

**Funktionsanalyse konservierter Leserahmen
von Chloroplasten nicht-grüner Algen**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Katja Schlink

aus Mülheim an der Ruhr

Düsseldorf 2000

Sehr alt sind die Steine.
Das Muster des Lebens liegt nicht in ihren Adern.
Als die Erde sich abkühlte, kamen die großen Regenfälle,
und die Meere füllten sich.
Nach und nach verbanden sich die Moleküle
in geordneter Asymmetrie.
Eine Milliarde Jahre verstrich,
Aeonen von Versuch und Irrtum.
Die Botschaft des Lebens nahm Form an, eine Spirale,
eine Helix, die sich endlos wiederholt,
gehüllt in Protein, ernährt von
Enzymen, geschützt durch Membranen,
umspült von Salzwasser, gewappnet mit Kalk.
Muscheln glitzern am Meeresstrand,
die Brandung brodeln, Seemöwen schreien, und der mächtige Wind
rauscht in der Zypresse.

Thomas H. Jukes
Molecules and Evolution, 1966

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material	6
2.1. Geräte	6
2.2. Vektoren	6
2.3. <i>Escherichia coli</i> Stämme	6
2.4. Verwendete Primer	7
2.4.1. <i>Synechocystis</i> PCC6803 ycf35 PCR-Primer	7
2.4.2. <i>Synechococcus</i> PCC7002 ycf35 Sequenzierungsprimer	7
2.4.3. <i>Synechocystis</i> PCC6803 ycf43 PCR-Primer	7
2.4.4. <i>Synechococcus</i> PCC7002 ycf43 Sequenzierungsprimer	7
2.4.5. <i>Synechocystis</i> PCC6803 ycf45 PCR-Primer	7
2.4.6. <i>Synechocystis</i> PCC6803 ycf46 PCR-Primer	8
2.4.7. Primer für die <i>Synechocystis</i> PCC6803 ycf46 Expressionsklone	8
2.4.8. <i>Synechocystis</i> PCC6803 psbO Primer	8
2.4.9. Sequenzierungsprimer für pET31	8
2.4.10. Geninterne PCR-Primer für <i>Synechocystis</i> PCC 6803	8
2.5. Antiseren	9
3. Methoden	10
3.1. <i>Escherichia coli</i> -Medien	10
3.2. Kultur von Cyanobakterien	10
3.2.1. Kultur von <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	10
3.2.2. Kultur von <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	11
3.3. Allgemeine molekulargenetische Methoden	11
3.4. <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 DNA-Präparation	12
3.5. <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 DNA-Präparation	12
3.6. Elektrophorese von DNA	13
3.7. PCR	13
3.8. Elution von DNA aus Agarosegelen	14
3.9. Plasmid Präparation	14
3.10. Plasmidpräparation für die automatische Sequenzierung	14
3.11. Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase	15
3.12. Herstellung chemisch-kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen	15
3.12.1. CaCl ₂ -kompetente Zellen	15
3.12.2. RbCl-kompetente Zellen	16
3.13. Transformation chemisch kompetenter Zellen	16
3.14. Elektrotransformation von <i>E. coli</i>	16
3.15. DNA-Sequenzierung mit T7-Polymerase	17
3.16. Southern-Blot (mod. nach Sambrook et al., 1989)	17
3.17. Radioaktive Markierung von DNA	17
3.18. Southern-Hybridisierung (mod. nach Bryant & Tandeau de Marsac, 1988)	18
3.19. Southern-Hybridisierung (mod. nach Sambrook et al., 1989)	18
3.20. RNA-Isolierung aus Cyanobakterien	19
3.21. Transformation von Cyanobakterien	19
3.22. Spektroskopische Chlorophyll- und Phycocyaninbestimmung	20
3.23. Chlorophyllbestimmung durch Methanolextraktion	21
3.24. Spektroskopische Untersuchung von Cyanobakterien	21
3.24.1 Absorptionsspektren	21

3.24.2.	77K Fluoreszenzemissionsspektren	21
3.25.	Messung der Sauerstoffentwicklung	21
3.26.	Präparation von Gesamtproteinen aus Cyanobakterien	22
3.27.	Proteinschnelltest	22
3.28.	Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese nach Lugtenberg	22
3.29.	Färbung von Proteinen in PAA-Gelen	23
3.29.1.	Coomassiefärbung	23
3.29.2.	Silberfärbung	23
3.30.	Proteinexpression im pET-System	24
3.31.	Zellfraktionierung von <i>E. coli</i>	24
3.32.	Inclusion body Präparation	25
3.33.	Reinigung exprimierter His-tag-Proteine unter denaturierenden Bedingungen	26
3.34.	Elektroelution von Proteinen aus SDS-Gelen	26
3.35.	Elektroelution von Proteinen aus PAA-Gelen	27
3.36.	Elektrotransfer von Proteinen	27
3.37.	Färbung von Proteinen auf Nitrozellulose mit Ponceau S	27
3.38.	Immunodetektion (Qiagen-Protokoll)	28
3.39.	Immunodetektion (Towbin et al., 1975)	28
3.40.	Immunisierung von Kaninchen	29
4.	Ergebnisse	30
4.1.	Insertionale Inaktivierung des ycf35	30
4.1.1.	Konstrukte zur ycf35-Inaktivierung in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 und <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	30
4.1.2.	Segregation der ycf35::KM Mutation in <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	32
4.1.3.	Wachstumseigenschaften der <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 ycf35::KM Mutante	33
4.1.4.	Chlorophyll- und Phycocyaningehalt im Vergleich zum Wildtyp	34
4.1.5.	Spektroskopische Untersuchung der <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 ycf35::KM Mutante	35
4.1.5.1.	Absorptionsspektren	35
4.1.5.2.	Fluoreszenz-Emissionsspektren	36
4.1.6.	Proteinkomposition der <i>Synechococcus</i> ycf35::KM Mutante	38
4.2.	Insertionale Inaktivierung des ycf36	39
4.2.1.	Konstrukt zur ycf36 Inaktivierung in <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	39
4.2.2.	Segregation der ycf36::KM Mutation in <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	40
4.2.3.	Wachstumseigenschaften der <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 ycf36::KM Mutante	40
4.2.4.	Chlorophyll- und Phycocyaningehalt im Vergleich zum Wildtyp	41
4.2.5.	Spektroskopische Untersuchung der <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 ycf36::KM Mutante	42
4.2.5.1.	Absorptionsspektren	42
4.2.5.2.	Fluoreszenz-Emissionsspektren	43
4.2.6.	Proteinkomposition der <i>Synechococcus</i> ycf36::KM Mutante	44
4.3.	Die <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 ycf35:: Ω ycf36::KM Doppelmutante	44
4.3.1.	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 ycf35:: Ω Konstrukt	44
4.3.2.	Segregation der ycf35:: Ω Mutation in <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 ycf36::KM	44
4.3.3.	Wachstumseigenschaften der <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 ycf35:: Ω ycf36::KM Mutante	45
4.3.4.	Chlorophyll- und Phycocyaningehalt im Vergleich zum Wildtyp	46
4.3.5.	Proteinkomposition der ycf35:: Ω ycf36::KM Mutante	47
4.4.1.	Konstrukt zur Mutagenese von ycf43 in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	47
4.4.2.	Klonierung und Sequenzierung des ycf43 von <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	48
4.4.3.	Konstrukt zur Inaktivierung des ycf43 in <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	48

4.5.	Insertionale Inaktivierung des <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 ycf45	49
4.5.1.	Konstrukt zur ycf45-Inaktivierung in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	49
4.5.2.	Segregation der ycf45::KM Mutation in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	50
4.5.3.	Wachstumseigenschaften der <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 ycf45::KM Mutante	51
4.5.4.	Vergleich der Chlorophyll- und Phycocyaningehalte zum Wildtyp	52
4.5.5.	Spektroskopische Untersuchung des <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 ycf45::KM Stammes	53
4.5.5.1.	Absorptionsspektren	53
4.5.5.2.	Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie	54
4.5.6.	Proteinkomposition der <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 ycf45::KM Mutante	56
4.6.	Mutagenese des ycf46 in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	56
4.6.1.	Konstrukt zur Inaktivierung des ycf46 in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	56
4.6.2.	Segregation der ycf46::KM Mutation in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	57
5.6.3.	Wachstumseigenschaften der <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 ycf46::KM Mutante	58
4.6.4.	Chlorophyll- und Phycocyaningehalte des <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 ycf46::KM Stammes	60
4.6.5.	Spektroskopische Untersuchung des <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 ycf46::KM Stammes	61
4.6.5.1.	Absorptionsspektren	61
4.6.5.2.	Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie	62
4.6.6.	Sauerstoffentwicklung von <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 WT und ycf46::KM	63
4.6.7.	Proteinkomposition der ycf46::KM Mutante	65
4.6.8.	Amplifizierung, Klonierung und Sequenzierung des psbO aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 ycf46::KM	66
4.6.9.	Transkriptanalyse von psbO im Vergleich zu anderen Photosystem II Untereinheiten in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 WT und ycf46::KM	67
4.6.10.	Expression des N-Terminus von Ycf46 und des kompletten Leserahmens in <i>Escherichia coli</i>	67
4.6.10.1.	Aufreinigung der rekombinanten Proteine	68
4.6.11.	Seren gegen den N-Terminus des <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 Ycf46	70
5.	Diskussion	71
5.1.	Genfunktionsanalyse des ycf35	73
5.1.1.	Sequenz des ycf35 Klons aus <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	73
5.1.2.	Eigenschaften des Ycf35	74
5.1.3.	Phänotypanalyse des <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 ycf35::KM Stammes	74
5.2.	Genfunktionsanalyse des ycf36	76
5.2.1.	Eigenschaften des Ycf36	76
5.2.2.	Phänotypanalyse des <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 ycf36::KM Stammes	76
5.3.	Phänotypanalyse des <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 ycf35::Ycf36::KM Stammes	77
5.4.	Genfunktionsanalyse des ycf43	79
5.4.1.	Eigenschaften des Ycf43 von <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	79
5.4.2.	Funktion des Ycf43	79
5.5.	Genfunktionsanalyse des ycf45	80
5.5.1.	Eigenschaften des Ycf45	80
5.5.2.	Phänotypanalyse des <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 ycf45::KM Stammes	81
5.6.	Genfunktionsanalyse des ycf46	84
5.6.1.	Eigenschaften des Ycf46	84
5.6.2.	Phänotypanalyse des <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 ycf46::KM Stammes	84
6.	Zusammenfassung	94
7.	Literatur	95

Inhaltsverzeichnis

Anhang	121
Anhang A1: Sequenzen der <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 Klone	121
Anhang A2: Alignments der Proteinsequenzen	128
Alignments der ycf Sequenzen	128
Alignments der sequenzierten <i>Synechococcus</i> orf-Sequenzen mit <i>Synechocystis</i>	137
Anhang A3: Sekundärstrukturberechnungen	142
Anhang A4: Proteinsequenzen der Expressionsproteine	150
Abkürzungsverzeichnis	151

1. Einleitung

Mereschkowsky erkannte 1905, daß Chloroplasten durch Endosymbiose aus Cyanobakterien hervorgegangen sind. Heute geht man davon aus, daß alle Chloroplasten auf ein einmaliges Endosymbioseereignis zurückzuführen sind (Cavalier-Smith, 1982; Kowallik, 1992). Der phylogenetische Vergleich von 16S rRNA Sequenzen zeigt dabei eine nähere Verwandtschaft der Chloroplasten zu filamentösen als zu kokkalen Cyanobakterien auf (Giovannoni et al., 1988). Im Laufe der Evolution fand eine Verkleinerung der plastidären Genome statt, die dazu geführt hat, daß die Chloroplastengenome rezenter Pflanzen auf eine Größe von durchschnittlich 100-200 Kilobasen (Ohyama et al., 1986; Shinozaki et al., 1986; Hiratsuka et al. 1989; Hallick et al. 1993; Wakasugi et al., 1994; Kowallik et al. 1995; Maier et al., 1995; Reith & Munholland, 1995; Stirewalt et al., 1995; Wakasugi et al., 1997; Wakasugi et al., 1998; Turmel et al. 1999; Sato et al., 1999; Lemieux et al. 2000) im Gegensatz zu den 1,8-13,2 Megabasen großen Genomen von Cyanobakterien (Herdman et al. 1979; Bancroft et al., 1989; Chen & Widger, 1993; Kaneko et al., 1996; Schyns et al., 1997) reduziert sind. Diese Reduktion beruht sowohl auf dem Verlust von Genen als auch auf einem Gentransfer vom Organell zum Kern.

Neben direkt an der Photosynthese beteiligten Proteinen, den für die Proteinsynthese nötigen Faktoren, Proteinen des Fettsäuremetabolismus sowie einigen Transportern kodieren Chloroplastengenome für eine Reihe von weiteren Proteinen, deren Funktion noch unbekannt ist. Solche Leserahmen, die mehreren Chloroplasten bzw. Chloroplasten und Cyanobakterien gemeinsam sind, werden als ycf (hypothetical chloroplast reading frame) bezeichnet (Hallick & Bairoch, 1994). Insgesamt sind bis heute 80 dieser hypothetischen Chloroplasten-Leserahmen identifiziert worden (Stöbe et al., 1998).

Die Verringerung des Gengehaltes ist aber nicht auf Chloroplastengenome beschränkt. Die Mitochondrien sowohl von Pflanzen als auch von Tieren zeigen ebenfalls eine starke Reduktion ihrer Genome. Die Ursache hierfür könnte die im Gegensatz zum Kern hohe Konzentration DNA-schädigender Radikale in Chloroplasten und Mitochondrien sein (Halliwell & Gutteridge, 1993; Martin & Palumbi, 1993; Raven et al. 1994a; Raven et al. 1994b). Die Endosymbionten können Mutationen und Deletionen innerhalb ihrer Genome nicht durch lateralen Gentransfer kompensieren (Andersson & Kurland, 1998). Der Vorteil eines Gentransfers in den Kern liegt also in der dort niedrigeren Mutationsrate (Allen & Raven, 1996). Trotzdem verblieb sowohl bei Mitochondrien als auch bei Chloroplasten ein Teil der Gene im Organellengenom. Von Heijne erklärte dies 1986 damit, daß viele Proteine aufgrund ihrer Hydrophobizität nicht wieder in das Organell importiert werden

können. Diese These wurde aber durch die Tatsache widerlegt, daß hydrophobe Proteine von Lichtsammelkomplexen sehr wohl kernkodiert sein können und über zwei oder sogar vier Membranen in Chloroplasten importiert werden (Mullet, 1988; Bhaya & Grossman, 1991). Die hydrophile große Untereinheit der Rubisco hingegen ist weiterhin im Plastidengenom kodiert (Ellis, 1981, 1984). Demnach ist die Hydrophobizität der Genprodukte kein Kriterium für den Verbleib von Genen im Chloroplastengenom (Allen & Raven, 1996).

Eine andere Hypothese besagt, daß solche Gene im Organell verbleiben, deren Expressionsraten direkter Redoxkontrolle unterliegen. Dabei handelt es sich um Gene, deren Produkte am primären Elektronentransport beteiligt sind oder die für dessen Anpassung an veränderte Umweltbedingungen verantwortlich sind (Allen 1993a,b).

Die Funktion der Chloroplasten ist in Pflanzen auf die Photosynthese reduziert, und die Gene, die die größte Resistenz gegen den Transfer zum Kern zeigen, sind jene, deren Funktion im oder nahe am photosynthetischen Reaktionszentrum liegt (Race et al., 1999). Es ist daher anzunehmen, daß eine große Zahl konservierter Leserahmen eine Rolle für die Photosynthese spielen. So erwiesen sich bereits einige der zunächst als Ycf klassifizierten Proteine als Untereinheiten des Photosystems II oder des Cytochrom *b₆/f*-Komplexes (Monod et al., 1994; Takahashi et al., 1996; Hager et al., 1999). Auch für die Assemblierung von c-Typ Cytochromen des photosynthetischen Elektronentransportes sind ycf-Genprodukte essentiell (Xie & Merchant, 1996; Hübschmann et al., 1997; Inoue et al., 1997).

Eine besonders interessante Gruppe bilden jene Ycf-Proteine, die für die Stabilität oder Assemblierung ganzer Photosysteme nötig sind (Ruf et al., 1997; Boudreau et al., 1997; Meurer et al., 1998), da über den Prozeß der Photosystem-Assemblierung und die Anzahl der dafür benötigten Proteine noch wenig bekannt ist. In diese Kategorie fällt auch das BtpA Protein, das das PS I bei niedrigen Temperaturen stabilisiert. Wie für die anderen Proteine ist auch hier der molekulare Mechanismus unbekannt. Denkbar ist eine Chaperonfunktion bei der Faltung von Untereinheiten bzw. während der Kofaktorinsertion oder eine indirekte Stabilisierung des Photosystems durch Aktivierung oder Stabilisierung von Proteinen mit Schutzfunktionen (Zak & Pakrasi, 2000). Für Ycf39 ist eine Funktion als Chaperon ähnliches Protein, das die Insertion von Chinon im Photosystem II unterstützt, bereits postuliert worden (Ermankova-Gerdes & Vermaas, 1999). Es wäre also denkbar, daß noch weitere ycf-Genprodukte Chaperonfunktionen für Photosynthesekomplexe besitzen.

Photosynthese in Cyanobakterien und Chloroplasten

Der photosynthetische Elektronentransport in Cyanobakterien ist in Abb. 1 dargestellt und unterscheidet sich grundsätzlich kaum von dem der Chloroplasten. Die Elektronen können zyklisch oder nicht-zyklisch transportiert werden. Der in beiden Fällen entstehende Protonengradient wird zur ATP-Bildung genutzt (Arnon, 1959), während die Reduktion von NADP^+ nur beim letzteren möglich ist. Im Calvin-Zyklus, dessen Endprodukt eine Hexose ist, werden dann ATP und $\text{NADPH} + \text{H}^+$ zur Reduktion von CO_2 genutzt. Die durch die Photosynthese bereitgestellten Hexosen bilden die Grundlage des photoautotrophen Wachstums.

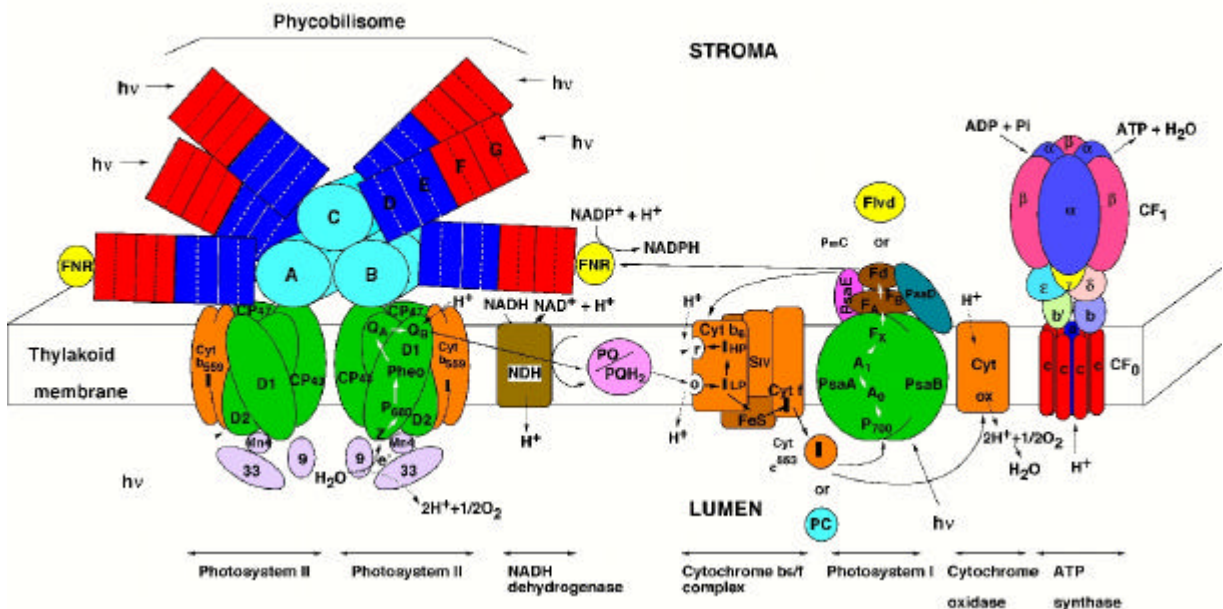


Abb.1: Thylakoidmodell und Elektronentransport in Cyanobakterien (aus Bryant, 1994);

A/B/C: Zylinder aus je 4 Allophycocyanintrimeren, D/E: Phycocyaninhexamere, E/F: Phycoerythrinhexamere, A₀: prim. Akzeptor des PS I (Chl a Monomer), A₁: sek. Akzeptor des PS I (Phyllochin), Cyt: Cytochrom, Fd: Ferredoxin, Flvd: Flavodoxin, FNR: Ferredoxin/NADP-Reduktase, F_x/F_A/F_B: Eisen-Schwefel Cluster des PS I, HP/LP: hohes/niedriges Reduktionspotential, I: Eisen, o/r: Chinon-oxidations- und -reduktionsstellen des Cyt *b₆/f* Komplexes, P₆₈₀/P₇₀₀: primäre Donorchlorophylle der Photosysteme, Pheo: Pheophytin, PC: Plastocyanin, PQ: Plastochinon, Q_A/Q_B: Plastochinone des PS II, Z: Mn-Cluster reduzierendes Tyrosin des PS II

Einer der Unterschiede zum cyanobakteriellen Elektronentransports ist die ausschließliche Verwendung von Plastocyanin als Elektronenüberträger zwischen dem Cytochrom *b₆/f*-Komplex und Photosystem I in den Chloroplasten grüner Algen und höherer Pflanzen. Außerdem teilen sich nur in Cyanobakterien Photosynthese und Atmungskette den Chinonpool.

Die Zusammensetzung der photosynthetischen Komplexe von Cyanobakterien und Chloroplasten unterscheidet sich hauptsächlich in den Untereinheiten der Photosysteme, während die ATP-Synthase und der Cytochrom *b₆/f* Komplex absolut konserviert sind.

Von den Photosystemen ist das Photosystem I wiederum besser konserviert als das Photosystem II. Dem Photosystem I von Cyanobakterien und nicht-grünen Algen fehlen drei zusätzliche nukleär codierte Untereinheiten der Grünalgen und höheren Pflanzen (G, H, N). Das Photosystem II ist hingegen deutlich variabler. Grünalgen und höhere Pflanzen weisen fünf Untereinheiten auf (P, Q, R, T', W), die aus Cyanobakterien und nicht-grünen Algen nicht bekannt sind. Dem Photosystem II der grünen Linie fehlen aber auch zwei Polypeptide (U und V), die in Cyanobakterien und nicht-grünen Algen vorkommen.

Während der Evolution der Chloroplasten haben sich innerhalb des Photosystems II die größten Veränderungen bei den extrinsischen Proteinen des Wasserspaltungsapparates ereignet, von dem nur das *psbO* Genprodukt (Mangan stabilisierendes Protein, 33kDa Protein oder OEE1 genannt) konserviert ist. Trotz der unterschiedlich starken Modifikation im Laufe der Evolution zeigt sich für beide Photosysteme bei höheren Pflanzen der Trend, die Cytochrome an der Donor-Seite zu ersetzen (Shen et al., 1995).

Die Lichtsammelkomplexe bestehen bei Cyanobakterien ausschließlich aus Phycobilisomen, welche auch bei Rotalgen vorkommen (Gantt & Conti, 1966, 1969). Cryptomonaden besitzen zusätzlich zu Chlorophyll a/c-haltigen Lichtsammelkomplexen, die denen höherer Pflanzen ähneln, auch Photosystem II assoziierte Phycobiline (Gantt, 1979; Ingram & Hiller, 1983). Diese sind aber nicht in Phycobilisomen ähnlichen Strukturen organisiert (Gantt, 1980). Bei grünen Pflanzen bestehen die Lichtsammelkomplexe aus Chlorophyll/Xanthophyll-bindenden Proteinen (Smith & French, 1963; Thornber, 1971). Dies spiegelt die unterschiedlichen Umweltbedingungen photosynthetischer Organismen wider. Dagegen hat sich im Laufe der Evolution vom freilebenden Cyanobakterium zum Chloroplasten der Photosyntheseapparat in seiner grundsätzlichen Struktur und Funktionsweise erhalten, so daß die Cyanobakterien den umfassendsten Modellorganismus zur Aufklärung der oxygenen Photosynthese darstellen.

Verwendung von Cyanobakterien zur Genfunktionsanalyse und Auswahl der untersuchten Leserahmen

Cyanobakterien bieten sich neben ihrer Modellfunktion aus folgenden Gründen zur Genfunktionsanalyse an:

Synechocystis sp. PCC6803 und *Synechococcus* sp. PCC7002 sind aufgrund ihrer natürlichen Transformierbarkeit (Shestakov & Khuyen, 1970) einfach zu mutieren. Sie nehmen dabei ausschließlich doppelsträngige DNA aus dem Medium auf, wobei es unerheblich ist, ob sie zirkulär oder linear ist (Barten & Lill, 1995). Dazu kommt, daß sie leicht und schnell zu kultivieren und in dieser Hinsicht den pflanzlichen Systemen überlegen sind. Ebenfalls ein großer Vorteil ist, daß *Synechocystis* sp. PCC6803 der einzige photosynthetische Organismus ist, dessen komplettes Genom sequenziert ist. Dagegen liegen für Pflanzen zwar zum Teil komplette plastidäre Sequenzen, aber noch keine kompletten nukleären Sequenzen vor.

Die ausgesuchten Leserahmen *ycf35*, *ycf36*, *ycf43*, *ycf45* und *ycf46* sind alle im Chloroplastengenom der Rotalge *Porphyra purpurea* (Reith & Munholland, 1995) kodiert. Sie kommen ebenfalls alle in den Chloroplastengenomen von Heterokontophyten oder Cryptomonaden vor (vergl. Anhang A2), deren Chloroplasten auf einen sekundären rhodophytischen Endosymbionten zurückgehen (Maier et al., 1991; Douglas, 1994). Alle fünf Leserahmen fehlen in den Plastidengenomen der grünen Linie (Grünalgen und höhere Pflanzen). Für *ycf36*, *ycf43* und *ycf45* sind aber bereits nukleäre Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* bekannt, so daß diese Leserahmen auch eine Funktion in höheren Pflanzen erfüllen. Die gute Konservierung von *ycf35* und *ycf46* spricht dafür, daß auch diese bei anderen Algen und höheren Pflanzen kernkodiert sein könnten.

Zielsetzung

Die Genfunktionsanalyse dieser konservierten Chloroplasten-Leserahmen ist das Thema der Arbeit. Dazu sollen die oben genannten *ycf*-Gene in Cyanobakterien inaktiviert werden.

Die physiologische Charakterisierung der erzeugten cyanobakteriellen Stämme soll Einblicke in die Funktion der jeweiligen inaktivierten Gene geben und richtungsweisend für die biochemischen Untersuchungen der Proteinfunktionen sein.

2. Material

Alle verwendeten Chemikalien hatten, falls nicht anders angegeben, p.A. Qualität. Die eingesetzten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Roche, MBI-Fermentas, New-England Biolabs, Pharmacia oder Promega bezogen. Als Proteinstandard wurde die 10kDa-Leiter der Firma Gibco eingesetzt. Bei der verwendeten Nitrozellulose handelt es sich um unterstützte BA-S83 der Firma Schleicher und Schuell, die ebenfalls Chromatographiepapier der Sorte 2040 A lieferte. In Western-Blot Versuchen wurde Magermilchpulver von Uelzena verwendet.

2.1. Geräte:

DNA/RNA Synthesizer	Model 392 Applied Biosystems (Foster City, Calif., USA)
Cary 14 Spectrophotometer	modifiziert zur computer- gestützten Datenaufnahme durch On-Line Instruments Systems (Bogart, GA, USA)
8000C Fluorometer	SLM-Aminco
Electroporator 2510	Eppendorf
Sauerstoffelektrode (Clark Typ)	Hansatech

2.2. Vektoren:

pUC18/19	Yanisch-Peron et al. (1985)
pBluescript SK+	Stratagene
pMOS	Amersham
pGEM-T	Promega
pRL161	Elhai & Wolk (1988)
pKS-NPT	Steinmüller
pH45Ω	Prentki & Krisch (1984)
pET31+	Novagen

2.3. *Escherichia coli* Stämme:

DH5α	Gibco
DH10B	Gibco
pMOS-Blue	Amersham
BL21DE	Novagen

2.4. Verwendete Primer

Die Primer wurden entweder mit einem Modell 392 DNA/RNA Synthesizer der Firma Applied Biosystems (Foster City Cal., USA) hergestellt oder bei den Firmen MWG Biotech bzw. Interactiva bestellt. Neben den Standardsequenzierungsprimern M13 Universal und Reverse wurden die unten aufgelisteten Primer eingesetzt. Die im Vergleich zur cyanobakteriellen Originalsequenz veränderte Basen sind unterstrichen und Restriktionsenzymkennungsstellen fett markiert.

2.4.1. *Synechocystis* PCC6803 ycf35 PCR-Primer:

7-72: GCC TGG GGG AAG TTG **AAT TCT** CTC T
EcoRI

7-73: TAT CAC CAT CAG GCA **CTG CAG** CGT TG
PstI

2.4.2. *Synechococcus* PCC7002 ycf35 Sequenzierungsprimer:

35-3: CAA GTA CCA TCT GCT GA
35-4: GCC CTC TAC GAC TGT CA
35-5: GGT CTC TTC CAA GAA CA
35-6: GTT TGC AGC CAT GCA GG
10-86: CAG ACT TGA GGG AAG TCA
10-87: CCC CAG CGG TCT GGT TTT
11-10: TAT CTC CGG ATT GAT CTG

2.4.3. *Synechocystis* PCC6803 ycf43 PCR-Primer:

7-74: TTT TGC **GGT ACC** TTT TAT ATT CAA
KpnI

7-75: TTC AAA TGA TAA **AGG ATC CGG** GAC T
BamHI

2.4.4. *Synechococcus* PCC7002 ycf43 Sequenzierungsprimer:

11-01: ACC CCG CAG TCA GAT CC
11-12: GAG AGA AAG AAA AAT TCG

2.4.5. *Synechocystis* PCC6803 ycf45 PCR-Primer:

7-76: TTC AAC ATT **ACT AGT** TGA TTT TCC C
SpeI

7-77: GGC CAC AGC **GCA GCT** GTT AAC CCA A
PvuII

2.4.6. *Synechocystis* PCC6803 ycf46 PCR-Primer:

8-22: GAC TAG TTA **TGG GCC** CAT GAC TTT T
ApaI

8-23: AGT AAT AAC **GGG ATC** **CAT** GGT TAA C
BamHI

2.4.7. Primer für die *Synechocystis* PCC6803 ycf46 Expressionsklone:

Kompetter ycf46:

11-52: GTT ATT TGC **ATA TGA** CTT TTA GTG
NdeI

11-53: GGG AAA **CTC GAG** GTC CCT GGA GGC
XhoI

N-Terminus:

11-92: CCA CCA GAC TAG TTA TTT **GCA TAT** **GAC** TTT TAG TG
NdeI

11-93: TAG TAA ACC CCG GGG **CTC GAG** TAA ACC GTA ACG AC
XhoI

2.4.8. *Synechocystis* PCC6803 psbO Primer:

PCR-Primer:

13-81: AAG TCT GGA GCG GGA CAA GGC CTG
13-82: ACG ACC ACC TTA ACG GCG ATC GCC

Sequenzierungsprimer:

14-31: GGT GGA ACC GAA TAC TAA
14-32: CCA TCA ACC TGG GTC ACC

2.4.9. Sequenzierungsprimer für pET31

T7-Promotor: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T7-Terminator: GCT AGT TAT TGC TCA GCG G

2.4.10. Geninterne PCR-Primer für *Synechocystis* PCC 6803

psbB:

14-45: CTG GAG CGT CAC CGG AGA ACC TGG
14-46: GGG TGG TGG CAT TAC CGT ACC ACA

psbV:

14-47: GGT CGG CAG TGC CAA TGC GGT GGA

14-48: GGG AGC AAT GAG GGT GTA ACC AGC

23SrRNA:

14-49: GCG GCG AGA GCT GTA CCA AAG TGA

14-50: TGT GTC GGT TTC GGG TAC AGG TGA

2.5. Antiseren

Die folgenden Antiseren wurden freundlicherweise von Prof. Dr. R.J. Berzborn (Ruhr-Universität Bochum) zur Verfügung gestellt:

194-4 Anti-PsbO (Spinat)

219-t Anti-PsaD (Spinat)

372-t Anti-CF1 (Spinat)

3. Methoden

3.1. *Escherichia coli*-Medien

Luria-Bertani Medium

0,5% (w/v)	Hefeextrakt
1% (w/v)	Trypton
1% (w/v)	NaCl
pH 7,5	

DYT-Medium

1% (w/v)	Hefeextrakt
1,6% (w/v)	Trypton
0,5% (w/v)	NaCl
pH 7,5	

SOC-Medium

10mM	NaCl
10mM	MgCl ₂
10mM	MgSO ₄
2,5mM	KCl
20mM	Glukose
0,5% (w/v)	Hefeextrakt
2% (w/v)	Trypton
pH 7,5	

3.2. Kultur von Cyanobakterien

3.2.1. Kultur von *Synechocystis* sp. PCC6803 (Dubbs J.M., Bryant D.A., 1991)

B-Hepes Medium

A5+-Cometalle	1ml
CaCl ₂ x 2H ₂ O	35,28mg/l
Citronensäure x H ₂ O	7,175mg/l
Fe(III)(NH ₄) ₂ -Citrat	12mg/l
Hepes	1,1g/l
K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O	200mg/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	75mg/l
Na ₂ CO ₃	2g/l
Na ₂ -EDTA	1,98mg/l
NaNO ₃	1,5g/l
Na ₂ O ₃ S ₂ x 5H ₂ O	1,5g/l

A5+-Cometalle

CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,079g/l
Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O	0,0404g/l
H ₃ BO ₃	2,86g/l
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,81g/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,39g/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,22g/l

Der pH wurde mit KOH auf 8 eingestellt. Für Platten wurden 200mg/l statt 2g/l Na₂CO₃ eingesetzt und das Medium wurde mit 1,5% (w/v) Agar versehen. Medium für mixotrophes Wachstum enthielt zusätzlich 5mM Glukose.

