

Physiologische Veränderungen bei der
Thylakoidmembranbiogenese und die Funktionsweise
des Nukleotidaustauschfaktors GrpE
in Cyanobakterien



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von Sandra Barthel

geb. am 24.10.1982 in Ludwigshafen am Rhein

Mainz, 29. Juli 2011

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 05.10.2011

Diese Arbeit wurde erstellt am
Institut für Pharmazie und Biochemie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Cyanobakterien.....	1
1.1.1 Die Thylakoidmembran.....	2
1.1.2 Der Photosyntheseapparat.....	3
1.1.2.1 Das Photosystem II.....	4
1.1.2.2 Der Cytochrom <i>b₆f</i> Komplex.....	6
1.1.2.3 Das Photosystem I.....	7
1.1.2.4 Die Phycobilisomen.....	8
1.1.3 Die Thylakoidmembranbiogenese.....	9
1.2 Das Cyanobakterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	9
1.3 Proteinsortierung.....	10
1.3.1 Typ I-Signalpeptidasen.....	12
1.3.1.1 Die Struktur der Signalpeptidasen.....	13
1.4 DnaK-DnaJ-GrpE-System.....	15
1.4.1 Die Struktur des Nukleotidaustauschfaktors GrpE.....	18
1.4.2 Die Dimerisierung des GrpE-Proteins.....	19
1.4.3 GrpE und seine Eigenschaft als Thermosensor.....	19
1.5 Zielsetzung.....	21
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Geräte und Zubehör.....	23
2.1.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	25
2.1.3 Chemikalien, Lösungen und Enzyme.....	25
2.1.4 Längen- und Größenstandards.....	25
2.1.5 Verwendete Stämme.....	26
2.1.6 Kulturmedien für <i>E. coli</i>	26

2.1.7	Kulturmedien für <i>Synechocystis</i>	27
2.1.8	Verwendete Plasmide	27
2.1.9	Verwendete Oligonukleotide.....	28
2.1.10	Antikörper	30
2.1.11	Computerprogramme	30
2.2	Methoden	31
2.2.1	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	31
2.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	31
2.2.1.2	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Synechocystis</i> sp.	31
2.2.1.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	31
2.2.1.4	DNA-Amplifikation durch die Polymerasenkettenreaktion (PCR)	32
2.2.1.5	Segregations-PCR	32
2.2.1.6	Klonierung in einen TA-Vektor	33
2.2.1.7	Restriktion von DNA	33
2.2.1.8	Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	33
2.2.1.9	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	33
2.2.1.10	Ligation von DNA.....	34
2.2.1.11	Ortsspezifische Mutagenese	34
2.2.1.12	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	34
2.2.1.13	Transformation in <i>Synechocystis</i> sp.	34
2.2.1.14	Sequenzierung von DNA	35
2.2.2	Biochemische Arbeitsmethoden.....	35
2.2.2.1	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	35
2.2.2.2	Trennung der Zellkomponenten	35
2.2.2.3	Solubilisierung von Membranproteinen.....	35
2.2.2.4	Dialyse von Proteinlösungen.....	36
2.2.2.5	Reinigung von Proteinen über Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie.....	36
2.2.2.6	Reinigung von Proteinen über an Sepharose gebundene Metallionen.....	36
2.2.2.7	Reinigung von Proteinen über Anionenaustauschchromatographie	36

2.2.2.8	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	36
2.2.2.9	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	37
2.2.2.10	Coomassie Färbung von Proteinen in SDS-Gelen	37
2.2.2.11	Western-Blot	38
2.2.2.12	Immunodetektion von Proteinen	38
2.2.2.13	Quervernetzung von Proteinen (<i>Crosslinking</i>).....	38
2.2.2.14	Das GALLEX-System zur Analyse der Dimerisierungstendenz	39
2.2.2.15	Circulardichroismus-Spektroskopie	39
2.2.2.16	<i>In vivo</i> Komplementationsstudien	40
2.2.2.17	PAM (Pulse Amplitude Measurements)-Messungen.....	41
2.2.2.18	Bestimmung der Sauerstoffentwicklung	41
2.2.2.19	Chlorophyllbestimmung	42
2.2.2.20	Bestimmung der Zellzahl	42
2.2.2.21	77 K-Fluoreszenzspektren	42
2.2.2.22	Absorptionsspektren	43
2.2.2.23	Fluoreszenzmikroskopie.....	43
2.2.2.24	Blau-Native-Gelelektrophorese.....	43
2.2.2.25	Saccharosedichte-zentrifugation.....	44
2.2.2.26	Spaltungsexperiment	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Untersuchungen zur Thylakoidmembranbiogenese	47
3.1.1	Untersuchung der Pigmentzusammensetzung.....	49
3.1.2	Untersuchung der photosynthetischen Aktivität	52
3.1.3	Untersuchung zur oligomeren Struktur der Photosysteme.....	59
3.2	Charakterisierung zweier Signalpeptidasen aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	61
3.2.1	Identifizierung der Signalpeptidasen in <i>Synechocystis</i> sp.....	61
3.2.2	Reinigung der Signalpeptidasen	63
3.2.3	Untersuchung der Substratspezifität.....	65
3.2.4	Untersuchungen zur Lokalisation der Signalpeptidasen	67

3.3	Charakterisierung zweier homologer GrpE-Proteine.....	72
3.3.1	Identifizierung der homologen Proteine.....	72
3.3.2	Heterologe Expression einzelner Domänen	75
3.3.3	Untersuchungen zur Dimerisierungstendenz	76
3.3.4	CD-Spektroskopische Ermittlung der Schmelztemperatur	79
4	Diskussion	85
4.1	Untersuchungen zur Thylakoidmembranbiogenese.....	85
4.1.1	Während der Thylakoidmembranbiogenese kommt es zu phänotypischen Veränderungen	85
4.1.2	Die Pigmentzusammensetzung zeigt bedeutende Veränderungen.....	86
4.1.3	Photosystem II liegt als inaktives Monomer vor.....	89
4.1.4	Modell zur Thylakoidmembranbiogenese.....	92
4.2	Signalpeptidasen	93
4.2.1	LepB2 ist eine funktionelle Signalpeptidase in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 ...	93
4.2.2	LepB1 wird nach heterologer Expression in <i>E. coli</i> abgebaut	94
4.2.3	Das LepB2 prozessiert Prä-Proteine	95
4.2.4	LepB1 und LepB2 zeigen eine voneinander abweichende intrazelluläre Lokalisation.....	97
4.3	Untersuchung zweier cyanobakterieller GrpE-Proteine.....	99
4.3.1	Verschiedene Domänen sind für die Dimerisierung essentiell	100
4.3.2	Funktionsverlust von GrpE durch einen direkten Übergang vom Dimer zum Monomer	101
4.3.3	Die Monomerisierung von GrpE ist reversibel	103
4.3.4	<i>Synechocystis</i> sp. und <i>Thermosynechococcus</i> verwenden zur Dimerisierung voneinander abweichende Mechanismen.....	104
5	Zusammenfassung.....	107
6	Literaturverzeichnis.....	109

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
Ala	Alanin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
Asn	Aspartat
Asp	Asparagin
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
β -DM	Dodecyl- β -D-maltosid
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
bp	Basenpaar(e)
Cm	Chloramphenicol
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTP	Cytosintriphosphat
Cys	Cystein
Da	Dalton
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5`-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Einstein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	“ <i>et alteri</i> ” und andere
ETR	Elektronentransportrate
g	Gramm

Gly	Glycin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalctosid
K	Kelvin
k	Kilo-
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria-Bertani
Lys	Lysin
μ	mikro (10 ⁻⁶)
m	Milli-
MBP	Maltosebindeprotein
Met	Methionin
min	Minute
n	nano-
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NaHCO ₃ ⁻	Natriumhydrogencarbonat
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
PCC	Pasteur Culture Collection
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PPBQ	Phenyl-p-benzoquinone
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin

sp.	Spezies
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
U	Unit
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolette Strahlung
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
VIS	sichtbare Strahlung
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Cyanobakterien

Bei der Entstehung der heutigen Biosphäre und damit beim Übergang von einer anoxygenen hin zu einer oxygenen Atmosphäre spielten Cyanobakterien, durch die Fähigkeit elementaren Sauerstoff (O_2) zu produzieren, eine entscheidende Rolle. Da Cyanobakterien die größte Gruppe an oxygenen photosynthetisch aktiven Prokaryoten darstellen (Hedges *et al.* 2001), sind sie für das Überleben Sauerstoff-verbrauchender Organismen, darunter auch der Mensch essentiell. Der Photosyntheseapparat der Cyanobakterien, welche einen typischen Zellaufbau mit einer Cytoplasmamembran, einer Peptidoglykanschicht und einer äußeren Membran besitzen (Abb. 1), ist in und an einem internen Membransystem, den Thylakoidmembranen lokalisiert (Stanier *et al.* 1977). Unter allen Cyanobakterien stellt hierbei nur *Gloeobacter violaceus* (Nelissen *et al.* 1995) eine Ausnahme dar, da hier die Photosynthese auf Grund des Fehlens der Thylakoidmembran innerhalb der Plasmamembran stattfindet (Rippka 1974). Das Thylakoidmembransystem (Abb. 1) der meisten bisher bekannten Cyanobakterien besteht aus drei bis acht jeweils gepaarten Lipiddoppelschichten, mit einem geschlossenen Ende (Herrero *et al.* 2008).

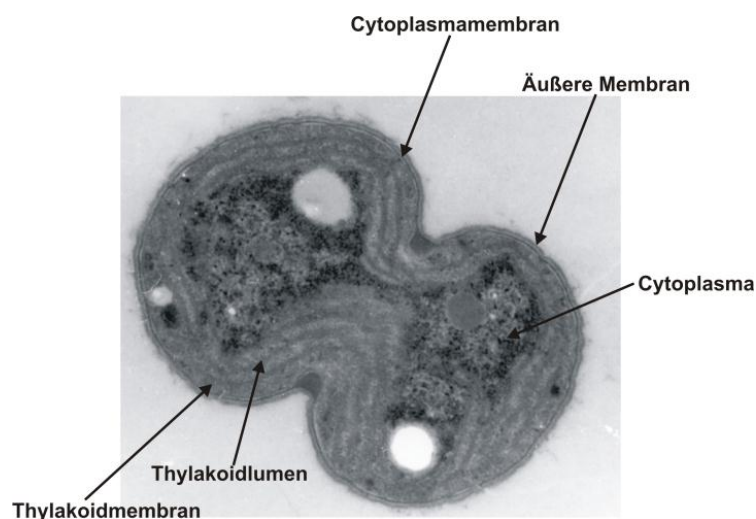


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Zelle des Cyanobakteriums *Synechocystis sp. PCC 6803*

Dargestellt ist der strukturelle Aufbau einer cyanobakteriellen Zelle am Beispiel des Bakteriums *Synechocystis sp. PCC 6803*. Die Zelle ist von der äußeren Membran und der Cytoplasmamembran umschlossen. Im Inneren befinden sich das Cytoplasma und das Thylakoidmembransystem.

Die gepaarten Membranen umgeben ein einziges geschlossenes Kompartiment, das Thylakoidlumen. Sowohl bei der Photosynthese als auch bei der Atmungskette, welche ebenfalls in den Thylakoiden stattfindet (Peschek *et al.* 2004), wird ein Protonengradient über die Membran aufgebaut (Pakrasi 1995). Der pH-Wert im Lumen liegt dabei unter dem im Cytoplasma wodurch eine in der Membran lokalisierte ATPase angetrieben und ATP gewonnen werden kann.

1.1.1 Die Thylakoidmembran

Die Thylakoidmembran unterscheidet sich in ihrem Protein zu Lipid Verhältnis entscheidend von der Cytoplasmamembran (Norling *et al.* 1998). Obwohl die Lipide der Thylakoidmembran etwa 90 % des Gesamtlipidgehaltes einer Zelle (Murata *et al.* 1981) ausmachen, liegt im Vergleich zur Cytoplasmamembran, in der Thylakoidmembran ein weitaus höheres Verhältnis an Protein zu Lipid vor (Szalontai *et al.* 2000).

Der Aufbau des cyanobakteriellen Thylakoidmembransystems zeigt im Gegensatz zu höheren Pflanzen weder Stroma- noch Granastrukturen, weshalb bei den bisher untersuchten Cyanobakterien eine strukturbedingte örtliche Trennung der Komponenten der Photosynthese nicht gegeben ist. Das Bakterium *Synechococcus* 7942 stellt eine Ausnahme dar, da hier die Proteinkomplexe eine Trennung zeigen. Das PS II und der Cytochrom *b₆f* Komplex sind über die Thylakoidmembran verteilt und das PS I genauso wie die ATPase liegen in den äußeren Schichten konzentriert vor (Sherman *et al.* 1994). In den anderen untersuchten Cyanobakterien konnte ebenfalls ein geordnetes System gefunden werden, welches einen maximalen Energiegewinn gewährleistet, indem es Fehler bei der Energieübertragung zwischen den Photosystemen minimiert (Abb. 2). Hierbei ist das immobile Photosystem II-Dimer (PS II) in parallelen Reihen angeordnet (Olive *et al.* 1997) und zwischen diesen Reihen befindet sich das sehr große Photosystem I-Trimer (PS I) (Westermann *et al.* 1999).

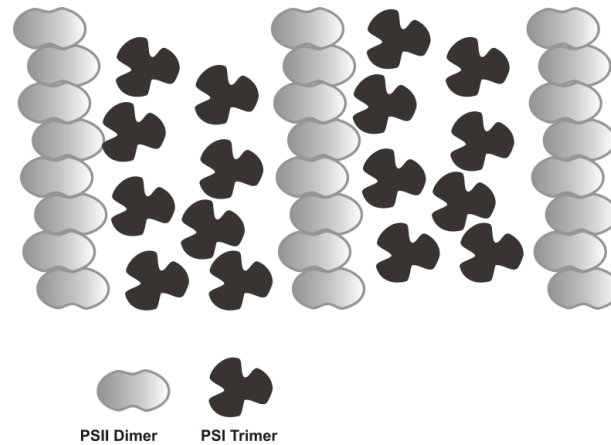


Abbildung 2: Schematische Darstellung der strukturellen Anordnung der Photosysteme innerhalb der Thylakoide

Die PS II-Dimere lagern sich in lange geordnete Strukturen zusammen, und das PS I-Trimer zeigt eine ungeordnete Lokalisation zwischen den PS II-Ketten (verändert nach Herrero und Flores 2008).

Die Proteinkomplexe und Photosysteme, die in der Thylakoidmembran lokalisiert sind, zeigen eine asymmetrische Anordnung, wobei die Donorseite der Photosysteme zum Lumen und die Akzeptorseite zum Cytoplasma hin gerichtet ist. Die Lichtsammelkomplexe der Cyanobakterien, die Phycobilisomen, ebenso wie der F_0 Teil der ATPase, sind ebenfalls dem Cytoplasma zugewandt.

1.1.2 Der Photosyntheseapparat

Wie bereits erwähnt, weist die Thylakoidmembran ein hohes Protein zu Lipidverhältnis auf, was durch die große Anzahl an Photosynthesekomplexen in den Thylakoiden zu erklären ist. Der Photosyntheseapparat besteht aus den großen Proteinkomplexen PS I und PS II und deren Verbindungsstelle, dem Cytochrom b_6f Komplex. Diese Proteinkomplexe werden in einer bestimmten Abfolge, dem so genannten Z-Schema, von Elektronen die aus dem Wasser stammen durchlaufen (Abb. 3). Hierbei kommt es an den Reaktionszentren der beiden Photosysteme zur Ladungstrennung.

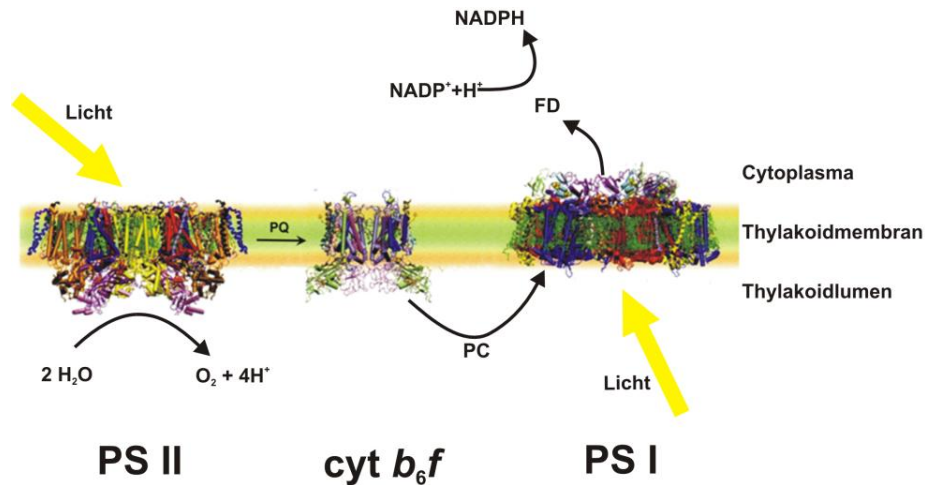


Abbildung 3: Membranproteinkomplexe der photosynthetischen Elektronentransportkette

Bei der oxygenen Photosynthese werden mit Hilfe des Lichtes als Energiequelle, Elektronen aus der Oxidation des Wassers über die Proteinkomplexe Photosystem II (PS II), den Cytochrom b_6f Komplex ($cyt\ b_6f$) und das Photosystem I (PS I) auf den mobilen Elektronentransporter Ferredoxin (FD) und in einem letzten Schritt auf $NADP^+$ übertragen. Weitere Elektronenüberträger sind das Plastochinon (PQ) und das Plastocyanin (PC).

Die Struktur der Komponenten konnte für das PS II (Ferreira *et al.* 2004) und PS I (Fromme *et al.* 2001) aus *Thermosynechococcus elongatus* und für den Cytochrom b_6f Komplex aus *Mastigocladis laminosus* (Kurusu *et al.* 2003) ermittelt werden. Verändert nach (DeRuyter *et al.* 2008).

1.1.2.1 Das Photosystem II

Die Kristallstruktur des PS II wurde bis heute von Zouni und Mitarbeitern (Zouni *et al.* 2001) geklärt. So wurde gezeigt, dass jedes Monomer aus mehreren Untereinheiten aufgebaut ist, welche nach den kodierenden Genen PsbA bis PsbO sowie PsbU, PsbV und PsbX benannt wurden (Abb. 4) (Herrero *et al.* 2008). Für die zwei größten Untereinheiten PsbA und PsbD wird das Synonym D1 und D2, und für die großen Antennenproteine PsbB und PsbC, die Synonyme CP43 und CP47 verwendet (Herrero *et al.* 2008). Neben den Proteinen CP43 und CP47 liegen noch viele weitere Antennenproteine an das PS II gekoppelt vor und gewährleisten eine bestmögliche Quantenausbeute. Im Zentrum eines jeden PS II-Monomers befindet sich dabei die komplette und funktional aktive Elektronentransportkette (Deisenhofer *et al.* 1984).

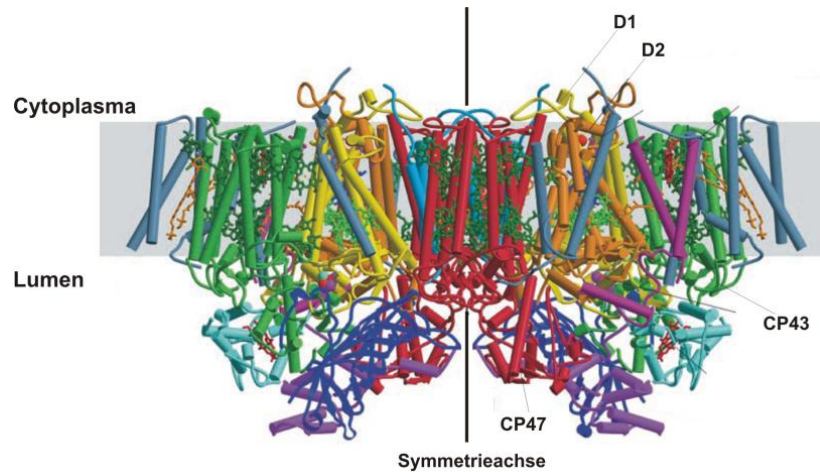


Abbildung 4: Struktur des dimeren Photosystems II

Die kristallografische Struktur des dimeren PS II aus dem Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus*. Die zwei großen Untereinheiten D1 (gelb) und D2 (orange) sind von den großen Antennenproteinen CP43 (grün) und CP47 (rot) sowie von weiteren Untereinheiten umgeben (Ferreira *et al.* 2004).

Bei der Oxidation des Wassers (Abb. 3), kommt es neben der Entwicklung von Sauerstoff zusätzlich zur Freisetzung von vier Protonen aus dem Wasser. Diese Wasserspaltung läuft im sogenannten Wasserspaltenden Komplex (OEC, *oxygen evolution center*) ab, wobei vier Manganatome und ein Calciumatom entscheidend an dem Prozess beteiligt sind (Abb. 5).

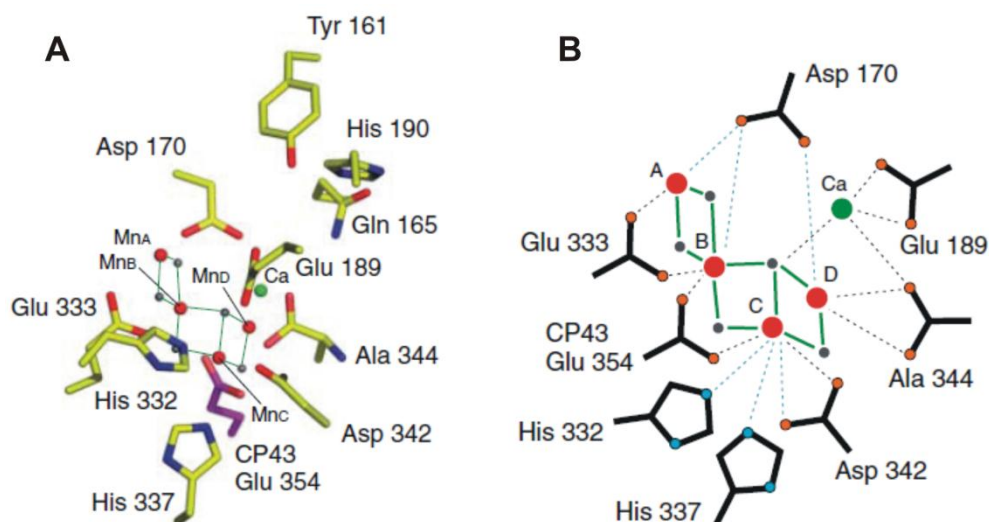


Abbildung 5: Struktur des Mn_4Ca -Clusters innerhalb des Wasserspaltenden Komplexes (OEC)

Dargestellt ist der OEC des PS II aus *Thermosynechococcus elongatus* mit der Position der Ca^{2+} -Atome (grün), der Manganionen (rot) und der O_2 -Atome (grau). **A)** Modell des Mn_4Ca -Clusters anhand der EXAFS (*extended X-ray absorption fine structure*). **B)** Schematische Darstellung des Mn_4Ca -Clusters. Oxo-Verbindungen (grüne Linie) und Bindungen zu Aminosäuren und zu Ca^{2+} -Atomen (gepunktete Linie) sind dargestellt (Yano *et al.* 2006).

Der primäre Elektronenakzeptor innerhalb des PS II, das P680, wird durch die von den Antennenpigmenten übertragene Energie in einen angeregten Zustand überführt (P680*), wodurch es zu einer Ladungstrennung über der Membran kommt. Zur Re-Reduktion entzieht das angeregte P680* dem OEC ein Elektron. Dieser Zyklus muss vier Mal durchlaufen und dabei vier Protonen angesammelt werden, bevor Sauerstoff aus dem OEC freigelassen wird. Die Manganatome nehmen hierbei fünf verschiedene Oxidationsstufen ein, die als S_i ($i=1-4$) bezeichnet werden (Yano *et al.* 2006; Herrero *et al.* 2008). Die Elektronenübertragung innerhalb des PS II läuft weiter bis zu einem gebundenen Plastochinon, Q_A , und dem terminalen Elektronenakzeptor innerhalb des PS II, dem mobilen Plastochinon Q_B . Nach zwei Durchläufen und der Bindung von zwei Protonen an das Q_B verlässt das Plastohydrochinol (PQH_2) den PS II-Komplex und gelangt zur Verbindung zwischen PS II und PS I, dem Cytochrom b_6f Komplex. Die frei gewordene Stelle des Q_B wird durch ein Plastochinon aus dem Plastochinonpool erneut besetzt.

1.1.2.2 Der Cytochrom b_6f Komplex

Die Struktur des dimeren Cytochrom b_6f Komplexes konnte ebenfalls kristallografisch geklärt werden (Kurusu *et al.* 2003; Stroebel *et al.* 2003) und wird genauso wie die beiden Photosysteme als Multiproteinkomplex beschrieben. Die großen Untereinheiten sind dabei das Cytochrom f , das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein, Cytochrom b_6 und die Untereinheit IV (Kallas 1994). Das mobile Plastohydrochinol PQH_2 gibt seine beiden Elektronen (Cramer *et al.* 2006; Baniulis *et al.* 2008) auf unterschiedlichen Wegen an den Cytochrom b_6f Komplex ab. Das erste Elektron durchläuft die Elektronentransportkette bestehend aus dem Eisen-Schwefel-Protein und dem Cytochrom f , wobei zwei Protonen ins Lumen abgegeben werden. Das zweite Elektron wird durch zwei Häm-Proteine des b-Typs auf die cytoplasmatische Seite transportiert. Dieser als Q-Zyklus bezeichnete Weg führt zum Aufbau eines Protonengradienten über die Membran (Baniulis *et al.* 2008). Von dem Cytochrom b_6f Komplex werden die Elektronen über das Plastocyanin (PC) oder das Cytochrom c_6 auf das PS I übertragen. Dabei wandert der Elektronenüberträger im Thylakoidlumen bis hin zum PS I und gibt sein Elektron dort an das P700 ab (Kurusu *et al.* 2003).

1.1.2.3 Das Photosystem I

Die Kristallstruktur des PS I (Abb. 6) konnte im Laufe der Jahre ermittelt werden (Ford *et al.* 1987; Krauss *et al.* 1996; Jordan *et al.* 2001). Die innerhalb des PS I-Trimers beteiligten Proteine zeigen in verschiedenen Organismen eine hohe Homologie (Ben-Shem *et al.* 2003), was auf einen gemeinsamen Ursprung schließen lässt. Laut Endosymbiontentheorie haben die Cyanobakterien und die Chloroplasten höherer Pflanzen einen gemeinsamen Vorfahr (Gray 1989).

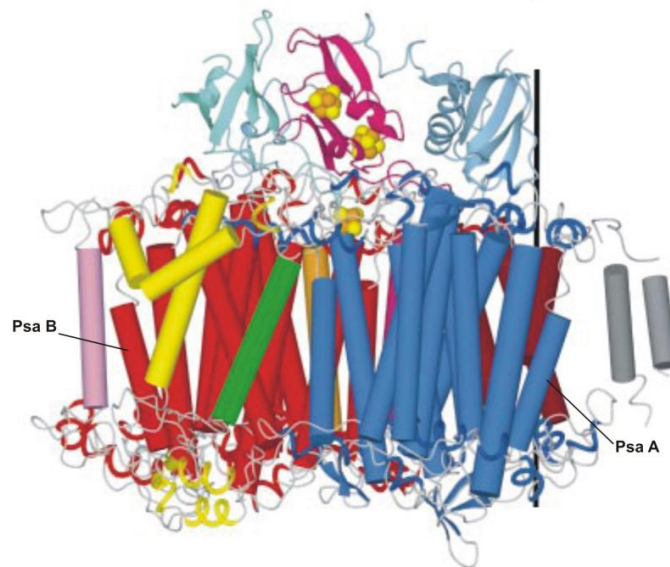


Abbildung 6: Struktur eines Monomers des Photosystem I aus *Thermosynechococcus elongatus*

Seitliche Ansicht eines PS I-Monomers mit den Untereinheiten PsaA (blau), PsaB (rot) und den weiteren Proteinuntereinheiten (Jordan *et al.* 2001).

Die zwei größten Untereinheiten, die Proteine PsaA und PsaB (Abb. 6) dienen als Bindungsstelle für das Plastocyanin. Neben diesen großen Untereinheiten sind ebenso wie beim PS II viele weitere Proteinuntereinheiten an der Funktion des PS I beteiligt. Ein entscheidender Unterschied bei der Elektronentransportkette des PS I zu der des PS II, ist das Vorkommen von drei Vier-Eisen-Vier-Schwefel-Proteinen (F_x , F_A , F_B) im PS I. Die Elektronen gelangen von dem angeregten $P700^*$ -Reaktionszentrum über weitere Chlorophyllmoleküle und Phyllochinone auf eben diese Vier-Eisen-Vier-Schwefel-Proteine. Der terminale Elektronenakzeptor innerhalb des PS I, das dritte Vier-Eisen-Vier-Schwefel-Protein F_B , überträgt die Elektronen auf das Ferredoxin (Fromme *et al.* 2001), ein nach

heutigem Wissensstand lösliches Protein, welches sich von der Membran entfernen kann. Bei Eisenmangel kann Ferredoxin durch Flavodoxin ersetzt werden, um den Elektronentransport aufrecht zu erhalten (Burkhart *et al.* 1995).

1.1.2.4 Die Phycobilisomen

Die gesamte Photosynthese kann nur zur Energiegewinnung genutzt werden, wenn ausreichend Licht zur Verfügung steht. Die innerhalb der Photosysteme lokalisierten Chlorophyllmoleküle können dabei nicht das komplette Lichtspektrum ausnutzen, da die Absorptionsmaxima des Chlorophyll a bei 430 – 440 nm sowie bei 670 nm liegen. Der daraus resultierende Bereich des Lichtes, welcher nicht durch die Chlorophylle genutzt werden kann, wird als Grünücke beschrieben.

Bei höheren Pflanzen überbrücken, im Gegensatz zu den Cyanobakterien, die Lichtsammelkomplexe (LHCs *light harvesting complex*) die Grünücke. Bei den Cyanobakterien wird das Fehlen der LHCs durch sogenannte Phycobilisomen ausgeglichen, deren Funktion heute gut verstanden ist. Phycobilisomen zeigen einen konservierten strukturellen Aufbau mit den Phycobiliproteinen als Bausteine. Die Energieübertragung durch die Phycobiliproteine zeigt eine konservierte Abfolge von Phycoerythrin auf Phycocyanin, auf Allophycocyanin und endend bei den Chlorophyllen der Photosysteme (Grossman *et al.* 1993; Grossman 2003).

Phycobilisomen sind Antennenproteine, die sowohl an das PS II als auch an das PS I gebunden vorliegen können. Da es sich bei den meisten Phycobilisomen um lösliche Proteine handelt, besitzen diese die Fähigkeit sich zwischen den Photosystemen zu bewegen, die sogenannte *state transition* (Sarcina *et al.* 2001; Joshua *et al.* 2004). Durch die *state transition* wird der Elektronentransport zwischen den Photosystemen kontrolliert, indem nicht zu jedem Zeitpunkt, die gleiche Menge an Phycobilisomen an die Photosysteme assoziiert vorliegen (Joshua *et al.* 2004). Die *state transition* spielt vor allem bei geringer Lichteinstrahlung eine entscheidende Rolle, indem durch die an die Photosysteme assoziierten Phycobilisomen bereits eine geringe Belichtung ausreicht um die Photosynthese aufrecht zu erhalten (Mullineaux *et al.* 2005).

1.1.3 Die Thylakoidmembranbiogenese

Der Prozess der Thylakoidmembranbiogenese ist bis heute nicht verstanden und wird kontrovers diskutiert. So konnte bisher nicht gezeigt werden, ob eine Verbindung zwischen der Cytoplasmamembran und der Thylakoidmembran besteht (Liberton *et al.* 2006; van de Meene *et al.* 2006; Schneider *et al.* 2007). Untersuchungen zum Proteintransport führten ebenso zu keiner Klärung betreffend die Frage, ob eine Verknüpfung zwischen den beiden Membranen existiert. Die Photosysteme konnten neben der Thylakoidmembran auch in der Cytoplasmamembran detektiert werden (Zak *et al.* 2001), doch weisen Untersuchungen mit einem grünfluoreszierenden Protein (GFP), welches an eine Tat-Signalsequenz fusioniert wurde, nicht darauf hin, dass eine Verbindung zwischen dem Periplasma und dem Lumen der Thylakoide besteht (Spence *et al.* 2003). In *Arabidopsis thaliana* (Kroll *et al.* 2001) konnte genauso wie in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Westphal *et al.* 2001; Fuhrmann *et al.* 2009) ein Protein ausgemacht werden, welches an der Thylakoidmembranbiogenese beteiligt ist. Die Depletion dieses Proteins, Vipp1 (*vesicle inducing protein in plastids 1*), führt zu einer Veränderung der Struktur der Thylakoidmembran und der Photosystemstöchiometrie. Doch auch hier ist noch keine eindeutige Klärung über die Verbindung zur Thylakoidmembranbiogenese gelungen.

Ein Modellorganismus für weitere Untersuchungen bezüglich der Thylakoidmembranbiogenese ist das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Dieses Cyanobakterium bietet einen entscheidenden Vorteil, da es die Fähigkeit besitzt, heterotroph, und somit ohne die Beteiligung des Photosyntheseapparates zu wachsen.

1.2 Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, dessen Genom bereits 1996 als das Erste eines photosynthetischen Organismus sequenziert wurde (Kaneko *et al.* 1996), ist ein einzelliges Cyanobakterium, welches hauptsächlich im Wasser vorkommt. Der Original *Berkley-Stamm* wurde aus dem Meerwasser vor Kalifornien isoliert (Stanier *et al.* 1977), und bis heute sind mindestens vier Unterstämme beschrieben. Aufgrund des Charakteristikums der natürlichen Kompetenz (Grigorieva *et al.* 1982) wird das Bakterium häufig für genetische und biochemische Analysen betreffend der Form und Funktion der Photosysteme verwendet (Pakrasi 1995). Ein weiterer bedeutender Aspekt ist die Fähigkeit des heterotrophen Wachstums, denn *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist auch ohne das Vorhandensein des

Photosyntheseapparates, bei gleichzeitiger Zugabe von Glukose, lebensfähig (Anderson *et al.* 1991; Smart *et al.* 1991). Neben *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist auch *Anabaena variabilis* (Ohki *et al.* 1975) in der Lage heterotroph zu wachsen. Für beide Cyanobakterien ist eine regelmäßige Belichtung mit Blaulicht essentiell (Anderson *et al.* 1991; Mannan *et al.* 1993). *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (Wolk *et al.* 1976) genauso wie *Synechocystis* sp. PCC 6714 (Vernotte *et al.* 1992) zeigen unter Zugabe von Glukose, auch bei völliger Dunkelheit, ohne eine regelmäßige Belichtung, ein Wachstum auf. Das Wachstum unter heterotrophen Bedingungen im Dunkeln, mit einer regelmäßigen Belichtung wird als *light activated heterotrophic growth* (LAHG) bezeichnet und ist eine Methode zur Charakterisierung der Thylakoidmembranbiogenese, indem die Zellen nach der Inkubation im Dunkeln mit Hilfe verschiedener Methoden charakterisiert werden.

So weisen Zellen des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 unter LAHG Bedingungen eine weitaus höhere Verdopplungszeit bis hin zu 38 h (Anderson *et al.* 1991; Smart *et al.* 1991; Zsiros *et al.* 2002) und kaum Thylakoide auf. Zusätzlich besitzen die Dunkelkulturen der Cyanobakterien *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Anabaena variabilis* ATCC 29413 ein verringertes PS I zu PS II Verhältnis (Smart *et al.* 1991; Mannan *et al.* 1993) und mehr mit dem PS II assoziierte Phycobilisomen (Anderson *et al.* 1991). Unter LAHG Bedingungen verringert sich der Chlorophyll a Gehalt in der Zelle von *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Liu *et al.* 2006). Die Veränderungen unter LAHG Bedingungen bezüglich der Phycobilisomen und des Chlorophyllgehaltes pro Zelle, verschieben das Verhältnis von Phycobilisomen zu Chlorophyll auf die Seite der Phycobilisomen (Smart *et al.* 1991).

Nachdem die Zellen des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803, welche zuvor unter heterotrophen Bedingungen im Dunkeln kultiviert wurden, wieder ins Licht überführt werden, zeigt sich ein Wiederaufbau des Thylakoidmembransystems bis hin zum Ursprungszustand unter phototrophen oder mixotrophen Bedingungen. Gleichzeitig erreicht der Chlorophyllgehalt pro Zelle wieder das Ausgangsniveau und das PS I zu PS II Verhältnis wird ebenso ausgeglichen (Wu *et al.* 1995; Zsiros *et al.* 2002).

1.3 Proteinsortierung

Proteine müssen innerhalb einer Zelle an den für ihre Funktion spezifischen Ort gelangen, wobei sowohl bei Prokaryoten als auch bei eukaryotischen Organismen verschiedene intrazelluläre Bereiche unterschieden werden. Bei Gram-negativen Bakterien können dies das

Cytoplasma, das Periplasma aber auch die Cytoplasmamembran und die äußere Membran sein, wogegen bei Gram-positiven Bakterien kein periplasmatischer Raum zu finden ist. Des Weiteren können Proteine an die Umgebung abgegeben werden. Einer der in Prokaryoten am besten beschriebenen Wege, ist der Sec-abhängige Transport von Proteinen über eine Membran (Abb. 7).

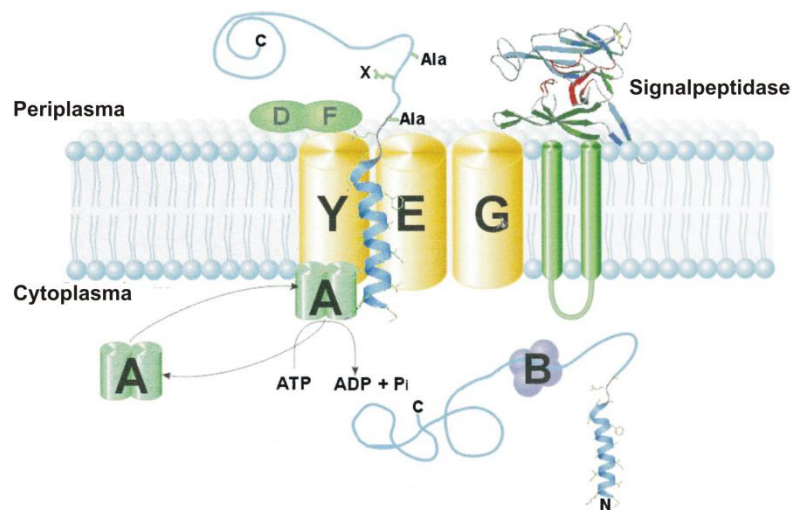


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Sec-abhängigen Proteintransportes

Ein im Cytoplasma synthetisiertes Vorläuferprotein kann alternativ durch das Protein SecB (B) zur Membran transportiert werden. Das Protein SecA (A), eine ATPase, treibt unter ATP-Hydrolyse den Transport durch den Kanal, welcher aus dem Heterotrimer SecYEG (Y, E, G) besteht, an. Während des Transportes wird das Signalpeptid durch eine Signalpeptidase von dem Prä-Protein abgespalten (Paetzel *et al.* 2000).

Bei dem Sec-abhängigen Proteintransport konnte gezeigt werden, dass das Protein nach seiner Synthese ungefalten an die Membran geleitet und hier mit Hilfe der Sec-Translokase über diese transportiert wird. Ein entscheidendes Charakteristikum des zu translozierenden Prä-Proteins, ist die Signalsequenz des Vorläuferproteins. Für die Entdeckung dieses internen Signals, welches für den Transport und damit für die Translokation des Proteins verantwortlich ist, erhielt Günter Blobel im Jahr 1999 den Medizinnobelpreis. Etwa zeitgleich zeigten Milstein und Mitarbeiter 1972 (Milstein *et al.* 1972), dass weitere Enzyme an diesem Transportprozess beteiligt sind. Die beschriebenen Peptidasen sind Signalpeptidasen, welche in jedem Organismus für die Prozessierung von Vorläuferproteinen verantwortlich sind (Dalbey *et al.* 1985). Bis heute konnten drei verschiedene Typen von Signalpeptidasen gefunden und beschrieben werden. Typ I-Signalpeptidasen spalten Nichtlipoproteine, welche über den SecYEG- oder den Tat-Transportweg über die Membran transportiert werden. Die

Typ II-Signalpeptidasen spalten über den Sec-Weg transportierte Lipoproteine und Typ VI-Signalpeptidasen spalten Prepilin und prepilin-ähnliche Proteine (Paetzel *et al.* 2002).

1.3.1 Typ I-Signalpeptidasen

Die Signalpeptidasen des Typ I spalten durch den Sec- und Tat-Weg über die Membran transportierte Vorläuferproteine an einer spezifischen Stelle innerhalb der Signalsequenz und führen zur Ablösung des reifen Proteins von der Membran. Somit sind die Signalpeptidasen bei Prokaryoten an dem Transport der Proteine ins Periplasma und in die äußere Umgebung beteiligt. Einen Spezialfall stellen hier die Cyanobakterien dar, da diese phototrophen Bakterien ein zusätzliches internes Membransystem besitzen, das Thylakoidmembransystem. Proteine werden hier neben der Cytoplasmamembran ebenfalls in und über die Thylakoidmembran transportiert. Für jeden dieser Transportwege wird eine spezifische Signalsequenz des Vorläuferproteins benötigt. Laut Definition leitet die Signalsequenz ein Protein an die Membran und initiiert den Membrantransport (Muller 1992). Eine funktionelle Signalsequenz besitzt verschiedene Charakteristika. Die Signalsequenz zeigt ein selektives Vorkommen in nicht-cytoplasmatischen Proteinen und nach einer Veränderung innerhalb der Sequenz, ist der Transport zur Membran beeinträchtigt. Außerdem kann diese Sequenz auch als Transportsignal für cytoplasmatische Proteine fungieren, wenn sie an eben solche fusioniert vorliegt (Muller 1992). Signalpeptide besitzen eine ganz bestimmte und hochkonservierte Domänenstruktur (Abb. 8), wobei die erste Domäne den positiv geladenen N-Terminus (n), die zweite Domäne den zentralen hydrophoben Bereich (h) und die dritte Domäne den C-terminalen hydrophilen Bereich (c) darstellt (von Heijne 1983).

