

**Hsp70-Chaperone und ihre Rolle bei der
Thylakoidmembranbiogenese im Cyanobakterium
Synechocystis sp. PCC 6803**



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften

im Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von Tobias Seidel
geb. am 21.10.1984 in Lindau (Bodensee)
Mainz, März 2015

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

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Das Cyanobakterium <i>Synechocystis</i> sp. als Modellorganismus.....	1
1.2 Die Thylakoidmembran als Kompartiment des Energiestoffwechsels	2
1.2.1 Phycobilisomen	4
1.2.2 Photosystem II.....	5
1.2.3 Cytochrom <i>b₆f</i> -Komplex.....	6
1.2.4 Photosystem I.....	7
1.2.5 Biogenese der Thylakoidmembran	8
1.3 Molekulare Chaperone	9
1.3.1 Familie der Hsp70-Proteine.....	11
1.3.1.1 Struktur und Funktion der DnaK-Proteine.....	11
1.3.1.2 Hsp70-Proteine in <i>Synechocystis</i> sp.	16
1.3.2 Die Interaktion von DnaK und <i>Trigger Factor</i> mit neu synthetisierten Polypeptiden	17
1.4 Ziele dieser Arbeit.....	21
2. Material und Methoden.....	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Laborgeräte und Zubehör	23
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.3 Bakterienstämme	25
2.1.4 Plasmide	26
2.1.5 Oligonukleotide.....	27
2.1.6 Antikörper	30
2.1.7 Chemikalien, Lösungen und Enzyme	30
2.1.8 Nährmedien.....	31
2.1.8.1 LB-Medium	31
2.1.8.2 BG11-Medium.....	31
2.1.8.3 Antibiotika und Medienzusätze.....	31

2.2 Methoden	32
2.2.1 Kulturbedingungen	32
2.2.1.1 <i>E. coli</i>	32
2.2.1.2 <i>Synechocystis</i> sp.	32
2.2.2 Zellzahlbestimmung.....	32
2.2.2.1 Bestimmung der optischen Dichte.....	32
2.2.2.2 Bestimmung der Gesamtzellzahl.....	32
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	33
2.2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	33
2.2.3.2 Isolierung genomischer DNA aus <i>Synechocystis</i> sp.....	33
2.2.3.3 DNA-Konzentrationsbestimmung	33
2.2.3.4 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
2.2.3.5 TA-Klonierungsstrategie.....	35
2.2.3.6 Restriktion von DNA.....	35
2.2.3.7 Klonierung von DNA-Fragmenten mit <i>blunt ends</i>	35
2.2.3.8 Agarosegel-Elektrophorese.....	35
2.2.3.9 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	36
2.2.3.10 Ligation von DNA	36
2.2.3.11 Überprüfung von DNA durch Sequenzierung	36
2.2.3.12 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	36
2.2.3.13 Transformation von <i>Synechocystis</i> sp.-Zellen	37
2.2.4 Biochemische Methoden	37
2.2.4.1 Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	37
2.2.4.2 Aufschluss und Fraktionierung von <i>E. coli</i> -Zellen	38
2.2.4.3 Aufschluss und Fraktionierung von <i>Synechocystis</i> sp.-Zellen	38
2.2.4.4 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie.....	38
2.2.4.5 Umpuffern von Proteinen	39
2.2.4.6 Proteinreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie	39
2.2.4.7 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	39
2.2.4.8 Bestimmung der Chlorophyllkonzentration	39
2.2.4.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
2.2.4.10 Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE.....	40
2.2.4.11 Western-Blot und Immunodetektion	40
2.2.4.12 Reinigung des Antikörpers gegen <i>Trigger Factor</i>	41

2.2.4.13 ATPase-Test.....	41
2.2.4.14 CD-Spektroskopie.....	42
2.2.4.15 Elektronenmikroskopische Aufnahmen.....	42
2.2.4.16 Absorptionsspektren.....	43
2.2.4.17 77K-Fluoreszenzspektren.....	43
2.2.4.18 Messung der Sauerstoffproduktion.....	43
2.2.4.19 PAM (<i>Pulse Amplitude Modulated</i>)-Messungen.....	44
2.2.4.20 Programme zur Strukturvorhersage von Proteinen.....	44
2.2.5 Proteomische und lipidomische Analyse von <i>Synechocystis</i> sp.-Zellen.....	45
3. Ergebnisse.....	47
3.1 Untersuchung des Proteoms und Lipidoms dunkel adaptierter <i>Synechocystis</i> sp.-Zellen.....	47
3.1.1 Proteine des Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus.....	49
3.1.2 Proteine der Atmungskette und des photosynthetischen Elektronentransports.....	49
3.1.3 Proteine der Translation und Membrantranslokation.....	50
3.1.4 Stress assoziierte Proteine.....	50
3.1.5 Proteine der Thylakoidmembranbiogenese.....	52
3.1.6 Lipidanalyse.....	52
3.2 Wachstumsverhalten von <i>Synechocystis</i> sp. bei Deletion/Depletion von DnaK1, DnaK2 und DnaK3.....	54
3.3 DnaK3 und seine Beteiligung an der Thylakoidmembranbiogenese.....	56
3.3.1 Expression und Deletion von <i>dnaK3</i>	57
3.3.2 Physiologische Charakterisierung der Depletionsmutante Δ <i>dnaK3</i>	59
3.3.2.1 Pigmentzusammensetzung.....	60
3.3.2.2 Stöchiometrie und Gehalt der Photosysteme.....	61
3.3.2.2 Photosynthetische Aktivität.....	63
3.3.2.3 Wachstumsverhalten.....	66
3.4 Die Rolle der DnaK-Proteine bei der Proteinbiosynthese und beim Proteintransport.....	67
3.5 Untersuchung zur Übertragung spezifischer Funktionen durch Neukombination der C-terminalen DnaK-Domänen.....	72
3.6 Heterologe Expression und Reinigung der Proteine DnaK1, 2, 3 und 4.....	76
3.7 Alignment und Strukturvorhersage für Slr0086 (DnaK4).....	83

4. Diskussion	89
4.1 Veränderung des Proteoms und Lipidoms dunkeladaptierter <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803-Zellen	89
4.1.1 Die physiologische Umstellung von <i>Synechocystis</i> sp. auf heterotrophes Wachstum	89
4.1.2 Dunkeladaptierte Zellen sind auf eine erneute Lichtexposition vorbereitet.....	91
4.1.3 Das Wachstum unter LAHG-Bedingungen verursacht Stress	93
4.2 Die Rolle der DnaK-Proteine bei der Proteinbiosynthese und beim Proteintransport ..	95
4.2.1 DnaK1, 2 und 3 könnten zusammen mit <i>Trigger Factor</i> mit naszierenden Polypeptiden interagieren.....	96
4.2.2 DnaK3 ist ein essentieller Faktor für die Aufrechterhaltung funktioneller Thylakoidmembranen.....	97
4.2.2.1 Die Expression von DnaK3 wird wahrscheinlich posttranskriptionell durch Licht reguliert.....	98
4.2.2.2 Die Depletion von DnaK3 führt zu weitreichenden physiologischen Veränderungen	98
4.2.2.3 Der Phänotyp des $\Delta dnaK3$ -Stamms zeigt Merkmale einer Starklichtadaptation.....	99
4.2.2.4 DnaK3 könnte am gerichteten Transport von Polypeptiden zur Thylakoidmembran beteiligt sein	101
4.2.2.5 Verschiedene Wechselwirkungen können der Bindung von DnaK3 an die Thylakoidmembran zu Grunde liegen	102
4.3 Mögliche Funktionen der DnaK-Proteine in <i>Synechocystis</i> sp.	103
4.3.1 Die spezifische Funktion der einzelnen DnaK-Proteine wird nicht allein durch den C-Terminus festgelegt	105
4.3.2 Die DnaK1-Funktion ist unter bestimmten Stressbedingungen essentiell	106
4.3.3 DnaK2 fungiert als kanonisches Hsp70 in <i>Synechocystis</i> sp.	107
4.3.4 DnaK4 könnte eine lichtabhängige Chaperonfunktion besitzen und an der oxidativen Stressantwort beteiligt sein.....	108
5. Zusammenfassung.....	111
6. Anhang.....	113
7. Literatur.....	119

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BG11-Medium	<i>Blue-Green</i> Medium
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cat/Cm ^R	Chloramphenicolresistenz
C-	Carboxy-
CD	<i>Circular Dichroism</i>
CT	C-Terminus
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
DH	Dehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Einstein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskop
et al.	<i>et alteri</i> (und andere)
ETK	Elektronentransportkette
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde (hora)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HL	<i>High Light</i> (Starklicht)
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
Hsp	Hitzeschockprotein
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
K	Kelvin
kDa	Kilo Dalton
kan/Km ^R	Kanamycinresistenz
l	Liter
LAHG	<i>Light-activated heterotrophic growth</i>
LB	Luria Bertani Broth
LDH	Laktatdehydrogenase
LL	<i>Low Light</i> (Schwachlicht)
M	molar

Abkürzungsverzeichnis

m	Meter
mAu	<i>milli Absorption units</i> (Milliabsorptionseinheiten)
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
min	Minute
mg	Milligramm
MGDG	(Monogalactosyl-Diacylglycerol)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mM	Millimolar
ms	Millisekunde
mS	Millisievert
N-	Amino-
NAD(H)	Nikotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NADP(H)	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
NBD	Nukleotidbindedomäne
n. d.	nicht detektiert
Ni-NTA	Nickel-Nitrioltriessigsäure-Agarose
nm	nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	<i>Pulse Amplitude Modulated</i>
PCC	<i>Pasteur Culture Collection</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pI	Isoelektrischer Punkt
PK	Pyruvatkinase
<i>ProOpDB</i>	<i>Prokaryotic Operon DataBase</i>
PS	Photosystem
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s/sek	Sekunde
SBD	Substratbindedomäne
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Spezies
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin

TF	<i>Trigger Factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Amino-Methan
U	<i>Unit</i>
UV/VIS	<i>Ultraviolet/Visible</i>
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
vgl.	vergleiche
w/v	<i>weight per volume</i>
Wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
μE	Mikroeinstein
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

1. Einleitung

1.1 Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. als Modellorganismus

Cyanobakterien zeichnen sich im Vergleich zu anderen Eubakterien durch die Fähigkeit der oxygenen Photosynthese aus (Stanier & Cohenbazire, 1977). Infolge des gemeinsamen evolutionsbiologischen Ursprungs weisen eukaryotische Chloroplasten und cyanobakterielle Zellen eine große funktionelle und strukturelle Ähnlichkeit auf, wodurch Cyanobakterien bei der Erforschung photosynthetischer Prozesse als Modellorganismen eine bedeutende Rolle einnehmen (Martin et al., 2002; Stanier & Cohenbazire, 1977). Darüber hinaus gerieten Cyanobakterien in den letzten Jahren wegen ihrer Diversität, der Besiedlung extremer Habitate und der Produktion zahlreicher sekundärer Metabolite immer mehr in den Fokus der industriellen Biotechnologie (Abed et al., 2009). Die cyanobakterielle Zelle besitzt einen Gram-negativen Zellwandaufbau mit einer inneren Cytoplasmamembran und einer aufgelagerten äußeren Membran (Abb. 1). In dem internen Thylakoidmembransystem findet die Lichtreaktion der Photosynthese statt.

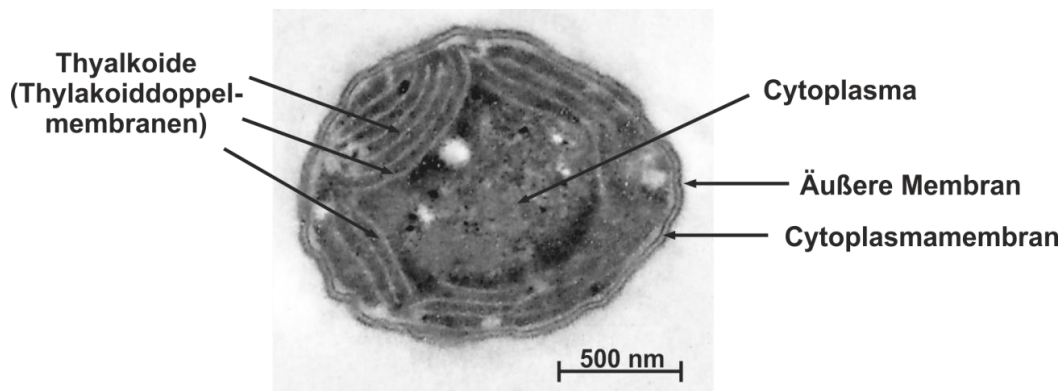


Abb. 1 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Zelle von *Synechocystis* sp. PCC6803.

Am Beispiel des Bakteriums *Synechocystis* sp. ist der Aufbau einer cyanobakteriellen Zelle dargestellt. (In Zusammenarbeit mit Dr. Uwe Kahmann, Universität Bielefeld)

Unter den Cyanobakterien bildet *Gloeobacter violaceus* eine bemerkenswerte Ausnahme, da es keine Thylakoide besitzt und die photosynthetische Elektronentransportkette in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist (Nelissen et al., 1995; Rippka et al., 1974).

In dieser Arbeit wurde der Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis* sp.) verwendet, ein einzelliges Cyanobakterium, welches 1968 aus einem kalifornischen See isoliert und in der *Pasteur Culture Collection* (PCC 6803) hinterlegt wurde (Stanier et al., 1971). Das Genom von *Synechocystis* sp. wurde als das Erste eines photosynthetischen Organismus vollständig sequenziert (Kaneko et al., 1996a) und öffentlich zugänglich gemacht (*CyanoBase*, (Nakamura et al., 2000)). Aufgrund der natürlichen Kompetenz der Zellen ist eine einfache genetische Manipulation durch homologe

Rekombination möglich (Williams, 1988). Auch die Kultivierung des Cyanobakteriums ist mit seiner relativ kurzen Generationszeit von etwa 12 Stunden praktikabel (Vermaas et al., 1988). Ein weiterer Vorteil des verwendeten Stamms ist seine Glukosetoleranz, durch die *Synechocystis* sp. befähigt ist, unter heterotrophen Bedingungen in Dunkelheit zu wachsen (Anderson & McIntosh, 1991). Jedoch erfordert eine solche Kultivierung eine regelmäßige, zeitlich begrenzte Beleuchtung mit blauem Licht, weshalb dieses Wachstum auch als *light-activated heterotrophic growth* (LAHG) bezeichnet wird (Anderson & McIntosh, 1991). Die Zucht von *Synechocystis* sp. unter LAHG-Bedingungen führt zu einer Reduzierung des Thylakoidmembransystems, das dann nur noch als diffuse Struktur unter dem Elektronenmikroskop (EM) erkennbar ist (Barthel et al., 2013; Vernotte et al., 1992). Werden jedoch dunkeladaptierte Zellen wieder Lichtbedingungen ausgesetzt, kommt es zu einer Regeneration der Thylakoidmembranen und einer verfolgbaren Rückgewinnung bzw. Steigerung der photosynthetischen Aktivität aufgrund von aktivem Photosystem II (Barthel et al., 2013). Somit stellt *Synechocystis* sp. einen geeigneten Modellorganismus dar, um die Thylakoidmembranbiogenese und photosynthetische Prozesse im Allgemeinen zu erforschen.

1.2 Die Thylakoidmembran als Kompartiment des Energiestoffwechsels

In der cyanobakteriellen Thylakoidmembran findet die Lichtreaktion der Photosynthese statt, bei der die Energie des Sonnenlichts in chemische Energie, in Form von Reduktionsäquivalenten und Phosphorylierungsenergie, umgewandelt wird (Abb. 2). NADPH (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat) und ATP (Adenosintriphosphat) können anschließend in der energieaufwändigen Dunkelreaktion für die Synthese von Zucker verwendet werden, die über eine schrittweise Reduktion von CO_2 zu Glukose im Calvinzyklus erfolgt. Die Lichtenergie wird durch Phycobilisomen (PBS) an die Photosysteme weitergeleitet (Abb. 2), was im Reaktionszentrum des Photosystem II (PS II) nach Anregung eines zentralen Chlorophyllpaars zu einer Ladungstrennung führt, wodurch Elektronen in die Elektronentransportkette (ETK) geleitet werden. Die entstandene Elektronenlücke wird über die Spaltung von Wassermolekülen im wasserspaltenden Komplex (OEC, *Oxygen Evolving Center*) wieder geschlossen. Mit Hilfe der Redoxmediatoren Plastochinon, Plastocyanin und Ferredoxin werden die Elektronen über den Cytochrom b_6f -Komplex und das Photosystem I (PS I) letztlich auf NADP^+ übertragen. Dabei wird ein Protonengradient über der Thylakoidmembran aufgebaut, der für die Umsetzung von ADP zu ATP an der ATP-Synthase verwendet wird (Abb. 2).

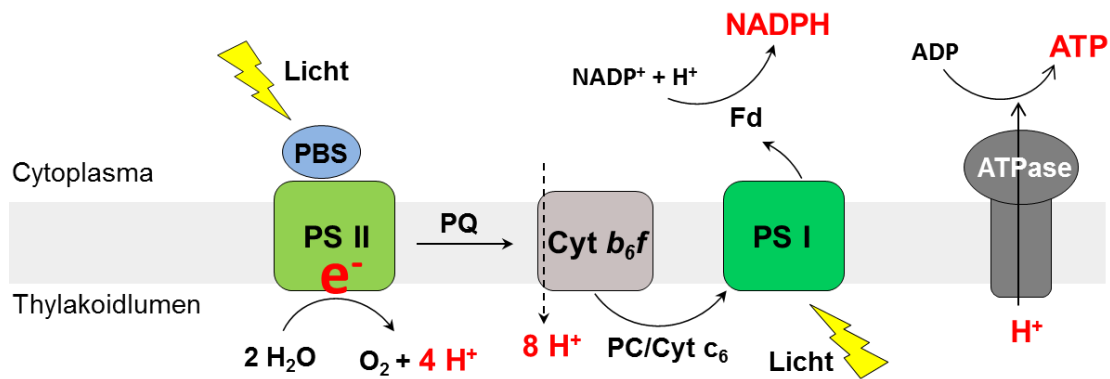


Abb. 2 Schematische Darstellung der Lichtreaktion mit den Proteinkomplexen des photosynthetischen Elektronentransports in der Thylakoidmembran.

In der Thylakoidmembran sind die Proteinkomplexe der Elektronentransportkette lokalisiert, über welche die Elektronen der Wasserspaltung geleitet werden. Die mit Hilfe der Phycobilisomen (PBS) gesammelte Lichtenergie wird auf das Photosystem II (PS II) übertragen, welches daraufhin Elektronen über Plastochinon (PQ), den Cytochrom b_6f -Komplex (Cyt b_6f), Plastocyanin (PC) bzw. Cytochrom c_6 (Cyt c_6), Photosystem I (PS I) und Ferredoxin (Fd) zu NADP^+ leitet. Bei diesem Elektronentransport wird ein Protonengradient (H^+) über der Thylakoidmembran aufgebaut, der für die Synthese von ATP an der ATP-Synthase verwendet werden kann.

Bemerkenswerterweise sind in Cyanobakterien neben den Proteinkomplexen der Photosynthese auch Komponenten der Atmungskette in der Thylakoidmembran lokalisiert, so dass in einem Kompartiment beide Reaktionen gleichzeitig ablaufen können (Mullineaux, 2014; Vermaas, 2001). Darüber hinaus überschneiden sich die Elektronentransportketten von Photosynthese und Respiration aufgrund der Verwendung gleicher Redoxkomponenten. Auf diese Weise kann der Plastochinon-Pool entweder von Elektronen des PS II oder von Elektronen der NADPH- bzw. Succinat-Dehydrogenase gespeist werden, die dann über den Cytochrom b_6f -Komplex auf PS I oder terminale Oxidasen übertragen werden (Cooley et al., 2000; Ogawa, 1991; Ohkawa et al., 2000; Vermaas, 2001).

Im Gegensatz zu höheren Pflanzen ist das Thylakoidsystem in Cyanobakterien nicht aus Stroma- oder Granathylakoiden aufgebaut, so dass eine örtliche Trennung der Komponenten der Photosynthese scheinbar nicht gegeben ist. Jedoch konnte in *Synechocystis* sp. eine räumliche Ordnung der Photosysteme nachgewiesen werden, die wahrscheinlich Fehler bei der Elektronenübertragung minimiert (Olive et al., 1997; Westermann et al., 1999). Dabei sind PS II Dimere dicht gepackt in parallelen Reihen angeordnet und dazwischen PS I-Trimere eingestreut (Mullineaux, 1999). Bemerkenswerterweise ist die Stöchiometrie der Photosysteme in vielen Cyanobakterien im Gegensatz zu höheren Pflanzen größer als 1, wie zum Beispiel bei *Synechocystis* sp. für den ein PS I:PS II Verhältnis von 5 beschrieben wurde.

1.2.1 Phycobilisomen

Die Phycobilisomen der Cyanobakterien sind frei bewegliche Lichtsammelantennen, welche die absorbierte Lichtenergie über ihre Antennensegmente zu den Kernsegmenten weiter auf die Photosysteme übertragen (Abb. 3). Sie sind aus Phycobiliproteinen aufgebaut, die mehr als die Hälfte des Proteins einer cyanobakteriellen Zelle ausmachen können. Phycobiliproteine bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit, an die jeweils ein Chromophor, das sogenannte Phycobilin, gebunden ist. Das $\alpha\beta$ -Heterodimer kann sich als Trimer oder Hexamer zu scheibenförmigen Segmenten und weiter zu Stapeln zusammenlagern, die den Kern bzw. die Antennen des Phycobilisomenkomplexes bilden (Abb. 3) (Arteni et al., 2009; Grossman et al., 1993).

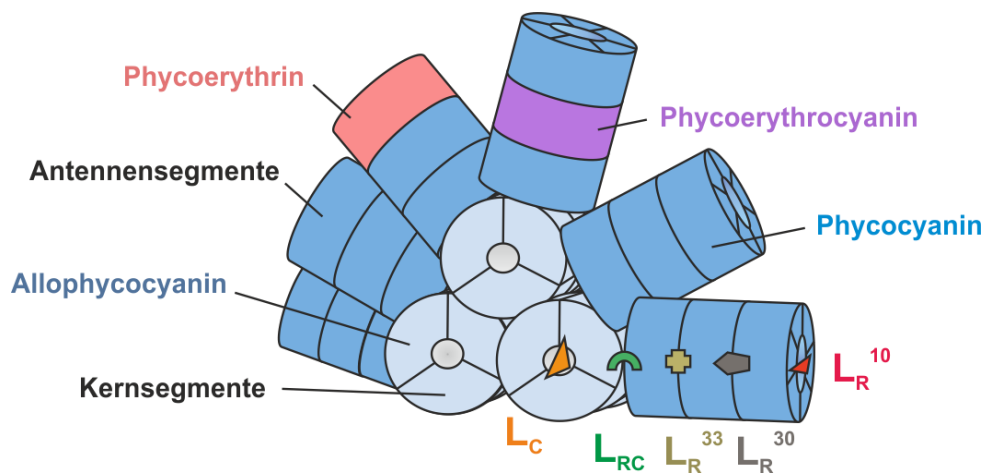


Abb. 3 Schematischer Aufbau eines Phycobilisom-Antennenkomplexes.

Der schematische Aufbau eines Phycobilisomkomplexes ist am Beispiel eines Komplexes aus *Synechocystis* sp. gezeigt. Die Kern- und Antennensegmente werden durch *Linkerproteine*, wie beispielsweise L_R^{10} , L_R^{30} , L_R^{33} , L_R^C und L_C miteinander verbunden und stabilisiert. Die Abbildung wurde verändert nach (Arteni et al., 2009).

Linkerproteine verbinden die Segmente miteinander und sind neben der Stabilisierung der einzelnen Segmente für die Stabilität des gesamten Komplexes verantwortlich (Abb. 3). Darüber hinaus spielt der Linker L_{CM} bei der Interaktion der Phycobilisomen-Kerneinheit mit der Thylakoidmembran eine zentrale Rolle, der wahrscheinlich eine direkte Wechselwirkung mit Photosystem II zu Grunde liegt (Arteni et al., 2009; Redlinger & Gantt, 1982). In Phycobilisomen bilden gestapelte Segmente aus trimerem Allophycocyanin den Kern, von dem gestapelte Antennensegmente strahlenförmig abgehen (Abb. 3). Neben dem Absorptionsbereich von Chlorophyll a, können Cyanobakterien mit Hilfe der pigmentbindenden Phycobiliproteine Phycocyanin, Phycoerythrin und Phycoerythrocyanin, den Wellenlängenbereich von 450 nm bis 660 nm für die Photosynthese nutzen (Grossman et al., 1993). Am Übergang der Antennensegmente zum Kern ist obligatorisch ein Phycocyaninsegment lokalisiert, während die distalen Segmente aus allen drei Phycobiliproteinen

gleichermaßen aufgebaut sein können (Abb. 3), was von der Art des Organismus sowie den Wachstumsbedingungen abhängig ist (Arteni et al., 2009).

Der Gehalt und die Zusammensetzung der Phycobilisomen können den sich ändernden Wachstumsbedingungen, wie Lichtstärke und Verfügbarkeit von Nährstoffen, angepasst werden (Grossman et al., 1993). Beispielsweise kommt es unter hohen Lichtintensitäten zu einer Verkürzung der Antennensegmente und einer allgemeinen Reduzierung der Phycobilisomen, um eine Absorption von überschüssiger Energie zu verhindern (Muramatsu & Hihara, 2012). Des Weiteren kann die Übertragung der von den Phycobilisomen absorbierten Lichtenergie auf die Photosysteme mit Hilfe von *state-transitions* reguliert werden, um bei niedrigeren Lichtintensitäten die Effektivität der Photosynthese zu erhöhen (Mullineaux & Emlyn-Jones, 2005). Die Lichtsammelantennen können dabei schnell von den Photosystemen gelöst und wieder gebunden werden, wodurch eine Umverteilung der Exzitationsenergie zwischen Photosystem I und Photosystem II ermöglicht wird.

1.2.2 Photosystem II

Jedes Monomer des dimeren Multiproteinkomplexes Photosystem II ist aus mehreren Untereinheiten aufgebaut, welche als PsbA bis PsbO sowie PsbU, PsbV und PsbX bezeichnet werden können (Abb. 4) (Ferreira et al., 2004).

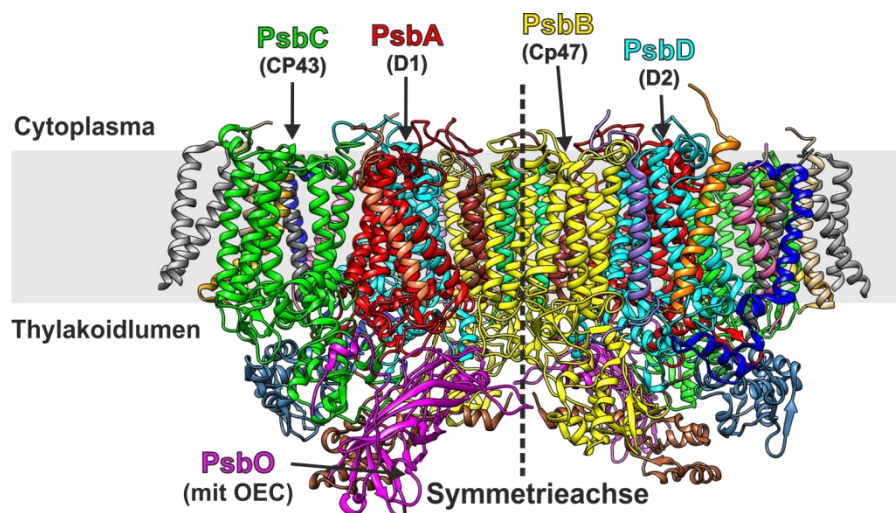


Abb. 4 Die Struktur des Photosystem II-Dimers.

Die einzelnen Untereinheiten der Kristallstruktur des dimeren PS II aus dem Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* (PDB 1S5L; (Ferreira et al., 2004)) wurden mit Hilfe des Programms *Chimera* farbig dargestellt (siehe 2.2.4.20). Die zwei Kernuntereinheiten PsbA (rot) und PsbD (türkis) sind von den großen Antennenproteinen PsbC (grün) und PsbB (gelb) sowie von weiteren Untereinheiten umgeben. In der Untereinheit PsbO ist der wasserspaltende Komplex (OEC) enthalten.

Das Reaktionszentrum wird aus den zwei großen Kernuntereinheiten PsbA (D1) und PsbD (D2) gebildet, an die neben dem zentralen Kernchromophor, eine Reihe weiterer Kofaktoren

gebunden sind. Antennenproteine, wie PsbB (CP47) und PsbC (CP43), sind an der Weiterleitung der Exzitationsenergie an das Reaktionszentrum beteiligt (Abb. 4), welche das zentrale Chlorophyllpaar P680 in einen angeregten Zustand überführt (P680*), das in Folge ein Elektron auf ein gebundenes Pheophytin überträgt. Das Elektron wird dann auf ein proteingebundenes Plastochinon (Q_A) und weiter auf ein dissoziierbares Plastochinon (Q_B) übertragen und auf diese Weise in den Plastochinon-Pool eingespeist. Zur Re-Reduktion von angeregtem P680* dient ein Elektron aus der Spaltung eines Wassermoleküls im wasserspaltenden Komplex der Untereinheit PsbO, wobei ein Cluster aus vier Manganatomen und ein Calciumatom in PsbO entscheidend an der Oxidation beteiligt sind (Yano & Yachandra, 2014). Neben der Freisetzung von Sauerstoff kommt es bei der Spaltung von Wasser zur Entstehung von Protonen, die zum Aufbau des Protonengradienten beitragen (Abb. 2).

1.2.3 Cytochrom *b*₆*f*-Komplex

In der cyanobakteriellen Thylakoidmembran übernimmt der Cytochrom *b*₆*f*-Komplex eine zentrale Rolle beim photosynthetischen und respiratorischen Elektronentransport und ist in allen bisher untersuchten Cyanobakterien essentiell für die Zellviabilität (Vermaas, 2001). Durch ihn wird eine Umstellung vom bisher stattfindenden Zwei-Elektronen-Transport des Plastohydrochinols (PQH₂), auf einen Ein-Elektronen-Transport durch Plastocyanin oder Cytochrom *c*₆, vermittelt (Baniulis et al., 2008). Im sogenannten Q-Zyklus werden Elektronen des reduzierten Redoxmediators Plastohydrochinol (PQH₂) auf den Cytochrom *b*₆*f*-Komplex übertragen und dabei ein Protonengradient über der Thylakoidmembran aufgebaut (Baniulis et al., 2008). Nach der Oxidation von PQH₂ wird eines der beiden Elektronen über das Eisen-Schwefel-Protein und Cytochrom *f* auf die frei beweglichen Redoxmediatoren Plastocyanin oder Cytochrom *c*₆ weitergeleitet, währenddessen eine Abgabe von zwei Protonen ins Thylakoidlumen erfolgt. Das zweite Elektron nimmt einen anderen Weg und reduziert nach Weiterleitung über zwei Häm *b*-Kofaktoren ein Plastochinon (PQ), welches an einer zusätzlichen Bindestelle an der cytosolischen Seite des Komplexes gebunden vorliegt zu Plastosemichinon (PQH•). Entsprechend werden die zwei Elektronen der Oxidation eines weiteren PQH₂ zu Plastocyanin bzw. zur zusätzlichen Bindestelle für Plastochinon übertragen, wodurch wiederum zwei Protonen ins Lumen abgegeben werden sowie PQH• zu PQH₂ reduziert wird und dabei zwei Protonen aus dem Cytoplasma aufnimmt. Durch den Q-Zyklus wurden letztlich vier Protonen über die Membran transportiert und zwei Protonen vom Cytoplasma aufgenommen. Anschließend kann der nachstehende frei bewegliche Elektronenträger Plastocyanin bzw. Cytochrom *c*₆ ein Elektron an Photosystem I bzw. an Cytochrom-Oxidase weitergeben (Vermaas, 2001).

1.2.4 Photosystem I

Der trimere Multiproteinkomplex Photosystem I überträgt Elektronen der Elektronentransportkette von Plastocyanin bzw. Cytochrom c_6 auf Ferredoxin, welches letztlich mit Hilfe der Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase NADP⁺ zu NADPH reduziert. Die großen Kernuntereinheiten PsaA und PsaB bilden das Reaktionszentrum (Abb. 5), in dem sich das zentrale Chlorophyllpaar P700 befindet, welches durch weitergeleitete Exzitationsenergie von Antennenpigmenten in den angeregten Zustand überführt werden kann (P700*). In Folge wird ein Elektron über Chlorophyll A₀, Phyllochinon A₁ und drei Eisen-Schwefel-Zentren auf den terminalen Akzeptor Ferredoxin geleitet und die Elektronenlücke in P700* durch Oxidation von Plastocyanin bzw. Cytochrom c_6 geschlossen.

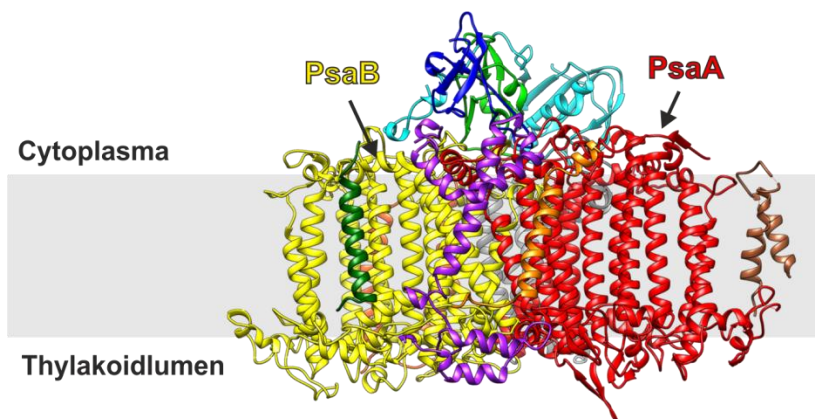


Abb. 5 Die Struktur des Photosystem I-Monomers.

Die Untereinheiten eines Monomers des trimeren PS I aus dem Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* (PDB 1JB0; (Jordan et al., 2001)) wurden mit Hilfe des Programms *Chimera* farbig dargestellt (siehe 2.2.4.20). PsaA (rot) und PsaB (gelb) stellen die Kernuntereinheiten des Komplexes dar.

Neben dem linearen photosynthetischen Elektronentransport kann Photosystem I an einem zyklischen Elektronentransport beteiligt sein, bei dem Elektronen von PS I/Ferredoxin zurück zu Plastochinon über den Cytochrom b_6f -Komplex wieder zu PS I geleitet werden (Abb. 2) (Bendall & Manasse, 1995). Auf diese Weise wird zwar ein Protonengradient aufgebaut, der für die Synthese von ATP verwendet werden kann, Reduktionsäquivalente in Form von NADPH entstehen jedoch nicht. Der zyklische Elektronentransport kann somit maßgeblich zur Einstellung eines für die Zelle optimalen ATP:NADPH-Verhältnis beitragen (Munekage et al., 2004), was insbesondere unter Stressbedingungen, wie zum Beispiel hohe Lichtintensitäten, eine wichtige Rolle spielt (Munekage et al., 2002).

1.2.5 Biogenese der Thylakoidmembran

Bis heute ist der Vorgang der Thylakoidmembranbiogenese nicht verstanden und wird kontrovers diskutiert (Rast et al., 2015). Die cyanobakterielle Thylakoidmembran weist eine zur Cytoplasmamembran vergleichbare Lipidzusammensetzung auf, entsprechenderweise konnte an beiden Membranen eine Synthese von Lipiden nachgewiesen werden (Gombos et al., 1996; Selao et al., 2014). Ein hoher Proteinanteil verbunden mit hohen Packungsdichten sind für die Thylakoidmembran charakteristisch, die sich von der Cytoplasmamembran hauptsächlich durch die Proteinzusammensetzung unterscheidet (Kirchhoff et al., 2002; Lee, 2000; Pisareva et al., 2011). Wie diese asymmetrische Proteinverteilung erreicht werden kann ist zwar noch weitestgehend ungeklärt, jedoch ist eine Beteiligung spezifischer Transportsequenzen denkbar, die von Transportfaktoren erkannt werden und einen spezifischen Transport neusynthetisierter Polypeptide zu den Translokasen in der Thylakoidmembran ermöglichen (Rajalahti et al., 2007; Schneider, 2014).

Interessanterweise sind auch in isolierten CM-Fractionen Kernuntereinheiten von Photosystem I und Photosystem II nachzuweisen (Smith & Howe, 1993; Zak et al., 2001). Die zusätzliche Detektion von Assemblierungsfaktoren spricht für eine initiale Zusammensetzung von Untereinheiten der Photosysteme in der Cytoplasmamembran und einen anschließenden Transport zur Thylakoidmembran (Nickelsen & Rengstl, 2013; Rast et al., 2015; Smith & Howe, 1993; Zak et al., 2001). Bisher konnte jedoch kein vorgeschlagener Transportmechanismus validiert werden (Schneider, 2014). In einigen Cyanobakterien laufen Thylakoidmembranen zu Kontaktstellen zusammen, die scheinbar an die Cytoplasmamembran assoziiert sind oder sich in unmittelbarer Nähe zu ihr befinden (van de Meene et al., 2006). Manche Kontaktstellen ließen eine zentrale zylindrische Struktur erkennen, von der die Thylakoidlamellen strahlenförmig zu entspringen scheinen (Kunkel, 1982; van de Meene et al., 2006). Diese besonderen Strukturen wurden als Thylakoidzentren beschrieben, in denen eine Pre-Assemblierung des Photosystems II und die Beladung mit Mn^{2+} , vermittelt durch das Manganbindeprotein PrtA, erfolgen könnte (Kunkel, 1982; Stengel et al., 2012). Obwohl in diesen Bereichen ein Übergang von Cytoplasmamembran zur Thylakoidmembran denkbar wäre, konnte bisher noch keine eindeutige Verbindung beider Membranen in den Thylakoidzentren nachgewiesen werden (Liberton et al., 2006; Nevo et al., 2007; van de Meene et al., 2006).

Das Thylakoidsystem kann von der cyanobakteriellen Zelle aufgebaut oder reduziert und auf diese Weise den sich ändernden Umweltbedingungen angepasst werden (Barthel et al., 2013; Kopečna et al., 2012; Vernotte et al., 1992). Bei der Regulation der adaptiven Thylakoidbiogenese spielt Licht eine übergeordnete Rolle. Mit einer Kultivierung von *Synechocystis* sp. in Dunkelheit unter *light-activated heterotrophic growth* (LAHG)-Bedingungen kommt es zu einer Reduktion des Thylakoidmembransystems, das im Licht

jedoch wieder vollständig aufgebaut werden kann (Barthel et al., 2013; Vernotte et al., 1992). Verbunden mit der Regeneration der Thylakoidmembranen lässt sich eine steigende photosynthetische Aktivität dokumentieren, die auf die Bildung von aktivem Photosystem II zurückzuführen ist (Barthel et al., 2013). Auch bei der Akklimatisierung an hohe Lichtintensitäten kommt es in *Synechocystis* sp. zu einer Reduktion der Thylakoide (Kopečna et al., 2012).

In den letzten Jahren wurden diverse Kandidaten in Verbindung mit der Thylakoidbiogenese in *Synechocystis* sp. gebracht, darunter das *Vesicle inducing protein in plastids* Vipp1 (SII0617), das membranassoziierte Chaperon DnaK3 (SII1932), die Membraninsertase YidC (Slr1471) und das Prohibitin-homologe Membranprotein Slr1768 (Bryan et al., 2011; Fuhrmann et al., 2009; Rupprecht et al., 2010; Spence et al., 2004). Die genaue Funktion dieser Proteine konnte jedoch noch nicht geklärt werden.

1.3 Molekulare Chaperone

Durch die Aminosäuresequenz einer neusynthetisierten linearen Polypeptidkette wird zwar die spätere funktionale dreidimensionale Struktur des fertig gefalteten Proteins festgelegt, eine spontane Faltung in die native Konformation wird jedoch durch das zelluläre Milieu erheblich beeinträchtigt, da es Fehlfaltung und Aggregation begünstigt (Agashe & Hartl, 2000; Anfinsen, 1973; Dobson & Karplus, 1999). Während des Translationsprozesses wird das naszierende Polypeptid vom Ribosom sukzessiv ins Cytosol abgegeben, in dem Proteine äußerst dicht gedrängt vorliegen (300-400 g/l), die seine Faltung durch unerwünschte Wechselwirkungen negativ beeinflussen können (Hartl et al., 2011). Obwohl für einige Proteine, vor allem kleine globuläre Polypeptide, eine spontane Faltung dennoch möglich ist, scheint für den überwiegenden Anteil der zellulären Proteine eine effektive Faltung von der Unterstützung molekularer Chaperone abzuhängen (Dobson & Karplus, 1999; Hartl et al., 2011). Allgemein werden Proteine als molekulare Chaperone bezeichnet, wenn sie mit einem anderen Polypeptid interagieren und es somit bei der Faltung in die native Konformation unterstützen, ohne nach dem Faltungsprozess selbst ein Bestandteil des fertigen Proteins zu sein (Hartl et al., 2011). Chaperone werden alternativ als Hitzeschockproteine bezeichnet und anhand ihres Molekulargewichts in verschiedene Familien (Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100, sHsp) eingeteilt. Vertreter dieser Proteinfamilien sind in nahezu allen prokaryotischen und eukaryotischen Organismen zu finden (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Weitere Faltungshelferproteine, wie Hsp33, die nicht ubiquitär verbreitet sind, werden keiner gesonderten Klasse zugeordnet (Jakob et al., 1999; Kumsta & Jakob, 2009). Molekulare Chaperone haben in der Zelle eine große Bandbreite an Funktionen und sind unter anderem an der *de novo*-Faltung eines neusynthetisierten

Polypeptids, der Oligomerisierung von Proteinen, der Rückfaltung eines denaturierten Proteins, der Auflösung von Proteinaggregaten und am Transport von Proteinen beteiligt (Hartl et al., 2011). In der *de novo*-Proteinfaltung sind vor allem Vertreter der Hsp60-, Hsp70- und Hsp90-Familien involviert, die ihre Substrate ATP- und Kofaktor-reguliert wiederholt binden und freigegeben und somit die Faltung des Polypeptids in seine native Konformation unterstützen. Allerdings sind es ribosomassoziierte Chaperone, wie das prokaryotische *Trigger Factor*-Protein (siehe 1.3.2), die zuerst mit dem naszierenden Protein am Ribosom interagieren, initiale Faltungsschritte einleiten und es gleichzeitig vor Fehlfaltung schützen (Craig et al., 2003; Hoffmann et al., 2010). Auch Hsp70-Proteine (siehe 1.3.1) können kotranslational als Faltungshelfer beteiligt sein und eine Aggregation der naszierenden Kette verhindern (Deuerling & Bukau, 2004). Die Chaperonine GroEL/ES der Hsp60-Familie sind überwiegend an der posttranslationalen Faltung neusynthetisierter Polypeptide beteiligt und bilden einen ATP-abhängigen Faltungskomplex, der durch seine kapselartige Struktur ein vorübergehend vom Cytosol getrenntes Kompartiment bereitstellen kann, das die native Faltung des eingeschlossenen Polypeptids begünstigt (Bukau & Horwich, 1998; Deuerling & Bukau, 2004). Im Vergleich zu den meisten anderen Chaperonen ist über den Mechanismus der ATP-abhängigen Funktion der Hsp90-Proteine wenig bekannt, die insbesondere an der Faltung von Proteinen der Signaltransduktion und des Proteintransports beteiligt sind und mit einer beachtlichen Anzahl von über 20 Kochaperonen wechselwirken (Taipale et al., 2010). Proteine der Hsp100-Familie besitzen eine ATP-abhängige Unfoldase-Aktivität, die es fehlgefalteten Proteinen ermöglicht erneut zu falten (Ogura & Wilkinson, 2001; Schirmer et al., 1996). Außerdem sind sie an der Auflösung von Proteinaggregaten beteiligt und vermitteln den proteolytischen Abbau fehlgefalteter Proteine (Lee et al., 2004). Andere Helferproteine, wie kleine Hitzeschockproteine (sHsps) und DnaJ-Proteine (Hsp40) agieren ATP-unabhängig (Jakob et al., 1993; Kampinga & Craig, 2010). Die sHsps verhindern als Holdasen durch Bindung hydrophober Bereiche die Aggregation teilweise denaturierter Proteine (Jakob et al., 1993; Walter & Buchner, 2002). DnaJ-Proteine werden als Kochaperone bezeichnet, da sie denaturierte Proteine binden und an Hsp70-Chaperone weiterreichen können sowie deren ATP-Hydrolyseaktivität durch Wechselwirkung mit der Nukleotidbindedomäne um mehr als das 1000-fache steigern (Craig et al., 2006; Laufen et al., 1999). Auf diese Weise vermitteln sie die Substratspezifität und somit die Funktion ihrer Hsp70-Interaktionspartner (Kampinga & Craig, 2010).

Molekulare Chaperone spielen neben ihrer Funktion unter physiologischen Normalbedingungen auch unter Stressbedingungen eine wichtige Rolle. Dementsprechend reagiert die Zelle auf Stressfaktoren, wie hohe Temperaturen, mit einer verstärkten Expression von Hitzeschockproteinen, um der Fehlfaltung, Denaturierung und Aggregation von Proteinen entgegenzuwirken (Hartl et al., 2011; Lindquist & Craig, 1988).

1.3.1 Familie der Hsp70-Proteine

Die Proteine der Hsp70-Familie weisen eine hohe Sequenzhomologie auf und sind in den meisten prokaryotischen und allen eukaryotischen Organismen zu finden (Deuerling & Bukau, 2004; Lindquist & Craig, 1988). In Pro- und Eukaryoten ist das Auftreten multipler homologer Hsp70-Proteine weit verbreitet, wobei in manchen Zellkompartimenten mehrere Homologe gleichzeitig auftreten können (Deuerling & Bukau, 2004). Hsp70-Chaperone sind unter anderem an der ATP-abhängigen Faltung neusynthetisierter Polypeptide, der Zusammensetzung sowie der Auflösung oligomerer Proteinstrukturen, der Rückfaltung denaturierter Proteine und am gerichteten Proteintransport beteiligt und spielen somit unter physiologischen Normalbedingungen als auch unter Stressbedingungen eine bedeutende Rolle (Deuerling & Bukau, 2004; Hartl et al., 2011). Ihr Funktionsmechanismus wird durch einen Zyklus beschrieben, bei dem das Substrat ATP- und Kofaktorabhängig wiederholt gebunden und freigesetzt werden kann (Genevaux et al., 2007; Kampinga & Craig, 2010). Hsp70-Proteine arbeiten wahrscheinlich als Teil eines zusammenhängenden Chaperonnetzwerks in Kooperation mit anderen Chaperonsystemen, wie Hsp60 (GroEL/ES) bei der Proteinfaltung (Deuerling & Bukau, 2004; Langer et al., 1992), Hsp90 bei der Proteinfaltung und Signaltransduktion (Pratt & Toft, 2003) und mit Hsp100 (ClpB) sowie sHsps bei der Auflösung von Proteinaggregaten und Rückfaltung von fehlgefalteten Proteinen (Haslbeck, 2002; Haslberger et al., 2007). Das am besten untersuchte Protein der Hsp70-Familie ist DnaK aus *E. coli*, dessen Struktur, Funktionsmechanismus und Wirkungsspektrum umfassend beschrieben werden konnte (Bertelsen et al., 2009; Deuerling & Bukau, 2004; Genevaux et al., 2007; Hartl et al., 2011; Zuiderweg et al., 2013). Die Funktion von DnaK ist abhängig von seinen Kochaperonen, die als Hsp40 bzw. DnaJ und Nukleotidaustauschfaktor (GrpE) bezeichnet werden (Brehmer et al., 2004; Laufen et al., 1999).

1.3.1.1 Struktur und Funktion der DnaK-Proteine

Das DnaK-Protein aus *E. coli* besteht aus 638 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 69 kDa und ist aus den drei Domänen Nukleotidbindedomäne (NBD), Substratbindedomäne (SBD) und *Lid*-Domäne (*Lid*) sowie einem unstrukturierten C-Terminus (CT) aufgebaut (Abb. 6). In der N-terminalen NBD findet die Bindung von ATP statt, das durch die intrinsische ATPase-Aktivität langsam zu ADP umgesetzt wird (McCarty et al., 1995). Die Bindung von ATP erfolgt zusammen mit Mg^{2+} und zwei K^{+} -Ionen in einer Kavität zwischen den Subdomänen IA/IB und IIA/IIB, die alle an der Interaktion beteiligt sind (Abb. 6) (Flaherty et al., 1990; Kityk et al., 2012). Nach einem kurzen Interdomänen-*Linker* folgt die SBD, in der die Substratbindetasche lokalisiert ist, durch die freiliegende hydrophobe Sequenzbereiche des denaturierten Substrats gebunden werden können (Abb. 6 und Abb. 7)

(Zhu et al., 1996). An der Regulation der Substratbindung und -freigabe ist die *Lid*-Domäne entscheidend beteiligt, welche sich abhängig von der Größe des Substrats über die Substratbindetasche bewegen kann (Abb. 6) (Aponte et al., 2010; Schlecht et al., 2011; Slepnev & Witt, 2002). Dem C-terminalen, unstrukturierten und flexiblen Bereich konnte zwar bisher noch keine eindeutige Funktion zugeschrieben werden, jedoch scheint er bedeutend für die Chaperonaktivität zu sein und ist möglicherweise über ein Bindemotiv an der Interaktion mit Substraten beteiligt (Smock et al., 2011).

Allgemein weisen die Sequenzbereiche von der NBD über den Interdomänen-*Linker* zur SBD in Hsp70-Proteinen eine starke Konservierung auf, wogegen die C-terminalen Sequenzbereiche, insbesondere der unstrukturierte C-Terminus, nur schwach konserviert vorliegen (Bertelsen et al., 1999; Bukau & Horwich, 1998; Rupprecht et al., 2007b).

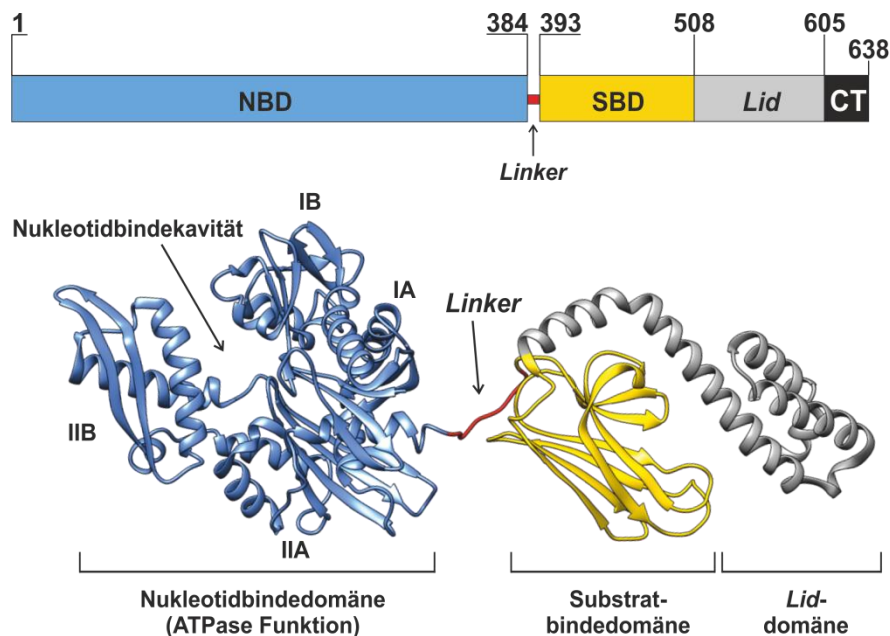


Abb. 6 Struktur und Domänenaufbau des DnaK-Proteins aus *E. coli*.

Schematische Darstellung der Domänenstruktur von *E. coli*-DnaK bestehend aus Nukleotidbindedomäne (NBD), Substratbindedomäne (SBD), Interdomänen-*Linker*, *Lid*-Domäne (*Lid*) und variablen C-Terminus (CT) mit Angabe von Aminosäurepositionen. Darunter ist die Kristallstruktur in der geschlossenen ADP-gebundenen Form (PDB 2KHO; (Bertelsen et al., 2009)) gezeigt, deren Domänen mit Hilfe des Programms *Chimera* farbig dargestellt wurden (siehe 2.2.4.20).

Die SBD ist aus zwei β -Faltblättern mit jeweils vier antiparallelen β -Strängen aufgebaut, welche eine β -*Sandwich*-Struktur bilden (Abb. 7) (Zhu et al., 1996). Für die Substratbindung sind vor allem die *Loops* zwischen den β -Strängen verantwortlich (Abb. 7) (Zhu et al., 1996). DnaK-Chaperone erkennen denaturierte Sequenzbereiche von Proteinen anhand eines Bindemusters aus vier bis fünf Aminosäureresten, das statistisch alle 36 Aminosäuren auftritt und somit wenigstens einmal in jedem Protein vorhanden sein sollte (Rüdiger et al., 1997; Van Durme et al., 2009). Dieses Bindemotiv weist im Zentrum hydrophobe Aminosäuren wie Leucin oder Valin auf, die von zwei basischen Resten flankiert werden (Gragerov et al., 12

1994). Anhand der Bindung eines kurzen Substratpeptids mit der Sequenz NRLLLTG in der SBD, konnten Reste, die an der Wechselwirkung zwischen SBD und Substrat beteiligt sind, nachgewiesen werden (Abb. 7) (Gragerov et al., 1994; Qi et al., 2013; Zhu et al., 1996). Die hydrophoben Aminosäuren des Polypeptides interagieren dabei am DnaK-Protein mit hydrophoben Aminosäurenresten in der Substratbindetasche, wobei die basischen Reste des Substratpeptids mit der negativen Ladung im äußeren Bereich der Substratbindetasche wechselwirken (Abb. 7). An der Bindung des Substrats sind die Loops L₁₂ und L₃₄ maßgeblich beteiligt, welche durch L₄₅ und L₅₆ stabilisiert werden (Abb. 7) (Qi et al., 2013; Zhu et al., 1996). Die flexible Lid-Domäne kann sich über die Substratbindetasche bewegen und kommt somit in engen Kontakt zum gebundenen Polypeptid (Aponte et al., 2010; Schlecht et al., 2011). Neben der Bindung und Interaktion mit dem Substrat, reguliert die Domäne durch eine Bewegung hinweg von der Bindetasche auch die Substratfreigabe (Zuiderweg et al., 2013).

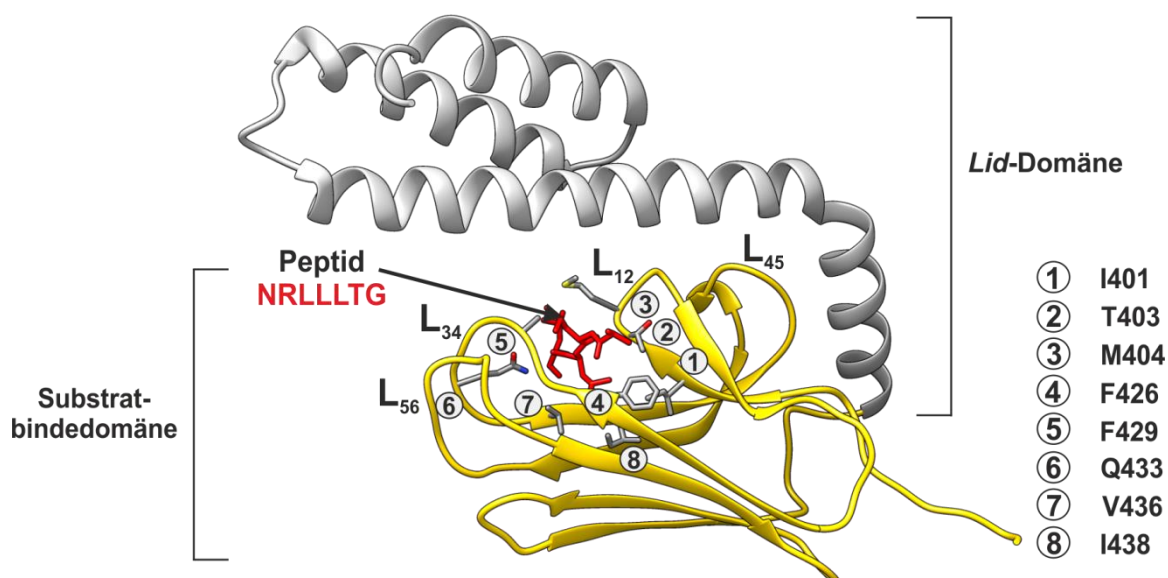


Abb. 7 Die Bindung von Substraten in der Substratbindedomäne des *E. coli*-DnaK-Proteins.

Gezeigt ist die Kristallstruktur der Substratbindedomäne von *E. coli* DnaK im Komplex mit dem Substratpeptid NRLLLTG (PDB 1DKZ; (Zhu et al., 1996)). Für die Substratinteraktion relevante Aminosäurereste sind numeriert von 1-8 angegeben (Zhu et al., 1996). Außerdem sind die Loops L₁₂ sowie L₃₄ markiert, die an der Substratbindung entscheidend beteiligt sind und von den Loops L₄₅ und L₅₆ stabilisiert werden. Die Domänen wurden mit Hilfe des Programms *Chimera* angefärbt (siehe 2.2.4.20)

Hsp70-Chaperone sind allosterische Proteine, bei denen eine Bindung von ATP in der NBD zu einer Freigabe des Substrats in der SBD führt sowie eine Bindung des Substrats in der SBD eine ATP-Hydrolyse in der NBD vermittelt, die wiederum die Substrataffinität in der SBD erhöht (Zuiderweg et al., 2013). Dabei nimmt das DnaK-Protein abhängig von der ATP-Bindung und -Hydrolyse zwei Konformationen ein (Abb. 8 A und B).

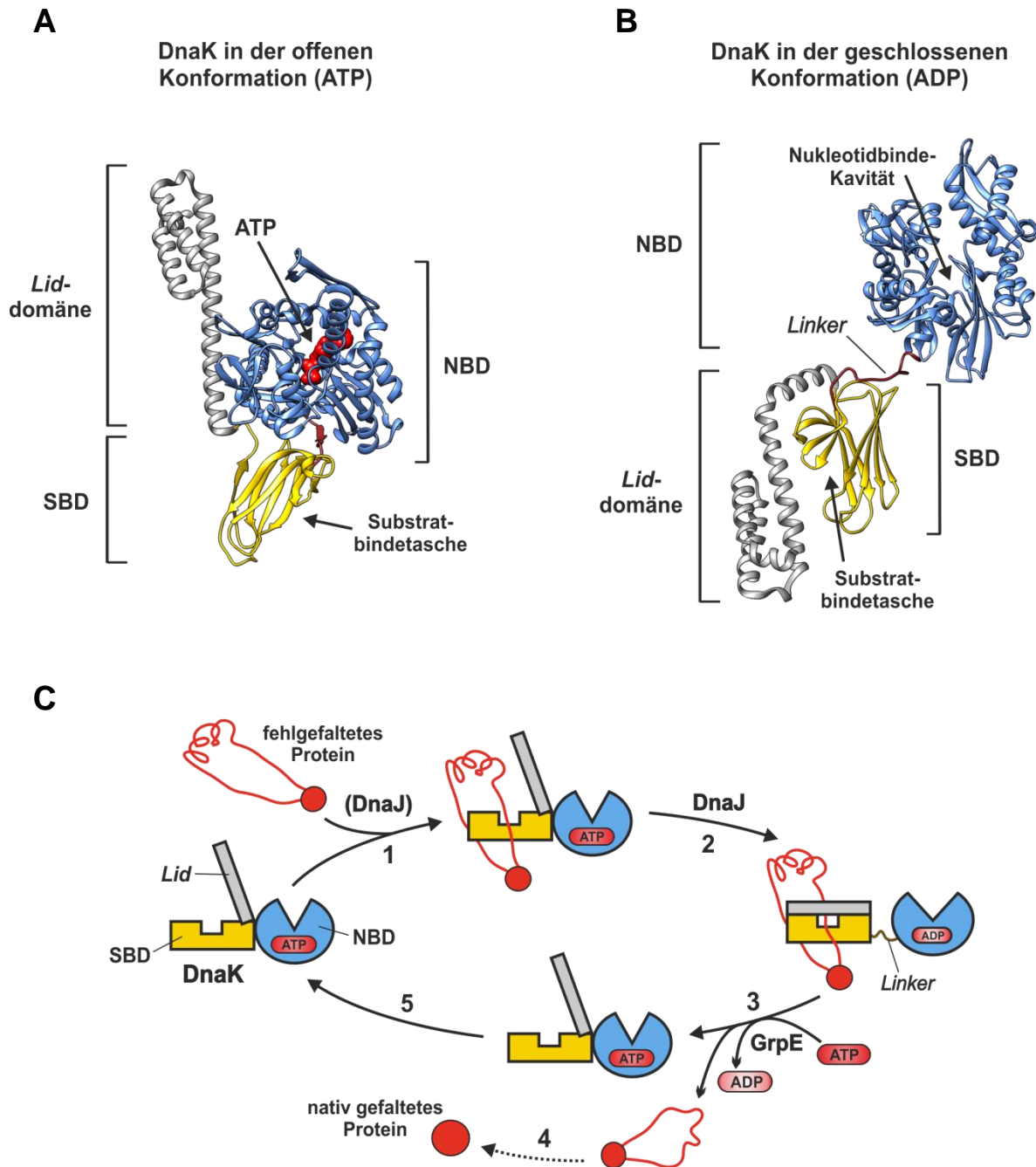


Abb. 8 ATP-abhängige Konformationsänderungen im Chaperonzyklus von *E. coli* DnaK.

Gezeigt ist die Kristallstruktur von DnaK aus *E. coli* in der A) offenen ATP gebundenen Form (PDB 4B9Q; (Kityk et al., 2012)) und der B) geschlossenen ADP gebundenen Form (PDB 2KHO; (Bertelsen et al., 2009)), deren Domänen mit dem Programms *Chimera* angefärbt wurden (siehe 2.2.4.20). C) Chaperonzyklus von DnaK verändert nach (Doyle et al., 2013): (1) Ein fehlgefaltetes Protein wird entweder von einem DnaJ-Kochaperon erkannt und auf die SBD eines DnaK-Proteins im ATP-gebundenen Zustand übertragen oder direkt von DnaK gebunden. (2) Durch Interaktion von DnaJ mit der NBD von DnaK kommt es zur Steigerung der ATP-Hydrolyseaktivität und durch die Umsetzung von ATP zu ADP zu einer Konformationsänderung in der SBD und Lid-Domäne, welche zu einer erhöhten Substrataffinität und zur Ausbildung eines stabilen DnaK-Substrat-Komplexes führt. Währenddessen löst sich DnaJ von diesem Komplex und kann wieder im nächsten Zyklus mitwirken. (3) Die Interaktion von GrpE mit der NBD von DnaK führt zu einer Konformationsänderung, die den Austausch von ADP zu ATP signifikant beschleunigt. In der offenen Konformation von DnaK ist die Affinität der SBD zum Substrat verringert, welches daraufhin freigegeben wird. (4) Das freigegebene Protein kann entweder selbst in die native Konformation falten oder wird erneut in den Chaperon-Zyklus eingeschleust. (5) Das DnaK-Protein liegt nach der Ablösung von GrpE wieder in Ausgangszustand vor und der DnaK-Chaperon-Zyklus kann von neuem beginnen.

Im ATP-gebundenen Zustand liegt das Protein in einer offenen Konformation vor, bei der nur eine geringe Affinität zum Substrat vorhanden ist (Abb. 8 A) (Qi et al., 2013; Schmid et al., 1994). Der direkte Kontakt zwischen NBD und SBD führt zu weitreichenden Konformationsänderungen in der SBD, die zu einer Veränderung der Substrataffinität und somit zu einer Freigabe des Substrats führen (Zuiderweg et al., 2013). Zudem befindet sich die *Lid*-Domäne in räumlicher Distanz zur SBD, wodurch die Bindetasche frei zugänglich wird, was eine Substratfreisetzung und erneute Substratbindung begünstigt (Abb. 8 A) (Mayer, 2013). Durch Hydrolyse von ATP zu ADP geht DnaK in die geschlossene Konformation über, bei der Substrate mit hoher Affinität gebunden werden (Abb. 8 B) (Bertelsen et al., 2009; Qi et al., 2013). Die *Lid*-Domäne bewegt sich dabei über die Substratbindetasche und trägt zur Bindung und Interaktion mit dem Substrat bei (Schlecht et al., 2011). Bei der Signaltransduktion zwischen den Domänen spielt die konservierte, überwiegend hydrophobe Linkersequenz (³⁸⁹VLLLD³⁹³) zwischen NBD und SBD eine entscheidende Rolle (Han & Christen, 2001; Vogel et al., 2006).