Synechocystis sp. PCC6803 wurde bei 25-30 °C entweder mit 1% (v/v) CO₂ belüftet oder mit 170rpm geschüttelt. Standardlichtbedingungen bedeuteten 50µE, 250µE entsprachen hoher und 5-25µE niedriger Lichtintensität.

3.2.2. Kultur von *Synechococcus* sp. PCC7002

A⁺-Medium (Stevens et al., 1973)

CaCl ₂ x 2H ₂ O	350g/l		
FeCl ₃ x6H ₂ O	1ml/l	einer Stammlösung von 3,89g/l in 0,1N HCl	
KCl	600mg/l		
KH ₂ PO ₄	50mg/l		
MgSO ₄ x 7H ₂ O	5g/l		
NaCl	18g/l		
Na ₂ -EDTA	333mg/l		
NaNO ₃	1g/l		
PI Metalle	1ml/l		
Tris	10ml/l	einer Stammlösung von 100g/l	pH 8,2

Das Medium wurde für 50-55 min autoklaviert und nach dem Abkühlen wurden 285,7µl/l einer 14g/l Stammlösung Vitamin B₁₂ hinzugeben. Sollten Platten gegossen werden, wurde das Medium mit 1,5% (w/v) Agar versehen. Medium für mixotrophes Wachstum enthielt 0,12% (v/v) Glyzerin.

PI Metalle

Co(NO ₃) ₂ x6H ₂ O	0,0148g/l
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,003g/l
H ₃ BO ₃	34,26g/l
MnCl ₂ x4H ₂ O	4,32g/l
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,0473g/l
ZnCl ₂	0,315g/l

Synechococcus sp. PCC7002 wurde bei 25-39°C entweder mit 1% (v/v) CO₂ belüftet oder bei 170rpm geschüttelt. Standardlichtbedingungen bedeuteten 100-250µE, hohe Lichtintensität 500µE und niedrige 20µE.

3.3. Allgemeine molekulargenetische Methoden

Restriktionen, Ligationen sowie Klenow-fill-in Reaktionen wurden nach Sambrook et al., 1989 oder nach Angaben des jeweiligen Enzymlieferanten in den mitgelieferten Puffern ausgeführt. Ethanol-fällung von DNA erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Na-Acetat (pH4,9) und 2,5-3 fachem Volumen Ethanol bei -20°C für 30min. Anschließend wurde die DNA bei 4°C für 30min mit 12000xg pelletiert. Zur Isopropanol-fällung von DNA wurde das 0,7-1 fache Volumen Isopropanol hinzugegeben und die DNA bei Raumtemperatur oder -20°C präzipitiert, die Zentrifugation erfolgte wie oben.

3.4. *Synechocystis* sp. PCC6803 DNA-Präparation (Williams J.G.K., 1986)

TES		TE-Puffer	
50mM	Tris/HCl pH 8-8,5	10 mM	Tris/HCl pH 8
50mM	NaCl	1 mM	EDTA
5mM	EDTA		

Die Zellen wurden bei Raumtemperatur für 6-10min mit 4500xg geerntet und in 2ml/g Frischgewicht gesättigtem Natriumjodid (4g NaJ unter Erhitzen in 2 ml H₂O bidest lösen) resuspendiert. Die Suspension wurde mit gleichem Volumen TES aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 8ml/g TES aufgenommen und mit 63mg/g Lysozym für 20min bei 37°C inkubiert. Es wurde 10% (w/v) N-Lauroyl-Sarkosin zu einer Endkonzentration von 1% (v/v) hinzugegeben und der Ansatz weitere 20min bei 37°C belassen. Das Lysat wurde mit gleichem Volumen Tris-gesättigtem Phenol versetzt und langsam bei Raumtemperatur für 30-60min auf einem Drehteller durchmischt. Nach einer Zentrifugation bei 4500xg für 10min wurde die wäßrige Phase mit einfachem Volumen Chloroform versetzt und wie zuvor gemischt und zentrifugiert. Die DNA wurde durch Isopropanol- oder Ethanol-fällung (3.3.) gewonnen, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer rückgelöst.

Zur Präparation von DNA im Mini-Maßstab wurde das Protokoll wie folgt modifiziert: Das Zellpellet von 5-10ml Kulturvolumen wurde in 50µl gesättigtem NaJ resuspendiert und nach der Zentrifugation in 200µl TES aufgenommen und diesem Volumen entsprechend weiter bearbeitet.

3.5. *Synechococcus* sp. PCC7002 DNA-Präparation (De Lorimier et al., 1984)

CTAB-NaCl

700mM	NaCl
10% (w/v)	CTAB

Die in 10 ml einer Kultur der OD₇₃₀ = 2,0-2,5 enthaltenen Zellen wurden bei Raumtemperatur mit 4500xg für 10min abzentrifugiert und in 800µl TES (3.4.) resuspendiert. Die Zellen wurden in zweimal 400µl unterteilt und in einem Reaktionsgefäß mit je 100µl Lysozymstammlösung (50mg/ml) versetzt. Nach 15min bei 37°C wurden je 50µl 10% (v/v) N-Lauroyl-Sarkosin hinzugegeben und gut gemischt. Je 600µl Tris-gesättigtes Phenol wurden pro Ansatz hinzugefügt und der Ansatz wurde für 15-30min auf einem Drehteller gemischt. Nach 5 min Zentrifugation bei 10000xg wurde die wäßrige

Phase mit 5µl RNase (2U/µg) bei 37°C 15min inkubiert. Es wurden dann 100µl 5M NaCl, 100µl CTAB-NaCl und 600µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) zugefügt und der Asatz wurde 15min auf einem Drehteller gemischt. Nach 2min Zentrifugation wie oben wurde die DNA mit 700µl Isopropanol aus der wäßrigen Phase bei -20°C ausgefällt, pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in ca. 40-60µl TE-Puffer (3.4.) rückgelöst.

3.6. Elektrophorese von DNA

TAE		Probenpuffer	
400mM	Tris/HCl pH 8,0	30%(w/v)	Glyzerin
50mM	Na ₂ EDTA	0,3%(w/v)	Bromphenolblau
20mM	Essigsäure		

Färbelösung

1mg/ml Ethidiumbromid in entsalztem Wasser

Die Proben werden vor dem Lauf mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgt für Minigele (7x11cm) bei 50-70mA und 100V und für große Gele (17cm x 20cm) bei 100mA.

3.7. PCR

Cyanobakterielle DNA wurde in einer Konzentration von 10ng/µl in PCRs eingesetzt. Es wurde 1pmol der Primer pro µl Ansatz verwendet und die Konzentration der dNTPs betrug 200µM. Je 100µl Ansatzvolumen werden 2,5U Taq Polymerase (Qiagen) bzw. 5U PfuTurbo Polymerase (Stratagene) verwendet. Die DNA wurde in einem einleitendem Denaturierungsschritt für 1min auf 95°C erhitzt. Jeder PCR-Zyklus begann mit einer 30 sek Denaturierung bei 95°C. Die Annealingtemperatur wurde 3°C unter der jeweils niedrigeren Schmelztemperatur des Primerpaares gewählt. Die Elongationszeit betrug 1min pro kb des Produktes und die Elongationstemperatur betrug für Taq Polymerase und PfuTurbo Polymerase 72°C. Es wurden 26-30 Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Elongation durchgeführt, bevor die PCR durch eine abschließende 5-10min Elongation beendet wurde. Primer und nicht eingebaute Nukleotide wurden über das PCR-Reinigungskit der Firma Qiagen entfernt.

3.8. Elution von DNA aus Agarosegelen

DNA einer Größe von weniger als 5kb wurde mit den Elutionskits der Firmen Qiagen, Peqlab oder Supelco aus Agarosegelen (3.6.) eluiert. Alternativ oder für größere DNA wurde die Elution mittels Agarase (Boehringer) aus Low-melt-Agarose durchgeführt. Alle Verfahren wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.9. Plasmid Präparation (nach Birnboim & Doly, 1979 mod. von Freier, 1995)

Lösung I

50mM	Tris/HCl pH 7,5
10mM	Na ₂ EDTA
100µg/ml	RNAseA

Lösung II

0,2M	NaOH
1%(w/v)	SDS

Lösung III

2,55M	Na-Acetat pH 4,9
-------	------------------

Die Zellen einer 1 ml *E. coli* Kultur wurden abzentrifugiert und das Pellet in 200µl Lösung I resuspendiert, mit ebenfalls 200µl Lösung II versetzt und mehrmals invertiert. Sobald die Lösung klar war wurden 200µl Lösung III hinzugegeben und der Ansatz wurde erneut invertiert. Diese Schritte erfolgten alle bei Raumtemperatur. Die ausgefällten Proteine wurden für 30min bei 12000xg abzentrifugiert und die DNA wurde aus dem Überstand mit 600µl Isopropanol für 30min bei -20°C präzipitiert. Anschließend wurde sie bei 4°C für 30min abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in TE-Puffer (3.4.) rückgelöst. Die Zellen aus 40ml Kulturvolumen wurden in 4ml Lösung I resuspendiert und dementsprechend behandelt.

3.10. Plasmidpräparation für die automatische Sequenzierung (Perkin-Elmer, 1995)

GTE-Puffer:

50mM	Glukose
25mM	Tris/HCl pH 8
10mM	EDTA

Die Zellen einer 1,5ml *E. coli*-Kultur wurden abzentrifugiert und in 200µl GTE-Puffer resuspendiert. Es wurden 300µl Lösung II (3.9.) hinzugegeben und der Ansatz wurde 5min auf Eis inkubiert, nach Zugabe von 300µl 3M Natriumacetat pH 4,9 folgt eine weitere 5min Inkubation auf Eis. Die RNA wurde durch Hinzugeben von 2µl RNAse-

Stammlösung (10mg/ml) für 20min bei 37°C entfernt. Es wurden 400µl Chloroform zugegeben, untergemischt und der Ansatz wurde 1min bei 12000xg zentrifugiert. Die DNA wurde aus dem Überstand mit gleichem Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur präzipitiert und sofort für 10min pelletiert. Das Pellet wurde mit 500µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 32µl H₂O bidest rückgelöst. Die DNA wurde erneut durch Zugabe von 8µl 4M NaCl und 40µl 13% (w/v) PEG für 20min auf Eis gefällt. Nach einer 15min Zentrifugation mit 12000xg bei 4°C wurde das Pellet mit 500µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20µl H₂O bidest gelöst.

3.11. Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Alkalische Phosphatase kann in jedem Puffer angewendet werden, in dem mindestens 10mM MgCl₂ und 20mM Tris bei einem pH von ca. 8 vorliegen. Bei einem Vektor von 2,5-3kb Größe wurden pro 2,5µg folgende Mengen an Enzym eingesetzt:

für 5' Überhänge:	0,1U
für glatte Enden:	0,3U
für 3' Überhänge:	0,5U

Die Dephosphorylierung erfolgte für 1 Stunde bei 37°C und das Enzym wurde durch 15min bei 65°C inaktiviert.

3.12. Herstellung chemisch-kompetenter *Escherichia coli* Zellen (Sambrook et al., 1989)

3.12.1. CaCl₂-kompetente Zellen

Die *E. coli* Zellen wurden in dYT-Medium (3.1.) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 angezogen, 10min auf Eis gekühlt und dann für 5min bei 4000xg pelletiert. Das Pellet wurde in 10ml eiskaltem 100mM CaCl₂ resuspendiert und nach 5min auf Eis erneut w.o. zentrifugiert, in 2ml eiskaltem 100mM CaCl₂ aufgenommen und mit Glycerin zu einer Endkonzentration von 15% (w/v) versetzt. Die Bakterien wurden in 200µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

3.12.2. RbCl-kompetente Zellen

RF I		RF II	
100mM	RbCl	10mM	MOPS
50mM	MnCl ₂ x 4H ₂ O	10mM	RbCl
30mM	K-Acetat	75mM	CaCl ₂
10mM	CaCl ₂	15%(w/v)	Glyzerin
15%(w/v)	Glyzerin		
pH 5,8		pH 6,8	

Eine *E.coli* Kultur wurde w.o. angezogen und die Zellen wurden pelletiert. Das Pellet wurde in eiskaltem RF I resuspendiert, dessen Volumen dem 0,4 fachen Volumen der Kultur entsprach. Die Suspension wurde 5min auf Eis inkubiert und Zellen wurden bei 4500xg abzentrifugiert. Das Pellet wurde nun in eiskaltem RF II resuspendiert, dessen Volumen 1/25 des ursprünglichen Kulturvolumens entsprach. Die Zellen wurden 15-60min auf Eis inkubiert und in 200µl Aliquots w.o. eingefroren und gelagert.

3.13. Transformation chemisch kompetenter Zellen

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 30min mit der DNA auf Eis inkubiert, einem 90sek Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und nach 2-5min auf Eis mit 1ml dYT (3.1.) versehen und 45min bei 37°C leicht geschüttelt. Die transformierten Zellen wurden in verschiedenen Mengen auf selektierende Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C angezogen.

3.14. Elektrotransformation von *E. coli*

Eine 500ml Kultur wurde bis zu einer OD von 0,6-1 in LB (3.1.) angezogen und die Zellen wurden nach 15min auf Eis für 10min bei 4000 xg pelletiert. Das Pellet wurde im gleichen Volumen sterilem, eiskaltem H₂O bidest resuspendiert und die Zellen erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde in eiskaltem H₂O bidest aufgenommen, dessen Volumen 1/20 des Ausgangsvolumen entsprach. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 10% (w/v) Glyzerin resuspendiert, das 1/50 des Ausgangsvolumen entsprach. Die Zellen wurden wieder pelletiert und in 10% (w/v) Glyzerin resuspendiert, dessen Volumen 1/250 des Ausgangsvolumens entsprach. Die Zellen wurden in 40µl Aliquots in Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Die Transformation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers bei 1500V. Die Zellen wurden in 1ml SOC Medium (3.1.) für 45min leicht bei 37°C geschüttelt, bevor sie in verschiedener Dichte auf selektiven Platten ausgestrichen wurden.

3.15. DNA-Sequenzierung mit T7-Polymerase (Sanger et al.,1977)

Die Sequenzreaktion wurde nach Angaben des Herstellers mit dem T7-Sequenzierungskit der Firma Pharmacia unter Verwendung von α -³⁵S-dATP durchgeführt. Es wurden 2-3 μ g Template-DNA und 15pmol Primer eingesetzt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte auf einem 5% Harnstoff-Acrylamid-Gel mit einem Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid von 19:1 bei 1500 V und max. 60 Watt.

3.16. Southern-Blot (mod. nach Sambrook et al., 1989)

Denaturierungslösung		Neutralisierungslösung	
1M	NaCl	3M	NaCl
0,5M	NaOH	0,5M	Tris/HCl pH 7,5
20xSSC		20xSSPE	
3M	NaCl	3M	NaCl
0,3M	Na-Citrat x 2H ₂ O	0,2M	NaH ₂ PO ₄
pH 6,8		0,02M	EDTA
		pH 7,4	

Der Blot erfolgte im Kapillarverfahren entweder als "Naß-Blot" unverändert nach Sambrook et al. oder in umgekehrter Reihenfolge mit der Nitrozellulose unten ohne Pufferzufuhr ("Trockenblot"). In diesem Fall wurden Gel, Filterpapier und Nitrozellulose vor dem Zusammenbau in SSPE statt SSC getränkt.

3.17. Radioaktive Markierung von DNA

10xOligo-Puffer (nach dem random primed labelling Kit von Boehringer)	
0,1M	MgCl ₂
0,5M	Tris/HCl pH 7,5
0,5mM	dC/G/TTP
14 M	β -Mercaptoethanol
25 μ g/ml	p(dN) ₆ Primer (Pharmacia)

Es wurden 200-400ng hitzedenaturierte DNA in Oligopuffer unter Zugabe von 2 μ l α -³⁵S-dATP mit 5U Klenow-Fragment radioaktiv markiert. Die Reaktion erfolgte entweder bei 37°C für 30-60min oder bei Raumtemperatur für 3 Stunden. Zur Hybridisierung wurde die Sonde erneut hitzedenaturiert.

3.18. Southern-Hybridisierung (mod. nach Bryant & Tandeau de Marsac, 1988)

20xNET		50x Denhardt's Lösung	
3M	NaCl	1%(w/v)	Ficoll
20mM	EDTA	1%(w/v)	PVP
600mM	Tris/HCl pH 8,0	1%(w/v)	BSA

Hybridisierungslösung

6x	NET
5x	Denhardt's
1%(w/v)	SDS

Die Prähybridisierung der Blots (3.16.) erfolgte in Hybridisierungslösung bei 65°C für 4-6 Stunden. Die Hybridisierungstemperatur richtete sich nach dem Grad der Sequenz-übereinstimmung von Sonde und Ziel-DNA. Homologe Sonden wurden bei 70°C und heterologe bei 63-65°C über Nacht inkubiert. Die Blots wurden mit 6 fachem NET bei Raumtemperatur gewaschen, bis keine Radioaktivität mehr im Waschpuffer nachgewiesen wurde.

3.19. Southern-Hybridisierung (mod. nach Sambrook et al., 1989)**Prähybridisierungslösung**

6x	SSPE (3.16.)
5x	Denhardt's (3.18.) ohne BSA
1/20	1:2 verdünntes Heringssperma 2mg/ml (Ultraschall behandelt)

Hybridisierungslösung: wie Prähybridisierungslösung, aber mit 3xSSPE

Spülpuffer

3x	SSPE
0,1%(w/v)	SDS

Die Prähybridisierung erfolgte bei der gewählten Hybridisierungstemperatur für 3-5 Stunden. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht, wobei die Temperaturen wie in 3.18. gewählt werden. Der Blot wurde bei Hybridisierungstemperatur gewaschen, bis keine Strahlung mehr im Spülpuffer nachgewiesen werden konnte.

3.20. RNA-Isolierung aus Cyanobakterien (mod. nach Golden et al., 1987)

Lysepuffer		TE 50/100	
10ml	TE 50/100	50mM	Tris
0,05ml	Triton X-100	100mM	EDTA
0,2 ml	25 % (w/v) N-Lauroylsarkosin	pH 8,0	
0,2ml	20 % (w/v) SDS		

Die Zellen aus 160ml einer exponentiell wachsenden Kultur wurden pelletiert und in 5ml TE 50/100 resuspendiert. Es wurde 1ml Chloroform hinzugefügt und der Ansatz wurde 5min auf Eis bei gelegentlichem Mischen inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 10000xg abzentrifugiert und in 5ml Lysepuffer aufgenommen. Es wurden 3g säuregewaschene, sterile 0,45mm Glasperlen und 5ml Tris-gesättigtes Phenol hinzugegeben. Die Zellen wurden durch dreimal drei Minuten auf einem maximal eingestellten Vortexer mit ebensolangen Pausen auf Eis aufgebrochen. Die Phasen wurden durch eine 10 min Zentrifugation bei 10000xg getrennt. Die obere Phase wurde noch zweimal mit Phenol/Chloroform (1:1) und zweimal Chloroform extrahiert. Die Nukleinsäuren wurden mit Na-Acetat und Ethanol ausgefällt, für 10 min bei 10000xg pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in 1ml TE (3.4.) rückgelöst. Die RNA wurde selektiv mit Lithiumchlorid in einer Endkonzentration von 2M über Nacht ausgefällt, 20 min bei 10000xg abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in 100µl TE gelöst. Die Konzentration wurde spektroskopisch bestimmt, wobei eine $OD_{260} = 1$ einer Konzentration von 40µg/ml RNA entsprechen.

Alternativ wurde die RNA aus Cyanobakterien auch mittels des Peqlab RNA Gold Kits präpariert. Die Elektrophorese erfolgte nach Lehrach et al., 1977 ohne Veränderung des Protokolls.

3.21. Transformation von Cyanobakterien (mod. nach Williams, 1986)

Die Anzucht der Kulturen sowie die anschließende Segregation erfolgten unter mixotrophen Bedingungen (3.2.). Zur Transformation von *Synechocystis* sp. PCC6803 wurden logarithmisch wachsende Wildtypzellen zu einer $OD_{730} = 2,5$ aufkonzentriert und 400µl davon transformiert. Im Falle von *Synechococcus* sp. PCC7002 wurde 1ml einer Kultur der $OD_{550} = 1,6-2,0$ verwendet. Die Zellen wurden mit 5-10µg DNA für 5h bei 30°C und 5µE Lichtintensität unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Zur Transformation eignet sich in Vektoren klonierte DNA in cirkulärer oder linearer Form. Befand sich die

DNA in TE-Puffer, stellte sie höchstens 1/10 des Ansatzes stellen, um die Verfügbarkeit ausreichender Mengen an Magnesium sicher zu stellen. Anschließend wurden die Zellen der Transformationsansätze auf die entsprechenden, nicht selektierenden Platten ausplattiert und für 2-3 Tage bei für den jeweiligen Stamm niedrigen Lichtbedingungen (3.2.) gehalten. Zur Selektion der transformierten Klone wurden die Platten dann mit 0,8% (w/v) Top-Agar überschichtet, der das entsprechende Antibiotikum enthielt. Für *Synechocystis* sp. PCC6803 wurde Agar in Wasser mit Kanamycin verwendet, so daß sich eine Endkonzentration der Platte von 50µg/ml ergab. *Synechococcus* sp. PCC7002 Transformanden wurden mit Agar in A⁺-Medium (3.2.2.) überschichtet, der Kanamycin zu einer Endkonzentration von 100µg/ml bzw. Streptomycin zu einer Endkonzentration von 50µg/ml enthielt. Sobald einzelne Kolonien auf den Platten sichtbar wurden, könnten diese zur Segregation in Flüssigmedium überführt werden. Diese durchliefen mindestens fünf Verdünnungszyklen, wobei die Kanamycinkonzentration in *Synechococcus* Kulturen auf 200µg/ml gesteigert wurde. Am Ende der Segregationsphase wurden die Zellen auf selektierende Platten ausgestrichen. Von den entstehenden Einzelkolonien wurde DNA präpariert (3.4. und 3.5.) und die Segregation der Mutation durch Hybridisierung (3.18.) überprüft.

3.22. Spektroskopische Chlorophyll- und Phycocyaninbestimmung

(Collier& Grossmann, 1992)

Chlorophyll kann photometrisch aus intakten Zellen durch folgende Formel bestimmt werden:

$$0,01494 (A_{680}-A_{750}) - 0,000615 (A_{620}-A_{750}) = \text{mgChl/ml}$$

Für die Phycocyaninbestimmung wurde die Kultur vor und nach einer 8 min Inkubation bei 75°C gemessen und dann mit folgender Formel der relative Gehalt bestimmt:

$$(A_{620}-A_{750}) - (A_{620}-A_{750} \text{ erhitzt}) = \text{rel. PC/ml}$$

Es handelt sich um einen relativen Wert, da das Phycocyanin in den Zellen in Phycobilisomen vorliegt, in denen sich auch Allophycocyanin befindet, das auch einen kleinen Anteil der Absorption bei 620nm darstellt. Außerdem sind die Phycobilisomen Komplexe aus Pigmenten und Proteinen, die nicht alle innerhalb der Zelle homogen aufgebaut sind, wodurch die Absorption beeinflusst wird.

3.23. Chlorophyllbestimmung durch Methanolextraktion (mod. nach McKinney, 1941)

Die Chlorophyllkonzentration wurde in Methanol nach folgender Formel bestimmt:

$$A_{663}/82 = \text{mgChl/ml}$$

Zur Chlorophyllbestimmung wurden die Zellen einer 1ml Kultur abzentrifugiert und das Pellet wurde in 20 μ l Medium resuspendiert. Die Suspension wurde auf 1ml mit Methanol aufgefüllt und im Photometer ausgemessen.

3.24. Spektroskopische Untersuchung von Cyanobakterien

3.24.1 Absorptionsspektren

Die Kulturen wurden auf eine optische Dichte von 0,2-0,5 in Medium verdünnt und das Absorptionsspektrum wurde von 550-750nm in einem Zweistrahlsspektrophotometer aufgenommen.

3.24.2. 77K Fluoreszenzemissionsspektren

Logarithmisch wachsende Kulturen wurden geerntet und in 1/100 Volumen 25mM Hepes-Puffer (pH 7) resuspendiert. Es wurden entweder Zellen einer OD von 1 oder einer Chlorophyllmenge von 5 μ g in 1ml 60% Glyzerin (v/v) in Hepes-Puffer eingesetzt. Die Fluoreszenzemission wurde in einem Fluorospektrometer bei 77K in flüssigem Stickstoff in einem Bereich von 600-800nm im Abstand von 1nm gemessen. Zur Anregung des Chlorophylls wurde eine Wellenlänge von 440nm und für die Anregung der Phycobiosomen wurde eine Wellenlänge von 590nm gewählt.

3.25. Messung der Sauerstoffentwicklung

HN-Puffer

10mM	Hepes
30mM	NaCl
pH 7,1	

Die Zellen wurden abzentrifugiert und in HN-Puffer zu einer OD₇₅₀=2 resuspendiert. Wurde die Gesamtphotosynthese gemessen, wurde NaHCO₃ zu einer Endkonzentration von 2mM hinzugefügt. Die Photosystem II Aktivität wurde mit 1mM DCQB (in Methanol)

und 1mM $K_3Fe(CN)_6$ gemessen. Die Messung fand mit einer Sauerstoffelektrode vom Clark-Typ in einer auf 30°C temperierten Küvette bei 1000 μ E Rotlicht statt und wurde mit Hilfe eines Schreibers dokumentiert. Zur Eichung wurde der gesamte Sauerstoff aus 1ml Wasser durch Zugabe von $Na_2S_2O_3$ entfernt.

3.26. Präparation von Gesamtproteinen aus Cyanobakterien

Die Zellen wurden geerntet und in 1ml/OD=13 PLG (3.28.) mit Hilfe eines Vortex oder Potters resuspendiert. Zur Lyse wurden die Zellen auf höchstens 50°C erhitzt, da sonst hydrophobe Membranproteine ausfallen. Intakte Zellen und Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und die Proteinkonzentration der Lysate wurde durch einen Proteintest bestimmt.

3.27. Proteinschnelltest (Stegemann et al., 1983)

Fixativ		Entfärber	
45%(v/v)	techn. Methanol	30%(v/v)	techn. Methanol
10%(v/v)	techn. Essigsäure	2,5%(v/v)	techn. Essigsäure

Färbelösung	
0,2%(w/v)	Serva Blau G-250 in Fixativ

Je 1 μ l einer Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin (0,05-1mg/ml) und 1 μ l der Probe wurden auf Chromatographiepapier pipettiert. Wenn die Proben vollständig eingetrocknet waren, wurde das Papier für 2 Minuten in Fixativ und 2-5 Minuten in Färbelösung geschwenkt. Die Entfärbung des Hintergrunds erfolgte zunächst mit Wasser und dann mit Entfärber.

3.28. Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese nach Lugtenberg (Lugtenberg et al. 1975)

Lösung II		Lösung IV	
750mM	Tris/HCl pH 8,8	250mM	Tris/HCl pH 6,8
0,4%(w/v)	SDS	0,2%(w/v)	SDS

Gel 30 Lösung (der Firma Roth mit Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1)

Proteinlösegemisch (PLG)		Laufpuffer	
104mM	Tris/HCl pH 6,8	25mM	Tris
16,7%(v/v)	Glyzerin	192mM	Glycin
8,3%(v/v)	β -Mercaptoethanol	0,1%(w/v)	SDS
3,3%(w/v)	SDS		
0,004%(w/v)	Bromphenolblau		

Bei den Lösungen II und IV handelte es sich um Zweifachpuffer, die Acrylamidlösung wurde gegebenenfalls mit Wasser verdünnt, um die gewünschte Konzentration zu erhalten. In dieser Arbeit wurden 12 oder 15% Trenngele sowie 5% Sammelgele verwendet. Für ein Gel der Größe 14x16cm wurde ein 28ml Trenngel angesetzt und mit 17,3 μ l TEMED und 116 μ l 10% (v/v) APS polymerisiert. Das Sammelgel hatte ein Volumen von 7,5ml und wurde mit 7,6 μ l TEMED und 80 μ l 10% (v/v) APS polymerisiert. Die Gelhöhe des Sammelgels betrug 1-1,5cm. Die Gele wurden über Nacht bei 4°C gelagert, bevor sie eingesetzt wurden. Die Proben wurden mindestens im Verhältnis 1:1 mit PLG versetzt und unlösliche Bestandteile wurden durch eine kurze Zentrifugation entfernt. Der Gellauf erfolgte bei 25-35mA und maximaler Spannung.

3.29. Färbung von Proteinen in PAA-Gelen

3.29.1. Coomassiefärbung

Färbelösung		Entfärber	
0,175%(w/v)	Serva Blau G-250	5%(v/v)	techn. Methanol
40%(v/v)	Methanol	7,5%(v/v)	techn. Essigsäure
10%(v/v)	Essigsäure		

Die Färbelösung wurde nach dem Ansetzen filtriert, um ungelöste Farbstoffe zu entfernen. Das Gel wurde 15-30min in der Färbelösung auf einem Taumeltisch inkubiert. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte ebenfalls auf dem Taumeltisch mit Entfärber, der mehrmals ersetzt wurde.

3.29.2. Silberfärbung (Blum et al., 1987)

Lösung I		Lösung II	
30%(v/v)	Methanol	0,2%(w/v)	AgNO ₃
12%(v/v)	Essigsäure	0,075%(v/v)	37% Formaldehyd

Lösung III

6% (w/v)

 $5 \cdot 10^{-2}$ % (v/v) $4 \cdot 10^{-4}$ % (w/v) Na_2CO_3

37% Formaldehyd

 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ **Lösung IV**

50% (v/v)

12% (v/v)

Methanol

Essigsäure

das Formaldehyd wurde den Lösungen immer frisch hinzugefügt

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Taumeltisch durchgeführt. Ein 1,5mm dickes Gel wurde mindestens 1 Stunde in Lösung I fixiert. Nach dreimal 20min in 30% Ethanol folgte eine Inkubation für 1min in 0,02% (w/v) Natriumthiosulfat. Das Gel wurde dreimal 20sek mit Wasser gewaschen und das Silbernitrat wurde durch 25-30min Inkubation in Lösung II aufgebracht. Es folgten zwei 2min Waschschrte mit Wasser, bevor die Färbung mit Lösung III bis zum gewünschten Färbungsgrad durchgeführt wurde. Die Farbentwicklung wurde mit Lösung IV gestoppt.