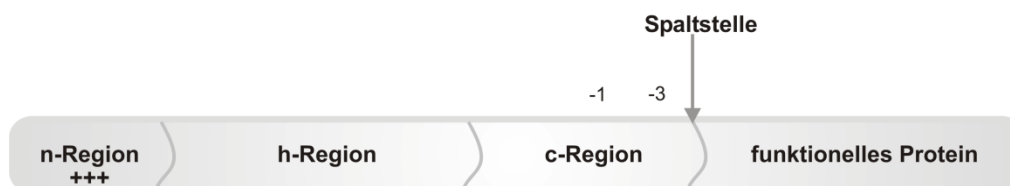


Abbildung 8: Aufbau eines typischen Signalpeptids

Ein Signalpeptid besteht aus einer positiv geladenen N-terminalen Domäne (n), einer zentralen hydrophoben Domäne (h) und einer C-terminalen hydrophilen Domäne (c), welche die für die Spaltung essentiellen Aminosäuren an Position -1 und -3 beinhaltet.

Entscheidend für die Abspaltung des Signalpeptids sind neben den beschriebenen Domänen, die Aminosäuren an den Stellen -1 und -3 vor der Spaltstelle (von Heijne 1986; Paetzel *et al.* 2002). Das Signalpeptid weist entscheidende Funktionen auf, wobei es zum Einen durch spezielle Rezeptoren erkannt und gebunden werden kann (Hartl *et al.* 1990; Dalbey *et al.* 2000a; Dalbey *et al.* 2000b) und zum Anderen zur korrekten Lokalisation des Vorläuferproteins an und in der Membran führt. Zusätzlich verhindert es die Faltung des Proteins während der Synthese (Park *et al.* 1988; Laminet *et al.* 1989; Liu *et al.* 1989). Die hochkonservierten Signalpeptide weisen allerdings in Bezug auf ihre Länge Unterschiede auf. Die Signalsequenz, und hier vor allem die hydrophobe h-Domäne, ist bei Gram-positiven Bakterien länger als bei Gram-negativen (von Heijne *et al.* 1989; Tjalsma *et al.* 2004) und eukaryotische Signalpeptide besitzen wiederum kürzere n-, h- und c-Domänen als Gram-negative Bakterien (von Heijne *et al.* 1989). Des Weiteren kann das Signalpeptid eines Proteins nicht immer in anderen Organismen erkannt und prozessiert werden, denn auch wenn bestimmte Substrate von Signalpeptidasen aus verschiedenen Organismen gespalten werden können, liegt häufig eine Substratspezifität vor (Becker *et al.* 1986; van Dijl *et al.* 1988; Peng *et al.* 2001).

In *E. coli* kodiert nur ein Gen für eine funktionelle Signalpeptidase des Typ I, wobei in dem Gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* fünf chromosomale und zwei plasmidkodierte Enzyme zu finden sind (Meijer *et al.* 1995; van Dijl *et al.* 1995; Bolhuis *et al.* 1996; Tjalsma *et al.* 1997). Dabei ist keines der Enzyme essentiell und auch jedes prozessiert abweichende Substrate (Bron *et al.* 1998). Interessanterweise gehören die sieben Signalpeptidasen den zwei unterschiedlichen Klassen der Signalpeptidasen des Typ I an. Hierbei wird zwischen dem P-Typ, der vor allem bei Bakterien und in den Organellen der Eukaryoten zu finden ist und dem ER-Typ, der in allen Bereichen zu finden ist, unterschieden (van Roosmalen *et al.* 2004). Bei *Bacillus subtilis* ist eine Signalpeptidase des ER-Typs durch das Gen *sipW* codiert.

1.3.1.1 Die Struktur der Signalpeptidasen

Beim Vergleich verschiedener Aminosäuresequenzen variabler Typ I-Signalpeptidasen sind konservierte Domänen zu finden, welche als Box A-E bezeichnet werden (van Dijl *et al.* 1992). Dabei beinhaltet die in der Transmembranhelix lokalisierte Box A einen Teil des hydrophoben Bereichs, der für die Verankerung in der Membran verantwortlich ist (van Dijl *et al.* 1992). Innerhalb der Box B befinden sich alle für die Katalyse essentiellen Aminosäuren

und die Box C beinhaltet die Substratbindetasche, welche an die -3 Region des Signalpeptids bindet. Neben der Box B und Box C, sind auch die Box D sowie die Box E in der periplasmatischen katalytischen Domäne lokalisiert und weisen wichtige konservierte Aminosäuren auf (Dalbey *et al.* 1997). Signalpeptidasen des Typ I aus *E. coli* (Abb. 9) besitzen drei apolare Regionen H1 bis H3 und zwei polare Regionen P1 und P2 (Dalbey *et al.* 1986, 1987).

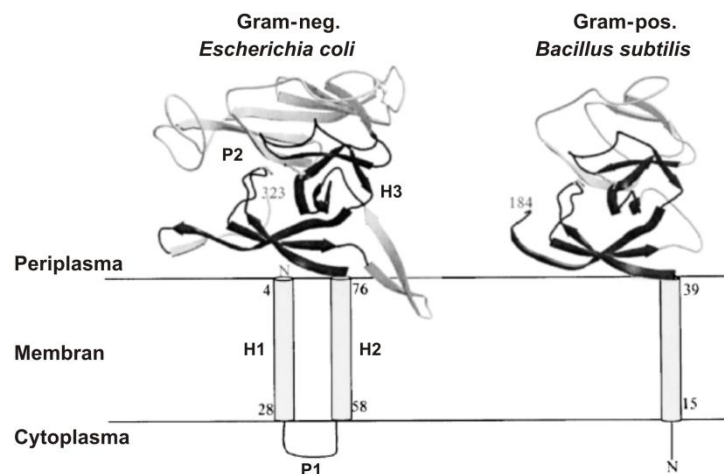


Abbildung 9: Struktur der Signalpeptidasen eines Gram-negativen und Gram-positiven Bakteriums

Der typische Aufbau einer Signalpeptidase aus einem Gram-negativen Bakterium wie *Escherichia coli* mit den hydrophoben Bereichen H1 und H2, welche die Membran durchspannen, dem cytoplasmatischen Bereich P1 und der großen periplasmatischen katalytischen Domäne mit den Segmenten P2 und H3. Die Signalpeptidase aus dem Gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* besitzt nur eine Transmembranregion und der N-Terminus befindet sich im Cytoplasma. Die katalytische Domäne ist ebenfalls im Periplasma lokalisiert (Paetzel *et al.* 2000).

Die apolaren Regionen H1 und H2 sind Transmembrandomänen, wobei der N-Terminus der ersten und der C-Terminus der zweiten jeweils im Periplasma lokalisiert ist (Wolfe *et al.* 1983; Moore *et al.* 1987). Die H2-Region besitzt zusätzlich eine interne Signalsequenz und ist für den Transport in die Membran und die anschließende Faltung von Bedeutung (Dalbey *et al.* 1987). Die Region P1 besitzt polare Reste und bildet den cytoplasmatischen *loop* der die hydrophoben Bereiche H1 und H2 verbindet (von Heijne *et al.* 1988). Dabei ist eine positive Ladung nach dem ersten hydrophoben Bereich für die Orientierung der Signalpeptidase innerhalb der Membran entscheidend (von Heijne *et al.* 1988; Laws *et al.* 1989; San Millan *et al.* 1989). Im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien besitzen Gram-positive Bakterien wie *B. subtilis* nur eine Transmembranhelix (Abb. 9), wobei hier der N-Terminus im Cytoplasma

und der C-Terminus im periplasmatischen Raum lokalisiert ist (Carlos *et al.* 2000). Der C-Terminus der Signalpeptidasen wird durch die für diesen Prozess essentiellen Proteine SecY und SecE unter Verbrauch von ATP und zusätzlich durch das elektrochemische Potenzial über die Membran transportiert (Wolfe *et al.* 1983; Wolfe *et al.* 1985; Lee *et al.* 1992). Zusätzlich ist die Region H3 genauso wie die Region P2 im Periplasma lokalisiert und stellt die aktive katalytische Domäne dar (Dalbey 1991). Im Jahr 1998 konnte die Kristallstruktur der katalytischen Domäne der *E. coli* Signalpeptidase, welche aus zwei antiparallel angeordneten β -Faltblattstrukturen besteht, aufgeklärt werden (Paetzel *et al.* 1998).

Der katalytische Mechanismus der Typ I-Signalpeptidasen stellt eine Besonderheit in dem Sinne dar, dass alle bisher bekannten katalytischen Mechanismen von Peptidasen hier nicht zutreffen. Die Katalyse läuft über eine Dyade, wobei die Aminosäure Lysin als generelle Base und die Aminosäure Serin essentiell sind (Black 1993; Paetzel *et al.* 1998). Abweichend zur katalytischen Triade der klassischen Serinproteasen mit den Aminosäuren Aspartat, Histidin und Serin, besitzt bei dem Mechanismus der Signalpeptidasen die Aminosäure Histidin keine gesonderte Funktion. Die Signalpeptidasen besitzen eine starke proteolytische Aktivität, da die benötigte Aktivierungsenergie im Vergleich zu anderen Proteasen keine signifikanten Unterschiede aufzeigt (Suciu *et al.* 1997).

1.4 DnaK-DnaJ-GrpE-System

Proteine stellen einen entscheidenden Bestandteil des Lebens dar und besitzen eine komplexe Struktur. Vielen Krankheiten liegen falsch gefaltete Proteine zu Grunde, weshalb eine korrekte und kontrollierte Faltung, gerade unter extremen Bedingungen, essentiell ist und von einem Organismus gewährleistet werden muss. Innerhalb einer Zelle interagieren eine Vielzahl an Proteinen miteinander um diese Funktion sicher zu stellen. Ein bereits in *E. coli* gut untersuchter und in diese Vorgänge involvierter Mechanismus ist das Chaperon und Cochaperon-System bestehend aus den Proteinen DnaK, DnaJ und GrpE. Homologe Proteine des DnaK, DnaJ und GrpE sind in allen Bereichen des Lebens, von Prokaryoten bis Eukaryoten zu finden. Das DnaK-DnaJ-GrpE-System stellt somit in Prokaryoten und Eukaryoten ein universelles System dar, wogegen bei Archaeen bisher wenig über das beschriebene System bekannt ist.

Die DnaK-Chaperone gehören der Hsp70-Proteinfamilie an. Zu dieser *heat shock protein* Familie zählende Proteine kommen ubiquitär vor und weisen in ihrer Mehrheit ein

Molekulargewicht von ~70 kDa auf. Zur Gruppe der DnaK-Familie zählende Chaperone spielen eine entscheidende Rolle bei der Proteinfaltung und verhindern die Missfaltung von Proteinen. DnaK-Proteine besitzen eine N-terminale ATPase-Domäne, eine C-terminale Substratbindedomäne (Groemping *et al.* 2001a) und fungieren ATP-abhängig. Die Expression des DnaK-Proteins aus *E. coli* wird über den alternativen Sigmafaktor σ^{32} reguliert (Groemping *et al.* 2001a), wobei eine zu starke Expression in *E. coli* zu einem Zellteilungsdefekt führt, wobei die Zellen einen filamentösen Phänotyp aufweisen können (Bukau *et al.* 1989). Die ATP-gebundene Form des DnaK-Proteins (Klostermeier *et al.* 1999) zeichnet sich durch eine geringe Affinität zu dem Substrat aus, wogegen in der ADP-gebundenen Form eine starke Affinität zu dem Substrat vorliegt (Abb. 10). Da die Hydrolyse des gebundenen Nukleotids selbst zu langsam abläuft, wird ein Cochaperon, das DnaJ-Protein benötigt, um die Reaktion zu beschleunigen. DnaJ-Proteine gehören zu der Klasse der Hsp40-Proteinfamilie und das molekulare Verhältnis von DnaJ zu DnaK liegt innerhalb der *E. coli* Zelle bei 5:1 (Szabo *et al.* 1994). Das Cochaperon, welches mit dem DnaK in einer 1:2 Stöchiometrie (DnaK:DnaJ) interagiert (Schonfeld *et al.* 1998), kann das Substrat zu dem DnaK führen, indem es ungefaltete und nicht native Proteine mit hydrophoben Bereichen erkennt (Siegenthaler *et al.* 2006). Diese Substrate werden dann über den bereits erwähnten hydrophoben Bereich an der Substratbindedomäne des DnaK-Proteins gebunden (Abb. 10). Durch die Hydrolyse des gebundenen ATPs, wird der T-Status erreicht und das Substrat liegt an das DnaK gebunden vor (Siegenthaler *et al.* 2006).

Die starke Affinität von ADP-gebundenem DnaK zu seinem Substrat, würde ein Ablösen des Substrats verhindern und das Chaperon sowie das Cochaperon könnten ihre Funktion nicht fortlaufend ausüben. Um den Zyklus aufrecht zu erhalten, muss das an DnaK gebundene ADP gegen ATP ersetzt und der R-Status mit einer geringen Affinität zum Substrat wieder hergestellt werden. Hierbei spielt das in dieser Arbeit zu untersuchende GrpE-Protein, der Nukleotidaustauschfaktor (NEF *nucleotide exchange factor*) eine entscheidende Rolle (Liberek *et al.* 1991). Die Geschwindigkeit des Austauschs von ADP zu ATP wird durch die Wechselwirkung des GrpEs mit der Nukleotidbindedomäne des DnaKs (Bukau *et al.* 2006) um ein Vielfaches erhöht (Packschies *et al.* 1997), wodurch ein ausreichendes Bereitstellen des ATP-gebundenen Chaperons gewährleistet ist. Zusätzlich fungiert der N-Terminus des GrpE-Proteins mit seinem eher hydrophoben Charakter als Pseudosubstrat und konkurriert mit dem bereits gebundenen Substrat (Brehmer *et al.* 2004; Moro *et al.* 2007). Im Gegensatz zum DnaK besitzt das GrpE-Protein keine ATPase Funktion (Reid *et al.* 1996) und sorgt

lediglich für den Austausch des Nukleotids. Eine funktionale Verbindung zwischen DnaK und GrpE wird durch die Beobachtung deutlich, dass eine Überexpression des GrpE-Proteins den bereits erwähnten filamentösen Phänotyp in *E. coli* hervorruft (Sugimoto *et al.* 2008).

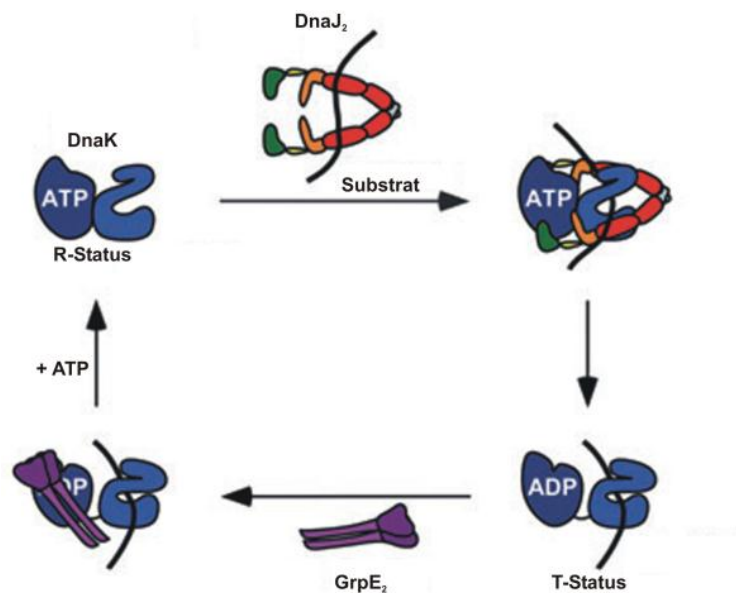


Abbildung 10: DnaK- DnaJ-GrpE-Zyklus

Das DnaK-Protein besitzt in seiner ATP-gebundenen Form eine geringe Substrataffinität. Das dimere DnaJ leitet das über hydrophobe Bereiche gebundene Substrat zum DnaK-Protein und beschleunigt nach der Bindung die ATP-Hydrolyse. Das DnaJ löst sich von dem DnaK-Protein in seiner ADP-gebundenen Form und das Substrat ist auf Grund einer hohen Substrataffinität fest an DnaK gebunden. Der Nukleotidaustauschfaktor, das dimere GrpE-Protein, führt zum Austausch von ADP gegen ATP und überführt somit das DnaK-Protein in den Grundzustand mit einer geringen Substrataffinität (Genevaux *et al.* 2007).

Der beschriebene Zyklus (Abb. 10) spielt bei einer Stressantwort eine entscheidende Rolle, wobei die am häufigsten beschriebene Stresssituation den Hitzestress darstellt. Hierbei übernimmt das GrpE-Protein die Funktion des Thermosensors. Um eine Hitzeschockantwort hervorzurufen, müssen alle Proteine, also das DnaK, DnaJ und GrpE, in der Zelle vorhanden sein (Siegenthaler *et al.* 2006). Bei einem Hitzeschock ist es erforderlich, dass die Substrate fest an das DnaK gebunden vorliegen um eine Anhäufung von falschgefalteten Proteinen oder Proteinaggregaten zu verhindern, was den T-Status des DnaK-Proteins voraussetzt. Der T-Status wird gewährleistet, indem das DnaJ-Protein den Übergang des R- in den T-Zustand bei höheren Temperaturen fördert und gleichzeitig die GrpE-Aktivität herabgesetzt wird. Ein Hitzeschock ruft den gleichen Effekt, wie eine sehr geringe GrpE-Konzentration hervor

(Siegenthaler *et al.* 2006). Somit ist ein kontinuierlicher Zyklus zwischen dem R- und dem T-Status sichergestellt.

1.4.1 Die Struktur des Nukleotidaustauschfaktors GrpE

Das GrpE-Protein konnte bis heute aus zahlreichen Organismen isoliert und charakterisiert werden, wodurch die molekularen und biochemischen Eigenschaften des Proteins mit seiner Funktion als Thermosensor identifiziert werden konnten. Neben dem Protein aus *E. coli* wurde im Jahr 2010 die Struktur des Proteins aus *Thermus thermophilus* (Abb. 11) kristallografisch untersucht und gelöst (Nakamura *et al.* 2010).

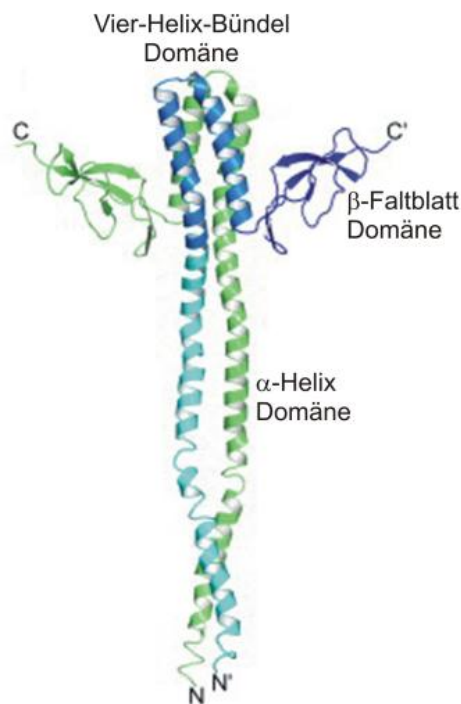


Abbildung 11: Struktur des dimeren GrpE-Proteins aus *Thermus thermophilus*

Struktureller Aufbau des GrpE-Proteins am Beispiel des thermophilen Cyanobakteriums *Thermus thermophilus*. Dem unstrukturierten N-Terminus folgen die langen, gepaarten α -Helices und das Vier-Helix-Bündel, welches jeweils aus zwei α -Helices eines Monomers besteht. Der C-Terminus bildet eine β -Faltblattstruktur aus (Nakamura *et al.* 2010).

Das GrpE liegt in seiner funktionalen Einheit als Dimer vor, welches sich in charakteristische Bereiche einteilen lässt. Auf den undefinierten N-Terminus folgt eine lange α -Helix und das Vier-Helix-Bündel, wobei aus jedem Monomer zwei Helices einen Teil des Vier-Helix-Bündels ausbilden. Der C-Terminus bildet eine β -Faltblattstruktur aus (Harrison *et al.* 1997; Nakamura *et al.* 2010). Diese Strukturen sind weitestgehend konserviert, wobei

Abweichungen vor allem innerhalb des nicht stark konservierten N-Terminus (Nakamura *et al.* 2010), möglich sind. So zeigt das Protein aus der eukaryotischen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* im Gegensatz zu dem Protein aus *E. coli* eine Verlängerung um etwa 14 Aminosäuren (Willmund *et al.* 2007).

1.4.2 Die Dimerisierung des GrpE-Proteins

Die Dimerisierung des GrpE-Proteins wurde in den letzten Jahren gut untersucht und es wurden Unterschiede im Bezug auf verschiedene Organismen hervorgehoben. Bei dem GrpE-Protein aus *E. coli*, was auch hier ein Paradigma darstellt, findet die Dimerisierung hauptsächlich über das Vier-Helix-Bündel statt (Gelinas *et al.* 2002). Anhand der Circular dichroismus-Spektroskopie aber auch durch *Crosslink*-Experimente konnte gezeigt werden, dass eine verkürzte Form des GrpE-Proteins (AS 1-88) aus *E. coli* keine Dimere ausbildet. Eine GrpE-Variante, welche neben der langen α -Helix einen Teil des Vier-Helix-Bündels besitzt (AS 1-112) zeigt eine dimere Struktur des GrpE-Proteins (Mehl *et al.* 2003). Die langen, gepaarten α -Helices haben bei *E. coli* keinen Einfluss auf die Dimerisierung. Die langen, gepaarten α -Helices werden in *E. coli* zusätzlich durch elektrostatische Verbindungen stabilisiert, wobei diese die Stabilität des gesamten Dimers nicht beeinflussen (Mehl *et al.* 2007). Die Dimerisierung wird nicht bei allen Homologen über das Vier-Helix-Bündel vermittelt. Bei dem thermophilen Bakterium *Thermus thermophilus* sind die langen, gepaarten α -Helices entscheidend an der Dimerisierung beteiligt. Bei der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* ist ebenfalls der N-Terminus und hier die ausgebildeten *coiled coil* Strukturen für die Dimerisierung essentiell (Willmund *et al.* 2007).

Die dimere Struktur des GrpE-Proteins ist essentiell für dessen Funktion. In gleichem Maße ist es von großer Bedeutung, dass strukturelle Veränderungen, in diesem Fall die Monomerisierung, vollzogen werden, um die Stressantwort und im speziellen die Hitzeschockantwort zu gewährleisten.

1.4.3 GrpE und seine Eigenschaft als Thermosensor

Wie bereits erwähnt, übernimmt das GrpE-Protein in dem System aus DnaK, DnaJ und GrpE die Funktion des Thermosensors. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass das GrpE-Protein seine Struktur temperaturabhängig verändert und bei hohen Temperaturen in der inaktiven, monomeren Form vorkommt (Grimshaw *et al.* 2001). Der Prozess der

Denaturierung und der daraus resultierenden Monomerisierung kann in verschiedene Schritte eingeteilt werden. Charakteristisch für das Protein ist ein zweistufiger Denaturierungsprozess, wobei jeder Schritt bei einer spezifischen Temperatur stattfindet. Am Beispiel des *E. coli* Proteins konnte bei einer Temperaturerhöhung von 10 °C auf 95 °C eine typische Schmelzkurve mit zwei spezifischen Schmelzpunkten ermittelt werden. Dabei spiegelt der erste Schmelzpunkt bei etwa 48 °C eine konzentrationsabhängige Strukturveränderung wieder. Das Protein bleibt dabei in seiner Form als Dimer bestehen und nur in den langen α -Helices konnte eine Strukturveränderung detektiert werden (Grimshaw *et al.* 2001). Diese erste kritische Temperatur liegt etwas über den physiologischen Bedingungen, demgegenüber liegt die zweite Schmelztemperatur weit über diesem Wert bei 75 – 80 °C. Bei dieser Temperatur konnte eine strukturelle Veränderung, die nicht konzentrationsabhängig ist, innerhalb des Vier-Helix-Bündels und damit einhergehend die Monomerisierung des Proteins beschrieben werden (Gelinis *et al.* 2002).

Nicht in jedem Organismus ist der erste Schmelzpunkt auf die α -Helix bezogen. Bei dem thermophilen Bakterium *Thermus thermophilus*, dessen optimale Wachstumstemperatur zwischen 70 – 75 °C liegt, ist der erste Schmelzpunkt bei ~90 °C zu detektieren. Die Veränderung bei dem ersten Schmelzpunkt ist auf die β -Faltblattstruktur am C-Terminus begrenzt. Diese strukturelle Veränderung ist reversibel, wogegen der zweite Schmelzpunkt, welcher mit der Monomerisierung einhergeht, nicht vollständig reversibel ist. Dieser Schmelzpunkt, bei ~105 °C, betrifft die langen, gepaarten α -Helices. Bei diesem thermophilen Bakterium sind noch weitere deutliche Unterschiede im Bezug auf das beschriebene Chaperonsystem gefunden worden. Im Grundzustand besteht der Komplex aus den Proteinen DnaK-DnaJ-DafA, wodurch eine Substratbindung nicht vollzogen werden kann. Erst wenn durch einen Temperaturanstieg dieser Komplex zerstört wird, kann eine Substratbindung stattfinden (Klostermeier *et al.* 1999). Demnach besitzt in diesem System das DnaJ-Protein keine bedeutende Funktion und lediglich das GrpE-Protein zeigt regulatorische Eigenschaften (Groemping *et al.* 2001a).

1.5 Zielsetzung

Die Thylakoidmembranbiogenese ist bis heute ein noch nicht verstandenes und stark diskutiertes Forschungsgebiet. Mit Hilfe der Methode des lichtinduzierten heterotrophen Wachstums (LAHG, *light activated heterotrophic growth*), sollte in dieser Arbeit die Thylakoidmembranbiogenese nach vorheriger Dunkeladaptation der cyanobakteriellen Zellen des Stammes *Synechocystis* sp. PCC 6803 beschrieben und der Wiederaufbau des Thylakoidmembransystems verfolgt werden. Bei dem Transfer der dunkeladaptierten Zellen in eine belichtete Umgebung wurden der Chlorophyllgehalt pro Zelle, die Pigmentzusammensetzung und die Zellzahl analysiert. Des Weiteren sollte die photosynthetische Aktivität mit Hilfe von Sauerstoffmessungen und PAM-Messungen detektiert und Unterschiede beschrieben werden. Auch die oligomere Struktur der Photosysteme wurde mit Hilfe der Blau-Nativen-Gelelektrophorese und der Saccharosedichtegradientenzentrifugation untersucht, um Veränderungen festzustellen.

Neben der Thylakoidmembranbiogenese sollten zusätzlich die zwei in dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 vorkommenden Signalpeptidasen LepB1 und LepB2 untersucht und charakterisiert werden. In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass beide Proteine unter photoautotrophen Bedingungen nicht deletiert werden können und somit essentiell sind. Die Lokalisation der beiden Signalpeptidasen innerhalb einer cyanobakteriellen Zelle ist ein erster Hinweis auf ihre Funktion und ihre Rolle innerhalb der Proteinsortierung. Anhand von GFP-Fusionsproteinen sollte in dieser Arbeit die Lokalisation untersucht werden. Des Weiteren ist bekannt, dass Signalpeptidasen eine Substratspezifität besitzen und die heterolog exprimierten und gereinigten Proteine sollten, um ebenfalls Rückschlüsse auf ihre Funktion zu erhalten, auf diesen Aspekt hin analysiert werden.

Zusätzlich sollte innerhalb dieser Arbeit der Nukleotidaustauschfaktor zweier verwandter Cyanobakterien in seiner Funktion als Thermosensor beschrieben werden. Dabei wurde das GrpE-Protein aus dem mesophilen Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 mit dem Protein aus dem thermophilen Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* BP1 verglichen. Diese Untersuchungen bezüglich der Dimerisierung und der Thermostabilität sollten zeigen, inwieweit das in *E. coli* beschriebene System auf zwei verwandte Bakterien mit abweichenden optimalen Wachstumstemperaturen zutrifft.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Zubehör

Gerät:	Typ:	Hersteller:
Blotapparatur	Trans-Blot [®] SD Semi-Dry	Bio-Rad, München
Brutschrank	B28	Binder, Tuttlingen
Detektion Chemilumineszenz	Stella	Raytest, Straubenhardt
Elektrophoresekammern	Mini-Protean [®] 3 Cell	Bio-Rad, München
	Mini-Protean [®] Tetra Cell	Bio-Rad, München
	Protean II XL Cell	Bio-Rad, München
	PerfectBlue Gelsystem Mini S, M, L	Peqlab, Erlangen
Elektrophorese-Netzgeräte	PowerPac Basic [™]	Bio-Rad, München
	PowerPac HC [™]	Bio-Rad, München
	peqPower 300 Volt	Peqlab, Erlangen
Fluorimeter	Aminco Bowman Series 2 fluorimeter	
Geldokumentationssystem für Agarosegele	Quantum Geldokumentationssystem	Peqlab, Erlangen
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler	Multitron HT	Infors, Bottmingen, Schweiz
Magnetrührer	MR Hei Standard	Heidolph, Schwabach
Mikroskop	Leica TSC SP	Leica Microsystems Heidelberg
Mikrowelle	MD 6459	Microstar
O ₂ -Elektrode	fiber-optic oxygen meter	PreSens

Gerät:	Typ:	Hersteller:
PAM	Dual-PAM-100	Walz GmbH, Effeltrich
pH-Meter	pH 211 Microprocessor	Hanna instruments, Kehl am Rhein
Photometer	Lambda 35 UV/VIS Spektrometer	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Polarimeter	Jasco J-810 CD spectrometer	Jasco, Gross-Umstadt
Speedvac	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Taumelschüttler	Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Thermocycler	Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad	USC500T	VWR, International GmbH, Ismaing
Ultraschallgerät	Sonifier 450	Branson, Danbury, CT, USA
Vortex-Mixer	Reagenzglasschüttler	VWR
Zentrifugen	Avanti ^R J-26 XP	Beckmann Coulter
	Optima TM L Series Ultracentrifuge	Beckmann Coulter
	Optima TM MAX-XP Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter
	5415R	Eppendorf, Hamburg
	5424	Eppendorf, Hamburg
	MLA-130	Beckmann Coulter
	JA-25.50	Beckmann Coulter
	JLA-16.250	Beckmann Coulter
Zentrifugenrotoren	70 Ti	Beckmann Coulter
	90 Ti	Beckmann Coulter
	JA-25.15	Beckmann Coulter
	TLA 100	Beckmann Coulter
	TLA 120.2	Beckmann Coulter

2.1.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial:	Bezeichnung:	Hersteller:
Dialyseschlauch	Spectra/Por [®] Membrane	Spectrumlabs, Breda, Niederlande
Einmalspritzen	Omnifix [®] 1-10 ml	Braun, Melsungen
Gel-Blotting-Papier	Protean [®] XL Size	Bio-Rad, München
PVDF-Membran	Roti [®] -PVDF	Roth, Karlsruhe
Spritzenfilter	Rotilabo [®] -Spritzenfilter Cameo 3AS Syringe Filter	Roth, Karlsruhe GE Waters, Trevose, PA, USA

Andere Verbrauchsmaterialien wurden bei den Firmen Sarstedt (AG & Co, Nümbrecht), VWR (GmbH, Ismaing) und Roth (Karlsruhe) bestellt.

2.1.3 Chemikalien, Lösungen und Enzyme

Alle Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Fluka (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (München) bezogen. Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und bei Bedarf durch Autoklavieren sterilisiert. Enzyme wurden von den Firmen Finnzymes (Espoo, Finnland), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Ipswich, MA, USA), Gibco (Invitrogen, GmbH Karlsruhe) sowie Stratagene (La Jolla, CA, USA) bezogen.

2.1.4 Längen- und Größenstandards

Folgende Längenstandards der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) wurden verwendet

DNA	Gene Ruler [™] 1 kb Ladder
	Gene Ruler [™] 50 bp Ladder
Proteine	Page Ruler [™] Unstained Protein Ladder (10 – 200 kDa)
	Page Ruler [™] Prestained Protein Ladder (10 – 170 kDa)

2.1.5 Verwendete Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) Rif ^R <i>phoA</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ</i> ⁻	(Hanahan 1983)
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (CamR)	(Grodberg <i>et al.</i> 1988)
HMS 174 (DE3)	F ⁻ <i>recA1 hsdR</i> (rK12 ⁻ mK12 ⁺) (DE3) pLysS (CamR, Rif R)	(Studier <i>et al.</i> 1986)
Rosetta (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysSRARE2 (CamR)	Novagen (Merck KGaA, Darmstadt)
SU101	<i>lexA71::Tn5</i> (def) <i>sulA211</i> Δ (<i>lacI POZYA</i>) 169/F ['] <i>lac</i> ^q <i>lacZ</i> Δ M15::Tn9	(Dmitrova <i>et al.</i> 1998)
IT41GE225	<i>tyr</i> (Am) <i>trpE9829</i> (Am) <i>thr metE ilv thy</i> <i>supF6</i> (Ts)	(Inada <i>et al.</i> 1989)
OD212 Δ GrpE	AM267 <i>dnaK332 DgrpE::VCamr</i>	(Liberek <i>et al.</i> 1991)

2.1.6 Kulturmedien für *E. coli*

Alle Medien wurde nach Sambrook und Russel (2001) hergestellt.

LB-Medium

10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, ad 1l H₂O. Für Platten wurden zusätzlich 15 g/l Agar hinzugefügt

TB-Medium

12 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, ad 900 ml H₂O. Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von 100 ml autoklaviertem Kaliumphosphatpuffer (0,17 M KH₂PO₄ / 0,72 M K₂HPO₄).

Nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen auf ca. 60 °C erfolgte die Zugabe der Antibiotika Ampicillin (100 μ g/ml), Chloramphenicol (10 – 30 μ g/ml), Kanamycin (10 μ g/ml) oder Tetracyclin (10 μ g/ml). IPTG (0,005 – 0,5 mM) wurde vor Gebrauch auf die Platten ausplattiert.

2.1.7 Kulturmedien für *Synechocystis*

Das BG-11 Medium und die Platten wurden wie in (Rippka *et al.* 1979) beschrieben angesetzt und nach dem Autoklavieren verwendet. Nach dem Abkühlen des Agars und vor Gebrauch des Mediums erfolgte die Zugabe der Antibiotika Kanamycin (10 – 90 µg/ml), Chloramphenicol (10 – 90 µg/ml) sowie Spectinomycin (90 µg/ml).

2.1.8 Verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Referenz
pGEMT-Easy	Ampicillin	Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road Madison, WI 53711-5399 USA
pSTBlue-1	Ampicillin, Kanamycin	Novagen (Merck KGaA, Darmstadt)
pRSET-His	Ampicillin	(Prodohl <i>et al.</i> 2007)
pRSET	Ampicillin	(Schoepfer 1993)
pMalc2-x	Ampicillin	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
pMalp2-x	Ampicillin	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
pLexA	Ampicillin	(Schneider <i>et al.</i> 2003)
pILA	Kanamycin	(Kunert <i>et al.</i> 2000)
pBad	Ampicillin	(Guzman <i>et al.</i> 1995)

2.1.9 Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Sequenzierung rekombinanter Plasmide

Bezeichnung	Sequenz 5'→'3'
T7-prom	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6 18er	ATTTAGGTGACACTATAG
M13 univ. -21	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13 univ. -49	GAGCGGATAACAATTCACACAGG

Oligonukleotide zur Untersuchung der GrpE-Proteine

Bezeichnung	Sequenz 5'→'3'
5'SynGrpE	TATGCCATATGACGAAGATCAAGTTTCCC
5'SynGrpEct	TATGCCATATGATCAAAGGAAGGACCATAACAG
5'SynGrpEct- <i>NheI</i>	TATGCGCTAGCATGATCAAAGGAAGGACCATAACAG
5'SynGrpEvl	TATGCCATATGAACGAAGATCAAGTTTCCC
5'SynGrpEvl- <i>NheI</i>	TATGCGCTAGCATGAACGAAGATCAAGTTTCCC
5'GrpEEC- <i>NheI</i>	GCTAGCATGAGTAGTAAAGAACAGAAAAC
5'ThermGrpEct	TATGCCATATGATTAAATGCAGTGTTCATTGCTG
5'ThermGrpEct- <i>NheI</i>	TATGCGCTAGCATGATTAAATGCAGTGTTCATTGCTG
5'ThermGrpEvl	TATGCCATATGCACAATCCACAGTCTAGAG
5'ThermGrpEvl- <i>NheI</i>	TATGCGCTAGCATGCACAATCCACAGTCTAGAG
NTgrpEEC- <i>NdeI</i>	GCGATCATATGAGTAGTAAAGAACAG
NTsII0057kurz	TATGCCATATGATCAAAGGAAGGACCATAACAG
NTTlr1314kurz	TATGCCATATGATTAAATGCAGTGTTCATTGCTG
3'SynGrpE	ATACGGGATCCTTAGGGGTTAGCTCCCGCCTC
3'GrpEEC- <i>EcoRV</i>	GATATCTTAAGCTTTTGCTTTCGCTAC
3'SynGrpEnt	ATACGGGATCCTTAGAGTTTTGCTTGCTCCTCTTTC
3'SynGrpEvl	ATACGGGATCCTTAGGGGTTAGCTCCCGCCTC
3'ThermGrpEnt	ATACGGGATCCTTACTGTAGCTCTAGCTCCTCTTTTTC
3'ThermGrpEvl	ATACGGGATCCTTACACGTCGGTTCACATCATTG

Oligonukleotide zur Klonierung der Fluoreszenzplasmide

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
5'dank2prom	ATAGCCTGCAGCCTATCAAGTTAACCCCAAG
5'NTGFP-MCS	CATATGCGTCGGCCGCGTGTTTAAACGTGCGGCCGC AGGTAATAACAATAACAATAACAATAACAATAACA TGGGGTACCTGCGTAAAG
5'tetprom- <i>Pst</i> I	CTGCAGGCTTAGTAAAGCCCTCGCTA
NTGFP- <i>Kpn</i> I	GGTACCATATGGCGTAAAGGAGAAGAACTTTTC
NTgfpmutx	GACCATATGGGGTACCTGCGTAAAGGAGAAGAACT TTTC
NTSynCerulean- <i>Kpn</i> I	TATCGGGTACCGGTTCCGGCGCCGTTAGTAAAG
NTtetprom	GTCCCATCGAATGGGCTTAGTAAAGCCCTCGCTAG
5'slr1377- <i>Sac</i> I	CGAGCTCATGACCGAAAATATTGTCCGC
5'sll0716- <i>Sac</i> I	CGAGCTCATGCAAATTCATCCCATCCC
3'CTGFP-MCS	TCTAGACTGAGGCCTCTGCGGCCGTCGGAGCTCGTT ATTGTTATTGTTATTGTTATTGTTATTAGCTTTGTAT AGTTCATCCATGCCA
3'CTSynCerulean- MCS	GCATGGATGAATTGTATAAAGCTAATAACAATAACA ATAACAATAACAATAACGGTGAGCTCCGACGGCCG CCACACGTGCAGTCTAGA
3'dnaK2p- <i>Nde</i> I	CGGTACCTTGCATATGAATTTTAATTA ACTCCCGTTA ACA
3'SynCerulean- <i>Xba</i> I	ATACGTCTAGATTATTTATAACAATTCATCCATGCCC
3'tetprom- <i>Kpn</i> I	CGCAGTCAGGCACCGTGTGGTACC
3'tetprom- <i>Kpn</i> I-gene	GGTACCTCGGACGGTGCCGAGGATGAC
CTsll0716- <i>Xba</i> I	GGCTCTAGATTAGGTATTGATGATGGTACGG
CTslr1377- <i>Xba</i> I	GGCTCTAGACTAACGACTCTCCGGCACTG

Oligonukleotide zur Untersuchung der Signalpeptidasen *lepB1* und *lepB2*

Bezeichnung	Sequenz 5'→'3'
5'sll0716KD	TAGCGAATTCCATATGCATCACCATCATCACCATCA CCATCTGCTGCTGCGTTTCTTTGTG
5'slr1377 KD	AATGCCATATGCACCATCATCACCATCATCACCATA TCGGTATTCGGACTTTTGTGG
5'lepBEC- <i>NdeI</i>	TATGCCATATGGCGAATATGTTTGCCCTG
5'sll0716	ATAGCCATATGCAAAATCCCCCATCCC
5'slr1377- <i>NdeI</i>	TATGCCATATGACCGAAAATATTGTCCGC
5'sll1667- <i>NdeI</i>	GCGCATATGTTAATTTTGAAAAATTCTATGG
5'slr1744- <i>NdeI</i>	GCGCATATGTCAAGATTGCCTGGTTTTG
3'lepBEC- <i>PstI</i>	CGCATTGGCGGCATCCATTAAGTGCAGCGATA
3'sll1667His6- <i>HindIII</i>	CGCAAGCTTGCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGC ATCAATGGCC
3'slr1744His6- <i>HindIII</i> kurz	CGCAAGCTTGCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGCAA TTCTGGGGTAGGTAATTC

2.1.10 Antikörper

Primäre Antikörper wurden von den Firmen Gramsch (Schwabhausen), Acris (Herford) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Die enzymgekoppelten sekundären Antikörper waren von Sigma Aldrich (München).

2.1.11 Computerprogramme

Bildbearbeitung	Adobe Photoshop 7.0.1 Corel Graphics Suite 11
Diagramme und Tabellen	Microsoft Excel 2007 Origin Pro 6
Textverarbeitung	Endnote Microsoft Word 2007
DNA-/Proteinanalysen	Genamics Expression

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus einer 3 ml Bakterienkultur gemäß der Angaben des *Kits High-Speed Plasmid Mini Kit* (Avergene, Taipei City, Taiwan).

2.2.1.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *Synechocystis* sp.

