400 ms	Puls	10.000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
10 s	dunkel	-
10 s	FR 20	24,55 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
400 ms	Puls	10.000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
25 s	dunkel	-

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Isolierung genomischer DNA aus *Synechocystis*

Zur Isolierung von genomischer DNA wurden Zellen mit einer sterilen Impföse von einer Agarplatte in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zum Aufbruch der Zellen wurden diese in 100 μl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM N_2 -EDTA x H_2O , pH 8,0) suspendiert und mit 10% (w/v) SDS, 100 μl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) (v/v/v) und Glasperlen ($\varnothing=0,5$ mm) versetzt. Die Mischung wurde 3 x 10 sec gevortext und anschließend 10 min bei Raumtemperatur und 10621 g zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5424 Rotor: FA-45-24-11, Eppendorf, Hamburg). Der wässrige nukleinsäurehaltige Überstand wurde abgenommen. Es folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion; hierfür wurden die nukleinsäurehaltigen Ansätze mit dem vierfachen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, geschüttelt und 5 min bei 4°C und 20817 g zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5804R, Rotor: F45-30-11, Eppendorf, Hamburg). Es bildeten sich drei Phasen, wobei die oberste wässrige Phase die Nukleinsäuren enthielt. Die oberste Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis nahezu keine Interphase aus v.a. gefällten Proteinen mehr erkennbar war. Es schlossen sich zwei Extraktionsschritte mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) an. Die DNA wurde mit Ethanol aus der wässrigen Phase gefällt. Zur Fällung von DNA wurde den entsprechenden Ansätzen 1/10 ihres Volumens an 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) zugegeben. Die Proben wurden mit 2,5 Volumen 98% Ethanol (-20°C) versetzt und für 15 min bei -80°C gekühlt. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei -9°C und 20817 g (Eppendorf Zentrifuge 5804R, Rotor: F45-30-11, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Nukleinsäuren mit 70 prozentigem (v/v) Ethanol gewaschen. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 5 min bei 20817 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet für mindestens 10 min in der SpeedVac (Keutz, Reiskirchen) getrocknet. Die DNA wurde in TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM N_2 -EDTA x H_2O , pH 8,0) aufgenommen.

3.4.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (Saiki *et al.* 1988) kann ein gewünschtes DNA-Fragment gezielt vervielfältigt werden. Nach Denaturierung der zu amplifizierenden doppelsträngigen DNA bei 95°C, hybridisiert je ein Oligonukleotid an jeden Strang der denaturierten DNA. Die Annealingtemperatur ist dabei abhängig von der Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide. Sie begrenzen den zu amplifizierenden Abschnitt und dienen als Oligonukleotide für die DNA-Synthese, die bei 72°C mit der hitzestabilen Taq-Polymerase erfolgt (Thermo Fisher SCIENTIFIC; Waltham, MA, USA). In dieser Arbeit wurde das in Tabelle 8 dargestellte Protokoll in einem PTC-200 Gradienten Cycler (MJ Research, Watertown, USA) verwendet. Die Dauer der Elongation richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden Produktes. In der Regel gilt für die Taq-Polymerase 1 min für 1 kb.

Tabelle 8: PCR Protokoll.

Schritte	Temperatur	Zeit	Zyklen/Wiederholungen
Initiierung:	95°C	5 min	
Denaturierung:	95°C	30 sec	
Annealing:	X	1 min	30-40
Elongation:	72°C	X	
	72°C	10 min	
Inkubation	20°C	∞	

Die PCR-Reaktionen wurden nach den Herstellerangaben (Tabelle 9) und mit H₂O in einem Volumen von 50 µl angesetzt.

Tabelle 9: PCR Zusammensetzung.

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

Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide (*Primer*) wurden sämtlich von Sigma-Aldrich (Steinheim) hergestellt. Zur Generierung der passenden Sequenzen wurde SnapGene® Software (GSL Biotech; Chicago, USA; snapgene.com) verwendet. Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide (Primer).

Name	Sequenz 5'-3'
<i>Fed1.1</i>	CGGAGGGGGAAACGGAAGAA
<i>Fed1.in1</i>	ATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGG GGCATTTGCACCGCACTACG
<i>Fed1.in2</i>	CTTTCTGGCTGGATGATGGGGCGAT CATCTTTGCCGACTCCGCCA
<i>Fed1.2</i>	AATCCAAAATAAATACCCC
<i>Fed2.1</i>	CCGTACTTAATGAATCGGCC
<i>Fed2.in1</i>	TTGGCACCCAGCCTGCGCGA CAGGCACTCCAGCGTTGCAC
<i>Fed2.in2</i>	ATCCGCATTAATAATCTAGCGAGGGC TTAATTGGGTGATGGAATCT
<i>Fed2.2</i>	CTGAGTAGATTAATGTGGAC
<i>Flv3out1</i>	TGGTGTGGCCCATCCAGCCCGGTA
<i>Flv3in1</i>	AAATGCTTCAATAATATCGAATTCCTGCAGAGGGGGTAGTGAACATGCCGTACT
<i>Flv3in2</i>	ATCCGTTAGCGAGGTGCCGCCATCAAGCTTCATCGCAAAGTCGGCAATTACT
<i>Flv3out2</i>	AACCCTGGGGTCAAACTCTCCGGG
<i>GdhB-1</i>	TGAGGCGGAAAATGCTCGCTTG
<i>GdhB-In1</i>	GGTTCGTGCCTTCATCCGTGCGAC AGCGCCAATTGATTGCGTTC
<i>GdhB-In2</i>	CGCCACCTAACAATTCGGTTCGAC ATCCACTGACTAAAGCTCCA
<i>GdhB-2</i>	GTTCTTTAGAGTAACTATTCC
<i>KA1</i>	GGTGGAGCGGTAATCTGGAA
<i>KAln1</i>	AGGTCGATGGAATCAGTGCGCCCGCCAAAAAGCGATGTAG
<i>KA2</i>	TGCCCTGCCATAGATTTGGT
<i>KAln2</i>	CGCCACCTAACAATTCGGTTCGACATGGGTAAAAGCAGGGGAGC
<i>Eda1</i>	CCAGGGTTGGCCCCATCGGAG
<i>Eda2</i>	TCCTCTACCCACATTTAGT
<i>PgdIn1:</i>	AGAGATTTATCTAATTTCTTTTTTCGTGCGACTCGCTTAGTCATAATAGCTA
<i>PgdIn2:</i>	GCTATAAATTATTTAATAAGTAAGTCGACCACGGAATGGCTTGATTGAT
<i>PGD-1</i>	GCCAGAGCCAGAGCCATTTA
<i>PGD-2</i>	CCTCGAAACTTTCCCTCCA
<i>EDD.1</i>	CTATTGCTTTTCGGCAAATA
<i>EDD.In1</i>	GGTTCGTGCCTTCATCCGTGCGAC TGTTCTCTCCTGTCTCGTAGC
<i>EDD.In2</i>	CGCCACCTAACAATTCGGTTCGAC ATGCTGGCAAGCGTTACTGC
<i>EDD.2</i>	CGTTAACCCCAAGAAGGAGGC
<i>M13-F</i>	AGGGTTTTCCAGTCACGACGTT
<i>M13-R</i>	GAGCGGATAACAATTTACACAGG
<i>Em F</i>	GTCGACGAAAAAGAAATTAGATAAA
<i>Em R</i>	GTCGACTTACTTATTAATAATTTATAGC
<i>Cm F</i>	TCAATAATATCGAATTCCTGCAG

<i>Cm R</i>	AGCGAGGTGCCGCCATCAAGCTT
<i>Gm1</i>	GTCGACGGATGAAGGCACGAACC
<i>Gm2</i>	GTCGACGAATTGTTAGGTGGCG
<i>Km f</i>	CCACGTTGTGTCTCAAAATCTCTGAT
<i>Km r</i>	ATCGCCCCATCATCCAGCCAGAAAG
<i>N-EDA6803-pET22</i>	CATATGTTGCGACAGCACCGGGCGAT
<i>C-EDA6803-pET22</i>	CTCGAGTCAGCCCCTTGGTGTCTGGATTCT
<i>N-EDABAR-pET22</i>	CATATGCTCATGCTCGTCGCCGACGAC
<i>C-EDABAR-pET22</i>	CTCGAGTCTTCCACGCTGTGATGCCTGTAAAGT
<i>Pcpc-F-Xhol:</i>	CTGACTCTCGAGACCTGTAGAGAAGAGTCCCTGAA
<i>Pcpc-R-eda:</i>	GCCCGGTGCTGTGCGCAACAT TGAATTAATCTCCTACTTGACTTTATG
<i>Eda-F:</i>	ATGTTGCGACAGCACCGGGC
<i>Eda-R-Trbc:</i>	CCGACAATCCAAACACCGGT TCAGCCCCTTGGTGTCTGGA
<i>Trbc-F:</i>	ACCGGTGTTTGGATTGTCGG
<i>Trbc-R-Xhol:</i>	CTGACTCTCGAGGCTGTGGAAGTTGAACATCAG
<i>Eda-His-R-Trbc</i>	ACCGGT TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTG GCCCCTTGGTGTCTGGATTTC
<i>Trbc-HIS-F:</i>	CACCACCACCACCACCACTGA ACCGGTGTGGATTGTCGG
<i>EdaBAR-Bam</i>	GGA TCCCTCA TGCTCGTCGCCGACGAC
<i>EdaBAR-Sal</i>	GTCGACTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTCTTCCACGCTGTGATGCCTGTAAAGT
<i>EC-Eda-up-l</i>	ATGAAAACTGGAAAAACAAGTGCAGAATCAATCCTGACCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>EC-Eda-down-l</i>	TTACAGCTTAGCGCCTTCTACAGCTTACGCGCCAGCTTATGGGAATTAGCCATGGTCC
<i>EC-Eda-up-s</i>	ATGAAAACTGGAAAAACAAG
<i>EC-Eda-down-s</i>	TTACAGCTTAGCGCCTTCTA
<i>EC-Edd-up-l</i>	ATGAATCCACAATTGTTACGCGTAACAAATCGAATCATTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>EC-Edd-down-l</i>	TTAAAAAGTGATACAGGTTGCGCCTGTTCCGGCACCGGACATGGGAATTAGCCATGGTCC
<i>EC-Edd-up-s</i>	ATGAATCCACAATTGTTACG
<i>EC-Edd-down-s</i>	TTAAAAAGTGATACAGGTTG
<i>EC-Gnd-up-l</i>	ATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>EC-Gnd-down-l</i>	TTAATCCAGCCATTTCGGTATGGAACACACCTTCTTTATCAATGGGAATTAGCCATGGTCC
<i>EC-Gnd-up-s</i>	ATGTCCAAGCAACAGATCGG
<i>EC-Gnd-down-s</i>	TTAATCCAGCCATTTCGGTAT

3.4.3 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zu analytischen und präparativen Zwecken wurde mittels der Agarose-Gelelektrophorese isolierte genomische DNA (3.4.1), die PCR-Produkte (3.4.2) und die Restriktionsverdau (3.4.5) 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. 180 V (7,7 V/cm) in 1x TBE-Puffer. Die Gele enthielten 0,8% (w/v) Agarose und wurden aus 1,2 g Agarose (LE Agarose, Biozym, Hess. Oldendorf) und 150 ml 1x TBE-Puffer (Tabelle 11) hergestellt, die in einer Mikrowelle aufgeköcht wurden.

Nach Herunterkühlen auf ca. 60°C wurden 15 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugefügt (0,001% (w/v)). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 5x Probenpuffer (Tabelle 11) 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) dokumentiert.

Tabelle 11: Agarose-Gelelektrophorese Puffer.

Name	Zusammensetzung
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) Na ₂ -EDTA* 2 H ₂ O (9,3 g auf 1 l)

3.4.4 *Aufreinigung von Nukleinsäuren*

Zur Aufreinigung von Nukleinsäuren wurden die gewünschten Banden aus den Agarosegelen (3.4.3) unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert. Um eine Beschädigung der Nukleinsäuren zu vermeiden, wurde die Leistung des UV-Transilluminators auf 70% reduziert. Für die Extraktion wurde das NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren) mit dem Protokoll 5.2 („DNA extraction from agarose gels“) verwendet. Die Konzentration der Eluate wurde über die Agarose-Gelelektrophorese (3.3.1) bestimmt.

3.4.5 *Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen*

Die Verwendung von Restriktionsendonukleasen zur sequenzspezifischen Spaltung von genomischer-DNA sowie Plasmid-DNA erfolgte jeweils nach Angaben des Herstellers (Thermo Fisher SCIENTIFIC; Waltham, MA, USA). In der Regel wurden 5 U Enzym pro µg DNA in einem Reaktionsvolumen von 50 µl eingesetzt. Soweit nicht anders vorgegeben, wurden die Ansätze bei 37°C für mindestens 1 h inkubiert. Der Verdau genomischer DNA erfolgte über Nacht. Zur Überprüfung wurde der Verdau auf ein Agarosegel gegen eine unverdaute Kontrolle aufgetragen.

3.4.6 *Fusion von PCR Produkten*

Die Fusion verschiedener DNA-Fragmente erfolgte nach Chenchik (Chenchik *et al.* 1996). Zur Fusion verschiedener Fragmente wurden diese zunächst per PCR (3.4.2) amplifiziert oder durch einen Restriktionsverdau (3.4.5) aus einem Plasmid geschnitten. Hierbei wurde den innenliegenden Oligonukleotiden jeweils ein Überhang hinzugefügt (Tabelle 10). Der Überhang hatte im Schnitt eine Länge von ca. 20 Nukleotiden, die mit der zu fusionierenden Sequenz homolog waren.

Alle drei zu fusionierenden Nukleotidsequenzen wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1:1 mit einem DNA-Gesamtgehalt von 100 ng in einer Fusions-PCR eingesetzt. Die Fusion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl durch Zusatz von 0,8 units Pfu-DNA-Polymerase (Thermo Fisher SCIENTIFIC; Waltham, MA, USA), dem entsprechenden Puffer und 4 µl dNTP's (2,5 mM) in einem PTC-200 Gradienten Cycler (MJ Research, Watertown, USA). Das verwendete Temperaturprogramm ist in Tabelle 8 dargestellt.

Die fusionierten DNA-Fragmente wurden in einer nachfolgenden PCR durch die außen liegenden Oligonukleotide amplifiziert, in den gewünschten Vektor ligiert (3.4.7), sequenziert (3.4.9) und für die Transformation (3.4.10) eingesetzt.

3.4.7 Ligation von DNA in verschiedene Vektoren

In dieser Arbeit wurden verschiedene Vektoren für *E. coli* und *Synechocystis* verwendet (Tabelle 12). Die Ligation eines doppelsträngigen DNA-Moleküls und eines Vektors wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Thermo Fisher SCIENTIFIC; Waltham, MA, USA) durchgeführt. Diese katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyenden.

In einem Standard-Ligationansatz betrug das molare Verhältnis Vektor:Insert 1:3 und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{ngVektor \times kb Insert}{kb Vektor} \times \text{molares Verhältnis} \frac{Insert}{Vektor} = ng Insert$$

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 5 U T4-Ligase, 1 µl 10x Puffer, x µl DNA Insert, x µl DNA Vektor, add. 10 µl H₂O. Der Ansatz wurde in der Regel über Nacht bei 4°C inkubiert. Die erhaltenen Plasmide wurden anschließend in kompetente Zellen transformiert.

Tabelle 12: Verwendete Vektoren.

Name	Ziel Organismus	Referenz
pCR2.1- TOPO®	<i>E. coli</i>	Invitrogen, Karlsruhe
pJET1.2/blunt®	<i>E. coli</i>	Thermo Fisher SCIENTIFIC; Waltham, MA, USA
pMAL-pIII	<i>E. coli</i>	NEB, Ipswich, MA, USA
pET22 b(+)	<i>E. coli</i>	Novagen, Merk KGaA, Darmstadt
pCP20	<i>E. coli</i>	(Cherepanov & Wackernagel 1995)
pKD3	<i>E. coli</i>	(Datsenko & Wanner 2000)
pKD20	<i>E. coli</i>	(Datsenko & Wanner 2000)
pKD46	<i>E. coli</i>	(Datsenko & Wanner 2000)
psM	<i>Synechocystis</i>	(Zhou <i>et al.</i> 2014)

3.4.7.1 Ligation in den TOPO®-Vektor

Die gereinigten PCR-Produkte, die mit der Taq-Polymerase amplifiziert wurden (3.4.4) 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 Viertelansatz verwendet. 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 (3.4.2), 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 Vaccinia Virus, die das PCR-Produkt in den Vektor ligiert.

3.4.7.2 Ligation in den pJET1.2/blunt®

Die Ligation in den pJET1.2/blunt® Vektor erfolgte nach Herstellerangaben (Thermo Fisher SCIENTIFIC; Waltham, MA, USA), wobei jedoch nur Viertelansätze verwendet wurden. pJET1.2/blunt® ist ein linearisierter Klonierungsvektor mit Phosphorylgruppen an den 5'-Enden, deshalb ist die Phosphorylierung der PCR-Produkte nicht erforderlich. *Blunt-end* PCR-Produkte, wie sie durch *Proofreading* DNA-Polymerasen wie der *pfu*-Polymerase (Thermo Fisher SCIENTIFIC; Waltham, MA, USA) erzeugt wurden, wurden direkt mit dem Vektor ligiert.

3.4.8 Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der „Alkalischen Lyse“. Dazu wurden Zellen aus 3 ml Übernachtskultur durch Zentrifugation (1 min, 10621 g, 4 °C; Eppendorf Zentrifuge 5804R) sedimentiert und anschließend mit dem NucleoSpin® Plasmid (Macherey und Nagel, Düren) nach Herstellerangaben („5.1 Isolation of high-copy plasmid DNA from *E. coli*“) isoliert.

3.4.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte durch das Institut für klinische Molekularbiologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (1977). Die beiden Vektoren, die zur Vervielfältigung genutzt wurden; pCR2.1- TOPO® und pJET1.2/blunt®, wurden mit den im Kit (Invitrogen/ Thermo Fisher SCIENTIFIC; Waltham, MA, USA) mitgelieferten Oligonukleotiden sequenziert. Für die Sequenzierung wurden je 300 ng Plasmid-DNA und 1 µl des Oligonukleotids (4,8 µM) zusammen in einem 200 µl Reaktionsgefäß vermischt und so zur weiteren Analyse abgegeben.

Die Ergebnisse wurden im Sequenz Format *.ab1 an unser Institut geschickt. Die Datei enthielt die Sequenz und das dazugehörige Chromatogramm. Die Sequenz wurde anschließend mit bioinformatischen Methoden weiterbearbeitet. Hierzu wurden das Chromatogramm mit Chromas lite 2.1.1 (Chromas Lite Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia) zunächst auf die Qualität untersucht und die Sequenz im FASTA-Format ausgegeben. Die zuvor bekannten Sequenzen wurden mit der SnapGene® Software (GSL Biotech; Chicago, USA; [snapgene.com](http://www.snapgene.com)) analysiert. Die nicht bekannten DNA-Sequenzen wurden mit den in der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) vorhandenen Sequenzen mit dem BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) -Algorithmus verglichen.

3.4.10 Transformation

Um die rekombinante DNA in den verschiedenen Vektoren in *E. coli* oder *Synechocystis* zu integrieren wurde diese in den jeweiligen Organismus transformiert.

3.4.10.1 Transformation von *Escherichia coli* durch Heat-shock

Die Transformation von Ligationen mit dem TOPO Vektor (3.4.7.1) sowie dem pJet (3.4.7.2) in *E. coli* erfolgte in kompetenten TOP10 Zellen (Invitrogen, Groningen, Niederlande). Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen, wobei jedoch Viertelansätze verwendet wurden. Für die Transformation anderer Plasmide (Tabelle 12) wurden chemisch kompetente *E. coli* (K12)-Zellen verwendet. 1-5 µl eines Ligationsansatzes wurden mit 25 µl kompetenten Zellen versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert; es folgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C. Die transformierten Zellen wurden erneut für 2 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 250 µl SOC-Medium (Tabelle 6) versetzt. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C auf einem Schüttelinkubator (4400 Innova Incubator Shaker; New Brunswick Scientific, Nürtingen) bei 80 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden die Transformanden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank (Heraeus, Hanau) inkubiert.

3.4.10.2 Transformation von *Escherichia coli* durch Elektroporation

Einige Vektoren mussten mittels Elektroporation in *E. coli* Zellen eingebracht werden. Zur Erstellung elektrokompenter Zellen wurde eine Vorkultur angesetzt, indem eine Einzelkolonie in 1 ml LB Medium über Nacht bei 37°C und 180 rpm (4400 Innova Incubator Shaker; New Brunswick Scientific, Nürtingen) angezogen wurde. Am nächsten Tag wurden 1,4 ml LB Medium mit 30 µl der Vorkultur angeimpft und für 2-3 h bei 37°C und 180 rpm angezogen. Die Kultur wurde für 1 min bei 10621 g bei 2°C sedimentiert (Eppendorf Zentrifuge 5804R, Rotor: F45-30-11, Eppendorf, Hamburg), der Überstand verworfen. Das Pellet wurde auf Eis gestellt und durch Auf- und Ab-Pipettieren mit 1 ml kaltem milliQ H₂O resuspendiert.

Nach erneuter Zentrifugation (1 min bei 11363 g bei 2°C; Eppendorfszentrifuge 5804R) wurde der Überstand grob verworfen und das Pellet in den übrigen 20 bis 30µl wieder resuspendiert. Das Reaktionsgefäß stand hierbei weiterhin auf Eis. Für die Elektroporation wurden zu den Zellen 100-400 ng Plasmid DNA und 400-800 ng lineare DNA (PCR) hinzugegeben. Die gut abgetrocknete Küvette wurde zur Elektroporation in die Pulsapparatur (Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems, BioRad, München) eingesetzt und der Elektropuls ausgelöst. Die Pulsdaten sind vom Elektrodenabstand abhängig und betragen für diese Versuche mit *E. coli* 25 µF, 200 Ohm, 2,5 kV. Gleich nach dem Puls wurden 1 mL SOC Medium (Tabelle 6) zugegeben und der Ansatz in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Regenerationsphase von ca. 1 Stunde bei 30°C/37°C konnten die transformierten Zellen auf Selektionsmedien ausplattiert werden.

3.4.10.3 Transformation von *Synechocystis*

Synechocystis ist in der Lage fremde DNA aufzunehmen und durch homologe Rekombination in das Genom einzubauen (Grigorieva & Shestakov 1982; Kufryk *et al.* 2002). Da die natürliche Transformierbarkeit teilungsfähiger Zellen besonders hoch ist, wurden die Kulturen möglichst in ihrer exponentiellen Wachstumsphase verwendet (Zang *et al.* 2007). Deshalb wurden 250 ml BG11 in einer Kulturröhre als Vorkultur angezogen. Am Vortag der Transformation wurde eine neue Kulturröhre mit 250 ml BG11 aus der Vorkultur auf eine OD₇₅₀ von 0,15 angeimpft. Die Zellen wurden für 10 min bei 25°C und 5500 g (Centrikon T-124, Rotor: A6-14, Kontron Instruments, Watford, UK) sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 600µl frischem BG11-Medium resuspendiert. Für eine Transformation wurden 300 µl der Suspension mit 6-18 µg Plasmid-DNA versetzt und der Ansatz für 6 h in einem Wasserbad bei 30°C in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen im Dunkeln inkubiert. Alle 30 min erfolgte eine leichte Durchmischung durch Invertieren der Gefäße. Nach der Inkubation wurden jeweils 100 µl des Transformations-Ansatzes auf autoklavierten Nitrocellulosefiltern auf BG11-Agarplatten (ohne Antibiotikum) ausgestrichen. Die Platten wurden für zwei Tage in der Klimakammer bei 28°C und 50 µE m² s⁻¹ inkubiert. Anschließend wurden die Nitrocellulosefilter auf BG11-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum überführt. Nach ca. zwei Wochen erschienen Einzelkolonien, die einzeln auf neue BG11-Platten ausgestrichen wurden. Nach 6-8 maligem Überimpfen wurde genomische DNA der neu hergestellten Mutanten isoliert und auf erfolgreiche Segregation überprüft.

3.4.11 Southern-Blot

Zur Überprüfung, ob das Wildtypgen erfolgreich aus allen Genomkopien der jeweiligen Mutante deletiert, wurde eine Southern-Hybridisierung durchgeführt. Die Zusammensetzung aller verwendeten Puffer und Lösungen ist in dargestellt.

Tabelle 13: Verwendete Southernblot Reagenzien.

Name	Zusammensetzung
Denaturierungspuffer (pH 7,4)	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungspuffer	0,5 M Tris 3,0 M NaCl
Blocking-Lösung	10% (w/v) Blocking-Reagenz in Puffer 1
20x SSC (pH 7,0)	0,3 M Na ₂ -Citrat x 2 H ₂ O 3 M NaCl
Puffer 1 (pH 7,5)	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl 0,2 M NaOH
Puffer 1 mit Tween: Puffer 2	0,3% (v/v) Tween 20 in Puffer 1
Puffer 3	Blocking-Lösung (10% v/v) Puffer 1 (90% v/v)
(Vor-) Hybridisierungspuffer	0,1 M Tris 0,1 M NaCl

Dazu wurde eine Digoxigenin-markierte Sonde verwendet, wobei es sich um ein PCR-Produkt handelt, das eine homologe Sequenz zum jeweils zu untersuchenden Gen darstellt.

Es wurde darauf geachtet, dass durch Binden der Sonde an die DNA im Wildtyp und in der Mutante unterschiedlich große Banden entstehen. Diese Sonde wurde mit einer PCR (3.4.2) bei einer Annealingtemperatur von 55°C hergestellt, dafür wurden Digoxigenin-markierte Desoxynukleotide (Roche, Mannheim) verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 10 aufgeführt. Für die PCR wurden 10 pmol DIG-gelabelte dNTP's eingesetzt. Anschließend an die PCR wurde eine Probe (2 µl) auf ein Agarosegel aufgetragen, um die Konzentration der Sonde zu bestimmen. Für den Blot wurde genomische DNA (mind. 100 ng) über Nacht mit 50 U HindIII (Thermo Fisher SCIENTIFIC; Waltham, MA, USA) geschnitten. Am nächsten Tag wurde die verdaut DNA auf ein Agarosegel aufgetragen. Als Größenstandard wurden 10 µl λ- Marker eingesetzt, dem 1 µl DIG-markierter DNA-Molecular-Weight Marker II (Roche, Mannheim) hinzugefügt wurde. Nach dem Lauf des Gels (ca. 45 min, bis die Bande bei ca. 2/3 des Gels war) 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. Dazu wurde der Blot, wie in Abbildung 7 dargestellt, aufgebaut. Zunächst wurden 3 mit 20x SSC-Puffer befeuchtete Whatmanpapiere auf die Apparatur gelegt, anschließend das Gel, die Membran, noch einmal 3 mit 20x SSC-Puffer befeuchtete Whatmanpapiere und anschließend ein Stapel saugfähiges Papier. Der ganze Aufbau wurde mit einem Gewicht von ca. 5-10 kg beschwert.

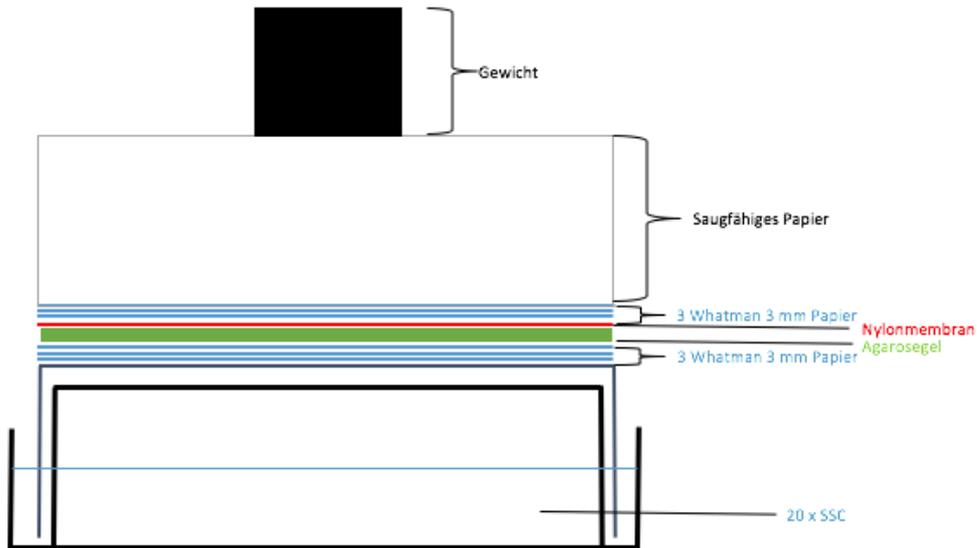


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Southernblots.

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. Die Übertragung der DNA auf die Membran dauerte ca. 18 h. 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.

3.4.11.1 Hybridisierung

Die Membran mit der aufgeblotteten und kovalent gebundenen DNA wurde in einer Hybridisierungsröhre (Biometra, Göttingen) mit 30 ml Vorhybridisierungspuffer für 1 h bei 68°C im Hybridisierungsöfen (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 Hybridisierungsöfen. 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, Roche, Mannheim) wurde 1:10000 in Puffer 2 verdünnt. Für die Detektion wurde die Membran nach dem Äquilibrieren in Puffer 3 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 (Roche, Mannheim) überschichtet. CDP-Star ist das Substrat für die alkaline Phosphatase, die am anti-DIG- Antikörper kovalent gebunden ist. Nach 5 min Dunkelinkubation bei 37°C wurde die Membran in einen neuen Gefrierbeutel eingeschweißt und in einer Expositionskassette mit der DNA-tragenden Seite nach oben befestigt. Ein Röntgenfilm (GE healthcare, Buckinghamshire, UK) 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 (Roentoroll HC (25% v/v) Röntgenentwickler Part 1 (12,5% v/v) Röntgenentwickler Part 2 (2,5% v/v)), danach kurz in Wasser und schließlich 5 min in Fixierer-Lösung geschwenkt (Superfix Part 1 (20% v/v) Superfix Part 2 (5% v/v)). Anschließend wurde der Film mindestens 20 min gewässert und dann getrocknet. Die Lösungen für Entwickler und Fixierer stammten von der Firma Tetenal (Norderstedt).

3.4.12 RNA Isolation aus *Synechocystis*

Zur Isolation der Gesamt-RNA aus *Synechocystis* wurden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums geerntet (12 h, 24 h, 36 h, 48 h und 72 h nach Animpfen). Hierfür wurden 200 ml der Zellen mit 50 ml Eis für 5 min bei 7000 g (Centrikon T-124, Rotor: A6-14, Kontron Instruments, Watford, UK) und 2°C in vorgekühlten Gefäßen sedimentiert. Der Überstand des Eis-Medium-Gemisches wurde verworfen, die Zellen in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Kulturen wurden daraufhin erneut sedimentiert (10 min, 10621 g, 2 °C; Eppendorf Zentrifuge 5804R, Rotor: F45-30-11, Eppendorf, Hamburg) und der restliche Überstand wurde verworfen. Die Zellen konnten so in flüssigem Stickstoff eingefroren werden und bei -80°C gelagert werden. Wichtig war, dass die Zellen ab dem Zeitpunkt der Ernte kalt gehalten wurden, um die Transkription zu stoppen.

Für die Isolierung der RNA wurde das Pellet im 4x Volumen Break-Puffer (Tabelle 14) resuspendiert und anschließend mit dem 4x Volumen Glasperlen ($\varnothing=0.5$ mm) und dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) (v/v/v) versehen. Das Gemisch wurde im Kühlraum (6 °C) 10 x 1 min gevortext. Nach jedem Durchgang wurden die Zellen 1 min auf Eis gestellt. Um die Zelltrümmer zu sedimentieren wurde das Gemisch für 5 min bei 2°C und 20817 g (Eppendorf Zentrifuge 5804R) zentrifugiert. Von den drei sichtbaren Phasen enthalten die untere Phase sowie die Interphase Proteine und DNA und die obere Phase die RNA. Diese obere Phase wurde abgenommen, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) überschichtet, gevortext und erneut für 5 min bei 2°C und 20817 g

(Eppendorf Zentrifuge 5804R) zentrifugiert. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt bis keine Interphase mehr sichtbar war, um sicher zu gehen, dass die RNAsen vollständig entfernt wurde. Anschließend wurde die Mischung mit dem gleichen Volumen Chloroform-Isoamylalcohol (24:1) (v/v) überschichtet, gevortext und für 2 min bei 2°C und 20817 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde wiederholt um sicherzustellen, dass das Phenol vollständig entfernt wurde. Zur Fällung der Nukleinsäuren wurden zu der Suspension 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat (pH 5,6- 6,5) und das 2,5x Volumen 99% (v/v) Ethanol (-20°C) hinzugegeben, vorsichtig invertiert und bei -20°C für mindestens 1 h, oder über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension für 10 min bei -9°C und 20817 g zentrifugiert um die RNA zu pelletieren. Das Pellet wurde mit 1 ml 70% (v/v) Ethanol (-20°C) gewaschen, erneut für 5 min bei 20817 g und -9°C zentrifugiert und getrocknet (SpeedVac, Keutz, Reiskirchen). Das getrocknete Pellet wurde in 200 µl TE- Puffer resuspendiert. Um die RNA von der restlichen DNA zu trennen, wurde anschließend eine Lithiumchlorid-Fällung durchgeführt. Zu dem gelösten Pellet wurden 200 µl 5 M Lithiumchlorid hinzugegeben und für 1,5 h bei -20°C inkubiert. Um zu verhindern, dass die Lösung gefriert, wurden die Reaktionsgefäße regelmäßig in einem Abstand von 20 min geschüttelt. Die RNA wurde durch erneutes Zentrifugieren (30 min bei -9°C und 20817 g) sedimentiert. Die Fällung wurde wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 200 µl RNase freiem Wasser resuspendiert und bei -80°C gelagert.

Tabelle 14: Verwendete Puffer für die RNA Extraktion.

Name	Zusammensetzung
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,4 1mM Na ₂ EDTA
Break Puffer	32 ml TE 50/100 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM EDTA) 150 µl Triton X-100 600 µl 25% (w/v) Natrium lauroylsarcosine 20% (w/v) Natrium dodecylsulfat

Die Konzentration der RNA wurde mit dem Nano Drop bestimmt (3.3.1).

3.4.13 DNase I Verdau

Der DNase I Verdau der RNA erfolgte nach Herstellerangaben (Thermo Fisher SCIENTIFIC; Waltham, MA, USA). Es wurden 15 µl RNA (1 µg) mit 2 µl DNase (10 U/µl), 2 µl 10x DNase Puffer und 1 µl Ribolock RNase Inhibitor (40 U/µl) für 2 h im Thermocycler inkubiert. Um die DNase und den Puffer wieder zu entfernen, wurde die Lösung auf Eis gekühlt, mit 2 µl 50 mM EDTA Lösung versetzt und im Thermocycler bei 65°C für 10 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben wieder auf Eis gestellt. Um die Effizienz des Verdau zu prüfen wurde eine Test PCR (3.4.2) durchgeführt.

Hierfür wurde 1 µl der verdauten RNA als Template eingesetzt. Als Kontrollen dienten 1 µl genomische DNA sowie 1 µl H₂O. In den DNase verdauten RNA Proben sollten keine Produkte sichtbar sein.

3.4.14 Reverse Transkriptase PCR

Die Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben mit dem „High Capacity RNA-to-cDNA Kit“ (Applied Biosystems, Warrington, UK). Für die Reaktion wurden 9 µl der verdauten RNA, 10 µl 2x Puffer und 1 µl RT-Mix eingesetzt. Für die Negativkontrolle wurde statt des RT-Mix 1 µl H₂O eingesetzt. Dann wurden die Proben wie folgt im Thermocycler inkubiert: (37°C /60min; 95 °C/ 5 min; 4 °C). Zur Kontrolle wurde erneut eine Test PCR wie bereits nach dem DNase Verdau (3.4.13) durchgeführt. Hierbei sollten außer in den Kontrollen PCR Produkte zu sehen sein. Die cDNA wurde nach der RT-PCR in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

3.4.15 Quantitative real time PCR

Die quantitative real time PCR (qRT-PCR) erfolgte nach Herstellerangaben mit dem „Power SYBR® Green PCR Master Mix“ (Applied Biosystems, Warrington, UK) in dem Thermocycler Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden).

Eine Reaktion setzte sich wie folgt zusammen: 7,5 µl SYBR Green Reaktions Mix, 1,5 µl forward *Primer* (2µM), 1,5 µl reverse *Primer* (2µM), 4,5 µl cDNA. Als cDNA wurde eine 1:200 Verdünnung der RT-Reaktion verwendet, wobei die Konzentration nicht bekannt war. Die verwendeten *Primer* für die qRT-PCR waren Ka-rt-I F: GAAACCATTGCTCACCTGCG und Ka-rt-I R: CAACGGCCTGGAGCAAATC (Chen 2014) Die Effizienz der *Primer* lag bei (1.914). Von jeder Probe wurden in einem Lauf je drei Wiederholungen durchgeführt. Als Referenzgen wurde 16S eingesetzt: 16s-91r: AAGTCATCATGCCCTTACG und 16s-91f: ATGGGATTCGCTTACTCTCG.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Rotor-Gene Software nach der $\Delta\Delta$ CT-Methode. Um die relative Expression des Zielgens zu bestimmen wurde folgende Formel verwendet:

$$Rate = \frac{(E \text{ Zielgen})^{dCt \text{ Zielgen (Bedingung1-Bedingung2)}}}{(E \text{ Referenzgen})^{dCt \text{ Referenzgen (Bedingung1-Bedingung2)}}$$

3.5 Erstellung von Mutanten

Die Erstellung der Mutanten erfolgte mittels homologer Rekombination. Homologe Rekombination ist der spezifische und genaue Austausch von genetischem Material zwischen zwei DNA-Molekülen. Homologe Rekombination entsteht durch Homologie-Regionen zwischen dem einzubringenden DNA Abschnitt und dem Ziellokus im Genom. Die homologe Region ist dabei frei wählbar und sollte zwischen 20-50 bp lang sein.

3.5.1 *Synechocystis* Mutanten

Zur Erstellung von *knock-out* Mutanten in *Synechocystis* wurden zunächst ca. 200-300 bp lange, stromab- und stromaufwärts liegende DNA Fragmente des Zielgens über eine PCR amplifiziert (3.4.2). Die verwendeten Oligonukleotide fügten an die zur Genmitte liegenden Enden der Fragmente jeweils Sequenzen von etwa 20 Nukleotiden an, die mit der 5'- bzw. 3'-Sequenz einer Antibiotika-Resistenzkassette übereinstimmten. Die Antibiotika-Resistenzkassette wurde über eine PCR aus einem Plasmid amplifiziert. Die Fusion erfolgte wie in Kapitel 3.4.6 beschrieben. Anschließend wurden die Fragmente in den TOPO Vektor ligiert (3.4.7.1) und anschließend in *E. coli* transformiert (3.4.10). Nach Überprüfung der Klone mittels Sequenzierung (3.4.9) wurde der Vektor in *Synechocystis* transformiert (3.4.10.3).

3.5.2 *Escherichia coli* Mutanten

Die Erstellung der *E. coli* Mutanten (Tabelle 15) erfolgte verändert nach dem technischen Protokoll von (Gene Bridges 2014) und nach (Datsenko & Wanner 2000). In Abbildung 8 ist die Methode skizziert (verändert nach (Gene Bridges 2014)).

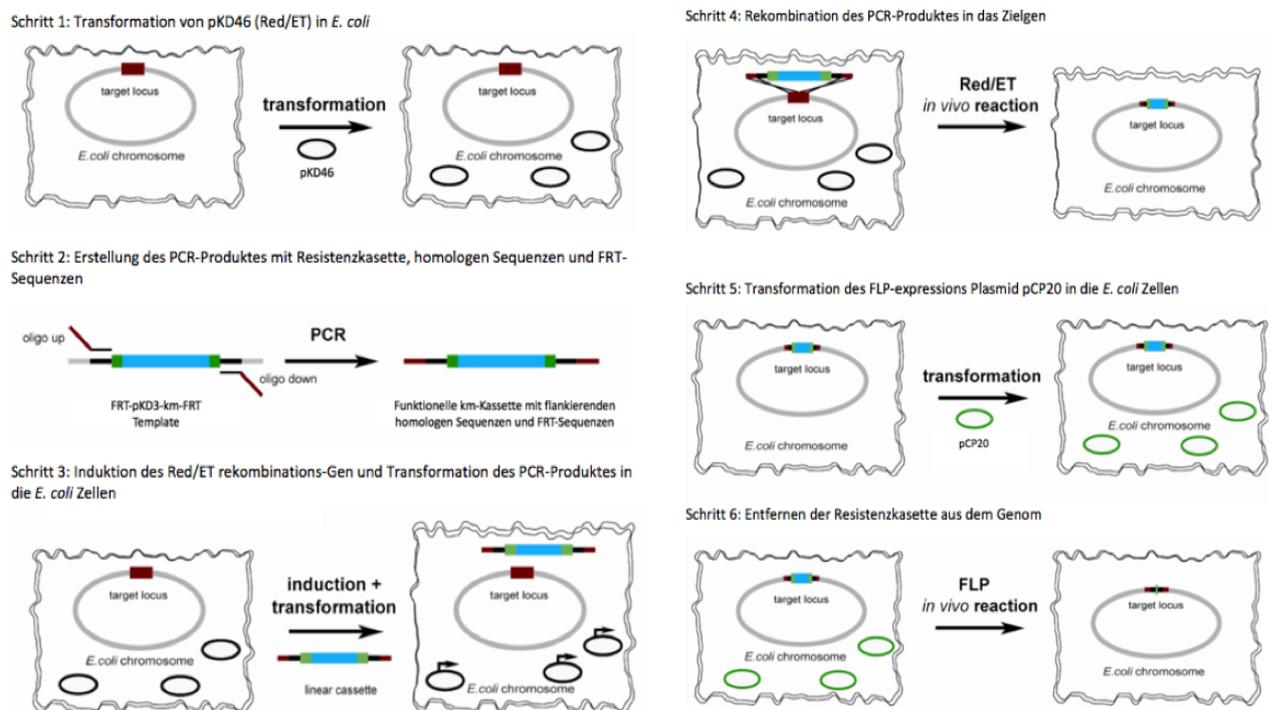


Abbildung 8: Skizzenhafte Darstellung der Erstellung von *E. coli* knock-out Mutanten.

Das dort beschriebene Red/ET Verfahren ermöglicht die Herstellung von *knock-out* Mutanten in denen die als Selektionsmarker verwendete Resistenzkassette am Ende nicht mehr vorhanden ist. Zuerst wurde dieses Verfahren durch Stewart beschrieben (Stewart *et al.* 2004).

Tabelle 15: *E. coli* knock-out Mutanten.

Name	Lokalisation im Genom	Protein	Quelle	Referenz
K12 Δ <i>eda</i>	1930780..1930139	KDPG-Aldolase	http://ecoliwiki.net	Diese Arbeit
K12 Δ <i>eda-edd</i> <i>gnd</i>	1932628..1930139 2099292..2097886	KDPG-Aldolase 6-Phosphogluconat-Dehydratase 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	http://ecoliwiki.net	Diese Arbeit

Zunächst wurde das Rekombinase Plasmid pKD46 (Datsenko & Wanner 2000) in *E. coli* Zellen eingebracht. Die Transformation von pKD46 in *E. coli* erfolgte durch Elektroporation in elektrokompente K12 Zellen (3.4.10.2). Anschließend wurden die Zellen für 1 h bei 30°C und 180 rpm inkubiert und auf LB-Agarplatten (+Ampicilin 50 µg/ml) ausgestrichen. Die niedrige Temperatur war essentiell, da bei 37°C das thermosensitive Plasmid aufgrund von temperatursensitiver Replikation wieder verloren geht. Die Platten wurden über Nacht bei 30°C im Wärmeschrank (Heraeus, Hanau) inkubiert.

Für die homologe Rekombination wurden PCR-Produkte der Kanamycin-Resistenzkassette mit FRT (*flippase recognition target*) -Sequenzen an beiden Enden und flankierenden homologen Sequenzen generiert. Bei der FRT-Sequenz handelt es sich um eine 34 bp lange Sequenz, an die die Rekombinase Flippase (*Flp*) bindet. Das PCR-Produkt wurde anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt (3.4.4). Für die Transformation des PCR Produktes wurden die *E. coli* Zellen, die das Rekombinase Plasmid pKD46 enthielten, zunächst wie in 3.4.10.2 beschrieben zur Aufnahme von DNA vorbereitet. Anschließend wurden das PCR-Produkt in die Zellen transformiert und die Zellen auf Agarplatten (+Kanamycin 15 µg/ml) ausgestrichen. Es ist wichtig, dass die Platten kein Ampicillin mehr enthalten, damit das Rekombinase Plasmid pKD46 nicht länger essentiell für das Überleben der Zellen ist. Die ausgestrichenen Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei diesem Schritt haben die Zellen aufgrund von temperatursensitiver Replikation pKD46 verloren. Anschließend werden die Transformanten auf eine neue LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert, um Einzelkolonien zu erhalten. Zur Überprüfung, ob die Resistenzkassette an der richtigen Stelle ins Genom integriert wurde, wurde eine „Colony-check-PCR“ durchgeführt. Für die „Colony-check-PCR“ wurde eine einzelne Kolonie mit einem Zahnstocher gepickt und in 30 µl sterilem H₂O suspendiert. Der Zahnstocher wurde anschließend in 3 ml LB Medium mit Kanamycin (Tabelle 4) gegeben und damit eine Übernacht-Kultur angeimpft. Die im Wasser suspendierte Kolonie wurde für 5 min bei 98°C aufgekocht und 2 µl dieser Suspension wurden als Template für die PCR eingesetzt. Für die Colony-check-PCR wurde die KAPAHiFi™ Polymerase Kit (Peqlab, Erlangen) nach Herstellerangaben verwendet (Tabelle 16).

Das Temperaturprogramm richtete sich ebenfalls nach den Herstellerangaben und ist in Tabelle 17 dargestellt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 16: Konzentrationen für „Colony-check-PCR“.

Reagenz	Konzentration
5X KAPA HiFi Buffer (GC)	1X (10 µl)
10 mM KAPA dNTP Mix	0.3 mM (je dNTP)
10 µM Forward <i>Primer</i>	0.3 µM
10 µM Reverse <i>Primer</i>	0.3 µM
Template DNA	2 µl
1 U/µl KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase	1U
H ₂ O	add 50 µl

Tabelle 17: KAPAHiFi™ -PCR Protokoll.

Schritte	Temperatur	Zeit	Zyklen/Wiederholungen
Initiierung:	95°C	3 min	
Denaturierung:	98°C	20 sec	15-35
Annealing:	60°C	15 sec	
Elongation:	72°C	30 sec/kb	
	72°C	1 min	
Inkubation	20°C	∞	

Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarose-Gel aufgetragen und deren Größe mit den erwarteten Größen verglichen (3.4.3). Wurde durch die PCR bestätigt, dass die Resistenzkassette erfolgreich an der gewünschten Stelle im Genom integriert ist, wurde die Resistenzkassette mittels dem pCP20 Plasmid (mit *Flp* recombinase Gen) aus dem Genom entfernt. Die Zellen, die über den *knock-out* verfügten, wurden wie in 3.4.10.2 beschrieben für eine Transformation vorbereitet und das Plasmid pCP20 in die Zellen transformiert. Nach der Transformation wurden die Zellen auf LB-Agarplatten (+Kanamycin und Ampicillin) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 30°C inkubiert (pCP20 ist ebenfalls ein thermosensitives Plasmid), am nächsten Tag wurden Einzelkolonien gepickt und in 1 ml LB (ohne Antibiotikum) bei 30°C für 2-3 h angezogen. Anschließend wurde die Temperatur auf 37°C erhöht und die Kultur über Nacht weiter inkubiert. Hierdurch wurde in den Zellen das FLP/FLPe-Protein überexprimiert und die FRT-Stellen rekombinieren aus dem Genom. Gleichzeitig konnte sich das Plasmid durch die erhöhte Temperatur nicht mehr replizieren und ging somit verloren. Um zu prüfen, ob die Resistenzkassette erfolgreich aus dem Genom entfernt wurde, wurden einzelne Kolonien gepickt und diese sowohl auf LB Agarplatten mit und ohne Antibiotikum ausgestrichen. Ist die Resistenzkassette erfolgreich entfernt worden, so wuchsen die jeweiligen Zellen nur auf der Agarplatte ohne Antibiotikum an. Anschließend wurden die Zellen noch einmal per “Colony-check-PCR“ überprüft.

3.6 Wasserstoffmessungen

Um die Wasserstoffproduktion der NiFe-Hydrogenase aus *Synechocystis* zu messen, wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet.