Durch spezifische Wechselwirkung mit Hsp70-Proteinen können die Kochaperone Hsp40 (DnaJ) und Nukleotidaustauschfaktor (GrpE) die Hydrolyse- und Austauschrate von ATP signifikant erhöhen und dadurch die Chaperonaktivität maßgeblich regulieren (Brehmer et al., 2004; Liberek et al., 1991). Der Funktionsmechanismus eines DnaK-Proteins beschreibt einen Zyklus, bei dem das Substrat ATP- und Kofaktorabhängig wiederholt gebunden und freigesetzt werden kann und der als DnaK-Chaperonzyklus bezeichnet wird (Abb. 8 C). Auf diese Weise können DnaK-Proteine als Holdasen die Konzentration von freiem Substrat reduzieren und seine Aggregation verhindern oder als Foldasen seine native Faltung unterstützen (Genevaux et al., 2007; Mayer & Bukau, 2005). Neben Hsp70-Proteinen sind auch Hsp40-Kochaperone dazu befähigt, denaturierte Proteine zu erkennen, die sie anschließend auf die SBD eines DnaK-Chaperons im offenen ATP-gebundenen Zustand übertragen (Abb. 8 A und C) (Craig et al., 2006). Durch Interaktion der J-Domäne des DnaJ-Proteins mit der NBD des DnaK-Proteins kann die ATP-Hydrolyse um mehr als das 1000-fache gesteigert werden (Laufen et al., 1999). Die Umsetzung von ATP zu ADP bewirkt eine Konformationsänderung in der SBD und *Lid*-Domäne, die zu einer gesteigerten Substrataffinität und zur Ausbildung eines stabilen DnaK-Substrat-Komplexes führt (Abb. 8 B und C). Währenddessen löst sich das DnaJ-Protein vom Komplex und kann in einem neuen Zyklus erneut mit DnaK interagieren. Die Interaktion von GrpE mit der NBD von DnaK verursacht eine Konformationsänderung, die eine Dissoziation von ADP erleichtert und dadurch den Nukleotidaustausch erheblich steigert (Brehmer et al., 2004; Packschies et al., 1997). Vermittelt durch den Austausch von ADP zu ATP und dem damit verbundenen Wechsel zur offenen Konformation (Abb. 8 A), verringert sich die Affinität der SBD zum Substrat, welches daraufhin freigegeben wird (Abb. 8 C). Zusätzlich kann der N-Terminus

des GrpE-Proteins als Pseudosubstrat mit dem bereits gebundenen Substrat konkurrieren und seine Loslösung erleichtern (Brehmer et al., 2004; Moro et al., 2007). Das freie Substrat kann nun selbst in seine native Konformation falten oder erneut in den Chaperonzyklus eingeschleust werden (Abb. 8 C). Nach der Dissoziation des Ko-chaperons liegt DnaK wieder in seinem Ausgangszustand vor und ein Zyklus kann von neuem beginnen (Abb. 8 C).

Allerdings scheint die Funktion des DnaK-Proteins für die Proteinfaltung in *E. coli* nicht essentiell zu sein, da eine Deletion des Genlokus ohne Beeinträchtigung der Zellviabilität möglich ist (Deuerling & Bukau, 2004; Teter et al., 1999). Dies gilt nicht für Temperaturen über 37 °C bzw. unter 25 °C, was die Bedeutung von DnaK als kanonisches Hitzeschockprotein in *E. coli* hervorhebt (Deuerling & Bukau, 2004).

1.3.1.2 Hsp70-Proteine in *Synechocystis* sp.

Im Genom des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. sind vier homologe Hsp70-Proteine kodiert, unter denen für DnaK1, 2 und 3 eine Proteinexpression nachgewiesen wurde (Rupprecht et al., 2007b). Dagegen ist für DnaK4 (Slr0086) bisher nur eine Transkription dokumentiert und das DnaK-Homolog bleibt bis heute weitestgehend uncharakterisiert (Mary et al., 2004; Trautmann et al., 2013; Wang et al., 2012).

In *Synechocystis* sp. kann *dnaK1* vollständig deletiert werden, was für *dnaK2* und *dnaK3* nicht möglich ist, da diese essentiell sind (Rupprecht et al., 2007b). Wie für Hsp70-Proteine typisch, weisen die Homologen DnaK1, 2, und 3 eine starke Konservierung in ihren N-terminalen Sequenzbereichen auf und unterscheiden sich hauptsächlich im Bereich des variablen C-Terminus` (Abb. 9) (Rupprecht et al., 2007b).

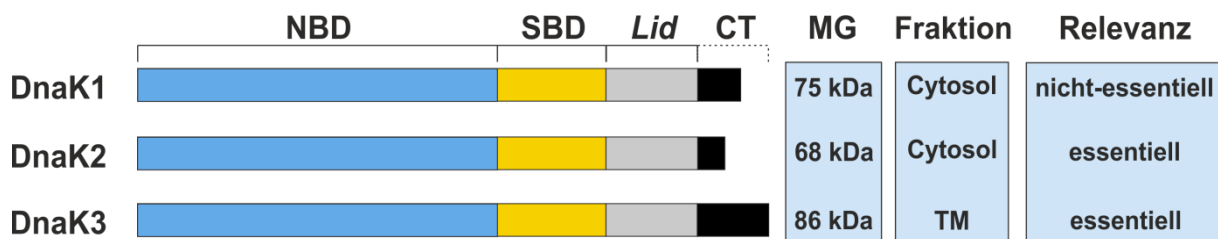


Abb. 9 Die homologen Proteine DnaK1, 2 und 3 aus *Synechocystis* sp.

Schematischer Domänenaufbau der Proteine DnaK1, 2, und 3 aus *Synechocystis* sp. mit Nukleotidbindedomäne (NBD), Substratbindedomäne (SBD), *Lid*-Domäne (*Lid*) und C-Terminus (CT). Daneben sind die Molekulargewichte (MG) in Kilodalton (kDa), die Zellfraktion der Proteine und die Deletierbarkeit angegeben. Thylakoidmembran (TM).

Im Vergleich zu den cytosolischen Proteinen DnaK1 und 2 besitzt das DnaK3-Protein eine stark verlängerte C-terminale Sequenz, die seine Bindung an die Thylakoidmembran vermittelt (Abb. 9) (Rupprecht et al., 2007b). Am distalen Ende des C-Terminus` liegt ein

konserviertes, tryptophan- und aspartatreiches Motiv, das für die noch unbekannte DnaK3-Funktion essentiell ist (Rupprecht et al., 2010). Wegen seiner Assoziation an Thylakoidmembranen und seiner Abwesenheit im thylakoidlosen Cyanobakterium *Gloeobacter violaceus* wurde das DnaK3-Protein in den letzten Jahren in Verbindung mit der Thylakoidmembranbiogenese gebracht (Nimura et al., 1996; Rupprecht et al., 2010; Schneider, 2014).

Für DnaK2 konnte eine erhöhte Expression unter diversen Stressbedingungen nachgewiesen werden (Fulda et al., 2006; Mary et al., 2004; Rupprecht et al., 2010). Dagegen zeigte die Expression von DnaK1 und DnaK3 keine bedeutungsvolle Änderung unter den getesteten Bedingungen (Rupprecht et al., 2010; Rupprecht et al., 2007a). Bei dem Vergleich der zellulären Konzentrationen der DnaK-Proteine unter Standard-Laborbedingungen konnte ein DnaK1:DnaK2:DnaK3-Verhältnis von 1:5,5:1,2 bestimmt und somit DnaK2 als das häufigste DnaK-Protein in *Synechocystis* sp. identifiziert werden (Rupprecht et al., 2010). Vergleichbar mit dem DnaK-Protein aus *E. coli* nimmt DnaK2 die Rolle des kanonischen Hitzeschockproteins in *Synechocystis* sp. ein (Rupprecht et al., 2010).

Wie für das *E. coli*-DnaK beschrieben, verfügen auch DnaK1, 2 und 3 aus *Synechocystis* sp. über die Bindemotive für eine Wechselwirkung mit GrpE. Dementsprechend konnte eine Interaktion mit dem Nukleotidaustauschfaktor experimentell nachgewiesen werden (Brehmer et al., 2004; Rupprecht et al., 2010). Im Genom von *Synechocystis* sp. sind sieben DnaJ-Proteine kodiert, die potentiell mit den homologen DnaK-Proteinen interagieren und ihre Chaperonaktivität sowie -spezifität beeinflussen können, was zu einer möglichen Verbreiterung des Wirkungsspektrums der DnaK-Chaperone führt (Düppre et al., 2011).

Während DnaK2 als kanonisches Hitzeschockprotein beschrieben werden konnte, bleibt die spezifische Funktion der einzelnen DnaK-Proteine in *Synechocystis* sp. jedoch bis heute weitestgehend ungeklärt.

1.3.2 Die Interaktion von DnaK und *Trigger Factor* mit neu synthetisierten Polypeptiden

Der Großteil neusynthetisierter Proteine benötigt bei der Faltung in ihre native funktionelle Struktur die Unterstützung molekularer Chaperone (Hartl et al., 2011). Die initialen Faltungsschritte werden dabei von ribosomassoziierten Chaperonen eingeleitet, die das naszierende Polypeptid gleichzeitig vor Aggregation und Fehlfaltung schützen. *Trigger Factor* (TF) stellt das einzig bekannte ribosomassoziierte Chaperon in Prokaryoten dar, wobei TF aus *E. coli* am besten untersucht ist (Hoffmann et al., 2010). Bei TF aus *E. coli* handelt es sich um ein konstitutiv exprimiertes cytosolisches Protein, das die molare

Konzentration der Ribosomen etwa zwei- bis dreifach übersteigt (Crooke et al., 1988). Durch Wechselwirkung mit der ribosomalen Untereinheit L23 kann es in einer 1:1 Stöchiometrie transient an Ribosomen binden und an der ribosomalen Austrittsstelle als erstes Chaperon mit naszierenden Polypeptiden interagieren (Abb. 10) (Ferbitz et al., 2004; Hesterkamp et al., 1997; Kramer et al., 2002; Lill et al., 1988).

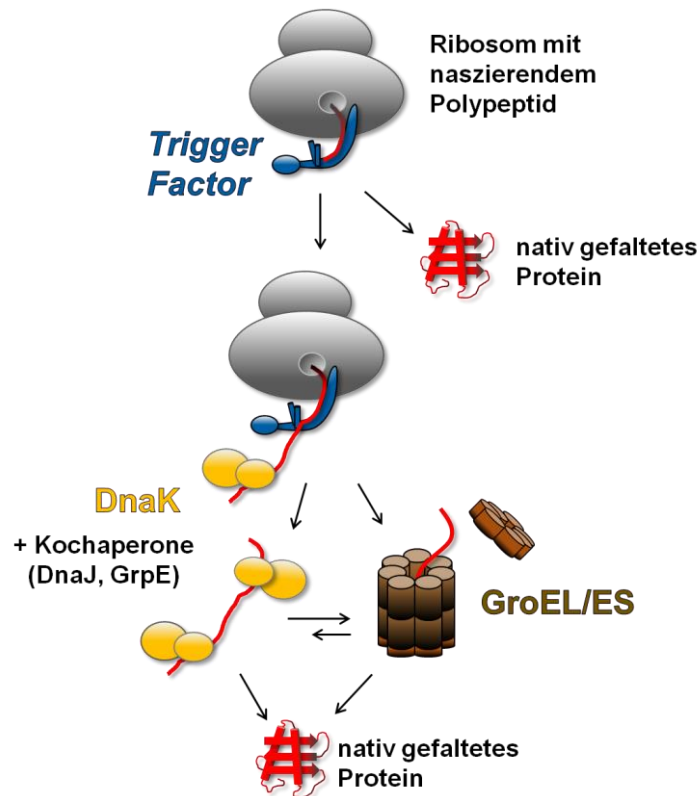


Abb. 10 Schematische Darstellung der Faltung eines neusynthetisierten Polypeptids.

Der ribosomassoziierte *Trigger Factor* interagiert mit naszierenden Polypeptiden, unterstützt deren Faltung und schützt sie vor Aggregation. Danach kann das neusynthetisierte Protein entweder spontan in seine native Konformation falten oder benötigt die Hilfe von ATP-abhängigen Chaperonsystemen, wie DnaK mit DnaJ und GrpE oder GroEL/ES (Deuerling & Bukau, 2004).

TF aus *E. coli* (~48 kDa) ist aus drei Domänen aufgebaut (Abb. 11). Die N-terminale Domäne trägt ein Bindemotiv (GFRxGxxP), das die Bindung an die ribosomale Untereinheit L23 vermittelt (Kramer et al., 2002). Der mittlere Abschnitt des Proteins besitzt eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase)-Aktivität, die für die Chaperonfunktion von TF jedoch nicht essentiell ist (Kramer et al., 2004; Merz et al., 2006). Die N-terminale Domäne bildet zusammen mit der C-terminalen Domäne eine Kavität, deren innere Oberfläche aus hydrophilen und hydrophoben Resten besteht und in ihrer Gesamtheit der Substratwechselwirkung dient (Abb. 11) (Ferbitz et al., 2004; Lakshmiathy et al., 2007; Martinez-Hackert & Hendrickson, 2009; Merz et al., 2008). Bei der Interaktion mit dem Substrat sind hydrophobe Bereiche und ein Bindemotiv, das reich an basischen und

aromatischen Resten ist, von Bedeutung, welches in ungefalteten Proteinen durchschnittlich alle 32 Reste auftritt (Hesterkamp et al., 1997; Kaiser et al., 2006; Patzelt et al., 2001).

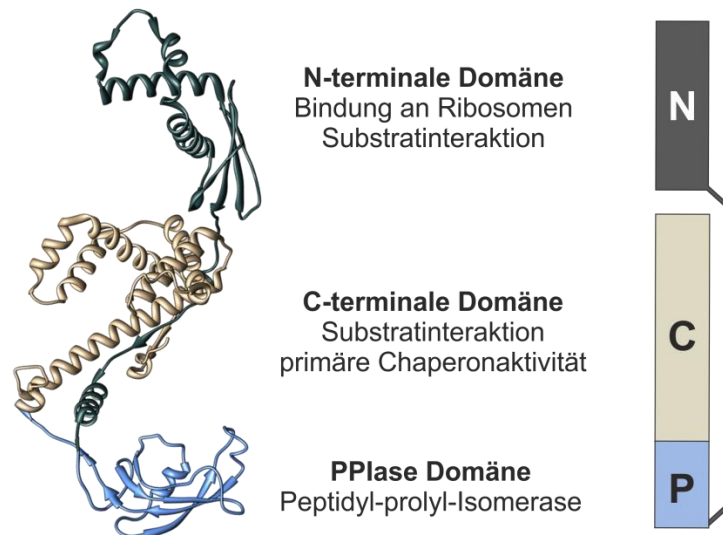


Abb. 11 Domänenstruktur des Trigger Factors aus *E. coli*.

Die drei Domänen der Kristallstruktur von *Trigger Factor* aus *E. coli* (PDB 1W26; (Ferbitz et al., 2004)) wurden mit Hilfe des Programms *Chimera* farbiger dargestellt (siehe 2.2.4.20). Daneben ist der Aufbau aus N-terminaler Domäne (N), PPIase Domäne (P) und C-terminaler Domäne (C) schematisch gezeigt.

TF unterstützt durch die Wechselwirkung mit dem naszierenden Polypeptid ATP-unabhängig dessen korrekte Faltung und schützt es vor Aggregation (Mashaghi et al., 2013). Allerdings ist das Chaperon in *E. coli* nicht essentiell und eine Deletion des Genlokus führte zu keiner detektierbaren Proteinaggregation oder Beeinträchtigung der Zellviabilität (Deuerling et al., 1999; Teter et al., 1999). Stattdessen konnte die Abwesenheit von TF durch verstärkte Interaktion von DnaK mit naszierenden Ketten kompensiert werden (Deuerling et al., 1999; Teter et al., 1999). Eine kombinierte Deletion der Gene *tig* (*trigger factor*) und *dnaK* in *E. coli* führte zu einer synthetischen Lethalität, was für eine kooperative Funktion beider Chaperone spricht (Deuerling et al., 1999; Teter et al., 1999). Die herausragende Bedeutung von DnaK und TF für die Faltung neusynthetisierter Polypeptide wurde anhand einer Depletion von *tig* im *E. coli*-Stamm $\Delta dnaK$ nachgewiesen, die eine massive Aggregation von Proteinen in der Zelle zur Folge hatte (Deuerling et al., 1999; Genevoux et al., 2004; Teter et al., 1999). Dabei zeigte sich vor allem die Faltung von Proteinen mit Multidomänenstruktur und einer molekularen Größe über 60 kDa abhängig von DnaK und TF (Deuerling et al., 2003). Kleine cytosolische Proteine können wahrscheinlich direkt nach der Interaktion mit TF und ohne Hilfe von ATP-abhängigen Chaperonen spontan in ihre native Form falten (Abb. 10). Dagegen kann die korrekte Faltung größerer Proteine durch die ATP-abhängigen DnaK (Hsp70)- und GroEL/ES (Hsp60)-Chaperonsysteme ko- bzw. posttranslational unterstützt

werden (Abb. 10) (Deuerling & Bukau, 2004; Hartl et al., 2011). Es wird angenommen, dass DnaK zusammen mit seinen Kochaperonen DnaJ und GrpE mit ungefähr 9-18 % der neusynthetisierten Polypeptide interagieren, die eine größere Bandbreite an Molekulargewichten aufweisen als die Substrate des GroEL/ES-Systems (Deuerling et al., 1999; Teter et al., 1999).

1.4 Ziele dieser Arbeit

Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 betreibt mit Hilfe spezieller Proteinkomplexe in den internen Thylakoidmembranen oxygene Photosynthese und dient als Modellorganismus zur Untersuchung photosynthetischer Prozesse. Die Bakterienzelle ist befähigt das Thylakoidmembransystem den äußeren Bedingungen anzupassen, wobei es im Dunkeln unter *light-activated heterotrophic growth*-Bedingungen umfassend reduziert und im Licht wieder vollständig aufgebaut wird. Im Genom von *Synechocystis* sp. sind vier homologe Hsp70-Proteine kodiert. Mit Ausnahme von DnaK2, das als kanonisches Hitzeschockprotein beschrieben wurde, konnte bisher keinem DnaK-Protein eine genauere Funktion zugeordnet werden. In dieser Arbeit sollten die homologen DnaK-Proteine genauer untersucht werden, um neue Erkenntnisse über die Funktion der einzelnen Mitglieder der Hsp70-Familie aus *Synechocystis* sp., insbesondere ihre physiologische Bedeutung bei der Photosynthese und Thylakoidmembranbiogenese, zu gewinnen.

Für ein besseres Verständnis der Dunkeladaptation mit den ausgeprägten physiologischen und morphologischen Veränderungen, wie der Reduzierung des Thylakoidmembransystems, sollte eine Analyse des Proteoms und Lipidoms von *Synechocystis* sp.-Zellen nach Zucht unter *light-activated heterotrophic growth*-Bedingungen durchgeführt werden. Dabei sollte das Hauptaugenmerk auf Veränderungen bei Membranproteinen und den homologen Hsp70-Chaperonen gelegt werden.

In *E. coli* wurde eine kooperative Funktion von DnaK und dem ribosomassoziierten Chaperon *Trigger Factor* bei der Faltung neusynthetisierter Proteine aufgedeckt. Eine Einzeldelation von *tig* (*trigger factor*) und *dnaK* verursachte keine physiologischen Defekte, eine Doppeldelation führte zu einer synthetischen Lethalität. Anhand der Durchführbarkeit einer Einzel- bzw. Doppeldelation von *tig* und dem nichtessentiellen *dnaK1* sowie einer Analyse der Auswirkung der jeweiligen Delation auf die Expression der anderen DnaK-Proteine, sollte in dieser Arbeit die Rolle der homologen Hsp70-Proteine zusammen mit *Trigger Factor* bei der Proteinfaltung in *Synechocystis* sp. untersucht werden. Während *dnaK1* in den multiplen Genomkopien des Cyanobakteriums vollständig deletiert werden kann, ist nur eine teilweise Delation von *dnaK2* sowie *dnaK3* und somit lediglich eine Depletion der essentiellen Gene zu erreichen. In dieser Arbeit sollten die *Synechocystis* sp.-Mutationsstämme $\Delta dnaK1$, $\Delta dnaK2$, $\Delta dnaK3$, Δtig , $\Delta dnaK1\Delta tig$, unter anderem anhand der Untersuchung des Wachstumsverhaltens, phenotypisch charakterisiert werden. Dabei sollte eine umfassende Charakterisierung von $\Delta dnaK3$ hinsichtlich photosynthetischer Prozesse erfolgen, um die putative Beteiligung des DnaK3-Proteins an der Thylakoidmembranbiogenese experimentell zu verifizieren.

Die homologen Hsp70-Proteine DnaK1, 2 und 3 weisen eine starke Konservierung in ihren N-terminalen Sequenzen auf und unterscheiden sich primär durch den variablen

C-Terminus. Somit könnte die DnaK-spezifische Funktion von den C-terminalen Proteinsequenzen abhängig sein. Mit einer Neu-Kombination der C-terminalen DnaK-Domänen sollte anhand der chimären DnaK-Proteine in *Synechocystis* untersucht werden, ob es möglich ist die DnaK-spezifische Funktion mit zu übertragen. Über das vierte homologe Hsp70-Protein Slr0086 ist bisher wenig bekannt. Mit Hilfe von Softwareprogrammen wie *ClustalW2*, *RaptorX* und *Chimera* sollte die Primär- und Tertiärstruktur des Proteins vorhergesagt und mit den anderen DnaK-Proteinen in *Synechocystis* sp. bzw. mit *E. coli*-DnaK verglichen werden. Des Weiteren sollten die vier homologen Hsp70-Proteine heterolog in *E. coli* exprimiert und anschließend über verschiedene Proteinreinigungsmethoden ein hoher Reinheitsgrad erreicht werden, um die Proteine eingehend charakterisieren zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte und Zubehör

Die wichtigsten in der vorliegenden Arbeit verwendeten Laborgeräte sind in Tab. 1 in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

Tab. 1 Liste relevanter Laborgeräte.

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Agarosegele-Dokumentationssystem	Quantum	PeqLab, Erlangen
Blotapparat	Trans-Blot [®] wet electroblotting system	Bio-Rad, München
Brutschrank für <i>E. coli</i>	Brutschrank B28	Binder, Tuttlingen
Brutschrank für <i>Synechocystis</i> sp.	Economic Delux, ECD01E	Snijders Scientific, Tilburg, Niederlande
CD-Spektropolarimeter	Jasco J-810	Jasco, Easton, USA
Chemilumineszenz-Dokumentationssystem	Stella	Raytest, Straubenhardt
Elektrophoresekammern	Mini-Protean [®] 3 Cell Mini-Protean [®] Tetra Cell PerfectBlue Gelsystem Mini S, M, L	Bio-Rad, München Bio-Rad, München PeqLab, Erlangen
Elektrophorese-Netzgeräte	PowerPac Basic [™] peqPower 300 Volt	Bio-Rad, München Peqlab, Erlangen
FPLC-System	ÄKTApurifier [™] 10	GE Healthcare, München
Fluorimeter	Series 2 fluorimeter	Aminco Bowman
Inkubationsschüttler	Multitron HT	Infors, Bottmingen, Schweiz
Mikroskop	Leica DM IL LED	Leica, Wetzlar
PAM Messsystem	Dual-PAM-100	Walz GmbH, Effeltrich
Photometer	Lambda 35 UV/VIS Spektrometer	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Sauerstoffsonde	<i>fiber-optic oxygen meter</i>	PreSens, Regensburg

Thermocycler	Thermocycler Primus 25	Peqlab, Erlangen
Zellhomogenisator Glasperlen	SpeedMill PLUS, 220 V	Analytik Jena, Jena
Zellhomogenisator Ultraschall	Branson Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
Zentrifugen	Allegra [®] X-15R Centrifuge Avanti [®] J-26 XP Optima [™] L Series Ultrazentrifuge Optima [™] MAX-XP Ultrazentrifuge 5415R	Beckmann Coulter, Krefeld Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tab. 2 aufgelistet. Weitere Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Bio-Rad (München), Braun (Melsungen), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht) und VWR (Darmstadt) bezogen.

Tab. 2 Liste verwendeter Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Blotting-Papier	Protean [®] XL Size	Bio-Rad, München
Glasperlen	Glasperlen 0,25 - 0,5 mm	Roth, Karlsruhe
Größenstandard DNA	Gene Ruler [™] 1 kb Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA
Größenstandard Protein	Page Ruler [™] Unstained Protein Ladder (10 – 200 kDa) Page Ruler [™] Prestained Protein Ladder (10 – 170 kDa)	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA
Kit für DNA-Extraktion aus Agarosegelen	Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit	Avegene, Taiwan
Kit für Plasmidpräparation	High-Speed Plasmid Mini kit	Avegene, Taiwan
Kit für TA-Cloning	pSTBlue-1 AccepTor [™] Vector	Novagen, Darmstadt
PVDF-Membran	Roti [®] -PVDF	Roth, Karlsruhe
Säulenmaterial FPLC	Q-Sepharose High Performance	GE Healthcare, München
Western-Blot Entwicklerlösung	Pierce [®] ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA

2.1.3 Bakterienstämme

In Tab. 3 sind Bakterienstämme aufgelistet, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden. Die *E. coli* Stämme DH5 α bzw. NovaBlue Single™ wurden für Standard-Klonierungen angewendet, die Stämme HMS174 (DE3) pLysS, Rosetta-gami pLysS und BL21 (DE3) pLysE für heterologe Genexpressionen.

Tab. 3 Liste verwendeter Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>rk⁻, mk⁺</i>) Rif ^R <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻</i>	(Hanahan, 1983)
BL21 (DE3) pLysE	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (<i>rB⁻ mB⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysE (Cam ^R)	Novagen, Darmstadt
HMS174 (DE3) pLysS	F ⁻ <i>recA1 hsdR</i> (<i>rK12⁻ mK12⁺</i>) (DE3) pLysS (Cam ^R , Rif ^R)	(Studier & Moffatt, 1986)
NovaBlue Single™	<i>endA1 hsdR17</i> (<i>rK12⁻ mK12⁺</i>) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lacF</i> [<i>proA⁺B⁺ lacI^f Z</i> Δ M15::Tn10](TetR)	Novagen, Darmstadt
Rosetta-gami pLysS	Δ (<i>ara-leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL</i> (DE3) F ⁻ [<i>lac⁺ lacI^q pro</i>] <i>gor522::Tn10 trxB</i> pLysS pRARE ² (Cam ^R , Kan ^R , Str ^R , Tet ^R)	Novagen, Darmstadt
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803		
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Wildtyp	“The Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria (PCC)”
<i>Synechocystis</i> Kan ^R	Wildtyp mit Kan ^R an neutraler Stelle <i>slr0168::Kan^R</i>	diese Arbeit
Δ <i>dnaK1</i>	Δ <i>slI0058::Kan^R</i>	(Rupprecht et al., 2007b)
Δ <i>dnaK2</i>	Δ <i>slI0170::Kan^R</i>	(Rupprecht et al., 2007b)
Δ <i>dnaK3</i>	Δ <i>slI1932::Kan^R</i>	(Rupprecht et al., 2007b)
Δ <i>tig</i>	Δ <i>slI0533::Cam^R</i>	(Rupprecht, 2007)
Δ <i>dnaK1</i> Δ <i>tig</i>	Δ <i>slI0058::Kan^R slI0533::Cam^R</i>	diese Arbeit

2.1.4 Plasmide

In dieser Arbeit verwendete Plasmide sind in Tab. 4 aufgelistet.

Tab. 4 Liste verwendeter Plasmide.

Stamm	Resistenz	Beschreibung	Referenz
Expressionsplasmide			
pILA	Amp ^R , Kan ^R	luxAB, RS1 und RS2 zur homologen Rekombination in <i>Synechocysis</i> sp.	(Kunert et al., 2000)
pRSET6aNT-HisMCS	Amp ^R	pRSET6a mit „ <i>Multiple Cloning Site</i> “, His-Tag (NT)	(Prodöhl et al., 2007)
pET19b	Amp ^R	T7-Promotor, His-Tag (NT)	Novagen, Darmstadt
pET19b- <i>dnaK1</i>	Amp ^R	<i>sll0058</i> über NdeI und HindIII	(Rupprecht, 2007)
pET19b- <i>dnaK2</i>	Amp ^R	<i>sll0170</i> über NdeI und HindIII	(Rupprecht, 2007)
pET19b- <i>dnaK3</i>	Amp ^R	<i>sll1932</i> über NdeI und HindIII	(Rupprecht, 2007)
pRSET6a- <i>dnaK4</i>	Amp ^R	<i>slr0086</i> über NdeI und HindIII	diese Arbeit
pRSET6a-SynTF	Amp ^R	<i>sll0533</i> über NdeI und blunt	(Rupprecht, 2007)
Plasmide zur Disruption der DnaK Gene bzw. des Trigger Factor Gens			
pACYC184	Cam ^R , Tc ^R	verwendet zur Amplifikation der Resistenzkassette Cam ^R	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
pBADDnaK1	Amp ^R	<i>sll0058</i> über NdeI und HindIII in pBAD24 (Guzman et al., 1995)	(Rupprecht et al., 2007b)
pBADDnaK2	Amp ^R	<i>sll0170</i> über NdeI und BamHI in pBAD24 (Guzman et al., 1995)	(Rupprecht et al., 2007b)
pBADDnaK3	Amp ^R	<i>sll0170</i> über NdeI und HindIII in pBAD24 (Guzman et al., 1995)	(Rupprecht et al., 2007b)
pRSETDnaK1KmR	Amp ^R , Kan ^R	Δ <i>sll0058</i> ::Kan ^R (Resistenzkassette über SmaI Schnittstelle in <i>dnaK1</i> eingeführt)	(Rupprecht et al., 2007b)
pRSETDnaK3KmR	Amp ^R , Kan ^R	<i>sll1932</i> ::Kan ^R (Resistenzkassette über HincII Schnittstelle in <i>dnaK3</i> eingeführt)	(Rupprecht et al., 2007b)

pRSETdnaK1CmR	Amp ^R , Cam ^R	Δ sII0058::Cam ^R (Resistenzkassette über SmaI Schnittstellen in <i>dnaK1</i> eingeführt)	diese Arbeit
pRSETdnaK2CmR	Amp ^R , Cam ^R	Δ sII0170::Cam ^R (Resistenzkassette über SmaI und Accl Schnittstellen in <i>dnaK2</i> eingeführt)	diese Arbeit
pRSETdnaK3CmR	Amp ^R , Cam ^R	Δ sII1932::Cam ^R (Resistenzkassette über HincII und EagI Schnittstelle in <i>dnaK3</i> eingeführt)	diese Arbeit
pCR2.1SynTFcmR	Amp ^R , Cam ^R	Δ sII0533::Cam ^R (Resistenzkassette über HincII und BstEII Schnittstelle in <i>tig</i> eingeführt)	(Rupprecht, 2007)
Plasmide zur Neukombination der N- und C-terminalen Domänen der DnaK Proteine			
pILA-NT1CT2	Amp ^R , Kan ^R	N-Terminus (NT) DnaK1 C-Terminus (CT) DnaK2	diese Arbeit
pILA-NT1CT3	Amp ^R , Kan ^R	NT DnaK1 CT DnaK3	diese Arbeit
pILA-NT2CT1	Amp ^R , Kan ^R	NT DnaK2 CT DnaK1	diese Arbeit
pILA-NT2CT3	Amp ^R , Kan ^R	NT DnaK2 CT DnaK3	diese Arbeit
pILA-NT3CT1	Amp ^R , Kan ^R	NT DnaK3 CT DnaK1	diese Arbeit
pILA-NT3CT2	Amp ^R , Kan ^R	NT DnaK3 CT DnaK2	diese Arbeit
Plasmide für TA-Klonierungen			
pSTBlue-1 AccepTor™	Amp ^R , Kan ^R	lineares Plasmid mit 3'-U-Überhängen, mögliche Blau-Weiß-Selektion	Novagen, Darmstadt
pGEM®-T Easy	Amp ^R	lineares Plasmid mit 3'-T-Überhängen, mögliche Blau-Weiß-Selektion	Promega, Mannheim

2.1.5 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide wurden bei der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert (Tab. 5).

Tab. 5 Liste verwendeter Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz 5'→ 3'	Beschreibung
Amplifikation <i>dnaK4</i> (<i>slr0086</i>)		
NTslr0086	GCATCCATATGCCCTACGCCATTGATTTTG	Schnittstellen PstI/HindIII
CTslr0086	CGTAGAAGCTTCTAACGCAACTGGGCTACCAC	
Neukombination der N- und C-terminalen Domänen der DnaK Proteine		
5'dnak1prom	ATAGCCTGCAGCCTAAATACCATGAGGCGATGC	Amplifikation der N-terminalen DnaK Domänen
5'dnak2prom	ATAGCCTGCAGCCTATCAAGTTAACCCCAAG	
5'dnak3prom	TATGCCTGCAGCCTTTGTCACCAGTGGTTTGC	
CTdnak1NT-Nar1	TAATGGCGCCGGAGGAATCCCCGCCAGTAAG	
CTdnak2NT-Nar1	TATGGCGCCGGGGGATACCATCTAAGCG	
CTdnak3NT-Nar1	TATGGCGCCGGCGGAATACCGCTCAG	
NTdnak1CT-Nar1	ATAGGCGCCCCGGGGGATGCCCC	Amplifikation der C-terminalen DnaK Domänen
NTdnak2CT-Nar1	ATAGGCGCCCCGGGGCGTACCTCAA	
NTdnak3CT-Nar1	ATAGGCGCCCAGGGGAGTGCCCCAG	
3'dnak1-HindIII	CCGCGAAGCTTCTAATCGATCGCTTCATAGTC	
3'dnak2-HindIII	CGCGGAAGCTTCTATTTCTCCGGCTCAGAGAA	
dnaK3Sac1rev	TGGTGATGGAGCTCTTAGAACCAATCATCATCGTC	
Disruption der DnaK Gene		
NTdnaK1	ATAGCCATATGGGCAAAGTCATTGGCATT	Amplifikation der <i>dnaK</i> Sequenzen
CTdnaK1	TATCGGGATCCCTAATCGATCGCTTCATAGTCAC	
NTdnaK2	TATGCCATATGGGAAAAGTTGTTGGGATT	
CTdnaK2	ATACGGGATCCCTATTTCTCCGGCTCAGAG	
NTdnaK3	ATTGCCATATGGGAAAAGTCGTCGGAATTG	
CTdnaK3	TAGCAAGCTTTTAATGATGATGGTGATGATGGTGATG GAACCAATCATCATCGTCATCATC	
NTCmR	CACTTTGCGCCGAATAAATACC	Amplifikation Cam ^R aus Plasmid pACYC184
CTCmR	TTACGCCCCCGCCCTGCC	

Primer zur Kontrolle der Insertion der pLA-Konstrukte in das <i>Synechocystis</i> sp. Genom		
pLAseq	CGGGTGCGCATAGAAATTGC	Primer flankieren die rekombinante Sequenz in pLA
pLA_seq-fusion	CTGACTTGACGGGACGGC	
Primer zur Kontrolle der Segregation in <i>Synechocystis</i> sp.		
NTdnaK1	ATAGCCATATGGGCAAAGTCATTGGCATT	Primer binden intern im jeweiligen DnaK-Gen und flankieren die Sequenz der eingeführten Resistenzkassette
CTdnaK1	TATCGGGATCCCTAATCGATCGCTTCATAGTCAC	
NTdnaK2	TATGCCATATGGGAAAAGTTGTTGGGATT	
CTdnaK2	ATACGGGATCCCTATTTCTCCGGCTCAGAG	
sII1932-seq-intern2	CGATTTTGATCGCCGCATTG	
CTdnak3WD	CTGCCACTAGTACCGTTTTGTAATGGGGCATT	
NTdnaK3check	GTTTTTAGAAGCGGAGAAAGTGG	Primer flankieren die inserierte <i>aphII</i> Sequenz in <i>dnak3</i>
CTdnaK3check	CCTTTGGGTTGGAAACCATTGG	
NTtf	TATGCCATATGAAAGTTACCCAGGAAAAATTGC	Primer flankieren die eingeführte <i>cat</i> Gensequenz in <i>tig</i>
CTtf	ATACGAAGCTTTACTCTTCGTCCGGAGGTTGC	
Primer zur Sequenzierung		
pLAseq	siehe oben	
pLAseq-fusion		
Dnak1seq	CCAGTGGATGGCAGAATCC	
Dnak2seq	GGCCGGTGAATTCCAGAAGG	
Dnak3seq	GCATTGTGGATTGGCTAGCG	
NTdnaK1	siehe oben	
NTdnaK2		
NTdnak3Sac1	GCGATGAGCTCATGGGAAAAGTCGTCCGAAT	
CTdnak3NT-Nar1	TATGGCGCCGGCGGAATACCGCTCAG	
T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	
T7 Terminator	TATGCTAGTTATTGCTCAG	
SP6-24er	CATTTAGGTGACACTATAG	

2.1.6 Antikörper

In Tab. 6 sind die in dieser Arbeit verwendeten primären bzw. sekundären Antikörper aufgelistet.

Tab. 6 Liste verwendeter primärer und sekundärer Antikörper.

Bezeichnung	gerichtet gegen	Eigenschaft	Quelle	eingesetzte Verdünnung
Primäre Antikörper				
anti-DnaK1	DnaK1 (C-Terminus) DFDADETVYSDYEA ID	polyklonal (Kaninchen)	Gramsch, Schwabhausen	1:5000
anti-DnaK2	DnaK2 (C-Terminus) GDDVIDAEFSEPEK	polyklonal (Kaninchen)	Gramsch, Schwabhausen	1:5000
anti-DnaK3	DnaK3 (C-Terminus) GNGRYGERPAQPG RNAP	polyklonal (Kaninchen)	Gramsch, Schwabhausen	1:1000
anti-DnaK3VL	DnaK3 (Volllänge)	polyklonal (Kaninchen)	Gramsch, Schwabhausen	1:2000
anti- <i>Trigger Factor</i>	<i>Trigger Factor</i>	polyklonal (Kaninchen)	Gramsch, Schwabhausen	1:200 (mit Reinigung)
anti-PsaA/B	Kern-Untereinheit PS I	polyklonal (Kaninchen)	M. Rögner, Bochum	1:1000
anti-PsbA	Kern-Untereinheit PS II	polyklonal (Kaninchen)	M. Rögner, Bochum	1:100
Sekundäre Antikörper				
anti-Rabbit IgG HRP	Kaninchen IgG	polyklonal (Ziege)	Sigma-Aldrich (München)	1:10.000

2.1.7 Chemikalien, Lösungen und Enzyme

Die in dieser Arbeit eingesetzten 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 autoklaviert. 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.

2.1.8 Nährmedien

2.1.8.1 LB-Medium

Zur Kultivierung von *E. coli* wurde LB-Medium verwendet (Sambrook & Russell, 2001).

LB-Medium

Trypton	1,0 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	1,0 % (w/v)
[Agar	1,5 % (w/v)]

2.1.8.2 BG11-Medium

Zur Kultivierung von *Synechocystis* sp. wurde BG11-Medium bzw. BG11-Agar nach Rippka *et al.* hergestellt und autoklaviert (Rippka *et al.*, 1979). Bei der Herstellung der BG11-Agarplatten wurden die BG11-Salzlösung und die Agarlösung getrennt autoklaviert und danach zusammengegeben. Nach dem Autoklavieren wurden den Medien bei Bedarf Glukose und entsprechende Antibiotika zugesetzt (Tab. 7). Der verwendete Bacto™ Agar wurde von der Firma BD (New Jersey, USA) bezogen.

2.1.8.3 Antibiotika und Medienzusätze

Nach dem Autoklavieren der Medien wurden bei Bedarf entsprechende Antibiotika oder Medienzusätze zugegeben (Tab. 7). Antibiotika und IPTG wurden sterilfiltriert, Glukose wurde getrennt autoklaviert.

Tab. 7 Liste verwendeter Antibiotika und Medienzusätze.

Substanz	Konzentration der Stammlösung	Lösungsmittel
Ampicillin	100 mg/ml	50 % Ethanol
Chloramphenicol	50 mg/ml	H ₂ O _{deion}
Kanamycin	50 mg/ml	H ₂ O _{deion}
Glukose	1 M	H ₂ O _{deion}
IPTG	1 M	H ₂ O _{deion}

2.2 Methoden

2.2.1 Kulturbedingungen

2.2.1.1 *E. coli*

Bakterienkulturen von *E. coli*-Stämmen wurden bei 37 °C in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten im Inkubationsschüttler mit 220 rpm bzw. im Brutschrank kultiviert.

2.2.1.2 *Synechocystis* sp.

Stämme des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. wurden im BG11-Flüssigmedium in einem Inkubationsschüttler bei 130 rpm oder auf BG11-Agarplatten in einem Brutschrank bei fluoreszierendem kalt-weißem Licht (30 µE) und 30 °C kultiviert. Bei photomixotropher Zucht wurde das Medium mit 5 mM Glukose versetzt.

Für die morphologische und physiologische Charakterisierung des Mutationsstamms $\Delta dnaK3$ erfolgte die Zucht der Mutante und des Wildtyps photomixotroph in speziellen Begasungsflaschen bei einer Lichtintensität von 20 bzw. 120 µE und einer Zufuhr von CO₂ angereicherter Luft (2 %) bei 30 °C. Das Medium der Mutante enthielt außerdem 80 µg/ml Kanamycin. Die Zucht erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen und die Kulturen wurden mindestens zweimal verdünnt.

Bei Wachstum unter *light-activated heterotrophic growth* (LAHG)-Bedingungen wurden dem Medium 60 mM Glukose zugesetzt und die Kulturen in einer speziellen Dunkelkammer auf einem Inkubationsschüttler (120 rpm) mindestens zwei Wochen kultiviert. Jeden Tag wurden die Kulturen obligatorisch für 15 min mit Weißlicht (10 µE) beleuchtet (Anderson & McIntosh, 1991). Die Zellkulturen mussten innerhalb der Kultivierungsdauer mindestens viermal verdünnt werden.

Allgemein erfolgte eine Ernte von *Synechocystis* sp.-Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₇₅₀ von 0,5-1,5.

2.2.2 Zellzahlbestimmung

2.2.2.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD) von Bakterienkulturen wurde an einem UV/VIS-Spektrometer (Perkin Elmer) bei 600 nm für *E. coli* bzw. bei 750 nm für *Synechocystis* sp. gemessen.

2.2.2.2 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl einer Flüssigkultur von *Synechocystis* sp. wurde mittels einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Dabei wurde die Kultur so verdünnt, dass nach Zugabe von 10 µl

Probenvolumen in die Kammer, beim Auszählen nicht mehr als 20 Zellen pro Großquadrat vorhanden waren. Aus fünf ausgezählten Großquadraten wurde der Mittelwert gebildet. Die Gesamtzellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen/ml} = \frac{\text{Mittelwert der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnung}}{\text{ausgezählte Fläche [mm}^2\text{]} \times \text{Kammertiefe [mm]}}$$

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach den Angaben des *High-Speed Plasmid Mini Kits* (Avegene, Taiwan).

2.2.3.2 Isolierung genomischer DNA aus *Synechocystis* sp.

Eine Flüssigkultur von *Synechocystis* sp. wurde nach dem Erreichen einer $OD_{750} \geq 2$ zentrifugiert (5.100 g, 10 min, 4 °C) und das Zellpellet bis zu viermal mit TES-Puffer (5 mM Tris-HCl pH 8,5, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA) gewaschen. Anschließend wurde es in 450 µl Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 50 µl Lysozym (20 mg/ml) 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 50 µl Sarcosyllösung (10 %) und 600 µl Phenol hinzugegeben und der Ansatz bei RT auf einem Taumelschüttler 15 min inkubiert. Die anschließende Zentrifugation (15.900 g, 10 min, 4 °C) führte zu einer Abtrennung der wässrigen Phase, welcher 5 µl RNase (10 µg/ml) zugesetzt wurde. Nach 15-minütiger Inkubation auf einem Taumelschüttler wurden 100 µl NaCl (5 M), 80 µl eines Gemischs aus 10 % CTAB und 0,7 M NaCl, sowie 600 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben. Der anschließende Zentrifugationsschritt (15.900 g, 10 min, 4 °C) führte zur Abtrennung der wässrigen Phase, welcher ein Volumen Isopropanol zugegeben wurde, um die DNA zu fällen. Nach gründlichem Mischen wurde erneut Zentrifugiert (15.900 g, 10 min, 4 °C), das gewonnene DNA-Pellet mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen und nach anschließender Trocknung in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA) resuspendiert.

2.2.3.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration konnte mit der gemessenen UV-Absorption bei 260 nm an einem Spektralphotometer bestimmt werden ($A_{260}=1$ entspricht 50 µg/µl doppelsträngiger DNA). Die Reinheit der präparierten DNA wurde mit dem Quotienten aus A_{260}/A_{280} ermittelt, wobei Werte größer bzw. kleiner 1,8 auf eine RNA- bzw. Protein-Verunreinigung hinweisen.

2.2.3.4 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Allgemein können mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide durch die PCR bestimmte DNA-Fragmente *in vitro* amplifiziert werden. Die Reaktionsansätze wurden nach einem Standardprotokoll erstellt, welches je nach Art der Polymerase (siehe Angabe des Herstellers) und der Template-DNA (plastidäre oder genomische DNA) variiert wurde.

10x Polymerase-Puffer	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 mM (optional, da im Polymerase-Puffer enthalten)
DMSO	3 % (optional)
dNTP-Mix (2 mM)	200 µM
5'-Primer (100 pM)	0,25 µM
3'-Primer (100 pM)	0,25 µM
DNA	100-500 ng
Polymerase	1-2,5 U
H ₂ O steril ad 50 µl	

Für die durchgeführten PCRs wurden die DNA-Polymerasen Phusion- oder Taq-Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) eingesetzt. Das Standard-PCR-Programm wurde je nach Polymerase (siehe Angaben des Herstellers) und Anforderung (DNA-Amplifizierung für eine Klonierung, Segregations-PCR, oder Kontroll-PCR nach einer Klonierung) variiert.

20-30 Zyklen	}	<u>initiale Denaturierung</u>	300 sek	95 °C
		Denaturierung	30 sek	95 °C
		Hybridisierung	60 sek	(entsprechend Primer T _M)
		<u>Elongation</u>	0,5 -1 kb/min	72 °C
		terminale Elongation	600 sek	72 °C

Die eingestellte Hybridisierungstemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur (T_M) der verwendeten Primer und wurde mit dem Programm *OligoCalc* berechnet (Kibbe, 2007). Mittels Agarosegelelektrophorese wurde der Erfolg der PCR überprüft.

Nach Isolierung genomischer DNA aus *Synechocystis* sp. konnte mittels PCR die Vollständigkeit der Integration eines DNA-Fragmentes in die multiplen Genomkopien des Cyanobakteriums analysiert werden. Abhängig von der Größe des DNA-Fragments, welches sich über homologe Rekombination an eine spezifische Stelle im Genom integriert hat, vergrößert oder verkleinert sich der Bereich im Vergleich zur wildtypischen DNA. Mittels

Agarosegel-Elektrophorese konnte dieser Größenunterschied dargestellt und eine Aussage über die Vollständigkeit der Segregation getroffen werden.

2.2.3.5 TA-Klonierungsstrategie

Der Vorteil des Klonierens eines PCR Amplifikats mit Adenin-Überhang am 5'-Ende in einen TA-Vektor pGEM[®]-T Easy bzw. pSTBlue-1 AccepTor[™] mit Thymin- bzw. Uracil-Überhang ist, dass ohne Verwendung von Restriktionsenzymen gearbeitet werden kann. Für die Amplifikation des DNA-Fragments wurde die Phusion-Polymerase verwendet (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), welche zwar keine Adenin-Überhänge anfügt, aber eine Korrekturlesefunktion besitzt. Die Adenin-Überhänge wurden in einer anschließenden Reaktion durch die Taq-Polymerase angefügt. Hierbei wurden 20 µl des PCR-Produkts in einem Reaktionsansatz mit 5 µl dATP (2 mM), 5 µl Polymerasepuffer (10x), 3 µl MgCl₂ (25 mM), 16,8 µl H₂O (nukleasefrei) und 0,2 µl Taq-Polymerase mit einem Gesamtvolumen von 50 µl für 20 min bei 72 °C inkubiert. Es ist zu beachten, dass der Ansatz nicht eingefroren werden darf, da sonst die Überhänge abbrechen können. Die Ligation mit dem TA-Vektor erfolgte wie vom Hersteller beschrieben.

2.2.3.6 Restriktion von DNA

Die eingesetzten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Die Restriktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Erfolg der Restriktion wurde mit einem analytischen Agarosegel überprüft oder das entsprechende DNA-Fragment aus einem präparativen Agarosegel isoliert (siehe 2.2.3.9).

2.2.3.7 Klonierung von DNA-Fragmenten mit *blunt ends*

Um eine Selbstligation zu vermeiden, wurden Vektoren, die nach einem Restriktionsverdau *blunt ends* aufwiesen, dephosphoryliert. Die Reaktion wurde mit der alkalischen Phosphatase CIAP (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben durchgeführt. PCR-Produkte mit *blunt ends* wurden mittels T4-Polynukleotid Kinase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) in einer Reaktion nach Herstellerangaben phosphoryliert.

2.2.3.8 Agarosegel-Elektrophorese

In einer Agarosegel-Elektrophorese können DNA-Fragmente in einem Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die entsprechende Menge Agarose für ein 0,7-1,5 %-iges Gel wurde in TAE-Puffer (0,4 M Tris, 10 mM EDTA, 200 mM Essigsäure) in einer Mikrowelle

gelöst und in eine Gelkammer mit Probenkamm gegossen. Das auspolymerisierte Agarosegel wurde in der Elektrophorese-Kammer mit TAE-Puffer überschichtet und die Proben vor dem Auftragen im Verhältnis 5:1 mit Probenpuffer (50 % Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol) versetzt. Die gelelektrophoretische Trennung erfolgte bei 120-145 V. Die DNA-Banden konnten nach Färben in einem Ethidiumbromid-Wasserbad (1 µg/ml) mittels UV-Licht im Transilluminator (peQLab Biotechnologie GmbH) unter Verwendung der Software *QuantumCap* (peQLab Biotechnologie GmbH) sichtbar gemacht werden.

2.2.3.9 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach der Färbung von Agarosegelen in einem Ethidiumbromid-Wasserbad (1 µg/ml) wurden die entsprechenden DNA-Fragmente mit einem Skalpell auf einem UV-Tisch ausgeschnitten und mit einem Kit für DNA-Extraktion aus Agarosegelen (Avegene, Taiwan) nach Herstellerangaben gereinigt.

2.2.3.10 Ligation von DNA

Für die Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde die T4-Ligase von New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) verwendet und die Ligation nach Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA-Fragmente wurden in einem Insert zu Vektor-Verhältnis von 3:1, 5:1 oder 10:1 eingesetzt und der Ansatz über Nacht bei 16 °C inkubiert. Mit dem Ligationsansatz wurden anschließend chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (siehe 2.2.3.12).

2.2.3.11 Überprüfung von DNA durch Sequenzierung

Die Korrektheit der generierten DNA-Sequenzen wurde mittels Sequenzierung überprüft, welche von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) durchgeführt wurde.

2.2.3.12 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode (Chung et al., 1989). Anschließend wurden die Zellen bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen auf Eis wurden 50 µl der Zelllösung mit der zu transformierenden Plasmid-DNA (100-500 ng) bzw. mit 10 µl des Ligationsansatzes versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Hitzeschock 45 sek bei 42 °C erfolgte eine weitere Inkubation 5 min auf Eis. Zu dem Transformationsansatz wurde dann 1 ml LB-Medium hinzugegeben und etwa eine Stunde aerob bei 37 °C im Inkubationsschüttler inkubiert.

Danach wurde ein Teil des Ansatzes auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und im Brutschrank über Nacht inkubiert.

2.2.3.13 Transformation von *Synechocystis* sp.-Zellen

Der Stamm *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist natürlich kompetent und kann direkt mit der zu transformierenden DNA versetzt werden, welche das Bakterium aus dem umgebenden Medium aufnehmen kann. Zuvor wurden die Zellen bis zu einer OD_{750} von 1-1,5 photomixotroph (in BG11-Medium mit 5 mM Glukose) kultiviert und dann zentrifugiert (4.400 g, 10 min, RT). Das Zellpellet wurde einmal mit BG11-Medium gewaschen und anschließend in BG11-Medium resuspendiert, sodass eine OD_{750} von 2,5 eingestellt war. Davon wurden 400 μ l in ein steriles Reagenzglas überführt und mit etwa 5 μ g Plasmid-DNA und 5 mM Glukose versetzt. Die Ansätze wurden über Nacht im Brutlichtschrank bei 30 °C und 30 μ E inkubiert und anschließend auf BG11-Platten mit 10 μ g/ml des jeweiligen Antibiotikums ausplattiert. Positive Klone wurden nacheinander auf BG11-Platten mit ansteigenden Konzentrationen des Antibiotikums überführt und im Fall einer Segregation, die Vollständigkeit mittels PCR überprüft (siehe 2.2.3.4). Dies wurde über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr durchgeführt.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Zur heterologen Anreicherung verschiedener rekombinanter Proteine wurden die jeweiligen Expressionsplasmide (Tab. 4) in einen geeigneten *E. coli*-Expressionsstamm transformiert (Tab. 3). Nach der Transformation wurden einzelne Klone von der Selektionsplatte zur Inokulation einer Vorkultur mit LB-Medium und entsprechenden Antibiotika verwendet. Nach Inkubation auf dem Schüttelinkubator bei 200 rpm und 37 °C über Nacht, wurde aus der Vorkultur eine Hauptkultur inokuliert, deren OD_{600} auf etwa 0,1 eingestellt wurde. Wenn eine OD_{600} von etwa 1 erreicht war, erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG. Die Expressionsdauer und -bedingung richtete sich nach dem jeweiligen Bakterienstamm und dem zu exprimierenden Protein und betrug 4 h bei 37 °C (DnaK2) bzw. 5-6 h bei 18 °C (DnaK1). Bei der Expression des *Trigger Factor*-Proteins wurde auf eine Induktion mittels IPTG verzichtet und über Nacht bei 37 °C exprimiert. Anschließend wurden die Kulturen geerntet (9.000 g, 10 min, 4 °C) und die Zellpellets bei -20 °C gelagert.

2.2.4.2 Aufschluss und Fraktionierung von *E. coli*-Zellen

Nach dem Auftauen des Zellpellets auf Eis wurde es in Aufschlusspuffer (50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 8, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin) resuspendiert und im Verhältnis 1:1000 mit Protease-Inhibitor-Mix (Sigma-Aldrich, München) und PMSF (0,1 M) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (Branson Sonifier 250) in vier bis fünf Intervallen (4 min, 40 microns) auf Eis. Im Anschluss wurde zentrifugiert (39.000 g, 10 min, 4 °C), um Zellbruchstücke, unaufgeschlossene Zellen und *inclusion bodies* abzutrennen und einen zellfreien Zellextrakt zu erhalten. Eine Fraktionierung in lösliche und membrangebundene Proteine erfolgte durch Ultrazentrifugation (288.000 g, 1 h, 4 °C), mit den löslichen Proteinen im Überstand und den Membranen im Pellet.

2.2.4.3 Aufschluss und Fraktionierung von *Synechocystis* sp.-Zellen

Kulturen von *Synechocystis* sp. mit einer $OD_{750} \leq 2$ wurden zentrifugiert (11.000 x g, 15 min, 4 °C), das Pellet mit Thylakoidpuffer (50 mM HEPES pH 7, 25 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 10 % Glycerin) gewaschen, anschließend in 1-2 ml Puffer resuspendiert und im Verhältnis 1:1000 mit Protease-Inhibitor-Mix (Sigma-Aldrich, München) versetzt. Die Zellsuspension wurde in ein Aufschlussröhrchen mit Schraubdeckel überführt, welches zuvor ein Drittel mit Glasperlen befüllt worden ist. Der Aufschluss erfolgte im Zellhomogenisator *SpeedMill* (Analytik Jena) in vier Intervallen von je 1 min. Zwischen jedem Intervall wurde die Probe auf Eis gekühlt. Nach dem Aufschluss wurde der Zellextrakt zweimal zentrifugiert (1.000 g, 5 min, 4 °C) und dabei der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, um Glasperlen und nicht aufgeschlossene Zellen abzutrennen. Der gewonnene Zellextrakt wurde entweder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert oder mittels Ultrazentrifugation (314.000 g, 1 h, 4 °C) in lösliche Proteine und Membranfraktion getrennt. Das Membranpellet wurde anschließend in Thylakoidpuffer resuspendiert.

2.2.4.4 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie

Die Reinigung heterolog exprimierter Proteine mit Polyhistidin-*tag* erfolgte über eine Ni-NTA-Agarose (Quiagen, Venlo, Niederlande) nach Herstellerangaben. Für die Äquilibration des Säulenmaterials wurde Aufschlusspuffer (50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 8, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin) verwendet. Das an die Säule gebundene Protein wurde optional mit Imidazol bzw. ATP im Puffer mehrmals gewaschen. Die Elution erfolgte mit einer erhöhten Imidazolkonzentration (500 mM) im Puffer.

2.2.4.5 Umpuffern von Proteinen

Für das Entfernen von Salzen oder Imidazol und das Austauschen von Puffern isolierter und gereinigter Proteinlösungen wurden PD-10 Entsalzungssäulen (GE Healthcare) verwendet.

2.2.4.6 Proteinreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie

Für die Anionenaustauschchromatographie an dem FPLC-System *ÄKTApurifier™ 10* (GE Healthcare, München) wurden 5 ml des Säulenmaterials *Q-Sepharose High Performance* (GE Healthcare, München) eingesetzt. Die Elutionsfraktionen der Reinigung wurden mit Hilfe des Fraktionssammlers *Frac-920* aufgefangen. Zur Äquilibrierung und Reinigung wurde Puffer A (20 mM BisTris pH 6,5 10 % Glycerin) eingesetzt, die Elution der Proteine erfolgte durch eine ansteigende Salzkonzentration mittels eines steigenden Gradienten an Puffer B (20 mM BisTris pH 6,5, 10 % Glycerin, 1 M NaCl).

2.2.4.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinlösungen und Zellextrakten wurde mit Hilfe des Bradford Reagenz (Sigma-Aldrich, München) nach Herstellerangaben in 96-well Platten in Dreifachbestimmung gemessen.

2.2.4.8 Bestimmung der Chlorophyllkonzentration

Zur Bestimmung der Chlorophyll-Konzentration ganzer Zellen bzw. von Zellextrakten oder Zellfraktionen des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp., wurden 10 µl der zu bestimmenden Proben mit 990 µl Methanol versetzt und nach gründlichem Mischen 5 min bei RT auf dem Taumelschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze zentrifugiert (15.900 g, 5 min, RT) und die Absorption der Überstände bei 665,2 nm und 652 nm photometrisch bestimmt. Mithilfe dieser Werte konnte die Konzentration von Chlorophyll a errechnet werden (Porra et al., 1989):

$$\text{Chl a} = (16,29 \times A_{665,2}) - (8,54 \times A_{652})$$

2.2.4.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit einer SDS-PAGE werden Proteine nach ihrer molekularen Masse in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die verwendeten Gele setzten sich aus 8-14%-igen Trenngelen und einem 6%-igen Sammelgel zusammen

(Tab. 8). Für das Trenngel wurde Trenngelpuffer (1,5 M Tris pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS) und für das Sammelgel Sammelgelpuffer (0,5 M Tris pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS) verwendet.

Tab. 8 Zusammensetzung der Trenngele und Sammelgele.

	Trenngel			Sammelgel
	8 %	12 %	14 %	6 %
H₂O	5,5 ml	4,5 ml	4 ml	6 ml
Acrylamid 40 %	2 ml	3 ml	3,5 ml	1,5 ml
Trenngel- bzw. Sammelgel-Puffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
APS (10 %)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

Die aufzutragenden Proben wurden 4:1 (Proben aus *E. coli* und Zellfraktionen von *Synechocystis* sp.) bzw. 3:2 (Zellextrakt von *Synechocystis* sp.) mit 5x Probenpuffer (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 500 mM β -Mercaptoethanol, 10 % SDS, 50 % Glycerol, 0,2 % Bromphenolblau) versetzt und anschließend 5 min bei 95 °C (Proben aus *E. coli* und Proteinlösungen allgemein) bzw. 15 min bei 65 °C (Proben aus *Synechocystis* sp.) denaturiert. Die Trennung der Proteine auf den Gelen erfolgte in Lauffpuffer (25 mM Tris, 0,192 M Glycin, 0,1 % SDS) bei einer angelegten Spannung von 200 V, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreichte.

2.2.4.10 Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE

Nach der Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Proteine in den Gelen mit Färbelösung (45 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 0,2 % Coomassie R250) auf einem Taumelschüttler gefärbt und anschließend mit Entfärber (45 % Ethanol, 10 % Essigsäure) wieder teilweise entfärbt bis deutliche Proteinbanden zu sehen waren. Die Gele wurden anschließend eingescannt.

2.2.4.11 Western-Blot und Immunodetektion

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden anschließend in einem *Tank-Blot-System* (Bio-Rad, München) in Blotpuffer (25 mM Tris, 0,192 M Glycin, 20 % Methanol) auf eine PVDF-Membran (Roth, Karlsruhe) 1 h bei 100 V transferiert. Die Membran wurde anschließend 1 h in 4 % Milchpulver in TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v)

Tween) auf einem Taumelschüttler abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die in TBST verdünnte primäre Antikörperlösung auf die Membran gegeben und 1 h bei RT auf dem Taumelschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen jeweils 5 min mit TBST erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (HRP-gekoppelt) für 1 h wiederum mit anschließendem dreimaligem Waschen. Nach Herstellerangaben wurde das Chemilumineszenz-Substrat *Pierce® ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific) auf die Membran gegeben, inkubiert und anschließend die Lumineszenz mit einem Dokumentationssystem (Raytest, Straubenhardt) detektiert.

Zur relativen Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurden die Bandenintensitäten mit Hilfe des Programms *ImageJ* (National Institutes of Health, USA) analysiert.

2.2.4.12 Reinigung des Antikörpers gegen *Trigger Factor*

Das *Trigger Factor*-Protein wurde heterolog mit Polyhistidin-tag exprimiert und anschließend mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Von dem gereinigten Protein wurde mehrfach 1 µl punktuell auf eine Nitrocellulose-Membran (Whatman Protran, Dassel) pipettiert und anschließend dreimal mit TBST jeweils 5 min gewaschen. Nach dem Sättigen der Membran 1 h mit 4 % Milchpulver in TBST wurde erneut dreimalig mit TBST gewaschen. Der primäre Antikörper anti-*Trigger Factor* (Gramsch, Schwabhausen) wurde 1:200 in TBST verdünnt und 2 h mit der Membran auf dem Taumelschüttler bei RT inkubiert. Darauf folgte ein dreimaliger Waschschrift, um unspezifische Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde der an den *Trigger Factor* spezifisch gebundene Antikörper mit 2 ml 100 mM Glycin pH 2,5 unter 20-minütigem Schütteln von der Membran gelöst. Die Antikörperlösung wurde anschließend mit 100 µl 100 mM Tris pH 8 neutralisiert. Der gereinigte Antikörper wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.4.13 ATPase-Test

Mit Hilfe des ATPase-Tests sollte die Aktivität der gereinigten DnaK-Proteine getestet werden. Dabei sind die Reaktionen des zu testenden ATP-umsetzenden Proteins, der Pyruvatkinase (PK) und der Laktatdehydrogenase (LDH) aneinander gekoppelt, sodass die ATP-Hydrolyse durch die Oxidation von NADH photometrisch durch die Abnahme der Absorption bei 340 nm verfolgt werden kann (Abb. 12).

Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert, wobei der PK/LDH-Enzymmix erst unmittelbar vor der Messung zugegeben wurde.

Ascorbinsäure (20 mM)	1 mM
ATPxMg ²⁺ (20 mM)	1 mM
Phosphoenolpyruvat (60 mM)	3 mM
NADH (12 mM)	0,21 mM
MgCl ₂ (20 mM)	1 mM
PK/LDH-Mix	3,5 µl
DnaK-Protein	0,1- 2 mM
HEPES-KOH, pH 7 (50 mM)	ad 200 µl

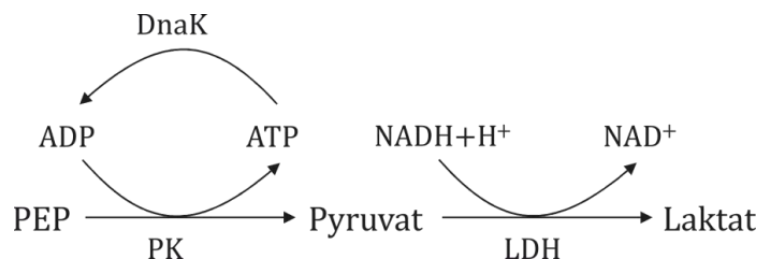


Abb. 12 Reaktionsmechanismus des ATPase-Tests.

Das zugesetzte DnaK-Protein hydrolysiert ATP, welches von der Pyruvatkinase (PK) unter Umsetzung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat, regeneriert wird. Bei der Reduktion des Pyruvats zu Laktat oxidiert die Laktatdehydrogenase (LDH) NADH zu NAD⁺, was photometrisch durch die Abnahme der Absorption bei 340 nm verfolgt werden kann.

2.2.4.14 CD-Spektroskopie

Von den gereinigten heterolog exprimierten DnaK-Proteinen wurden CD-Spektren mit dem CD-Spektrometer *Jasco-815* (Jasco, Easton, USA) aufgenommen, um die Sekundärstruktur und die thermische Stabilität zu bestimmen. Für die Messung wurde das Protein in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7 umgepuffert und die Konzentration in einer 1 mm Küvette auf etwa 0,1-0,2 µg/µl eingestellt. Die Aufnahme des Spektrums erfolgte von 190 bis 260 nm in 1 nm-Schritten mit einer Geschwindigkeit von 500 nm/min und einer digitalen Integrationszeit (D.I.T.) von 0,25 sek. Die Temperatur wurde von 10-95 °C in 1 °C-Schritten erhöht und jeweils für 5 sek. gehalten bzw. direkt nach Erreichen von 95 °C wieder entsprechend bis auf 10 °C gekühlt. Die Auswertung der Messdaten wurde mit der Software *Spectra Analysis* von Jasco (Jasco, Easton, USA) durchgeführt. Mit den Messwerten bei 222 nm wurden Schmelzkurven erstellt, bei welchen der Wendepunkt dem Schmelzpunkt des jeweiligen Proteins entspricht.