Eine Cyanokultur $OD_{750} \geq 2$ wurde abzentrifugiert (3600 UpM, 15 min, 4 °C) und das Pellet vier Mal mit TES-Puffer (5 mM Tris-HCl pH 8,5, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 450 µl TES-Puffer aufgenommen und es erfolgte die Zugabe von 50 µl Lysozym (20 mg/ml). Nach einer Inkubation von 15 bis 30 min bei 37 °C wurden 50 µl einer 10 % Sarcosyllösung und 600 µl Phenol hinzugegeben und alles 15 min bei RT auf einem Taumelschüttler inkubiert. Die Zentrifugation von 13000 UpM, 10 min bei 4 °C führte zu einer Phasentrennung. Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt bevor die Zugabe von 5 µl RNase (10 µg/ml) und eine weitere Inkubation von 15 min auf einem Taumelschüttler folgte. Die Zugabe von 100 µl NaCl (5 M), 80 µl CTAB/0,7 M NaCl und 600 µl Chlorophorm/Isoamylalkohol (24:1) führte nach einer Zentrifugation bei 13000 UpM, für 5 min und 4 °C erneut zu einer Phasentrennung. Die obere Phase wurde erneut in ein Reaktionsgefäß überführt und es wurde 1 Vol. Isopropanol zugegeben. Nach gründlichem Mischen erfolgte eine weitere Zentrifugation (13000 UpM, 10 min, 4 °C) und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Nach diesem Trocknungsschritt wurde das Pellet in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA) resuspendiert und die DNA-Konzentration wie unter 2.2.1.3 beschrieben bestimmt.

2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers. Hierbei wurde die Absorption der Probe bei 280 nm und 260 nm ermittelt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die folgende Formel verwendet

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \Delta\text{OD}_{260} \times 50 [\mu\text{g/ml}] \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Reinheitsgrad wurde aus dem Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ bestimmt. Der Quotient sollte dabei einen Wert von 2,0 aufweisen (Sambrook *et al.* 2001)

2.2.1.4 DNA-Amplifikation durch die Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte nach einem Standardprotokoll. Dabei enthielt ein 50 μl Ansatz 100 – 500 ng Matrizen-DNA, je 0,25 μM *Forward* sowie *Reverse* Primer, 1 x PCR-Reaktionspuffer, 200 μM dNTPs, 2,5 U Polymerase (Taq-Polymerase, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) und zusätzlich 2,5 mM MgCl_2 . Es erfolgte eine drei minütige initiale Denaturierung bei 95 °C. Anschließend wurden 25 – 30 Zyklen der folgenden Schritte durchgeführt:

Denaturierung für 30 Sekunden bei 95 °C

Hybridisierung der Oligonukleotide für 60 Sekunden wobei sich die Temperatur nach der Schmelztemperatur der Primer richtete. Zur Ermittlung diente folgende Formel

$$T_m = G/C (4 \text{ °C}) + T/A (2 \text{ °C})$$

Elongation bei 72 °C für 0,5 – 1 min/kb abhängig von der verwendeten Polymerase
Abschließend erfolgte eine Elongation bei 72 °C für 10 min. Die Analyse erfolgte in einem analytischen Agarosegel (2.2.1.8).

2.2.1.5 Segregations-PCR

Da das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 mehrere Genomkopien aufweist, muss zur Überprüfung der homologen Rekombination eines DNA-Fragmentes in alle Genomkopien, mit isolierter cyanobakterieller DNA, (2.2.1.2) eine Segregations-PCR durchgeführt werden. Durch die Integration eines DNA-Fragmentes an einer spezifischen Stelle im Genom, vergrößert sich dieser Bereich. Der resultierende Größenunterschied, der mittels der PCR erhaltenen Amplifikate, kann anhand eines Agarosegels (2.2.1.8) sichtbar gemacht werden. Der PCR-Ansatz entsprach grundlegend dem in 2.2.1.4 Beschriebenen. Die Menge an eingesetzter genomischer DNA wurde auf 1 bis 2 μg erhöht.

2.2.1.6 Klonierung in einen TA-Vektor

Es wurden die Vektoren pGEMT-Easy der Firma Promega sowie der Vektor pSTBlue-1 der Firma Novagen nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.1.7 Restriktion von DNA

Etwa 0,5 – 1 µg isolierte Plasmid-DNA wurde mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen der Firmen New England Biolabs (Ipswich, MA, USA), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und Invitrogen (GmbH Karlsruhe) geschnitten. Analytische Restriktionen wurden in einem 10 µl Ansatz und Präparate in einem Volumen von 50 µl bei den jeweiligen vom Hersteller angegebenen Restriktionsbedingungen durchgeführt. Die Analyse erfolgte in einem analytischen Agarosegel.

2.2.1.8 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten, wurde ein 1 – 2 % Agarosegel angesetzt. Für ein (8,0 x 7,0 cm) Gel, wurde die entsprechende Menge Agarose in 40 ml TAE-Puffer (0,4 M Tris, 10 mM EDTA, 200 mM Essigsäure) in der Mikrowelle vollständig gelöst und in die dafür vorgesehene Kammer gegossen. Anschließend wurde der benötigte Probenkamm eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet und die Proben im Verhältnis 5:1 mit 6x Probenpuffer (50 % Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol) versehen. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 – 130 V und dauerte 30 bis 60 min. Das Gel wurde ca. 15 min in einer Ethidiumbromidlösung (1µg/ml) inkubiert, bevor die Visualisierung anhand von UV-Licht erfolgte.

2.2.1.9 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Anschließend an eine elektrophoretische Auftrennung wurden DNA-Fragmente gegebenenfalls mit Hilfe eines Skalpells auf einem UV Tisch aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA wurde mittels des Gelextraktionskits *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* (Avegene, Taipei City, Taiean) extrahiert und jeweils in 35 µl H₂O aufgenommen.

2.2.1.10 Ligation von DNA

Für die Ligation wurde die T4-DNA-Ligase der Firma MBI Fermentas (St-Leon-Rot) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Ligation wurde über Nacht bei 16 °C oder bei Raumtemperatur (RT) 1 – 2 h in einem Volumen von 20 µl mit einem Vektor:Insert Verhältnis von 1:3 bis 1:6 durchgeführt.

2.2.1.11 Ortsspezifische Mutagenese

Zielgerichtete Mutationen wurden mit der Phusion-DNA-Polymerase (Finnzymes Espoo, Finnland) in bestimmte Gene eingefügt. Hierzu wurde nach dem Protokoll des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene vorgegangen.

2.2.1.12 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach Chung *et al.* (Chung *et al.* 1989). Für die Transformation wurden 50 – 500 ng Plasmid-DNA 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzschock von 60 Sec bei 42 °C. Nach einer weiteren Inkubation von 5 min auf Eis wurden 1 ml LB-Medium hinzugegeben und die Zellen 1 h bei entsprechender Wachstumstemperatur in einem Inkubationsschüttler (Thermomixer, Eppendorf) bei 250 UpM inkubiert. Abschließend wurden 250 – 1000 µl der Zellen auf LB-Selektivplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei der optimalen Wachstumstemperatur inkubiert.

2.2.1.13 Transformation in *Synechocystis sp.*

Da es sich bei *Synechocystis sp.* PCC6803 um einen natürlich kompetenten Stamm handelt, mussten die Zellen nicht chemisch kompetent gemacht werden. Für die Transformation von DNA wurde eine Bakterienkultur bei einer $OD_{750} < 1$ abzentrifugiert (3600 UpM, 15 min, RT) und das Pellet in einem ermittelten Volumen BG-11 Medium resuspendiert, um eine $OD_{750} = 2,5$ zu erzielen. Anschließend wurde in einem Reagenzglas zu 400 µl Kultur bis zu 5 µg Plasmid-DNA und 5 mM Glukose gegeben. Bei der Negativkontrolle wurde H₂O anstatt der Plasmid-DNA eingesetzt. Diese Ansätze wurden über Nacht bei 30 °C und einer Belichtung von 40 µE/m² inkubiert bevor das gesamte Volumen auf eine BG11-Selektivplatte ausplattiert und bei 30 °C inkubiert wurde.

2.2.1.14 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG (Martinsried) durchgeführt.

2.2.2 Biochemische Arbeitsmethoden

2.2.2.1 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Die Expression rekombinanter Proteine erfolgte in verschiedenen *E. coli* Expressionsstämmen. Hierzu wurden 1 bis 1,5 L LB-Medium oder TB-Medium mit 0,1 Vol. einer Vorkultur angeimpft und bei der entsprechenden Wachstumstemperatur und 200 UpM inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 erfolgte eine Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG. Nach einer weiteren Inkubation von 3 bis 4 h wurden die Zellen bei 4600 UpM, 15 min abzentrifugiert und das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C weggefroren.

2.2.2.2 Trennung der Zellkomponenten

Das Zellpellet einer Expression (2.2.2.1) wurde in Lysispuffer (50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0), resuspendiert. Nach Zugabe eines Protease-Inhibitor-Cocktails der Firma Sigma Aldrich in einem Verhältnis 1/1000 wurden die Zellen durch eine Ultraschallbehandlung von 4 min und vier Wiederholungen lysiert. Zelltrümmer und Einschlusskörperchen wurden durch einen Zentrifugationsschritt (13000 Upm, 4°C, 15 min) abgetrennt. Der Überstand wurde durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (40000 Upm, 4 °C, 1 h) in lösliche Proteine im Überstand und Membranfraktion im Pellet aufgetrennt.

2.2.2.3 Solubilisierung von Membranproteinen

Zur Solubilisierung wurden isolierten Membranen in einem Volumen von 20 – 50 ml Puffer (50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0, 1 % Triton-X-100) aufgenommen und 1 h bei 40 °C inkubiert. Nach einem 30 minütigen Zentrifugationsschritt bei 40000 und 4 °C wurde der Überstand mit den solubilisierten Membranen in ein frisches Gefäß überführt.

2.2.2.4 Dialyse von Proteinlösungen

Um die Puffer von Proteinlösungen auszutauschen oder um bestimmte Substanzen aus einer Lösung zu entfernen, wurden die Proben in einen Dialyseschlauch mit geeigneter Porengrößen gegeben und gegen ein hundertfaches Volumen über Nacht bei 4 °C unter leichtem Rühren dialysiert.

2.2.2.5 Reinigung von Proteinen über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Die Reinigung der rekombinant exprimierten Proteine aus den verschiedenen Zellkomponenten über Ni²⁺-Affinitätschromatographie erfolgte mit dem Material der Firma Qiagen (Hilden). Die Probenvorbereitung sowie die Reinigung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.2.6 Reinigung von Proteinen über an Sepharose gebundene Metallionen

Das Säulenmaterial Chelating Sepharose™ Fast Flow der Firma GE Healthcare wurde mit je einem Säulenvolumen der Metallionen Zn⁺ (0,2 M ZnSO₄, 10 % Essigsäure), Ni²⁺ (0,2 M Ni(NO₃)₂), Cu²⁺ (0,2 M CuSO₄) und Co²⁺ (Co(NO₃)₂) beladen. Die Reinigung wurde in einem 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0 durchgeführt und die Elution erfolgte über verschiedene Imidazolkonzentrationen wie vom Hersteller beschrieben.

2.2.2.7 Reinigung von Proteinen über Anionenaustauschchromatographie

Zur Anionenaustauschchromatographie wurde das Säulenmaterial DEAE Sephacel™ der Firma GE Healthcare verwendet. Die Equilibrierung und Reinigung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde ein 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,6 verwendet und die Elution erfolgte über einen ansteigenden Gehalt von NaCl in einem Bereich zwischen 100 – 1000 mM.

2.2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration der Proteine wurde mit dem *BCA™ Protein Assay Kit* (Pierce, Reckford, IL, USA) ermittelt. Es wurde jeweils ein dreifacher Reaktionsansatz gemessen und der Mittelwert errechnet.

2.2.2.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden nach Laemmli (Laemmli 1970) in einer diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Die Gele bestanden aus einem 12 – 18 %-igen Trenngel und einem 6 %-igen Sammelgel (Tab. 1). Das Trenngel wurde dabei nach dem Gießen mit Isopropanol beschichtet und erst nach dem Auspolymerisieren und dem Entfernen des Isopropanols wurde das Sammelgel gegossen und der jeweilige Probenkamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden in einem Verhältnis 4:1 mit 5x Probenpuffer (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 % SDS, 0,2 % Bromphenolblau, 50 % Glycerol, 500 mM β -Mercaptoethanol) versehen und vor dem Auftragen 5 min bei 95 °C erhitzt. Der komplette Gellauf erfolgte in Lauffpuffer (25 mM Tris, 0,192 M Glycin, 0,1 % SDS), wobei der Einlauf in das Sammelgel bei 100 V und die Trennung im Trenngel bei 200 V stattfand. Der Lauf wurde beendet, wenn die Lauffront am unteren Ende des Gels angelangt war.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Trenngels und Sammelgels

	Trenngel			Sammelgel
	12 %	14 %	16 %	6 %
H ₂ O	4,5 ml	4,0 ml	3,5 ml	6 ml
Acrylamid (40 %)	3,0 ml	3,5 ml	4,0 ml	1,5 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
APS (10 %)	25 μ l	25 μ l	25 μ l	25 μ l
TEMED	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l

2.2.2.10 Coomassie Färbung von Proteinen in SDS-Gelen

Die Anfärbung der Proteine wurde mit einer Coomassie-Färbelösung (45 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 0,2 % Coomassie R250) gewährleistet. Hierzu wurden die Gele um überschüssiges SDS zu entfernen mit H₂O gewaschen und dann 20 bis 60 min in der

Färbelösung inkubiert. Die sich anschließende Entfärbung (45 % Ethanol, 10 % Essigsäure) wurde bis zum Erreichen des gewünschten Entfärbungsgrads durchgeführt.

2.2.2.11 Western-Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden zum immunologischen Nachweis in einem Semi-Dry Verfahren auf eine Roti[®]PVDF (Roth, Karlsruhe) Membran übertragen. Die Membran wurde hierfür zunächst in Methanol aktiviert und dann in Blottingpuffer (15 % Methanol, 25 mM Tris, 0,192 M Glycin) geschwenkt. Der Aufbau der Apparatur erfolgte nach Herstellerangaben (BioRad, München). Der Transfer erfolgte für 45 min bei 15 V.

2.2.2.12 Immunodetektion von Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine auf eine Membran wurde diese, um unspezifische Bindungen zu vermeiden, zunächst 1 h in einer 4 %-igen Blockierungslösung (4 % Milchpulver in TBST) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran 4 x mit TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween) gewaschen und mit dem nach Herstellerangaben in TBST verdünnten ersten Antikörper ca. 1 h inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit TBST erfolgte die einstündige Inkubation mit dem zweiten, ebenfalls nach Herstellerangaben in TBST verdünnten, Antikörper. Nach erneutem Waschen wurde der Western-Blot mit dem Pierce *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA) nach Herstellerangaben entwickelt.

2.2.2.13 Quervernetzung von Proteinen (*Crosslinking*)

Für die Quervernetzung von Proteinen mit Glutaraldehyd (Sigma, München) wurde zunächst die Proteinkonzentration wie in 2.2.2.8 beschrieben ermittelt. In einem Volumen von 9,5 µl wurden 2 µg Protein 10 min bei folgenden Temperaturen inkubiert 10 °C, 20 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C 70 °C, 75 °C, 80 °C. Anschließend erfolgte die Zugabe von 25 mM Glutaraldehyd und eine weitere Inkubation von 10 min bei den oben genannten Temperaturen. Das Abstoppen der Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 µl 2 x Laemmli-Puffer und dem Erhitzen von 5 min bei 95 °C erzielt. In einer SDS-PAGE (2.2.2.9) wurde der gesamte Ansatz aufgetrennt und mit Coomassie (2.2.2.10) gefärbt.

2.2.2.14 Das GALLEX-System zur Analyse der Dimerisierungstendenz

Im GALLEX-System wird ein gewünschtes Protein an die LexA-Dimerisierungsdomäne fusioniert, wobei das Stop-Codon des zu untersuchenden Gens erhalten bleibt. Hierdurch wird das Maltosebindeprotein (MBP) nicht abgelesen und das Protein liegt weiterhin löslich vor. Um die Expression des Fusionsproteins von dem P_{LexA}-Plasmid zu ermöglichen, wurden die Konstrukte und die entsprechenden Kontrollen zunächst in kompetente SU101 Zellen transformiert (2.2.1.12). Am nächsten Tag wurden von jedem Transformationsansatz drei Kolonien in 3 ml Flüssigmedium (LB, 100 µg/ml Ampicillin, 10 µg/ml Chloramphenicol, 0,01 mM IPTG) angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 10 ml Flüssigkultur (LB, 10 µg/ml Ampicillin, 10 µg/ml Chloramphenicol, 0,5 mM IPTG) mit 1/40 Volumen der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 inkubiert.

Zu 900 µl Z-Puffer (300 mM Na₂HPO₄, 200 mM NaH₂PO₄, 50 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 50 mM β-Mercaptoethanol) wurden 100 µl Kultur, 10 µl 0,1 % SDS und zwei Tropfen Chloroform gegeben und zur Lyse der Zellen stark geschüttelt. Der Nachweis der β-Galaktosidase-Aktivität wurde durch die Zugabe von 200 µl ONPG (4 mg/ml) in Z-Puffer gestartet und nach ausreichender Färbung durch Zugabe von 500 µl 0,5 M Natriumcarbonat gestoppt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde die OD₄₂₀ und die OD₅₅₀ in einem Photometer ermittelt. Die Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach folgender Formel (Miller *et al.* 1993):

$$1 \text{ Miller Unit} = \frac{1000 \times OD_{420} - (1,75 \times OD_{550})}{\text{Zeit [min]} \times 0,1 \text{ ml} \times OD_{660}}$$

2.2.2.15 Circular dichroismus-Spektroskopie

CD-Spektren wurden mit dem CD-Spektrometer Jasco-815 zur Bestimmung der Sekundärstruktur und der thermischen Stabilität des GrpE-Proteins aufgenommen. Hierzu wurde zunächst die Proteinkonzentration der heterolog exprimierten Proteine bestimmt (2.2.2.8). Zur Messung wurde eine Proteinkonzentration von 0,125 mg/ml in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,6 verwendet. Die Messung erfolgte in einer 1 mm Küvette von 190 bis 250 nm in 1 nm Schritten. Die Geschwindigkeit der Messung wurde auf 200 nm/min

eingestellt. Die Datenaufnahme erfolgte in einem Temperaturbereich von 10 – 95 °C. Dabei wurde die Temperatur in 1 °C Schritten erhöht wobei vor dem Beginn der Messung die entsprechende Temperatur 5 Sec gehalten wurde. Die Auswertung erfolgte abschließend mit der *Spectra Analysis* Software. Von allen Messpunkten wurde die molare Eliptizität berechnet.

$$\text{deg x cm}^2/\text{dmol} = \frac{m_0 * M}{(10 * L * C)}$$

(m₀: Messwert, M: Molekulargewicht g/L, L: Schichtdicke, C: Konzentration g/L)

Anhand der Messwerte bei 208 nm abzüglich des Puffers wurde die Schmelzkurve ermittelt.

2.2.2.16 *In vivo* Komplementationsstudien

Komplementationsstudien erfolgten mit temperaturempfindlichen *E. coli* Stämmen anhand eines Wachstumsexperiments. Dabei lag das endogene *E. coli* Gen *lepB* oder *grpE* in einer mutierten Form vor. Durch die Expression eines Gens, dessen Genprodukt die Funktion des endogenen Proteins LepB oder GrpE in *E. coli* übernehmen kann, ist ein Wachstum bei erhöhter Temperatur möglich. Hierzu wurden die zu untersuchenden *grpE* Gene und die verkürzten Formen in den Vektor pMalc2-x und die *lepB* Gene *sl10716* und *slr1377* in den Vektor pBad kloniert. Als Negativkontrolle diente das leere Plasmid und als Positivkontrolle das endogene Gen *lepB* oder *grpE* aus *E. coli*. Für die Komplementation des GrpE-Proteins wurde der Stamm OD212ΔGrpE (Liberek *et al.* 1991) und für das LepB der Stamm IT41GE225 (Inada *et al.* 1989) verwendet. Nach der Transformation der Plasmide folgte eine Inkubation der LB-Selektivplatten bei 30 °C über Nacht. Am folgenden Tag wurde die Vorkultur von 3 ml jeweils mit einer Kolonie der Transformationsplatte angeimpft und bei 30 °C und 200 UpM inkubiert. Die Hauptkultur von 10 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurde mit einer OD₆₀₀ von etwa 0,1 – 0,2 angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ 0,5 bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in LB-Medium von 10⁻² bis 10⁻⁶ verdünnt. Jeweils 2 µl jeder Verdünnung wurden auf eine LB-Platte mit den entsprechenden Antibiotika getropft. Die Expression wurde, je nach System, durch die Zugabe von IPTG (0,005 mM) oder durch die Zugabe von 0,5 % Arabinose induziert. Die Platten wurden über Nacht bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die Auswertung erfolgte am nächsten Tag anhand des Wachstums.

2.2.2.17 PAM (Pulse Amplitude Measurements)-Messungen

PAM-Messungen dienen zur Untersuchung der Aktivität der Photosysteme. Kulturen von *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurden auf eine OD_{750} von 2 eingestellt und anschließend für die Messung verwendet. Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur und die Kulturen wurden bis zur Messung im Dunkeln gehalten. Die Messungen wurden mit einer Dual-PAM-100 und im speziellen mit den Modulen Dual-E und Dual-ER (Walz GmbH, Effeltrich) durchgeführt.

Induktionskurve

Die Messung der Hintergrundfluoreszenz erfolgte bei einem schwachen Messlicht von $0,024 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Anschließend wurde ein aktinisches rotes Licht von einer Intensität von $95 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ zugeschaltet. Ein einmaliger sättigender Lichtpuls von 600 ms ($10000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) wurde während der initialen Dunkelphase (40 s) und anschließend alle 30 sec abgegeben. Die minimale Fluoreszenz (F_0) und die variable Fluoreszenz (F_v) wurden während des ersten Lichtblitzes ermittelt.

P700 Re-Reduktionskinetiken

Die Re-Reduktionskinetiken des P700 wurden aus 10 Wiederholungen gemittelt. Die vollständige Oxidation des P700 erfolgte durch einen sättigenden Lichtpuls von 20 ms ($10000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Die Messung wurde nach der Zugabe von DCMU ($10 \mu\text{M}$) wiederholt. Die Halbwertszeiten der Abnahme wurden anhand einer exponentiellen Funktion ermittelt.

Elektronentransportraten

Die Elektronentransportraten wurden anhand der *steady state* Fluoreszenz (F_t) und der maximalen Fluoreszenz (F_m') ermittelt. Der F_t -Wert wurde durch eine Lichtkurve mit schrittweise ansteigenden Lichtintensitäten zwischen 0 bis $850 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ von je 30 Sec bestimmt. Am Ende jeder Lichtintensität erfolgte die Bestimmung der maximalen Fluoreszenz (F_m') durch einem sättigenden Lichtpuls.

2.2.2.18 Bestimmung der Sauerstoffentwicklung

Die Sauerstoffentwicklung wurde als Anhaltspunkt für die photosynthetische Aktivität mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode bestimmt. Kulturen von *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurden auf eine OD_{750} von 2 eingestellt und für die Messung verwendet. Zur Detektion der Photosyntheserate wurden NaHCO_3^- (10 mM) bzw. der Elektronenakzeptor PPBQ (Phenyl-p-benzoquinone) ($0,5 \text{ mM}$) zu der Kultur hinzugegeben. Die Messung erfolgte unter leichtem

Rühren in einem abgedunkelten Raum. Zu Beginn erfolgte eine zweiminütige Messung ohne Belichtung und anschließend wurde bei einer Belichtung von 2000 K (Farbtemperatur) die Entwicklung der Sauerstoffproduktion für 2 min verfolgt. Durch die Steigung konnte die O₂-Produktion ermittelt werden. Die Messung wurde jeweils drei Mal wiederholt und der Mittelwert berechnet.

2.2.2.19 Chlorophyllbestimmung

Die Ermittlung der Chlorophyllkonzentration von ganzen Zellen und von isolierten Membranen erfolgte nach (Porra *et al.* 1989) in Methanol.

2.2.2.20 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Thoma-Zählkammer verwendet. Die cyanobakteriellen Zellen wurde in BG11-Medium soweit verdünnt, dass nach der Zugabe von 10 µl Kultur nicht mehr als 20 Zellen pro Großquadrat gezählt wurden. Es wurden mindestens fünf Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Die Zellzahl wurde nach folgender Formel ermittelt.

$$\text{Zellen/ml} = \frac{\text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnung}}{\text{mm}^2 \times \text{Kammertiefe}}$$

2.2.2.21 77 K-Fluoreszenzspektren

Die Fluoreszenzspektren der Zellen von *Synechocystis* sp. nach heterotrophem Wachstum im Dunkeln und nach verschiedenen Zeitpunkten im Licht wurden bei 77 Kelvin gemessen. Die zu messende Kultur wurde auf eine OD₇₅₀ von 2 eingestellt und 1 ml in eine Küvette gegeben und sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden bei einer Wellenlänge von 435 nm und bei 580 nm angeregt. Das Fluoreszenzemissionsspektrum wurde in einem Bereich von 630 bis 760 nm aufgenommen.

2.2.2.22 Absorptionsspektren

Absorptionsspektren ganzer Zellen wurden an einem Photometer in einem Bereich zwischen 200 – 800 nm gemessen, wobei die Kultur auf eine konstante Zellzahl eingestellt wurde. Mit Hilfe dieser Messung wurde das PC/Chlorophyll Verhältnis wie bei (Bennett *et al.* 1973) beschrieben ermittelt.

2.2.2.23 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte an einem konfokalen Lasermikroskop (Leica TSC SP, Heidelberg). Die Kulturen wurden auf eine OD₇₅₀ zwischen 3 – 5 eingestellt um eine ausreichende Anzahl an Zellen detektieren zu können. Zur Fixierung der Zellen wurden diese auf BG11-Medium mit 1 % Agarose gebettet und anschließend mit einem Deckglas abgedeckt. Die Zellen wurden mit einem Öl-Immersionsobjektiv betrachtet und mit einem Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Die Emission des GFPs wurde zwischen 510 – 515 nm und die Autofluoreszenz bei 660 nm detektiert.

2.2.2.24 Blau-Native-Gelelektrophorese

Die Blaue-Native-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von hochmolekularen Proteinkomplexen. Die Präparation der Membranfraktion aus Kulturen von *Synechocystis* sp. erfolgte nach (Duhring *et al.* 2006). Bei den Kulturen von *Synechocystis* sp. welche unter heterotrophen und mixotrophen Bedingungen angezogen wurden, erfolgte der Auftrag nach zuvor bestimmter Proteinkonzentration (2.2.2.8). Auf das Gradientengel wurde eine Proteinkonzentration zwischen 250 µg bis hin zu 1 mg aufgetragen und die freien Spuren mit *free slot buffer* (750 mM Aminocaprinsäure, 0,5 % Coomassie Blue G250) versetzt. Eine Ampulle des Markers *HMW Native Marker Kit* (GE Helathcare Europe GmbH, München) wurde in 100 µl BN-Thylakoidpuffer (50 mM HEPES/NaOH pH 7, 5 mM MgCl₂, 25 mM CaCl₂, 10 % (v/v) Glycerol) aufgenommen und 50 µl wurden pro Gel mit 10 µl Coomassie Blue Lösung (5 % Coomassie Blue G250, 750 mM Aminocaprinsäure) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Für die Präparation des Gels und die Elektrophorese wurde das System *Protean II XL* der Firma BioRad verwendet. Die 18,5 x 20 cm großen Gradientengele von 4,5 – 12 % wurden von unten gegossen wobei die beiden Trenngellösungen sukzessive gemischt und über eine Peristaltikpumpe in die Gießvorrichtung gepumpt wurden. Das

entstandene Trenngel wurde nach dem Auspolymerisieren mit dem Sammelgel überschichtet und der entsprechende Probenkamm eingesetzt. Die auspolymerisierten Gele wurden über Nacht bei 4 °C aufbewahrt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Gradientengele

	Trenngel	Sammelgel	
	4,5 %	12,6 %	
H ₂ O	15,4 ml	5,65 ml	11 ml
Acrylamid (40 %)	2,36 ml	5,83 ml	1,5 ml
6x Gelpuffer (1,5 M Aminocaprinsäure, 0,15 M Bis-Tris pH 7)	3,5 ml	3 ml	2,5 ml
Glycerin (87 %)	-	4,02 ml	-
APS (10 %)	95 µl	61 µl	150 µl
TEMED	9,5 µl	6,1 µl	75 µl

Vor der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel in die Apparatur eingespannt, auf Dichtigkeit hin überprüft und anschließend der Kathodenpuffer (50 mM Tricin, 15 mM Bis-Tris pH 7, 0,02 % (w/v) Coomassie Blue G250, 0,03 % β-DM (n-Dodecyl-β-maltosid)) in die obere und der Anodenpuffer (50 mM Bis-Tris pH 7) in die untere Kammer gefüllt. Der Gellauf erfolgte über Nacht bei 4 °C. Dabei wurde zunächst eine elektrische Spannung von 100 V angelegt, bevor diese nach dem Erreichen des Trenngels durch die Lauffront, auf 150 V erhöht wurde. Gestoppt wurde der Lauf, nachdem die Lauffront das Ende erreicht hat. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (2.2.2.10) und bis zum gewünschten Punkt entfärbt.

2.2.2.25 Saccharosedichte-zentrifugation

Bei der Saccharosedichte-zentrifugation wandern bei einer Zentrifugation, Proteine und Proteinkomplexe in einem Gradienten abhängig von ihrer Dichte wodurch eine Auftrennung der Membranproteinkomplexe erzielt wird. Die Präparation der Membranen der heterotrophen und mixotrophen wachsenden *Synechocystis* sp. Kulturen erfolgte nach (Duhring *et al.* 2006)

wobei eine Proteinkonzentration zwischen 250 µg und 1 mg auf die zuvor hergestellten Saccharosegradienten geladen wurde. Die linearen Gradienten wurden nach (Duhring *et al.* 2006) hergestellt und 17 h bei 154000x g und 4 °C in einem Aufschwungrotor (90 Ti) zentrifugiert.

2.2.2.26 Spaltungsexperiment

Für die Spaltungsexperimente wurden die Substrate in einer gekoppelten *in vitro* Transkription und Translation synthetisiert. Der 25 µl Ansatz bestand aus 5 µl Kompensationspuffer (40 mM TEA/Tris, 140 mM K⁺, 10 mM Mg²⁺, 0,8 M Spermidin), 0,25 µl DTT (200 mM), 4,25 µl Mastermix (18,8 % PEG 6000, 14,7 mM ATP, 3 mM GTP, 3 mM UTP, 3 mM CTP, 59 mM KOH, 24 mM jeder der 18 Aminosäuren bis auf Met und Cys), 0,4 µl Kreatinphosphat (500 mM), 0,1 µl Kreatinphosphokinase (10 mg/ml), 3 µl Zellextrakt von dem *E. coli* Stamm S135, 0,1 µl T7-Polymerase, 0,5 µl S³⁵-Met+Cys und 1 µg DNA. Die Reaktion wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und durch die Zugabe von 5 % TCA gestoppt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurde die Lösung abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 13000 UpM) und das Pellet in 30 µl SDS-Probenpuffer welcher aus der Lösung A (200 mM Tris, 20 mM EDTA pH 8,0), Lösung B (8,3 % SDS, 83,3 mM Tris, 29 % Glycerol, 0,04 % Bromphenolblau) und DTT (1 M) in einem Verhältnis von 5:4:1 angesetzt wurde resuspendiert. Nach dem Aufkochen für 5 min bei 95 °C wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.2.9).

Anschließend an den Gellauf, erfolgte ein 15 minütiges Fixieren (35 % Ethanol, 10 % Essigsäure) sowie das Entfernen des Fixierers mit Wasser. Das Gel wurde unter Vakuum auf einem Streifen Whatmanpapier getrocknet. Nach der Exposition über Nacht auf einem *PhosphorScreen* (GE Healthcare GmbH), wurde die Radioaktivität mit dem Phosphorimager *Storm845* (GE Healthcare GmbH) gemessen.

Für den Spaltungsversuch mit den Signalpeptidasen LepB1 und LepB2 wurde zu je einem Ansatz das Protein in einer Konzentration zwischen 0,08 µM und 1,125 µM und zusätzlich 1 % Triton-X-100 gegeben. Nach einer weiteren 30 minütigen Inkubation bei 30 °C wurden die Reaktionen wie bereits beschrieben abgestoppt und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Thylakoidmembranbiogenese

Zur Untersuchung der Thylakoidmembranbiogenese wurden Kulturen des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 zwei Wochen unter LAHG Bedingungen kultiviert, bevor ein anschließender Transfer ins Licht erfolgte. Nach definierten Zeitpunkten des Wachstums im Licht, wurden verschiedene Parameter untersucht um Veränderungen bezüglich des Thylakoidmembransystems festzustellen. Dabei wurden die Zeitpunkte zwischen 0 h und 24 h gewählt.

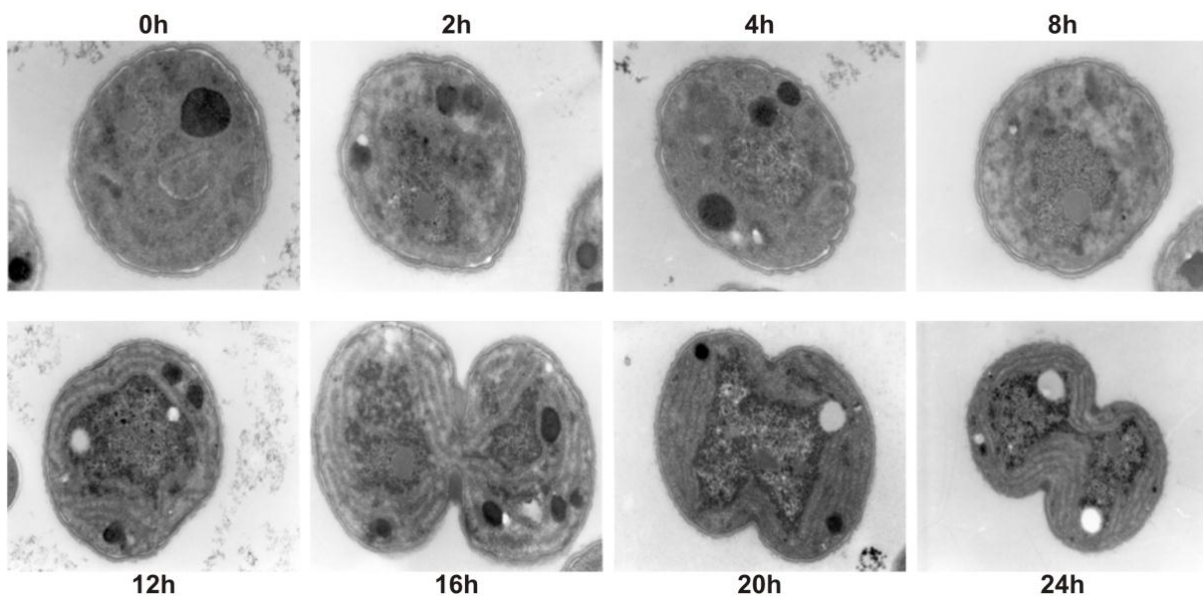


Abbildung 12: EM-Bilder der dunkeladaptierten Zellen von *Synechocystis* sp. nach dem Transfer ins Licht bei verschiedenen Zeitpunkten

Die EM-Bilder zeigen jeweils eine Zelle bzw. eine sich teilende Zelle bei verschiedenen Zeitpunkten nach dem Transfer ins Licht (In Zusammenarbeit mit Uwe Kahrmann).

In einem ersten Schritt wurden hierzu die Zellen nach bestimmten Zeitpunkten anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen phänotypisch charakterisiert (Abb. 12).

Die Aufnahmen zeigen cyanobakterielle Zellen umgeben von der Cytoplasmamembran und der äußeren Membran. Nach der Inkubation der Zellen unter heterotrophen Bedingungen im Dunkeln (0 h), sind keine Thylakoide sichtbar und das Zellinnere zeigt eine diffuse Struktur

ohne eine klare Abgrenzung von Thylakoiden, wie etwa nach 24 h zu erkennen ist. Ein vergleichbares Bild zeigen die Zellen nach zwei bis vier Stunden unter Belichtung, wogegen nach zwölf Stunden erste deutliche Konturen des Thylakoidmembransystems zu erkennen sind. Die Anzahl der Thylakoidpaare steigt nach 16 und 20 Stunden stetig an, bis nach 24 Stunden wieder ein komplettes Thylakoidmembransystem deutlich zu erkennen ist. Trotz der drastischen Unterschiede im Bezug auf die Thylakoidstrukturen, weisen die Zellen keine Größenunterschiede auf.

Nach der Visualisierung der Membranbiogenese anhand von EM-Bildern wurde die Regeneration der Thylakoide mit Hilfe der Autofluoreszenz verfolgt. *Synechocystis* sp. PCC 6803 besitzt an die Photosysteme gekoppelte Chlorophylle, welche nach Anregung bei 435 nm im Bereich um 660 nm eine starke Emission aufzeigen. Die Fluoreszenz wurde im Fluoreszenzmikroskop sichtbar und konnte quantitativ ausgewertet werden (Abb. 13).

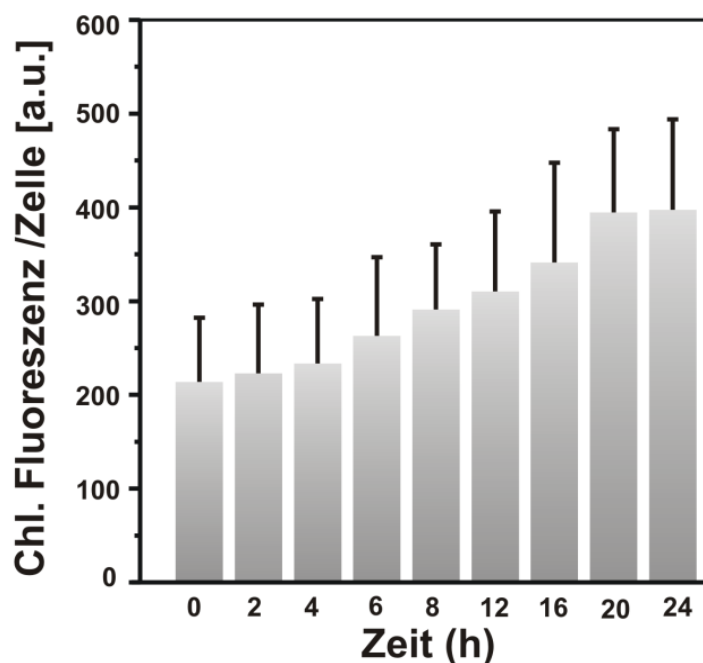


Abbildung 13: Autofluoreszenz der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Transfer ins Licht

Die Autofluoreszenz wurde bei einer Extinktion von 435 nm und einer Emission bei 660 nm detektiert und anschließend anhand der Software *MetaVue* quantitativ über die Pixelanzahl pro Zelle ausgewertet. Jeder Datenpunkt ist das Mittel aus 100 Einzelzellen und die Standardabweichung wurde daraus berechnet. Die Autofluoreszenz der Zellen steigt im Verlauf der Zeit konstant an.

Nach der Inkubation im Dunkeln (0 h) zeigt sich eine sehr geringe Autofluoreszenz, welche jedoch nach einer kurzen Phase bis zu vier Stunden ohne drastische Veränderungen, mit der

Belichtungszeit kontinuierlich ansteigt. Nach 20 h ist die relative Autofluoreszenz verglichen zu den dunkeladaptierten Zellen etwa doppelt so hoch, was auf einen erhöhten Chlorophyllgehalt zurückzuführen ist.

Der Chlorophyllgehalt der Zellen wurde ebenfalls bestimmt und auf die zuvor berechnete Zellzahl bezogen (Abb. 14). Der Gehalt an Chlorophyll innerhalb einer Zelle steigt bis zu acht Stunden langsam und anschließend bis 16 h stark an. Dieser Wert ändert sich bei weiterer Inkubation im Licht bis 24 h nur minimal.

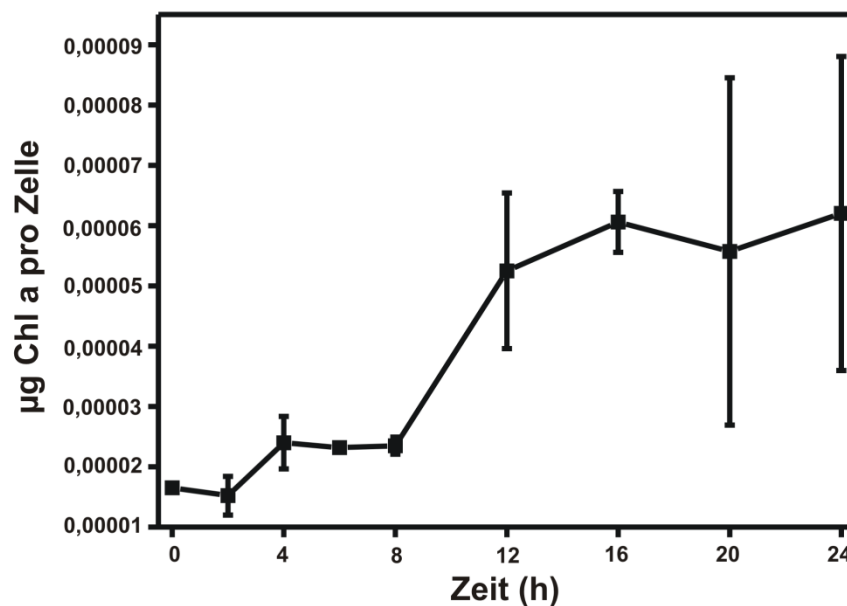


Abbildung 14: Bestimmung des Chlorophyllgehaltes pro Zelle nach steigender Wachstumsdauer im Licht

Die gemessene Chlorophyllkonzentration wurde auf die zuvor bestimmte Zellzahl bezogen. Jeder Datenpunkt (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h) wurde aus fünf Einzelmessungen ermittelt und die Standardabweichung berechnet.