3.30. Proteinexpression im pET-System

Über Nacht wurde eine Vorkultur in LB-Medium bei 37°C (3.1.) angezogen, mit der am folgenden Tag das 10 fache Volumen dYT-Medium (3.1.) bei gleicher Temperatur angeimpft wurde. Bei einer $\text{OD}_{600}=0,6$ wurde die Proteinexpression mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert.

3.31. Zellfraktionierung von *E. coli* (mod. nach Sambrook et al., 1989)**Lysepuffer I**

50mM

100mM

1mM

Tris/HCl pH 8

NaCl

EDTA

Lysepuffer II

100mM

Tris/HCl pH 8

Lysepuffer III

0,5% (w/v)

Triton X-100 in Lysepuffer I

Die Zellen aus 1ml einer induzierten Kultur wurden pelletiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde nach Einfrieren über Nacht bei -80 °C in 1ml Lysepuffer I resuspendiert und die Suspension auf 1mg/ml Lysozym eingestellt, eine Stunde bei 28°C inkubiert und für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation stellte die Periplasmafraktion dar. Das Pellet wurde in 1ml Lysepuffer II resuspendiert, zweimal bei -20°C eingefroren und dazwischen bei Raumtemperatur aufgetaut. Es folgte eine Zentrifugation, deren Überstand die Cytoplasmaproteine enthält. Die Membranproteine

wurden aus dem restlichen Pellet durch 10 Minuten Inkubation bei 4°C in Lysepuffer III gelöst und befanden sich nach 5min Zentrifugation im Überstand. Die nicht aufgeschlossenen Zellen und die "inclusion bodies" der aufgeschlossenen Zellen bildeten das Pellet dieser Zentrifugation. Zur Analyse wurde des in 10µl unter 3.28. beschriebenem PLG aufgenommen. Die Proteine wurden aus den jeweils erhaltenen Überstände mit TCA ausgefällt und die in 10 µl PLG aufgenommen. Zur TCA-Fällung wurde die Probe auf 10% (w/v) TCA p.A. eingestellt und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die Proteine wurden bei 4°C 10 Minuten bei 12000xg abzentrifugiert.

3.32. Inclusion body Präparation

Lysepuffer I

50Mm	Tris/HCl pH 8
100mM	NaCl
1mM	EDTA

Lysepuffer II

8M	Harnstoff
0,1M	NaH ₂ PO ₄
0,01M	Tris
0,15M	NaCl
0,5%(w/v)	Nonidet NP-40
pH 8	

Die Zellen aus 40ml einer induzierten Kultur der OD₆₀₀ = 3 wurden pelletiert und das Pellet wurde über Nacht bei -70°C eingefroren. Die Zellen wurden in 3ml Lysepuffer I resuspendiert und durch Zugabe von 60µl Lysozymstammlösung (10mg/ml) für 1h auf Eis lysiert. Das doppelte Volumen eiskalten Wassers wurde hinzugegeben und die Suspension dann zweimal bei -20°C eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut. Es wurden 2,3ml 5M NaCl zu einer Endkonzentration von 1M und 1,3ml 5% (v/v) Triton X-100 zu einer Endkonzentration von 0,5% (v/v) dazugegeben und der Ansatz wurde für 15 min bei 4°C inkubiert. Die nun klare Lösung wurde 30min bei 4°C mit 10000xg zentrifugiert. Die im Pellet befindlichen inclusion bodies wurden in 4ml Lysepuffer II resuspendiert. Die DNA wurde mit einer Pipettenspitze herausgezogen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 30min und 10000xg bei Raumtemperatur wurde der Überstand, in dem sich die Proteine befanden, in ein neues Gefäß überführt.

3.33. Reinigung exprimierter His-tag-Proteine unter denaturierenden Bedingungen

Lysepuffer

8M	Harnstoff
0,1M	NaH ₂ PO ₄
0,01M	Tris
0,15M	NaCl
0,5%(w/v)	Nonidet NP-40
pH 8	

Waschpuffer

8M	Harnstoff
0,1M	NaH ₂ PO ₄
0,01M	Tris
0,15M	NaCl
0,5%(w/v)	Nonidet NP-40
pH 7	

Elutionspuffer D

8M	Harnstoff
0,1M	NaH ₂ PO ₄
0,01M	Tris
0,15M	NaCl
0,5%(w/v)	Nonidet NP-40
pH 5,9	

Elutionspuffer E

8M	Harnstoff
0,1M	NaH ₂ PO ₄
0,01M	Tris
0,15M	NaCl
0,5%(w/v)	Nonidet NP-40
pH 4,5	

Die "inclusion bodies" einer induzierten Kultur wurden nach 3.3.2. präpariert. Zu je 4ml Lysat wurde 1ml Ni-NTA Agaroselösung (Qiagen) hinzugegeben und 30min auf einem Drehteller langsam mit dem Lysat vermischt. Die Suspension wurde in eine Säule gegossen. Alternativ wurde das Lysat auf eine regenerierte und mit 4 fachem Volumen Lysepuffer äquilibrierte Säule entsprechender Größe gegeben. Die so beladene Säule wurde mit 4 fachem Volumen Waschpuffer gewaschen und mit viermal ½ Volumen Elutionspuffer E, gefolgt von viermal ½ Volumen Elutionspuffer D, eluiert. Die Fraktionen wurden auf einem SDS-Gel (3.28) analysiert. Befand sich das gesuchte Protein zum Teil in den Fraktionen des Puffers D, wurde die Elution mit Puffer E weggelassen und statt dessen mit 8 mal ½ Volumen D eluiert. Die Säule wurde mit 4 fachem Volumen 0,2 M Essigsäure, 4 fachem Volumen 30% Glycerin, gefolgt vom 4 fachen Volumen H₂O bidest., regeneriert und in 30% Ethanol gelagert.

3.34. Elektroelution von Proteinen aus SDS-Gelen

oberer Tankpuffer

192mM	Glycin
25mM	Tris
0,05%(w/v)	SDS
0,0025%(w/v)	Coomassie R250

Die Elektrophorese erfolgte nach 3.28. mit modifiziertem oberem Tankpuffer. Durch die Färbung im Gel umgeht man die Fixierung der Proteine, die bei nachträglichem Färben

notwendig ist und die Elution aus dem Gel stark behindert. Die Banden waren trotz des blauen Hintergrundes auf einem Leuchttisch gut sichtbar und wurden ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden bis zur Elution bei -20°C gelagert.

3.35. Elektroelution von Proteinen aus PAA-Gelen

Die BT1 Membran wurde durch Dialyseschlauch ersetzt, der 1 Stunde bei 60°C in 1% (w/v) NaHCO_3 inkubiert, mehrmals mit H_2O gewaschen und 1 Stunde bei ebenfalls 60°C mit 0,1% (w/v) SDS behandelt wurde. Er wurde in 0,1% (w/v) SDS bei Raumtemperatur gelagert. Die Elektroelution erfolgte in einer Elutrap Kammer der Firma Schleicher und Schüll in dem vom Hersteller beschriebenen Aufbau bei 180V und max. Strom in Lugtenberg-Laufpuffer, bis das gesamte Protein aus den Gelstücken in den Sammelraum gewandert war. Dies war meist nach 3-5 Stunden der Fall. Die Proteinmenge wurde nach (3.27) oder durch Ausmessen der Farbdichte eines Coomassie gefärbten (3.29.) SDS-Gels (3.28.) im Vergleich zu einer Eichreihe von BSA durch einen Scanner bestimmt.

3.36. Elektrotransfer von Proteinen (Towbin et al., 1979)

Transferpuffer

25mM	Tris
192mM	Glycin
20%(v/v)	techn. Methanol

Die Proteine wurden aus 1,5 mm dicken Gelen in einem Tankblotter mit Plattenelektroden unter ständigem Durchmischen im Kühlraum bei 10V und maximalem Strom in 15h auf Nitrozellulose geblottet.

3.37. Färbung von Proteinen auf Nitrozellulose mit Ponceau S

Färbelösung

0,2%(w/v)	Ponceau S in 3% (w/v) TCA
-----------	---------------------------

Die Nitrozellulose wurde einige Minuten in Färbelösung geschwenkt und danach in destilliertem Wasser so lange inkubiert, bis sich der Hintergrund entfärbt hatte und die angefärbten Proteine gut sichtbar waren. Die Entfärbung der Proteine wurde durch Waschen in TBS (3.38.) erreicht.

3.38. Immunodetektion (Qiagen-Protokoll)**TBS**

20mM Tris/HCl pH 7,5
150mM NaCl

TBS-Tween/Triton

20mM Tris/HCl pH 7,5
500mM NaCl
0,05%(v/v) Tween
0,2%(v/v) Triton X-100

Absättigungslösung

3%(w/v) BSA in TBS

Alle Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur auf einem Taumeltisch. Die Nitrozellulose wurde zweimal 10min mit TBS gewaschen und 1 Stunde abgesättigt. Sie wurde dann zweimal 10 min. mit TBS-Tween-Triton und einmal mit TBS gewaschen. Die Penta-His Antikörperlösung (0,1mg/ml) wurde 1:2000 in Absättigungslösung verdünnt und für eine Stunde mit dem Blot inkubiert. Es wurde erneut mit TBS-Tween-Triton und TBS gewaschen und für eine Stunde mit 1:2500 verdünntem Antimaus IgG-HRP-Konjugat (Promega) in Absättigungslösung inkubiert. Nichtgebundene Antikörper wurden durch viermal 10min Waschen mit TBS-Tween-Triton entfernt. Die Färbung erfolgte nach 3.40.

3.39. Immunodetektion (Towbin et al., 1975)**Absättigungslösung**

5%(w/v) Magermilchpulver
beides in TBS (3.38.)

Antikörperpuffer

1,7%(w/v) Magermilchpulver

Färbelösung I

3mg/ml 4-Chloro-1-Naphtol
in Methanol
(bei -20°C lagern)

Färbelösung II

30µl/50ml H₂O₂ in TBS

Alle Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur auf einem Taumeltisch. Die Absättigung erfolgte für eine Stunde. Dann wurde der Blot mit dem spezifischen Kaninchen-Serum, verdünnt in Antikörperpuffer, über Nacht inkubiert. Nach drei 10 min Waschschritten mit TBS erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper 1:2500 in Antikörperpuffer verdünnt. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper mit gekoppelter Meerrettich-Peroxidase der Firma Promega verwendet. Es wurde wiederum gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Die Farbentwicklung erfolgte ohne Taumelbewegung durch ein Gemisch von 10ml Färbelösung I und 50ml Färbelösung II und wurde durch Waschen mit Wasser gestoppt.

3.40. Immunisierung von Kaninchen (mod. nach Berzborn, 1980)

Die Primärimmunisierung erfolgte mit 80µg nach 3.33 präpariertem Protein, das mit sterilfiltriertem TBS (3.38.) auf 700µl aufgefüllt wurde. Mittels Ultraschall wurde die Antigenlösung mit 700µl inkompletten Freundschem Adjuvants zu einer Paste verarbeitet, die dem Kaninchen in mehreren Portionen intrakutan am Rücken injiziert wurde. Die erste Auffrischung erfolgte mit 100µg, die zweite mit 150µg und die dritte mit 270µg jeweils in vier Wochen Abstand. Zur Kontrolle des Antikörpertiters wurden Blutproben jeweils eine Woche nach einer Auffrischung genommen. Am 14. Tag nach der dritten Auffrischung erfolgte das Ausbluten der Tiere durch Eröffnung der Carotis unter Betäubung mit 50mg/ml Nembutal in 150mM NaCl. Das gewonnene Serum wurde sterilfiltriert bei -20°C eingefroren.

4. Ergebnisse

4.1. Insertionale Inaktivierung des ycf35

4.1.1. Konstrukte zur ycf35-Inaktivierung in *Synechocystis* sp. PCC6803 und *Synechococcus* sp. PCC7002

Aus chromosomaler DNA von *Synechocystis* sp. PCC6803 (3.4.) wurde mit Hilfe der Primer 7-72 und 7-73 (2.4.1.) ein 452bp Fragment, das das ycf35 Gen enthielt, mittels PCR (3.7.) amplifiziert. Neben ycf35 waren in diesem Fragment stromaufwärts 8bp und stromabwärts 57bp flankierende, nicht kodierende Sequenzbereiche enthalten. Unter Verwendung der durch die Primer eingeführten EcoRI- (7-72) und PstI-Schnittstellen (7-73) wurde das PCR-Produkt in pUC18 inseriert und anschließend mittels Sequenzierung (3.15.) überprüft.

Die interne AvrII-Schnittstelle wurde zur Insertion der Kanamycinresistenzkassette genutzt. Hierzu wurden die Enden nach der Restriktion mittels Klenow-Fragment in glatte Enden umgewandelt. Auch die Kanamycinresistenzkassette, die durch Restriktion mit EcoRI und XhoI aus dem Vektor pKS-NPT ausgeschnitten wurde, wurde auf diese Weise mit glatten Enden versehen. Die Orientierung der Resistenz innerhalb des ycf35 wurde über eine Restriktionsanalyse mit HindIII überprüft und als gleichgerichtet bestimmt (siehe Abb. 2).

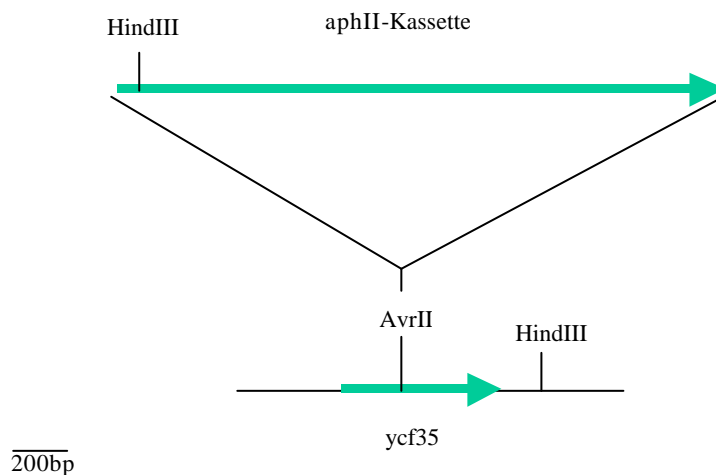


Abb. 2: Inaktivierungskonstrukt für den ycf35 von *Synechocystis*

Da es nicht möglich war, eine ycf35::KM Mutante von *Synechocystis* zu erzeugen, wurde der oftmals leichter transformierbare und schneller segregierende Stamm *Synechococcus* sp. PCC7002 als Alternative gewählt. Im Gegensatz zu *Synechocystis* liegt noch keine Gesamtsequenz des Genoms von *Synechococcus* vor, daher mußte der entsprechende

kodierende Bereich erst identifiziert und sequenziert werden. Dazu wurde *Synechococcus* DNA präpariert (3.5.), mit verschiedenen Enzymen restringiert und geblottet (3.16.). Zur Hybridisierung (3.18.) wurde das *Synechocystis* ycf35-PCR-Produkt radioaktiv markiert (3.17.). Ein Bereich von 3kb einer HindIII/BamHI-Restriktion, der mit der Sonde hybridisierte, wurde aus einem Gel eluiert (3.8.) und damit eine Klonbank in pUC19 erstellt. Es wurde eine Koloniehybridisierung mit dem *Synechocystis* PCR-Produkt durchgeführt (3.18.) und die Plasmid-DNA eines positiven Klons automatisch durch die Nucleic Acid Facility der Pennsylvania State University sequenziert (Primer unter 2.4.2.). Die Sequenz des 2940bp Klons (siehe Anhang A1) ist unter AF136577 in Genbank abgelegt worden. Die Karte des Klons ist in Abb. 3 dargestellt.

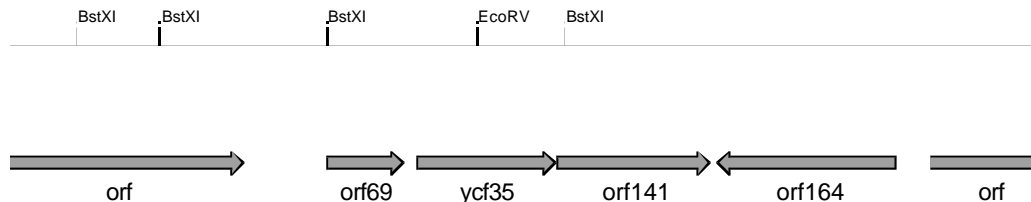


Abb. 3: Karte des ycf35 Klons von *Synechococcus*

Dem ersten orf fehlt der N-Terminus, so daß seine Größe nicht angegeben werden kann. Er zeigt Sequenzhomologien zu dem 783bp Leserahmen sll1367 von *Synechocystis*, der ein hypothetisches Protein kodiert und besitzt ein Motiv für die Bindung zyklischer Nukleotide (CNMP-Bindung 3: Prosite PS50042). Orf69 zeigt Sequenzhomologien zu ssl1263, der ein 80 Aminosäuren großes ebenfalls hypothetisches Protein kodiert. Orf141 ist homolog zu sll0662, einem Leserahmen, der ein 131 Aminosäuren umfassendes bakterielles Ferredoxin kodiert (Kaneko et al., 1996). Orf164 ist homolog zu sll0361. Die partielle Sequenz des letzten orf zeigt zu dem 339bp großen slr1039 von *Synechocystis* Homologien, der ein S-Adenosyl-L-Methionin Bindemotiv (SAM-Bindung: Prosite PS50193) aufweist, welches charakteristisch für Methyl-Transferasen ist. Die Alignments zu diesem Fragment befinden sich im Anhang (A2).

Da keine der im ycf35 befindlichen Schnittstellen singular in diesem Klon ist, wurde er mit BstXI geschnitten und das 659bp große ycf35-Fragment nach Klenow-fill-in in die SmaI-Schnittstelle von pUC19 inseriert. Eine mit HincII aus pRL161 ausgeschnittene aphII-Kassette wurde dann in die ycf35-interne EcoRV-Schnittstelle, die sich 156bp vom Startkodon entfernt befindet, eingesetzt. Das so entstandene Inaktivierungs-Konstrukt wurde zur Kontrolle durch die Nucleic Acid Facility (Pennsylvania State University)

sequenziert. Daraus ergab sich eine komplementäre Orientierung des Resistenzgens (siehe Abb. 4).

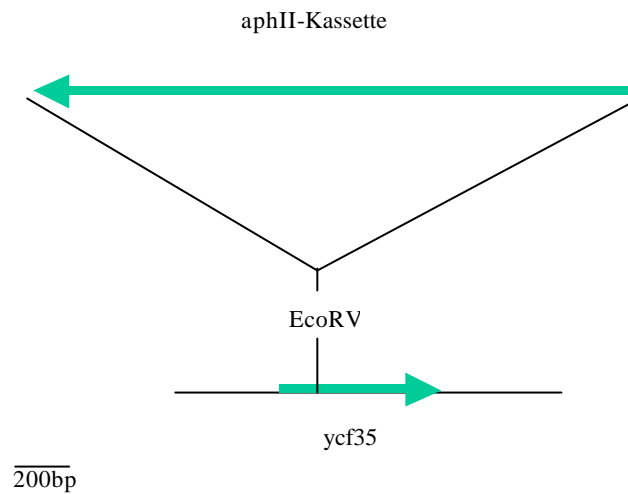


Abb. 4: Inaktivierungskonstrukt für den ycf35 von *Synechococcus*

4.1.2. Segregation der ycf35::KM Mutation in *Synechococcus* sp. PCC7002

Synechococcus sp. PCC7002 Wildtyp wurde mit dem unter 4.1.1. beschriebenen Konstrukt transformiert (3.21.). Die vollständige Segregation der Mutation wurde durch Hybridisierung (3.18.) der BstXI geschnittenen DNA mit dem *Synechocystis* ycf35 PCR-Produkt bestätigt (Abb. 5). Durch die Insertion der 1362bp großen Resistenzkassette vergrößerte sich das BstXI Fragment von den 665bp des Wildtyps auf 2027bp bei der Mutante. Da kein Signal in Wildtyphöhe im ycf35::KM Stamm detektierbar war, wurde der Leserahmen in diesem Stamm vollständig inaktiviert. Der auf diese Weise generierte Stamm kann durch die Analyse seines Phänotyps Aufschluß über die Funktion des inaktivierten Leserahmens liefern.

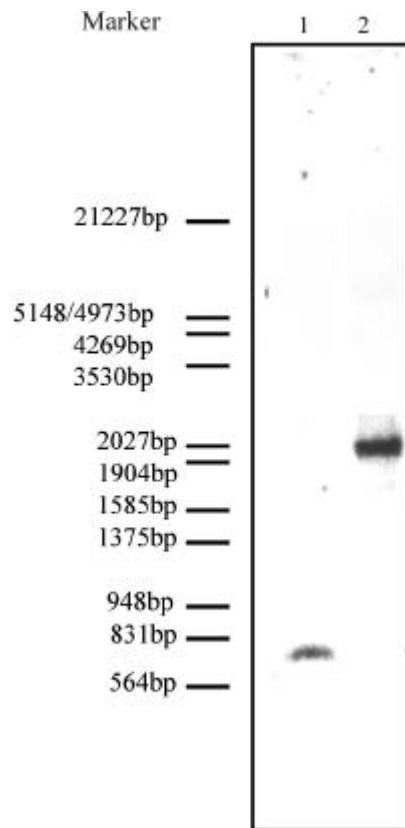


Abb. 5: Autoradiogramm der Hybridisierung zur Segregationskontrolle der *ycf35::KM* Mutation

Spur 1: 10µg *Synechococcus* WT DNA mit BstXI geschnitten

Spur 2: 10µg *Synechococcus ycf35::KM* DNA mit BstXI geschnitten

4.1.3. Wachstumseigenschaften der *Synechococcus* sp. PCC7002 *ycf35::KM* Mutante

Das Wachstum der Kulturen wurde durch Messen der optischen Dichte bei 550nm dokumentiert. Jeder Meßwert repräsentiert die Werte zweier paralleler Kulturen. Neben den optimalen Bedingungen (Abb. 6) wurden verschiedene Wachstumssituationen untersucht, die einen Hinweis auf die Funktion des ausgeschalteten Leserahmens geben können. Der *Synechococcus ycf35::KM* Stamm zeigte sowohl bei Belüftung mit CO₂ als auch bei Kultivierung auf einem Schüttler keine signifikanten Unterschiede zum WT. Auch suboptimale Beleuchtung (Abb. 7) oder eine von 39°C auf 25°C erniedrigte Wachstumstemperatur hatten keinen nennenswerten Einfluß.

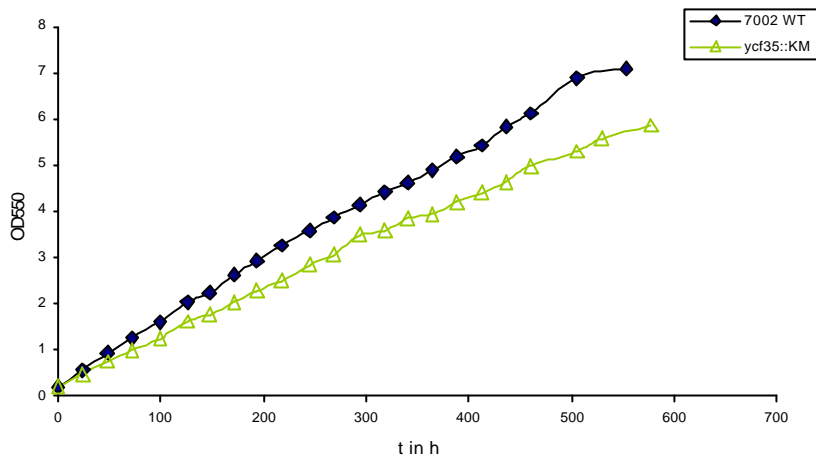


Abb. 6: Photoautotrophes Wachstum von *Synechococcus* WT und *ycf35::KM* bei 250 μ E

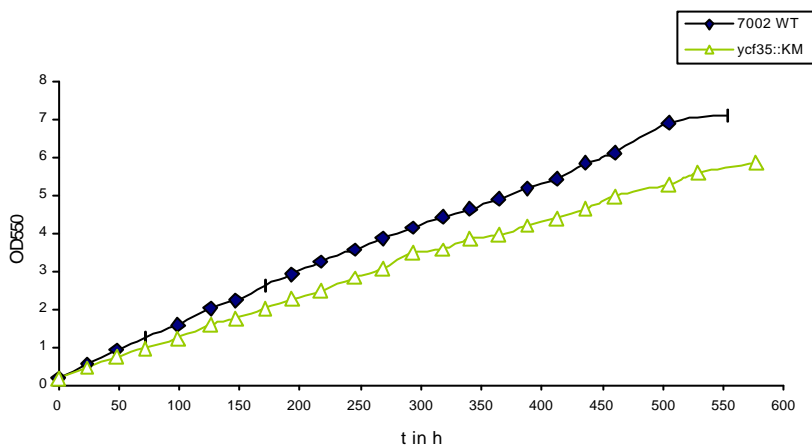


Abb. 7: Photoautotrophes Wachstum von *Synechococcus* WT und *ycf35::KM* bei 30 μ E

4.1.4. Chlorophyll- und Phycocyaningehalt im Vergleich zum Wildtyp

Da die Pigmentzusammensetzung bei photoautotrophen Organismen Auskunft über den physiologischen Status einer Zelle geben kann, wurden Chlorophyll- und Phycocyaningehalte exponentiell wachsender Kulturen spektroskopisch nach 3.22. bestimmt und in Tabelle 1 mit dem Wildtyp verglichen. Alle Einzelwerte stammen von unabhängigen Kulturen und wurden auf die optische Dichte bezogen. Unter Berücksichtigung der Standard- und Mittelwertabweichung zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *ycf35::KM* Mutante.

Tab. 1: Vergleich der Chlorophyllgehalte

	Wildtyp	ycf35::KM
Mittelwert	$7,3035 \times 10^{-3}$ mg/OD	$7,3505 \times 10^{-3}$ mg/OD
Standardabweichung	0,2816	0,2636
Mittelwertabweichung	0,2334	0,1937
Anzahl der Meßwerte	28	27

Tab. 2: Vergleich der Phycocyaningehalte; Phycocyanin ist in relativen Mengen angegeben

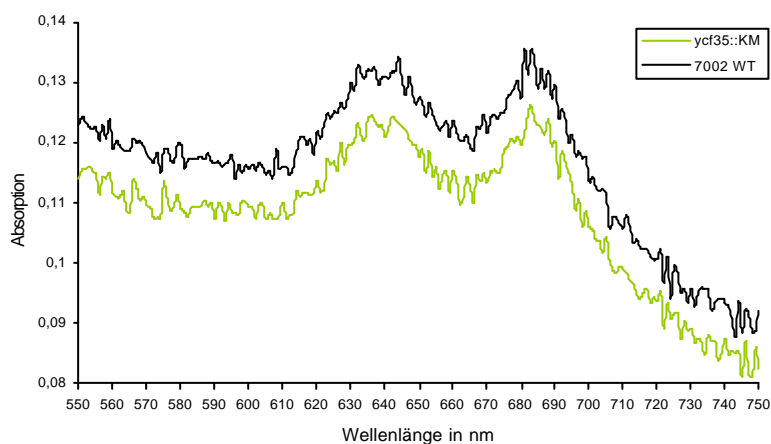
	Wildtyp	ycf35::KM
Mittelwert	0,1664/OD	0,1654/OD
Standardabweichung	0,0352	0,0312
Mittelwertabweichung	0,0315	0,0265
Anzahl der Meßwerte	44	44

4.1.5. Spektroskopische Untersuchung der *Synechococcus* sp. PCC7002 ycf35::KM

Mutante

4.1.5.1. Absorptionsspektren

Die Messung erfolgte in einem Zweistrahl-Photometer im jeweiligen Medium, jeder Wert resultiert aus einer Doppelbestimmung. Die Kulturen wurden bei einer Lichtintensität von $250\mu\text{E}$ angezogen.

Abb. 8: Absorptionsspektren von *Synechococcus* WT und ycf35::KM

Die Absorptionsspektren (nach 3.24.1.) zeigen, daß Menge und Verhältnis von Phycocyanin (630-650nm) und Chlorophyll (685-690nm) durch die Inaktivierung des *yfc35* unverändert bleiben (Abb. 8). Das Ergebnis der Phycocyanin- und Chlorophyll-Messungen unter 4.1.4. wird durch diese Daten abgesichert.

4.1.5.2. Fluoreszenz-Emissionsspektren

Licht der Wellenlänge 440nm regt die Chlorophylle der Photosysteme an, wobei die Emission der PSI-Chlorophylle bei 715nm und die der PS II-Chlorophylle bei 685nm und 695nm liegt. Von den beiden PS II Maxima wird die Fluoreszenzemission bei 685nm dem CP43 gebundenen Chlorophyll zugerechnet und das Maximum bei 695nm dem Reaktionszentrumschlorophyll bzw. Interaktionen unter funktionalen PS II-Komponenten (Dzelkalns & Bogorad, 1989). Mit 590nm werden die Phycobilisomen (vergl. Abb.1A in der Einleitung, wobei *Synechococcus* sp. PCC7002 kein Phycoerythrin besitzt) angeregt, woraus die Emissionen von Phycocyanin bei 650nm, Allophycocyanin bei 665nm und die des PS II als ganzem bei 685nm resultieren.

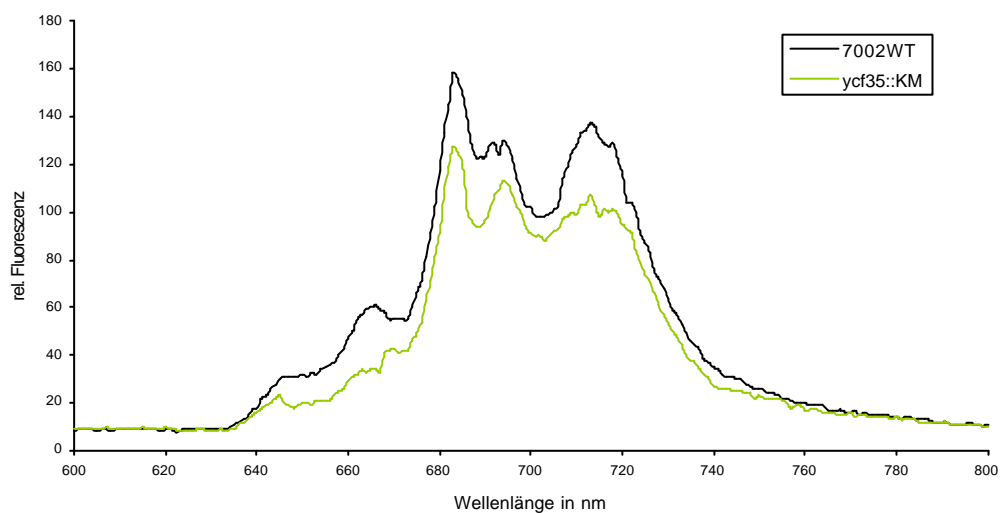


Abb. 9: Fluoreszenz-Emissionsspektren von *Synechococcus* WT und *yfc35::KM* bei 440nm Anregungswellenlänge; eingesetzte Zellmenge entspricht einer $OD_{550}=1$

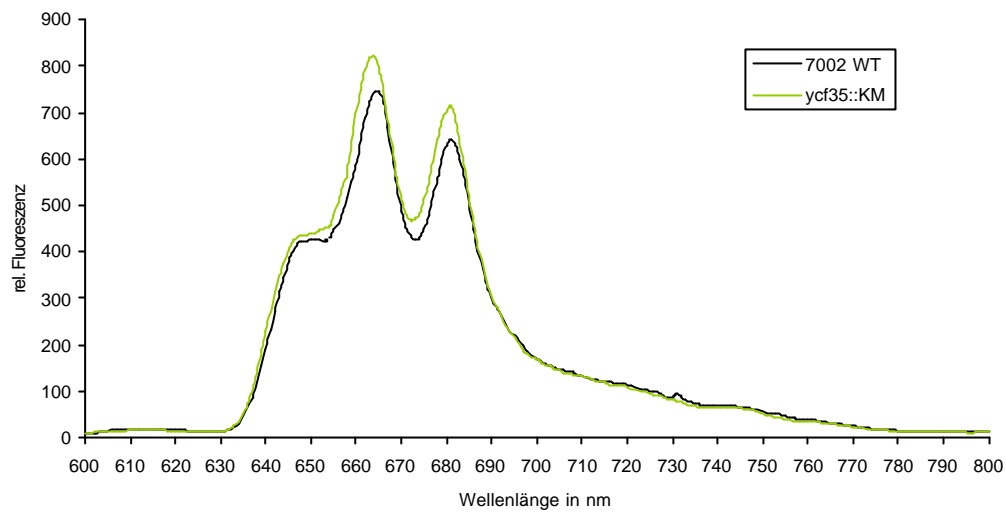


Abb. 10: Fluoreszenz-Emissionsspektren von *Synechococcus* WT und ycf35::KM bei 590nm Anregungswellenlänge; eingesetzte Zellmenge entspricht einer $OD_{550}=1$

Aufgrund der Fluoreszenz-Emissionsspektren (nach 3.24.2.) läßt sich sagen, daß sowohl Komposition als auch Funktion der Photosysteme durch die Inaktivierung des ycf35 nicht beeinflußt wurden.