3.6.1 Wasserstoffmessungen mit der Clark-Elektrode

Die Clark-Elektrode wurde vor allem für die Messung der Photowasserstoffproduktion eingesetzt. Bei der Clark-Elektrode handelt es sich um eine Sauerstoff-Elektrode vom Clark-Typ (DW1 Liquid, Hansatech, Norfolk, UK), die umgekehrt polarisiert mit einer Silber-Kathode und einer Platin-Anode betrieben ist (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 & Bishop 1976). In Abbildung 9 ist der schematische Aufbau dargestellt. An der Platinelektrode wird Wasserstoff oxidiert und an der Silberkathode wird Silber reduziert; Platin bindet Wasserstoff. Weil die Platinelektrode über die Kontrollbox an einen positiven Pol angeschlossen ist, wird der Wasserstoff an der Platinelektrode oxidiert und die Elektronen fließen durch die Kontrollbox zum oxidierten Silber. Das oxidierte Silber wird reduziert, das Chlorid bildet mit den Protonen HCl. Daher ist der Stromfluss durch die Kontrollbox proportional zur Wasserstoffkonzentration. Die Stromänderung wurde durch einen Einkanalschreiber (ABB S-120, Goerz AG, Wien, Österreich) gegen die Zeit aufgezeichnet. Die Kalibrierung der Wasserstoffelektrode erfolgte mit 900 μl H_2O und 100 μl mit H_2 gesättigtem Wasser (30 °C). Unter diesen Bedingungen enthält Wasser 77,4 nmol H_2/ml .

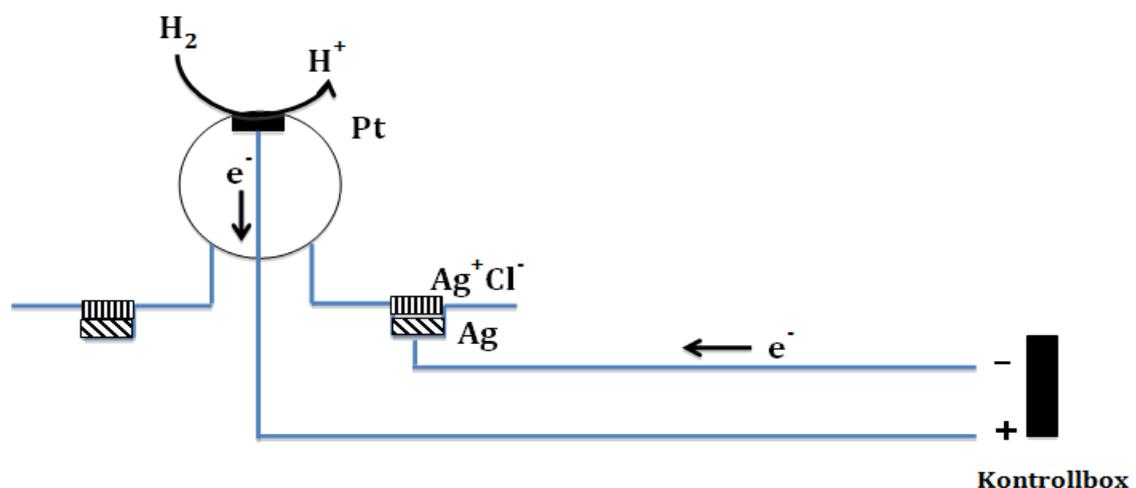


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Funktion und des Elektronenflusses der Elektrode.

3.6.1.1 Fermentative- und Photowasserstoffproduktion

Zur Messung der fermentativen Wasserstoffproduktion in einer Lösung wurde je eine Kultur aus einer Knieseröhre (250 ml) mit einer OD_{750} von mindestens 3 sedimentiert und in 1 ml BG11 resuspendiert. Für die Messung an der Wasserstoffelektrode wurde jeweils eine Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ Chlorophyll in der Küvette eingesetzt. Zu der Kultur in der Küvette wurde BG11 (Endvolumen 1 ml), 10 μl Enzymmix (40 U Glukoseoxidase und 50 U Katalase) und 5 μl 2 M Glukose zugegeben, um anaerobe Bedingungen einzustellen. Die Kultur wurde dann sofort verdunkelt. Jede Kultur wurde mindestens dreimal je 20 min gemessen.

Um die Photowasserstoffproduktion zu messen, wurde nach den fermentativen Messungen ein Photoprojektor eingeschaltet um die Kulturen zu beleuchten.

3.6.1.1.1 Aktivität der bidirektionalen Hydrogenase

Für die Quantifizierung von funktioneller bidirektionaler Hydrogenase in den Zellen wurde von einer Cyanobakterienkultur ein Volumen entsprechend 20 μg Chlorophyll mit BG11 auf 850 μl Volumen aufgefüllt. Mit einer Hamilton-Spritze wurden 100 μl Natrium-Dithionit-Lösung (100 mM) und 50 μl Methylviologen (1,1-Dimethyl-4,4-bipyridinium-dichlorid) (100 mM) zugefügt. Dithionit disproportioniert in Lösung, wodurch der Sauerstoff aus der Lösung in der Reaktionskammer entfernt wird. Zusätzlich wird auch das Methylviologen reduziert, das als Elektronendonator für die bidirektionale Hydrogenase dient. Die Schreibergeschwindigkeit wurde auf 3 cm/min eingestellt und die Empfindlichkeit so gewählt, dass eine gut messbare Steigung erzielt werden konnte.

3.6.1.2 Auswertung

Die Auswertungen der Wasserstoffmessungen, sowie die Berechnungen der Mengen wurden mit Microsoft Office Excel (2010) durchgeführt. Für die Auswertung der fermentativen- und der Photowasserstoffproduktion wurden zunächst die Eichkurven, die zuvor mit einer bekannten Wasserstoffkonzentration erstellt wurden, vom Nullpunkt bis zu ihrem höchsten Punkt in cm gemessen und aus den gemessenen Replikaten der Mittelwert gebildet. Anschließend wurde, wie in Abbildung 10 (a & b) dargestellt, an der Stelle der größten Steigung ein Steigungsdreieck eingezeichnet. Ebenso wurde der höchste Punkt der im Dunkeln gemessenen Kurve (c) und die Entfernung zum Nullpunkt sowie die Steigung nach dem Einschalten des Lichtes (d) bestimmt. Zur Berechnung der Menge an fermentativem Wasserstoff wurde die gemessene Länge bis zum höchsten Punkt der Kurve (siehe c in Abbildung 10) gemessen. Um die Menge an Photowasserstoff zu bestimmen wurde die Länge d wie in der Abbildung 10 gezeigt, gemessen.

Die Menge an gebildetem Wasserstoff errechnet sich dann durch folgende Formel:

$$\frac{(\text{Länge (cm)} * 77,4 \text{ nmol} * 1000 \text{ } \mu\text{g}) / (\text{Eichung} * \text{Verstärkung})}{\text{Chlorophyll (} \mu\text{g) in der Küvette}} = \text{Menge an gebildetem Wasserstoff in der Küvette}$$

Die Verstärkung leitet sich aus der Einstellung während der Eichung und der Messung ab. Wenn z.B. bei 50 mV geeicht und bei 5 mV gemessen wurde, wäre die Verstärkung 10.

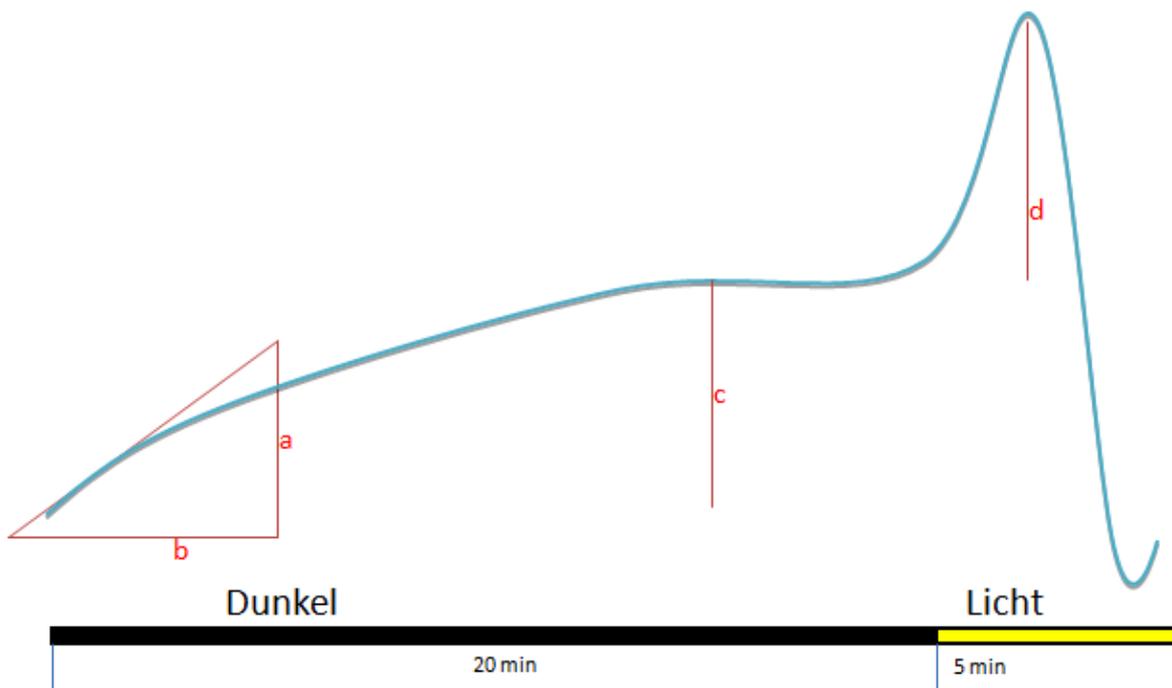


Abbildung 10: Schematische Darstellung einer Messkurve von fermentativer und Photowasserstoffproduktion gemessen mit der Clark-Elektrode.

Für die Auswertung der Aktivitätsmessung der Hydrogenase wurde in die gemessene Kurve (Abbildung 11) ein Steigungsdreieck an die steilste Steigung gelegt und die Aktivitätsrate in nmol H₂ / ml Zellsuspension (a/b) durch folgende Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Steigung} * \text{Schreibergeschwindigkeit (cm/min)} * 77,4 \text{ nmol} * \text{Verdünnung}}{\text{Eichung (cm)} + \text{Verstärkung des Schreibers}}$$

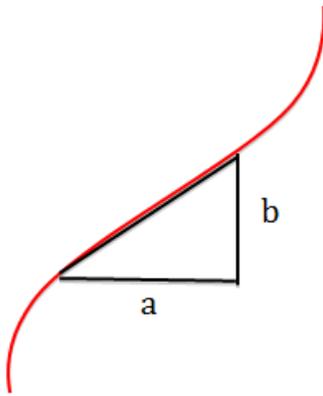


Abbildung 11: Schematische Darstellung eine Messkurve für die Aktivitätsmessung der Hydrogenase.

3.6.2 Direkte Wasserstoffmessungen in Zellkulturen

Für weitere fermentative Wasserstoffmessungen wurden Wasserstoff-Mikrosensoren H₂-500 von Unisense (Aarhus, Dänemark) verwendet. Bei den Sensoren handelt es sich um Clark-Typ Sensoren, die den Wasserstoff-Partialdruck messen. Das Prinzip beruht auf der Diffusion von Wasserstoff durch eine Membran zu einer Platin-Anode, an der Wasserstoff oxidiert wird. Die Anode ist gegen eine innere Ag-/ AgCl⁻Kathode polarisiert. Das sich daraus ergebende Sensorsignal kann mit Hilfe der Unisense Mikrosensor Multimeter im Picoamperemeter (pA)-Bereich gemessen werden. Da die Wasserstoffkonzentrationen in natürlichen Systemen in der Regel sehr gering sind, ist eine niedrige Nachweisgrenze des Sensors wichtig. Allgemeinen liegt die Nachweisgrenze der Sensoren nahe 0,02% Wasserstoff. Zusätzlich zu den Wasserstoffsensoren wurde ein Sauerstoffsensor eingesetzt, um zu prüfen, ob die Kulturen anaerob waren.

3.6.2.1 Vorbereitung der Kulturen

Für die Wasserstoffmessungen in den Zellkulturen wurden Kulturen bis zu einer OD₇₅₀ von mindestens 3 in Knieseröhren angezogen (3.2.2). Am Tag der Messung wurden die Kulturen sedimentiert, mit BG110 (Tabelle 3) gewaschen und anschließend in BG11₀ + Arginin (5 mM) + Glukose (10 mM) resuspendiert. Die OD₇₅₀ wurde auf 2, eingestellt um eine Vergleichbarkeit der Kulturen zu gewährleisten.

3.6.2.2 Fermentative Wasserstoffproduktion

Die Messungen mit den Sensoren erfolgten nach Herstellerangaben („Oxygen sensor user manual Copyright © 2014 Unisense A/S Version January 2014“ und „Hydrogen sensor user manual Copyright © 2014 Unisense A/S Version January 2014“). Zunächst wurden die Sensoren an das Multimeter (Unisense 4-Channel Microsensor Multimeter) angeschlossen und polarisiert. Die Wasserstoffsensoren wurden mit +0,8 V und der Sauerstoffsensor mit -0,8 V polarisiert.

Die Polarisation wurde über mindestens 2 h durchgeführt, da die Sensoren einige Zeit brauchen, um ein stabiles Signal abzugeben. Erst, wenn für mindestens 10 min ein stabiles Signal erkennbar war, wurden die Sensoren kalibriert. Bei der Kalibrierung der Sensoren wurde eine zwei-Punkt-Kalibrierung angewandt. Für die Kalibrierung der Wasserstoffsensoren wurden die Sensoren zunächst in N_2 begastes Medium gehängt. War die gemessene Spannung konstant, wurde so der Nullpunkt bestimmt. Für die Bestimmung des zweiten Punktes wurden 30 ml des Mediums in einem 50 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht) für 10 min mit H_2 begast. Anschließend wurde das H_2 gesättigte Medium zu 270 ml Medium im Becherglas hinzugegeben, durch leichtes Schwenken vermischt und die Sensoren hineingehalten. Anhand der im Manual vorhandenen Tabelle (s. Anhang Seite 131) konnte so, unter Berücksichtigung der Temperatur, angegeben werden, wie viel Wasserstoff pro ml in dem Kalibrationsgefäß waren. Dieser Wert wurde dann für die Sensoren angegeben. Zur Kalibrierung des Nullwertes des Sauerstoffsensors wurde der Sensor in eine 0,1 M Natriumascorbat- und NaOH-Lösung (~ 2 g Natriumascorbat in 100 ml 0,1M NaOH) gehalten. Für die weitere Kalibrierung wurde der Sensor in eine mit Raumluft begaste Kalibrierungskammer mit sauerstoffgesättigtem Wasser gehalten und so der zweite Punkt bestimmt. Der Wert des im Wasser gelösten Sauerstoffs errechnete sich ebenfalls aus der im Anhang angegebenen Tabelle (s. Anhang Seite 132), unter Berücksichtigung der Temperatur. Aus den so ermittelten Kalibrierungspunkten errechnete das Programm „Unisense Sensor Trace Basic“ (Version 3.2.5) eine Eichkurve, die zur Umrechnung der Messwerte in μmol genutzt wurde. Nach ausreichender Kalibrierung wurden die Sensoren gründlich gereinigt. Hierfür wurde die Schutzkappe der Sensoren vorsichtig entfernt, die Elektroden sowie die Schutzkappen vorsichtig mit 70% EtOH (v/v) und H_2O gereinigt und wieder zusammengesetzt. Dieser Schritt ist besonders wichtig, um Kontaminationen der Kulturen zu vermeiden. Die Sensoren wurden in die Kulturen gehängt, so dass die Spitze des Sensors in die Kultur reichte. In der Wildtyp Kultur wurde zusätzlich zu der Wasserstoffproduktion als Kontrolle der Sauerstoffgehalt gemessen. Die Kulturen wurden jeweils 3 Tage hintereinander für 12 h im Dunkeln gemessen. Um zu gewährleisten, dass die Kulturen anaerob waren, wurden sie vor Beginn jeder Messung für 10 min mit N_2 begast. Die Daten wurden über das Multimeter mittels der SensorTrace Logger Software (SenSorTrace Suite Unisense A/S Version January 2015) aufgezeichnet.

3.6.2.3 Auswertung

Zur Auswertung der Logger Daten wurde die Datei in eine Excel kompatible csv Datei umgewandelt und mit Excel ausgewertet. In Abbildung 12 ist eine beispielhafte Messung dargestellt. In rot ist die Kurve des Sauerstoffsensors und in blau die des Wasserstoffsensors dargestellt.

Die Rate der Wasserstoffproduktion errechnet sich aus der Steigung (a/b in Abbildung 12). Außerdem wurde über die Höhe von c (Abbildung 12) die maximale Produktion von fermentativem Wasserstoff errechnet und auf die OD₇₅₀ der Kultur bezogen.

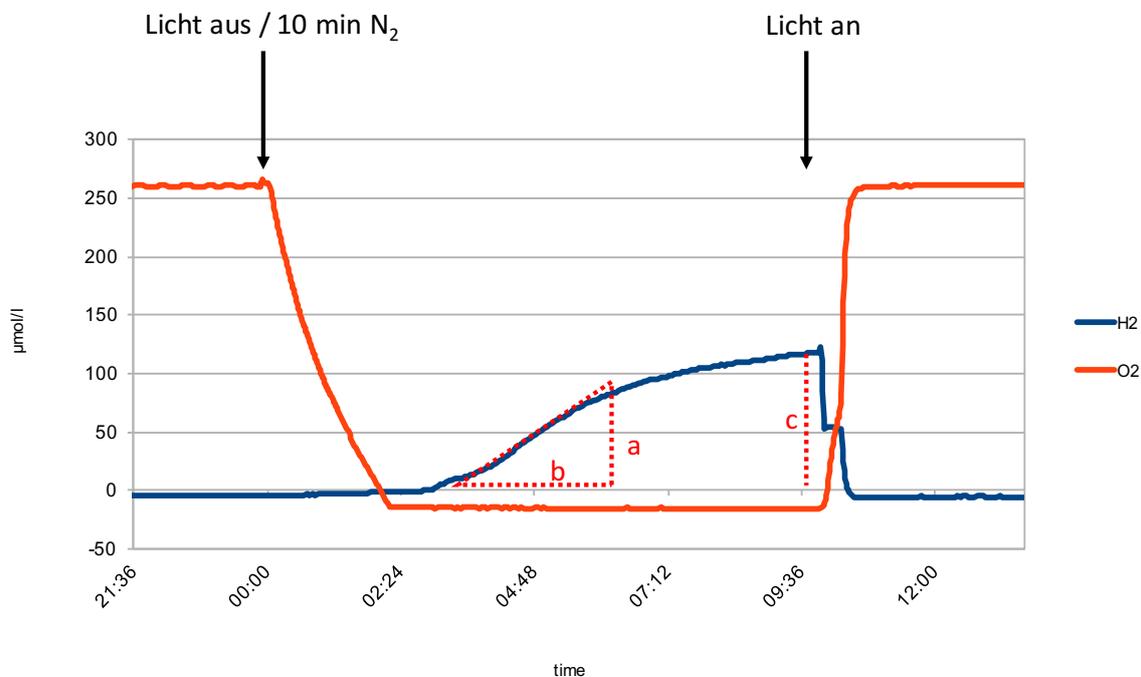


Abbildung 12: Schematische Darstellung der fermentativen Wasserstoffmessung mit Unisense-Sensoren.

3.7 Proteinanalysen

Um herauszufinden, ob es sich bei den putativen Eda-Proteinen tatsächlich um eine KDPG-Aldolase handelt, wurden die jeweiligen Leserahmen der kodierenden Gene aus *Synechocystis* und *H. vulgare* amplifiziert und überexprimiert. Nach der Expression der Enzyme wurden die isolierten Enzyme zur Verifizierung mittels SDS-PAGE denaturiert, aufgetrennt und anhand ihrer Größe überprüft (3.7.3). Zur genaueren Kontrolle wurde ein Western-Blot eingesetzt. Außerdem wurde ein Enzymtest durchgeführt, wobei das Protein zunächst überexprimiert und die Aktivität anschließend über einen gekoppelten Enzymtest bestimmt wurde.

3.7.1 Überexpression

Die Überexpression der KDPG-Aldolase (Eda) erfolgte in zwei verschiedenen Organismen. Die Expression der KDPG-Aldolase aus *Hordeum vulgare* erfolgte in *E. coli* und die Expression der KDPG-Aldolase aus *Synechocystis* erfolgte in *Synechocystis* selbst.

3.7.1.1 Expression der KDPG-Aldolase in *E. coli*

Als Expressionssysteme in *E. coli* dienten die Vektoren pet22b+ und pMAL-pIII (s. Tabelle 12). Der Expressions-Vektor pet22 b+ (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt) besitzt eine Ampicillinresistenz und einen T7 Promotor.

Der pMal-pIII Expressionsvektor trägt eine Ampicillinresistenz sowie die Sequenz für das Maltosebinde-Protein (MBP) *malE*. Das Fusionsprodukt aus dem exprimierten *eda* und *malE* ist stabiler und erhöht die Löslichkeit des Proteins. Es kann von *E. coli* über die Transportsequenz von MalE leichter ins Periplasma ausgeschieden werden. Das MBP kann mit Hilfe des Factor Xa wieder abgespalten werden.

Die Leserahmen der vermuteten KDPG-Aldolasen wurden für die Überexpression zunächst aus cDNA einer jungen *Hordeum vulgare* Pflanze (BAJ87430; AK356212, freundlicherweise bereitgestellt von Mirl Trösch, Arbeitsgruppe von Prof. Karin Krupinska, Botanisches Institut, Universität Kiel) und aus genomischer DNA von *Synechocystis* via PCR amplifiziert. Dem Leserahmen wurde zusätzlich eine C-Terminale His-Tag (repetitive Histidinsequenz) Sequenz angehängt und das Konstrukt in den pCR2.1-TOPO® zwischenkloniert und anschließend in den pet22 und den pMAL Vektor (Tabelle 12) ligiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 10 dargestellt. Zur Prüfung der Sequenz wurde das Konstrukt bereits im TOPO Vektor sequenziert (3.4.9). Die Expression erfolgte in *E. coli* BL21 und BL21 (pLys3). Es wurden zunächst 3 ml Vorkulturen über Nacht (37 °C, 180 rpm) angezogen. Anschließend wurden 200 ml LB + Ampicillin und 1% Glukose (v/v) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen und anschließend mit 0,4 mM IPTG für 12 h induziert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 4°C und 10621 g (Eppendorffzentrifuge 5804R) sedimentiert. Das Pellet wurde in Lysepuffer resuspendiert und mit 1 mg/ml Lysozym 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mittels Ultraschall 6x 10 s auf Eis lysiert. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurde das Homogenat bei 20817 g (Eppendorff Zentrifuge 5804R) für 15 min zentrifugiert und der Überstand wurde auf eine Ni-NTA-Säule geladen. Anschließend wurde die Säule mit dem 4 x des Volumens (cvs) Waschpuffer gewaschen und das Protein mit 6x 0,5 cvs Elutionspuffer von der Säule in 0,5 ml Fraktionen eluiert. Um zu verhindern, dass das Enzym beschädigt wurde, wurde die Proteinaufreinigung im Kühlraum bei 6°C durchgeführt. Um zu prüfen, ob das Protein erfolgreich isoliert werden konnte, wurde ein Aliquot von 10 µl auf ein analytisches Gel aufgetragen (3.7.3) und mit Coomassie angefärbt (3.7.4).

Tabelle 18: Verwendete Lösungen zur Proteinaufreinigung.

Name	Zusammensetzung
Lysepuffer, pH 8	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol

Waschpuffer, pH 8	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol
Elutionspuffer, pH 8	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM Imidazol

Zur Abspaltung des Maltosebindepoteins mit der Factor Xa Protease (NEB, Ipswich, MA, USA) wurde 1 µg Factor Xa zu 50 µg des Fusionsproteins in einem Ansatz von 50 µl (mit 20 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 8) gegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 6°C inkubiert. Um zu sehen, ob das Fusionsprotein geschnitten wurde, wurde ein Aliquot von 5 µl auf ein analytisches Gel aufgetragen (3.7.3) und mit Coomassie angefärbt (3.7.4). Um das Maltosebindepotein und die putative KDPG-Aldolase voneinander zu trennen, wurde eine Gelfiltrations-Chromatographie (GFC) durchgeführt, hierbei werden Proteine anhand ihrer Größe durch Diffusion getrennt. Die GFC wurde mit 2 ml Sephadex® G-25 (GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg) in 5 ml Säulen (Pierce™ Disposable Columns, Thermo Fisher SCIENTIFIC; Waltham, MA, USA) durchgeführt. Die putativen KDPG-Aldolasen haben eine Größe von ca. 20-25 kDa, das MBP eine Größe von ca. 40 kDa, die porösen Polymere in der Sephadex-Säule erlauben kleineren Molekülen einzudringen und werden daher bei der Elution stärker zurückgehalten als große, die durch die Zwischenräume fließen können. Aus diesem Grund werden große Moleküle in früheren Fraktionen des Eluats erwartet als kleinere. Die Säule wurde mit dem Ansatz des Verdaus beladen und die Proteine anschließend mit 5 ml des Lysepuffer (Tabelle 18 - ohne Imidazol) eluiert. Die Fraktionen wurden in 500 µl Aliquots aufgefangen. Um zu prüfen in welcher Elutionsfraktion die putative KDPG-Aldolase ist, wurden je 10 µl auf ein analytisches Gel aufgetragen (3.7.3) und eine Silberfärbung (3.7.5) durchgeführt.

3.7.1.2 Expression in *Synechocystis*

Zur Überexpression der KDPG-Aldolase (Eda) aus *Synechocystis* (SII0107) wurde der für Eda kodierende Leserahmen per PCR aus genomischer DNA von *Synechocystis* amplifiziert. An die Nukleotidsequenz wurde per PCR ein P_{cpc560}Promotor am 5'Ende und ein T_{rbc}Terminator am 3'Ende fusioniert und in den mit XhoI aufgeschnittenen pSM Vektor (s. Tabelle 12) ligiert. Der ligierte Vektor wurde anschließend in die *eda* Mutante transformiert. Zur Expression wurden die Zellen in BG11 mit Kanamycin angezogen und bis zu einer OD₇₅₀ von ca. 2 angezogen und anschließend für ca. 12 h die Lichtintensität von 65 µE m⁻² s⁻¹ auf 100 µE m⁻² s⁻¹ erhöht.

3.7.2 Präparation von Gesamtextrakt

Zunächst wurden die Zellkulturen für 5 min bei 18407 g (Eppendorf Zentrifuge 5424 Rotor: FA-45-24-11, Eppendorf, Hamburg) sedimentiert und der Überstand verworfen.

Anschließend wurde das Zellpellet in 200-500 ml KPi Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,8) resuspendiert (die Menge an KPi Puffer variiert je nach Größe des Zellpellets). Anschließend wurden Glasperlen (Durchmesser 0,17-0,18 mm) hinzugegeben, sodass etwa 2 mm Flüssigkeit über den Perlen blieben. Die Reaktionsgefäße wurden auf Eis gestellt und dann für 10 min im Kühlraum gevortext.

Um die Zelltrümmer zu entfernen, wurde die Suspension 1 min bei 803 g (Eppendorfszentrifuge 5804R) zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um Kontaminationen durch die Glasperlen zu verhindern, wurden die Überstände erneut für 10 min bei 1301 g (Eppendorfszentrifuge 5804R) zentrifugiert. Der saubere Überstand wurde nun in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die weiteren Analysen verwendet.

3.7.3 SDS Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von denaturierten Proteinen aus dem Gesamtextrakt erfolgte mittels diskontinuierlicher Elektrophorese, verändert nach Laemmli und Schrägger (Laemmli 1970); (Schägger & Jagow 1987); (Schägger 2006). Natriumdodecylsulfate (SDS)-Gele enthaltenen 0.1% SDS (w/v) und 1 M Tris (pH 8.5). Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Verwendete Lösungen für SDS-PAGE.

Name	Zusammensetzung
Lösung A	30% Acrylamid (w/v) 0,8% Bisacrylamid (w/v)
Lösung B	3 M Tris/HCl (pH 8.5) 0.3% SDS (w/v)
Laufpuffer	100 mM Tris (pH 8,25) 100 mM Tricine 0,1% SDS (w/v)
Probenpuffer	150 mM Tris/HCL (pH 7) 750 mM DTT 12% SDS (w/v) 30% Glycerin (w/v) 0,05 Coomassie- brilliant blue G-250 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

Die Acrylamid Konzentration im Sammelgel betrug 4% (w/v) und im Trenngel-Gel 16.5% (w/v). Die Zusammensetzung der verwendeten Gele ist in Tabelle 20 dargestellt. Vor der SDS-PAGE wurden die Proben in Probenpuffer (Tabelle 19) für 10 min bei 95°C erhitzt.

Tabelle 20: Zusammensetzung der SDS-Gele.

Sammelgel	1,2 ml Lsg. A 3 ml Lsg. B 4,8 ml H ₂ O TEMED: 0,02 ml APS (10%) (w/v): 0,1 ml
-----------	--

Trenngel	8 ml Lsg. A 5 ml Lsg.B 2 ml H ₂ O TEMED: 0,005 ml APS: 0,05 ml
----------	---

Die Gele wurden in vertikalen Gel-Kammern (11 x 14 x 0,1 cm) eingespannt (Midigel System, Biometra, Göttingen) und die Kammer mit Laufpuffer (Tabelle 19) gefüllt. Anschließend wurden die Gele mit den Proben beladen. Die Elektrophorese wurde bei 30 V (Standard Power Pack P25, Biometra, Göttingen) durchgeführt, bis die Proben vollständig in das Gel eingelaufen waren. Anschließend wurde die Spannung auf 90 V erhöht. Als Marker wurde der PageRuler prestained Protein-Leiter (10 bis 130 kDa, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

3.7.4 Coomassie-Färbung

Zur weiteren Analyse der aufgetrennten Proteine wurde das Gel zum Anfärben aus der Apparatur und den Glasplatten genommen und in eine verschließbare Plastikbox gelegt. Es wurde so viel Färbelösung (Tabelle 21) hinzugegeben, bis das Gel bedeckt war und über Nacht leicht schüttelnd inkubiert. Zum Entfärben wurde das Gel zweimal mit Entfärber (Tabelle 21) gespült und anschließend schüttelnd inkubiert. Der Entfärber wurde so oft gewechselt, bis die Banden klar auf einem entfärbten Hintergrund zu erkennen waren.

Tabelle 21: Verwendete Lösungen bei der Coomassie Färbung.

Name	Zusammensetzung
Färbelösung	0,8% (w/v) Coomassie brilliant blue G-250 200 ml Methanol 200 ml H ₂ O 40 ml Eisessig
Entfärber	250 ml Methanol 100 ml Eisessig 650 ml H ₂ O

3.7.5 Silber-Färbung

In einigen Fällen reichte die Coomassiefärbung nicht aus, um einzelne Proteine nachzuweisen. In diesem Fall wurde die sensitivere Methode der Silberfärbung genutzt, um die aufgetrennten Proteine nachzuweisen. Bei dieser binden Silberionen an anionische Aminosäurereste (Asparaginsäure, Glutaminsäure und Cystein) und werden anschließend reduziert. Die Nachweisgrenze liegt bei weniger als 10 ng/Bande. Die Methode wurde verändert nach Blum durchgeführt (Blum *et al.* 1987). Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 22 aufgeführt. Zunächst wurde das Gel für mindestens 1,5 h in Fixierlösung geschwenkt, sodass 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. Nach zwei kurzen Waschschritten für je 20 s in H₂O wurde das Gel für 30 min in der Silber-Nitratlösung inkubiert. Es folgten zwei kurze Waschschrritte 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.

Tabelle 22: Verwendete Lösungen bei der Silberfärbung.

Name	Zusammensetzung
Fixierlösung	30% (v/v) EtOH 10% (v/v) Essigsäure
Thiosulfatlösung	200 mg/l Na ₂ S ₂ O ₃ * 5 H ₂ O
Silbernitratlösung	2 g/l AgNO ₃
Entwickler	30 g/l Na ₂ CO ₃ 700 µl/l Formaldehyd 10 mg/l Na ₂ S ₂ O ₃ * 5 H ₂ O
Stopplösung	50 g/l Tris 25 ml/l Essigsäure

3.7.6 Western-Blot

Für eine genauere quantitative Analyse der Proteine wurde ein Semi-Dry-Westernblot durchgeführt. Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 23 aufgelistet.

Tabelle 23: Verwendete Lösungen für den Westernblot.

Name	Zusammensetzung
TBS/Transferpuffer	2,93 g Glycin 5,81 g Tris 0,375 g SDS 200 ml Methanol
TTBS	0,05% (v/v) Tween20 in TBS
Ausgangspuffer	5x TBS 146,12 g NaCl 12,12 g Tris/HCl pH 7,5 auf 1 l H ₂ O auffüllen
Absättigungspuffer	50 g BSA auf 1 l 1x TBS auffüllen
Spezifische Antikörper Lösung	10g BSA spezifischer Antikörper
Tween Puffer	1ml Tween 20 auf 1 l 1x TBS auffüllen
Detektionslösung I	2,6 µM Luminol (3-Aminophtalhydrazid) 400 µM p-Coumarsäure 100 mM Tris (pH 8,5)
Detektionslösung II	0,075% (v/v) H ₂ O ₂ 100 mM Tris (pH 8,5)

Für die Analyse wurden zunächst das Sammelgel und die Taschen vom SDS-Gel entfernt. Anschließend wurde das Gel für 15-30 min in den Transferpuffer gelegt. In dieser Zeit wurde die Blotapparatur (Fast Blot B34, Biometra, Göttingen) vorbereitet, indem die Graphitplatten des Blots mit H₂O bidest befeuchtet wurden. Zusätzlich wurden für das Gel 6 Whatmanpapiere und eine Nitrocellulose Transfer Membran (Porengröße 0,1 µm, Whatman GmbH, Dassel) in etwa der Größe des Gels zugeschnitten. Der Blot wurde, wie in Abbildung 13 dargestellt, folgendermaßen aufgebaut (von unten nach oben): zunächst 3 Whatmanpapiere, anschließend das Gel, dann die Membran und erneut 3 Whatmanpapiere.

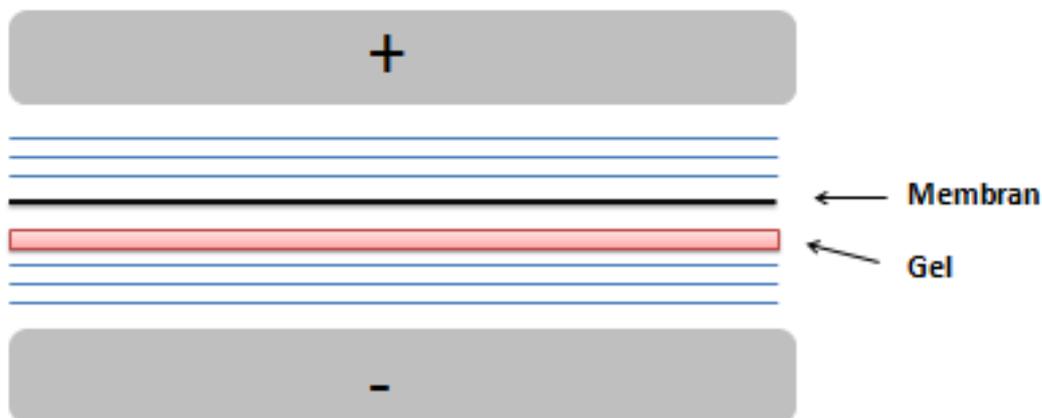


Abbildung 13: Aufbau des Semi-Dry Western-Blots: Zwischen den Graphitplatten liegen 3 Whatmanpapiere, das Gel, dann die Membran und erneut 3 Whatmanpapiere (von unten nach oben).

Die Membran wurde für 30 min bei 0,8 mA/cm² geblottet. Bei diesem Schritt werden die Proteine auf der Membran immobilisiert. Nach dem Blotten wurde die Apparatur wieder auseinander gebaut, die Membran vorsichtig abgenommen und kurz in TBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran 1 h in TBS mit 5% (w/v) Blocking Reagenz (BioRad Milchpulver) geschüttelt (2 g Milchpulver in 40 ml) und 2 x 5 min in TTBS gewaschen, um die Reste des Milchpulvers wieder zu entfernen. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit dem primären Antikörper (1:1000 in TTBS mit 1% (w/v) Milchpulver) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 4-5x 5 min mit TTBS gewaschen, dann 2 h mit dem sekundären Antikörper (*anti-rabbit*) inkubiert (Verdünnung: 1:10000 = 2 µl in 20 ml TTBS mit 1% (w/v) Milchpulver = 0,2 g, für eine Membran) und anschließend noch 3-5x 5 min in TTBS und 2x 5 min in TBS gewaschen. Zum Nachweis des Protein-Antikörper-Komplexes wurde die Membran in einen Plastikbeutel gelegt und mit 2 ml Substratlösung (Lösung I und Lösung II 1:1) (Tabelle 23) für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige Lösung verworfen und die Membran in einem neuen Beutel eingeschweißt.

Die Peroxidase-Aktivität wurde 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.

3.7.7 Messung der Enzymaktivität von *Eda*

Zur Aktivitätsbestimmung von *Eda* aus *Synechocystis* sowie aus *H. vulgare* wurde ein Enzymtest verwendet. Der Test basiert dabei auf einem gekoppelten Enzymtest. Hierbei wird 2-Keto-3-Deoxy-6-Phosphogluconat (KDPG) unter Einwirkung von *Eda* in Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) umgesetzt. Bei dieser Reaktion entsteht Pyruvat. Die Reaktion wurde mittels Laktat-Dehydrogenase an die Oxidation von NADH gekoppelt. Wie viel Enzym eingesetzt wurde, wurde im Nachhinein über die Methode nach Bradford bestimmt (3.3.5).

Die isolierte KDPG-Aldolase aus *H. vulgare* wurde in 1 ml Assays eingesetzt. Hierfür wurden 50-200 µl der Elutionsfraktion mit der Aldolase zusammen mit Lysepuffer (auf 1 ml aufgefüllt) (Tabelle 18) in eine (Halb-Mikro-Küvette, PMMA, Acryl, Höhe: 45 mm, Schichtdicke: 10 mm; Sarstedt, Nümbrecht) überführt. In die Küvette wurden zusätzlich 10 mM NADH und 5 U Lactatdehydrogenase zugegeben und mit einem Stäbchen gut verrührt. Die Messung bei 366 nm wurde gestartet und nach 40-60 s (wenn der Wert sich nicht mehr verändert hat) wurde KDPG in verschiedenen Konzentrationen (0,02 mM – 8 mM) in 100 mM Tris, 150 mM NaCl (pH 8) bei 32°C hinzugegeben. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von KDPG gestartet und der Verbrauch an NADH wurde bei 366 nm photometrisch gemessen.

Die Messungen der KDPG-Aldolase aus *Synechocystis*, die in *Synechocystis* überexprimiert wurde, erfolgte im Zellhomogenat und im zellfreien Extrakt nach der Proteinaufreinigung über eine Ni-NTA-Säule (His-Select[®] Nickel Affinity Gel; Sarstedt, Nümbrecht) mit Hilfe des His-Tags. Für die Messung wurden die Zellen des mutierten Δeda Stammes und des Überexpressionsstammes $\Delta edaCpc::edaHIS_{Synechocystis}$ aufgebrochen (siehe 3.7.2). Für die Messung im Gesamtextrakt wurde das Homogenat frisch für KDPG-Aldolase-Messungen verwendet. 50-100 µl Aliquots des Extraktes wurden mit verschiedenen KDPG-Konzentrationen (0,02 bis 0,7 mM) für 30 min inkubiert. Nach 30 min wurden die Proben für 5 min bei 20817 g (Eppendorf Zentrifuge 5424) zentrifugiert, um die Membranen zu entfernen. Im Homogenat wurde Pyruvat erzeugt, welches anhand einer Absorptionsänderung bei 366 nm nach Zugabe von 10 mM NADH und 5 U Lactatdehydrogenase bestimmt wurde. Der Extrakt der *eda* Mutante wurde als Kontrolle verwendet. Um auszuschließen, dass die beobachtete Abnahme von NADH einen anderen Hintergrund hat als die Umsetzung von KDPG durch die KDPG-Aldolase, wurde die Reaktion in einer Zeitreihe gemessen, wobei die Inkubationszeit von 10 min, in 10 min Schritten auf 2 h erhöht wurde. Außerdem wurde die eingesetzte Enzymmenge von 50, 100, 150 und 200 µl überprüft.

Des Weiteren wurde die Aktivität der KDPG-Aldolase aus *Synechocystis* im zellfreien Extrakt bestimmt. Hierfür wurde das Homogenat von Δ edaCpc::edaHIS_{Synechocystis} für 30 min bei 20817 g und 4°C (Eppendorf Zentrifuge 5424) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Ni-NTA-Säule (HIS-Select® Nickel Affinity Gel; Sarstedt, Nümbrecht) gegeben. Anschließend wurde die Säule mit dem 4x des Volumens (cvs) Waschpuffer gewaschen. Das Protein wurde mit 6x 0,5 cvs Elutionspuffer von der Säule in 0,5 ml Fraktionen eluiert. Um eine Denaturierung des Proteins zu verhindern, wurde die Proteinaufreinigung im Kühlraum bei 6°C durchgeführt. Um zu prüfen, ob das Protein erfolgreich isoliert werden konnte, wurde ein Aliquot von 10 µl auf ein analytisches Gel aufgetragen (3.7.3) und mit Coomassie angefärbt (3.7.4). Das aufgereinigte Protein wurde direkt in den Enzymtest eingesetzt. Hierfür wurden 5-20 µl der Elutionsfraktion mit der Aldolase zusammen mit Lysepuffer (auf 1 ml aufgefüllt) (Tabelle 18) in eine (Halb-Mikro-Küvette, PMMA, Acryl, Höhe: 45 mm, Schichtdicke: 10 mm; Sarstedt, Nümbrecht) gegeben. In die Küvette wurden zusätzlich 10 mM NADH und 5 U Lactatdehydrogenase zugegeben und mit einem Stäbchen gut verrührt. Die Messung bei 366 nm wurde gestartet und nach 40-60 s (wenn der Wert sich nicht mehr verändert hat) wurde KDPG in verschiedenen Konzentrationen (0,02 mM – 8mM) in 100 mM Tris, 150 mM NaCl (pH 8) bei 32 ° C hinzugegeben.

3.8 Bioinformatische Untersuchungen

Alle für diese Arbeit verwendeten Datenbanken und Programme sind nachfolgend angeführt.

3.8.1 Proteinstrukturanalyse

Zur Veranschaulichung einiger Kandidatengene wurde eine Sekundär-Struktur-Vorhersage mittels RaptorX erstellt (<http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/predict.>; (Källberg *et al.* 2012), Stand Jan. 2015). Hierfür wurde auf der Seite unter dem Punkt „Submit RaptorX Structure Prediction“ die Proteinsequenz im FASTA-Format angegeben. Nach einigen Tagen erhielt man das Ergebnis der Analyse per Post.

3.8.2 Vorhersage einer Ziellokalisierung

Um zu prüfen, ob das Kandidatengen ein Lokalisationspeptid trägt, wurden verschiedene Programme zur subzellulären Lokalisation von eukaryotischen Proteinen verwendet (s. Kapitel 3.8.4). Ein Beispiel für ein verwendetes Program ist TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>; Stand Jan. 2015). Bei der Vorhersage wurde die Aminosäuresequenz im FASTA-Format auf der Webseite eingegeben. Ein Algorithmus berechnet aus der angegebenen Sequenz mögliche Lokalisationen, wobei zwischen Chloroplasten-Transitpeptid (CTP), mitochondrialen Zielpeptiden (mTP) oder Signalpeptiden (SP) unterschieden wird (Emanuelsson *et al.* 2000).

3.8.3 *Verwendete Datenbanken*

Cyanobase: <http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

NCBI microbes: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi

NCBI proteins: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi>

GOS: <http://camera.calit2.net/> KEGG: <http://www.genome.jp/kegg/>

<http://biocyc.org>

3.8.4 *Verwendete Programme*

SnapGene® software (GSL Biotech; snapgene.com)

BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Nebcutter V2.0: <http://tools.neb.com/NEBcutter2>

<http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/predict/>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>

<http://ipsort.hgc.jp>

<http://aias.biol.uoa.gr/PredSL/index.html>

<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>

4 Ergebnisse

4.1 Aufklärung der Rolle der Ferredoxine im Elektronentransports bei der Wasserstoffproduktion in *Synechocystis*

Ferredoxine (Fdx) kommen in vielen verschiedenen Organismen vor. Es handelt sich dabei um Proteine, die ein Eisen-Schwefelcluster besitzen, mit dessen Hilfe sie Elektronen auf verschiedene Stoffwechselwege verteilen können. *Synechocystis* ist in der Lage, mit Hilfe der bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenase Wasserstoff zu produzieren. In unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass Ferredoxin unter fermentativen Bedingungen ein wichtiger Elektronenüberträger für die Hydrogenase ist (Gutekunst *et al.* 2014). *Synechocystis* besitzt neun verschiedene Ferredoxingene, wobei diese sich durch den Aufbau der Eisen-Schwefelcluster unterscheiden (Cassier-Chauvat *et al.* 2014). Es gibt bakterielle Ferredoxine mit einem [2Fe-2S]-Cluster und pflanzliche Ferredoxine mit einem [4Fe-4S]-Cluster (Sticht & Rösch 1998). Bei denen in dieser Arbeit erstellten Mutanten handelt es sich um *knock-out* Mutanten zweier pflanzlicher Ferredoxine.

4.1.1 Ferredoxin-Mutanten

In dieser Arbeit wurden zwei neue Ferredoxin-Mutanten erstellt. Zu Beginn der Arbeit wurden sie $\Delta fed1$ (*slr2059*) und $\Delta fed2$ (*slI0662*) benannt. Diese Benennung wurde zur besseren Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten zu Ferredoxinen jedoch angepasst (Cassier-Chauvat *et al.* 2014), sodass die Mutanten im Weiteren wie folgt benannt wurden: $\Delta fed1$ (*slr2059*) = $\Delta fdx9$ und $\Delta fed2$ (*slI0662*) = $\Delta fdx7$. Zur Erstellung der Mutanten wurden zunächst, wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, mittels PCR *knock-out* Konstrukte erstellt. Für das Konstrukt zur Erzeugung von $\Delta fdx9$ wurden die Primer Fed1.1-Fed1.in1 und Fed1.In2-Fed1.2 (s. Tabelle 10) verwendet. Für das Konstrukt für $\Delta fdx7$ wurden die Primer Fed2.1-Fed2.in1 und Fed2.In2-Fed2.2 (s. Tabelle 10) verwendet. Die Mutante $\Delta fdx9$ wurde mit Hilfe der Resistenzkassette Kanamycin selektiert und die *fdx7*-Mutante mit der Spectinomycin Resistenzkassette. Zusätzlich zu den beiden Einzelmutanten wurden Doppelmutanten erstellt: $\Delta fdx9/\Delta isiB$, $\Delta fdx7/\Delta isiB$ und $\Delta fdx7/\Delta fdx9$. Bei *isiB* (*slI0248*) handelt es sich um Flavodoxin, das ebenfalls als Elektronenüberträger für die Hydrogenase fungieren kann (Gutekunst *et al.* 2014). Zur Konstruktion wurden die Konstrukte für $\Delta fdx9$ und $\Delta fdx7$ mit den homologen Gensequenzen sowie der Resistenzkassetten in die bereits vollständig segregierte *isiB*-Mutante eingebracht. Um zu prüfen, ob die Mutanten vollständig segregiert waren, wurde eine PCR durchgeführt mit den außenliegenden Primern (Fed1.2-Fed1.2 und Fed2.1-Fed2.2), die für die Erstellung der *knock-out* Konstrukte benutzt wurden. Durch die Insertion der Resistenzkassetten verändert sich die Größe des PCR-Produktes (Abbildung 14).

Die erwarteten Bandengrößen der PCR-Produkte sind für *fdx9*: WT: 953 bp, Δ *fdx9*: 1754 bp und für *fdx7*: WT: 969 bp und Δ *fdx7*: 2317 bp. Die PCR-Produkte wurden über ein 0,8%-iges Agarosegel aufgetrennt (Abbildung 15).



Abbildung 14: (A) *fdx9* im Wildtyp von *Synechocystis* und das PCR knock-out Konstrukt für Δ *fdx9* und (B) *fdx7* im Wildtyp von *Synechocystis* und das PCR knock-out Konstrukt für Δ *fdx7* mit den jeweiligen Primerbindestellen.