3.1.1 Untersuchung der Pigmentzusammensetzung

Die Zusammensetzung und die Menge verschiedener Pigmente, darunter die Chlorophylle und Karotinoide sowie die Pigmente der Phycobilisomen, stellen innerhalb einer cyanobakteriellen Zelle einen entscheidenden Faktor für die Effizienz der Photosynthese dar. Chlorophyllmoleküle genauso wie Phycobilisomen liegen an die Photosysteme assoziiert vor und werden für die Energieübertragung zum aktiven Zentrum der Photosysteme benötigt. Einen ersten Hinweis auf Veränderungen innerhalb der Zusammensetzung der Pigmente lieferten Absorptionsspektren ganzer Zellen. Abb. 15A zeigt die Absorptionsspektren mit den charakteristischen Maxima bei 439 nm und 679 nm für die Chlorophyllmoleküle und einem

Maximum bei 625 nm, welches der Absorption der Phycobilisomen entspricht. Die dunkeladaptierten Zellen sowie die Zellen nach zwei stündiger Inkubation bei kontinuierlicher Belichtung zeigen bei den Chlorophyllmaxima eine Verringerung im Vergleich zu den Zellen nach einer Belichtungsdauer von sechs bis acht Stunden. Bei längerer Inkubation steigt die Absorption weiter an und nach 16 h ist im Vergleich zu 24 h kaum eine Veränderung zu detektieren. Auch bei der Absorption der Phycobilisomen bei 625 nm ist mit der Dauer des mixotrophen Wachstums ein kontinuierlicher Anstieg zu erkennen. Ein wichtiger Aspekt ist hierbei wie Abb. 15B zeigt, das Verhältnis zwischen Phycobilisomen und Chlorophyllen. Dabei wird deutlich, dass die dunkeladaptierten Zellen ein weitaus höheres Verhältnis aufzeigen, als die Zellen nach 24 stündiger Belichtung. Nach 12 stündiger Inkubation im Licht sinkt dieses Verhältnis stark ab und zusammen mit den Ergebnissen der Absorptionsspektren, zeigt sich somit zu Beginn ein höherer relativer Anteil an Phycobilisomen in den dunkeladaptierten Zellen. Unter Lichteinfluss und der daraus resultierenden Chlorophyllzunahme sinkt dieses Verhältnis auf einen Wert von etwa eins ab.

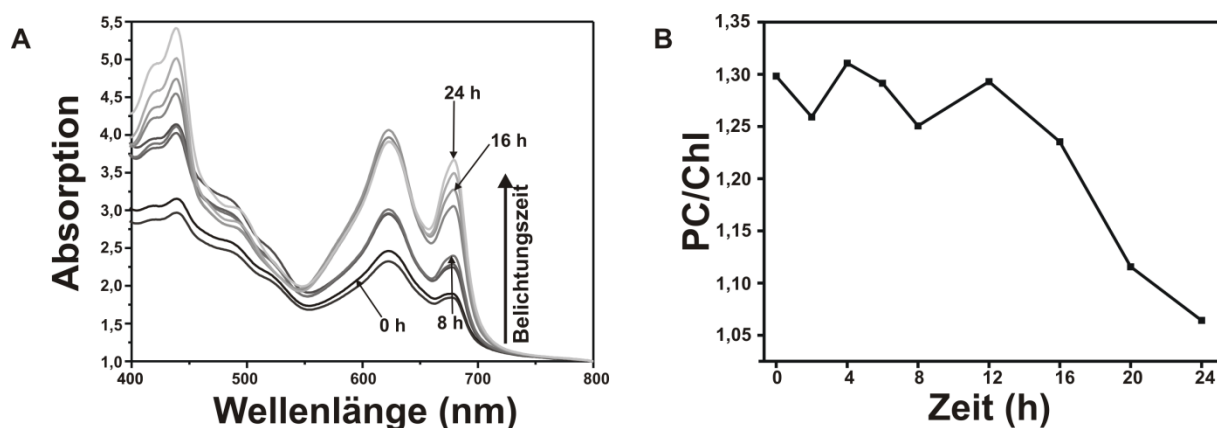


Abbildung 15: Absorptionsspektren ganzer Zellen bei verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums im Licht

A) Absorptionsspektren dunkeladaptierter Zellen nach der Überführung ins Licht, wobei die Kurven auf den Wert bei 800 nm normiert sind. Die Zeit der Belichtung liegt zwischen 0 h und 24 h (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h) was durch heller werdende Graustufen verdeutlicht ist. Die Maxima der Chlorophylle sind bei 439 nm und 679 nm, das Maximum der Phycobilisomen bei 625 nm und das der Karotinoide im Bereich von 500 nm. **B)** Das Verhältnis der Phycobilisomen (Phycocyanin) zu Chlorophyll wurde zu den einzelnen Zeitpunkten aus den Werten bei 679 nm und 625 nm berechnet.

Da die Maxima für die Chlorophylle sowohl das PS I als auch das PS II berücksichtigen, lassen die Absorptionsspektren keine Rückschlüsse auf Veränderungen innerhalb der einzelnen Photosysteme zu. Der Großteil der Chlorophylle liegt dabei an das PS I assoziiert vor, wobei die an das PS II assoziierten Chlorophylle bei Raumtemperatur eine stärkere

Fluoreszenz zeigen. Bei den 77 K-Spektren werden die Zellen auf 77 Kelvin gekühlt und anschließend die Fluoreszenzspektren aufgenommen. Dies bietet die Möglichkeit, Veränderungen in Bezug auf das Verhältnis von PS I zu PS II aufzuzeigen.

Abb. 16A zeigt die Spektren bei einer Anregung der Chlorophylle bei 435 nm mit den Maxima für die an das PS I assoziierten Chlorophylle bei 725 nm und die an das PS II assoziierten Chlorophylle bei 685 nm sowie 695 nm. Diese Spektren zeigen deutliche Unterschiede, wobei die dunkeladaptierten Zellen und die Zellen nach der Inkubation im Licht für zwei bis acht Stunden ein verringertes PS I zu PS II Verhältnis aufweisen. Erst nach einer Inkubation von 24 h ist das Verhältnis wieder ausgeglichen. Zusätzlich zeigen die Zellen nach Inkubation unter LAHG Bedingungen eine Verschiebung des Maximums der PS II-Fluoreszenzemission von 695 nm hin zu 685 nm und ein zusätzliche Signal bei 676 nm, welches mit zunehmender Dauer der Anzuchtbedingungen im Licht verschwindet. Parallel dazu verschiebt sich das Signal bei 685 nm mit andauernder Belichtung erneut hin zu 695 nm.

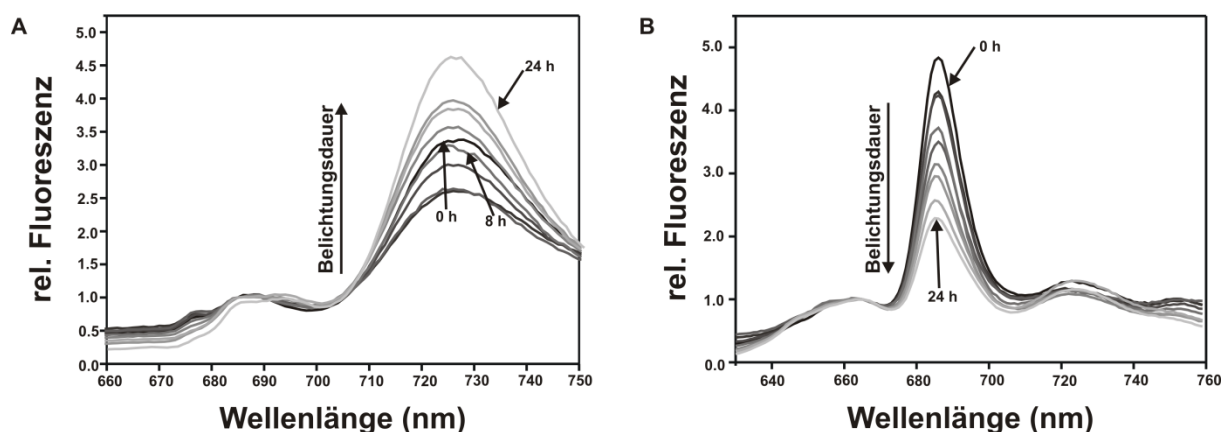


Abbildung 16: 77 K-Spektren der dunkeladaptierten und der belichteten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten

Dargestellt sind 77 K-Spektren der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten von 0 h (schwarz), 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h bis 24 h (hellgrau) **A)** Die Spektren der bei 435 nm angeregten Chlorophylle wurden auf 685 nm normiert. Das Maximum für PS II liegt bei 695 nm und das für PS I bei 725 nm. **B)** Die Spektren der Anregung der Phycobilisomen bei 580 nm wurden auf 665 nm normiert. Das Maximum für Phycobilisomen ist bei 679 nm, für PS II bei 695 nm und für PS I bei 725 nm.

Abb. 16B zeigt die Anregung der Phycobilisomen und somit die Energieübertragung von den Phycobilisomen auf das PS I (725 nm) und das PS II (685 nm). Zu Beginn der Inkubation im Licht ist eine starke Energieübertragung von den Phycobilisomen auf das PS II zu beobachten was andeutet, dass eine hohe Anzahl an das PS II gekoppelter Phycobilisomen vorliegt. Mit andauernder Belichtung sinkt diese Energieübertragung auf etwa die Hälfte ab, da

wahrscheinlich weniger an das PS II assoziierte Phycobilisomen vorhanden sind. Die Energieübertragung auf das PS I zeigt keine gravierenden Unterschiede zwischen den dunkeladaptierten und den Zellen nach 24 stündiger Inkubation unter mixotrophen Bedingungen.

3.1.2 Untersuchung der photosynthetischen Aktivität

Die EM-Bilder zeigten ein weitgehendes Fehlen der Thylakoide bei den unter LAHG Bedingungen wachsenden Zellen, was die Vermutung zulässt, dass die photosynthetische Aktivität, und damit gleichzusetzen die in den Thylakoiden lokalisierten Photosysteme, beeinträchtigt sind. Desweiteren zeigten die 77 K-Fluoreszenzspektren Unterschiede bezüglich des PS I zu PS II Verhältnisses und der Energieübertragung durch die Phycobilisomen. Anhand der Sauerstoffentwicklung bei der Photosynthese, sollte die photosynthetische Aktivität und damit die Aktivität des PS I sowie des PS II untersucht werden.

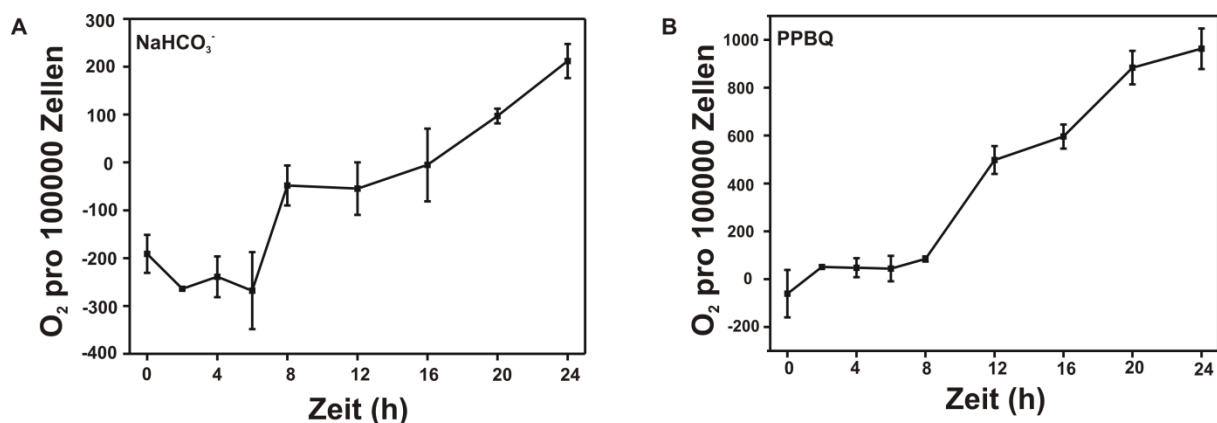


Abbildung 17: Sauerstoffentwicklung der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten unter mixotrophen Bedingungen

Die O₂-Entwicklung wurde aus fünf Einzelmessungen mit jeweils drei Wiederholungen ermittelt und die Standardabweichung berechnet. Alle Messungen wurden auf 100000 Zellen bezogen. **A)** zeigt die O₂-Entwicklung unter Zugabe von NaHCO₃⁻ und **B)** unter Zugabe des Elektronenakzeptors PPBQ (phenyl-p-benzoquinone) bei den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h des Wachstums im Licht.

Abb. 17A zeigt die Sauerstoffentwicklung unter Zugabe von NaHCO₃⁻, wodurch die komplette photosynthetische Aktivität ermittelt werden kann. NaHCO₃⁻ versorgt den Calvin-Zyklus, durch den wiederum das für den letzten Schritt der Photosynthese benötigte NADP⁺

bereitgestellt wird. Somit ist der limitierende Faktor nicht das NADP^+ , sondern die Elektronentransportrate der Photosynthese. Die Kurve zeigt einen ansteigenden Verlauf, wobei bei den dunkeladaptierten Zellen ein Verbrauch an O_2 detektiert werden kann. Erst nach einer Inkubation von acht Stunden bei stetiger Belichtung ist eine minimale O_2 -Produktion festzustellen, welche dann kontinuierlich ansteigt bis nach 24 h eine deutliche O_2 -Entwicklung zu messen ist. Abb. 17B zeigt die Ergebnisse der Messungen mit PPBQ, einem starken Elektronenakzeptor innerhalb des PS II, welcher die Funktion des Plastochinons Q_B ersetzt. Alle aus der Oxidation des Wassers entstehenden Elektronen, werden auf das PPBQ übertragen und somit kann die maximale O_2 -Entwicklung gemessen werden, da kein limitierender Faktor vorhanden ist. Auch bei der Messung mit PPBQ ist bei den dunkeladaptierten Zellen ein Verbrauch an O_2 zu detektieren. Nach bereits zwei Stunden des Wachstums der cyanobakteriellen Zellen im Licht, zeigt sich eine, wenn auch sehr geringen Sauerstoffentwicklung. Der Kurvenverlauf ist, mit einem kontinuierlichen Anstieg und einer maximalen O_2 -Entwicklung nach 24 h, mit der zuvor beschriebenen Messung vergleichbar. Die maximale Sauerstoffentwicklung ist bei der Messung mit PPBQ etwa dreimal höher als bei der Messung mit NaHCO_3^- . Zusätzlich ist bei der Messung mit NaHCO_3^- der O_2 -Verbrauch in den ersten Stunden höher als bei der Messung mit PPBQ.

Die Sauerstoffmessungen zeigten eine stark verringerte photosynthetische Aktivität während des Wachstums unter LAHG Bedingungen. Dieses Defizit kann in einer verringerten Funktion der Photosysteme begründet liegen, weshalb diese im Weiteren untersucht werden sollten. Bei den PAM-Messungen (Pulse-Amplitude-Measurements) wird vor allem der Status des Q_A dargestellt. Chlorophyllmoleküle können Energie auf verschiedenen Wegen abgeben. Neben der Umwandlung in photochemische Energie für die Photosynthese und Wärme, kann die Energie ebenso als Fluoreszenz abgegeben werden (Oxborough 2004). Hat das Plastochinon Q_A ein Elektron aufgenommen, befindet es sich in einem „geschlossenen“ Zustand und kann bis zur Weitergabe des Elektrons auf das Q_B , kein weiteres Elektron aufnehmen. Somit können die Chlorophyllmoleküle die Elektronen nicht weiter bis zum Plastochinon übertragen und geben ihre überschüssige Energie als Fluoreszenz ab, welche detektiert werden kann (Kautsky *et al.* 1960; Maxwell *et al.* 2000). Die Fluoreszenzintensität lässt dabei Rückschlüsse auf die Photosysteme und vor allem auf das PS II zu, da das PS I bei Raumtemperatur nur eine minimale Fluoreszenz aufweist. In einem ersten Versuch, den Messungen der Induktionskurve, werden die Zellen, nach einer Dunkelphase mit einem sättigenden Lichtpuls bestrahlt, wodurch die maximale Fluoreszenz (F_m^0) gemessen wird.

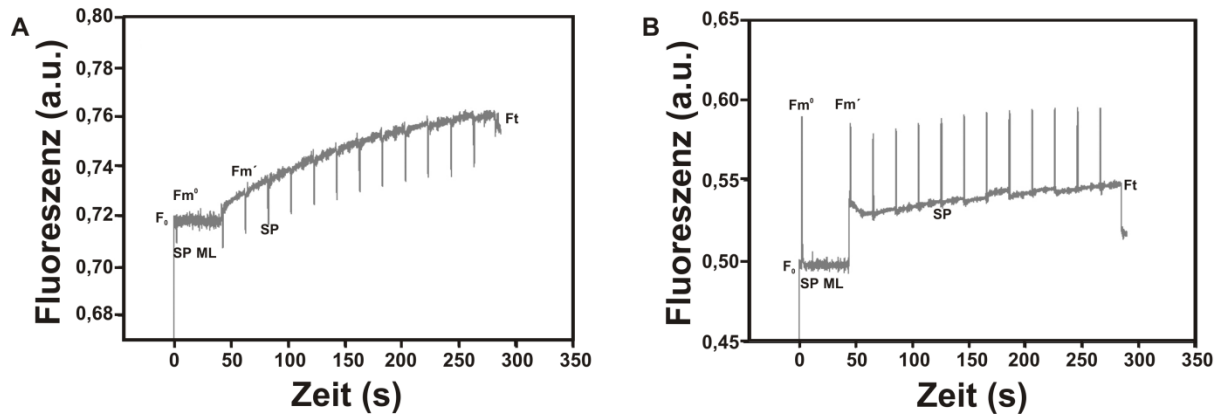


Abbildung 18: Induktionskurven der dunkeladaptierten sowie der Zellen nach 24 h mixotrophen Wachstums im Licht

F_0 : Hintergrundfluoreszenz, Fm^0 : Fluoreszenz nach einem sättigenden Lichtpuls, Fm' : Fluoreszenz eines Lichtpulses bei Messlicht (620 nm), SP: sättigender Puls, ML: Messlicht (620 nm), Ft: *steady state* Fluoreszenz ohne Messlicht.

A) Messung der dunkeladaptierten Zellen. B) Messung der Zellen nach 24 h mixotrophen Wachstums im Licht.

Abb. 18 zeigt exemplarisch Messungen der dunkeladaptierten Zellen (Abb. 18A) und der Zellen nach 24 stündigen mixotrophen Wachstums im Licht (Abb. 18B). Die Hintergrundfluoreszenz F_0 ist bei den dunkeladaptierten Zellen im Vergleich zu den belichteten Zellen höher. Diese Hintergrundfluoreszenz wird sowohl durch die Chlorophyllmoleküle als auch durch die Phycobilisomen beeinflusst, weshalb ein hoher Anteil an Phycobilisomen zu einer hohen Fluoreszenz führt. Im Gegensatz hierzu ist durch einen starken Lichtpuls von $10000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ für 600 ms bei den dunkeladaptierten Zellen keine maximale, und bei den belichteten Zellen eine starke Fluoreszenz (Fm^0) sichtbar. Der fehlende Anstieg des Fluoreszenzsignals zeigt, dass das PS I im Gegensatz zum PS II weiterhin aktiv und nicht beeinträchtigt ist. Die Lichtpulse bei kontinuierlichem Messlicht von 620 nm (Fm') zeigen unterschiedliche Auswirkungen. Während bei den belichteten Zellen nach jedem Lichtpuls eine Fluoreszenz im positiven Bereich gemessen werden kann, gehen die Signale bei den dunkeladaptierten Zellen ins Negative. Diese negativen Signale weisen auf eine bedeutende Veränderung innerhalb des PS II unter heterotrophen Bedingungen hin. Aus den gezeigten Messungen wurde die maximale Effizienz des PS II durch das Verhältnis von Fv ($Fm^0 - F_0$) zu Fm ermittelt (Abb. 19) (Oxborough 2004).

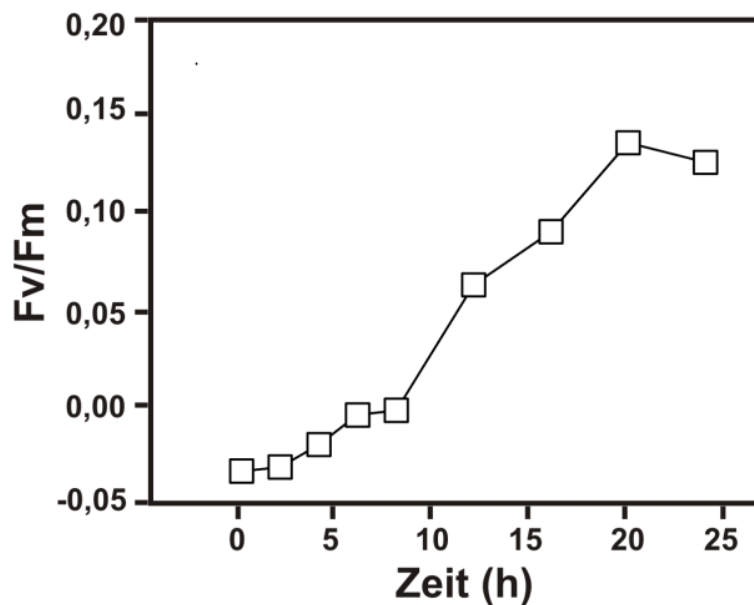


Abbildung 19: Effizienz der Photosynthese mit ansteigender Belichtungsdauer

Das Verhältnis F_v zu F_m wurde anhand der Induktionskurven der einzelnen Messpunkte (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h und 24 h) bestimmt. Dabei ist $F_v = F_m - F_0$.

Bis zu einer Inkubation von acht Stunden unter mixotrophen Bedingungen im Licht ist eine Anlaufphase mit nur geringen Veränderungen betreffend der Effizienz der Photosynthese zu beobachten. Hier zeigt sich, dass das PS II eine drastische Beeinträchtigung aufweist und die Photosynthese nur auf einem geringen Niveau abläuft. Nach einem sich anschließenden starken Anstieg bis hin zu 20 h, folgt eine erneute Plateauphase, wobei die photosynthetische Aktivität einen maximalen Wert erreicht und eine weitere Inkubation unter Belichtung keine Veränderung nach sich zieht. Die bedeutendste Veränderung bei kontinuierlicher Belichtung zeigt sich hierbei in einem Zeitraum zwischen acht und zwanzig Stunden, wobei die PS II-Aktivität auf einen Maximalwert ansteigt.

Da die beschriebene Messung hauptsächlich Rückschlüsse bezüglich der PS II-Aktivität zulässt, wurde, um die Einflüsse auf das PS I zu untersuchen, eine weitere Messung durchgeführt. Diese Messung beruht auf der Grundlage, dass das reduzierte P700*-Reaktionszentrum des PS I im Gegensatz zum P680* des PS II stabil ist. Nach der Oxidation aller P700-Reaktionszentren durch einen starken Lichtpuls von $10000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, wird die durch die Elektronen der Plastochinone und des Cytochrom b_6f Komplexes vermittelte Re-Reduktion anhand einer Absorptionsänderung bei 830 nm verfolgt (Klughammer *et al.* 1994, 2008). In einer zweiten Messung wurde zusätzlich der PS II-

Inhibitor DCMU (3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff) verwendet, um den Einfluss des PS II auf die Re-Reduktion der P700*-Reaktionszentren zu bestimmen. DCMU inhibiert den Elektronentransport auf das Plastochinon, was bei einem aktiven PS II zu einer langsameren Re-Reduktion der P700*-Reaktionszentren führt. Abb. 20A zeigt exemplarisch eine Messung ohne und mit DCMU der dunkeladaptierten, sowie der Zellen nach Wachstum im Licht für 24 h.

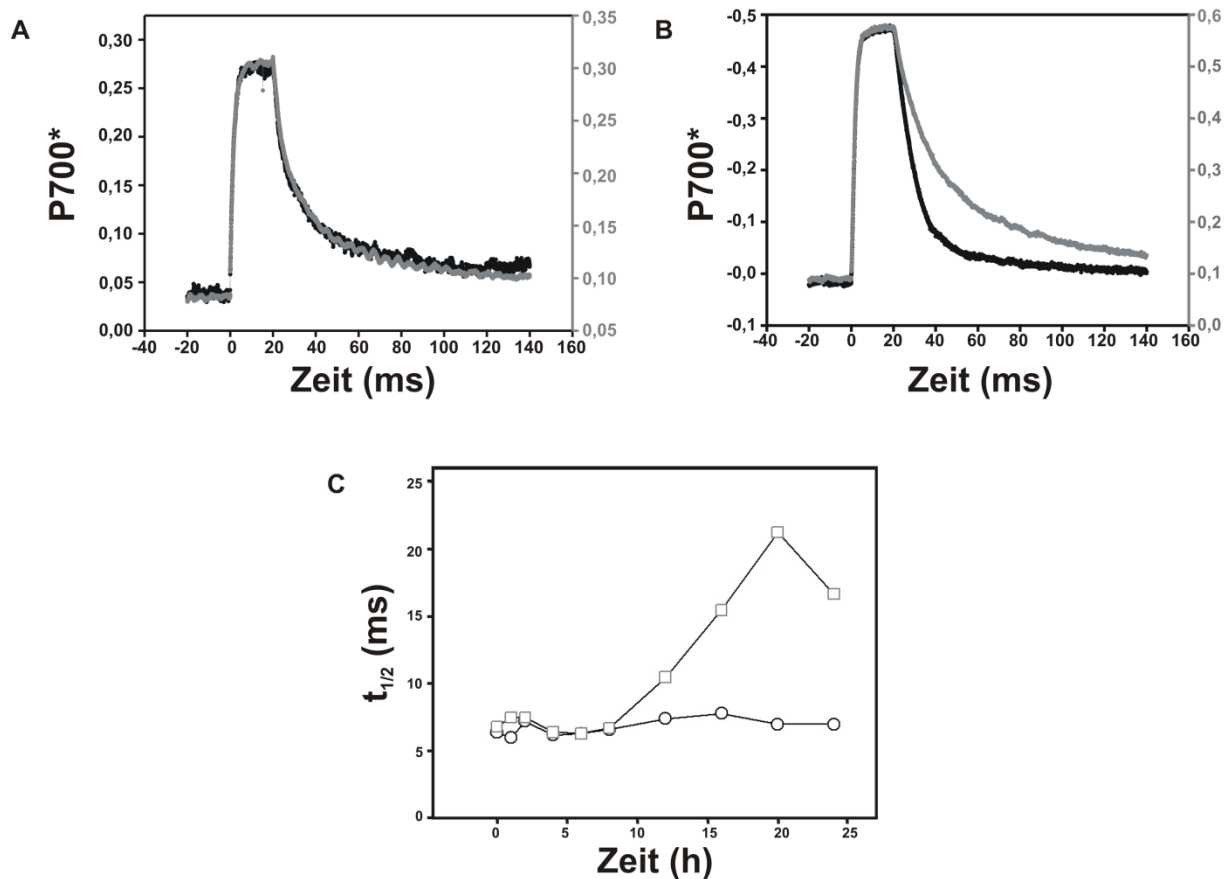


Abbildung 20: P700 Re-Reduktion der Zellen unter LAHG Bedingungen und anschließender Inkubation im Licht für verschiedene Zeitpunkte

Die Messung ohne DCMU ist in schwarz und mit DCMU in grau dargestellt. **A)** Messung der LAHG Kultur. **B)** Messung der Kultur nach Inkubation im Licht für 24 h. **C)** Die Halbwertszeiten der Abnahme in der Absorption bei den Messungen nach 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h 20 h und 24 h ohne DCMU (○) und mit DCMU (□) wurden anhand der P700 Messungen ermittelt.

Die Messungen mit den dunkeladaptierten Zellen sowie den für 24 h im Licht kultivierten Zellen ohne DCMU (Abb. 20A/B), zeigen einen typischen Verlauf. Nach einem starken Lichtpuls ist das P700 oxidiert und die gemessene Absorption bei 830 nm hoch. Mit der Re-

Reduktion der P700*-Reaktionszentren durch Elektronen aus dem PS II und dem zyklischen Elektronentransport fällt die Absorption kontinuierlich ab, bis der Grundzustand erreicht ist. Bei der Messung mit dem PS II-Inhibitor DCMU (graue Linien), zeigt sich bei den dunkeladaptierten Zellen, im Gegensatz zu den belichteten Zellen bei denen eine deutliche Verzögerung des Abfalls auf etwa 15 ms zu erkennen ist, kein Unterschied (Abb. 20C). Die dunkeladaptierten Zellen, zeigen bei beiden Messungen eine Halbwertszeit von 6 – 7 ms. Dieses Ergebnis deutet an, dass das PS II auf die Re-Reduktion der P700*-Reaktionszentren keine Einfluss hat. Erst nach einer Inkubation von zwölf Stunden im Licht zeigen sich zwischen den Messungen mit und ohne den PS II-Inhibitor DCMU Unterschiede. Die Halbwertszeit von 6 – 7 ms steigt durch die Zugabe des PS II-Inhibitors DCMU auf ~10 ms an. Der darauffolgende starke Anstieg der Halbwertszeiten nach Zugabe von DCMU erlangt einen maximalen Wert von etwa 20 ms nach einer Inkubation von 20 h im Licht. Die weitere Inkubation im Licht führt zu einem erneuten leichten Abfall der Halbwertszeit auf einen Wert von 15 ms (Abb. 20C). Die durch Zugabe von DCMU ansteigenden Halbwertszeiten sind mit einer Wiedererlangung der PS II-Aktivität gleichzusetzen.

Zur Detektion der gesamten Elektronentransportrate wurden für die Zellen nach dem Wachstum unter LAHG Bedingungen und der Inkubation im Licht für verschiedene Zeitpunkte Lichtkurven aufgezeichnet. Hierbei wird die Messung der Induktionskurve mit der Messung der Re-Reduktion der P700*-Reaktionszentren verbunden. Nach einer Dunkeladaptation werden die Zellen 30 Sec beleuchtet, und abschließend mit einem sättigenden Lichtpuls von $10000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ bestrahlt. Anhand der Chlorophyllfluoreszenz des PS II aus den Induktionskurven und der Re-Reduktion der P700*-Reaktionszentren wird die maximale Elektronentransportrate durch die Software berechnet. Die verwendete Lichtintensität während der Beleuchtung von 30 Sec wird nach dem sättigenden Lichtpuls schrittweise von 0 auf $850 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (PAR) erhöht. Ab einer bestimmten Lichtintensität erreicht die Kurve der Elektronentransportrate ein Plateau, was die maximale Elektronentransportrate darstellt.

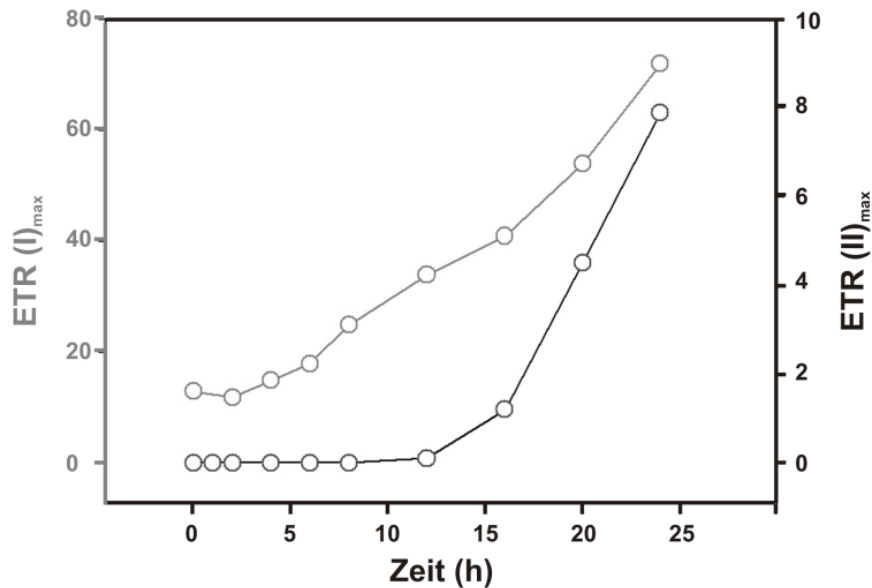


Abbildung 21: Elektronentransportraten der Zellen unter LAHG Bedingungen und dem Wachstum im Licht zu verschiedenen Zeitpunkten

Die maximale Elektronentransportrate von PS II ist in schwarz und die von PS I in grau dargestellt. Gemessen wurden die Kulturen nach 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h und 24 h Wachstum im Licht.

Die Kurven zeigen deutlich, dass in den dunkeladaptierten Zellen kein durch das PS II vermittelter Elektronenfluss (ETR) stattfindet. Eine Elektronentransportrate von PS II kann nur dann ermittelt werden, wenn die Induktionskurven positive Signale zeigen. Da bei den Induktionskurven der Zellen unter LAHG Bedingungen negative Werte (Abb. 18A) gemessen wurden, kann hier auch keine Elektronentransportrate berechnet werden. Erst nach einer Inkubation von zwölf Stunden kann ein Wert für die maximale Elektronentransportrate des PS I ermittelt werden, welcher mit der Inkubation im Licht bis hin zu 24 h steil ansteigt. Auch die Werte der maximalen Elektronentransportrate des PS I steigen mit der Dauer der Inkubation im Licht kontinuierlich an und erreichen ebenfalls nach 24 h ein Maximum. Die maximalen Elektronentransportraten des PS I sind im Gegensatz zu denen des PS II bei allen Messungen höher.

Zusammenfassend wird deutlich, dass während des Wachstums unter LAHG Bedingungen die photosynthetische Aktivität stark reduziert ist. Das PS II liegt inaktiv vor, während der zyklische Elektronentransport und der Elektronenfluss durch das PS I weiterhin aktiv sind.

3.1.3 Untersuchung zur oligomeren Struktur der Photosysteme

Die vorangegangenen Versuche zeigten, dass das Wachstum unter LAHG Bedingungen bedeutende Veränderungen bezüglich der photosynthetischen Aktivität zur Folge hat. Daher sollte in einem weiteren Schritt, die oligomere Struktur des PS I genauso wie die des PS II von Zellen unter LAHG Bedingungen und Zellen nach dem Transfer ins Licht für 24 h verglichen werden. Die Blau-Native-Gelelektrophorese ist eine etablierte Methode zur Auftrennung von Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen (Abb. 22A). Die Proteinkomplexe wurden aus Membranen der Zellen unter LAHG Bedingungen sowie unter Wachstum im Licht für 24 h solubilisiert und anschließend in der Blau-Nativen-Gelelektrophorese aufgetrennt. Aus den Membranen der dunkeladaptierten Zellen konnte ein stabiles PS I-Trimer, nicht aber ein PS II-Dimer solubilisiert werden. Die monomeren Formen der beiden Photosysteme, liegen in den unter LAHG Bedingungen wachsenden Zellen in geringer Konzentration vor. Nach Inkubation der Zellen für 24 h im Licht, ist ein PS II-Dimer zu erkennen und die PS II-Monomere liegen in höherer Konzentration innerhalb der Zelle vor. Dieses Ergebnis konnte durch eine Saccharosedichtegradientenzentrifugation bestätigt werden. Hierzu wurden die Proteinkomplexe aus den Membranen der dunkeladaptierten Zellen und der Zellen nach 24 h Wachstum bei kontinuierlicher Belichtung solubilisiert und in einem Saccharosegradienten aufgetrennt. Wie Abb. 22B zeigt, befinden sich am oberen Ende des Gradienten die orange gefärbten Karotinoide. In der Mitte des Gradienten zeigt sich nach 24 h mixotrophen Wachstums im Licht, eine klare grün gefärbte Bande, welche die PS I- und PS II-Monomeren widerspiegelt. Diese Bande ist in dem Gradienten der solubilisierten Membranen der unter LAHG Bedingungen wachsenden Zellen nur sehr schwach zu erkennen. Am Boden des Gradienten zeigt sich bei beiden Proben eine deutliche Bande, welche den Trimeren des PS I entspricht. Die dunkeladaptierten Zellen besitzen demnach ein PS I-Trimer und die monomeren Einheiten, wogegen das PS II-Dimer innerhalb der Membranfraktion bei der verwendeten Proteinkonzentration nicht zu detektieren ist.

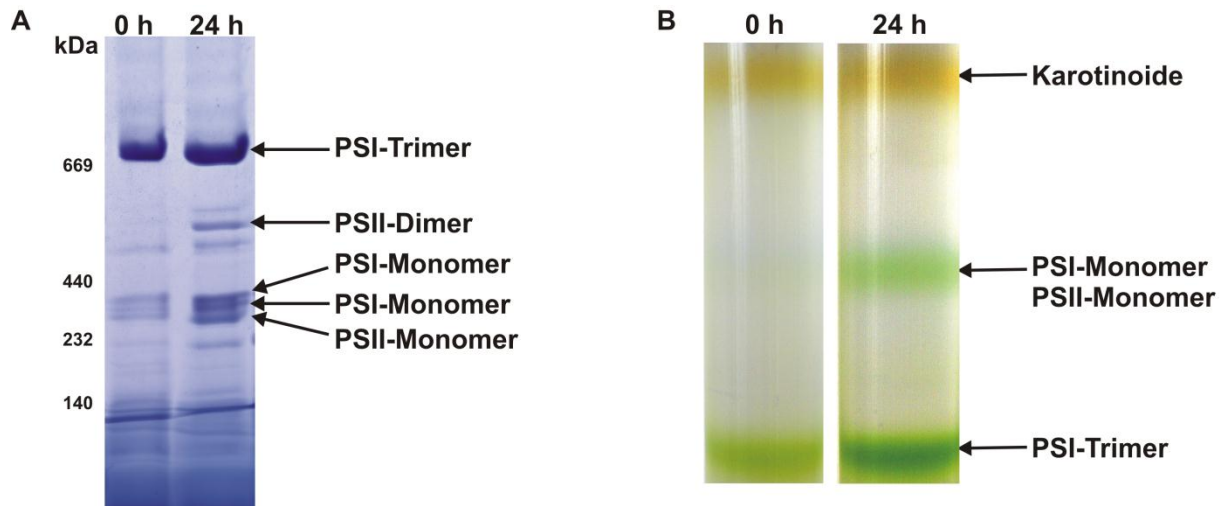


Abbildung 22: Auftrennung oligomerer Membranproteinkomplexe

Solubilisierte Membranproteinkomplexe gleicher Proteinkonzentration der Zellen unter LAHG Bedingungen (0 h) und der Zellen nach Wachstum im Licht für 24 h (24 h) wurden durch **A**) eine Blau-Native-Gelelektrophorese und **B**) durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation aufgetrennt.

3.2 Charakterisierung zweier Signalpeptidasen aus *Synechocystis* sp. PCC 6803

3.2.1 Identifizierung der Signalpeptidasen in *Synechocystis* sp.

Innerhalb des Genoms von *Synechocystis* sp. codieren die Gene *sl10716* und *slr1377* für zwei Typ I-Signalpeptidasen. Der Sequenzvergleich in Abb. 23 zeigt, dass bei beiden Proteinen die konservierten Bereiche, welche als Boxen B-E bezeichnet werden vorhanden sind. Innerhalb dieser Boxen sind die für die katalytische Aktivität essentiellen Aminosäuren zu finden und zusätzlich ist innerhalb dieser Bereiche eine hohe Homologie zwischen allen Peptidasen zu detektieren.



Abbildung 23: Aminosäuresequenzvergleich der Signalpeptidasen aus *Synechocystis* sp. und *E. coli*.

Das Alignment zwischen den beiden putativen Signalpeptidasen Sl10716 (LepB1) und Slr1377 (LepB2) aus *Synechocystis* sp. und dem Protein aus *E. coli* wurde mit dem Programm *ClustalX* durchgeführt. Die spezifischen konservierten Bereiche sind als Box C bis Box E hervorgehoben. Die Box A wurde hierbei nicht berücksichtigt.

Einen ersten Anhaltspunkt bezüglich der Funktion der beiden Proteine aus *Synechocystis* sp. sollten Komplementationsstudien liefern. Hierbei wurden die Gene der putativen Signalpeptidasen in einem Vektor hinter einen arabinoseinduzierbaren Promotor kloniert und in einem *E. coli* Stamm, welcher eine Mutation innerhalb des *lepB*-Gens trägt, exprimiert (Inada *et al.* 1989). Dieser Stamm zeigt einen Wachstumsdefekt bei Temperaturen über 30 °C, wenn parallel keine aktive Signalpeptidase exprimiert wird.

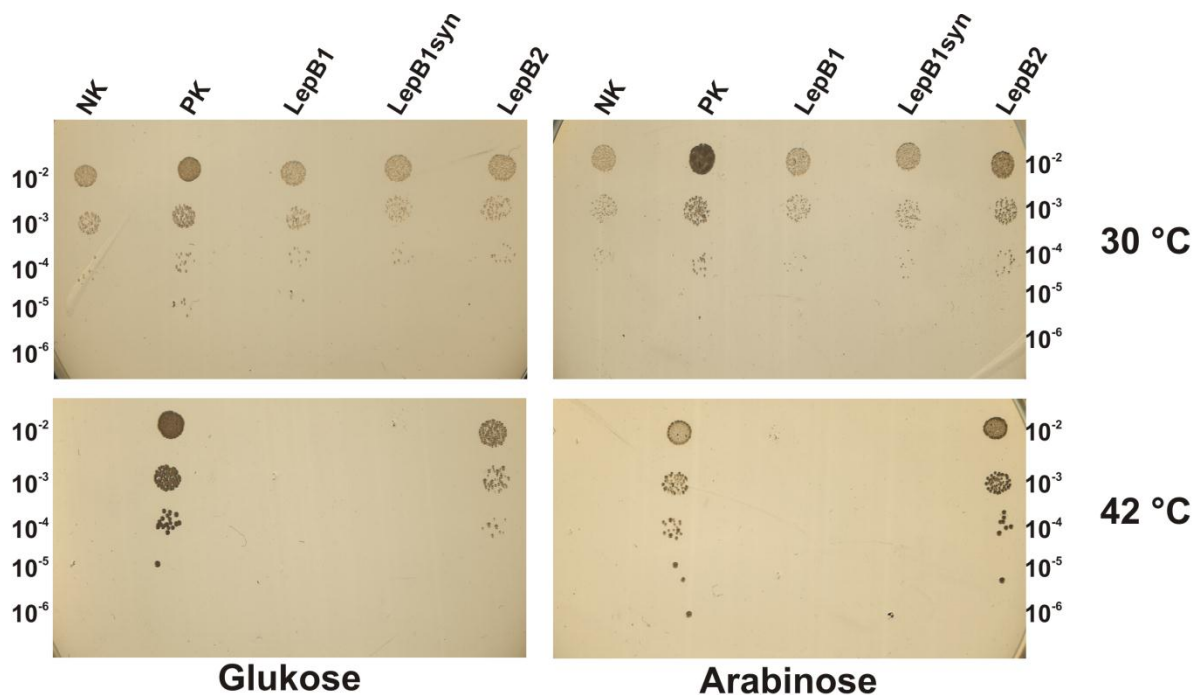


Abbildung 24: Komplementation des *E. coli* Stammes IT41GE225 mit den Proteinen LepB1 und LepB2 aus *Synechocystis* sp.