4.1.6. Proteinkomposition der *Synechococcus* ycf35::KM Mutante

Neben den vorangegangenen physiologischen Untersuchungen könnte auch das Fehlen oder Überexprimieren von Proteinen einen Hinweis auf die Funktion des ycf35 geben. Es wurden daher Gesamtlysate nach 3.2.6. hergestellt, auf einem PAA-Gel nach Lugtenberg (3.28.) aufgetrennt und zur Analyse mit Silber gefärbt (3.29.2.).

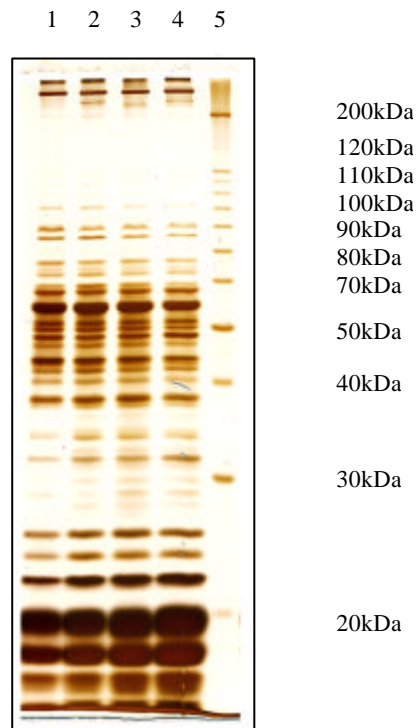


Abb. 11: Silbergefärbtes SDS-Gel der Gesamtlysate der *Synechococcus* Stämme
Spur 1: 9µg *Synechococcus* WT Proteine
Spur 2: 9µg *Synechococcus* ycf35::KM Proteine
Spur 3: 9µg *Synechococcus* ycf36::KM Proteine
Spur 4: 9µg *Synechococcus* ycf35::Ωycf36::KM Proteine
Spur 5: 4µl 10kDa Leiter

Die Proteinkomposition der ycf35::KM Mutante zeigte sowohl in einem silbergefärbten (Abb. 11) als auch einem Coomassie gefärbten Gel (ohne Abb.) keinen Unterschied zum Wildtyp.

4.2. Insertionale Inaktivierung des ycf36

4.2.1. Konstrukt zur ycf36-Inaktivierung in *Synechococcus* sp. PCC7002

Ein Klon, der den *Synechococcus* ycf36 und einen zu sl0585 homologen Leserahmen enthielt, wurde mir von Gaozhong Shen (Pennsylvania State University) zur Verfügung gestellt (Abb. 12). Es handelt sich um einen Subklon des unter AF05229 in Genbank abgelegten Klons.

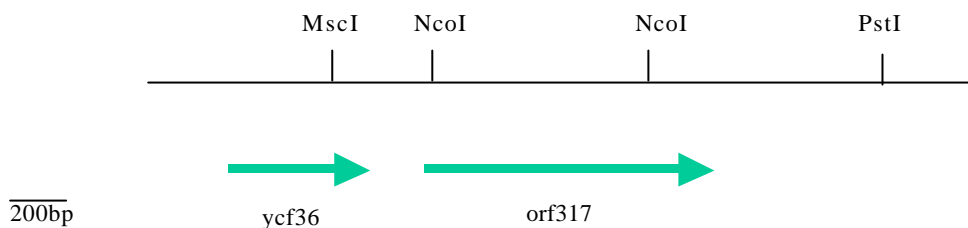


Abb. 12: Karte des ycf36 Klons

Durch eine NcoI/PstI Restriktion wurde der orf317 entfernt, der restliche Vektor mit dem ycf36 aus einem Gel eluiert (3.8.) und nach Auffüllen der Enden mittels Klenow-Fragment religiert. In die interne MscI-Schnittstelle, die 346bp vom Startkodon entfernt liegt, wurde die mit HincII aus pRL161 herausgeschnittene Kanamycinresistenzkassette inseriert. Die Orientierung wurde durch eine Restriktion mit HindIII und BglII überprüft und ein Klon mit komplementär zum ycf36 inserierter Resistenz ausgewählt (Abb. 13).

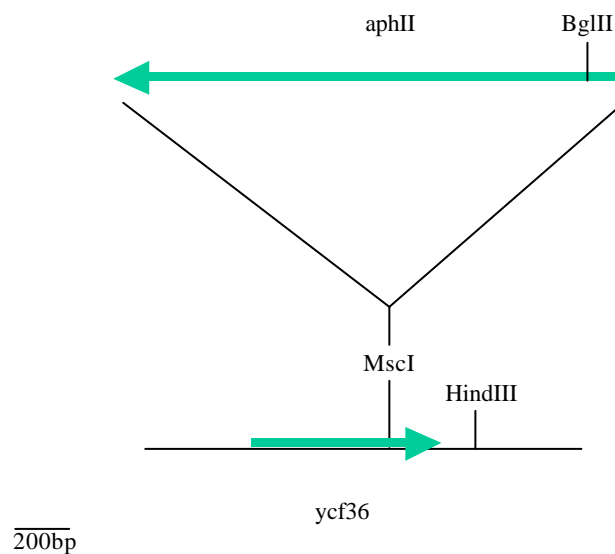


Abb. 13: Inaktivierungsstrategie für den ycf36 in *Synechococcus*

4.2.2. Segregation der ycf36::KM Mutation in *Synechococcus* sp. PCC7002

Synechococcus sp. PCC7002 wurde mit dem oben dargestellten Konstrukt transformiert (3.21.) und die vollständige Segregation der Mutation nach Restriktion der DNA mit BstXI durch Hybridisierung (3.18) mit dem *Synechococcus* ycf36-BstXI Subklon bestätigt (Abb. 14).

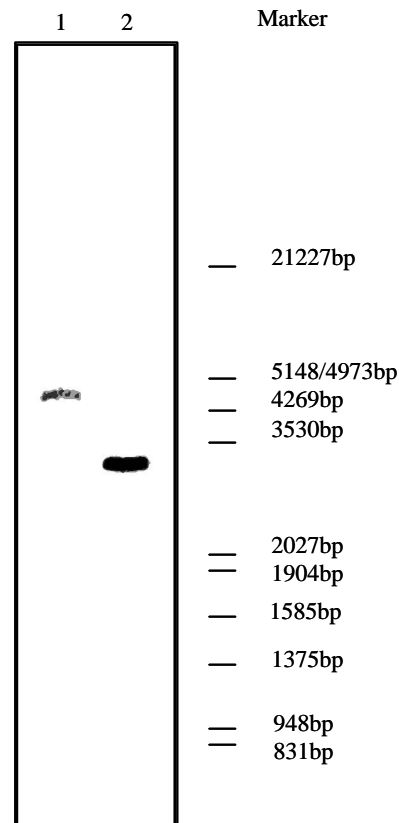


Abb. 14: Autoradiogramm der Hybridisierung zur Segregationskontrolle der ycf36:: Mutation

Spur 1: 10µg *Synechococcus* ycf36::KM DNA mit BstXI geschnitten

Spur 2: 10µg *Synechococcus* WT DNA mit BstXI geschnitten

Durch die Insertion der 1362bp großen Resistenzkassette vergrößerte sich das BstXI Fragment von den 3400bp des Wildtyps auf 4762bp bei der Mutante, die kein Wildtypsignal mehr aufwies.

4.2.3. Wachstumseigenschaften der *Synechococcus* sp. PCC7002 ycf36::KM Mutante

Wie für den ycf35::KM Stamm wurde das Wachstum unter optimalen (3.2.2.) und niedrigen Lichtbedingungen sowie bei Nitrat-, Phosphat-, Eisen-, Magnesium und Calciummangel gemessen. Nitratmangel bedeutet 5mM statt 12mM NaNO₃, ansonsten jeweils 1/10

der normalen Konzentration. Unter diesen Bedingungen verhielt sich die *ycf36::KM* Mutante wie der Wildtyp (Abb. 15 und 16). Es zeigte sich auch kein Unterschied im Wachstumsverhalten bei Belüftung mit 1% (v/v) CO₂ oder Schütteln oder einer Erniedrigung der Wachstumstemperatur von 39°C auf 25°C.

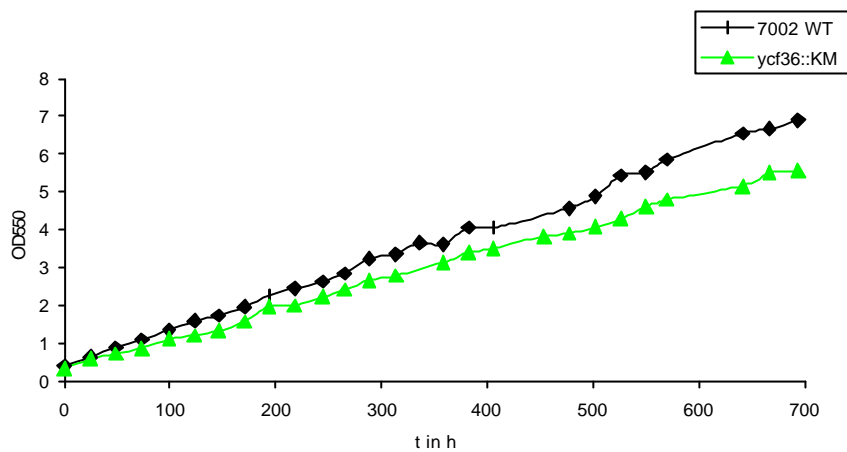


Abb. 15: Photoautotrophes Wachstum von 7002 WT und *ycf36::KM* bei 70 μ E

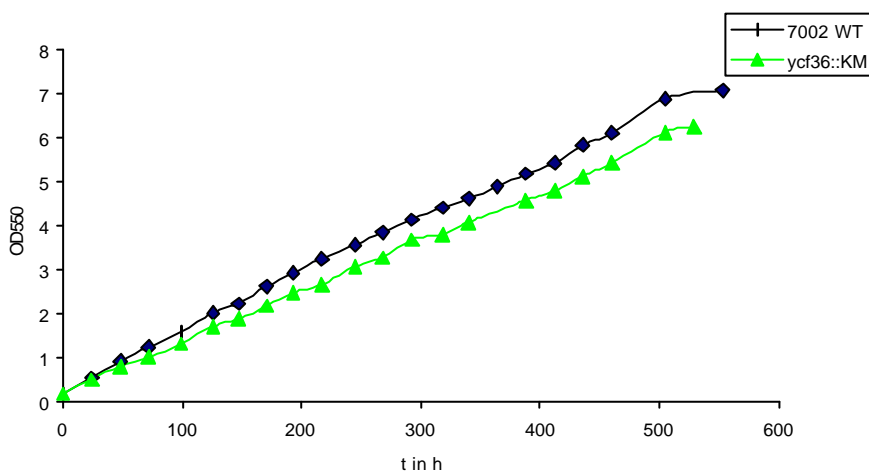


Abb. 16: Photoautotrophes Wachstum von *Synechococcus* WT und *ycf36::KM* bei 30 μ E

4.2.4. Chlorophyll- und Phycocyaningehalt im Vergleich zum Wildtyp

Der Chlorophyll- und Phycocyaningehalt exponentiell wachsender Kulturen wurde wie für den *ycf35::KM* Stamm (3.22.) ermittelt. Unter Berücksichtigung der Standard- und Mittelwertabweichung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *ycf35::KM* Mutante (Tab. 3 und 4).

Tab. 3: Vergleich der Chlorophyllgehalte

	Wildtyp	ycf36::KM
Mittelwert	$7,3035 \times 10^{-3}$ mg/OD	$7,2136 \times 10^{-3}$ mg/OD
Standardabweichung	0,2816	0,2852
Mittelwertabweichung	0,2334	0,2087
Anzahl der Meßwerte	28	27

Tab. 4: Vergleich der Phycocyaningehalte

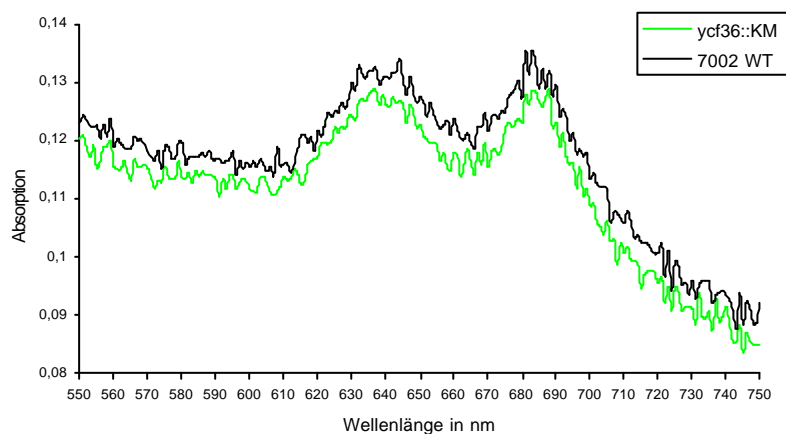
	Wildtyp	ycf36::KM
Mittelwert	0,1664/OD	0,1685/OD
Standardabweichung	0,0352	0,0393
Mittelwertabweichung	0,0315	0,0326
Anzahl der Meßwerte	44	47

4.2.5. Spektroskopische Untersuchung der *Synechococcus* sp. PCC7002 ycf36::KM

Mutante

Die Spektren wurden wie unter 3.24. beschrieben aufgezeichnet.

4.2.5.1. Absorptionsspektren

Abb. 17: Absorptionsspektren von *Synechococcus* WT und ycf36::KM nach Wachstum bei 250 μ E

Sowohl die Absorptionen von Phycocyanin (630-650nm) als auch von Chlorophyll (685-690) stimmten in Größe und Verhältnis zueinander bei Wildtyp und Mutante überein, wodurch die Meßwerte der Pigmentbestimmungen unter 4.2.4. bestätigt wurden.

4.2.5.2. Fluoreszenz-Emissionsspektren

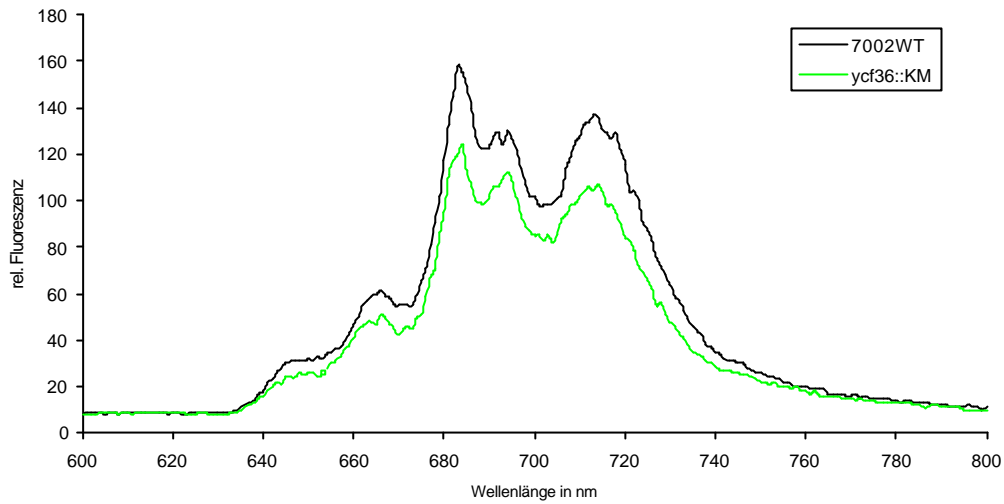


Abb. 18: Fluoreszenz-Emissionsspektren von *Synechococcus* WT und ycf36::KM bei 440nm Anregungswellenlänge; eingesetzte Zellmenge entspricht einer $OD_{550}=1$

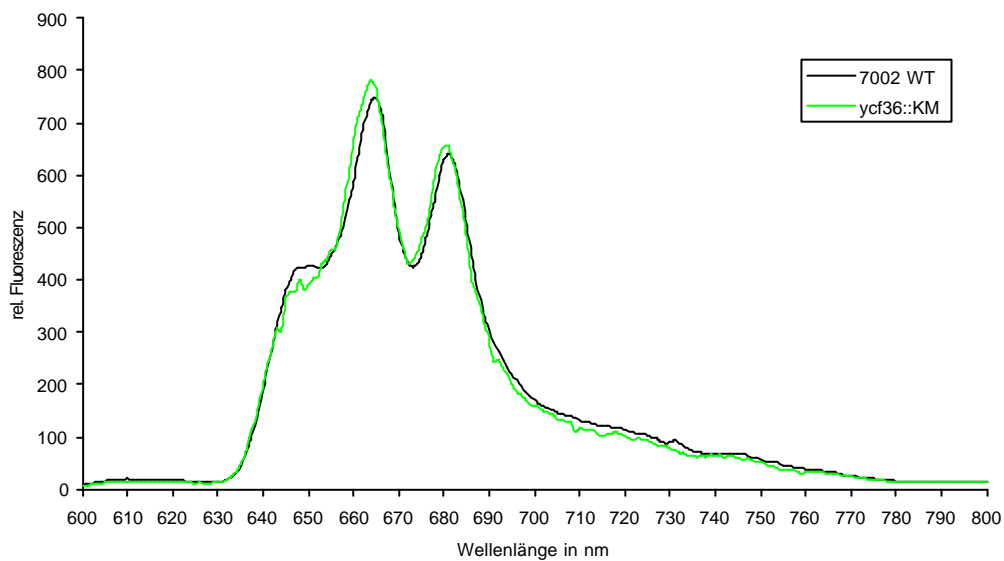


Abb. 19: Fluoreszenz-Emissionsspektren von *Synechococcus* WT und ycf36::KM bei 590nm Anregungswellenlänge; eingesetzte Zellmenge entspricht einer $OD_{550}=1$

Die Fluoreszenz-Emissionsspektren (Abb. 18 und 19) deuten auf keine Veränderungen des photosynthetischen Elektronentransportes im Vergleich zum Wildtyp hin.

4.2.6. Proteinkomposition der *Synechococcus* ycf36::KM Mutante

In dem in Abb. 11 unter 4.1.6. gezeigten SDS-Gel ist keine Veränderung der Proteinzusammensetzung aufgrund der Inaktivierung des ycf36 zu erkennen. Auch in einem Coomassie gefärbten Gel (ohne Abb.) zeigten sich keine Unterschiede.

4.3. Die *Synechococcus* sp. PCC7002 ycf35:: Ω ycf36::KM Doppelmutante

Sowohl die ycf35::KM als auch die ycf36::KM Mutante wies keinen Unterschied zum Phänotyp des Wildtyps auf. Die Photosynthese wurde in beiden Mutanten durch die Inaktivierung des jeweiligen ycf's nicht beeinträchtigt. Eine Funktion in Biogenese oder Aufrechterhaltung bzw. Optimierung des Photosynthesapparates kann also für beide Ycf's ausgeschlossen werden. Sie könnten aber beide gemeinsam an einem anderen zellularen Prozeß teilhaben oder in miteinander verknüpften Reaktionen fungieren. Daher sollten in einer Doppelmутante synergistische Effekte untersucht werden, die durch die gleichzeitige Inaktivierung auftreten können.

4.3.1. *Synechococcus* sp. PCC7002 ycf35:: Ω Konstrukt

Wie für das ycf35::KM Konstrukt (4.1.1. Abb. 4) wurde auch für die Inserierung des Streptomycinresistenz vermittelnden Ω -Fragmentes die EcoRV-Schnittstelle genutzt, in die das mit SmaI aus dem Vektor pH45 Ω geschnittene Ω -Fragment inseriert wurde. Das Konstrukt wurde durch Sequenzierung (3.15.) überprüft und so die Orientierung des Resistenzgens als gegenläufig bestimmt.

4.3.2. Segregation der ycf35:: Ω Mutation in *Synechococcus* sp. PCC7002 ycf36::KM

Der ycf36::KM Stamm wurde mit dem ycf35:: Ω Konstrukt transformiert (nach 3.21.) und die Segregation durch Hybridisierung (3.19.) der BstXI geschnitten DNA mit dem ycf35-BstXI-Subklon kontrolliert und bestätigt (Abb. 20).

Die Hybridisierung zeigte, daß die vollständig segregierte Doppelmutante anstelle des 665bp ycf35-Fragments des Wildtyps nur noch das durch die Insertion der 2kb großen Streptomycinresistenzkassette auf 2665bp vergrößerte Fragment enthielt.

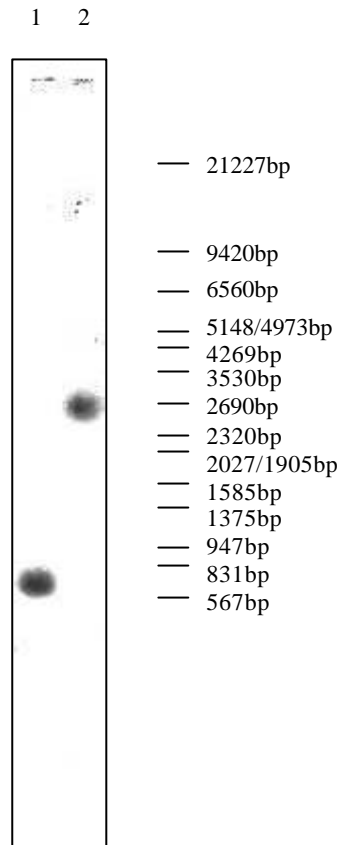


Abb. 20: Hybridisierung zur Segregationskontrolle der *ycf35::Ω* Mutation in *Synechococcus ycf36::KM*;
 Spur 1: 10µg *Synechococcus* WT DNA BstXI geschnitten
 Spur 2: 10 µg *Synechococcus ycf35::Ω ycf36::KM* Mutanten DNA BstXI geschnitten

4.3.3. Wachstumseigenschaften der *Synechococcus* sp. PCC7002 *ycf35::Ω ycf36::KM* Mutante

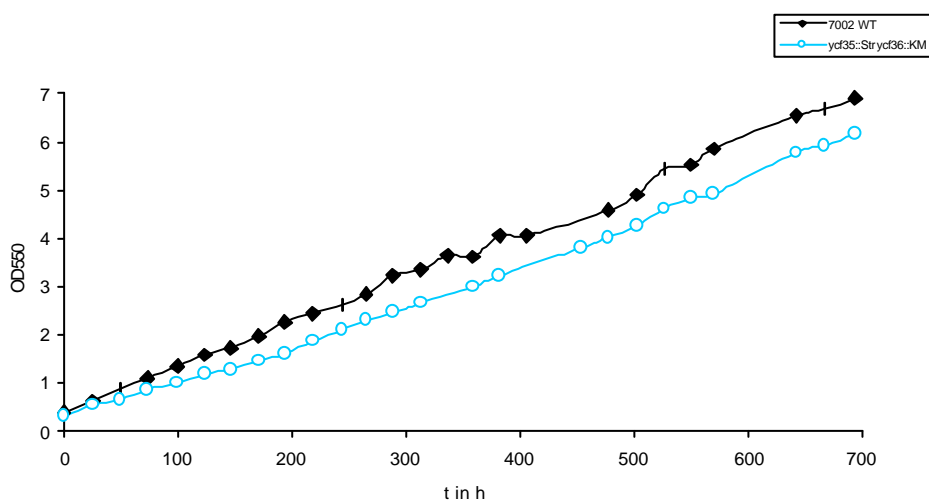


Abb. 21: Wachstum von *Synechococcus* WT und *ycf35::Ω ycf36::KM* Mutante bei 70µE

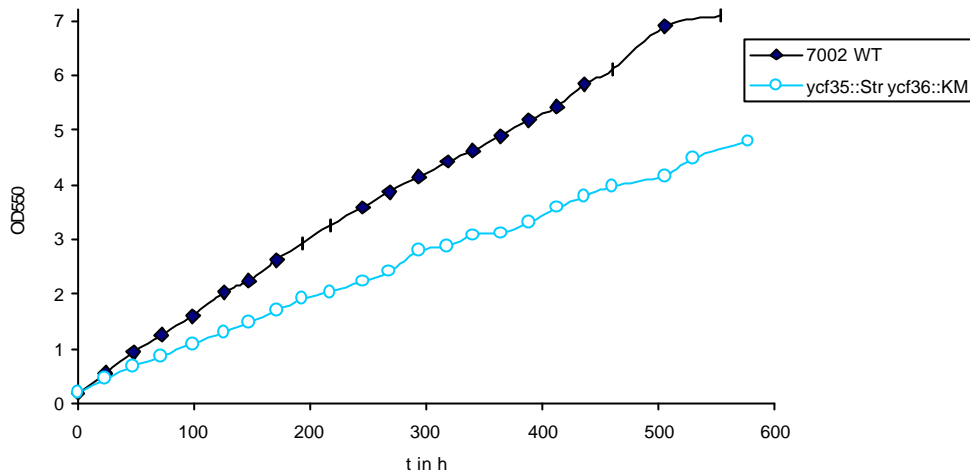


Abb. 22: Wachstum von *Synechococcus* WT und *ycf35::Ω ycf36::KM* Mutante bei $30\mu\text{E}$

Die gleichzeitige Inaktivierung von *ycf35* und *ycf36* führte zu deutliche eingeschränktem Wachstum bei niedriger Lichtintensität von $30\mu\text{E}$ (Abb. 22). Eine geringe Wachstumstemperatur von 25°C hat keinen Einfluß auf die Doppelmutante (ohne Abb.).

4.3.4. Chlorophyll- und Phycocyaningehalt im Vergleich zum Wildtyp

Der Chlorophyll- und Phycocyaningehalt exponentiell wachsender Kulturen wurde wie unter 3.22. beschrieben bestimmt.

Unter Berücksichtigung der Standard- und Mittelwertabweichung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *ycf35::KM* Mutante (Tab. 5 und 6).

Tab. 5: Vergleich der Chlorophyllgehalte

	Wildtyp	<i>ycf35::Ωycf36::KM</i>
Mittelwert	$7,3035 \times 10^{-3} \text{ mg/OD}$	$7,1364 \times 10^{-3} \text{ mg/OD}$
Standardabweichung	0,2816	0,1862
Mittelwertabweichung	0,2334	0,1347
Anzahl der Meßwerte	28	19

Tab. 6: Vergleich der Phycocyaningehalte; Phycocyanin ist in relativen Mengen angegeben

	Wildtyp	ycf35:: Ω ycf36::KM
Mittelwert	0,1664/OD	0,1557/OD
Standardabweichung	0,0352	0,0183
Mittelwertabweichung	0,0315	0,0159
Anzahl der Meßwerte	44	21

4.3.5. Proteinkomposition der ycf35:: Ω ycf36::KM Mutante

Das in Abschnitt 4.1.6. dargestellte Protein-Gel (Abb. 11) läßt keine Veränderung der Proteinkomposition im Vergleich zum Wildtyp erkennen. Das gleiche Ergebnis wurde auch in einem Coomassie gefärbten Gel erzielt (ohne Abb.).

4.4.1. Konstrukt zur Mutagenese von ycf43 in *Synechocystis* sp. PCC6803

Da zunächst die Inaktivierung des ycf43 in *Synechocystis* sp. PCC6803 erfolgen sollte, wurde mit den Primern 7-74 und 7-75 (2.4.3.) ein 981bp Fragment aus *Synechocystis*-DNA amplifiziert (nach 3.4. und 3.7.). Neben dem 765bp großen ycf43 beinhaltet es stromaufwärts 24bp und stromabwärts 192bp zusätzliche Sequenz. Durch die Primer wurden eine KpnI- (7-74) und eine BamHI-Schnittstelle (7-75) eingeführt, mit deren Hilfe das Fragment in pKS II inseriert wurde. Daß es sich bei der klonierten DNA tatsächlich um das gewünschte Fragment handelte, wurde durch Sequenzierung (3.15.) überprüft. Eine ycf43 interne EcoRI-Schnittstelle wurde genutzt, um den Leserahmen mit einem Kanamycin-resistenzgen zu unterbrechen. Dazu wurde das Resistenzgen mit XhoI/EcoRI aus pKS-NPT isoliert und die Schnittstellen wurden ebenso wie die EcoRI-Schnittstelle des ycf43 durch Klenow-Fragment aufgefüllt. Das Produkt der Ligation wurde durch Restriktionsanalyse mit SmaI und KpnI überprüft und ein Klon mit gegenläufiger Kanamycinresistenz ausgewählt, um *Synechocystis* WT damit nach 3.21. zu transformieren. Da aber keine Mutanten mit dem Konstrukt erzeugt werden konnten, wurde die Mutagenese in *Synechococcus* sp. PCC7002 versucht.

4.4.2. Klonierung und Sequenzierung des ycf43 von *Synechococcus* sp. PCC7002

Da für *Synechococcus* noch keine Sequenzinformation vorlag, mußte der kodierende Bereich erst innerhalb der chromosomalen DNA gefunden und kloniert werden. Dazu wurde *Synechococcus* sp. PCC7002 DNA (3.5.) mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, geblottet (3.16.) und mit dem *Synechocystis* ycf43-PCR-Produkt als Sonde (3.17.) hybridisiert (3.18.). Ein so identifizierter Bereich von 1500bp der HindII/PstI-Restriktion wurde eluiert (3.8.) und in pUC19 kloniert. Die entstandene Klonbank wurde nach dem ycf43 wiederum mittels Hybridisierung durchsucht und die Plasmid-DNA eines positiven Klons in der Nucleic Acid Facility der PSU sequenziert (die Sequenz ist im Anhang A1 beigefügt). Die Sequenz wurde unter AF136578 in Genbank abgelegt. Abb. 23 zeigt die Karte des Klons.

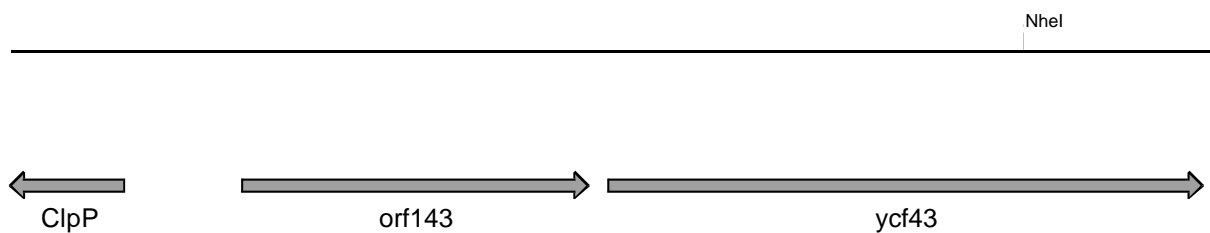


Abb. 23: Karte des ycf43 Fragmentes aus *Synechococcus* sp. PCC7002

Die im Klon enthaltene ClpP Sequenz ist nur partiell und umfaßt die ersten 43 Aminosäuren des in *Synechocystis* 436 Aminosäuren langen Proteins (slr0930). Orf143 weist Sequenzhomologien zu dem *Synechocystis*-Leserahmen sll1897 auf und enthält keine bekannten Domänen oder Motive. Die Alignments zu diesem Fragment befinden sich im Anhang A2.

4.4.3. Konstrukt zur Inaktivierung des ycf43 in *Synechococcus* sp. PCC7002

Zur Inaktivierung des ycf43 wurde die interne NheI-Schnittstelle (vergl. Abb. 23) mittels Klenow-fill-in (3.3.) aufgefüllt und die mit HincII aus pRL161 ausgeschnittene Kanamycinresistenz inseriert. Ein Klon mit komplementär zum ycf43 liegender Resistenz wurde zur Transformation eingesetzt. Trotz einer überdurchschnittlich großen Zahl von zehn Verdünnungsschritten bei einer Kanamycinkonzentration von 200µg/ml konnte immer nur ein Teil der Genkopien ersetzt werden, so daß kein ycf43::KM Stamm vorliegt.