2.2.4.15 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Nach der Anzucht in Begasungsflaschen (siehe 2.2.1.2) wurden *Synechocystis*-Zellen zentrifugiert (2095 g, 15 min, RT) und das Zellpellet anschließend mit 50 mM

Kaliumphosphat-Puffer pH 7 gewaschen. Danach wurden die Zellen in Puffer mit 2,5 % Glutaraldehyd resuspendiert und somit fixiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden anschließend von Dr. Uwe Kahmann an der Universität Bielefeld durchgeführt.

2.2.4.16 Absorptionsspektren

Zur Bestimmung der Pigmentzusammensetzung wurden von einer in Begasungsflaschen angezogenen (siehe 2.2.1.2) und auf Zellzahl normierten (siehe 2.2.2) *Synechocystis* sp.-Kultur, Absorptionsspektren an einem Photometer mit integrierender Sphäre (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) im Bereich von 260-800 nm aufgenommen.

Die Verhältnisse zwischen den Pigmenten konnte mithilfe der ermittelten Absorptionsmaxima berechnet werden. Für das Verhältnis Phycocyanin/Chlorophyll a wurde der Quotient aus A_{625} und A_{680} , für Carotinoid/Chlorophyll a aus A_{490} und A_{440} gebildet.

2.2.4.17 77K-Fluoreszenzspektren

In Begasungsflaschen angezogene *Synechocystis*-Zellen (siehe 2.2.1.2) wurden auf Chlorophyll bzw. OD_{750} normiert und anschließend in einer Küvette in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Anregung der Chlorophylle bzw. der Phycobilisomen erfolgte bei 435 nm bzw. 580 nm an einem Fluorimeter des Typs *Aminco Bowman Series 2*. Die Emissionsspektren wurden in einem Bereich von 630-760 nm aufgenommen. Für jede Probe wurden jeweils drei Spektren aufgenommen.

2.2.4.18 Messung der Sauerstoffproduktion

Nach der Anzucht in Begasungsflaschen (siehe 2.2.1.2) wurden *Synechocystis*-Zellen auf Chlorophyll bzw. OD_{750} (siehe 2.2.4.8 und 2.2.2.1) normiert, mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt und anschließend die Sauerstoffproduktion mit einer optischen Sauerstoffsonde (PreSens, Regensburg) gemessen. In die Messkammer wurden unter langsamem Rühren 10 μ l NaHCO_3^- (100 mM) zu 900 μ l Zellsuspension gegeben. Die Messung der Sauerstoffproduktion erfolgte in einem abgedunkelten Raum, beginnend mit einer zweiminütigen Dunkelphase und einer anschließenden Belichtung von 2000 K (Farbtemperatur). Die erhaltenen Werte wurden graphisch ausgewertet. Aus den ermittelten Steigungen der Dunkelphase und der Lichtphase konnte die Sauerstoffproduktion berechnet werden. Die Messungen wurden jeweils drei Mal wiederholt und gemittelt.

2.2.4.19 PAM (Pulse Amplitude Modulated)-Messungen

In Begasungsflaschen angezogene *Synechocystis* sp.-Zellen (siehe 2.2.1.2) wurden auf Chlorophyll bzw. OD₇₅₀ normiert und anschließend mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt. Die Messungen fanden in einem abgedunkelten Raum, unter Verwendung eines Dual-PAM-100 Messsystems mit den Komponenten DUAL-E und DUAL-DR und der DualPAM Software (Walz GmbH, Effeltrich), statt.

Dunkel/Licht-Induktionskurven

Zur Bestimmung der photosynthetischen Aktivität von Photosystem II wurden Dunkel/Licht-Induktionskurven aufgenommen. Während einer initialen Dunkelphase mit einem schwachen Messlicht ($0,024 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) wurde die Hintergrundfluoreszenz F_0 , sowie die maximale Fluoreszenz F_m des PS II durch Gabe eines sättigenden Lichtpulses (600 ms, $10.000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) bestimmt. Nach 40 sek. wurde aktinisches Licht ($95 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) zugeschaltet und die maximale Fluoreszenz F_m' bei photosynthetisch aktivem Licht durch Gabe von sättigenden Lichtpulsen alle 20 sek. ermittelt. Aus den erhaltenen Werten konnte die maximale photosynthetische Aktivität ($(F_m - F_0)/F_m$), sowie die effektive photosynthetische Aktivität ($(F_m' - F_0')/F_m'$) des PS II berechnet werden. Während der Messung wurde F_0' mithilfe einer Approximation ($F_0' = F_0 / (F_v/F_m + F_0/F_m')$, wobei $F_v = F_m - F_0$) ermittelt (Oxborough & Baker, 1997).

P700 Re-reduktion

Durch einen sättigenden Lichtpuls (20 ms, $10.000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) wurde das P700 vollständig oxidiert, sichtbar durch ein aufgezeichnetes Absorptionsmaximum. Die folgende Reduktion des P700 durch ein Elektron aus der Elektronentransportkette zwischen PS II und PS I, konnte durch eine Abnahme des Absorptionssignals beobachtet werden. Die aus 15 Einzelmessungen gemittelte Kinetik der Re-Reduktion wurde durch eine Ausgleichsrechnung mit einer exponentiellen Funktion erster Ordnung approximiert und die Halbwertszeit der Reduktion bestimmt.

2.2.4.20 Programme zur Strukturvorhersage von Proteinen

Anhand der Sequenzen der DnaK-Proteine aus *Synechocystis* sp. der Datenbank *CyanoBase* (Nakamura et al., 2000) konnte ihre Tertiärstruktur mit Hilfe des Programms *RaptorX* (Källberg et al., 2012) vorhergesagt werden. Dabei diente DnaK aus *E. coli* im ATP gebundenen Zustand als Matrize (PDB 4BQ9; (Kityk et al., 2012)). Anschließend konnten die erhaltenen Strukturmodelle mit dem Programm *Chimera* (Pettersen et al., 2004) analysiert werden. Mit der Funktion *MatchMaker* wurden über die bekannte Struktur von *E. coli*-DnaK

(PDB 4BQ9; (Kityk et al., 2012)) die vorhergesagten Strukturen von DnaK1, 2, 3 und 4 gelegt und miteinander verglichen (Meng et al., 2006). Durch die Funktion *MatchAlign* konnte im Programm *Chimera* ein Sequenzalignment nach der Überlagerung von zwei oder mehreren Proteinstrukturen durchgeführt werden (Meng et al., 2006). Konservierung wurde im *Clustal*-Format annotiert, wobei ein Stern eine konservierte Aminosäure (AS), ein Doppelpunkt eine Konservierung von AS mit sehr ähnlichen Eigenschaften und ein Punkt eine Konservierung von AS mit bedingt ähnlichen Eigenschaften markiert (Larkin et al., 2007). Zur Angabe der Sequenzidentitäten der DnaK-homologen Proteine wurde ein Alignment der Proteinsequenzen (*CyanoBase*, (Nakamura et al., 2000)) mit dem Programm *ClustalW2* durchgeführt (Larkin et al., 2007).

2.2.5 Proteomische und lipidomische Analyse von *Synechocystis* sp.-Zellen

Synechocystis sp.-Zellen wurden photomixotroph (in BG11-Medium mit 10 mM Glukose) oder heterotroph unter LAHG (*light-activated heterotrophic growth*)-Bedingungen (in BG11-Medium mit 60 mM Glukose) kultiviert (siehe 2.2.1.2). Der anschließende Zellaufschluss und die Fraktionierung erfolgten wie in Absatz 2.2.4.3 beschrieben. Im Folgenden wurden die Proben von Nicole Plohnke an der Ruhr-Universität Bochum (Fakultät für Biologie und Biotechnologie, Lehrstuhl Biochemie der Pflanzen) weiter bearbeitet, wie in Plohnke *et. al* (2015) beschrieben. Für die Proteinanalyse wurden 5 µg Proteine auf ein Polyacrylamid-Gel geladen und die Elektrophorese gestoppt, sobald die Lauffront das Trenngel erreichte. Nach einer Coomassie-Färbung wurden die Proteinbanden aus dem Gel geschnitten und anschließend mit Trypsin verdaut. Die durch Restriktion erzeugten Peptide wurden aus dem Gel extrahiert (50 % (v/v) Acetonitril, 1 % (v/v) Ameisensäure), lyophilisiert und kurz vor der massenspektrometrischen Analyse in 20 µl 0,1 % Ameisensäure aufgenommen. Anschließend folgte eine Flüssigchromatographie verbunden mit einer Massenspektrometrie (LC-MS/MS) und eine Auswertung der Daten, wie in Plohnke *et. al* (2015) beschrieben.

Für die Lipidanalyse wurden Lipide mittels Chloroform:Methanol:Natriumacetat (MGDG, DGDG) oder Chloroform:Methanol:Ammoniumacetat (PG, SQDG) aus aufgebrochenen *Synechocystis* sp. Zellen extrahiert (Bligh & Dyer, 1959). Anschließend erfolgten eine Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) und eine Datenauswertung, wie in Plohnke *et. al* (2015) beschrieben.

Für die Protein- und Lipid-Analyse wurden drei (photomixotroph) bzw. vier (heterotroph) unabhängige *Synechocystis* sp.-Kulturen eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung des Proteoms und Lipidoms dunkel adaptierter *Synechocystis* sp.-Zellen

Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. ist befähigt heterotroph, mit Glukose als Energie- und Kohlenstoffquelle, unter *light-activated heterotrophic growth* (LAHG)-Bedingungen zu wachsen (Anderson & McIntosh, 1991). Die physiologische Umstellung von Phototrophie auf Heterotrophie lässt sich unter anderem anhand der Reduzierung des Thylakoidsystems und der erhöhten Aktivität von Enzymen des Zuckerstoffwechsels nachvollziehen (Knowles & Plaxton, 2003; Vernotte et al., 1992). In einer Proteomanalyse heterotroph und autotroph kultivierter *Synechocystis* sp.- Zellen von Kurian et. al (2006), wurde eine Veränderung der quantitativen Zusammensetzung löslicher Proteine unter diesen Wachstumsbedingungen untersucht. Allerdings konnte hier nur bei 23 löslichen Proteinen eine signifikante Veränderung des Expressionsniveaus nachgewiesen werden (Kurian et al., 2006a).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine umfassendere Abdeckung des Proteoms im Vergleich zu vorangehenden Studien angestrebt und das Hauptaugenmerk auf Veränderungen bei Membranproteinen gelegt, um die Dunkeladaptation mit der Reduzierung des Thylakoidmembransystems in *Synechocystis* sp. besser verstehen zu können. Für den vollständigen Datensatz wird auf die Veröffentlichung Plohnke et. al (2015) verwiesen, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden ist.

Für die Proteomanalyse wurden *Synechocystis* sp.-Zellen unter mixotrophen bzw. heterotrophen Bedingungen kultiviert und nach Aufschluss der Zellen in Membranfraktion und lösliche Fraktion getrennt. Anschließend wurde das Proteom beider Fraktionen massenspektrometrisch über LC-MS/MS analysiert (siehe 2.2.5). Die Analyse des Lipidoms erfolgte über ESI-MS/MS nach Extraktion der Lipide nach Bligh et. al. (1959) jeweils aus Gesamt-Zellextrakt. Unter den gewählten Zuchtbedingungen für *Synechocystis* sp. konnten durch mikroskopische Analysen morphologische Unterschiede verifiziert werden, da die Zellen nach einer Zucht von mindestens zwei Wochen unter LAHG-Bedingungen im Vergleich zu photomixotropher Zucht weitreichende Veränderungen in ihrer Ultrastruktur aufwiesen (Abb. 13). Das Thylakoidsystem war fast vollständig verschwunden und Fragmente der Thylakoidmembranen nur noch als diffuse Strukturen unter dem Elektronenmikroskop erkennbar. Zusammen mit einem stark reduzierten Chlorophyllgehalt wiesen die untersuchten Zellen somit die allgemeinen Charakteristika dunkeladaptierter *Synechocystis* sp.-Zellen auf (Barthel et al., 2013; Vernotte et al., 1992) und konnten für die Proteom- und Lipidom-Analyse verwendet werden.

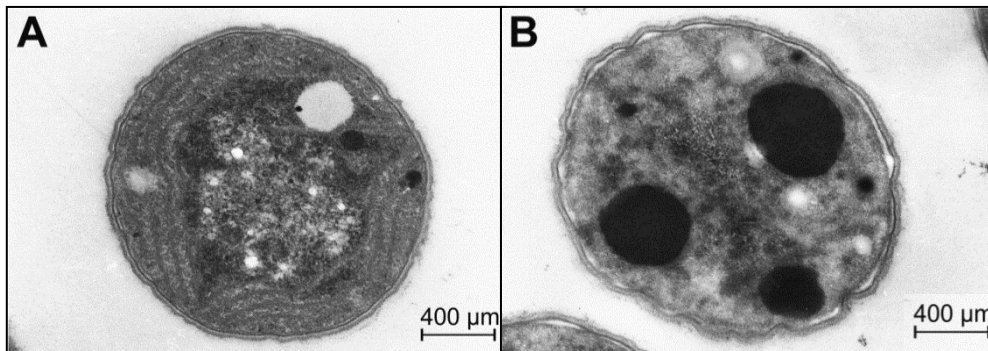


Abb. 13 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Synechocystis* sp.-Zellen nach Zucht unter A) mixotrophen oder B) heterotrophen Bedingungen.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (siehe 2.2.3.15) zeigen die Veränderung der Ultrastruktur von *Synechocystis* sp.-Zellen hinsichtlich des Thylakoidsystems nach Zucht unter A) mixotrophen oder B) heterotrophen Bedingungen. Möglicherweise ist die weiße Fläche in A) auf die Verdampfung von Polyphosphatgranula durch den Elektronenstrahl zurückzuführen. Den stark lichtbrechenden Einschlüssen in B) können Cyanophycin Granula zugeordnet werden (Stanier, 1988). (In Zusammenarbeit mit Dr. Uwe Kahmann, Universität Bielefeld).

Insgesamt konnten in der durchgeführten Proteomanalyse 1528 Proteine identifiziert werden. Darunter wurden 374 als integrale Membranproteine registriert, was einem Anteil von 24,5 % entspricht. Dieser Wert stimmt mit dem theoretischen Anteil von 25 % im Genom kodierter Membranproteine in *Synechocystis* sp. überein (Kaneko et al., 1996b). Von den 1528 Proteinen waren 824 Proteine unter beiden Bedingungen, mixotroph und heterotroph, zu detektieren (Abb. 14). Aufgrund des gesetzten Qualitätsstandards von 8 identifizierten Peptiden je Protein konnten aber nur 641 Proteine quantifiziert werden ((Plohnke et al., 2015a), ausgewählte Proteine siehe Anhang Tab. A1). Basierend auf einer t-Test-Signifikanz von 95 % und einer mehr als zweifachen Expressionsänderung, wiesen 261 Proteine ein verändertes Expressionslevel zwischen mixotrophen und heterotrophen Wachstumsbedingungen auf. Unter LAHG-Bedingungen zeigten 188 Proteine eine erhöhte und 73 Proteine eine verminderte Expression (Abb. 14).

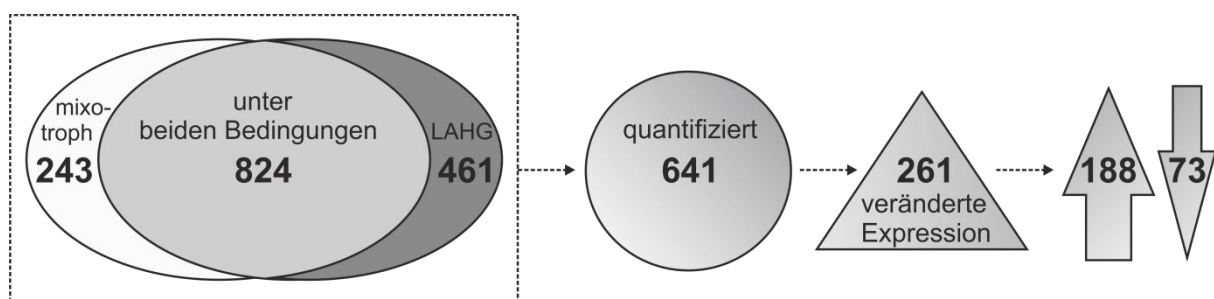


Abb. 14 In der Proteomanalyse von *Synechocystis* sp.-Zellen identifizierte und quantifizierte Proteine

In der Proteomanalyse (siehe 2.2.5) konnten insgesamt 1528 Proteine identifiziert und davon 824 unter beiden Bedingungen (mixotroph und heterotroph) nachgewiesen werden. Von den identifizierten Proteinen konnten 641 quantifiziert werden, wobei 261 Proteine ein geändertes Expressionsniveau aufwiesen (Signifikanz im t-Test 95 %, mind. zweifache Expressionsänderung). Davon zeigten unter LAHG-Bedingungen 188 Proteine eine erhöhte und 73 Proteine eine verminderte Expression.

3.1.1 Proteine des Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus

Allgemein zeigte sich unter LAHG-Bedingungen eine quantitative Veränderung der Proteine des Glukosestoffwechsels. So war eine erhöhte zelluläre Konzentration von Enzymen der Glykolyse, des oxidativen Pentosephosphatwegs und des Citratzyklus zu detektieren ((Plohnke et al., 2015a), siehe Anhang Tab. A1).

3.1.2 Proteine der Atmungskette und des photosynthetischen Elektronentransports

Unter den Proteinkomplexen der Atmungskette und des photosynthetischen Elektronentransports zeigten sich im Vergleich der Wachstumsbedingungen nur bei Photosystem II (PS II) signifikante Unterschiede mit einer mehr als zweifachen Änderung. Durchschnittlich war die zelluläre Konzentration der 12 detektierten Untereinheiten unter LAHG-Bedingungen im Vergleich zu photomixotrophen Bedingungen um etwa 50 % reduziert (Abb. 15 und siehe Anhang Tab. A1).

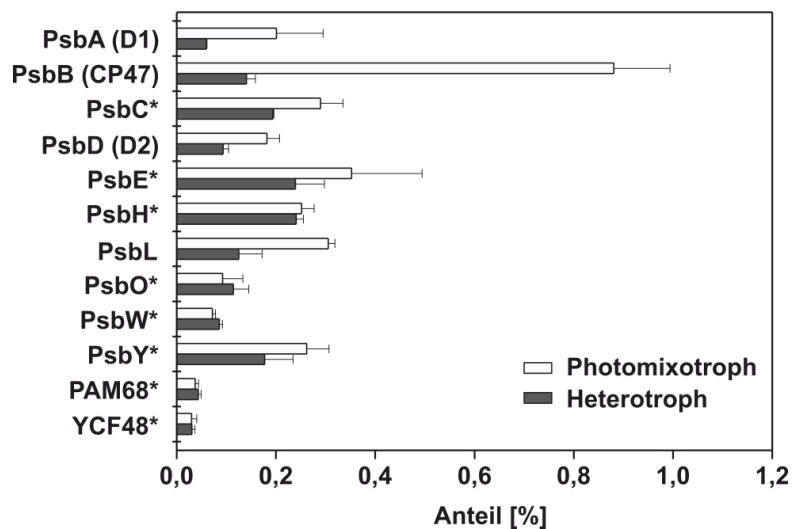


Abb. 15 Relative Häufigkeit der PS II-Untereinheiten und -Assemblierungsfaktoren.

Die in der Membran-Proteom-Analyse (siehe 2.2.5) detektierten Untereinheiten und Assemblierungsfaktoren des PS II sind mit ihren relativen Häufigkeiten alphabetisch aufgelistet. Proteine wurden mit einem Stern markiert, wenn deren Änderung als nicht signifikant eingestuft wurde (Änderungsfaktor ≤ 2). Die relative Quantifizierung erfolgte durch „spectral counting“ unter Verwendung von „Normalized Spectral Abundance Factors“ (NSAF). (In Zusammenarbeit mit Nicole Plohnke, Ruhr-Universität Bochum).

Während die großen Kernuntereinheiten des PS II (D1, D2, CP47) in ihrer Häufigkeit reduziert waren, blieb der Gehalt der kleinen Untereinheiten – mit Ausnahme von PsbL – und der Komponenten für die initiale PS II-Assemblierung (PsbE, PsbH, PsbY, PsbW, PAM68, YCF48, (Komenda et al., 2012; Nickelsen & Rengstl, 2013)) nahezu unverändert. Zusätzlich

wurden Proteine wie die Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR) und SII1694, welche an der Zulieferung von Chlorophyll an PS II beteiligt sind (He & Vermaas, 1999), nur unter LAHG-Bedingungen detektiert bzw. als Proteine mit gesteigerter Häufigkeit identifiziert.

In der quantitativen Analyse konnten zugleich alle großen Untereinheiten des Photosystem I (PS I) nachgewiesen werden, für die sich keine signifikante Änderung in der relativen Häufigkeit zeigte. Auch für die detektierten Untereinheiten weiterer Proteinkomplexe der Thylakoidmembran, wie der NADH-Dehydrogenase, des Cytochrom-*b₆f*-Komplexes oder der ATP-Synthase, konnte keine signifikante Änderung unter LAHG-Bedingungen festgestellt werden (siehe Anhang Tab. A1).

Die pigmentbindenden Untereinheiten der lichtsammelnden Phycobilisomen zeigten keinen signifikanten Unterschied in ihrer Häufigkeit. Jedoch waren die sogenannten *Linkerproteine* L_R³³ (SII1580), L_R³⁰ (SII1579) und L_{RC} (SII1471), welche die Scheibensegmente stabilisieren, deutlich reduziert (siehe Anhang Tab. A1) (MacColl, 1998). Das *Orange Carotenoid Protein* OCP (SIr1963) zeigte einen Anstieg des Gehalts um den Faktor 11 in LAHG-Zellmembranfraktionen.

3.1.3 Proteine der Translation und Membrantranslokation

In Bakterien und Chloroplasten werden Proteine generell über zwei Haupttranslokationswege über oder in die Membransysteme transloziert. Mithilfe des Sec-Systems kann der Transport der Polypeptide in einem teilweise ungefalteten Zustand co- und posttranslational erfolgen (Koch et al., 2003; Müller et al., 2001). Hingegen werden durch das Tat-System vornehmlich gefaltete Proteine über die Membran transportiert (Du Plessis et al., 2011; Lee et al., 2006).

Allgemein zeigten ribosomale Proteine in der quantitativen Analyse eine signifikant geringere Häufigkeit unter LAHG-Bedingungen (siehe Anhang Tab. A1). Im Vergleich zu photomixotrophen Bedingungen war der Anteil von 24 Untereinheiten (19 davon in der Membranfraktion) aus den insgesamt 50 detektierten ribosomalen Proteinen um etwa 50 % reduziert. Die Untereinheiten des Sec-Translokation-Systems SecA (SII0616), SecY (SII1814) und SecE (Ssl3335) traten mit einer signifikant geringeren Häufigkeit unter heterotrophen Wachstumsbedingungen auf (siehe Anhang Tab. A1). Dies galt gleichermaßen für das an der Membraninsertion von Proteinen beteiligte YidC (Dalbey et al., 2014; Wang & Dalbey, 2011). Im Gegensatz dazu waren bei den Untereinheiten des Tat-Systems keine Veränderungen festzustellen (siehe Anhang Tab. A1).

3.1.4 Stress assoziierte Proteine

Interessanterweise zeigte sich unter heterotrophen Bedingungen ein erhöhter Gehalt an Proteinen der oxidativen Stressantwort (Abb. 16 und siehe Anhang Tab. A1). Dem-

entsprechend wiesen die Superoxiddismutase SodB (Slr1515), Katalase (Sll1987), Thioredoxin (Slr0623), Peroxiredoxin (Sll0755), NADPH-Peroxidase Gpx2 (Slr1992) und das Hitzeschockprotein HtpG (Sll0430) (Hossain & Nakamoto, 2003) eine erhöhte zelluläre Konzentration auf. Aber auch Chaperone wie GroEL1 und GroEL2, die an der generellen Stressantwort beteiligt sind, zeigten bei der quantitativen Analyse in beiden Fraktionen einen erhöhten Anteil unter LAHG-Bedingungen (Abb. 16).

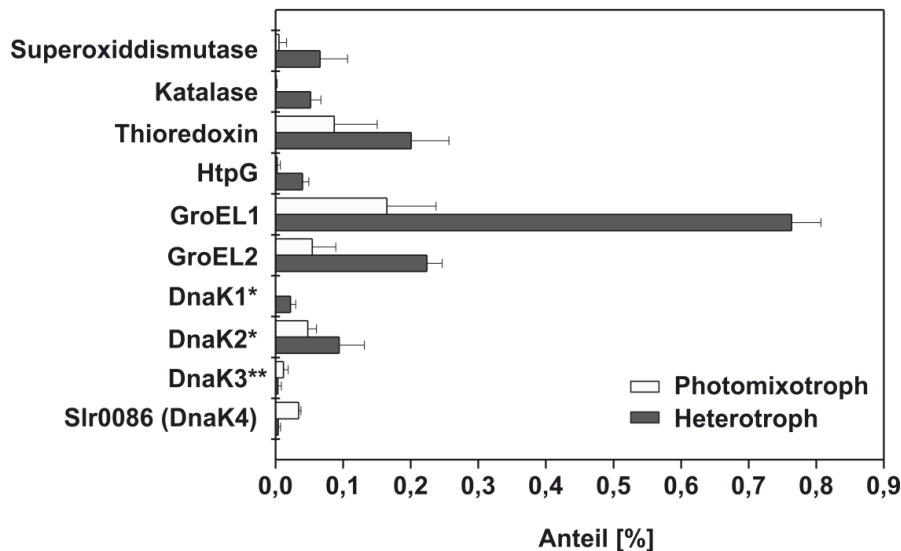


Abb. 16 Relative Häufigkeit von Stress-assoziierten Proteinen.

Die in der Membran-Proteom-Analyse (siehe 2.2.5) detektierten Enzyme und Chaperone sind mit ihren relativen Häufigkeiten dargestellt. Es wurden die Proteine mit einem Stern markiert, welche nur unter einer Bedingung nachgewiesen werden konnten (DnaK1) oder deren Änderung als nicht signifikant eingestuft wurde (DnaK2). DnaK3 wurde mit zwei Sternen markiert, da es die gesetzten Qualitätsstandards der quantitativen Analyse (95 % Signifikanz im t-test) nicht erfüllte. Die relative Quantifizierung erfolgte durch „spectral counting“ unter Verwendung von „Normalized Spectral Abundance Factors“ (NSAF). (In Zusammenarbeit mit Nicole Plohnke, Ruhr-Universität Bochum).

DnaK2 ist als kanonisches Hsp70-Protein in *Synechocystis* sp. an der generellen Stressantwort beteiligt (Rupprecht et al., 2010) und zeigte in der löslichen Fraktion einen etwa fünffach gesteigerten Gehalt, in der Membranfraktion jedoch keine signifikante Änderung (Abb. 16, siehe Anhang Tab A1). Desweiteren konnte das nicht-essentielle DnaK1 Protein, das eine noch unbekannter Funktion besitzt (Rupprecht et al., 2010), nur unter heterotrophen Bedingungen und nur in der Membranfraktion nachgewiesen werden. Das membrangebundene DnaK3-Protein konnte zwar in beiden Zellfraktionen und unter beiden Bedingungen detektiert werden, erfüllte aber nicht die gesetzten Qualitätsstandards der quantitativen Analyse (95 % Signifikanz im t-test). Übergeht man diesen Standard, lässt sich eine geringere Häufigkeit des Proteins unter LAHG-Bedingungen feststellen (Abb. 16, siehe Anhang Tab A1). Das bis *dato* noch nicht charakterisierte DnaK homologe Protein Slr0086 (DnaK4) zählte in der quantitativen Analyse zu den Proteinen, die in Dunkelheit am stärksten herabreguliert waren.

3.1.5 Proteine der Thylakoidmembranbiogenese

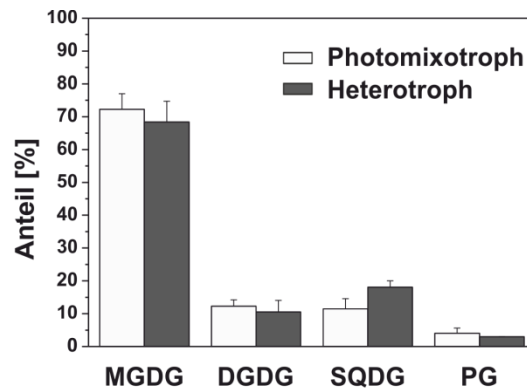
In den letzten Jahren wurden Proteine wie das *Vesicle inducing protein in plastids* Vipp1 (SII0617), das membranassoziierte Chaperon DnaK3 (SII1932), die Membraninsertase YidC (Slr1471) und das Prohibitin-homologe Membranprotein Slr1768, in Verbindung mit der Thylakoidbiogenese in *Synechocystis* sp. gebracht. Die genaue Funktion dieser Proteine konnte jedoch bisher noch nicht aufgeklärt werden (Bryan et al., 2011; Fuhrmann et al., 2009; Rupprecht et al., 2010; Spence et al., 2004). Bei der quantitativen Proteom-Analyse erfüllten die Daten zu den Proteinen DnaK3 und Vipp1 nicht die gesetzten Qualitätsstandards. Das in der Cytoplasma- und Thylakoidmembran vorliegende YidC trat unter LAHG-Bedingungen mit einer reduzierten Häufigkeit auf (siehe Anhang Tab. A1). Interessanterweise zeigte Slr1768 eine erhöhte Konzentration unter heterotrophen Wachstumsbedingungen, konnte aber bei lichtadaptierten Zellen nicht detektiert werden.

3.1.6 Lipidanalyse

Mit der Hilfe von Lipidstandards konnte die absolute Konzentration der Lipidklassen in *Synechocystis* sp. nach photomixotropher und heterotropher Zucht bestimmt und miteinander verglichen werden (Abb. 17 A).

Hierbei zeigten LAHG-Kulturen einen signifikant erhöhten Gehalt an SQDG (Sulfoquinovosyl-Diacylglycerol), wogegen der Anteil von MGDG (Monogalactosyl-Diacylglycerol), DGDG (Digalactosyl-Diacylglycerol) und PG (Phosphatidyl-glycerol) konstant blieb. Entsprechend war in der Proteomanalyse auch ein Anstieg der Häufigkeit des Enzyms SqdB (Slr1020) festzustellen, welches an der Biosynthese von SQDG beteiligt ist (siehe Anhang Tab. A1). Aus der detaillierten Analyse der individuellen Lipide konnte abgeleitet werden, dass *Synechocystis* sp. tendenziell einen erhöhten Anteil an gesättigten Fettsäuren unter LAHG-Bedingungen aufwies (Abb. 17 B). Dabei zeigten MGDG und DGDG eine Verschiebung von ungesättigten Fettsäuren (34:4, 34:3) hin zu gesättigten Lipidspezies (34:2 und 34:1). Im Fall von SQDG war es eine Verschiebung von 34:2 zu 34:1 und 34:0 und bei PG von 34:3 zu 34:1 und 34:0 (Abb. 17 B).

A



B

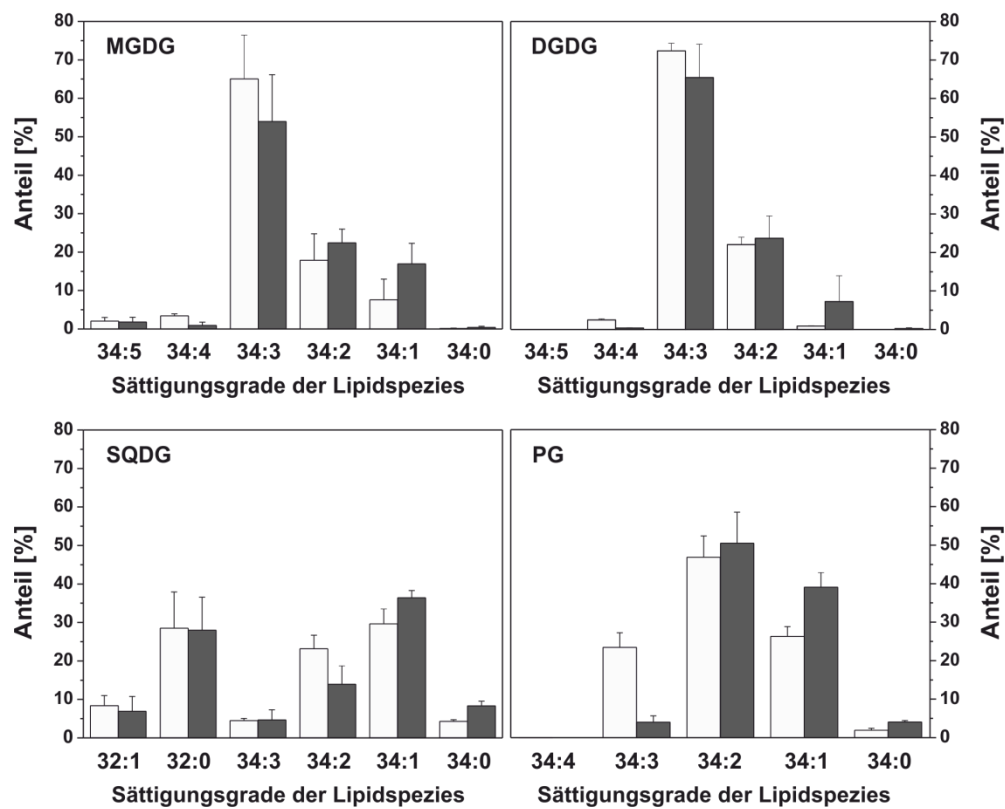


Abb. 17 Relative Häufigkeit der Lipidklassen und Sättigungsgrade der Lipidspezies.

A) Die relativen Häufigkeiten der Lipidklassen unter photomixotrophen und heterotrophen Bedingungen in der Lipid-Analyse (siehe 2.2.5). B) Die relativen Häufigkeiten der Sättigungsgrade der einzelnen Lipidspezies. Die Analyse des Lipidoms über ESI-MS/MS erfolgte nach Extraktion der Lipide nach Bligh *et. al.* (1959) aus Gesamt-Zellextrakt (siehe 2.2.5). (In Zusammenarbeit mit Nicole Plohnke, Ruhr-Universität Bochum).

3.2 Wachstumverhalten von *Synechocystis* sp. bei Deletion/Depletion von DnaK1, DnaK2 und DnaK3

DnaK2 ist das Hsp70-Protein mit der höchsten Sequenzidentität zu DnaK aus *E. coli* sowie zu Hsp70-Proteinen aus Chloroplasten und wird als das kanonische Hitzeschockprotein in *Synechocystis* beschrieben (Rupprecht et al., 2007b). Unter anderem konnte für *dnaK2* eine erhöhte Promotoraktivität unter zahlreichen Stressbedingungen nachgewiesen werden (Rupprecht et al., 2010; Rupprecht et al., 2007a). Im Gegensatz dazu zeigten *dnaK1* und *dnaK3* in diesen Aktivitätstests keine bedeutsamen Veränderungen, gleichwohl unter Hitzestress bei *dnaK3* eine stärkere Aktivität als bei *dnaK1* registriert werden konnte (Rupprecht et al., 2007b). Da der zelluläre Anteil an DnaK1 und DnaK3 jedoch vergleichbar zu sein scheint, wurde eine posttranskriptionelle Regulation vorgeschlagen (Rupprecht et al., 2010).

Um die Auswirkungen der Deletion bzw. Depletion in den *dnaK*-Mutationsstämmen genauer zu untersuchen, wurde ihr Wachstumsverhalten unter diversen Stressbedingungen getestet und mit dem Wildtypstamm *Synechocystis*Kar^R (siehe Tab. 3) verglichen. Die Ergebnisse sind zur Übersicht in Tab. 9 zusammengefasst.

Tab. 9 Übersicht des Wachstumsverhaltens der *Synechocystis* Δ *dnaK*-Stämme unter diversen Bedingungen. Im Vergleich zum Wt (○) kein Wachstumsdefekt, (●) ein Wachstumsdefekt.

Wachstumsbedingung	<i>Synechocystis</i> sp. Stamm		
	Δ <i>dnaK1</i>	Δ <i>dnaK2</i>	Δ <i>dnaK3</i>
Autotroph	○	○	○
Mixotroph (5 mM Glukose)	○	○	○
Hitzestress (42 °C)	●	●	●
Kältestress (22 °C)	○	○	○
Starklicht (120 μ E)	○	○	○
Oxidativer Stress (1 mM H ₂ O ₂)	●	●	○
Osmotischer Stress (0,1 M Mannitol)	○	○	○
Säurestress (pH 5,5)	●	●	○

Bei den Standardwachstumsbedingungen (aerob, 30 °C autotroph bzw. mixotroph mit 5 mM Glukose) konnte für die Mutationsstämmen keine Beeinträchtigung des Wachstums festgestellt werden (Abb. 18, Tab. 9). Auch unter Kältestress (22 °C), Starklicht (120 μ E) und osmotischem Stress (0,1 M Mannitol) war kein Wachstumsnachteil zu verzeichnen (Tab. 9). Allerdings zeigten die Stämme Δ *dnaK1* und Δ *dnaK2* einen deutlichen Wachstumsdefekt bei

42 °C und auch für $\Delta dnaK3$ war eine offensichtliche Beeinträchtigung des Wachstums zu erkennen (Abb. 18, Tab. 9). Gleichmaßen zeigten $\Delta dnaK1$ und $\Delta dnaK2$ bei Säurestress (pH 5,5) einen starken Wachstumsdefekt (Abb. 18). Zudem war für $\Delta dnaK1$ und $\Delta dnaK2$ unter oxidativem Stress (1 mM H_2O_2) ein stark verzögertes Wachstum zu verzeichnen, die Stämme erreichten jedoch nach einer längeren *Lag*-Phase und anschließend starkem Wachstum eine vergleichbare optische Dichte wie der Wildtyp-Stamm (Abb. 18).

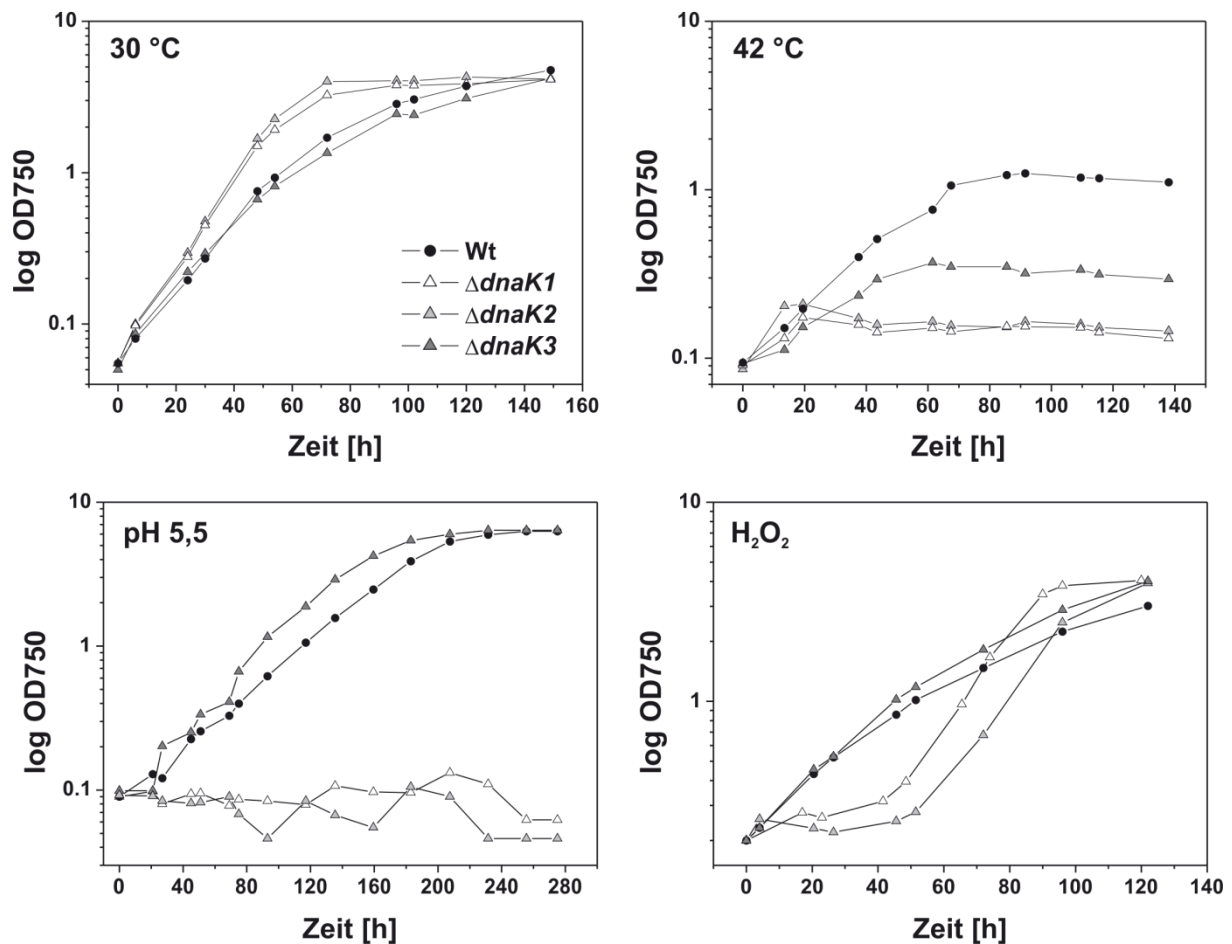


Abb. 18 Wachstumsverhalten der *Synechocystis* sp.-Deletionsstämme $\Delta dnaK1$, $\Delta dnaK2$ und $\Delta dnaK3$ unter Stressbedingungen.

Zu Beginn wurden die Kulturen auf die gleiche OD_{750} eingestellt und unter Standardbedingungen (30 °C) oder unter den jeweiligen Stressbedingungen (42 °C, 1 mM H_2O_2 , pH 5,5) kultiviert. Die optische Dichte wurde bis zum Erreichen der stationären Phase täglich bestimmt und mit dem Wildtypstamm *SynechocystisKanR* verglichen. Die Zucht erfolgte photomixotroph unter Zugabe von 5 mM Glukose sowie 70 $\mu g/ml$ Kanamycin und mit einer Lichtintensität von 30 μE (siehe 2.2.1.2).

3.3 DnaK3 und seine Beteiligung an der Thylakoidmembranbiogenese

Neben anderen möglichen Faktoren wurden in den letzten Jahren die Proteine DnaK3 (SII1932) und DnaJ3 (SII1933) in Verbindung mit der Thylakoidmembranbiogenese in Cyanobakterien gebracht (Düppre et al., 2011; Katano et al., 2006; Nimura et al., 1996). Beide Proteine sind in *Synechocystis* sp. und *Synechococcus* sp. essentiell (Düppre et al., 2011; Nimura et al., 1996; Oguchi et al., 1997; Rupprecht et al., 2007b) und in einem konservierten Gen-Cluster organisiert, welches in zahlreichen cyanobakteriellen Genomen vorzufinden ist (*CyanoBase*, (Nakamura et al., 2000)). Ihre Beteiligung an der Biogenese von Thylakoidmembranen wird durch die Beobachtung unterstützt, dass in dem Cyanobakterium *Gloeobacter violaceus*, welches keine Thylakoidmembranen besitzt (Rippka et al., 1974), auch kein DnaK3 oder DnaJ3 vorhanden ist (Nakamura et al., 2003). Allerdings wurde noch kein Nachweis einer entsprechenden Funktion dieser Proteine erbracht.

Im Gegensatz zu den homologen Proteinen DnaK1 und DnaK2, besitzt DnaK3 einen verlängerten C-Terminus, welcher die Bindung an Thylakoidmembranen ermöglicht (Nimura et al., 1996; Rupprecht et al., 2007b). Nach Fraktionierung von *Synechocystis* sp.-Zellen und anschließender SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse war DnaK3 nur im Gesamtzellextrakt und in der Membranfraktion immunologisch nachzuweisen (Abb. 19 links).

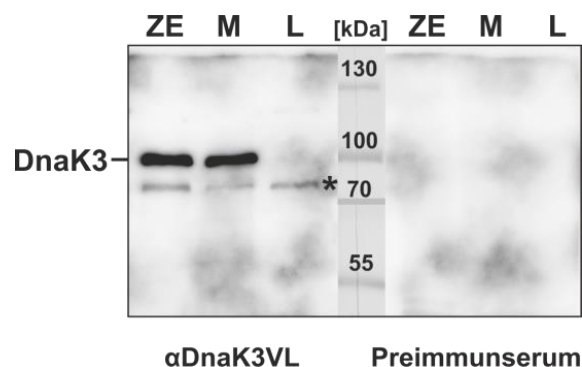


Abb. 19 Western-Blot zum Nachweis von DnaK3 in Zellfraktionen von *Synechocystis* sp.

Nach der Zellfraktionierung einer photomixotrophen *Synechocystis* sp.-Kultur wurden Zellextrakt (ZE), Membranfraktion (M) und lösliche Fraktion (L) SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend Western-Blot-Analysen unter Verwendung des Antikörpers α DnaK3VL bzw. des Preimmunserums durchgeführt. Die zusätzliche Bande oberhalb der 70 kDa-Markerbande wurde mit einem Stern markiert.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Antikörper gegen DnaK3 verwendet, einer war gegen den C-Terminus (α DnaK3CT) und der andere gegen das vollständige Protein (α DnaK3VL) gerichtet. Unter Verwendung des Antikörpers α DnaK3VL zeigte sich neben der Bande für DnaK3 eine weitere, schwächer ausgeprägte Bande zwischen der 70 kDa und der 100 kDa-Markerbande (Abb. 19 links). Diese war jedoch nicht auf eine Kreuzreaktion des Kaninchenserums zurückzuführen, da die Bande bei der Verwendung von Preimmunserum

nicht in Erscheinung trat (Abb. 19 rechts). Eine Reaktion auf die homologen DnaK Proteine DnaK1 und 2 wurde getestet und konnte ebenfalls ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich zu klären, ob es sich bei der zusätzlichen Bande um eine verkürzte Form von DnaK3 oder um eine unspezifische Bindung des Antikörpers an ein Protein im Zellextrakt handelt.

3.3.1 Expression und Deletion von *dnaK3*

Die photosynthetische Aktivität von *Synechocystis* sp. ist abhängig von den vorherrschenden Lichtverhältnissen und der adaptiven Biogenese von Thylakoiden (Barthel et al., 2013; Kopečna et al., 2012). Bei einer Zucht unter *light-activated heterotrophic growth* (LAHG)-Bedingungen mit Glukose als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle weisen *Synechocystis* sp.-Zellen ein rückgebildetes Thylakoidsystem auf, bei welchem die Thylakoidmembranen nur noch als diffuse Struktur erkennbar sind (Abb. 13 B). Werden jedoch dunkeladaptierte Zellen wieder den Lichtbedingungen ausgesetzt, kommt es zu einer Regeneration der Thylakoidmembranen und einer verfolgbaren Rückgewinnung bzw. Steigerung der photosynthetischen Aktivität (Barthel et al., 2013). Um einen Zusammenhang zwischen der Funktion von DnaK3 und der Thylakoidbiogenese zu überprüfen, wurde die Expression von DnaK3 untersucht. Dafür wurden zunächst dunkeladaptierte *Synechocystis* sp.-Zellen phototroph (d. h. unter normalen Lichtbedingungen (siehe 2.2.1.2)) kultiviert und die Zellextrakte nach unterschiedlicher Wachstumsdauer in Licht präpariert. Die Western-Blot-Analyse der Zellextrakte ließ eine lichtabhängige Expression von DnaK3 erkennen (Abb. 20). In dunkeladaptierten Zellen konnte kein DnaK3 detektiert werden. Nach einer Stunde Inkubation im Licht hingegen war eine Expression nachweisbar, welche mit der Dauer der Inkubation an Licht stärker wurde.

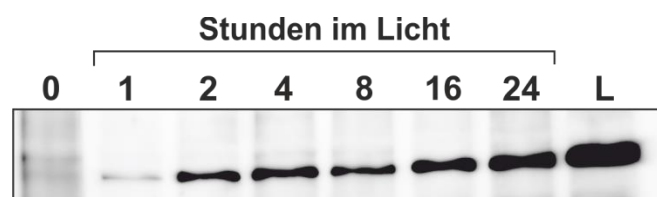


Abb. 20 Lichtabhängige Expression von DnaK3 in *Synechocystis* sp.

Western-Blot-Analyse von Zellextrakten dunkeladaptierter *Synechocystis* sp.-Zellen (0 h) nach verschiedener Inkubationsdauer im Licht (1 bis 24 h) und einer lichtadaptierten Kultur (L) als Positivkontrolle. Es wurden jeweils 20 µg Protein aufgetragen und der Antikörper αDnaK3CT verwendet (in Zusammenarbeit mit Sandra Barthel).

Um zu testen, ob die DnaK3-Funktion im Dunkeln essentiell ist, wurde versucht, das *dnaK3*-Gen in allen Genomkopien von *Synechocystis* sp. unter LAHG-Bedingungen zu deletieren. Bei einer erfolgreichen Deletion sollten alle Genkopien von *dnaK3* durch eine Kanamycin-

resistenz-Kassette unterbrochen sein (Abb. 21 A). Auch nach zahlreichen Segregations-schritten war nach Isolation genomischer DNA aus der Mutante in einer PCR noch ein wildtypisches Produkt nachweisbar (Abb. 21 B). Somit konnte das Gen nicht vollständig deletiert werden. Dennoch zeigte ein Teil der *dnaK3*-Genkopien eine Integration der Kanamycinresistenz-Kassette *aphAII*, was sich anhand eines Größenunterschieds des PCR-Produkts von etwa 1000 bp nachvollziehen ließ (Abb. 21 B).

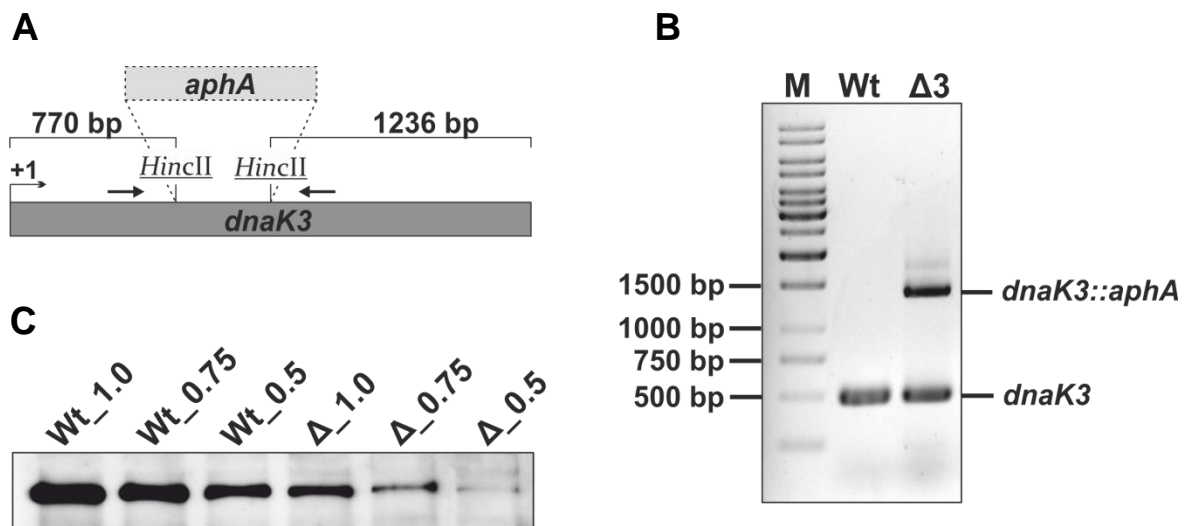


Abb. 21 Deletion von *dnaK3* unter LAHG-Bedingungen und Expression von DnaK3 im *Synechocystis* sp.-Mutationsstamm Δ *dnaK3*.

A) Schematische Darstellung der Unterbrechung der *dnaK3*-Gensequenz durch Einführung einer Kanamycin-Resistenzkassette (*aphA*). Die *aphA*-flankierenden Primer in der *dnaK3*-Gensequenz dienen zur Kontrolle der Deletion mittels PCR und sind als Pfeil dargestellt (siehe Tab. 5). B) Agarosegel-Elektrophorese der analytischen PCR von isolierter genomischer DNA aus Wildtyp (Wt) und Δ *dnaK3*- Mutante (Δ 3). Die Integration der Resistenzkassette *aphAII* ist durch ein PCR-Produkt auf Höhe der 1500 bp-Markerbande (M) zu erkennen. C) Relative Quantifizierung von DnaK3 mittels Western-Blot-Analyse von *Synechocystis* sp. Zellextrakt des Wildtyps (Wt) und der Δ *dnaK3*-Mutante (Δ) unter Verwendung des Antikörpers α DnaK3CT (1.0 entspricht 10 μ g Protein). Die Bestimmung der Bandenintensitäten erfolgte mit Hilfe des Programms *ImageJ* (National Institutes of Health, USA).

Infolge dieser teilweisen Deletion konnte eine verminderte DnaK3-Expression in der Δ *dnaK3*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Rupprecht et al., 2007b). Um die Abnahme der Expression von DnaK3 zu ermitteln, wurden Gesamtzellextrakte des *Synechocystis* sp.-Wildtyps und der Δ *dnaK3*-Mutante in absteigenden Proteinkonzentrationen auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen und nach Western-Blot die Intensität der DnaK3-Bande quantifiziert. Hierbei wurde deutlich, dass trotz unvollständiger Segregation die Expression von DnaK3 in der Δ *dnaK3*-Mutante um etwa 70 % ($66,9 \pm 4,3$ %) reduziert war (Abb. 21 C).

Daraufhin wurde der Effekt der DnaK3-Depletion auf die Zellmorphologie von *Synechocystis* sp. mittels Elektronenmikroskopie untersucht (Abb. 22 A). Beim Vergleich der Ultrastruktur von Zellen des Wildtyps und Δ *dnaK3* konnten keine bedeutenden Unterschiede ausgemacht werden. Hierbei zeigte sich die Struktur der Thylakoide unverändert. Beim

Zählen der Thylakoidlamellen ließ sich jedoch eine Tendenz zu weniger Lamellen bei dem $\Delta dnaK3$ -Mutationsstamm feststellen (Abb. 22 B).

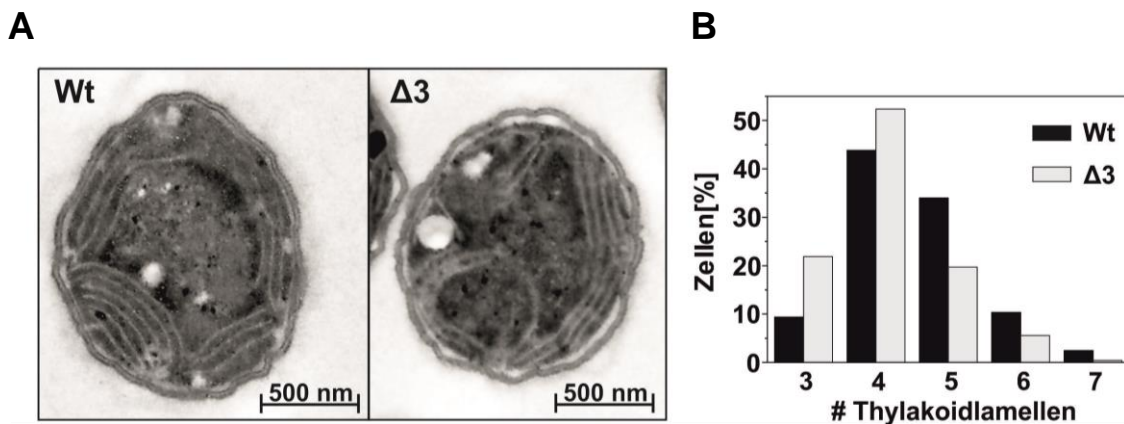


Abb. 22 Betrachtung der Ultrastruktur des *Synechocystis* sp.-Stamms $\Delta dnaK3$.

A) Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen (siehe 2.2.4.15) der *Synechocystis* sp.-Stämme Wt und $\Delta dnaK3$. Vermutlich sind die weißen Flächen auf die Verdampfung von Polyphosphatgranula durch den Elektronenstrahl zurückzuführen (Stanier, 1988). (In Zusammenarbeit mit Dr. Uwe Kahmann, Universität Bielefeld) B) Relative Anzahl von Wt- (schwarz) bzw. $\Delta dnaK3$ - (grau) Zellen mit einer bestimmten Anzahl von Thylakoidlamellen. Es wurden je Stamm die Thylakoide von mindestens 200 Zellen gezählt.

Unter den verwendeten Wachstumsbedingungen wurden beim Wildtyp-Stamm am häufigsten vier bis fünf Doppelmembranen gezählt, wogegen bei $\Delta dnaK3$ -Zellen häufiger drei bis vier Thylakoidlamellen auftraten und mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit fünf, sechs oder sieben Doppelmembranen (Abb. 22 B).

3.3.2 Physiologische Charakterisierung der Depletionsmutante $\Delta dnaK3$

Wegen der Möglichkeit einer beeinträchtigten Funktion der vorhandenen Thylakoide in $\Delta dnaK3$ -Zellen, wurde der Mutationsstamm im Vergleich zum Wildtyp (Wt)-Stamm, physiologisch charakterisiert. Aufgrund der lichtabhängigen Expression von DnaK3 erfolgte die Anzucht der *Synechocystis* sp.-Stämme unter Starklicht (*high light*, HL) und Schwachlicht (*low light*, LL), photomixotroph in Begasungsflaschen mit CO₂-angereicherter Luft in BG11-Medium (siehe 2.2.1.2). Für *Synechocystis* sp. ist bekannt, dass eine Starklicht-Adaptation mit einer Verringerung des Gehalts der Photosysteme, einem reduzierten PS I:PS II-Verhältnis und einer Abnahme der Chlorophyllkonzentration pro Zelle einhergeht (Murakami & Fujita, 1991; Muramatsu & Hihara, 2003). Demzufolge sollten die Messergebnisse des Wt-Stamms mit dem der DnaK3-Depletionsmutante $\Delta dnaK3$ verglichen und eingeordnet werden.

3.3.2.1 Pigmentzusammensetzung

Bei der Messung des Chlorophyllgehaltes pro OD_{750} zeigte der Wildtyp-Stamm unter Starklicht (WtHL) einen um etwa 50 % reduzierten Chlorophyllgehalt im Vergleich zu einer Kultivierung unter Schwachlicht (WtLL) (Abb. 23 B). Interessanterweise ließ sich eine stark verminderte Chlorophyllkonzentration bei dem Mutationsstamm $\Delta dnaK3$ unter Schwachlicht ($\Delta dnaK3LL$) feststellen, die vergleichbar mit der des WtHL-Stamms war und unter Starklicht ($\Delta dnaK3HL$) weiter abnahm. Anhand von Absorptionsspektren ganzer Zellen konnten Unterschiede in der Pigmentzusammensetzung beider Stämme verdeutlicht werden (Abb. 23 A). In allen Spektren der Stämme waren die charakteristischen Absorptionsmaxima für Chlorophyll (440 und 680 nm), für Carotinoide (490 nm) und Phycocyanin (625 nm) deutlich zu erkennen.

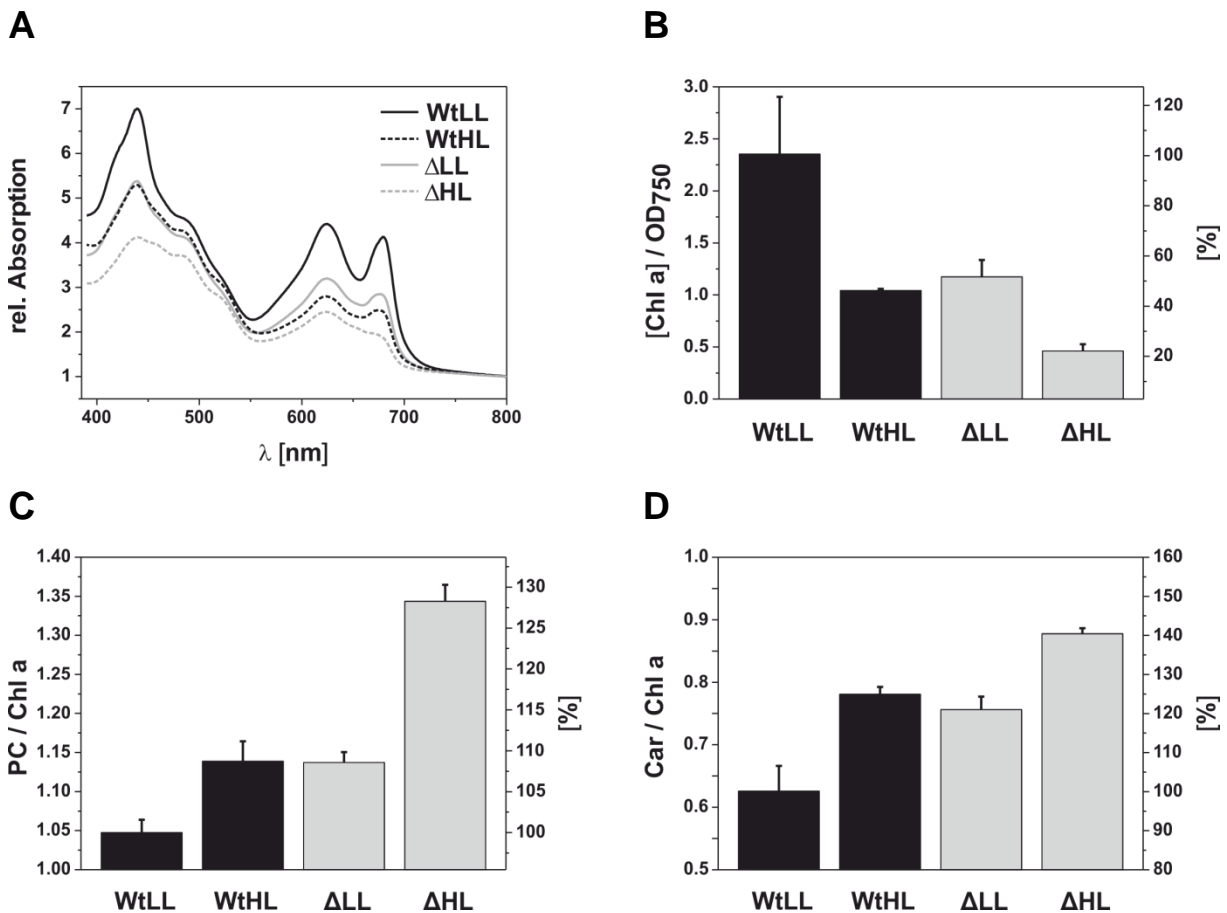


Abb. 23 Untersuchung der Pigmentzusammensetzung im *Synechocystis* sp.-Stamm $\Delta dnaK3$.

A) Absorptionsspektren (siehe 2.2.4.16) ganzer Zellen von Wildtyp (Wt) und Mutante ($\Delta dnaK3$) nach Anzucht unter Schwachlicht (LL) bzw. Starklicht (HL) normiert auf A_{800} . B) Chlorophyll a-Konzentration (siehe 2.2.4.8) bezogen auf OD_{750} von Wt (schwarz) und $\Delta dnaK3$ -Mutante (grau) unter Schwachlicht (LL) bzw. Starklicht (HL). C) Verhältnis zwischen Phycocyanin (A_{625}) und Chlorophyll a (A_{680}) von Wt (schwarz) und $\Delta dnaK3$ -Mutante (grau) nach Anzucht unter Schwachlicht (LL) bzw. Starklicht (HL). D) Verhältnis zwischen Carotinoiden (A_{490}) und Chlorophyll a (A_{440}) von Wt (schwarz) und $\Delta dnaK3$ -Mutante (grau) nach Anzucht unter Schwachlicht (LL) bzw. Starklicht (HL).

Über den Verlauf der Spektren konnte eine vergleichbare Pigmentzusammensetzung der Stämme WtHL und $\Delta dnaK3LL$ ausgemacht werden, die sich deutlich von dem des Wt-Stamms unter Schwachlicht unterschied. Dies zeigten auch die Verhältnisse von Phycocyanin bzw. Carotinoid zu Chlorophyll a (Abb. 23 C und D), welche mithilfe der ermittelten Absorptionsspektren berechnet wurden (siehe 2.2.4.16). Dabei zeigte der Wt-Stamm unter Starklicht ein im Vergleich zu Schwachlicht gesteigertes Phycocyanin:Chlorophyll- sowie Carotinoid:Chlorophyll-Verhältnis, und die Mutante wies unter Schwachlicht vergleichbare Werte wie der WtHL-Stamm auf. Bei der unter HL angezogenen Mutante konnte eine weitere Verlagerung der Pigmentverhältnisse in Richtung Phycocyanin und Carotinoide festgestellt werden, was bei der Betrachtung der Absorptionsspektren noch deutlicher wird (Abb. 23 A).