NK: das leere Plasmid pBAD dient als Negativkontrolle, PK: die Positivkontrolle exprimiert das LepB-Protein aus *E. coli*. Die beiden Signalpeptidasen LepB1 und LepB2 aus *Synechocystis* sp. sowie eine auf das *codon usage* von *E. coli* abgestimmte Signalpeptidase (LepB1syn), wurden in den *E. coli* Stamm IT41GE225 transformiert. Ansteigende Verdünnungsstufen wurden auf Agar-Platten, die 1 % Glukose oder 1 % Arabinose enthalten getropft und bei 30 °C und 42 °C über Nacht inkubiert.

Die Expression der beiden Signalpeptidasen LepB1 und LepB2 aus *Synechocystis* sp. führt sowohl unter Zugabe von Glukose als auch unter Zugabe von Arabinose zu einem Wachstum des *E. coli* Stammes IT41GE225 bei 30 °C. Im Vergleich zu der Expression der Signalpeptidasen aus *Synechocystis* sp. führt die Expression der endogenen *E. coli* Signalpeptidase (PK) zu keinem Unterschied beim Wachstum des *E. coli* Stammes bei 30 °C. Bei einer Inkubation von 42 °C konnte der Wachstumsdefekt des *E. coli* Stammes durch die

Expression des *E. coli* LepB-Proteins und des LepB2-Proteins aus *Synechocystis* sp. komplementiert werden. Das LepB1 scheint die Funktion des Proteins aus *E. coli* nicht übernehmen zu können, wogegen die Expression des LepB2 den Wachstumsdefekt komplementiert. Die Komplementation berücksichtigt nur wenige physiologische Aspekte, weshalb die Möglichkeit besteht, dass das LepB1-Protein aus *Synechocystis* sp. zwar die Funktion einer Signalpeptidase besitzt, doch diese in einem anderen Organismus nicht ausüben kann. Zusätzlich kann eine Expression zum Einschluss des Proteins in sogenannte *inclusion bodies* führen, wobei das Protein als inaktives Aggregat in der Zelle angereichert wird.

3.2.2 Reinigung der Signalpeptidasen

Um beide LepB-Proteine aus *Synechocystis* sp. im Detail charakterisieren zu können, wurden diese heterolog in *E. coli* exprimiert und nach der Solubilisierung der Membran mit dem Detergenz Triton-X-100 über eine Affinitätschromatographie gereinigt (Abb. 25).

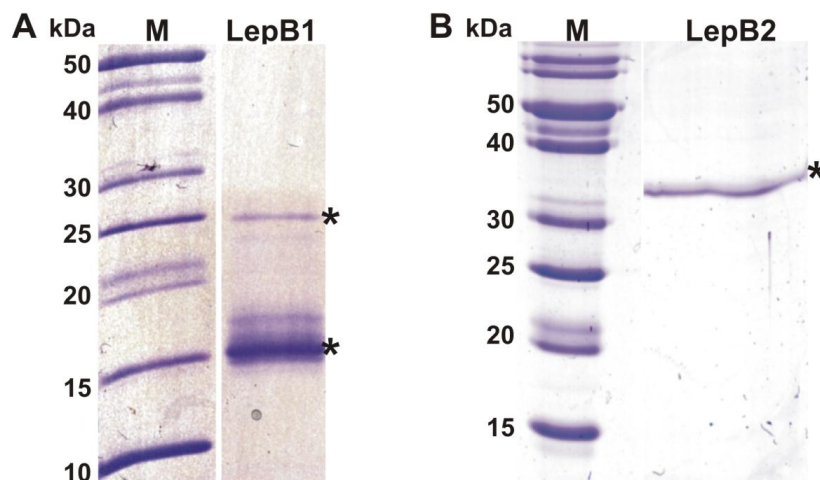


Abbildung 25: Gereinigte Proteine Sll0716 und Slr1377

Auftrennung der über Affinitätschromatographie gereinigten Proteine in einem 14 % SDS-Gel M: Molekulargewichtsmarker. Die mit einem (*) gekennzeichneten Banden wurden für massenspektrometrische Analysen verwendet. **A)** zeigt das Protein Sll0716 (LepB1) und **B)** das Protein Slr1377 (LepB2)

Dass LepB1-Protein besitzt eine berechnete molekulare Masse von 24,9 kDa, doch zeigt die Abb. 25A bei der erwarteten Größe nur eine sehr schwache Bande, wogegen bei ~15 kDa eine starke Bande zu detektieren ist. Das LepB2 besitzt eine berechnete molekulare Masse von 27,5 kDa und zeigt im SDS-Gel ein etwas abweichendes Laufverhalten zwischen 30 – 40 kDa

(Abb. 25B). Zur Absicherung, dass es sich bei den gereinigten Proteinen um die Signalpeptidasen LepB1 und LepB2 aus *Synechocystis* sp. handelt, wurden mit den gereinigten Proteinen in Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Tenzer (Universität Mainz, Institut für Immunologie) massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Das LepB2-Protein konnte innerhalb der isolierten Bande aus Abb. 25B identifiziert werden. Heterolog exprimiertes LepB2 konnte somit aus den *E. coli* Membranen solubilisiert und anschließend gereinigt werden. Die gereinigten Fragmente des LepB1 wurden ebenfalls massenspektrometrisch untersucht, und auch hier konnten beide Fragmente dem LepB1 zugeordnet werden (Abb. 25A*). Die massenspektrometrische Analyse zeigte, dass es sich bei dem Protein von ~15 kDa nicht um das komplette LepB1-Protein sondern um ein Spaltfragment handelt, wobei nur die Aminosäuren 32 – 59 klar detektiert werden konnten. Bei dem Protein von ~25 kDa konnten die Aminosäuren 39 – 196 bestätigt werden. Da in der Literatur für die Signalpeptidasen aus *Bacillus subtilis* bereits eine autokatalytische Spaltung gezeigt werden konnte (van Roosmalen *et al.* 2000), sollten die LepB1-Fragmente anhand einer Western-Blot-Analyse einzelnen Bereichen innerhalb des Proteins zugeordnet werden. Durch den an den N-Terminus angefügten Poly-Histidin-Tag konnte mit einem spezifischen Antikörper dieser detektiert werden. Zusätzlich kam ein Peptidantikörper, der gegen den C-terminalen Teil des LepB1-Proteins gerichtet ist, zum Einsatz.

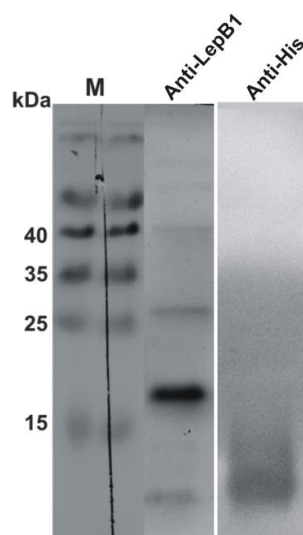


Abbildung 26: Western-Blot-Analyse des gereinigten LepB1

Das gereinigte Protein wurde in einem 14 % SDS-Gel aufgetrennt und anschließend geblottet. Die Detektion erfolgte mit einem Antikörper gegen den fusionierten His-Tag und einem Peptidantikörper gegen das LepB1. M: Molekulargewichtsmarker, Anti-LepB1: Peptidantikörper gegen LepB1 (1:1000), Anti-His: Anti-His-Antikörper der Firma Novagen (1:1000).

Der Western-Blot (Abb. 26) mit dem Peptidantikörper, welcher gegen den C-terminalen Teil des LepB1-Proteins gerichtet ist, zeigt neben einem starken Signal zwischen 15 – 25 kDa weitere schwache Signale bei ~25 kDa, ~40 kDa sowie unter ~15 kDa. Das Signal zwischen 15 kDa und ~25 kDa entspricht dabei der unteren Bande im SDS-Gel der Reinigung (Abb. 25A). Das Signal bei ~25 kDa entspricht dem volllängen Protein LepB1, wobei bei dieser Höhe kein Signal mit dem Anti-His-Antikörper detektiert werden kann. Dieser Antikörper zeigt unter 15 kDa ein Signal, welches auch durch den Anti-LepB1-Antikörper detektiert wurde.

Die heterolog in *E. coli* exprimierte Signalpeptidase LepB1 aus *Synechocystis* sp. scheint während der Reinigung prozessiert zu werden. Bei dem Protein von ~25 kDa konnten anhand der Massenspektrometrie die Aminosäuren 39 – 196 detektiert werden. Bei der Western-Blot-Analyse mit dem Anti-His-Antikörper wird diese Bande bei ~25 kDa nicht detektiert, was andeutet, dass der N-Terminus mit dem fusionierten His-Tag während der Reinigung autokatalytisch abgespalten wird. Die Western-Blot-Analyse mit dem gegen den C-Terminus gerichteten Peptidantikörper zeigt, dass die C-terminale katalytische Domäne in allen Fragmenten vorhanden ist.

3.2.3 Untersuchung der Substratspezifität

Die Substratspezifität ist ein bedeutendes Charakteristikum für Signalpeptidasen, weshalb untersucht werden sollte, ob sich die Proteine LepB1 und LepB2 in ihrer Substratspezifität unterscheiden. Da das Bakterium *Synechocystis* sp. ein internes Membransystem, die Thylakoide besitzt, besteht die Möglichkeit, dass die beiden Signalpeptidasen LepB1 und LepB2 in unterschiedlichen Membranen lokalisiert sind. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden verschiedene Proteine ausgewählt, welche ihre Funktion entweder im Periplasma, in den Thylakoidmembranen oder aber im Thylakoidlumen ausüben (Tab.3). Das kodierende Gen für das Vorläuferprotein Slr1744 wurde in einer verkürzten Form, ohne die AMIN-Domäne, kloniert und exprimiert. Das Protein Slr1744 besitzt mit AMIN-Domäne eine errechnete molekulare Masse von ~70 kDa, weshalb die Unterschiede nach einer Prozessierung in einem SDS-Gel schwer zu beobachten wären.

Tabelle 3: Überblick über die Lokalisation und die molekulare Masse der gewählten Substrate

Protein	Lokalisation	molekulare Masse (unprozessiert)	molekulare Masse (prozessiert)
PetE (SII0199)	Periplasma und Thylakoidlumen	~13 kDa	~10 kDa
PetJ (SII1796)	Thylakoidlumen	~12 kDa	~10 kDa
PsbO (SII0427)	Thylakoidmembran	~30 kDa	~27 kDa
PsbU (SII1194)	Thylakoidlumen	~14 kDa	~11 kDa
Slr1744 (kurz)	Periplasma	~13 kDa	~11 kDa

Die Substrate sollten in einem *in vitro* Transkription-Translationsansatz unter Einbau eines radioaktivmarkierten Methionins (³⁵S-Met) synthetisiert werden, um anschließend die katalytische Aktivität der Signalpeptidasen LepB1 und LepB2 verfolgen zu können. Nachdem in einem Vorversuch gezeigt wurde, dass die gewählten Proteine, welche in dem Plasmid pRSET vorliegen, synthetisiert werden, folgte der *in vitro* Transkription-Translation eine Inkubation mit den Signalpeptidasen LepB1 und LepB2, um die Effizienz der möglichen Spaltung zu untersuchen.

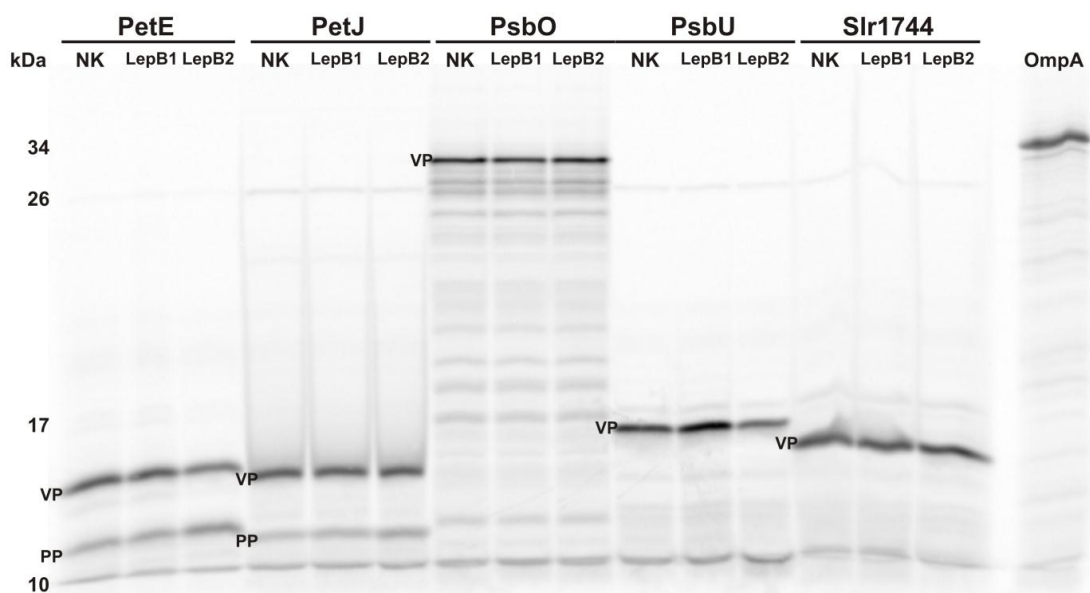


Abbildung 27: Spaltungsexperiment der verschiedenen Substrate mit den Signalpeptidasen

Nach der *in vitro* Transkription-Translation und der Inkubation mit den Signalpeptidasen, wurden die Ansätze in einem 15 % SDS-Gel aufgetrennt und die Radioaktivität anschließend detektiert. OmpA dient als Kontrolle, dass keine endogene *E. coli* Signalpeptidase vorhanden ist. NK: Negativkontrolle ist ein Ansatz ohne Zugabe einer Signalpeptidase, M: Molekulargewichtsmarker, VP: Vorläuferprotein, PP: Prozessiertes Protein.

Das Gel zeigt auf Grund der Signale bei der jeweiligen errechneten molekularen Masse der Vorläuferproteine (VP), dass die Substrate synthetisiert wurden. Bei den Substraten Prä-PsbO, Prä-PsbU sowie Prä-Slr1744 findet keine Spaltung durch die Signalpeptidasen LepB1 und LepB2 statt, da keine prozessierte Form (PP) detektiert wird. Die Negativkontrolle, der Ansatz ohne Zugabe einer Signalpeptidase, zeigt bei den erwähnten Proteinen wie zu erwarten war ebenso keine Prozessierung der Vorläuferproteine. Dementgegen ist bereits bei der Negativkontrolle der Proteine PetE und PetJ eine Prozessierung deutlich in Form einer im Gel schneller laufenden Bande zu erkennen (PP). Die Vorläuferproteine liegen in großer Menge vor und bei der prozessierten Form ist nach der Zugabe des Proteins LepB2 eine Steigerung der Bandenintensität des prozessierten Proteins zu erkennen. Die Zugabe der Peptidase LepB1 zeigt im Gegensatz zu der Negativkontrolle kein verändertes Muster. Dies heißt, dass die Vorläuferproteine Prä-PetE und Prä-PetJ als Substrat für die Signalpeptidase LepB2 dienen, wogegen die Signalpeptidase LepB1 in der eingesetzten Konzentration keines der Vorläuferproteine prozessieren kann.

3.2.4 Untersuchungen zur Lokalisation der Signalpeptidasen

Neben Untersuchungen zur Substratspezifität der Vorläuferproteine aus verschiedenen Zellkompartimenten, wurde die Lokalisation der beiden Signalpeptidasen mit Hilfe des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP, *green fluorescent protein*) untersucht. Durch das zusätzliche interne Thylakoidmembransystem muss der Transport von Prä-Proteinen an zwei Membranen organisiert werden. In dem Genom des Bakteriums *E. coli* kodiert nur ein Gen eine Signalpeptidase des Typ I, wogegen in *Synechocystis* sp. mit den Gene *slr0716* und *slr1377* zwei Signalpeptidasen kodiert werden. Wenn beide Signalpeptidasen in *Synechocystis* sp. aktiv sind, lässt es die Vermutung zu, dass die Signalpeptidasen ihre Funktion an verschiedenen Membranen ausüben.

Synechocystis sp. weist durch die hohe Anzahl an Chlorophyllmolekülen und Phycobilisomen eine starke Autofluoreszenz auf, was die Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie in diesem Bakterium in den letzten Jahren zu einer Herausforderung machte. Andere Arbeitsgruppen konnten bereits mit einem speziellen GFP, dem *gfpmut3** (Andersen *et al.* 1998), die Fluoreszenzmikroskopie an *Synechocystis* sp. erfolgreich anwenden (Spence *et al.* 2003; Aldridge *et al.* 2008). Das beschriebene GFP wurde in dieser Arbeit verwendet, und die Signalpeptidasen LepB1 und LepB2 an dessen C-Terminus fusioniert (Abb. 28A). Diese C-

terminale Fusionierung stellt sicher, dass das GFP im Cytoplasma lokalisiert vorliegt, was von großer Bedeutung ist. Wenn das GFP über den Sec-Weg in den periplasmatischen Raum transportiert wird, ist es inaktiv (Feilmeier *et al.* 2000). Nach der Generierung der in Abb. 28A gezeigten Konstrukte, wurden diese in *Synechocystis* sp. transformiert. Über homologe Rekombination (Kunert *et al.* 2000) wurde das Fusionskonstrukt an eine neutrale Stelle, welche keine bedeutenden Gene und somit keine gesonderte Funktion besitzt, innerhalb des *Synechocystis* sp. Genoms eingebaut. Da *Synechocystis* sp. mehrere Genomkopien besitzt, musste die Konzentration des Antibiotikums Kanamycin stetig erhöht werden, um den Einbau in alle Genomkopien zu erzwingen. Anhand einer Segregations-PCR wurde dieser Vorgang überprüft (Abb. 28B).

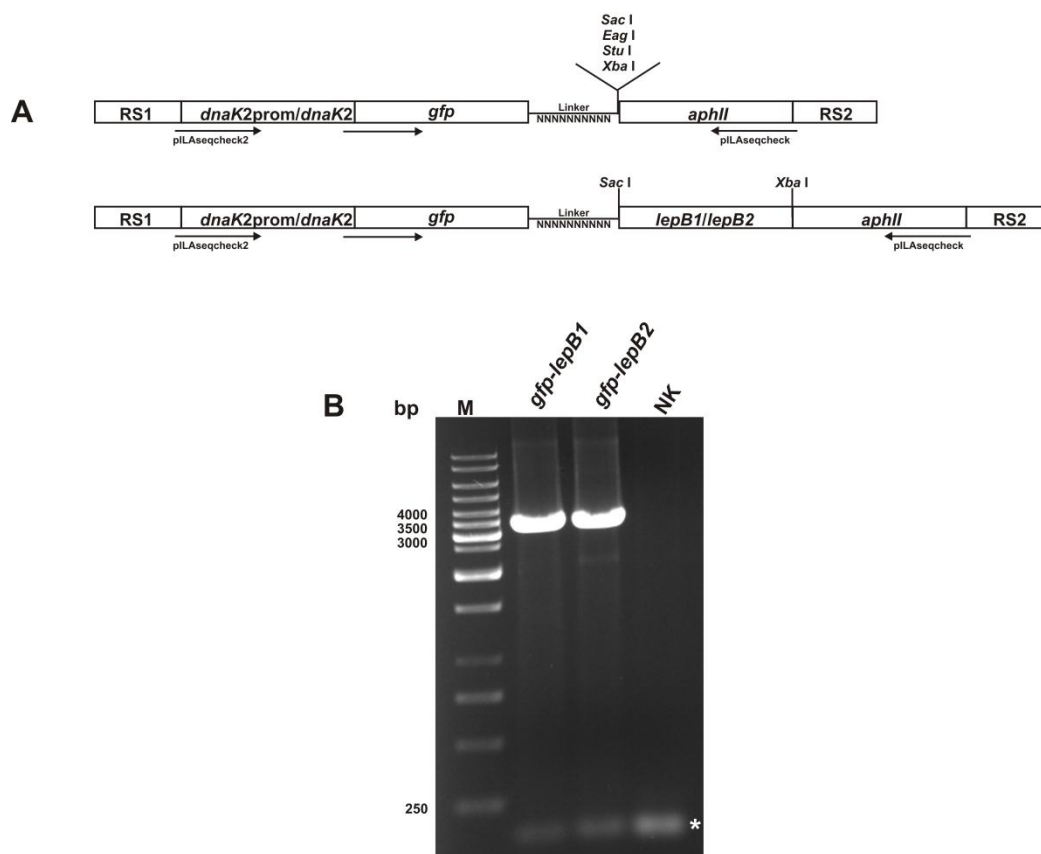


Abbildung 28: Klonierungsstrategie und Analyse der Segregation mittels PCR

A) Die Gene *lepB1* (*sll0716*) und *lepB2* (*str1377*) wurden hinter eine eingefügte Linkersequenz, welche zehn aufeinanderfolgende Asparaginreste kodiert, über eine *multiple cloning site* an das 3'-Ende des *gfp*-Gens fusioniert. Die Integration in das *Synechocystis* sp. Genom erfolgte über homologe Rekombination (RS1, RS2) und Selektion durch die Kanamycinresistenzkassette (*aphII*). Die Expression der Fusionsgene wurde durch den *dnaK2*-Promotor erzielt.

B) Die Überprüfung der homologen Rekombination in alle Genomkopien erfolgte mit den Primern pILAseqcheck und pILAseqcheck2. Als Matrize diente genomische DNA der *Synechocystis* Stämme und als Negativkontrolle (NK) die DNA des Wildtyps. M: DNA-Größenstandard, bp: Basenpaare, das Wildtypfragment ist mit einem (*) gekennzeichnet.

Die Segregations-PCR zeigt, dass die Fusionskonstrukte in die Genomkopien eingebaut wurden, da bei der PCR des *gfp-lepB1* ein Fragment von ~3300 bp und bei *gfp-lepB2* ein Fragment von ~3400 bp amplifiziert werden konnte. Bei beiden Ansätzen konnte, wie auch bei der Negativkontrolle (NK) ein Fragment unter 250 bp detektiert werden, was der erwarteten Größe des Wildtyp-Fragmentes von ~100 bp entspricht. Diese 100 bp entsprechen den Abschnitten RS1 und RS2, die für die homologe Rekombination essentiell sind. Diese DNA-Abschnitte enthalten Sequenzen des Gens *slr0168*, welches durch das generierte Konstrukt durch homologe Rekombination unterbrochen wird. Da die Mehrheit der Genomkopien das Fusionskonstrukt exprimieren, sollte anhand einer Western-Blot-Analyse die intrazelluläre Lokalisation der Signalpeptidasen LepB1-GFP und LepB2-GFP untersucht werden. Die Expression der Fusionskonstrukte wurde durch den *dnaK2*-Promotor (Abb. 28A) reguliert. Dieser ist wie bereits in zurückliegenden Arbeiten gezeigt, konstitutiv aktiv. Zusätzlich zeigt der Promotor unter Hitzeschockbedingungen eine höhere Aktivität (Rupprecht *et al.* 2007), weshalb die Kulturen sowohl bei einer kontinuierlichen Temperatur von 30 °C und zusätzlich bei 42 °C für sechs bis acht Stunden inkubiert wurden.

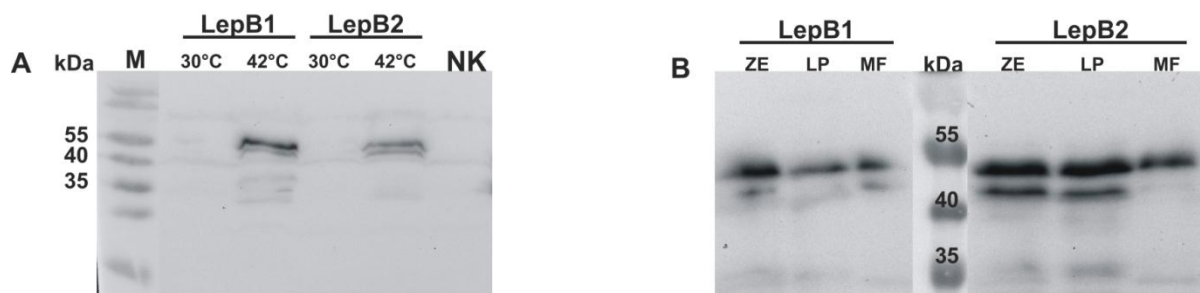


Abbildung 29: Western-Blot-Analyse der GFP-Fusionsproteine

Die Western-Blot-Analysen wurden mit einem GFP-Antikörper der Firma Acris durchgeführt und die Proteine mittels der Chemilumineszenz detektiert. M: Molekulargewichtsmarker, NK: Negativkontrolle, ZE: Zellextrakt, LP: lösliche Proteine, MF: Membranfraktion. Die errechnete molekulare Masse beträgt für das Fusionsprotein GFP-LepB1 52 kDa und für das Protein GFP-LepB2 54 kDa. **A)** Western-Blot von *Synechocystis* sp. Zellextrakt nach dem Wachstum bei 30 °C und 42 °C zur Überprüfung der Aktivität des *dnaK2*-Promotors. **B)** Western-Blot zur Bestimmung der zellulären Lokalisation der Proteine LepB1 und LepB2.

In einem ersten Versuch wurde überprüft, inwieweit der Promotor unter normalen Wachstumsbedingungen und unter Hitzeschockbedingungen die Expression des Fusionsproteins beeinflusst. Anhand einer Western-Blot-Analyse mit einem spezifischen, gegen das GFP gerichteten Antikörper (Abb. 29A), konnte gezeigt werden, dass eine

Inkubation bei 42 °C die Expression deutlich erhöht und ein Signal bei beiden Proteinen detektiert werden kann. Bei der Inkubation unter normalen Bedingungen bei 30 °C zeigt sich genauso wie bei der Negativkontrolle, bei der das GFP nicht exprimiert wird, kein Signal bei der erwarteten molekularen Masse. Nachdem gezeigt werden konnte, dass nach einer Inkubation bei 42 °C die Fusionsproteine exprimiert werden, sollte deren Lokalisation ebenfalls mittels einer Western-Blot-Analyse untersucht werden. Das Fusionsprotein GFP-LepB1, genauso wie das GFP-LepB2 sind neben der löslichen Fraktion auch in der Membranfraktion zu detektieren (Abb. 29B). Bei dem GFP-LepB2 ist das Signal in der löslichen Fraktion stärker und außerdem kann sowohl im Zellextrakt als auch in der löslichen Fraktion eine Doppelbande detektiert werden.

Da es während der Trennung der löslichen Proteine von den Membranproteinen zu Verunreinigungen der einzelnen Fraktionen kommen kann, wurde die Lokalisation zusätzlich fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Abb. 30 zeigt die Aufnahmen von Zellen, welche sowohl das an das GFP fusionierte LepB1 als auch das fusionierte LepB2 zeigen. Die Zellen wurden unter normalen Wachstumsbedingungen angezogen und anschließend zwei Stunden einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt, bevor sie erneut bei 30 °C inkubiert wurden. Die Fusionsproteine GFP-LepB1 sowie GFP-LepB2 zeigen beide ein GFP Signal, welches deckungsgleich mit dem Signal der Autofluoreszenz ist. Da die Autofluoreszenz die Lokalisation der Thylakoide widerspiegelt, sind beide Signalpeptidasen innerhalb der Thylakoidmembranen lokalisiert. Nach der Expression des GFP-LepB1 kann jedoch im Vergleich zum GFP-LepB2 innerhalb der Thylakoidmembranen vermehrt ein rotes Signal detektiert werden, weshalb von einer niedrigeren Konzentration des Proteins innerhalb dieser Membranen auszugehen ist. Zusätzlich zeichnet sich bei dem Protein GFP-LepB2 um die Zellen ein Signal ab, welches als GFP-Signal erkannt werden kann. Dieses Signal umrandet die Zelle und deutet eine Lokalisation des GFP-LepB2-Proteins auch innerhalb der Cytoplasmamembran an.

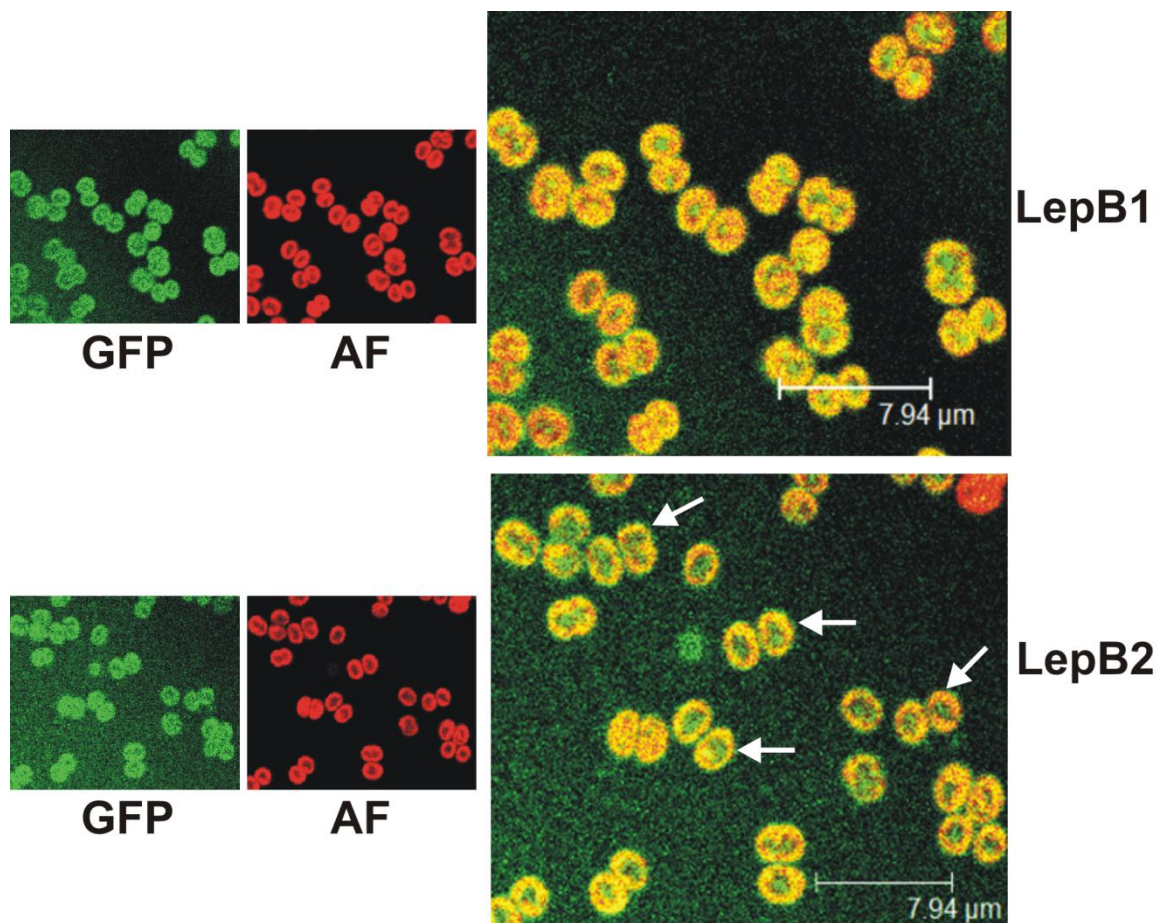


Abbildung 30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen, welche die Fusionsproteine exprimieren

Die Extinktion erfolgte mit einem Argonlaser bei 488 nm. Die Emission der Autofluoreszenz (AF) wurde bei 660 nm und die des GFP-Signals (GFP) zwischen 511 nm und 515 nm detektiert. Die Bilder wurden anschließend übereinandergelegt. Grüne Bereiche zeigen dabei das GFP-Signal, rote Bereiche zeigen Signale der Autofluoreszenz und innerhalb der gelben Bereiche werden beide Signale detektiert. Die Pfeile zeigen ein GFP-Signal innerhalb der Cytoplasmamembran.

Die Untersuchungen zur Lokalisation der Fusionsproteine geben einen ersten Hinweis darauf, dass beide Proteine innerhalb der Thylakoidmembranen und LepB2 zusätzlich in der Cytoplasmamembran lokalisiert sind. Desweiteren scheint das durch den *dnaK2*-Promotor kontrollierte LepB2-Protein in einer höheren Konzentration innerhalb der Zelle vorzuliegen.

3.3 Charakterisierung zweier homologer GrpE-Proteine

3.3.1 Identifizierung der homologen Proteine

Im Genom der Cyanobakterien *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Thermosynechococcus elongatus* BP1 konnte jeweils ein Leserahmen identifiziert werden, der Homologien zu dem des *E. coli* GrpE-Proteins aufweist. Dabei kodiert der Leserahmen *sll0057* im Genom des mesophilen Bakteriums *Synechocystis* sp. für ein Protein von 249 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 27,6 kDa (Kaneko *et al.* 1996). Der Leserahmen *tlr1314* im Genom des thermophilen Bakteriums *Thermosynechococcus* kodiert für ein Protein von 252 Aminosäuren, mit einer vorhergesagten molekularen Masse von 27,8 kDa (Nakamura *et al.* 2002). Die homologen Proteine besitzen beide im Vergleich zu dem Protein aus *E. coli* sowohl einen verlängerten N-Terminus wie auch C-Terminus.

Ein Sequenzvergleich beider Proteine zeigt eine Identität von 44 % und eine Ähnlichkeit von 60 %, wobei der C-Terminus beider Proteine mit dem Vier-Helix-Bündel und der β -Faltblattstruktur (vgl. Abb. 11) eine höhere Ähnlichkeit besitzt als der N-Terminus und die lange α -Helix (Abb.31).

```

Synechocystis      MNEDQVSLNQTNPVSPEASDVPVAVTPEESPQPTDAVLGEPSEGEQSEDP
Thermosynechococcus MHN PQSRGHNLSQAMSDQTVINPAAEAQEGEITPDTPTDVKVENTPVEN
*: *  . * : : * : :  * . . : * . . * : . * : : .

Synechocystis      IGAATETEGGPLEQE-KSSEEIIAILQKDLASHRQELAEQSEQLDSIKKR
Thermosynechococcus VENPAEATPGEEDQASEATSANAADLLEQIAALEAAKASLSQVVERNSQ
: . : * : * : * : : . * * : : * : . * . * : : : :

Synechocystis      YVALAAEFDNFRKRTQREKEEQAKLIKGRITELLEVVDNFERARTQIKP
Thermosynechococcus YIRLAADFENFRKRTQREKEELELQIKCSVIADLLEVVDSFELARTHIQT
* : * * : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Synechocystis      NSDGENQIHKSYQGVYKLVDSLKGLGVA PMRPEGKPFDPKYHEAMLREP
Thermosynechococcus ETEAEKIHRSYQGVYKQLVECLKRIGVSAMQAKGKPFDPNLHEAVLREA
: : * : * : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Synechocystis      TAEYPEDTVIEELVRYLLDDIVLRHSMVKVAVAPEEG-AEVNGEAGAN
Thermosynechococcus TNEHPEGTVIEELKRYMLQDRVLRHAMVKVAAPPEEGSASNTNPTNDVT
* * : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Synechocystis      P-
Thermosynechococcus DV

```

Abbildung 31: Aminosäuresequenzvergleich der beiden GrpE-Proteine

Der Sequenzvergleich der Aminosäuresequenz erfolgte mit dem Programm *ClustalX*.

Um eine erste Aussage über die Funktion beider Proteine treffen zu können, wurde eine Komplementationsstudie durchgeführt. Hierbei sollte analysiert werden, ob beide Proteine die Funktion des GrpEs aus *E. coli* ersetzen können. Der verwendete *E. coli* Stamm OD212ΔGrpE zeigt bei 30 °C ein normales Wachstum (Deloche *et al.* 1997), wogegen bei höheren Temperaturen ein Wachstumsdefekt vorliegt. Dieser Defekt kann durch die Koexpression eines funktionellen GrpE-Proteins aufgehoben werden. Abb. 32 zeigt das Ergebnis der Komplementation mit den putativen GrpE-Homologen aus den Cyanobakterien *Synechocystis* sp. und *Thermosynechococcus*.

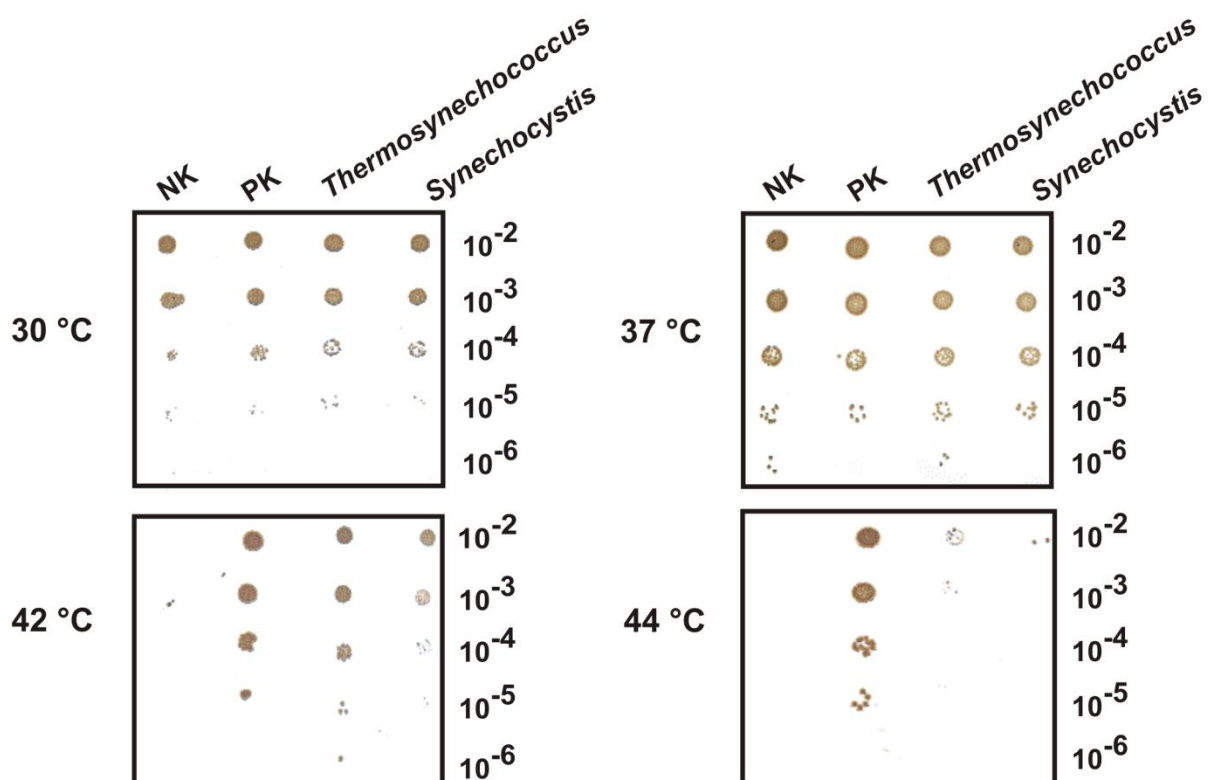


Abbildung 32: In vivo Komplementation des *E. coli* Stammes OD212ΔGrpE durch die cyanobakteriellen GrpE-Proteine

Der leere Vektor pMALp2 (NK), das Plasmid mit dem *E. coli* GrpE (PK) und die Plasmide mit den zwei zu untersuchenden GrpE-Proteinen wurden in den Stamm OD212ΔGrpE transformiert. Verdünnungsstufen wurden auf Agar-Platten mit 0,005 mM IPTG aufgetropft und über Nacht bei 30 °C, 37 °C, 42 °C und 44 °C inkubiert. NK: Negativkontrolle, PK: Positivkontrolle.

Die Negativkontrolle (NK), d.h. *E. coli* Zellen in die der leere Vektor transformiert wurde, zeigt ein Wachstum bei 30 °C und 37 °C. Bei Temperaturen von 42 °C und 44 °C, welche einem Hitzeschock gleichzusetzen sind, ist kein Wachstum bei den verwendeten

Verdünnungen zu erkennen. Dementgegen zeigt die Positivkontrolle (PK), wobei es sich um Zellen handelt die das *E. coli* GrpE-Protein exprimieren, bei allen Bedingungen das beste Wachstumsverhalten. Die Stämme, welche die GrpE-Proteine aus den zwei Cyanobakterien exprimieren, zeigen Unterschiede in der Fähigkeit das Wachstumsdefizit des *E. coli* Stammes zu komplementieren. Bei der Expression des GrpE-Proteins aus dem thermophilen Bakterium *Thermosynechococcus* kann bei 30 °C, 37 °C und 42 °C ein Wachstum, welches der Positivkontrolle entspricht beobachtet werden. Bei diesen Temperaturen zeigt auch der Stamm, welcher das GrpE-Protein des mesophilen Bakteriums *Synechocystis* sp. exprimiert kaum einen Wachstumsdefekt. Bei einer Temperatur von 42 °C ist das Wachstum jedoch nur bis zu einer Verdünnung von 10^{-5} zu detektieren, wogegen bei der Expression des GrpE-Proteins aus *Thermosynechococcus* auch bei einer Verdünnung von 10^{-6} eine Koloniebildung stattfindet. Bei 44 °C wird diese Abweichung deutlicher, hier zeigt der Stamm, welcher das GrpE-Protein aus dem mesophilen *Synechocystis* sp. exprimiert ein minimales Wachstum wogegen die Expression des GrpE-Proteins aus dem thermophilen *Thermosynechococcus elongatus* ein besseres Wachstum zeigt, was jedoch stark von der Positivkontrolle abweicht. Der beobachtete Effekt kann stark von dem Expressionslevel abhängen, weshalb nach der Komplementation eine SDS-PAGE-Analyse durchgeführt wurde, welche das Niveau der Expression der einzelnen GrpE-Proteine widerspiegelt.

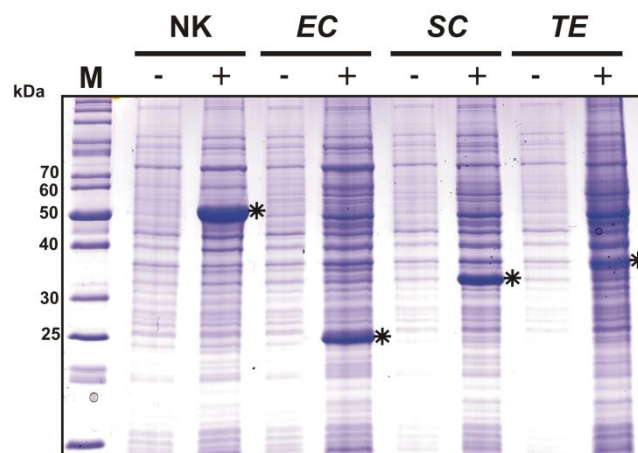


Abbildung 33: SDS-Gel zur Überprüfung der Proteinexpression der Komplementationsstudie

Die entsprechenden Proteine sind mit einem Stern (*) markiert. NK: Negativkontrolle, EC: *E. coli*, SC: *Synechocystis* sp., TE: *Thermosynechococcus elongatus*, M: Molekulargewichtsmarker, (-): Probe vor der Induktion mit IPTG, (+): Probe 4 h nach Induktion mit 0,005 mM IPTG.