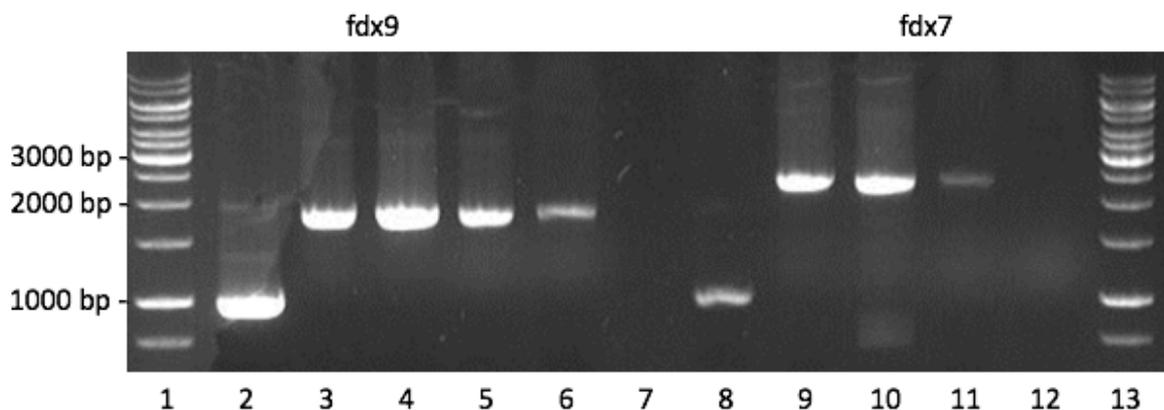


Abbildung 15: PCR mit genomischer DNA von *Synechocystis* WT und verschiedenen Mutanten zur Verifizierung, dass *fdx9* und *fdx7* in allen Genomkopien der gezeigten Mutanten ausgeschaltet wurde. Die Taschen des Gels sind wie folgt beladen: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Spur 1); Wt (Spur 2); Δ *fdx9*-1 (Spur 3); Δ *fdx9*-2 (Spur 4); Δ *isiB*/ Δ *fdx9*-1 (Spur 5); Δ *isiB*/ Δ *fdx9*-2 (Spur 6); leere Spur (Spur 7); Wt (Spur 8); Δ *fdx7*-1 (Spur 9); Δ *fdx7*-2 (Spur 10); Δ *isiB*/ Δ *fdx7*-1 (Spur 11); Δ *isiB*/ Δ *fdx7*-2 (Spur 12) GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Spur 13). Erwartete Bandengröße für *fdx9*: WT: 953 bp und für Δ *fdx9*: 1754 bp. Erwartete Bandengröße für *fdx7*: WT: 969 bp und für Δ *fdx7*: 2317 bp.

In Abbildung 15 ist zu erkennen, dass alle Gene in den verschiedenen Ferredoxin-Mutanten vollständig segregiert sind und diese somit keine Wildtypgenkopie mehr tragen.

4.1.2 Wachstum der Ferredoxin-Mutanten

Zur Überprüfung, ob die Mutanten einen Phänotyp im Wachstum zeigten, wurde das Wachstum der Kulturen unter autotrophen Bedingungen gemessen. Hierbei wurde bei den Kulturen über einen Zeitraum von 8 Tagen alle 24 h die OD_{750} bestimmt. Bei einer Messung wurden jeweils 3 parallele Kulturen angezogen und gemessen, aus denen ein Mittelwert und die Standardabweichung berechnet wurde. In Abbildung 16 ist eine repräsentative Messkurve des autotrophen Wachstums der Ferredoxin-Mutanten dargestellt, insgesamt wurde die Kurve dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

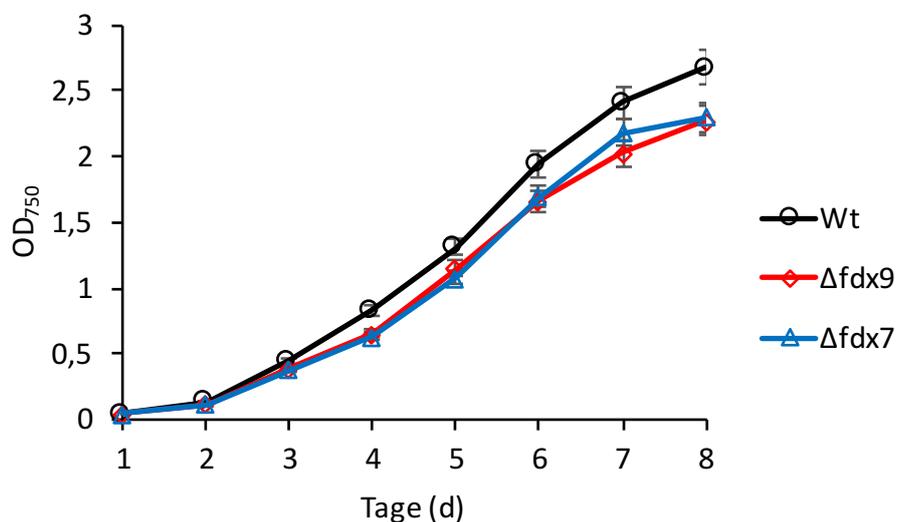


Abbildung 16: Autotrophes Wachstum der Ferredoxin-Mutanten $\Delta fdx9$ und $\Delta fdx7$ im Vergleich zum Wildtyp.

Wie in Abbildung 16 zu sehen ist zeigten die Mutanten, in denen je eins der Ferredoxine (*fdx9* oder *fdx7*) ausgeschaltet wurde, ein leicht gehemmtes Wachstum. Im Vergleich zum Wildtyp ist jedoch kein stark ausgeprägter Phänotyp im Wachstum zu erkennen.

4.1.3 Pigmente

Bei den Untersuchungen zum Wachstum der Mutanten ist aufgefallen, dass die Mutante, in der *fdx9* ausgeschaltet war, optisch blasser erscheint als der Wildtyp (Abbildung 17), obwohl es keinen nennenswerten Unterschied im Wachstum gibt.

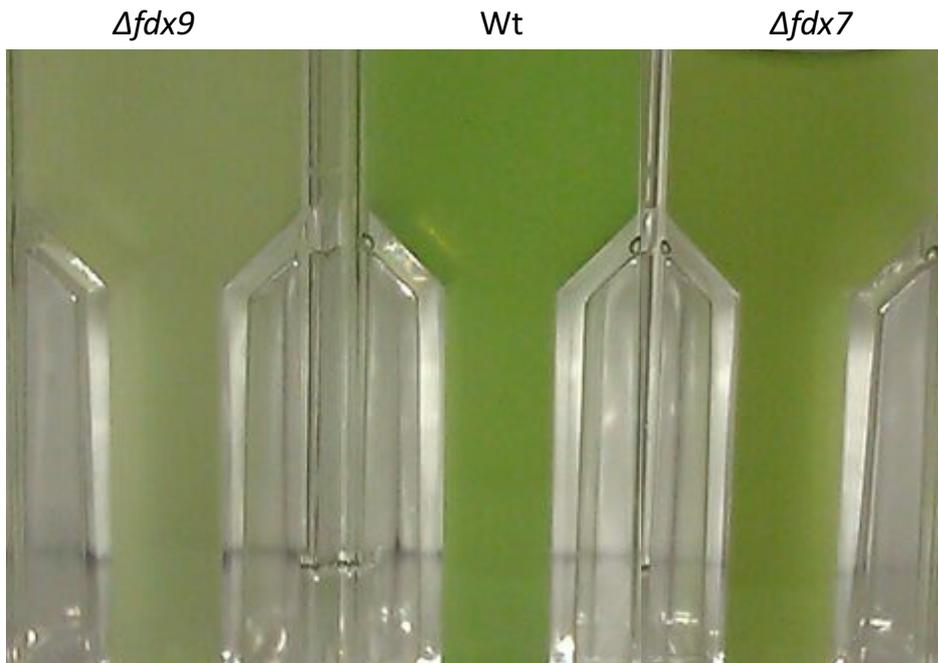


Abbildung 17: Ansicht der Ferredoxin-Mutanten *Δfdx9*, *Δfdx7* und des WT am 5. Messtag.

Die in Abbildung 17 gezeigte Veränderung ist am fünften Messtag bei einer OD_{750} von knapp über 1 (Abbildung 16) aufgenommen worden. Aufgrund dieser Veränderung wurde das Spektrum der Pigmente der einzelnen Mutanten wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben aufgenommen (Abbildung 18 A). Aus den jeweiligen Maxima der Peaks errechnete sich der relative Anteil an Chlorophyll a und Phycocyanin sowie das Verhältnis der beiden Pigmente zueinander (Abbildung 18 B). Es ist zu erkennen, dass die *fdx9*-Mutante einen leicht geringeren Anteil an Pigmenten aufweist als der Wildtyp und die *fdx7*-Mutante. Das Verhältnis der beiden zueinander ist jedoch ähnlich dem des Wildtyps und dem der *fdx7*-Mutante. Die Messung wurde bei jeder Wachstumsmessung am fünften Tag des Experiments wiederholt und jede Kultur wurde je dreimal gemessen.

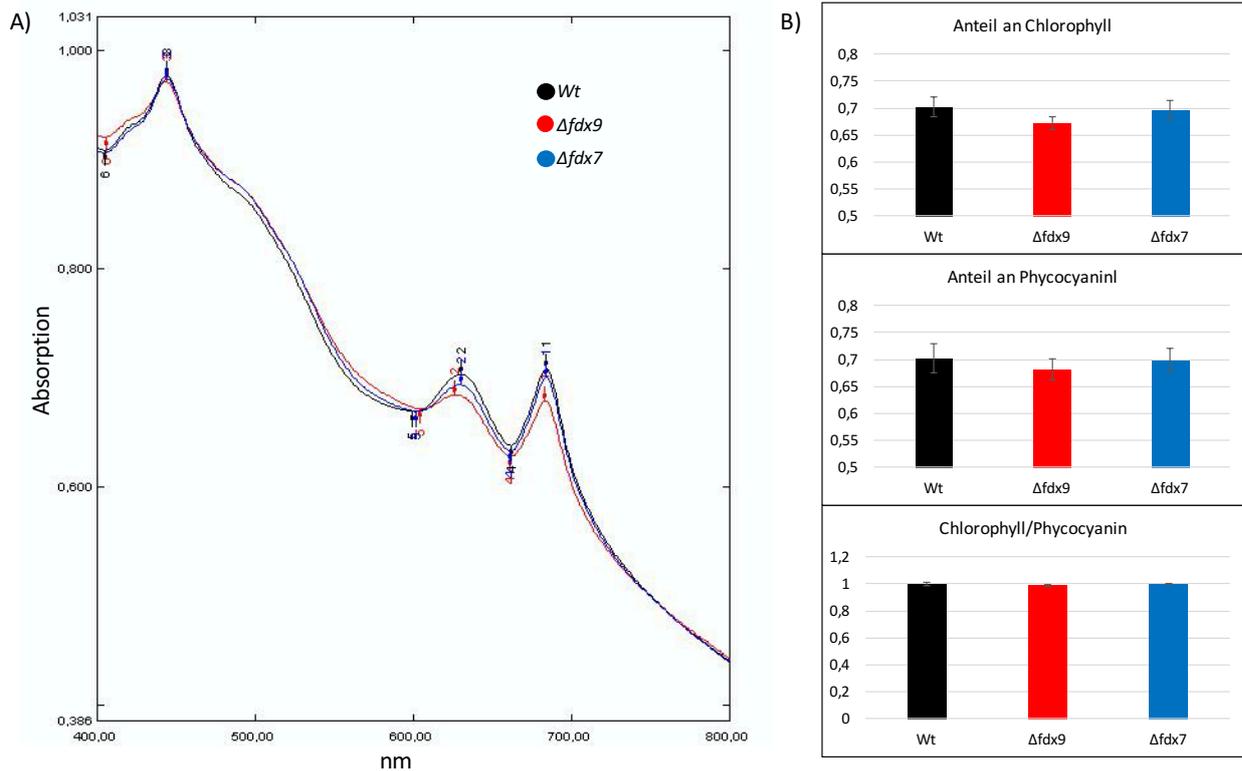


Abbildung 18: Darstellung des Spektrums (400- 800 nm) der Ferredoxin-Mutanten $\Delta fdx9$, $\Delta fdx7$ und des Wildtyps (A) und der errechnete relative Anteil an Pigmenten in den verschiedenen Kulturen (B).

4.1.4 Wasserstoffmessungen

Um zu prüfen, ob die untersuchten Ferredoxine einen Einfluss auf die Wasserstoffproduktion haben, wurden die Mutanten in einer Wasserstoffmessung mit der Clark-Elektrode eingesetzt (s. Kapitel 3.6.1). Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde die Analyse mit zwei biologischen Replikaten durchgeführt. In Abbildung 19 ist die Rate der fermentativen Wasserstoffproduktion (A) sowie die Photowasserstoffproduktion dargestellt.

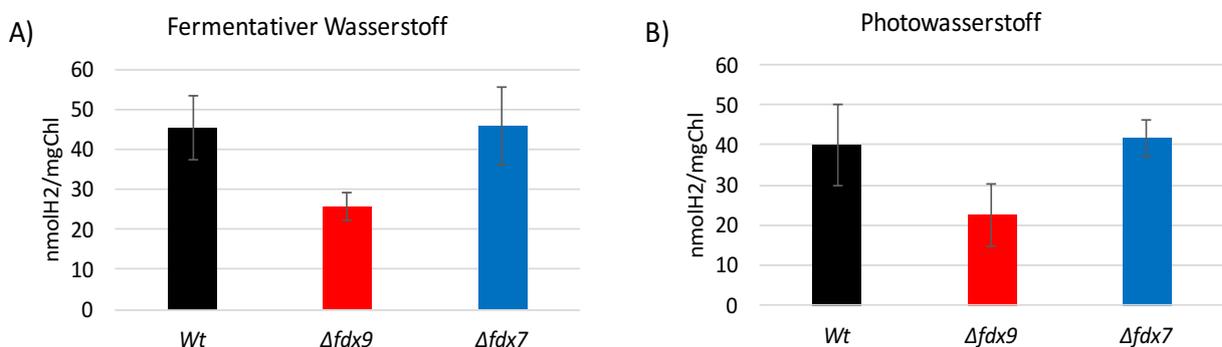


Abbildung 19: Rate der fermentativen Wasserstoffproduktion (A), Photowasserstoffproduktion (B) der Ferredoxin-Mutanten $\Delta fdx9$, $\Delta fdx7$ im Vergleich zum Wildtyp.

Wie in Abbildung 19 zu erkennen ist, ist die Rate der fermentativen Wasserstoffproduktion sowie die Photowasserstoffproduktion in der *fdx9*-Mutante geringer im Vergleich zu der Produktion in der *fdx7*-Mutante und dem Wildtyp, die sich von den Werten kaum unterscheiden. Die maximale Menge der fermentativen Wasserstoffproduktion wurde in diesem Fall nicht bestimmt, weitere Messungen der *fdx9*-Mutante in unserer Arbeitsgruppe zeigen jedoch eine deutliche Steigerung der Produktion an fermentativen Wasserstoff (Wang, persönliche Mitteilung).

4.1.5 Überexpression der Ferredoxine

Um den Einfluss der beiden Ferredoxine Fdx7 und Fdx9 auf die Hydrogenase zu untersuchen, wurden Überexpressionskonstrukte erstellt, die die entsprechenden Proteine exprimieren. Es wurden je zwei Konstrukte erstellt. Neben dem einfachen Proteinkonstrukt wurde noch ein weiteres mit einem StrepTag (siehe die unterstrichene Sequenz in Tabelle 24) versehenes Konstrukt erstellt, um das überexprimierte Enzym über eine Streptavidinsäule aufzureinigen zu können. Die Konstrukte wurden mittels PCR und den in Tabelle 24 angegebenen Primern aus der genomischen DNA von *Synechocystis* amplifiziert. Die Primer hatten zusätzlich eine Restriktionsschnittstelle (NdeI: CATATG oder EcoRI: GAATTC). Mit Hilfe der Schnittstellen sollte das Konstrukt später in den pet22b(+) Vektor (s. Tabelle 12) subkloniert werden.

Tabelle 24: Verwendete Oligonukleotide für Ferredoxinüberexpressionskonstrukte.

Name	Sequenz 5'-3'
Fed1ex-for	CATATGTGGAGCCACCCGCAGTTCGAGAAAGCTAGCAAGAAGCGTGTGACCCT GACTTTTCCC
Fed1ex-rev	GAATTCTTAGAAATTAGTGGCGATCGCCTGG
Fed1exOT-for	CATATGAAGAAGCGTGTGACCCTGACTTTTCCC
Fed1exOT-rev	GAATTCTTAGAAATTAGTGGCGATCGCCTGG
Fed2ex-for	CATATGTGGAGCCACCCGCAGTTCGAGAAAGCTAGCGTGATAGCTGATCTAAATTTTC
Fed2ex-rev	GAATTCTTACAAATGGGGATTGATTTGCGGG
Fed2exOT-for	CATATGGTGATAGCTGATCTAAATTTTC
Fed2exOT-rev	GAATTCTTACAAATGGGGATTGATTTGCGGG

Die Überexpressionskonstrukte wurden nach der ursprünglichen Benennung fed1ex (für Fdx9 mit Streptag), fed1exOT (für Fdx9 ohne Tag), fed2ex (für Fdx7 mit Streptag) und fed2exOT (für Fdx7 ohne Tag) benannt. Die einzelnen Konstrukte konnten erfolgreich amplifiziert und in den pCR2.1-TOPO ligiert werden. Die Sequenzierung zeigt, dass die Aminosäuresequenz korrekt ist.

4.2 Untersuchung des Einflusses von Flavoproteinen auf die Photowasserstoffproduktion

Es ist bekannt, dass Flavoproteine (Flv) eine wichtige Rolle im Elektronentransport der Photosynthese spielen.

In *Synechocystis* kodieren insgesamt vier verschiedene Gene für diese Proteingruppe: *flv1* (*sll1521*) und *flv3* (*sll0550*) sowie *flv2* (*sll0219*) und *flv4* (*sll0217*), wobei Flv1 und Flv3 sowie Flv2 und Flv4 Heterodimere bilden (Zhang *et al.* 2009). Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Heterodimer aus Flv1 und Flv3 bei der lichtinduzierten Aufnahme von Sauerstoff ähnlich einer Mehler-Reaktion Elektronen auf Sauerstoff übertragen kann, jedoch ohne dabei reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu erzeugen (Helman *et al.* 2003; Allahverdiyeva *et al.* 2011). Zudem wurde bereits gezeigt, dass der Heterodimer aus Flv2 und Flv4 (Flv2/4) eine Schutzfunktion für das Photosystem II in der Photosynthese bildet (Zhang *et al.* 2009; 2012).

Da Flavoproteine Ventile für überschüssige Elektronen aus der Photosynthese sind, genauso wie die Hydrogenase, wenn sie Photowasserstoff produziert, stellt sich die Frage, ob die Hydrogenase und die Flavoproteine in Konkurrenz zueinanderstehen. Um dies zu prüfen wurde untersucht, ob in den Flavoprotein-Mutanten mehr Photowasserstoff produziert, da der Überschuss an Elektronen durch die fehlenden Flavoproteine größer sein müsste.

4.2.1 Flavoprotein-Mutanten

Zu Beginn der Arbeit lagen bereits verschiedene Hydrogenase und Flavoprotein-Mutanten (*flv2/4*) vor (Appel *et al.* 2000; Forberich 2011). Zur genaueren Untersuchung wurden neben den vorhandenen Mutanten zusätzliche Mutanten erstellt, in denen *flv3* deletiert wurde. Zur Erstellung der Mutanten wurden zunächst, wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, mittels PCR *knock-out* Konstrukte erstellt (Abbildung 20). Für das Konstrukt für $\Delta flv3$ wurden die Primer Flv3out1-Flv3in1 und Flv3in2-Flv3out2 (s. Tabelle 10) verwendet. Die Mutante $\Delta flv3$ wurde mit Hilfe der Resistenzkassette kodierend für Chloramphenicol selektiert. Zusätzlich zu der Einzelmutante wurden verschiedene Doppelmutanten erstellt: $\Delta flv24\Delta flv3$, $\Delta hoxH\Delta flv3$, $\Delta hoxE-H\Delta flv3$ und $\Delta hoxE-H/\Delta flv24/\Delta flv3$, hierbei wurde jeweils das *flv3* Konstrukt in die bereits vorhandenen Mutanten eingebracht. Bei HoxH (Sll1226) handelt es sich um die große Untereinheit der Hydrogenase, die in den Mutanten deletiert wurde. In der *hoxE-H*-Mutante wurde das gesamte Operon deletiert, welches für die Hydrogenase und die Diaphorase kodiert. Die deletierten Gene auf dem Operon sind *sll1220* (*hoxE*), *sll1221* (*hoxF*), *sll1222*, *sll1223* (*hoxU*), *sll1224* (*hoxY*), *ssl2420*, *sll1225* und *sll1226* (*hoxH*). Um zu prüfen, ob die Mutanten vollständig segregiert sind, wurden Southernblots erstellt (s. Abbildung 21 und Abbildung 23).

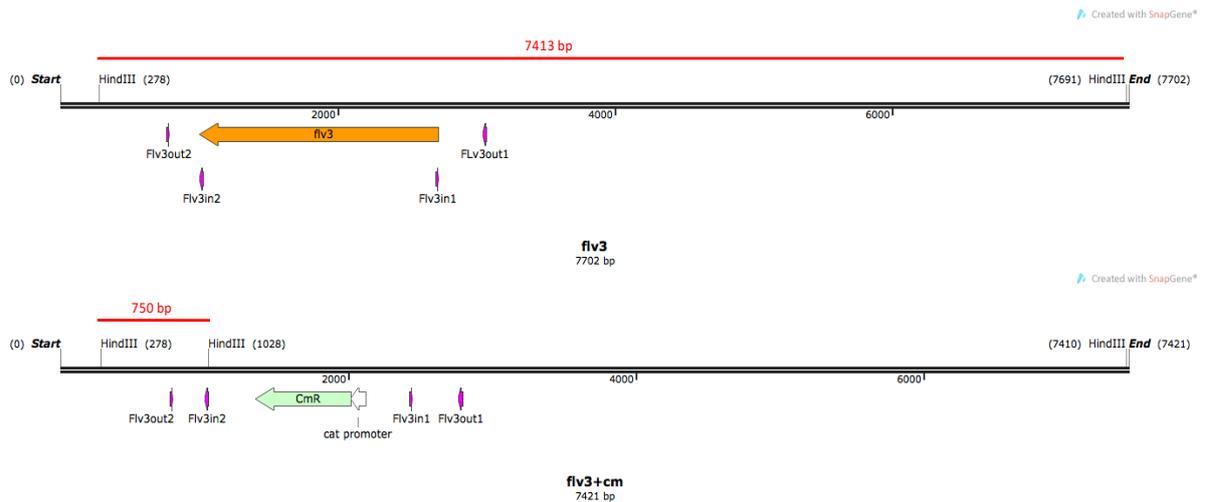


Abbildung 20: *flv3* im Wildtyp von *Synechocystis* (oben) und das PCR *knock-out* Konstrukt für $\Delta flv3$ (unten) mit den Primerbindestellen und den HindIII Schnittstellen.

Für den Southernblot zur Überprüfung der *flv3*-Mutanten wurde mit Hilfe der beiden Oligonukleotide Flv3in2-Flv3out2 eine Sonde erstellt (s. Kapitel 3.4.11). Durch das Einbringen der Chloramphenicol Resistenzkassette verändert sich die Größe der Bande in der (Abbildung 20). Die erwartete Bandengröße für den Wildtyp liegt bei 7413 bp und die für $\Delta flv3$ bei 750 bp.

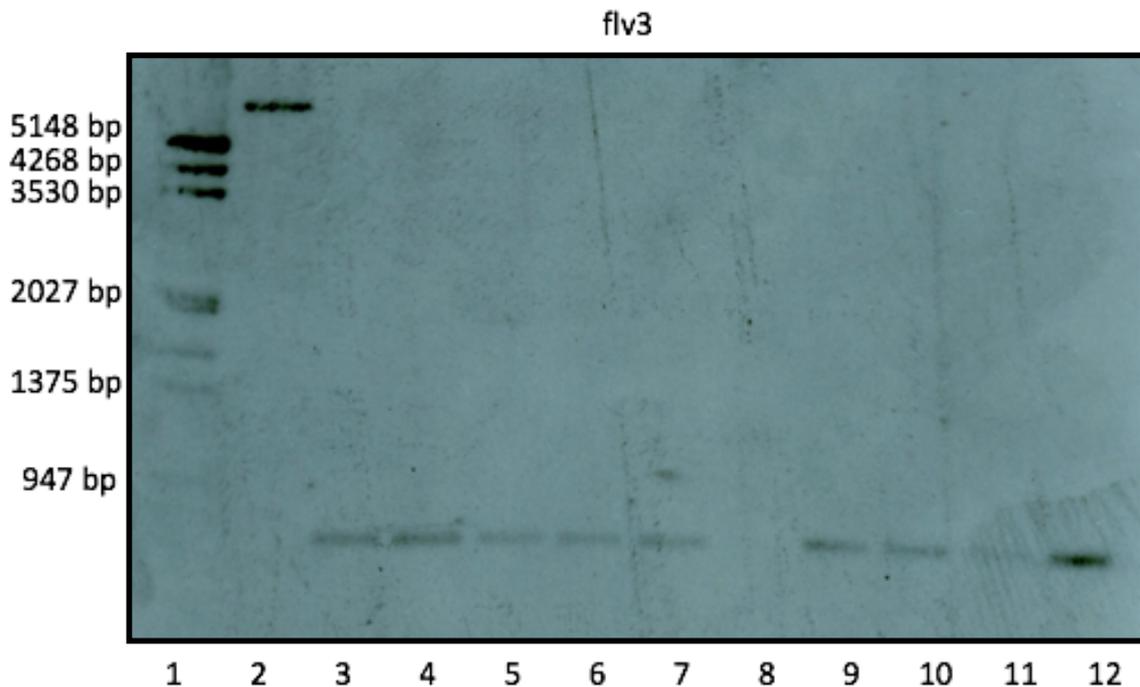


Abbildung 21: Southernblot mit genomischer DNA von *Synechocystis* WT und verschiedenen Mutanten zur Verifizierung, dass *flv3* in allen Genomkopien der gezeigten Mutanten ausgeschaltet wurde. Dig-labelled λ -HindIII-Marker (Spur 1); Wt (Spur 2); $\Delta flv3$ -1 (Spur 3); $\Delta flv3$ -2 (Spur 4); $\Delta hoxH/\Delta flv3$ -1 (Spur 5); $\Delta hoxH/\Delta flv3$ -2 (Spur 6); $\Delta hoxE-H/\Delta flv3$ -1 (Spur 7); $\Delta hoxE-H/\Delta flv3$ -2 (Spur 8); $\Delta hoxE-H/\Delta flv24/\Delta flv3$ -1 (Spur 9); $\Delta hoxE-H/\Delta flv24/\Delta flv3$ -2 (Spur 10); $\Delta flv24/\Delta flv3$ -1 (Spur 11); $\Delta flv24/\Delta flv3$ -2 (Spur 12).

Der Southernblot zur Verifizierung, dass *flv3* in allen Genomkopien der gezeigten Mutanten ausgeschaltet wurde, ist zu erkennen, dass alle Mutanten vollständig segregiert sind und keine Wildtypgenomkopie mehr vorhanden ist (Abbildung 21).

Die Segregation der *flv24*-Mutanten wurde ebenfalls per Southernblot überprüft. Zur Erstellung der Sonde wurden die Oligonukotide 0217-OUT1 (ccacaaagtttctatggttac) und 0217-in1 (GGTTCGTGCCTTCATCCGTCGACTctgtatgattgacgatcaaata) verwendet. Diese Oligonukleotide wurden bereits zur Erstellung der Mutanten genutzt (Forberich 2011). Durch das Einbringen der Gentamycin-Resistenzkassette verändert sich die Größe der Bande in der Mutante im Gegensatz zu der Bande im Wildtyp (Abbildung 22). Die erwartete Bandengröße für den Wildtyp liegt bei 3163 bp und die für $\Delta flv24$ bei 4925 bp. In Abbildung 23 ist der Southernblot mit genomischer DNA von *Synechocystis* Wt und verschiedenen Mutanten, zur Verifizierung, dass *flv24* in allen Genomkopien der gezeigten Mutanten ausgeschaltet wurde, dargestellt.

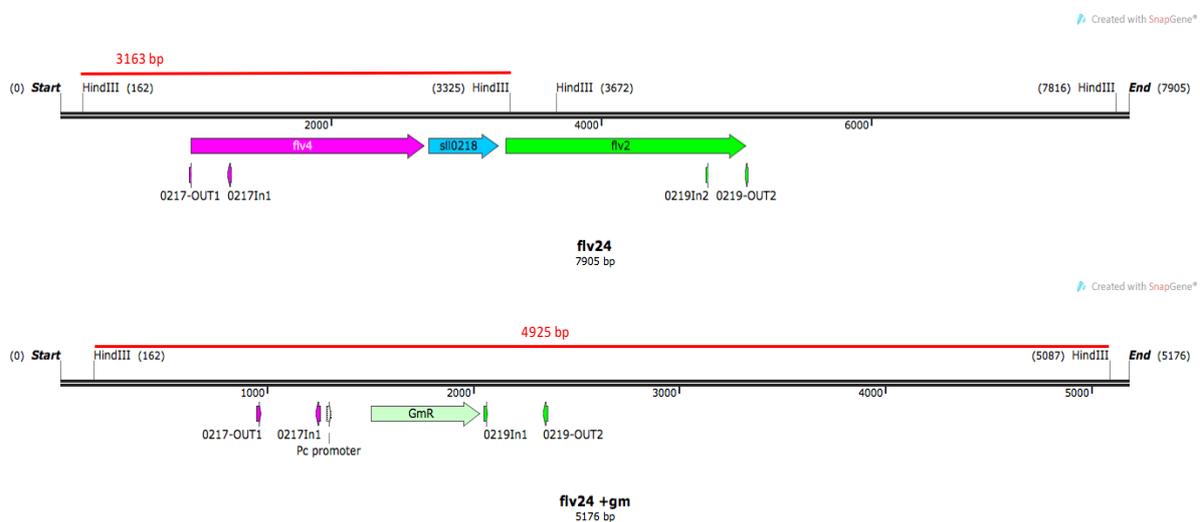


Abbildung 22: *flv24* im Wildtyp von *Synechocystis* (oben) und das PCR *knock-out* Konstrukt für $\Delta flv24$ (unten) mit den Primerbindestellen und den HindIII Schnittstellen.

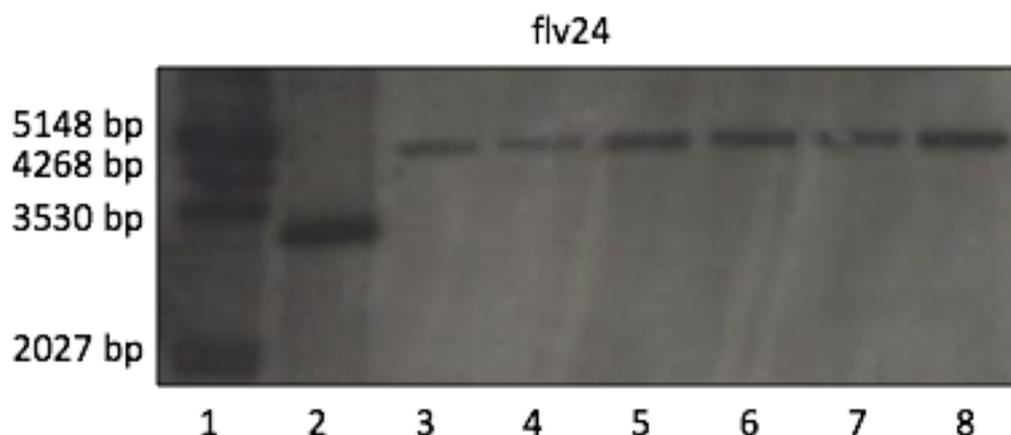


Abbildung 23: Southern blot mit genomischer DNA von *Synechocystis* Wt und verschiedenen Mutanten zur Verifizierung, dass *flv24* in allen Genomkopien der gezeigten Mutanten ausgeschaltet wurde. Dig-labelled λ -HindIII-Marker (Spur 1); Wt (Spur 2); $\Delta flv24$ (Spur 3); $\Delta hoxH/\Delta flv24$ (Spur 4); $\Delta hoxE-H/\Delta flv24$ (Spur 5); $\Delta hoxE-H/\Delta flv24/\Delta flv3$ (Spur 6); $\Delta flv24/\Delta flv3-1$ (Spur 7); $\Delta flv24/\Delta flv3-2$ (Spur 8).

4.2.2 Wachstum der Flavoprotein-Mutanten

Zur Überprüfung, ob die Flavoprotein-Mutanten einen Phänotyp im Wachstum zeigten, wurde das Wachstum der Kulturen unter autotrophen und mixotrophen Bedingungen gemessen. Für die mixotropen Messungen wurde zum Standard BG11-Medium zusätzlich mit 10 mM Glukose als Kohlenstoffquelle supplementiert. Zur Bestimmung des Wachstums wurde jeweils über einen Zeitraum von 8 Tagen alle 24 h die OD₇₅₀ der Kulturen gemessen. Bei einer Messung wurden immer parallel zwei Kulturen angezogen und gemessen, aus denen ein Mittelwert und die Standardabweichung berechnet wurde. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal unabhängig wiederholt und mit den anderen verglichen. In Abbildung 24, Abbildung 25 und Abbildung 26 sind repräsentative Messkurven des Wachstums der verschiedenen Flavoprotein-Mutanten dargestellt.

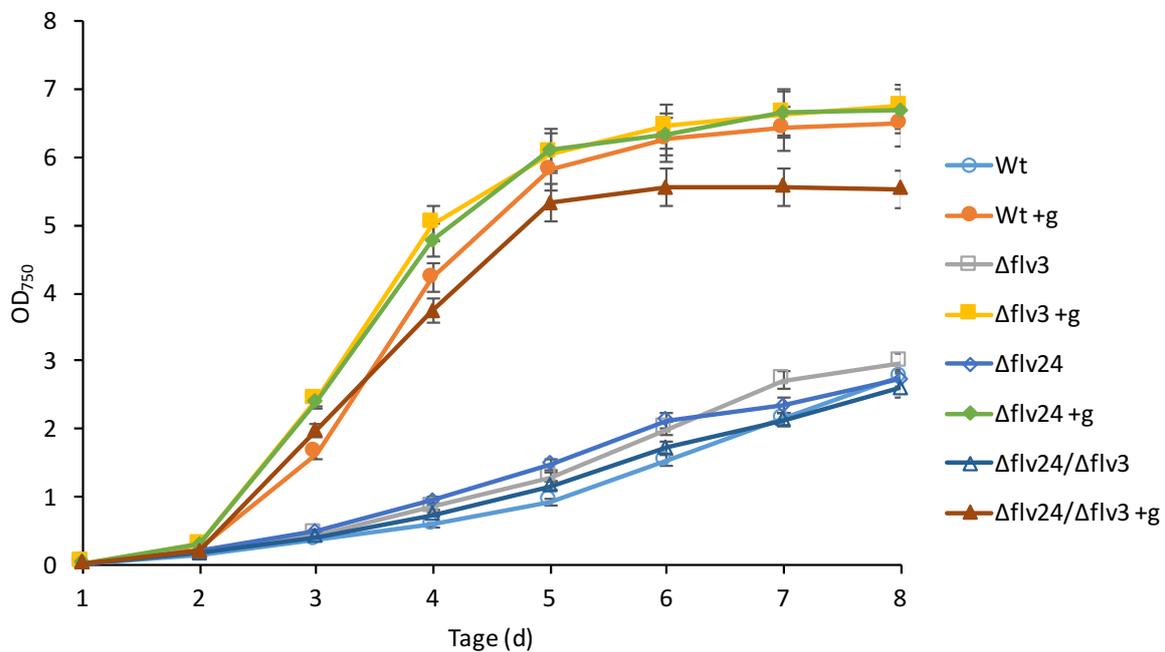


Abbildung 24: Wachstum der Flavoprotein-Mutanten unter autotrophen und mixotropen (+g) Bedingungen.

Wie in Abbildung 24 zu erkennen ist, zeigten die Flavoprotein-Mutanten unter autotrophen Wachstumsbedingungen kein verändertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Unter mixotropen Bedingungen mit Glukose als zusätzliche Kohlenstoffquelle war jedoch in allen Messungen zu beobachten, dass die stationäre Phase der Doppelmutante ($\Delta flv24/\Delta flv3$) eine geringere OD₇₅₀ (ca. 5,5) aufweist als die Einzelmutanten und der Wildtyp (ca. 6,5).

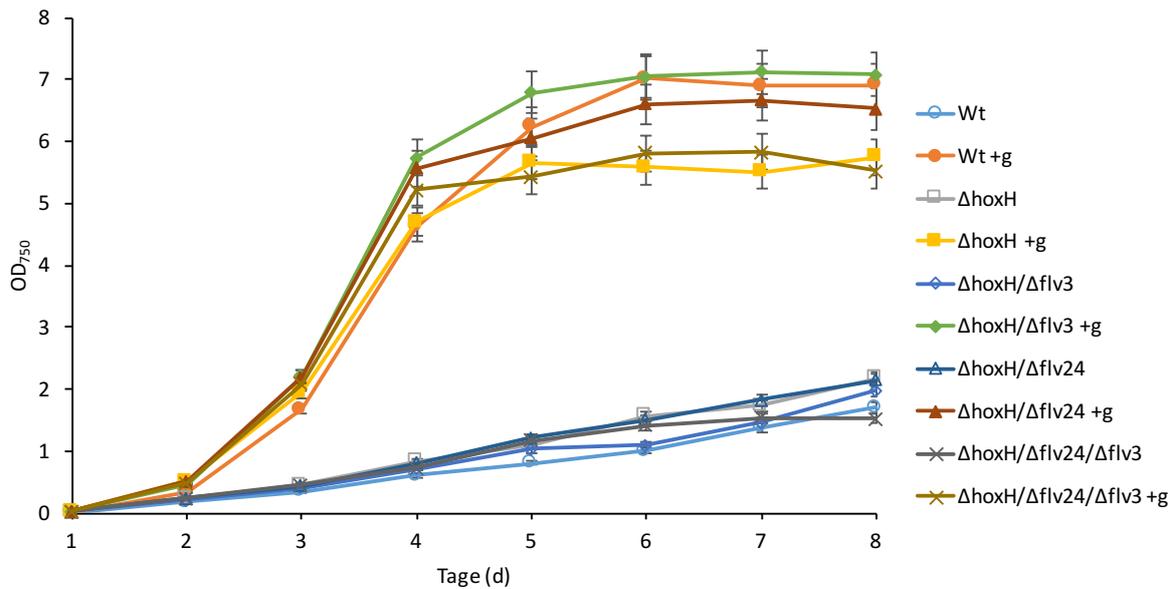


Abbildung 25: Wachstum der Flavoprotein und Hydrogenase/Flavoprotein-Mutanten unter autotrophen und mixotrophen (+g) Bedingungen.

Bei den Mutanten, in denen neben den Flavoproteinen *flv24* und *flv3* auch die große Untereinheit der Hydrogenase (*hoxH*) ausgeschaltet wurde, ist im Wachstum unter autotrophen Bedingungen kein Unterschied zum Wildtyp zu erkennen (Abbildung 25). Beim Wachstum unter mixotrophen Bedingungen mit Glukose als zusätzliche Kohlenstoffquelle zeigt sich, dass sowohl die *hoxH* Mutante als auch die Mehrfachmutante in der *hoxh* sowie beide Flavoproteinkomplexe (*flv24* und *flv3*) deletiert wurden, ein leicht geringeres Wachstum aufwiesen als die anderen Mutanten und der Wildtyp (Abbildung 25).

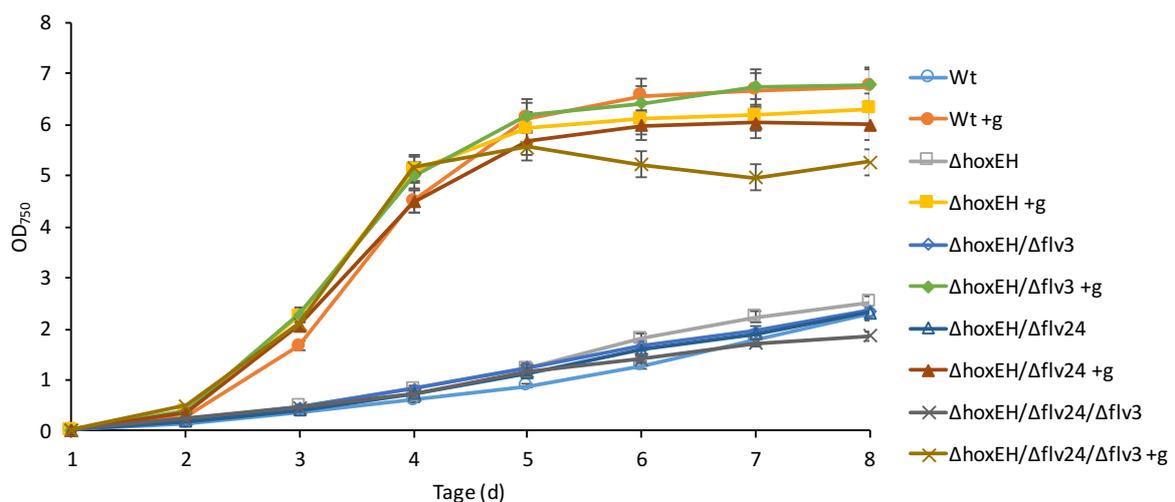


Abbildung 26: Wachstum der Flavoprotein und Hydrogenasekomplex/Flavoprotein-Mutanten unter autotrophen und mixotrophen (+g) Bedingungen.

In Abbildung 26 ist das Wachstum der Flavoprotein-Mutanten, in denen zusätzlich der gesamte Bereich, der für die Hydrogenase sowie die Diaphorase kodiert (*hoxE-H*) ausgeschaltet wurde, dargestellt. Beim Wachstum unter autotrophen Bedingungen ist kein Unterschied zu erkennen. Unter mixotrophen Bedingungen mit Glukose als zusätzliche Kohlenstoffquelle ist zu erkennen, dass die Mehrfachmutante, in der der Hydrogenasekomplex (HoxE-H) und beide Flavoproteinkomplexe (Flv24 und Flv3) ausgeschaltet wurden, ein leicht geringeres Wachstum aufwies als die anderen Mutanten und der Wildtyp.

4.2.3 Expression von HoxF

Zur Analyse der Expression der Hydrogenase in den Flavoprotein-Mutanten wurde eine SDS-PAGE und Westernblot-Analyse durchgeführt. Hierfür wurde ein spezifischer Antikörper gegen HoxF verwendet. HoxF kodiert für die große Untereinheit der Diaphorase. In Abbildung 27 und Abbildung 28 sind die Ergebnisse der Analyse dargestellt. Für den Westernblot wurden je Probe 150 µg Protein eingesetzt, was einer ungefähren Chlorophyllmenge von 5 µg entsprach. Das erwartete Molekulargewicht von HoxF liegt bei 57,7 kDa.

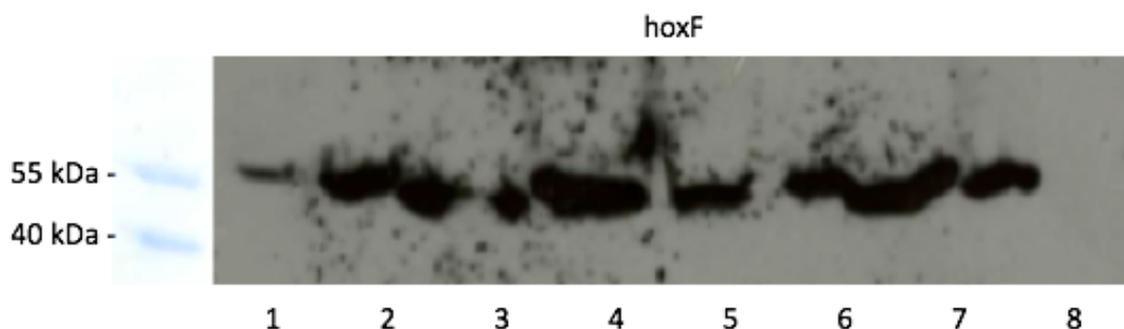


Abbildung 27: SDS-PAGE und Westernblot-Analyse der Flavoprotein-Mutanten zur Expressionsanalyse von HoxF. Wt (Spur 1); $\Delta flv3-1$ (Spur 2); $\Delta flv3-2$ (Spur 3); $\Delta flv24-1$ (Spur 4); $\Delta flv24-2$ (Spur 5); $\Delta flv24/\Delta flv3-1$ (Spur 6); $\Delta flv24/\Delta flv3-2$ (Spur 7); $\Delta hoxEH$ (Spur 8).

Für die SDS-PAGE die in Abbildung 27 gezeigt ist, wurde ein Gel mit großen Taschen (Volumen ca. 30 µl) verwendet. Trotz technischer Schwierigkeiten und somit schwierigerer Interpretation der Bandenzugehörigkeit der einzelnen Proben ist deutlich zu erkennen, dass die Signale der verschiedenen Mutanten stärker sind als das Signal des Wildtyps. Ebenso ist zu erkennen, dass in der Negativkontrolle (letzte Spur), in der das gesamte Operon ausgeschaltet wurde, ($\Delta hoxE-H$) kein Signal aufweist. Zur Verifizierung der Analyse wurde der Southernblot wiederholt, das Ergebnis ist in Abbildung 28 dargestellt.

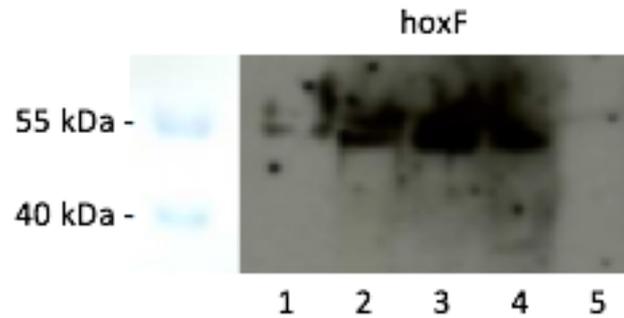


Abbildung 28: SDS-PAGE und Westernblot-Analyse der Flavoprotein-Mutanten zur Expressionsanalyse von HoxF (Wiederholung). Wt (Spur 1); $\Delta flv3$ (Spur 2); $\Delta flv24$ (Spur 3); $\Delta flv24/\Delta flv3$ (Spur 4); $\Delta hoxEH$ (Spur 5).

Bei der Wiederholung der SDS-PAGE und anschließenden Westernblotanalyse zur Bestimmung der Expression von HoxF in den verschiedenen Flavoprotein-Mutanten wurde je nur eine *flv3*, eine *flv24* und eine *flv3/flv24* Mutante eingesetzt (Abbildung 28). Es ist zu erkennen, dass das Signal in den verschiedenen Mutanten stärker ist als in dem Wildtyp. In der Negativkontrolle ist eine schwache Bande zu erkennen, die in der Größe jedoch knapp über den erwarteten Banden liegt.

4.2.4 Oxidation des Photosystem I der *flv3*-Mutanten

Nach der Überprüfung des Wachstums der Mutanten, wurde die Oxidation des Photosystem I (PSI) der *flv3*-Mutanten gemessen. Die Messungen erfolgten mittels eines Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometers (PAM). In Abbildung 29 sind die Messergebnisse der Flavoprotein-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. In Abbildung 29 ist die PSI-Oxidation in Anwesenheit von Sauerstoff (A) und in Abwesenheit von Sauerstoff dargestellt (B).

In Abbildung 29 A ist zu erkennen, dass $\Delta flv3$ unter oxischen Bedingungen eine verlangsamte Oxidation von PSI bei Anregung beider Photosysteme durch rotes Licht aufweist. Unter anoxischen Bedingungen sind ähnliche Effekte zu erkennen (Abbildung 29 B). Der Wildtyp weist jedoch in Abwesenheit von Sauerstoff einen ähnlichen Phänotyp auf, wie die *flv3*-Mutante und zeigt eine deutliche Verzögerung der PSI Oxidation im Vergleich zur Oxidation in Anwesenheit von Sauerstoff.

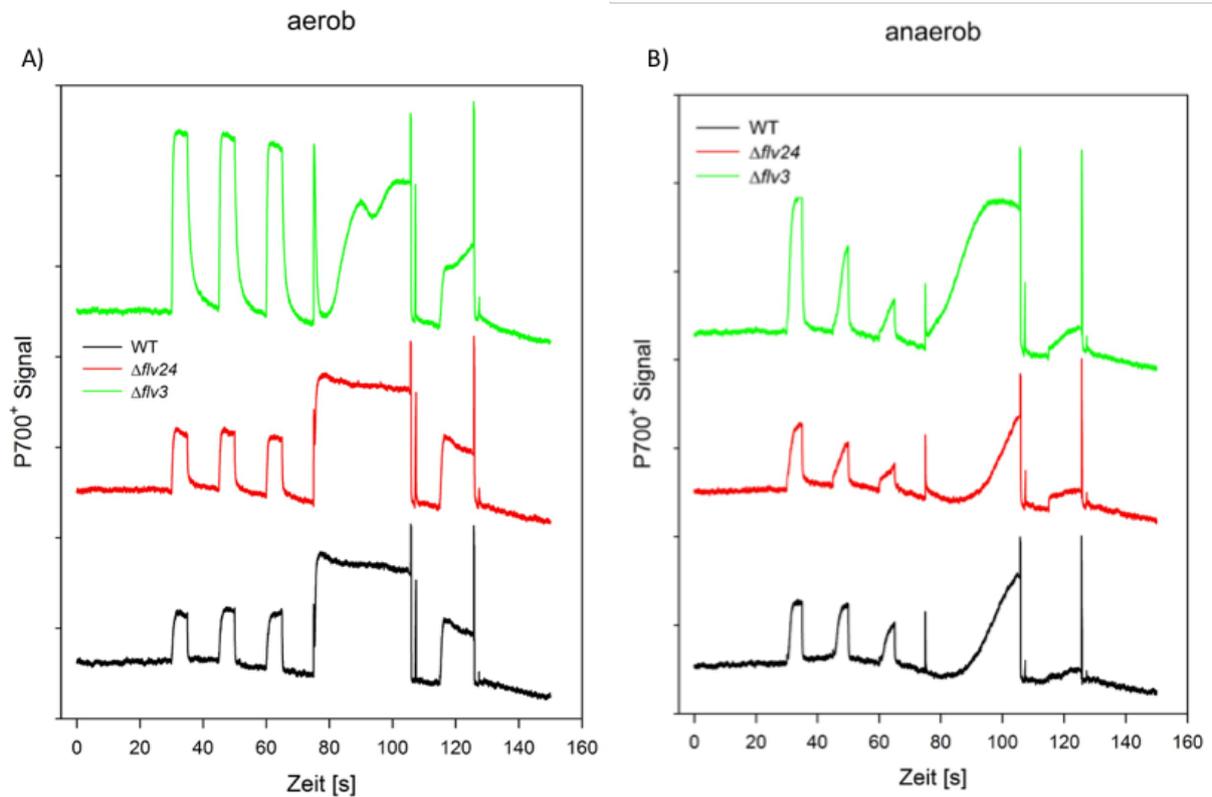


Abbildung 29: : PSI-Oxidations Messungen der Flavoprotein-Mutanten $\Delta flv3$ und $\Delta flv3/\Delta flv24$ in Anwesenheit von O₂ (A) und in Abwesenheit von O₂ (B).