3.3.2.2 Stöchiometrie und Gehalt der Photosysteme

Da in *Synechocystis* sp. mehr als 80 % des zellulären Chlorophylls mit PS I assoziiert vorliegen und ein Abfall der Pigmentkonzentration meist mit einer Reduzierung des Gehalts an PS I verbunden ist (Shen et al., 1993), wurde die Stöchiometrie der Photosysteme mittels 77K-Fluoreszenzspektroskopie untersucht (Abb. 24 A). Nach Anregung der Chlorophylle bei 435 nm zeigten sich die charakteristischen Emissionsmaxima für PS I bei 721 nm und für PS II bei 684 nm und 693 nm. Dabei zeigte der WtHL-Stamm im Vergleich zum WtLL-Stamm ein geringeres PS I:PS II-Verhältnis, sichtbar durch ein verringertes Emissionsmaximum bei 721 nm (Abb. 24 A). Die $\Delta dnaK3$ -Mutante zeigte diese Abnahme bereits unter Schwachlicht und verringerte das Verhältnis weiter unter Starklichtbedingungen. Außerdem war bei den Stämmen $\Delta dnaK3LL$ und $\Delta dnaK3HL$ eine erhöhte Fluoreszenzemission bei 684 nm festzustellen, welche auf PS II und/oder auf nicht von Phycobilisomen auf die Photosysteme übertragene Energie zurückzuführen ist (Rakhimberdieva et al., 2007).

Infolgedessen wurde die Energieübertragung von den Phycobilisomen auf die einzelnen Photosysteme nach Anregung der Phycobiline bei 580 nm untersucht (Abb. 24 B). Verglichen mit dem WtLL-Stamm zeigte der WtHL-Stamm einen stärkeren Energietransfer zu PS II relativ zu PS I, sichtbar durch ein höheres Emissionsmaximum bei 693 nm in Relation zum Maximum bei 721 nm. Zudem wiesen die Spektren von den Stämmen WtHL und $\Delta dnaK3LL$ eine hohe Ähnlichkeit und somit eine vergleichbare Energieübertragung auf. Wie nach Anregung der Chlorophylle (Abb. 24 A) war auch nach Anregung der Phycobilisomen (Abb. 24 B) ein Anstieg der Emission bei 684 nm bei den Stämmen WtHL, $\Delta dnaK3LL$ und $\Delta dnaK3HL$, im Vergleich zum WtLL-Stamm zu beobachten.

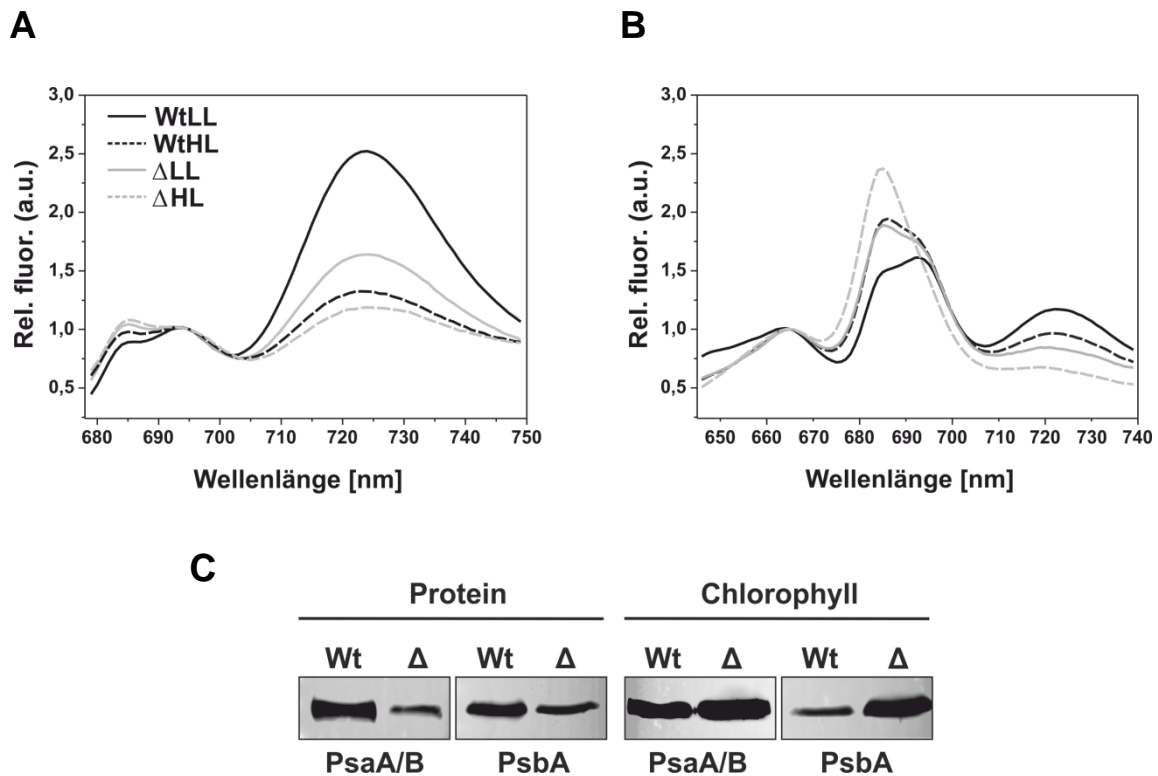


Abb. 24 Stöchiometrie und Gehalt der Photosysteme im *Synechocystis* sp. $\Delta dnaK3$ -Stamm.

Aus drei unabhängigen Messungen gemittelte 77K-Fluoreszenz-Spektren (siehe 2.2.4.17) ganzer Zellen von Wildtyp (Wt) und Mutante ($\Delta dnaK3$) nach Anzucht unter Schwachlicht (LL) bzw. Starklicht (HL) (siehe 2.2.1.2). A) Anregung von Chlorophyllen bei 435 nm und Normierung auf E_{693} . B) Anregung von Phycobilisomen bei 580 nm und Normierung auf E_{685} . C) Western-Blot-Analyse der Kern-Untereinheiten von PS I (PsaA/B) und PS II (PsbA) in Zellextrakten von Wildtyp (Wt) und $\Delta dnaK3$ (Δ) nach Anzucht unter Schwachlicht (LL). Die Auftragungen wurden auf Protein (25 μ g) bzw. Chlorophyll (0,6 μ g) normiert.

Durch eine Western-Blot-Analyse mit Antikörpern, die gegen die zentralen Untereinheiten der Photosysteme PS I (PsaA/PsaB) und PS II (PsbA) gerichtet waren, sollte der Proteinanteil beider Systeme genauer untersucht werden. Bei der Auftragung von Zellextrakten normiert auf Gesamtprotein zeigte der $\Delta dnaK3$ -Stamm schwächere Banden für PsaA/B (PS I) und PsbA (PS II) im Vergleich zum Wt-Stamm (Abb. 24 C links). Allgemein schien im Vergleich zum Wt-Stamm der Anteil der Photosysteme in der Mutante niedriger zu sein. Sehr deutlich war eine Reduktion des PS I im $\Delta dnaK3$ -Stamm zu beobachten. Mit der Normierung der Zellextrakte auf Chlorophyll erfolgte im Grunde auch eine Normierung auf PS I, da in *Synechocystis* sp. der überwiegende Anteil des zellulären Chlorophylls an PS I gebunden vorliegt (Shen et al., 1993). Auf diese Weise konnte beim $\Delta dnaK3$ -Stamm im Vergleich zum Wt-Stamm eine in etwa gleich starke Bande für PsaA/B (PS I) und eine stärkere Bande für PsbA (PS II) nachgewiesen werden (Abb. 24 C rechts), was auf das verringerte PS I:PS II-Verhältnis zurückzuführen war.

3.3.2.2 Photosynthetische Aktivität

Um die physiologischen Auswirkungen der beobachteten veränderten Zusammensetzung der Pigmente und der Photosysteme des $\Delta dnaK3$ -Mutationsstamms genauer zu untersuchen, wurde die photosynthetische Aktivität über die Messung der Sauerstoffproduktion bestimmt (Abb. 25). Durch die Zugabe von Natriumhydrogencarbonat bei der Messung war die zelluläre CO_2 -Konzentration kein limitierender Faktor und die Aktivität der gesamten photosynthetischen Elektronentransportkette konnte erfasst werden. Hierbei zeigte der starklichtadaptierte Wt-Stamm eine geringere Sauerstoffproduktion als bei Schwachlicht-Adaptation (O_2/OD_{750}) (Abb. 25). Für die schwachlichtadaptierte Mutante $\Delta dnaK3LL$ konnte eine zum WtHL-Stamm vergleichbare Sauerstoffentwicklung nachgewiesen werden. Die Mutante $\Delta dnaK3HL$ zeigte eine noch geringere Produktion als der $\Delta dnaK3LL$ -Stamm.

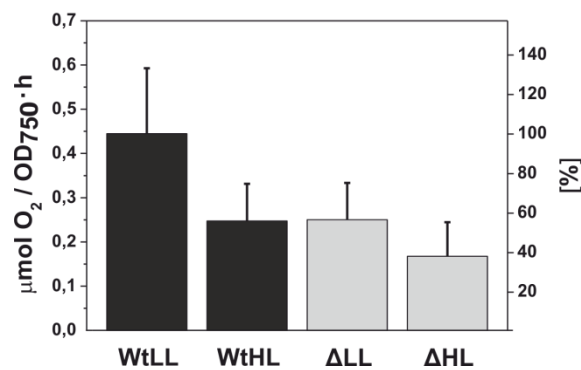


Abb. 25 Sauerstoffproduktion der *Synechocystis* sp.-Stämme Wt und $\Delta dnaK3$.

Graphische Darstellung der aus mindestens drei unabhängigen Messungen gemittelte O_2 -Produktion [$\mu\text{mol O}_2 / \text{OD}_{750}$] von Wildtyp (Wt) und Mutante $\Delta dnaK3$ (Δ) nach Anzucht unter Schwachlicht (LL) bzw. Starklicht (HL) nach Zugabe von HCO_3^- (siehe 2.2.1.2 und 2.2.4.18).

Aufgrund der tendenziell geringeren Sauerstoffproduktion der $\Delta dnaK3$ -Mutante, sollte die Funktionalität des PS II genauer untersucht werden. Durch Parameter der PAM (*Pulse Amplitude Modulated*)-Fluoreszenzmessung ist es möglich, die photochemische Effektivität des PS II zu beschreiben (siehe 2.2.4.19). Für diesen Zweck wurden von den Bakterienstämmen Dunkel-/Licht-Induktionskurven aufgezeichnet (Abb. 26 A). Zu Beginn der Messung war eine durch das eingeschaltete Messlicht hervorgerufene Grundfluoreszenz F_0 detektierbar. Dieses Messlicht besitzt allerdings eine so geringe Intensität, dass seine Energie nicht ausreicht, um die zentralen Chlorophylle der Photosysteme anzuregen und somit eine photosynthetische Aktivität hervorzurufen. Nach einem unmittelbar gegebenen sättigenden Lichtpuls lagen die Reaktionszentren aller PS II im reduzierten Zustand vor, sodass kein weiterer Elektronenfluss mehr möglich war. Die daraus resultierende maximale Fluoreszenz F_m ist als definierter Peak erkennbar (Abb. 26 A).

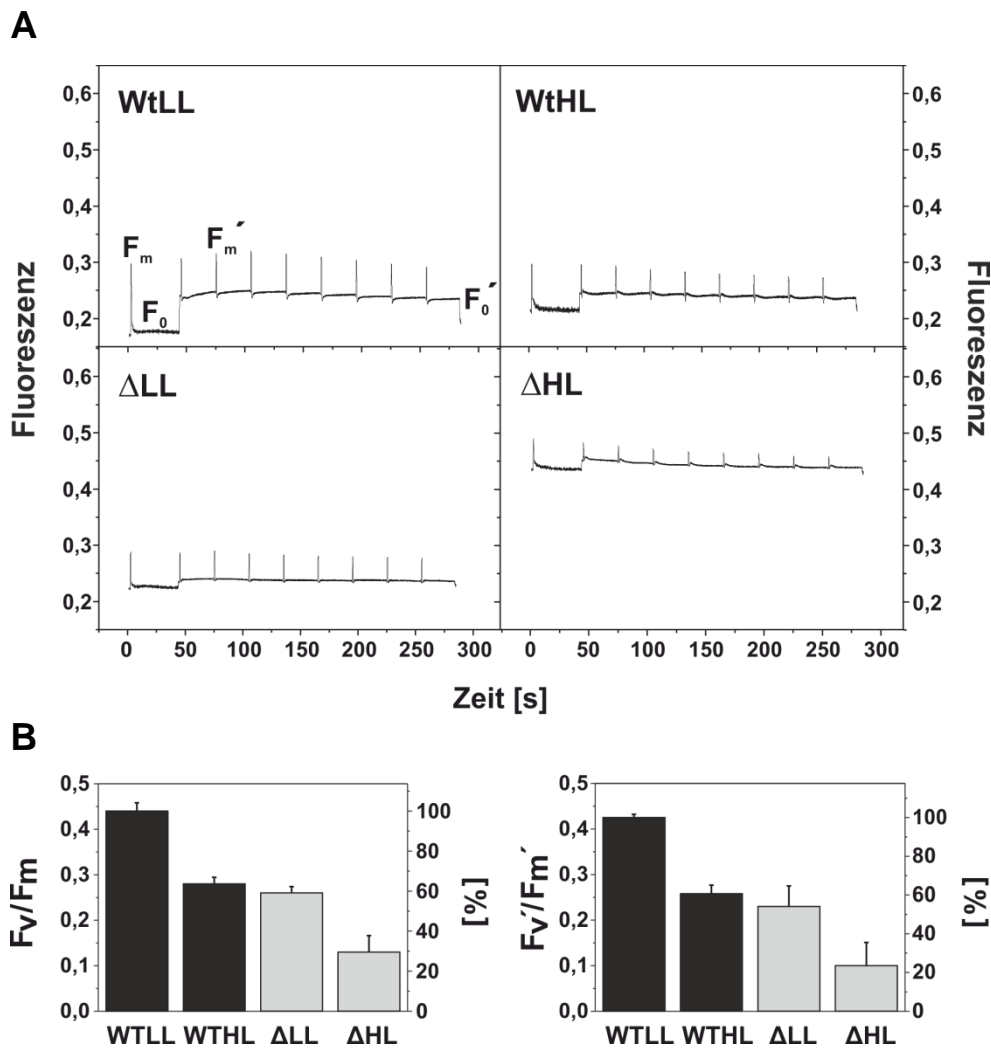


Abb. 26 PAM-Fluoreszenz-Messungen zur Bestimmung der photochemischen Aktivität des PS II der *Synechocystis* sp.-Stämme Wt und $\Delta dnaK3$.

A) Aus vier unabhängigen PAM-Fluoreszenz-Messungen gemittelte Dunkel-/Licht-Induktionskurven (siehe 2.2.4.19) ganzer Zellen von Wildtyp (Wt) und Mutante ($\Delta dnaK3$) nach Anzucht unter Schwachlicht (LL) bzw. Starklicht (HL). F_0 =Grundfluoreszenz im Dunkeln, F_0' =Grundfluoreszenz im Licht, F_m =maximale Fluoreszenz im Dunkeln, F_m' =maximale Fluoreszenz im Licht. B) Links: Auftragung der Parameter F_v/F_m zur Beschreibung der maximalen photochemischen Aktivität des PS II; Rechts: Auftragung der Parameter F_v'/F_m' zur Beschreibung der photochemischen Effektivität des PS II.

Allgemein kann eine maximale Chlorophyllfluoreszenz erreicht werden, wenn die Energieabgabe an die photosynthetische Elektronentransportkette (photochemisches Quenchen) oder die Freisetzung von Wärme (nicht-photochemisches Quenchen) minimal ist. Dies wurde durch Dunkeladaptation der Zellen vor der Messung und die Gabe des sättigenden Lichtpulses berücksichtigt. Der Parameter F_v/F_m konnte anschließend verwendet werden, um die maximale photochemische Aktivität des PS II zu bewerten (Abb. 26 B links). Dabei beschreibt die variable Fluoreszenz F_v die Differenz aus F_m und F_0 . Nach dem Zuschalten von photochemisch stark wirksamem Licht (aktinisches Licht), waren alle PS II-Zentren für die Photosynthese aktiviert und ein Anstieg der Grundfluoreszenz auf F_0' war zu beobachten (Abb. 26 A). Anschließend gegebene Starklichtpulse führten zu einem im

Vergleich zu F_m geringeren Fluoreszenzsignal F_m' , was auf nicht-photochemisches Quenchen zurückzuführen ist. Mit dem Parameter F_v'/F_m' kann der Teil der absorbierten Lichtenergie ermittelt werden, welcher in chemische Energie umgewandelt werden konnte, was auch als photochemische Effektivität des PS II bezeichnet wird (Abb. 26 B rechts). Bei der Betrachtung der Induktionskurven (Abb. 26 A) war beim WtHL-Stamm im Vergleich zum WtLL-Stamm eine Abnahme der Fluoreszenzsignale F_m und F_m' festzustellen. Dabei zeigten die Stämme WtHL und $\Delta dnaK3LL$ ähnlich starke Signale und der $\Delta dnaK3HL$ -Stamm Signale von noch geringerer Intensität. Bei den Messungen wurde bei den Stämmen WtHL und $\Delta dnaK3LL$ im Vergleich zum WtLL-Stamm ein moderater Anstieg der Grundfluoreszenz beobachtet, die beim $\Delta dnaK3HL$ -Stamm jedoch doppelt so stark auftrat. Diese Zunahme ist auf die Fluoreszenz der Phycobilisomen zurückzuführen, welche ebenfalls angeregt wurden (Campbell et al., 1998). Die Werte der maximalen photochemischen Aktivität bzw. der photochemischen Effektivität des PS II zeigten in der graphischen Darstellung ein ähnliches Bild (Abb. 26 B), mit einem geringeren Wert für den WtHL-Stamm im Vergleich zum WtLL-Stamm, vergleichbaren Werten für die Stämme WtHL und $\Delta dnaK3LL$ sowie stark reduzierte Werte für den $\Delta dnaK3HL$ -Stamm.

Der Redoxzustand der Elektronentransportkette ist ein wichtiger Indikator für den physiologischen Status einer Photosynthese betreibenden Zelle (Escoubas et al., 1995; Huner et al., 1996; Li & Sherman, 2000; Murakami & Fujita, 1991). Dieser konnte durch Messung der Dauer für die Re-Reduktion von oxidiertem PS I bestimmt werden (siehe 2.2.4.19). Mit Hilfe eines starken Lichtpulses wurde das PS I vollständig oxidiert, detektierbar über einen Anstieg der P700-Absorption, welche durch Reduktion des PS I über ein Elektron aus dem Plastochinon-Pool unmittelbar wieder abfiel (Abb. 27 A).

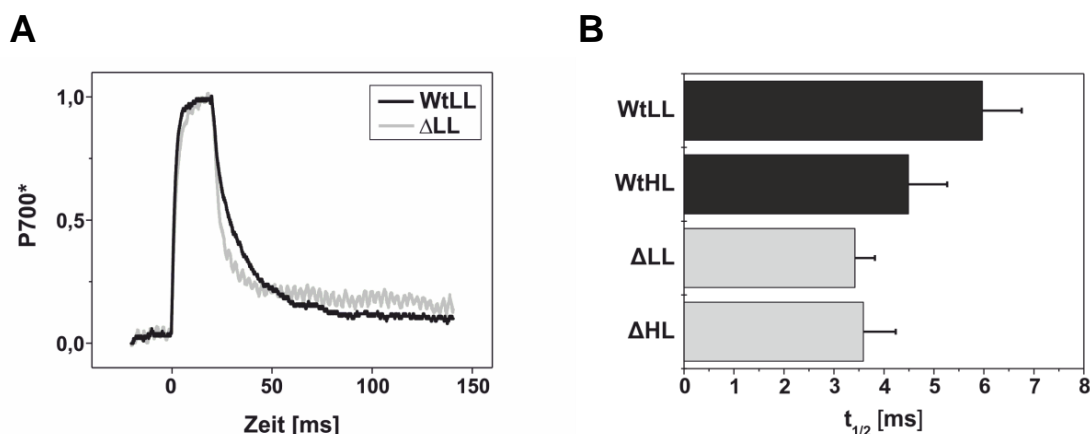


Abb. 27 PS I-Re-Reduktions-Kinetiken der *Synechocystis* sp.-Stämme Wt und $\Delta dnaK3$.

A) Graphische Darstellung der aus drei unabhängigen P700-Messungen (siehe 2.2.4.19) gemittelten Re-Reduktionskinetiken ganzer Zellen von Wildtyp (Wt) und Mutante ($\Delta dnaK3$) nach Zucht unter Schwachlicht (LL) bzw. Starklicht (HL). B) Im Säulendiagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der ermittelten Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der Re-Reduktion dargestellt.

Aus den daraus ermittelten Kurvenverläufen ist für den $\Delta dnaK3LL$ -Stamm ein schnellerer Abfall des Absorptionssignals als beim WtLL-Stamm zu beobachten (Abb. 27 A). Die Halbwertszeit dieser Re-Reduktion konnte nach dem Anpassen der Kinetikdaten über eine exponentielle Funktion ersten Grades bestimmt werden (Abb. 27 B). Für die Mutante $\Delta dnaK3$ war eine signifikant geringere Halbwertszeit im Vergleich zum WtLL-Stamm zu bestimmen, was auf eine stärker reduzierte Elektronentransportkette hindeutet.

3.3.2.3 Wachstumsverhalten

Interessanterweise hatten die durch die DnaK3-Depletion hervorgerufenen physiologischen Veränderungen keine Auswirkung auf das Wachstumsverhalten des $\Delta dnaK3$ -Stammes unter Schwach- oder Starklicht (Abb. 28). Unter beiden Wachstumsbedingungen zeigten Wildtyp und Mutante vergleichbare Verdopplungszeiten mit $11,2 \text{ h} \pm 0,1$ bzw. $11,1 \text{ h} \pm 0,2$ für die Stämme WtLL bzw. $\Delta dnaK3LL$ und mit $8,1 \text{ h} \pm 0,5$ bzw. $9,4 \text{ h} \pm 1,2$ für die Stämme WtHL bzw. $\Delta dnaK3HL$.

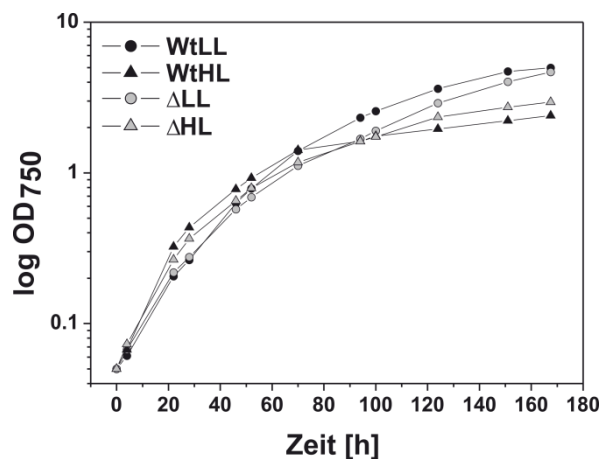


Abb. 28 Wachstumsverhalten der *Synechocystis* sp.-Stämme Wt und $\Delta dnaK3$ bei Schwach- bzw. Starklichtbedingungen.

Zu Beginn wurden die Kulturen auf $OD_{750} = 0,05$ eingestellt und die OD der untersuchten Stämme bis zum Erreichen der stationären Phase zweimal täglich bestimmt (siehe 2.2.2.1). Die Zucht erfolgte photomixotroph, in Begasungsflaschen mit CO_2 angereicherter Luft, unter Zugabe von 5 mM Glukose und 80 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin, mit Schwach- (20 μE) bzw. Starklicht (120 μE) (siehe 2.2.1.2). Wegen des verwendeten Antibiotikums bei der Kultivierung des $\Delta dnaK3$ -Stamms wurde zur besseren Vergleichbarkeit *SynechocystisKan^R* als Wildtyp eingesetzt (siehe 2.1.3).

3.4 Die Rolle der DnaK-Proteine bei der Proteinbiosynthese und beim Proteintransport

Das Protein *Trigger Factor* (TF) ist befähigt, als erstes Chaperon mit naszierenden Polypeptidketten zu interagieren und sie vor Aggregation zu schützen (Deuerling & Bukau, 2004; Lill et al., 1988). Dennoch ist das Protein in *E. coli* nicht essentiell und eine Deletion des Genlokus führte zu keinen physiologischen Defekten (Deuerling et al., 1999). Auch das Hitzeschockprotein DnaK, welches das einzige DnaK-Protein in *E. coli* darstellt, ist unter Standardbedingungen in *E. coli* deletierbar (Bukau & Walker, 1989). Im Gegensatz dazu führte eine kombinierte Deletion der Gene *tig* (*trigger factor*) und *dnaK* zu einer synthetischen Lethalität, was für eine kooperative Funktion dieser Chaperone spricht (Deuerling et al., 1999; Genevaux et al., 2004; Teter et al., 1999). Eine Depletion des *tig*-Gens im *E. coli*-Stamm $\Delta dnaK$ führte zu einer massiven Aggregation von Proteinen in der Zelle und unterstreicht somit die Bedeutung von DnaK und TF bei der Faltung neusynthetisierter Polypeptide (Calloni et al., 2012; Deuerling et al., 1999).

Um zu untersuchen, ob TF auch in *Synechocystis* sp. deletierbar ist, wurde das Gen *tig* im Plasmid pCR2.1 durch eine Chloramphenicol-Resistenzkassette unterbrochen und in *Synechocystis* sp.-Zellen transformiert, wobei es über homologe Rekombination das wildtypische Gen ersetzen sollte (Rupprecht, 2007). Nach sequenzieller Überimpfung auf BG11-Platten mit steigenden Antibiotikum-Konzentrationen, erfolgte die Überprüfung der Deletion mittels analytischer PCR. Die verwendeten Primer flankierten das *tig*-Gen und ermöglichten somit die Unterscheidung zwischen wildtypischer und unterbrochener Gensequenz, sichtbar durch einen Größenunterschied der PCR-Produkte nach Agarosegel-Elektrophorese (Abb. 29 A und B).

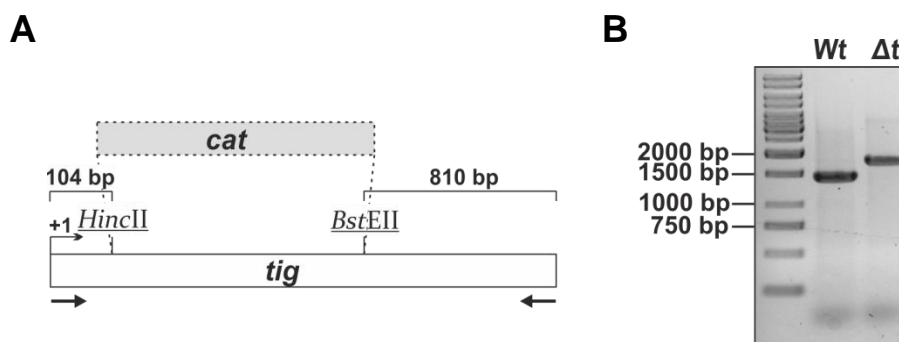


Abb. 29 Deletion von *trigger factor* in *Synechocystis* sp.

A) Die mit Hilfe der Primer NTCmR und CTCmR amplifizierte Chloramphenicol-Resistenzkassette (*cat*) wurde mittels *blunt end*-Klonierung durch die Enzyme *HincII* und *BstEII* in die Gensequenz von *trigger factor* (*tig*) eingeführt (in Zusammenarbeit mit Eva Rupprecht). Die *tig*-flankierenden Primer sind als Pfeil dargestellt. B) Agarosegel-Elektrophorese nach analytischer PCR zur Überprüfung der Deletion des *trigger factor*-Gens im *Synechocystis* sp.-Stamm Δtig (Δt) mit *tig*-flankierenden Primern NTtf und CTtf (Tab. 5). Zur Kontrolle wurde das PCR-Produkt mit wildtypischer DNA aufgetragen (Wt). Anhand des Größenunterschieds der PCR-Produkte durch die eingeführte Resistenzkassette, lassen sich die wildtypische und unterbrochene Gensequenz voneinander unterscheiden.

Die Auftragung des PCR-Produkts der Mutante Δtig zeigte eine einzige Bande oberhalb der 1500 bp-Markerbande, was auf eine vollständige Unterbrechung aller Genomkopien schließen lässt. Dies konnte zudem über Western-Blot-Analyse bestätigt werden, bei welcher im Zellextrakt des Stamms Δtig kein TF-Protein detektiert werden konnte (Abb. 31).

In *Synechocystis* sp. ist von den drei codierten Hsp70-Proteinen nur DnaK1 vollständig deletierbar (Rupprecht et al., 2007b). Um zu untersuchen, ob die vermutlich kooperativen funktionellen Eigenschaften von Hsp70-Proteinen und TF ähnlich wie in *E. coli* auch in *Synechocystis* sp. eine wichtige physiologische Bedeutung haben, wurde versucht *tig* im *Synechocystis* sp.-Stamm $\Delta dnaK1$ (Rupprecht et al., 2007b) zu deletieren. Die PCR-Analyse mit *tig*- bzw. *dnaK1*-flankierenden Primern zeigte nach anschließender Agarosegel-Elektrophorese, dass beide Gene in allen Genomkopien des Stamms $\Delta dnaK1 \Delta tig$ deletiert vorlagen (Abb. 30 B). Zur Unterscheidung von wildtypischer und unterbrochener Gensequenz, wurden die Produkte der PCR-Analyse mit *dnaK1*-flankierenden Primern mit Hilfe des Restriktionsenzym *Bgl*II verdaut, dessen Schnittstelle über die Kanamycin-Resistenzkassette eingeführt wurde (Abb. 30 A). Infolgedessen zeigte nur der Wildtyp nach dem Restriktionsverdau eine Bande auf Höhe der 2000 bp-Markerbande, da hier keine Schnittstelle für *Bgl*II vorhanden war (Abb. 30 B). Über die Immunoblot-Analyse konnte die vollständige Deletion von *tig* und *dnaK1* bestätigt werden (Abb. 31).

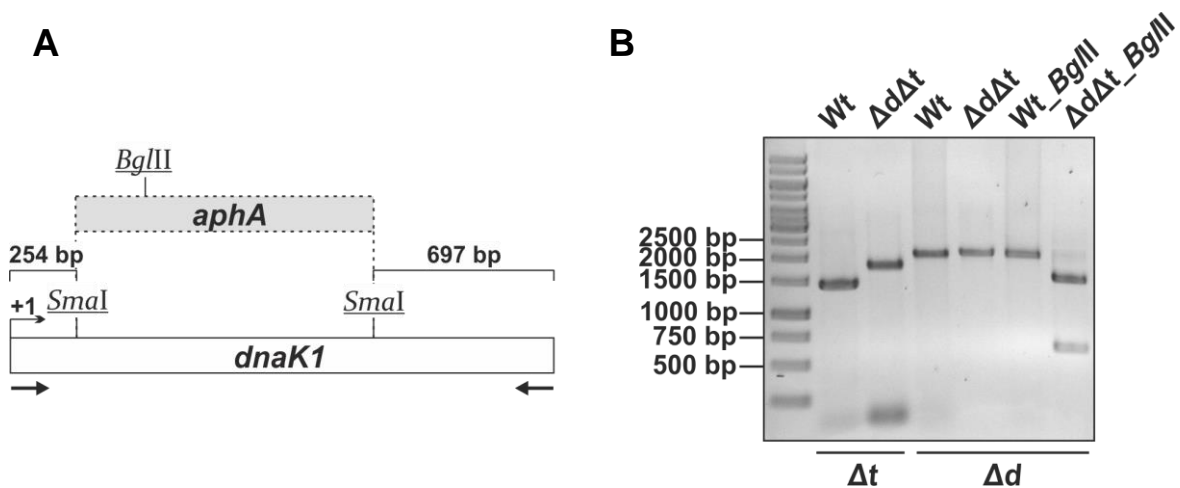


Abb. 30 Doppeldelation von *trigger factor* und *dnaK1* in *Synechocystis* sp.

A) Schematische Darstellung der Unterbrechung der *dnaK1*-Gensequenz in *Synechocystis* sp. durch Einführung einer Kanamycin-Resistenzkassette (*aphA*), die eine *Bgl*II-Restriktionsschnittstelle trägt (Rupprecht et al., 2007b). Die *dnaK1*-flankierenden Primer sind als Pfeil dargestellt (siehe Tab. 5). B) Agarosegel-Elektrophorese nach analytischer PCR zur Überprüfung der kombinierten Deletion von *tig* (Δt) (vergleiche Abb. 29) und *dnaK1* (Δd) in *Synechocystis* sp. mit den Primern NTtf und CTtf bzw. NTdnaK1 und CTdnaK1. Zur Kontrolle wurden die Produkte der PCR-Analyse mit wildtypischer DNA aufgetragen (Wt). Zur Unterscheidung von wildtypischer und unterbrochener Gensequenz, wurden die Produkte der PCR-Analyse mit *dnaK1*-flankierenden Primern mit Hilfe des Restriktionsenzym *Bgl*II verdaut.

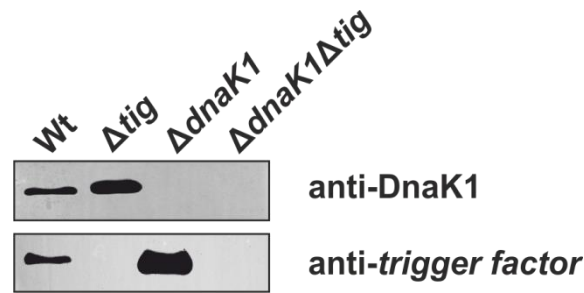


Abb. 31 Western-Blot-Analyse zur Kontrolle der Einzel- bzw. Doppeldeletion von *tig* und *dnaK1*. Western-Blot-Analyse von Zellextrakten aus den *Synechocystis* sp.-Mutationsstämmen Δtig , $\Delta dnaK1$, $\Delta dnaK1\Delta tig$ im Vergleich zu Zellextrakt aus *Synechocystis* sp.-Wildtyp (Wt) zur Überprüfung der Einzel- bzw. Doppeldeletion von *tig* und *dnaK1* mit den Antikörpern anti-DnaK1 und anti-Trigger Factor. (In Zusammenarbeit mit Linda Manhart).

Um die Viabilität der *Synechocystis* sp. $\Delta dnaK1\Delta tig$ -Doppeldeletionsmutante zu untersuchen, wurde das Wachstumsverhalten unter Standardbedingungen (30 °C) und Hitzestress (42 °C) getestet (Abb. 32).

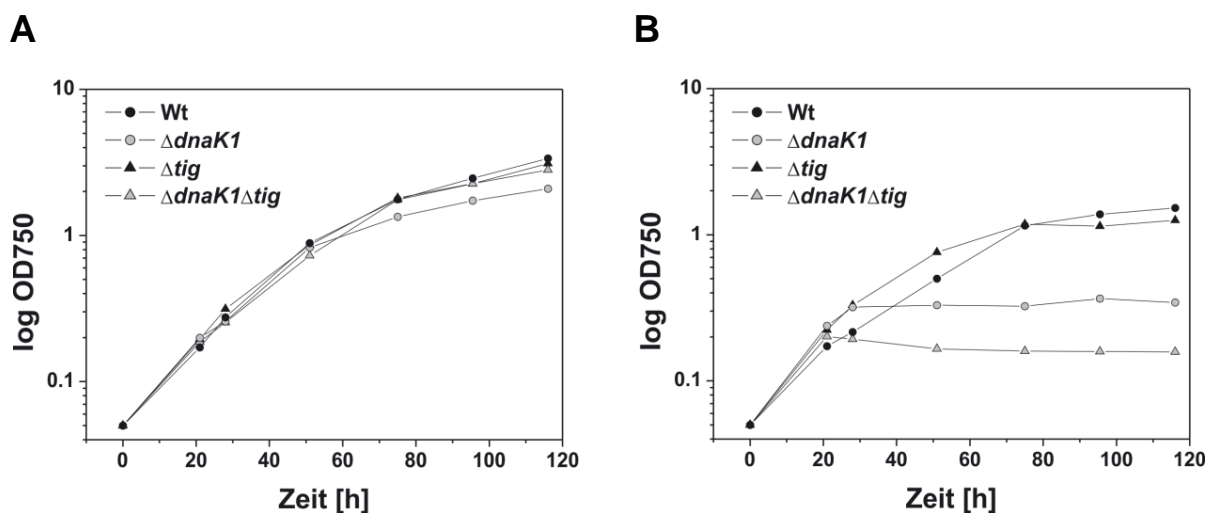


Abb. 32 Wachstumsverhalten der *Synechocystis* sp.-Deletionsstämme $\Delta dnaK1$, Δtig und $\Delta dnaK1\Delta tig$ unter A) Standardbedingungen bei 30 °C oder B) Hitzestress bei 42 °C.

Zu Beginn wurden die Kulturen auf $OD_{750} = 0,05$ eingestellt und die OD der untersuchten in *Synechocystis* sp.-Stämme bis zum Erreichen der stationären Phase täglich bestimmt. Die Kultivierung erfolgte photomixotroph in Gegenwart von 5 mM Glukose ohne Antibiotika.

Dabei zeigte sich für alle Mutationsstämme ein wildtypisches Wachstum unter Standardbedingungen (Abb. 32 A), jedoch ein Wachstumsdefekt der Mutanten $\Delta dnaK1$ und $\Delta dnaK1\Delta tig$ bei 42 °C (Abb. 32 B). Bezüglich des Chlorophyllgehalts und der photosynthetischen Aktivität konnten keine signifikanten Unterschiede zu wildtypischen Zellen festgestellt werden (siehe Anhang Abb. A1).

Anhand von Immunoblot-Analysen sollte anschließend die Auswirkung der vollständigen Deletion der Gene *dnaK1* und *tig* auf die Expression anderer Chaperone untersucht werden. Hierfür wurden Zellextrakte des Wildtyps und des jeweiligen Mutationsstammes in absteigenden Chlorophyll-Konzentrationen nebeneinander aufgetragen und nach SDS-

PAGE mittels Immunoblotting, unter Verwendung entsprechender Antikörper, analysiert und mit dem Programm *ImageJ* (National Institutes of Health, USA) quantifiziert. Dabei zeigte der Δtig -Stamm einen um $64 \pm 37\%$ erhöhten Gehalt an DnaK1 im Vergleich zum Wt-Stamm (Abb. 33 A) und analog der $\Delta dnaK1$ -Stamm einen um $43 \pm 15\%$ erhöhten Gehalt an *Trigger Factor* (Abb. 33 B).

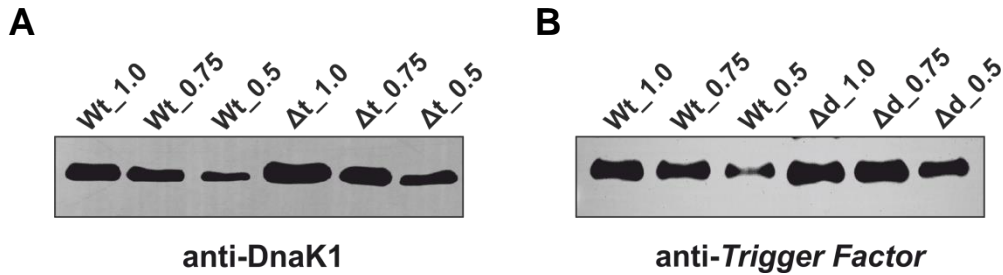


Abb. 33 Analyse der Expression von DnaK1 bzw. *Trigger Factor* in den *Synechocystis* sp.-Mutationsstämmen A) Δtig und B) $\Delta dnaK1$.

Immunoblot-Analyse nach SDS-PAGE von Zellextrakten des Wt-Stamms (Wt) und der Mutationsstämmen Δtig (Δt) sowie $\Delta dnaK1$ (Δd) mit absteigender Chlorophyllkonzentration und den Antikörpern anti-DnaK1 und anti-*Trigger Factor*. 100 % Chlorophyll (1.0) entsprechen bei A) 0,192 μg Chlorophyll und bei B) 0,45 μg Chlorophyll. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm *ImageJ* (National Institutes of Health, USA) aus mindestens zwei unabhängigen Western-Blots und einer Bestimmung von mindestens vier Banden. (In Zusammenarbeit mit Linda Manhart).

Darüber hinaus konnte in den Mutationsstämmen eine verstärkte Expression von DnaK2 dokumentiert werden (Abb. 34 A). Dabei zeigte die Deletion von *tig* den stärksten Effekt, mit einem um etwa 4-fach erhöhten Gehalt bei den Stämmen Δtig ($237 \pm 33\%$) und $\Delta dnaK1\Delta tig$ ($235 \pm 61\%$) im Vergleich zum Wt-Stamm und einer um etwa 2-fach verstärkten Expression beim $\Delta dnaK1$ -Mutationsstamm ($100 \pm 37\%$). Die Mutante Δtig zeigte einen Anstieg des Gehalts an DnaK3 von $42 \pm 21\%$ im Vergleich zum Wt-Stamm. Demgegenüber war bei den Deletionsstämmen $\Delta dnaK1$ ($-37 \pm 5\%$) und $\Delta dnaK1\Delta tig$ ($-44 \pm 10\%$) eine Abnahme des Gehalts an DnaK3 von etwa 40 % feststellbar (Abb. 34 B). Aufgrund der Verwendung des Antikörpers $\alpha\text{DnaK3VL}$ trat in der Western-Blot-Analyse eine weitere Bande auf, die mit einem Stern markiert und bei der Quantifizierung nicht berücksichtigt wurde (siehe auch 3.2.1).

Zur besseren Übersicht sind die Expressionsänderungen der Chaperone in den jeweiligen Mutationsstämmen in Tab. 10 zusammengefasst.

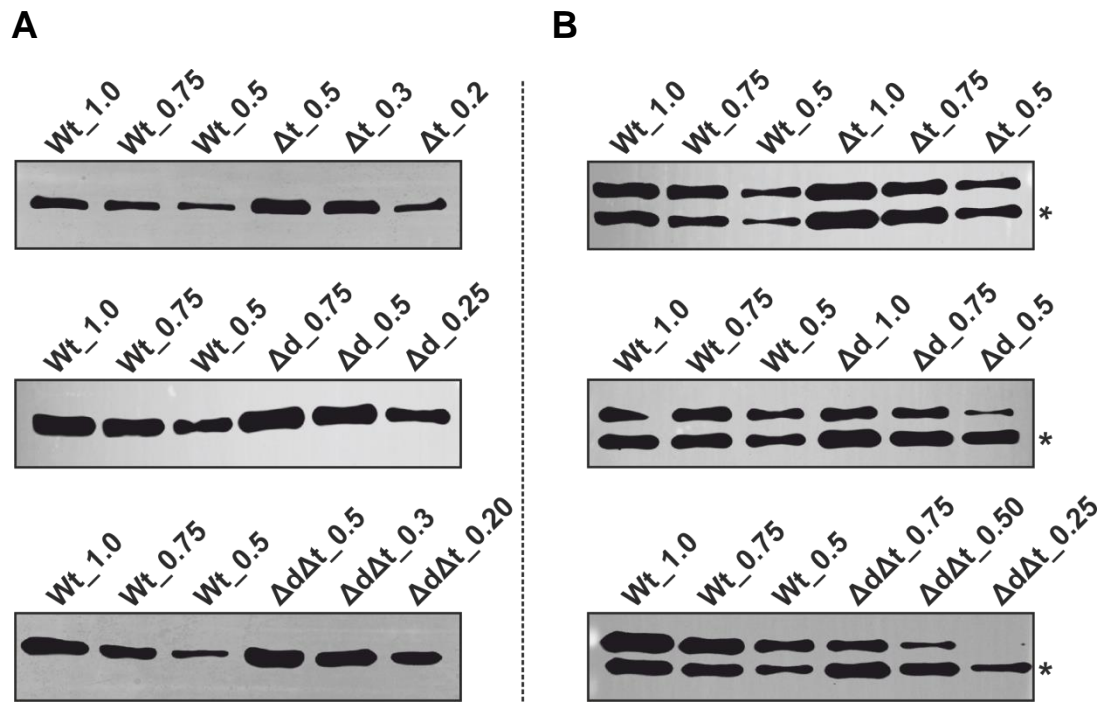


Abb. 34 Analyse der Expression von A) DnaK2 bzw. B) DnaK3 in den *Synechocystis* sp.-Mutationsstämmen Δtig , $\Delta dnaK1$ und $\Delta dnaK1\Delta tig$.

Immunoblot-Analyse nach SDS-PAGE von Zellextrakten mit absteigender Chlorophyllkonzentration A) Δtig (Δt) und $\Delta dnaK1$ (Δd) 100 % (1.0) = 0,107 μ g Chlorophyll, $\Delta dnaK1\Delta tig$ ($\Delta d\Delta t$) 100 % = 0,134 μ g Chlorophyll B) Δtig (Δt) 100 % = 0,14 μ g Chlorophyll, $\Delta dnaK1$ (Δd) 100 % = 0,19 μ g Chlorophyll, $\Delta dnaK1\Delta tig$ ($\Delta d\Delta t$) 100 % = 0,25 μ g Chlorophyll. Es wurden die Antikörper anti-DnaK2 und anti-DnaK3VL eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm *ImageJ* (National Institutes of Health, USA) aus mindestens zwei unabhängigen Western-Blots und einer Bestimmung von mindestens vier Banden. Die zusätzliche, vermutlich unspezifische Bande unter der Bande für DnaK3, wurde mit einem Stern markiert und bei der Quantifizierung nicht berücksichtigt. (In Zusammenarbeit mit Linda Manhart).

Tab. 10 Expressionsänderungen von *Trigger Factor* sowie DnaK1, 2 und 3 in den *Synechocystis* sp.-Mutationsstämmen Δtig , $\Delta dnaK1$ und $\Delta dnaK1\Delta tig$.

Im Vergleich zum Wt-Stamm (+) verstärkte Expression, (++) sehr verstärkte Expression, (-) verringerte Expression

<i>Synechocystis</i> sp. Stamm	Protein			
	<i>Trigger Factor</i>	DnaK1	DnaK2	DnaK3
Δtig		+	++	+
$\Delta dnaK1$	+		+	-
$\Delta dnaK1\Delta tig$			++	-

3.5 Untersuchung zur Übertragung spezifischer Funktionen durch Neukombination der C-terminalen DnaK-Domänen

Die drei in *Synechocystis* sp. kodierten DnaK-Proteine weisen eine hohe Sequenzidentität in der N-terminalen Nukleotidbindedomäne auf und unterscheiden sich durch einen variablen C-Terminus, der einen Teil der Substratbindedomäne mit einschließt (Rupprecht et al., 2007b). Somit scheint die DnaK-spezifische Funktion vom C-Terminus abhängig zu sein. Ähnlich wie in Komplementationsstudien mit chimären DnaK-Proteinen in *E. coli* gezeigt (Mogk et al., 1999; Suppini et al., 2004), sollte durch die Neu-Kombination der C-terminalen DnaK-Domänen in *Synechocystis* sp. untersucht werden, ob es möglich ist, die DnaK-spezifische Funktion mit zu übertragen. Hierfür wurden 5'- und 3'-terminale Sequenzen der jeweiligen *dnaK*-Gene, welche die N- und C-terminalen Proteindomänen repräsentieren, einzeln amplifiziert und über Primer Schnittstellen eingeführt (Abb. 35).

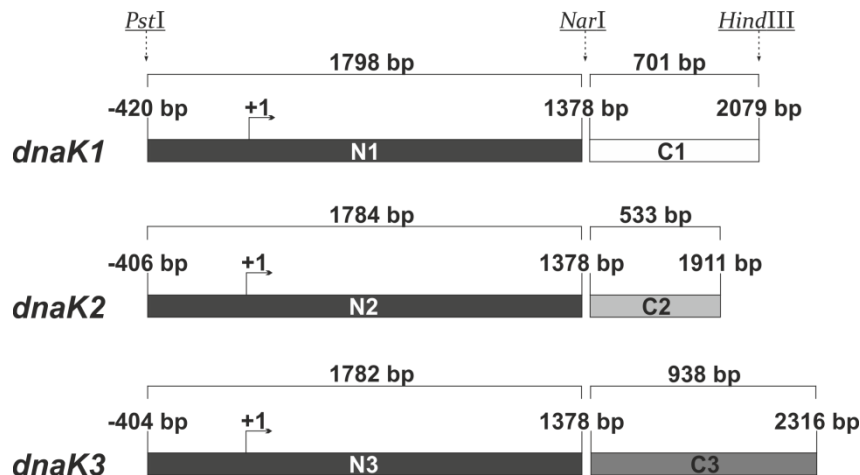


Abb. 35 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für den kombinierten Domänen-austausch der drei DnaK-Proteine aus *Synechocystis* sp.

Mittels PCR und spezifischen Primern (Tab. 5) wurden die 5'- und 3'-terminalen DNA-Sequenzen der drei *dnaK*-Gene welche die N- und C-terminalen Proteindomänen repräsentieren, amplifiziert und Restriktionsschnittstellen eingeführt (*PstI/NarI* bzw. *NarI/HindIII*). Die vorgelagerten Promotorsequenzen wurden mit etwa 400 bp berücksichtigt. Die 5'- und 3'-terminalen Fragmente wurden nach einem TA-Klonierungsschritt im Plasmid pILA miteinander neu kombiniert.

Die 5'- und 3'-terminalen Fragmente der jeweiligen *dnaK*-Gene (Abb. 35) wurden in verschiedenen Kombinationen in das Plasmid pILA kloniert und in *Synechocystis* sp. transformiert, wodurch über homologe Rekombination eine Integration der Konstrukte an eine neutrale Stelle im Genom (*slr0168* (Kunert et al., 2000)) erzielt werden sollte (Abb. 37). Des Weiteren wurden die drei *dnaK*-Gene amplifiziert und nach Klonierung in das Plasmid pRSET6a mit einer Chloramphenicol-Resistenz-Kassette unterbrochen (Abb. 36). Die am 5'- und 3'-Ende verbliebenen *dnaK*-Sequenzen sollten anschließend zur homologen Rekombination des Deletionskonstrukts in die wildtypische Gensequenz in *Synechocystis* sp. dienen.

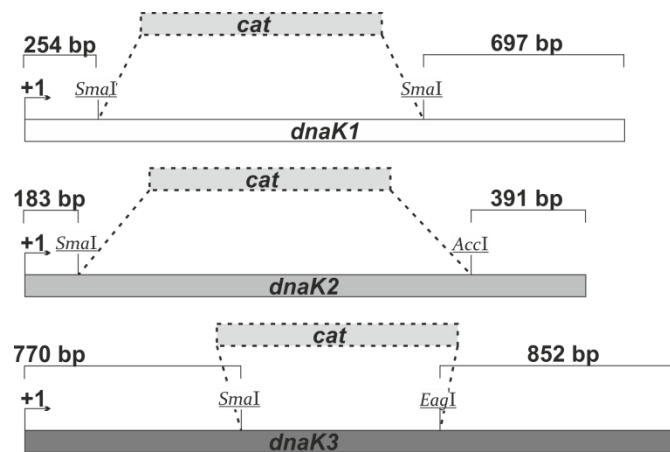


Abb. 36 Klonierung der Konstrukte zur Deletion der *dnaK*-Gene.

Nach Amplifikation der *dnaK*-Gensequenzen (Tab. 5) erfolgte die Klonierung in pRSET6a über *Nde*I/*Bam*HI bzw. *Nde*I/*Hind*III. Die mit Hilfe der Primer NTCmR und CTCmR amplifizierte Chloramphenicol-Resistenzkassette (*cat*) wurde mittels *blunt end*-Klonierung durch die Enzyme *Sma*I, *Acc*I und *Eag*I in die jeweilige *dnaK*-Sequenz eingeführt.

Die generierten Deletionskonstrukte wurden in die sechs *Synechocystis* sp.-Stämme mit den jeweils integrierten neu kombinierten *dnaK*-Gensequenzen transformiert, sodass letztlich 12 verschiedene Stämme erstellt wurden (Abb. 37).

Stamm Bezeichnung	neukombiniertes <i>dnaK</i> im Genom von <i>Synechocystis</i> sp.	zu deletierendes <i>dnaK</i> -Gen
12Δ1	--- N1 C2 ---	--- <i>dnaK1</i> ---
12Δ2	--- N1 C2 ---	--- <i>dnaK2</i> ---
13Δ1	--- N1 C3 ---	--- <i>dnaK1</i> ---
13Δ3	--- N1 C3 ---	--- <i>dnaK3</i> ---
21Δ2	--- N2 C1 ---	--- <i>dnaK2</i> ---
21Δ1	--- N2 C1 ---	--- <i>dnaK1</i> ---
23Δ2	--- N2 C3 ---	--- <i>dnaK2</i> ---
23Δ3	--- N2 C3 ---	--- <i>dnaK3</i> ---
31Δ3	--- N3 C1 ---	--- <i>dnaK3</i> ---
31Δ1	--- N3 C1 ---	--- <i>dnaK1</i> ---
32Δ3	--- N3 C2 ---	--- <i>dnaK3</i> ---
32Δ2	--- N3 C2 ---	--- <i>dnaK2</i> ---

Abb. 37 Übersicht der generierten *Synechocystis* sp.-Stämme mit neukombiertem *dnaK*-Gen und das zu deletierende wildtypische *dnaK*-Gen.

Die sechs neukombinierten *dnaK*-Gene (Abb. 35) im Plasmid pILA wurden in *Synechocystis* sp. transformiert, wodurch über homologe Rekombination eine Integration der Konstrukte an eine neutrale Stelle im Genom erfolgen sollte. In diesen Stämmen sollte untersucht werden, ob es mit Hilfe der Expression der chimären Proteine möglich ist, die entsprechenden wildtypischen *dnaK*-Gene zu deletieren (Abb. 36).

In diesen Stämmen wurde untersucht, ob die exprimierten chimären DnaK-Proteine die Funktion des jeweils zu deletierenden DnaK-Proteins übernehmen können und es somit möglich ist, das entsprechende Gen vollständig zu deletieren. Zu diesem Zweck wurden Klone der einzelnen Stämme über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr nacheinander auf BG11-Platten mit steigenden Antibiotika-Konzentrationen überimpft. Eine Überprüfung der Klone erfolgte über analytische PCR nach Isolierung genomischer DNA. Die Integration der neu kombinierten *dnaK*-Sequenzen wurde mit Hilfe von spezifischen Primern untersucht, welche die rekombinante Sequenz in pLA flankierten (Abb. 38). Als Kontrolle diente das entsprechende Konstrukt im Plasmid pLA und wildtypische DNA. Dabei konnte in allen 12 Stämmen eine Integration der neu kombinierten *dnaK*-Sequenzen nachgewiesen werden (Abb. 38).

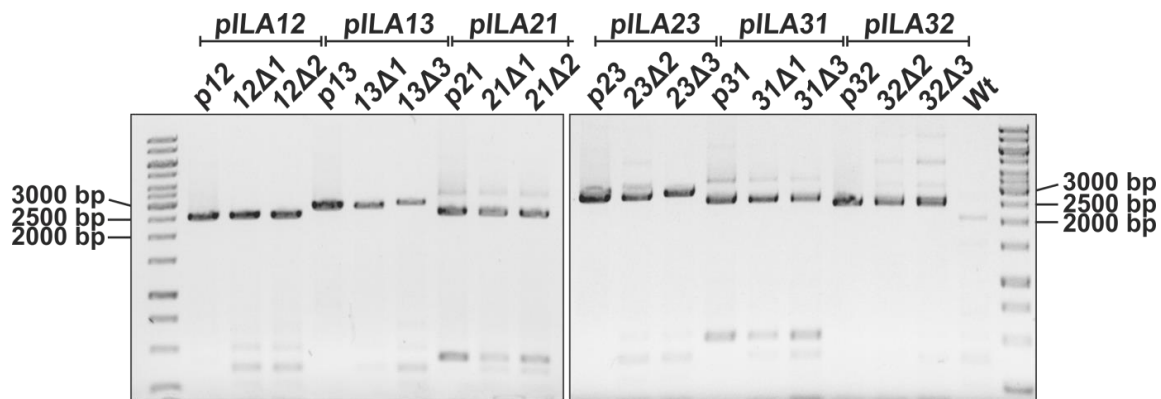


Abb. 38 PCR-Analyse zur Überprüfung der Integration der neu kombinierten *dnaK*-Gensequenzen in *Synechocystis* sp.

Nach Isolierung genomischer DNA aus den 12 *Synechocystis* sp.-Stämmen (Abb. 37) und PCR mit spezifischen Primern (pLAseq/pLAseqfusion) erfolgte eine Agarosegel-Elektrophorese (siehe 2.2.3.8). Die verwendeten Primer flankierten die rekombinante Gensequenz in pLA. Anhand der Kontrolle mit dem jeweiligen Konstrukt im Plasmid pLA (z.B. p12) konnte die Integration in das *Synechocystis* sp.-Genom überprüft werden (Abb. 37).

Daneben wurde die Deletion der drei *dnaK*-Gene in den 12 Stämmen mittels Segregations-PCR untersucht, wobei es durch den Vergleich mit wildtypischer DNA möglich ist, eine vollständige bzw. unvollständige Segregation aufzuzeigen. Als zusätzliche Kontrolle dienten dabei die Deletionskonstrukte im Plasmid pRSET6a. Die in der PCR verwendeten Primer flankierten den Genbereich im jeweiligen *dnaK*-Gen, in welchen die Resistenzkassette eingeführt wurde. Dabei ergab sich im Vergleich zur wildtypischen Gensequenz ein Größenunterschied des PCR-Produktes. Eine vollständige Segregation konnte bei allen Stämmen mit beabsichtigter *dnaK1*-Deletion nachgewiesen werden (Abb. 39 A). Im Gegensatz dazu zeigten die Stämme mit beabsichtigter *dnaK2*- und *dnaK3*-Deletion keine vollständige Segregation, da eine der zwei Banden im Agarosegel noch vorhandene wildtypische Genkopien repräsentierte (Abb. 39 B und C).

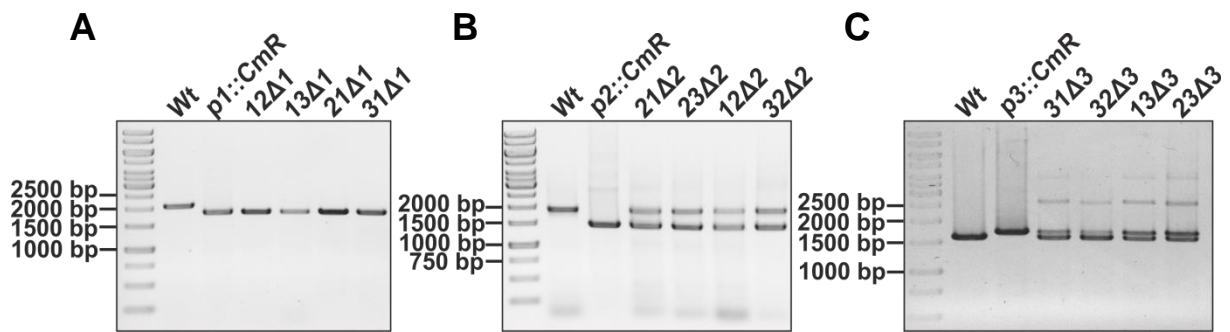


Abb. 39 PCR-Analyse zur Überprüfung der Segregation der *dnaK*-Gene in *Synechocystis* sp.-Stämmen mit integrierter neu kombinierter *dnaK*-Sequenz.

Agarosegel-Elektrophorese nach PCR mit isolierter genomischer DNA aus den 12 *Synechocystis* sp.-Stämmen (Abb. 37) und *dnaK*-spezifischen Primern (Tab. 5), welche den Genbereich flankierten, in den die Resistenzkassette integriert wurde. Als Kontrolle diente wildtypische DNA (Wt) bzw. das jeweilige Deletionskonstrukt im Plasmid pRET6a, z.B. *dnaK1::Cm^R* in pRSET6a (*p1::CmR*). Für die Bezeichnung der 12 *Synechocystis* sp.-Stämme siehe Abb. 32. Auftragung der Produkte der PCR-Analyse zur Untersuchung der A) *dnaK1*-Deletion. B) *dnaK2*-Deletion. C) *dnaK3*-Deletion.

Mit Hilfe von Immunoblot-Analysen der Zellextrakte sollte die Expression der chimären DnaK-Proteine in den 12 Stämmen nachgewiesen werden (Abb. 40). Dabei waren die verwendeten Antikörper anti-DnaK1 und anti-DnaK2 gegen den C-Terminus und anti-DnaK3VL gegen die volle Länge des Proteins gerichtet. Anhand der Auftragung von 12Δ1 und 13Δ1 ließ sich die vollständige Deletion von *dnaK1* bestätigen, da hier kein DnaK1-Protein zu detektieren war (Abb. 40 links). Bei den Stämmen 21Δ1 und 31Δ1 dagegen war eine Bande präsent, die auf das jeweilige chimäre DnaK-Protein (N2C1 bzw. N3C1) zurückgeführt werden konnte. Des Weiteren war bei der Auftragung 21Δ2 eine Doppelbande nachzuweisen und ließ im Vergleich mit Wt und 21Δ1 auf das wildtypische DnaK1 und das chimäre N2C1-Protein schließen (Abb. 40 links). Bei den restlichen Auftragungen zeigten sich nur einzelne Banden, wobei das wildtypische und das chimäre Protein vermutlich auf gleicher Höhe liefen und deswegen zusammen in einer Bande detektiert wurden (Abb. 40).

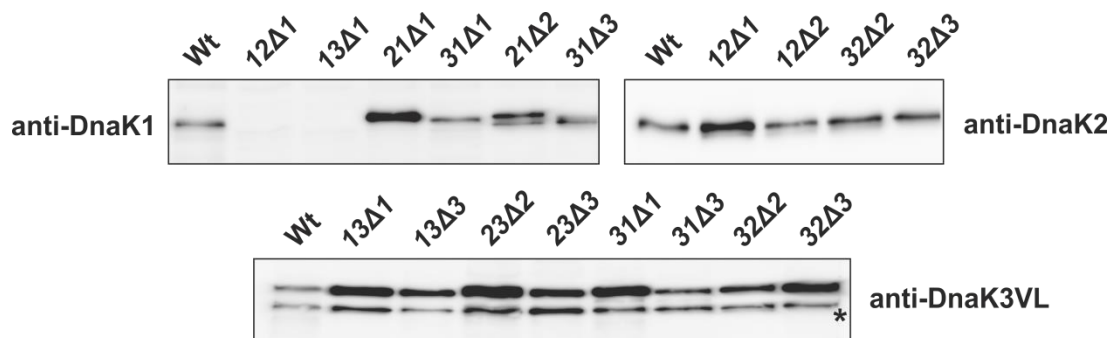


Abb. 40 Western-Blot-Analyse zur Überprüfung der Expression der chimären DnaK-Proteine in *Synechocystis* sp.

Nach Zellaufschluss von Kulturen der 12 *Synechocystis* sp.-Stämme (Abb. 37) erfolgte eine SDS-PAGE der Zellextrakte mit anschließender Immunoblot-Analyse mit Antikörpern gegen den C-Terminus (anti-DnaK1 und anti-DnaK2) oder die volle Länge des Proteins gerichtet (anti-DnaK3VL). Als Kontrolle diente wildtypischer Zellextrakt (Wt). Die unspezifische Bande bei der Verwendung des Antikörpers anti-DnaK3VL wurde mit einem Stern markiert. Für die Bezeichnung der 12 *Synechocystis* sp.-Stämme siehe Abb. 37.

3.6 Heterologe Expression und Reinigung der Proteine DnaK1, 2, 3 und 4

Um die cyanobakteriellen DnaK-Proteine biochemisch charakterisieren zu können, sollten die Proteine mit N-terminalen deca-His-Tag heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Hierzu war es zunächst nötig, geeignete Bedingungen zur heterologen Expression der Proteine in *E. coli* zu etablieren, da eine toxische Wirkung bei Überexpression von DnaK in *E. coli* bereits bekannt war (Blum et al., 1992; Grossman et al., 1987). Aus diesem Grund wurden verschiedene Expressionsplasmide, Expressionsstämme, Anzuchttemperaturen, Kulturmedien und Induktionszeitpunkte getestet, um eine optimale Überexpression der gewünschten Proteine zu erreichen. Für DnaK1 und DnaK2 konnte eine optimale Expression über das Expressionsplasmid pRSET6aHis im *E. coli* Stamm HMS174 (DE3) pLysS und einer Zucht in LB-Medium erzielt werden. Die Induktion der Expression erfolgte zu Beginn der stationären Phase ($OD_{750} = 1$) mit 0,5 mM IPTG, der sich eine Kultivierung über fünf Stunden bei 18 °C (DnaK1) bzw. vier Stunden bei 37 °C (DnaK2) anschloss. Eine erfolgreiche Expression wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse nachgewiesen (Abb. 41 A und B). Nach Zellfraktionierung sollte die Reinigung von DnaK1 und DnaK2 aus der löslichen Fraktion über Affinitätschromatographie erfolgen. Dafür wurden zunächst steigende Imidazolkonzentrationen im Puffer zur Elution der Proteine von der Ni-NTA-Agarose getestet. Für DnaK1 zeigte sich eine Elution ab 100 mM Imidazol und für DnaK2 ab 50 mM (Abb. 41 A und B).