4.5. Insertionale Inaktivierung des *Synechocystis* sp. PCC6803 ycf45

4.5.1. Konstrukt zur ycf45-Inaktivierung in *Synechocystis* sp. PCC6803

Ycf45 wurde mit den Primern 7-76 und 7-77 (2.4.5.) aus *Synechocystis* WT DNA (3.4.) durch PCR (3.7.) amplifiziert. Das 1537bp große PCR-Produkt beinhaltet neben den 1500 Basenpaaren des ycf45 26bp C-terminale Sequenz des stromaufwärts liegenden sll0635 und stromabwärts vom ycf45 106bp nichtkodierende Sequenz. Es wurde in den TA-Klonierungsvektor pMOS inseriert und die Identität des Fragmentes durch Sequenzierung (3.15.) sichergestellt. Eine interne BstXI-Schnittstelle wurde zur Inaktivierung genutzt. Dazu wurde eine mit XhoI/EcoRI aus pKS-NPT isolierte Kanamycinresistenzkassette durch Klenow-Fragment mit glatten Enden versehen und in die BstXI-Schnittstelle ein-kloniert. Nach einer BamHI/BglII Restriktionsanalyse wurde ein Klon mit gegenläufig zu ycf45 klonierter Resistenz ausgewählt (Abb. 24).

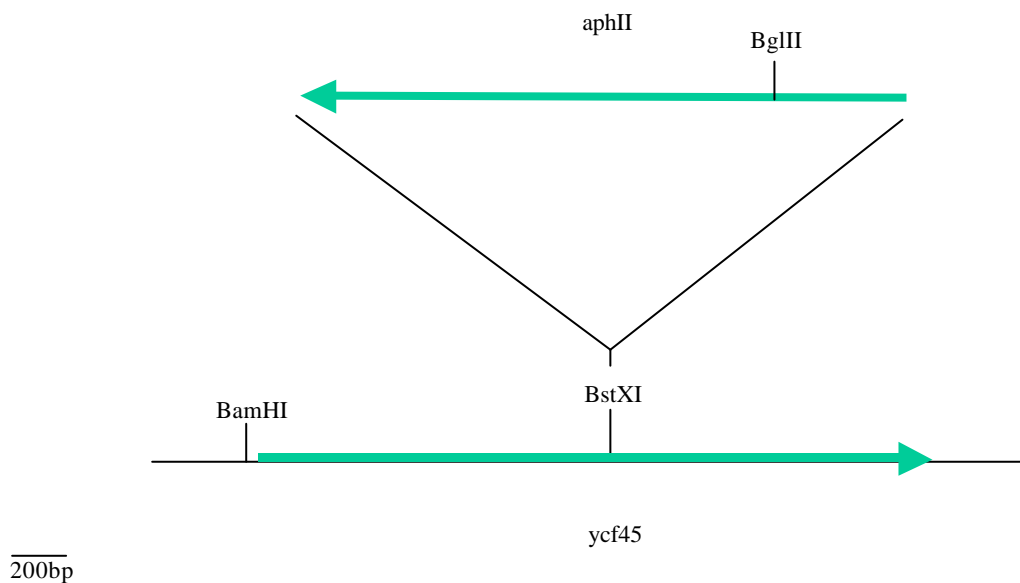


Abb. 24: Inaktivierungsstrategie für den ycf45 in *Synechocystis*

4.5.2. Segregation der *ycf45::KM* Mutation in *Synechocystis* sp. PCC6803

Synechocystis sp. PCC6803 WT wurde mit dem Konstrukt aus 4.5.1. transformiert (3.21.) und die Segregation durch Hybridisierung (3.18.) der BglIII/BamHI geschnittenen und geblotteten (3.16.) DNA mit dem nach 3.17. radioaktiv markierten *ycf45* PCR-Produkt kontrolliert.

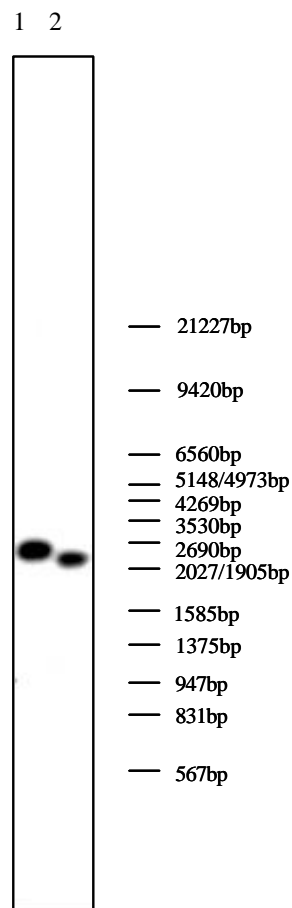


Abb. 25: Autoradiogramm der Hybridisierung zur Segregationskontrolle der *ycf45::KM* Mutation

Spur 1: 10 μ g *Synechocystis* WT DNA mit BglIII und BamHI geschnitten

Spur 2: 10 μ g *ycf45::KM* DNA mit BglIII und BamHI geschnitten

Die vollständig segregierte Mutante (Abb. 25) enthält ausschließlich den inaktivierten *ycf45*-Leserahmen. Bei einer Restriktion mit BglIII und BamHI, lag das Signal der Mutante unterhalb des Wildtyps (2628bp), da durch eine zusätzliche BglIII-Schnittstelle innerhalb des Resistenzgens zwei 2129bp Fragmente entstanden.

4.5.3. Wachstumseigenschaften der *Synechocystis* sp. PCC6803 *ycf45::KM* Mutante

Die Wachstumskurven wurden entsprechend den unter 3.2.1. beschriebenen Kulturbedingungen aufgezeichnet.

Die Inaktivierung des *ycf45* beeinträchtigte das Wachstum erheblich. Schon bei niedrigen Lichtintensitäten blieb die Mutante deutlich hinter dem Wildtyp zurück und erreichte nur 52% der Dichte des Wildtyps (Abb. 26). Setzte man sie hohen Lichtintensitäten aus, kam das Wachstum fast völlig zum Erliegen (Abb. 27).

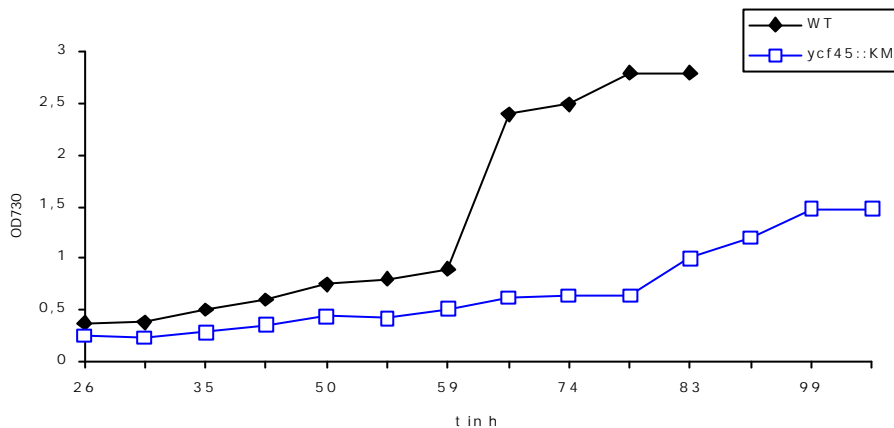


Abb. 26: photoautotrophes Wachstum von *Synechocystis* WT und *ycf45::KM* bei 25μE

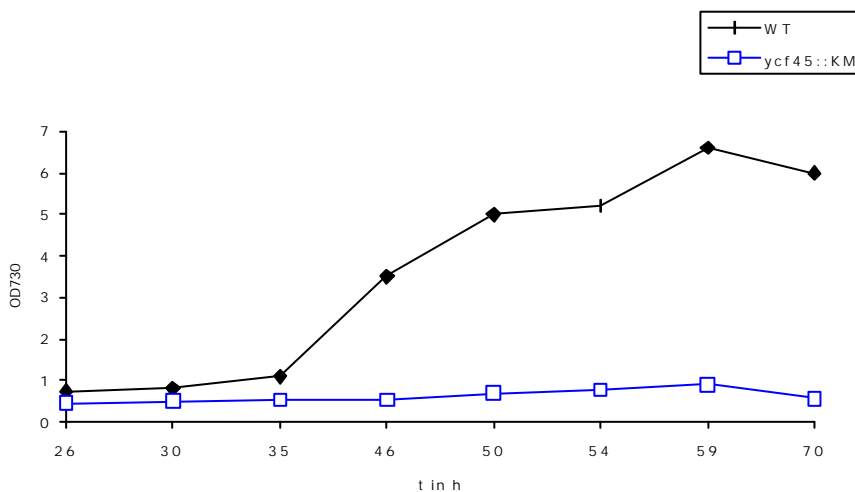


Abb. 27: photoautotrophes Wachstum von *Synechocystis* WT und *ycf45::KM* bei 250μE

Von den getesteten Mangelbedingungen (Mangelbedingungen wurden durch 1/10 der normalen Konzentrationen bzw. 5mM statt 13mM NaNO₃ herbeigeführt), zeigte nur Magnesium-Mangel einen Einfluß auf das Wachstum (Abb. 28). Während der WT mit

einer kleinen Verzögerung auf 86% der Dichte heranwuchs, die er im Standardmedium erreichte, kam der *ycf45::KM* Stamm nicht über 51% der normalen Dichte hinaus. Phosphat-, Nitrat-, Eisen- und Calciummangel veränderten das Wachstum hingegen nicht mehr zusätzlich.

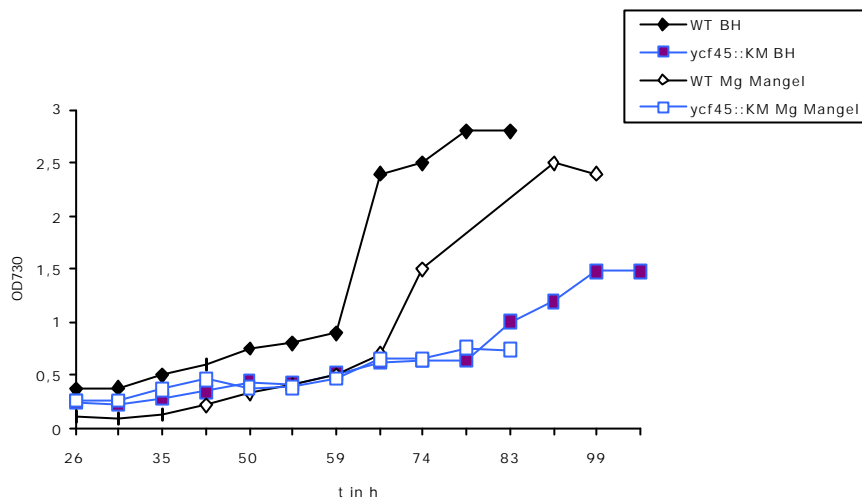


Abb. 28: photoautotrophes Wachstum von *Synechocystis* WT und *ycf45::KM* bei Magnesiummangel und 25µE

4.5.4. Vergleich der Chlorophyll- und Phycocyaningehalte zum Wildtyp

Die Pigmentgehalte wurden von exponentiell bei 20µE wachsenden Kulturen nach 3.22. bestimmt.

Tab. 7: Vergleich der Chlorophyllgehalte von *Synechocystis* WT und *ycf45::KM*

	Wildtyp	<i>ycf45::KM</i>
Mittelwert	$5,7895 \times 10^{-3} / \text{OD}$	$5,7580211 / \text{OD}$
Standardabweichung	0,3049	0,2971
Mittelwertabweichung	0,2699	0,2414
Anzahl der Meßwerte	18	18

Tab. 8: Vergleich der Phycocyaningehalte von *Synechocystis* WT und ycf45::KM;
Phycocyanin ist in relativen Mengen angegeben

	Wildtyp	ycf45::KM
Mittelwert	0,2013/OD	0,1747/OD
Standardabweichung	0,0188	0,0124
Mittelwertabweichung	0,0159	0,0097
Anzahl der Meßwerte	16	17

Der Chlorophyllgehalt der Mutante entsprach dem des Wildtyps, sie zeigte aber einen niedrigeren Phycocyaningehalt (Tab. 7 und 8).

4.5.5. Spektroskopische Untersuchung des *Synechocystis* sp. PCC6803 ycf45::KM Stammes

Die Absorptions- und Fluoreszenz-Emissionsspektren wurden gemäß 3.24. aufgezeichnet. Es wurden parallel bei einer Lichtintensität von 25 μE angezogene exponentiell wachsende Kulturen gleicher Dichte verwendet.

4.5.5.1. Absorptionsspektren

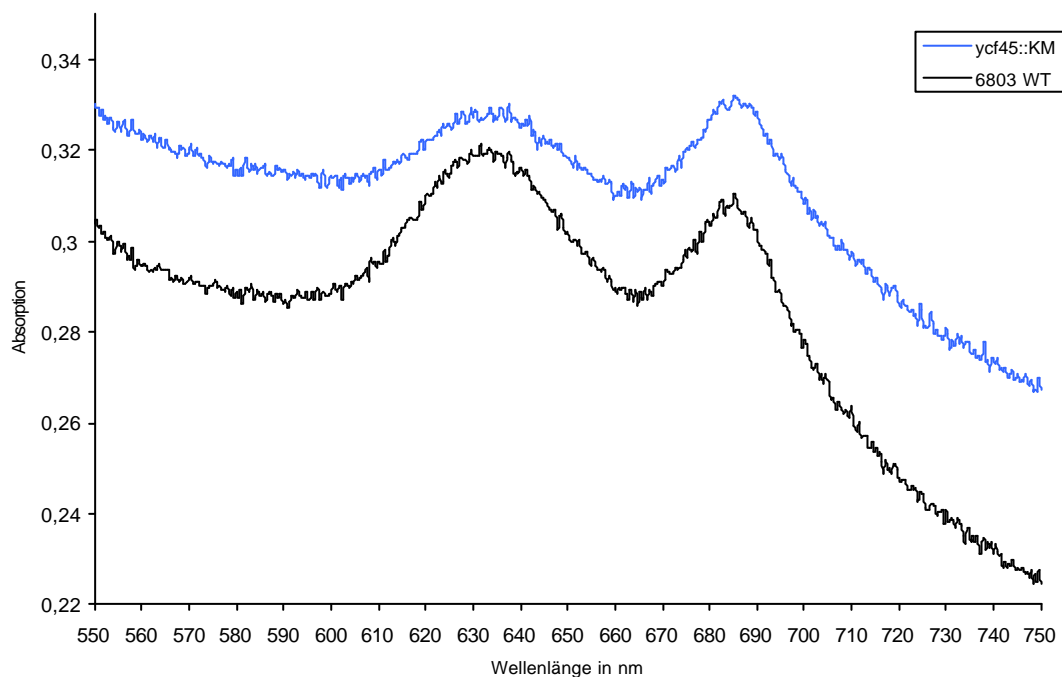
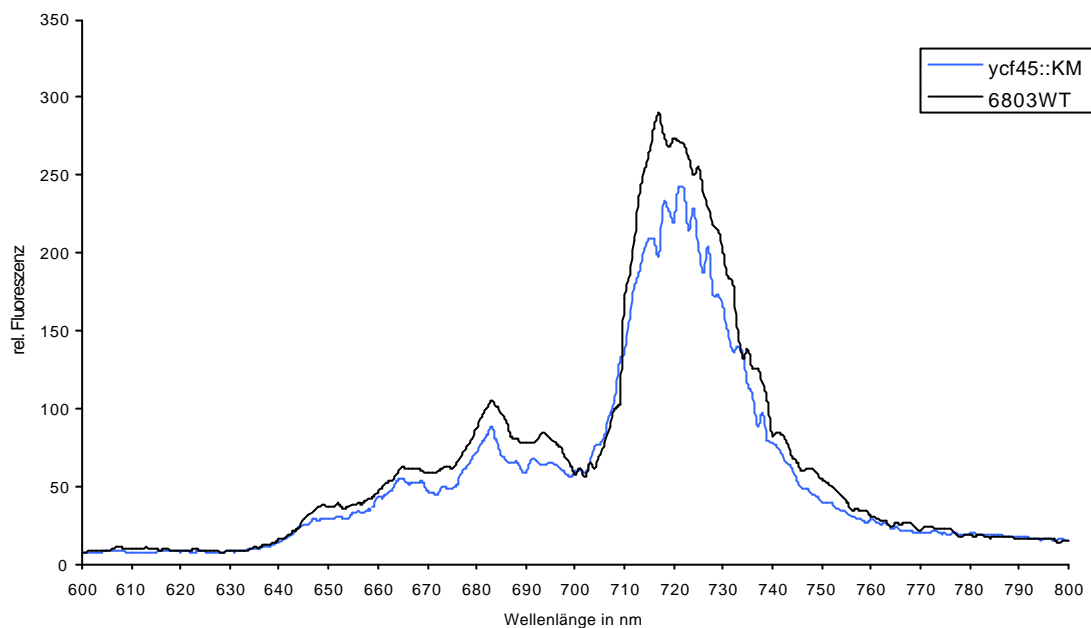


Abb. 29: Absorptionsspektren von *Synechocystis* WT und ycf45::KM nach Wachstum bei 25 μE

Das im Absorptionsspektrum im Verhältnis zum Chlorophyll (690nm) deutlich flachere Phycocyaninmaximum (635nm) der *ycf45::KM* Mutante bestätigt die Ergebnisse der Pigmentmessungen unter 4.5.4., die einen geringeren Phycocyaningehalt ergaben. Das Verhältnis der Absorption von Phycocyanin zu Chlorophyll, das im Wildtyp deutlich zu Gunsten des Phycocyanins ausfiel, kehrte sich in der *ycf45::KM* Mutante leicht zu Gunsten des Chlorophylls um.

4.5.5.2. Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie



vergrößerter Bereich von 675nm bis 700nm

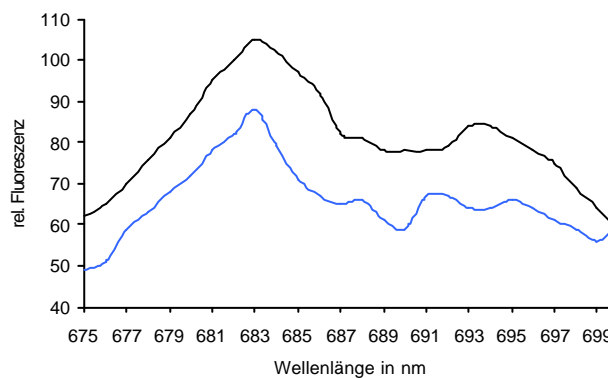


Abb. 30: Fluoreszenz-Emissionsspektrum *Synechocystis* WT und *ycf45::KM* bei 440nm Anregungswellenlänge; eingesetzte Zellmenge entspricht $OD_{730}=1$

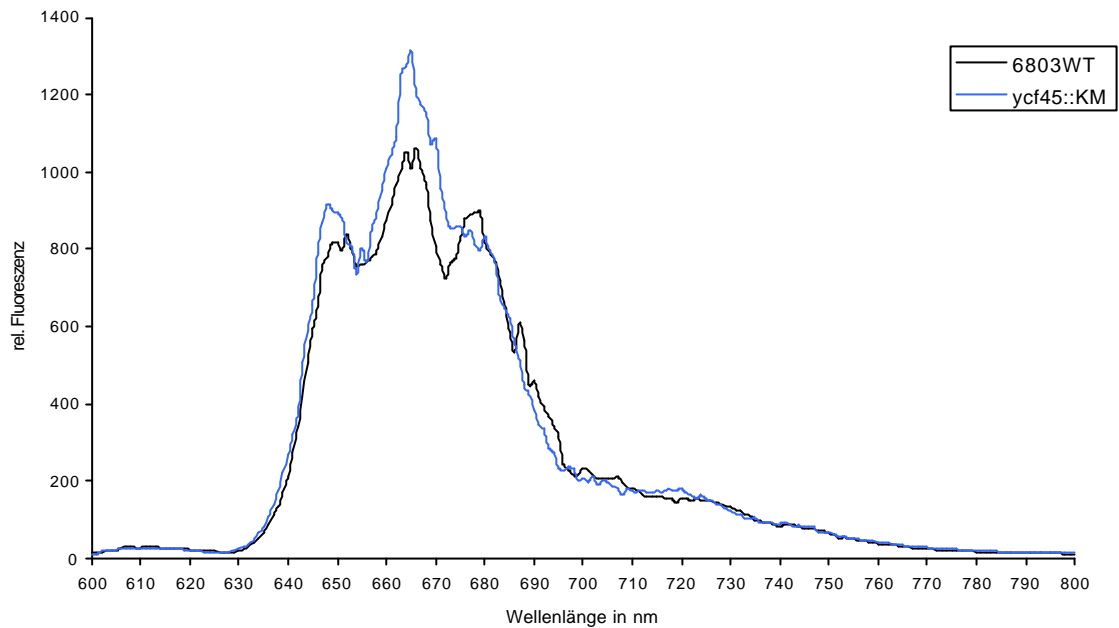


Abb. 31: Fluoreszenz-Emissionsspektrum von *Synechocystis* WT und *ycf45::KM* bei 590nm Anregungswellenlänge; eingesetzte Zellmenge entspricht $OD_{730}=1$

Bei Chlorophyllanregung mit 440nm zeigte die *ycf45::KM* Mutante eine Aufspaltung des PS II Emissionsmaximums von 694nm für den WT in eine 691nm und eine 695nm Fluoreszenzspitze (Abb. 30). Die Emission bei 691nm wird auf das CP47 gebundene Chlorophyll zurückgeführt und wird bei voll funktionalem PS II von der Gesamtemission des Photosystems überdeckt (Dzelzkalns & Bogorad, 1989). Auch bei Phycobilisomenanregung bei 590nm (Abb. 31) zeigte sich eine niedrigere PS II Fluoreszenz (680nm) beim *ycf45::KM* Stamm, gleichzeitig war die Emission des Allophycocyanins (665nm) im Verhältnis erhöht.

4.5.6. Proteinkomposition der *Synechocystis* sp. PCC6803 ycf45::KM Mutante

Die Gesamtlysate (3.26.) des Wildtyps und der Mutante wurden auf einem 12% PAA-Gel (3.28) aufgetrennt und mit Silber gefärbt (3.29.2.).

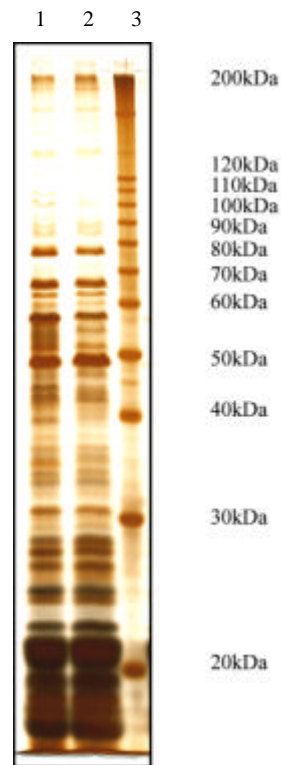


Abb. 32: silbergefärbtes SDS-Gel der Gesamtlysate von *Synechocystis* WT und ycf45::KM

Spur 1: 4µg *Synechocystis* WT Proteine

Spur 2: 4µg *Synechocystis* ycf45::KM Proteine

Spur 3: 10kDa Leiter

Im Bereich von 40-60 kDa waren die Banden der ycf45::KM Mutante allgemein schwächer ausgeprägt als die des Wildtyps. Die deutliche WT-Bande bei 40kDa fehlte in der Mutante (Abb. 32).

4.6. Mutagenese des ycf46 in *Synechocystis* sp. PCC6803

4.6.1. Konstrukt zur Inaktivierung des ycf46 in *Synechocystis* sp. PCC6803

Ein 1537bp Fragment, das den 1500bp großen ycf45 sowie stromaufwärts 16bp und stromabwärts 21bp zusätzliche Sequenz enthielt, wurde mit den Primern 8-22 und 8-23 (2.4.6.) aus *Synechocystis* sp. PCC6803 DNA (3.4.) mittels PCR (3.7.) amplifiziert.

Die durch die Primer eingeführten *ApaI*- (8-22) und *BamHI*-Schnittstellen (8-23) wurden zur Klonierung in pKS II genutzt. Eine 775bp vom Startkodon entfernte *SmaI*-Schnittstelle diente zur Insertion einer Kanamycinresistenzkassette, die wie in 4.5.1. isoliert und mit glatten Enden versehen wurde. Die Orientierung der Resistenz im Vergleich zum *ycf46* wurde durch eine *BamHI/SalI*-Restriktion überprüft und ein Klon mit gegenläufiger Richtung zur Transformation von *Synechocystis* ausgewählt. Eine Karte des Konstruktes ist in Abb. 33 dargestellt.

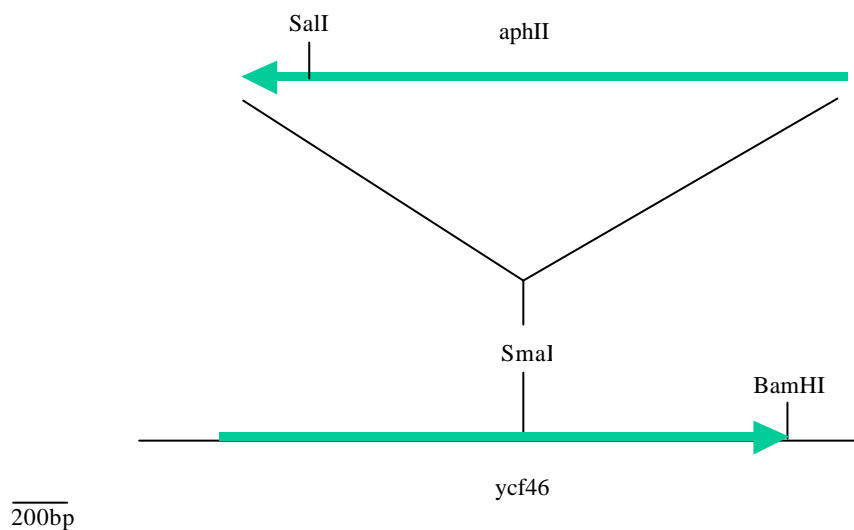


Abb. 33: Karte zur Inaktivierungsstrategie des *ycf46* in *Synechocystis*

4.6.2. Segregation der *ycf46*::KM Mutation in *Synechocystis* sp. PCC6803

Das unter 4.6.1. dargestellt Konstrukt wurde zur Transformation von *Synechocystis* sp. PCC6803 verwendet und die Segregation der Mutation durch eine Southern-Hybridisierung (3.18.) überprüft. Durch die Insertion der Kanamycinresistenz vergrößerte sich das *ycf46*-Fragment der Mutante um 1360bp. Abb. 34 zeigt, daß der *ycf46*::KM Stamm keine Wildtypkopie des *ycf46* mehr enthielt.

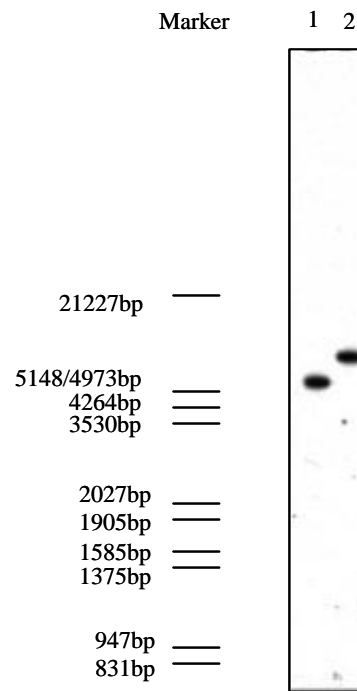


Abb. 34 : Hybridisierung zur Segregation der *ycf46::KM* Mutation in *Synechocystis*

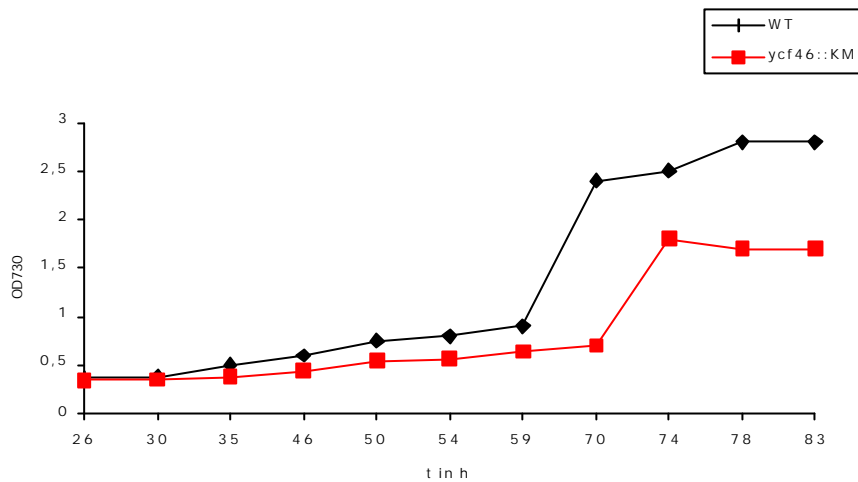
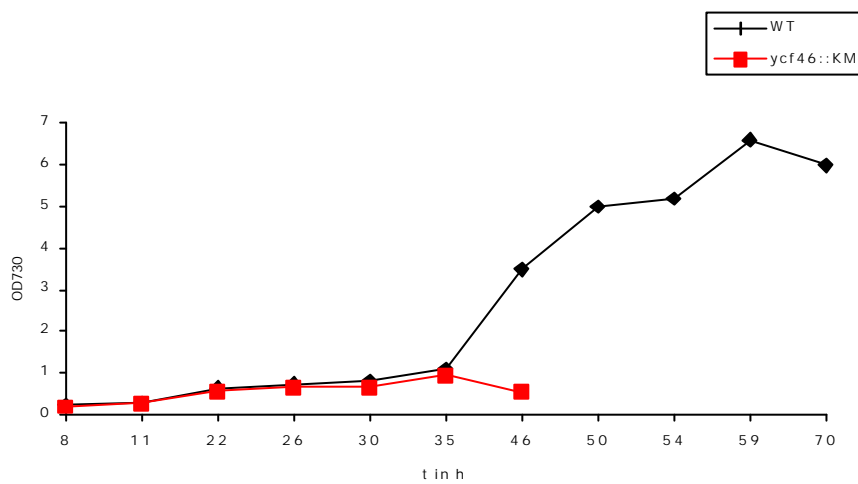
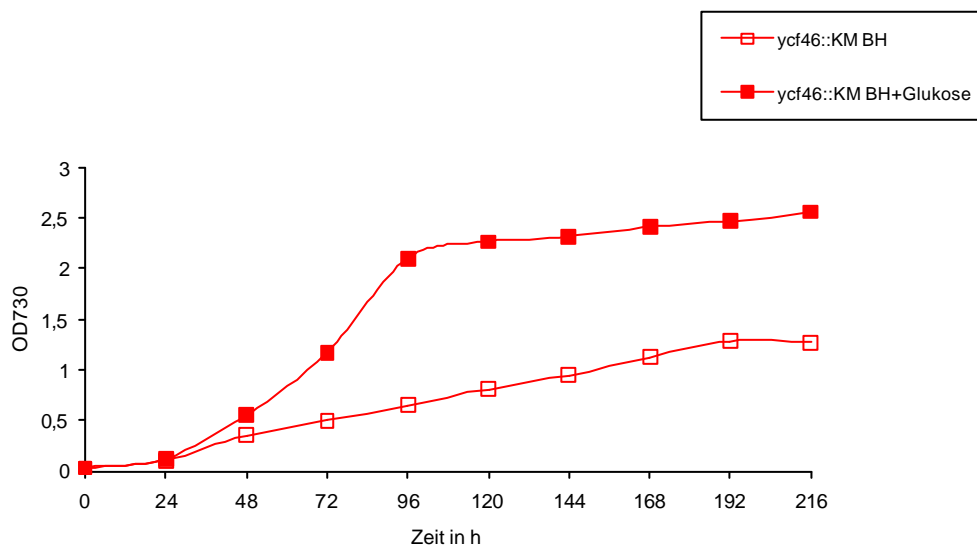
Spur 1: 10 μ g *Synechocystis* WT DNA *SpeI/SacI* geschnitten

Spur 2: 10 μ g *Synechocystis ycf46::KM* DNA *SpeI/SacI* geschnitten

5.6.3. Wachstumseigenschaften der *Synechocystis* sp. PCC6803 *ycf46::KM* Mutante

Alle Wachstumskurven wurden aus den Meßwerten zweier paralleler Kulturen gebildet. Es wurden neben niedrigen (25 μ E), mittleren (60 μ E) und hohen (250 μ E) Lichtintensitäten Phosphat-, Nitrat-, Stickstoff-, Eisen-, Magnesium- und Calcium-Mangelbedingungen getestet, wobei jeweils 1/10 bzw. 5 statt 13 mM für Nitrat der Konzentration des Standardmediums bei niedrigen Lichtbedingungen verwendet wurde. Photoheterotrophes Wachstum wurde bei 5mM Glukose und mittlerer Lichtintensität gemessen.