4.2.5 Wasserstoffproduktion der Flavoprotein-Mutanten

Um zu prüfen, ob die untersuchten Flavoproteine einen Einfluss auf die Wasserstoffproduktion haben, wurden die Mutanten in einer Wasserstoffmessung mit der Clark-Elektrode eingesetzt (s. Kapitel 3.6.1). Aufgrund der Tatsache, dass die Flavoproteine eine Rolle im photosynthetischen Elektronentransport spielen, wurde nur der Einfluss der *knock-outs* auf die Photowasserstoff-Produktion gemessen. In Abbildung 30 ist das Ergebniss der Photowasserstoff-Produktion dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Mutanten in denen *flv24* ausgeschaltet wurde ($\Delta flv24$ und $\Delta flv24\Delta flv3$), eine erhöhte Photowasserstoffproduktion aufweisen als der Wildtyp und die *flv3*-Mutante.

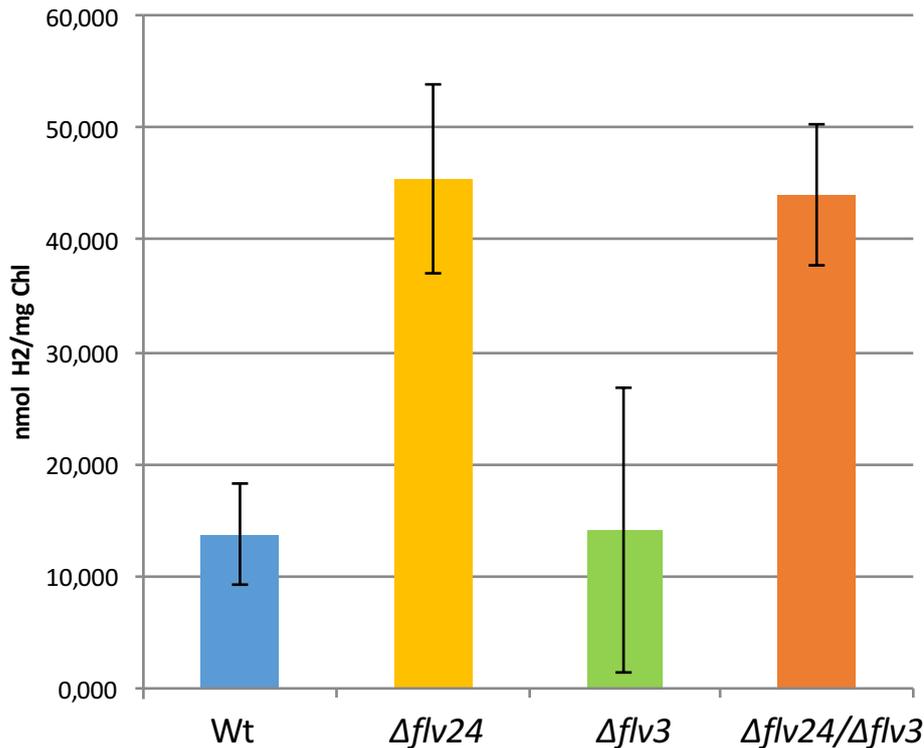


Abbildung 30: Photowassertoffproduktion der Flavoprotein-Mutanten $\Delta flv3$, $\Delta flv24$ und $\Delta flv3/\Delta flv24$ und des Wildtyps.

4.3 Aufklärung der Glukoseabbauwege

Die bei der fermentativen Wasserstoffproduktion benötigten Elektronen stammen aus der Oxidation der Glukose. Hierbei wird Glukose über verschiedene Wege wieder zu H₂O und CO₂ oxidiert. Bisher waren in *Synechocystis* nur die Glykolyse, auch Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (EMP) genannt und der Oxidative-Pentosephosphatweg (OPP) bekannt (Knowles & Plaxton 2003). Es gibt jedoch Hinweise, dass es einen weiteren Kohlenhydratoxidationsweg in *Synechocystis* gibt (Chen 2014). Diese Hinweise wurden in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht.

4.3.1 Glukoseabbau-Mutanten

Um zu untersuchen, welcher der Wege in *Synechocystis* relevant ist und ob einer wichtiger ist für die fermentative Wasserstoffproduktion wurden neue Mutanten erstellt, in denen die Schlüsselenzyme der einzelnen Glukoseabbauwege ausgeschaltet wurden.

Zu Beginn der Arbeit standen bereits einige Mutanten zur Verfügung, in denen die Schlüsselenzyme für die Glykolyse sowie für den OPP-Weg ausgeschaltet wurden (Chen 2014). In unserer Arbeitsgruppe wurden anhand einer Blastanalyse im Vergleich mit dem Gen aus *E. coli*, Kandidatengene für die beiden Schlüsselenzyme des ED-Weg in *Synechocystis* identifiziert (Chen & Schreiber *et al.* 2016). In dieser Arbeit wurden diese, dem ED-Weg zugeschriebenen Enzyme Sll1196 (putative KDPG-Aldolase/Eda) und Slr0452 (putative 6PG-Dehydratase/Edd), sowie das dem OPP-

Weg zugehörige Gnd (6PG-Dehydrogenase/SII0329) ausgeschaltet. Die einzelnen *knock-outs* wurden in den Wildtyp sowie in verschiedene weitere Mutanten eingebracht.

Für das *knock-out* Konstrukt wurden die Primer Eda1-KAln1 und KAln2-Eda2 verwendet (s. Tabelle 10). Das Konstrukt wurde in den Wildtyp sowie in Δgnd , $\Delta pfk/\Delta zwf$ und $\Delta pfk/\Delta zwf/\Delta gnd$ eingebracht. Die Mutanten wurden mit der eingebrachten Genatmycinkassette selektiert (Abbildung 31).

Zur Prüfung der Mutanten wurde ein Southernblot mit den Primern Eda1 und KAln1 durchgeführt (Abbildung 32). Die erwarteten Bandengrößen lagen im WT bei 1867 bp und in Δeda bei 2696 bp.

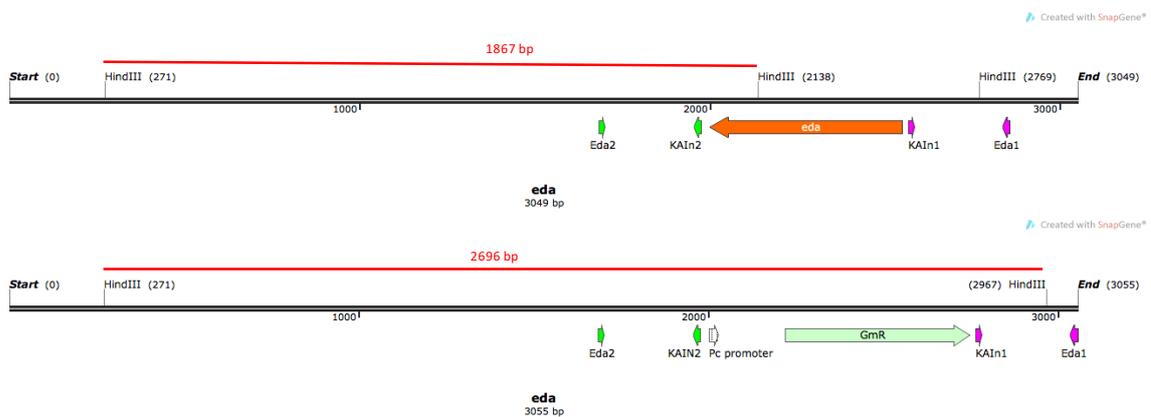


Abbildung 31: *eda* im Wildtyp von *Synechocystis* (oben) und das PCR *knock-out* Konstrukt für Δeda (unten) mit den Primerbindestellen und den HindIII Schnittstellen.

In Abbildung 32 ist der Southernblot zur Überprüfung der *eda*-Mutanten dargestellt. Für die Sonde wurde das Primerpaar Eda1-KAln1 verwendet. Es ist zu erkennen, dass alle *eda*-Mutanten vollständig segregiert sind.

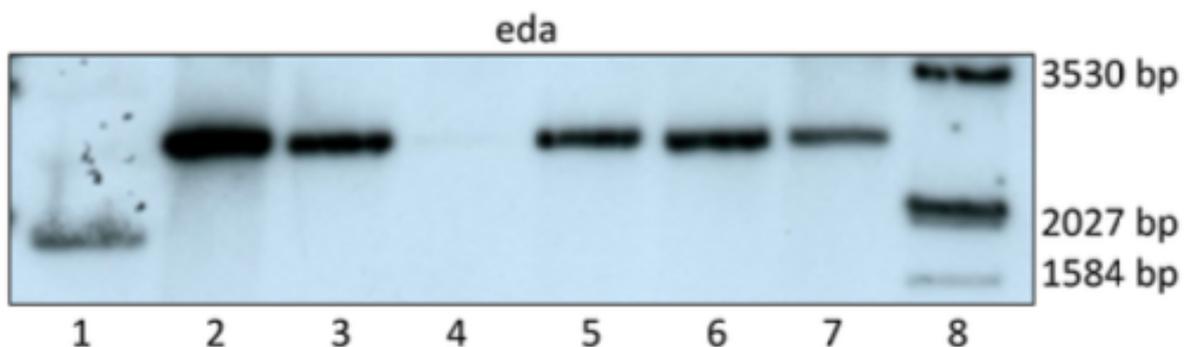


Abbildung 32: Southernblot mit genomischer DNA von *Synechocystis* Wt und verschiedenen Mutanten zur Verifizierung, dass *eda* in allen Genomkopien der gezeigten Mutanten ausgeschaltet wurde. Wt (Spur 1); Δeda (Spur 2); Δeda (Spur 3); $\Delta eda/\Delta gnd$ (Spur 4); $\Delta pfk/\Delta zwf/\Delta eda$ (Spur 5); $\Delta pfk/\Delta zwf/\Delta gnd/\Delta eda$ (Spur 6); $\Delta pfk/\Delta zwf/\Delta gnd/\Delta eda$ (Spur 7); Dig-labelled λ -HindIII-marker (Spur 8).

Zusätzlich zu den in Abbildung 32 gezeigten, im Southernblot überprüften Mutanten wurden zwei weitere Mutanten erstellt, in denen *eda* ausgeschaltet wurde: $\Delta zwf/\Delta eda$ und $\Delta pfk/\Delta eda$, beide Mutanten sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht überprüft worden.

Zur Prüfung, ob der ED-Weg in *Synechocystis* ähnlich abläuft wie in *E. coli*, wurden auch für die weiteren Enzyme mögliche Kandidatengene identifiziert. Für die 6-Phosphogluconat-Dehydratase (Edd) wurde das Kandidatengen *slr0452* bestimmt. Für das *knock-out* Konstrukt wurden die Primer EDD.1-EDD.In1 und EDD.In2-EDD.2 verwendet (s. Tabelle 10). Das Konstrukt wurde in den Wildtyp, in Δzwf , $\Delta pfk/\Delta zwf$ und $\Delta pfk/\Delta zwf/\Delta gnd$ eingebracht. Die Mutante wurde mit der eingebrachten Genatmycinkassette selektiert (Abbildung 33). In Abbildung 34 ist der Southernblot zur Prüfung der *edd* Mutanten dargestellt. Für die Sonde wurde das Primerpaar EDD.1-EDD.In1 verwendet und die erwarteten Bandengrößen liegen beim Wildtyp bei 1741 bp und in Δedd bei 3128 bp.

Es ist zu erkennen, dass keine Mutanten vollständig segregiert ist. Es tragen jedoch alle Mutanten die Mutation und die Resistenz.

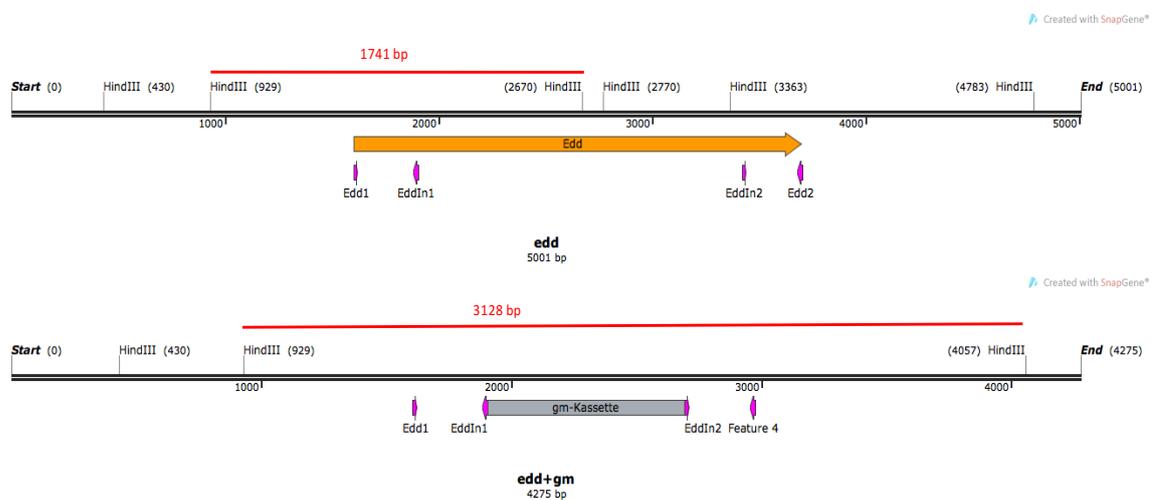


Abbildung 33: *edd* im Wildtyp von *Synechocystis* (oben) und das PCR *knock-out* Konstrukt für Δedd (unten) mit den Primerbindestellen und den HindIII Schnittstellen.

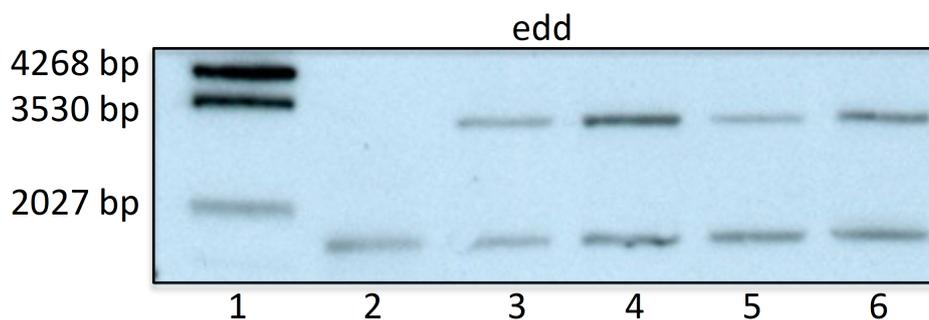


Abbildung 34: Southernblot mit genomischer DNA von *Synechocystis* Wt und verschiedenen Mutanten zur Verifizierung, dass *edd* in allen Genomkopien der gezeigten Mutanten ausgeschaltet wurde. Dig-labelled λ -HindIII-Marker (Spur 1); Wt (Spur 2); Δedd (Spur 3); $\Delta edd/\Delta zwf$ (Spur 4); $\Delta pfk/\Delta zwf/\Delta edd$ (Spur 5); $\Delta pfk/\Delta zwf/\Delta gnd/\Delta edd$ (Spur 6); $\Delta pfk/\Delta zwf/\Delta gnd/\Delta edd$ (Spur 7).

Zu Beginn der Arbeit stand bereits eine Mutante, in der das Schlüsselenzym des OPP-Wegs ausgeschaltet wurde, die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Zwf) zur Verfügung (Chen 2014).

Um zu prüfen, ob Glukose mittels einer Glukose-Dehydrogenase zu Glukonat oxidiert werden kann, wurden weitere Mutanten erstellt. Hierbei lag bereits eine Glukose-Dehydrogenase (*gdh*)-Mutante vor. Bei der Suche über Cyanobase findet sich jedoch noch eine andere mögliche, periplasmatische Glukose-Dehydrogenase (GdhB/slr1608). Für diese wurde in dieser Arbeit ein PCR Konstrukt zur Erstellung einer *knock-out* Mutante generiert (Abbildung 35/A). Zur Erstellung des Konstruktes wurden die Primerpaare GdhB-1-GdhB-In1 und GdhB-In2-GdhB2 verwendet. Zur Selektion wurde die Gentamycinkassette verwendet. Das Konstrukt wurde erfolgreich in den Wildtyp von *Synechocystis* (Δ *gdhB*) und in Δ *pfk*/ Δ *zwf* eingebracht (Δ *pfk*/ Δ *zwf*/ Δ *gdhB*). Wird Glukose über Gdh zu Glukonat und weiter zu 6-Phosphoglukonat metabolisiert, kann dieses über den OPP-Weg weiter zu Pyruvat abgebaut werden. Um diesen Umweg zu verifizieren, wurde die Phosphoglukonat-Dehydrogenase (Gnd/Sll0329) im Wildtyp und in verschiedenen Mutanten ausgeschaltet. Gnd oxidiert 6-Phosphoglukonat zu Ribolose-5-Phosphat und wird dem OPP-Weg zugeordnet. Die Mutante wurde zunächst unter dem Namen Δ *ph* erstellt und bearbeitet. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Name jedoch an die gängigere Bezeichnung Δ *gnd*, die auch für das Enzym aus *E. coli* verwendet wird, geändert.

Zur Erstellung des Konstruktes für die *knock-out* Mutanten der *gnd*-Mutante (Abbildung 35/B) wurden die Primerpaare PGD-1-PgdIn1 und PgdIn2-PGD-2 verwendet. Zur Selektion wurde eine Erythromycinkassette eingebaut. Der Einbau und die Segregation wurden mittels Southernblot überprüft (Abbildung 36). Die erwarteten Bandengößen liegen beim Wildtyp bei 1810 bp und bei der Mutante bei 4786 bp. Die Sonde wurde mit Hilfe des Primerpaares PgdIn2-PGD-2 per PCR erstellt.

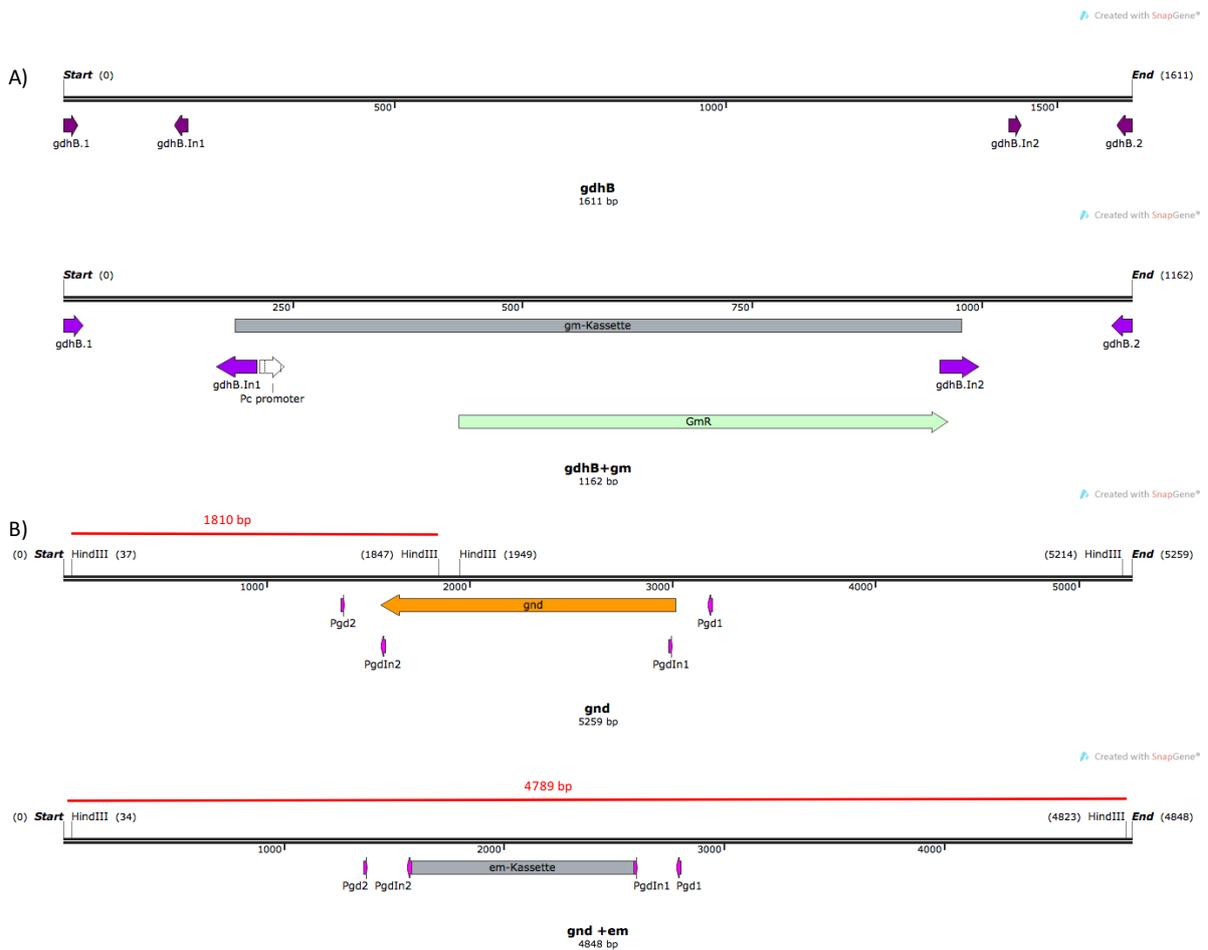


Abbildung 35: A) *gdhB* im Wildtyp von *Synechocystis* (oben) und das PCR *knock-out* Konstrukt für Δ *gdhB* (unten) mit den Primerbindestellen; B) *gnd* im Wildtyp von *Synechocystis* (oben) und das PCR *knock-out* Konstrukt für Δ *gnd* (unten) mit den Primerbindestellen und den HindIII Schnittstellen.

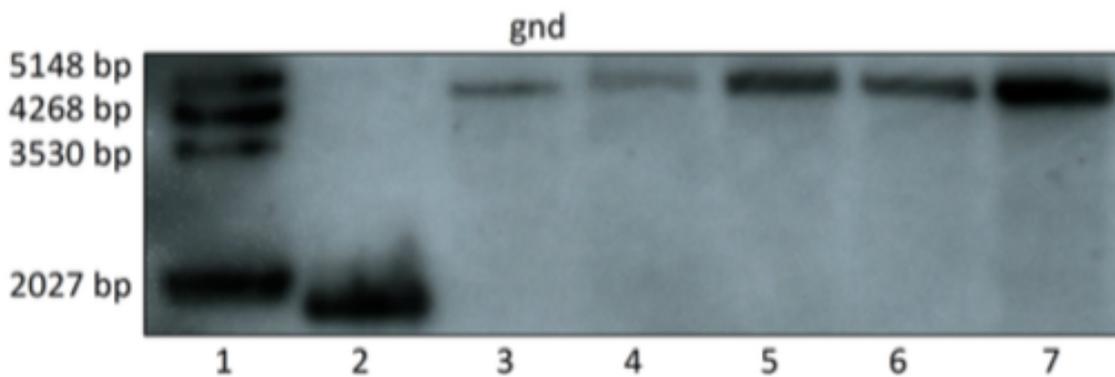


Abbildung 36: Southernblot mit genomischer DNA von *Synechocystis* Wt und verschiedenen Mutanten zur Verifizierung, dass *gnd* in allen Genomkopien der gezeigten Mutanten ausgeschaltet wurde. Dig-labelled λ -HindIII-Marker (Spur 1); Wt (Spur 2); Δ *gnd* (Spur 3); Δ *gnd*/ Δ eda (Spur 4); Δ *pfk*/ Δ *zwf*/ Δ *gnd* (Spur 5); Δ *pfk*/ Δ *gnd* (Spur 6); Δ *pfk*/ Δ *zwf*/ Δ *gnd*/ Δ eda (Spur 7).

4.3.2 Wachstum der Glukoseabbau-Mutanten

Zur Überprüfung, ob die Mutanten einen Phänotyp im Wachstum zeigten, wurde das Wachstum der Kulturen unter verschiedenen Bedingungen gemessen.

Hierbei wurden die Kulturen über einen Zeitraum von mindestens 7 Tagen täglich zur gleichen Zeit beprobt und die OD₇₅₀ gemessen. Bei einer Messung wurden jeweils 3 Parallel-Kulturen angezogen und gemessen, aus denen dann ein Mittelwert und die Standardabweichung berechnet wurde. Jedes Wachstumsexperiment wurde mindestens dreimal unabhängig repliziert. Gezeigt ist jeweils das Ergebnis eines Wachstumsexperiments, das repräsentativ für die Replikate ist. Zunächst wurden die Mutanten, in denen jeweils nur ein Enzym der Wege ausgeschaltet wurde, unter autotrophen und unter mixotrophen (+g) Bedingungen gemessen (Abbildung 37). Neben den Wachstumskurven sind vereinfachte Schemata der Kohlenhydratoxidationswege dargestellt. In den Schemata ist der EMP-Weg in rot, der OPP-Weg in blau und der ED-Weg in grün dargestellt. Die roten Kreuze symbolisieren das jeweils ausgeschaltete Gen.

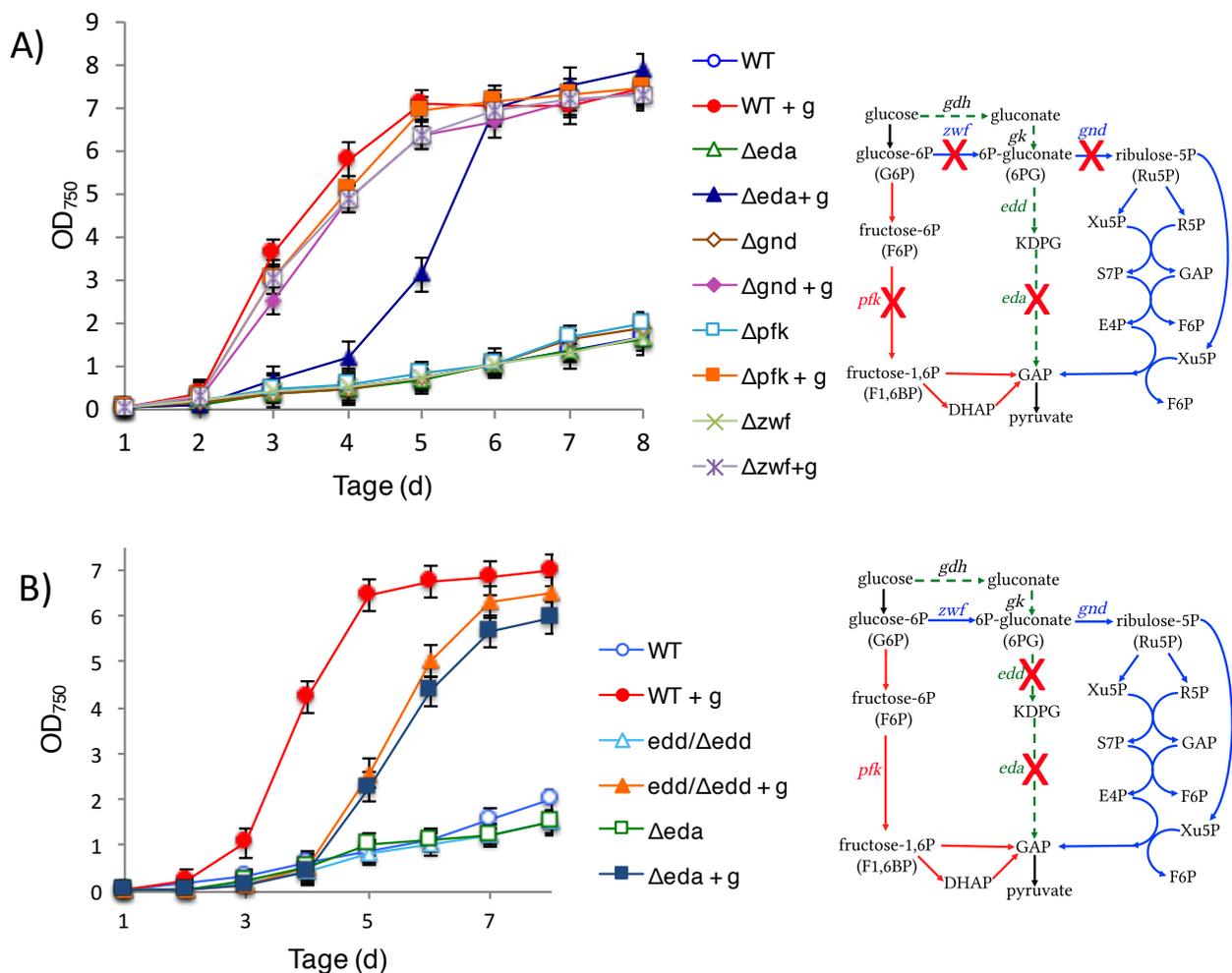


Abbildung 37: Wachstum von *Synechocystis* WT und verschiedenen Einzelmutanten der Glukoseabbauwege unter autotrophen und mixotrophen (+g) Bedingungen unter Dauerlicht.

In Abbildung 37 A) ist zu erkennen, dass *Δeda* als einzige der vollständig segregierten Einzelmutanten unter mixotrophen Bedingungen einen Phänotyp im Wachstum zeigt.

Nach dem zweiten Tag zeigt die Kultur ein deutlich verzögertes Wachstum im Gegensatz zu den anderen Mutanten Δgnd , Δpfk , Δzwf und dem Wildtyp. Nach ca. sechs Tagen konnten die Kulturen ihr Wachstum jedoch wieder dem der anderen anpassen und erreichen bei einer OD_{750} von ca. 7 ihre stationäre Phase. In Abbildung 37 B) ist das Wachstum der nicht vollständig ausgegeregneten edd -Mutante dargestellt. Es ist zu erkennen, dass $edd/\Delta edd$ unter mixotrophen Bedingungen den gleichen Phänotyp im Wachstum aufweist wie die eda -Mutante.

In Abbildung 38 ist das Wachstum der Mutante, in der der OPP-Weg sowie der EMP-Weg ausgeschaltet wurden ($\Delta gnd/\Delta pfk/\Delta zwf$), im Vergleich zum Wachstum des Wildtyp von *Synechocystis* unter autotrophen und mixotrophen (+g) Bedingungen dargestellt. Im Vergleich zum Wildtyp ist zu erkennen, dass die Mutante unter autotrophen Bedingungen ein leicht geringeres Wachstum aufweist. Dieser Phänotyp ist unter mixotrophen Bedingungen (+g) noch deutlicher zu erkennen. Die Mutante ist in ihrem Wachstum ab dem dritten Tag verzögert. Die OD_{750} der stationären Phase liegt deutlich unter der des Wildtyps.

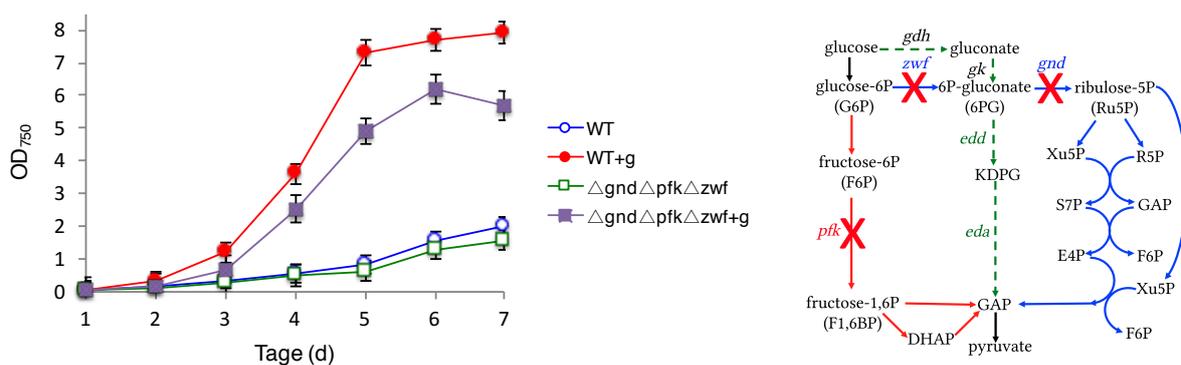


Abbildung 38: Wachstum von *Synechocystis* WT und $\Delta gnd/\Delta pfk/\Delta zwf$ unter autotrophen und mixotrophen (+g) Bedingungen unter Dauerlicht.

In *Synechocystis* sind verschiedene putative Glukosedehydrogenasen (Gdh) zu finden. Xi Chen hat in seiner Arbeit bereits Sll1709 (Gdh) untersucht (Chen 2014, Chen & Schreiber *et. al* 2016). Die in dieser Arbeit untersuchte Gdh ist putative periplasmatische Glukosedehydrogenase (GdhB/Sll1608). Um zu prüfen ob diese einen Einfluss auf das Wachstum von *Synechocystis* hat, wurde das Wachstum von Mutanten, in denen $gdhB$ deletiert wurde sowie eine Mutante in der pfk , zwf und $gdhB$ deletiert wurden mit dem Wachstum des Wildtyps verglichen. In Abbildung 39 ist eine repräsentative Wachstumskurve der Mutanten unter autotrophen und mixotrophen Bedingungen (+g) im Dauerlicht dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Deletion von $gdhB$ einen Einfluss auf das Wachstum hat, sowohl unter autotrophen Bedingungen als auch unter mixotrophen Bedingungen weisen die Kulturen ein verzögertes Wachstum auf. Die Mutante, in der neben der Glukosedehydrogenase noch der EMP-Weg sowie der erste Teil des OPP-Weges ausgeschaltet wurden ($\Delta pfk/\Delta zwf/\Delta gdhB$), weist einen noch stärkeren Phänotyp im Wachstum auf.

Unter mixotropen Bedingungen zeigt die Mutante ein verzögertes Wachstum und unter autotrophen Bedingungen wächst die Mutante ebenfalls deutlich schlechter als der Wildtyp unter gleichen Bedingungen.

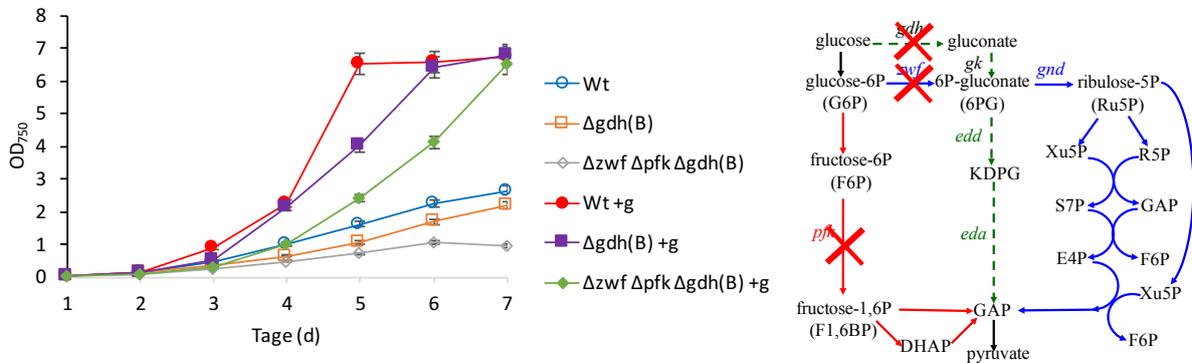


Abbildung 39: Wachstum von *Synechocystis* WT und $\Delta gdh(B)$, $\Delta pfk/\Delta zwf/\Delta gdh(B)$ unter autotrophen und mixotropen (+g) Bedingungen unter Dauerlicht. (bei *gdhB/sll1608* handelt es sich nicht um das in Chen & Schreiber *et al.* untersuchte *gdh/ sll1709*)

In Abbildung 40 ist das Wachstum des Wildtyps und der Mutante in der der EMP-Weg (Δpfk), ein Teil des OPP-Wegs (Δzwf) und der ED-Weg (Δeda) ausgeschaltet wurden, dargestellt. Das Wachstum wurde unter autotrophen und mixotropen Bedingungen im Dauerlicht gemessen. Es ist zu erkennen, dass die Mehrfach-Mutante einen ähnlichen Phänotyp zeigt, wie die *eda*-Einzelmutante (Abbildung 37). Unter mixotropen Bedingungen (+g) ist das Wachstum im Gegensatz zum Wildtyp verzögert. Nach ca. sechs Tagen konnte die Kultur ihr Wachstum jedoch wieder dem des Wildtyps anpassen und erreicht bei einer OD₇₅₀ von ca. 7 ihre stationäre Phase. Das Wachstum unter autotrophen Bedingungen ist in der Mutante leicht schlechter als das Wachstum der Wildtypkultur unter gleichen Bedingungen.

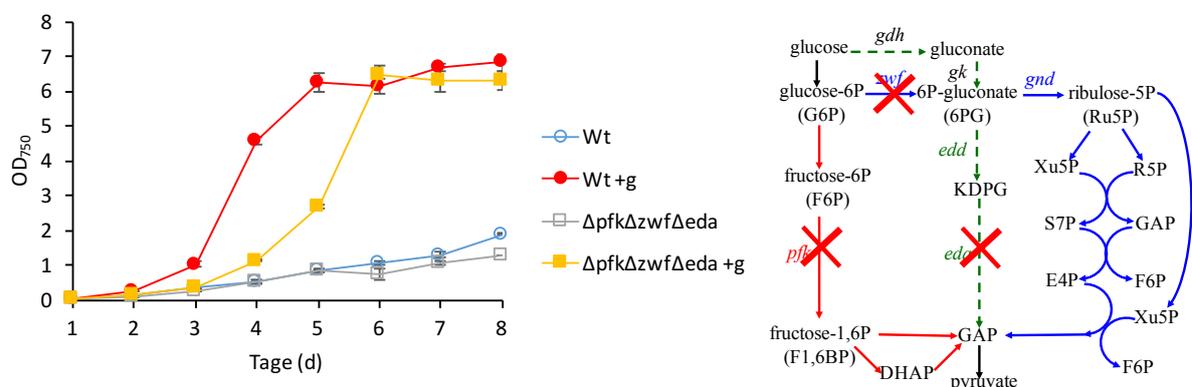


Abbildung 40: Wachstum von *Synechocystis* WT und $\Delta pfk/\Delta zwf/\Delta eda$ unter autotrophen und mixotropen (+g) Bedingungen unter Dauerlicht.

In der Mutante, in der zusätzlich zu den in Abbildung 40 gezeigten *knock-outs* ($\Delta pfk/\Delta zwf/\Delta eda$) noch der zweite Teil des OPP-Wegs (Δgnd) ausgeschaltet wurde, ist deutlich zu erkennen, dass die Mutante unter mixotrophen Bedingungen (+g) nicht mehr in der Lage ist, ihr Wachstum zu erhöhen (Abbildung 41). In der Abbildung liegt $\Delta eda/\Delta gnd/\Delta pfk/\Delta zwf$ genau unter der Kurve der *eda*-Mutante und ist daher nicht gleich zu erkennen. Die in Abbildung 41 gezeigte Wachstumskurve ist repräsentativ für das Wachstum der Mutanten.

Bei einigen Messungen konnte die Mehrfach-Mutante unter mixotrophen Bedingungen gar nicht wachsen. Meist war das Wachstum jedoch, wie in Abbildung 41 gezeigt, ähnlich dem des Wildtyps unter autotrophen Bedingungen. In keiner der Messungen ist die Mutante unter mixotrophen Bedingungen ähnlich wie der Wildtyp oder wie die *eda*-Mutante gewachsen. Unter autotrophen Bedingungen zeigt die Mutante keinen eindeutigen Wachstumsphänotyp, meist war das Wachstum jedoch ähnlich dem der *eda*-Mutante oder leicht schlechter als das des Wildtyps.

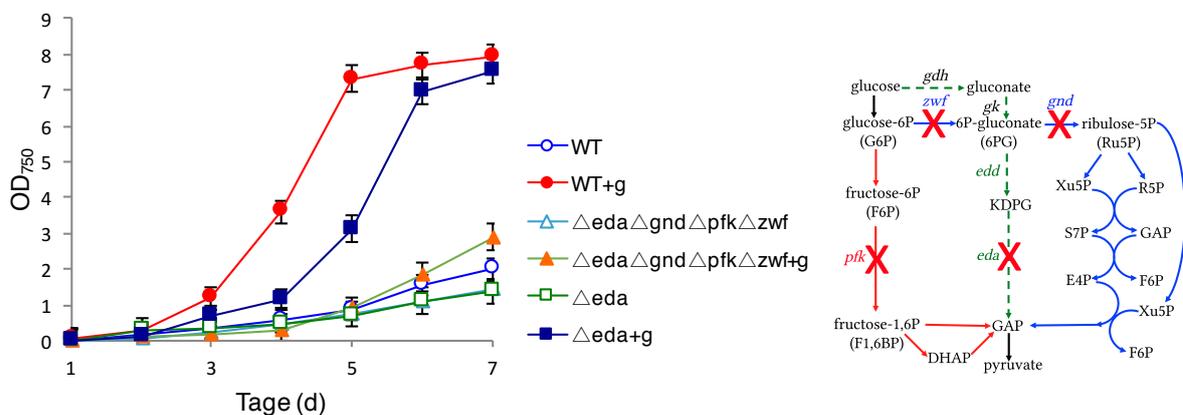


Abbildung 41: Wachstum von *Synechocystis* WT, Δeda und $\Delta eda/\Delta gnd/\Delta pfk/\Delta zwf$ unter autotrophen und mixotrophen (+g) Bedingungen unter Dauerlicht. $\Delta eda/\Delta gnd/\Delta pfk/\Delta zwf$ unter autotrophen Bedingungen liegt genau unter der Δeda Kurve.

In der Mutante, in der der ED-Weg (Δeda) sowie der hintere Teil des OPP-Wegs (Δgnd) ausgeschaltet wurde, wurde das Wachstum ebenfalls unter autotrophen und mixotrophen Bedingungen im Dauerlicht gemessen. Eine repräsentative Wachstumskurve ist in Abbildung 42 dargestellt. Im Vergleich zum Wildtyp zeigt die Mutante im Wachstum unter beiden Bedingungen einen Phänotyp. Unter autotrophen Bedingungen zeigt $\Delta gnd/\Delta eda$ ein schwächeres Wachstum als der Wildtyp. Unter mixotrophen Bedingungen (+g) ist die Mutante nicht in der Lage zu wachsen. Die Kulturen sind in keiner der Messungen angewachsen.

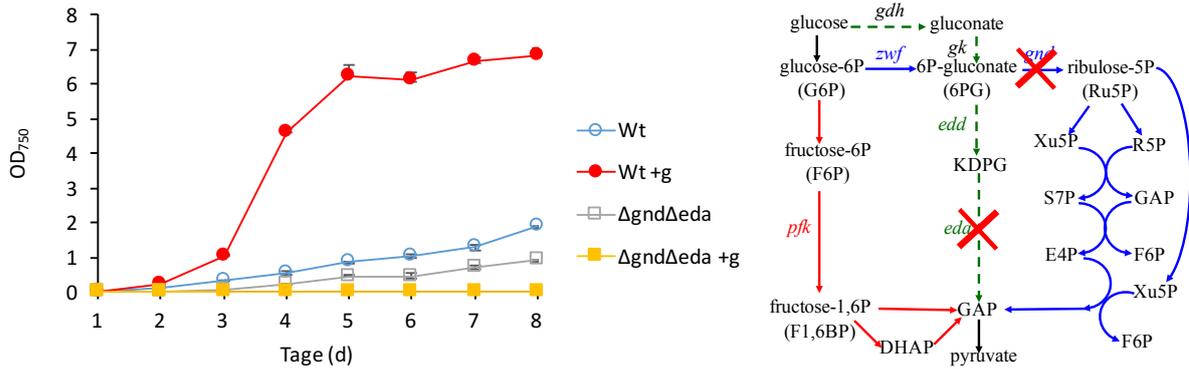


Abbildung 42: Wachstum von *Synechocystis* WT und $\Delta gnd/\Delta eda$ unter autotrophen und mixotropen (+g) Bedingungen unter Dauerlicht.

Um zu prüfen, ob das Ausschalten der verschiedenen Glukoseabbauwege einen Einfluss auf das Wachstum unter anderen Bedingungen als den zuvor gezeigten Bedingungen (autotroph und mixotroph unter Dauerlicht) hat, wurde das Wachstum der Einzelmutanten unter autotrophen Bedingungen im Tag/Nacht-Zyklus (Abbildung 43) und unter heterotrophen Bedingungen (Abbildung 44) gemessen.

Bei der Messung des Wachstums im Tag/Nacht-Zyklus wurden die Kulturen 12 h am Tag belichtet. In der Zeit, in der die Kulturen verdunkelt wurden, wurden sie weiterhin mit Raumluft begast und durchmischt. In Abbildung 43 ist eine repräsentative Wachstumskurve der verschiedenen Mutanten dargestellt. Es ist zu erkennen, dass alle Mutanten leicht schlechter wachsen als der Wildtyp. Die Mutante, in der der ED-Weg blockiert wurde (Δeda), zeigt hierbei das schlechteste Wachstum.

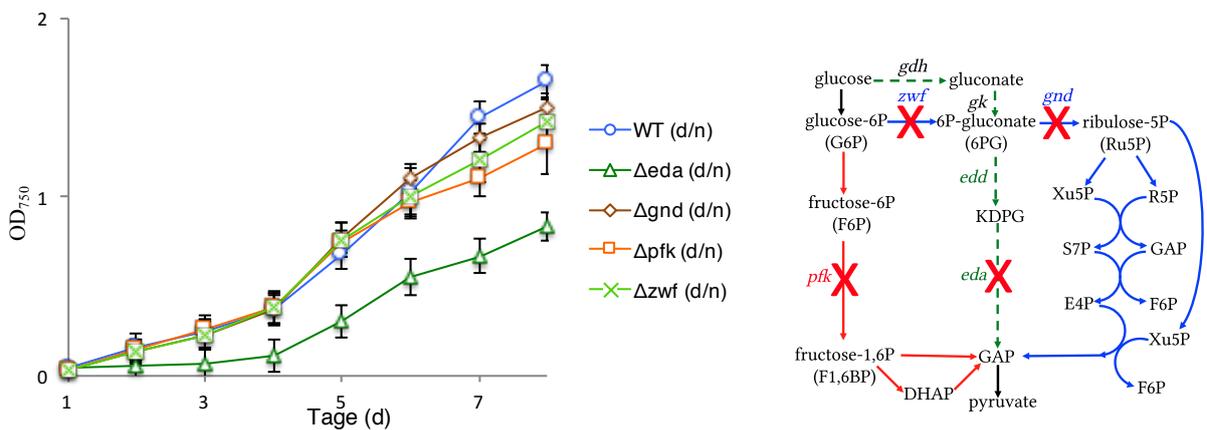


Abbildung 43: Wachstum von *Synechocystis* WT und verschiedenen Einzelmutanten der Glukoseabbauwege unter autotrophen Bedingungen im Tag/Nacht-Zyklus.

Die Kulturen, in denen jeweils nur eins der Enzyme der Glukoseabbauwege ausgeschaltet wurde, wurden ebenfalls unter heterotrophen Bedingungen gemessen. Im Fall dieser Arbeit sind unter heterotrophen Bedingungen LAHG-Bedingungen (light activated heterotrophic growth) zu verstehen (Anderson & McIntosh 1991). Die Kulturen wurden täglich je 10 min belichtet, kurz vor Ende jeder Belichtung wurden die Proben für die OD-Messung abgenommen.

Die Kulturen wurden außerdem dauerhaft mit Raumluft begast und durchmischt. In Abbildung 44 ist das Wachstum der Einzelmutanten unter heterotrophen Bedingungen über einen Zeitraum von 11 Tagen dargestellt. Die Mutanten, in denen die Enzyme des OPP-Wegs ausgeschaltet wurden (Δzwf und Δgnd), konnten nicht wachsen. Die Mutante, in der der EMP-Weg blockiert wurde (Δpfk), zeigte ein schlechteres Wachstum als der Wildtyp. Die Mutante, in der der ED-Weg blockiert wurde (Δeda), zeigte ein leicht erhöhtes Wachstum im Gegensatz zu dem des Wildtyps.