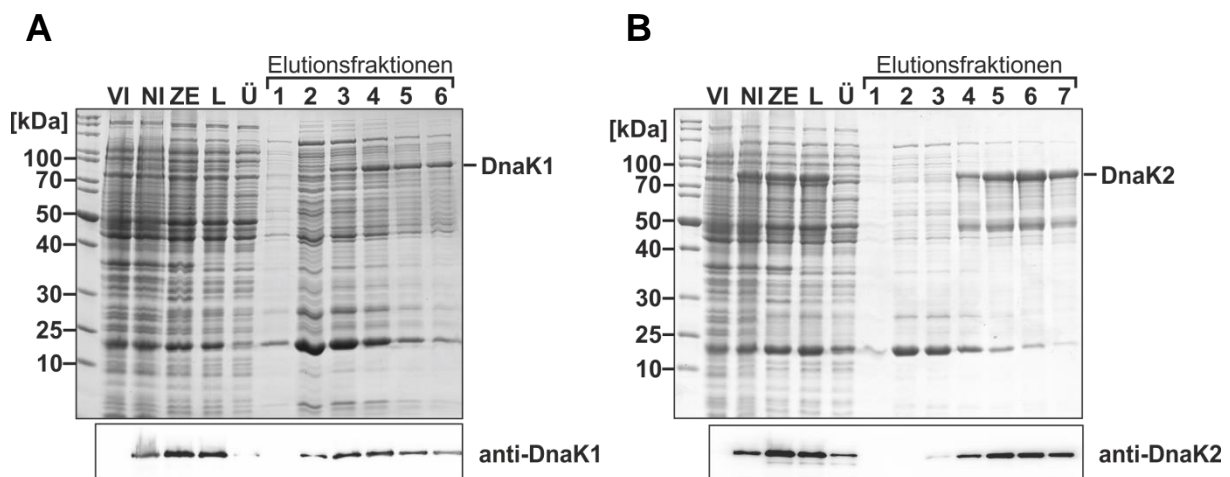


Abb. 41 Überprüfung der heterologen Expression von A) DnaK1 und B) DnaK2 in *E. coli* und Bestimmung der kritischen Imidazolkonzentration bei der Affinitätschromatographie.

Gezeigt sind die Coomassie-gefärbten 8%-igen Polyacrylamidgele nach SDS-PAGE und darunter die zugehörigen Immunoblot-Analysen mit den Antikörpern anti-DnaK1 und anti-DnaK2 (VI) vor Induktion der Expression, (NI) nach Induktion, (ZE) Zellextrakt, (L) lösliche Proteinfraction, (Ü) Überstand nach Inkubation der löslichen Proteinfraction mit Ni-NTA-Agarose, DnaK1 Elutionsfraktionen 1-6 (50, 100, 200, 300, 400, 500 mM Imidazol), DnaK2 Elutionsfraktionen 1-7 (25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 mM Imidazol). Die Expression erfolgte im *E. coli*-Stamm HMS174 (DE3) pLysS in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 10 µg/ml Chloramphenicol. Nach Erreichen einer OD_{600} von etwa 1,0 wurde die Expression mit 0,5 mM IPTG induziert und 5 h bei 18 °C (DnaK1) bzw. 4 h bei 37 °C (DnaK2) inkubiert.

Im Gegensatz dazu war es nicht möglich, für DnaK3 geeignete Bedingungen für eine ausreichend starke Expression zu etablieren. Meist zeigte sich eine Expression in *inclusion bodies*, bei welcher das Protein fehlgefaltet und aggregiert in der Zelle vorlag (Abb. 42).

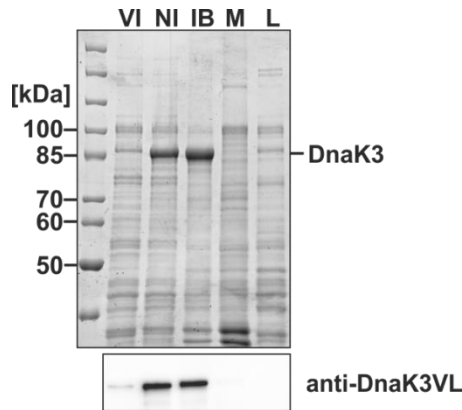


Abb. 42 Überprüfung der heterologen Expression von DnaK3 in *E. coli*.

Gezeigt ist das Coomassie-gefärbte 8%-ige Polyacrylamidgel nach SDS-PAGE und darunter die zugehörige Immunoblot-Analyse mit dem Antikörper anti-DnaK3VL. (VI) vor Induktion der Expression, (NI) nach Induktion, (IB) *inclusion bodies*, (M) Membranfraktion, (L) lösliche Proteinfraction. Die Expression erfolgte im *E. coli*-Stamm Rosetta-gami plysS in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 10 µg/ml Chloramphenicol. Nach Erreichen einer OD_{600} von etwa 1,0 wurde die Expression mit 0,5 mM IPTG induziert und 5 h bei 37 °C inkubiert.

Der Versuch *dnaK4* im Plasmid pRSET6aNT-HisMCS heterolog in BL21 (DE3) pLysE Zellen zu exprimieren war ebenfalls nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

Nach Bestimmung der geeigneten Imidazolkonzentration erfolgte die affinitätschromatographische Reinigung von DnaK1 und DnaK2. Zur Entfernung von Proteinen, die unspezifisch an die Matrix binden konnten, wurde Waschpuffer (50 mM Na-Phosphat-Puffer pH 8, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin) mit 50 mM bzw. 25 mM Imidazol eingesetzt. Dabei wurden 5 mM ATP und 5 mM $MgCl_2$ zugegeben, um die Substrataffinität der DnaK-Proteine zu vermindern. Anhand von SDS-PAGE konnte der Reinigungseffekt der fünf aufeinanderfolgenden Waschschrte verfolgt und eine erhöhte Reinheit der Proteinlösungen nach Elution mit 500 mM Imidazol nachgewiesen werden (Abb. 43). Nach der erfolgreichen Elution von DnaK1 und DnaK2 waren allerdings noch einige Proteinverunreinigungen vorhanden, was sich anhand weiterer Banden unterhalb der Bande für DnaK1 bzw. DnaK2 zeigte.

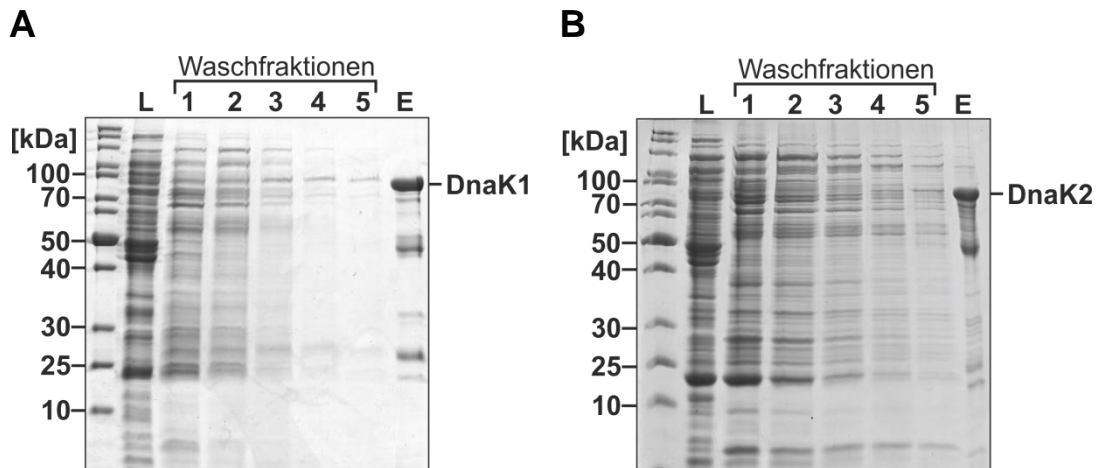


Abb. 43 SDS-PAGE nach Reinigung von A) DnaK1 oder B) DnaK2 über Affinitätschromatographie.

Für die SDS-PAGE wurden 8%-ige Polyacrylamidgele verwendet. (L) lösliche Proteinfraction, (Waschfraktionen 1-5) aufeinanderfolgendes Waschen mit jeweils 20 ml Waschpuffer, (E) Elution mit 500 mM Imidazol.

Aus diesem Grund wurde nach Umpuffern in Laufpuffer (20 mM BisTris pH 6,5, 10 % Glycerin) eine Anionenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Dabei richtete sich der pH-Wert des Puffers nach den ermittelten isoelektrischen Punkten (*ExpASy* Server, (Gasteiger, 2005)) der Proteine DnaK1 und DnaK2 von 4,6 bzw. 4,7. Von den Proteinlösungen wurden jeweils 2 x 5 ml auf eine Q-Sepharose-Säule aufgetragen und anschließend mit steigenden Salzkonzentrationen mit Elutionspuffer (Laufpuffer mit 1M NaCl) gewaschen bzw. eluiert. Nach Auftragung der Proben auf die Säule wurde zunächst ein Stufengradient eingestellt, um unspezifisch gebundene Proteine weitestgehend von der Säule zu entfernen. Mit dem sich anschließenden linearen Salzgradienten sollte die Elution von der Säule erfolgen. Zuletzt wurden die gesammelten Proteinfractionen für DnaK1 und DnaK2 mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

Bei der Chromatographie von DnaK1 waren zwei Elutionspeaks zu verzeichnen. Durch den Stufengradienten mit 25 % Elutionspuffer konnten unspezifisch gebundene Proteine von der Säule gewaschen werden, was die Analyse der Fraktionen des ersten Peaks aufzeigte (Abb. 44 A und B). Der zweite Peak bei 38 % Elutionspuffer während des linearen Gradienten war eindeutig dem DnaK1-Protein zuzuordnen. Bei den Auftragungen der Fraktionen nach SDS-PAGE zeigte sich nur eine Bande, was den erreichten Reinigungsgrad von DnaK1 widerspiegelte (Abb. 44).

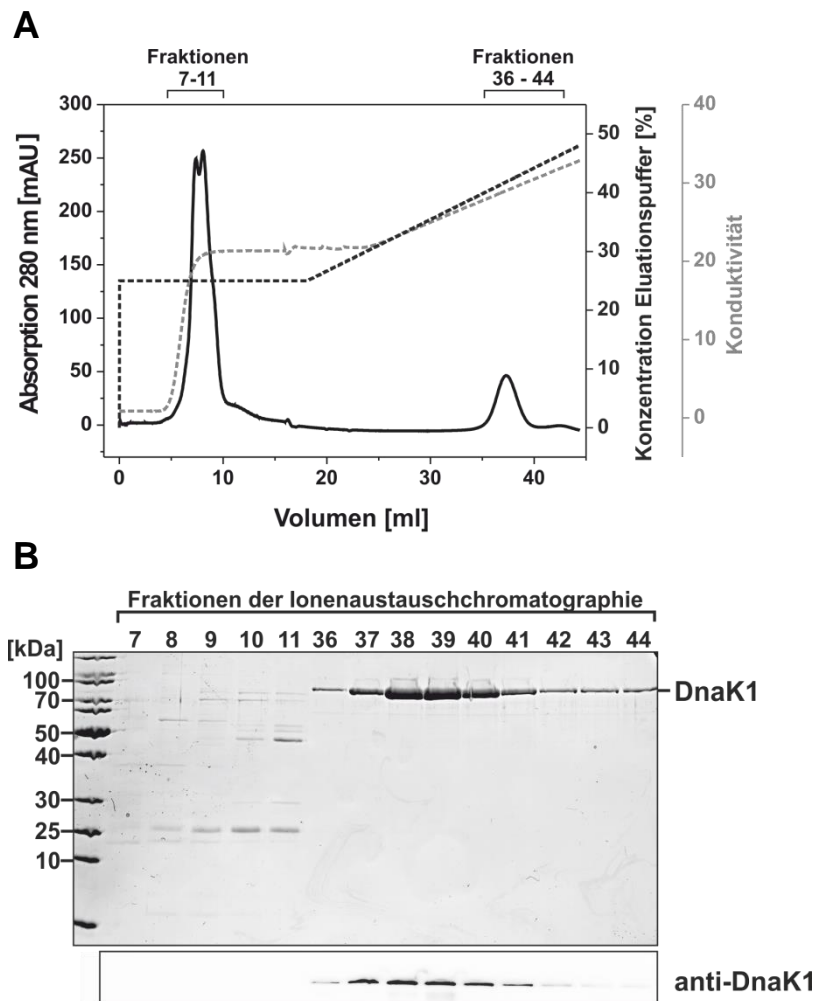


Abb. 44 Reinigung von DnaK1 über Anionenaustauschchromatographie.

A) Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose-Säule (CV = 5 ml) in 25 mM BisTris pH 6,5 und 10 % Glycerin bei 0,5 ml/min. Nach Injektion von 2 x 5 ml Proteinlösung und anschließendem Waschen mit Laufpuffer bis Erreichen eines Absorptionssignals auf Nullniveau erfolgte ein Waschschritt über einen Stufengradienten mit 25 % Elutionspuffer (250 mM NaCl) wiederum bis Erreichen eines Absorptionssignals auf Nullniveau. Danach wurde ein linearer Gradient von 25 % - 60 % Elutionspuffer über 10 Säulenvolumen (CV) eingestellt und 1 ml Fraktionen gesammelt, bis eine Elution von DnaK1 erfolgte.

Im Chromatogramm von DnaK2 waren drei prominente Peaks zu verzeichnen (Abb. 45). Die Analyse der Fraktionen des ersten Peaks zeigte zwar eine geringe Elution des DnaK2-Proteins durch den 19%-igen Stufengradienten, es wurden jedoch hauptsächlich unspezifisch bindende Proteine von der Säule gewaschen, was die intensive Bande auf Höhe der 50 kDa-Markerbande nach SDS-PAGE verdeutlichte (Abb. 45 B). Durch den flachen linearen Gradienten konnten weitere Verunreinigungen abgetrennt werden. Dies zeigte sich anhand einer vorangehenden Schulter im zweiten Peak bei 28 % Elutionspuffer (Abb. 45 A). Nach SDS-PAGE-Analyse der Fraktionen ließ sich eine Abtrennung einer Bande unterhalb der Bande für DnaK2 verfolgen, wobei ab Fraktion 46 nur noch DnaK2 nachweisbar war (Abb. 45 B). Der dritte Peak bei 100 % Elutionspuffer zeigte weder nach SDS-PAGE noch bei Immunoblot-Analyse eine Bande für DnaK2.

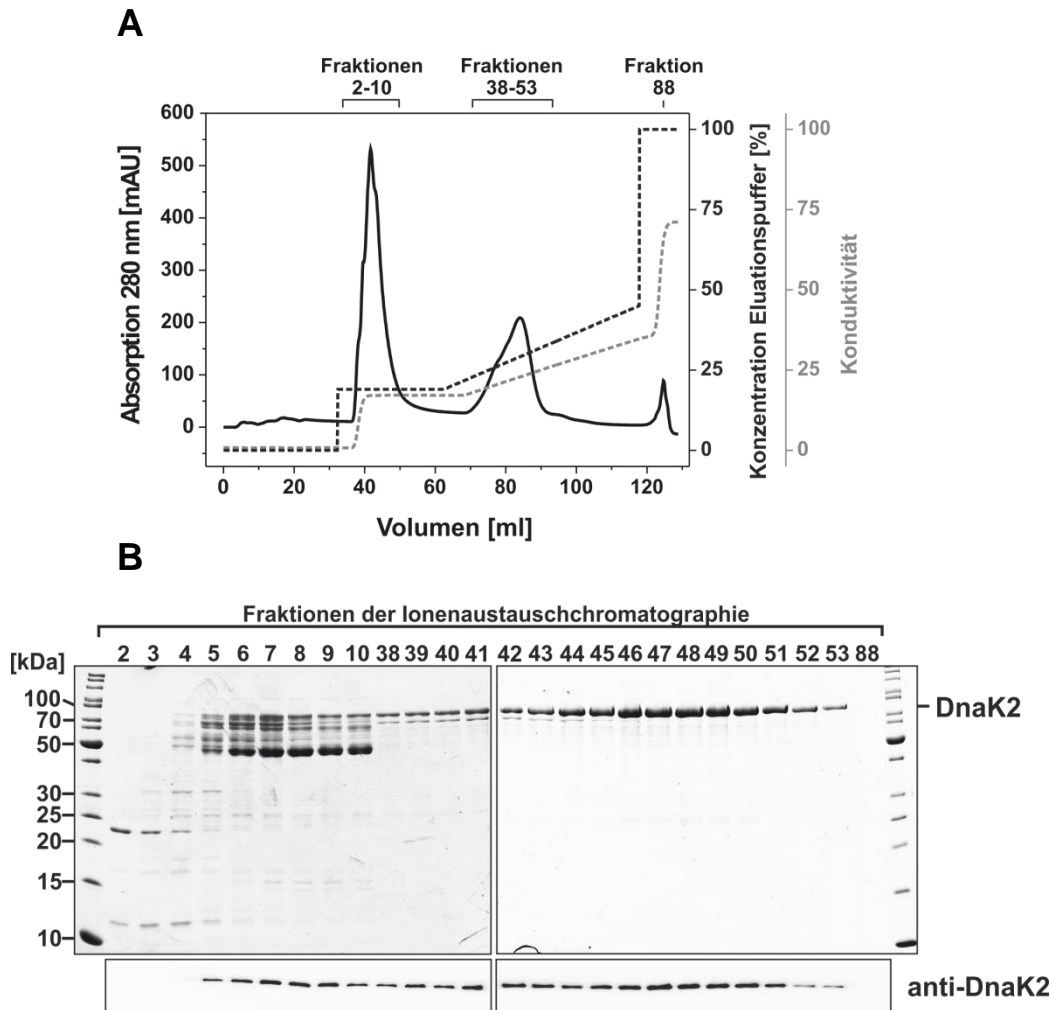


Abb. 45 Reinigung von DnaK2 über Anionenaustauschchromatographie.

A) Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose-Säule (CV = 5 ml) in 25 mM BisTris pH 6,5 und 10 % Glycerin bei 0,5 ml/min. Nach Injektion von 2 x 5 ml Proteinlösung und anschließendem Waschen mit Laufpuffer bis Erreichen eines Absorptionssignals auf Nullniveau erfolgte ein Waschschriff über einen Stufengradienten mit 19 % Elutionspuffer (250 mM NaCl) wiederum bis Erreichen eines Absorptionssignals auf Nullniveau. Danach wurde ein linearer Gradient von 19 % - 100 % Elutionspuffer über 30 CV eingestellt und 1 ml Fraktionen gesammelt, bis eine Elution von DnaK2 erfolgte, und anschließend mit 100 % Elutionspuffer gewaschen.

Um die Aktivität der gereinigten DnaK-Proteine nachzuweisen, wurde ihre ATPase-Aktivität nach Umpuffern in 50 mM HEPES pH 7 in einem gekoppelten Enzymtest untersucht (siehe 2.2.4.13). Über diese Methode konnte jedoch keine signifikante ATP-Umsetzung für DnaK1 und DnaK2 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Chaperone müssen ihre native Struktur unter Stressbedingungen beibehalten, um ihre biologische Funktion ausüben zu können. Aus diesem Grund sollten nach der Reinigung der Proteine DnaK1 und DnaK2 CD-Spektren im Temperaturbereich von 10 bis 95 °C aufgenommen werden, um ihre thermische Stabilität zu untersuchen. Bei DnaK aus *E. coli* wurde gezeigt, dass die Bindung von ATP/Mg²⁺ eine erhöhte thermische Stabilität zur Folge hatte, was sich anhand eines erhöhten Schmelzpunktes zeigte (Palleros et al., 1992).

Deswegen wurden die Spektren in An- und Abwesenheit von $200 \mu\text{M ATP/Mg}^{2+}$ aufgenommen und Schmelzkurven anhand der Messwerte bei 222 nm erstellt (Abb. 46).

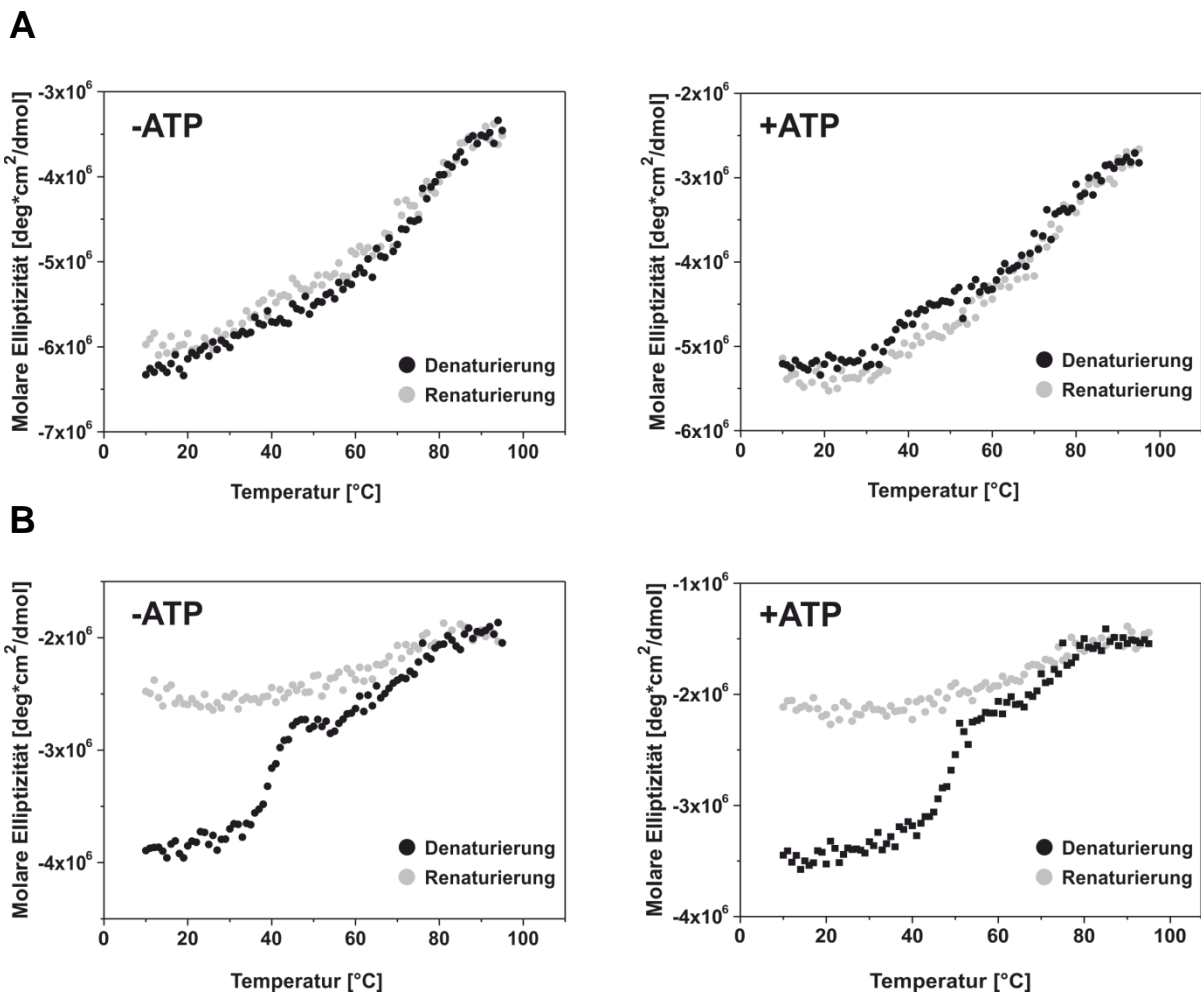


Abb. 46 Thermische De- und Renaturierung von A) DnaK1 und B) DnaK2.

Für die Aufnahme der CD-Spektren (siehe 2.2.4.14) wurden die Proteinlösungen in 10 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7 umgepuffert und in den Küvetten eine Konzentration von $0,119 \text{ g/l}$ (DnaK1) und $0,169 \text{ g/l}$ (DnaK2) eingestellt. Gemessen wurde in An- und Abwesenheit von $200 \mu\text{M ATP/Mg}^{2+}$ während der Denaturierung durch Erhöhung der Temperatur (Heizen, schwarz) bzw. Abkühlen der Probe (Kühlen, grau) in einem Temperaturbereich von $10 - 95 \text{ °C}$. Die molare Elliptizität bei 222 nm wurde anschließend gegen die Temperatur aufgetragen. Die erhaltene Kurve beschreibt die Schmelzkurve, wobei der Wendepunkt dem Schmelzpunkt des Proteins entspricht.

Auf diese Weise konnte für das DnaK1-Protein eine hohe thermische Stabilität nachgewiesen werden, da die Auftragung der Werte der De- und Renaturierung einen annähernd gleichen Kurvenverlauf zeigten (Abb. 46 A). Somit handelte es sich um eine reversible Denaturierung des Proteins. Nach Zugabe von ATP/Mg^{2+} wurde eine dreiphasige Denaturierung erkennbar und anhand der Erhöhung des Schmelzpunkts von $30,1 \text{ °C}$ (ohne ATP) auf $38,5 \text{ °C}$ eine Stabilisierung des Proteins durch ATP-Bindung nachgewiesen. Für DnaK2 zeigte sich sowohl bei Anwesenheit als auch bei Abwesenheit von ATP/Mg^{2+} eine dreiphasige Denaturierung (Abb. 46 B). Eine Stabilisierung von DnaK2 durch ATP-Bindung

ließ sich anhand der veränderten Schmelzpunkte des Proteins nachweisen. Ohne ATP lag der Schmelzpunkt bei 39,1 °C, mit ATP bei 48,6 °C. Die molare Elliptizität stellte sich bei Abkühlung auf das erste Plateau ein, was auf ein Faltungsintermediat oder auf eine irreversible Denaturierung von DnaK2 zurückgeführt werden könnte.

3.7 Alignment und Strukturvorhersage für Slr0086 (DnaK4)

In Eubakterien ist das Auftreten multipler homologer Hsp70-Proteine weit verbreitet. Entsprechend konnten in *Synechocystis* sp. drei homologe DnaK-Proteine beschrieben und eine Expression nachgewiesen werden (Rupprecht 2007). Interessanterweise ist mit *slr0086* noch ein weiterer offener Leserahmen (ORF) vorhanden, der für ein homologes DnaK-Protein mit 531 Aminosäuren (AS) und einer theoretischen Größe von etwa 59 kDa kodiert (*CyanoBase*, (Nakamura et al., 2000)) und welches im Folgenden als DnaK4 bezeichnet wird. Das Gen *dnaK4* ist in einem Operon lokalisiert, welches nachweislich aus acht ORFs (*slr0086* bis *slr0096*) besteht (Trautmann et al., 2013). Die Gene des Operons kodieren für Proteine, die an der Tocopherol- bzw. Carotinoid-Biosynthese sowie am Schutz der Zelle vor oxidativem Stress beteiligt sind. Neben einer möglichen Beteiligung an der oxidativen Stressantwort lässt die nachweisbare Kotranskription mit *slr0093* auf eine Interaktion mit dem entsprechenden membranständigen DnaJ-Protein schließen (Trautmann et al., 2013).

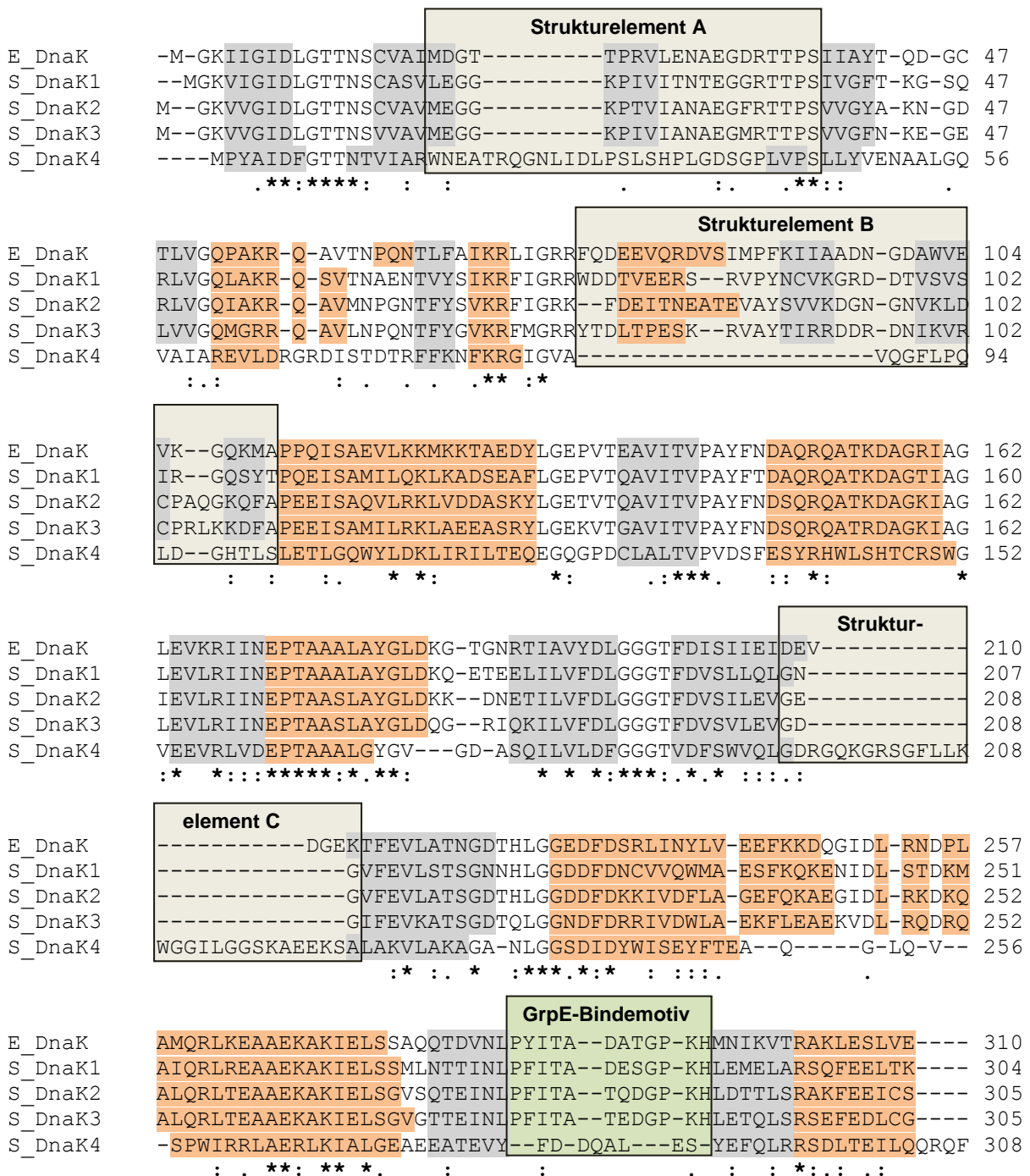
In vielen cyanobakteriellen Genomen liegt *dnaK4* stark konserviert vor (*NCBI Protein Blast*; (Altschul et al., 1990)), bleibt aber bis heute noch weitestgehend unerforscht. Mit 531 AS ist DnaK4 bedeutend kürzer als die anderen homologen DnaK-Proteine in *Synechocystis* sp. und weist im Vergleich zueinander eine deutlich geringere Sequenzidentität auf (Tab. 11).

Tab. 11 Sequenzidentitäten der homologen DnaK-Proteine aus *E. coli* und *Synechocystis* sp.
Die angegebenen Identitäten in Prozent ließen sich aus der Analyse eines Multi-Proteinsequenzalignments mit dem Programm *ClustalW2* ableiten (siehe 2.2.4.20).

Protein	DnaK (<i>E. coli</i>)	DnaK1	DnaK2	DnaK3	DnaK4
DnaK (<i>E. coli</i>)		49,7 %	56,9 %	49,6 %	19,0 %
DnaK1	49,7 %		56,5 %	47,8 %	22,2 %
DnaK2	57,0 %	56,5 %		61,8 %	19,4 %
DnaK3	49,6 %	47,8 %	61,8 %		20,0 %
DnaK4	19,0 %	22,2 %	19,4 %	20,0 %	

Aus diesem Grund stellt sich die Frage, welche Strukturelemente im Vergleich zu *E. coli*-DnaK und den anderen Hsp70-Proteinen in *Synechocystis* sp. verändert bzw. nicht vorhanden sind. In dieser Arbeit wurden anhand von Software-Programmen, die eine Strukturvorhersage eines Proteins ermöglichen (siehe 2.2.4.20), putative strukturelle Unterschiede von DnaK4 zu *E. coli*-DnaK und den homologen DnaK-Proteinen aus *Synechocystis* sp. aufgezeigt. Mit Hilfe des Programms *RaptorX* (Källberg et al., 2012) konnte die Tertiärstruktur von DnaK1, 2, 3 und 4 anhand der Primärsequenzen (*CyanoBase*; (Nakamura et al., 2000)) vorhergesagt werden (siehe auch 2.2.4.20). Als Matrize diente

hierbei die Kristallstruktur von DnaK aus *E. coli* in der offenen ATP-gebundenen Konformation (PDB 4BQ9; (Kityk et al., 2012)). Mit dem Programm *Chimera* (Pettersen et al., 2004) wurden die verschiedenen DnaK Strukturmodelle übereinandergelegt und anschließend ein Sequenzalignment durchgeführt, um die Konservierung von Strukturmerkmalen und einzelnen AS zu betrachten (Abb. 47). Bei der Betrachtung des Alignments wird die vorhergesagte hohe strukturelle Ähnlichkeit von DnaK1, 2 und 3 mit DnaK aus *E. coli* sehr deutlich. Im Gegensatz dazu zeigt DnaK4 besondere Strukturmerkmale, die es von den homologen DnaK-Proteinen unterscheidet und welche mit Strukturelement A-F gekennzeichnet wurden (Abb. 47).



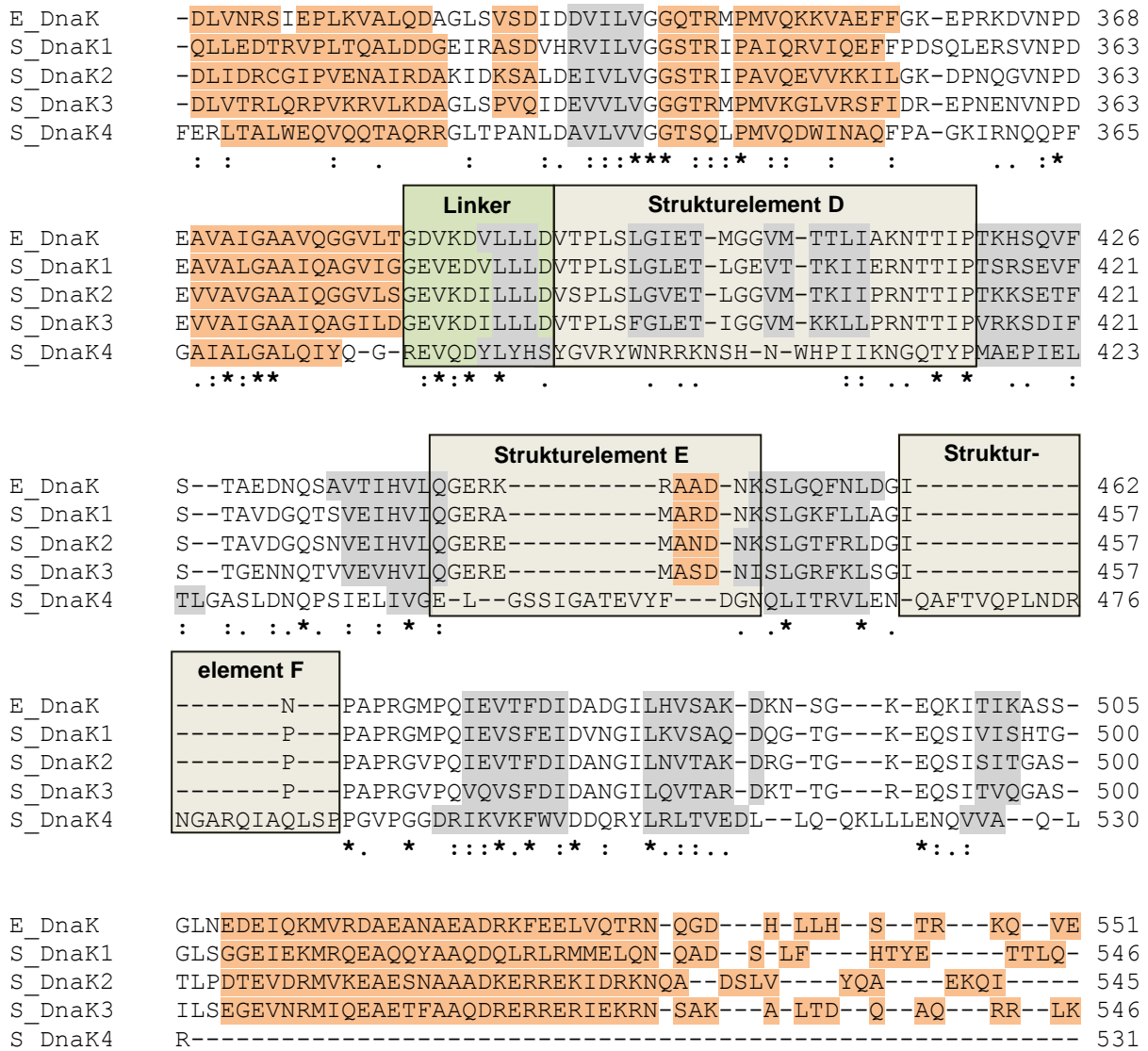


Abb. 47 Sequenz-Alignment von *E. coli*-DnaK und DnaK1, 2, 3 und 4 aus *Synechocystis* sp.
 Die Strukturvorhersage für DnaK1, 2, 3 und 4 aus *Synechocystis* sp. (S_DnaK1, 2, 3, 4) erfolgte durch das Programm *RaptorX* mit DnaK aus *E. coli* (E_DnaK) im ATP-gebundenen Zustand als Matrize (PDB 4B9Q; (Kityk et al., 2012)). Mit Hilfe des Programms *Chimera* konnten die Proteinstrukturen übereinandergelegt werden. Mit der Funktion *MatchAlign* wird im Programm *Chimera* ein Sequenzalignment nach der Überlagerung von zwei oder mehreren Proteinstrukturen durchgeführt (Meng et al., 2006). Aufgrund der kürzeren Sequenz von DnaK4 und der niedrigen Konservierung des C-Terminus (CT) ist das Alignment nur bis zum Anfang der *Lid*-Domäne (etwa 550 AS) dargestellt. Die Sekundärstrukturelemente wurden farblich hervorgehoben: α -Helix (orange), β -Faltblatt (grau). Bemerkenswerte Strukturunterschiede wurden mit einem Kasten markiert und mit Strukturelement A-F bezeichnet (siehe auch Abb. 38). Das GrpE-Bindemotiv und die *Linker*-Sequenz wurden grün hervorgehoben. Ein Stern (*) markiert eine konservierte AS; ein Doppelpunkt (:) zeigt eine Konservierung von AS mit sehr ähnlichen Eigenschaften an; ein Punkt (.) zeigt eine Konservierung von AS mit bedingt ähnlichen Eigenschaften.

Zur Veranschaulichung der strukturellen Unterschiede ist das vorhergesagte Strukturmodell von DnaK4 (rot) mit *E. coli*-DnaK (blau) in Abb. 48 übereinandergelegt dargestellt. Die Elemente A-F zeigen dem Sequenzalignment entsprechend, in Vergrößerung und farblich hervorgehoben, die vorhergesagten Strukturunterschiede im Detail (Abb. 48, A-F).

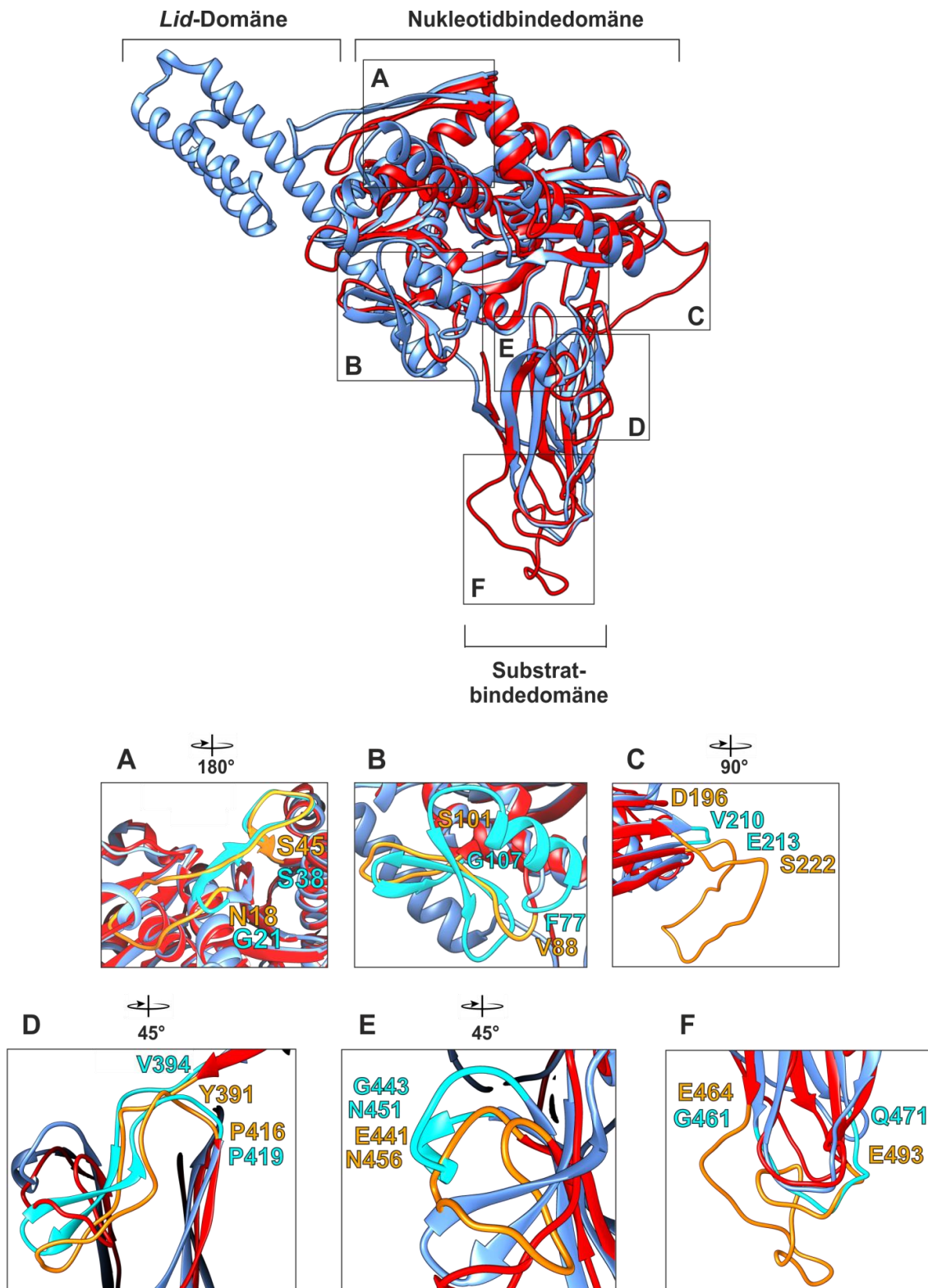


Abb. 48 Vergleich der vorhergesagten Struktur von DnaK4 (rot) mit DnaK aus *E. coli* (blau). Anhand der Primärsequenz von DnaK4 konnte mit Hilfe des Programms *RaptorX* die Tertiärstruktur vorhergesagt werden (siehe 2.2.4.20). Eine Überlagerung der vorhergesagten Struktur mit DnaK aus *E. coli* im ATP-gebundenen Zustand (PDB 4BQ9; (Kityk et al., 2012)) erfolgte mit dem Programm *Chimera*. Die Strukturunterschiede wurden als Strukturelemente A-F gekennzeichnet und sind unterhalb der Gesamtstruktur in Vergrößerung dargestellt. Zur Verdeutlichung wurden die betreffenden Strukturen für *E. coli*-DnaK (türkis) und DnaK4 aus *Synechocystis* sp. (orange) farblich hervorgehoben und die AS am Beginn und am Ende der markierten Sequenz angegeben.

Anhand der übereinandergelegten Strukturmodelle ist bei DnaK4 der für Hsp70-Proteine typische Aufbau aus Nukleotidbindedomäne und Substratbindedomäne deutlich zu erkennen, eine C-terminale *Lid*-Domäne ist jedoch nicht vorhanden (Abb. 48). Neben der Abwesenheit der α -helikalen *Lid*-Domäne lassen sich im Sequenzalignment weitere Strukturunterschiede feststellen (Abb. 47, Strukturelemente A-F). So sind ausschließlich in der für DnaK4 vorhergesagten Struktur in der Nukleotidbindedomäne zwei Bereiche vorhanden, die eine verlängerte AS-Sequenz in Form von vergrößerten *Loops* aufweisen (Strukturelement A und C, Abb. 47 und Abb. 48). Bemerkenswerterweise fehlt bei DnaK4 jedoch ein Strukturelement, bestehend aus einer α -Helix und drei β -Faltblättern (Strukturelement B, Abb. 47 und Abb. 48), welches bei Konformationsänderungen vermittelt durch Interaktion von DnaK mit dem Nukleotidaustauschfaktor GrpE eine gewisse Rolle spielen könnte (Brehmer et al., 2001). Für DnaK aus *E. coli* wurde anhand von fluoreszenzmarkiertem Trp102 (im Strukturelement B, Abb. 47) eine nukleotidabhängige räumliche Annäherung an den GrpE-Interaktions-*Loop* nachgewiesen (Brehmer et al., 2001). Dieser *Loop* enthält das GrpE-Bindemotiv, welches bei *E. coli*-DnaK sowie *Synechocystis* DnaK1, 2 und 3 konserviert vorliegt (Abb. 47) und für eine Interaktion mit GrpE essentiell ist (Brehmer et al., 2001; Rupprecht et al., 2010). Interessanterweise zeigt DnaK4 dieses Motiv nicht und könnte zusammen mit dem Fehlen des Strukturelements B darauf hindeuten, dass der Nukleotidaustauschfaktor GrpE möglicherweise kein Interaktionspartner von DnaK4 ist. Dennoch scheint DnaK4 eine ATP-abhängige Funktion zu besitzen, da die an der ATP-Koordination in *E. coli* DnaK beteiligten Aminosäuren (K70, E171, D194, G197, G198, A199, E267, K270 und S274), auch in DnaK4 konserviert vorliegen (Abb. 47) (Kityk et al., 2012). Außerdem weist die Konservierung von Aminosäuren (R167, N170, T173, E217 und V218), die in *E. coli*-DnaK für eine DnaJ/DnaK-Bindung von Bedeutung sind (Gässler et al., 1998; Suh et al., 1998), auf eine mögliche Interaktion von DnaK4 mit Hsp40-Kochaperonen hin (Abb. 47). Bei dem Vergleich der möglichen Substratbindedomäne, werden deutliche Unterschiede von DnaK4 zu den homologen Hsp70-Proteinen erkennbar (Strukturelemente D-F, Abb. 47 und Abb. 48). Die SBD besteht allgemein aus einer β -*Sandwich*-Struktur, welche aus zwei β -Faltblättern mit jeweils vier antiparallelen β -Strängen aufgebaut ist. An der Substratbindung sind maßgeblich die Verbindungsschleifen zwischen den β -Strängen beteiligt und die *Loops* L₁₂ und L₃₄ zusammen mit L₄₅ und L₅₆ bilden in *E. coli*-DnaK die Substratbindetasche (Zhu et al., 1996). Die Proteinsequenz sowie die vorhergesagte Struktur von DnaK4 weisen in drei dieser *Loops* im Vergleich zu den homologen DnaK-Proteinen markante Unterschiede auf (Strukturelemente D-F, Abb. 47 und Abb. 48). Der Sequenzbereich des *Loops* L₁₂ mit den flankierenden Strängen β 1 und β 2 ist in den DnaK homologen Proteinen aus *E. coli* und *Synechocystis* sp. mit Ausnahme von DnaK4 stark konserviert (Strukturelement D, Abb. 47). Für DnaK4 konnte in diesem Bereich nur ein

verlängerter *Loop* vorhergesagt werden. Auch die *Loops* L₄₅ und L₅₆, denen die Funktion einer Stabilisierung der *Loops* L₁₂ und L₃₄ zugeschrieben wird, zeigen bei DnaK4 eine verlängerte Sequenz (Strukturelemente E und F, Abb. 47 und Abb. 48) (Zhu et al., 1996). Auch die für die Wechselwirkung mit dem Substrat wichtigen Aminosäuren (F426, V436, I401, T403 und I438) des *E. coli*-DnaK scheinen bei allen homologen DnaK-Proteinen aus *Synechocystis* sp. mit Ausnahme von DnaK4 weitestgehend konserviert zu sein (Abb. 47) (Zhu et al., 1996). Dies könnte auf eine grundlegend andere Art und Weise der Substratinteraktion von DnaK4 hindeuten. Im Allgemeinen sind Hsp70-Proteine allosterische Proteine, bei welchen ATP-Bindung in der NBD zu einer Loslösung des Substrats in der SBD führt, eine erneute Substratbindung die ATP-Hydrolyse induziert, welche in Folge die Substratbindung verstärkt. Bei dieser Kommunikation zwischen den Domänen spielt der *Linker* zwischen NBD und SBD eine entscheidende Rolle (Han & Christen, 2001; Vogel et al., 2006). In der Verbindungssequenz liegt bei allen homologen DnaK-Proteinen aus *E. coli* und *Synechocystis* sp. mit Ausnahme von DnaK4 ein Motiv aus drei hydrophoben AS vor (³⁹⁰LLL³⁹², Abb. 47). Zusammen mit der Abwesenheit des GrpE-Bindemotivs und der *Lid*-Domäne könnten die Unterschiede im Interdomänen-Linker und der SBD auf eine andersartige Funktionsweise von DnaK4 im Vergleich zu DnaK1, 2 und 3 sprechen.

4. Diskussion

4.1 Veränderung des Proteoms und Lipidoms dunkeladaptierter *Synechocystis* sp. PCC6803-Zellen

Bis heute ist über den Mechanismus der Thylakoidmembranbiogenese wenig bekannt und der Ursprung der Thylakoidmembran sowie Biogenesefaktoren werden kontrovers diskutiert. Mit dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 steht ein Modellorganismus zur Verfügung, um diese Prozesse eingehend zu untersuchen. Die Kultivierung von *Synechocystis* sp. unter *light-activated heterotrophic growth* (LAHG)-Bedingungen führt zu einer Reduktion des Thylakoidmembransystems (Abb. 13) (Barthel et al., 2013; Verotte et al., 1992). Durch einen Rücktransfer von *Synechocystis* sp. ins Licht kann das System jedoch wieder vollständig aufgebaut und die Thylakoidmembranbiogenese verfolgt werden (Barthel et al., 2013; Zsiros et al., 2002). Um die ausgeprägten morphologischen und physiologischen Veränderungen in dunkeladaptierten *Synechocystis* sp.-Zellen besser zu verstehen, wurde ihr Proteom und Lipidom analysiert und mit lichtadaptierten Zellen verglichen. In dieser Arbeit konnte im Vergleich zu älteren Studien eine erheblich größere Anzahl von Proteinen detektiert und quantifiziert werden (Abb. 14) (Kurian et al., 2006a). Entscheidend war hierbei die Identifikation von Membranproteinen, die es ermöglichte, neue Erkenntnisse hinsichtlich der Biogenese von Thylakoidmembranen zu gewinnen.

4.1.1 Die physiologische Umstellung von *Synechocystis* sp. auf heterotrophes Wachstum

Die Thylakoidmembran mit den integrierten Proteinkomplexen der Photosynthese und Atmungskette stellt eines der bedeutendsten Kompartimente für den Energiestoffwechsel der cyanobakteriellen Zelle dar. Folglich ist bei Dunkeladaptation die Umstellung von Licht auf Glukose als einzige Energiequelle sowie die Reduzierung der Thylakoide mit einer weitgehenden Veränderung der katabolen Stoffwechselwege verbunden und führt somit zu einer Modifikation der Proteinzusammensetzung. Die katabolische Anpassung mit Glukose als einzig verfügbare Energiequelle konnte anhand einer vermehrten Expression von Enzymen des Glukosestoffwechsels nachgewiesen werden. Entsprechend wurde ein signifikant höherer Anteil an Proteinen, die an Reaktionen der Glykolyse, der Pyruvat-Dehydrogenase und des Citratzyklus beteiligt sind, in dunkeladaptierten Zellen registriert (siehe Anhang Tab. A1). Die in vorangehenden Arbeiten dargelegte Bedeutung des oxidativen Pentosephosphatwegs als Hauptroute des Zuckerkatabolismus unter

heterotrophen Wachstumsbedingungen (Lex & Carr, 1974; Pelroy et al., 1972; Yang et al., 2002) konnte durch die detektierte Stimulation der Expression von Enzymen des Stoffwechselwegs bestätigt werden (siehe Anhang Tabelle A1).

Trotz dieser Umstellung auf eine heterotrophe Lebensweise und der Reduzierung des Thylakoidmembransystems zeigten alle Proteinkomplexe des photosynthetischen Elektronentransports in der Thylakoidmembran, mit Ausnahme von PS II (Abb. 15), keine Veränderungen im Vergleich zu lichtadaptierten Zellen (siehe Anhang Tab. A1). Für PS II konnte ein verringerter Anteil der großen Untereinheiten dokumentiert werden, während die Menge der kleinen Untereinheiten weitestgehend unverändert blieb (Abb. 15). Somit ist unter *light-activated heterotrophic growth* (LAHG)-Bedingungen die photosynthetische Elektronentransportkette im Wesentlichen nur durch inaktives PS II unterbrochen (Barthel et al., 2013). Diese Beobachtung steht mit der Synthese des D1- Proteins (PsbA) im Einklang, die im Dunkeln inhibiert (Herranen et al., 2001) und unter Lichtbedingungen durch die Quantität und Qualität des Lichts reguliert wird (El Bissati & Kirilovsky, 2001; Mate et al., 1998; Mohamed et al., 1993). Diese Regulation ist für die cyanobakterielle Zelle wichtig, um sich an die entsprechenden Lichtbedingungen anzupassen und die lichtinduzierten Schäden am Photosystem, über einen angeglichenen Auf- und Abbau von PsbA, beheben zu können. Im Gegensatz dazu liegt das PS II unter LAHG-Bedingungen inaktiv vor und der Reparaturmechanismus mit der energieaufwändigen Proteinexpression kann eingestellt werden. Dies zeigte sich beispielsweise an einer etwa um 50 % verringerten Expression von Psb27 (Sll1414), welches hauptsächlich am PS II-Reparatur-Zyklus beteiligt ist (Nowaczyk et al., 2006) (siehe Anhang Tab. A1).

Der niedrigere Gehalt an Proteinen des Sec-Translokationssystems sowie der Insertase YidC (siehe Anhang Tab. A1) deutet zudem auf einen geringeren Bedarf hin, neusynthetisierte ungefaltete Polypeptide über bzw. in die Membranen des reduzierten Thylakoidsystems zu transportieren, da beide Systeme in der Cytoplasma- als auch in der Thylakoidmembran zu finden sind (Du Plessis et al., 2011; Veenendaal et al., 2004; Wang & Dalbey, 2011). Allerdings könnte der geringere Anteil der membranständigen Sec- und YidC-Proteine auch direkt mit der reduzierten Menge interner Membranen zusammenhängen.

Bei den Untereinheiten des Tat-Transportsystems, welches für den Membrantransport von gefalteten Polypeptiden zuständig ist, wurden keine Veränderungen registriert (siehe Anhang Tab. A1). Während ein aktives Tat-Translokationssystem einerseits in der Cytoplasmamembran beschrieben wurde (Spence et al., 2003), wurde ihm andererseits eine Funktion in beiden Membranen, Cytoplasmamembran und Thylakoidmembran, zugeschrieben (Aldridge et al., 2008). Die Daten dieser Arbeit deuten jedoch auf eine

primäre Lokalisation in der Cytoplasmamembran hin, da sich trotz des reduzierten Thylakoidsystems der Anteil der Tat-Proteine unverändert zeigte (siehe Anhang Tab. A1).

Ein insgesamt geringerer Bedarf an der Neusynthese von Polypeptiden ließ sich aus dem signifikant reduzierten Gehalt an ribosomalen Proteinen in der quantitativen Analyse (siehe Anhang Tab. A1) ableiten, der auch die stark verminderte Wachstumsrate dunkeladaptierter Zellen widerspiegeln könnte (Anderson & McIntosh, 1991).

Thylakoidmembranen besitzen im Vergleich zur Cytoplasmamembranen ein hohes Protein zu Lipid-Verhältnis, wobei die Membranproteine sehr dicht gepackt vorliegen und maßgeblich zur Membranstabilität beitragen (Kirchhoff et al., 2002; Lee, 2000). Aufgrund der Reduktion des Thylakoidmembransystems stieg zwar der Einfluss der Cytoplasmamembranlipide in der detektierten Gesamtlipidzusammensetzung, eine Untersuchung der cyanobakteriellen Membranlipide zeigte jedoch keine Unterschiede in der Zusammensetzung beider Membransysteme (Gombos et al., 1996). Die Hauptkomponente der Membranlipide stellt hierbei das Galaktolipid MGDG (Monogalactosyl-Diacylglycerol) dar, welches dazu neigt, hexagonal inverse Phasen anstelle von lamellaren Strukturen, wie Lipiddoppelschichten, zu bilden (Yuzawa et al., 2012). Somit können Thylakoidmembranen nur durch integrale Membranproteine bestehen, die die Lipiddoppelschicht stabilisieren (Lee, 2000). Ein reduzierter Proteingehalt erfordert folglich einen strukturellen Ausgleich, um die Membranintegrität aufrecht zu halten. Anhand der Lipidanalyse zeigte sich unter LAHG-Bedingungen ein erhöhter Anteil an SQDG (Sulfoquinovosyl-Diacylglycerol), hingegen blieb der Gehalt an MGDG, DGDG (Digalactosyl-Diacylglycerol) und PG (Phosphatidylglycerol) konstant (Abb. 17). Da SQDG dazu neigt Lipiddoppelschichten auszubilden, könnte es folglich die membranstabilisierende Funktion in dunkeladaptierten Zellen übernehmen.

Die genauere Analyse der Lipide und die Quantifizierung der individuellen Fettsäurespezies zeigte für alle Lipidklassen ein erhöhtes Vorkommen an gesättigten Fettsäuren unter LAHG-Bedingungen (Abb. 17). Dies verursacht eine geringere Fluidität der Thylakoidmembran in dunkeladaptierten Zellen. Ein höherer Sättigungsgrad der Lipide erlaubt höhere Packungsdichten der Acylketten und könnte somit einer, unter LAHG-Bedingungen vorteilhaften, Stabilisierung der Lipiddoppelschichten dienen.

4.1.2 Dunkeladaptierte Zellen sind auf eine erneute Lichtexposition vorbereitet

Die Zucht von *Synechocystis* sp. unter heterotrophen Bedingungen, mit Glukose als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle, führte zu einer drastischen Reduzierung des Thylakoidmembransystems (Abb. 13). Interessanterweise hatte diese deutliche physiologische Veränderung nur geringfügige Auswirkungen auf die Expression der Proteinkomplexe der Thylakoidmembran. Nur das PS II zeigte einen reduzierten Gehalt, wogegen bei der Häufigkeit der Untereinheiten der NADH-Dehydrogenase, des Cytochrom-

b₆f-Komplexes, des PS I und der ATP-Synthase keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren (siehe Anhang Tab. A1). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Veröffentlichung von Barthel *et al.*, in der gezeigt wurde, dass in heterotroph kultivierten *Synechocystis* sp.-Zellen das PS I vollständig funktional, das PS II jedoch inaktiv vorliegt und erst zusammen mit der fortschreitenden Rückbildung des Thylakoidsystems unter Licht seine Aktivität zurückerlangt (Barthel *et al.*, 2013). Von der Reduzierung des PS II unter LAHG-Bedingungen sind der Großteil der kleinen PS II-Untereinheiten und Komponenten der initialen PS II-Assemblierung nicht betroffen (siehe Anhang Tab. A1). Darüber hinaus wurden Proteine wie SII1694, die an dem Transport von Chlorophyll zum PS II involviert sind (He & Vermaas, 1999), nur unter LAHG-Bedingungen detektiert bzw. als Proteine mit gesteigerter Häufigkeit identifiziert. Somit scheint die dunkeladaptierte Zelle auf eine erneute Lichtexposition vorbereitet zu sein, um aktives PS II schnellstmöglich bilden zu können. Auch die pigmentbindenden Untereinheiten der Phycobilisomen, welche als häufigste Proteine der cyanobakteriellen Zelle gelten, zeigten unter LAHG-Bedingungen in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen (Barthel *et al.*, 2013) keine signifikante Änderung zu lichtadaptierten Zellen (siehe Anhang Tab. A1). Allerdings deutet der reduzierte Gehalt an *Linkerproteinen* auf Phycobilisomen mit beeinträchtigter Lichtsammelfunktion hin (siehe Anhang Tab. A1), da diese an der Weiterleitung von Excitationsenergie zu den Photosystemen sowie an der Stabilisierung der Phycobilisomstruktur maßgeblich beteiligt sind (MacColl, 1998). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass eine Anregung der Phycobilisomen unter LAHG-Bedingungen zu einer verstärkten Fluoreszenzemission bei 685 nm führte, was sich auf einen bestimmten Anteil ungekoppelter Phycobilisomen zurückführen ließ (Barthel *et al.*, 2013). Der terminale Emitter der Phycobilisomen kann die Anregungsenergie somit nicht auf die Photosysteme weiterleiten und verursacht die starke Fluoreszenzemission bei 685 nm (Rakhimberdieva *et al.*, 2007). Mit einem inaktiven PS II sind heterotroph kultivierte Zellen sensitiv gegenüber unvermittelt verfügbarer Lichtenergie, die, von den Phycobilisomen als Anregungsenergie auf die Photosysteme übertragen, Schäden verursachen kann. Davor scheint sich *Synechocystis* sp. unter LAHG-Bedingungen durch eine verstärkte Expression des *Orange Carotenoid Protein* (OCP) zu schützen, welches in der quantitativen Analyse eine 11-fache Konzentrationsänderung im Vergleich zu photomixotrophen Bedingungen aufwies (Abb. 16, siehe Anhang Tab. A1). Unter Starklicht wird die Expression des photoprotektiven OCP induziert und schützt die Zelle vor übermäßig absorbierter Lichtenergie (Boulay *et al.*, 2008). Eine erhöhte Akkumulation von OCP in *Synechocystis* sp. unter heterotrophen Bedingungen konnte auch in einer früheren Proteomanalyse festgestellt werden (Kurian *et al.*, 2006a).

Zusammen betrachtet scheinen dunkeladaptierte *Synechocystis* sp.-Zellen darauf vorbereitet zu sein, sich bei wieder verfügbarem Licht vor überschüssiger Energieabsorption zu

schützen, die Komponenten des PS II schnell zu einem funktionellen Photosystem zu assemblieren und sich somit in kurzer Zeit auf phototrophes Wachstum einzustellen.

Unter den Proteinen Vipp1, DnaK3, YidC und Slr1768, denen eine Beteiligung an der Thylakoidmembranbiogenese in *Synechocystis* sp. zugeschrieben wurde, konnten nur für YidC und Slr1768 signifikante Änderungen detektiert werden. Ein geringerer Anteil von YidC könnte allerdings auch lediglich auf die Reduzierung des Thylakoidsystems zurückzuführen sein. Dagegen unterstreicht die in der quantitativen Analyse gemessene erhöhte Konzentration von Slr1768, eine mögliche Funktion bei der Thylakoidmembranbiogenese von *Synechocystis* sp. (siehe Anhang Tab. A1) (Bryan et al., 2011).

4.1.3 Das Wachstum unter LAHG-Bedingungen verursacht Stress

Infolge der heterotrophen Lebensweise dient unter LAHG-Bedingungen einzig der Elektronentransport der Atmungskette dem Aufbau eines elektrochemischen Gradienten zur Synthese von ATP. Dabei entstehen als unvermeidbare Nebenprodukte reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *Reactive Oxygen Species*), wie Hyperoxid-Anionen ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxyl-Radikale (HO^{\cdot}), die bei oxidativem Stress eine wesentliche Rolle spielen (Imlay, 2003; Latifi et al., 2009). In der quantitativen Proteomanalyse zeigten sich bei dunkeladaptierten Zellen vermehrt Komponenten der oxidativen Stressantwort, wie zum Beispiel Katalase, bei der eine über 60-fach gestiegene Häufigkeit in der Membranfraktion nachgewiesen werden konnte (Abb. 16). Auch beim photosynthetischen Elektronentransport unter Lichtbedingungen entstehen reaktive Sauerstoffspezies, nur scheint die Verwertung von Glukose als einziger Energiequelle zu einer erhöhten Produktion von ROS zu führen und die Zelle somit verstärkt oxidativem Stress auszusetzen. Zudem wurde in Übereinstimmung mit früheren Studien (Tabei et al., 2009) das Hitzeschockprotein HtpG vermehrt nachgewiesen (Abb. 16), welches an der Adaptation an oxidativen Stress beteiligt ist (Hossain & Nakamoto, 2003).

Aber auch Chaperone, die bei der generellen Stressantwort involviert sind, zeigten unter LAHG-Bedingungen erhöhte Konzentrationen (Abb. 16). Wie in vorangehenden Arbeiten beschrieben (Choi et al., 2000; Tabei et al., 2009), war auch hier ein erhöhter Anteil an GroEL-1 und GroEL-2 in dunkeladaptierten Zellen nachzuweisen. Dieser Effekt zeigte sich nicht beim Vergleich des Proteoms unter photomixotrophen und photoautotrophen Bedingungen (Kurian et al., 2006b). Interessanterweise ließen sich bei allen homologen Hsp70-Proteinen Veränderungen in den dunkeladaptierten Zellen detektieren. Dabei schien die Expression von DnaK1 und DnaK2 anzusteigen, während sie für DnaK4 sowie bedingt für DnaK3 reprimiert zu sein schien (Abb. 16, siehe Anhang Tab. A1). Mit der Funktion des kanonischen Hitzeschockproteins in *Synechocystis* sp. ist der erhöhte Bedarf an DnaK2

unter den stressinduzierenden heterotrophen Wachstumsbedingungen nachvollziehbar. Möglicherweise könnte dabei das nicht essentielle DnaK1 eine vergleichbare Chaperonfunktion einnehmen. Die Reduzierung des zellulären Gehalts an DnaK3 und DnaK4 im Dunkeln lässt eine lichtabhängige Regulation in Betracht ziehen. Die Gene beider Proteine sind in einem Operon organisiert und werden wahrscheinlich polycistronisch transkribiert. Dies konnte im Fall von DnaK4 anhand eines gemeinsamen Transkripts aus den acht offenen Leserahmen des Operons (*slr0086* bis *slr0096*) nachgewiesen werden (Trautmann et al., 2013). Die entsprechenden Gene kodieren für Proteine, die an der Tocopherol- bzw. Carotinoid-Biosynthese sowie am Schutz der Zelle vor oxidativem Stress beteiligt sind. Darunter befindet sich die Aldehyddehydrogenase Slr0091, bei welcher eine signifikante Expressionssteigerung durch Starklicht beschrieben wurde (Trautmann et al., 2013), was eine lichtabhängige Expression von DnaK4 mit einschließen könnte. Eine Kotranskription von *slr0093*, welches für ein membranständiges DnaJ kodiert, mit *slr0086* lässt in Slr0093 einen möglichen Interaktionspartner von DnaK4 vermuten. Außerdem könnte die gravierende Repression der DnaK4-Expression in dunkeladaptierten Zellen auf eine potenziell lichtabhängige Expression und somit auf eine wichtige Funktion unter licht-induziertem Wachstum dieses speziellen DnaK-Homologs hindeuten.