Schon bei niedriger Lichtintensität blieb das Wachstum der Mutante hinter dem Wildtyp zurück (Abb. 35) und offenbarte bei Starklicht die Photosensibilität der Mutante (Abb. 36). Das Wachstum konnte unter photoheterotrophen Bedingungen wieder hergestellt werden (Abb. 37). Von den getesteten Mangelbedingungen zeigte sich nur bei geringer Calciumkonzentration eine zusätzliche Verlangsamung des Wachstums (Abb. 38).

Abb. 35: photoautotrophes Wachstum von *Synechocystis* WT und *ycf46::KM* bei 25µEAbb. 36: photoautotrophes Wachstum von *Synechocystis* WT und *ycf46::KM* bei 250µEAbb. 37: Vergleich von photoautotrophem und photoheterotrophem Wachstum von *Synechocystis* WT und *ycf46::KM* bei 60µE

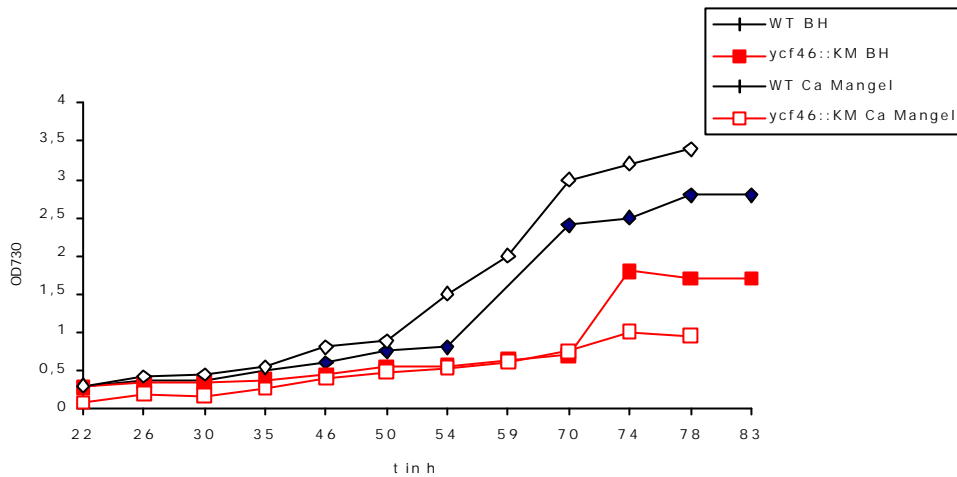


Abb. 38: photoautotrophes Wachstum von *Synechocystis* WT und ycf46::KM bei Calcium-Mangel und 25μE

4.6.4. Chlorophyll- und Phycocyaningehalte des *Synechocystis* sp. PCC6803 ycf46::KM Stammes

Chlorophyll- und Phycocyaningehalt wurden nach 3.22. bestimmt, wobei immer exponentiell wachsende Kulturen gleicher Dichte verwendet wurden, die bei mittlerer Lichtintensität angezogen wurde.

Der ycf46::KM Stamm zeigt einen leicht erhöhten Chlorophyllgehalt während der Phycocyaningehalt dem des Wildtyps entspricht (Tab. 9 und 10).

Tab. 9: Vergleich der Chlorophyllgehalte von *Synechocystis* WT und ycf46::KM

	Wildtyp	ycf46::KM
Mittelwert	$5,7895 \times 10^{-3} / \text{OD}$	$6,2653 \times 10^{-3} / \text{OD}$
Standardabweichung	0,3049	0,2798
Mittelwertabweichung	0,2699	0,2397
Anzahl der Meßwerte	18	20

Tab. 10: Vergleich der Phycocyaningehalte von *Synechocystis* WT und ycf46::KM;
Phycocyanin ist in relativen Mengen angegeben

	Wildtyp	ycf46::KM
Mittelwert	0,2013/OD	0,2056/OD
Standardabweichung	0,0188	0,0216
Mittelwertabweichung	0,0159	0,0174
Anzahl der Meßwerte	16	14

4.6.5. Spektroskopische Untersuchung des *Synechocystis* sp. PCC6803 ycf46::KM Stammes

Absorptions- und Fluoreszenz-Emissionsspektren wurden nach 3.24. von parallel angezogen Kulturen gleicher Dichte aufgenommen.

4.6.5.1. Absorptionsspektren

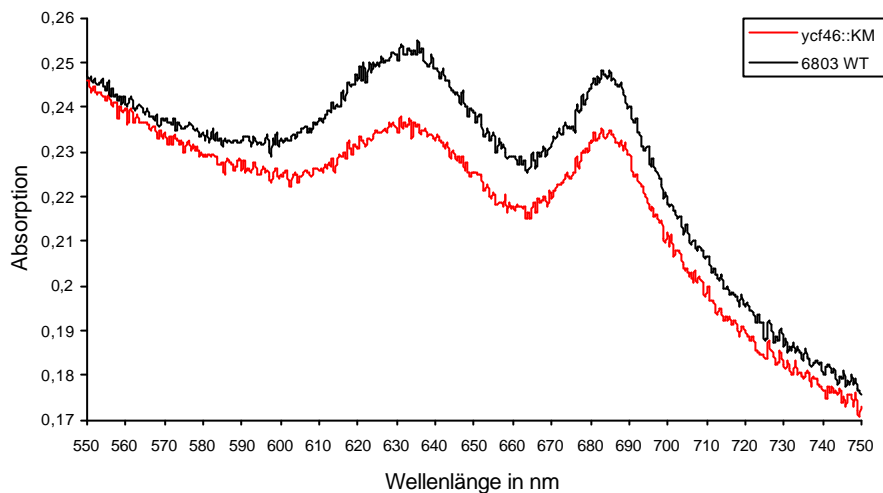
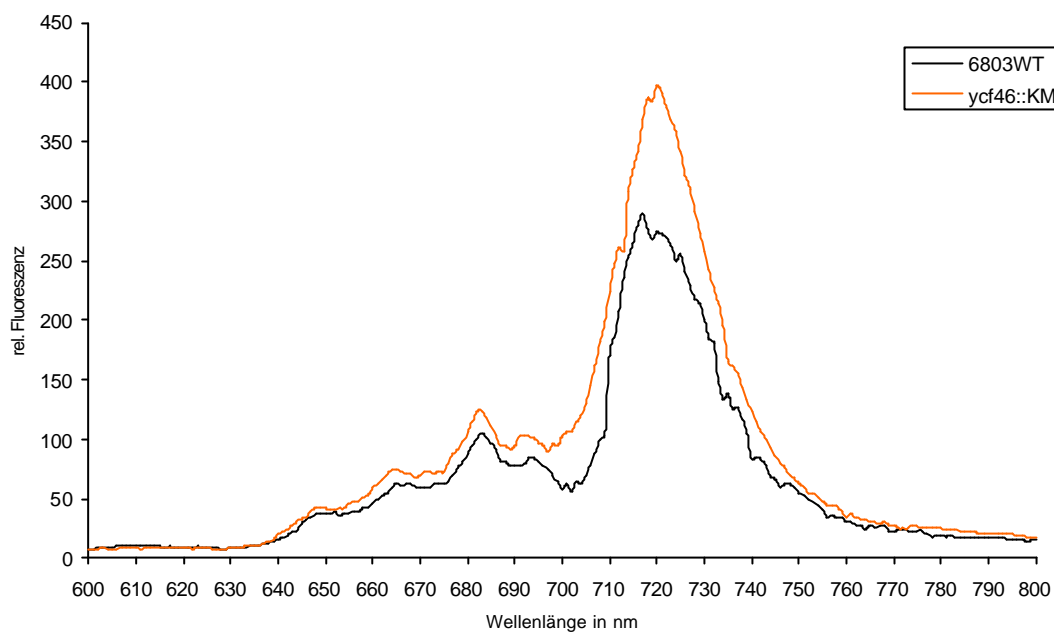


Abb. 39: Absorptionsspektren von *Synechocystis* WT und ycf46::KM nach Wachstum bei 25 μ E

Der unter 4.6.4. gemessene höhere Chlorophyllgehalt der ycf46::Km Mutante spiegelte sich in dem zu Gunsten des Chlorophyll verschobenen Pigmentverhältnisses im Absorptionsspektrum der Abb. 39 wider. Während beim Wildtyp das Absorptionsmaximum des Phycocyanins (630-640nm) deutlich höher als das des Chlorophylls (680-695nm) war, waren die Absorptionen der beiden Pigmente in der Mutante gleichgroß.

4.6.5.2. Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie



vergrößerter Bereich von 675nm bis 700nm

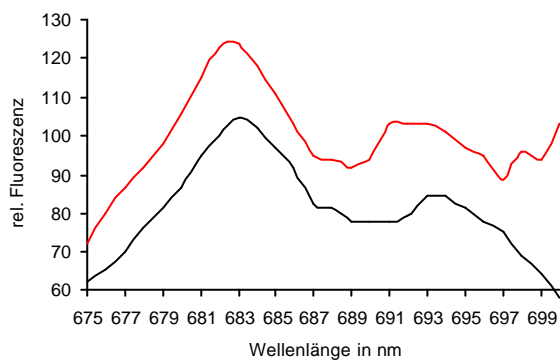


Abb. 40: Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie bei 440nm Anregungswellenlänge; die eingesetzte Zellmenge entspricht einer $OD_{730}=1$

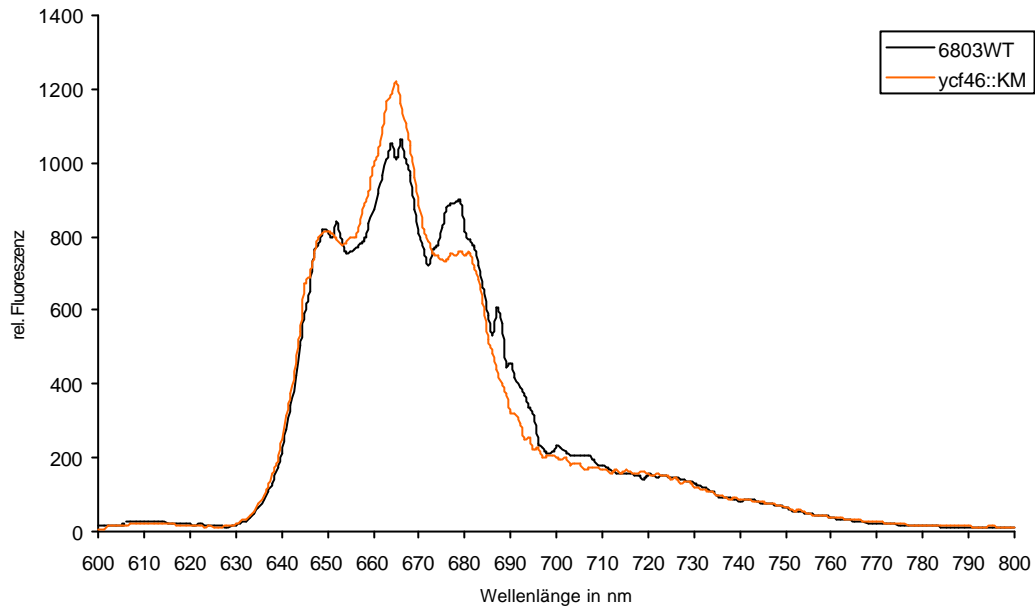


Abb. 41: Fluoreszenz-Emissionsspektrum bei 590nm Anregungswellenlänge; die eingesetzte Zellmenge entspricht einer $OD_{730}=1$

Das Fluoreszenz-Emissionsspektrum bei 440nm chlorophyllspezifischer Anregungswellenlänge zeigte für die ycf46::KM Mutante eine Verschiebung und Verbreiterung des PS II Maximums zu einer kürzeren Wellenlänge (691nm) hin und eine erhöhte PS I-Fluoreszenz bei 720nm (Abb. 40). Bei Phycobilisomenanregung (Abb. 41) fiel eine fast fehlende PS II Emission bei 680nm und eine erhöhte Allophycocyaninfluoreszenz bei 665nm auf.

4.6.6. Sauerstoffentwicklung von *Synechocystis* sp. PCC6803 WT und ycf46::KM

Die Sauerstoffentwicklung der Gesamtphotosynthese und die Photosystem II-Aktivität wurden nach 3.25. gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tab. 11: Vergleich der Sauerstoffentwicklung von WT und ycf46::KM, Werte in $\mu\text{mol O}_2/\text{mgChl/h}$

	WT	ycf46::KM
Gesamtphotosynthese	158,8 +/- 2,55 100%	117,5 +/- 1,27 74%
PSII-Aktivität	358,6 +/- 1,55 100%	146,3 +/- 5,2 40,8%

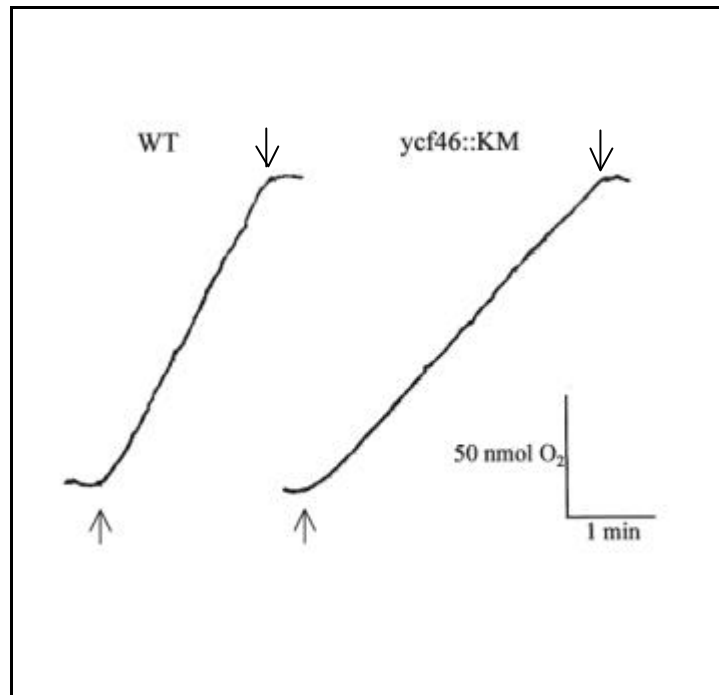


Abb. 42: Photosystem II Aktivität von WT und ycf46::KM gemessen and der Sauerstoffentwicklung beim Elektronentransport von Wasser nach DCQB; die Pfeile markieren den Beginn und das Ende der Beleuchtung

Die deutlich flachere Kurve der Photosystem II-Aktivität der ycf46::KM Mutante im Vergleich zum Wildtyp ist durch das Beispiel einer Sauerstoffmessung in Abb. 42 dargestellt. Sie verdeutlicht die in Tab. 11 aufgeführten Werte, die eine deutlich geringere Photosystem II-Aktivität der Mutante beschreiben, während für die Gesamtphotosynthese unter den gewählten Bedingungen ein wesentlich geringerer Unterschied festgestellt wurde.

4.6.7. Proteinkomposition der ycf46::KM Mutante

Da die physiologischen Untersuchungen einen deutlichen Phänotyp aufzeigten, sollen im Folgenden die Auswirkungen der ycf46 Inaktivierung auf die Proteinexpression betrachtet werden. Als erstes wurden Gesamtlysate nach 3.26. hergestellt und auf einem SDS-Gel (3.28) aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Silber nach 3.29.2.

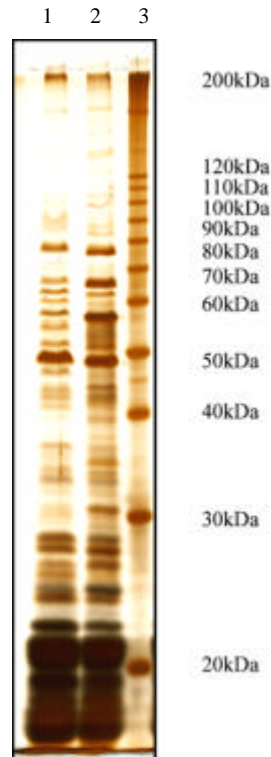


Abb. 43: silbergefärbtes SDS-Gel der Gesamtlysate von *Synechocystis* WT und ycf46::KM

Spur 1: 4 μ g *Synechocystis* ycf46::KM Proteine

Spur 2: 4 μ g *Synechocystis* WT Proteine

Spur 3: 10kDa Leiter

In Abb. 43 wird deutlich, daß die ycf46 Inaktivierung zu einer Veränderung des Proteinmusters geführt hat. Im Vergleich zum Wildtyp sind im Bereich von ca. 30-70kDa weniger Proteine vorhanden. Bei der zusätzlichen Bande der Mutante bei ca. 25kDa handelt es sich vermutlich um die zur Inaktivierung verwendete Kanamycinresistenz verleihende Aminoglycosid-3'-phosphotransferase II, deren theoretische Größe bei 27kDa liegt.

Aufgrund des bis dahin charakterisierten Phänotyps wurden die Lysate mit Antiseren gegen Photosystem-Untereinheiten aus Spinat untersucht. Abb. 44 zeigt einen mit Anti-psbO und Anti-psaD durchgeführten Westernblot (nach 3.36. und 3.39.).

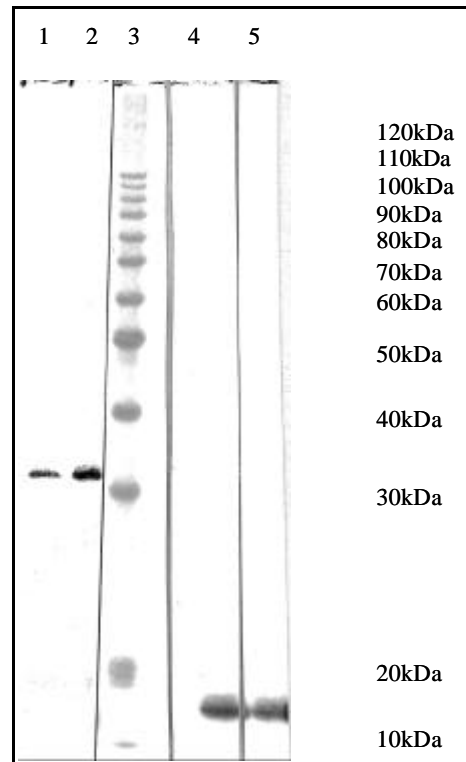


Abb. 44: Westernblot der *Synechocystis* WT und *ycf46::KM* Lysate mit den Antisera 194-4 und 219-t
 Spur 1: 8µg *Synechocystis ycf46::KM* Protein mit 1: 500 verdünntem 194-4 (Anti-psbO)
 Spur 2: 8µg *Synechocystis* WT Protein mit 1: 500 verdünntem 194-4 (Anti-psbO)
 Spur 3: Ponceau gefärbte 10kDa Leiter
 Spur 4: 8µg *Synechocystis ycf46::KM* Protein mit 1: 500 verdünntem 219-t (Anti-psaD)
 Spur 5: 8µg *Synechocystis* WT Protein mit 1: 500 verdünntem 219-t (Anti-psaD)

Der *Synechocystis ycf46::KM* Stamm zeigte eine Halbierung der PsbO Menge bei gleicher Menge an Psd (Abb. 44). Ein Blot mit Anti CF₁ zeigte, daß auch die Menge an CF₁-α und -β bei Wildtyp und Mutante gleich sind (ohne Abb.).

4.6.8. Amplifizierung, Klonierung und Sequenzierung des psbO aus *Synechocystis* sp. PCC6803 *ycf46::KM*

Um auszuschließen, daß eine zufällige Mutation im psbO-Gen der Mutante für die geringere PsbO Menge in den Lysaten (Abb. 43) verantwortlich ist, wurde die Sequenz des Gens in der *ycf46::KM* Mutante untersucht. Hierzu wurde die PsbO kodierende Sequenz mit den Primern 13-81 und 13-82 (2.4.8.) in einer PCR (3.7.) durch PfuTurbo Polymerase amplifiziert und in einen EcoRV geschnittenen pKSII Vektor kloniert. Die Plasmide zweier Klone wurden mit den Standardprimern M13-Universal und Reverse sowie den Primern 14-31 und 14-32 (2.4.8.) nach 3.15. sequenziert. Die erhaltene Sequenz des psbO

der *ycf46::KM* Mutante war identisch zu der bekannten Sequenz (Kaneko et al., 1996) des Wildtyps. Somit ist der veränderte PsbO-Gehalt der Mutante auf die Inaktivierung des *ycf46* zurückzuführen.

4.6.9. Transkriptanalyse von psbO im Vergleich zu anderen Photosystem II Untereinheiten in *Synechocystis* sp. PCC6803 WT und *ycf46::KM*

Je 5 µg RNA (nach 3.20.) der beiden Stämme wurde in einem denaturierenden Formaldehyd-Gel (Lehrach et al., 1977) aufgetrennt. Als Sonde wurden geninterne PCR-Fragmente (Primer unter 2.4.10.) von *psbB*, *psbV*, 23SrRNA und das klonierte *psbO* aus *ycf46::KM* (4.6.8.) verwendet. Die PCRs (nach 3.7.) ergaben alle nur jeweils ein Produkt korrekter Größe. Nach einer Klonierung in pGEM-T wurde die Plasmid-DNA zweier Klone zur Kontrolle sequenziert (3.15), demnach waren in den PCRs nur die gewünschten Produkte vorhanden.

Die Kontrolle durch die Hybridisierung (nach 3.19.) mit 23SrRNA bestätigte, daß die gleiche Menge RNA aufgetragen war. Der erste Versuch zeigte eine gleiche Menge an *psbV* und *psbB* für Wildtyp und Mutante, aber das *psbO* scheint im *ycf46::KM* Stamm stärker transkribiert zu werden als im Wildtyp.

4.6.10. Expression des N-Terminus von Ycf46 und des kompletten Leserahmens in *Escherichia coli*

Zum Nachweis der Ycf46-Expression und für Immunopräzipitationsversuche zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner war es nötig, ein spezifisches Antiserum herzustellen. Hierzu wurde der N-Terminus des *ycf46* bis zum Walker A Motiv verwendet, um Kreuzreaktionen mit AAA-Proteinen und anderen ATP-bindenden Proteinen auszuschließen. Da sich die AAA-Domäne bis zum C-Terminus erstreckt, stand nur der N-Terminus als Ycf46-spezifischer Bereich zur Verfügung (vergl. Alignment im Anhang A2). Der komplette *ycf46* sollte zur *in-vitro* Untersuchung der Funktion exprimiert werden. Beide Proteine wurden im *E.coli* Stamm BL21DE exprimiert (3.30).

Mit Hilfe der Primer 11-92 und 11-93 (2.4.7.) wurde der N-Terminus bis zur Aminosäure 261 in einer PCR Reaktion mit PfuTurbo Polymerase amplifiziert. Durch die Primer wurden am N-Terminus eine NdeI- und am C-Terminus eine XhoI-Schnittstelle eingeführt, durch die das Produkt in einen ebenso geschnittenen pET 31b (+) Vektor inseriert werden

konnte. Durch diese Klonierung wurde C-terminal ein His-Tag von 6 Histidinen angefügt. Das entstandene Konstrukt wurde zur Kontrolle sequenziert (Anhang A4). Dieser Klon bzw. das exprimierte Protein wird im Folgenden auch mit ycf46-AB bezeichnet.

Die Primer 11-52 und 11-53 (2.4.7.) wurden zur Amplifizierung des kompletten Leserahmens verwendet, der in gleicher Weise in pET 31 b (+) kloniert wurde. In diesem Fall unterscheidet sich das rekombinante Protein vom nativen durch das Fehlen der letzten 7 Aminosäuren und durch die direkt vor dem His-tag hinzugefügten Aminosäuren Leucin und Glutaminsäure (Anhang A4). Auch dieses Konstrukt wurde durch Sequenzierung (3.15.) überprüft und mit ycf46-Komplett bezeichnet.

4.6.10.1. Aufreinigung der rekombinanten Proteine

Zunächst wurden Lokalisation (nach 3.31.) und zeitlicher Verlauf der Expression in *E. coli* bestimmt, um die richtige Aufreinigungstrategie und den günstigsten Zeitpunkt festzustellen. Für beide Proteine zeigte sich, daß sie nach zwei Stunden Induktion in großen Mengen in inclusion bodies vorlagen.

Die inclusion bodies wurden nach 3.32. präpariert und die Proteine über eine Nickel-NTA Agarose Säule aufgereinigt (3.33.). Der zur Immunisierung verwendete N-Terminus des ycf46 wurde außerdem nach 3.34. aus einem SDS-Gel eluiert.

Aus Abb. 45 geht hervor, daß beide Proteine sauber aus *E. coli* präpariert wurden. Die Elektrophorese erfolgte nach 3.28 und die Färbungen nach 3.29.

Durch die Reaktion des Penta-His Antikörpers (Detektion nach 3.38.) mit den geblotteten Proteinen (3.36.) konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei den gereinigten Proteinen um His-tag Proteine handelte. Da der Antikörper im Gesamtlisat keine weiteren Reaktionen zeigte, und die apparenten Größen der Proteine mit den theoretischen Größen von 56,8kDa für ycf46-Komplett und 30,6kDa für ycf46-AB korrelieren, handelte es sich um die beabsichtigten Produkte (Abb. 45 B und C). Auf der Abbildung ist außerdem zu erkennen, daß beide rekombinanten Proteine unter den denaturierenden Bedingungen der Aufreinigung Aggregate bildeten (Abb. 45 B und C jeweils in Spur 2).

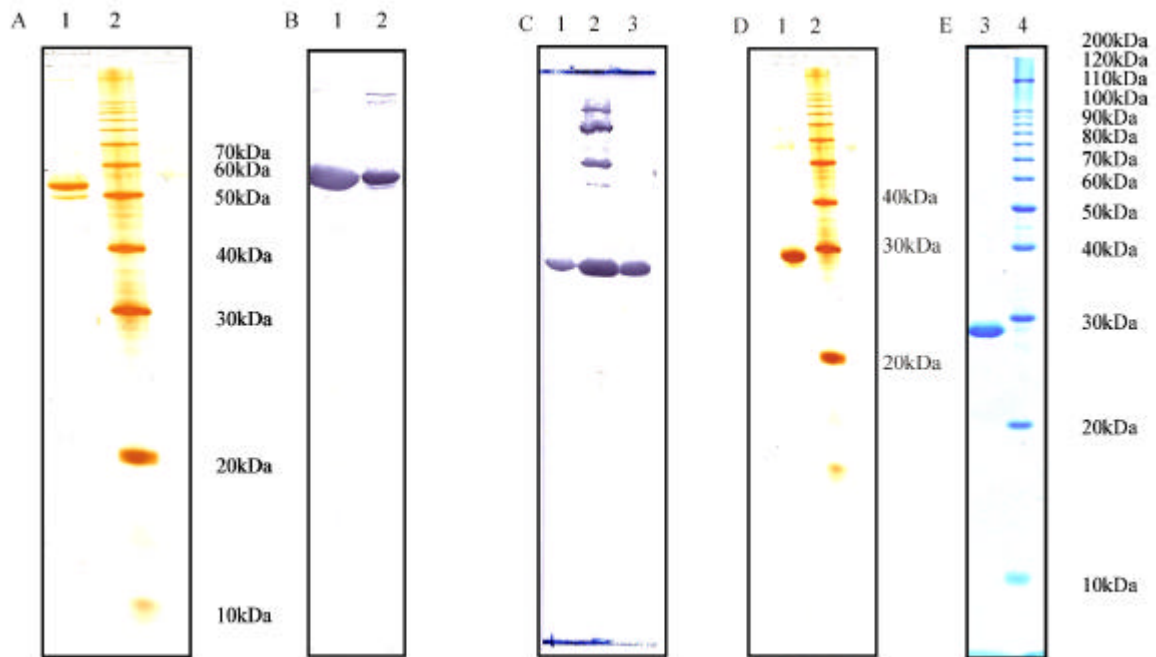


Abb. 45: Reinigung der in *E. coli* exprimierten His-tag Proteine und deren Nachweis durch einen Anti-His-tag Antikörper

A: silbergefärbtes SDS-Gel

Spur 1: 0,1µg ycf46-Komplett Säuleneluat

Spur 2: 10kDa Leiter

B: Westernblot mit 1:2000 verdünntem Penta-His Antikörper

Spur 1: 10µg Gesamtlysat des ycf46-Komplett exprimierenden *E. coli* Stamms

Spur 2: 1µg ycf46-Komplett Säuleneluat

C: Westernblot mit 1:2000 verdünntem Penta-His Antikörper

Spur 1: 10µg Gesamtlysat des ycf46-AB exprimierenden *E. coli* Stamms

Spur 2: 1,6µg ycf46-AB Säuleneluat

Spur 3: 1µg aus dem Gel eluiertes ycf46-AB

D: silbergefärbtes SDS-Gel

Spur 1: 0,2µg aus dem Gel eluiertes ycf46-AB

Spur 2: 10kDa Leiter

E: coomassiegefärbtes SDS-Gel

Spur 1: 2µg aus dem Gel eluiertes ycf46-AB

Spur 2: 10kDa Leiter

4.6.11. Seren gegen den N-Terminus des *Synechocystis* sp. PCC6803 Ycf46

Der unter 4.6.10. dargestellte N-Terminus mit angehängtem His-tag wurde nach 3.39. zur Immunisierung von zwei Kaninchen verwendet. Die Präimmunsere der beiden Kaninchen zeigten keine Reaktion mit *Synechocystis* sp PCC6803 Wildtypgesamtlysaten. Die produzierten Seren wurden mit 500-t bzw. 501-t bezeichnet. Die Nachweisgrenzen wurden anhand eines Dot-Blots mit dem verwendeten Antigen für das Serum 500-t mit 1ng bei einer 1:1000 Verdünnung und für das Serum 501-t mit 0,5ng bei einer 1:1000 Verdünnung bestimmt. Abb. 46 zeigt einen Western-Blot (3.37. und 3.39.) mit *Synechocystis* WT und ycf46::KM Gesamtlysaten, der mit den beiden Seren durchgeführt wurde. Beide Seren zeigten auch bei der ycf46::KM Mutante starke Reaktionen auf derselben Höhe wie beim WT, die auf eine Kreuzreaktion mit dem *Synechocystis* Leserahmen slr0374 zurückzuführen sind, der starke Sequenzhomologien zum ycf46 aufweist (Alignment im Anhang A2).