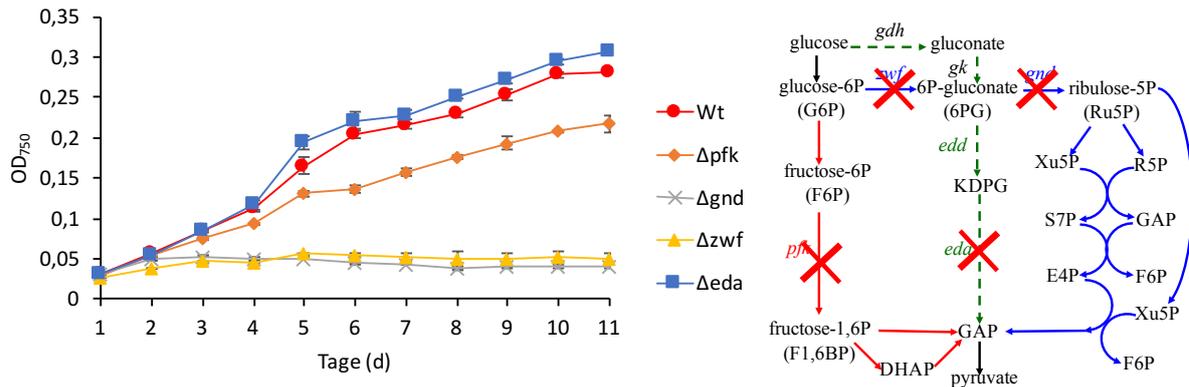


Abbildung 44: Wachstum von *Synechocystis* WT und verschiedenen Einzelmutanten der Glukoseabbauwege unter heterotrophen bzw. LAHG-Bedingungen.

4.3.3 Messung der Enzymaktivität der KDPG-Aldolase

Um zu überprüfen, ob es sich bei den *eda*-Kandidatengen aus *Synechocystis* (*sll1196*) und aus der Geste (*Hordeum vulgare*) tatsächlich um KDPG-Aldolasen handelt, wurden diese überexprimiert und in einem gekoppelten Enzymtest in vitro gemessen (s. 3.7.7).

4.3.3.1 Etablierung des Enzymtests mit *Escherichia coli*

Bereits 1976 wurde in *E. coli* der Entner Doudoroff Weg nachgewiesen (Eisenberg & Dobrogosz 1967). Aus diesem Grund sind die drei Enzyme Eda, Edd und Gnd bereits gut charakterisiert.

Zur Etablierung des Enzymtests wurden in dieser Arbeit *E. coli knock-out* Mutanten erstellt, in denen das Operon, auf dem *eda*-*edd* und *gnd* liegen (Abbildung 45), ausgeschaltet wurden. Beim Erstellen der Mutanten wurde darauf geachtet, dass kein weiteres an den Leseramen angrenzendes Gen beschädigt wurde. Es wurde ebenfalls darauf geachtet, dass der Leseramen für die angrenzenden Gene nicht verschoben wurde. Die *Knock-outs* wurden nacheinander in die Mutanten eingebracht und die zur Selektion verwendete Resistenzkassette wurde wieder entfernt (s. Kapitel 3.5.2). Um zu prüfen, ob das Gen ausgeschaltet wurde, wurde eine PCR mit genomischer DNA aus *E. coli* Wildtyp und den Mutanten durchgeführt. In Abbildung 45 (C) ist das Ergebnis der PCR zur Prüfung des *knock-outs* von Δeda - Δedd in *E. coli* gezeigt. Die erwarteten PCR-Produkte liegen im WT bei 2454 bp, in der Mutante, in der die Resistenz noch nicht wieder entfernt wurde, bei 1600 bp und in der Mutante, in der die Kassette entfernt wurde, bei 250 bp.

Es ist zu erkennen, dass alle drei getesteten Klone die Mutation im *eda-edd* Operon tragen. Es ist ebenfalls zu sehen, dass die Resistenzkassette in allen drei Klonen erfolgreich entfernt wurde und nur noch das deletierte Operon vorliegt. In Abbildung 45 (A) ist die Anordnung des Operons in dem *eda* und *edd* liegen im Genom von *E. coli* dargestellt (ECOCyc; Stand 01/2016). In Abbildung 45 (B) ist die Position von *gnd* im Genom von *E. coli* dargestellt (ECOCyc; Stand 01/2016).

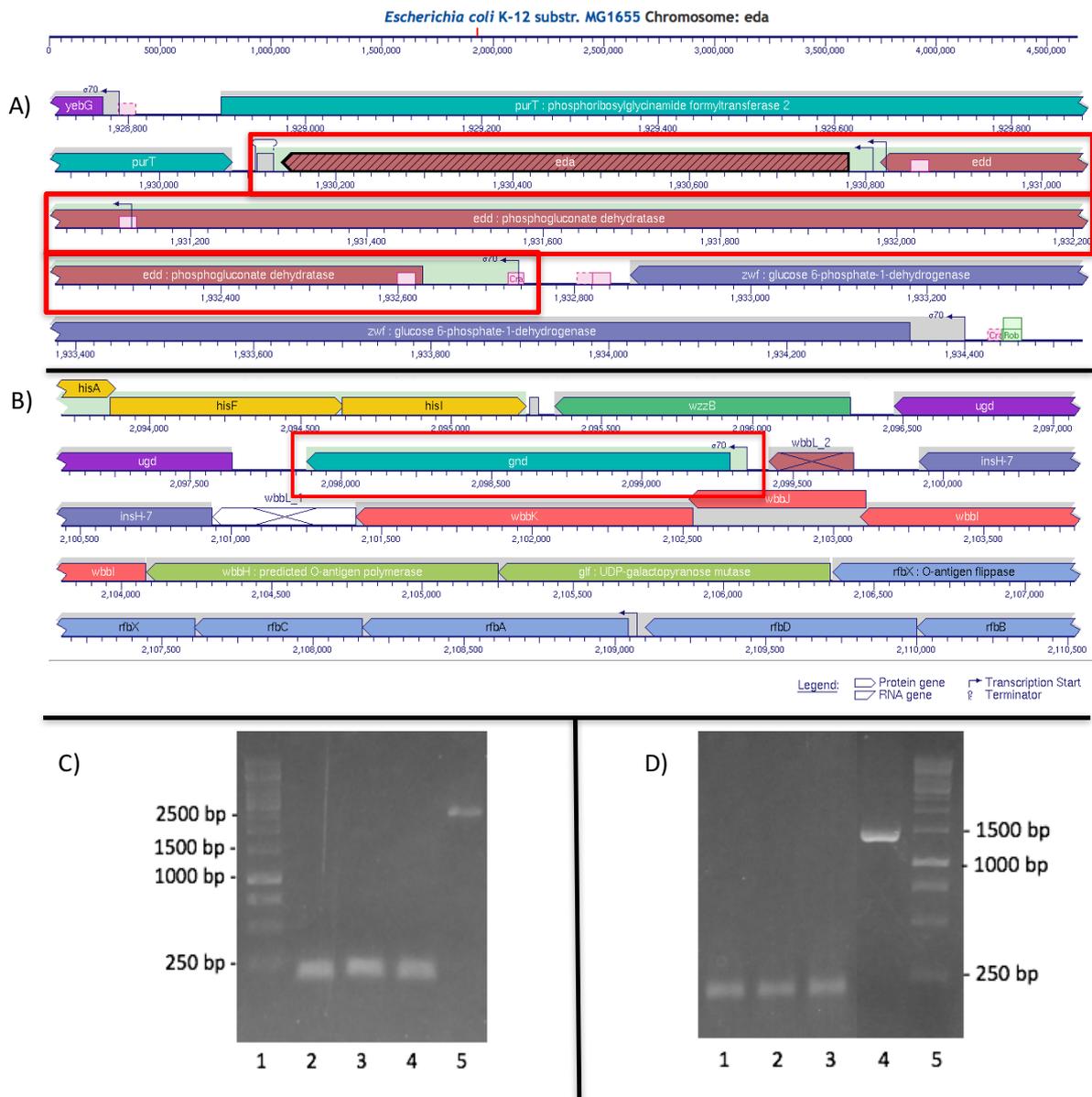


Abbildung 45: (A) Anordnung von *eda-edd* auf dem Operon im Genom von *E. coli* (Quelle ECOCyc/BIOCyc Database 01/2016). (B) Anordnung von *zwf* im Operon im Genom von *E. coli* (Quelle ECOCyc/BIOCyc Database 01/2016); (C) Agarosegelelektrophorese zur Prüfung des *knock-outs* von *eda-edd* in *E. coli*: GeneRuler 1kb DNA Ladder (Spur 1); *Δeda-edd* 1-3 (Spur 2-4) und WT (Spur 5). (D) Agarosegelelektrophorese zur Prüfung des *knock-outs* von *gnd* in *E. coli*. *Δeda-eddΔgnd* 1-3 (Spur 1-3); WT (Spur 4) und GeneRuler 1kb DNA Ladder (Spur 5).

Glukonat kann von *E. coli* aufgenommen und metabolisiert werden (Zwaig *et al.* 1973). Hierbei wird es zunächst über eine Glukonatkinase zu 6-Phosphoglukonat (6PG) phosphoryliert.

6PG kann dann entweder über den OPP-Weg über *Gnd*, oder über den ED-Weg über *Edd* weiter abgebaut werden. Um die erstellten *E. coli* Mutanten zu prüfen, wurden sie auf Minimalmedium mit Glukonat als einzige Kohlenstoffquelle angezogen (Abbildung 46). Um zu verhindern, dass Glukonat über den OPP-Weg abgebaut werden kann, wurde zusätzlich zum *eda-edd* Operon noch *gnd* ausgeschaltet. Das Ausschalten von *gnd* erfolgte nach der Prüfung der *eda-edd*-Mutanten, da die gleiche Resistenzkassette zur Selektion verwendet wurde. Um zu prüfen, ob das Gen ausgeschaltet wurde, wurde eine PCR mit genomischer DNA aus *E. coli* Wildtyp und den Mutanten durchgeführt.

In Abbildung 45 ist das Ergebnis der PCR zur Prüfung des *knock-outs* von *gnd* in Δ *eda-edd* aus *E. coli* gezeigt. Die erwarteten PCR-Produkte liegen im WT bei 1407 bp, in der Mutante in der die Resistenz noch nicht wieder entfernt wurde bei 1600 bp und in der Mutante in der die Kassette entfernt wurde bei 250 bp. Es ist zu erkennen, dass die drei geprüften Δ *eda-edd*-Mutanten auch die Mutation in Δ *gnd* tragen (Abbildung 45/D). Die Resistenzkassette ist auch nach dieser Mutation wieder erfolgreich aus dem Genom entfernt worden.

Nach Prüfung der Mutanten via PCR (Abbildung 45/ C & D) wurde die Mutation zusätzlich durch das Wachstum auf Minimalmedium mit Glukonat (MM-Medium) als einzige Kohlenstoffquelle getestet. In Abbildung 46 ist das Ergebnis des Tests gezeigt. Es wurden je zwei verschiedene Klone auf LB (l) und MM (r) aufgebracht und für drei Tage bei 37°C inkubiert. Es ist zu sehen, dass der Wildtyp von *E. coli* (K12) sowie die Mutante, in der nur das *eda-edd* Operon ausgeschaltet wurde (EDA), in der Lage ist, auf dem Minimalmedium zu wachsen. Die Mutante, in der neben *eda-edd* zusätzlich *gnd* ausgeschaltet wurde, kann nicht mehr auf dem Minimalmedium wachsen. Das gleiche Ergebnis zeigt sich auch beim Wachstum der Zellen in flüssigem Medium.

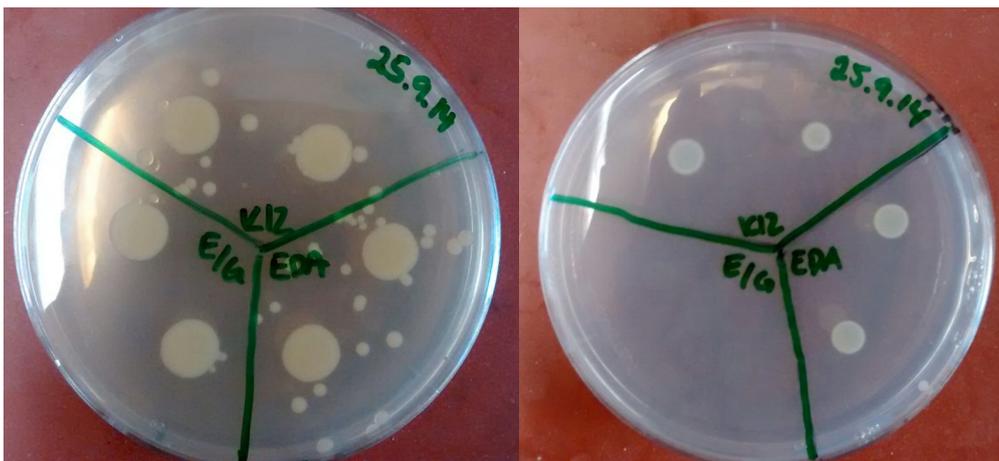


Abbildung 46: Wachstumstest der Δ *eda-edd* und Δ *eda-edd* Δ *gnd* Mutanten und dem Wildtyp von *E. coli* auf LB-Medium (l) und Minimal-Medium mit Glukonat (r).

Der Test zur Aktivitätsbestimmung von Eda basiert auf einem gekoppelten Enzymtest, die Reaktion ist schematisch in Abbildung 47/A dargestellt.

4.3.3.2 Messung der Enzymaktivität von *sll0107* aus *Synechocystis* PCC 6803

Für die Aktivitätsmessung der putativen KDPG-Aldolase (Eda) aus *Synechocystis* wurde das identifizierte Kandidatengen (*sll0107*) via PCR aus genomischer DNA des Wildtyp amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in den pCR2.1-TOPO® zwischenkloniert. Die Aminosäuresequenz wurde mittels Sequenzierung geprüft. Die korrekten Sequenzen wurden mittels Restriktionsenzymverdau herausgeschnitten und in den Überexpressionsvektor pet22b+ eingebracht. Dieses Konstrukt wurde ebenfalls zur Überprüfung sequenziert und anschließend in den *E. coli* Überexpressionsstamm BL21(DE3) PLYs eingebracht. Die erwartete Größe des putativen Eda ist ca. 22 kDa. Das Protein konnte nach Induktion mit 0,4 mM bei 15 °C exprimiert werden (Abbildung 48).

Das Protein wurde jedoch in *inclusion bodies* exprimiert und es konnte nur im Pellet gefunden werden. Um das Protein zu extrahieren, wurde es in 8 M Harnstoff gelöst und denaturierend mit Hilfe des His-Tags über eine Ni-NTA Säule aufgereinigt. Die verschiedenen Fraktionen sind in Abbildung 48 dargestellt. Es konnte jedoch kein aktives Protein gewonnen werden.

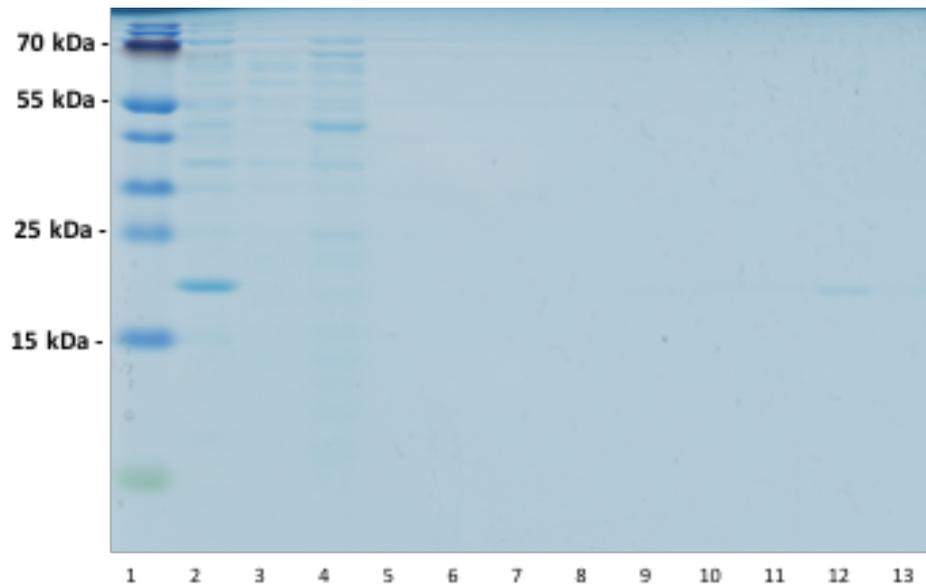


Abbildung 48: Aufreinigung von Eda aus *Synechocystis* nach Expression im pet22b+Vektor. PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Spur 1); Pellet (Spur 2); Überstand (Spur 3); Waschfraktion 1 (Spur 4); Waschfraktion 4 (Spur 5); Elution 1-8 (Spur 6-13).

Um das Protein in die lösliche Fraktion zu bekommen, wurde der Leserahmen mit dem C-terminalen His-Tag aus dem Vektor mittels Restriktionsverdau geschnitten und in den pMAL-pIII ligiert. Das Fusionsprotein aus Eda und dem Maltosebindeprotein sollte durch die Signalsequenz von *malE* ins Periplasma transportiert werden. Es wurden drei Klone mit starker Expression identifiziert: 6803-16, 6803-17 und 6803-19. Die drei Klone wurden für die Überexpression genutzt. In Abbildung 49 ist das Coomassie gefärbte SDS-Gel der Expression und der Elutionen nach der Aufreinigung mit Hilfe des His-Tags über eine Ni-NTA Säule gezeigt.

Für die Elution wurden die Überstände aller drei Klone vereinigt. In Abbildung 49 ist zu erkennen, dass ein Protein der richtigen Größe (ca. 61 kDa) aufgereinigt werden konnte. In Elutionsfraktion 3 (Abbildung 49/Spur 11) ist am meisten Protein enthalten. Diese Fraktion wurde für den Enzymtest eingesetzt. Es konnte keine Aktivität mit dem überexprimierten Fusionsprodukt von Eda aus *Synechocystis* und dem Maltosebindeprotein nachgewiesen werden.

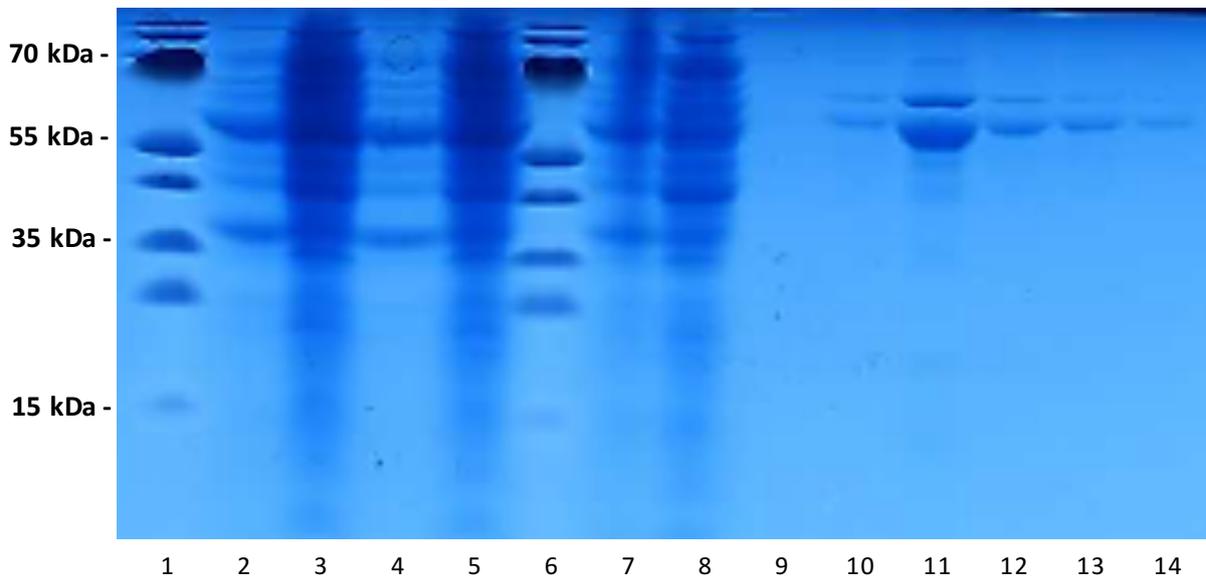


Abbildung 49: Aufreinigung von dem putativen Eda aus *Synechocystis* nach Expression im pMAL-Vektor. PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Spur 1); 6803-17 Überstand (Spur 2); 6803-17 Pellet (Spur 3); 6803-17 Überstand (Spur 4); 6803-17 Pellet (Spur 5); PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Spur 6); 6803-16 Überstand (Spur 7); 6803-16 Pellet (Spur 8); Elutionsfraktionen 1-6 (Spur 9-14).

Für die homologe Genexpression des putativen Eda-Proteins in *Synechocystis* wurde der psM-Shuttlevektor genutzt (Zhou *et al.* 2014). In Abbildung 50 A ist der verwendete Vektor mit dem Insert zur Überexpression von Eda dargestellt. Der Vektor besitzt zwei Rekombinationsstellen die eine Insertion des eingefügten Leserahmens ins Genom von *Synechocystis* mittels homologer Rekombination ermöglichen. Die Rekombination erfolgt in *pta* (*slr2132*). Das *pta* Gen kodiert für eine Phosphotransacetylase, dem ersten Enzym in der Acetat-Synthese. Eine Insertion in dieses Gen beeinflusst das Zellwachstum nicht (Zhou *et al.* 2012). Zur Erstellung des Konstruktes zur Überexpression wurden die einzelnen Bestandteile via PCR amplifiziert und fusioniert. Für die Expression wurde der Promoter P_{cpc560} aus genomischer DNA des *Synechocystis* Wildtyps amplifiziert. Er ist der natürliche Promoter von c-Phycocyanin. Die Sequenz wurde mit Hilfe spezifischer Primer am 5' Ende mit einer XhoI Schnittstelle und am 3' Ende mit einer homologen Sequenz zu *eda* erstellt. Als Terminator wurde T_{rbcl} aus der genomischen DNA von *Synechocystis* amplifiziert. T_{rbcl} ist der natürliche Terminator der Ribulose-Bisphosphate-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco). Die amplifizierte Sequenz hatte am 5' Ende eine homologe Sequenz zu *eda* und am 3' Ende eine XhoI Schnittstelle. Die

Methode haben wir aus dem Artikel Zhou *et al.* 2014 übernommen und der Vektor wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Jie Zhou zur Verfügung gestellt.

Ein Konstrukt mit der *eda* Sequenz aus *Synechocystis* wurde mit einem C-terminalen His-Tag versehen. Der zur Sequenz zugehörige Terminator wurde nicht mit amplifiziert, da T_{rbcl} als Terminator für das Konstrukt verwendet wurde.

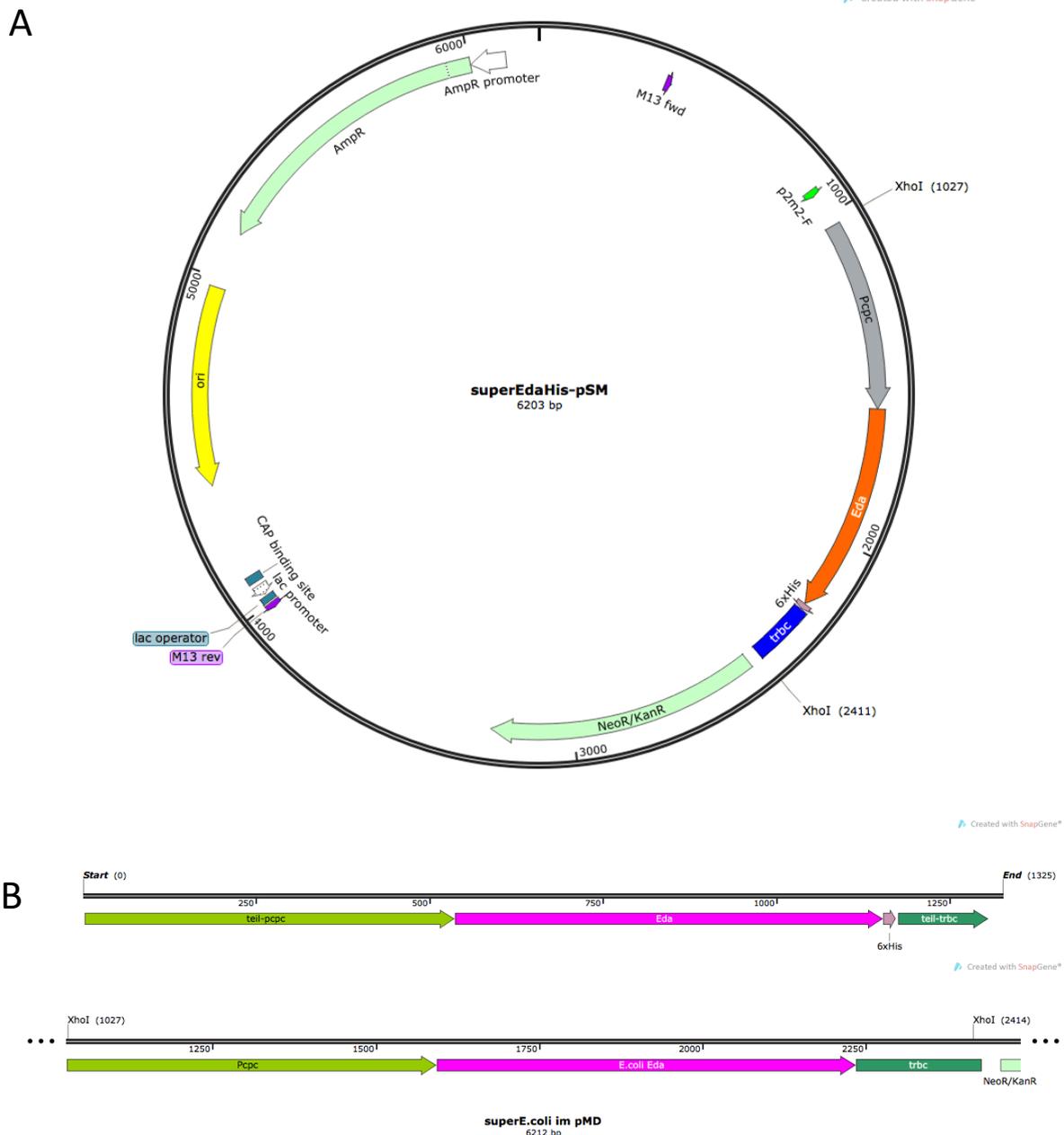


Abbildung 50: (A) psM-Schuttlevektor zur Überexpression des putativen Eda in *Synechocystis*; (B) Expressionskonstrukte zur Expression von Eda in *Synechocystis* mit HIS-Tag (oben) und ohne HIS-Tag (unten).

Das fusionierte Produkt aus P_{cpC560} , *eda*-HIS und T_{rbcl} wurde in den pCR2.1-TOPO® zwischenkloniert und sequenziert. Die geprüfte Sequenz wurde mit dem Restriktionsenzym XhoI aus dem Vektor geschnitten und in den psM-Vektor ligiert. Der ligierte psM-Vektor wurde erneut sequenziert und anschließend in Δeda transformiert. Die Mutante wird im Weiteren $\Delta eda:: P_{cpC560}edaHis$ benannt.

In Abbildung 51 ist die Aktivitätsmessung von Eda aus *Synechocystis* dargestellt. Die Messung ist im Gesamtextrakt durchgeführt worden und als Negativkontrolle diente Δeda . Im Extrakt der Mutante ohne das Überexpressionskonstrukt konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.

Es ist eine deutliche Abhängigkeit zwischen der KDPG Konzentration und der Menge an produziertem Pyruvat zu erkennen. Um ein Maß für die Affinität von Eda zu KDPG zu bestimmen wurde die Michaeliskonstante (K_M) errechnet. Diese ergibt sich aus der halbmaximalen Umsatzgeschwindigkeit der Substratkonzentration ($v = \frac{1}{2} \cdot v_{\max}$). Aus der Messung errechnet sich der K_M -Wert mit 0,095 mM.

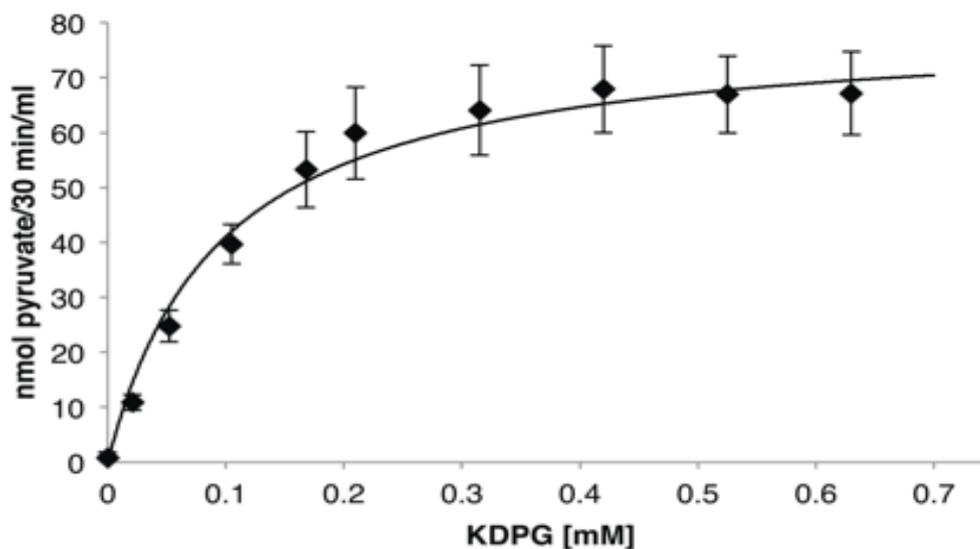


Abbildung 51: Aktivitätsmessung der KDPG-Aldolase (Eda) aus *Synechocystis* im Gesamtextrakt. K_M -Wert 0,095.

Dieser Test zeigt klar, dass es sich bei dem putativen Eda-Protein aus *Synechocystis* tatsächlich um eine KDPG-Aldolase handelt. Um jedoch auszuschließen, dass die Reaktion durch andere Proteine im Zellextrakt hervorgerufen wurde, wurde Eda aus *Synechocystis* im Zellfreien Extrakt gemessen. Durch den His-Tag war es möglich, das überexprimierte Eda aus *Synechocystis* über eine Ni-NTA Säule aufzureinigen. Das aufgereinigte Protein konnte erfolgreich im Enzymtest eingesetzt werden und es konnte Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 52). Der K_M -Wert von 0.095 aus der vorherigen Messung konnte in dieser Messung bestätigt werden.

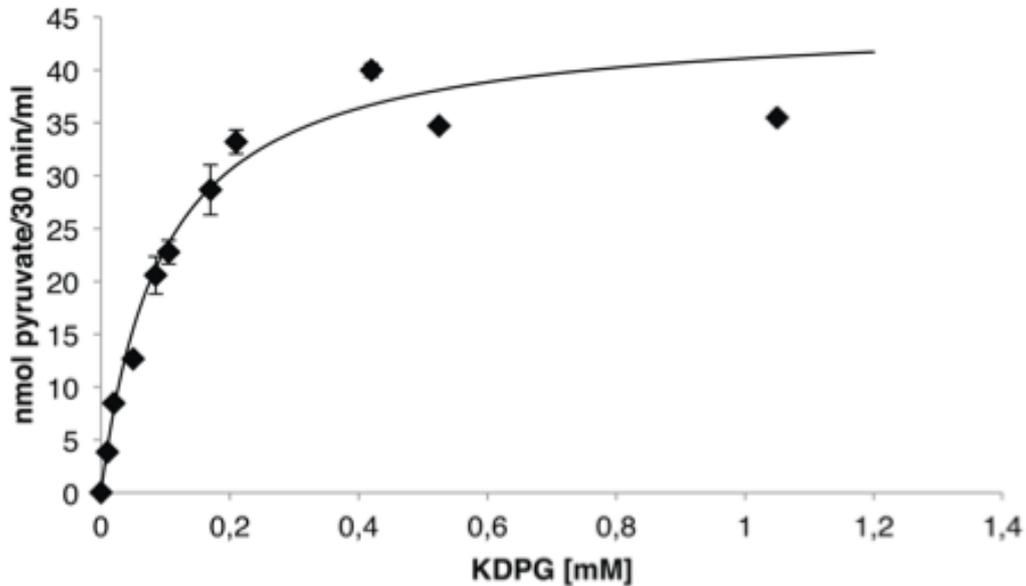


Abbildung 52: : Aktivitätsmessung der aufgereinigten KDPG-Aldolase (Eda) aus *Synechocystis*. K_M -Wert 0,095.

4.3.4 Komplementierung von Δeda in *Synechocystis*

Um den Phänotyp von Δeda zu komplementieren wurde die Mutante mit Hilfe des psM-Shuttlevektors (Abbildung 50) erneut transformiert. Zur Erstellung des Konstruktes zur Komplementation wurden die einzelnen Bestandteile via PCR amplifiziert und fusioniert. Für die Expression wurde der Promoter P_{cpc560} aus genomischer DNA des *Synechocystis*-Wildtyps amplifiziert mit einer XhoI-Schnittstelle (5') und einer homologen Sequenz zu *eda* (3'). Als Terminator wurde T_{rbcl} aus der genomischen DNA aus *Synechocystis* amplifiziert mit einer homologen Sequenz zu *eda* (5') und einer XhoI-Schnittstelle (3'). Für die Komplementierung wurde *eda* aus *Synechocystis* und aus *E. coli* amplifiziert und mit dem Promoter P_{cpc560} und dem Terminator T_{rbcl} fusioniert. Im Gegensatz zu dem Leserahmen, der für die Überexpression verwendet wurde, wurde dem Leserahmen für die Komplementation kein His-Tag angehängt (Abbildung 50/B). Die geprüften Sequenzen wurden in den psM Vektor ligiert und anschließend in Δeda transformiert. Die Mutanten sind im weiteren $\Delta eda::P_{cpc}edaSynechocystis$ und $P_{cpc}edaEcoli$ benannt. Als Kontrolle wurde neben den beiden Konstrukten auch ein psM-Vektor ohne Insert in Δeda transformiert. Diese Mutante wird im Weiteren $\Delta eda+pSM(leer)$ benannt. Die Mutanten wurden mit Hilfe der über den pSM-Vektor eingebauten Kanamycinresistenz selektiert. In Abbildung 53 ist das Ergebnis der Überprüfung der erstellten Komplementationsmutanten gezeigt. Jede Kultur wurde zweimal aufgetragen, wobei die erste jeweils eine 1:100 Verdünnung der DNA ist. Die erwarteten Größen der Banden liegen für den Wildtyp und Δeda bei 1763 bp, für $\Delta eda+pSM(leer)$ bei 1010 bp, für $\Delta eda::P_{cpc}edaSynechocystis$ bei 2376 bp und für $\Delta eda::P_{cpc}edaE.coli$ bei 2397 bp. Es ist zu erkennen, dass alle Mutanten das Konstrukt zur Komplementierung der Mutation eingebaut haben. Wobei $\Delta eda::P_{cpc}edaSynechocystis$ und $\Delta eda::P_{cpc}edaE.coli$ noch Wildtypkopien tragen und damit nicht vollständig segregiert waren.

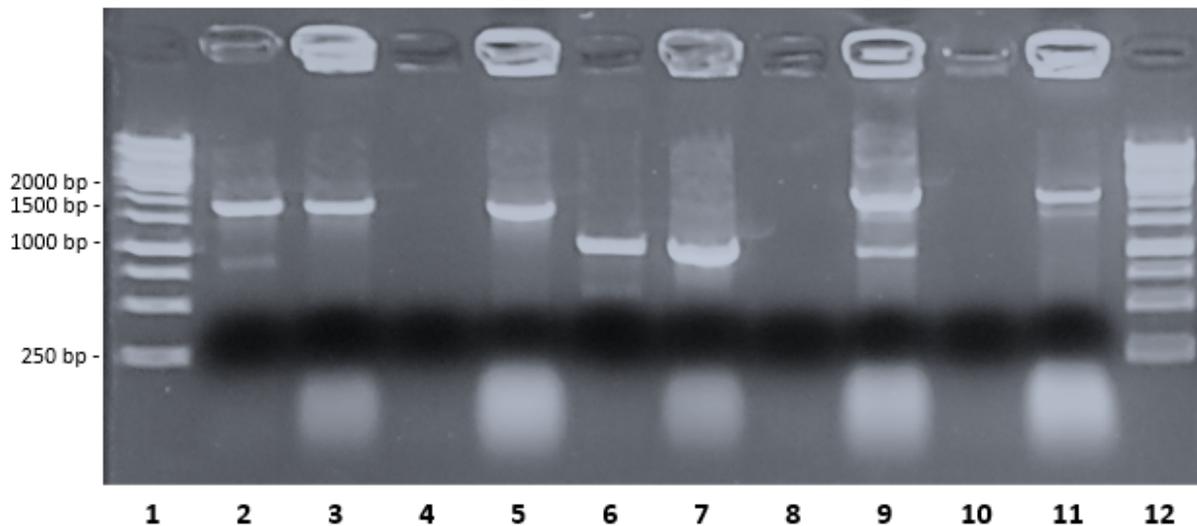


Abbildung 53: PCR zur Überprüfung der komplementierten *eda*-Mutanten. GeneRuler 1kb DNA Ladder (Spur 1); WT (Spur 2-3); Δeda (4-5); Δeda +pSM(Leer) (6-7); $\Delta eda::PcpcedaSynechocystis$ (8-9); $\Delta eda::PcpcedaE.coli$ (10-11); GeneRuler 1kb DNA Ladder (Spur 12); Die erwarteten Größen sind: WT, Δeda : 1763 bp; Δeda +pSM(Leer):1010 bp; $\Delta eda::PcpcedaSynechocystis$: 2376 bp; $\Delta eda::PcpcedaE.coli$: 2397 bp.

In Abbildung 54 ist das Wachstum der komplementierten *eda*-Mutanten im Vergleich zur Mutante selber und zum Wildtyp unter mixotrophen Bedingungen dargestellt. Die Wachstumskurve in Abbildung 54/B zeigt ein repräsentatives Ergebnis der Messung. Für jede Kultur wurden jeweils in 3 Parallel-Kulturen angezogen und gemessen, aus denen ein Mittelwert und die Standardabweichung berechnet wurde. Das Wachstumsexperiment wurde dreimal unabhängig repliziert. In Abbildung 54/A sind Bilder der Kulturen am zweiten, dritten, vierten, fünften und siebten Messtag gezeigt. Da die Mutanten nicht vollständig segregiert waren (Abbildung 53), wurde den Kulturen Kanamycin hinzugegeben. Das Antibiotikum soll den Selektionsdruck erhöhen und verhindern, dass die Mutation im Wachstum wieder verloren geht. Um zu verhindern, dass die Zugabe des Antibiotikums das Ergebnis verfälscht wurde der Kultur zur Kontrolle, mit dem leeren pSM Vektor ebenfalls Kanamycin hinzugegeben. Die Kontrolle diente weiterhin zur Prüfung, ob die Insertion von fremd DNA in *pta*, dem Gen das für die Phosphotransacetylase kodiert, kein Einfluss auf das Zellwachstum hat (Zhou *et al.* 2012).

Die Komplementationen der *eda*-Mutanten $\Delta eda::P_{cpceda}Synechocystis$ und $\Delta eda::P_{cpceda}E.coli$ waren erfolgreich. In Abbildung 54/B ist zu erkennen, dass die Mutanten in der Lage sind ihr Wachstum wieder dem des Wildtyps anzupassen. Die Insertion des leeren pSM-Vektors zeigte keinen Einfluss auf das Wachstum. Die Mutante verhielt sich in allen Messungen wie Δeda . Die Zugabe von Kanamycin zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf das Zellwachstum der Kulturen.

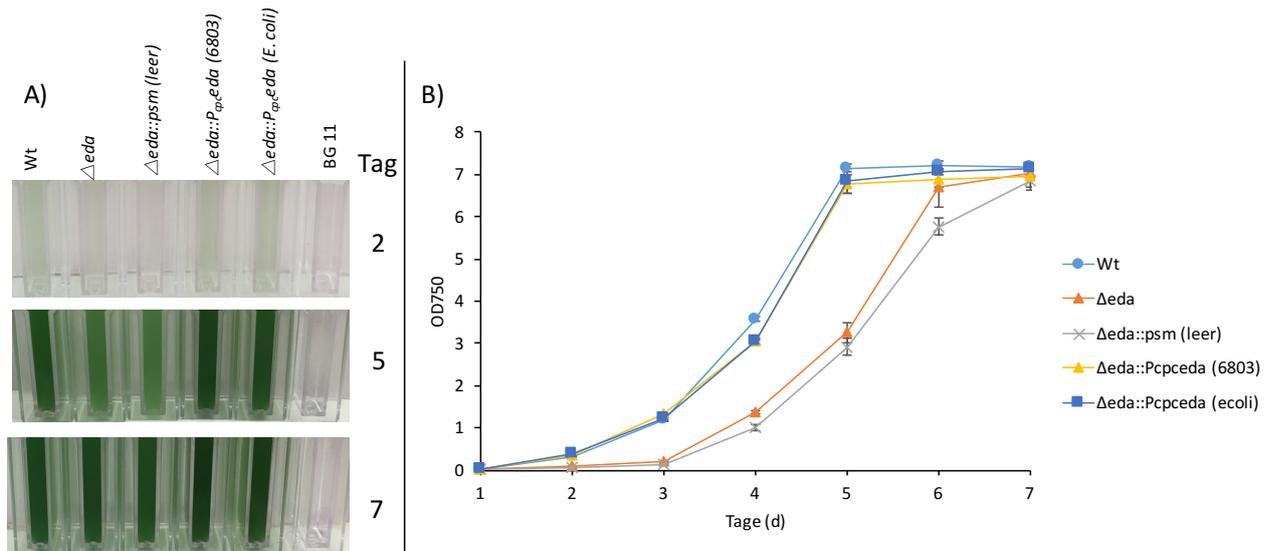


Abbildung 54: Wachstum komplementierter *eda*-Mutanten $\Delta eda::P_{cpc}eda$ *Synechocystis* und $\Delta eda::P_{cpc}eda$ *E. coli*, dem Wildtyp, Δeda und $\Delta eda+psm$ (leer) unter mixotropen Bedingungen. A) Bilder der Kulturen am 2., 5., und 7. Messtag. B) Wachstumskurve der gemessenen Mutanten.

4.3.5 Messung der Enzymaktivität der putativen KDPG-Aldolase aus *Hordeum vulgare*

Zur Messung der Enzymaktivität der putativen KDPG-Aldolase aus *H. vulgare* wurde der Leserahmen des identifizierten Kandidatengens (BAJ87430; AK356212) zunächst via PCR aus cDNA amplifiziert. Zusätzlich zum Leserahmen wurde mit Hilfe der Oligonukleotide ein C-terminaler His-Tag an die Sequenz fusioniert. Die korrekten Sequenzen wurden in den Überexpressionsvektor pet22b+ eingebracht. Dieses Konstrukt wurde in die *E. coli* Überexpressionsstämme BL21(DE3) und BL21(DE3) PLYs eingebracht. Es wurden zu Anfang je zwei verschiedene Klone gespickt und mit 0,4 mM IPTG für 24 h induziert, diese wurden anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen, um die Expression des putativen Eda-Proteins zu überprüfen. Die erwartete Größe des Proteins liegt bei ca. 25 kDa. In Abbildung 55 ist das Ergebnis der Expression der verschiedenen Klone dargestellt. Um festzustellen, ob das Protein in der löslichen Fraktion oder im Zellpellet zu finden ist, wurden die Zelltrümmer nach dem Aufbruch durch Zentrifugation von der löslichen Fraktion getrennt. Beide Proben, Pellet und Überstand wurden jeweils auf das Gel aufgetragen. Die Kulturen in den Spuren 2-9 wurden in BL21 (DE3) und die Kulturen in den Spuren 10-17 wurden in BL21 (DE3) PLYs-Zellen exprimiert. Die Expression erfolgte bei 15 °C (Bar1 und Bar2) und 37 °C (Bar3 und Bar4).

In Abbildung 55 ist zu erkennen, dass nur in den Kulturen Bar1 und Bar2 in den PLYs-Zellen eine Überexpression zu erkennen ist (Spur 11 und 13). Das exprimierte Produkt ist jedoch nur im Pellet und nicht in der löslichen Fraktion im Überstand zu finden. Das putative Eda-Protein wurde dementsprechend in sogenannten *inclusion bodies* exprimiert.

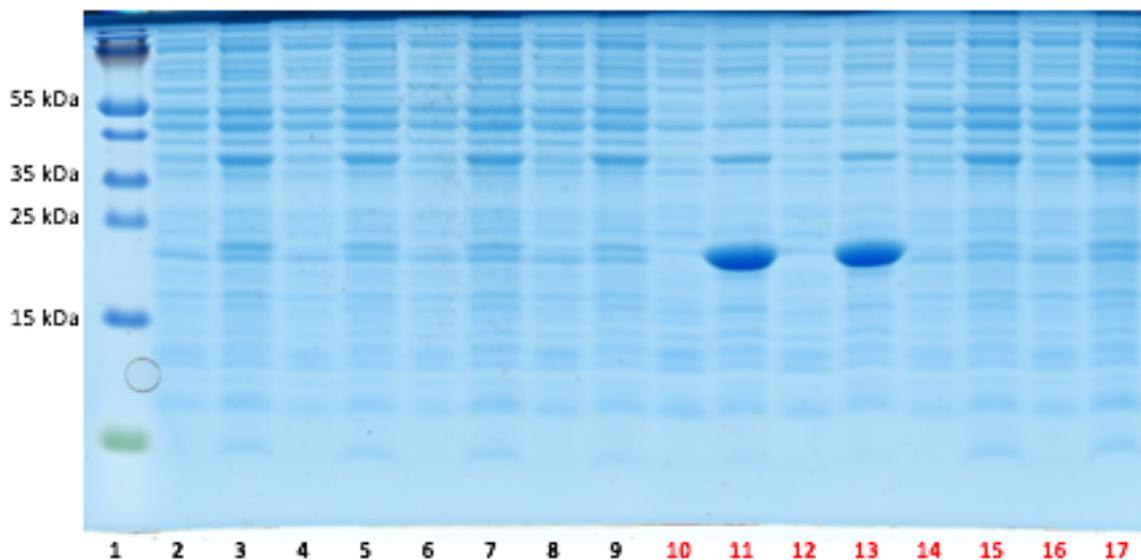


Abbildung 55: Expression von Eda aus *H. vulgare* im pet22-b+Vektor. PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Spur 1); Bar1-Überstand (Spur 2); Bar1-Pellet (Spur 3); Bar2-Überstand (Spur 4); Bar2-Pellet (Spur 5); Bar3-Überstand (Spur 6); Bar3-Pellet (Spur 7); Bar4-Überstand (Spur 8); Bar4-Pellet (Spur 9); Bar1-Überstand (Spur 10); Bar1-Pellet (Spur 11); Bar2-Überstand (Spur 12); Bar2-Pellet (Spur 13); Bar3-Überstand (Spur 14); Bar3-Pellet (Spur 15); Bar4-Überstand (Spur 16); Bar4-Pellet (Spur 17).

Um das Protein aus den *inclusion bodies* zu lösen und einer eventuell falschen Faltung des Proteins entgegen zu wirken, wurden die Pellets von Bar1 und Bar2 wurden vereinigt, in 8 M Harnstoff gelöst und denaturierend über eine Ni-NTA Säule aufgereinigt. Die verschiedenen Fraktionen sind in Abbildung 56 dargestellt. Es konnte Protein über die Ni-NTA Säule aufgereinigt werden. Im Enzymtest konnte jedoch keine Aktivität nachgewiesen werden. Es war nicht möglich, das Protein aus dem Pellet zu isolieren und Enzymaktivität nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde eine Überexpression eines Fusionsproteins aus dem putativen Eda aus *H. vulgare* mit dem Maltose Bindeprotein in *E. coli* BL21 durchgeführt. Hierfür wurde der Leserahmen mit dem C-Terminalen His-Tag, der bereits zur Expression im pet22-Vektor verwendet wurde, in den pMAL-pIII-Vektor ligiert. Der pMAL-pIII-Vektor besitzt hinter dem eingefügten Insert das Gen *malE* des Maltose- Binde-Protein (MBP). Da das MBP ein sehr stabiles Protein ist, sollte hierbei eine Produktion von *inclusion bodies* vermieden werden (Maina *et al.* 1988). Die Signalsequenz von *malE* leitet das Fusionsprotein durch die cytoplasmatische Membran und das pMAL-Fusionsprotein kann so aus dem Periplasma gereinigt werden.