Insgesamt zeigten die Daten der Proteom- und Lipidomanalyse deutlich die physiologische Umstellung des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. von photomixotrophem zu heterotrophem Wachstum, unter Nutzung von Glukose als einzige Energiequelle. Außerdem änderte sich die Lipidzusammensetzung in Richtung gesättigte Fettsäuren, was vermutlich den geringen Proteingehalt in der Thylakoidmembran kompensieren soll. Trotz der weitgehenden physiologischen Änderungen bei der Dunkeladaptation, zeigte die Zelle Anpassungen, die bei wieder verfügbarem Licht eine schnelle Umstellung auf phototrophes Wachstum ermöglichen können. Mit einem erhöhten Gehalt an photoprotektivem *Orange Carotenoid Protein* und der Strategie, die photosynthetische Elektronentransportkette in kurzer Zeit durch Aufbau von aktivem Photosystem II wieder zu vervollständigen, ist das Cyanobakterium auf eine erneute Lichtexposition vorbereitet. Allgemein scheint die heterotrophe Lebensweise für die Zelle mit Stress verbunden zu sein, da die Expression von Chaperonen der oxidativen bzw. generellen Stressantwort hochreguliert war. Daran sind wahrscheinlich auch Hsp70-Proteine, wie DnaK1 und DnaK2, beteiligt. Die erhöhte Expression von DnaK3 und DnaK4 unter Lichtbedingungen lässt auf eine vorwiegende Funktion unter phototrophem Wachstum schließen.

4.2 Die Rolle der DnaK-Proteine bei der Proteinbiosynthese und beim Proteintransport

Bereits während der Proteinbiosynthese wird das naszierende Polypeptid durch Interaktion mit den Chaperonen *Trigger Factor* (TF) und DnaK vor Aggregation und Fehlfaltung geschützt. Das wichtige Zusammenspiel der Proteine wird durch Deletion des *Trigger Factors* deutlich, was eine verstärkte Interaktion von DnaK mit naszierenden Ketten zur Folge hat (Deuerling et al., 1999; Teter et al., 1999). Allgemein kompensiert die Zelle das Fehlen von TF mit der Induktion der Hitzeschockantwort und somit einer generell erhöhten Expressionsrate von Proteasen und Chaperonen (Deuerling et al., 2003). Eine gleichzeitige Deletion von TF und DnaK führt in *E. coli* zu einer synthetischen Lethalität verbunden mit massiver Proteinaggregation, was die Bedeutung beider Proteine für die Proteinfaltung hervorhebt (Deuerling et al., 1999). Eine Faltung von cytosolischen Polypeptiden kann abhängig von ihrer Beschaffenheit nach einer Interaktion mit TF spontan oder unterstützt durch DnaK und/oder das GroEL/GroES-System erfolgen (Deuerling & Bukau, 2004). Proteine, die für andere Zellkompartimente bestimmt sind, werden durch spezifische Transportsysteme transloziert bzw. in Membranen eingebaut. Der Transport des betreffenden Polypeptids kann hierbei im ungefalteten Zustand in Verbindung mit Chaperonen ko- und posttranslational oder im gefalteten Zustand posttranslational erfolgen (Müller et al., 2001). Für diesen Vorgang werden Faktoren benötigt, die Erkennungssequenzen registrieren und einen gerichteten Transport ermöglichen. In *E. coli* bekannte Faktoren sind das Ribonukleoprotein SRP (*Signal Recognition Particle*) und das Chaperon SecB, welches neusynthetisierte Polypeptide im ungefalteten Zustand zum Sec-Translokationssystem in der Plasmamembran leitet (Müller et al., 2001; Zhou & Xu, 2005). Eine Deletion von SecB kann in *E. coli* durch die Chaperone DnaK und DnaJ kompensiert werden (Altman et al., 1991). Interessanterweise ist SecB in Chloroplasten und Cyanobakterien nicht vorhanden. Demzufolge wurden weitere Chaperone in Verbindung mit dem gerichteten Transport zu membrangebundenen Translokasen gebracht (Müller et al., 2001; van der Sluis & Driessen, 2006). Für einige Proteine, welche über die Tat-Translokase transportiert werden, konnte eine Interaktion von DnaK mit spezifischen Signalsequenzen nachgewiesen werden (Graubner et al., 2007). Zusammen betrachtet lässt sich somit eine Beteiligung von Hsp70-Chaperonen am gerichteten Proteintransport annehmen. Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. besitzt mehrere homologe Hsp70-Proteine und zwei zusätzliche Zellkompartimente durch das interne Thylakoidmembransystem. Eine mögliche Beteiligung bestimmter DnaK-Proteine an der Proteinfaltung zusammen mit *Trigger Factor* und am Transport zu den Thylakoidmembranen konnte in dieser Arbeit experimentell nachgewiesen werden.

4.2.1 DnaK1, 2 und 3 könnten zusammen mit *Trigger Factor* mit naszierenden Polypeptiden interagieren

Wie in *E. coli* ist es auch in *Synechocystis* sp. möglich, *Trigger Factor* (TF) zu deletieren, ohne die Zellviabilität zu beeinträchtigen (Abb. 29 und Abb. 32). Demzufolge kann die TF-Funktion auch hier von anderen Proteinen übernommen werden. Anhand von Western-Blot-Analysen wurde im Stamm *Synechocystis* sp. Δtig eine verstärkte Expression von DnaK1, DnaK2 und DnaK3 (Abb. 33 und Abb. 34) nachgewiesen, die für eine Kompensation der Deletion von TF verantwortlich sein könnten. DnaK-Proteine binden ähnlich wie TF hydrophobe Sequenzbereiche an Substratoberflächen, dementsprechend konnte in *E. coli*, anhand eines Screenings von Peptid-Bibliotheken, eine hohe Übereinstimmung ihrer Substratbindespezifitäten nachgewiesen werden (Deuerling et al., 2003; Patzelt et al., 2001). Anhand einer Deletion von TF wurde außerdem eine verstärkte Interaktion von DnaK mit naszierenden Ketten aufgezeigt (Deuerling et al., 1999; Teter et al., 1999). Demgemäß könnten auch in *Synechocystis* sp. bei einem Verlust der TF-Funktion, die DnaK-Proteine verstärkt mit neusynthetisierten Polypeptiden interagieren. Entgegen einer spezifischen Expressionssteigerung eines bestimmten DnaK Proteins kam es zu einem Anstieg von DnaK1, 2 und 3, was für eine kooperative Funktion der homologen Hsp70-Proteine bei der Interaktion mit naszierenden Proteinen spricht. Dabei wies DnaK2 als kanonisches Hitzeschockprotein die stärkste Expressionssteigerung auf, in Übereinstimmung mit der allgemeinen Induktion der Hitzeschockantwort bei Deletion von TF in *E. coli* (Abb. 34) (Deuerling et al., 2003). Das DnaK1-Protein aus *Synechocystis* sp. ist wie DnaK aus *E. coli* nicht essentiell, konnte aber im Unterschied zu diesem ohne Verlust der Zellviabilität gemeinsam mit dem *tig*-Gen in *Synechocystis* sp. deletiert werden (Abb. 30 und Abb. 32). Der Doppeldeletionsstamm $\Delta dnaK1\Delta tig$ zeigte zwar eine Beeinträchtigung des Wachstums bei 42°C, die aber sehr wahrscheinlich auf die Deletion von DnaK1 zurückzuführen ist (Abb. 32). Interessanterweise war beim Verlust der DnaK1-Funktion eine erhöhte Expression des TF-Proteins im Stamm $\Delta dnaK1$ nachzuweisen (Abb. 33). Somit wäre es möglich, dass TF die Funktion des Hsp70-Proteins übernehmen und DnaK1 eine hervorgehobene Bedeutung bei der kooperativen Interaktion mit naszierenden Polypeptidketten zusammen mit TF zukommen könnte. Allerdings ist eine gemeinsame Deletion von *tig* und *dnaK1* möglich, sodass der Verlust beider Funktionen durch weitere Proteine kompensiert werden kann. Eine Deletion von DnaK1 und TF hatte Auswirkungen auf die Expression der anderen Hsp70-Proteine (Abb. 34). Demgemäß zeigte DnaK2 bei Deletion von DnaK1 eine rund 2-fache Expressionssteigerung und bei Deletion von TF eine rund 4-fache Steigerung. Auch bei einer Doppeldeletion $\Delta dnaK1\Delta tig$ war eine rund 4-fach erhöhte DnaK2-Expression zu verzeichnen (Abb. 34). Somit könnte DnaK2 die Funktion von DnaK1 und TF ersetzen und bei Deletion von *tig* und *dnaK1* vermehrt mit naszierenden Polypeptiden interagieren.

Dementsprechend könnte DnaK3 an der Kompensation der Deletion von TF beteiligt sein, da in *Synechocystis* sp. Δ *tig* eine Expressionssteigerung (42 ± 21 %) nachweisbar war (Abb. 34). Hingegen war die DnaK3-Konzentration bei den Stämmen Δ *dnaK1* und Δ *dnaK1\Delta**tig* im Vergleich zum Wt-Stamm um etwa 40 % verringert (Abb. 34). Die Auswirkung der Deletion von *dnaK1* auf die DnaK3-Expression war somit größer als der Effekt der Deletion von *tig*. Da sich die Expression der homologen Hsp70-Proteine bei Deletion von *dnaK1* änderte, scheint sich der relative Gehalt DnaK1:DnaK2:DnaK3 (1:5,5:1,2 unter Standardbedingungen (Rupprecht et al., 2010)) den physiologischen Bedingungen anpassen zu können. Neben der Funktion als Faltungshelfer könnten die Hsp70-Proteine in *Synechocystis* sp. auch am gerichteten Transport der Polypeptide in die verschiedenen Zellkompartimente beteiligt sein. Dabei trat die Verbindung zwischen TF und DnaK1 besonders hervor, da TF die DnaK1-Funktion möglicherweise übernehmen könnte. Zusammengefasst lassen die Ergebnisse in *Synechocystis* sp. auf ein kooperatives Netzwerk der homologen Hsp70-Proteine DnaK1, 2, und 3 zusammen mit *Trigger Factor* schließen, welches maßgeblich dazu beiträgt, naszierende Polypeptide vor Aggregation zu schützen und ihre korrekte Faltung zu begünstigen.

4.2.2 DnaK3 ist ein essentieller Faktor für die Aufrechterhaltung funktioneller Thylakoidmembranen

Mit Hilfe von speziellen Proteinkomplexen in der Thylakoidmembran ist die cyanobakterielle Zelle befähigt, über photosynthetischen Elektronentransport in der sogenannten Lichtreaktion Lichtenergie in chemische Energie umzuwandeln. Allerdings kommt es dabei unweigerlich zu stressinduzierten Schäden, die einen steten Auf- und Abbau bzw. eine stete Reparatur der betreffenden Proteine erforderlich macht (Melis, 1999; Muramatsu & Hihara, 2012; Sass et al., 1997). Außerdem kann das Thylakoidsystem den vorherrschenden Umweltbedingungen wie der Lichtverhältnisse angepasst werden. So wird es bei einer andauernden Kultivierung in Dunkelheit stark reduziert und mit einer Inkubation im Licht wieder aufgebaut, wobei Licht mit hoher Intensität wiederum zu einer Rückbildung des Systems führt, um die Zelle vor Schäden der übermäßig vorhandenen Energie zu schützen (Barthel et al., 2013; Kopečna et al., 2012). Daneben muss das Thylakoidsystem nach jeder Zellteilung wieder aufgebaut werden, da es zuvor auf die zwei Tochterzellen aufgeteilt wurde (van de Meene et al., 2006; Vothknecht & Westhoff, 2001). Zusammen betrachtet scheint eine Beteiligung von Hsp70-Proteinen an der Biogenese bzw. Aufrechterhaltung der Thylakoidmembran sehr naheliegend. Entsprechend konnte dem in Chloroplasten von *Chlamydomonas* sp. lokalisierten Hsp70B eine mögliche Beteiligung am Reparaturmechanismus des PS II zugeschrieben werden (Schroda et al., 1999). In

Cyanobakterien wurde unter den homologen DnaK-Proteinen vor allem DnaK3, zusammen mit dem möglichen Kochaperon DnaJ3, in Verbindung mit der Biogenese bzw. Instandhaltung der Thylakoidmembran gebracht (Düppre et al., 2011; Katano et al., 2006; Nimura et al., 1996). Dies wird durch die Beobachtung bekräftigt, dass das Cyanobakterium *Gloeobacter violaceus* keine Thylakoidmembranen besitzt und gleichzeitig auch kein DnaK3 oder DnaJ3 enthält (Nakamura et al., 2003; Rippka et al., 1974).

In dieser Arbeit konnte eine Beteiligung von DnaK3 an der funktionellen Aufrechterhaltung der Thylakoidmembran in *Synechocystis* sp. experimentell nachgewiesen werden.

4.2.2.1 Die Expression von DnaK3 wird wahrscheinlich posttranskriptionell durch Licht reguliert

Die im Rahmen dieser Arbeit aufgezeigte lichtabhängige Expression von DnaK3 bekräftigt eine mögliche Funktion, die eng mit der lichtabhängigen Thylakoidmembranbiogenese verbunden ist (Abb. 20). Allerdings scheint DnaK3 auch bei Dunkelheit eine unentbehrliche Funktion einzunehmen, weil eine Deletion von *dnaK3* unter *light-activated heterotrophic growth* (LAHG)-Bedingungen nicht zu erreichen war (Abb. 21 B). Eine Funktion von DnaK3 verbunden mit der Thylakoidmembranbiogenese ist jedoch auch in dunkeladaptierten Zellen denkbar, da das Thylakoidsystem zwar weitestgehend reduziert vorliegt, aber noch rudimentär vorhanden ist (Barthel et al., 2013; Vernotte et al., 1992). Wahrscheinlich könnte die Zelle mit einem Basallevel an DnaK3 auf eine erneute Lichtexposition vorbereitet sein, um schnellstmöglich die Thylakoidmembranen wieder aufzubauen (siehe auch Abschnitt 4.1.2). Interessanterweise hatten bei Promotoraktivitätsstudien alle getesteten Stressbedingungen, einschließlich Starklicht, keine Auswirkung auf die *dnaK3*-Transkription (Mary et al., 2004; Rupprecht et al., 2010). Dies ist in Übereinstimmung mit den Studien zu *dnaJ3* (*sll1933*), welches zusammen mit *dnaK3* in einem Operon organisiert vorliegt und für das ebenfalls keine transkriptionelle Regulation nachgewiesen werden konnte (Düppre, 2011; Mary et al., 2004; Rupprecht et al., 2010). Demzufolge könnte eine posttranskriptionelle Regulation für die nachweisliche Induktion der Expression von DnaK3 unter Lichteinfluss zu Grunde liegen.

4.2.2.2 Die Depletion von DnaK3 führt zu weitreichenden physiologischen Veränderungen

In dieser Arbeit konnte die besondere Bedeutung von DnaK3 für die photosynthetischen Reaktionen in der Thylakoidmembran von *Synechocystis* sp. anhand der Depletionsmutante $\Delta dnaK3$ aufgezeigt werden. Im Vergleich zum Wt-Stamm zeigte der $\Delta dnaK3$ -Stamm einen um 70 % reduzierten Gehalt an DnaK3 (Abb. 21 C). Als Folge dieser Depletion von DnaK3

zeigten $\Delta dnaK3$ -Zellen verschiedene phenotypische Charakteristika, wie eine beträchtliche Reduzierung des Chlorophyllgehalts mit einer Änderung der Pigmentzusammensetzung (Abb. 23), ein allgemein geringerer Gehalt der Photosysteme mit einem verringerten PS I:PS II-Verhältnis (Abb. 24), eine stärker reduzierte Elektronentransportkette (Abb. 27) und eine signifikant verminderte photosynthetische Aktivität (Abb. 25 und Abb. 26). Allerdings hatte eine Depletion von DnaK3 keine Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten des $\Delta dnaK3$ -Stamms, welches unter Schwach- und Starklichtbedingungen mit dem wildtypischen Stamm vergleichbar war (Abb. 28). Auch bei der Ultrastruktur des Thylakoidsystems konnten keine sichtbaren Unterschiede im Vergleich zum Wt ausgemacht werden, nur die Anzahl der Thylakoidlamellen war bei $\Delta dnaK3$ leicht reduziert (Abb. 22). Demnach scheint die Depletion von DnaK3 keinen signifikanten Einfluss auf die Vitalität von *Synechocystis* sp. zu besitzen, obgleich Effekte auf photosynthetische Prozesse deutlich erkennbar waren.

4.2.2.3 Der Phänotyp des $\Delta dnaK3$ -Stamms zeigt Merkmale einer Starklichtadaptation

Während einer Anpassung an höhere Lichtintensitäten ist die Zelle bestrebt ihre Lichtsammelkapazität zu reduzieren, um kritische Schäden durch eine überlastete Elektronentransportkette (ETK) weitestgehend zu verhindern (Muramatsu & Hihara, 2012). Bei der physiologischen Charakterisierung von Wt- und $\Delta dnaK3$ -Zellen nach Anzucht unter Schwach- (LL) bzw. Starklichtbedingungen (HL) ließ sich eine große Ähnlichkeit zwischen den Stämmen $\Delta dnaK3LL$ und WtHL feststellen. Interessanterweise zeigte sich für den $\Delta dnaK3$ -Stamm bereits unter Schwachlichtbedingungen eine Veränderung der Pigmentzusammensetzung mit der Reduzierung des Chlorophyllgehalts und einer relativen Erhöhung der photoprotektiven Carotinoide (Abb. 23) (Muramatsu & Hihara, 2012). Der Anstieg des Verhältnisses Phycocyanin:Chlorophyll bei den Stämmen $\Delta dnaK3$ und WtHL kann höchstwahrscheinlich auf die beträchtliche Herabregulierung des Chlorophylls zurückgeführt werden. Bekanntermaßen wird als Antwort auf starke Lichtintensitäten die Lichtsammelkapazität der Phycobilisomen reduziert, ihre Loslösung von der Thylakoidmembran induziert und allgemein der Gehalt an Phycobilisomen durch Herabregulierung der Gene, welche für PBS-Untereinheiten kodieren, verringert (Grossman et al., 1993; Muramatsu & Hihara, 2012; Pojidaeva et al., 2004). Entsprechend war bei der Untersuchung der Energieübertragung von PBS auf PS II mittels 77 K-Spektroskopie im Vergleich zum WtLL-Stamm bei den Stämmen WtHL, $\Delta dnaK3LL$ und $\Delta dnaK3HL$ ein Anstieg der Emission E_{684} zu beobachten (Abb. 24). Dies könnte auf nicht übertragene Energie der Phycobilisomen auf die Photosysteme zurückzuführen sein und somit für nicht vollständig assemblierte oder von der Membran entkoppelte PBS sprechen (Rakhimberdieva et al., 2007). Bekannterweise wird in Cyanobakterien unter Starklichtbedingungen der Gehalt an Photosystemen reduziert, um vor

zu viel gesammelter Lichtenergie geschützt zu sein, wobei die Expression des PS I am stärksten herabreguliert wird (Hihara et al., 1998; Murakami & Fujita, 1991). Entsprechend konnte das verringerte PS I:PS II-Verhältnis und der allgemein geringere Gehalt der Photosysteme für die Stämme WtHL, $\Delta dnaK3LL$ und $\Delta dnaK3HL$ nachgewiesen werden (Abb. 24). Mit der Adaptation an höhere Lichtintensitäten und der damit verbundenen herabgesetzten Lichtsammelkapazität ergab sich demzufolge für die Stämme WtHL, $\Delta dnaK3LL$ und $\Delta dnaK3HL$ eine verringerte photosynthetische Aktivität, die anhand der Sauerstoffproduktion und der PAM-Fluoreszenzmessungen dokumentiert werden konnte (Abb. 25 und Abb. 26).

Zusammenfassend betrachtet führte die Depletion von DnaK3 bei dem $\Delta dnaK3$ -Mutationsstamm zu phenotypischen Veränderungen, die beim Wildtypstamm unter Starklicht-Exposition zu beobachten waren. Gleichwohl scheint die Detektion und Anpassung an Starklicht in $\Delta dnaK3$ unbeeinträchtigt zu sein, da $\Delta dnaK3HL$ -Zellen meist eine weitgehendere Adaptation im Vergleich zu $\Delta dnaK3LL$ und WtHL aufwiesen (Abb. 23 bis Abb. 26).

Eine Perzeption sich ändernder Umweltbedingungen, wie erhöhte Lichtintensitäten, steht in enger Verbindung mit dem Redoxzustand von Komponenten der Elektronentransportkette (ETK) (El Bissati & Kirilovsky, 2001; Li & Sherman, 2000; Pfannschmidt, 2003). Bei *Synechocystis* sp.-Zellen konnte nach Zugabe von photosynthetischen Inhibitoren unter Starklichtbedingungen eine Genregulation nachgewiesen werden, die sich abhängig vom Redoxzustand bestimmter Teilabschnitte der ETK zeigte (Muramatsu & Hihara, 2012). Beispielsweise konnte, wenn der primäre Elektronenakzeptor Q_A im reduzierten Zustand vorlag, eine verstärkte Expression von *psbA2* detektiert werden, welches für die große Untereinheit D1 des PS II kodiert. Dagegen zeigten Gene, die für Untereinheiten des PS I und der Phycobilisomen kodieren, eine erhöhte Transkription, wenn dem Plastochinon-Pool nachfolgende Komponenten reduziert vorlagen (Muramatsu & Hihara, 2012). Bisher ist über Regulationsfaktoren der redoxabhängigen Transkription und ihre Wechselwirkung mit Komponenten der ETK jedoch wenig bekannt. Anhand der schnelleren Re-Reduktion von oxidiertem PS I kann bei der $\Delta dnaK3$ -Mutante von einer stärkeren Reduktion der ETK im Vergleich zum WtLL-Stamm ausgegangen werden (Abb. 27). Somit könnte die Perzeption des Redoxzustandes durch redox-induzierte Signalwege bei dem $\Delta dnaK3$ -Stamm eine Herabregulierung der Transkription von Genen der Pigmentsynthese (Abb. 23) und der Photosystem-Untereinheiten (Abb. 24) induziert haben, welche eine physiologische Adaptation an höhere Lichtintensitäten zur Folge hatte. Interessanterweise schien DnaK3 ausschließlich bei hohen Temperaturen für das Wachstum von *Synechocystis* sp. essentiell zu sein, da der Depletionsstamm $\Delta dnaK3$ unter allen getesteten Stressbedingungen nur bei

einer erhöhten Temperatur von 42 °C ein beeinträchtigt Wachstum zeigte (Abb. 18). Die Photosyntheseleistung ist in phototrophen Organismen durch Temperaturveränderungen stark beeinflussbar und eine Kombination von Hitze und Starklicht führt zu einer noch erheblicheren Beeinträchtigung der photosynthetischen Aktivität (Salvucci & Crafts-Brandner, 2004). Hohe Temperaturen und Lichtintensitäten führen zu einer Überreduktion des Plastochinon-Pools und zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (Asadulghani et al., 2003). Demzufolge könnte das Wachstumsdefizit des $\Delta dnaK3$ -Stamms bei 42 °C auf die übermäßige Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zurückzuführen sein, da die DnaK3-Depletion zusammen mit der erhöhten Temperatur wahrscheinlich eine Überreduktion des Plastochinon-Pools zu Folge hatte.

4.2.2.4 DnaK3 könnte am gerichteten Transport von Polypeptiden zur Thylakoidmembran beteiligt sein

Die möglichen Ursachen für die stärker reduzierten Komponenten der Elektronentransportkette (ETK) im $\Delta dnaK3$ -Stamm bleiben indes mannigfältig, da die Gesamtfunktion von DnaK3 noch ungeklärt ist. Jedoch handelt es sich bei der Lichtadaptation um einen koordinierten Prozess, der unmittelbar von der Perzeption der Lichtintensität und des Redoxzustandes der Zelle abhängig ist (El Bissati & Kirilovsky, 2001; Muramatsu & Hihara, 2012), wodurch insbesondere Regulationssysteme von der Depletion der DnaK3-Funktion beeinträchtigt sein könnten. Die Histidinkinase Hik33 (SlI0698) ist nachweislich an der Perzeption und Adaptation an Starklicht beteiligt und reguliert wahrscheinlich zusammen mit dem Regulationsprotein RpaB (Slr0947) als Zweikomponentensystem die lichtabhängige Genexpression in *Synechocystis* sp. (Emlyn-Jones et al., 1999; Hsiao et al., 2004; Mascher et al., 2006; Tu et al., 2004). Interessanterweise führte die Deletion von *hik33* unter Schwachlichtbedingungen zu einer Expression von starklichtinduzierten Genen, wodurch Hik33 eine Regulation von Genen, die für die Photosynthese wichtig sind, zugeschrieben wurde (Hsiao et al., 2004). Somit wäre eine Beteiligung von DnaK3 an dem Transport spezifischer Substrate, wie Hik33, zur Thylakoidmembran denkbar. Entsprechend wurde in einer vorangehenden Studie die Kernuntereinheit D1 des PS II (PsbA) als mögliches Substrat von DnaK3 in *Synechococcus* sp. vorgeschlagen (Katano et al., 2006). Die Translation der *psbA*-Transkripte zeigte sich in *Synechocystis* sp. im besonderen Maße lichtabhängig, da die Translation an cytosolischen Ribosomen bei Dunkelheit an einer bestimmten Stelle pausierte und erst im Licht nach der Direktion des Translationskomplexes zur Thylakoidmembran weitergeführt wurde (Tyytjarvi et al., 2001). DnaK3 könnte somit das naszierende PsbA am Ribosom spezifisch binden und den gerichteten Transport zur Thylakoidmembran vermitteln.

Durchaus könnte DnaK3 auch ein breiteres Substratspektrum aufweisen und ein allgemein verringerter Proteintransport zur Thylakoidmembran für die Veränderungen in der Depletionsmutante $\Delta dnaK3$ verantwortlich sein. Eine mögliche Interaktion mit naszierenden Polypeptiden könnte von der verstärkten Expression von DnaK3 bei Deletion des *Trigger Factor*-Gens abgeleitet werden (Abb. 34 und siehe Abschnitt 4.2.1). Für DnaK3 aus *Synechococcus* sp. wurde darüber hinaus eine Interaktion mit der ribosomalen Untereinheit L24 vorgeschlagen, welche direkt neben der TF-interagierenden Untereinheit L23 lokalisiert ist (Katano et al., 2006; Kramer et al., 2002). Zusammen betrachtet könnte DnaK3 am gerichteten Transport diverser Proteine zu den Translokationssystemen in der Thylakoidmembran beteiligt sein.

DnaK3 weist in der Primär- und Tertiärstruktur eine hohe Ähnlichkeit zu den homologen Hsp70-Proteinen aus *E. coli* und *Synechocystis* sp. auf, was zusammen mit der nachweisbaren Interaktion mit dem Nukleotidaustauschfaktor GrpE auf eine ATP-abhängige Chaperonfunktion schließen lässt (Tab. 11 und Abb. 47) (Rupprecht et al., 2010). Charakteristisch für DnaK3 ist ein verlängerter C-Terminus mit einem konservierten tryptophan- und aspartatreichen Motiv, welcher die Assoziation mit der Thylakoidmembran vermittelt und für die DnaK3-Funktion essentiell ist (Rupprecht et al., 2010). Die Bindung an die Membran kann als relativ stark beschrieben werden, da bei einer Alkaliextraktion mit Na_2O_3 keine Elution des Proteins von der Membran erfolgte (Rupprecht et al., 2007b). Wie die Bindung im Detail erfolgt, bleibt allerdings unklar. Für DnaK3 aus *Synechococcus* sp. wurde die Substratbindedomäne als essentielles Strukturelement zur Membranbindung beschrieben (Nimura et al., 1996). Auch bei einer Verkürzung des C-Terminus mit dem konservierten tryptophan- und aspartatreichen Motiv war eine Membranlokalisation des rekombinanten DnaK3-Proteins nachzuweisen (Nimura et al., 1996). Dieses Motiv scheint dennoch eine bedeutende Aufgabe zu übernehmen, da sich die C-terminale Sequenz aus den letzten neun Aminosäuren, die das entsprechende Motiv enthält, als essentiell für die Funktion von DnaK3 aus *Synechocystis* sp. erwies (Rupprecht et al., 2010).

4.2.2.5 Verschiedene Wechselwirkungen können der Bindung von DnaK3 an die Thylakoidmembran zu Grunde liegen

Eine naheliegende Ursache für die Assoziation von DnaK3 an die Thylakoidmembran wäre eine Interaktion mit membranständigen DnaJ-Proteinen. Dementsprechend wurde eine Interaktion von DnaK3 aus *Synechococcus* sp. mit dem membranständigen DnaJ3 vorgeschlagen (Katano et al., 2006). In *Synechocystis* sp. hingegen handelt es sich bei DnaJ3 (Sll1933) um ein lösliches Protein, das wahrscheinlich zusammen mit DnaK3 exprimiert wird und als Kochaperon am gerichteten Proteintransport beteiligt sein könnte (Düppe et al., 2011).

Auch eine Wechselwirkung von DnaK3 mit Translokationssystemen ist denkbar, könnte aber weitere membranspezifische Kofaktoren erfordern, da das Sec-System in Cyanobakterien höchstwahrscheinlich in Cytoplasmamembran und Thylakoidmembran gleichermaßen aktiv vorliegt (Barbrook et al., 1993; Nakai et al., 1994; Nakai et al., 1993; Schneider, 2014).

Neben einer voraussichtlichen Wechselwirkung mit Membranproteinen könnte DnaK3 möglicherweise über seinen C-Terminus direkt mit den Lipiden der Thylakoidmembran interagieren. Für das humane Hsp70-Homolog wurde eine spezifische Bindung an Lipidmembranen nachgewiesen, bei der Tryptophanreste eine maßgebliche Rolle spielen (Mahalka et al., 2014). Bemerkenswerterweise enthält das konservierte Motiv am C-Terminus von DnaK3 aus *Synechocystis* sp. zwei Tryptophanreste, die sechs Aspartatreste flankieren. Es bleibt zu analysieren, ob dieses Motiv eine Protein-Lipid-Interaktion von DnaK3 vermitteln könnte. Allerdings würde diese Bindung nur als zusätzliche Stabilisierung der Membranassoziation dienen, da die Cytoplasmamembran und Thylakoidmembran eine vergleichbare Lipidzusammensetzung aufweisen (Gombos et al., 1996), was eine spezifische Interaktion mit der Thylakoidmembran erschweren würde.

Bisher sind noch keine typischen Erkennungssequenzen für einen Transport von Polypeptiden zur Thylakoidmembran in Cyanobakterien bekannt, jedoch wurden im N-Terminus von Propeptiden Bereiche mit charakteristischen physikochemischen Eigenschaften gefunden, die einen spezifischen Transport in *Synechocystis* sp. vermitteln könnten (Rajalahti et al., 2007). Es bleibt zu untersuchen, ob DnaK3 bestimmten Signalsequenzen für einen gerichteten Transport erkennen und binden kann, wobei die Bestimmung der Substratspezifität wichtige Einblicke in die Interaktionspartner beim spezifischen Proteintransport ermöglichen würde. Im Rahmen dieser Arbeit war es allerdings nicht möglich geeignete Bedingungen für eine heterologe DnaK3 Expression zu finden (Abb. 42).

Zusammengefasst konnte DnaK3 als essentieller Faktor für die Aufrechterhaltung der Thylakoidmembran in *Synechocystis* sp. identifiziert werden, der möglicherweise am gerichteten Proteintransport zur Thylakoidmembran beteiligt ist.

4.3 Mögliche Funktionen der DnaK-Proteine in *Synechocystis* sp.

Im Genom von *Synechocystis* sp. sind vier homologe Hsp70-Proteine kodiert (*CyanoBase* (Nakamura et al., 2000)). Mit Ausnahme von *dnaK2* scheinen alle *dnaK*-Gene in getrennten Operons, bestehend aus mehreren Strukturgenen, vorzuliegen ((Mary et al., 2004; Trautmann et al., 2013); *Prokaryotic Operon DataBase* (Taboada et al., 2012)). Die mögliche Kotranskription der verschiedenen *dnaK*-Gene mit weiteren Genen lässt eine

zusammenhängende Funktion der entsprechenden Genprodukte für möglich erscheinen (siehe Abschnitte 4.3.2 und 4.3.5). Während die Funktion von DnaK1, DnaK3 und DnaK4 noch weitestgehend ungeklärt ist, wurde DnaK2 als das kanonische Hitzeschockprotein in *Synechocystis* sp. beschrieben (Rupprecht et al., 2010). Allerdings konnte für DnaK1, 2 und 3 eine ATP-abhängige Interaktion mit dem Nukleotidaustauschfaktor GrpE nachgewiesen werden, was für eine ATP-abhängige Funktion dieser Proteine spricht (Rupprecht et al., 2010). Außerdem deuten Beobachtungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit auf mögliche kooperative Funktionen der homologen Hsp70-Proteine in *Synechocystis* sp. hin (siehe 4.2.1). Die entsprechenden DnaK-Proteine weisen eine starke Konservierung in ihren N-terminalen Sequenzen auf, welche die NBD und einen Teil der SBD umfassen, und lassen sich primär über den variablen C-Terminus voneinander unterscheiden (Abb. 9 und Abb. 47) (Rupprecht et al., 2007b). In dieser Arbeit konnten über proteinbiochemische und *in silico* Methoden sowie anhand des Wachstumsverhaltens von Mutationsstämmen mögliche Funktionen der homologen Hsp70-Proteine in *Synechocystis* sp. abgeleitet werden. Zur Übersicht sind die putativen Funktionen und besonderen Merkmale in Abb. 49 zusammengefasst.

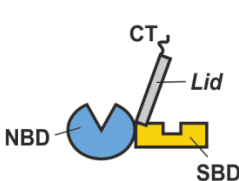


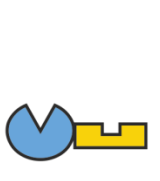
	DnaK1	DnaK2	DnaK3	DnaK4
Schematische Struktur				
Besondere Merkmale	nicht essentiell (unter Standardbedingungen) ^{1*} mögliches Operon mit <i>grpE</i> ^{2*}	essentiell ¹ kanonisches Hsp70 ³	essentiell ¹ Bindung an TM über verlängerten CT ³	C-terminal verkürzt (keine <i>Lid</i> -Domäne, kein CT) [*] evtl. keine Interaktion mit GrpE [*]
Putative Funktionen	oxidative Stressantwort [*] Säure Stressantwort [*] Hitze Stressantwort [*] kooperative Funktion mit TF [*]	generelle Stressantwort ^{3*} kooperative Funktion mit TF [*] überschneidende Funktion mit DnaK1 [*]	funktionelle Aufrechterhaltung der TM [*] Beteiligung am Proteintransport zur TM [*] Hitze Stressantwort [*]	lichtabhängige Funktion [*] ATP-abhängige Chaperonfunktion [*] oxidative Stressantwort ⁴ Ethanol Stressantwort ⁵

Abb. 49 Mögliche Funktionen der homologen DnaK-Proteine aus *Synechocystis* sp.

Die Struktur der DnaK-Proteine aus Nukleotidbindedomäne (NBD), Substratbindedomäne (SBD), *Lid*-Domäne (*Lid*) und unstrukturiertem C-Terminus (CT) ist schematisch dargestellt. Darunter sind ausgewählte besondere Merkmale und mögliche Funktionen aufgelistet. Thylakoidmembran (TM); *Trigger Factor* (TF); *diese Arbeit; ¹(Rupprecht et al., 2007b); ²(Mary et al., 2004); ³(Rupprecht et al., 2010); ⁴(Trautmann et al., 2013); ⁵(Wang et al., 2012).

4.3.1 Die spezifische Funktion der einzelnen DnaK-Proteine wird nicht allein durch den C-Terminus festgelegt

Da eine strukturelle Unterscheidung der verschiedenen DnaK-Proteine aus *Synechocystis* sp. anhand der Primärsequenz und Strukturvorhersagen hauptsächlich durch den variablen C-Terminus möglich scheint, könnten auch die jeweiligen Funktionsunterschiede der einzelnen DnaK-Proteine durch dieses Strukturmerkmal vermittelt sein. Für DnaK3 konnte entsprechend gezeigt werden, dass die C-terminalen Sequenzen für die Funktion des Proteins essentiell sind (Rupprecht et al., 2010; Rupprecht et al., 2007b). Anhand von chimären DnaK-Proteinen wurde untersucht, ob eine Übertragung spezifischer Funktionen mit dem Austausch von Sequenzen homologer Hsp70-Proteine möglich ist (Mogk et al., 1999; Nimura et al., 1996; Suppini et al., 2004). Demgemäß wurden in dieser Arbeit die C-terminalen Domänen mit den N-terminalen Domänen der Proteine DnaK1, 2 und 3 aus *Synechocystis* sp. neu kombiniert und untersucht, ob die DnaK-spezifische Funktion mit übertragen wurde (Abb. 35 bis Abb. 40). Anhand der Komplementationsstudien zeigte sich jedoch, dass keines der chimären Proteine die Funktion des jeweiligen wildtypischen DnaK-Proteins ersetzen konnte, obgleich die Chimären jeweils in ausreichender Menge exprimierbar waren (Abb. 39 und Abb. 40). Somit scheint die spezifische Funktion der einzelnen DnaK-Proteine nicht allein durch den C-Terminus festgelegt zu sein.

Im Chaperonzyklus regulieren die Interaktionspartner DnaJ und GrpE entscheidend die Aktivität der Hsp70-Proteine durch Erhöhung der ATPase-Aktivität und der Nukleotidaustauschrate (Craig et al., 2006; Packschies et al., 1997). Darüber hinaus wurden für beide Proteine weitere mögliche Wechselwirkungen aufgezeigt, welche die Interaktion von DnaK mit seinen Substraten beeinflussen können (Brehmer et al., 2004; Kampinga & Craig, 2010; Moro et al., 2007; Szabo et al., 1996). Neben der Steigerung der Geschwindigkeit des Austauschs von ADP zu ATP durch Wechselwirkung mit der NBD von DnaK könnte GrpE über hydrophobe N-terminale Sequenzbereiche als Pseudosubstrat mit dem bereits gebundenen Substrat in der SBD konkurrieren und somit womöglich seine Freigabe erleichtern (Brehmer et al., 2004; Moro et al., 2007). Des Weiteren ist es für DnaJ-Proteine möglich, selbst denaturierte Proteine zu binden und sie an die SBD von DnaK weiterzureichen (Kampinga & Craig, 2010; Szabo et al., 1996). Zusammen betrachtet könnte die spezifische Interaktion der homologen DnaK-Proteine aus *Synechocystis* sp. mit GrpE und bestimmten DnaJ-Proteinen die Aktivität und Substrataffinität des jeweiligen Chaperons maßgeblich beeinflussen und damit zur spezifischen DnaK-Funktion beitragen. Möglicherweise waren bei den chimären DnaK-Proteinen die Wechselwirkungen mit den entsprechenden Kochaperonen gestört, wodurch sie in Folge inaktiv vorlagen. Bemerkenswerterweise war es nicht möglich, durch Expression der homologen DnaK-Proteine aus *Synechocystis* sp. den Wachstumsdefekt der temperatursensitiven *E. coli*-

Mutante $\Delta dnaK756$ zu komplementieren (Rupprecht et al., 2007b). Dies könnte auf die nicht kompatiblen Kochaperone aus *E. coli* zurückgeführt werden, sodass die DnaK-Proteine aus *Synechocystis* sp. ohne Wechselwirkung mit GrpE und DnaJ ihre Funktion nicht ausüben konnten. In dieser Arbeit wurden DnaK1 und DnaK2 heterolog exprimiert und gereinigt (Abb. 41 bis Abb. 45). Die nicht detektierbare ATPase-Aktivität der gereinigten Proteine könnte in der Abwesenheit der entsprechenden Kochaperone durch den hohen Reinheitsgrad begründet liegen, ohne diese DnaK1 und DnaK2 womöglich eine sehr geringe ATP-Hydrolyse aufweisen. Wahrscheinlich erst durch Zugabe bestimmter DnaJ-Proteine kann eine signifikante Steigerung der ATP-Umsetzung beider Proteine herbeigeführt werden (Düppre, 2011). Allerdings konnte für DnaK1 und DnaK2 eine erhöhte thermische Stabilität nach ATP-Bindung nachgewiesen werden, was für eine ATP-Bindung und eine erfolgreiche Reinigung aktiver DnaK-Proteine spricht (Abb. 46).

Die homologen DnaK-Proteine aus *Synechocystis* sp. unterscheiden sich primär in ihren C-terminalen Sequenzbereichen. Diese sind jedoch wahrscheinlich an Wechselwirkungen mit der SBD beteiligt, die durch ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse über Konformationsänderungen im DnaK-Protein vermittelt werden (Zuiderweg et al., 2013). Somit könnten die chimären Proteine durch Inkompatibilität der Fremddomänen in ihrer Funktion beeinträchtigt sein.

4.3.2 Die DnaK1-Funktion ist unter bestimmten Stressbedingungen essentiell

Das *dnaK1*-Gen ist gemeinsam mit *sll0057* und *sll0060* in einem möglichen Operon organisiert ((Mary et al., 2004); *ProOpDB*, (Taboada et al., 2012)). Dabei kodiert *sll0057* für den Nukleotidaustauschfaktor GrpE, welcher als Kochaperon die Aktivität von Hsp70-Proteinen reguliert, und *sll0060* für ein putatives Membranprotein mit noch ungeklärter Funktion (Kwon et al., 2010). GrpE ist an der generellen Stressantwort beteiligt (Liberek et al., 1991) und DnaK1 könnte bei einer möglichen Kotranskription unter diversen Stressbedingungen die Funktion eines Hitzeschockproteins übernehmen. Bei der Untersuchung der Aktivität des *dnaK1*-Promotors zeigte sich keine Induktion durch die getesteten stressinduzierenden Bedingungen (Rupprecht et al., 2010; Rupprecht et al., 2007a), was entweder auf eine posttranskriptionelle Regulation oder auf eine gemeinsame Transkription von *dnaK1* mit *grpE* hindeuten könnte. Eine vollständige Deletion von *dnaK1* kann unter Standardbedingungen erreicht werden (Rupprecht et al., 2007b), jedoch zeigt der Mutationsstamm $\Delta dnaK1$ bei Hitze-, Säure- und oxidativem Stress einen deutlichen Wachstumsdefekt (Abb. 18 und Tab. 9). Somit scheint DnaK1 unter bestimmten Stressbedingungen für die Zellviabilität essentiell zu sein. Außerdem konnte in dieser Arbeit für DnaK1, ähnlich wie bei DnaK aus *E. coli*, eine ATP-Bindung und eine damit verbundene erhöhte thermische Stabilität nachgewiesen werden (Abb. 46). Die gesteigerte Expression

von *Trigger Factor* bei einer Deletion von *dnaK1* und die entsprechende Expressionssteigerung von DnaK1 bei Deletion von *tig* (Abb. 33) lassen auf eine besondere Rolle von DnaK1 bei der Faltung naszierender Polypeptide zusammen mit *Trigger Factor* schließen (siehe Abschnitt 4.2.1).

4.3.3 DnaK2 fungiert als kanonisches Hsp70 in *Synechocystis* sp.

Bei Analysen zum Wachstumsverhalten unter verschiedenen Stressbedingungen zeigte der $\Delta dnaK2$ -Stamm bei Hitze-, Säure- und oxidativem Stress einen deutlichen Wachstumsdefekt (Abb. 18 und Tab. 9). Somit scheint der geringere zelluläre Gehalt des Proteins unter bestimmten Stressbedingungen die Zellviabilität entscheidend zu beeinträchtigen. DnaK2 ist in *Synechocystis* sp. ein wichtiger Bestandteil der generellen Stressantwort und unter diversen Stressbedingungen hochreguliert (Fulda et al., 2006; Mary et al., 2004; Rupprecht et al., 2010). Auch unter *light-activated heterotrophic growth* (LAHG)-Bedingungen scheint DnaK2 eine wichtige Funktion zu übernehmen, da hier ein erhöhtes Expressionsniveau von DnaK2 zusammen mit anderen Proteinen der generellen und oxidativen Stressantwort nachgewiesen werden konnte (Abb. 16). Wie in *E. coli*, ist bei Deletion des *Trigger Factors* ein beträchtlicher Konzentrationsanstieg des kanonischen Hsp70 in *Synechocystis* sp. nachweisbar (Abb. 34), was auch hier für eine Induktion der generellen Stressantwort spricht (Deuerling et al., 2003). Zusätzlich wurde für DnaK aus *E. coli* eine verstärkte Interaktion mit naszierenden Ketten und somit eine kooperative Funktion mit *Trigger Factor* bei der Proteinfaltung aufgezeigt (Deuerling & Bukau, 2004). Unter den homologen DnaK-Proteinen aus *Synechocystis* sp. weist DnaK2 die höchste Sequenzidentität zum *E. coli*-DnaK-Protein auf (Tab. 11). Aus diesem Grund erscheint eine homologe Funktion für DnaK2 als wahrscheinlich. Da nach Deletion von *dnaK1* ebenfalls eine erhöhte DnaK2-Expression nachzuweisen war (Abb. 34), lässt sich somit auf überschneidende Funktionen der homologen DnaK-Proteine in *Synechocystis* sp. schließen. Am bestimmten Schmelzpunkt für das gereinigte DnaK2-Protein spiegelt sich die Funktion eines Hitzeschockproteins wider (Abb. 46). Des Weiteren zeigte sich eine thermische Stabilisierung durch ATP-Bindung, was sich durch die Erhöhung des Schmelzpunktes um zehn Grad von etwa 39 °C auf etwa 49 °C zeigte (Abb. 46).

Zusammenfassend ist zu schlussfolgern, dass es sich bei DnaK2 um ein kanonisches Hitzeschockprotein der generellen Stressantwort handelt.

4.3.4 DnaK4 könnte eine lichtabhängige Chaperonfunktion besitzen und an der oxidativen Stressantwort beteiligt sein

Für *dnaK4* konnte eine gemeinsame Transkription mit den Genen des Operons (*slr0086* bis *slr0096*) nachgewiesen werden, deren Genprodukte an der Tocopherol- bzw. Carotinoid-Biosynthese sowie am Schutz der Zelle vor oxidativem Stress beteiligt sind (Trautmann et al., 2013). Demzufolge wäre eine Funktion von DnaK4 verbunden mit der oxidativen Stressantwort sehr wahrscheinlich. Die Transkription des Gens *slr0091* ist nachweislich licht- und temperaturabhängig (Trautmann et al., 2013). Eine Transkription von *slr0091* ohne *dnaK4* ist zwar nicht auszuschließen, jedoch könnte die in dieser Arbeit beobachtete stark reduzierte zelluläre Proteinkonzentration unter LAHG-Bedingungen auf eine lichtabhängige Expression von *dnaK4* zurückzuführen sein (Abb. 16). Die Kotranskription von *slr0086* mit *slr0093* lässt auf eine Interaktion von DnaK4 mit dem entsprechenden membranständigen DnaJ-Protein schließen. Entsprechend konnte für *slr0093* eine erhöhte Promotoraktivität unter oxidativem Stress nachgewiesen werden (Düppre, 2011). Darüber hinaus wurde eine erhöhte DnaK4-Expression als Antwort auf Ethanolstress beschrieben (Wang et al., 2012).

In dieser Arbeit konnten anhand von Software-Programmen (siehe 2.2.4.20) putative strukturelle Unterschiede von DnaK4 zu *E. coli*-DnaK und den homologen DnaK-Proteinen aus *Synechocystis* sp. aufgezeigt werden (Abb. 47 und Abb. 48). In der Primärsequenz von DnaK4 wurden konservierte Bereiche identifiziert, die für die Koordination von ATP und Interaktion mit Hsp40-Proteinen essentiell sind (siehe 3.7). Dies lässt auf eine ATP-abhängige Funktion schließen, die bekanntermaßen durch Wechselwirkung mit DnaJ-Proteinen, wie Slr0093, reguliert sein könnte (Craig et al., 2006). Der Nukleotidaustausch funktioniert dabei vermutlich unabhängig von GrpE, da ein GrpE-Bindemotiv und ein Strukturelement fehlen, welche wahrscheinlich an GrpE vermittelten Konformationsänderungen beteiligt sind (Brehmer et al., 2001). Die Dissoziation von ADP und somit der Austausch zu ATP muss dadurch nicht ineffektiv sein, da anhand von Modifikationen in der Nukleotidbindedomäne von *E. coli*-DnaK eine schnellere Freigabe von ADP nachgewiesen werden konnte (Brehmer et al., 2001). Bei der Dissoziation spielen zwei Salzbrücken und der GrpE-Interaktions-Loop eine übergeordnete Rolle (Abb. 47) (Brehmer et al., 2001). In DnaK4 scheint die zweite der in *E. coli*-DnaK nachgewiesenen Salzbrücke (R65/E264) nicht möglich zu sein (D65/R262 siehe Abb. 47), was zusammen mit dem fehlenden GrpE-Bindemotiv im entsprechenden GrpE-Interaktions-Loop (Abb. 47 und Abb. 48) für einen nicht limitierenden Nukleotidaustausch sprechen könnte (Brehmer et al., 2001).

Die vermutlich abwesende *Lid*-Domäne und die vorhergesagten Unterschiede in den für die Substratinteraktion wichtigen *Loops*, deuten auf eine grundlegend andere Art und Weise der Substratwechselwirkung von DnaK4 im Vergleich zu den homologen DnaK-Proteinen aus *Synechocystis* sp., hin (Abb. 47 und Abb. 48). Auch die Kommunikation über intermolekulare

Wechselwirkungen zwischen den Domänen scheint in DnaK4 bedeutend abzuweichen. In der Linkersequenz von DnaK4 fehlt ein konserviertes Motiv aus drei hydrophoben Aminosäuren (³⁹⁰LLL³⁹², Abb. 47), welches für die Kommunikation der Substratbindedomäne mit der Nukleotidbindedomäne in *E. coli*-DnaK eine entscheidende Rolle spielt (Han & Christen, 2001; Vogel et al., 2006).

Zusammen betrachtet scheinen die möglichen Unterschiede für eine andersartige Funktionsweise von DnaK4 im Vergleich zu DnaK1, 2 und 3 zu sprechen. Dennoch könnte DnaK4 als homologes Hsp70 eine Chaperonfunktion unter bestimmten Stressbedingungen, wie oxidativen Stress (Trautmann et al., 2013), ausüben. In dieser Arbeit konnte erstmals eine Proteinexpression von DnaK4 in *Synechocystis* sp. nachgewiesen werden.

5. Zusammenfassung

Im Genom des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC6803 sind vier homologe Hsp70-Proteine kodiert. Darunter konnte bisher nur DnaK2 als kanonisches Hitzeschockprotein mit hoher Ähnlichkeit zu *E. coli* DnaK beschrieben werden, die Funktion der anderen DnaK-Proteine blieb bis heute weitestgehend ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse über die möglichen Funktionen der einzelnen Mitglieder der Hsp70-Proteinfamilie aus *Synechocystis* sp. gewonnen bzw. bekannte Aufgabenbereiche erweitert werden.

Synechocystis sp. stellt ein Modellorganismus zur Untersuchung der oxygenen Photosynthese bzw. Thylakoidmembranbiogenese dar. Das Thylakoidmembransystem kann den Lichtverhältnissen angepasst werden, wobei es im Dunkeln unter *light-activated heterotrophic growth*-Bedingungen umfassend reduziert und im Licht wieder vollständig aufgebaut wird. Durch die Analyse des Proteoms und Lipidoms dunkeladaptierter Zellen konnte im Vergleich zu älteren Studien eine erheblich größere Anzahl von Proteinen detektiert und quantifiziert werden, womit neue Erkenntnisse über die physiologischen Veränderungen unter heterotrophem Wachstum sowie der Thylakoidmembranbiogenese gewonnen werden konnten. Die heterotrophe Lebensweise scheint für die Zelle mit Stress verbunden zu sein, da eine gesteigerte Expression von Chaperonen der oxidativen bzw. generellen Stressantwort nachweisbar war. Daran sind wahrscheinlich auch Hsp70-Proteine wie DnaK1 und DnaK2 beteiligt.

Wie für *E. coli* schon gezeigt, konnte in dieser Arbeit auch für *Synechocystis* sp. nachgewiesen werden, dass eine Deletion des ribosomassoziierten Chaperons *Trigger Factor* ohne Beeinträchtigung der Zellviabilität möglich ist. Darüber hinaus war auch eine Doppeldeletion mit *dnaK1* durchführbar. Als Auswirkung der Deletion ließ sich in den jeweiligen Deletionsstämmen eine veränderte Expression der homologen Hsp70-Proteine und *Trigger Factor* nachweisen und folglich auf eine kooperative Funktion der Proteine DnaK1, DnaK2 und DnaK3 zusammen mit *Trigger Factor* bei der Faltung neusynthetisierter Proteine schließen. Mit Hilfe der *Synechocystis* sp.-Mutationsstämme $\Delta dnaK1$, $\Delta dnaK2$, $\Delta dnaK3$, Δtig und $\Delta dnaK1\Delta tig$ wurden in dieser Arbeit Auswirkungen der Deletion bzw. Depletion umfassend dargestellt und daraus hervorgehende putative Funktionen eingehend diskutiert. Die Reduzierung der zellulären DnaK3-Konzentration um etwa 70 % führte im Depletionsstamm $\Delta dnaK3$ zu weitreichenden physiologischen Änderungen hinsichtlich photosynthetischer Prozesse. Zusammen mit einer lichtabhängigen Expression, die wahrscheinlich posttranskriptionell reguliert ist, konnte DnaK3 als essentieller Faktor für die funktionelle Aufrechterhaltung der Thylakoidmembran identifiziert werden.

Die homologen Hsp70-Proteine DnaK1, 2 und 3 weisen in den N-terminalen Sequenzbereichen der Primärstruktur eine starke Konservierung auf und lassen sich hauptsächlich anhand des C-Terminus unterscheiden. Durch eine Komplementationsstudie konnte gezeigt werden, dass die spezifische Funktion der einzelnen DnaK-Proteine nicht allein durch den C-Terminus festgelegt wird, da exprimierte chimäre Proteine mit neukombinierten C-terminalen DnaK-Domänen die Funktion der entsprechenden wildtypischen Chaperone in *Synechocystis* sp. nicht übernehmen konnten. Über das Hsp70-Protein DnaK4 (Slr0086) ist bisher am wenigsten bekannt, jedoch konnten in dieser Arbeit anhand von Software-Programmen mögliche Strukturunterschiede zu den homologen DnaK-Proteinen beschrieben werden, die für eine andersartige Funktionsweise von DnaK4 im Vergleich zu DnaK1, 2 und 3 sprechen. Außerdem wurde in dieser Arbeit erstmals eine Proteinexpression von DnaK4 nachgewiesen.

Für die Hsp70-Proteine DnaK1 und DnaK2 konnte ein Reinigungsprotokoll erstellt werden, mit dem eine erfolgreiche Expression und ein hoher Reinigungsgrad der Proteine zu erreichen ist. Mittels CD-Spektroskopie konnte eine erhöhte thermische Stabilität der Proteine durch Bindung von ATP nachgewiesen werden. Darüber hinaus stehen die Proteine weiteren Charakterisierungen zur Verfügung, die eine Bestimmung spezifischer Funktionen erleichtern können.

6. Anhang

Tab. A1 Ausgewählte quantifizierte Proteine von Membranfraktionen mixotropher und LAHG *Synechocystis* sp. Kulturen. Für die vollständige Liste aller quantifizierten Proteine siehe (Plohnke et al., 2015b)

Proteine des Glukosemetabolismus				
DBID^{a)}	Name	Mixotroph %^{b)}	LAHG %^{b)}	n-fache Veränderung
slI0726	Phosphoglukomutase	0,006 ± 0,010	0,053 ± 0,016	9,3
slr1334	Phosphoglukomutase/Phosphomannomutase	0,001 ± 0,002	0,004 ± 0,007	4,1
slr1349	Glukose-6-phosphat-Isomerase	0,0069 ± 0,0023	0,0218 ± 0,0132	3,2
slr0394	Phosphoglyceratkinase	0,0062 ± 0,0005	0,0547 ± 0,0097	8,8
slI1841	Dihydrolipoyl transacetylase (Pyruvat-DH Komplex Komponente E2)	0,0149 ± 0,0034	0,0520 ± 0,0137	3,5
slr1843	Glukose-6-phosphat-DH	0,0013 ± 0,0022	0,0184 ± 0,0069	14,4
slI0329	6-Phosphoglukonat-DH	0,0148 ± 0,0067	0,1904 ± 0,0253	12,9
slI0401	Citratsynthase	0,0041 ± 0,0071	0,0131 ± 0,0015	3,2
Proteine des photosynthetischen und respiratorischen Elektrontransports				
DBID^{a)}	Name	Mixotroph %^{b)}	LAHG %^{b)}	n-fache Veränderung
slr0906	Photosystem II Kernprotein PsbB	0,881 ± 0,113	0,140 ± 0,018	0,2
slI0851	Photosystem II CP43 Protein PsbC	0,290 ± 0,046	0,194 ± 0,002	0,7
slI0849	Photosystem II D2 Protein PsbD	0,182 ± 0,025	0,093 ± 0,011	0,5
ssr3451	Cytochrom b559 alpha-Untereinheit PsbE	0,352 ± 0,142	0,239 ± 0,058	0,7
ssl2598	Photosystem II PsbH Protein PsbH	0,252 ± 0,025	0,241 ± 0,014	1,0
smr0007	Photosystem II PsbL Protein PsbL	0,305 ± 0,013	0,125 ± 0,047	0,4

DBID ^{a)}	Name	Mixotroph % ^{b)}	LAHG % ^{b)}	n-fache Veränderung
sII0427	Photosystem II Manganzentrum-stabilisierendes Protein PsbO	0,093 ± 0,041	0,114 ± 0,031	1,2
sII1418	Photosystem II sauerstoffproduzierender Komplex 23K protein PsbP	0,013 ± 0,001	0,006 ± 0,012	0,5
sII1194	Photosystem II extrinsisches Protein PsbU	0,094 ± 0,081	0,029 ± 0,012	0,3
sII0258	Cytochrom c550 PsbV	0,316 ± 0,094	0,035 ± 0,007	0,1
sml0007	Photosystem II Protein Y PsbY	0,262 ± 0,045	0,177 ± 0,057	0,7
slr2034	Photosystem II Assemblierungsfaktor Ycf48	0,030 ± 0,010	0,030 ± 0,006	1,0
sII1398	Photosystem II Reaktionszentrum 13 kDa Protein Psb28	0,072 ± 0,006	0,085 ± 0,007	1,2
slr2048	Photosystem II Biogenesefaktor PratA	0,005 ± 0,011	0,003 ± 0,004	0,6
sII0933	Photosystem II Biogenesefaktor PAM68	0,037 ± 0,006	0,043 ± 0,006	1,2
slr1645	Photosystem II 11 kD Protein Psb27	0,271 ± 0,093	0,126 ± 0,009	0,5
sII1414	Photosystem II Biogenesefaktor Psb29/Thzf1	n. d.	0,027 ± 0,004	---
slr0506	Light-abhängige NADPH-Protochlorophyllid Oxidoreduktase POR	n. d.	0,013 ± 0,014	---
sII1694	Protein beteiligt am Chlorophylltransport (He & Vermaas, 1999)	0,052 ± 0,018	0,135 ± 0,045	2,6
sII0519	NADH dehydrogenase Untereinheit 1 NdhA	0,0367 ± 0,0092	0,0633 ± 0,0111	1,7
sII0521	NADH dehydrogenase Untereinheit 6 NdhG	0,0368 ± 0,0064	0,0402 ± 0,0079	1,1
slr0261	NADH dehydrogenase Untereinheit 7 NdhH	0,0511 ± 0,0105	0,0384 ± 0,0108	0,8
slr0343	Cytochrom b6f Komplex petD	0,1133 ± 0,0126	0,1390 ± 0,0142	1,2
slr0342	Cytochrom b6f Komplex petB	0,1127 ± 0,0154	0,1490 ± 0,0037	1,3
sII1316	Cytochrom b6f Komplex petC1	0,2590 ± 0,0674	0,1893 ± 0,0196	0,7
slr1834	P700 Apoprotein Untereinheit Ia PsaA	0,140 ± 0,015	0,253 ± 0,021	1,8

DBID ^{a)}	Name	Mixotroph % ^{b)}	LAHG % ^{b)}	n-fache Veränderung
slr1835	P700 Apoprotein Untereinheit Ib PsaB	0,158 ± 0,017	0,270 ± 0,041	1,7
ssl0563	Photosystem I Untereinheit VII PsaC	0,249 ± 0,065	0,289 ± 0,026	1,2
slr0737	Photosystem I Untereinheit II PsaD	0,590 ± 0,253	0,757 ± 0,092	1,3
sll0819	Photosystem I Untereinheit III PsaF	1,252 ± 0,064	1,780 ± 0,062	1,4
sll0629	Photosystem I Untereinheit X PsaK	0,105 ± 0,023	0,121 ± 0,016	1,2
slr1655	Photosystem I Untereinheit XI PsaL	0,437 ± 0,079	0,379 ± 0,019	0,9
sll0634	Photosystem I Biogenesefaktor BtpA	0,001 ± 0,003	0,027 ± 0,007	18,4
slr0171	Photosystem I Biogenesefaktor Ycf37	0,030 ± 0,009	0,029 ± 0,009	1,0
sll1322	ATP Synthase Kette A der Untereinheit CF.0 Protein AtpI	0,0801 ± 0,0026	0,1408 ± 0,0372	1,8
sll1324	ATP Synthase Kette B der Untereinheit CF.0 Protein AtpF	0,3918 ± 0,0282	0,4319 ± 0,0381	1,1
ssl2615	ATP Synthase Kette C der Untereinheit CF.0 Protein AtpH	0,0787 ± 0,0846	0,0721 ± 0,0905	0,9
sll1327	ATP Synthase Kette γ der Untereinheit CF.1 Protein AtpC	0,2795 ± 0,0321	0,3420 ± 0,0313	1,2
sll1325	ATP Synthase Kette δ der Untereinheit CF.1 Protein AtpD	0,1538 ± 0,0219	0,1583 ± 0,0249	1,0
slr1963	<i>Orange carotenoid protein</i>	0,025 ± 0,001	0,293 ± 0,051	11,6
slr2067	Allophycocyanin alpha Untereinheit apcA	4,088 ± 1,132	7,023 ± 0,653	1,7
slr1986	Allophycocyanin beta Untereinheit apcB	4,971 ± 0,502	6,129 ± 0,551	1,2
sll1578	Phycocyanin alpha Untereinheit cpcA	9,465 ± 1,987	8,867 ± 0,580	0,9
sll1577	Phycocyanin beta Untereinheit cpcB	17,432 ± 3,049	17,216 ± 0,443	1,0
sll1580	Phycobilisomales <i>rod linker polypeptide</i> cpcC1 LR ³³	1,200 ± 0,382	0,385 ± 0,215	0,3
sll1579	Phycobilisomales <i>rod linker polypeptide</i> cpcC2 LR ³⁰	0,422 ± 0,092	0,143 ± 0,031	0,3
sll1471	Phycobilisomales <i>rod-core linker polypeptide</i> cpcG2 L _{RC}	0,235 ± 0,012	0,110 ± 0,040	0,5

Ribosomale Proteine und Untereinheiten der Membrantranslokationssysteme				
DBID^{a)}	Name	Mixotroph %^{b)}	LAHG %^{b)}	n-fache Veränderung
sll1817	30S ribosomales Protein S11 Rps11	0,3730 ± 0,0355	0,1466 ± 0,0320	0,4
sll1816	30S ribosomales Protein S13 Rps13	0,5930 ± 0,1364	0,0912 ± 0,0297	0,2
slr0628	30S ribosomales Protein S14 Rps14	0,2301 ± 0,0921	0,0898 ± 0,0435	0,4
ssr1399	30S ribosomales Protein S18 Rps18	0,6003 ± 0,1142	0,4363 ± 0,0388	0,7
sll1813	50S ribosomales Protein L15 Rpl15	0,6472 ± 0,1024	0,2301 ± 0,0299	0,4
sll1805	50S ribosomales Protein L16 Rpl16	0,2302 ± 0,0347	0,0537 ± 0,0377	0,2
sll1819	50S ribosomales Protein L17 Rpl17	0,3456 ± 0,0500	0,1170 ± 0,0244	0,3
sll1801	50S ribosomales Protein L23 Rpl23	0,5527 ± 0,2289	0,2258 ± 0,0050	0,4
sll0616	Sec-Translokase SecA	0,013 ± 0,004	0,003 ± 0,003	0,3
sll1814	Sec-Translokase SecY	0,022 ± 0,006	0,003 ± 0,005	0,1
ssl3335	Sec-Translokase SecE	0,150 ± 0,047	0,059 ± 0,002	0,4
slr1471	YidC	0,043 ± 0,004	0,015 ± 3,88E-05	0,4
slr1046	Tat-Translokase TatA	0,0306 ± 0,0257	0,0382 ± 0,0014	1,3
Stress assoziierte Proteine				
DBID^{a)}	Name	Mixotroph %^{b)}	LAHG %^{b)}	n-fache Veränderung
slr1516	Superoxiddismutase (SodB)	0,005 ± 0,011	0,066 ± 0,041	13,2
sll1987	Katalase	0,001 ± 0,001	0,052 ± 0,015	66,3
slr0623	Thioredoxin (TrxA)	0,087 ± 0,064	0,201 ± 0,056	2,32
slr2076	60kD Chaperonin GroEL1	0,165 ± 0,073	0,764 ± 0,043	4,64

DBID ^{a)}	Name	Mixotroph % ^{b)}	LAHG % ^{b)}	n-fache Veränderung
sII0416	60 kDa Chaperonin GroEL2	0,054 ± 0,035	0,224 ± 0,022	4,14
sII0058	DnaK1 (HSP70)	n. d.	0,022 ± 0,008	---
sII0170	DnaK2 (HSP70)	0,048 ± 0,013	0,094 ± 0,037	2,0
(sII1932)	DnaK3 (HSP70)	(0,0117 ± 0,0068)	(0,0036 ± 0,0051)	(0,3)
slr0086	DnaK4 (DnaK homolog)	0,034 ± 0,004	0,004 ± 0,003	0,1
Sonstige Proteine				
DBID ^{a)}	Name	Mixotroph % ^{b)}	LAHG % ^{b)}	n-fache Veränderung
slr1020	Enzym der SQDG Biosynthese SqdB	0,0268 ± 0,0113	0,0640 ± 0,0297	2,4
slr1768	Protein Slr1768 möglicherweise an TM Biogenese beteiligt (Bryan et al., 2011)	0,000176081 ± 0,000144782	n. d.	---

a) Identifikationsnummer der Genomsequenzierung (Kaneko et al., 1996b)

b) Werte bezogen auf *normalized spectral abundance factors* (Zybailov et al., 2006) als Mittelwert aus drei (mixotroph) oder vier (LAHG) unabhängigen Kulturen

die n-fache Änderung bildet sich aus dem Verhältnis LAHG/mixotroph

n. d. = nicht detektiert

(DnaK3 in Klammern, da die Quantifizierung nicht den gesetzten Qualitätsstandards genügte)

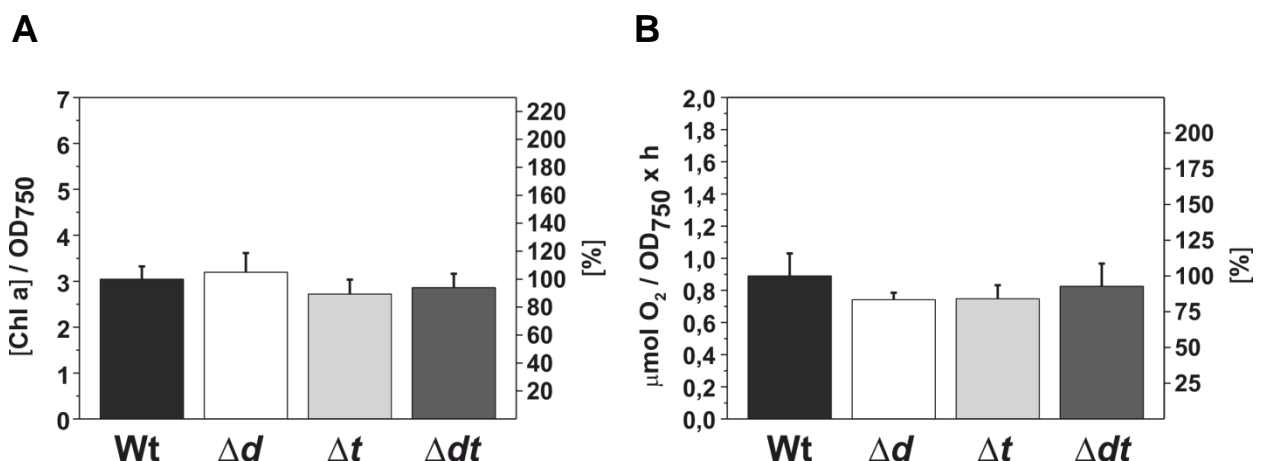


Abb. A1 Chlorophyllgehalt und O₂-Produktion der *Synechocystis* sp-Mutationsstämme Δ*dnaK1*, Δ*tig*, Δ*dnaK1Δtig*.