Das GrpE-Protein aus *E. coli* mit einer molekularen Masse von ~22 kDa zeigt das gleiche Expressionslevel wie das Protein aus *Synechocystis* sp. mit einer molekularen Masse von ~28 kDa. Das GrpE-Protein aus dem thermophilen Cyanobakterium *Thermosynechococcus* wird dagegen auf einem etwas geringeren Niveau exprimiert (Abb. 33). Auch die Negativkontrolle zeigt eine starke Expression eines Proteins von ~50 kDa, was der Expression des MalE-Proteins entspricht. Alle Proteine zeigen erst durch die Zugabe von IPTG, und somit nach Induktion des Promotors, eine gesteigerte Expression.

3.3.2 Heterologe Expression einzelner Domänen

Nachdem anhand der Komplementationstudien gezeigt werden konnte, dass es sich bei den Proteinen aus *Synechocystis* sp. und *Thermosynechococcus* um Homologe des GrpE-Proteins aus *E. coli* handelt, sollten in einem nächsten Schritt die Proteine in ihrer vollen Länge, genauso wie verkürzte Varianten, heterolog in *E. coli* exprimiert und anschließend über eine Affinitätschromatographie gereinigt werden. Wie einleitend schon erwähnt, lässt sich das GrpE-Protein in verschiedene Domänen unterteilen. Innerhalb dieser Arbeit wurde die NT-Domäne (NT) von der CT-Domäne (CT) unterschieden (Abb. 34).

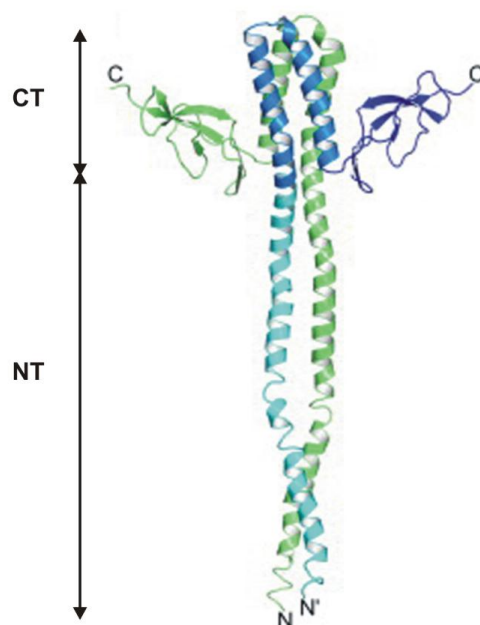


Abbildung 34: Struktur des GrpE-Proteins aus dem Bakterium *Thermus thermophilus*

Die Unterteilung des GrpE-Proteins ist anhand der Pfeile dargestellt. Die NT-Domäne umfasst den unstrukturierten N-terminalen Teil genauso wie die langen α -Helices, und die CT-Domäne neben dem Vier-Helix-Bündel, die β -Faltblattstruktur (Nakamura *et al.* 2010).

Die beschriebenen Fragmente wurden zur Überexpression in das Plasmid pRSET mit einem N-terminalen deca-His-Tag kloniert und in einem *E. coli* Expressionsstamm heterolog exprimiert. Zur Überprüfung der Reinheit wurden die über den His-Tag gereinigten Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abb.35). Die volllängen Proteine zeigen Signale ohne dass Verunreinigungen festgestellt werden können. Die exprimierten und gereinigten NT-Domänen der GrpE-Proteine haben eine berechnete molekulare Masse von ~16 kDa und zeigen somit im SDS-Gel eine Bande, welche dem Dimer entspricht. Genauso wie die CT-Domänen, welche als Monomer mit einer molekularen Masse von ~17 kDa detektiert werden können, zeigen auch die NT-Domänen nach der Affinitätschromatographie keine durch andere Proteine verursachten Verunreinigungen.

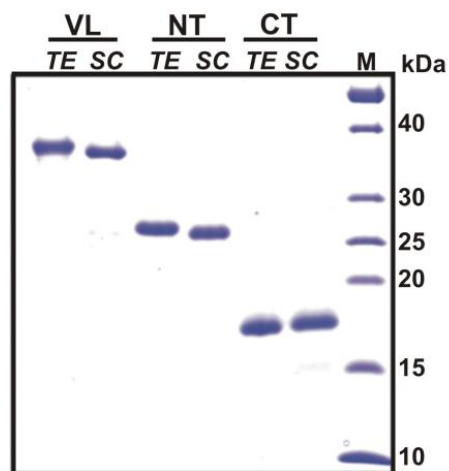


Abbildung 35: SDS-Gel zur Überprüfung der Reinigung der GrpE-Domänen

SDS-Gel der einzelnen Domänen nach einer Affinitätschromatographie. VL: Volllängen Protein, NT: NT-Domäne, CT: CT-Domäne, TE: *Thermosynechococcus elongatus*, SC: *Synechocystis* sp., M: Molekulargewichtsmarker

3.3.3 Untersuchungen zur Dimerisierungstendenz

Da bekannt ist, dass das GrpE-Protein aus *E. coli* als Thermosensor dient, wobei es in seiner aktiven Form als Dimer vorliegt und nur durch einen Hitzeschock in ein inaktives Monomer zerfällt, sollten die gereinigten Proteine im Hinblick auf ihre Dimerisierungseigenschaften untersucht werden. Dies sollte des Weiteren darüber Aufschluss geben, inwieweit die einzelnen Regionen des Proteins an der Dimerisierung beteiligt sind. Anhand einer GALLEX-Messung sollte *in vivo* gezeigt werden, ob und wenn ja wie stark die GrpE-Proteine und ihre verkürzten Formen dimerisieren. Die zu untersuchenden Proteine werden dabei durch

molekularbiologische Methoden an die DNA-Bindedomäne des LexA-Proteins fusioniert und nur wenn die fusionierten Proteine miteinander interagieren und Dimere bilden, kann die DNA-Bindedomäne des LexA eine bestimmte Promotor/Operator-Region auf der DNA binden und die Expression des Reportergens *lacZ*, welches für das Protein β -Galaktosidase codiert, reprimieren (Abb. 36).

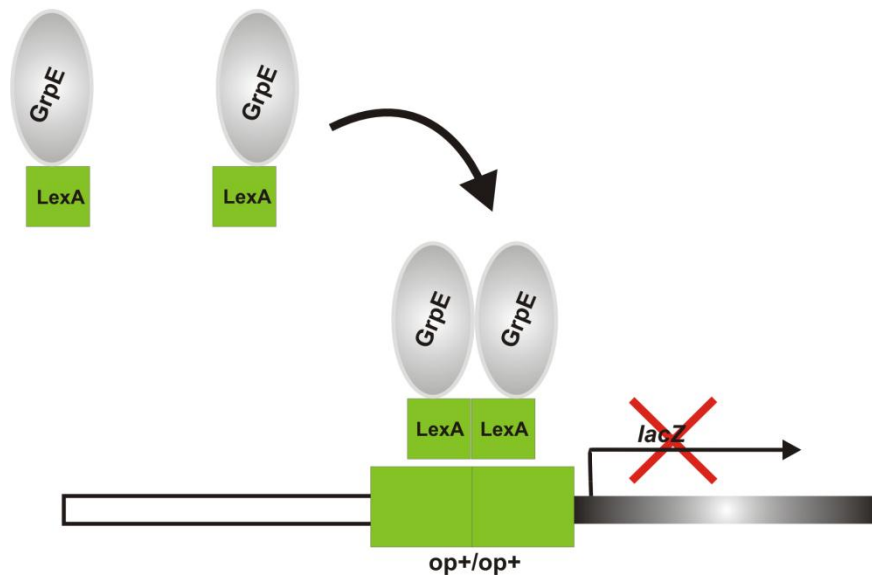


Abbildung 36: Schematische Darstellung des GALLEX-Systems

Die zu untersuchenden Proteine werden an die DNA-Bindedomäne des LexA-Proteins fusioniert. Durch eine Dimerisierung der fusionierten Proteine kommt es zur Bindung des LexA-Proteins an eine Operatorregion (op^+/op^+) und zur Repression des Reportergens *lacZ*.

Kommt es bei den chimären Proteinen nicht zu einer Interaktion, ist die Aktivität der β -Galaktosidase hoch. Anhand der Umsetzung eines Substrates lässt sich die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmen (Miller 1972).

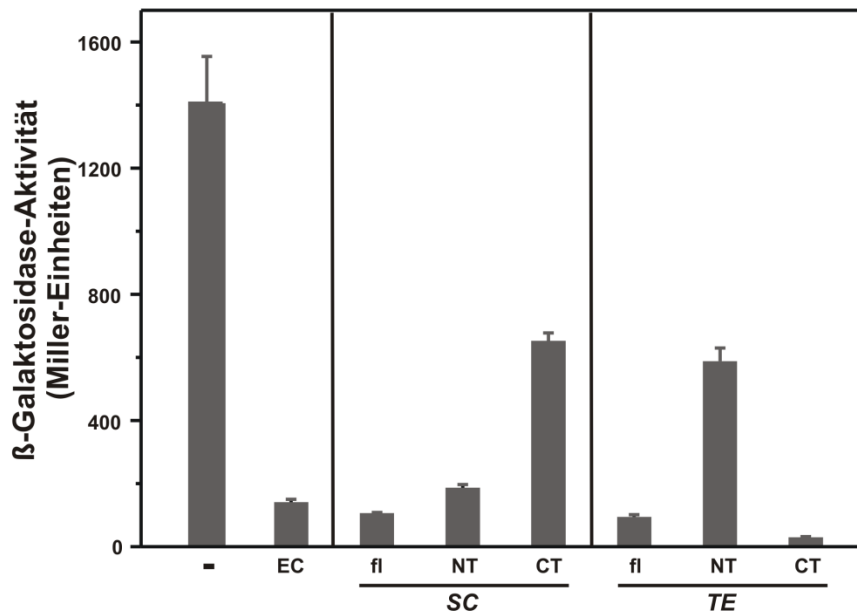


Abbildung 37: GALLEX-Messung der GrpE-Proteine und der einzelnen GrpE-Domänen

Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde anhand einer Dreifachbestimmung ermittelt und die Standardabweichung errechnet.

(-): Negativkontrolle (pMALp2x), EC: Positivkontrolle, VL: Volllängen Protein, NT: NT-Domäne, CT: CT-Domäne, SC: *Synechocystis sp.*, TE: *Thermosynechococcus elongatus*.

Bei der Negativkontrolle (-) ist die Substratumsetzung sehr hoch. Dementgegen weist die β -Galaktosidase-Aktivität bei der Positivkontrolle (EC) eine Reprimierung auf und die Substratumsetzung sinkt auf einen minimalen Wert ab. Als Positivkontrolle wurde das gut untersuchte und als starkes Dimer beschriebene GrpE-Protein aus *E. coli* an die DNA-Bindedomäne des LexA-Proteins fusioniert. Ein Vergleich der zu untersuchenden Domänen verdeutlicht, dass sowohl das volllängen GrpE, wie auch die NT-Domäne aus *Synechocystis sp.* eine deutliche Dimerisierungstendenz aufzeigen. Die CT-Domäne allerdings besitzt keine bzw. eine nur sehr geringe Dimerisierungseigenschaft, was durch einen hohen Substratumsatz gekennzeichnet ist. Ein genauerer Vergleich zwischen der NT-Domäne und dem volllängen Protein zeigt, dass hier die NT-Domäne einen etwas höheren Substratumsatz besitzt, was auf eine schwächere Dimerisierung hindeutet. Im Fall des GrpE-Proteins aus *Thermosynechococcus* zeigt sich ein anderer Sachverhalt. Das volllängen Protein sowie die CT-Domäne zeigen eine starke Dimerisierungstendenz und die NT-Domäne bildet keine Dimere aus. Die CT-Domäne, zeigt eine noch stärkere Inhibierung des Substratumsatzes und damit eine höhere Dimerisierungstendenz als das volllängen Protein. In diesem Fall zeigt sich eine noch höhere Dimerisierung als bei der Positivkontrolle.

3.3.4 CD-Spektroskopische Ermittlung der Schmelztemperatur

Wie bereits erwähnt, übt das GrpE-Protein die Funktion eines Thermosensors aus. Hierbei vollzieht nur das GrpE eine Strukturveränderung in dem relevanten Temperaturbereich, und führt durch seine damit einhergehende geringere Aktivität zu einer Hitzeschockantwort (Grimshaw *et al.* 2001). Anhand der isolierten Proteine aus dem mesophilen und thermophilen Cyanobakterium, sollte eine Schmelzkurve der volllängen Proteine und der einzelnen Domänen ermittelt werden. Zusätzlich zu der Schmelzkurve wurde gleichzeitig die Veränderung der Sekundärstruktur verfolgt. Die CD-Spektren zur Untersuchung der Sekundärstruktur der volllängen Proteine aus *Synechocystis* sp. und *Thermosynechococcus* zeigen für α -helikale Proteine typische Kurven mit negativen Maxima bei 222 nm und 208 nm (Abb. 38 schwarze Linie).

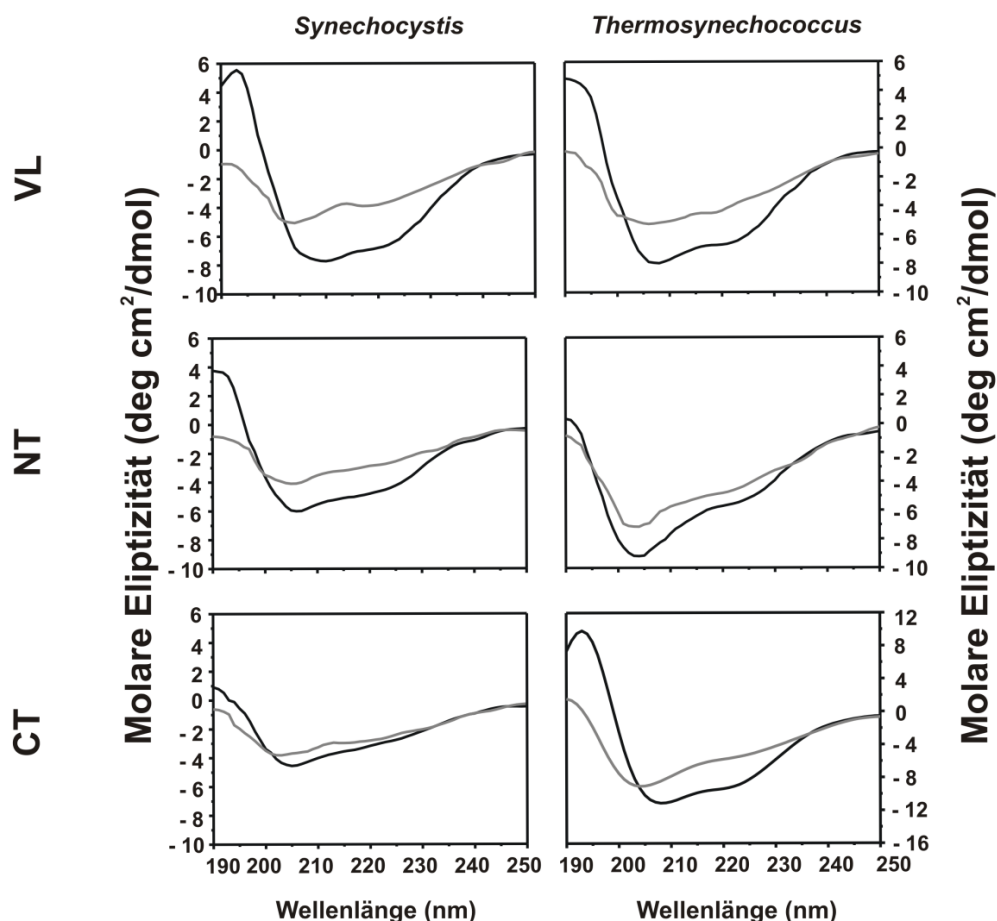


Abbildung 38: CD-Spektren der volllängen GrpE-Proteine und der einzelnen GrpE-Domänen

Die Messung der CD-Spektren erfolgte in einem Temperaturbereich zwischen 10 °C und 95 °C innerhalb des Wellenlängenbereichs von 190 – 250 nm. Abgebildet sind nur die Spektren bei 30 °C (schwarz) und 95 °C (grau). VL: Volllängen Protein, NT: NT-Domäne, CT: CT-Domäne.

Bei einer Temperatur von 95 °C (Abb. 38 graue Linie) ist das CD-Spektrum verändert und das Maximum bei ~200 nm deutet auf *random coiled* Strukturen und somit auf ein denaturiertes Protein hin. Beim Betrachten der einzelnen Domänen, sind deutliche Unterschiede in der Sekundärstruktur zu erkennen. Bei dem Protein aus *Synechocystis* ist die NT-Domäne bei 30 °C überwiegend α -helikal, wobei das CD-Spektrum der CT-Domäne keine definierte Sekundärstruktur erkennen lässt. Ein konträres Bild zeigt das GrpE-Protein aus dem Cyanobakterium *Thermosynechococcus*. Hier zeigt die CT-Domäne im Gegensatz zur NT-Domäne eine eindeutige α -helikale Sekundärstruktur bei 30 °C und einen Verlust der Sekundärstruktur mit steigender Temperatur.

Da es sich bei dem GrpE-Protein um einen Thermosensor handelt, ist es entscheidend, dass das Protein nach dem Erhitzen und dem darauffolgenden Abkühlen, seine Funktion nicht verliert. Zur Ermittlung der Schmelztemperatur, welche eine Auskunft über die Stabilität des Proteins gibt, wurde der Wert des CD-Signals bei 208 nm mit steigender Temperatur verfolgt (Abb. 39).

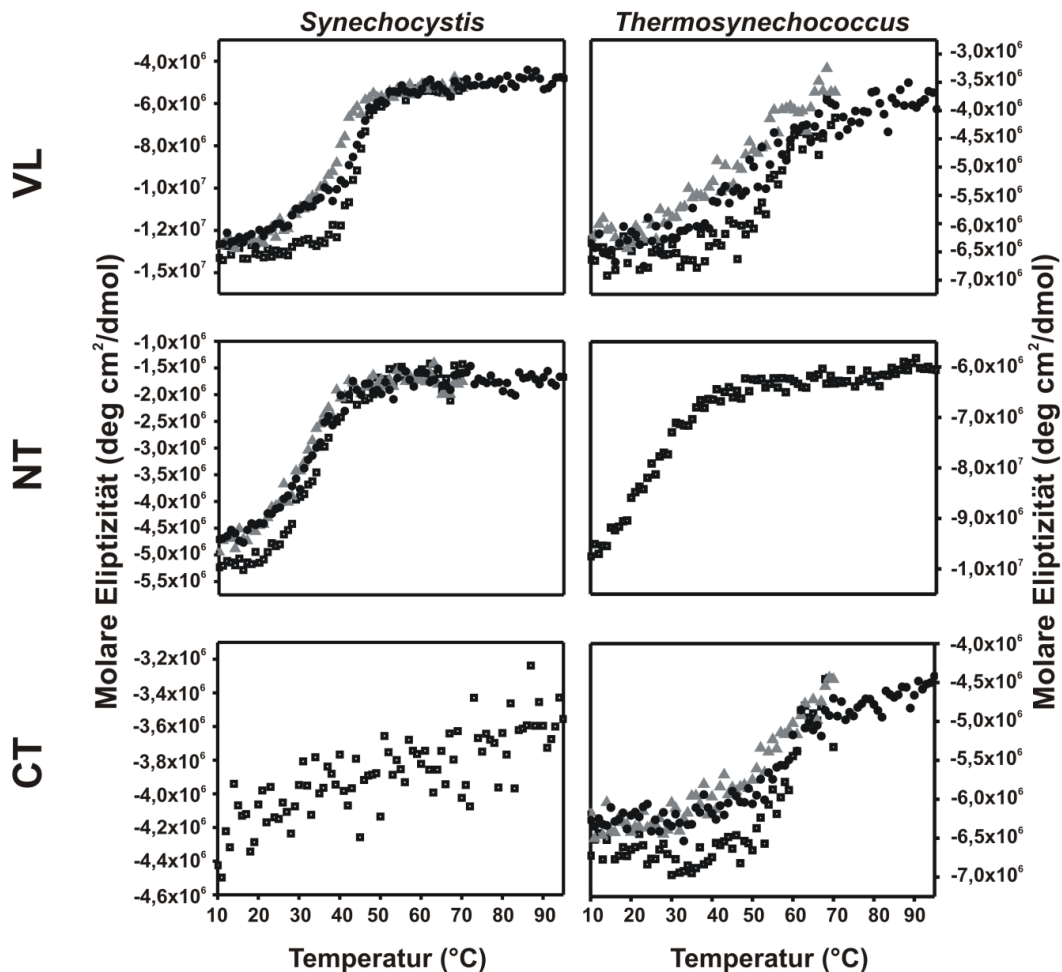


Abbildung 39: Schmelzkurven der volllängigen GrpE-Proteine und der GrpE-Proteinfragmente

Die Schmelzkurven wurden anhand des Wertes der CD-Spektren bei 208 nm ermittelt. Die Schmelzpunkte wurden bei einem Temperaturanstieg von 10 °C auf 70 °C (□), bei einer Abkühlung von 70 °C auf 10 °C (▲) und einem erneuten Temperaturanstieg von 10 °C auf 95 °C (●) detektiert. VL: Volllänge Protein, NT: NT-Domäne, CT: CT-Domäne.

Die Schmelzkurven des volllängigen Proteins aus *Synechocystis* sp. zeigen, dass der Prozess der Denaturierung reversibel ist. Bei der Kurve nach dem Erhitzen von 10 °C auf 70 °C lässt sich der Schmelzpunkt bei ~43 °C und nach dem anschließenden Abkühlen bei ~38 °C ermitteln. Bei dem erneuten Erhitzen von 10 °C auf 95 °C liegt der Schmelzpunkt bei einer Temperatur von ~42 °C. Vergleichbar sind die Ergebnisse bei der NT-Domäne, wobei hier der erste Schmelzpunkt bei ~33 °C liegt. Der Schmelzpunkt bei der rückläufigen Reaktion ist bei ~30 °C und bei erneutem Erhitzen von 10 °C auf 95 °C bei ~32°C. Bei der CT-Domäne aus *Synechocystis* sp. genauso wie bei der NT-Domäne aus *Thermosynechococcus* lassen sich bei der ersten Reaktionen keine Schmelzpunkte ermitteln, weshalb hier nur der Weg von 10 °C auf 95 °C dargestellt ist.

Bei den Kurven des volllängen Proteins aus dem thermophilen Cyanobakterium *Thermosynechococcus* zeigen sich zwischen den Messungen geringe Unterschiede. Beim Erhitzen von 10 °C auf 70 °C liegt der Schmelzpunkt bei ~54 °C und beim folgenden Abkühlungsprozess sinkt dieser auf ~50 °C ab. Beim erneuten Erhitzen ist die Schmelztemperatur ebenfalls bei ~50 °C und zeigt somit keine Veränderung. Bei der Messung der CT-Domäne zeigt sich ein Schmelzpunkt von ~58 °C und liegt somit höher als bei der Messung des volllängen Proteins. Beim Abkühlen steigt dieser Wert auf ~61 °C an und beim letzten Erhitzen lässt sich erneut ein Schmelzpunkt bei ~58 °C detektieren.

Da durch die CD-Spektroskopie für beide GrpE-Proteine und für die NT-Domäne aus *Synechocystis* sp. sowie die CT-Domäne aus *Thermosynechococcus* nur ein Schmelzpunkt ermittelt werden konnte, könnte es sein, dass die GrpE-Proteine direkt von einer dimeren in eine monomere Struktur übergehen. Zur Absicherung, dass bei der durch die Schmelzkurven ermittelten Temperatur bereits eine Monomerisierung stattfindet, wurden mit den volllängen Proteinen und den einzelnen Domänen *Crosslink*-Experimente bei steigender Temperatur durchgeführt. Die volllängen Proteine genauso wie die einzelnen Domänen wurden zunächst bei einer Temperatur zwischen 10 °C und 80 °C für 10 min inkubiert, bevor die Zugabe des Crosslinkers Glutaraldehyd, welcher mit Amingruppen reagiert, zu einer Vernetzung benachbarter Proteine führen kann. Liegen die GrpE-Proteine oder die GrpE-Domänen als Dimer vor, werden sie durch den Einsatz von Glutaraldehyd vernetzt und bleiben auch unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE stabil. Durch die Denaturierung der Proteine und der damit einhergehenden Monomerisierung, kommt es zu keiner Quervernetzung und die Proteine sind als Monomere zu detektieren. Durch den Temperaturanstieg von 10 °C auf 80 °C kann die Temperatur ermittelt werden, bei der das Dimer zu Monomer Verhältnis im Gleichgewicht liegt und damit die Schmelztemperatur darstellt.

Bei den volllängen Proteinen (Abb. 40) aus *Synechocystis* sp. und *Thermosynechococcus* zeigt sich ein klarer Verlauf der Denaturierung bis hin zur vollständigen Monomerisierung. Der Punkt des Gleichgewichts zwischen Dimer und Monomer unterscheidet sich dabei bei den Proteinen aus dem mesophilen sowie dem thermophilen Cyanobakterium. Bei dem GrpE-Protein aus *Synechocystis* sp. ist das Gleichgewicht bei einer Temperatur von ~45 °C erreicht und bei dem GrpE-Protein des thermophilen Bakteriums liegt dieses Gleichgewicht bei einer Temperatur von etwa 60 °C. Zusätzlich zeigt das Protein aus *Thermosynechococcus* zwei

monomere Formen. Bei der Negativkontrolle, dem Protein ohne Zugabe von Glutaraldehyd zeigt sich nur die langsamer laufende Form des Monomers.

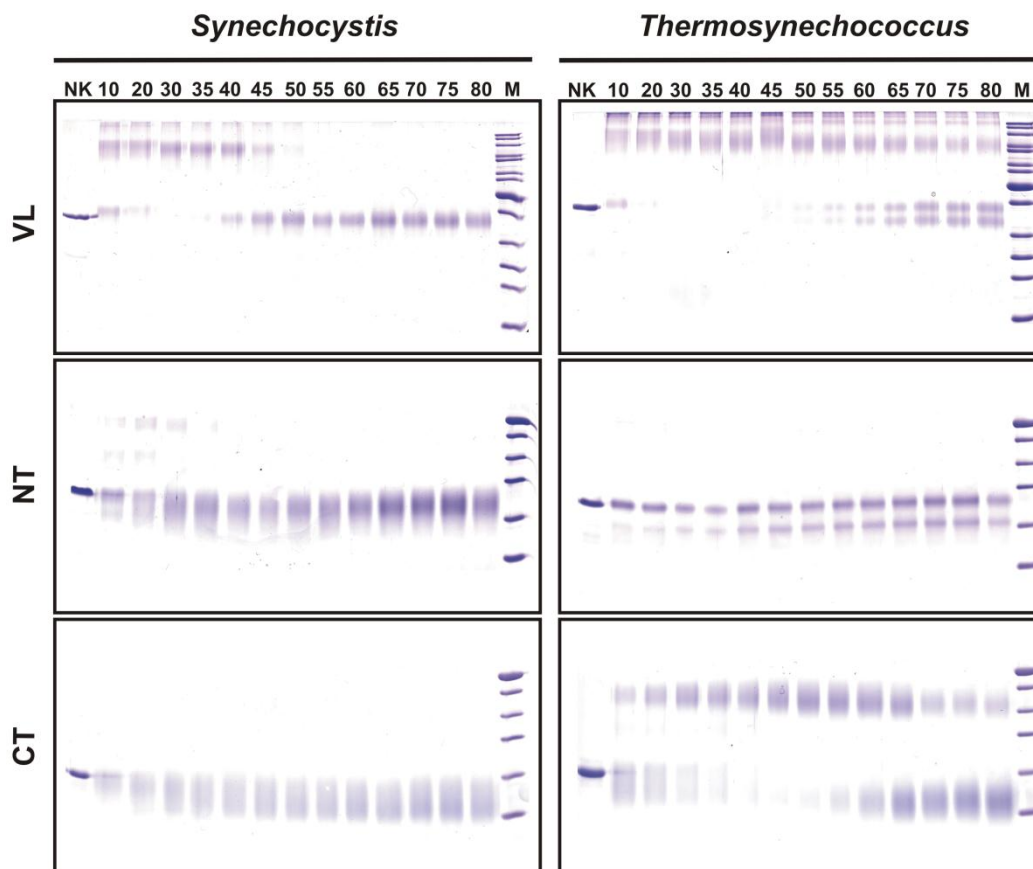


Abbildung 40: Crosslink der volllängen GrpE-Proteine und der einzelnen GrpE-Domänen

SDS-PAGE der volllängen Proteine und der einzelnen GrpE-Domänen nach Zugabe von Glutaraldehyd und Inkubation bei verschiedenen Temperaturen (10 – 80 °C). M: Molekulargewichtsmarker, NK: Negativkontrolle, VL: Volllängen Protein, NT: NT-Domäne, CT: CT-Domäne.

Bei den einzelnen GrpE-Domänen sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Die NT-Domäne des mesophilen Bakteriums *Synechocystis* sp. zeigt ein Equilibrium zwischen Dimer und Monomer bereits bei <math><10^{\circ}\text{C}</math> wobei die CT-Domäne schon bei der geringsten Temperatur von 10 °C als Monomer vorliegt und somit keine Dimere ausbildet. Ein gegensätzliches Bild liefern die GrpE-Domänen des thermophilen Bakteriums *Thermosynechococcus*. Dabei kann für die NT-Domäne keine Dimerisierungstendenz beobachtet werden und desweiteren zeigt die NT-Domäne, ähnlich wie das volllängen Protein zwei Formen des Monomers. Die Negativkontrolle zeigt auch hier nur eine Form, welche ein langsames Laufverhalten aufweist. Die CT-Domäne zeigt zu Beginn die monomere und die dimere Form, wobei mit

steigender Temperatur das Dimer zunimmt, bevor es wieder denaturiert und ein Gleichgewicht zwischen beiden Formen bei ~60 °C bis 65 °C zu detektieren ist. Bis zu einer Temperatur von 80 °C ist die dimere Form weiter zu erkennen und somit liegt das Protein nicht vollständig als Monomer vor.

4 Diskussion

4.1 Untersuchungen zur Thylakoidmembranbiogenese

Die Thylakoidmembranbiogenese der Cyanobakterien ist bis heute nicht verstanden und ein kontrovers diskutierter Forschungsbereich. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Stämme mit Mutationen welche die photosynthetischen Gene betreffen, untersucht und charakterisiert. Zusätzlich wurde das Protein VIPP1, welches in den Prozess der Thylakoidmembranbiogenese involviert ist charakterisiert (Westphal *et al.* 2001; Fuhrmann *et al.* 2009). Ein komplexes Modell zu den Vorgängen konnte bis zum heutigen Stand der Forschung noch nicht aufgestellt werden. Bei einer Kultivierung des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 unter *light activated heterotrophic growth* (LAHG) Bedingungen, zeigt sich eine starke Reduktion des Thylakoidmembransystems. Nach dem Transfer ins Licht wird das Thylakoidmembransystem jedoch wieder vollständig aufgebaut (Zsiros *et al.* 2002). Diese Kultivierungsmethode diente als Grundlage für die Untersuchung der Thylakoidmembranbiogenese. Kulturen des Stammes *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurden mindestens zwei Wochen unter LAHG Bedingungen angezogen und anschließend erfolgte das Wachstum im Licht für mindestens 24 h. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen im Bezug auf die Pigmentzusammensetzung, die photosynthetische Aktivität und die oligomere Struktur der Photosysteme charakterisiert.

4.1.1 Während der Thylakoidmembranbiogenese kommt es zu phänotypischen Veränderungen

Veränderungen des Phänotyps, insbesondere des Thylakoidmembransystems, wurden bereits in früheren Arbeiten festgestellt. Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde unter LAHG Bedingungen ein starker Rückgang des Thylakoidmembransystems beobachtet (Vernotte *et al.* 1992; Zsiros *et al.* 2002). Auch die EM-Aufnahmen in dieser Arbeit zeigten eine klare Reduktion des internen Membransystems und eine phänotypische Veränderung innerhalb der Zellen (Abb. 12). Die Regeneration des Thylakoidmembransystems setzte nach acht Stunden ein und bereits nach zwölf Stunden waren erste, parallel zur Cytoplasmamembran angeordnete Thylakoidmembranpaare innerhalb der Zellen zu erkennen. Für die benötigte Assemblierung der Photosysteme ist eine geordnete Struktur der

Thylakoidmembranen essentiell (Zsiros *et al.* 2002), was wiederum die Funktion verschiedener Enzyme voraussetzt. Unter LAHG Bedingungen liegt eine lichtaktivierte Desaturase, welche für die Bereitstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren verantwortlich ist, inaktiv vor. Auf Grund des inaktiven Enzyms steigt der Gehalt an einfach ungesättigten Fettsäuren innerhalb der Zelle, was eine verringerte Fluidität zum Einen und eine eingeschränkte Assemblierung der Photosysteme zum Anderen zur Folge hat (Zsiros *et al.* 2002). Diese veränderte Lipidzusammensetzung und die damit gleichzusetzenden veränderten Eigenschaften der Thylakoidmembran könnten die bereits beschriebene diffuse Struktur begründen. Demnach werden die Thylakoide im Dunkeln nicht abgebaut sondern lediglich destabilisiert, was zu einem Verlust der Photosysteme führt (Kanervo *et al.* 1997). Um diese Hypothese zu bestätigen, müsste die Lipidzusammensetzung im Inneren der Zelle in zukünftigen Arbeiten untersucht werden. Befinden sich im Inneren der dunkeladaptierten Zellen Lipide, welche sich den Thylakoidmembranen zuordnen lassen, würde es einen ersten Hinweis auf den Verbleib der Thylakoide unter LAHG Bedingungen geben. Da in den Zellen unter LAHG Bedingungen neben den Photosystemen auch Phycobilisomen und Chlorophyllmoleküle zu finden waren, müssen vereinzelt Thylakoide, auch wenn sie in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht zu erkennen waren aktiv in den Zellen vorliegen. Ein weiterer deutlicher Unterschied zeigte sich nach zwölf Stunden und damit nach der Regeneration der ersten Thylakoidmembranpaare. Im Inneren der Zelle zeigte sich eine Anhäufung von dunkel gefärbten Strukturen, wobei es sich um die Speicherformen Cyanophycin oder Poly- β -Hydroxybutyrat, welche schon häufig in *Synechocystis* sp. beschrieben wurden (Allen 1984; Wu *et al.* 2001), handeln könnte. Des Weiteren verdeutlichten die elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit der Dauer der Belichtung eine deutlich dunklere Färbung im Raum zwischen den Thylakoidmembranpaaren, was durch die an die Photosysteme gebundenen Phycobilisomen zu erklären ist (Zsiros *et al.* 2002). Die zeitliche Abfolge der Regeneration des internen Membransystems, lässt sich phänotypisch darstellen, wobei ein erster entscheidender Unterschied nach acht Stunden deutlich wird. Nach 24 h Wachstum im Licht ist das Thylakoidmembransystem vollständig regeneriert.

4.1.2 Die Pigmentzusammensetzung zeigt bedeutende Veränderungen

Die Pigmente, darunter vor allem die Chlorophylle sowie die Pigmente der Phycobilisomen, spielen bei der Photosynthese eine essentielle Rolle. Während der Inkubation unter LAHG

Bedingungen zeigte sich eine Verringerungen des Chlorophyllgehaltes pro Zelle. Sowohl die Autofluoreszenz der dunkeladaptierten Zellen (Abb. 13), welche zum größten Teil durch die Chlorophylle bestimmt wird, als auch die Chlorophyllkonzentration pro Zelle (Abb. 14) zeigten eine Verminderung. Ein vollständiger Verlust wurde dabei nicht erzielt, da *Synechocystis* sp. eine lichtunabhängige Chlorophyllbiosynthese besitzt (Wu *et al.* 1995). Wie die Messungen des Chlorophyllgehaltes zeigten, beginnt die Chlorophyllbiosynthese bereits nach zwei Stunden Wachstum im Licht und ist damit einer der früh einsetzenden Prozesse während der Regenerierung des Photosyntheseapparates (Wu *et al.* 1995). Wie die 77 K-Spektren (Abb. 16A) jedoch andeuteten, liegt das Chlorophyll nach dem Transfer der Zellen ins Licht zuerst nicht an das PS II gebunden vor. Die Verschiebung des Maximums von 695 nm zu 685 nm entspricht ungebundenem Chlorophyll (Wu *et al.* 1995). Da freies Chlorophyll für die Zelle toxisch wäre, muss ein zusätzlicher Mechanismus vorhanden sein, der die neu gebildeten Chlorophyllmoleküle bindet. Bei höheren Pflanzen konnten *early light induced proteins* (ELIPs), welche die Chlorophylle in einem ersten Schritt fixieren, identifiziert werden (Adamska *et al.* 1991; Adamska *et al.* 1992). In Cyanobakterien und auch in *Synechocystis* sp. PCC 6803 wird dem IsiA-Protein, welches eine hohe Ähnlichkeit zu dem CP43 des PS II aufweist, eine ähnliche Funktion zugeschrieben. Das IsiA-Protein konnte jedoch bei Wachstum unter Eisenmangel innerhalb cyanobakterieller Zellen in einem Komplex mit dem PS I gefunden werden. Dabei sind 18 Kopien des IsiA um das PS I-Trimer angeordnet und jedes IsiA bindet 12 Chlorophyllmoleküle, was zu einer verstärkten Energieübertragung auf das PS I-Trimer führt (Bibby *et al.* 2001; Boekema *et al.* 2001). Eine erhöhte Konzentration des *isiA*-Transkripts konnte ebenso bei Wachstum unter Hochlicht in cyanobakteriellen Zellen gefunden werden. Ein weiterer Hinweis auf die schützende Funktion vor lichtinduzierten Schädigungen der Photosysteme zeigten Versuche mit einer *isiA*-Mutante. Die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) stieg in einer *isiA*-Mutante drastisch an (Havaux *et al.* 2005). Durch Microarray-Analysen muss gezeigt werden, ob das *isiA*-Transkript auch unter LAHG Bedingungen in einer erhöhten Konzentration in den Zellen von *Synechocystis* sp. vorliegt, um so die Zelle vor reaktiven Sauerstoffspezies zu schützen. Zusätzlich zeigten die 77 K-Spektren (Abb. 16A) ein Maximum bei 676 nm, was auf nicht assembliertes Chlorophyll hindeutet (Keren *et al.* 2005). Unter Berücksichtigung dieser Annahme kommt es noch vor der Aktivierung der Chlorophyllbiosynthese zur Assemblierung der bereits vorhandenen Chlorophylle und damit zur Abnahme des Maximums bei 676 nm. Dies wird durch den Aspekt bestätigt, dass die an der Chlorophyllbiosynthese beteiligten

Enzyme in der Thylakoidmembran lokalisiert sind (Srivastava *et al.* 2005) und somit die Regeneration des internen Membransystems die Voraussetzung für die Chlorophyllbiosynthese darstellt.

Im Vergleich zu dem Chlorophyllgehalt weist der Gehalt der Lichtsammelkomplexe, der Phycobilisomen, keine so deutliche Verringerung auf, was sowohl durch das ermittelte Verhältnis von Phycocyanin zu Chlorophyll (Abb. 15B), als auch durch die Absorptionsspektren gezeigt werden konnte (Abb. 15A). Die Phycobilisomen (PBS) liegen unter LAHG Bedingungen an das PS II assoziiert vor, was anhand der 77 K-Spektren (Abb. 16B) deutlich wurde. Die Energieübertragung von den PBS auf das PS II war nach dem Transfer ins Licht sehr hoch und mit der Dauer des mixotrophen Wachstums sank der Wert kontinuierlich ab. Eine effiziente Energieübertragung von den PBS auf das PS II ist nach der Inkubation im Dunkeln jedoch nicht gewährleistet, was die Fluoreszenzinduktionskurven bestätigten (Abb. 18A). Die gemessene starke Hintergrundfluoreszenz ist durch den hohen Gehalt der an das PSII assoziierten PBS zu erklären, da die verwendete Beleuchtung von 620 nm stärker von den Phycobilisomen als von den Chlorophyllmolekülen absorbiert wird. Der anschließende sättigende Lichtpuls, welcher zur Bestimmung der maximalen Fluoreszenz und damit zur Ermittlung der maximalen Effizienz des PS II dient, zeigte keine gesteigerte Fluoreszenzemission. Der fehlende positive Wert F_m^0 , deutet eine gestörte Energieübertragung von den PBS auf das Reaktionszentrum des PS II an. Eine verringerte Energieübertragung von den PBS auf das PS II wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben (Vernotte *et al.* 1992). Während der Regeneration des Thylakoidmembransystems verändert sich die Lokalisation der Lichtsammelkomplexe, indem die PBS bei den dunkeladaptierten Zellen an das PS II assoziiert vorliegen und sich unter Wachstum im Licht lösen und frei oder an beide Photosysteme assoziiert vorkommen. Zusammenfassend beschreibt Abb. 41 die Veränderungen in der Pigmentzusammensetzung nach dem Transfer der dunkeladaptierten Zellen ins Licht.