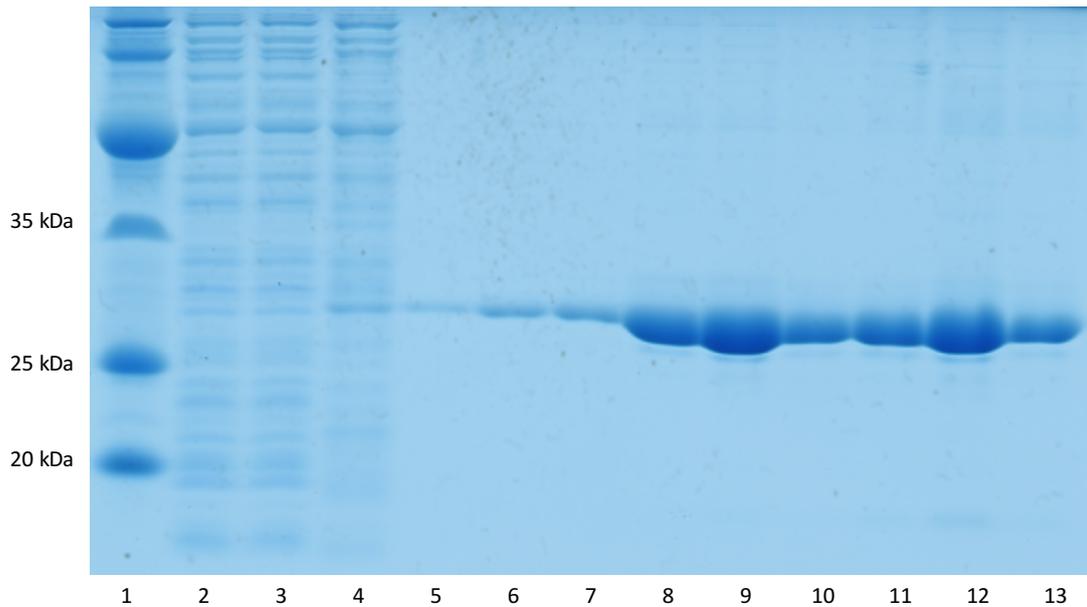


Abbildung 56: Aufreinigung von Eda aus *H. vulgare* nach Expression im pet22b+Vektor. Pierce™ Prestained Protein MW Marker (Spur 1); Pellet (Spur 2) Durchlauf (Spur 3) Waschfraktion 1 (Spur 4); Waschfraktion 4 (Spur 5); Elutionsfraktionen 1-8 (Spur 6-13).

Die Sequenzen wurden erneut überprüft und in den *E. coli* Überexpressionsstamm BL21(DE3) PLYs eingebracht. Die Expression erfolgte nach Induktion mit 0,4 mM IPTG für 24 h bei 15 °C. Das erwartete Fusionsprotein hat eine erwartete Größe von ca. 61 kDa. In Abbildung 57 ist das Coomassie gefärbte SDS-Gel der Aufreinigung des Fusionsproteins von Eda und dem MBP gezeigt. Das Fusionsprotein konnte erfolgreich exprimiert werden, der größte Anteil befindet sich hierbei in der löslichen Fraktion im Überstand (Abbildung 57/Spur 1). Das Protein wurde mit Hilfe des C-Terminalen His-Tags über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt.

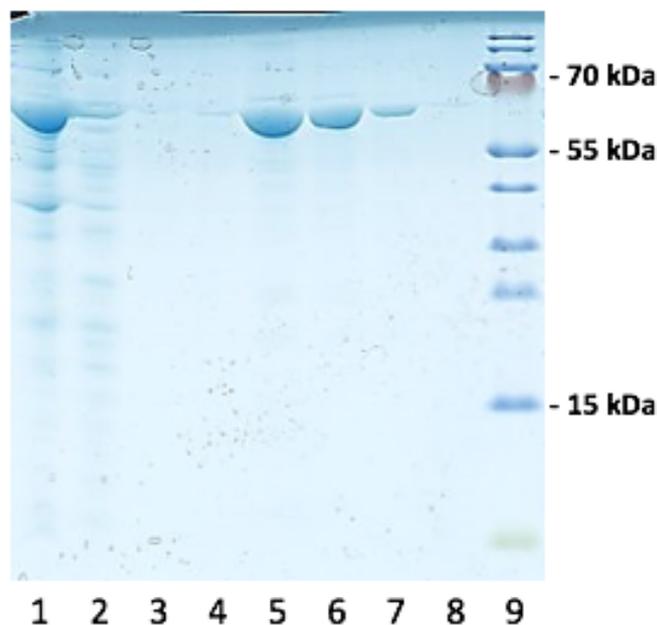


Abbildung 57: Aufreinigung von Eda aus *H. vulgare* nach Expression im pMAL. Überstand (Spur 1); Pellet (Spur 2); Elution 1 (Spur 3); Elution 2 (Spur 4); Elution 3 (Spur 5); Elution 4 (Spur 6); Elution 5 (Spur 7); Elution 6 (Spur 8); PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Spur 9).

Um das MBP von Eda zu trennen, wurde das aufgereinigte Fusionsprodukt mit der Faktor Xa Protease (NEB, Ipswich, MA, USA) verdaut. Im ersten Teil (Spur 1-11) in Abbildung 58 ist das Ergebnis des Verdaus nach der Aufreinigung durch eine Entsalzer-Säule dargestellt (s.3.7.1.1). Das SDS-Gel wurde anschließend silbergefärbt, um ein sensitiveres Ergebnis zu erhalten. Es ist zu erkennen, dass das Fusionsprotein mittels der Protease teilweise geschnitten wurde. Die Effizienz des Verdaus konnte durch Veränderung der Parameter in verschiedenen Versuchen nicht verbessert werden. Anschließend an den Xa-Verdau wurde das Protein über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Das Ergebnis ist in Abbildung 58/Teil 2 (Spur 12-21) dargestellt.

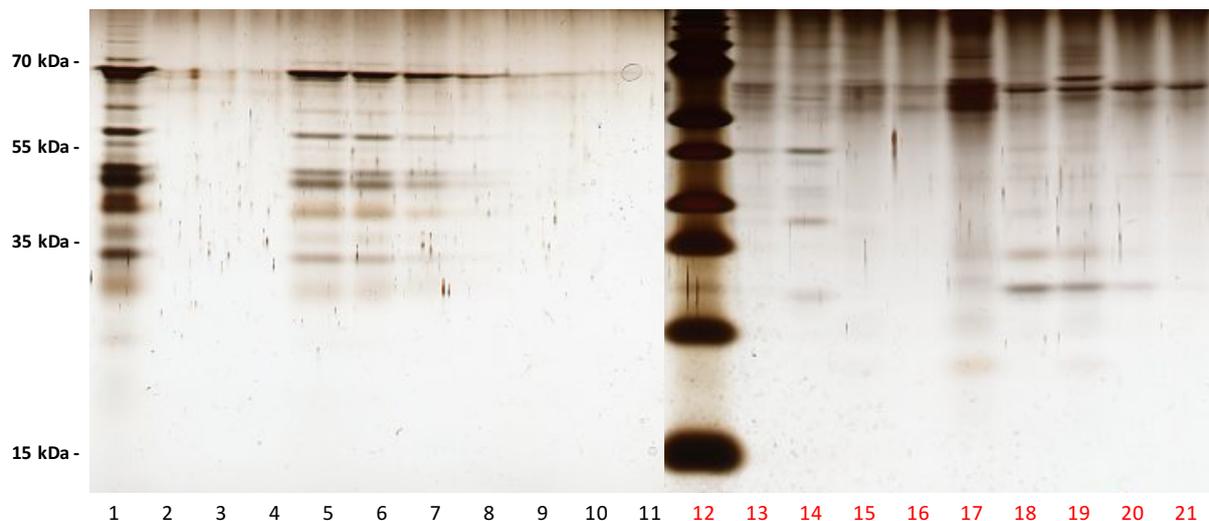


Abbildung 58: SDS-Gel zur Überprüfung des Xa-Verdaus des Fusionsproteins aus Eda und dem MBP; Verdautes Eda/MalE Protein (Spur 1) Elutionsfraktionen 1-10 (Spur 2-11). PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Spur 12); Durchlauf (Spur 13); Waschfraktion 1 (Spur 14); Waschfraktion 2 (Spur 15); Elutionsfraktionen 1-6 (Spur 16-21).

Der verdaute Enzymkomplex wurde in den Enzymtest eingesetzt, die Aktivität war jedoch sehr gering und kaum nachweisbar. Aus diesem Grund wurde der Enzymtest zum Nachweis der Aktivität von Eda aus *H. vulgare* mit dem Enzymkomplex aus Eda und dem MBP durchgeführt.

In Abbildung 59 ist die Aktivitätsmessung von Eda aus *H. vulgare* dargestellt. Es ist eine deutliche Abhängigkeit zwischen der KDPG-Konzentration und der Menge an produziertem Pyruvat zu erkennen. Aus der Messung errechnete sich der K_M -Wert mit 0,35. Dieser Test zeigt klar, dass es sich bei dem putativen Eda aus *H. vulgare* tatsächlich um eine KDPG-Aldolase handelt.

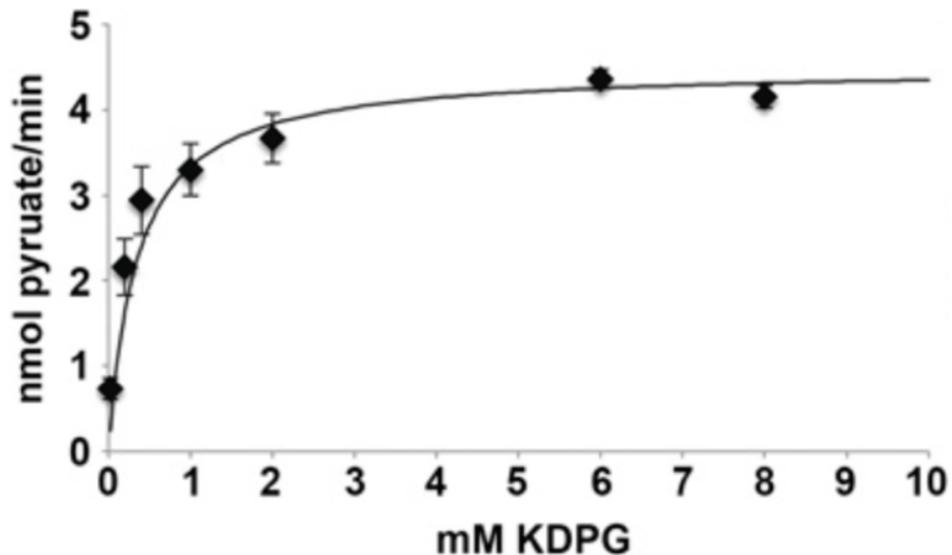


Abbildung 59: Aktivitätsmessung der KDPG-Aldolase (Eda) aus *Hordeum vulgare*. K_M -Wert mit 0,35.

4.3.6 Bioinformatische Untersuchungen zu *eda*

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden Kandidatengene für *eda* in verschiedenen Organismen identifiziert (Chen & Schreiber *et al.* 2016). Um die Kristallstrukturen der beiden in dieser Arbeit genauer untersuchten Proteine von *Synechocystis* und *H. vulgare* zu betrachten, wurden die Proteinstrukturen mit Hilfe des RaptorX-Web-Servers (Källberg *et al.* 2012) in 3D Kristallstrukturen umgewandelt (Stand 05/2015). In Abbildung 60 sind die Strukturen des bereits bekannten Proteins aus *E. coli* und die Proteine von *Synechocystis* und *H. vulgare* abgebildet. Es ist zu erkennen, dass die beiden Proteine die gleiche $(\alpha/\beta)_8$ barrel Struktur zeigen wie das bereits bekannte und gut untersuchte Protein aus *E. coli*. Der katalytische Lysinrest ist immer in der Mitte des Zylinders angeordnet, in der Nähe des 6. β -Stranges. Die KDPG-Aldolase aus *E. coli* bildet einen Trimer (Walters *et al.* 2008). Über die Konformation der anderen beiden Proteine lassen sich anhand der Analyse keine Aussagen treffen.

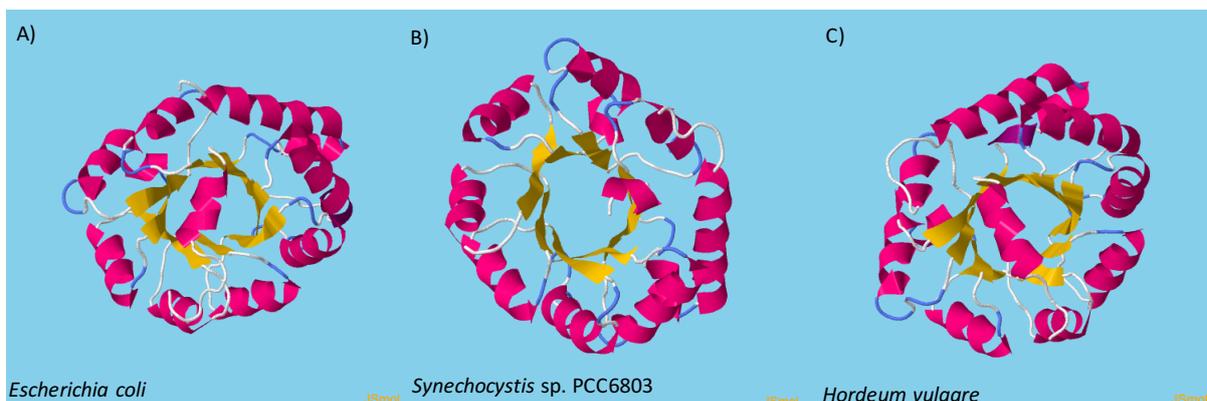


Abbildung 60: Abgeleitete Kristallstruktur von Eda aus *E. coli*, *Synechocystis* und *H. vulgare*.

Pflanzenproteine besitzen oft Zielsequenzen, die dazu führen, dass die Proteine vom Synthesort zum Einsatzort transportiert werden. Um zu prüfen, ob die Aminosäuresequenz eine entsprechende Information trägt, wurde TargetP 1.1 zur Vorhersage der Lokalisation von Eda verwendet (Emanuelsson *et al.* 2000). Die Analyse weist darauf hin, dass Eda aus *H. vulgare* eine Mitochondrien Importsequenz trägt (s. Anhang/ Seite: 133). Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass das Protein in den Chloroplasten lokalisiert ist. Weitere Analysen mit weiteren Vorhersage-Programmen iPSORT (Bannai *et al.* 2002), PredSL (<http://aias.biol.uoa.gr/PredSL/index.html>) und WoLFPSORT (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>) haben dieses Ergebnis bestätigt (Tabelle 25), ++ stellt eine eindeutig identifizierte Lokalisationssequenz dar und +, +/- eine mögliche Lokalisation.

Tabelle 25: Vorhersagen zur Lokalisation von Eda in *Hordeum vulgare*.

Webseite	Chloroplast	Mitochondrien
TargetP 1.1	+	++
iPSORT	+	++
PredSL	+/-	++
WoLFPSORT	+	++

4.3.7 Quantitative real time PCR des *eda* Gens

Da die *Synechocystis*-Mutante, in der *eda* ausgeschaltet wurde und somit der ED-Weg blockiert wurde, den auffälligsten Phänotyp unter mixotrophen Bedingungen gezeigt hat, wurde die relative Transkription von *eda* in BG11-Medium mit Glukose und in normalem BG11 untersucht. Hierfür wurde RNA aus Wildtypkulturen isoliert. Die Proben zur RNA-Isolierung wurden zu fünf verschiedenen Zeitpunkten entnommen: 12, 24, 36, 48 und 72 h nach Zugabe von Glukose. Die Effizienz der genutzten Primer wurde bereits in einer vorherigen Arbeit getestet (Chen 2014). Die gemessene Transkription wurde auf die Transkription des Referenzgens *16s* bezogen und ist in Abbildung 61 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass nach 48 h die Transkriptmenge von *eda* deutlich erhöht ist.

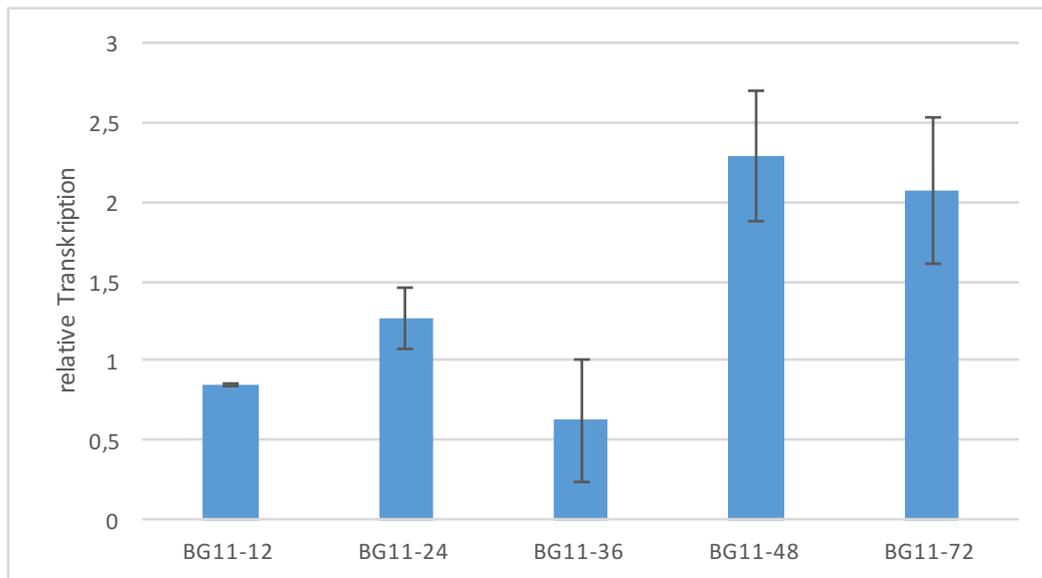


Abbildung 61: Relative Transkription von *eda* in BG11+g/BG11 nach 12, 24, 36, 48 und 72 h nach Zugabe von Glukose im Bezug auf die Trankription von *16s*.

4.3.8 Wasserstoffmessungen

Um zu prüfen, ob einer der Glukoseabbauwege einen besonderen Einfluss auf die fermentative Wasserstoffproduktion hat, wurden die Mutanten, in denen jeweils einer der Wege ausgeschaltet wurde, die Wasserstoffproduktion mit den Mikrosensoren von Unisense gemessen. Die Messung erfolgte direkt in den Zellkulturen.

Die Zellen wurden vor der Messung mit Stickstoff begast, um anaerobe Bedingungen zu erhalten. Damit die Bedingungen erhalten bleiben, wurden die Kulturen über einen Zeitraum von 12 h im Dunkeln gemessen. Dass kein Sauerstoff mehr in den Kulturen vorhanden war, konnte mit dem Sauerstoffsensoren, der sich in der Wildtyp-Referenz befand, gemessen werden. Wasserstoffproduktion konnte nur beobachtet werden, wenn kein Sauerstoff mehr in der Kultur zu detektieren war. In Abbildung 62 ist das Mittel aller gemessenen maximalen Wasserstoffproduktionen der verschiedenen *Synechocystis*-Mutanten und dem Wildtyp bezogen auf die gemessene OD₇₅₀ gezeigt. Die Mutante, in der der ED-Weg unterbrochen wurde (Δeda), zeigt keine verminderte Wasserstoffproduktion, in einigen Messungen produzierte die Mutante mehr Wasserstoff, im Mittel ist jedoch kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Die Mutante, in der der EMP-Weg ausgeschaltet wurde (Δpfk), zeigt eine leicht verminderte Wasserstoffproduktion im Vergleich zum Wildtyp. Die Mutanten, in denen der OPP-Weg blockiert wurde, zeigen eine deutlich geringere Wasserstoffproduktion als der Wildtyp, wobei die Mutante in der der vordere Teil ausgeschaltet wurde (Δzwf) noch deutlich mehr Wasserstoff produziert als die Mutante, in der der hintere Teil ausgeschaltet wurde (Δgnd).

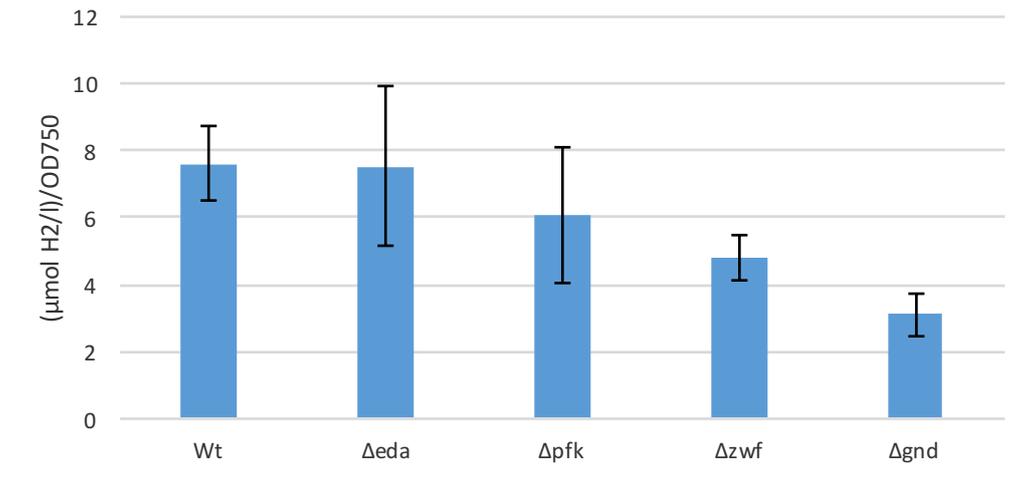


Abbildung 62: Fermentative Wasserstoffproduktion des *Synechocystis* WT und verschiedenen Einzelmutanten der Glukoseabbauwege.

Bei einer Wiederholung der Messung zeigte die Mutante in der *eda* ausgeschaltet wurde eine deutlich erhöhte Wasserstoffproduktion. Da die Messwerte dieser Reihe extrem von den darauf folgenden Messwerten abweichen und bisher nicht reproduziert werden konnten, sind sie gesondert in Abbildung 63 dargestellt. Bei den in Abbildung 63 dargestellten Ergebnissen handelt es sich um die Mittelwerte von drei Messungen aus aufeinander folgenden Tagen. Die Kultur wurde für jede Messung neu vorbereitet, stammte aber aus der gleichen Vorkultur. Es ist zu sehen, dass die Mutante bei dieser Messreihe fast siebenmal mehr Wasserstoff produziert als der Wildtyp.

Die in Abbildung 62 und Abbildung 63 gezeigte Wasserstoffproduktion wurde in Zellen in BG11₀-Medium mit Glukose und 5 mM Arginin gemessen. Bei dem BG11₀-Medium handelt es sich um BG11-Medium, das kein Nitrat enthält. Aus diesem Grund wurde Arginin als reduzierte Stickstoffquelle hinzugegeben. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass unter diesen Bedingungen im Wildtyp die größte Menge an Wasserstoff produziert wird (Burgstaller, persönliche Mitteilung).

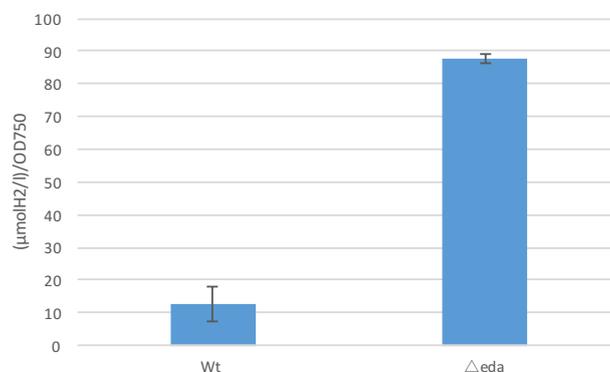


Abbildung 63: Gesonderte Messung der fermentativen Wasserstoffproduktion im WT von *Synechocystis* und in der *eda*-Mutante.

Um zu prüfen, wie die gemessenen Mutanten unter gleichen Bedingungen wachsen, wurden sie über einen Zeitraum von 8 Tagen in BG11₀ mit Arginin und Glukose angezogen und das Wachstum anhand der OD₇₅₀ gemessen. Das Wachstum sowie eine schematische Darstellung der ausgeschalteten Glukoseabbauwege ist in Abbildung 64 dargestellt. Die Kulturen wurden im Tag/Nacht-Rhythmus (12 h Licht/ 12 h Dunkel) angezogen, wobei die Kulturen nachts nicht mit Raumluft begast und durchmischt wurden. Alle Kulturen wuchsen unter diesen Bedingungen schlechter als unter Normalbedingungen (Abbildung 37/A). Die Kulturen in denen der EMP-Weg ausgeschaltet wurde (Δpfk), wächst leicht schlechter als der Wildtyp. Die *eda*-Mutante wächst leicht verzögert und ist nicht in der Lage so weit zu wachsen, die stationäre Phase ist bereits bei einer OD₇₅₀ von ca. 0,5 erreicht. Die Mutanten Δzwf und Δgnd , in denen der OPP-Weg blockiert wurde, sind gar nicht gewachsen.

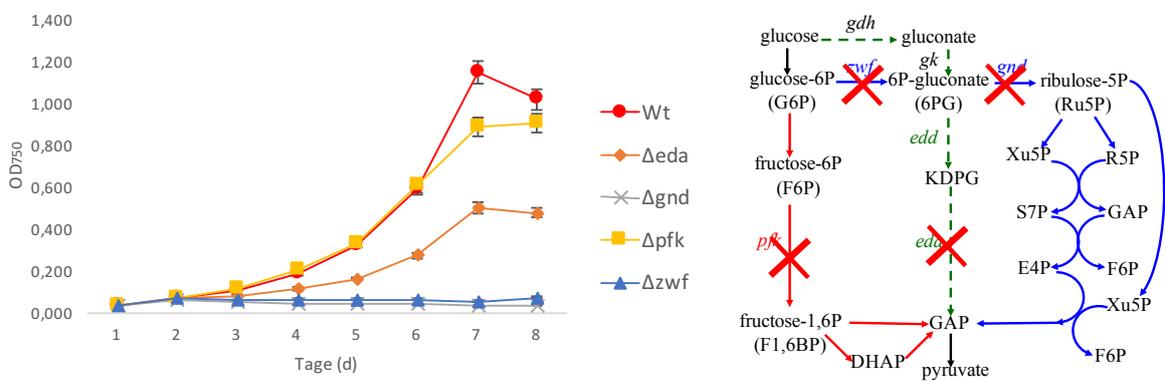


Abbildung 64: Wachstum von *Synechocystis* WT und verschiedenen Einzelmutanten der Glukoseabbauwege in BG11₀ mit Glukose und Arginin (5 mM) im Tag/Nacht-Zyklus.

5 Diskussion

5.1 Elektronentransport zur bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenase

Synechocystis spec. PCC 6803 ist mit Hilfe der bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenase in der Lage, Wasserstoff zu produzieren. Um die Wasserstoffproduktion in *Synechocystis* für biotechnologische Nutzung zu erhöhen, wurde in dieser Arbeit der Elektronentransport zur Hydrogenase, unter Betrachtung verschiedener Aspekte, genauer untersucht.

5.1.1 Aufklärung der Rolle der Ferredoxine im Elektronentransports bei der Wasserstoffproduktion in *Synechocystis*

Synechocystis besitzt neun verschiedene Gene, die für Ferredoxine kodieren. Diese unterscheiden sich hauptsächlich durch den Aufbau der Eisen-Schwefelcluster (Fe-S-Cluster) (Cassier-Chauvat *et al.* 2014), aber auch durch die Aminosäuren, welche die Fe-S-Cluster umgeben (Imlay 2006). Entsprechend der Organismen, in denen sie zuerst beschrieben wurden und anhand ihrer Fe-S-Cluster, unterscheidet man zwischen bakteriellen Ferredoxinen mit [2Fe-2S], [3 Fe-4S] oder [4Fe-4S]-Clustern und pflanzlichen Ferredoxinen mit einem [2Fe-2S]-Cluster (Sticht & Rösch 1998). Die Ferredoxine Fdx1, Fdx2, Fdx3, Fdx6 und Fdx8 sind nachweislich essentiell unter photoautotrophen Bedingungen (Poncelet *et al.* 1998; Cassier-Chauvat & Chauvat 2014). Fdx1 ist vor allem für die Elektronenübertragung vom Photosystem I zur Ferredoxin-NADP-Reduktase bekannt (Hanke & Mulo 2013). Es kann jedoch auch direkt die [NiFe]-Hydrogenase reduzieren, was weiter zur Produktion von Photowasserstoff führt (Gutekunst *et al.* 2014). Im Gegensatz zu Fdx1 sind die anderen Ferredoxine unter photoautotrophen Bedingungen nur schwach exprimiert (Poncelet *et al.* 1998; Mazouni *et al.* 2003). Die Expression der einzelnen Ferredoxine ist stark an Umweltbedingungen wie Licht-, Sauerstoff- und CO₂-Verfügbarkeit gekoppelt (Cassier-Chauvat & Chauvat 2014).

Im Gegensatz zu Fdx1 sind nur wenige Studien über die Ferredoxine Fdx7 und Fdx9 bekannt. Um weitere Information über diese Enzyme und ihrer Rolle in der Wasserstoffproduktion zu erhalten beschäftigt sich diese Arbeit mit der Analyse dieser beiden bakteriellen Ferredoxine: Fdx7 und Fdx9. Fdx9 (Slr2059) besitzt ein [4Fe-4S] [4Fe-4S]-Cluster (Cassier-Chauvat & Chauvat 2014). Durch die beiden [4Fe-4S]-Cluster in einem Monomer ist Fdx9 in der Lage, zwei Elektronen pro Reaktion zu übertragen (Imlay 2006). Im Genom clustert *fdx9* zusammen mit *txIA* (Cassier-Chauvat & Chauvat 2014). *TxIA* ist für die Bildung von Disulfidbrücken innerhalb von Proteinen notwendig. Durch die Erstellung von *knock-out*-Mutanten der einzelnen Ferredoxine konnte deren Funktion für die Zelle untersucht werden. Die in dieser Arbeit erstellte Mutante $\Delta fdx9$ wurde daraufhin überprüft, ob *fdx9* aus allen Genomkopien erfolgreich mutiert wurden. Die Mutante wies zum Zeitpunkt der Messungen keine Kopie des Wildtyps mehr auf (s. Abbildung 15, Seite 62).

Durch die vollständige Segregation konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, dass Fdx9 nicht essentiell für das Wachstum von *Synechocystis*, unter autotrophen Bedingungen ist. Es ist bekannt, dass Flavodoxin als Elektronenüberträger zur Hydrogenase eine höhere Wasserstoffproduktionsrate erzielt als die gemessenen pflanzlichen Ferredoxine (Gutekunst *et al.* 2014). Dies liegt vermutlich an der höheren Umsatzzahl des Hydrogenase-Flavodoxin Komplexes im Gegensatz zu dem Hydrogenase-Ferredoxin Komplex (Gutekunst *et al.* 2014). Um zu prüfen, ob die bakteriellen Ferredoxine ebenfalls als Elektronenüberträger der Hydrogenase fungieren können, wurde die Wasserstoffproduktion der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp gemessen (s. Kapitel 4.1.4, Seite 65).

Im Vergleich zum Wildtyp zeigt die *fdx9*-Mutante eine geringere fermentative Wasserstoffproduktions-Rate (s. Abbildung 19, Seite 65). Die Messungen der fermentativen Wasserstoffproduktion mit der Clark-Elektrode zeigen nur die ersten 10-20 min der H₂-Produktion, nach Verdunkelung der Zellen auf. Aus diesem Grund konnte hier nur die Rate der fermentativen H₂-Produktion bestimmt werden. Neue Messungen in unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die *fdx9*-Mutante über einen Zeitraum von 12 h eine gesteigerte Gesamtproduktion an fermentativen Wasserstoff aufweist (Y. Wang, persönliche Mitteilung).

Im Gegensatz zum Wildtyp zeigt die *fdx9*-Mutante bei der Messung der Photowasserstoffproduktion eine deutlich geringere Menge an produziertem Wasserstoff (s. Abbildung 19, Seite 65). Fdx9 hat demnach einen Einfluss auf den Elektronentransport zur Hydrogenase. Die geringere Photowasserstoffproduktion der *fdx9*-Mutante lässt vermuten, dass Fdx9 Elektronen vom PSI, bzw. in der Nähe des PSI aufnehmen kann und hier mit anderen Redoxpartnern interagiert. Dieses Ergebnis passt zu der Beobachtung, dass Fdx9 ebenso wie Fdx1, die Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase (FNR) reduzieren kann (Cassier-Chauvat & Chauvat 2014). Fdx1 kann Elektronen direkt auf die Hydrogenase übertragen (Gutekunst *et al.* 2014). Trotz der unterschiedlichen Fe-S-Cluster haben Fdx1 und Fdx9 ähnliche Redoxpotentiale von -440 mV und -420 mV (Cassier-Chauvat & Chauvat 2014), daher ist es möglich, dass die beiden Proteine mit den gleichen Redoxpartnern, wie beispielsweise der Hydrogenase, interagieren können.

Diese Vermutung, dass Fdx9 ein Redoxpartner der Hydrogenase ist wird auch durch die Interaktion mit dem Flavoprotein Flv3 (Cassier-Chauvat & Chauvat 2014) bestätigt. Der Enzymkomplex aus Flv1 und Flv3 reduziert in der *Mehler-like* Reaktion, Sauerstoff am PSI direkt zu Wasser (Allahverdiyeva *et al.* 2011). Die Interaktion von Flv3 und Fdx9 kann im Weiteren dem Schutz des Fe-S-Clusters von Fdx9 dienen. Die [4Fe-4S]-Cluster sind sensitiv gegenüber Sauerstoff. Trifft Superoxid auf das Fe-S-Cluster wird es von [4Fe-4S]²⁺ in eine instabile [4Fe-4S]³⁺ Form oxidiert, in der das Eisen leicht aus der Verbindung gelöst werden kann und das Protein so irreversibel geschädigt wird (Imlay 2006). Interagiert Fdx9 nahe dem PSI kann es demnach durch oxidativen Stress schnell beschädigt werden.

Die Konformation der Fe-S-Cluster spielt eine große Rolle bei der Sensitivität gegenüber Sauerstoff, die „*high-potential*“ Ferredoxine (HiPIPs) beispielsweise sind durch ihre Form in der Lage, zwischen den beiden Oxidationsstadien $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ und $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$ zu wechseln, ohne ein Eisenmolekül zu verlieren (Imlay 2006). Ebenso konnte für die O_2 -tolerante [NiFe]-Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* gezeigt werden, dass durch Veränderungen der Konformation des Fe-S-Clusters die Sauerstofftoleranz beeinflusst werden kann (Goris *et al.* 2011). In *Clostridium Pasteurianum* konnte der Einfluss eines $2[4\text{Fe-4S}]$ -Ferredoxins auf die Stabilization der [FeFe]-Hydrogenase nachgewiesen werden (Quinkal *et al.* 1994). Ob Fdx9 sich selber oder andere Proteine wie die Hydrogenase durch eine besondere Konformationsänderung vor O_2 schützen kann, ist bisher nicht bekannt.

Das zweite, in dieser Arbeit untersuchte Ferredoxin, ist Fdx7 (SII0662), das ein einfaches $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster trägt. Da Fdx7 nicht essentiell für das Wachstum unter phototrophen Bedingungen ist (Cassier-Chauvat & Chauvat 2014) war es möglich, die *fdx7*-Mutante vollständig zu segregieren (s. Abbildung 15, Seite 62). Sie zeigte in den Wachstumsexperimenten weder unter photoautotrophen noch unter mixotrophen Bedingungen einen Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp (s. Abbildung 16, Seite 63). Für Fdx7 wurde jedoch eine Funktion in der Stresstoleranz nachgewiesen. Es fungiert vermutlich, ebenso wie Fdx9 in einem Ferredoxin-Glutaredoxin-Thioredoxin System und schützt die Zelle vor photooxidativem Stress (Cassier-Chauvat *et al.* 2014; Mustila *et al.* 2014). Fdx7 übernimmt unter LC/HL (low CO_2 /high light) Bedingungen eine wichtige Funktion in der Regulation der Transkription des *flv24*-Operons, die *fdx7*-Mutante wies weniger Transkript auf als der Wildtyp und der durch Flv24 induzierte Lichtschutz war nicht vollständig aktiv (Mustila *et al.* 2014). Es ist bekannt, dass die *fdx7*-Mutante im Wachstum mit wenig CO_2 (LC) und viel Licht (HL) einen erhöhten Chlorophyll a Anteil und eine reduzierte Menge an Photosystem I aufweist (Mustila *et al.* 2014). In den Messungen der vorliegenden Arbeit konnte unter photoautotrophen Bedingungen in der *fdx7*-Mutante keine Veränderung der Pigmentzusammensetzung festgestellt werden (s. Abbildung 18, Seite 65). Die *fdx9*-Mutante zeigte unter gleichen Bedingungen, bei gleicher OD_{750} , eine leicht hellere Färbung und es wurden leicht geringere Mengen an Chlorophyll a gemessen (s. Abbildung 18, Seite 65). Fdx9 könnte daher, ähnlich wie Fdx7, einen Einfluss auf die Menge an Chlorophyll a in der Zelle haben.

Bei den Messungen der fermentativen Wassertoffproduktion der *fdx7*-Mutante konnte keine Veränderung in der Rate festgestellt werden. Der *Knock-out* hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Photowasserstoffproduktion (s. Abbildung 19, Seite 65). Fdx7 scheint damit keinen direkten Einfluss auf die Wasserstoffproduktion von *Synechocystis* zu haben. Gegen eine Zusammenarbeit der beiden Enzyme spricht auch das höhere Redoxpotential von -150 mV (Cassier-Chauvat *et al.* 2014). Die Elektronenübertragung von Fdx7 zur Hydrogenase (-414 mV) wäre energetisch nicht rentabel, da Energie für eine Reaktion aufgewendet werden müsste.

Man geht davon aus, dass das [4Fe-4S]-Cluster von Fdx7 durch oxidativen Stress in ein [3Fe-4S]-Protein konvertiert, das mit der FNR eine Verbindung eingehen kann, die zum Schutz vor weiteren oxidativen Schäden dient (Cassier-Chauvat & Chauvat 2014).

Die Aufklärung der Rolle der bakteriellen Ferredoxine in *Synechocystis* steht noch am Anfang und muss weiter untersucht werden.

5.1.2 Einfluss der Flavoproteine auf die Photowasserstoffproduktion

Photowasserstoff wird bei der Belichtung dunkeladaptierter Zellen gebildet. Hierbei werden Elektronen aus dem photosynthetischen Elektronentransport vom PSI über Ferredoxin, bzw. Flavodoxin auf die bidirektionale [NiFe]-Hydrogenase übertragen (Gutekunst *et al.* 2014).

Der durch die Photosynthese entstehende Sauerstoff inhibiert die Hydrogenase innerhalb weniger Sekunden (Cournac *et al.* 2002), aus diesem Grund wird nur für einen kurzen Zeitraum Photowasserstoff gebildet. Die Hydrogenase übernimmt in dem kurzen Zeitraum, in dem die Photosynthese bereits aktiv ist, der Calvin-Benson-Zyklus als Haupt-Elektronenakzeptor aber noch nicht aktiv ist, eine Funktion als Elektronensenke (Appel *et al.* 2000; Cournac *et al.* 2004). Um die Photowasserstoffproduktion genauer zu untersuchen, muss die physiologische Bedeutung des Enzyms als Elektronensenke verstanden werden. *Synechocystis* besitzt neben der Hydrogenase weitere Möglichkeiten überflüssige Elektronen aus dem photosynthetischen Elektronentransport abzuleiten (Mullineaux 2014). Ein Beispiel für andere Elektronenventile sind Flavoproteine (Flv). Cyanobakterielle Flavoproteine sind strukturell gut untersucht, sie bilden meist Homo- bzw. Heterodimere (Vicente *et al.* 2008; 2009). Sie beinhalten ein [2Fe]-Zentrum, eine Flavin-Mononukleotid (FMN)-Bindestelle und eine Flavinreduktase (Vicente *et al.* 2002; Zang *et al.* 2007).

Um zu prüfen, ob die Flavoproteine in Konkurrenz mit der Hydrogenase stehen, wurden Mutanten erstellt und gemessen, in denen verschiedene Flavoproteine sowie die Hydrogenase ausgeschaltet wurden. *Synechocystis* besitzt vier verschiedene Flavoproteine (Flv1-4) (Helman *et al.* 2003), wobei Flv1 und Flv3 (Helman *et al.* 2003), sowie Flv2 und Flv4 (Zhang *et al.* 2012) zusammen jeweils Heterodimere bilden können.

Die im Rahmen dieser Arbeit erstellte *flv3*-Mutante ($\Delta flv3$), sowie die Doppelmutanten, in denen zusätzlich die Hydrogenase ausgeschaltet wurde ($\Delta hoxH/\Delta flv3$ und $\Delta hoxEH/\Delta flv3$), konnten vollständig segregiert werden (s. Abbildung 21, Seite 68). Sie zeigten unter autotrophen und mixotrophen Bedingungen keinen Phänotyp im Wachstum. Demnach ist Flv3, weder unter autotrophen noch unter mixotrophen Bedingungen essentiell für das Wachstum von *Synechocystis*. Es ist jedoch bekannt, dass Flv3 für das Wachstum unter fluktuierendem Licht essentiell ist (Allahverdiyeva *et al.* 2011).

Die Flavoproteine Flv1 und Flv3 sind, ebenso wie die Hydrogenase, ein wichtiges Elektronenventil zum Schutz vor Photooxidation in dem Zeitraum vom Beginn der Belichtung, bis die CO₂ Fixierung über den Calvin-Benson-Zyklus startet (Helman *et al.* 2003). Diese Ergebnisse werden auch anhand der DUAL-PAM Messungen bestätigt (s. Abbildung 29, Seite 74). Sie zeigen in Gegenwart von Sauerstoff eine deutliche Verzögerung der Oxidation des PSI. Bei der Belichtung der dunkeladaptierten Wildtyp-Zellen erreicht das Oxidationssignal des PSI innerhalb einer Sekunde einen maximalen stationären Wert, der bis zum Ende der Belichtungsphase beibehalten wird. Dies zeigt, dass das PSI in der Lage ist, Elektronen in der genannten Zeit auf einen entsprechenden Elektronenüberträger abzugeben, auch vor Aktivierung des Calvin-Benson-Zyklus. Die Mutante, in der *flv3* deletiert wurde, zeigt eine deutliche Veränderung des Oxidationssignals gegenüber dem Wildtyp (s. Abbildung 29, Seite 74). Bei der Belichtung über 30 s steigt das Oxidationssignal des PSI nur kurz an und fällt sofort wieder ab. Erst nach einigen Sekunden steigt das Signal wieder an. Verantwortlich dafür ist die Aktivierung des Calvin-Benson-Zyklus, der Elektronen vom PSI übernimmt. Gleiche Ergebnisse wurden auch für *flv1*-Mutanten gemessen (Helman *et al.* 2003). Bei der Messung der Mutanten unter anoxischen Bedingungen zeigt der Wildtyp ein ähnliches Bild der PSI Oxidation, wie die *flv3*-Mutante unter oxischen Bedingungen (s. Abbildung 29, Seite 74). Sauerstoff dient demnach als Haupt-Elektronenakzeptor für das PSI bei der Belichtung dunkeladaptierter Zellen. Diese Ergebnisse bestätigen vorangegangene Untersuchungen (Helman *et al.* 2003), sie zeigen auf, dass in der *flv3*-Mutante die komplette Funktion des Heterodimers Flv1/3 ausgeschaltet wurde. Flv1/3 überträgt in der sogenannten *Mehler-like* Reaktion Elektronen aus dem photosynthetischen Elektronentransport vom PSI, über NADH direkt auf Sauerstoff (Allahverdiyeva *et al.* 2011).

Die Mutante, in der *flv24* deletiert wurde, sowie die Mutanten, in der die Hydrogenase (*hoxE-H* und *hoxH*) ausgeschaltet wurde, standen bereits zu Beginn der Arbeit zur Verfügung (Appel *et al.* 2000; Forberich 2011). Es wurden weitere Mutanten erstellt, in denen *flv3* zusätzlich deletiert wurde. Keine der Mutanten zeigt unter den gemessenen Bedingungen einen ausgeprägten Phänotyp (s. Abbildung 24, Abbildung 25 und Abbildung 26, Seite 70-71). Da die Mutanten vollständig segregiert sind, lässt sich sagen, dass keines der Flavoproteine unter autotrophen oder unter mixotrophen Bedingungen essentiell für das Überleben und das Wachstum der Zellen ist.

Es konnte bisher nicht sicher gezeigt werden, an welchen Akzeptor Flv24 seine Elektronen unter photoautotrophen Bedingungen weitergibt. Bekannt ist jedoch, dass Flv24 als Elektronensenke an der Akzeptorseite des PSII agiert und somit den Plastochinonpool im oxidierten Zustand halten kann (Bersanini *et al.* 2014). Flv24 scheint unter CO₂-Mangel eine wichtige Rolle im Schutz vor Photooxidation zu spielen und es wird vermutet, dass in diesem Fall ebenfalls Sauerstoff der Elektronenakzeptor ist (Shimakawa *et al.* 2015). Es wurde gezeigt, dass die Transkription des Operons *flv2-4* durch Starklicht induziert wird (Hihara *et al.* 2001).

Bei der Messung der Photowassertstoff-Produktion in den Flavoprotein-Mutanten ist deutlich zu erkennen, dass die Mutante, in der *flv24* deletiert wurde, im Vergleich zum Wildtyp und der *flv3*-Mutante eine deutlich erhöhte Wasserstoffproduktion aufweist (s. Abbildung 30, Seite 75). Dies gilt für die Einzelmutante ($\Delta flv24$) ebenso wie für die Doppelmutante ($\Delta flv3/\Delta flv24$). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass sich die Hydrogenase und Flv24 funktionell ersetzen können, da die Hydrogenase bei Belichtung dunkeladaptierter Zellen die Funktion des fehlenden Elektronenventils Flv24 übernimmt und daher mehr Photowasserstoff produziert. Unter Stressbedingungen werden bis zu 30% der Elektronen über Flv24 aus dem Elektronentransport geleitet (Zhang *et al.* 2012). Ein Teil der Elektronen werden beim Wegfall von Flv24 vermutlich über die Hydrogenase abgeleitet. Flv24 scheint eine wichtige Rolle für den Schutz des PSII zu spielen (Zhang *et al.* 2012; Chukhutsina *et al.* 2015). Ein weiterer Hinweis darauf, dass die Hydrogenase als Elektronenventil für die fehlenden Flavoproteine einspringen kann, liefert der Westernblot (s. Abbildung 27 und Abbildung 28, Seite 72). Hier ist deutlich zu erkennen, dass die Expression von HoxF in den Flavoprotein *knock-out* Mutanten stärker ist als die Expression im Wildtyp. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen versuchen die fehlenden Flavoproteine durch die Hydrogenase auszugleichen. Ein weiteres Indiz hierfür findet sich auch in einer anderen Arbeit unserer Arbeitsgruppe. Diese zeigt, dass die Mutante, in der *flv24* und die Hydrogenase ausgeschaltet waren, nicht mehr in der Lage ist bei Starklicht ($200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) zu wachsen (Burgstaller, persönliche Mitteilung).

Neben der Hydrogenase und den Flavoproteinen gibt es noch einige weitere Enzyme, die als Elektronensenken im photosynthetischen Elektronentransport fungieren können, wie beispielsweise die respiratorischen Oxidasen. In *Synechocystis* finden sich drei dieser respiratorischen terminalen Oxidasen, die Cytochrom c Oxidase, die Quinol Oxidase und die alternative RTO (ARTO) (Pils & Schmetterer 2001). Durch Ausschalten der Cytochrom c Oxidase in *Synechocystis* konnte in unserer Gruppe bereits eine Steigerung der Wasserstoffproduktion beobachtet werden (Gutthann *et al.* 2007). Für weitere Untersuchungen wäre es interessant, diese Oxidasen ebenfalls in den *flv24*-Mutanten auszuschalten und den Effekt auf die Wasserstoffproduktion zu beobachten.

Obwohl in der Messung der Photowasserstoffproduktion von $\Delta flv3$ keine Veränderung zum Wildtyp nachgewiesen wurde, ist es interessant, die fermentative Wasserstoffproduktion dieser Mutante in Zukunft zu untersuchen, da Fdx9 einen Einfluss auf die Wasserstoffproduktion hat und mit Flv3 interagiert (Cassier-Chauvat & Chauvat 2014).

5.2 Aufklärung von Glukoseabbauwegen ins *Synechocystis*

Neben Photowasserstoff ist *Synechocystis* in der Lage, fermentativen Wasserstoff zu produzieren. Dies geschieht im Dunkeln im Zuge des Glukoseabbaus.

Synechocystis ist in der Lage, Glukose mittels Photosynthese im Licht zu synthetisieren und in Form von Glykogen zu speichern oder die Glukose direkt aus ihrer Umgebung aufzunehmen (Anderson & McIntosh 1991). Beim Abbau von Glukose in der Zelle entsteht Pyruvat, das zu Acetyl-CoA abgebaut wird. Bei diesem Schritt wird unter fermentativen Bedingungen Ferredoxin reduziert, welches wiederum die Elektronen auf die Hydrogenase übertragen kann.

Bisher ist man davon ausgegangen, dass *Synechocystis* Glukose ausschließlich über den Embden-Meyerhof-Parnas Weg (EMP oder auch Glykolyse) und den Oxidativen Pentose-Phosphat-Weg (OPP) abbaut. Um herauszufinden, ob beide Wege für die Bedeutung der Wasserstoffproduktion gleichwertig sind, wurden diese genauer untersucht.