A) Chlorophyll a-Konzentration (siehe 2.2.4.8) bezogen auf OD₇₅₀ des *Synechocystis* sp.-Wildtyp-Stamms (schwarz), der Δ*dnaK1*-Mutante (Δ*d*, weiß), der Δ*tig*-Mutante (Δ*t*, hellgrau) und der Δ*dnaK1Δtig*-Mutante (Δ*dt*, dunkelgrau). B) Graphische Darstellung der O₂-Produktion [μmol O₂/OD₇₅₀] des Wildtyp-Stamms (Wt) und der Mutationsstämme nach Zugabe von HCO₃⁻ (siehe 2.2.1.2 und 2.2.4.18).

7. Literatur

- ABED, R. M. M., DOBRETSOV, S. & SUDESH, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 1-12.
- AGASHE, V. R. & HARTL, F. U. (2000). Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 11(1), 15-25.
- ALDRIDGE, C., SPENCE, E., KIRKILIONIS, M. A., FRIGERIO, L. & ROBINSON, C. (2008). Tat-dependent targeting of Rieske iron-sulphur proteins to both the plasma and thylakoid membranes in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Molecular Microbiology*, 70(1), 140-150.
- ALTMAN, E., KUMAMOTO, C. A. & EMR, S. D. (1991). Heat-Shock Proteins Can Substitute for SecB Function during Protein Export in *Escherichia-Coli*. *Embo Journal*, 10(2), 239-245.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- ANDERSON, S. L. & MCINTOSH, L. (1991). Light-Activated Heterotrophic Growth of the Cyanobacterium *Synechocystis* Sp Strain Pcc-6803 - a Blue-Light-Requiring Process. *Journal of Bacteriology*, 173(9), 2761-2767.
- ANFINSEN, C. B. (1973). Principles That Govern Folding of Protein Chains. *Science*, 181(4096), 223-230.
- APONTE, R. A., ZIMMERMANN, S. & REINSTEIN, J. (2010). Directed Evolution of the DnaK Chaperone: Mutations in the Lid Domain Result in Enhanced Chaperone Activity. *Journal of Molecular Biology*, 399(1), 154-167.
- ARTENI, A. A., AJLANI, G. & BOEKEMA, E. J. (2009). Structural organisation of phycobilisomes from *Synechocystis* sp strain PCC6803 and their interaction with the membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1787(4), 272-279.
- ASADULGHANI, SUZUKI, Y. & NAKAMOTO, H. (2003). Light plays a key role in the modulation of heat shock response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306(4), 872-879.
- BANIULIS, D., YAMASHITA, E., ZHANG, H., HASAN, S. S. & CRAMER, W. A. (2008). Structure-Function of the Cytochrome b(6)f Complex. *Photochemistry and Photobiology*, 84(6), 1349-1358.
- BARBROOK, A. C., PACKER, J. C. L. & HOWE, C. J. (1993). Components of the Protein Translocation Machinery in the Thermophilic Cyanobacterium *Phormidium-Lamosum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 197(2), 874-877.
- BARTHEL, S., BERNAT, G., SEIDEL, T., RUPPRECHT, E., KAHMANN, U. & SCHNEIDER, D. (2013). Thylakoid Membrane Maturation and PSII Activation Are Linked in Greening *Synechocystis* sp PCC 6803 Cells. *Plant Physiology*, 163(2), 1037-1046.
- BENDALL, D. S. & MANASSE, R. S. (1995). Cyclic Photophosphorylation and Electron-Transport. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1229(1), 23-38.
- BERTELSEN, E. B., CHANG, L., GESTWICKI, J. E. & ZUIDERWEG, E. R. P. (2009). Solution conformation of wild-type *E. coli* Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(21), 8471-8476.
- BERTELSEN, E. B., ZHOU, H. J., LOWRY, D. F., FLYNN, G. C. & DAHLQUIST, F. W. (1999). Topology and dynamics of the 10 kDa C-terminal domain of DnaK in solution. *Protein Science*, 8(2), 343-354.
- BLIGH, E. G. & DYER, W. J. (1959). A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917.
- BLUM, P., ORY, J., BAUERNFEIND, J. & KRŠKA, J. (1992). Physiological Consequences of DnaK and DnaJ Overproduction in *Escherichia-Coli*. *Journal of Bacteriology*, 174(22), 7436-7444.

- BOULAY, C., ABASOVA, L., SIX, C., VASS, I. & KIRILOVSKY, D. (2008). Occurrence and function of the orange carotenoid protein in photoprotective mechanisms in various cyanobacteria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1777(10), 1344-1354.
- BREHMER, D., GASSLER, C., RIST, W., MAYER, M. P. & BUKAU, B. (2004). Influence of GrpE on DnaK-substrate interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 279(27), 27957-27964.
- BREHMER, D., RUDIGER, S., GASSLER, C. S., KLOSTERMEIER, D., PACKSCHIES, L., REINSTEIN, J., MAYER, M. P. & BUKAU, B. (2001). Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nature Structural Biology*, 8(5), 427-432.
- BRYAN, S. J., BURROUGHS, N. J., EVERED, C., SACHARZ, J., NENNINGER, A., MULLINEAUX, C. W. & SPENCE, E. M. (2011). Loss of the SPHF Homologue Slr1768 Leads to a Catastrophic Failure in the Maintenance of Thylakoid Membranes in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plos One*, 6(5).
- BUKAU, B. & HORWICH, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92(3), 351-366.
- BUKAU, B. & WALKER, G. C. (1989). Cellular Defects Caused by Deletion of the *Escherichia-Coli* DnaK Gene Indicate Roles for Heat-Shock Protein in Normal Metabolism. *Journal of Bacteriology*, 171(5), 2337-2346.
- CALLONI, G., CHEN, T., SCHERMANN, S. M., CHANG, H. C., GENEVAUX, P., AGOSTINI, F., TARTAGLIA, G. G., HAYER-HARTL, M. & HARTL, F. U. (2012). DnaK Functions as a Central Hub in the *E. coli* Chaperone Network. *Cell Reports*, 1(3), 251-264.
- CAMPBELL, D., HURRY, V., CLARKE, A. K., GUSTAFSSON, P. & OQUIST, G. (1998). Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 667-+.
- CHOI, J. S., KIM, D. S., LEE, J., KIM, S. J., KIM, S. I., KIM, Y. H., HONG, J., YOO, J. S., SUH, K. H. & PARK, Y. M. (2000). Proteome analysis of light-induced proteins in *Synechocystis* sp. PCC 6803: identification of proteins separated by 2D-PAGE using N-terminal sequencing and MALDI-TOF MS. *Molecules and cells*, 10(6), 705-711.
- CHUNG, C. T., NIEMELA, S. L. & MILLER, R. H. (1989). One-Step Preparation of Competent *Escherichia-Coli* - Transformation and Storage of Bacterial-Cells in the Same Solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(7), 2172-2175.
- COOLEY, J. W., HOWITT, C. A. & VERMAAS, W. F. J. (2000). Succinate : quinol oxidoreductases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803: Presence and function in metabolism and electron transport. *Journal of Bacteriology*, 182(3), 714-722.
- CRAIG, E. A., EISENMAN, H. C. & HUNDLEY, H. A. (2003). Ribosome-tethered molecular chaperones: the first line of defense against protein misfolding? *Current Opinion in Microbiology*, 6(2), 157-162.
- CRAIG, E. A., HUANG, P., ARON, R. & ANDREW, A. (2006). The diverse roles of J-proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, Vol 156, 156, 1-21.
- CROOKE, E., GUTHRIE, B., LECKER, S., LILL, R. & WICKNER, W. (1988). Proompa Is Stabilized for Membrane Translocation by Either Purified *Escherichia-Coli* Trigger Factor or Canine Signal Recognition Particle. *Cell*, 54(7), 1003-1011.
- DALBEY, R. E., KUHN, A., ZHU, L. & KIEFER, D. (2014). The membrane insertase YidC. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1843(8), 1489-1496.
- DEUERLING, E. & BUKAU, B. (2004). Chaperone-assisted folding of newly synthesized proteins in the cytosol. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 39(5-6), 261-277.
- DEUERLING, E., PATZELT, H., VORDERWULBECKE, S., RAUCH, T., KRAMER, G., SCHAFFITZEL, E., MOGK, A., SCHULZE-SPECKING, A., LANGEN, H. & BUKAU, B. (2003). Trigger Factor and DnaK possess overlapping substrate pools and binding specificities. *Molecular Microbiology*, 47(5), 1317-1328.

- DEUERLING, E., SCHULZE-SPECKING, A., TOMOYASU, T., MOGK, A. & BUKAU, B. (1999). Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature*, 400(6745), 693-696.
- DOBSON, C. M. & KARPLUS, M. (1999). The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr Opin Struct Biol*, 9(1), 92-101.
- DOYLE, S. M., GENEST, O. & WICKNER, S. (2013). Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(10), 617-629.
- DU PLESSIS, D. J. F., NOUWEN, N. & DRIESSEN, A. J. M. (2011). The Sec translocase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1808(3), 851-865.
- DÜPPRE, E. (2011). Untersuchungen zur Funktion multipler DnaJ-Proteine in dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. PhD thesis, University of Mainz.
- DÜPPRE, E., RUPPRECHT, E. & SCHNEIDER, D. (2011). Specific and promiscuous functions of multiple DnaJ proteins in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Microbiology-Sgm*, 157, 1269-1278.
- EL BISSATI, K. & KIRILOVSKY, D. (2001). Regulation of *psbA* and *psaE* expression by light quality in *Synechocystis* species PCC 6803. A redox control mechanism. *Plant Physiology*, 125(4), 1988-2000.
- EMLYN-JONES, D., ASHBY, M. K. & MULLINEAUX, C. W. (1999). A gene required for the regulation of photosynthetic light harvesting in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Molecular Microbiology*, 33(5), 1050-1058.
- ESCOUBAS, J. M., LOMAS, M., LAROCHE, J. & FALKOWSKI, P. G. (1995). Light-Intensity Regulation of Cab Gene-Transcription Is Signaled by the Redox State of the Plastoquinone Pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(22), 10237-10241.
- FERBITZ, L., MAIER, T., PATZELT, H., BUKAU, B., DEUERLING, E. & BAN, N. (2004). Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature*, 431(7008), 590-596.
- FERREIRA, K. N., IVERSON, T. M., MAGHLAOU, K., BARBER, J. & IWATA, S. (2004). Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science*, 303(5665), 1831-1838.
- FLAHERTY, K. M., DELUCA-FLAHERTY, C. & MCKAY, D. B. (1990). Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature*, 346(6285), 623-628.
- FUHRMANN, E., BULTEMA, J. B., KAHMANN, U., RUPPRECHT, E., BOEKEMA, E. J. & SCHNEIDER, D. (2009). The Vesicle-inducing Protein 1 from *Synechocystis* sp PCC 6803 Organizes into Diverse Higher-Ordered Ring Structures. *Molecular Biology of the Cell*, 20(21), 4620-4628.
- FULDA, S., MIKKAT, S., HUANG, F., HUCKAUF, J., MARIN, K., NORLING, B. & HAGEMANN, M. (2006). Proteome analysis of salt stress response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803. *Proteomics*, 6(9), 2733-2745.
- GÄSSLER, C. S., BUCHBERGER, A., LAUFEN, T., MAYER, M. P., SCHRODER, H., VALENCIA, A. & BUKAU, B. (1998). Mutations in the DnaK chaperone affecting interaction with the DnaJ cochaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15229-15234.
- GASTEIGER, E., HOOGLAND, C., GATTIKER, A., WILKINS, M. R., APPEL, R. D., & BAIROCH, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. Humana Press, (The proteomics protocols handbook), 571-607.
- GENEVAUX, P., GEORGOPOULOS, C. & KELLEY, W. L. (2007). The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions. *Molecular Microbiology*, 66(4), 840-857.
- GENEVAUX, P., KEPPEL, F., SCHWAGER, F., LANGENDIJK-GENEVAUX, P. S., HARTL, F. U. & GEORGOPOULOS, C. (2004). In vivo analysis of the overlapping functions of DnaK and trigger factor. *Embo Reports*, 5(2), 195-200.
- GOMBOS, Z., WADA, H., VARKONYI, Z., LOS, D. A. & MURATA, N. (1996). Characterization of the Fad12 mutant of *Synechocystis* that is defective in Delta 12

- acyl-lipid desaturase activity. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, 1299(1), 117-123.
- GRAGEROV, A., LI, Z., XUN, Z., BURKHOLDER, W. & GOTTESMAN, M. E. (1994). Specificity of DnaK Peptide Binding. *Journal of Molecular Biology*, 235(3), 848-854.
- GRAUBNER, W., SCHIERHORN, A. & BRUSER, T. (2007). DnaK plays a pivotal role in Tat targeting of CueO and functions beside SlyD as a general Tat signal binding chaperone. *Journal of Biological Chemistry*, 282(10), 7116-7124.
- GROSSMAN, A. D., STRAUS, D. B., WALTER, W. A. & GROSS, C. A. (1987). Sigma-32 Synthesis Can Regulate the Synthesis of Heat-Shock Proteins in *Escherichia-Coli*. *Genes & Development*, 1(2), 179-184.
- GROSSMAN, A. R., SCHAEFER, M. R., CHIANG, G. G. & COLLIER, J. L. (1993). The Phycobilisome, a Light-Harvesting Complex Responsive to Environmental-Conditions. *Microbiological Reviews*, 57(3), 725-749.
- GUZMAN, L. M., BELIN, D., CARSON, M. J. & BECKWITH, J. (1995). Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose P-Bad Promoter. *Journal of Bacteriology*, 177(14), 4121-4130.
- HAN, W. J. & CHRISTEN, P. (2001). Mutations in the interdomain linker region of DnaK abolish the chaperone action of the DnaK/DnaJ/GrpE system. *Febs Letters*, 497(1), 55-58.
- HANAHAH, D. (1983). Studies on Transformation of *Escherichia-Coli* with Plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557-580.
- HARTL, F. U., BRACHER, A. & HAYER-HARTL, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324-332.
- HARTL, F. U. & HAYER-HARTL, M. (2002). Protein folding - Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561), 1852-1858.
- HASLBECK, M. (2002). SHsps and their role in the chaperone network. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(10), 1649-1657.
- HASLBERGER, T., WEIBEZAHN, J., ZAHN, R., LEE, S., TSAI, F., BUKAU, B. & MOGK, A. (2007). M-domains couple the ClpB threading motor with the DnaK chaperone activity. *Febs Journal*, 274, 206-206.
- HE, Q. F. & VERMAAS, W. (1999). Genetic deletion of proteins resembling Type IV pilins in *Synechocystis* sp PCC 6803: their role in binding or transfer of newly synthesized chlorophyll. *Plant Molecular Biology*, 39(6), 1175-1188.
- HERRANEN, M., ARO, E. M. & TYYSTJARVI, T. (2001). Two distinct mechanisms regulate the transcription of photosystem II genes in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Physiologia Plantarum*, 112(4), 531-539.
- HESTERKAMP, T., DEUERLING, E. & BUKAU, B. (1997). The amino-terminal 118 amino acids of *Escherichia coli* trigger factor constitute a domain that is necessary and sufficient for binding to ribosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 272(35), 21865-21871.
- HIHARA, Y., SONOIKE, K. & IKEUCHI, M. (1998). A novel gene, *pmgA*, specifically regulates photosystem stoichiometry in the cyanobacterium *Synechocystis* species PCC 6803 in response to high light. *Plant Physiology*, 117(4), 1205-1216.
- HOFFMANN, A., BUKAU, B. & KRAMER, G. (2010). Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1803(6), 650-661.
- HOSSAIN, M. & NAKAMOTO, H. (2003). Role for the cyanobacterial HtpG in protection from oxidative stress. *Current Microbiology*, 46(1), 70-76.
- HSIAO, H. Y., HE, Q. F., VAN WAASBERGEN, L. G. & GROSSMAN, A. R. (2004). Control of photosynthetic and high-light-responsive genes by the histidine kinase DspA: Negative and positive regulation and interactions between signal transduction pathways. *Journal of Bacteriology*, 186(12), 3882-3888.
- HUNER, N. P. A., MAXWELL, D. P., GRAY, G. R., SAVITCH, L. V., KROL, M., IVANOV, A. G. & FALK, S. (1996). Sensing environmental temperature change through imbalances between energy supply and energy consumption: Redox state of photosystem II. *Physiologia Plantarum*, 98(2), 358-364.

- IMLAY, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology*, 57, 395-418.
- JAKOB, U., GAESTEL, M., ENGEL, K. & BUCHNER, J. (1993). Small Heat-Shock Proteins Are Molecular Chaperones. *Journal of Biological Chemistry*, 268(3), 1517-1520.
- JAKOB, U., MUSE, W., ESER, M. & BARDWELL, J. C. A. (1999). Chaperone activity with a redox switch. *Cell*, 96(3), 341-352.
- JORDAN, P., FROMME, P., WITT, H. T., KLUKAS, O., SAENGER, W. & KRAUSS, N. (2001). Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 angstrom resolution. *Nature*, 411(6840), 909-917.
- KAISER, C. M., CHANG, H. C., AGASHE, V. R., LAKSHMIPATHY, S. K., ETCHELLS, S. A., HAYER-HARTL, M., HARTL, F. U. & BARRAL, J. M. (2006). Real-time observation of trigger factor function on translating ribosomes. *Nature*, 444(7118), 455-460.
- KÄLLBERG, M., WANG, H., WANG, S., PENG, J., WANG, Z., LU, H. & XU, J. (2012). Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc*, 7(8), 1511-1522.
- KAMPINGA, H. H. & CRAIG, E. A. (2010). The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity (vol 11, pg 579, 2010). *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(10).
- 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. & TABATA, S. (1996a). 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. *DNA Research*, 3(3), 109-136.
- 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. & TABATA, S. (1996b). 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 research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 3(3), 185-209.
- KATANO, Y., NIMURA-MATSUNE, K. & YOSHIKAWA, H. (2006). Involvement of DnaK3, one of the three DnaK proteins of cyanobacterium *Synechococcus* sp PCC7942, in translational process on the surface of the thylakoid membrane. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70(7), 1592-1598.
- KIBBE, W. A. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research*, 35, W43-W46.
- KIRCHHOFF, H., MUKHERJEE, U. & GALLA, H. J. (2002). Molecular architecture of the thylakoid membrane: Lipid diffusion space for plastoquinone. *Biochemistry*, 41(15), 4872-4882.
- KITYK, R., KOPP, J., SINNING, I. & MAYER, M. P. (2012). Structure and Dynamics of the ATP-Bound Open Conformation of Hsp70 Chaperones. *Molecular Cell*, 48(6), 863-874.
- KNOWLES, V. L. & PLAXTON, W. C. (2003). From genome to enzyme: Analysis of key glycolytic and oxidative pentose-phosphate pathway enzymes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant and Cell Physiology*, 44(7), 758-763.
- KOCH, H. G., MOSER, M. & MULLER, M. (2003). Signal recognition particle-dependent protein targeting, universal to all kingdoms of life. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol 146, 146, 55-94.
- KOMENDA, J., SOBOTKA, R. & NIXON, P. J. (2012). Assembling and maintaining the Photosystem II complex in chloroplasts and cyanobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(3), 245-251.

- KOPECNA, J., KOMENDA, J., BUCINSKA, L. & SOBOTKA, R. (2012). Long-Term Acclimation of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 to High Light Is Accompanied by an Enhanced Production of Chlorophyll That Is Preferentially Channeled to Trimeric Photosystem I. *Plant Physiology*, 160(4), 2239-2250.
- KRAMER, G., PATZELT, H., RAUCH, T., KURZ, T. A., VORDERWULBECKE, S., BUKAU, B. & DEUERLING, E. (2004). Trigger factor peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity is not essential for the folding of cytosolic proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 14165-14170.
- KRAMER, G., RAUCH, T., RIST, W., VORDERWULBECKE, S., PATZELT, H., SCHULZE-SPECKING, A., BAN, N., DEUERLING, E. & BUKAU, B. (2002). L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome. *Nature*, 419(6903), 171-174.
- KUMSTA, C. & JAKOB, U. (2009). Redox-regulated chaperones. *Biochemistry*, 48(22), 4666-4676.
- KUNERT, A., HAGEMANN, M. & ERDMANN, N. (2000). Construction of promoter probe vectors for *Synechocystis* sp PCC 6803 using the light-emitting reporter systems Gfp and LuxAB. *Journal of Microbiological Methods*, 41(3), 185-194.
- KUNKEL, D. D. (1982). Thylakoid Centers - Structures Associated with the Cyanobacterial Photosynthetic Membrane System. *Archives of Microbiology*, 133(2), 97-99.
- KURIAN, D., JANSEN, T. & MAENPAA, P. (2006a). Proteomic analysis of heterotrophy in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Proteomics*, 6(5), 1483-1494.
- KURIAN, D., JANSEN, T. & MÄENPÄÄ, P. (2006b). Proteomic analysis of heterotrophy in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proteomics*, 6(5), 1483-1494.
- KWON, J., OH, J., PARK, C., CHO, K., KIM, S. I., KIM, S., LEE, S., BHAK, J., NORLING, B. & CHOI, J. S. (2010). Systematic cyanobacterial membrane proteome analysis by combining acid hydrolysis and digestive enzymes with nano-liquid chromatography-Fourier transform mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(3), 285-293.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, 227(5259), 680-&.
- LAKSHMIPATHY, S. K., TOMIC, S., KAISER, C. M., CHANG, H. C., GENEVAUX, P., GEORGOPOULOS, C., BARRAL, J. M., JOHNSON, A. E., HARTL, F. U. & ETCHELLES, S. A. (2007). Identification of nascent chain interaction sites on trigger factor. *Journal of Biological Chemistry*, 282(16), 12186-12193.
- LANGER, T., LU, C., ECHOLS, H., FLANAGAN, J., HAYER, M. K. & HARTL, F. U. (1992). Successive Action of Dnak, Dnaj and Groel Along the Pathway of Chaperone-Mediated Protein Folding. *Nature*, 356(6371), 683-689.
- LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J. & HIGGINS, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
- LATIFI, A., RUIZ, M. & ZHANG, C. C. (2009). Oxidative stress in cyanobacteria. *Fems Microbiology Reviews*, 33(2), 258-278.
- LAUFEN, T., MAYER, M. P., BEISEL, C., KLOSTERMEIER, D., MOGK, A., REINSTEIN, J. & BUKAU, B. (1999). Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10), 5452-5457.
- LEE, A. G. (2000). Membrane lipids: It's only a phase. *Current Biology*, 10(10), R377-R380.
- LEE, P. A., TULLMAN-ERCEK, D. & GEORGIU, G. (2006). The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annual Review of Microbiology*, 60, 373-395.
- LEE, S., SOWA, M. E., CHOI, J. M. & TSAI, F. T. F. (2004). The ClpB/Hsp104 molecular chaperone - a protein disaggregating machine. *Journal of Structural Biology*, 146(1-2), 99-105.
- LEX, M. & CARR, N. G. (1974). Metabolism of Glucose by Heterocysts and Vegetative Cells of *Anabaena-Cylindrica*. *Archives of Microbiology*, 101(2), 161-167.

- LI, H. & SHERMAN, L. A. (2000). A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 182(15), 4268-4277.
- LIBEREK, K., MARSZALEK, J., ANG, D., GEORGOPOULOS, C. & ZYLICZ, M. (1991). *Escherichia-Coli* Dnaj and Grpe Heat-Shock Proteins Jointly Stimulate Atpase Activity of Dnak. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(7), 2874-2878.
- LIBERTON, M., BERG, R. H., HEUSER, J., ROTH, R. & PAKRASI, H. B. (2006). Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803. *Protoplasma*, 227(2-4), 129-138.
- LILL, R., CROOKE, E., GUTHRIE, B. & WICKNER, W. (1988). The Trigger Factor Cycle Includes Ribosomes, Presecretory Proteins, and the Plasma-Membrane. *Cell*, 54(7), 1013-1018.
- LINDQUIST, S. & CRAIG, E. A. (1988). The Heat-Shock Proteins. *Annual Review of Genetics*, 22, 631-677.
- MACCOLL, R. (1998). Cyanobacterial phycobilisomes. *Journal of Structural Biology*, 124(2-3), 311-334.
- MAHALKA, A. K., KIRKEGAARD, T., JUKOLA, L. T. I., JAATTELA, M. & KINNUNEN, P. K. J. (2014). Human heat shock protein 70 (Hsp70) as a peripheral membrane protein. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1838(5), 1344-1361.
- MARTIN, W., RUJAN, T., RICHLY, E., HANSEN, A., CORNELSEN, S., LINS, T., LEISTER, D., STOEBE, B., HASEGAWA, M. & PENNY, D. (2002). Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12246-12251.
- MARTINEZ-HACKERT, E. & HENDRICKSON, W. A. (2009). Promiscuous Substrate Recognition in Folding and Assembly Activities of the Trigger Factor Chaperone. *Cell*, 138(5), 923-934.
- MARY, I., TU, C. J., GROSSMAN, A. & VAULOT, D. (2004). Effects of high light on transcripts of stress-associated genes for the cyanobacteria *Synechocystis* sp PCC 6803 and *Prochlorococcus* MED4 and MIT9313. *Microbiology-Sgm*, 150, 1271-1281.
- MASCHER, T., HELMANN, J. D. & UNDEN, G. (2006). Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4), 910-+.
- MASHAGHI, A., KRAMER, G., BECHTLUFT, P., ZACHMANN-BRAND, B., DRIESSEN, A. J. M., BUKAU, B. & TANS, S. J. (2013). Reshaping of the conformational search of a protein by the chaperone trigger factor. *Nature*, 500(7460), 98-U125.
- MATE, Z., SASS, L., SZEKERES, M., VASS, I. & NAGY, F. (1998). UV-B-induced differential transcription of *psbA* genes encoding the D1 protein of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Journal of Biological Chemistry*, 273(28), 17439-17444.
- MAYER, M. P. (2013). Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(10), 507-514.
- MAYER, M. P. & BUKAU, B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(6), 670-684.
- MCCARTY, J. S., BUCHBERGER, A., REINSTEIN, J. & BUKAU, B. (1995). The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *Journal of Molecular Biology*, 249(1), 126-137.
- MELIS, A. (1999). Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends in Plant Science*, 4(4), 130-135.
- MENG, E. C., PETERSEN, E. F., COUCH, G. S., HUANG, C. C. & FERRIN, T. E. (2006). Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. *BMC Bioinformatics*, 7, 339.
- MERZ, F., BOEHRINGER, D., SCHAFFITZEL, C., PREISSLER, S., HOFFMANN, A., MAIER, T., RUTKOWSKA, A., LOZZA, J., BAN, N., BUKAU, B. & DEUERLING, E.

- (2008). Molecular mechanism and structure of Trigger Factor bound to the translating ribosome. *Embo Journal*, 27(11), 1622-1632.
- MERZ, F., HOFFMANN, A., RUTKOWSKA, A., ZACHMANN-BRAND, B., BUKAU, B. & DEUERLING, E. (2006). The C-terminal domain of *Escherichia coli* trigger factor represents the central module of its chaperone activity. *Journal of Biological Chemistry*, 281(42), 31963-31971.
- MOGK, A., BUKAU, B., LUTZ, R. & SCHUMANN, W. (1999). Construction and analysis of hybrid *Escherichia coli* *Bacillus subtilis* dnaK genes. *Journal of Bacteriology*, 181(6), 1971-1974.
- MOHAMED, A., ERIKSSON, J., OSIEWACZ, H. D. & JANSSON, C. (1993). Differential Expression of the Psba Genes in the Cyanobacterium *Synechocystis*-6803. *Molecular & General Genetics*, 238(1-2), 161-168.
- MORO, F., TANEVA, S. G., VELAZQUEZ-CAMPOY, A. & MUGAL, A. (2007). GrpE N-terminal domain contributes to the interaction with DnaK and modulates the dynamics of the chaperone substrate binding domain. *Journal of Molecular Biology*, 374(4), 1054-1064.
- MÜLLER, M., KOCH, H. G., BECK, K. & SCHAFFER, U. (2001). Protein traffic in bacteria: multiple routes from the ribosome to and across the membrane. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 66, 107-157.
- MULLINEAUX, C. W. (1999). The thylakoid membranes of cyanobacteria: structure, dynamics and function. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26(7), 671-677.
- MULLINEAUX, C. W. (2014). Electron transport and light-harvesting switches in cyanobacteria. *Frontiers in Plant Science*, 5.
- MULLINEAUX, C. W. & EMLYN-JONES, D. (2005). State transitions: an example of acclimation to low-light stress. *J Exp Bot*, 56(411), 389-393.
- MUNEKAGE, Y., HASHIMOTO, M., MIYAKE, C., TOMIZAWA, K., ENDO, T., TASAKA, M. & SHIKANAI, T. (2004). Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature*, 429(6991), 579-582.
- MUNEKAGE, Y., HOJO, M., MEURER, J., ENDO, T., TASAKA, M. & SHIKANAI, T. (2002). PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell*, 110(3), 361-371.
- MURAKAMI, A. & FUJITA, Y. (1991). Regulation of Photosystem Stoichiometry in the Photosynthetic System of the Cyanophyte *Synechocystis* Pcc-6714 in Response to Light-Intensity. *Plant and Cell Physiology*, 32(2), 223-230.
- MURAMATSU, M. & HIHARA, Y. (2003). Transcriptional regulation of genes encoding subunits of photosystem I during acclimation to high-light conditions in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Planta*, 216(3), 446-453.
- MURAMATSU, M. & HIHARA, Y. (2012). Acclimation to high-light conditions in cyanobacteria: from gene expression to physiological responses. *Journal of Plant Research*, 125(1), 11-39.
- NAKAI, M., NOHARA, T., SUGITA, D. & ENDO, T. (1994). Identification and Characterization of the SecA Protein Homolog in the Cyanobacterium *Synechococcus* Pcc7942. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 200(2), 844-851.
- NAKAI, M., SUGITA, D., OMATA, T. & ENDO, T. (1993). Sec-Y Protein Is Localized in Both the Cytoplasmic and Thylakoid Membranes in the Cyanobacterium *Synechococcus* Pcc7942. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 193(1), 228-234.
- NAKAMURA, Y., KANEKO, T., SATO, S., MIMURO, M., MIYASHITA, H., TSUCHIYA, T., SASAMOTO, S., WATANABE, A., KAWASHIMA, K., KISHIDA, Y., KIYOKAWA, C., KOHARA, M., MATSUMOTO, M., MATSUNO, A., NAKAZAKI, N., SHIMPO, S., TAKEUCHI, C., YAMADA, M. & TABATA, S. (2003). Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA Research*, 10(4), 137-145.
- NAKAMURA, Y., KANEKO, T. & TABATA, S. (2000). CyanoBase, the genome database for *Synechocystis* sp strain PCC6803: status for the year 2000. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 72-72.

- NELISSEN, B., VANDEPEER, Y., WILMOTTE, A. & DEWACHTER, R. (1995). An Early Origin of Plastids within the Cyanobacterial Divergence Is Suggested by Evolutionary Trees Based on Complete 16s Ribosomal-Rna Sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 12(6), 1166-1173.
- NEVO, R., CHARUVI, D., SHIMONI, E., SCHWARZ, R., KAPLAN, A., OHAD, I. & REICH, Z. (2007). Thylakoid membrane perforations and connectivity enable intracellular traffic in cyanobacteria. *Embo Journal*, 26(5), 1467-1473.
- NICKELSEN, J. & RENGSTL, B. (2013). Photosystem II Assembly: From Cyanobacteria to Plants. *Annual Review of Plant Biology*, Vol 64, 64, 609-635.
- NIMURA, K., YOSHIKAWA, H. & TAKAHASHI, H. (1996). DnaK3, one of the three DnaK proteins of cyanobacterium *Synechococcus* sp PCC7942, is quantitatively detected in the thylakoid membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 229(1), 334-340.
- NOWACZYK, M. M., HEBELER, R., SCHLODDER, E., MEYER, H. E., WARSCHEID, B. & ROGNER, M. (2006). Psb27, a cyanobacterial lipoprotein, is involved in the repair cycle of photosystem II. *Plant Cell*, 18(11), 3121-3131.
- OGAWA, T. (1991). A Gene Homologous to the Subunit-2 Gene of NADH Dehydrogenase Is Essential to Inorganic Carbon Transport of *Synechocystis* PCC6803. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(10), 4275-4279.
- OGUCHI, K., NIMURA, K., YOSHIKAWA, H. & TAKAHASHI, H. (1997). Sequence and analysis of a dnaJ homologue gene in Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236(2), 461-466.
- OGURA, T. & WILKINSON, A. J. (2001). AAA(+) superfamily ATPases: common structure-diverse function. *Genes to Cells*, 6(7), 575-597.
- OHKAWA, H., PRICE, G. D., BADGER, M. R. & OGAWA, T. (2000). Mutation of *ndh* genes leads to inhibition of CO₂ uptake rather than HCO₃⁻ uptake in *Synechocystis* sp strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 182(9), 2591-2596.
- OLIVE, J., AJLANI, G., ASTIER, C., RECOUVREUR, M. & VERNOTTE, C. (1997). Ultrastructure and light adaptation of phycobilisome mutants of *Synechocystis* PCC 6803. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1319(2-3), 275-282.
- OXBOROUGH, K. & BAKER, N. R. (1997). Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components - calculation of qP and Fv 'Fm' without measuring Fo '. *Photosynthesis Research*, 54(2), 135-142.
- PACKSCHIES, L., THEYSSEN, H., BUCHBERGER, A., BUKAU, B., GOODY, R. S. & REINSTEIN, J. (1997). GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacement mechanism. *Biochemistry*, 36(12), 3417-3422.
- PALLEROS, D. R., REID, K. L., MCCARTY, J. S., WALKER, G. C. & FINK, A. L. (1992). DnaK, Hsp73, and Their Molten Globules - 2 Different Ways Heat-Shock Proteins Respond to Heat. *Journal of Biological Chemistry*, 267(8), 5279-5285.
- PATZELT, H., RUDIGER, S., BREHMER, D., KRAMER, G., VORDERWULBECKE, S., SCHAFFITZEL, E., WAITZ, A., HESTERKAMP, T., DONG, L., SCHNEIDER-MERGENER, J., BUKAU, B. & DEUERLING, E. (2001). Binding specificity of *Escherichia coli* trigger factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), 14244-14249.
- PELROY, R. A., STANIER, R. Y. & RIPPKA, R. (1972). Metabolism of Glucose by Unicellular Blue-Green-Algae. *Archiv Fur Mikrobiologie*, 87(4), 303-&.
- PETTERSEN, E. F., GODDARD, T. D., HUANG, C. C., COUCH, G. S., GREENBLATT, D. M., MENG, E. C. & FERRIN, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25(13), 1605-1612.
- PFANNSCHMIDT, T. (2003). Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends in Plant Science*, 8(1), 33-41.
- PISAREVA, T., KWON, J., OH, J., KIM, S., GE, C. R., WIESLANDER, A., CHOI, J. S. & NORLING, B. (2011). Model for Membrane Organization and Protein Sorting in the

- Cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 Inferred from Proteomics and Multivariate Sequence Analyses. *Journal of Proteome Research*, 10(8), 3617-3631.
- PLOHNKE, N., SEIDEL, T., KAHMANN, U., RÖGNER, M., SCHNEIDER, D. & REXROTH, S. (2015a). The proteome and lipidome of *Synechocystis* sp. PCC 6803 cells grown under light-activated heterotrophic conditions. *Molecular & Cellular Proteomics*.
- PLOHNKE, N., SEIDEL, T., KAHMANN, U., RÖGNER, M., SCHNEIDER, D. & REXROTH, S. (2015b). The proteome and lipidome of *Synechocystis* sp. PCC 6803 cells grown under light-activated heterotrophic conditions (supplemental data). *Molecular & Cellular Proteomics*.
- POJIDAEVA, E., ZINCHENKO, V., SHESTAKOV, S. V. & SOKOLENKO, A. (2004). Involvement of the SppA1 peptidase in acclimation to saturating light intensities in *Synechocystis* sp strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 186(12), 3991-3999.
- PORRA, R. J., THOMPSON, W. A. & KRIEDEMANN, P. E. (1989). Determination of Accurate Extinction Coefficients and Simultaneous-Equations for Assaying Chlorophyll-a and Chlorophyll-B Extracted with 4 Different Solvents - Verification of the Concentration of Chlorophyll Standards by Atomic-Absorption Spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 975(3), 384-394.
- PRATT, W. B. & TOFT, D. O. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Experimental Biology and Medicine*, 228(2), 111-133.
- PRODÖHL, A., DREHER, C., HIELSCHER, R., HELLWIG, P. & SCHNEIDER, D. (2007). Heterologous expression and in vitro assembly of the transmembrane cytochrome b(6). *Protein Expression and Purification*, 56(2), 279-285.
- QI, R. F., SARBENG, E. B., LIU, Q., LE, K. Q., XU, X. P., XU, H. Y., YANG, J., WONG, J. L., VORVIS, C., HENDRICKSON, W. A., ZHOU, L. & LIU, Q. L. (2013). Allosteric opening of the polypeptide-binding site when an Hsp70 binds ATP. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(7), 900-907.
- RAJALAHTI, T., HUANG, F., KLEMENT, M. R., PISAREVA, T., EDMAN, M., SJOSTROM, M., WIESLANDER, A. & NORLING, B. (2007). Proteins in different *Synechocystis* compartments have distinguishing N-terminal features: A combined proteomics and multivariate sequence analysis. *Journal of Proteome Research*, 6(7), 2420-2434.
- RAKHIMBERDIEVA, M. G., VAVILIN, D. V., VERMAAS, W. F. J., ELANSKAYA, I. V. & KARAPETYAN, N. V. (2007). Phycobilin/chlorophyll excitation equilibration upon carotenoid-induced non-photochemical fluorescence quenching in phycobilisomes of the *Synechocystis* sp PCC 6803. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1767(6), 757-765.
- RAST, A., HEINZ, S. & NICKELSEN, J. (2015). Biogenesis of thylakoid membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta*.
- REDLINGER, T. & GANTT, E. (1982). A Mr 95,000 Polypeptide in *Porphyridium-Cruentum* Phycobilisomes and Thylakoids - Possible Function in Linkage of Phycobilisomes to Thylakoids and in Energy-Transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 79(18), 5542-5546.
- RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. B., HERDMAN, M. & STANIER, R. Y. (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111(Mar), 1-61.
- RIPPKA, R., WATERBURY, J. & COHENBAZIRE, G. (1974). Cyanobacterium Which Lacks Thylakoids. *Archives of Microbiology*, 100(4), 419-436.
- RÜDIGER, S., GERMEROOTH, L., SCHNEIDERMERGENER, J. & BUKAU, B. (1997). Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *Embo Journal*, 16(7), 1501-1507.
- RUPPRECHT, E., DUPPRE, E. & SCHNEIDER, D. (2010). Similarities and Singularities of Three DnaK Proteins from the Cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant and Cell Physiology*, 51(7), 1210-1218.
- RUPPRECHT, E., FUHRMANN, E. & SCHNEIDER, D. (2007a). Stress response of multiple Hsp70 proteins from the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. *Photosynthesis Research*, 91(2-3), 289-289.

- RUPPRECHT, E., GATHMANN, S., FUHRMANN, E. & SCHNEIDER, D. (2007b). Three different DnaK proteins are functionally expressed in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. *Microbiology-Sgm*, 153, 1828-1841.
- RUPPRECHT, E. K. (2007). Charakterisierung der DnaK-Proteinfamilie aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Doctoral dissertation).
- SALVUCCI, M. E. & CRAFTS-BRANDNER, S. J. (2004). Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of rubisco activase in plants from contrasting thermal environments. *Plant Physiology*, 134(4), 1460-1470.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SASS, L., SPETEA, C., MATE, Z., NAGY, F. & VASS, I. (1997). Repair of UV-B induced damage of photosystem II via de novo synthesis of the D1 and D2 reaction centre subunits in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynthesis Research*, 54(1), 55-62.
- SCHIRMER, E. C., GLOVER, J. R., SINGER, M. A. & LINDQUIST, S. (1996). HSP100/Clp proteins: A common mechanism explains diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(8), 289-296.
- SCHLECHT, R., ERBSE, A. H., BUKAU, B. & MAYER, M. P. (2011). Mechanics of Hsp70 chaperones enables differential interaction with client proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(3), 345-U135.
- SCHMID, D., BAICI, A., GEHRING, H. & CHRISTEN, P. (1994). Kinetics of Molecular Chaperone Action. *Science*, 263(5149), 971-973.
- SCHNEIDER, D. (2014). Protein Targeting, Transport and Translocation in Cyanobacteria. In *The Cell Biology of Cyanobacteria* (ed. E. a. H. Flores, A.): Caister Academic Press
- SCHRODA, M., VALLON, O., WOLLMAN, F. A. & BECK, C. F. (1999). A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell*, 11(6), 1165-1178.
- SELAO, T. T., ZHANG, L. F., ARIOZ, C., WIESLANDER, A. & NORLING, B. (2014). Subcellular Localization of Monoglucosyldiacylglycerol Synthase in *Synechocystis* sp PCC6803 and Its Unique Regulation by Lipid Environment. *Plos One*, 9(2).
- SHEN, G. Z., BOUSSIBA, S. & VERMAAS, W. F. J. (1993). *Synechocystis* Sp Pcc-6803 Strains Lacking Photosystem-I and Phycobilisome Function. *Plant Cell*, 5(12), 1853-1863.
- SLEPENKOV, S. V. & WITT, S. N. (2002). Kinetic analysis of interdomain coupling in a lidless variant of the molecular chaperone DnaK: DnaK's lid inhibits transition to the low affinity state. *Biochemistry*, 41(40), 12224-12235.
- SMITH, D. & HOWE, C. J. (1993). The Distribution of Photosystem-I and Photosystem-II Polypeptides between the Cytoplasmic and Thylakoid Membranes of Cyanobacteria. *Fems Microbiology Letters*, 110(3), 341-347.
- SMOCK, R. G., BLACKBURN, M. E. & GIERASCH, L. M. (2011). Conserved, Disordered C Terminus of DnaK Enhances Cellular Survival upon Stress and DnaK in Vitro Chaperone Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 286(36), 31821-31829.
- SPENCE, E., BAILEY, S., NENNINGER, A., MOLLER, S. G. & ROBINSON, C. (2004). A homolog of Albino3/Oxal is essential for thylakoid biogenesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC6803. *Journal of Biological Chemistry*, 279(53), 55792-55800.
- SPENCE, E., SARCINA, M., RAY, N., MOLLER, S. G., MULLINEAUX, C. W. & ROBINSON, C. (2003). Membrane-specific targeting of green fluorescent protein by the Tat pathway in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Molecular Microbiology*, 48(6), 1481-1489.
- STANIER, C. B. G. (1988). Fine-Structure of Cyanobacteria. *Methods in Enzymology*, 167, 157-172.
- STANIER, R. Y. & COHENBAZIRE, G. (1977). Phototropic Prokaryotes - Cyanobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 31, 225-274.
- STANIER, R. Y., KUNISAWA, R., MANDEL, M. & COHENBAZ.G. (1971). Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order Cchroococcales). *Bacteriological Reviews*, 35(2), 171-&.

- STENGEL, A., GUGEL, I. L., HILGER, D., RENGSTL, B., JUNG, H. & NICKELSEN, J. (2012). Initial Steps of Photosystem II de Novo Assembly and Preloading with Manganese Take Place in Biogenesis Centers in *Synechocystis*. *Plant Cell*, 24(2), 660-675.
- STUDIER, F. W. & MOFFATT, B. A. (1986). Use of Bacteriophage-T7 Rna-Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113-130.
- SUH, W. C., BURKHOLDER, W. F., LU, C. Z., ZHAO, X., GOTTESMAN, M. E. & GROSS, C. A. (1998). Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its cochaperone DnaJ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15223-15228.
- SUPPINI, J. P., AMOR, M., ALIX, J. H. & LADJIMI, M. M. (2004). Complementation of an *Escherichia coli* DnaK defect by Hsc70-DnaK chimeric proteins. *Journal of Bacteriology*, 186(18), 6248-6253.
- SZABO, A., KORSZUN, R., HARTL, F. U. & FLANAGAN, J. (1996). A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *Embo Journal*, 15(2), 408-417.
- TABELI, Y., OKADA, K., MAKITA, N. & TSUZUKI, M. (2009). Light-induced gene expression of fructose 1,6-bisphosphate aldolase during heterotrophic growth in a cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The FEBS journal*, 276(1), 187-198.
- TABOADA, B., CIRIA, R., MARTINEZ-GUERRERO, C. E. & MERINO, E. (2012). ProOpDB: Prokaryotic Operon DataBase. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D627-D631.
- TAIPALE, M., JAROSZ, D. F. & LINDQUIST, S. (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(7), 515-528.
- TETER, S. A., HOURY, W. A., ANG, D., TRADLER, T., ROCKABRAND, D., FISCHER, G., BLUM, P., GEORGOPOULOS, C. & HARTL, F. U. (1999). Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. *Cell*, 97(6), 755-765.
- TRAUTMANN, D., BEYER, P. & AL-BABILI, S. (2013). The ORF slr0091 of *Synechocystis* sp PCC6803 encodes a high-light induced aldehyde dehydrogenase converting apocarotenals and alkanals. *Febs Journal*, 280(15), 3685-3696.
- TU, C. J., SHRAGER, J., BURNAP, R. L., POSTIER, B. L. & GROSSMAN, A. R. (2004). Consequences of a deletion in *dspA* on transcript accumulation in *Synechocystis* sp strain PCC6803. *Journal of Bacteriology*, 186(12), 3889-3902.
- TYYSTJARVI, T., HERRANEN, M. & ARO, E. M. (2001). Regulation of translation elongation in cyanobacteria: membrane targeting of the ribosome nascent-chain complexes controls the synthesis of D1 protein. *Molecular Microbiology*, 40(2), 476-484.
- VAN DE MEENE, A. M. L., HOHMANN-MARRIOTT, M. F., VERMAAS, W. F. J. & ROBERSON, R. W. (2006). The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. *Archives of Microbiology*, 184(5), 259-270.
- VAN DER SLUIS, E. O. & DRIESSEN, A. J. (2006). Stepwise evolution of the Sec machinery in Proteobacteria. *Trends Microbiol*, 14(3), 105-108.
- VAN DURME, J., MAURER-STROH, S., GALLARDO, R., WILKINSON, H., ROUSSEAU, F. & SCHYMKOWITZ, J. (2009). Accurate Prediction of DnaK-Peptide Binding via Homology Modelling and Experimental Data. *Plos Computational Biology*, 5(8).
- VEENENDAAL, A. K. J., VAN DER DOES, C. & DRIESSEN, A. M. (2004). The protein-conducting channel SecYEG. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1694(1-3), 81-95.
- VERMAAS, W. F. (2001). Photosynthesis and respiration in cyanobacteria. *eLS*.
- VERMAAS, W. F. J., RUTHERFORD, A. W. & HANSSON, O. (1988). Site-Directed Mutagenesis in Photosystem-II of the Cyanobacterium *Synechocystis* Sp Pcc-6803 - Donor-D Is a Tyrosine Residue in the D2-Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(22), 8477-8481.
- VERNOTTE, C., PICAUD, M., KIRILOVSKY, D., OLIVE, J., AJLANI, G. & 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(1), 45-57.
- VOGEL, M., MAYER, M. P. & BUKAU, B. (2006). Allosteric regulation of Hsp70 chaperones involves a conserved interdomain linker. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50), 38705-38711.
- VOTHKNECHT, U. C. & WESTHOFF, P. (2001). Biogenesis and origin of thylakoid membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1541(1-2), 91-101.
- WALTER, S. & BUCHNER, J. (2002). Molecular chaperones - Cellular machines for protein folding. *Angewandte Chemie-International Edition*, 41(7), 1098-1113.
- WANG, J. X., CHEN, L., HUANG, S. Q., LIU, J., REN, X. Y., TIAN, X. X., QIAO, J. J. & ZHANG, W. W. (2012). RNA-seq based identification and mutant validation of gene targets related to ethanol resistance in cyanobacterial *Synechocystis* sp PCC 6803. *Biotechnology for Biofuels*, 5.
- WANG, P. & DALBEY, R. E. (2011). Inserting membrane proteins: The YidC/Oxa1/Alb3 machinery in bacteria, mitochondria, and chloroplasts. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1808(3), 866-875.
- WESTERMANN, M., NEUSCHAEFER-RUBE, O., MORSCHEL, E. & 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. *Journal of Plant Physiology*, 155(1), 24-33.
- WILLIAMS, J. G. K. (1988). Construction of Specific Mutations in Photosystem-II Photosynthetic Reaction Center by Genetic-Engineering Methods in *Synechocystis*-6803. *Methods in Enzymology*, 167, 766-778.
- YANG, C., HUA, Q. & SHIMIZU, K. (2002). Integration of the information from gene expression and metabolic fluxes for the analysis of the regulatory mechanisms in *Synechocystis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(6), 813-822.
- YANO, J. & YACHANDRA, V. (2014). Mn4Ca Cluster in Photosynthesis: Where and How Water is Oxidized to Dioxygen. *Chemical Reviews*, 114(8), 4175-4205.
- YUZAWA, Y., NISHIHARA, H., HARAGUCHI, T., MASUDA, S., SHIMOJIMA, M., SHIMOYAMA, A., YUASA, H., OKADA, N. & OHTA, H. (2012). Phylogeny of Galactolipid Synthase Homologs Together with their Enzymatic Analyses Revealed a Possible Origin and Divergence Time for Photosynthetic Membrane Biogenesis. *DNA Research*, 19(1), 91-102.
- ZAK, E., NORLING, B., MAITRA, R., HUANG, F., ANDERSSON, B. & PAKRASI, H. B. (2001). The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 13443-13448.
- ZHOU, J. H. & XU, Z. H. (2005). The structural view of bacterial translocation-specific chaperone SecB: implications for function. *Molecular Microbiology*, 58(2), 349-357.
- ZHU, X. T., ZHAO, X., BURKHOLDER, W. F., GRAGEROV, A., OGATA, C. M., GOTTESMAN, M. E. & HENDRICKSON, W. A. (1996). Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*, 272(5268), 1606-1614.
- ZSIROS, O., KIS, M., MUSTARDY, S., FARKAS, T., VARKONYI, Z., GOMBOS, Z. & SZALONTAI, B. (2002). Light-driven structural changes in thylakoid and cytoplasmic membranes of a cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803. *Journal of Plant Physiology*, 159(4), 403-414.
- ZUIDERWEG, E. R., BERTELSEN, E. B., ROUSAKI, A., MAYER, M. P., GESTWICKI, J. E. & AHMAD, A. (2013). Allostery in the Hsp70 chaperone proteins. *Top Curr Chem*, 328, 99-153.
- ZYBAILOV, B., MOSLEY, A. L., SARDIU, M. E., COLEMAN, M. K., FLORENS, L. & WASHBURN, M. P. (2006). Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Proteome Research*, 5(9), 2339-2347.

MCP Papers in Press. Published on January 5, 2015 as Manuscript M114.042382

Title: The proteome and lipidome of *Synechocystis* sp. PCC 6803 cells grown under light-activated heterotrophic conditions

Authors: Nicole Plohnke^{a,#} (Nicole.Plohnke@ruhr-uni-bochum.de), Tobias Seidel^{b,#} (seidelt@uni-mainz.de), Uwe Kahmann^c (zud@gmx.de), Matthias Rögner^a (Matthias.Roegner@ruhr-uni-bochum.de), Dirk Schneider^b (Dirk.Schneider@uni-mainz.de) and Sascha Rexroth^a (Sascha.Rexroth@ruhr-uni-bochum.de)

^a)Plant Biochemistry, Faculty of Biology & Biotechnology, Ruhr-University Bochum, 44780 Bochum, Germany.

^b)Department of Pharmacy and Biochemistry, Johannes Gutenberg-University Mainz, 55128 Mainz, Germany

^c)Department of molecular cell biology, Bielefeld University, 33615 Bielefeld, Germany

N.P. and T.S. contributed equally to this work

Corresponding authors:

Sascha Rexroth, Ruhr-University Bochum, Universitätsstraße 150, ND 3/133, 44780 Bochum, Germany, tel.: 0049-234/32-29896, fax: 0049-234/32-14322, e-mail: Sascha.Rexroth@ruhr-uni-bochum.de

and

Dirk Schneider, Johannes Gutenberg-University Mainz, Johann-Joachim-Becher-Weg 30, 55128 Mainz, Germany, Tel.: +49-6131/3925833, Fax: +49 (0)6131 3925348, e-mail: dirk.schneider@uni-mainz.de

Abbreviations page

CM: cytoplasmic membrane

DGDG: Digalactosyldiacylglycerol

LAHG: Light-activated heterotrophic growth

MGDG: Monogalactosyldiacylglycerol

NSAF: Normalized spectral abundance factor

PG: Phosphatidylglycerol

PS I: Photosystem I

PS II: Photosystem II

ROS: reactive oxygen species

SQDG: Sulfoquinovosyldiacylglycerol

SRM: selected reaction monitoring

TM: thylakoid membrane

Summary

Cyanobacteria are photoautotrophic prokaryotes with a plant-like photosynthetic machinery. Due to their short generation times, the ease of their genetic manipulation, and the limited size of their genome and proteome, cyanobacteria are popular model organisms for photosynthetic research. Although the principal mechanisms of photosynthesis are well-known, much less is known about the biogenesis of the thylakoid membrane, hosting the components of the photosynthetic and respiratory electron transport chain in cyanobacteria. Here we present a detailed proteome analysis of the important model and host organism *Synechocystis* sp. PCC 6803 under light-activated heterotrophic growth conditions. Due to the mechanistic importance and severe changes in thylakoid membrane morphology under light-activated heterotrophic growth conditions, a focus was put on the analysis of the membrane proteome, which was supported with a targeted lipidome analysis. In total, 1528 proteins (24.5 % membrane integral) were identified in our analysis. For 641 of these proteins quantitative information was obtained by spectral counting. Prominent changes were observed for proteins associated with oxidative stress response and protein folding. Due to the heterotrophic growth conditions, also proteins involved in carbon metabolism and C/N-balance were severely affected. Although intracellular thylakoid membranes were significantly reduced, only minor changes were observed in their protein composition. The increased proportion of the membrane-stabilizing sulfoquinovosyl diacyl lipids found in the lipidome analysis, as well as the increased content of lipids with more saturated acyl chains, are clear indications for a coordinated synthesis of proteins and lipids, resulting in stabilization of intracellular thylakoid membranes under stress conditions.

Introduction

Cyanobacteria are a widespread group of photoautotrophic organisms, which significantly contribute to global carbon fixation. Cyanobacteria and plant chloroplasts share a common ancestor, and thus cyanobacteria have a plant-like photosynthetic metabolism (1, 2). Consequently, they are established model organisms for studies, aiming to elucidate photosynthetic mechanisms. Both, chloroplasts and cyanobacteria, have two internal membrane systems, *i.e.* the inner envelope and the cytoplasmic membrane (CM) in chloroplasts or cyanobacteria, respectively, as well as the thylakoid membrane (TM) system, which harbors the complexes of the photosynthetic electron transfer chain (3, 4). The photosynthetic electron transfer chain typically consists of the three membrane integral protein complexes: photosystem I (PS I), photosystem II (PS II) and the cytochrome *b₆f* complex, as well as of the soluble electron carriers plastoquinone and plastocyanin (5, 6). In the end, reduction equivalents are produced, which are used for CO₂-fixation (7). However, besides the ability to grow photoautotrophically, some cyanobacteria are also capable to grow photoheterotrophically, where they use reduced organic compounds as carbon source, or even completely heterotrophically by using reduced organic compounds as carbon and energy source (8). The well characterized cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (9) (hereafter: *Synechocystis*) can grow in darkness under light-activated heterotrophic growth (LAHG) conditions by using glucose as carbon and energy source (10). Enhanced sugar catabolism in LAHG cultures is *e.g.* reflected by increased activities of enzymes involved in sugar catabolism, such as glucokinase and pyruvate kinase (11). The effects of LAHG conditions on the abundance of soluble *Synechocystis* proteins have been analyzed previously, although only 23 proteins with a significantly altered expression level (LAHG vs. autotrophic growth) have been described. This study has *e.g.* indicated that under LAHG conditions glucose is mainly degraded by the oxidative pentose phosphate (OPP) pathway (12). The histidine kinase 8 (Hik8) as well as the sigma factor E (SigE), regulating the expression of sugar-degrading genes, were shown to be essential for LAHG (13, 14).

While readjustments of the cellular energy metabolism are important, the impact on the cellular membrane architecture is more striking. The ability of *Synechocystis* to grow under LAHG conditions has been used recently to analyze TM formation within cyanobacterial cells (15). While dark-adapted *Synechocystis* cells have no active PS II complex, complete photosynthetic activity is regained within 24 h after transferring dark-adapted cells into the light. Furthermore, reappearance of photosynthetic electron transfer processes is coupled to the formation of internal TMs. However, it is essentially still completely enigmatic how the formation of internal TM is controlled, although some proteins have been suggested to be involved. These proteins

include the vesicle inducing protein in plastids 1 (Vipp1), DnaK proteins, a prohibitin-like protein as well as the YidC protein, a membrane protein integrase (16-19). Nevertheless, while some proteins have been suggested to be more directly involved in TM formation, the stability of the TM is also globally affected indirectly by pathways, which control the biogenesis of lipids and/or cofactors, and mutants defective in synthesis of chlorophyll or of the membrane lipid phosphatidylglycerol (PG) have severely reduced TM systems (20, 21).

In the present work, we combined pre-fractioning of *Synechocystis* cellular membranes with a global proteome and lipidome analysis, to shift the analytical focus towards the rearrangement of the internal thylakoid membrane system observed in *Synechocystis* cells under LAHG conditions, with a significantly larger coverage of the proteome than in former studies. Furthermore, also the effect on *Synechocystis* lipids was analyzed in a targeted mass spectrometric approach, revealing significant adjustment of fatty acid saturation in response to the LAHG conditions.

Experimental procedures

Growth condition

A glucose-tolerant *Synechocystis* sp. PCC 6803 wild-type strain was cultivated photo-mixotrophically in liquid BG11 media (1) supplemented with 10 mM glucose. Erlenmeyer flasks were incubated at 30 °C on an orbital shaker (150 rpm) under fluorescent white light at a light intensity of 30 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. For LAHG cultures, light-grown cells were diluted to an OD_{750} of about 0.2 and grown in the dark in BG11 media supplemented with 60 mM glucose in Erlenmeyer flasks on an orbital shaker at 150 rpm. Cultures were illuminated with white light (10 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 15 min per day (10). When LAHG cultures had reached an OD_{750} of 1 or above, cultures were diluted to $\text{OD}_{750} = 0.2$ in fresh medium. LAHG cultures were grown in the dark for at least two weeks, during which cultures were diluted at least five times in fresh medium.

Electron Microscopy

A *Synechocystis* cell pellet obtained from a 10 mL cell suspension was washed three times with EM buffer (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.0), and ultra-structural investigations were performed as described previously (22)

Cell fractionation

Synechocystis cells grown in light or under LAHG conditions were harvested in the exponential growth phase (OD_{750} of 0.5–2.0). Cell pellets were resuspended in buffer (50 mM HEPES

pH 7.0, 25 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 10% (v/v) glycerol), a proteinase inhibitor mix (Sigma Aldrich) was added at a 1:1000 dilution, and cells were broken with glass beads (0.25–0.5 mm diameter) in a Mini Beadbeater. Glass beads and unbroken cells were removed by centrifuging twice at 1600 g. The supernatant was subsequently centrifuged at 100000 g for 1 h, and the soluble fraction represented the “soluble proteins” fraction. The pellet was washed twice with buffer and subsequently resuspended in HEPES buffer (→ membrane fraction).

Sample preparation and LC-MS analysis

For protein analysis, 5 µg proteins were loaded onto a SDS-gel. The total acrylamide concentration was 5 % in the stacking gel and 14 % in the separating gel. Electrophoresis was stopped when the migrating front entered the separating gel, resulting in one single, clearly focused band per sample (supplemental Fig. S1). Due to this procedure dust and other particular matter is efficiently removed and matrix contaminants, such as salts, detergents and lipids, are significantly reduced. The gel was stained with Coomassie blue and then the protein-bands were cut out and digested with trypsin (23). Resulting peptides were extracted from the gel with 50 % (v/v) acetonitrile/1 % (v/v) formic acid. The lyophilized peptides were resuspended in 20 µL buffer A (0.1 % (v/v) formic acid) right before MS-measurement.

LC-MS analysis was performed as described previously, with slight modifications (24). For reversed-phase chromatography, a linear gradient of 90 min from buffer B (99.9 % acetonitrile, 0.1 % formic acid) and buffer A (0.1 % formic acid) was used with a flow rate of 400 nL/min (nanoAcquity, Waters). For MS analysis, a Thermo LTQ Orbitrap XL mass spectrometer was operated in duty cycle, consisting of one 300-2000 m/z FTMS and four MS-MS LTQ scans. Acquisition of MS and MS/MS data was carried out using Xcalibur 2.1 (Thermo Scientific). Three independent biological replicates from cultures grown under photomixotrophic conditions were analyzed and compared to four independent biological replicates from LAHG-cultures. For each biological replicate, three to five technical replicates were analyzed.