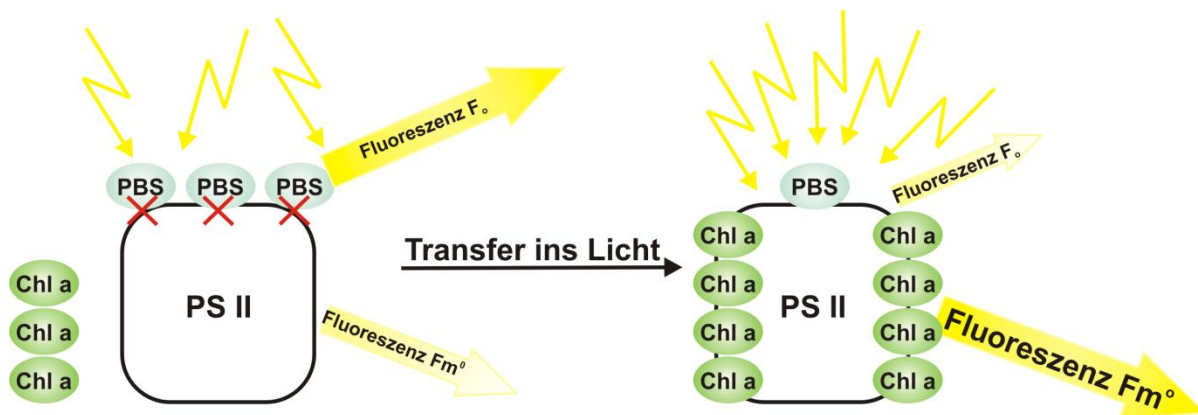


Abbildung 41: Veränderungen der Pigmentzusammensetzung nach dem Transfer der dunkeladaptierten Zellen ins Licht

Bei Wachstum unter LAHG Bedingungen ist der Chlorophyllgehalt pro Zelle verringert und die Chlorophyllmoleküle (Chl a) sind nicht an das Photosystem II (PS II) assoziiert. Eine hohe Anzahl an Phycobilisomen (PBS) liegt an das PS II assoziiert vor und führt zu einer starken Hintergrundfluoreszenz (F_0). Die Energieübertragung auf das PS II ist jedoch gestört, was zu einer geringen Fluoreszenz F_m^0 führt. Nach dem Transfer ins Licht, steigt der Chlorophyllgehalt und die Chlorophyllmoleküle sind an das PS II assoziiert. Der Gehalt an gekoppelten Phycobilisomen verringert sich, was zu einer geringeren Hintergrundfluoreszenz führt. Die effiziente Energieübertragung auf das PS II führt zu einer gesteigerten Chlorophyllfluoreszenz F_m^0 .

4.1.3 Photosystem II liegt als inaktives Monomer vor

Um die Elektronentransportkette über die Thylakoidmembran aufrecht zu erhalten und Energie zu gewinnen, müssen die Photosysteme PS I und PS II aktiv vorliegen. Die Auftrennung, der aus Membranen solubilisierten Proteinkomplexe, in einer Blau-Nativen-Gelelektrophorese, zeigte keine PS II-Dimere in den Zellen unter LAHG Bedingungen. Im Gegensatz zu den Zellen nach Wachstum im Licht für 24 h besitzen die dunkeladaptierten Zellen eine geringere Konzentration der monomeren Formen des PS I und PS II (Abb. 22A/B). Ein vollkommener Verlust an Reaktionszentren des PS II innerhalb der dunkeladaptierten Zellen kann ausgeschlossen werden. Bei den PAM-Messungen wird anhand der Chlorophyllfluoreszenz die Effizienz des PS II ermittelt. Die Induktionskurven zeigten ein durch das PS II vermitteltes Signal, indem nach einem starken Lichtpuls ein negativer Wert F_m^0 erreicht wurde (Abb. 18A). Dies deutet an, dass der Plastochinonpool bereits während der Dunkelphase stark reduziert vorliegt und der anschließende Lichtpuls zur Bildung des PQH_2 führt, welches die Elektronen über den Cytochrom b_6f Komplex an das PS I abgibt. Diese Ergebnisse lassen auf eine inaktive Donorseite innerhalb des PS II schließen (Keren *et al.* 2005). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die

Photosysteme neben der Thylakoidmembran auch in der Plasmamembran lokalisiert sind (Zak *et al.* 2001; Keren *et al.* 2005), wobei das PS II hier nicht voll aktiv vorliegt. Zur Bildung des aktiven PS II muss neben der Prozessierung des D1-Vorläuferproteins (pD1) durch die in der Plasmamembran lokalisierte Protease CtpA (Diner *et al.* 1988; Zak *et al.* 2001), die Assemblierung des Manganclusters an das PS II gewährleistet werden. Dies setzt den Transport des PS II zur Thylakoidmembran und die Bindung des CP43-Proteins, welches nur in der Thylakoidmembran lokalisiert ist, (Zak *et al.* 2001) voraus. Die Assemblierung des Manganclusters ist wiederum die Voraussetzung zur Bildung des Sauerstoffs durch die Oxidation des Wassers (Keren *et al.* 2005). Die in dieser Arbeit durchgeführten Sauerstoffmessungen, verifizieren das Ergebnis einer inaktiven PS II-Donorseite. Bei der Verwendung des Elektronenakzeptors PPBQ, kam es nach der Inkubation unter LAHG Bedingungen zu einem Sauerstoffverbrauch (Abb. 17B). Es findet somit keine Oxidation des Wassers mit gleichzeitiger Freisetzung von Elektronen statt. Der gemessene Sauerstoffverbrauch ist durch eine aktive Atmungskette innerhalb der dunkeladaptierten Zellen zu erklären. Nach einer sich anschließenden Inkubation unter mixotrophen Bedingungen im Licht für acht Stunden zeigte sich eine Sauerstoffentwicklung und damit eine Regeneration der PS II-Aktivität. In früheren Arbeiten wurde bei einem Transfer der heterotroph wachsenden Zellen von *Synechococcus* sp. PCC 6714 ins Licht bereits eine in zwei Stufen stattfindende Regeneration der PS II-Aktivität beschrieben (Vernotte *et al.* 1992). Dabei ist ein erster Anstieg, innerhalb der zeitlichen Abfolge der O₂-Entwicklung, bis etwa sechs Stunden nach dem Transfer ins Licht unabhängig von der Proteinbiosynthese, da eine Inhibierung durch das Antibiotikum Chloramphenicol nicht möglich ist. Der zweite Schritt wird durch das Antibiotikum inhibiert und ist damit mit der Proteinbiosynthese gekoppelt. Während der, in dieser Arbeit zu detektierenden, achtstündigen Plateauphase (Abb. 17B) werden die vorhandenen aber inaktiven PS II-Komplexe assembliert. Der darauf folgende starke Anstieg bis 24 h Belichtung steht vermutlich in Verbindung mit der Proteinbiosynthese und dem Bereitstellen von neuen PS II-Komplexen. Nach etwa acht bis zwölf Stunden lassen sich auch die ersten Thylakoidmembranen detektieren, was mit den Sauerstoffmessungen sowie den PAM-Messungen konform geht. Die in der Plasmamembran lokalisierten unvollständigen PS II-Komplexe, welche eine Energieübertragung genauso wie eine Ladungstrennung vollziehen können (Keren *et al.* 2005), werden mit der Bildung der ersten Thylakoide an das CP43 assembliert. Dadurch wird der Mangancluster aktiv und es kommt zur O₂-Produktion. Neben der inaktiven Donorseite des PS II zeigen die Messungen der

Chlorophyllfluoreszenz zu Beginn eine weitaus stärkere Oxidationskraft des PS I im Vergleich zur Reduktionskraft des PS II, was durch die negativen Signale während der Lichtpulse mit Messlicht gezeigt wurde (Abb. 18A). Diese negativen Signale und die ansteigenden Werte der Parameter F_m' und F_t bedeuten, dass der Prozess der *state transition* abläuft, wobei die PBS vom PS I zum PS II wandern. Durch die Verwendung von spezifischen gegen das PS II gerichteten Antikörpern, muss die Lokalisation des inaktiven PS II ermittelt werden.

Abweichend zu dem inaktiven PS II ist das PS I bei den isolierten und solubilisierten Membranen der dunkeladaptierten Zellen sowohl bei der Blau-Nativen-Gelelektrophorese (Abb. 22A) als auch im Saccharosedichtegradienten (Abb. 22B) als Trimer zu detektieren. Die Konzentration des Trimers genauso wie die der Monomere ist bei den dunkeladaptierten Zellen im Vergleich zu den Zellen nach 24 h mixotrophen Wachstums geringer. Die anhand der P700 Re-Reduktions-Messung (Abb. 20) ermittelte Aktivität des PS I, zeigt unter LAHG Bedingungen einen aktiven zyklischen Elektronentransport über den Cytochrom *b₆f* Komplex. Durch den zyklischen Elektronentransport kann ein Protonengradient über die Membran aufgebaut werden, der zur ATP-Gewinnung genutzt wird (Mi *et al.* 1995). Gleichzeitig zeigte sich auch hier erneut, dass das PS II inaktiv vorliegt und nicht zur Re-Reduktion beiträgt, da es keine Elektronen in den Plastochinonpool einschleust. Der Verlauf der Messung unter Zugabe des PS II-Inhibitors DCMU führte unter LAHG Bedingungen zu keiner Verzögerung bei der Re-Reduktion des P700. Erst nach acht Stunden mixotrophen Wachstums waren Veränderungen im Verlauf der beiden Messungen zu beobachten (Abb. 20C). Die ansteigenden Halbwertszeiten $t_{1/2}$ unter Zugabe von DCMU gehen mit der Regeneration der PS II-Aktivität einher, wobei die Halbwertszeiten der Re-Reduktion ohne den Inhibitor kontinuierlich auf einem gleichen Niveau stagnierten, was auf eine beständige Aktivität des PS I und des zyklischen Elektronentransportes hindeutet. In der Thylakoidmembran des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. ist der Photosyntheseapparat vermutlich mit der Atmungskette über den Plastochinonpool, den Cytochrom *b₆f* Komplex und über die löslichen Elektronencarrier miteinander gekoppelt (Schmetterer 1994). Die Atmungskette und das in Verbindung mit der Photosynthese wichtige Cytochrom *c* ist neben den Thylakoidmembranen in der Plasmamembran lokalisiert (Huang *et al.* 2002). Nach den gezeigten Ergebnissen könnte die Möglichkeit bestehen, dass auch in der Plasmamembran ein zyklischer Elektronentransport abläuft. Um die genaue Lokalisation des aktiven PS I-Trimers feststellen zu können, müssen in Zukunft weitere Versuche durchgeführt werden. Eine Immunogold-

Analyse unter Zuhilfenahme eines spezifischen, gegen das PS I gerichteten Antikörpers könnte eine genaue Lokalisationsbestimmung möglich machen.

4.1.4 Modell zur Thylakoidmembranbiogenese

Die Untersuchungen zur Thylakoidmembranbiogenese in dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. zeigten einen zeitlichen Ablauf bei der Regeneration des internen Membransystems. Unter LAHG Bedingungen liegt die lichtaktivierte Desaturase inaktiv vor und führt durch die vermehrte Konzentration an einfach ungesättigten Fettsäuren innerhalb der Thylakoidmembran zur Destabilisierung der Thylakoide und zu einem inaktiven Elektronentransport. Der Chlorophyllgehalt sinkt im Gegensatz zu dem Gehalt an Phycobilisomen stark ab, da nur die lichtunabhängige Chlorophyllbiosynthese abläuft. Die Synthese der Phycobilisomen scheint ebenfalls lichtunabhängig abzulaufen, um eine maximale Quantenausbeute zu erzielen. Nach dem Transfer hin zu mixotrophen Bedingungen ins Licht, wird in einem ersten Schritt die Chlorophyllbiosynthese aktiviert und das vorhandene Chlorophyll wird assembliert. Diese Chlorophylle binden an das PS II, welches in den dunkeladaptierten Zellen durch das Fehlen des CP43 eine inaktive Donorseite besitzt und sorgen somit für die Assemblierung des Manganclusters. Dieser Prozess ist nach etwa acht Stunden abgeschlossen und die Oxidation des Wassers führt erneut zu einer netto O₂-Produktion. Das PS I, welches auch innerhalb der dunkeladaptierten Zellen aktiv und als Trimer vorliegt, hält den zyklischen Elektronentransport und somit die Bildung des ATPs aufrecht. Zusätzlich ist der Cytochrom *b₆f* Komplex ebenfalls aktiv, was für die stattfindende Atmungskette essentiell ist.

Nach einer Assemblierung der destabilisierten Thylakoide und des PS II, setzt nach etwa zwölf Stunden mixotrophen Wachstums im Licht vermutlich eine verstärkte Proteinbiosynthese ein, um neue Bestandteile des Photosyntheseapparates und der Thylakoide bereitzustellen. Ob der Aufbau des Thylakoidmembransystems und die Aktivität des PS II nach dem Transfer ins Licht mit einer verstärkten Proteinbiosynthese zusammenhängt, muss in einer Proteomanalyse untersucht werden. Die bei der Thylakoidmembranbiogenese involvierten Gene sollen in weiteren Arbeiten durch Microarray-Analysen identifiziert werden.

4.2 Signalpeptidasen

4.2.1 LepB2 ist eine funktionelle Signalpeptidase in *Synechocystis* sp. PCC 6803

Synechocystis sp. PCC 6803 besitzt, genauso wie andere Cyanobakterien, mit Ausnahme von *Gloeobacter violaceus*, ein zusätzliches internes Membransystem, die Thylakoide. Die Thylakoidmembran ist der Ort der Photosynthese und eventuell der Atmungskette, weshalb der Transport der beteiligten Proteine zu definierten Membranen geregelt sein muss. Der Transport von Vorläuferproteinen über die Plasmamembran ins Periplasma und über die Thylakoidmembran erfolgt auch in *Synechocystis* sp. über den Tat- oder den Sec-Transportweg (Aldridge *et al.* 2008). In allen bisher sequenzierten Cyanobakterien wurden, im Vergleich zu *E. coli*, jeweils zwei homologe LepB-Proteine detektiert (Rajalahti *et al.* 2007). Bei *Synechocystis* sp. kodieren die Gene *sl10716* (*lepB1*) und *slr1377* (*lepB2*) für putative Signalpeptidasen und ihre Funktion sollte zunächst anhand einer Komplementationsstudie untersucht werden (Abb. 24). Hierbei komplementierte lediglich das LepB2-Protein aus *Synechocystis* sp., bei erhöhter Temperatur, den Wachstumsdefekt eines *E. coli* *lepB*-Mutationsstammes (Inada *et al.* 1989) (Abb. 24). Dieses Ergebnis kann verschieden diskutiert werden, wobei durch einen solchen Versuch die Funktion der putativen Signalpeptidasen LepB1 und LepB2 nicht eindeutig geklärt werden kann. Die zu untersuchenden Proteine stammen aus einem anderen Organismus und könnten deshalb in Form von *inclusion bodies* innerhalb der Zelle angereichert vorliegen und ihre Funktion nicht ausüben. Eine Trennung in die verschiedenen Zellbestandteile, könnte hierüber Aufschluss geben. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass das LepB1-Protein in seiner Funktion auf das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. beschränkt ist und deshalb die Funktion des endogenen *E. coli* LepB-Proteins nicht übernehmen kann. LepB1 zeigt bei einem Aminosäurevergleich (Abb. 23), genauso wie LepB2, die für Signalpeptidasen typischen Domänen und Aminosäuren. In der Box B befindet sich die konservierte Aminosäureabfolge von Ser und Met, wobei das Serin an der katalytischen Dyade beteiligt ist. Genauso besitzt die Box D die konservierten Aminosäuren Lys und Arg und die Box E die Abfolge Gly-Asp-Asn sowie ein konserviertes Arg (Dalbey *et al.* 1997; van Roosmalen *et al.* 2004), was auf eine Funktion als Signalpeptidase hindeutet. Zusätzlich wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass das LepB1 in *Synechocystis* sp. unter photoautotrophen Bedingungen und das LepB2 auch unter mixotrophen oder heterotrophen Wachstum essentiell ist (Zhbanko *et al.* 2005). Der *lepB1*-

Deletionsstamm ist unfähig Photosynthese zu betreiben und zeigt Einschränkungen bei der Prozessierung des PsbO, einem Mangan-stabilisierenden Polypeptid des PS II (Zhbanko *et al.* 2005). Dies zeigte, dass das LepB1 in *Synechocystis* sp. unter bestimmten Bedingungen essentiell ist und als Signalpeptidase fungiert. Da eine Deletion des *lepB1*-Gens nur unter photoautotrophen Bedingungen letal ist, besteht die Vermutung, dass das LepB1-Protein hauptsächlich in den Thylakoiden vorkommt und hier Vorläuferproteine wie das Prä-PsbO prozessiert. Die Deletion des *lepB2*-Gens führt unter allen Wachstumsbedingungen zum Verlust der Vitalität des Bakteriums *Synechocystis* sp. und deutet somit an, dass es sich bei dem LepB2 um ein Protein handelt, welches unter allen Wachstumsbedingungen eine essentielle Funktion einnimmt.

4.2.2 LepB1 wird nach heterologer Expression in *E. coli* abgebaut

Auch die Reinigung der heterolog in *E. coli* exprimierten Signalpeptidasen LepB1 und LepB2 aus *Synechocystis* sp. zeigten deutliche Unterschiede insofern (Abb. 25), dass das LepB2 in seiner vollen Länge heterolog exprimiert und gereinigt werden konnte. Hingegen zeigte die elektrophoretische Auftrennung des LepB1-Proteins (Abb. 25A) mehrere, durch Western-Blot-Analysen sowie massenspektroskopische-Analysen detektierte Fragmente. Die Analysen verdeutlichten, dass bei der Spaltung vor allem der N-Terminus betroffen ist (Abb. 26). Die anhand des Antikörpers gegen das LepB1 detektierten Fragmente stellen vermutlich die katalytische Domäne dar, denn der verwendete Peptidantikörper ist gegen einen Bereich am C-Terminus gerichtet. Bereits für die lösliche Form der Signalpeptidase SipS aus *Bacillus subtilis* wurde eine solche Prozessierung beschrieben (van Roosmalen *et al.* 2000). Innerhalb der Sequenz der Signalpeptidase konnte hierbei eine interne Signalsequenz mit den für die Spaltung essentiellen Aminosäuren Ala-X-Ala und damit einhergehend die autokatalytische Spaltung gezeigt werden. Eine solche interne Signalsequenz ist in der Aminosäureabfolge der Signalpeptidase LepB1 aus *Synechocystis* sp. nicht zu finden, was auf einen abweichenden Mechanismus hindeutet. Während der Arbeit mit dem Protein wurde häufig festgestellt, dass die Zellen bei einer verstärkten Expression ihr Wachstum einstellten, was darauf hindeutet, dass das Protein für *E. coli* toxisch ist und deshalb möglicherweise zum Schutz abgebaut wird. Dieser Annahme widerspricht die Tatsache, dass es erst während der Reinigung zu einer Spaltung des LepB1-Proteins kam. Die Reinigung erfolgte über den an den N-Terminus fusionierten His-Tag und somit würde der C-Terminus alleine nicht an das

Säulenmaterial binden können. Die Affinitätschromatografie zur Reinigung des LepB1 erfolgte am Platz und als Detergenz wurde Triton-X-100 verwendet. Eine Spaltung durch andere *E. coli* Proteasen, wurde durch die Zugabe eines Protease-Inhibitor-Cocktails der Firma Sigma verhindert. Dieser inhibiert sowohl Serin-, Cystein- und Aspartatproteasen als auch Aminopeptidasen. In früheren Arbeiten wurde jedoch beschrieben, dass die Aktivität der Signalpeptidase aus *E. coli* durch die gängigen Protease-Inhibitoren nicht gehemmt wird (Kim *et al.* 1995). Dies deutet an, dass das LepB1 ebenso durch die endogene *E. coli* Signalpeptidase gespalten werden kann. Neben der Temperatur hat auch die Wahl des Detergenz einen entscheidenden Einfluss auf die Proteolyse verschiedener Signalpeptidasen (Musial-Siwiek *et al.* 2008). In einem nächsten Schritt, sollte die Reinigung bei einer Temperatur von 4 °C und unter Zugabe des bisher noch nicht getesteten Detergenz DPC (Dodecylphosphocholin) durchgeführt werden.

4.2.3 Das LepB2 prozessiert Prä-Proteine

Zur Charakterisierung der katalytischen Aktivität der Signalpeptidasen musste ein System entwickelt werden, in dem ein bestimmtes Vorläuferprotein von den Signalpeptidasen prozessiert wird. In Vorarbeiten wurde bereits festgestellt, dass es nicht möglich ist die ausgewählten putativen Substrate in ihrer unprozessierten Form heterolog zu exprimieren und zu reinigen. Die Proteine aus *Synechocystis* sp. wurden daher anhand eines *in vitro* Transkriptions-Translations-Ansatzes exprimiert (Abb. 27). Anschließend an die *in vitro* Transkription-Translation erfolgte die Zugabe der Signalpeptidasen zu dem Reaktionsansatz. Bei LepB1 wurden alle gereinigten Fragmente zugegeben und somit bestand nicht die Möglichkeit, eine Prozessierung auf ein bestimmtes Fragment zurückzuführen. Eine Prozessierung konnte nur bei den verwendeten Substraten PetE und PetJ beobachtet werden. Dabei ist Plastocyanin (PetE) sowohl im Periplasma als auch im Thylakoidlumen (Rajalahti *et al.* 2007) und PetJ nur im Thylakoidlumen lokalisiert. Die weiteren Substrate PsbO, PsbU sowie die verkürzte Form des Slr1744 konnten *in vitro* exprimiert werden doch zeigte sich nach der Zugabe der Signalpeptidasen LepB1 und LepB2 aus *Synechocystis* sp. keine Prozessierung. Bei PsbO waren bei der erwarteten molekularen Masse des prozessierten Proteins von 27 kDa mehrere Banden zu erkennen, wobei keine der Banden durch die Zugabe der Signalpeptidasen an Intensität zunahm. In weiteren Versuchen müssen die optimalen Pufferbedingungen gefunden und angewendet werden. Die Substrate wurden mit den

Signalpeptidasen 30 min bei 37 °C inkubiert, wogegen bei anderen Substraten eine Inkubation von bis zu 16 h durchgeführt wurde, was jedoch nicht den physiologischen Bedingungen entspricht (van Roosmalen *et al.* 2001). Des Weiteren wurde die Reaktion der *in vitro* Transkription-Translation nicht abgestoppt und alle Komponenten waren in dem späteren Reaktionsansatz enthalten, wodurch es auf Grund bestimmter Substanzen zu einer verringerten Aktivität kommen könnte. In einem neuen Ansatz muss die Reaktion abgestoppt und die exprimierten Proteine vor dem Spaltungsexperiment von den übrigen Komponenten getrennt werden, um eine Kreuzreaktion auszuschließen. Ein weiterer Aspekt könnte sein, dass die Signalpeptidasen für ihre Aktivität weitere Komponenten in Form von Lipiden benötigen. Die Signalpeptidase aus *E. coli* besitzt nach Zugabe von Phospholipiden eine gesteigerte Aktivität (Tschantz *et al.* 1995). Eine Wiederholung des Experiments unter Zugabe von Lipiden könnte zu einer erhöhten Aktivität führen. Einen ersten Hinweis auf die Aktivität der endogenen *Synechocystis* sp. Signalpeptidasen könnte ein Spaltungsversuch der Substrate mit einem Membranextrakt aus *Synechocystis* sp. geben. Führt die Zugabe dieses Extraktes zu einer prozessierten Form, stellen die verwendeten Proteine, Substrate für eine der beiden Signalpeptidasen dar. Bei den Proteinen PetE und PetJ, kam es dementsprechend auch ohne die Zugabe der Signalpeptidasen zu einer Prozessierung (Abb. 27 NK). Die Kontrolle mit dem Substrat OmpA, welches von der *E. coli* Signalpeptidase prozessiert wird (Dalbey *et al.* 1985) bestätigte, dass in dem verwendeten Zellextrakt keine endogene *E. coli* Signalpeptidase vorlag. Die Zugabe des Detergenz Triton-X-100 lässt die Signalsequenz des Substrates frei zugänglich vorliegen, wodurch das Vorläuferprotein auch anderen endogenen Proteasen einen Angriffspunkt bietet. Die Zugabe von zusätzlichen Inhibitoren, könnte eventuell diese unspezifische Spaltung verhindern. Nach der Zugabe von LepB2 zeigte sich jedoch im Vergleich zur Negativkontrolle eine Zunahme der prozessierten Form. Bei der Zugabe der Signalpeptidase LepB1 wurde keine Prozessierung beobachtet. Die Proteine PetE sowie PetJ dienen vermutlich als Substrate für das LepB2 und werden durch dieses in ihre reife Form überführt. Dagegen ist das LepB1 in der eingesetzten Konzentration nicht zur Prozessierung der Vorläuferproteine fähig. Die korrekte Proteinkonzentration sowie die optimalen Spaltungsbedingungen müssen in weiteren Ansätzen gefunden werden, doch sind die Proteine PetE und PetJ für weitere Untersuchungen betreffend der katalytischen Aktivität geeignet.

4.2.4 LepB1 und LepB2 zeigen eine voneinander abweichende intrazelluläre Lokalisation

Die intrazelluläre Lokalisation der beiden Signalpeptidasen LepB1 und LepB2 sollte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ermittelt werden. Das kodierende Gen des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) wurde hinter den Promotor des *dnaK2*-Gens kloniert und die kodierenden Gene der Signalpeptidasen hinter eine Linkersequenz über eine *multiple cloning site* (MCS) an das 3' Ende des *gfp*-Gens fusioniert. Die Signalpeptidasen LepB1 und LepB2 sind somit an den C-Terminus des GFPs fusioniert (Abb. 28A). Das GFP wurde an die N-terminale, cytoplasmatische Seite der Signalpeptidasen fusioniert, um eine korrekte Faltung zu gewährleisten. In früheren Arbeiten mit *E. coli* wurde festgestellt, dass das über den Sec-Weg transportierte GFP im Periplasma nicht korrekt gefaltet und somit inaktiv vorliegt (Feilmeier *et al.* 2000). Nach der Transformation der Fusionskonstrukte in das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. wurde eine Segregations-PCR zur Überprüfung der homologen Rekombination durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass die Fusionsgene nicht in alle Genomkopien eingebaut wurden (Abb. 28B). Eine vollständige Segregation kann einige Zeit in Anspruch nehmen und muss nach weiterer Inkubation und steigender Antibiotikumkonzentration erneut durchgeführt werden. Wie die Western-Blot-Analysen zeigten, werden die Fusionsproteine GFP-LepB1 und GFP-LepB2 unter Hitzeschockbedingungen exprimiert (Abb. 29). Dabei waren die Proteine im Zellextrakt, in der Membranfraktion ebenso wie in der löslichen Fraktion zu detektieren. Das Signal in der löslichen Fraktion des GFP-LepB2-Fusionsproteins war stärker als das in der Membranfraktion und zusätzlich zeigte der Western-Blot im Zellextrakt und der löslichen Fraktion zwei Banden. Da das Signal in der Membranfraktion etwas höher lief, handelt es sich vermutlich um das volllängen Protein wobei die Doppelbande in den anderen Fraktionen proteolytische Formen darstellt. Ein Western-Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen das LepB2 könnte diese Annahme experimentell bestätigen. Auch die Inkubation der *Synechocystis* sp. Kulturen unter Hitzeschockbedingungen könnte zu Veränderungen und Fehlern bei der Proteinfaltung führen. Aus diesem Grund muss ein System entwickelt werden, um die Fusionsproteine unter physiologischen Bedingungen zu exprimieren. Erste Klonierungsschritte für eine Expression unter der Kontrolle des Tetracyclin-Promotors waren erfolgreich, so dass die Fusionsproteine in weiteren Arbeiten auf Ihre Funktionalität hin überprüft werden können. Das LepB1-Fusionsprotein zeigte im Gegensatz zur

Membranfraktion, in der löslichen Fraktion eine schwächere Bande, wobei auch hier eine Doppelbande zu detektieren war.

Auch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden nach der Inkubation unter Hitzeschockbedingungen durchgeführt. Jedoch wurden die Zellen hier nicht acht sondern maximal zwei Stunden bei 42 °C inkubiert und zeigten ein schwaches GFP-Signal (Abb. 30). Unter standardisierten Wachstumsbedingungen bei 30 °C konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass die Fluoreszenz des GFPs sehr gering ist (Spence *et al.* 2003). Hier wurde der durch Hochlicht zu aktivierende *psbA2*-Promotor verwendet, da innerhalb der *Synechocystis* sp. Kulturen ohne eine erhöhte Expression nur 5 % der in *E. coli* zu detektierenden Fluoreszenz vorlag. Die Wachstumsbedingungen müssen für die Fluoreszenzmikroskopie optimiert werden. Bei einem ersten Ansatz, sollten die Zellen von *Synechocystis* sp. für einen längeren Zeitraum bei 42 °C inkubiert werden, um eine verstärkte Expression des LepB1-GFP und LepB2-GFP zu erzielen. Cyanobakterien besitzen durch die hohe Anzahl an Chlorophyllen und Phycobilisomen eine verstärkte Autofluoreszenz, welche auch bei den hier untersuchten Kulturen ganz deutlich zum Vorschein kam und auf die Thylakoide beschränkt ist (MacColl 1998). Somit ist es möglich eine Lokalisation innerhalb der Thylakoide von einer Lokalisation in der Cytoplasmamembran zu unterscheiden. Bei einem Vorkommen der Proteine innerhalb der Plasmamembran zeigt sich ein klares GFP-Signal am äußeren Rand der Zelle (Spence *et al.* 2003), wogegen eine Lokalisation innerhalb der Thylakoidmembran durch ein überlagertes Signal aus Autofluoreszenz und GFP-Fluoreszenz gekennzeichnet ist. Die Fusionsproteine GFP-LepB1 genauso wie GFP-LepB2 sind stark in der Thylakoidmembran vertreten (Abb. 30). Bei dem Fusionsprotein LepB2-GFP zeigte sich bei einigen Zellen außerdem ein GFP-Signal um die Zellen, was eine Lokalisation dieses Proteins in der Cytoplasmamembran andeutet. In Proteomanalysen wurden die Proteine LepB1 und LepB2 in verschiedenen Membranen detektiert. Hierbei lag das LepB1-Protein nur in der Thylakoidmembran und das LepB2-Protein einzig in der Plasmamembran vor (Huang *et al.* 2002; Srivastava *et al.* 2005). Die bisher durchgeführten Studien hingegen deuten eine Kollokalisierung der beiden Signalpeptidasen an, wobei das LepB2 zusätzlich in der Plasmamembran seine Funktion ausübt. Die Proteine SecY und SecA des Sec-Proteintransportes konnten sowohl in der Plasmamembran als auch in der Thylakoidmembran identifiziert werden (Rajalahti *et al.* 2007). Genauso konnte für das Tat-Transportsystem eine Lokalisation in beiden Membranen gezeigt werden (Spence *et al.* 2003; Aldridge *et al.* 2008). Dies deutet an, dass die Signalpeptidase LepB2, mit einer Lokalisation in der Plasmamembran

und der Thylakoidmembran, für die Prozessierung von zahlreichen Prä-Proteinen verantwortlich ist. Die Signalpeptidase LepB1, mit einer ausschließlichen Lokalisation in der Thylakoidmembran, ist vermutlich für die Prozessierung von Prä-Proteinen verantwortlich, die an der Photosynthese beteiligt sind. Die beiden Signalpeptidasen besitzen eventuell eine voneinander abweichende Substratspezifität, was jedoch durch weitere Experimente gezeigt werden muss.

4.3 Untersuchung zweier cyanobakterieller GrpE-Proteine

Der Nukleotidaustauschfaktor GrpE spielt in dem System bestehend aus dem Hsp70-Protein DnaK und den Cochaperonen DnaJ eine entscheidende Rolle. Das GrpE-Protein, welches genauso wie das DnaJ-Protein, als Dimer vorliegt beschleunigt den Austausch des an das DnaK gebundenen Nukleotids und somit den Übergang zu dem R-Status, bei dem das DnaK-Protein eine schwache Affinität zu dem Substrat besitzt (Liberek *et al.* 1991). Dieser Übergang ist bedeutend, da das an das DnaK gebundene DnaJ-Protein die ATP-Hydrolyse initiiert und somit den T-Status hervorruft (Siegenthaler *et al.* 2006). Dieser T-Status zeichnet sich durch eine hohe Affinität gegenüber dem Substrat aus und die Bindung würde ohne den Austausch von ADP zu ATP bestehen bleiben. Der Übergang von dem R- hin zum T-Status ist dann notwendig, wenn sich in der Zelle falsch gefaltete oder auch denaturierte Proteine anhäufen. Zu einer erhöhten Konzentration an denaturierten Proteinen kommt es während eines Hitzeschocks, weshalb unter diesen Bedingungen die Proteine zunächst an das DnaK-Protein gebunden vorliegen, um eine unspezifische Aggregation zu verhindern. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das GrpE-Protein unter Hitzeschockbedingungen seine Aktivität verlangsamt oder verliert und somit den Thermosensor innerhalb des Systems darstellt (Siegenthaler *et al.* 2006). Neben einer erhöhten Expression der Proteine DnaK und DnaJ durch den alternativen Sigmafaktor σ^{32} (Groemping *et al.* 2001a) wird die Aktivität des GrpE-Proteins herab reguliert.

Die Vorgänge während eines Hitzeschocks wurden innerhalb des Bakteriums *Escherichia coli* bereits gut untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein bei einer Temperaturerhöhung seine Funktion in zwei Stufen verliert (Grimshaw *et al.* 2001). Dabei verändert sich bei einer Erhöhung der Temperatur in einem ersten Schritt die Sekundärstruktur eines bestimmten Abschnittes innerhalb des Proteins. Doch erst nach einem weiteren Anstieg kommt es zu einer Monomerisierung und damit einhergehend zu einem

Verlust der Funktion (Gelinis *et al.* 2002). Während innerhalb des ersten Schrittes bei *E. coli* vor allem die am N-Terminus lokalisierten langen, gepaarten α -Helices betroffen sind, zeigt das Bakterium *Thermus thermophilus*, bei dem es sich um ein thermophiles Bakterium handelt, eine primäre Veränderung in der C-terminalen β -Faltblattstruktur (Nakamura *et al.* 2010). Trotz einer Homologie zwischen den Proteinen von ~30 % (Nakamura *et al.* 2010), sind die Organismen nicht miteinander verwandt und eine allgemeine Aussage zu den Vorgängen in einem mesophilen und einem thermophilen Bakterium lassen sich nicht treffen. So zeigt sich bei dem thermophilen Bakterium ein abweichender Prozess bei der Aktivierung des Systems. Erst durch einen Hitzeschock wird der Komplex aus den Proteinen DnaK-DnaJ-DafA zerstört und der Chaperonzyklus durch die Proteine DnaK, DnaJ und GrpE kann vollzogen werden (Klostermeier *et al.* 1999). In dieser Arbeit sollten die Proteine zweier verwandter Cyanobakterien, dem mesophilen *Synechocystis* sp. PCC 6803 und dem thermophilen *Thermosynechococcus elongatus* BP1 betreffend der Funktion als Thermosensor untersucht und die zugrunde liegenden Mechanismen verglichen werden. Die beiden Proteine zeigen eine Homologie von 44 % und eine Ähnlichkeit von 60 % zueinander, wobei im Vergleich, der C-Terminus beider Proteine eine weitaus höhere Homologie aufweist als der N-Terminus (Abb. 31). Wie die Komplementationsstudie zeigte (Abb. 32), sind beide Proteine fähig die Funktion des *E. coli* GrpEs zu übernehmen und den Wachstumsdefekt des Stammes OD212 Δ GrpE zu komplementieren (Abb. 32). Dieses Ergebnis war unerwartet, da das Protein aus dem thermophilen *Thermosynechococcus* bei Temperaturen, welche für *E. coli* einen Hitzeschock darstellen, seine Aktivität als Nukleotidaustauschfaktor nicht verringern sollte. Da Komplementationsstudien ein sehr komplexes System darstellen und viele Faktoren eine Rolle spielen, lassen sich keine Aussagen über die Aktivität und Funktionalität treffen. Die GrpE-Proteine aus *Synechocystis* sp. und *Thermosynechococcus* müssen zum Einen mit dem *E. coli* DnaK-Protein interagieren und zum Anderen müssen sie stabil in der *E. coli* Zelle vorliegen. Die beobachteten Veränderungen können daher auch von einer unterschiedlichen Interaktion der beiden GrpE-Proteine mit dem endogenen *E. coli* DnaK herrühren.

4.3.1 Verschiedene Domänen sind für die Dimerisierung essentiell

Die meisten Untersuchungen zur Dimerisierung des GrpE-Proteins erfolgten anhand der Proteine aus *E. coli* und *Thermus thermophilus*. Beide GrpE-Proteine liegen, wie bereits

beschrieben, unter physiologischen Temperaturen als Dimer vor, was auf die in dieser Arbeit zu untersuchenden Proteine ebenfalls zutrifft. Die GALLEX-Messungen zeigten, dass die Dimerisierungstendenzen der Proteine mit der des *E. coli* GrpEs vergleichbar sind (Abb.37). Für die Proteine aus *E. coli* und *Thermus thermophilus* wurde das Vier-Helix-Bündel als Plattform für die Dimerisierung beschrieben. Dabei wurden verkürzte Formen des Proteins untersucht um spezifische und für die Dimerisierung essentielle Abschnitte aufzuzeigen. Ein Protein ohne das Vier-Helix-Bündel ist nicht in der Lage Dimere auszubilden und liegt in seiner monomeren Form vor (Gelinas *et al.* 2002; Mehl *et al.* 2003), wogegen der C-Terminus ohne die langen α -Helices als Dimer (Gelinas *et al.* 2002) detektiert wird. Dies trifft auf das GrpE-Protein aus *Thermosynechococcus elongatus* in gleichem Maße zu. Die CT-Domäne, welche sich aus dem Vier-Helix-Bündel und der β -Faltblattstruktur zusammensetzt, bildete genauso wie das volllängen Protein bei der *in vivo* GALLEX-Messung Dimere. Die Tendenz zur Dimerisierung der CT-Domäne überstieg dabei die des volllängen Proteins (Abb. 37). Bei dem Protein aus *Thermus thermophilus* konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus zur Stabilisierung des Dimers beiträgt (Groemping *et al.* 2001a; Groemping *et al.* 2001b), was auch für das Protein aus *Thermosynechococcus elongatus* gezeigt werden konnte. Die NT-Domäne, bestehend aus den langen, gepaarten α -Helices, war sowohl bei der GALLEX-Messung als auch bei den *Crosslink*-Experimenten nur als Monomer zu detektieren. Der Wert lag dabei noch unter dem der Negativkontrolle, was eine Dimerisierungstendenz aufzeigt. Bei dem Protein aus dem mesophilen Cyanobakterium *Synechocystis* sp. zeigt sich ein konträres Bild. Wie die GALLEX-Messung zeigte, bildete die CT-Domäne keine Dimere, (Abb. 37) womit das Vier-Helix-Bündel und die β -Faltblattstruktur nicht die zuvor beschriebene Dimerisierungsplattform liefern. Dementgegen dimerisierte die NT-Domäne mit den langen α -Helices und stellt somit die an der Dimerisierung beteiligten Bereiche dar. Die Substratumsetzung der NT-Domäne stieg gegenüber der des volllängen Proteins an, was andeutet, dass die volle Funktionalität bezogen auf die Dimerisierung nur durch die Präsenz beide Domänen gewährleistet wird.

4.3.2 Funktionsverlust von GrpE durch einen direkten Übergang vom Dimer zum Monomer

Während einer Hitzeschockantwort wird die Funktion des GrpE-Proteins herabgesetzt oder eingestellt, indem z.B. in einem ersten Schritt die Bindung an die Nukleotidbindetasche des

DnaKs gestört wird und in einem zweiten Schritt, das Protein in seine monomere Form zerfällt, bevor es anschließend vollständig denaturiert. Wie bereits bei *E. coli* beobachtet wurde, kann der Übergang des GrpE-Proteins von einem Dimer hin zu einem Monomer und der anschließenden kompletten Denaturierung mittels der Circular dichroismus-Spektroskopie und der dynamischen Differenzkalorimetrie nachvollzogen werden. Der erste Schmelzpunkt, die Strukturveränderung innerhalb der langen, gepaarten α -Helices, liegt nicht weit über den physiologischen Temperaturen wogegen der Zweite Schmelzpunkt, und somit die Monomerisierung weit über der Temperatur des ersten Schmelzpunktes gemessen wird (Grimshaw *et al.* 2001; Nakamura *et al.* 2010).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die GrpE-Proteine aus *Synechocystis* sp. und *Thermosynechococcus* genauso wie die NT-Domäne aus *Synechocystis* sp. und die CT-Domäne aus *Thermosynechococcus* davon abweichend nur einen Schmelzpunkt zu besitzen scheinen (Abb. 39), welcher mit der Monomerisierung des GrpE-Dimers einhergeht. Bei den CD-Spektren wird eine Veränderung innerhalb der β -Faltblattstruktur nicht berücksichtigt, weshalb der Übergang der GrpE-Proteine aus *Synechocystis* sp. und *Thermosynechococcus* von einer dimeren hin zu einer monomeren Form im Folgenden anhand der *Crosslink*-Experimente (Abb. 40) verifiziert wurde. In Tab. 4 sind die durch CD-Spektren ermittelten Schmelzpunkte denen der *Crosslink*-Experimente gegenübergestellt.

Tabelle 4: Vergleich der ermittelten Schmelzpunkte, n.d.: nicht zu detektieren

	CD-Spektren	<i>Crosslink</i>
<u>Synechocystis sp.</u>		
GrpE	43 °C	45 °C
NT-Domäne	33 °C	30 °C
CT-Domäne	n.d.	n.d.
<u>Thermosynechococcus</u>		
GrpE	54 °C	60 °C
NT-Domäne	n.d.	n.d.
CT-Domäne	58 °C	60-65 °C

So zeigten auch die *Crosslink*-Experimente der beiden GrpE-Proteine, bei der durch die Schmelzkurve ermittelten Temperatur, einen Übergang von der dimeren zur monomeren

Form. Die Proteine der beiden Organismen zeigten im Gegensatz zu den in anderen Organismen beschriebenen Funktionsweisen des GrpE-Proteins (Groemping *et al.* 2001a), einen direkten Übergang vom Dimer zum Monomer. Da die Funktion des GrpE-Proteins als Nukleotidaustauschfaktor nur für das dimere Protein zutrifft, ist die Monomerisierung mit dem Funktionsverlust gleichzusetzen (Grimshaw *et al.* 2001). Die CT-Domäne aus *Synechocystis* sp. sowie die NT-Domäne aus *Thermosynechococcus* besitzen keine Struktur (Tab. n.d.), was mit den Ergebnissen der Dimerisierungsstudien übereinstimmt. Interessanterweise zeigten das volllängen GrpE-Protein genauso wie die NT-Domäne aus *Thermosynechococcus* bei den *Crosslinks* zwei monomere Formen, welche durch die Zugabe von Glutaraldehyd stabilisiert wurden. Diese im SDS-Gel sich schneller fortbewegende Form, zeigte nur bei den mit Glutaraldehyd versetzten Proben, eine mit der Temperaturerhöhung verbundene Zunahme. Es handelt sich hierbei vermutlich um zwei verschiedene intramolekulare Vernetzungen, welche auf Grund der Denaturierung des Proteins ausgebildet werden können. Dies deutet auf eine mit steigender Temperatur verbundene Strukturveränderung hin.