Um die physiologische Bedeutung der bekannten Glukoseabbauwege zu untersuchen, wurde im Vorfeld zu dieser Arbeit in unserer Abreibtsgruppe von Dr. Xi Chen das Schlüsselenzym der Glykolyse (PfkB1B2) und ein wichtiges Enzym des OPP Weges (Zwf) aus dem Genom von *Synechocystis* deletiert (Chen 2014; Chen & Schreiber *et al.* 2016).

Synechocystis besitzt zwei homologe Gene für die 6-Phospho-Fruktokinase (Pfk) (*pfkB1* und *pfkB2*). Beide Kopien wurden deletiert (die Mutante ist im Weiteren nur als Δpfk benannt). Nach der Deletion beider Enzyme sowie der Deletion von Zwf ($\Delta pfk \Delta zwf$) war die Mutante entgegen der Erwartungen weiterhin in der Lage, ihr Wachstum unter mixotrophen Bedingungen durch Aufnahme von Glukose stark zu erhöhen (Chen & Schreiber *et al.* 2016). Es wurde daher angenommen, dass 6-P-Glukonat über einen Umweg mit einer Glukose-Dehydrogenase (Gdh) und einer Glukonat-Kinase (Gk) aus Glukose gebildet wird und im OPP-Weg abgebaut werden kann. Im Genom von *Synechocystis* sind verschiedene Glukose-Dehydrogenase annotiert: *sll1709* (*gdh*) und *sll1608* (*gdhB*). Xi Chen hat im Rahmen seiner Arbeit *gdh* deletiert.

Die *gdh*-Mutante wuchs im Vergleich zum Wildtyp unter mixotrophen Bedingungen schlechter und die Mutante, in der der EMP-, der OPP-Weg und die Gdh ausgeschaltet wurde ($\Delta pfk \Delta zwf \Delta gdh$), konnte ihr Wachstum unter mixotrophen Bedingungen gar nicht mehr steigern (Chen 2014; Chen & Schreiber *et al.* 2016). Zudem konnte $\Delta pfk \Delta zwf \Delta gdh$ nicht segregiert werden, was darauf hinweist, dass Gdh in dieser Mutante essentiell für ihr Überleben ist (Chen 2014; Chen & Schreiber *et al.* 2016). Ein Beweis dafür, dass der Weg auch *in vivo* abläuft, zeigte sich durch den Nachweis von Glukonat, das als Metabolit der Glukose über die Glukose-Dehydrogenase im Wt und in $\Delta pfk \Delta zwf$ entsteht (Chen & Schreiber *et al.* 2016: A. Markowka).

Dieses Ergebnis weist zum einen darauf hin, dass es sich bei Gdh tatsächlich um eine Glukose-Dehydrogenase handeln könnte, zum anderen, dass GdhB die Funktion von Gdh nicht ersetzen kann. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde *gdhB* aus dem Genom vom *Synechocystis* WT und der $\Delta pfk \Delta zwf$ -Mutante deletiert.

Die Mutante $\Delta pfk\Delta zwf\Delta gdhB$ ist weiterhin in der Lage, ihr Wachstum unter mixotrophen Bedingungen zu steigern (s. Abbildung 39, Seite 82). Das leicht geringere Wachstum der Mutante ist durch die Deletion von *pfk* und *zwf* zu erklären, da diese Mutante im Vergleich zum Wildtyp bereits ein leicht verringertes Wachstum unter mixotrophen Bedingungen aufwies (Chen & Schreiber *et al.* 2016). Um zu testen, ob das 6-P-Glukonat, welches über die Glukose-Dehydrogenase synthetisiert wird, über den OPP-Weg mittels der 6-P-Glukonat-Dehydrogenase (*Gnd*) metabolisiert werden kann, wurden Mutanten erstellt, in denen *gnd* deletiert wurde. Alle Mutanten, in denen *gnd* ausgeschaltet wurde sind vollständig segregiert (s. Abbildung 36, Seite 79). Das bedeutet, dass *Gnd* unter autotrophen und mixotrophen Bedingungen nicht essentiell für das Überleben von *Synechocystis* ist. Die Mutante, in der *Gnd* sowie *Pfk* und *Zwf* ausgeschaltet wurden, war entgegen der Erwartungen in der Lage, ihr Wachstum unter mixotrophen Bedingungen zu steigern (Chen & Schreiber *et al.* 2016: diese Arbeit, Abbildung 38, Seite 81). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es einen weiteren, nicht bekannten Glukoseabbau-Weg in *Synechocystis* gibt.

5.2.1 Charakterisierung des ED-Weg in *Synechocystis*

In verschiedenen Prokaryoten, wie *E. coli* (Eisenberg & Dobrogosz 1967), tritt neben dem EMP-Weg und dem OPP-Weg der Entner-Doudoroff-Weg (ED) als weiterer Glukoseabbauweg auf. Kürzlich wurden auch in der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* funktionelle Formen der 6-P-Glukonat-Dehydratase (*Edd*) und der KDPG-Aldolase (*Eda*) nachgewiesen und dem ED-Weg zugeordnet (Fabris *et al.* 2012).

Für *Synechocystis* war bisher nicht bekannt, dass es neben dem EMP- und dem OPP-Weg einen weiteren Glukoseabbauweg gibt (Fabris *et al.* 2012; Chavarría *et al.* 2013). Eine genaue Untersuchung des Genoms von *Synechocystis* wies darauf hin, dass der ED-Weg ebenfalls in *Synechocystis* existieren könnte. Im Genom konnte ein Kandidatengen für die KDPG-Aldolase (*Eda*), dem Schlüsselenzym des ED-Wegs, sowie ein Kandidatengen für die 6-Phosphoglukonat-Dehydratase (*Edd*) identifiziert werden. Bei den beiden Kandidatengenen handelt es sich um *slI0107* für *eda* und *slr0452* für *edd* (Chen & Schreiber *et al.* 2016: B. Fähnrich).

Um die Funktionalität des potentiellen *Eda*-Enzyms zu untersuchen, wurde es aus dem Genom vom *Synechocystis* WT und verschiedenen anderen Mutanten, in denen Enzyme aus den Glukoseabbauwegen deletiert waren, ausgeschaltet. Alle Mutanten konnten vollständig segregiert werden (s. Abbildung 32, Seite 76). Unter autotrophen und mixotrophen Bedingungen ist *Eda* demnach nicht essentiell für das Überleben der Zelle. Eine mixotrophe Lebensweise, also die Aufnahme von Kohlenhydraten wie z.B. Glukose im Licht, wurden in Mikroalgen und Cyanobakterien bisher unterschätzt (Moore 2013).

Im Gegensatz zu den anderen Mutanten, in denen entweder der EMP-Weg (Δpfk) oder der OPP-Weg (Δzwf und Δgnd) unterbrochen wurde, zeigt Δeda , in der der potentielle ED-Weg ausgeschaltet wurde, einen deutlichen Phänotyp im Wachstum unter mixotrophen Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp (s. Abbildung 37, Seite 80). Die Mutante zeigt in den ersten fünf bis sechs Tagen ein verzögertes Wachstum. Erst nach sechs bis sieben Tagen ist die Kultur der Mutante in der Lage, ihr Wachstum an das der Wildtyp-Kultur anzugleichen (Chen & Schreiber *et al.* 2016: diese Arbeit). Unter mixotrophen Bedingungen teilen sich der EMP-Weg und der OPP-Weg mehrere Intermediate mit dem Calvin-Benson-Zyklus. Würden die Wege gleichzeitig ablaufen, könnte es zu wirklosen Zyklen („*futile cycle*“) führen, die unnötig Energie verbrauchen und die CO₂-Fixierung verlangsamen, was wiederum zu oxidativem Stress führen kann (Narainsamy *et al.* 2013). Dies könnte erklären, warum Δeda im Vergleich zum Wildtyp, Δpfk , Δzwf und Δgnd unter mixotrophen Bedingungen langsamer wächst (s. Abbildung 37, Seite 80).

Die Mutante, in der alle drei Abbauwege, der EMP-, OPP-, und der ED-Weg, blockiert sind ($\Delta pfk\Delta zwf\Delta gnd\Delta eda$), kann ihr Wachstum unter mixotrophen Bedingungen nicht mehr steigern (s. Abbildung 41, Seite 83). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass es sich bei dem potentiellen *eda*-Gen tatsächlich um eine KDPG-Aldolase handeln könnte, die in dem ED-Weg als einem zusätzlichen Glukoseabbauweg in *Synechocystis* involviert ist.

Im Gegensatz zu *eda* ließ sich die putative 6-P-Glukonat-Dehydratase *edd* (slr0452) nicht vollständig aus dem Genom von *Synechocystis* ausschalten (s. Abbildung 34, Seite 77). In allen Mutanten waren noch Genomkopien des Wildtyps nachweisbar. Die merodiploide Mutante *edd/\Delta edd* weist trotz der unvollständigen Segregation einen ähnlichen Phänotyp im Wachstum wie die *eda*-Mutante auf (s. Abbildung 37, Seite 80). Dieses Ergebnis weist stark darauf hin, dass es sich bei Slr0452 tatsächlich um Edd handelt, das ebenfalls in den vermuteten ED-Weg involviert zu sein scheint.

Dass sich *edd* nicht vollständig ausschalten lässt, könnte daran liegen, dass das Enzym neben der Funktion in dem ED-Weg auch eine Rolle für die Synthese der Aminosäuren Valin und Isoleucin spielt. Eine solche duale Funktion konnte für das entsprechende Enzym im Archaeon *Sulfolobus solfataricus* gezeigt werden (Kim & Lee 2006).

5.2.2 Aktivitätsmessungen der putativen KDPG-Aldolase in *Synechocystis*

Um zu zeigen, dass die putative KDPG-Aldolase aus *Synechocystis* tatsächlich eine solche ist, wurde sie im *Synechocystis* Wildtyp und in Δeda im pSM-P_{cpc}560-Vektor überexprimiert und in einem Aktivitätstest eingesetzt (s. Abbildung 51 und Abbildung 52, Seite 92). Da die Aktivität von Eda, welches KDPG zu GAP und Pyruvat umsetzt nicht direkt gemessen werden kann, wurde die Reaktion mit Hilfe der Laktatdehydrogenase (LDH) an die Oxidation von NADH gekoppelt. Die LDH setzt Pyruvat zu Laktat um, wobei NADH zu NAD⁺ oxidiert wird.

Die Abnahme von NADH wiederum kann photometrisch bestimmt werden. Die Aktivität der putativen KDPG-Aldolase SII0107 aus *Synechocystis* wurde zunächst im zellfreien Homogenat von $\Delta eda::P_{cpc560}eda$ *Synechocystis* nachgewiesen (s. Abbildung 51, Seite 92). Zusätzlich konnte SII0107 über den angehängten HIS-Tag über eine Ni-NTA Säule aufgereinigt und in dem Enzymtest eingesetzt werden (s. Abbildung 52, Seite 92). Beide Enzymtests zeigen die gleichen biochemischen Eigenschaften und es wurde ein K_M -Wert von 0,095 bestimmt.

Neben der KDPG-Aldolase des phosphorilierenden ED-Weges gibt es noch eine 2-Keto-3-desoxygluconat (KDG)-Aldolase, welche in (hyper)thermoacidophilen Archaeen in einem semi-phosphorilierendem ED-Weg (Ahmed *et al.* 2005) und in einem nicht-phosphorilierendem ED-Weg (Reher *et al.* 2010) zu finden ist. Um zu prüfen, ob die KDPG-Aldolase aus *Synechocystis* ebenfalls den semi- oder den nicht-phosphorilierenden Weg nutzen kann, wurde neben KDPG auch KDG als Substrat verwendet. In der Messung konnte für die Aldolase aus *Synechocystis* mit KDG keine Aktivität nachgewiesen werden, was zeigt, dass es sich um eine KDPG-Aldolase des phosphorilierenden ED-Weges handelt.

Ein weiterer Beweis für die Funktionlilität des ED-Weges in *Synechocystis* ist die Komplementation der *eda*-Mutante. Hierfür wurden in Δeda sowohl die kodierende Gensequenz von Eda aus *Synechocystis*, als auch die kodierende Sequenz von Eda aus *E. coli* im pSM-P_{cpc560}-Vektor zur Expression in Δeda eingebracht. In beiden Fällen konnten die Enzyme der eingebrachten Sequenzen den Wachstumsphänotyp der *eda*-Mutante ausgleichen (s. Abbildung 54, Seite 95). Das Wachstum der komplementierten Mutanten war wieder ähnlich dem des Wildtyps. Vorhersagen der Proteinstruktur durch den RaptorX-Server zeigen, dass die Struktur von Eda aus *Synechocystis* der *Tim-barrel* Struktur des Eda aus *E. coli* ähnelt (s. Abbildung 60, Seite 99). Im Vergleich der Aminosäuren zeigte sich, dass sieben von acht konservierten Aminosäuren in SII0107 aus *Synechocystis*, im Vergleich zu der KDPG-Aldolase aus *E. coli* konserviert sind, nur das Arginin an Position 49 wurde durch ein Asparagin ersetzt (Chen & Schreiber *et al.* 2016: B. Fähnrich).

Ein Beweis dafür, dass der Ed-Weg in *Synechocystis* *in vivo* abläuft, zeigt sich durch den Nachweis von KDPG (einem für den ED-Weg einzigartiger Metabolit) im Wt und in $\Delta pfk/\Delta zwf$ (Chen & Schreiber *et al.* 2016: A. Makowka).

5.2.3 Untersuchung zur Transkription von *eda* in *Synechocystis*

Aufgrund des starken Phänotyps im Wachstum unter mixotrophen Bedingungen wurde die relative Transkription von *eda* aus *Synechocystis* unter mixotrophen Bedingungen im Vergleich zu normalen Bedingungen untersucht. Dies geschah über einen Zeitraum von 72 h, wobei jeweils nach 12, 24, 36, 48 und 72 h Proben entnommen wurden.

Bei der Untersuchung der relativen Transkription von *eda* zeigt sich eine deutliche Erhöhung der Transkriptmenge bereits 48 h nach Zugabe der Glukose (s. Abbildung 61, Seite 101).

Dieses Ergebnis passt zu den Ergebnissen der Wachstumsversuche unter mixotrophen Bedingungen (s. Abbildung 64, Seite 103). Nach 48 h ist im Wachstum der Mutante, in der *eda* ausgeschaltet wurde, das verringerte Wachstum zu erkennen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass der ED-Weg unter mixotrophen Bedingungen stärker induziert wird als unter autotrophen.

5.2.4 Vorkommen und Physiologie des ED-Wegs in Cyanobakterien

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass in *Synechocystis* ein lang übersehener Glukoseabbauweg, der Enter-Doudoroff-Weg, existiert.

Bisher wurde der ED-Weg noch nicht in Cyanobakterien beschrieben. Um zu untersuchen, ob *Synechocystis* in diesem Aspekt eine Ausnahme bildet oder ob der Weg auch in anderen Cyanobakterien existiert, wurde in unserer Arbeitsgruppe von B. Fähnrich in weiteren Blast-Analysen nach dem Vorkommen *Eda* (KDPG-Aldolase; Schlüsselenzym des ED-Weges) in allen vollständig sequenzierten Cyanobakterien gesucht. Um eine Vergleichbare Größe zu haben wurde zusätzlich noch das Vorkommen von *Pfk* (Schlüsselenzym des EMP-Weges) untersucht.

In der Untersuchung zeigte sich, dass 92% aller vollständig sequenzierten Cyanobakterien (210 nach aktuellem Stand) eine KDPG-Aldolase besitzen. Erstaunlicherweise besaßen nur 57% aller untersuchten Cyanobakterien *Pfk* (Chen & Schreiber *et al.* 2016: B. Fähnrich). 43% der Cyanobakterien besitzen nur den ED-Weg und nicht den EMP-Weg, zu diesen Cyanobakterien zählten vor allem Arten die im offenen Ozean zu finden sind, wie beispielsweise *Prochlorococcus*, *Crocospaera*, *Synechococcus* und *Trichodesmuim* (Chen & Schreiber *et al.* 2016: B. Fähnrich). Bei den 8% der Cyanobakterien, welche keine KDPG-Aldolase besitzen, handelt es sich um Süßwasserarten (Chen & Schreiber *et al.* 2016: B. Fähnrich). Diese Verteilung zeigt, dass der ED-Weg ein wichtiger Weg des Glukoseabbaus in Cyanobakterien ist. In Cyanobakterien ist der ED-Weg sogar weiter verbreitet als der EMP-Weg.

Da Cyanobakterien im Licht über die Photosynthese große Mengen ATP erzeugen können, birgt die geringere ATP-Ausbeute des ED-Wegs von einem ATP, einem NADH und einem NADPH pro Glukosemolekül (im Gegensatz zum EMP-Weg: zwei ATP und zwei NADH) (Bar-Even *et al.* 2012) keinen Nachteil für sie. Im Gegenteil, der ED-Weg hat geringere Proteinkosten und eine höhere thermodynamische Triebkraft (Flamholz *et al.* 2013). Da Cyanobakterien besonders in oligotrophen Habitaten eher nährstofflimitiert sind und daher mit ihren Proteinkosten haushalten müssen kann der ED-Weg insbesondere in diesen Habitaten von Vorteil sein (Scott *et al.* 2010, Chen & Schreiber *et al.* 2016).

Für das Cyanobakterium *Prochlorococcus* konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass es in der Lage ist, Glukose aus seiner Umwelt aufzunehmen (Muñoz-Marín *et al.* 2013).

Insgesamt lässt sich mit den vorliegenden Ergebnissen feststellen, dass der ED-Weg ein in Cyanobakterien lang übersehener Glukoseabbauweg mit physiologischer Bedeutung ist. Um seinen Einfluss auf den zentralen Kohlenstoffwechsel quantitativ abschätzen zu können, sind Fluxanalysen notwendig.

Aufbauend auf den gewonnenen Ergebnissen wurde das in Abbildung 65 dargestellte neue Modell der Glukoseabbauwege in *Synechocystis* entworfen. Neben dem EMP-Weg und dem OPP-Weg besitzt *Synechocystis* ebenfalls den ED-Weg.

5.2.5 Wasserstoffmessungen mit den Glukoseabbau-Mutanten

Die Wasserstoffproduktion unter fermentativen Bedingungen ist eng mit dem Glukosestoffwechsel der Cyanobakterien verbunden. In *Synechocystis* wird fermentativer Wasserstoff im Zuge des Abbaus von Glukose gebildet. Bei der Oxidation von Pyruvat, das durch den Abbau von Glukose entsteht, wird Ferredoxin reduziert. Das Ferredoxin überträgt Elektronen auf die Hydrogenase, die Protonen zu Wasserstoff reduziert (Gutekunst *et al.* 2014). Pyruvat wird über alle drei Glukoseabbauwege synthetisiert, den EMP-Weg, den ED-Weg und den OPP-Weg. Um zu prüfen, ob einer der Wege einen besonderen Einfluss auf die Wasserstoffproduktion hat, wurde die Wasserstoffproduktion der Mutanten, in denen jeweils einer der Wege ausgeschaltet wurde, gemessen. Um sicherzugehen, dass die verschiedenen Kulturen vergleichbar waren, wurden sie für die Messungen zunächst auf die gleiche OD₇₅₀ eingestellt. Um eine möglichst hohe Wasserstoffproduktion zu erreichen, wurden die Kulturen gewaschen und in BG11₀-Medium, mit Glukose und Arginin als alternativer Stickstoffquelle, wieder resuspendiert. Durch Zugabe von Glukose wird der Calvin-Beson-Zyklus gehemmt (Narainsamy *et al.* 2013). Außerdem wird durch Austauschen der Stickstoffquelle von Nitrat zu Arginin der Elektronentransfer von reduziertem Ferredoxin auf Nitrat verhindert, wodurch mehr Elektronen für die Wasserstoffproduktion zur Verfügung stehen. Die Messungen zeigen, dass die Mutanten, in denen der ED-Weg (Δeda) und der EMP-Weg (Δpfk) blockiert wurde, im Vergleich zum Wildtyp zunächst keinen signifikanten Unterschied in der Wasserstoffproduktion aufweisen (s. Abbildung 62, Seite 102). Die beiden Mutanten, in denen Teile des OPP-Wegs ausgeschaltet wurden (Δzwf und Δgnd), zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich verringerte Wasserstoffproduktion. Die Wasserstoffproduktion wurde über 12 h im Dunkeln gemessen, unter diesen Bedingungen gilt der OPP-Weg als der wichtigste Glucoseabbauweg (Pelroy & Bassham 1972; Knowles & Plaxton 2003). Die Mutanten, in denen der OPP-Weg blockiert wurde (Δzwf und Δgnd), sind dementsprechend nicht mehr in der Lage zu wachsen. Diese Annahme bestätigt der Wachstumsversuch, in dem die Kulturen unter den gleichen Bedingungen wie zur Wasserstoffmessung, gemessen wurden (s. Abbildung 64, Seite 103). Die Kulturen wurden in einem Tag/Nacht Zyklus in BG11₀-Medium mit Arginin und Glukose angezogen.

Es zeigt sich, dass beide Mutanten (*Δzwf* und *Δgnd*) nicht mehr in der Lage sind, ihr Wachstum zu steigern. Dieser Umstand kann eine Begründung für die verminderte Wasserstoffproduktion sein.

Unter den beschriebenen Wachstumsbedingungen zeigt die Mutante, in der der ED-Weg (*Δeda*) blockiert wurde, ebenfalls einen Phänotyp im Wachstum. Die Mutante weist ein verzögertes Wachstum auf. Trotz des schlechteren Wachstums ist die Mutante dennoch in der Lage, ähnlich viel Wasserstoff wie der Wildtyp zu produzieren. In einer Messung konnte die Mutante, in der *eda* deletiert wurde, sogar fast siebenmal mehr Wasserstoff produzieren als der Wildtyp (s. Abbildung 63, Seite 102). Diese Messung wurde je dreimal, in drei aufeinander folgenden Tagen gemessen. Die Kultur, die als Vorkultur benutzt wurde, war bei diesen Messungen jedoch die gleiche. Es ist nicht gelungen, dieses Ergebnis noch einmal zu replizieren. Insofern sind weitere Messungen notwendig, um den Einfluss der verschiedenen Glukoseabbauwege auf die fermentative Wasserstoffproduktion abschließend zu evaluieren.

5.3 Vorkommen des ED-Wegs in Pflanzen

Nachdem in vielen Cyanobakterien die Sequenzen, die für die Schlüsselenzyme des ED-Wegs kodieren, nachgewiesen werden konnten, wurde die Suche mit Hilfe des Blast-Algorithmus auf Pflanzen ausgedehnt. In unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass mögliche KDPG-Aldolasen auch in Moosen, Farnen, Algen und Pflanzen auftreten (Chen & Schreiber *et al.* 2016). Phylogenetische Vergleiche weisen darauf hin, dass die in Pflanzen gefundenen Enzyme mit denen aus Cyanobakterien clustern und sie dementsprechend vermutlich über endosymbiontischen Gentransfer von Cyanobakterien auf Pflanzen übertragen wurden (Chen & Schreiber *et al.* 2016: M. Roettger, B. Martin).

Der Nachweis, ob es sich bei den identifizierten Sequenzen tatsächlich um eine KDPG-Aldolase handelt, erfolgte in der Gerste (*H. vulgare*-BAJ87430). Der Abbau von Zuckern ist für Pflanzen in der Wachstumsphase von besonderer Bedeutung für die Gewinnung von ATP, NAD(P)H und Vorstufen für die Biosynthese. Aus diesem Grund wurde die Transkription des Gens aus *H. vulgare* nach der Keimung beobachtet. Daher wurde über einen Zeitraum von 8 Tagen mRNA aus Gerstenkeimlingen isoliert. Es konnte in einer RT-PCR gezeigt werden, dass das *eda* in der frühen Keimentwicklung transkribiert wurde (Chen & Schreiber *et al.* 2016, K. Gutekunst).

Um zu testen, ob die mutmaßliche KDPG-Aldolase aus *H. vulgare* funktionsfähig ist, wurde das Kandidatengen aus der cDNA eines Keimlings amplifiziert (die cDNA wurde freundlicherweise bereitgestellt von Mirl Trösch, aus der Arbeitsgruppe um Prof. Karin Krupinska, CAU-Kiel). Das Protein wurde in *E. coli* überexprimiert, über eine Ni-NTA Säule aufgereinigt und in einem gekoppelten Enzymtest eingesetzt (s. Abbildung 59, Seite 99). Die Aktivität der KDPG-Aldolase aus *H. vulgare* konnte nachgewiesen werden.

Für die Umsetzung von KDPG zu GAP wurde ein K_M -Wert von 0,35 bestimmt. Dieser K_M -Wert liegt nahe dem Wert der KDPG-Aldolase aus *E. coli* (Cheriyian *et al.* 2007). Ebenso wie bei der KDPG-Aldolase aus *Synechocystis* wurde auch hier KDG als mögliches Substrat getestet. Es konnte jedoch keine Aktivität nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass höhere Pflanzen ebenso wie Cyanobakterien eine KDPG-Aldolase des phosphorylierenden ED-Weges besitzen. Ebenso fällt beim Betrachten der durch den RaptorX-Sever vorhergesagten Proteinstruktur auf, dass die Struktur von Eda aus *H. vulgare* ebenso wie *E. coli* und *Synechocystis* eine *Tim-barrel* Struktur aufweist (s. Abbildung 60, Seite 99). Das katalytische Lysin ist in allen drei Fällen räumlich in der Mitte des Zylinders auf einem β -Strang angeordnet.

Darüber hinaus konnte KDPG, das ein einzigartiger Metabolit des ED-Weg ist, in den Wurzeln von Gerstenkeimlingen nachgewiesen werden (Chen & Schreiber *et al.* 2016), was darauf hinweist, dass der ED-Weg auch in Pflanzen *in vivo* abläuft.

Zusammengefasst zeigen die Daten deutlich, dass der ED-Weg in Cyanobakterien und Pflanzen existent ist und auch *in vivo* abläuft.

5.3.1 Lokalisation von Eda

Die Stoffwechselwege höherer Pflanzen sind im Gegensatz zu den Stoffwechselwegen der einzelligen Cyanobakterien durch Kompartimentierung voneinander getrennt. Um Aussagen über die mögliche Lokalisation von Eda in *H. vulgare* treffen zu können, wurde die Aminosäuresequenz mit verschiedenen Programmen zur Vorhersage von Importsequenzen analysiert (s. Tabelle 25, Seite 100). Die Ergebnisse gehen etwas auseinander, da die unterschiedlichen Programme verschiedene Schnittstellen für Ihre Vorhersage benutzt haben. Der Trend weist aber darauf hin, dass Eda entweder in den Mitochondrien oder alternativ den Chloroplasten lokalisiert ist.

Um die genaue Lokalisation festzustellen, sollen in Zukunft weitere Experimente mit GFP-getagten Proteinen durchgeführt werden. Die Lokalisation des ED-Wegs ist daher interessant, da die beiden anderen Wege teilweise ebenfalls voneinander getrennt ablaufen, sie sind in den Plastiden und im Cytosol lokalisiert (Miernyk & Dennis 1982; Andriotis *et al.* 2010; Moriyama *et al.* 2014).

6 Referenzen

- Abröll, C., Kurth, T., Langer, T., Munk, K. & Nethe-Jaenchen, R. (2008). Biochemie-Zellbiologie.
- Adman, E.T., Sieker, L.C. & Jensen, L.H. (1973). The structure of a bacterial ferredoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 248, 3987–3996.
- Ahmed, H., Ettema, T.J., Tjaden, B., Geerling, A.C., van der Oost, J. & Siebers, B. (2005). The semi-phosphorylative Entner–Doudoroff pathway in hyperthermophilic archaea: a re-evaluation. *Biochemical Journal*, 390, 529–540.
- Allahverdiyeva, Y., Ermakova, M., Eisenhut, M., Zhang, P., Richaud, P., Hagemann, M., *et al.* (2011). Interplay between flavodiiron proteins and photorespiration in *Synechocystis spec.* PCC 6803. *J. Biol. Chem.*, 286, 24007–24014.
- Allahverdiyeva, Y., Mustila, H., Ermakova, M., Bersanini, L., Richaud, P., Ajlani, G., *et al.* (2013). Flavodiiron proteins Flv1 and Flv3 enable cyanobacterial growth and photosynthesis under fluctuating light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110, 4111–4116.
- Anderson, S.L. & McIntosh, L. (1991). Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis spec.* strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. *Journal of Bacteriology*, 173, 2761–2767.
- Andersson, J.O., Hirt, R.P., Foster, P.G. & Roger, A.J. (2006). Evolution of four gene families with patchy phylogenetic distributions: influx of genes into protist genomes. *BMC Evol. Biol.*, 6, 27.
- Andersson, J.O., Sjögren, A.M., Davis, L.A.M., Embley, T.M. & Roger, A.J. (2003). Phylogenetic analyses of diplomonad genes reveal frequent lateral gene transfers affecting eukaryotes. *Curr. Biol.*, 13, 94–104.
- Andriotis, V.M.E., Kruger, N.J., Pike, M.J. & Smith, A.M. (2010). Plastidial glycolysis in developing *Arabidopsis* embryos. *New Phytol.*, 185, 649–662.
- Aoyama, K., Uemura, I., Miyake, J. & Asada, Y. (1997). Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83, 17–20.
- Appel, J., Phunpruch, S., Steinmüller, K. & Schulz, R. (2000). The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis spec.* PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Arch Microbiol*, 173, 333–338.
- Arnon, D.I. (1988). The discovery of ferredoxin: the photosynthetic path. *Trends Biochem. Sci.*, 13, 30–33.
- Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K. & Miyano, S. (2002). Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics*, 18, 298–305.
- Bar-Even, A., Flamholz, A., Noor, E. & Milo, R. (2012). Rethinking glycolysis: on the biochemical logic of metabolic pathways. *Nat. Chem. Biol.*, 8, 509–517.
- Bennett, B.D., Kimball, E.H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S.J. & Rabinowitz, J.D. (2009). Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat. Chem. Biol.*, 5, 593–599.
- Bersanini, L., Battchikova, N., Jokel, M., Rehman, A., Vass, I., Allahverdiyeva, Y., *et al.* (2014). Flavodiiron protein Flv2/Flv4-related photoprotective mechanism dissipates excitation pressure of PSII in cooperation with phycobilisomes in Cyanobacteria. *Plant Physiology*, 164, 805–818.
- Blankenship, R.E. & Hartman, H. (1998). The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.*, 23, 94–97.
- Blum, H., Beier, H. & Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *electrophoresis*, 8, 93–99.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248–254.
- Cammack, R., Rao, K.K., Barger, C.P., Hutson, K.G., Andrew, P. & Rogers, L.J. (1977). Midpoint redox potentials of plant and algal ferredoxins. *Biochemical Journal*, 168, 205–209.
- Cassier-Chauvat, C. & Chauvat, F. (2014). Function and Regulation of Ferredoxins in the Cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803: Recent Advances. *Life (Basel)*, 4, 666–680.
- Cassier-Chauvat, C., Veaudor, T. & Chauvat, F. (2014). Advances in the function and regulation of hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis PCC6803*. *Int J Mol Sci*, 15, 19938–19951.
- Catling, D.C. & Claire, M.W. (2005). How Earth's atmosphere evolved to an oxic state: a status report. *Earth*

- and *Planetary Science Letters*, 237, 1–20.
- Change, I.P.O.C. (2014). Climate Change 2013: The physical science basis: Working group I contribution to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.
- Chavarría, M., Nickel, P.I., Pérez-Pantoja, D. & de Lorenzo, V. (2013). The Entner-Doudoroff pathway empowers *Pseudomonas putida* KT2440 with a high tolerance to oxidative stress. *Environ. Microbiol.*, 15, 1772–1785.
- Chen, X. (2014). *Characterization of Synechocystis spec. PCC 6803 under mixotrophic conditions. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.*
- Chen, X., Schreiber, K., Appel, J., Makowka, A., Fähnrich, B., Roettger, M., et al. (2016). The Entner-Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, , doi: 10.1073/ 1521916113.
- Chenchik, A., Diachenko, L., Moqadam, F., Tarabykin, V., Lukyanov, S. & Siebert, P.D. (1996). Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cDNA. *BioTechniques*, 21, 526–534.
- Cherepanov, P.P. & Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*, 158, 9–14.
- Cheriyian, M., Toone, E.J. & Fierke, C.A. (2007). Mutagenesis of the phosphate-binding pocket of KDPG aldolase enhances selectivity for hydrophobic substrates. *Protein Sci.*, 16, 2368–2377.
- Christie, J.M., Reymond, P., Powell, G.K., Bernasconi, P., Raibekas, A.A., Liscum, E., et al. (1998). *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science*, 282, 1698–1701.
- Chukhutsina, V., Bersanini, L., Aro, E.-M. & van Amerongen, H. (2015). Cyanobacterial flv4-2 Operon-Encoded Proteins Optimize Light Harvesting and Charge Separation in Photosystem II. *Mol Plant*, 8, 747–761.
- Climate Change 2014 Synthesis Report. (2015). Climate Change 2014 Synthesis Report, 1–32.
- Conway, T. (1992). The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiol. Rev.*, 9, 1–27.
- Cournac, L., Guedeney, G., Peltier, G. & Vignais, P.M. (2004). Sustained Photoevolution of Molecular Hydrogen in a Mutant of *Synechocystis spec.* Strain PCC 6803 Deficient in the Type I NADPH-Dehydrogenase Complex. *Journal of Bacteriology*, 186, 1737–1746.
- Cournac, L., Mus, F., Bernard, L., Guedeney, G., Vignais, P. & Peltier, G. (2002). Limiting steps of hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechocystis* PCC 6803 as analysed by light-induced gas exchange transients. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1229–1237.
- Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 6640–6645.
- DeRuyter, Y.S. & Fromme, P. (2008). Molecular structure of the photosynthetic apparatus. *The cyanobacteria: molecular biology, genomics, and evolution*, 217–269.
- Douglas, S.E. The molecular biology of cyanobacteria /Springer (1994). Chloroplast origins and evolution, 91–118.
- Eiler, A. (2006). Evidence for the ubiquity of mixotrophic bacteria in the upper ocean: implications and consequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7431–7437.
- Eisenberg, R.C. & Dobrogosz, W.J. (1967). Gluconate metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 93, 941–949.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. & Heijne, von, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.*, 300, 1005–1016.
- Emes, M.J. & Tobin, A.K. (1993). Control of metabolism and development in higher plant plastids. *International Review of Cytology*, 149–149.
- Entner, N. & Doudoroff, M. (1952). Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *Journal of Biological Chemistry*, 196, 853–862.
- Entwicklung, Bericht des Bundesministeriums für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (2014). Nachhaltige Energie für Entwicklung, 1–44.
- Espinosa-Ruiz, A., Bellés, J.M., Serrano, R. & Culiáñez-Maclà, F.A. (1999). *Arabidopsis thaliana* AtHAL3: a flavoprotein related to salt and osmotic tolerance and plant growth. *Plant J.*, 20, 529–539.

- Fabris, M., Matthijs, M., Rombauts, S., Vyverman, W., Goossens, A. & Baart, G.J.E. (2012). The metabolic blueprint of *Phaeodactylum tricornutum* reveals a eukaryotic Entner-Doudoroff glycolytic pathway. *The Plant Journal*, 70, 1004–1014.
- Falkowski, P.G., Katz, M.E., Knoll, A.H., Quigg, A., Raven, J.A., Schofield, O., *et al.* (2004). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science*, 305, 354–360.
- Flamholz, A., Noor, E., Bar-Even, A., Liebermeister, W. & Milo, R. (2013). Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110, 10039–10044.
- Forberich, B. (2011). Der NDH-1-Komplex von *Synechocystis* PCC 6803 Modularer Aufbau und physiologische Relevanz. *Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel*.
- Fuhrer, T., Fischer, E. & Sauer, U. (2005). Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *Journal of Bacteriology*, 187, 1581–1590.
- Garcia, H.E. & Gordon, L.I. (1992). Oxygen solubility in seawater: Better fitting equations. *Limnology and oceanography*, 37, 1307–1312.
- Gene Bridges. (2014). Quick and Easy *E. coli* Gene Deletion Kit, 1–40.
- Gill, R.T., Katsoulakis, E., Schmitt, W., Taroncher-Oldenburg, G., Misra, J. & Stephanopoulos, G. (2002). Genome-wide dynamic transcriptional profiling of the light-to-dark transition in *Synechocystis spec.* strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 184, 3671–3681.
- Golbeck, J.H. Photosystem I: the light-driven plastocyanin: ferredoxin oxidoreductase-Springer (2007), Kapitel 24.
- Gonçalves, V.L., Vicente, J.B., Saraiva, L.M. & Teixeira, M. (2011). Flavodiiron proteins and their role in cyanobacteria, 631–653.
- Goris, T., Wait, A.F., Saggi, M., Fritsch, J., Heidary, N., Stein, M., *et al.* (2011). A unique iron-sulfur cluster is crucial for oxygen tolerance of a [NiFe]-hydrogenase. *Nat. Chem. Biol.*, 7, 310–318.
- Gómez-Baena, G., López-Lozano, A., Gil-Martínez, J., Lucena, J.M., Diez, J., Candau, P., *et al.* (2008). Glucose uptake and its effect on gene expression in prochlorococcus. *PLoS ONE*, 3, e3416.
- Griese, M., Lange, C. & Soppa, J. (2011). Ploidy in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 323, 124–131.
- Grigorieva, G. & Shestakov, S. (1982). Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis spec.* 6803. *FEMS Microbiol. Lett*, 13, 367–370.
- Gutekunst, K., Chen, X., Schreiber, K., Kaspar, U., Makam, S. & Appel, J. (2014). The Bidirectional NiFe-hydrogenase in *Synechocystis spec.* PCC 6803 Is Reduced by Flavodoxin and Ferredoxin and Is Essential under Mixotrophic, Nitrate-limiting Conditions. *J. Biol. Chem.*, 289, 1930–1937.
- Gutekunst, K., Hoffmann, D., Lommer, M., Egert, M., Suzuki, I., Schulz Friedrich, R., *et al.* (2006). Metal dependence and intracellular regulation of the bidirectional NiFe-hydrogenase in *Synechocystis spec.* PCC 6803. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 1452–1459.
- Gutekunst, K., Phunpruch, S., Schwarz, C., Schuchardt, S., Schulz Friedrich, R. & Appel, J. (2005). LexA regulates the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis spec.* PCC 6803 as a transcription activator. *Molecular Microbiology*, 58, 810–823.
- Gutthann, F., Egert, M., Marques, A. & Appel, J. (2007). Inhibition of respiration and nitrate assimilation enhances photohydrogen evolution under low oxygen concentrations in *Synechocystis spec.* PCC 6803. *BBA - Bioenergetics*, 1767, 161–169.
- Hanke, G. & Mulo, P. (2013). Plant type ferredoxins and ferredoxin-dependent metabolism. *Plant Cell Environ.*, 36, 1071–1084.
- Hase, T., Mizutani, S. & Mukohata, Y. (1991). Expression of Maize Ferredoxin cDNA in *Escherichia coli* Comparison of Photosynthetic and Nonphotosynthetic Ferredoxin Isoproteins and their Chimeric Molecule. *Plant Physiology*, 97, 1395–1401.
- Hasunuma, T., Matsuda, M., Senga, Y., Aikawa, S., Toyoshima, M., Shimakawa, G., *et al.* (2014). Overexpression of *flv3* improves photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis spec.* PCC 6803 by enhancement of alternative electron flow. *Biotechnology for biofuels*, 7, 1.
- Helman, Y., Tchernov, D., Reinhold, L., Shibata, M., Ogawa, T., Schwarz, R., *et al.* (2003). Genes encoding A-type flavoproteins are essential for photoreduction of O₂ in cyanobacteria. *Curr. Biol.*, 13, 230–235.
- Hihara, Y., Kamei, A., Kanehisa, M., Kaplan, A. & Ikeuchi, M. (2001). DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. *The Plant Cell*, 13, 793–806.
- Hillmann, F., Riebe, O., Fischer, R.-J., Mot, A., Caranto, J.D., Kurtz, D.M., *et al.* (2009). Reductive dioxygen

- scavenging by flavo-diiron proteins of *Clostridium acetobutylicum*. *FEBS Letters*, 583, 241–245.
- Hormann, H., Neubauer, C., Asada, K. & Schreiber, U. (1993). Intact chloroplasts display pH 5 optimum of O₂-reduction in the absence of methyl viologen: Indirect evidence for a regulatory role of superoxide protonation. *Photosynthesis research*, 37, 69–80.
- Huppe, H.C. & Turpin, D.H. (1994). Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 45, 577–607.
- Imlay, J.A. (2006). Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Molecular Microbiology*, 59, 1073–1082.
- Jansèn, T., Kurian, D., Raksajit, W., York, S., Summers, M.L. & Mäenpää, P. (2010). Characterization of trophic changes and a functional oxidative pentose phosphate pathway in *Synechocystis spec.* PCC 6803. *Acta physiologiae plantarum*, 32, 511–518.
- Jensen, G.M., Warshel, A. & Stephens, P.J. (1994). Calculation of the redox potentials of iron-sulfur proteins: the 2-/3-couple of [Fe₄S₄Cys₄] clusters in *Peptococcus aerogenes* Ferredoxin, *Azotobacter vinelandii* Ferredoxin I, and *Chromatium vinosum* high-potential iron protein. *Biochemistry*, 33, 10911–10924.
- Johnson, X. & Alric, J. (2013). Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. *Eukaryotic cell*, 12, 776–793.
- Jones, L.W. & Bishop, N.I. (1976). Simultaneous measurement of oxygen and hydrogen exchange from the blue-green alga *Anabaena*. *Plant Physiology*, 57, 659–665.
- Jouanneau, Y., Meyer, C., Gaillard, J. & Vignais, P.M. (1990). Purification and characterization of a 7Fe-ferredoxin from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171, 273–279.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., *et al.* (1996). Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis spec.* Strain PCC 6803. II. Sequence Determination of the Entire Genome and Assignment of Potential Protein-coding Regions. *DNA Research*, 3, 109–136.
- Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H., *et al.* (2012). Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc*, 7, 1511–1522.
- Kerscher, L., Oesterhelt, D., Cammack, R. & Hall, D.O. (1976). A New Plant-Type Ferredoxin from Halobacteria. *European Journal of Biochemistry*, 71, 101–107.
- Kim, S. & Lee, S.B. (2006). Catalytic promiscuity in dihydroxy-acid dehydratase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Biochem.*, 139, 591–596.
- Knaff, D.B. *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*/Springer (1996). Chapter 17: Ferredoxin and ferredoxin-dependent enzymes, 333–361.
- Knowles, V.L. & Plaxton, W.C. (2003). From genome to enzyme: analysis of key glycolytic and oxidative pentose-phosphate pathway enzymes in the cyanobacterium *Synechocystis spec.* PCC 6803. *Plant and Cell Physiology*, 44, 758–763.
- Koksharova, O. & Wolk, C. (2002). Genetic tools for cyanobacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 58, 123–137.
- Krause, G.H. & Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 42, 313–349.
- Kufryk, G.I., Sacht, M., Schmetterer, G. & Vermaas, W.F. (2002). Transformation of the cyanobacterium *Synechocystis spec.* PCC 6803 as a tool for genetic mapping: optimization of efficiency. *FEMS Microbiology Letters*, 206, 215–219.
- Kurian, D., Jansèn, T. & Mäenpää, P. (2006). Proteomic analysis of heterotrophy in *Synechocystis spec.* PCC 6803. *Proteomics*, 6, 1483–1494.
- Labarre, J., Chauvat, F. & Thuriaux, P. (1989). Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 171, 3449–3457.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Langen, R., Jensen, G.M., Jacob, U., Stephens, P.J. & Warshel, A. (1992). Protein control of iron-sulfur cluster redox potentials. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 25625–25627.

- Lichtenthaler, H. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology. Plant Cell Membranes, Methods in Enzymology*, 148, 350–382.
- Lüthi, D., Le Floch, M., Bereiter, B., Blunier, T., Barnola, J.-M., Siegenthaler, U., *et al.* (2008). High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000–800,000 years before present. *Nature*, 453, 379–382.
- Maina, C.V., Riggs, P.D., Granda, A.G., Slatko, B.E., Moran, L.S., Tagliamonte, J.A., *et al.* (1988). An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene*, 74, 365–373.
- Matsubara, H., Hase, T., Wakabayashi, S. & Wada, K. (1979). Structural and evolution of chloroplast- and bacterial-type ferredoxins. *UCLA Forum Med Sci*, 245–266.
- Mazouni, K., Domain, F., Chauvat, F. & Cassier-Chauvat, C. (2003). Expression and regulation of the crucial plant-like ferredoxin of cyanobacteria. *Molecular Microbiology*, 49, 1019–1029.
- McConnell, M.D., Koop, R., Vasil'ev, S. & Bruce, D. (2002). Regulation of the distribution of chlorophyll and phycobilin-absorbed excitation energy in cyanobacteria. A structure-based model for the light state transition. *Plant Physiology*, 130, 1201–1212.
- McGlade, C. & Ekins, P. (2015). The geographical distribution of fossil fuels unused when limiting global warming to 2 [deg]C. *Nature*, 517, 187–190.
- McNeely, K., Xu, Y., Ananyev, G., Bennette, N., Bryant, D.A. & Dismukes, G.C. (2011). *Synechococcus spec.* strain PCC 7002 nifJ mutant lacking pyruvate: ferredoxin oxidoreductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 2435–2444.
- Meyer, J. (1988). The evolution of ferredoxins. *Trends in ecology & evolution*, 3, 222–226.
- Miernyk, J.A. & Dennis, D.T. (1982). Isozymes of the glycolytic enzymes in endosperm from developing castor oil seeds. *Plant Physiology*, 69, 825–828.
- Millero, F.J. & Poisson, A. (1981). International one-atmosphere equation of state of seawater. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 28, 625–629.
- Moore, L.R. (2013). More mixotrophy in the marine microbial mix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110, 8323–8324.
- Moriyama, T., Sakurai, K., Sekine, K. & Sato, N. (2014). Subcellular distribution of central carbohydrate metabolism pathways in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Planta*, 240, 585–598.
- Mullineaux, C.W. (2014). Electron transport and light-harvesting switches in cyanobacteria. *Front Plant Sci*, 5, 7.
- Muñoz-Marín, M.D.C., Luque, I., Zubkov, M.V., Hill, P.G., Diez, J. & García-Fernández, J.M. (2013). *Prochlorococcus* can use the Pro1404 transporter to take up glucose at nanomolar concentrations in the Atlantic Ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110, 8597–8602.
- Mustila, H., Allahverdiyeva, Y., Isojärvi, J., Aro, E.M. & Eisenhut, M. (2014). The bacterial-type [4Fe-4S] ferredoxin 7 has a regulatory function under photooxidative stress conditions in the cyanobacterium *Synechocystis spec.* PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta*, 1837, 1293–1304.
- Narainsamy, K., Cassier-Chauvat, C., Junot, C. & Chauvat, F. (2013). High performance analysis of the cyanobacterial metabolism via liquid chromatography coupled to a LTQ-Orbitrap mass spectrometer: evidence that glucose reprograms the whole carbon metabolism and triggers oxidative stress. *Metabolomics*, 9, 21–32.
- Peekhaus, N. & Conway, T. (1998). What's for dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180, 3495–3502.
- Pelroy, R.A. & Bassham, J.A. (1972). Photosynthetic and dark carbon metabolism in unicellular blue-green algae. *Arch Mikrobiol*, 86, 25–38.
- Peschek, G.A., Obinger, C. & Renger, G. (2011). Bioenergetic processes of Cyanobacteria.
- Pils, D. & Schmetterer, G. (2001). Characterization of three bioenergetically active respiratory terminal oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis spec.* strain PCC 6803. *FEMS Microbiology Letters*, 203, 217–222.
- Plaxton, W.C. & Podestá, F.E. (2006). The functional organization and control of plant respiration. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25, 159–198.
- Poncelet, M., Cassier-Chauvat, C., Leschelle, X., Bottin, H. & Chauvat, F. (1998). Targeted deletion and mutational analysis of the essential (2Fe-2S) plant-like ferredoxin in *Synechocystis* PCC 6803 by plasmid shuffling. *Molecular Microbiology*, 28, 813–821.