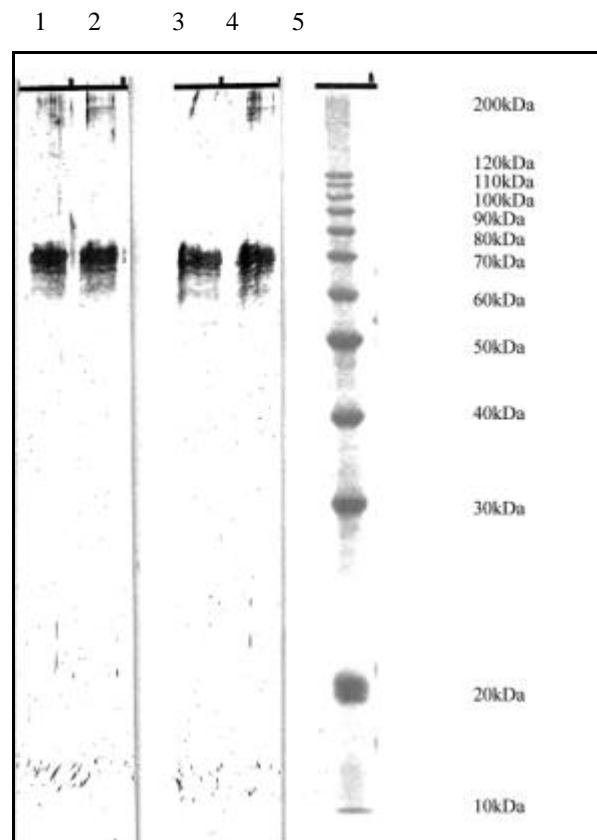


Abb. 46: Westernblot der *Synechocystis* WT und ycf36 Lysate mit den Antiseren 500-t und 501-t

Spur 1: 10 μ g *Synechocystis* WT Gesamtlysate mit 1:500 verdünntem 500-t

Spur 2: 10 μ g *Synechocystis* ycf46::KM Gesamtlysate mit 1:500 verdünntem 500-t

Spur 3: 10 μ g *Synechocystis* WT Gesamtlysate mit 1:1000 verdünntem 501-t

Spur 4: 10 μ g *Synechocystis* ycf46::KM Gesamtlysate mit 1:1000 verdünntem 501-t

Spur 5: 10kDa-Leiter

5. Diskussion

Grundsätzlich bieten sich mit der Deletion oder Insertion zwei Möglichkeiten, einen Leserahmen zu inaktivieren. Bei der Deletion wird der Leserahmen durch eine Resistenzkassette vollständig ersetzt. Es ist dabei oft nötig, benachbarte Gene in das Konstrukt einzubeziehen, wenn die nichtkodierenden Randsequenzen nicht ausreichen, um genügend identische Sequenz für die homologe Rekombination zur Verfügung zu haben. Dies birgt natürlich die Gefahr, diese Gene durch einen Leserahmensprung als Folge einer nicht präzisen Rekombination zu verändern. Bei einer Insertion wird die Resistenzkassette innerhalb des Leserahmens eingefügt, was diesen unterbricht und so inaktiviert. Da der Leserahmen selbst als homologe Sequenz ausreicht, können benachbarte Gene nicht in Mitleidenschaft gezogen werden. Deshalb wurde die Insertion der Deletion vorgezogen.

Genfunktionen können aufgrund der Phänotypanalyse der erzeugten Mutanten bestimmt werden. Diese Phänotypanalyse beruht auf der Auswertung der physiologischen Charakteristika im Vergleich zum Wildtyp. Dabei werden als erste Indikatoren für den Zustand der Mutanten Wachstumseigenschaften und Pigmentierung herangezogen. Da es sich bei den ausgewählten Leserahmen um solche handelt, die in Chloroplasten konserviert sind, muß auch auf Auswirkungen auf die Photosynthese geachtet werden. Die folgenden Tabellen sollen in Verbindung mit der Abb.1 (Einleitung) dazu dienen, entstandene Phänotypen mit den möglicherweise beeinflussten Proteinen der Photosysteme in Verbindung zu bringen.

Tab. 12: Photosystem I Untereinheiten

Gen	Protein	Funktion
psaA	84kDa	Reaktionszentrum, Elektronentransport, bindet Chlorophyll a
psaB	83kDa	Reaktionszentrum, Elektronentransport, enthält FeS-Cluster, bindet Antenne
psaC	9kDa	enthält 2 FeS- Cluster, Elektronenakzeptor und Transfer zum Ferredoxin/Flavodoxin
psaD	18kDa	Ferredoxinbindung, bindet PsaC,
psaE	10kDa	Zyklischer Elektronentransport, Ferredoxin Reduktion
psaF	17kDa	Plastocyanin/Cytochrom c_6 -Bindung
psaG ⁺	11kDa	?
psaH ⁺	11kDa	?
psaI	4kDa	Trimerbildung in Cyanobakterien, Chinonbindung?
psaJ	5kDa	?
psaK	9kDa	?
psaL	18kDa	Rolle in der state transition, Trimerbildung
psaM	3kDa	?
psaN ⁺	10kDa	?

Tab. 13: Photosystem II Untereinheiten

Gen	Protein	Funktion
psbA	D1/39kDa	Reaktionszentrum, enthält Z^+ , Mn-Clusterbindung
psbB	CP47/56kDa	innere Antenne, OEC-Bindung
psbC	CP43/51kDa	innere Antenne, OEC-Bindung?
psbD	D2/39kDa	Reaktionszentrum, enthält D^+
psbE	cytb ₅₅₉ α /9kDa	strukturelle Rolle
psbF	cytb ₅₅₉ β /4kDa	strukturelle Rolle
psbH	6,5kDa	Optimierung des Q_A zu Q_B Elektronentransfers?
psbI	5kDa	assoziiert mit dem Reaktionszentrum
psbJ*	4kDa	Assemblierung und Stabilität des PS II
psbK	3,9kDa	?
psbL	5kDa	Photoreduktion von Q_A ?, essentiell für PS II-Aktivität
psbM*	4,7kDa	?
psbN*	4,7kDa	?
psbO	MSP/33kDa	Mn-Cluster stabilisierend
psbP ⁺	20kDa/OE23	Ca^{2+} und Cl^- Bindung
psbQ ⁺	16,5kDa/OE16	Ca^{2+} und Cl^- Bindung
psbR ⁺	10kDa	?
psbT	4kDa	?
(ycf8)		
psbT ⁺	3kDa	?
psbU*	12kDa	optimiert OEC
psbV*	cytc ₅₅₀ /15kDa	Rolle in Wasserspaltung, stabilisiert PS II
psbW ⁺	6kDa	?
psbX	4kDa	?
psbY	20kDa 2 x 7kDa	?
(ycf32)	matur	

*: nur in Cyanobakterien und nicht-grünen Algen

+: nur in Grünalgen und höheren Pflanzen

nach: Wollman et al., 1999

Die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Photosysteme bei Cyanobakterien und nicht-grünen Algen auf der einen Seite und Grünalgen und höheren Pflanzen auf der anderen Seite sind bei der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf alle Gruppen zu berücksichtigen.

Durch die unterschiedlichen Voraussetzungen für die Genfunktionsanalyse in *Synechocystis* sp. PCC6803 und *Synechococcus* sp. PCC7002, sowie durch variable Zeitspannen bei der Segregation der einzelnen Mutationen bedingt, sind einige Phänotypen der erzeugten Stämme genauer als andere charakterisiert.

5.1. Genfunktionsanalyse des ycf35

Die Inaktivierung des ycf35 wurde im marinen Stamm *Synechococcus* sp. PCC7002 vorgenommen. Dieser weist eine höhere natürliche Kompetenz als *Synechocystis* sp. PCC6803 und ein doppelt so schnelles Wachstum auf. Da aber die Sequenz des Genoms noch nicht vorliegt, mußte der entsprechende chromosomale Bereich kloniert werden.

5.1.1. Sequenz des ycf35 Klons aus *Synechococcus* sp. PCC7002

Das unter 4.1.1. dargestellte chromosomale Fragment enthält neben ycf35 noch weitere Leserahmen unbekannter Funktion, die alle homolog zu *Synechocystis* sp. PCC6803 orfs sind, für die es aber keine weiteren Homologe in den Datenbanken gibt. Da im allgemeinen die Genabfolge der beiden Genome so divergent ist, daß sich die meisten in einem Genom benachbarten Gene im anderen an weit entfernten Positionen wiederfinden, ist es auffällig, daß die Reihenfolge von orf69 (ssl1263 bei *Synechocystis*), ycf35 und orf141 (sll0662 bei *Synechocystis*) zwischen den beiden Arten konserviert ist. Stromaufwärts von orf69 befinden sich AT-reiche Bereiche, die -10 und -35 Regionen eines Promotors bilden könnten (Abb. 47). Zwischen orf69, ycf35 und orf141 existieren keine weiteren Promotor ähnlichen Elemente oder Transkriptionsterminatoren. Es könnte sich also um eine Transkriptionseinheit handeln, die einen funktionalen Zusammenhang der Leserahmen nahelegt.

CCGCCAAAT TTGGTCA ACTTTCCACCAT GCCAAT <u>GAGGAAGCGCACCCATG</u>	orf69-ycf35-orf141
..... TTGTCA TAGTAT	ssl0020 Promotor
..... TTGACA TATAAT	tac-Promotor

Abb 47.: mögliche Promotorsequenzen stromaufwärts des orf69; unterstrichen: Ribosomenbindestelle

In diesem Zusammenhang scheint es daher nicht unbedeutend, daß orf141 (*Synechocystis* sll0662) ein Ferredoxin bakteriellen Typs kodiert. Das Genom von *Synechocystis* sp. PCC6803 enthält acht verschiedene Ferredoxine, von denen allein vier Ferredoxine Isoformen des chloroplastidären PetF sind, die unter verschiedenen physiologischen Bedingungen exprimiert werden. Von diesen zum Ferredoxin I Typ gehörenden Genen ist ssl0020 das am häufigsten exprimierte, während slr0150 unter negativer Kontrolle durch Licht nur gering, sll1382 nur bei Vorhandensein von Glukose und slr1828 anscheinend gar nicht exprimiert wird (Poncelet et al.,1998). Die stromaufwärts von orf69 gelegene Region (Abb. 47) zeigt außerdem neben einer perfekt konservierten Ribosomen-Bindestelle (Shine & Dalgarno, 1974) starke Übereinstimmungen mit den Promotorbereichen des ssl0020

(Poncelet et al. 1998), der wiederum Ähnlichkeiten zum in *Synechocystis* stark aktiven *tac*-Promotor aus *E. coli* (Ferino & Chauvet, 1989) zeigt. Eine ähnlich hohe Transkriptionsrate wie für das *petF* ist also auch für die *orf69-ycf35-orf141* Region anzunehmen.

Ferredoxin hat neben dem Elektronentransport vom Photosystem I zur Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreduktase (FNR) noch weitere Funktionen in verschiedenen Redox-Reaktionen. Die Vielfalt der cyanobakteriellen Ferredoxine gab Anlaß zu der Spekulation, daß diese spezifisch für verschiedene Enzymreaktionen sind (Morand et al., 1994). Zu den Ferredoxin abhängigen Reaktionen gehören Nitrit- und Nitratreduktase (Manzano et al., 1976), Glutamin-2-oxoglutarat Aminotransferase (Glutamat-Synthase, GOGAT; Lea & Mifflin, 1975), Fettsäuresaturase (Wada et al., 1993), die Synthese der Phytobilichromophoren von Phycobiliproteinen und Phytochromen (Beale & Cornejo, 1991; Cornejo et al., 1998) und die Ferredoxin-Thioredoxin Reduktase (Droux et al., 1987). Für die FNR (Onda et al., 2000) und die Sulfit-Reduktase (Yonekura-Sakakibara et al., 2000) wurden in Mais bereits unterschiedlich starke Interaktionen mit verschiedenen Ferredoxinformen nachgewiesen, so daß auch das von *orf141* kodierte Ferredoxin eine spezifische Funktion erfüllen könnte.

5.1.2. Eigenschaften des Ycf35

Das vom *ycf35*-Gen kodierte Protein hat bei einer Länge von 127 überwiegend hydrophilen Aminosäuren eine theoretische Größe von 14,8 kDa und einen berechneten pI von 6,28. Die vorhergesagte Sekundärstruktur (Anhang A3) beschreibt ein Protein mit ausgeglichenem α -Helix zu β -Faltblattverhältnis ohne Transmembranregion. Es enthält keine bekannten Domänen oder Motive, die Hinweise auf die Funktion geben könnten.

5.1.3. Phänotypanalyse des *Synechococcus* sp. PCC7002 *ycf35::KM* Stammes

Voraussetzung für die Untersuchung der Genfunktion mittels Phänotypanalyse eines Stammes, in dem der entsprechende Leserahmen inaktiviert ist, ist die vollständige Segregation der eingeführten Mutation. Da jede Cyanobakterienzelle durchschnittlich 12 Kopien des Genoms enthält (Lebarre et al., 1989), ist dies der kritische Faktor und bedarf daher genauer Kontrolle. Die unter 4.1.2. dargestellte Hybridisierung zeigt, daß die Segregation der Mutation im *Synechococcus ycf35::KM* Stamm vollständig ist, was auch bedeutet, daß der Leserahmen für das Überleben nicht essentiell ist, da bei essentiellen Genen nur eine unvollständige Segregation möglich ist.

Der erste Schritt auf dem Wege zur Charakterisierung eines Phänotyps ist die Untersuchung des Wachstums einer Mutante im Vergleich zu Wildtyp. Das erste Augenmerk richtet sich hierbei darauf, ob die Fähigkeit zum photoautotrophen Wachstum durch die Inaktivierung beeinträchtigt ist, was im Falle des *ycf35* nicht zutrifft (4.1.3.). Die vom Wildtyp kaum abweichenden Wachstumskurven bei normalen wie Schwachlichtbedingungen lassen auf keine physiologische Beeinträchtigung schließen. Da zum Mechanismus der Kältetoleranz die Desaturierung von Fettsäuren gehört (Wada et al., 1990, 1994), kann aufgrund des unbeeinträchtigten Wachstums bei 25°C eine Störung dieses Ferredoxin abhängigen Prozesses (Wada et al., 1993) über eine Verbindung von *ycf35* zum *orf141* (bakt. Ferredoxin) ausgeschlossen werden.

Die im Vergleich zum Wildtyp unveränderten Mengen und Verhältnisse an Chlorophyll und Phycocyanin (4.1.5.1. und 4.1.4.) weisen auf ein unverändertes Photosystem I zu II Verhältnis hin, da das meiste Chlorophyll an das Photosystem I gebunden ist, während die Phycobilisomen mit dem Photosystem II assoziiert sind (Bryant, 1992). Auch eine Störung der Phycobilinsynthese, die durch das *orf141* kodierte Ferredoxin (vergl. 5.1.1.) vermittelt werden könnte, ist somit ausgeschlossen.

Einen genaueren Einblick in die Funktion der Photosynthese bietet die Fluoreszenz-Emissionsspektroskopie. Dabei wird ausgenutzt, daß die Energie eines angeregten Pigmentes drei Wege nehmen kann. Sie kann in Wärme abgegeben werden, was zu einem geringen Prozentsatz immer geschieht, sie kann innerhalb des photosynthetischen Elektronentransportes weitergeleitet werden oder, falls dies nicht möglich ist, in Fluoreszenz abgestrahlt werden. Die Fluoreszenz-Emission gibt also Aufschluß über die Effektivität des Elektronentransportes im Photosyntheseapparat.

Die unter 4.1.5.2. dargestellten Spektren bestätigen durch die Übereinstimmung von Wildtyp und Mutante die bisher aufgeführten Ergebnisse und führen zu dem Schluß, daß die Inaktivierung des *ycf35*-Gens in *Synechococcus* sp. PCC7002 die Photosynthese weder direkt noch indirekt beeinflusst und daß das *ycf35*-Genprodukt unter den getesteten Bedingungen für das Wachstum nicht benötigt wird.

Eine weitere Möglichkeit, eine Veränderung durch die Inaktivierung festzustellen, besteht in der Analyse des Proteinmusters. Auf diese Weise kann der Einfluß auf Proteine nachgewiesen werden, auch wenn dadurch nur eine geringe Modifikation oder gar keine

Veränderung des Phänotyps entsteht. Da jedoch sowohl eine Silber- als auch eine Coomassie-Färbung keine Veränderung der Proteinkomposition (4.1.6.) erkennen ließ, kann derzeit keine Aussage über eine Funktion des ycf35 getroffen werden kann.

5.2. Genfunktionsanalyse des ycf36

5.2.1. Eigenschaften des Ycf36

Das ycf36-Gen von *Synechococcus* sp. PCC7002 kodiert ein 169 Aminosäuren Protein mit einer theoretischen Größe von 20,1 kDa und einem sehr basischen pI von 8,46. Die Proteinsequenz weist zwei Regionen auf, die aufgrund ihrer Hydrophathie membranintegriert sein könnten. Die vorhergesagte Sekundärstruktur läßt auf ein Protein schließen, das nach einem kurzen meist als Coil vorliegenden N-Terminus zwei direkt nacheinander liegende Transmembranhelices besitzt und dessen C-Terminus ein ausgeglichenes Verhältnis von α -Helices und β -Faltblattstrukturen aufweist (vergl. Anhang A3). Es sind keine Domänen oder Motive erkennbar, die auf die Funktion des Proteins schließen lassen. Auch die, mit der Situation in *Synechocystis* übereinstimmende, gleichgerichtete Orientierung von ycf36 und orf317 (*Synechocystis* Leserahmen sll0585) kann keine Hinweise auf eine mögliche Funktion geben, da orf317 ebenfalls keine bekannten Domänen oder Motive aufweist.

5.2.2. Phänotypanalyse des *Synechococcus* sp. PCC7002 ycf36::KM Stammes

Die vollständig segregierte ycf36::KM Mutante (4.2.2.) zeigte keine Beeinflussung des Wachstums bei verschiedenen Lichtbedingungen (4.2.3.). Ihre Unempfindlichkeit gegenüber Nitrat-, Phosphat-, Eisen-, Magnesium und Calciummangel deutet darauf hin, daß weder die Aufnahme dieser für die Proteinsynthese bzw. als Cofaktor für Enzyme wichtigen Nährstoffe noch die Verwertung im Stoffwechsel durch die Inaktivierung des ycf36 beeinträchtigt werden.

Wie für den *ycf35::KM* Stamm konnte auch für diese Mutante kein Unterschied in Pigmentmenge oder -verhältnis im Vergleich zum Wildtyp gefunden werden (4.2.4. und 4.2.5.1.). Die Fluoreszenz-Emissionsspektren zeigen, daß der photosynthetische Elektronentransport ebenfalls nicht vom Fehlen des Ycf36 beeinflusst wird (4.2.5.2.). Das gleiche gilt für die Proteinkomposition (4.1.6.), so daß auch für die Inaktivierung des *ycf36* noch keine Auswirkungen beobachtet werden konnten und der Leserahmen nicht essentiell unter den experimentell überprüften Bedingungen ist. Dies schließt natürlich nicht aus, daß beide Gene unter noch nicht getesteten Streßbedingungen wie z.B. Hitzestreß, Salzstreß, Mangel an anderen Nährstoffen oder Beleuchtung mit Licht eines begrenzten Spektralbereiches eine entscheidende Rolle für das Überleben der Zellen spielen.

5.3. Phänotypanalyse des *Synechococcus* sp. PCC7002 *ycf35::Ωycf36::KM* Stammes

Die Phänotypanalysen der *ycf35::KM* und *ycf36::KM* Stämme ergab, daß keines der beiden Genprodukte für die Biogenese von Photosystem-Untereinheiten oder die Aufrechterhaltung bzw. Optimierung der Photosynthese benötigt wird. Die beiden Stämme zeigten unter keiner der untersuchten Wachstumsbedingungen eine Veränderung des Phänotyps im Vergleich zum Wildtyp. Es wurde daher eine Doppelmutante erzeugt, in der synergistische Effekte Aufschluß über die Funktionen der Proteine geben können.

Die vollständige Segregation der *ycf35::Ω* Mutation im *ycf36::KM* Stamm (4.3.2.) bedeutet, daß auch die gleichzeitige Inaktivierung beider Leserahmen nicht letal für die Zellen sind.

Bei mittlerer Lichtintensität ließ sich noch kein Unterschied zum Wachstumsverhalten des Wildtyps erkennen (4.3.3.). Erst bei suboptimaler Beleuchtung bleibt das Wachstum der Doppelmutante deutlich hinter dem des Wildtyps zurück. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß die Photosynthese in diesem Stamm weniger effektiv ist, was zu einer energetischen Unterversorgung der Zelle bei limitierenden Lichtbedingungen führt. Da es aber keine Hinweise auf eine Beeinträchtigung des photosynthetischen Elektronentransportes in den Einzelmutanten gibt (5.1.3. und 5.2.2.) und die Pigmentkomposition der Doppelmutante ebenfalls der des Wildtyps entspricht (siehe 4.1.6.), kann diese Möglichkeit ausgeschlossen werden.

Des Weiteren würde ein Aktivitätsverlust auf der Ebene des Calvin-Zyklus zu einer erhöhten Photosensitivität führen und somit einen genau entgegengesetzten Phänotyp erzeugen. Als Ursache für die Photosensitivität wird in diesem Fall eine Akkumulation reduzierter Elektronentransporter diskutiert, die in hohen Konzentrationen schädlich sind. Alternativ kommt eine vermehrte Produktion von Sauerstoffradikalen in Frage, die aus einem Mißverhältnis der unverändert hohen Elektronentransportrate der Photosysteme zur erniedrigten Rate der CO₂-Fixierung resultiert (Su & Bogorad, 1991).

Ein weiterer Grund für das schlechte Wachstum der Mutante unter Schwachlichtbedingungen könnte eine Störung im Stoffwechsel sein, die erst bei niedrigen Lichtintensitäten deutlich wird, da nun die Energieversorgung durch die Photosynthese limitiert ist. In Frage kommen zum Beispiel die unter 5.1.1. genannten Reaktionen oder weitere bisher noch nicht als Ferredoxin abhängig erkannte Prozesse, mit denen Ycf35 über das Ferredoxin des orf141 verknüpft sein könnte. Gleichzeitig würde der unveränderte Phycocyaningehalt (4.3.4.) eine Störung der Synthese von Phycobilichromophoren ausschließen. Auch eine Verbindung zur Fettsäuredesaturase kann aufgrund der nicht vorhandenen Kältesensitivität sowohl des ycf35::KM als auch der Doppelmutante nicht vorliegen (Vergl. 5.1.3.).

Die Analyse der Proteinkomposition läßt wie bei den Einzelmutanten keine Veränderung erkennen (4.1.6.). Da die Proteindichte der Gesamtlysate allerdings sehr hoch ist, könnten für alle Mutanten genauere Aussagen über die Proteinzusammensetzung erst durch eine zweidimensionale Auftrennung nach isoelektrischem Punkt und Größe getroffen werden.

Der im Gegensatz zu den Einzelmutanten erkennbar veränderte Phänotyp könnte auf einen funktionalen Zusammenhang der beiden ycf's hinweisen oder durch zwei unabhängige Effekte entstehen, die zusammen die Fitness der Doppelmutante beeinträchtigen.

5.4. Genfunktionsanalyse des ycf43

Für ycf43 wurden Inaktivierungskonstrukte sowohl für *Synechocystis* sp. PCC6803 als auch für *Synechococcus* sp. PCC7002 hergestellt (4.4.1. und 4.4.3.).

5.4.1. Eigenschaften des Ycf43 von *Synechococcus* sp. PCC7002

Wie alle Ycf43-Proteine weist auch das ycf43-Genprodukt von *Synechococcus* sp. PCC7002 in seiner berechneten Sekundärstruktur 6 Helices auf, die ihrem Hydrophathie-index zufolge membranintegriert sind (Anhang A3). Das 254 Aminosäuren umfassende Protein hat eine berechnete Größe von 27,8 kDa und einen theoretischen pI von 4,99.

5.4.2. Funktion des Ycf43

Im Laufe der Arbeit wurde deutlich, daß das ycf43-Gen dem bakteriellen tatC entspricht und somit Bestandteil eines Proteintransporters bzw. -translokators ist, der als Tat-System (twin-arginine-translocating) bezeichnet wird (Alignment im Anhang A2). Das chloroplastidäre Homolog dieses Systems ist der Δ pH-abhängige Proteintransporter (Settles & Martienssen, 1998). Beide Systeme transportieren bereits gefaltete Proteine (Berks, 1996, Settles & Martienssen, 1998), deren Signalsequenz das "Twin-Arginine"-Motiv (S/T)-R-R-x-F-L-K enthalten (Berks, 1996).

In *Escherichia coli* liegen vier der fünf Gene (tatA-D) in einem Operon, während tatE von diesen getrennt ist. Die tatA-D umfassende Operon-Struktur ist aber in anderen Organismen nicht konserviert (Settles & Martienssen, 1998). Nach neueren Untersuchungen ist tatD kein Bestandteil des Transport-Systems, da die Deletion in *E. coli* keinen Einfluß auf den RR-Proteintransport hat und das tatD Genprodukt stattdessen DNase Aktivität zeigt (Wexler et al., 2000). In *Synechocystis* sp. PCC6803 existieren neben ycf43=tatC auch homologe Leserahmen für die restlichen Untereinheiten (tatA/B=slr1046 und tatE=ssl2823), die unabhängig voneinander im Genom kodiert sind. Da homologe Gene für Tat-Untereinheiten in Archaeobakterien, Eubakterien, Cyanobakterien, Chloroplasten und Mitochondrien gefunden wurden, kann der Tat/ Δ pH-Translokator als charakteristisch für alle Membranen prokaryotischen Ursprungs angesehen werden (Settles & Martienssen, 1998).

Für *tatA*, *tatB*, *tatC* und *tatE* existieren in *E. coli* Insertionsmutanten, die alle nicht mehr zum Transport von RR-Proteinen fähig sind (Weiner et al., 1998, Sargent et al., 1998, Bogsch et al., 1998). Da auch die Mutation von *hcf106* (entspricht *tatA* und *tatE*) in Mais den Transport von RR-Proteinen verhindert (Voelker & Barkan, 1995), ist nicht nur die genetische, sondern auch die funktionale Homologie von Tat- und Δ pH-System bewiesen. Die Funktion des Tat/ Δ pH Translokators beschränkt sich aber nicht auf den Transport von Proteinen ins Chloroplastenlumen bzw. bakterielle Periplasma, sondern umfaßt auch die Integration von Proteinen in die Membran (Summer et al., 2000). In *Synechocystis* ist eines der Proteine mit RR-Signal das Rieske-Protein (PetC) des Cytochrom *b₆f* Komplexes, der in Cyanobakterien sowohl Teil der photosynthetischen Elektronentransportkette als auch der Atmungskette ist. Die vollständige Inaktivierung des *ycf43*-Gens wäre demzufolge letal, was wiederum erklärt, warum die Segregation sowohl in *Synechocystis* als auch in *Synechococcus* mißlang (4.4.1 und 4.4.3).

Überraschenderweise ist die Membranintegration im Gegensatz zum Transport in Chloroplasten unabhängig vom Vorhandensein des RR-Motivs, obwohl bewiesen werden konnte, daß auch hierfür der Δ pH-abhängige Transporter verantwortlich ist (Summer et al., 2000). Dies bedeutet zum einen, daß ein weiteres Signal innerhalb der Proteine vorhanden sein muß und zum anderen, daß das Substratspektrum des Tat/ Δ -pH-Translokators wesentlich breiter sein könnte als bisher vermutet. Somit könnten neben dem Rieske-Protein noch weitere essentielle Proteine von der Inaktivierung des *ycf43* betroffen und dadurch mitverantwortlich für die unvollständige Segregation sein.

5.5. Genfunktionsanalyse des *ycf45*

5.5.1. Eigenschaften des *Ycf45*

Die aus den Nukleinsäuresequenzen abgeleiteten Proteinsequenzen aller bisher sequenzierten *ycf45*-Gene besitzen die ATP-Bindemotive Walker A und B (Walker et al., 1982), in deren Umgebung die Sequenz besonders gut konserviert ist (Anhang A2). Es konnten keine anderen bekannten Domänen oder Motive festgestellt werden. In *Synechocystis* sp. PCC6803 kodiert *ycf45* ein Protein aus 589 Aminosäure mit der theoretischen Größe von 65,9 kDa und einem berechneten pI von 5,86.

Eine Berechnung der Sekundärstruktur (Anhang A3) ergab ein ausgeglichenes Verhältnis von α -Helices und β -Faltblattstrukturen und eine relativ große Anzahl an Coils. Keine der

Helices stellt einen potentiellen Membrandurchgang dar, und da die hydrophilen Aminosäuren leicht überwiegen, kann von einem löslichen Protein ausgegangen werden. Es existieren allerdings mehrere Regionen mit überwiegend hydrophoben Aminosäuren, die zur Membrananlagerung dienen könnten.

5.5.2. Phänotypanalyse des *Synechocystis* sp. PCC6803 ycf45::KM Stammes

Die erfolgreiche Segregation der Mutation (4.5.2.) beweist, daß die Inaktivierung des ycf45 nicht letal in *Synechocystis* ist. Das photoautotrophe Wachstum war allerdings schon bei niedrigen Lichtintensitäten verlangsamt und bei Starklicht fand praktisch kein Wachstum mehr statt (4.5.3.). Diese Photosensitivität weist darauf hin, daß in dieser Mutante die Photoinhibierung (Barber & Andersson, 1992; Prasil et al., 1992) durch eine veränderte Energieübertragung im Photosystem II schneller als beim Wildtyp einsetzt. Dies würde bedeuten, daß während des photosynthetischen Elektronentransportes eine übermäßige Reduktion der Akzeptorseite zur Entstehung von Chlorophylltriplets und zur Produktion von Singulett-Sauerstoff führt, wodurch das Reaktionszentrum irreversibel geschädigt wird (Vass et al. 1992; Telfer et al., 1994; Hideg et al., 1998).

Da Nitrat- und Phosphatmangel keinen zusätzlichen Effekt auf das Wachstum hatten (4.5.3.), kann eine allgemeine Störung des Stoffwechsels ausgeschlossen werden. Auch Eisen- und Calciummangel hatten im Gegensatz zu Magnesiummangel keinen Einfluß. Magnesium ist zwar Bestandteil des Chlorophylls, das verminderte Wachstum der Mutante beruht aber nicht auf einem allgemeinem Chlorophyllmangel, da die gemessene Chlorophyllmenge der des Wildtyps entspricht (4.5.4.), und auch in den Absorptions- und Emissionsspektren (4.5.5.) keine Verminderung zu erkennen ist. Da Magnesium bei allen ATP-abhängigen Reaktionen nötig ist, um dieses als Mg-ATP für Enzyme nutzbar zu machen, könnte die Beeinträchtigung einer ATP-abhängigen Enzymreaktion für den erhöhten Magnesiumbedarf der Mutante verantwortlich sein.

Die Messung des Phycocyaningehaltes (4.5.4. Tab. 10) und das Absorptionsspektrum (4.5.5.1.) weisen eine geringe Menge an Phycocyanin für die Mutante aus, was auf eine geringere Anzahl oder Verkleinerung der Phycobilisomen hinweist.

Die erhöhte Fluoreszenz des Allophycocyanins (4.5.5.2. Abb. 31), das als inneres Pigment der Phycobilisomen dem Reaktionszentrum am nächsten ist (vergl. Abb.1 in der Einleitung, wobei *Synechocystis* sp. PCC6803 kein Phycoerythrin besitzt), deutet auf eine schlechtere Übertragung der Anregungsenergie von den Phycobilisomen auf das PS II hin. Weil die Kopplung der Phycobilisomen an das Photosystem II durch Bindung von ApcE (Bryant, 1988, 1991) an CP47=PsbB (Bald et al., 1996) und vermutlich auch an CP43=PsbC (Nilsson et al., 1992) erfolgt, ist eine Mißfaltung oder ein teilweiser Verlust eines dieser Proteine wahrscheinlich. Da in Proteinkomplexen allerdings Veränderungen eines Bestandteils Konformationsänderungen innerhalb des gesamten Komplexes hervorrufen können und sich somit auch auf weit entfernte Regionen auswirken, können auch andere Proteine betroffen sein. So verringern zum Beispiel Austausch der N-terminalen Threonine zu Valinen des D1 die Energieübertragung aus den Phycobilisomen, indem deren Bindung behindert wird (Funk et al., 1998).

Die geringere Proteindichte der *ycf45*-Insertionsmutante im Bereich von 40-60 kDa (4.5.6.) ließe sich durch eine Verringerung der Anzahl von PS II-Reaktionszentren erklären, da sich die Größen von D1/D2 (39kDa), CP43 (51kDa) und CP47 (56kDa) in diesem Bereich befinden. Auch die geringere Emission des Photosystem II (4.5.5.2. Abb. 31) bestätigt diese Annahme. Um dies zu überprüfen, müßten die Proteine zweidimensional aufgetrennt und die entsprechenden Proteine N-terminal ansequenziert werden.