4.3.3 Die Monomerisierung von GrpE ist reversibel

Die in dieser Arbeit charakterisierten GrpE-Proteine aus dem mesophilen und dem thermophilen Cyanobakterium zeigen einen direkten Übergang vom Dimer zum Monomer, ohne dass eine Zwischenstufe detektiert werden kann. Für die Funktion als Thermosensor ist es von entscheidender Bedeutung, dass der Prozess reversibel ist, um den Chaperonzyklus aufrecht zu erhalten. Bei der Charakterisierung des *E. coli* GrpEs zeigte sich, dass die Reversibilität hauptsächlich auf den ersten Schmelzpunkt begrenzt ist (Grimshaw *et al.* 2001) und bei einer Temperaturerhöhung bis auf 95 °C diese Reversibilität auf Grund von Aggregatbildung zurückgeht. Gleiches konnte für das Protein aus *Thermus thermophilus* gezeigt werden (Groemping *et al.* 2001a), wobei nur 70 % der Reversibilität erreicht werden konnten.

Für die in dieser Arbeit ermittelten Schmelzpunkte lässt sich sagen, dass die Prozesse reversibel sind, doch zeigt das GrpE-Protein aus *Thermosynechococcus* eine Tendenz zur Aggregatbildung. Die Schmelzpunkte der beiden volllängen Proteine und der GrpE-Domänen erreichten bei den rückläufigen Reaktionen, mit Ausnahme der CT-Domäne von *Thermosynechococcus*, einen geringeren Wert, und die anschließende Temperaturerhöhung

bis 95 °C führte zu nur minimalen Veränderungen. Bei der Rückreaktion sind die Pufferbedingungen entscheidend (Willmund *et al.* 2007), und bei dem in dieser Arbeit verwendeten Natriumphosphatpuffer zeigen Rückreaktionen häufig etwas niedrigere Werte an, doch sind die eigentlichen Spektren eindeutiger.

Tabelle 5: Vergleich der Schmelztemperaturen bei verschiedenen Temperaturskalen, n.d.: nicht zu detektieren

	10-70 °C	70-10 °C	10-95 °C
<u>Synechocystis sp.</u>			
GrpE	43 °C	38 °C	42 °C
NT-Domäne	33 °C	30 °C	32 °C
CT-Domäne	n.d.	n.d.	n.d.
<u>Thermosynechococcus</u>			
GrpE	54 °C	50 °C	50 °C
NT-Domäne	n.d.	n.d.	n.d.
CT-Domäne	58 °C	61 °C	58 °C

4.3.4 *Synechocystis sp.* und *Thermosynechococcus* verwenden zur Dimerisierung voneinander abweichende Mechanismen

Die Untersuchungen an den zwei GrpE-Proteinen aus den verwandten Cyanobakterien *Synechocystis sp.* und *Thermosynechococcus* zeigten, dass die Dimerisierung und damit verbunden, die Funktion als Thermosensor auf abweichenden Mechanismen basieren. Bei dem Protein des thermophilen *Thermosynechococcus* ist der C-Terminus mit dem Vier-Helix-Bündel und der β -Faltblattstruktur entscheidend an der Dimerisierung beteiligt und stabilisiert das volllängen Protein. Die Schmelztemperatur (Abb. 39 und Abb. 40) und die Tendenz zur Dimerisierung übersteigen die Werte des volllängen Proteins, wogegen bei der isolieren NT-Domäne mit den langen, gepaarten α -Helices und dem unstrukturierten N-Terminus keine Struktur ermittelt werden konnte. Bei der Betrachtung der Schmelzkurve (Abb. 40) der NT-Domäne ist zu Beginn ein deutlicher Anstieg zu erkennen doch würde ein möglicher Schmelzpunkt noch unter der Anfangstemperatur von 10 °C liegen. Der N-Terminus alleine führt zu keiner dimeren Struktur und wird beim volllängen Protein durch den C-Terminus stabilisiert.

Bei dem GrpE-Protein aus *Synechocystis* sp. liegt der isolierte N-Terminus als Dimer vor und zeigt einen Schmelzpunkt unterhalb des volllängen Proteins. Damit scheint auch hier der N-Terminus die Stabilität des Proteins negativ zu beeinflussen und nur durch das Zusammenspiel des N-Terminus mit dem C-Terminus wird die Stabilität des volllängen Proteins erreicht. Somit ist der unstrukturierte C-Terminus (Abb. 40) an der Funktion des volllängen Proteins beteiligt und dient der Stabilisierung.

Die Funktion des Thermosensors wird wie Abb. 42 verdeutlicht bei dem GrpE-Protein aus dem mesophilen Bakterium *Synechocystis* sp. von dem N-Terminus und bei dem thermophilen Bakterium *Thermosynechococcus* von dem C-Terminus eingenommen.

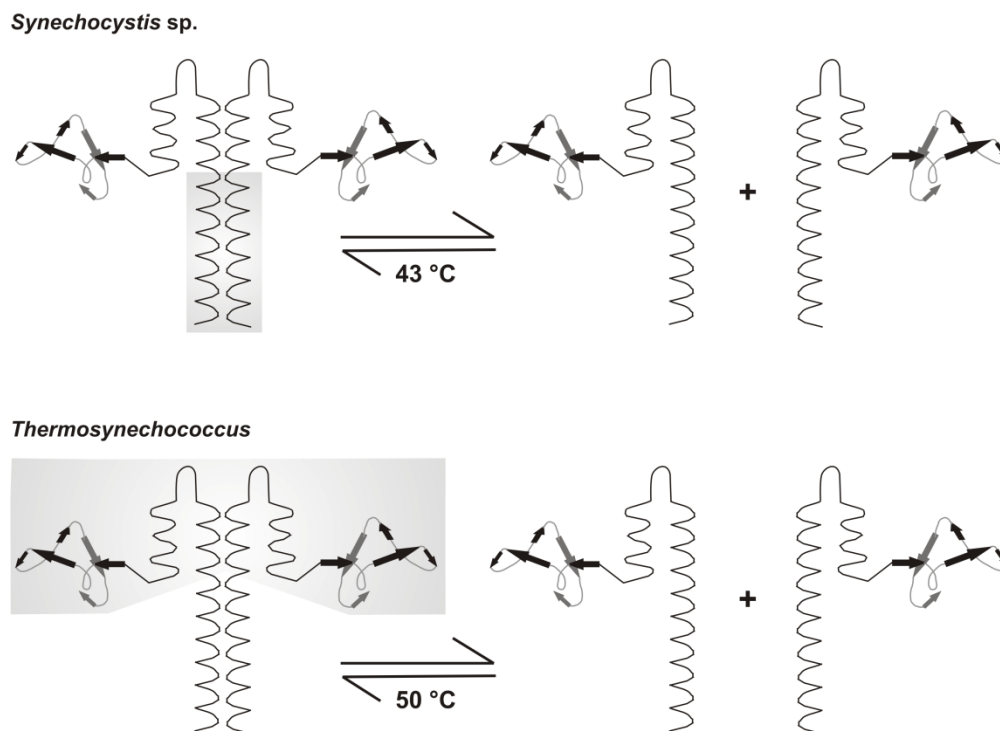


Abbildung 42: Schematische Darstellung des Übergangs von einem Dimer zu einem Monomer während eines Hitzeschocks

Dargestellt ist der Vorgang der Monomerisierung der GrpE-Proteine aus dem mesophilen Bakterium *Synechocystis* sp. und dem thermophilen Bakterium *Thermosynechococcus*. Der Übergang von der dimeren zur monomeren Form findet bei beiden Proteinen in einem Schritt statt und ist reversibel. Bei *Synechocystis* sp. beginnt die Monomerisierung bei einer Temperatur von 43 °C und bei *Thermosynechococcus* bei 50 °C. Die für die Dimerisierung verantwortliche Domäne, welche den Thermosensor darstellt, ist bei dem mesophilen Bakterium *Synechocystis* sp. der N-Terminus mit den langen, gepaarten α -Helices und bei dem thermophilen Bakterium *Thermosynechococcus* der C-Terminus mit dem Vier-Helix-Bündel und der β -Faltblattstruktur in grau hinterlegt. Verändert nach (Groemping *et al.* 2001b)

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden physiologische Veränderungen bei der Thylakoidmembranbiogenese in einem Cyanobakterium verfolgt. Die Zellen des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 zeigten bei Wachstum im Dunkeln in elektronenmikroskopischen Aufnahmen nur rudimentäre Thylakoidstrukturen. Nach dem Transfer ins Licht, bildeten sich nach acht bis zwölf Stunden erneut Thylakoidmembranen, und nach etwa 24 h war ein vollständiges Thylakoidmembransystem ausgebildet. Parallel mit der Entwicklung der Thylakoide stieg bei der Messung des Chlorophylls, der Chlorophyllgehalt pro Zelle nach acht Stunden im Licht kontinuierlich an, bevor nach 24 h ein maximaler Wert erreicht wurde. Das Verhältnis von Phycobilisomen zu Chlorophyll verschob sich während des Wachstums auf die Seite des Chlorophylls. Die im Dunkeln an das PS II assoziierten Phycobilisomen lösten sich und das im Dunkeln detektierte verringerte PS I zu PS II Verhältnis stieg an. Das bei Wachstum im Dunkeln primär als Monomer vorliegende PS II, war durch eine inaktive Donorseite nicht funktional. Nach dem Transfer ins Licht, zeitgleich mit der Bildung der ersten Thylakoidmembranen, nach etwa acht bis zwölf Stunden, war in den verschiedenen Messungen ein aktives PS II zu detektieren. Nach Wachstum im Licht für 24 h waren keine Unterschiede bei der Aktivität des PS II im Vergleich zu *Synechocystis* sp. Zellen, welche dauerhaft unter Belichtung kultiviert wurden zu erkennen. Das PS I lag nach der Inkubation im Dunkeln, in geringerer Konzentration aber aktiv als Trimer in den cyanobakteriellen Zellen vor.

In einem weiteren Projekt wurden zwei Typ I-Signalpeptidasen aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 im Bezug auf ihre intrazelluläre Lokalisation und ihre katalytische Aktivität untersucht. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten LepB1 ausschließlich in der Thylakoidmembran und LepB2 zusätzlich auch in der Plasmamembran lokalisiert. Für die Untersuchungen der Lokalisation konnte ein neues System der Fluoreszenzmikroskopie entwickelt und erfolgreich eingesetzt werden, welches auf dem durch Hitze zu aktivierenden *Synechocystis dnaK2*-Promotor basiert. Bei der Reinigung der heterolog in *E. coli* exprimierten Proteine zeigte sich ein (auto-) proteolytischer Abbau des LepB1-Proteins. Für weitere Untersuchungen der katalytischen Aktivität wurden die Vorläuferproteine Prä-PetE sowie Prä-PetJ als Substrate für LepB2 identifiziert.

Neben der Thylakoidmembranbiogenese und den Signalpeptidasen wurde die Funktionsweise des Nukleotidaustauschfaktors GrpE aus den verwandten Cyanobakterien *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Thermosynechococcus elongatus* BP1 untersucht.

Bei den GrpE-Proteinen beider Cyanobakterien erfolgt der Übergang von einem Dimer hin zu einem Monomer in einem Schritt. Dabei setzt die Monomerisierung der GrpE-Proteine bei einer Temperatur ein, die jeweils etwas über den physiologischen Wachstumsbedingungen der beiden Bakterien liegt. Der Prozess der Monomerisierung ist reversibel, wodurch die Funktion der Proteine als Thermosensor gewährleistet wird. Hinsichtlich der Dimerisierung zeigten die verschiedenen Proteindomänen der untersuchten GrpE-Proteine Unterschiede. Bei dem Protein aus *Synechocystis* sp. ist der N-Terminus für die Dimerisierung und somit hauptsächlich für die Funktion als Thermosensor verantwortlich. Der C-Terminus trägt in dem mesophilen Bakterium zusätzlich zu der Stabilität des Gesamtproteins bei. Das GrpE-Protein aus dem thermophilen Bakterium *Thermosynechococcus* besitzt eine primär durch den C-Terminus vermittelte und stabilisierte dimere Struktur. Der C-Terminus stellt hier vermutlich den Thermosensor dar, wogegen der N-Terminus keinen direkten Einfluss auf die Dimerisierung und die Funktion als Thermosensor zeigt.

Literaturverzeichnis

- Adamska, I. und Kloppstech, K. (1991) Evidence for an association of the early light-inducible protein (ELIP) of pea with photosystem II. *Plant Mol Biol* **16**: 209-223.
- Adamska, I., Ohad, I. und Kloppstech, K. (1992) Synthesis of the early light-inducible protein is controlled by blue light and related to light stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 2610-2613.
- Aldridge, C., Spence, E., Kirkilionis, M.A., Frigerio, L. und Robinson, C., (eds) (2008) Tat-dependent targeting of Rieske iron-sulphur proteins to both the plasma and thylakoid membranes in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. England.
- Allen, M.M. (1984) Cyanobacterial cell inclusions. *Annu Rev Microbiol* **38**: 1-25.
- Andersen, J.B., Sternberg, C., Poulsen, L.K., Bjorn, S.P., Givskov, M. und Molin, S. (1998) New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2240-2246.
- Anderson, S.L. und McIntosh, L. (1991) Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. *J Bacteriol* **173**: 2761-2767.
- Baniulis, D., Yamashita, E., Zhang, H., Hasan, S.S. und Cramer, W.A., (eds) (2008) Structure-function of the cytochrome b6f complex. United States.
- Becker, G.W. und Hsiung, H.M., (eds) (1986) Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*. Purification and characterization. Netherlands.
- Bennett, A. und Bogorad, L. (1973) Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J Cell Biol* **58**: 419-435.
- Ben-Shem, A., Frolow, F. und Nelson, N., (eds) (2003) Crystal structure of plant photosystem I. England.
- Bibby, T.S., Nield, J. und Barber, J., (eds) (2001) Iron deficiency induces the formation of an antenna ring around trimeric photosystem I in cyanobacteria. England.
- Black, M.T. (1993) Evidence that the catalytic activity of prokaryote leader peptidase depends upon the operation of a serine-lysine catalytic dyad. *J Bacteriol* **175**: 4957-4961.
- Boekema, E.J., Hifney, A., Yakushevskaya, A.E., Piotrowski, M., Keegstra, W., Berry, S., Michel, K.P., Pistorius, E.K. und Kruijff, J., (eds) (2001) A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria. England.
- Bolhuis, A., Sorokin, A., Azevedo, V., Ehrlich, S.D., Braun, P.G., de Jong, A., Venema, G., Bron, S. und van Dijl, J.M. (1996) *Bacillus subtilis* can modulate its capacity and specificity for protein secretion through temporally controlled expression of the sipS gene for signal peptidase I. *Mol Microbiol* **22**: 605-618.

- Brehmer, D., Gassler, C., Rist, W., Mayer, M.P. und Bukau, B., (eds) (2004) Influence of GrpE on DnaK-substrate interactions. United States.
- Bron, S., Bolhuis, A., Tjalsma, H., Holsappel, S., Venema, G. und van Dijl, J.M., (eds) (1998) Protein secretion and possible roles for multiple signal peptidases for precursor processing in bacilli. Netherlands.
- Bukau, B. und Walker, G.C. (1989) Cellular defects caused by deletion of the *Escherichia coli* dnaK gene indicate roles for heat shock protein in normal metabolism. *J Bacteriol* **171**: 2337-2346.
- Bukau, B., Weissman, J. und Horwich, A., (eds) (2006) Molecular chaperones and protein quality control. United States.
- Burkhart, B.M., Ramakrishnan, B., Yan, H., Reedstrom, R.J., Markley, J.L., Straus, N.A. und Sundaralingam, M., (eds) (1995) Structure of the trigonal form of recombinant oxidized flavodoxin from *Anabaena* 7120 at 1.40 Å resolution. Denmark.
- Carlos, J.L., Paetzel, M., Brubaker, G., Karla, A., Ashwell, C.M., Lively, M.O., Cao, G., Bullinger, P. und Dalbey, R.E., (eds) (2000) The role of the membrane-spanning domain of type I signal peptidases in substrate cleavage site selection. United States.
- Chung, C.T., Niemela, S.L. und Miller, R.H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2172-2175.
- Cramer, W.A. und Zhang, H., (eds) (2006) Consequences of the structure of the cytochrome b6f complex for its charge transfer pathways. Netherlands.
- Dalbey, R.E. und Wickner, W. (1985) Leader peptidase catalyzes the release of exported proteins from the outer surface of the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Biol Chem* **260**: 15925-15931.
- Dalbey, R.E. und Wickner, W. (1986) The role of the polar, carboxyl-terminal domain of *Escherichia coli* leader peptidase in its translocation across the plasma membrane. *J Biol Chem* **261**: 13844-13849.
- Dalbey, R.E. und Wickner, W. (1987) Leader peptidase of *Escherichia coli*: critical role of a small domain in membrane assembly. *Science* **235**: 783-787.
- Dalbey, R.E. (1991) Leader peptidase. *Mol Microbiol* **5**: 2855-2860.
- Dalbey, R.E., Lively, M.O., Bron, S. und van Dijl, J.M. (1997) The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Sci* **6**: 1129-1138.
- Dalbey, R.E., Chen, M., Jiang, F. und Samuelson, J.C., (eds) (2000a) Understanding the insertion of transporters and other membrane proteins. United States.

- Dalbey, R.E. und Kuhn, A., (eds) (2000b) Evolutionarily related insertion pathways of bacterial, mitochondrial, and thylakoid membrane proteins. United States.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. und Michel, H., (eds) (1984) X-ray structure analysis of a membrane protein complex. Electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*. England.
- Deloche, O., Kelley, W.L. und Georgopoulos, C. (1997) Structure-function analyses of the Ssc1p, Mdj1p, and Mge1p *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 6066-6075.
- DeRuyter, Y.S. und Fromme, P. (2008) Molecular structure of the photosynthetic apparatus. In *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*. Herrero, A. and Flores, E. (eds): Norfolk, UK, Caister Academic Press, pp. 271-288.
- Diner, B.A., Ries, D.F., Cohen, B.N. und Metz, J.G. (1988) COOH-terminal processing of polypeptide D1 of the photosystem II reaction center of *Scenedesmus obliquus* is necessary for the assembly of the oxygen-evolving complex. *J Biol Chem* **263**: 8972-8980.
- Dmitrova, M., Younes-Cauet, G., Oertel-Buchheit, P., Porte, D., Schnarr, M. und Granger-Schnarr, M. (1998) A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **257**: 205-212.
- Duhring, U., Irrgang, K.D., Lunser, K., Kehr, J. und Wilde, A., (eds) (2006) Analysis of photosynthetic complexes from a cyanobacterial *yfc37* mutant. Netherlands.
- Feilmeier, B.J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H. und Phillips, G.J. (2000) Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**: 4068-4076.
- Ferreira, K.N., Iverson, T.M., Maghlaoui, K., Barber, J. und Iwata, S., (eds) (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. United States.
- Ford, R.C., Picot, D. und Garavito, R.M. (1987) Crystallization of the photosystem I reaction centre. *Embo J* **6**: 1581-1586.
- Fromme, P., Jordan, P. und Krauss, N., (eds) (2001) Structure of photosystem I. Netherlands.
- Fuhrmann, E., Gathmann, S., Rupprecht, E., Golecki, J. und Schneider, D. (2009) Thylakoid membrane reduction affects the photosystem stoichiometry in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol* **149**: 735-744.
- Gelinas, A.D., Langsetmo, K., Toth, J., Bethoney, K.A., Stafford, W.F. und Harrison, C.J., (eds) (2002) A structure-based interpretation of *E. coli* GrpE thermodynamic properties. England.
- Genevaux, P., Georgopoulos, C. und Kelley, W.L., (eds) (2007) The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions. England.

- Gray, M.W. (1989) The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet* **5**: 294-299.
- Grigorieva, G.und Shestakov, S. (1982) Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiology Letters* **13**: 367-370.
- Grimshaw, J.P., Jelesarov, I., Schonfeld, H.J.und Christen, P., (eds) (2001) Reversible thermal transition in GrpE, the nucleotide exchange factor of the DnaK heat-shock system. United States.
- Grodberg, J.und Dunn, J.J. (1988) ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* **170**: 1245-1253.
- Groemping, Y., Klostermeier, D., Herrmann, C., Veit, T., Seidel, R.und Reinstein, J., (eds) (2001a) Regulation of ATPase and chaperone cycle of DnaK from *Thermus thermophilus* by the nucleotide exchange factor GrpE. England.
- Groemping, Y.und Reinstein, J., (eds) (2001b) Folding properties of the nucleotide exchange factor GrpE from *Thermus thermophilus*: GrpE is a thermosensor that mediates heat shock response. England.
- Grossman, A.R., Schaefer, M.R., Chiang, G.G.und Collier, J.L. (1993) The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Rev* **57**: 725-749.
- Grossman, A.R. (2003) A molecular understanding of complementary chromatic adaptation. *Photosynthesis research* **76**: 207-215.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J.und Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**: 4121-4130.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Harrison, C.J., Hayer-Hartl, M., Di Liberto, M., Hartl, F.und Kuriyan, J. (1997) Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science* **276**: 431-435.
- Hartl, F.U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J.P.und Wickner, W., (eds) (1990) The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. United States.
- Havaux, M., Guedeney, G., Hagemann, M., Yeremenko, N., Matthijs, H.C.und Jeanjean, R., (eds) (2005) The chlorophyll-binding protein IsiA is inducible by high light and protects the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 from photooxidative stress. Netherlands.
- Hedges, S.B., Chen, H., Kumar, S., Wang, D.Y., Thompson, A.S.und Watanabe, H. (2001) A genomic timescale for the origin of eukaryotes. *BMC Evol Biol* **1**: 4.

- Herrero, A. und Flores, E. (2008) The cyanobacteria: molecular biology, genomics, and evolution: *Caister Academic Press*.
- Huang, F., Parmryd, I., Nilsson, F., Persson, A.L., Pakrasi, H.B., Andersson, B. und Norling, B. (2002) Proteomics of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: identification of plasma membrane proteins. *Mol Cell Proteomics* **1**: 956-966.
- Inada, T., Court, D.L., Ito, K. und Nakamura, Y. (1989) Conditionally lethal amber mutations in the leader peptidase gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**: 585-587.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W. und Krauss, N., (eds) (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. England.
- Joshua, S. und Mullineaux, C.W., (eds) (2004) Phycobilisome diffusion is required for light-state transitions in cyanobacteria. United States.
- Kallas, T. (1994) The Cytochrome *b₆f* Complex: *Kluwer Academic Publishers*.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. und Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement). *DNA Res* **3**: 185-209.
- Kanervo, E., Tasaka, Y., Murata, N. und Aro, E.M., (eds) (1997) Membrane lipid unsaturation modulates processing of the photosystem II reaction-center protein D1 at low temperatures. United States.
- Kautsky, H., Appel, W. und Amann, H. (1960) [Chlorophyll fluorescence and carbon assimilation. Part XIII. The fluorescence and the photochemistry of plants]. *Biochem Z* **332**: 277-292.
- Keren, N., Liberton, M. und Pakrasi, H.B., (eds) (2005) Photochemical competence of assembled photosystem II core complex in cyanobacterial plasma membrane. United States.
- Kim, Y.T., Muramatsu, T. und Takahashi, K. (1995) Leader peptidase from *Escherichia coli*: overexpression, characterization, and inactivation by modification of tryptophan residues 300 and 310 with N-bromosuccinimide. *J Biochem* **117**: 535-544.
- Klostermeier, D., Seidel, R. und Reinstein, J., (eds) (1999) The functional cycle and regulation of the *Thermus thermophilus* DnaK chaperone system. England.
- Klughammer, C. und Schreiber, U. (1994) An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700⁺-absorbance changes at 830 nm. *Planta* **192**: 261-268.

- Klughammer, C. und Schreiber, U. (2008) Saturation Pulse method for assessment of energy conversion in PSI. *PAM Application Notes* **1**: 11-14.
- Krauss, N., Schubert, W.D., Klukas, O., Fromme, P., Witt, H.T. und Saenger, W. (1996) Photosystem I at 4 Å resolution represents the first structural model of a joint photosynthetic reaction centre and core antenna system. *Nat Struct Biol* **3**: 965-973.
- Kroll, D., Meierhoff, K., Bechtold, N., Kinoshita, M., Westphal, S., Vothknecht, U.C., Soll, J. und Westhoff, P., (eds) (2001) VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. United States.
- Kunert, A., Hagemann, M. und Erdmann, N., (eds) (2000) Construction of promoter probe vectors for *Synechocystis* sp. PCC 6803 using the light-emitting reporter systems Gfp and LuxAB. Netherlands.
- Kurisu, G., Zhang, H., Smith, J.L. und Cramer, W.A., (eds) (2003) Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. United States.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lamiet, A.A. und Pluckthun, A. (1989) The precursor of beta-lactamase: purification, properties and folding kinetics. *Embo J* **8**: 1469-1477.
- Laws, J.K. und Dalbey, R.E. (1989) Positive charges in the cytoplasmic domain of *Escherichia coli* leader peptidase prevent an apolar domain from functioning as a signal. *Embo J* **8**: 2095-2099.
- Lee, J.I., Kuhn, A. und Dalbey, R.E. (1992) Distinct domains of an oligotopic membrane protein are Sec-dependent and Sec-independent for membrane insertion. *J Biol Chem* **267**: 938-943.
- Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. und Zylicz, M. (1991) *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 2874-2878.
- Liberton, M., Howard Berg, R., Heuser, J., Roth, R. und Pakrasi, H.B. (2006) Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Protoplasma* **227**: 129-138.
- Liu, G., Topping, T.B. und Randall, L.L. (1989) Physiological role during export for the retardation of folding by the leader peptide of maltose-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 9213-9217.
- Liu, X., Zhao, J. und Wu, Q., (eds) (2006) Biogenesis of chlorophyll-binding proteins under iron stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. United States.
- MacColl, R., (ed) (1998) Cyanobacterial phycobilisomes.

- Mannan, R.M. und Pakrasi, H.B., (eds) (1993) Dark heterotrophic growth conditions result in an increase in the content of photosystem II units in the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. United States.
- Maxwell, K. und Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence--a practical guide. *J Exp Bot* **51**: 659-668.
- Mehl, A.F., Heskett, L.D., Jain, S.S. und Demeler, B. (2003) Insights into dimerization and four-helix bundle formation found by dissection of the dimer interface of the GrpE protein from *Escherichia coli*. *Protein Sci* **12**: 1205-1215.
- Mehl, A.F., Demeler, B. und Zraikat, A. (2007) A water mediated electrostatic interaction gives thermal stability to the "tail" region of the GrpE protein from *E. coli*. *Protein J* **26**: 239-245.
- Meijer, W.J., de Jong, A., Bea, G., Wisman, A., Tjalsma, H., Venema, G., Bron, S. und van Dijk, J.M. (1995) The endogenous *Bacillus subtilis* (natto) plasmids pTA1015 and pTA1040 contain signal peptidase-encoding genes: identification of a new structural module on cryptic plasmids. *Mol Microbiol* **17**: 621-631.
- Mi, H., Endo, T., Ogawa, T. und Asada, K. (1995) Thylakoid Membrane-Bound, NADPH-Specific Pyridine Nucleotide Dehydrogenase Complex Mediates Cyclic Electron Transport in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant & Cell Physiol* **36**: 661-668.
- Miller, J.H. (1972) A short course in bacterial genetics: *Cold Spring Harbor Laboratory. New York*.
- Miller, K.W., Konen, P.L., Olson, J. und Ratanavanich, K.M., (eds) (1993) Membrane protein topology determination by proteolysis of maltose binding protein fusions. United States.
- Milstein, C., Brownlee, G.G., Harrison, T.M. und Mathews, M.B. (1972) A possible precursor of immunoglobulin light chains. *Nat New Biol* **239**: 117-120.
- Moore, K.E. und Miura, S. (1987) A small hydrophobic domain anchors leader peptidase to the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **262**: 8806-8813.
- Moro, F., Taneva, S.G., Velazquez-Campoy, A. und Muga, A., (eds) (2007) GrpE N-terminal domain contributes to the interaction with Dnak and modulates the dynamics of the chaperone substrate binding domain. England.
- Muller, M. (1992) Proteolysis in protein import and export: signal peptide processing in eu- and prokaryotes. *Experientia* **48**: 118-129.
- Mullineaux, C.W. und Emllyn-Jones, D., (eds) (2005) State transitions: an example of acclimation to low-light stress. England.
- Murata, N., Sato, N., Omata, T. und Kuwabara, T. (1981) Separation and characterization of thylakoid and cell-envelope of the blue-green- algae (cyanobacterium) *Anacystis nidulans*. *Plant Cell Physiol*. **22**: 403-410.

- Musial-Siwiek, M., Kendall, D.A. und Yeagle, P.L., (eds) (2008) Solution NMR of signal peptidase, a membrane protein. Netherlands.
- Nakamura, A., Takumi, K. und Miki, K., (eds) (2010) Crystal structure of a thermophilic GrpE protein: insight into thermosensing function for the DnaK chaperone system. England.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Ikeuchi, M., Katoh, H., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. und Tabata, S. (2002) Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *DNA Res* **9**: 123-130.
- Nelissen, B., Van de Peer, Y., Wilmotte, A. und De Wachter, R. (1995) An early origin of plastids within the cyanobacterial divergence is suggested by evolutionary trees based on complete 16S rRNA sequences. *Mol Biol Evol* **12**: 1166-1173.
- Norling, B., Zak, E., Andersson, B. und Pakrasi, H., (eds) (1998) 2D-isolation of pure plasma and thylakoid membranes from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Netherlands.
- Ohki, K. und Katoh, T. (1975) Photoorganotrophic growth of a blue-green alga, *Anabaena variabilis*. *Plant & Cell Physiol* **16**: 53.64.
- Olive, J., Ajlani, G., Astier, C., Recouvreur, M. und Vernotte, C. (1997) Ultrastructure and light-adaptation of phycobilisome mutants of *Synechocystis* PCC 6803. *Biochim Biophys Acta* **1319**: 275-282.
- Oxborough, K., (ed) (2004) Imaging of chlorophyll a fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. England.
- Packschies, L., Theyssen, H., Buchberger, A., Bukau, B., Goody, R.S. und Reinstein, J., (eds) (1997) GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacement mechanism. United States.
- Paetzel, M., Dalbey, R.E. und Strynadka, N.C. (1998) Crystal structure of a bacterial signal peptidase in complex with a beta-lactam inhibitor. *Nature* **396**: 186-190.
- Paetzel, M., Dalbey, R.E. und Strynadka, N.C., (eds) (2000) The structure and mechanism of bacterial type I signal peptidases. A novel antibiotic target. England.
- Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N.C. und Dalbey, R.E., (eds) (2002) Signal peptidases. United States.
- Pakrasi, H.B. (1995) Genetic analysis of the form and function of photosystem I and photosystem II. *Annu Rev Genet* **29**: 755-776.
- Park, S., Liu, G., Topping, T.B., Cover, W.H. und Randall, L.L. (1988) Modulation of folding pathways of exported proteins by the leader sequence. *Science* **239**: 1033-1035.

- Peng, S.B., Wang, L., Moomaw, J., Peery, R.B., Sun, P.M., Johnson, R.B., Lu, J., Treadway, P., Skatrud, P.L. und Wang, Q.M. (2001) Biochemical characterization of signal peptidase I from gram-positive *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **183**: 621-627.
- Peschek, G.A., Obinger, C. und Paumann, M., (eds) (2004) The respiratory chain of blue-green algae (cyanobacteria).
- Porra, R.J., Thompson, W.A. und Kriedemann, P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **975**: 384-394.
- Prodohl, A., Dreher, C., Hielscher, R., Hellwig, P. und Schneider, D., (eds) (2007) Heterologous expression and in vitro assembly of the transmembrane cytochrome b6. United States.
- Rajalahti, T., Huang, F., Klement, M.R., Pisareva, T., Edman, M., Sjostrom, M., Wieslander, A. und Norling, B. (2007) Proteins in different *Synechocystis* compartments have distinguishing N-terminal features: a combined proteomics and multivariate sequence analysis. *J Proteome Res* **6**: 2420-2434.
- Reid, K.L. und Fink, A.L. (1996) Physical interactions between members of the DnaK chaperone machinery: characterization of the DnaK.GrpE complex. *Cell Stress Chaperones* **1**: 127-137.
- Rippka, J.W., and G. Cohen-Bazire (1974) A Cyanobacterium Which Lacks Thylakoids. *Arch. Microbiol.* **100**: 419-436.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. und Stanier, R.Y. (1979) Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* **111**: 1-61.
- Rupprecht, E., Gathmann, S., Fuhrmann, E. und Schneider, D. (2007) Three different DnaK proteins are functionally expressed in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* **153**: 1828-1841.
- Sambrook, J. und Russel, D.W. (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- San Millan, J.L., Boyd, D., Dalbey, R., Wickner, W. und Beckwith, J. (1989) Use of phoA fusions to study the topology of the *Escherichia coli* inner membrane protein leader peptidase. *J Bacteriol* **171**: 5536-5541.
- Sarcina, M., Tobin, M.J. und Mullineaux, C.W., (eds) (2001) Diffusion of phycobilisomes on the thylakoid membranes of the cyanobacterium *Synechococcus* 7942. Effects of phycobilisome size, temperature, and membrane lipid composition. United States.

- Schmetterer, G. (1994) Cyanobacterial respiration. In *The molecular biology of cyanobacteria*. Bryant, D.A. (ed): Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 409-435.
- Schneider, D. und Engelman, D.M., (eds) (2003) *GALLEX*, a measurement of heterologous association of transmembrane helices in a biological membrane. United States.
- Schneider, D., Fuhrmann, E., Scholz, I., Hess, W.R. und Graumann, P.L. (2007) Fluorescence staining of live cyanobacterial cells suggest non-stringent chromosome segregation and absence of a connection between cytoplasmic and thylakoid membranes. *BMC Cell Biol* **8**: 39.
- Schoepfer, R., (ed) (1993) *The pRSET family of T7 promoter expression vectors for Escherichia coli*. Netherlands.
- Schonfeld, H.J. und Behlke, J. (1998) Molecular chaperones and their interactions investigated by analytical ultracentrifugation and other methodologies. *Methods Enzymol* **290**: 269-296.
- Sherman, D.M., Troyan, T.A. und Sherman, L.A., (eds) (1994) Localization of Membrane Proteins in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942 (Radial Asymmetry in the Photosynthetic Complexes).
- Siegenthaler, R.K. und Christen, P., (eds) (2006) Tuning of DnaK chaperone action by nonnative protein sensor DnaJ and thermosensor GrpE. United States.
- Smart, L.B., Anderson, S.L. und McIntosh, L. (1991) Targeted genetic inactivation of the photosystem I reaction center in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Embo J* **10**: 3289-3296.
- Spence, E., Sarcina, M., Ray, N., Moller, S.G., Mullineaux, C.W. und Robinson, C., (eds) (2003) Membrane-specific targeting of green fluorescent protein by the Tat pathway in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. England.
- Srivastava, R., Pisareva, T. und Norling, B. (2005) Proteomic studies of the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proteomics* **5**: 4905-4916.
- Stanier, R.Y. und Cohen-Bazire, G. (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu Rev Microbiol* **31**: 225-274.
- Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J.L. und Picot, D., (eds) (2003) An atypical haem in the cytochrome b(6)f complex. England.
- Studier, F.W. und Moffatt, B.A., (eds) (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. England.
- Suciu, D., Chatterjee, S. und Inouye, M. (1997) Catalytic efficiency of signal peptidase I of *Escherichia coli* is comparable to that of members of the serine protease family. *Protein Eng* **10**: 1057-1060.

- Sugimoto, S., Saruwatari, K., Higashi, C. und Sonomoto, K., (eds) (2008) The proper ratio of GrpE to DnaK is important for protein quality control by the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone system and for cell division. England.
- Szabo, A., Langer, T., Schroder, H., Flanagan, J., Bukau, B. und Hartl, F.U. (1994) The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the Escherichia coli Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10345-10349.
- Szalontai, B., Nishiyama, Y., Gombos, Z. und Murata, N., (eds) (2000) Membrane dynamics as seen by fourier transform infrared spectroscopy in a cyanobacterium, Synechocystis PCC 6803. The effects of lipid unsaturation and the protein-to-lipid ratio. Netherlands.
- Tjalsma, H., Noback, M.A., Bron, S., Venema, G., Yamane, K. und van Dijl, J.M. (1997) Bacillus subtilis contains four closely related type I signal peptidases with overlapping substrate specificities. Constitutive and temporally controlled expression of different sip genes. *J Biol Chem* **272**: 25983-25992.
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J.D., Braun, P.G., Darmon, E., Dorenbos, R., Dubois, J.Y., Westers, H., Zanen, G., Quax, W.J., Kuipers, O.P., Bron, S., Hecker, M. und van Dijl, J.M., (eds) (2004) Proteomics of protein secretion by Bacillus subtilis: separating the "secrets" of the secretome. United States.
- Tschantz, W.R., Paetzel, M., Cao, G., Suciu, D., Inouye, M. und Dalbey, R.E. (1995) Characterization of a soluble, catalytically active form of Escherichia coli leader peptidase: requirement of detergent or phospholipid for optimal activity. *Biochemistry* **34**: 3935-3941.
- van de Meene, A.M., Hohmann-Marriott, M.F., Vermaas, W.F. und Roberson, R.W. (2006) The three-dimensional structure of the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. *Arch Microbiol* **184**: 259-270.
- van Dijl, J.M., Smith, H., Bron, S. und Venema, G. (1988) Synthesis and processing of Escherichia coli TEM-beta-lactamase and Bacillus licheniformis alpha-amylase in E. coli: the role of signal peptidase I. *Mol Gen Genet* **214**: 55-61.
- van Dijl, J.M., de Jong, A., Vehmaanpera, J., Venema, G. und Bron, S. (1992) Signal peptidase I of Bacillus subtilis: patterns of conserved amino acids in prokaryotic and eukaryotic type I signal peptidases. *Embo J* **11**: 2819-2828.
- van Dijl, J.M., de Jong, A., Venema, G. und Bron, S. (1995) Identification of the potential active site of the signal peptidase SipS of Bacillus subtilis. Structural and functional similarities with LexA-like proteases. *J Biol Chem* **270**: 3611-3618.
- van Roosmalen, M.L., Jongbloed, J.D., Kuipers, A., Venema, G., Bron, S. und van Dijl, L.J. (2000) A truncated soluble Bacillus signal peptidase produced in Escherichia coli is subject to self-cleavage at its active site. *J Bacteriol* **182**: 5765-5770.
- van Roosmalen, M.L., Jongbloed, J.D., de Jonf, A., van Eerden, J., Venema, G., Bron, S. und van Dijl, J.M. (2001) Detergent-independent in vitro activity of a truncated Bacillus signal peptidase. *Microbiology* **147**: 909-917.

- van Roosmalen, M.L., Geukens, N., Jongbloed, J.D., Tjalsma, H., Dubois, J.Y., Bron, S., van Dijl, J.M. und Anne, J., (eds) (2004) Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. Netherlands.
- Vernotte, C., Picaud, M., Kirilovsky, D., Olive, J., Ajlani, G. und Astier, C. (1992) Changes in the photosynthetic apparatus in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6714 following light-to-dark and dark-to-light transitions. *Photosynthesis Research* **32**: 42-57.
- von Heijne, G. (1983) Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur J Biochem* **133**: 17-21.
- von Heijne, G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res* **14**: 4683-4690.
- von Heijne, G., Wickner, W. und Dalbey, R.E. (1988) The cytoplasmic domain of Escherichia coli leader peptidase is a "translocation poison" sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 3363-3366.
- von Heijne, G. und Abrahmsen, L., (eds) (1989) Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. Netherlands.
- Westermann, M., Neuschaefer-Rube, O., Mörschel, E. und Wehrmeyer, W. (1999) Trimeric photosystem I complexes exist in vivo in thylakoid membranes of the *Synechocystis* strain BO 9201 and differ in absorption characteristics from monomeric photosystem I complexes. *J. Plant Physiol.* **155**: 24-33.
- Westphal, S., Heins, L., Soll, J. und Vothknecht, U.C., (eds) (2001) Vipp1 deletion mutant of *Synechocystis*: a connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis? United States.
- Willmund, F., Muhlhaus, T., Wojciechowska, M. und Schroda, M., (eds) (2007) The NH₂-terminal domain of the chloroplast GrpE homolog CGE1 is required for dimerization and cochaperone function in vivo. United States.
- Wolfe, P.B., Wickner, W. und Goodman, J.M. (1983) Sequence of the leader peptidase gene of Escherichia coli and the orientation of leader peptidase in the bacterial envelope. *J Biol Chem* **258**: 12073-12080.
- Wolfe, P.B., Rice, M. und Wickner, W. (1985) Effects of two sec genes on protein assembly into the plasma membrane of Escherichia coli. *J Biol Chem* **260**: 1836-1841.
- Wolk, C.P. und Shaffer, P. (1976) Heterotrophic micro- and macrocultures of a nitrogen-fixing cyanobacterium. *Arch. Microbiol.* **110**: 145-147.
- Wu, G.F., Wu, Q.Y. und Shen, Z.Y., (eds) (2001) Accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. England.

Wu, Q. und Vermaas, W.F. (1995) Light-dependent chlorophyll a biosynthesis upon chlL deletion in wild-type and photosystem I-less strains of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol* **29**: 933-945.

Yano, J., Kern, J., Sauer, K., Latimer, M.J., Pushkar, Y., Biesiadka, J., Loll, B., Saenger, W., Messinger, J., Zouni, A. und Yachandra, V.K., (eds) (2006) Where water is oxidized to dioxygen: structure of the photosynthetic Mn₄Ca cluster. United States.

Zak, E., Norling, B., Maitra, R., Huang, F., Andersson, B. und Pakrasi, H.B., (eds) (2001) The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes. United States.

Zhbanko, M., Zinchenko, V., Gutensohn, M., Schierhorn, A. und Klossgen, R.B., (eds) (2005) Inactivation of a predicted leader peptidase prevents photoautotrophic growth of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. United States.

Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W. und Orth, P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature* **409**: 739-743.

Zsiros, O., Kis, M., Mustárdy, L., Frakas, T., Várkony, Z., Gombos, Z. und Szalontai, B. (2002) Light-driven structural changes in thylakoid and cytoplasmic membranes of a cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803. *Journal of Plant Physiology* **159**: 403-414.

Danksagung