- Quinkal, I., Davasse, V., Gaillard, J. & Moulis, J.M. (1994). On the role of conserved proline residues in the structure and function of *Clostridium pasteurianum* 2[4Fe-4S] ferredoxin. *Protein Eng.*, 7, 681–687.
- Reed, R.H. & Stewart, W. (1985). Osmotic adjustment and organic solute accumulation in unicellular cyanobacteria from freshwater and marine habitats. *Marine Biology*, 88, 1–9.
- Reher, M., Fuhrer, T., Bott, M. & Schönheit, P. (2010). The nonphosphorylative Entner-Doudoroff pathway in the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus* involves a novel 2-keto-3-deoxygluconate-specific aldolase. *Journal of Bacteriology*, 192, 964–974.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. & Stanier, R.Y. (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology*, 111, 1–61.
- Rodrigues, R., Vicente, J.B., Félix, R., Oliveira, S., Teixeira, M. & Rodrigues-Pousada, C. (2006). Desulfovibrio gigas flavodiiron protein affords protection against nitrosative stress in vivo. *Journal of Bacteriology*, 188, 2745–2751.
- Romano, A.H. & Conway, T. (1996). Evolution of carbohydrate metabolic pathways. *Res. Microbiol.*, 147, 448–455.
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of theoretical biology*, 14, 225–IN6.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., et al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487–491.
- Sandmann, G., Peleato, M.L., Fillat, M.F., Lázaro, M.C. & Gómez-Moreno, C. (1990). Consequences of the iron-dependent formation of ferredoxin and flavodoxin on photosynthesis and nitrogen fixation on Anabaena strains. *Photosynthesis research*, 26, 119–125.
- Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc*, 1, 16–22.
- Schägger, H. & Jagow, von, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 166, 368–379.
- Schmitz, O., Boison, G., Salzmann, H., Bothe, H., Schütz, K., Wang, S.-H., et al. (2002). HoxE—a subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex (HoxEFUYH) of cyanobacteria. *BBA - Bioenergetics*, 1554, 66–74.
- Schopf, J.W. (1993). Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science*, 260, 640–646.
- Schopf, J.W. (2000). The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage. *The ecology of cyanobacteria*. Springer Netherlands, 2000, 13–35.
- Schopf, J.W. (2006). Fossil evidence of Archaean life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361, 869–885.
- Schreiber, U. (1983). Chlorophyll fluorescence yield changes as a tool in plant physiology I. The measuring system. *Photosynthesis research*, 4, 361–373.
- Schreiber, U., Klughammer, C. & Neubauer, C. (1988). Measuring P700 absorbance changes around 830 nm with a new type of pulse modulation system. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 43, 686–698.
- Schreiber, U., Schliwa, U. & Bilger, W. (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis research*, 10, 51–62.
- Scott, M., Gunderson, C.W., Mateescu, E.M., Zhang, Z. & Hwa, T. (2010). Interdependence of cell growth and gene expression: origins and consequences. *Science*, 330, 1099–1102.
- Shestakov, S.V. & Khyen, N.T. (1970). Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Molecular and General Genetics MGG*, 107, 372–375.
- Shiji, I. (1977). Purification to homogeneity of spinach nitrite reductase by ferredoxin-sepharose affinity chromatography. *J. Biochem.*, 82, 915–918.
- Shimakawa, G., Shaku, K., Nishi, A., Hayashi, R., Yamamoto, H., Sakamoto, K., et al. (2015). FLAVODIIRON2 and FLAVODIIRON4 proteins mediate an oxygen-dependent alternative electron flow in *Synechocystis spec.* PCC 6803 under CO₂-limited conditions. *Plant Physiology*, 167, 472–480.
- Siebers, B. & Schönheit, P. (2005). Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.*, 8, 695–705.
- Stal, L.J. & Moezelaar, R. (1997). Fermentation in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 21, 179–211.
- Stanier, R.Y. & Bazine, G.C. (1977). Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 31, 225–274.

- Stewart, F., Zhang, Y. & Buchholz, F. U.S. Patent No. 6,787,316. 7 Sep. 2004. Novel DNA cloning method.
- Sticht, H. & Rösch, P. (1998). The structure of iron–sulfur proteins. *Progress in biophysics and molecular biology*, 70, 95–136.
- Swingle, W.D., Blankenship, R.E. & Raymond, J. (2008). The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics, and Evolution/Caister Academic Press; Chapter 2: Insights into cyanobacterial evolution from comparative genomics. *The cyanobacteria: molecular biology, genomics, and evolution*, 21–43.
- Tamagnini, P., Costa, J.-L., Almeida, L., Oliveira, M.-J., Salema, R. & Lindblad, P. (2000). Diversity of cyanobacterial hydrogenases, a molecular approach. *Current microbiology*, 40, 356–361.
- Tamagnini, P., Leitão, E., Oliveira, P., Ferreira, D., Pinto, F., Harris, D.J., *et al.* (2007). Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31, 692–720.
- Teeling, H., Fuchs, B.M., Becher, D., Klockow, C., Gardebrecht, A., Bennke, C.M., *et al.* (2012). Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Science*, 336, 608–611.
- Tittel, J., Bissinger, V., Zippel, B., Gaedke, U., Bell, E., Lorke, A., *et al.* (2003). Mixotrophs combine resource use to outcompete specialists: implications for aquatic food webs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 12776–12781.
- Troshina, O., Serebryakova, L., Sheremetieva, M. & Lindblad, P. (2002). Production of H₂ by the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 during fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1283–1289.
- Van der Oost, J., Bulthuis, B.A., Feitz, S., Krab, K. & Kraayenhof, R. (1989). Fermentation metabolism of the unicellular cyanobacterium *Cyanothece* PCC 7822. *Arch Microbiol*, 152, 415–419.
- Verhees, C.H., Kengen, S., Tuininga, J.E., Schut, G.J. & Adams, M. (2004). The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochemical Journal*, 377, 819–822.
- Vicente, J.B., Gomes, C.M., Wasserfallen, A. & 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.
- Vicente, J.B., Justino, M.C., Gonçalves, V.L., Saraiva, L.M. & Teixeira, M. (2008). Biochemical, spectroscopic, and thermodynamic properties of flavodiiron proteins. *Meth. Enzymol.*, 437, 21–45.
- Vicente, J.B., Testa, F., Mastronicola, D., Forte, E., Sarti, P., Teixeira, M., *et al.* (2009). Redox properties of the oxygen-detoxifying flavodiiron protein from the human parasite *Giardia intestinalis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 488, 9–13.
- Vincent, K.A., Parkin, A. & Armstrong, F.A. (2007). Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases. *Chem. Rev.*, 107, 4366–4413.
- Walters, M.J., Srikannathasan, V., McEwan, A.R., Naismith, J.H., Fierke, C.A. & Toone, E.J. (2008). Characterization and crystal structure of *Escherichia coli* KDPGal aldolase. *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 710–720.
- Wang, R., Healey, F.P. & Myers, J. (1971). Amperometric measurement of hydrogen evolution in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology*, 48, 108–110.
- Wasserfallen, A., Ragettli, S., Jouanneau, Y. & Leisinger, T. (1998). A family of flavoproteins in the domains Archaea and Bacteria. *Eur. J. Biochem.*, 254, 325–332.
- Werber, M.M. & Mevarech, M. (1978). Purification and characterization of a highly acidic 2Fe-ferredoxin from Halobacterium of the Dead Sea. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 187, 447–456.
- Whitton, B.A. & Potts, M. (2007). The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space.
- Wiesenburg, D.A. & Guinasso, N.L., Jr. (1979). Equilibrium solubilities of methane, carbon monoxide, and hydrogen in water and sea water. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 24, 356–360.
- Williams, J.G. (1988). Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods Enzymol.*, 167, 766–778.
- Winkler, M., Hemschemeier, A., Jacobs, J., Stripp, S. & Happe, T. (2010). Multiple ferredoxin isoforms in *Chlamydomonas reinhardtii* - their role under stress conditions and biotechnological implications. *Eur. J. Cell Biol.*, 89, 998–1004.
- World Energy Outlook 2014. (2014). World Energy Outlook 2014, 1–13.
- Yang, C., Hua, Q. & Shimizu, K. (2002). Metabolic flux analysis in *Synechocystis* using isotope distribution from 13 C-labeled glucose. *Metab. Eng.*, 4, 202–216.

- Zang, X., Liu, B., Liu, S., Arunakumara, K. & Zhang, X. (2007). Optimum conditions for transformation of *Synechocystis spec.* PCC 6803. *Journal of Microbiology-Seoul*, 45, 241.
- Zhang, P., Allahverdiyeva, Y., Eisenhut, M. & Aro, E.-M. (2009). Flavodiiron proteins in oxygenic photosynthetic organisms: photoprotection of photosystem II by Flv2 and Flv4 in *Synechocystis spec.* PCC 6803. *PLoS ONE*, 4, e5331.
- Zhang, P., Eisenhut, M., Brandt, A.-M., Carmel, D., Silén, H.M., Vass, I., *et al.* (2012). Operon flv4-flv2 provides cyanobacterial photosystem II with flexibility of electron transfer. *The Plant Cell*, 24, 1952–1971.
- Zhou, J., Zhang, H., Meng, H., Zhu, Y., Bao, G., Zhang, Y., *et al.* (2014). Discovery of a super-strong promoter enables efficient production of heterologous proteins in cyanobacteria. *Sci. Rep.*, 4, 4500 EP.
- Zhou, J., Zhang, H., Zhang, Y., Li, Y. & Ma, Y. (2012). Designing and creating a modularized synthetic pathway in cyanobacterium *Synechocystis* enables production of acetone from carbon dioxide. *Metab. Eng.*, 14, 394–400.
- Zubkov, M.V., Fuchs, B.M., Tarran, G.A., Burkill, P.H. & Amann, R. (2003). High rate of uptake of organic nitrogen compounds by *Prochlorococcus* cyanobacteria as a key to their dominance in oligotrophic oceanic waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1299–1304.
- Zurbriggen, M.D., Tognetti, V.B. & Carrillo, N. (2007). Stress-inducible flavodoxin from photosynthetic microorganisms. The mystery of flavodoxin loss from the plant genome. *IUBMB life*, 59, 355–360.
- Zwaig, N., de Zwaig, R.N., Istúriz, T. & Weckler, M. (1973). Regulatory mutations affecting the gluconate system in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 114, 469–473.

Danksagung

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei den vielen Menschen bedanken, die mich während meiner Promotion begleitet und auf vielfältige Art und Weise unterstützt haben und die ich hier aus Platzgründen nur zu einem kleinen Teil namentlich erwähnen kann.

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rüdiger Schulz für die Möglichkeit, mich mit meinem Vorhaben seiner Forschungseinheit anschließen zu dürfen. Ich danke ihm ferner für die Gelegenheit an Konferenzen teilzunehmen und so mit anderen Wissenschaftlern in Austausch zu kommen. Er hatte stets ein offenes Ohr für meine Anliegen und ließ mir dennoch viel Raum für eigenständige Arbeit und freie Entfaltung.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Kirstin Gutekunst für die inhaltliche Leitung, die enge und intensive Zusammenarbeit und die hervorragende Unterstützung. Ich danke ihr sehr für die viele Zeit und Geduld, die sie in unsere Zusammenarbeit investiert hat und für unzählige, inspirierenden Gespräche, auch außerhalb des Labors. Ferner danke ich ihr für die Unterstützung bei der Antragsstellung zur Finanzierung dieser Arbeit. Ebenso danke ich Herrn Dr. Jens Appel, der mir mit seinem Rat und seinem Fachwissen in vielen Situationen zur Seite stand. Bei Frau Claudia Marquardt bedanke ich mich für die umfangreiche Unterstützung im Labor, sie war mir durch ihr umfangreiches technisches Wissen stets eine große Stütze. Ich danke Herrn Prof. Dr. Ober für die Bereitschaft meine Arbeit als Gutachter zu betreuen und für seine Hilfsbereitschaft und moralische Unterstützung bei meiner Promotion.

Ich danke der Deutschen Bundesstiftung Umwelt für die finanzielle Unterstützung, das Vertrauen in meine Arbeit und in mich. Dank des Promotionsstipendiums war es mir möglich, diese Arbeit zu verwirklichen und eröffnete mir darüber hinaus Möglichkeiten viele interessante Menschen und Themen kennen zu lernen. In diesem Zusammenhang möchte ich stellvertretend meinem Betreuer Herrn Dr. Christian Schäfer für seine Unterstützung im Stipendienprogramm danken. Ebenso danke ich Frau Henrike Rambo und Frau Karin Kraus für den interdisziplinär-wissenschaftlichen Austausch und die spannenden Einblicke in andere naturwissenschaftlichen Themenbereiche.

Für die gute Zusammenarbeit in der Zeit meiner Promotion möchte ich insbesondere Herrn Dr. Jens Appel und Frau Dr. Kirstin Gutekunst für die gemeinsamen Enzymmessungen, Heinrich Burgstaller für die gemeinsamen qRT-PCR-Messungen und Melanie Roggendorf für die gemeinsamen Wachstumsexperimente unter heterotrophen Bedingungen danken.

Ich danke den ehemaligen und den aktuellen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für die außerordentliche Hilfsbereitschaft sowie für unterhaltsame Stunden im Labor und fernab der Arbeit, die mir auch moralisch eine große Hilfe waren. Insbesondere Herrn Heinrich Burgstaller, welcher die gesamte Promotionszeit mit mir zusammengearbeitet hat und mir in dieser Zeit ein guter Freund geworden ist. Ebenso wie Cornelia Herzog-Truxa, welche es verstand mich an Tagen schlechter Stimmung aufzumuntern. Vielen Dank an jene, die diese Arbeit Korrektur lasen.

Ein besonderer Dank richtet sich an meine treue Hündin Emma, die mir sprichwörtlich immer zu Füßen lag und dafür sorgte, dass ich auch an langen Arbeitstagen gelegentlich an die frische Luft kam.

Ganz herzlich danke ich auch meiner Familie, die mich durch ihre Liebe und Geduld auch in dieser Phase meines Lebens unterstützt hat. Vor allem meine Eltern, meine Brüder, meine verstorbene Großmutter und mein Patenonkel waren immer für mich da.

Erklärung

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

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

Teile dieser Arbeit sind in folgender Publikation enthalten:

Chen, X.*, **Schreiber, K.***, Appel, J., Makowka, A., Faehnrich, B., Roettger, M., Hajirezaei, M.R, Sönnichsen, F.D., Schönheit, P., Martin, W.F., and Kirstin Gutekunst (2016). The Entner-Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, doi: 10.1073/ 1521916113

*geteilte Erstautorenschaft

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

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt.

Karoline Schreiber

Eigene Veröffentlichungen

Chen, X.*, **Schreiber, K.***, Appel, J., Makowka, A., Faehrich, B., Roettger, M., Hajirezaei, M.R, Sönnichsen, F.D., Schönheit, P., Martin, W.F., and Kirstin Gutekunst (2016). The Entner-Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, doi: 10.1073/ 1521916113

*geteilte Erstautorenschaft

Gutekunst, K., Chen, X., **Schreiber, K.**, Kaspar, U., Makam, S. and Jens Appel (2014). The bidirectional NiFe-hydrogenase in *Synechocystis spec.* PCC 6803 is reduced by flavodoxin and ferredoxin and is essential under mixotrophic, nitrate-limiting conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 1930–1937.

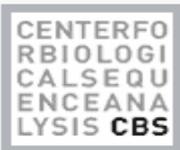
Anhang

Tabelle 26: Wasserstoffkonzentrationen ($\mu\text{mol/liter}$) bei einem Umgebungwasserstoffpartialdruck von 1 atm in Wasser als Funktion der Temperatur. Quelle: Hydrogen sensor user manual Copyright © 2014· Unisense A/S Version January 2014 / (Wiesenburg & Guinasso 1979).

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

Tabelle 27: Gleichgewichtskonzentration von Sauerstoff ($\mu\text{mol O}_2/\text{Liter}$) bei einem Umgebungspartialdruck von 0,21 atm in Wasser als Funktion der Temperatur und Salzgehalt. Quelle Oxygen sensor user manual Copyright © 2014 · Unisense A/S Version January 2014 / (Millero & Poisson 1981; Garcia & Gordon 1992).

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



TargetP 1.1 Server - prediction results

Technical University of Denmark

```
### targetp v1.1 prediction results #####
Number of query sequences: 1
Cleavage site predictions not included.
Using PLANT networks.
```

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC
Sequence	236	0.499	0.766	0.005	0.016	M	4
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000		

Explain the output. Go **back**.

Output format

DESCRIPTION

The output is a table in plain text (see the [example](#) below). For each input sequence one table row is output. The columns are as follows:

Name	Sequence name truncated to 20 characters
Len	Sequence length
cTP, mTP, SP, other	Final NN scores on which the final prediction is based (Loc, see below). Note that the scores are not really probabilities, and they do not necessarily add to one. However, the location with the highest score is the most likely according to TargetP, and the relationship between the scores (the reliability class, see below) may be an indication of how certain the prediction is.
Loc	Prediction of localization, based on the scores above; the possible values are: C Chloroplast, i.e. the sequence contains cTP, a chloroplast transit peptide; M Mitochondrion, i.e. the sequence contains mTP, a mitochondrial targeting peptide; S Secretory pathway, i.e. the sequence contains SP, a signal peptide; - Any other location. * "don't know", indicates that cutoff restrictions were set (see instructions) and the winning network output score was below the requested cutoff for that category.
RC	Reliability class, from 1 to 5, where 1 indicates the strongest prediction. RC is a measure of the size of the difference (diff) between the highest (winning) and the second highest output scores. There are 5 reliability classes, defined as follows: 1: diff > 0.800 2: 0.600 > diff > 0.600 3: 0.600 > diff > 0.400 4: 0.400 > diff > 0.200 5: 0.200 > diff Thus, the lower the value of RC the safer the prediction.
TPIen	Predicted presequence length; it appears only when TargetP was asked to perform cleavage site predictions (see instructions).

Abbildung 66: TargetP Ergebnis der *eda* Sequenz aus *H. vulgare*.

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHER AUFBAU EINER BIDIREKTIONALEN [NiFe]-HYDROGENASE, VERÄNDERT NACH (TAMAGNINI <i>ET AL.</i> 2007).....	6
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PHOTOSYNTHETISCHEN ELEKTRONENTRANSPORTS IN CYANOBAKTERIEN. VERÄNDERT NACH (HASUNUMA <i>ET AL.</i> 2014; MULLINEAUX 2014). FLV: FLAVODIIRON PROTEIN; FNR: FERREDOXIN - NADP OXIDOREDUKTASE; HOX: BIDIREKTIONALE [NiFe]-HYDROGENASE; PSI: PHOTOSYSTEM I; PSII: PHOTOSYSTEM II.....	9
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE ABBILDUNG ZUM ZUSAMMENHANG ZWISCHEN GLUKOSESTOFFWECHSEL UND WASSERSTOFFPRODUKTION UNTER FERMENTATIVEN BEDINGUNGEN (VERÄNDERT NACH CHEN <i>ET. AL.</i> 2016). DIE ELEKTRONEN ZUR BILDUNG VON H ₂ STAMMEN LETZTLICH AUS DER GLUKOSE BZW. DEM GLYKOGEN. IN ROT DARGESTELLT IST DER EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS-WEG (EMP) UND IN BLAU DER OXIDATIVE-PENTOSEPHOSPHAT-WEG (OPP).....	12
ABBILDUNG 4: A) EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS-WEG (EMP) IN ROT UND DER ENTNER DOUDOROFF-WEG (ED) IN GRÜN (FLAMHOLZ <i>ET AL.</i> 2013).	13
ABBILDUNG 5: OXIDATIVER-PENTOSEPHOSPHAT-WEG (OPP) (AUSTRALIAN SOCIETY OF PLANT SCIENTISTS, VON: NICOLAS TAYLOR & HARVEY MILLAR: HTTP://PLANTSINACTION.SCIENCE.UQ.EDU.AU / © AUSTRALIAN SOCIETY OF PLANT SCIENTISTS, NEW ZEALAND SOCIETY OF PLANT BIOLOGISTS, AND NEW ZEALAND INSTITUTE OF AGRICULTURAL AND HORTICULTURAL SCIENCE 2010).....	14
ABBILDUNG 6: BEISPIELHAFT EINE DARSTELLUNG EINER PAM-MESSUNG. DIE DUNKEL ROTEN PFEILE ZEIGEN DIE ANREGUNG DES PSI BEI 24,55 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ UND DIE HELLROTEN DIE DES PSI UND DES PSII BEI 339 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. DIE BLITZE SYMBOLISIEREN EINEN SÄTTIGUNGSPULS BEI 10000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. AUF DER Y-ACHSE IST DIE MENGE AN OXIDIERTEM PSI AUFGETRAGEN.	28
ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHER AUFBAU DES SOUTHERNBLOTS.	39
ABBILDUNG 8: SKIZZENHAFT EINE DARSTELLUNG DER ERSTELLUNG VON <i>E. COLI</i> KNOCK-OUT MUTANTEN.	43
ABBILDUNG 9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER FUNKTION UND DES ELEKTRONENFLUSSES DER ELEKTRODE.....	46
ABBILDUNG 10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER MESSKURVE VON FERMENTAIVER- UND PHOTOWASSERSTOFFPRODUKTION GEMESSEN MIT DER CLARK-ELEKTRODE.	48
ABBILDUNG 11: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINE MESSKURVE FÜR DIE AKTIVITÄTSMESSUNG DER HYDROGENASE.....	49
ABBILDUNG 12: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER FERMENTATIVEN WASSERSTOFFMESSUNG MIT UNISENSE-SENSOREN.....	51
ABBILDUNG 13: AUFBAU DES SEMI-DRY WESTERN-BLOTS: ZWISCHEN DEN GRAPHITPLATTEN LIEGEN 3 WHATMANPAPIERE, DAS GEL, DANN DIE MEMBRAN UND ERNEUT 3 WHATMANPAPIERE (VON UNTEN NACH OBEN).	57
ABBILDUNG 14: (A) <i>FDX9</i> IM WILDTYP VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> UND DAS PCR KNOCK-OUT KONSTRUKT FÜR Δ <i>FDX9</i> UND (B) <i>FDX7</i> IM WILDTYP VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> UND DAS PCR KNOCK-OUT KONSTRUKT FÜR Δ <i>FDX7</i> MIT DEN JEWELIGEN PRIMERBINDESTELLEN.	62
ABBILDUNG 15: PCR MIT GENOMISCHER DNA VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> WT UND VERSCHIEDENEN MUTANTEN ZUR VERIFIZIERUNG, DASS <i>FDX9</i> UND <i>FDX7</i> IN ALLEN GENOMKOPIEN DER GEZEIGTEN MUTANTEN AUSGESCHALTET WURDE. DIE TASCHEN DES GELS SIND WIE FOLGT BELADEN: GENE RULER 1 KB DNA LADDER (SPUR 1); WT (SPUR 2); Δ <i>FDX9-1</i> (SPUR 3); Δ <i>FDX9-2</i> (SPUR 4); Δ <i>ISIB/\Delta</i> <i>FDX9-1</i> (SPUR 5); Δ <i>ISIB/\Delta</i> <i>FDX9-2</i> (SPUR 6); LEERE SPUR (SPUR 7); WT (SPUR 8); Δ <i>FDX7-1</i> (SPUR 9); Δ <i>FDX7-2</i> (SPUR 10); Δ <i>ISIB/\Delta</i> <i>FDX7-1</i> (SPUR 11); Δ <i>ISIB/\Delta</i> <i>FDX7-2</i> (SPUR 12) GENE RULER 1 KB DNA LADDER (SPUR 13). ERWARTETE BANDENGRÖÖE FÜR <i>FDX9</i> : 953 BP UND FÜR Δ <i>FDX9</i> : 1754 BP. ERWARTETE BANDENGRÖÖE FÜR <i>FDX7</i> : WT: 969 BP UND FÜR Δ <i>FDX7</i> : 2317 BP.....	62
ABBILDUNG 16: AUTOTROPHE WACHSTUM DER FERREDOXIN-MUTANTEN Δ <i>FDX9</i> UND Δ <i>FDX7</i> IM VERGLEICH ZUM WILDTYP.	63
ABBILDUNG 17: ANSICHT DER FERREDOXIN-MUTANTEN Δ <i>FDX9</i> , Δ <i>FDX7</i> UND DES WT AM 5. MESSTAG.....	64
ABBILDUNG 18: DARSTELLUNG DES SPEKTRUMS (400- 800 NM) DER FERREDOXIN-MUTANTEN Δ <i>FDX9</i> , Δ <i>FDX7</i> UND DES WILDTYPS (A) UND DER ERRECHNETE RELATIVE ANTEIL AN PIGMENTEN IN DEN VERSCHIEDENEN KULTUREN (B).....	65
ABBILDUNG 19: RATE DER FERMENTATIVEN WASSERSTOFFPRODUKTION (A), PHOTOWASSERSTOFFPRODUKTION (B) DER FERREDOXIN-MUTANTEN Δ <i>FDX9</i> , Δ <i>FDX7</i> IM VERGLEICH ZUM WILDTYP.....	65
ABBILDUNG 20: <i>FLV3</i> IM WILDTYP VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> (OBEN) UND DAS PCR KNOCK-OUT KONSTRUKT FÜR Δ <i>FLV3</i> (UNTEN) MIT DEN PRIMERBINDESTELLEN UND DEN HINDIII SCHNITTSTELLEN.	68
ABBILDUNG 21: SOUTHERNBLOT MIT GENOMISCHER DNA VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> WT UND VERSCHIEDENEN MUTANTEN ZUR VERIFIZIERUNG, DASS <i>FLV3</i> IN ALLEN GENOMKOPIEN DER GEZEIGTEN MUTANTEN AUSGESCHALTET WURDE. DIG-LABELLED Λ -HINDIII-MARKER (SPUR 1); WT (SPUR 2); Δ <i>FLV3-1</i> (SPUR 3); Δ <i>FLV3-2</i> (SPUR 4); Δ <i>HOXH/\Delta</i> <i>FLV3-1</i> (SPUR 5); Δ <i>HOXH/\Delta</i> <i>FLV3-2</i> (SPUR 6); Δ <i>HOXE-H/\Delta</i> <i>FLV3-1</i> (SPUR 7); Δ <i>HOXE-H/\Delta</i> <i>FLV3-2</i> (SPUR 8); Δ <i>HOXE-H/\Delta</i> <i>FLV24/\Delta</i> <i>FLV3-1</i> (SPUR 9); Δ <i>HOXE-H/\Delta</i> <i>FLV24/\Delta</i> <i>FLV3-2</i> (SPUR 10); Δ <i>FLV24/\Delta</i> <i>FLV3-1</i> (SPUR 11); Δ <i>FLV24/\Delta</i> <i>FLV3-2</i> (SPUR 12).....	68
ABBILDUNG 22: <i>FLV24</i> IM WILDTYP VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> (OBEN) UND DAS PCR KNOCK-OUT KONSTRUKT FÜR Δ <i>FLV24</i> (UNTEN) MIT DEN PRIMERBINDESTELLEN UND DEN HINDIII SCHNITTSTELLEN.	69
ABBILDUNG 23: SOUTHERN BLOT MIT GENOMISCHER DNA VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> WT UND VERSCHIEDENEN MUTANTEN ZUR VERIFIZIERUNG, DASS <i>FLV24</i> IN ALLEN GENOMKOPIEN DER GEZEIGTEN MUTANTEN AUSGESCHALTET WURDE. DIG-LABELLED Λ -HINDIII-MARKER (SPUR 1); WT (SPUR 2); Δ <i>FLV24</i> (SPUR 3); Δ <i>HOXH/\Delta</i> <i>FLV24</i> (SPUR 4); Δ <i>HOXE-H/\Delta</i> <i>FLV24</i> (SPUR 5); Δ <i>HOXE-H/\Delta</i> <i>FLV24/\Delta</i> <i>FLV3</i> (SPUR 6); Δ <i>FLV24/\Delta</i> <i>FLV3-1</i> (SPUR 7); Δ <i>FLV24/\Delta</i> <i>FLV3-2</i> (SPUR 8).	69

ABBILDUNG 24: WACHSTUM DER FLAVOPROTEIN-MUTANTEN UNTER AUTOTROPHEN UND MIXOTROPHEN (+G) BEDINGUNGEN.....	70
ABBILDUNG 25: WACHSTUM DER FLAVOPROTEIN UND HYDROGENASE/FLAVOPROTEIN-MUTANTEN UNTER AUTOTROPHEN UND MIXOTROPHEN (+G) BEDINGUNGEN.	71
ABBILDUNG 26: WACHSTUM DER FLAVOPROTEIN UND HYDROGENASEKOMPLEX/FLAVOPROTEIN-MUTANTEN UNTER AUTOTROPHEN UND MIXOTROPHEN (+G) BEDINGUNGEN.	71
ABBILDUNG 27: SDS-PAGE UND WESTERNBLOT-ANALYSE DER FLAVOPROTEIN-MUTANTEN ZUR EXPRESSIONSANALYSE VON HOXF. WT (SPUR 1); $\Delta FLV3-1$ (SPUR 2); $\Delta FLV3-2$ (SPUR 3); $\Delta FLV24-1$ (SPUR 4); $\Delta FLV24-2$ (SPUR 5); $\Delta FLV24/\Delta FLV3-1$ (SPUR 6); $\Delta FLV24/\Delta FLV3-2$ (SPUR 7); $\Delta HOXEH$ (SPUR 8).	72
ABBILDUNG 28: SDS-PAGE UND WESTERNBLOT-ANALYSE DER FLAVOPROTEIN-MUTANTEN ZUR EXPRESSIONSANALYSE VON HOXF (WIEDERHOLUNG). WT (SPUR 1); $\Delta FLV3$ (SPUR 2); $\Delta FLV24$ (SPUR 3); $\Delta FLV24/\Delta FLV3$ (SPUR 4); $\Delta HOXEH$ (SPUR 5).	73
ABBILDUNG 29: : PSI-OXIDATIONS MESSUNGEN DER FLAVOPROTEIN-MUTANTEN $\Delta FLV3$ UND $\Delta FLV3/\Delta FLV24$ IN ANWESENHEIT VON O ₂ (A) UND IN ABWESENHEIT VON O ₂ (B).	74
ABBILDUNG 30: PHOTOWASSERTOFFPRODUKTION DER FLAVOPROTEIN-MUTANTEN $\Delta FLV3$, $\Delta FLV24$ UND $\Delta FLV3/\Delta FLV24$ UND DES WILDTYPS.	75
ABBILDUNG 31: <i>EDA</i> IM WILDTYP VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> (OBEN) UND DAS PCR <i>KNOCK-OUT</i> KONSTRUKT FÜR ΔEDA (UNTEN) MIT DEN PRIMERBINDESTELLEN UND DEN HINDIII SCHNITTSTELLEN.	76
ABBILDUNG 32: SOUTHERNBLOT MIT GENOMISCHER DNA VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> WT UND VERSCHIEDENEN MUTANTEN ZUR VERIFIZIERUNG, DASS <i>EDA</i> IN ALLEN GENOMKOPIEN DER GEZEIGTEN MUTANTEN AUSGESCHALTET WURDE. WT (SPUR 1); ΔEDA (SPUR 2); ΔEDA (SPUR 3); $\Delta EDA/\Delta GND$ (SPUR 4); $\Delta PFK/\Delta ZWF/\Delta EDA$ (SPUR 5); $\Delta PFK/\Delta ZWF/\Delta GND/\Delta EDA$ (SPUR 6); $\Delta PFK/\Delta ZWF/\Delta GND/\Delta EDA$ (SPUR 7); DIG-LABELLED λ -HINDIII-MARKER (SPUR 8).	76
ABBILDUNG 33: <i>EDD</i> IM WILDTYP VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> (OBEN) UND DAS PCR <i>KNOCK-OUT</i> KONSTRUKT FÜR ΔEDD (UNTEN) MIT DEN PRIMERBINDESTELLEN UND DEN HINDIII SCHNITTSTELLEN.	77
ABBILDUNG 34: SOUTHERNBLOT MIT GENOMISCHER DNA VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> WT UND VERSCHIEDENEN MUTANTEN ZUR VERIFIZIERUNG, DASS <i>EDD</i> IN ALLEN GENOMKOPIEN DER GEZEIGTEN MUTANTEN AUSGESCHALTET WURDE. DIG-LABELLED λ -HINDIII-MARKER (SPUR 1); WT (SPUR 2); ΔEDD (SPUR 3); $\Delta EDD/\Delta ZWF$ (SPUR 4); $\Delta PFK/\Delta ZWF/\Delta EDD$ (SPUR 5); $\Delta PFK/\Delta ZWF/\Delta GND/\Delta EDD$ (SPUR 6); $\Delta PFK/\Delta ZWF/\Delta GND/\Delta EDA$ (SPUR 7).	77
ABBILDUNG 35: A) <i>GDHB</i> IM WILDTYP VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> (OBEN) UND DAS PCR <i>KNOCK-OUT</i> KONSTRUKT FÜR $\Delta GDHB$ (UNTEN) MIT DEN PRIMERBINDESTELLEN; B) <i>GND</i> IM WILDTYP VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> (OBEN) UND DAS PCR <i>KNOCK-OUT</i> KONSTRUKT FÜR ΔGND (UNTEN) MIT DEN PRIMERBINDESTELLEN UND DEN HINDIII SCHNITTSTELLEN.	79
ABBILDUNG 36: SOUTHERNBLOT MIT GENOMISCHER DNA VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> WT UND VERSCHIEDENEN MUTANTEN ZUR VERIFIZIERUNG, DASS <i>GND</i> IN ALLEN GENOMKOPIEN DER GEZEIGTEN MUTANTEN AUSGESCHALTET WURDE. DIG-LABELLED λ -HINDIII-MARKER (SPUR 1); WT (SPUR 2); ΔGND (SPUR 3); $\Delta GND/\Delta EDA$ (SPUR 4); $\Delta PFK/\Delta ZWF/\Delta GND$ (SPUR 5); $\Delta PFK/\Delta GND$ (SPUR 6); $\Delta PFK/\Delta ZWF/\Delta GND/\Delta EDA$ (SPUR 7).	79
ABBILDUNG 37: WACHSTUM VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> WT UND VERSCHIEDENEN EINZELMUTANTEN DER GLUKOSEABBAUWEGE UNTER AUTOTROPHEN UND MIXOTROPHEN (+G) BEDINGUNGEN UNTER DAUERLICHT.	80
ABBILDUNG 38: WACHSTUM VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> WT UND $\Delta GND/\Delta PFK/\Delta ZWF$ UNTER AUTOTROPHEN UND MIXOTROPHEN (+G) BEDINGUNGEN UNTER DAUERLICHT.	81
ABBILDUNG 39: WACHSTUM VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> WT UND $\Delta GDH(B)$, $\Delta PFK/\Delta ZWF/\Delta GDH(B)$ UNTER AUTOTROPHEN UND MIXOTROPHEN (+G) BEDINGUNGEN UNTER DAUERLICHT. (BEI <i>GDHB/SL1608</i> HANDELT ES SICH NICHT UM DAS IN CHEN & SCHREIBER <i>ET AL.</i> UNTERSUCHTE <i>GDH/SL1709</i>)	82
ABBILDUNG 40: WACHSTUM VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> WT UND $\Delta PFK/\Delta ZWF/\Delta EDA$ UNTER AUTOTROPHEN UND MIXOTROPHEN (+G) BEDINGUNGEN UNTER DAUERLICHT.	82
ABBILDUNG 41: WACHSTUM VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> WT, ΔEDA UND $\Delta EDA/\Delta GND/\Delta PFK/\Delta ZWF$ UNTER AUTOTROPHEN UND MIXOTROPHEN (+G) BEDINGUNGEN UNTER DAUERLICHT. $\Delta EDA/\Delta GND/\Delta PFK/\Delta ZWF$ UNTER AUTOTROPHEN BEDINGUNGEN LIEGT GENAU UNTER DER ΔEDA KURVE.....	83
ABBILDUNG 42: WACHSTUM VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> WT UND $\Delta GND/\Delta EDA$ UNTER AUTOTROPHEN UND MIXOTROPHEN (+G) BEDINGUNGEN UNTER DAUERLICHT.	84
ABBILDUNG 43: WACHSTUM VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> WT UND VERSCHIEDENEN EINZELMUTANTEN DER GLUKOSEABBAUWEGE UNTER AUTOTROPHEN BEDINGUNGEN IM TAG/NACHT-ZYKLUS.	84
ABBILDUNG 44: WACHSTUM VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> WT UND VERSCHIEDENEN EINZELMUTANTEN DER GLUKOSEABBAUWEGE UNTER HETEROTROPHEN BZW. LAHG- BEDINGUNGEN.	85
ABBILDUNG 45: (A) ANORDNUNG VON <i>EDA-EDD</i> AUF DEM OPERON IM GENOM VON <i>E. COLI</i> (QUELLE ECOCYC/BIOCYC DATABASE 01/2016). (B) ANORDNUNG VON <i>ZWF</i> IM OPERON IM GENOM VON <i>E. COLI</i> (QUELLE ECOCYC/BIOCYC DATABASE 01/2016); (C) AGAROSEGELEKTROPHORESE ZUR PRÜFUNG DES <i>KNOCK-OUTS</i> VON <i>EDA-EDD</i> IN <i>E. COLI</i> : GNERULER 1KB DNA LADDER (SPUR 1); $\Delta EDA-EDD$ 1-3 (SPUR 2-4) UND WT (SPUR 5). (D) AGAROSEGELEKTROPHORESE ZUR PRÜFUNG DES <i>KNOCK-OUTS</i> VON <i>GND</i> IN <i>E. COLI</i> . $\Delta EDA-EDD\Delta GND$ 1-3 (SPUR 1-3); WT (SPUR 4) UND GNERULER 1KB DNA LADDER (SPUR 5).....	86

ABBILDUNG 46: WACHSTUMSTEST DER Δ EDA-EDD UND Δ EDA-EDD Δ GND MUTANTEN UND DEM WILD-TYP VON <i>E. COLI</i> AUF LB-MEDIUM (L) UND MINIMAL-MEDIUM MIT GLUKONAT (R).....	87
ABBILDUNG 47: A) SCHEMATISCHER ABLAUF DER REAKTION IM ENZYMTEST. KDPG WIRD DURCH EDA ZU PYRUVAT UMGESETZT, DAS ÜBER DIE LDH ZU LAKTAT UMGESETZT WIRD, HIERBEI WIRD NADH OXIDIERT. DIE ABNAHME VON NADH KANN PHOTOMETRISCH BEI 366 NM BESTIMMT WERDEN. B) ABSORPTIONSSPEKTREN BEI 366 NM ZUR AKTIVITÄTSBESTIMMUNG DER KDPG-ALDOLASE AUS <i>E. COLI</i> . OBEN: DIE MESSUNG DES <i>E. COLI</i> WILD-TYP; UNTEN: MESSUNG VON Δ EDA-EDD Δ GND.	88
ABBILDUNG 48: AUFREINIGUNG VON EDA AUS <i>SYNECHOCYSTIS</i> NACH EXPRESSION IM PET22B+VEKTOR. PAGERULER™ PRESTAINED PROTEIN LADDER (SPUR 1); PELLET (SPUR 2); ÜBERSTAND (SPUR 3); WASCHFRAKTION 1 (SPUR 4); WASCHFRAKTION 4 (SPUR 5); ELUTION 1-8 (SPUR 6-13).....	89
ABBILDUNG 49: AUFREINIGUNG VON DEM PUTATIVEN EDA AUS <i>SYNECHOCYSTIS</i> NACH EXPRESSION IM pMAL-VEKTOR. PAGERULER™ PRESTAINED PROTEIN LADDER (SPUR 1); 6803-17 ÜBERSTAND (SPUR 2); 6803-17 PELLET (SPUR 3); 6803-17 ÜBERSTAND (SPUR 4); 6803-17 PELLET (SPUR 5); PAGERULER™ PRESTAINED PROTEIN LADDER (SPUR 6); 6803-16 ÜBERSTAND (SPUR 7); 6803-16 PELLET (SPUR 8); ELUTIONSFRAKTIONEN 1-6 (SPUR 9-14).	90
ABBILDUNG 50: (A) PSM-SCHUTTLEVEKTOR ZUR ÜBEREXPRESSION DES PUTATIVEN EDA IN <i>SYNECHOCYSTIS</i> ; (B) EXPRESSIONSKONSTRUKTE ZUR EXPRESSION VON EDA IN <i>SYNECHOCYSTIS</i> MIT HIS-TAG (OBEN) UND OHNE HIS-TAG (UNTEN).	91
ABBILDUNG 51: AKTIVITÄTSMESSUNG DER KDPG-ALDOLASE (EDA) AUS <i>SYNECHOCYSTIS</i> IM GESAMTEXTRAKT. K_M -WERT 0,095. ...	92
ABBILDUNG 52: : AKTIVITÄTSMESSUNG DER AUFGEREINIGTEN KDPG-ALDOLASE (EDA) AUS <i>SYNECHOCYSTIS</i> . K_M -WERT 0,095.....	93
ABBILDUNG 53: PCR ZUR ÜBERPRÜFUNG DER KOMPLEMENTIERTEN EDA-MUTANTEN. GENE RULER 1KB DNA LADDER (SPUR 1); WT (SPUR 2-3); Δ EDA (4-5); Δ EDA+pSM(LEER) (6-7); Δ EDA::PCPCEDA <i>SYNECHOCYSTIS</i> (8-9); Δ EDA::PCPCEDA <i>E. COLI</i> (10-11); GENE RULER 1KB DNA LADDER (SPUR 12); DIE ERWARTETEN GRÖßEN SIND: WT, Δ EDA: 1763 BP; Δ EDA+pSM(LEER):1010 BP; Δ EDA::PCPCEDA <i>SYNECHOCYSTIS</i> : 2376 BP; Δ EDA::PCPCEDA <i>E. COLI</i> : 2397 BP.	94
ABBILDUNG 54: WACHSTUM KOMPLEMENTIERTER EDA-MUTANTEN Δ EDA::P _{cp} EDA <i>SYNECHOCYSTIS</i> UND Δ EDA::P _{cp} EDA <i>E. COLI</i> , DEM WILD-TYP, Δ EDA UND Δ EDA+pSM(LEER) UNTER MIXOTROPHEN BEDINGUNGEN. A) BILDER DER KULTUREN AM 2., 5., UND 7. MESSTAG. B) WACHSTUMSKURVE DER GEMESSENEN MUTANTEN.....	95
ABBILDUNG 55: EXPRESSION VON EDA AUS <i>H. VULGARE</i> IM PET22-B+VEKTOR. PAGERULER™ PRESTAINED PROTEIN LADDER (SPUR 1); BAR1-ÜBERSTAND (SPUR 2); BAR1-PELLET (SPUR 3); BAR2-ÜBERSTAND (SPUR 4); BAR2-PELLET (SPUR 5); BAR3-ÜBERSTAND (SPUR 6); BAR3-PELLET (SPUR 7); BAR4-ÜBERSTAND (SPUR 8); BAR4-PELLET (SPUR 9); BAR1-ÜBERSTAND (SPUR 10); BAR1-PELLET (SPUR11); BAR2-ÜBERSTAND (SPUR 12); BAR2-PELLET (SPUR13); BAR3-ÜBERSTAND (SPUR 14); BAR3-PELLET (SPUR 15); BAR4-ÜBERSTAND (SPUR 16); BAR4-PELLET (SPUR 17).	96
ABBILDUNG 56: AUFREINIGUNG VON EDA AUS <i>H. VULGARE</i> NACH EXPRESSION IM PET22B+VEKTOR. PIERCE™ PRESTAINED PROTEIN MW MARKER (SPUR 1); PELLET (SPUR 2) DURCHLAUF (SPUR 3) WASCHFRAKTION 1 (SPUR 4); WASCHFRAKTION 4 (SPUR 5); ELUTIONSFRAKTIONEN 1-8 (SPUR 6-13).....	97
ABBILDUNG 57: AUFREINIGUNG VON EDA AUS <i>H. VULGARE</i> NACH EXPRESSION IM pMAL. ÜBERSTAND (SPUR 1); PELLET (SPUR 2); ELUTION 1 (SPUR 3); ELUTION 2 (SPUR 4); ELUTION 3 (SPUR 5); ELUTION 4 (SPUR 6); ELUTION 5 (SPUR 7); ELUTION 6 (SPUR 8); PAGERULER™ PRESTAINED PROTEIN LADDER (SPUR 9).....	97
ABBILDUNG 58: SDS-GEL ZUR ÜBERPRÜFUNG DES XA-VERDAUS DES FUSIONSPROTEINS AUS EDA UND DEM MBP; VERDAUTES EDA/MALE PROTEIN (SPUR 1) ELUTIONSFRAKTIONEN 1-10 (SPUR 2-11). PAGERULER™ PRESTAINED PROTEIN LADDER (SPUR 12); DURCHLAUF (SPUR 13); WASCHFRAKTION 1 (SPUR 14); WASCHFRAKTION 2 (SPUR 15); ELUTIONSFRAKTIONEN 1-6 (SPUR 16-21).	98
ABBILDUNG 59: AKTIVITÄTSMESSUNG DER KDPG-ALDOLASE (EDA) AUS <i>HORDEUM VULGARE</i> . K_M -WERT MIT 0,35.	99
ABBILDUNG 60: ABGELEITETE KRISTALLSTRUKTUR VON EDA AUS <i>E. COLI</i> , <i>SYNECHOCYSTIS</i> UND <i>H. VULGARE</i>	99
ABBILDUNG 61: RELATIVE TRANSKRIPTION VON EDA IN BG11+G/BG11 NACH 12, 24, 36, 48 UND 72 H NACH ZUGABE VON GLUKOSE IM BEZUG AUF DIE TRANSKRIPTION VON 16s.....	101
ABBILDUNG 62: FERMENTATIVE WASSERSTOFFPRODUKTION DES <i>SYNECHOCYSTIS</i> WT UND VERSCHIEDENEN EINZELMUTANTEN DER GLUKOSEABBAUWEGE.	102
ABBILDUNG 63: GESONDERTE MESSUNG DER FERMENTATIVEN WASSERSTOFFPRODUKTION IM WT VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> UND IN DER EDA-MUTANTE.	102
ABBILDUNG 64: WACHSTUM VON <i>SYNECHOCYSTIS</i> WT UND VERSCHIEDENEN EINZELMUTANTEN DER GLUKOSEABBAUWEGE IN BG11 ₀ MIT GLUKOSE UND ARGININ (5 MM) IM TAG/NACHT-ZYKLUS.	103
ABBILDUNG 65: MODELL DER GLUKOSEABBAUWEGE IN <i>SYNECHOCYSTIS</i> . DER EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS-WEG (EMP) IN ROT, OXIDATIVE-PENSTOSEPHOSPHAT-WEG (OPP) IN BLAU UND DER ENTNER DOUDOROFF-WEG (ED) IN GRÜN.....	115
ABBILDUNG 66: TAGETP ERGEBNIS DER EDA SEQUENZ AUS <i>H. VULGARE</i>	133

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: RENDITE DES EMP-, ED- UND OPP-WEGS AN NADH, NADPH UND ATP PRO OXIDIERTEM GLUKOSEMOLEKÜL.	15
TABELLE 2: VERWENDETE <i>SYNECHOCYSTIS</i> MUTANTEN. (S.B: SOUTHERN BLOT)	21

TABELLE 3: KULTURMEDIE FÜR <i>SYNECHOCYSTIS</i> .	24
TABELLE 4: ANTIBIOTIKA KONZENTRATION.	24
TABELLE 5: VERWENDETE <i>E. COLI</i> STÄMME.	25
TABELLE 6: KULTURMEDIE FÜR <i>E. COLI</i> .	25
TABELLE 7: MESSPROTOKOLL FÜR DIE MESSUNG IM DUAL-PAM.	28
TABELLE 8: PCR PROTOKOLL.	30
TABELLE 9: PCR ZUSAMMENSETZUNG.	30
TABELLE 10: VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER).	31
TABELLE 11: AGAROSE-GELELEKTROPHORESE PUFFER.	33
TABELLE 12: VERWENDETE VEKTOREN.	34
TABELLE 13: VERWENDETE SOUTHERNBLOT REAGENZIE.	38
TABELLE 14: VERWENDETE PUFFER FÜR DIE RNA EXTRAKTION.	41
TABELLE 15: <i>E. COLI</i> KOCK-OUT MUTANTEN.	44
TABELLE 16: KONZENTRATIONEN FÜR „COLONY-CHECK-PCR“.	45
TABELLE 17: KAPAHI TM -PCR PROTOKOLL.	45
TABELLE 18: VERWENDETE LÖSUNGEN ZUR PROTEINAUFREINIGUNG.	52
TABELLE 19: VERWENDETE LÖSUNGEN FÜR SDS-PAGE.	54
TABELLE 20: ZUSAMMENSETZUNG DER SDS-GELE.	54
TABELLE 21: VERWENDETE LÖSUNGEN BEI DER COOMASSIE FÄRBUNG.	55
TABELLE 22: VERWENDETE LÖSUNGEN BEI DER SILBERFÄRBUNG.	56
TABELLE 23: VERWENDETE LÖSUNGEN FÜR DEN WESTERNBLOT.	56
TABELLE 24: VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE FÜR FERREDOXINÜBEREXPRESSIONSKONSTRUKTE.	66
TABELLE 25: VORHERSAGEN ZUR LOKALISATION VON EDA IN <i>HORDEUM VULGARE</i> .	100
TABELLE 26: WASSERSTOFFKONZENTRATIONEN (MMOL/LITER) BEI EINEM UMGEBUNGSWASSERSTOFFPARTIALDRUCK VON 1 ATM IN WASSER ALS FUNKTION DER TEMPERATUR. QUELLE: HYDROGEN SENSOR USER MANUAL COPYRIGHT © 2014· UNISENSE A/S VERSION JANUARY 2014 /(WIESENBURG & GUINASSO 1979).	131
TABELLE 27:GLEICHGEWICHTSKONZENTRATION VON SAUERSTOFF (MMOL O ₂ /LITER) BEI EINEM UMGEBUNGSPARTIALDRUCK VON 0,21 ATM IN WASSER ALS FUNKTION DER TEMPERATUR UND SALZGEHALT. QUELLE OXYGEN SENSOR USER MANUAL COPYRIGHT © 2014 · UNISENSE A/S VERSION JANUARY 2014 / (MILLERO & POISSON 1981; GARCIA & GORDON 1992).	132