All MS-Data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) via the PRIDE partner repository (25) with the dataset identifier PXD000980. The MS² spectra with assigned fragment ions can be reviewed using the free software “thermo-msf-parser” (26).

LC-MS data analysis

The LC-MS/MS data were analyzed using the Sequest algorithm (27) implemented in the proteome discoverer 1.3 software (Thermo Scientific). For peptide identification, spectra were matched to a database derived from the genome sequence of *Synechocystis* (28, 29),

containing 3661 protein sequences. Trypsin was selected as the specified enzyme, and maximal two missed cleavages were permitted. The precursor ion mass tolerance was set to 10 ppm and the fragment ion mass tolerance to 0.8 Da. Percolator, implemented in proteome discoverer 1.3 was used to estimate confidence of peptide identification and peptides with false discovery rates bigger than 5 % (q-value > 0.05) were discarded (30, 31).

Mean and standard deviation were calculated for all technical and biological replicates. Proteins were quantified using spectral counting (32) and normalized spectral abundance factors (NSAF) (33, 34) when at least 8 peptides per protein were identified. The NSAF takes into account the protein length (L), which has an impact on the number of spectral counts (Spc) per protein. In the first step, the number of spectral counts per protein is calculated (Spc/L) and is divided by the sum of all Spc/L in the sample in the second step (35). In contrast to spectral counting, the NSAF approach pays respect to the fact that proteolytic digest of bigger proteins result in a higher number of peptides than in case of small ones. Proteins were determined as significantly changed according to a t-test on a significance level of 95 % and an at least 2-fold changed abundance.

Lipid analysis

For lipid extraction, whole *Synechocystis* cells were resuspended in hot isopropanol, disrupted by glass beads and lipids were extracted afterwards, following the method of Blight *et al.* (36). Broken cells were incubated 30 minutes in chloroform:methanol (2:1, 0.01 % (w/v) 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol). Then the lower lipid phase was collected and the extraction step was repeated. Both lipid phases were united and lipids were shaken out first with 0.73 % (w/v) NaCl and then with water. One part of the dried extract was dissolved in chloroform:methanol:sodium acetate (50 mM) in water, for the analysis of MGDG and DGDG. The other part was dissolved in chloroform:methanol:ammonium acetate (300 mM) in water, to analyze SQDG and PG. Lipid standards for MGDG, DGDG (Matreya) and for PG, SQDG (Larodan) were added, and lipid analysis was carried out by ESI-MS/MS after direct infusion with a flow rate of 5 μ L/min into a triple quadrupole mass spectrometer (TSQ Vantage, Thermo Scientific). Lipids were detected by selected reaction monitoring (SRM) using the settings adapted from (37). MGDG and DGDG were analyzed in positive mode. The ion spray voltage was set to 3500 V and 5 sheath gas was added. SQDG and PG were analyzed in negative mode and the ion spray voltage was set to 3000 V and 20 sheath gas was added. During all acquisitions, the temperature of the ion transferring tube was set to 270 °C and collision-activated dissociation pressure was set to 1.5 mTorr. A list of all transitions for MGDG and DGDG can be found in supplemental Table S3, all transitions for SQDG and PG can be found in supplemental Table S4. Three independent light-

adapted cultures and four LAHG-cultures were analyzed. For each biological replicate, two technical replicates were analyzed and measured three times each. The SRM-data have been deposited to the PeptidesAtlas SRM Experiment Library (PASSEL) and are accessible via the website <http://www.peptideatlas.org/PASS/PASS00503>.

Lipid raw data were converted using an in-house software and further evaluated using Microsoft Excel. Mean and standard deviation were calculated from all respective biological and technical replicates.

Results and Discussion

Experimental strategy

Growth under LAHG conditions has a serious impact on the structure of *Synechocystis* cells. The internal TM system is almost completely lost and TM remnants remain as largely unstructured, cloudy assemblies within the cyanobacterial cell (Fig. 1). The chlorophyll content per cell dramatically decreases (15), and severe reduction of pigment-binding protein complexes is one of the most prominent phenotype associated with LAHG conditions. In contrast, the cellular concentration of the pigment binding subunits of the soluble light-harvesting phycobilisomes is not decreased, as revealed by former spectroscopic analysis (15). Only LAHG cells having these characteristics were harvested and fractionated for subsequent analyses.

Position Fig. 1

Some effects of LAHG on the *Synechocystis* proteome have been described recently, using 2D-gel electrophoresis followed by MALDI-ToF-MS (12, 38). However, this approach focused on soluble proteins, and thus only a fraction of the proteome has been analyzed. In order to get information on a more global level, we here used a shotgun approach to analyze the soluble as well as the membrane protein fraction of *Synechocystis* cells cultivated under LAHG conditions, in comparison to cells cultivated under mixotrophic conditions in the light. In our shotgun approach, using nanoHPLC coupled to ESI-MS/MS, a higher number of proteins was identified and also relatively quantified by using spectral counting (32) and normalized spectral abundance factors (33, 34). This method is highly suitable to identify a high number of proteins and to detect strong changes in abundance. Nevertheless, it should be mentioned that spectral counting tends to overestimate regulation factors, whereas low abundant proteins are always underrepresented (39).

The cytosolic and total membrane protein fractions of three independent *Synechocystis* cultures grown under photomixotrophic conditions in the light, and of four independent LAHG cultures,

were isolated, digested with trypsin and analyzed in an untargeted mass spectrometric approach, using at least three technical replicates per biological replicate. Prior to tryptic digest, protein samples were purified and concentrated by focusing the protein samples in an SDS gel as one single, focused band per sample between the stacking and separating gel to remove particulate matter and matrix contaminants (Fig. 2A, supplemental Fig. S1). Following LC-MS analysis, individual peptides were identified using the Sequest algorithm (27), and filter criteria were set to achieve a false positive rate of less than 5 %. In total, the analysis resulted in the identification of 1528 proteins (supplemental Table S1). With 374 identified membrane integral proteins, a proportion of 24.5 % was obtained, which is close to the 25 % of membrane proteins predicted to be encoded in the *Synechocystis* genome (28). The distribution of mass and pI, as well as mass and hydrophobicity of the identified proteins indicated no apparent bias, when compared to the complete set of proteins annotated in the *Synechocystis* genome (Fig. 2C).

Position Fig. 2

For relative quantification, spectral counting (32) and the concept of normalized spectral abundance factors (33, 34) were applied. The coefficient of variation (CV) declined strongly with the number of identified peptides per protein, as it is generally observed for MS-based label free quantification approaches (Fig. 3A). For quantifications based on 8 or more identified peptides per protein, the CV declined to about 30 % and did not decrease further with rising number of identified peptides. Requiring a minimum of 8 identified peptides per protein as a threshold, 641 proteins were finally quantified in our analysis (supplemental Table S2). The correlation between the *p*-value and the fold-change between LAHG and mixotrophic growth conditions is shown in a volcano plot in Fig. 3B+C for the cytosolic and membrane fraction, respectively. Based on a *t*-test significance level of 95 % and at least 2-fold regulation, 261 proteins have altered cellular concentrations, with 188 proteins being more and 73 proteins being less abundant under LAHG conditions (supplemental Table S2).

Position Fig. 3

Metabolic pathways associated with high glucose and C/N-balance

One the level of individual proteins (Table I), the glycogen synthase GlgA (SII1393, SII0945) was one of the proteins, which were most strongly enriched under LAHG conditions. Proteins involved in glycogen synthesis were in general more abundant under LAHG conditions. Remarkably, due to the applied ultra-centrifugation conditions, all proteins involved in glycogen

turnover were predominantly found in the membrane fraction. Besides the glycogen synthase GlgA, the glycogen branching enzymes GlgB, the glucose activating ADP glucose pyrophosphorylase GlgC, as well as the phosphoglucomutase (SII0726, Slr1334), which provides glucose-1-phosphate for glycogen synthesis (40), were increased by factors of 4-13 in their relative abundance (Table I). In contrast, the abundance of the glycogen phosphorylase GlgP (SII1356), which is involved in glycogen degradation (41), was 4-fold decreased under LAHG conditions. Thus, these changes might indicate a shift towards glycogen synthesis and storage under LAHG conditions. However, in *Synechocystis* the activity of enzymes involved in glycogen synthesis is controlled by photosynthesis *via* the ferredoxin/thioredoxin system and glycogen is synthesized exclusively in the light (42, 43). In line with this and despite the apparent increase in enzyme abundance, we did not observe enrichment of glycogen granules in the EM micrographs of the dark-grown *Synechocystis* cells (Figure 1).

Although marked differences were also observed for proteins involved in the glucose energy metabolism, these differences were self-evidently smaller than the differences observed before, when LAHG cells were compared to *Synechocystis* cultures grown in complete absence of glucose (12). Several proteins involved in glucose metabolism did not pass the thresholds for quantification. However, as listed in the supplemental Table S1, the cellular content of several glycolytic enzymes was significantly increased under LAHG conditions, most likely due to the fact that glucose is the only energy source in the dark.

Furthermore, enzymes involved in the NADPH-producing steps of the oxidative pentose phosphate pathway were also significantly increased under LAHG conditions, likely reflecting the need for producing NADPH by this pathway in the dark. The general importance of the oxidative pentose phosphate pathway as a major route of sugar catabolism under heterotrophic growth conditions has been discussed before (44-46). In line with this, the cellular concentration of enzymes involved in the subsequent steps of this pathway remained unaltered when compared to photomixotrophically grown *Synechocystis* cells. Together, the observed changes of proteins involved in the glucose energy metabolism highlight the need of LAHG cells to utilize glucose as the solely available energy source. The increased need for energy production provided by glycolysis is *e.g.* further supported by the observation that also the relative abundance of enzymes of the TCA cycle and the upstream pyruvate dehydrogenase reaction were increased. Expression of glucose catabolite genes in *Synechocystis* is controlled by SigE and the PamA proteins (13), and, in line with this, the PamA protein (SII0985) was only detected under LAHG conditions. The final products of the glycolysis and the subsequent oxidative TCA cycle is 2-oxoglutarate (2-OG), as cyanobacteria do not contain a 2-OG dehydrogenase (47). 2-OG is subsequently used for ammonium fixation, resulting in formation of glutamate. Thus, the 2-OG

level directly links the TCA cycle (and the preceding glucose metabolism) to N-assimilation (47). 2-OG is a regulatory metabolite, coordinating the carbon and nitrogen metabolism in cyanobacteria (2). It appears to be likely that this signal transduces the inherent C/N imbalance, caused by the high glucose concentration in the culture media. Normally, 2-OG accumulates under N-starvation, resulting in activation of signaling proteins and in increased expression of proteins involved in N-fixation (48). Two bypasses, the 2-OGDH shunt (47) and the GABA shunt (49), have been suggested recently to close the TCA cycle and to counteract 2-OG accumulation. While the 2-OG dehydrogenase, an essential component of the 2-OGDH shunt, was not detected under photomixotrophic conditions, all enzymes involved in the GABA shunt were detected, and the N-acetylornithine aminotransferase (Slr1022) was significantly increased in LAHG cultures. Increased abundance of proteins involved in N-metabolism was observed although the growth conditions are not N-limiting, most likely due to the increased metabolic flow through the glycolysis and TCA cycle and increased production of the regulatory metabolite 2-OG. In fact, PamA functionally interacts with the PII sensor protein, a protein highly conserved in prokaryotes and plant chloroplasts (50), which was also significantly more abundant under LAHG conditions. PII appears to monitor the cellular C- as well as the N-status by binding 2-OG in a cooperative manner together with ATP, and furthermore, phosphorylation might additionally trigger the PII sensory function (51). As interaction of PamA with PII controls expression of genes involved in sugar catabolism (13), this observation nicely rationalizes the observed increased expression of proteins involved in glucose metabolism (compare above). However, PII integrates and simultaneously regulates the energy, carbon and nitrogen metabolism in cyanobacteria (52). PII interacts with the nitrogen regulator PipX (Ssl0105) as well as with the global nitrogen regulator NtcA (Sll1423) (40). NtcA was among the proteins most strongly increased in their abundance under LAHG conditions. Typically, PipX, which was detected exclusively under LAHG conditions, interacts with NtcA under N-limited growth conditions and controls expression of PII as well as of the glutamine synthetase (GlnN) to facilitate efficient acclimation of cyanobacteria to conditions of nitrogen limitation (53). While the growth conditions were not N-limiting *per se*, the N-starvation response was most likely activated in *Synechocystis* due to excess C supply (60 mM glucose in growth medium), possibly sensed as C/N imbalance. In line with an undesigned activation of N-starvation signaling, also the nitrate transporter subunits NrtA, C and D (Sll1450, Sll1452, Sll1453), as well as the urea transporter subunits UrtA and UrtE (Slr0447 and Sll0374) were more abundantly expressed in LAHG cells. An overload of the TCA cycle, potentially resulting in accumulation of 2-OG, is also indicated by the observation that LAHG cells produce and accumulate polyhydroxyalkanoates (PHA). Production of PHAs enables the cell to store excess acetyl-CoA (provided by glycolysis and PDH reaction).

The thus far best studied PHA poly-3-hydroxybutarate is produced in three consecutive steps from acetyl-coenzyme A, and the PHA-specific beta-ketothiolase (phaA), which catalyzes the first step in PHA synthesis (53), was identified only in LAHG cells.

Together, these observed changes in the abundance of enzymes involved in carbon or nitrogen metabolism reflect the metabolic situation that *Synechocystis* uses solely glucose as an energy source under LAHG conditions.

Position Table I

Proteins involved in photosynthetic and respiratory electron transport

Alterations of the TM structure are apparent during LAHG conditions. However, while the amount of intracellular membranes was severely reduced (Fig. 1), the changes in protein composition appeared to be minor. Among the protein complexes involved in electron transport in the TMs, photosystem II (PS II) showed the most prominent changes. On average, the 12 quantified subunits of the active PS II were reduced in the dark to ~50% of the level observed in photomixotrophically grown cells (Table I). However, while the amount of the large PS II core subunits (D1, D2, and CP47) was decreased, the amounts of the small subunits and of components relevant for the initial assembly (16, 54) of the protein complex (PsbE, PsbH, PsbY, Psb28, PAM68 and YCF48) remained rather constant and were not reduced during LAHG conditions. This could be perceived as a strategy to keep metabolic costs for protein synthesis and quenching of chlorophyll low, while maintaining the competence to assemble active PS II and adapt to photosynthetic growth conditions quickly. The differential regulation of assembly factors and large subunits was most apparent for the CP47 subunit. The abundance of this subunit was reduced by a factor of 5 under LAHG conditions, while the assembly factors Psb28 (SII1398) and PAM68 (SII01933) binding unassembled CP47 (55, 56) as well as the small PS II subunits PsbH and PsbY forming an assembly intermediate with CP47 remained at the levels of light adapted cells. In agreement with this, a similar correlation is observed for D1, PsbE and the assembly factors Ycf48 (57). Also, Psb29 (SII1414), a protein involved in early steps of PS II complex assembly (58), was exclusively found in LAHG cells. In contrast, the amount of Psb27, a component mainly involved in the PS II repair cycle (59-61) was decreased 2-fold in line with the dark growth conditions and the obvious absence of light-stress. In addition to the small subunits and assembly factors involved in the early steps of PS II assembly, proteins involved in chlorophyll supply to PS II, such as the POR and SII1694 (62), were identified exclusively under LAHG conditions or had also an increased abundance. Thus, while having an inactive PS II (15), *Synechocystis* cells appear to be prepared to rapidly assemble functional PS II complexes in

order to adopt a photoautotrophic lifestyle. However, as dark-adapted *Synechocystis* cells have no functional PS II and are thus light-sensitive, the potential risk of excitation energy transfer from the light-harvesting phycobilisomes to the photosystems is suppressed by a strong overexpression of the orange carotenoid protein (OCP, Slr1963), a protein, which is typically induced under high-light (63). Its abundance was increased in the LAHG membrane fractions by a factor of 11. An increased OCP accumulation in *Synechocystis* cells grown under heterotrophic vs. photoautotrophic conditions has been reported in a preceding proteome analysis (12), with an OCP accumulation which apparently was also not light-induced. An increased OCP abundance has also been observed in a *Synechocystis* mutant deficient in both photosystems (64), as well as in the *Synechocystis* PAL mutant, which is devoid of phycobilisomes (65). Combined, these observations indicate a general rise in abundance of OCP under condition of redox imbalance, which is additionally supported by an increased expression during acclimation to low CO₂ growth conditions (66).

The quantity of pigment binding subunits of the light-harvesting phycobilisomes, which are the most abundant proteins in cyanobacteria, had not significantly changed, in line with recent observations (15). However, the abundance of linker proteins L_R³³(Sll1580), L_R³⁰(Sll1579) and L_{RC}(sll1471) were dramatically reduced, indicating that the phycobilisomes might not be properly assembled. In line with this assumption, an increased fluorescence emission, due to uncoupled phycobilisome proteins, was recently observed in LAHG-grown *Synechocystis* cells upon phycobilisome excitation (15).

The quantitative analysis covered all large subunits of the active PS I complex (Table I). For none of these subunits a significant change was observed, which is in line with the recent observation that LAHG cells have fully functional PS I centers (15). Only the PS I assembly factor BtpA (Sll0634) (67) was increased 18-fold under LAHG conditions, while the content of other quantified PS I assembly factors, such as Ycf3 (67) or Ycf37 (68), was not altered. Similarly to PS I, also no significant changes in the amount of cytochrome *b₆f* complex, NADH dehydrogenase or ATP synthase subunits, all well covered in our analysis, were detected.

Together, while *Synechocystis* cells cannot use photosynthetic electron transfer reactions under LAHG conditions, we only observed significant changes of proteins somehow linked to PS II, whereas the relative abundance of subunits of other protein complexes involved in energy transfer has not changed. This is in line with former studies, showing decreased PS II activity and full PS I activity in dark-adapted *Synechocystis* cells (15).

Translation and membrane translocation

Ribosomal proteins were significantly less abundant under LAHG conditions. From 50 ribosomal proteins quantified in the analysis, 24 subunits (19 of these in the membrane fraction) showed less than 50 % of the abundance detected in cells cultivated under photomixotrophic conditions. This might reflect the significantly reduced growth rate of *Synechocystis* cells grown under LAHG conditions (10). In bacteria and chloroplasts, unfolded proteins are translocated across a membrane (cytoplasmic or thylakoid membrane) via the Sec pathway (69, 70), whereas folded proteins are translocated via the Tat pathway (71). In *Synechocystis*, both protein translocation pathways appear to coexist and most likely mediate protein translocation across both, the CM and the TM (72). The amount of the Sec translocase subunits SecA (SII0616), SecY (SII1814) and SecE (Ssl3335) was significantly reduced under LAHG conditions. Furthermore, besides the Sec translocase, the YidC protein (named Alb3 in chloroplasts) mediates integration of membrane integral proteins in bacteria and TMs (73). As observed for Sec translocon subunits, also the relative amount of YidC was reduced in LAHG cells. As these two proteins are likely present in both, the CM and TM, in cyanobacteria, the reduced cellular content might simply be caused by the observed degradation of the internal TM system. However, no changes of subunits involved in protein translocation via the Tat pathway were detected in this study. While an active Tat pathway has been detected in the *Synechocystis* CM (74), and potentially operates in both, CM and TM (75), our observation that the cellular level of Tat subunits is not altered in LAHG cells might indicate a predominant location of the Tat pathway in the CM.

Stress related proteins

When *Synechocystis* cells are grown under LAHG conditions, only respiratory electron transfer reactions are utilized to generate an electrochemical gradient and to subsequently produce ATP. However, reactive by-products of this oxygen-consuming process are reactive oxygen species (ROS), such as superoxide anion radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), or hydroxyl radicals (OH^\cdot). The cellular concentration of the superoxide dismutase SodB (Slr1515) has recently been reported to increase during LAHG (38, 76). Here we found that several oxidative stress related proteins, such as superoxide dismutase (Slr1516), catalase (SII1987), thioredoxin (Slr0623), peroxiredoxin (SII0755) and glutathione peroxidase-like NADPH peroxidase (gpx2, Slr1992) rose in their abundance under LAHG conditions in the soluble or membrane fraction, respectively (Table I). Also the heat shock protein HtpG, which is important for acclimation to oxidative stress in cyanobacteria (77), was found to be upregulated, in line with previous observations (76). Furthermore, several other chaperones involved in a general stress response, were more abundant in LAHG cells (Table I). This again reflects that the metabolic changes associated with

LAHG conditions imply cellular stress for the cyanobacterial cells. While the cellular concentration of the Hsp60 proteins GroEL-1 and GroEL-2 did not change when proteomes of cells grown under photomixotrophic vs. photoautotrophic conditions were compared (12), increased abundances of both proteins in dark-adapted cells have also been described in previous studies (38, 76). Noteworthy, while DnaK2 (SII0170) is the major Hsp70 protein in *Synechocystis* (19, 78), this protein was not significantly overrepresented in LAHG cells, whereas DnaK1, a non-essential Hsp70 protein with a still enigmatic function (19), was found to be severely overrepresented. Furthermore, the thus far completely uncharacterized DnaK-like chaperone Slr0086 was one of the most significantly down-regulated proteins identified in our proteomic screen. This might indicate a specific function of this protein in the light.

Proteins suggested being involved in TM biogenesis

In the past, some proteins have been suggested to be of special importance for the biogenesis of TMs in cyanobacteria. These proteins include the *vesicle inducing protein in plastids 1* (Vipp1, SII0617), the DnaK chaperone DnaK3 (SII1933), the YidC/Alb3 protein as well as the prohibitin-like protein Slr1768 (16-19). Noteworthy, the exact mode of action of any of these proteins still is completely mysterious. The proteins Vipp1 and DnaK3 did not pass the quality control, and thus we did not obtain reliable information on their cellular content. In case of the YidC/Alb3 protein we observed a reduced cellular level in LAHG cells, as described above. However, reduction of the *Synechocystis* TM system upon depletion of YidC/Alb3 (74) was caused indirectly, as insertion of proteins into the TM was generally impaired in the generated mutant strain. Thus, the function of YidC/Alb3 is only indirectly linked to TM biogenesis. In contrast to the gene encoding YidC, the *slr1768* gene was completely deleted in *Synechocystis* and the mutant strain displayed defects in TM formation. Because of this it was concluded that the prohibitin-like protein has an important role in TM formation and/or maintenance (18). In the present analysis we indeed found that the membrane attached Slr1768 protein was significantly more abundant in the membrane fraction under LAHG conditions, but below the detection limit in the light adapted cultures. While thylakoid biogenesis certainly depends on multiple factors, it appears as if the dark-adapted *Synechocystis* cells store Slr1768 to immediately generate TMs in the light.

The Synechocystis lipidome under LAHG conditions

In addition to the proteome analysis, we also analyzed changes in the lipidome of LAHG cells. From three independent light-grown cultures and four independent LAHG-grown cultures lipids were extracted as described in the methods section. Due to the lower complexity of the lipidome in contrast to the *Synechocystis* proteome, a targeted approach, using selected reaction

monitoring, was performed. MGDG and DGDG were analyzed in a positive mode, SQDG and PG in a negative mode, as described (37).

Position Fig. 4

After addition of lipid standards, the absolute concentrations of the lipid classes were quantified (Fig. 5A). In comparison to photoautotrophic grown cells under photomixotrophically conditions, the proportion of MGDG (72 %) was significantly increased whereas the amounts of DGDG (12 %) and PG (4 %) were reduced (79, 80). The SQDG content (11%) was not affected by the mixotrophic growth conditions. In LAHG cells, the amount of SQDG was increased as compared to cells grown under photomixotrophic conditions (Fig. 5A), whereas the proportions of MGDG, DGDG and PG remained constant within the experimental error. This is perfectly in line with the observation that the cellular content of the SQDG biosynthesis protein SqdB (Slr1020) was upregulated in the dark (Table I). As the TMs were severely reduced in LAHG cells, the impact of CM lipids on the totally detected lipid composition was increased. However, in recent analyzes of cyanobacterial membrane lipids, no significant differences have been observed between these two internal membrane systems (81). The major constituent of cyanobacterial membranes (as well as of chloroplast TMs) is MGDG, a non-bilayer forming lipid, which tends to form inverse hexagonal lipid phases, rather than lamellar structures (82). TMs have been shown to only exist due to the presence of membrane integral proteins, which together with the lipids form a membranous structure (83). Thus, when the amount of membrane integrated proteins, such as the photosystems, is reduced, there is a need for bilayer stabilization, e.g. by increasing the content of bilayer forming lipids. SQDG is a bilayer forming lipid, and thus the increased relative abundance of SQDG might simply reflect the need for bilayer stabilizing membrane lipids.

For a more detailed analysis, the individual fatty acid species of all lipid classes were quantified and a general shift towards more saturated fatty acids was observed (Fig. 5B-E). The fatty acids of MGDG and DGDG lipids were shifted from unsaturated 34:4 and 34:3 species toward more saturated 34:2 and 34:1 ones in the dark (Fig. 5B+C). In case of SQDG, a shift from 34:2 to 34:1 and 34:0 (Fig. 5D) was observed, and for PG a shift from 34:3 to 34:1 and 34:0 was observed under LAHG conditions (Fig. 5E). In total, the cyanobacterial membranes appear to become less fluid, as more saturated lipid species were more abundant under LAHG conditions. However, increased lipid packing in the acyl-chain region again stabilizes the lipid bilayer structure, which appears to be advantageous under LAHG conditions.

Together, the changed lipid composition of LAHG cells might be a consequence of the reduction of TM proteins and protein complexes, which normally stabilize the membranous structure.

Position Fig. 5

Final Remarks

Significant effort has been dedicated to characterization of *Synechocystis* cells cultivated under LAHG conditions, which are characterized by high glucose concentrations in the media and besides short (15 min) illumination periods per day the absence of light during the cultivation. These - for photosynthetic organisms – highly artificial conditions result in severe changes in the cellular membrane structure. While in the past proteome studies concentrated on the carbon metabolism, cellular membranes were in the focus of proteome and lipidome analysis in this work. Next to a significant influence on proteins involved in C/N-balance and ROS homeostasis our analysis confirmed that despite reduction of cellular TM content changes to the photosynthetic machinery are mainly limited to a reduction of PS II complexes (15).

As the TM integrated proteins stabilize the integrity of the TMs and TM structures only exist due to a delicate interplay of proteins and lipids (82, 83), the rearrangement of the TM compositions eventually results in membrane destabilization. Such destabilization might be compensated by the cells via moderate alterations of the membrane lipid composition. Indeed, lipids with increased bilayer stabilizing properties are found under LAHG conditions. While several proteins have been suggested in the past to be involved in biogenesis of TMs, we expected to see an impact of the cellular content of these proteins when *Synechocystis* cells were grown in the dark. However, solely the prohibitin-like protein Slr1768 is more prominently expressed under LAHG conditions. Although the function of this protein is still unresolved, our observation together with the results presented in (18) strongly indicate a prominent role of this protein in TM assembly in *Synechocystis*.

Acknowledgements

We thank Kai Cormann for the helpful discussion of PS II assembly. The data deposition to the ProteomeXchange Consortium was supported by the PRIDE Team as well as Martin Eisenacher and Gerhard Meyer from the HUPO PSI - Proteome Informatics Working Group. We also appreciate the excellent technical assistance of R. Oworah-Nkruma.

Author contributions:

D.S. and S.R.: designed research and analyzed data; T.S., N.P. and U.K. performed experiments; N.P., T.S., S.R. and D.S. wrote the paper. M.R. provided the infrastructure and contributed to the background and discussion parts.

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M., and Stanier, R. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1-61
2. Stanier, R. Y., and Cohen-Bazire, G. (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 31, 225-274
3. Murata, N., and Omata, T. (1988) Isolation of cyanobacterial plasma membranes. *Meth. Enzymol.* 167, 245-251
4. Schultze, M., Forberich, B., Rexroth, S., Dyczmons, N. G., Rögner, M., and Appel, J. (2009) Localization of cytochrome *b₆f* complexes implies an incomplete respiratory chain in cytoplasmic membranes of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 1479-1485
5. Mullineaux, C. W. (2014) Electron transport and light-harvesting switches in cyanobacteria. *Front. Plant Sci.* 5, 7
6. Nelson, N. (2011) Photosystems and global effects of oxygenic photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 856-863
7. Rae, B. D., Long, B. M., Whitehead, L. F., Forster, B., Badger, M. R., and Price, G. D. (2013) Cyanobacterial carboxysomes: microcompartments that facilitate CO₂ fixation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 23, 300-307
8. Rippka, R. (1972) Photoheterotrophy and chemoheterotrophy among unicellular blue-green algae. *Arch. Microbiol.* 87, 93-98
9. Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol Rev* 35, 171-205
10. Anderson, S. L., and 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
11. Knowles, V. L., and Plaxton, W. C. (2003) From genome to enzyme: analysis of key glycolytic and oxidative pentose-phosphate pathway enzymes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 44, 758-763
12. Kurian, D., Jansen, T., and Mäenpää, P. (2006) Proteomic analysis of heterotrophy in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proteomics* 6, 1483-1494
13. Osanai, T., Kanesaki, Y., Nakano, T., Takahashi, H., Asayama, M., Shirai, M., Kanehisa, M., Suzuki, I., Murata, N., and Tanaka, K. (2005) Positive regulation of sugar catabolic pathways

in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the group 2 sigma factor sigE. *J. Biol. Chem.* 280, 30653-30659

14. Singh, A. K., and Sherman, L. A. (2005) Pleiotropic effect of a histidine kinase on carbohydrate metabolism in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and its requirement for heterotrophic growth. *J. Bacteriol.* 187, 2368-2376

15. Barthel, S., Bernat, G., Seidel, T., Rupprecht, E., Kahmann, U., and Schneider, D. (2013) Thylakoid membrane maturation and PSII activation are linked in greening *Synechocystis* sp. PCC 6803 cells. *Plant Physiol.* 163, 1037-1046

16. Nickelsen, J., and Rengstl, B. (2013) Photosystem II assembly: from cyanobacteria to plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 609-635

17. Fuhrmann, E., Bultema, J. B., Kahmann, U., Rupprecht, E., Boekema, E. J., and Schneider, D. (2009) The vesicle-inducing protein 1 from *Synechocystis* sp. PCC 6803 organizes into diverse higher-ordered ring structures. *Mol. Biol. Cell* 20, 4620-4628

18. Bryan, S. J., Burroughs, N. J., Evered, C., Sacharz, J., Nenninger, A., Mullineaux, C. W., and Spence, E. M. (2011) Loss of the SPHF homologue Slr1768 leads to a catastrophic failure in the maintenance of thylakoid membranes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS ONE* 6, e19625

19. Rupprecht, E., Duppre, E., and Schneider, D. (2010) Similarities and singularities of three DnaK proteins from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 51, 1210-1218

20. Laczko-Dobos, H., Ughy, B., Toth, S. Z., Komenda, J., Zsiros, O., Domonkos, I., Parducz, A., Bogos, B., Komura, M., Itoh, S., and Gombos, Z. (2008) Role of phosphatidylglycerol in the function and assembly of Photosystem II reaction center, studied in a *cdsA*-inactivated PAL mutant strain of *Synechocystis* sp. PCC6803 that lacks phycobilisomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 1184-1194

21. Sobotka, R., Duhring, U., Komenda, J., Peter, E., Gardian, Z., Tichy, M., Grimm, B., and Wilde, A. (2008) Importance of the cyanobacterial Gun4 protein for chlorophyll metabolism and assembly of photosynthetic complexes. *J. Biol. Chem.* 283, 25794-25802

22. Gathmann, S., Rupprecht, E., Kahmann, U., and Schneider, D. (2008) A conserved structure and function of the YidC homologous protein Slr1471 from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1090-1094

23. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858

24. Rexroth, S., Poetsch, A., Rögner, M., Hamann, A., Werner, A., Osiewacz, H. D., Schäfer, E. R., Seelert, H., and Dencher, N. A. (2012) Reactive oxygen species target specific tryptophan site in the mitochondrial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 381-387
25. Vizcaino, J. A., Cote, R. G., Csordas, A., Dianes, J. A., Fabregat, A., Foster, J. M., Griss, J., Alpi, E., Birim, M., Contell, J., O'Kelly, G., Schoenegger, A., Ovelleiro, D., Perez-Riverol, Y., Reisinger, F., Rios, D., Wang, R., and Hermjakob, H. (2013) The PRoteomics IDentifications (PRIDE) database and associated tools: status in 2013. *Nucleic Acids Res.* 41, D1063-1069
26. Colaert, N., Barsnes, H., Vaudel, M., Helsens, K., Timmerman, E., Sickmann, A., Gevaert, K., and Martens, L. (2011) Thermo-msf-parser: an open source Java library to parse and visualize Thermo Proteome Discoverer msf files. *J. Proteome Res.* 10, 3840-3843
27. Eng, J. K., McCormack, A. L., and Yates, J. R., 3rd (1994) An approach to correlate tandem mass-spectral data of peptides with amino-acid-sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5, 976-989
28. Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., and 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
29. Kaneko, T., Tanaka, A., Sato, S., Kotani, H., Sazuka, T., Miyajima, N., Sugiura, M., and Tabata, S. (1995) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. I. Sequence features in the 1 Mb region from map positions 64% to 92% of the genome. *DNA Res.* 2, 153-166, 191-158
30. Kall, L., Canterbury, J. D., Weston, J., Noble, W. S., and MacCoss, M. J. (2007) Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat. Methods* 4, 923-925
31. Kall, L., Storey, J. D., MacCoss, M. J., and Noble, W. S. (2008) Assigning significance to peptides identified by tandem mass spectrometry using decoy databases. *J. Proteome Res.* 7, 29-34
32. Liu, H., Sadygov, R. G., and Yates, J. R., 3rd (2004) A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal. Chem.* 76, 4193-4201
33. Usaitė, R., Wohlschlegel, J., Venable, J. D., Park, S. K., Nielsen, J., Olsson, L., and Yates, J. R., 3rd (2008) Characterization of global yeast quantitative proteome data generated

from the wild-type and glucose repression *Saccharomyces cerevisiae* strains: the comparison of two quantitative methods. *J. Proteome Res.* 7, 266-275

34. Zybilov, B., Mosley, A. L., Sardi, M. E., Coleman, M. K., Florens, L., and Washburn, M. P. (2006) Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteome Res.* 5, 2339-2347

35. Neilson, K. A., Ali, N. A., Muralidharan, S., Mirzaei, M., Mariani, M., Assadourian, G., Lee, A., van Sluyter, S. C., and Haynes, P. A. (2011) Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics* 11, 535-553

36. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917

37. Welti, R., Wang, X., and Williams, T. D. (2003) Electrospray ionization tandem mass spectrometry scan modes for plant chloroplast lipids. *Anal. Biochem.* 314, 149-152

38. Choi, J. S., Kim, D. S., Lee, J., Kim, S. J., Kim, S. I., Kim, Y. H., Hong, J., Yoo, J. S., Suh, K. H., and Park, Y. M. (2000) Proteome analysis of light-induced proteins in *Synechocystis* sp. PCC 6803: identification of proteins separated by 2D-PAGE using N-terminal sequencing and MALDI-TOF MS. *Mol. Cells* 10, 705-711

39. Xie, F., Liu, T., Qian, W. J., Petyuk, V. A., and Smith, R. D. (2011) Liquid chromatography-mass spectrometry-based quantitative proteomics. *J. Biol. Chem.* 286, 25443-25449

40. Osanai, T., Azuma, M., and Tanaka, K. (2007) Sugar catabolism regulated by light- and nitrogen-status in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6, 508-514

41. Fu, J., and Xu, X. (2006) The functional divergence of two glgP homologues in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 260, 201-209

42. Gründel, M., Scheunemann, R., Lockau, W., and Zilliges, Y. (2012) Impaired glycogen synthesis causes metabolic overflow reactions and affects stress responses in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* 158, 3032-3043

43. Lindahl, M., and Florencio, F. J. (2003) Thioredoxin-linked processes in cyanobacteria are as numerous as in chloroplasts, but targets are different. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 16107-16112

44. Lex, M., and Carr, N. G. (1974) The metabolism of glucose by heterocysts and vegetative cells of *Anabaena cylindrica*. *Arch. Microbiol.* 101, 161-167

45. Pelroy, R. A., Rippka, R., and Stanier, R. Y. (1972) Metabolism of glucose by unicellular blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.* 87, 303-322

46. Yang, C., Hua, Q., and Shimizu, K. (2002) Integration of the information from gene expression and metabolic fluxes for the analysis of the regulatory mechanisms in *Synechocystis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 813-822
47. Zhang, S., and Bryant, D. A. (2011) The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria. *Science* 334, 1551-1553
48. Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C., and Florencio, F. J. (2001) Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels. *J. Biol. Chem.* 276, 38320-38328
49. Knoop, H., Grundel, M., Zilliges, Y., Lehmann, R., Hoffmann, S., Lockau, W., and Steuer, R. (2013) Flux balance analysis of cyanobacterial metabolism: the metabolic network of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS Comput. Biol.* 9, e1003081
50. Chellamuthu, V. R., Alva, V., and Forchhammer, K. (2013) From cyanobacteria to plants: conservation of PII functions during plastid evolution. *Planta* 237, 451-462
51. Ninfa, A. J., and Jiang, P. (2005) PII signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 168-173
52. Osanai, T., and Tanaka, K. (2007) Keeping in touch with PII: PII-interacting proteins in unicellular cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 48, 908-914
53. Taroncher-Oldenburg, G., Nishina, K., and Stephanopoulos, G. (2000) Identification and analysis of the polyhydroxyalkanoate-specific beta-ketothiolase and acetoacetyl coenzyme A reductase genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4440-4448
54. Komenda, J., Sobotka, R., and Nixon, P. J. (2012) Assembling and maintaining the Photosystem II complex in chloroplasts and cyanobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 245-251
55. Mabbitt, P. D., Wilbanks, S. M., and Eaton-Rye, J. J. (2014) Structure and function of the hydrophilic Photosystem II assembly proteins: Psb27, Psb28 and Ycf48. *Plant Physiol. Biochem.* 81C, 96-107
56. Sakata, S., Mizusawa, N., Kubota-Kawai, H., Sakurai, I., and Wada, H. (2013) Psb28 is involved in recovery of photosystem II at high temperature in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 50-59
57. Komenda, J., Nickelsen, J., Tichy, M., Prasil, O., Eichacker, L. A., and Nixon, P. J. (2008) The cyanobacterial homologue of HCF136/YCF48 is a component of an early photosystem II assembly complex and is important for both the efficient assembly and repair of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 283, 22390-22399
58. Keren, N., Ohkawa, H., Welsh, E. A., Liberton, M., and Pakrasi, H. B. (2005) Psb29, a conserved 22-kD protein, functions in the biogenesis of Photosystem II complexes in *Synechocystis* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 2768-2781

59. Komenda, J., Knoppova, J., Kopečna, J., Sobotka, R., Halada, P., Yu, J., Nickelsen, J., Boehm, M., and Nixon, P. J. (2012) The Psb27 assembly factor binds to the CP43 complex of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* 158, 476-486
60. Nowaczyk, M. M., Hebel, R., Schlodder, E., Meyer, H. E., Warscheid, B., and Rögner, M. (2006) Psb27, a cyanobacterial lipoprotein, is involved in the repair cycle of photosystem II. *Plant Cell* 18, 3121-3131
61. Nowaczyk, M. M., Sander, J., Grasse, N., Cormann, K. U., Rexroth, D., Bernat, G., and Rögner, M. (2010) Dynamics of the cyanobacterial photosynthetic network: communication and modification of membrane protein complexes. *Eur. J. Cell Biol.* 89, 974-982
62. He, Q., and Vermaas, W. (1999) Genetic deletion of proteins resembling Type IV pilins in *Synechocystis* sp. PCC 6803: their role in binding or transfer of newly synthesized chlorophyll. *Plant Mol. Biol.* 39, 1175-1188
63. Boulay, C., Abasova, L., Six, C., Vass, I., and Kirilovsky, D. (2008) Occurrence and function of the orange carotenoid protein in photoprotective mechanisms in various cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 1344-1354
64. Rakhimberdieva, M. G., Kuzminov, F. I., Elanskaya, I. V., and Karapetyan, N. V. (2011) *Synechocystis* sp. PCC 6803 mutant lacking both photosystems exhibits strong carotenoid-induced quenching of phycobilisome fluorescence. *FEBS Lett.* 585, 585-589
65. Kwon, J. H., Bernat, G., Wagner, H., Rögner, M., and Rexroth, S. (2013) Reduced light-harvesting antenna: Consequences on cyanobacterial metabolism and photosynthetic productivity. *Algal Research* 2, 188-195
66. Battchikova, N., Vainonen, J. P., Vorontsova, N., Keranen, M., Carmel, D., and Aro, E. M. (2010) Dynamic changes in the proteome of *Synechocystis* 6803 in response to CO₂ limitation revealed by quantitative proteomics. *J. Proteome Res.* 9, 5896-5912
67. Schwabe, T. M., Gloddek, K., Schluesener, D., and Kruij, J. (2003) Purification of recombinant BtpA and Ycf3, proteins involved in membrane protein biogenesis in *Synechocystis* PCC 6803. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 786, 45-59
68. Wilde, A., Lunser, K., Ossenbuhl, F., Nickelsen, J., and Borner, T. (2001) Characterization of the cyanobacterial ycf37: mutation decreases the photosystem I content. *Biochem. J.* 357, 211-216
69. du Plessis, D. J., Nouwen, N., and Driessen, A. J. (2011) The Sec translocase. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 851-865
70. Veenendaal, A. K., van der Does, C., and Driessen, A. J. (2004) The protein-conducting channel SecYEG. *Biochim. Biophys. Acta* 1694, 81-95

71. Lee, P. A., Tullman-Ercek, D., and Georgiou, G. (2006) The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 373-395
72. Schneider, D. (2014) Protein targeting, transport and translocation in cyanobacteria. In: Flores, E., and Herrero, A., eds. *The cell biology of cyanobacteria*, Caister Academic Press
73. Wang, P., and Dalbey, R. E. (2011) Inserting membrane proteins: the YidC/Oxa1/Alb3 machinery in bacteria, mitochondria, and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 866-875
74. Spence, E., Sarcina, M., Ray, N., Moller, S. G., Mullineaux, C. W., and Robinson, C. (2003) Membrane-specific targeting of green fluorescent protein by the Tat pathway in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Mol. Microbiol.* 48, 1481-1489
75. Aldridge, C., Spence, E., Kirkilionis, M. A., Frigerio, L., and Robinson, C. (2008) Tat-dependent targeting of Rieske iron-sulphur proteins to both the plasma and thylakoid membranes in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Mol. Microbiol.* 70, 140-150
76. Tabei, Y., Okada, K., Makita, N., and Tsuzuki, M. (2009) Light-induced gene expression of fructose 1,6-bisphosphate aldolase during heterotrophic growth in a cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS J.* 276, 187-198
77. Hossain, M. M., and Nakamoto, H. (2003) Role for the cyanobacterial HtpG in protection from oxidative stress. *Curr. Microbiol.* 46, 70-76
78. Rupprecht, E., Gathmann, S., Fuhrmann, E., and Schneider, D. (2007) Three different DnaK proteins are functionally expressed in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* 153, 1828-1841
79. Awai, K., Watanabe, H., Benning, C., and Nishida, I. (2007) Digalactosyldiacylglycerol is required for better photosynthetic growth of *Synechocystis* sp. PCC6803 under phosphate limitation. *Plant Cell Physiol.* 48, 1517-1523
80. Murata, N., Wada, H., and Gombos, Z. (1992) Modes of fatty-acid desaturation in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 33, 933-941
81. Gombos, Z., Wada, H., Varkonyi, Z., Los, D. A., and Murata, N. (1996) Characterization of the Fad12 mutant of *Synechocystis* that is defective in delta 12 acyl-lipid desaturase activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1299, 117-123
82. Yuzawa, Y., Nishihara, H., Haraguchi, T., Masuda, S., Shimojima, M., Shimoyama, A., Yuasa, H., Okada, N., and Ohta, H. (2012) Phylogeny of galactolipid synthase homologs together with their enzymatic analyses revealed a possible origin and divergence time for photosynthetic membrane biogenesis. *DNA Res.* 19, 91-102
83. Lee, A. G. (2000) Membrane lipids: it's only a phase. *Curr. Biol.* 10, R377-380
84. Stanier, G. (1988) Fine structure of cyanobacteria. *Meth. Enzymol.* 167, 157-172

Figure legends

FIG. 1: Electron micrographs of *Synechocystis* cells grown under mixotrophic conditions (A) or LAHG conditions (B) respectively. In mixotrophically grown cells (A), the thylakoid membranes are organized in layers at the periphery of the cell. In contrast, in LAHG grown cells (B) remnants of thylakoid membranes appear as cloudy structures within the cell. The white area visible in (A) represents a hole, most likely caused by volatilization of polyphosphate granules under the electron beam (84). Due to their characteristic structure, the large inclusions visible in (B) were identified as cyanophycin granules (84).

FIG. 2. Proteome analysis of *Synechocystis* cells grown under LAHG and mixotrophic conditions. A) Workflow of the proteome analysis. After cultivation (i) and breakage by glass beads, membrane and soluble protein fraction are obtained by ultracentrifugation (ii). For analysis, proteins are concentrated and separated from lipids and particles by in-gel focusing (iii). Samples are loaded on a SDS gel. Electrophoresis is stopped when migration front reaches interface between stacking and separating gel. The focusing process is followed by a pre-stained protein marker. For each sample, all proteins are focused as a single band at the stacking/separating gel interface (supplemental Fig. S1). These bands are subjected to a tryptic in-gel digest and LC-MS/MS analysis. B) Number of proteins identified for both culture conditions. C) Mass, isoelectric point and hydrophobicity of the proteins identified during the analysis and all proteins annotated in the *Synechocystis* genome.

FIG. 3. Spectral counting for relative quantification. A) Average of the observed coefficients of variation resulting for the quantification versus the number of identified peptides per protein. B) and C) Volcano plot of all quantified proteins in the membrane fraction B) and the soluble fraction C). The negative log of the p-value from a t-test was plotted against the log₂ of the fold change between mixotrophic and LAHG samples. Light grey points represent proteins with a p-value less than 0.05 and less than 2-fold change in abundance. Dark grey points represent proteins with statistical or biological significance and black points represent proteins with biological and statistical significance.

FIG. 4. Lipidome analysis and overview about lipid classes in mixotrophic and LAHG *Synechocystis* cells. Workflow of the lipid analysis. After cultivation cells were broken by glass beads and each biological replicate was divided into two technical replicates. From each technical replicate lipids were extracted using chloroform/methanol. Lipid extracts were dissolved in chloroform/methanol/sodium acetate for MGDG and DGDG analysis and in chloroform/methanol/ammonium acetate for SQDG and PG analysis. Lipids were analyzed using SRM.

FIG. 5. Absolute amount of lipid classes (A) and relative amount of molecular lipid species of all four lipid classes (B-E) in mixotrophic and LAHG cultures. Prominent lipid species of MGDG (B), DGDG (C), SQDG (D) and PG (E) quantified by SRM. Dark grey bars: mixotrophic cultures, light grey bars: LAHG cultures. Error bars display the standard deviation based on three (mixotrophic) or four (LAHG) biological replicates.

TABLES

TABLE I

Selected proteins quantified in the membrane fractions of mixotrophic and LAHG cultures (see supplemental Table S2 for complete list of all quantified proteins).

Metabolic pathways associated with high glucose and C/N-balance					
DBID^{a)}	Name	Mixotrophic %^{b)}	LAHG %^{b)}		Fold change^{c)}
slI1393	Glycogen starch synthase GlgA	n.d.	0.079 ± 0.019	±	---
slI0945	Glycogen synthase GlgA	0.002 ± 0.004	0.028 ± 0.009	±	13.4
slI0158	1.4-alpha-glucan branching enzyme glgB	0.009 ± 0.004	0.073 ± 0.026		8.1
slr1176	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	0.015 ± 0.007	0.060 ± 0.031	±	4.0
slI0726	Phosphoglucomutase	0.006 ± 0.010	0.053 ± 0.016	±	9.3
slr1334	Phosphoglucomutase/phosphomannomutase	0.001 ± 0.002	0.004 ± 0.007	±	4.1
slI1356	Glycogen phosphorylase	0.109 ± 0.020	0.024 ± 0.015	±	0.2
ssl0707	Nitrogen regulatory protein P-II glnB	0.378 ± 0.171	0.756 ± 0.150	±	2.0
slI1423	Global nitrogen regulator NtcA	n.d.	0.025 ± 0.013	±	---
slI1450	Nitrate/nitrite transport system NrtA	0.093 ± 0.014	0.181 ± 0.010	±	2.0
slI1452	Nitrate/nitrite transport system NrtC	n.d.	0.023 ± 0.009	±	---
slI1453	Nitrate/nitrite transport system NrtD	n.d.	0.049 ± 0.021	±	---
slr0447	ABC-type urea transport system UrtA	0.299 ± 0.061	0.603 ± 0.029	±	2.0
slI0374	Urea transport system UrtE	n.d.	0.023 ± 4.94E-05	±	---
slr1993	PHA-specific beta-ketothiolase phaA	n.d.	0.016 ± 0.002	±	---
Proteins involved in photosynthetic and respiratory electron transport					
DBID^{a)}	Name	Mixotrophic %^{b)}	LAHG %^{b)}		Fold change
slI1867	Photosystem II D1 protein PsbA	0.201 ± 0.094	0.060 ± 0.001	±	0.3
slr0906	Photosystem II core light harvesting protein PsbB	0.881 ± 0.113	0.140 ± 0.018	±	0.2
slI0851	Photosystem II CP43 protein PsbC	0.290 ± 0.046	0.194 ± 0.002	±	0.7
slI0849	Photosystem II reaction center D2 protein PsbD	0.182 ± 0.025	0.093 ± 0.011	±	0.5
ssr3451	Cytochrome b559 alpha subunit PsbE	0.352 ± 0.142	0.239 ± 0.058	±	0.7

Publikation

ssl2598	Photosystem II PsbH protein PsbH	0.252 ± 0.025	0.241 ± 0.014	± 1.0
smr0007	Photosystem II PsbL protein PsbL	0.305 ± 0.013	0.125 ± 0.047	± 0.4
sll1418	Photosystem II oxygen-evolving complex protein PsbP	0.013 ± 0.001	0.006 ± 0.012	± 0.5
sll1194	Photosystem II 12 kDa extrinsic protein PsbU	0.094 ± 0.081	0.029 ± 0.012	± 0.3
sll0258	Cytochrome c550 PsbV	0.316 ± 0.094	0.035 ± 0.007	± 0.1
sml0007	Photosystem II protein Y PsbY	0.262 ± 0.045	0.177 ± 0.057	± 0.7
slr2034	Ycf48	0.030 ± 0.010	0.030 ± 0.006	± 1.0
sll1398	Photosystem II reaction center 13 kDa protein Psb28	0.072 ± 0.006	0.085 ± 0.007	± 1.2
slr2048	PratA	0.005 ± 0.011	0.003 ± 0.004	± 0.6
sll0933	PAM68	0.037 ± 0.006	0.043 ± 0.006	± 1.2
slr1645	Photosystem II 11 kD protein Psb27	0.271 ± 0.093	0.126 ± 0.009	± 0.5
sll1414	Psb29/Thzf1	n.d.	0.027 ± 0.004	± ---
slr0506	Light-dependent NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase POR	n.d.	0.013 ± 0.014	± ---
sll1694	Protein involved in chlorophyll transport	0.052 ± 0.018	0.135 ± 0.045	± 2.6
slr1963	Orange carotenoid protein	0.025 ± 0.001	0.293 ± 0.051	± 11.6
slr2067	Allophycocyanin alpha subunit apcA	4.088 ± 1.132	7.023 ± 0.653	± 1.7
slr1986	Allophycocyanin beta subunit apcB	4.971 ± 0.502	6.129 ± 0.551	± 1.2
sll1578	Phycocyanin alpha subunit cpcA	9.465 ± 1.987	8.867 ± 0.580	± 0.9
sll1577	Phycocyanin beta subunit cpcB	17.432 ± 3.049	17.216 ± 0.443	± 1.0
sll1580	Phycobilisome rod linker polypeptide cpcC1 LR ³³	1.200 ± 0.382	0.385 ± 0.215	± 0.3
sll1579	Phycobilisome rod linker polypeptide cpcC2 LR ³⁰	0.422 ± 0.092	0.143 ± 0.031	± 0.3
sll1471	Phycobilisome rod-core linker polypeptide cpcG2 L _{RC}	0.235 ± 0.012	0.110 ± 0.040	± 0.5
slr1834	P700 apoprotein subunit Ia PsaA	0.140 ± 0.015	0.253 ± 0.021	± 1.8
slr1835	P700 apoprotein subunit Ib PsaB	0.158 ± 0.017	0.270 ± 0.041	± 1.7
ssl0563	Photosystem I subunit VII PsaC	0.249 ± 0.065	0.289 ± 0.026	± 1.2

slr0737	Photosystem I subunit II PsaD	0.590 ± 0.253	0.757 ± 0.092	± 1.3
slI0819	Photosystem I subunit III PsaF	1.252 ± 0.064	1.780 ± 0.062	± 1.4
slI0629	Photosystem I subunit X PsaK	0.105 ± 0.023	0.121 ± 0.016	± 1.2
slr1655	Photosystem I subunit XI PsaL	0.437 ± 0.079	0.379 ± 0.019	± 0.9
slI0634	Photosystem I biogenesis protein BtpA	0.001 ± 0.003	0.027 ± 0.007	± 18.4
slr0171	Photosystem I assembly related protein Ycf37	0.030 ± 0.009	0.029 ± 0.009	± 1.0

Membrane translocation				
DBID^{a)}	Name	Mixotrophic %^{b)}	LAHG %^{b)}	Fold change
slI0616	Preprotein translocase SecA	0.013 ± 0.004	0.003 ± 0.003	± 0.3
slI1814	Preprotein translocase SecY	0.022 ± 0.006	0.003 ± 0.005	± 0.1
ssl3335	Preprotein translocase SecE	0.150 ± 0.047	0.059 ± 0.002	± 0.4
slr1471	YidC	0.043 ± 0.004	0.015 ± 3.88E-05	± 0.4

Stress related proteins				
DBID^{a)}	Name	Mixotrophic %^{b)}	LAHG %^{b)}	Fold change
slr1516	Superoxide dismutase (SodB)	0.005 ± 0.011	0.066 ± 0.041	± 13.2
slI1987	Catalase	0.001 ± 0.001	0.052 ± 0.015	± 66.3
slr0623	Thioredoxin (TrxA)	0.087 ± 0.064	0.201 ± 0.056	± 2.32
slr2076	60kD chaperonin groEL1	0.165 ± 0.073	0.764 ± 0.043	± 4.64
slI0416	60 kDa chaperonin GroEL2	0.054 ± 0.035	0.224 ± 0.022	± 4.14
slI0058	DnaK1 (HSP70)	n.d.	0.022 ± 0.008	± ---
slI0170	DnaK2 (HSP70)	0.048 ± 0.013	0.094 ± 0.037	± 2.0
slr0086	Similar to DnaK protein	0.034 ± 0.004	0.004 ± 0.003	± 0.1

a) Identification number assigned during genome sequencing (28)

b) Values represent normalized spectral abundance factors (34) averaged over three (mixotrophic) and four (LAHG) biological replicates and the corresponding standard deviation

c) Ratio of the normalized spectral abundance factors for LAHG and mixotrophic fractions.

Figures

FIG. 1

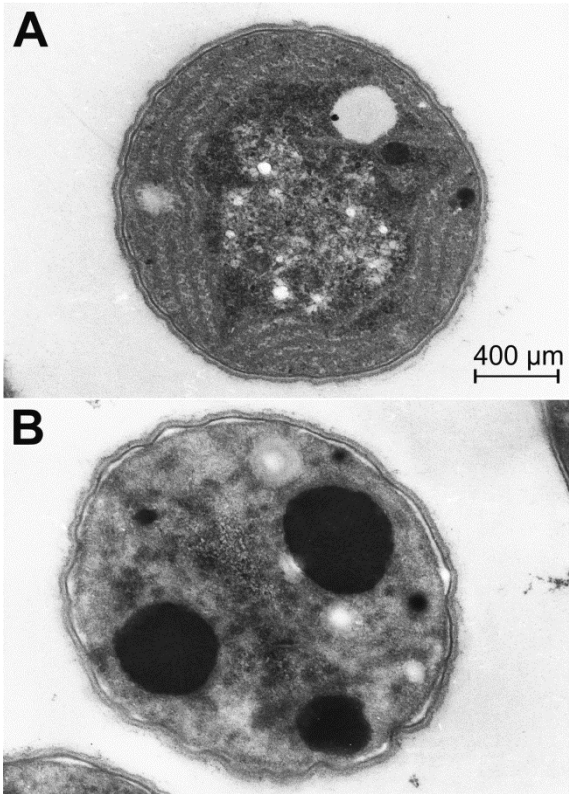
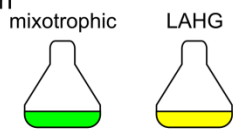


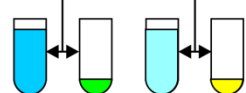
FIG.2

A

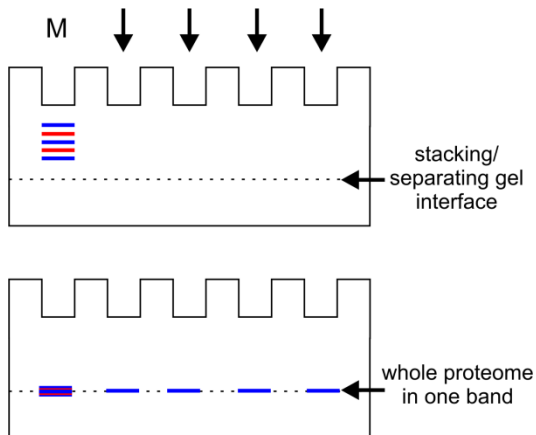
i) Cultivation



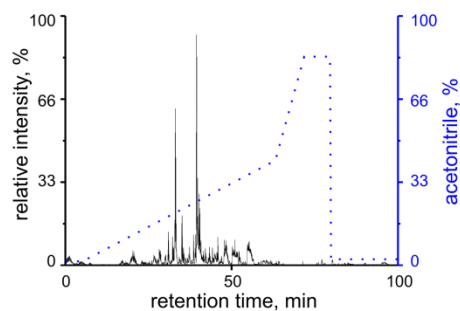
ii) Separation of membrane fraction



iii) In-gel focusing

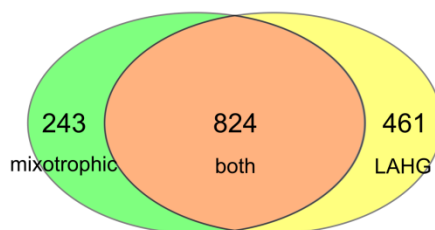


iv) Tryptic digest & LC-MS analysis



B

Identified proteins



C

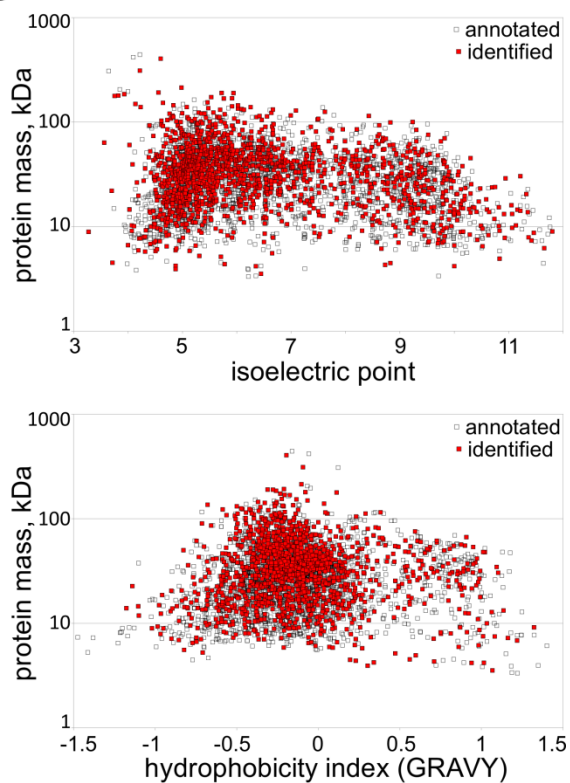
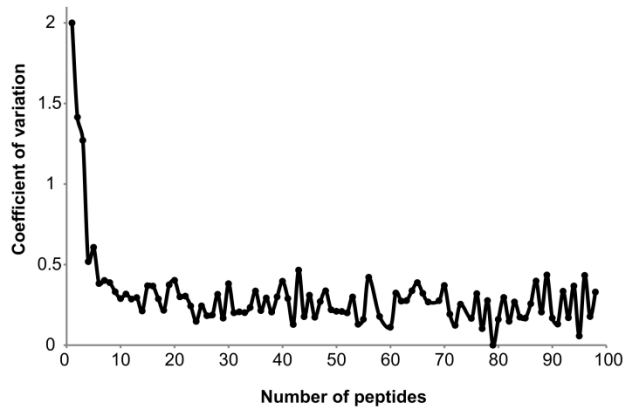
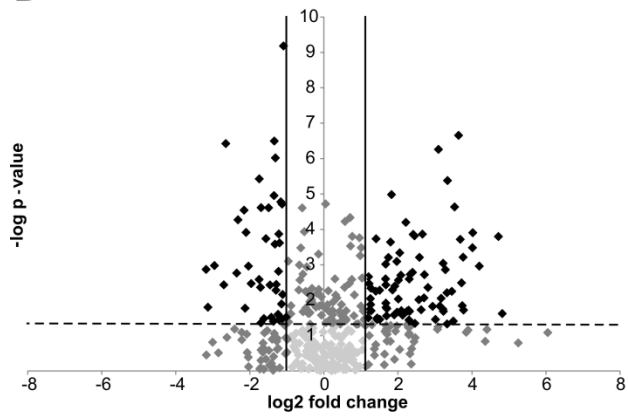


FIG.3

A



B



C

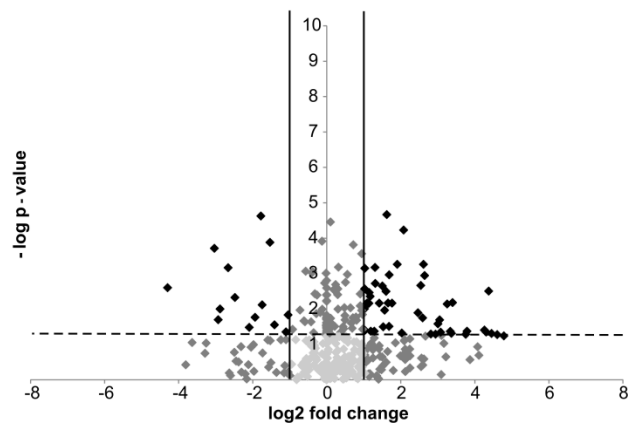


Fig. 4

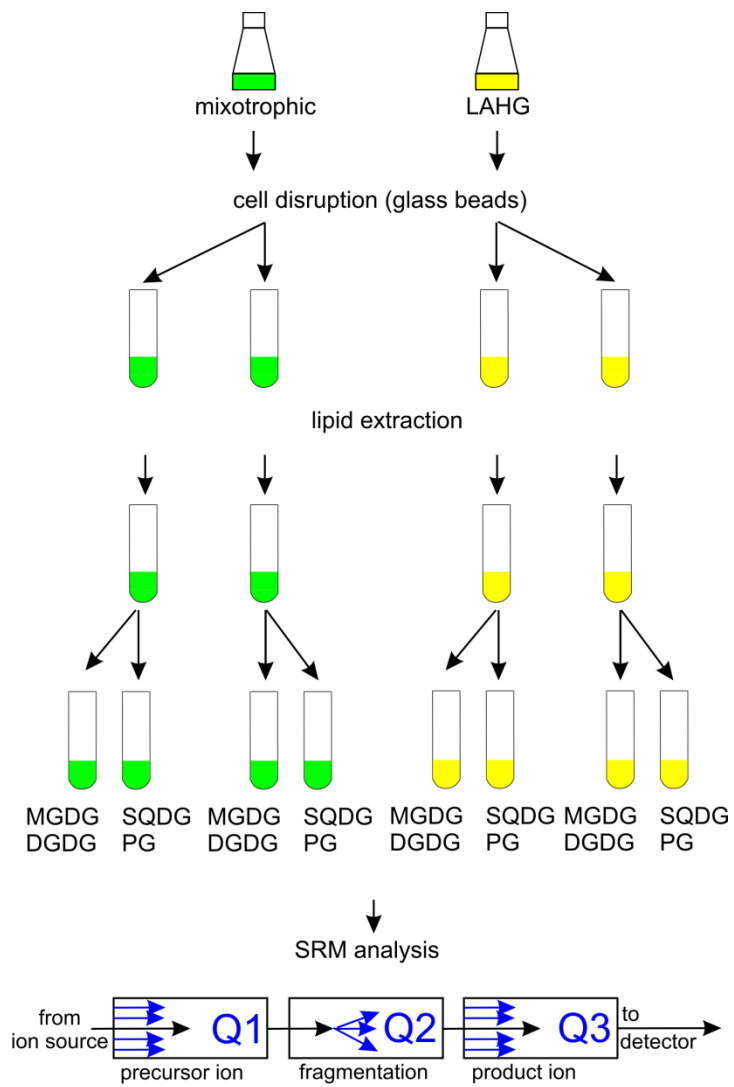


FIG 5