Das in Abb. 30 (4.5.5.2.) dargestellte gespaltene Photosystem II Emissionsmaximum der Mutante schließlich macht deutlich, daß der Energietransfer innerhalb des PS II nicht einwandfrei funktioniert. Die in der Mutante auftauchende Emission bei 691nm wurde von Dzelekalns und Bogorad (1989) als die des CP47-Proteins identifiziert. Sie wurde nur sichtbar, wenn CP43 fehlte, wird also bei voll funktionalem PS II von der Emission des Gesamtkomplexes überdeckt. Die Existenz dieser Spitze im Emissionsspektrum des *ycf45::KM* Stamms bedeutet, daß der Energietransfer zwischen der inneren Antenne und dem Reaktionszentrum beeinträchtigt ist. Ein vollständiges Fehlen des CP43 kann ausgeschlossen werden, da ein CP43 loser Stamm nicht mehr zum photoautotrophen Wachstum fähig ist (Dzelekalns & Bogorad, 1989). Es ist aber möglich, daß die Energieübertragung am CP43 aufgrund von falscher CP43-Faltung oder fehlerhaftem Einbau im PS II bzw. Zusammenbau eines Teils des Photosystems behindert wird. Das gleiche gilt für CP47, wobei die erhöhte CP47-Fluoreszenz dann auf mangelnde Weiterleitung zum Reaktions-

zentrum zurückzuführen wäre. Ein dadurch bedingter höherer Umsatz von CP43 oder CP47 würde zu einem erhöhten Bedarf an Chlorophyll und somit Magnesium führen, was das geringere Wachstum der Mutante bei Magnesiummangel erklären würde. Da das CP43- bzw. CP47-gebundene Chlorophyll im Gegensatz zum Antennen-Chlorophyll des Photosystems I nur einen sehr kleinen Anteil des Gesamtchlorophylls bildet, hätte eine geringere Menge dieser Proteine in Übereinstimmung mit dem *ycf45::KM* Phänotyp keinen nennenswerten Einfluß auf den Chlorophyllgehalt der Zellen.

Mit der Verringerung des Phycocyaningehaltes und der möglicherweise geringeren Menge an PS II-Reaktionszentren handelt es sich um zwei Effekte, die eigentlich unabhängig voneinander sein sollten. Denn Mutanten, denen CP43 oder CP47 fehlen und die nur Spuren von D2 aufweisen, enthalten Phycobilisomen, die normalen Energietransfer zeigen. Die Synthese und funktionale Integrität von Phycobilisomen ist daher unabhängig von der Bildung von PS II-Reaktionszentren (Dzelekalns & Bogorad, 1989). Die Inaktivierung von *ycf45* könnte somit sowohl einen Einfluß auf die Synthese von Phycocyanin bzw. die Assemblierung der Phycobilisomen als auch auf die Assemblierung des Photosystems II haben. Auf der anderen Seite könnte sich eine strukturelle Veränderung im PS II über eine veränderte Bindung auch auf die Phycobilisomen auswirken. Eine Störung des Energietransfers im PS II könnte so in den Phycobilisomen zur Schädigung von Untereinheiten aufgrund mangelnder Weiterleitung der Anregungsenergie beitragen und dadurch zu einer geringen Phycobilisomenkonzentration führen. Yu und Vermaas (1993) konnten zeigen, daß das Fehlen einzelner PS II-Proteine die Akkumulation anderer Untereinheiten verhindert, wobei nicht die Herunterregelung der Translation, sondern der schnellere Abbau dieser Proteine der Grund ist. Die Schädigung einzelner Untereinheiten kann demnach einen Einfluß auf die Konzentration aller Untereinheiten haben.

Bezieht man das Vorhandensein der ATP-Bindestellen im *Ycf45* (5.5.1.) in die Überlegungen ein, ergibt sich daraus ein Hinweis auf dessen Funktion, da ATP-Hydrolyse viele Chaperone charakterisiert (Miernyk, 1999). Eine Chaperonfunktion während der Biogenese oder Assemblierung des Photosystem II oder der Phycobilisomen ist also durchaus wahrscheinlich.

5.6. Genfunktionsanalyse des ycf46

5.6.1. Eigenschaften des Ycf46

Das ycf46-Gen von *Synechocystis* sp. PCC6803 kodiert für ein 499 Aminosäuren großes Protein mit der theoretischen Masse von 56 kDa und einem pI von 5,85. Die vorhergesagte Sekundärstruktur ist überwiegend helical (Anhang A3), wobei aber keine der Helices einen potentiellen Membrandurchgang darstellt. Außerdem enthält das Protein mehr hydrophile als hydrophobe Aminosäuren und ist demnach sehr wahrscheinlich löslich. Der N-Terminus könnte aber aufgrund seiner überwiegend hydrophoben Aminosäuren der Membranalagerung dienen.

Das ycf46-Genprodukt besitzt eine AAA-Familiendomäne, die die Walker A und B Motive für ATP-Bindung beinhaltet (vergl. Anhang A2).

5.6.2. Phänotypanalyse des *Synechocystis* sp. PCC6803 ycf46::KM Stammes

Die vollständig segregierte *Synechocystis* sp. PCC6803 ycf46::KM Mutante (5.6.2.) zeigt deutliche Photosensibilität (5.6.3. Abb. 35 und 36), die auf eine schnellere Photoinhibition durch Überreduktion der Akzeptorseite des Photosystems II hinweist (vergl. 5.5.2.). Auch die Tatsache, daß das Wachstum durch Zugabe von Glukose wiederhergestellt werden kann (5.6.3. Abb. 37), ist charakteristisch für Stämme mit beeinträchtigter Photosynthese, da Glukose von Cyanobakterien im Licht nur dann genutzt wird, wenn sie durch Inhibition des Photosystems II auf diese Energiequelle angewiesen sind (Pelroy et al., 1972; Hirano et al., 1980).

Um den Elektronentransport während der Photosynthese genauer zu analysieren, wurden die Fluoreszenz-Emissionsspektren von *Synechocystis* ycf46::KM und Wildtyp verglichen. Es zeigte sich, daß die Mutante bei einer Chlorophyll-spezifischen Anregung eine höhere Photosystem I-Fluoreszenz aufweist (4.6.5.2. Abb. 40). Die Photosystem I-Aktivität ist also höher als im Wildtyp. Der erhöhte Chlorophyllgehalt (4.6.4.) weist außerdem auf einen etwas höhere Photosystem I-Gehalt hin, da das meiste Chlorophyll in Cyanobakterien PS I assoziiert ist (Bryant, 1992).

Eine erhöhte Aktivität bei gleichzeitig leicht erhöhtem Gehalt von Photosystem I ist bei *Synechocystis* sp. PCC6803 auch bei Hochsalzbedingungen bekannt (Jeanjean et al., 1993). In diesen Zellen wurde ein vermehrter zyklischer Elektronentransport festgestellt, der eine größere ATP-Produktion ermöglicht. Das zusätzliche ATP wird für den aktiven Ionen-transport benötigt (Hibino et al., 1996; Jeanjean et al., 1998). Aus Versuchen mit Spinat und *Chlamydomonas* wurde geschlossen, daß der zyklische Elektronentransport durch die Photosystem II abhängige Sauerstoffentwicklung inhibiert wird und daß hierfür die Konkurrenz mit der Mehler-Reaktion verantwortlich ist (Hormann et al., 1994; Finazzi et al., 1999). Im Falle der ycf46::KM Mutante könnte eine geringere Photosystem II-Aktivität (4.6.6.) aufgrund von Photoinhibierung über eine dadurch bedingte geringere Sauerstoffkonzentration einen vermehrten zyklischen Elektronentransport verursachen, der sich in der erhöhten PS I-Fluoreszenz widerspiegelt. Eine Erhöhung der zyklischen Elektronentransportes ist auch als Reaktion auf Photoinhibierung oder Hitzeschock bekannt. Das dadurch zusätzlich produzierte ATP wird in diesen Fällen wahrscheinlich für die Neusynthese streßgeschädigter Proteine verwendet (Canaani et al., 1989; Goldbeck & Bryant, 1991; Fork & Herbert, 1993). Da die ycf46 Mutante schneller photoinhibiert wird, könnte zusätzliches ATP so die Energie für den Ersatz geschädigter Photosystem II Proteine liefern.

Die erhöhte Allophycocyaninfluoreszenz (4.6.5.2. Abb. 41) läßt auf eine geringere Energieübertragung von den Phycobilisomen auf das Photosystem II schließen. Die Verschiebung der Photosystem II-Fluoreszenz bei Chlorophyllanregung und das sehr flache PS II-Maximum bei Phycobilisomenanregung (4.6.5.2.) weisen auf einen gestörten Energietransfer innerhalb des PS II der Mutante als Grund für die schnellere Photoinhibierung und die ineffizientere Kopplung an die Phycobilisomen hin. Ähnlich wie beim ycf45::KM Stamm (vergl. 5.5.2.) ist ein kleines vom CP47 stammendes Fluoreszenzmaximum bei 691nm (Abb.40) sichtbar, das in vollfunktionalen PS II-Komplexen nicht entsteht (Dzelekalns & Bogorad, 1989).

Einen Beweis für eine Beeinträchtigung der Photosystem II-Funktion durch die Inaktivierung des ycf46 liefert die Messung der Sauerstoffentwicklung im Vergleich zum Wildtyp (4.6.6.). Die Mutante zeigt zwar einen relativ milden Abfall der Gesamtphotosyntheseleistung, aber auch einen deutlichen Rückgang der PS II-Aktivität.

Insgesamt ergibt sich aus dem charakterisierten Phänotyp der *ycf46::KM* Mutante eine erstaunliche Übereinstimmung mit denen für die *Synechocystis*-Deletionsmutanten Δ psbO (Burnap & Sherman, 1991; Bricker, 1992) und Δ psbV (Shen et al. 1995) beschriebenen Phänotypen. PsbO (= MSP: Mangan stabilisierendes Protein) und PsbV (= Cyt c_{50}) sind Teil des Wasserspaltungsapparates. Sie sind an der Sauerstoffentwicklung sowie an der Stabilisierung des Photosystems II beteiligt, aber für beides in Cyanobakterien nicht essentiell (Burnap & Sherman, 1991; Shen et al. 1995).

Das MSP ist das einzige Protein des cyanobakteriellen Wasserspaltungsapparates (OEC), das in allen Chloroplasten konserviert ist. Im Gegensatz zu Cyanobakterien ist es aber in *Chlamydomonas reinhardtii*, dessen OEC dem der höheren Pflanzen entspricht, essentiell für das photoautotrophe Wachstum (Mayfield et al., 1987; de Vitry et al., 1989). Dies ist vermutlich auf die unterschiedliche Zusammensetzung des Komplexes und nicht auf eine unterschiedliche Funktion des MSP zurückzuführen, da bei der *Chlamydomonas* Mutante das Fehlen des MSP zum Verlust aller drei OEC-Untereinheiten führt (Mayfield et al., 1987), während die Deletion in Cyanobakterien die Bindung der anderen Untereinheiten nicht verhindert (Shen & Inoue, 1993). Auch die identische Lage des MSP in *Synechococcus elongatus* und *Chlamydomonas reinhardtii* (Nield et al., 2000) legen eine identische Funktion in beiden Photosystemen nahe.

Die Eigenschaften der drei Stämme sind in Tabelle 14 gegenübergestellt. Dies ist zulässig, da die Messungen der Sauerstoffentwicklung und der Fluoreszenzemissionsspektren, soweit dies aus den Arbeiten erkennbar ist, unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt wurden. Allerdings weisen die Meßwerte in der Arbeit über den Δ psbV Stamm sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutante eine größere Differenz zwischen Gesamtphotosynthese und PS II-Aktivität auf. Es müssen also in diesem Fall andere Bedingungen vorgelegen haben, die aus den Angaben im Methodenteil nicht erkennbar sind. Die Ergebnisse sind also nicht absolut vergleichbar. Der Faktor, um den die Sauerstoffproduktion bei alleiniger PS II-Messung zunimmt, gibt die Effizienz des Photosystems II im Vergleich zur Gesamtphotosyntheseleistung an. Der Unterschied zum Wildtyp ist für die Δ psbV Mutante geringer, dies sollte aber aus dem oben genannten Grund nicht überbewertet werden.

Da sowohl psbO- als auch psbV-Deletionsmutanten geringeres photoautotrophes Wachstum, erhöhten Calciumbedarf und um 60% reduzierte PS II-Aktivität aufweisen, könnte der beschriebene Phänotyp der *ycf46* Mutante auf den Verlust von PsbO- oder PsbV-Funktion

zurückzuführen sein. Die Inaktivierung des *ycf46* hat sich aber nicht auf alle Untereinheiten des Wasserspaltungsapparates ausgewirkt, da keine verminderte Thermotoleranz auftrat, wie sie für *psbU* Deletionsmutanten typisch ist (Nishiyama et al., 1999).

Tab. 14: Vergleich der Phänotypen von *ycf46::KM*, Δ *psbO* und Δ *psbV*; n.u.: nicht untersucht

	<i>ycf46::KM</i>	Δ <i>psbO</i>	Δ <i>psbV</i>
photoautotrophes Wachstum in % vom WT Wachstum	60%	65%	53-67%
Gesamtphotosynthese in % der WT Leistung	74%	66%	60-67%
PS II-Aktivität (H ₂ O zu DCQB) in % der WT Leistung	40,8%	32,5%	38-42%
Steigerung der O ₂ -Produktion bei e-Transport zu DCQB statt CO ₂ in % der WT-Steigerung	53,9%	48,8%	58,1-69,7%
verringerte PS II-Fluoreszenz	+	+	n.u.
größere Phycobilisomen-Fluoreszenz	+	+	n.u.
höherer Bedarf an Ca ²⁺	+	+	+

Die Δ *psbV* Mutante von *Synechocystis* sp. PCC 6803 zeigt neben den in Tabelle 14 aufgeführten Charakteristika eine Verringerung der D1-, D2- und CP43-Proteine, was wegen der Beeinträchtigung mehrerer Komponenten auf eine Destabilisierung des Photosystems II und nicht auf eine verminderte Synthese der Untereinheiten zurückgeführt wurde (Shen et al., 1995). Diese Destabilisierung könnte durch eine veränderte Konformation des D1-Proteins bei Abwesenheit des Cyt c₅₅₀ bedingt sein, da diese beiden Untereinheiten elektronenmikroskopischen Untersuchungen zufolge aneinander binden (Nield et al., 2000). Da die Verringerung der PS II-Untereinheiten geringer als der Verlust an Sauerstoffentwicklung ist, wirkt sich der Verlust von Cyt c₅₅₀ nicht nur auf die Stabilität sondern auch auf die Funktion des PS II aus (Shen et al., 1995).

Das Proteinmuster der *ycf46* Mutante zeigt im Bereiche von 30-45 kDa eine geringere Dichte, was auf eine Verringerung der D1/D2- (39kDa) und CP43-Proteine ähnlich wie in der Δ *psbV* Mutante hinweisen könnte (4.6.7. Abb. 43). Das *psbV* selber liegt mit 15 kDa genau im Größenbereich der Phycobiliproteine (15-22 kDa), die in so großer Menge vor-

kommen, daß sie alle anderen Proteine überdecken. Da mir kein spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, kann keine Aussage über einen Effekt der *ycf46::KM* Inaktivierung auf den Gehalt an Cyt *c*₅₅₀ gemacht werden. Die Transkription des *psbV* scheint jedoch unbeeinträchtigt zu sein (4.6.9.), was die Möglichkeit einer Genregulation durch Ycf46 ausschließen würde.

Da das MSP in Cyanobakterien mit deletiertem *psbV* alleine die Sauerstoffproduktion aufrechterhalten kann (Shen et al., 1995), ist der geringere MSP-Gehalt der *ycf46* Mutante (4.6.7.) nicht auf einen Verlust des Cyt *c*₅₅₀ zurückzuführen. Der Einbau eines mißgefalteten Cyt *c*₅₅₀ in einen Teil der Wasserspaltungskomplexe, könnte allerdings in diesen die Bindung des MSP verhindern und den reduzierten MSP-Gehalt erklären. Eine höhere Fehlerrate bei der Cyt *c*₅₅₀-Faltung wäre dann die Folge fehlende Chaperonaktivität des Ycf46.

Man muß an dieser Stelle bedenken, daß PsbV den Grünalgen und höheren Pflanzen fehlt, welche anstelle von PsbU und PsbV die Untereinheiten PsbP und PsbQ besitzen (vergl. Tab. 13), die auch die gleiche Position im Komplex einnehmen (Nield et al. 2000). Eine alleinige Funktion als PsbV-Chaperon würde Ycf46 also in der grünen Linie überflüssig machen.

Da der *ycf46::KM*-Phänotyp dieselbe Ähnlichkeit sowohl zum Δ *psbV* Phänotyp als auch zum Δ *psbO* Phänotyp aufweist, wurden die Auswirkungen der *ycf46*-Inaktivierung auf PsbO genauer untersucht. Ein Immunoblot der Gesamtproteine mit Anti-PsbO und Anti-PsaD als Kontrolle ergab für den *ycf46::KM* Stamm einen gegenüber dem Wildtyp um 50% verminderten Gehalt an PsbO bei unveränderter PsaD Menge (4.6.7., Abb. 44). Eine entsprechend geringere Proteinmenge bei der apparenten Größe des PsbO von etwas mehr 30 kDa korreliert mit diesem Ergebnis (4.6.7., Abb. 43). Gleichzeitig zeigen erste Transkriptanalysen (4.6.9.), daß die Transkriptionsrate des *psbO* in der Mutante höher als im Wildtyp ist, was für einen erhöhten Umsatz des Proteins spricht.

Um auszuschließen, daß dies auf eine unabhängige Mutation im *psbO* zurückzuführen ist, wurde das Gen der Mutante amplifiziert, kloniert und sequenziert (4.6.8.). Die Sequenz entsprach der Wildtypsequenz, so daß die Ursache für die Verringerung außerhalb des *psbO* zu suchen ist.

Wie läßt sich der Phänotyp der *ycf46* Mutante aus dem Verlust an Mangan stabilisierendem Protein erklären?

Die Funktion des MSP besteht in der Stabilisierung des Ca^{2+} am Mangan-Cluster, wodurch dieser vor Reduktion durch die Umgebung geschützt wird und weniger schnell vom Reaktionszentrum dissoziieren kann. Da das Mangan-Cluster die vier Oxidationsäquivalente, die zur Freisetzung von Sauerstoff aus Wasser nötig sind, akkumulieren kann (Kok et al., 1970), ist seine Stabilität Voraussetzung für die Funktionalität des Komplexes. Das MSP verändert außerdem durch seine Bindung an das PS II den Komplex, so daß die Zugänglichkeit oder Bindungsaffinität für Mangan herabgesetzt wird und so eine Schädigung durch überschüssige Ladungsakkumulierung verhindert wird (Chu et al., 1994; Burnap et al., 1996). So können sowohl die Photosensibilität und die geringere Sauerstoffentwicklung als auch der höhere Bedarf an Calcium der *ycf46* Mutante durch den Mangel an PsbO erklärt werden.

Das Problem hierbei ist allerdings, daß diese Effekte denen einer *psbO*-Deletion entsprechen, der *ycf46::KM* Stamm aber noch 50% PsbO enthält. Eine Erklärung hierfür könnte in der Stöchiometrie des MSP liegen. Immunelektrophoresen und Coomassie gefärbte Gele ergaben ein Ergebnis von 1 MSP/Photosystem II (Andersson et al., 1984; Murata et al., 1984), während in letzter Zeit Immuno-Quantifikationen (Xu & Bricker, 1992) und Rekonstitutionsversuche (Leuschner & Bricker, 1996; Betts et al., 1997) Hinweise auf eine Stöchiometrie von 2 MSP/PSII geben. In diesen Arbeiten werden zwei verschiedene Bindungsstellen für das MSP beschrieben, von denen das an CP47 gebundene die Sauerstoffentwicklung reguliert und das an CP43 gebundene die Struktur des Komplexes stabilisiert (Betts et al., 1997). Die beiden Bindungsstellen könnten unterschiedliche Faltungszustände verlangen, wobei der des regulatorischen MSP vom Ycf46 vermittelt würde. Unter dieser Voraussetzung ließe sich der Phänotyp durch eine fehlende Assemblierung des regulatorischen MSP erklären, da so trotz halber Menge an MSP die Funktion ganz wegfallen könnte.

Es ist aber auch möglich, daß die Assemblierung eines mißgefalteten MSP ins Photosystem II dieses mehr destabilisiert als das komplette Fehlen. Die geringere Menge an MSP wäre dann darauf zurückzuführen, daß das mißgefaltete Protein einem schnelleren Abbau unterliegt. Durch die Destabilisierung des PS II könnten die schwächeren Banden auf der Höhe von D1, D2, und CP47 erklären (4.6.7.), die bei einer Deletion des *psbO*-Gens weiterhin in Wildtypmengen vorliegen (Burnap & Sherman, 1991).

Grundsätzlich besteht aber die Frage, ob das MSP überhaupt ein Chaperon zur Faltung benötigt. Auch zu diesem Thema gibt es divergente Meinungen. Ein Protein kann drei verschiedene Konformationen haben: ungefaltet, "molten globule" (Bezeichnung für Faltungsintermediate) und nativ (Tcherkasskaya & Ptitsyn, 1999). Auf der einen Seite wird die Sekundärstruktur des MSP als nativ ungefaltet bezeichnet und die daraus resultierende Flexibilität als Voraussetzung für die Insertion in den OEC gesehen (Lydakis-Simantiris et al., 1999). Andere Autoren kommen zu dem Schluß, daß es sich um eine "molten globule" Struktur handelt, die ebenfalls die nötige Flexibilität ausweist und zudem die Bindung von Calcium ermöglichen soll (Shutova et al., 2000). Die "molten globule"-Konformation ist ein Faltungsintermediat, das von Chaperonen erkannt und gebunden werden kann (Robinson et al., 1994; Miernyk, 1999). Liegt das MSP nativ ungefaltet vor, ist ein Chaperon für dessen Faltung unnötig. Im Falle einer "molten globule"-Konformation des MSP ist eine Chaperon abhängige Faltung hingegen wahrscheinlich.

Neben der demnach fraglichen Rolle während der MSP-Faltung ist es genauso gut möglich, das Ycf46 am Prozeß der Assemblierung des Photosystems als solchem beteiligt ist. Das Fehlen von Ycf46 könnte zu einer Mißkonformation innerhalb des Photosystems führen, die dann neben dem Elektronentransport (4.6.2.) auch den Wasserspaltungsapparat und hier speziell das MSP beeinträchtigt. Die Konformationsänderungen, die zur vorliegenden Störung der PS II-Funktion führen, können natürlich auch durch unkorrekte Faltung einer Untereinheit bedingt sein, durch die für die MSP-Bindung nötige Aminosäuren unzugänglich werden. So führt der E29Q-Austausch im CP43 durch die Destabilisierung des Komplexes zu geringeren D1- und MSP-Gehalten (Rosenberg et al., 1999). Auch die RR384/385EE Mutation im CP47 bewirkt aufgrund beeinträchtigter MSP-Bindung einen zum Δ psbO Stamm identischen Phänotyp (Qian et al., 1997).

Zwischen diesen beiden Möglichkeiten Funktionen kann im Moment nicht unterschieden werden, da beide mit Phänotyp der Mutante gleich gut korrelieren.

Es sind insgesamt drei mögliche Funktionen für den Ycf46 diskutiert worden, deren Übereinstimmung mit den Charakteristika des *Synechocystis* sp. PCC ycf46::KM Stammes in der folgenden Tabelle noch einmal zusammenfaßt ist.

Tab.: 15 Übereinstimmung der möglichen Ycf46-Funktionen mit dem ycf46::KM Phänotyp

	Photosensibilität	erhöhter Ca ²⁺ Bedarf	verringerte PSII Aktivität	Destabilisierung des PS II	geringerer MSP Gehalt
Chaperon für Cyt c ₅₅₀	+	+	+	+	?
Chaperon für MSP	+	+	+	?	+
Chaperon für PS II Assemblierung oder Faltung einer Reaktionszentrums- untereinheit	+	+	+	+	+

Da sowohl eine Funktion als Chaperon für Cyt c₅₅₀ als auch für das MSP fraglich erscheint, ist die wahrscheinlichste Funktion die eines Chaperons für die korrekte PS II-Assemblierung oder die Faltung einer Reaktionszentrums-Untereinheit, da so alle beobachteten Auswirkungen der ycf46-Inaktivierung erklärt werden können.

Unabhängig von der Frage, ob Ycf46 ein Chaperon für die Assemblierung des PS II oder die Faltung einer Untereinheit ist, stellt sich die Frage, ob es sich überhaupt um ein Chaperon handelt.

Molekulare Chaperone verhindern unerwünschte Verbindungen oder Aggregate hydrophober Flächen von ungefalteten oder teilweise gefalteten Proteinen und führen diese weiteren Faltungs-, Transport- oder Degradierungsprozessen zu (Boston et al., 1996; Miernyk, 1997; Netzer & Hartl, 1998; Sigler et al. 1998). Daß es sich bei Ycf46 tatsächlich um ein Chaperon handelt könnte, wird durch seine Zugehörigkeit zur sogenannten AAA-Familie (ATPases associated with diverse cellular activities, Kunau et al., 1993) unterstützt. Es handelt sich hierbei um eine Proteinfamilie, die durch eine konservierte Region von 230-250 Aminosäuren gekennzeichnet ist, die neben den ATP-Bindemotiven Walker A und B (vergl. Anhang A2) auch eine gemeinsame Signatur besitzen (Confaloneri & Duguet, 1995; Patel & Latterich, 1998). AAA-Proteine existieren in Archaeobakterien, Eubakterien und Eukaryoten gleichermaßen und sind an verschiedensten Prozessen wie Proteinabbau,

Polypeptidkomplex-Assemblierung, Vesikelfusion, Zellzykluskontrolle und sekretorischen Vorgängen beteiligt (Latterich et al., 1995; Arlt et al., 1996; Mayer et al., 1996; Leonhard et al., 1999; Cruciat et al., 1999). Allen Prozessen ist die Bindung von Proteinen und die Hydrolyse von ATP durch das AAA-Protein gemeinsam. Die Chaperon-definierende Fähigkeit der AAA-Domäne, ungefaltete Proteine spezifisch zu binden, wurde von Leonhard et al. 1999 bewiesen. Ein Charakteristikum aller AAA-Proteine ist die Oligomerisierung (Cruciat et al., 1999; Vale, 2000). Die Aggregate, die bei der Aufreinigung der Ycf46-Expressionsproteine entstehen (4.6.10.1.), könnten eine Folge der Denaturierung und Aufkonzentrierung sein. Es könnte sich allerdings auch um spezifische Oligomere handeln, die für die Funktion wichtig sind.

Für die diskutierte Funktion des Ycf46 in der Komplex-Assemblierung findet sich ein Beispiel innerhalb dieser AAA-Familie, das als Modell für die Rolle des Ycf46 in der Photosystem II-Assemblierung fungieren könnte.

Das Bsc1-Protein aus Hefe-Mitochondrien ist ein molekulares Chaperon für die Assemblierung des Rieske Proteins und des Qcr10 Proteins im Cytochrom bc_1 Komplex. Es bindet an den teilweise assemblierten Präkomplex und hält ihn dadurch in einer Konformation, die die Inkorporation von Rieske-Protein und Qcrp10p möglich macht. Für das Lösen von Bsc1p aus diesem Komplex mit dem Cytochrom bc_1 -Präkomplex ist die Hydrolyse von ATP durch Bsc1p nötig (Cruciat et al., 1999).

Die Chaperonfunktion sowie die Substrate des Ycf46 müssen zur Überprüfung dieser These nachgewiesen werden, wozu folgende Ansätze verwendet werden können:

Die Substrate eines Chaperons können durch Immunopräzipitation mit einem spezifischen Antikörper bestimmt werden, da sie mit dem Chaperon kopräzipitieren, wenn sie an dieses gebunden sind. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, das überexprimierte Ycf46 (4.6.10.) mit seinem His-tag an eine Nickelsäule zu binden und so die Substrate aus dem Lysat des Wildtyps zu isolieren. In beiden Fällen könnte eine Mutation der Glutaminsäure des Walker B Motivs zu einem Glutamin hilfreich sein, da so die ATP-Hydrolyse blockiert wird, wodurch die Substratbindung anderer AAA-Proteine verstärkt werden konnte (Vale, 2000).

Die gegen den N-Terminus des Ycf46 produzierten Antiseren (unter 4.6.11.) können zur Immunopräzipitation aufgrund ihrer Reaktion mit dem Gesamtlisat der Inaktivierungsmutante nicht ohne weitere Aufreinigung verwendet werden. Ein Teil der Antikörper

reagiert wahrscheinlich mit Epitopen, die auch im slr0374-Genprodukt enthalten sind. Nach einer Reinigung des polyklonalen Serums am Lysat der ycf46::KM Mutante sollten aber noch genügend Ycf46 spezifische Antikörper vorhanden sein, da ausreichend Sequenzbereiche vorhanden sind, die keine Übereinstimmung der beiden Proteine zeigen (vergl. Alignment im Anhang A2).

Aufgrund der fast identischen Größe (Ycf46: 55,97kDa und Slr0374: 56,44kDa) und der großen Sequenzübereinstimmung der beiden Genprodukte (vergl. A2) besteht die Möglichkeit einer Genduplikation und somit eines gemeinsamen Ursprungs der beiden Gene. Da bei Eisenmangel die Transkription von slr0374 stark ansteigt, kann für das slr0374-Genprodukt wie auch für Ycf46 eine Funktion im Rahmen einer Stressbewältigung der Zelle abgeleitet werden. Vermutlich ist dies aber nicht die einzige Aufgabe des slr0374-Genproduktes, da es auch bei ausreichender Eisenversorgung gut detektierbar ist (Singh & Sherman, 2000).

6. Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit in Cyanobakterien durchgeführte Inaktivierung mehrerer konservierter Leserahmen nicht-grüner Chloroplasten lieferte Einblicke in deren bisher unbekannt Funktion.

Durch die Inaktivierung von *ycf35* und *ycf36* in *Synechococcus* sp. PCC7002 konnte nachgewiesen werden, daß die Genprodukte dieser Leserahmen keinen Einfluß auf die Funktion und Effizienz der Photosynthese haben und ihr Fehlen zu keiner erkennbaren Veränderung des Phänotyps führt. Erst eine gleichzeitige Inaktivierung bewirkt eine Verminderung des Wachstums unter Schwachlichtbedingungen. Aufgrund der physiologischen Eigenschaften der Einzelmutanten sowie der Doppelmutante kann des weiteren eine Rolle in der Synthese von Phycobilichromophoren und Fettsäuren ausgeschlossen werden. Die zwischen *Synechocystis* sp. PCC6803 und *Synechococcus* sp. PCC7002 konservierte Lage des *ycf35* vor einem Ferredoxin kodierendem Leserahmen legt eine Verbindung zu einer Ferredoxin abhängigen Reaktion nahe.

Die Inaktivierung des *ycf45* in *Synechocystis* sp. PCC6803 führte zu einer erhöhten Photosensibilität, einem teilweisen Verlust des Antennenpigmentes Phycocyanin, einer Störung der Energieübertragung innerhalb des Photosystems II und einer Verringerung des Proteingehaltes im Bereich der Photosystem II-Untereinheiten. Diese Charakteristika lassen auf eine Chaperonfunktion des Ycf45 während der Biogenese des Photosystems II schließen.

Auch ein *Synechocystis* sp. PCC6803 Stamm mit inaktiviertem *ycf46* erwies sich als photosensitiv. In diesem Fall konnte neben einer erhöhten Photosystem I-Fluoreszenz und einem höheren Gehalt an Chlorophyll ebenfalls eine Beeinträchtigung der Energieübertragung im Photosystem II nachgewiesen werden. Die Mutante hat eine auf 40% reduzierte Photosystem II-Aktivität und besitzt nur die Hälfte des 33kDa Proteins des Wasserspaltungsapparates. Geringere Proteindichten im Größenbereich der Photosystem II-Untereinheiten lassen auf eine Reduktion dieses Komplexes schließen. Aus dem Vergleich mit bereits bekannten Photosystem II-Mutanten kann wie für Ycf45 auch für Ycf46 eine Chaperonfunktion während der Assemblierung des Photosystem II abgeleitet werden.

7. Literatur

Allen J.F.:

Redox control of gene expression and the function of chloroplast genomes – an hypothesis
Photosynth. Res. **36**, 95-102 (1993a)

Allen J.F.:

Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and
mitochondrial genomes

J. Theor. Biol. **165**, 609-631 (1993b)

Allen J.F., Raven J.A.:

Free-radical-induced mutation vs redox regulation: costs and benefits of genes in
organelles

J. Mol. Evol. **42**, 482-492 (1996)

Andersson B., Larsson C., Jansson C., Ljungberg U., Åkerlund H.:

Immunological studies on the organization of proteins in photosynthetic oxygen evolution
Biochim. Biophys. Acta **766**, 21-28 (1984)

Andersson S.G.E., Kurland C.G.:

Reductive evolution of resident genomes

Trends Microbiol. **6**, 263-268 (1999)

Arlt H., Tauer R., Feldmann H., Neupert W., Langer T.:

The YTA 10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner
membrane of mitochondria

Cell **85**, 875-885, (1995)

Arnon D.I.:

Conversion of light into chemical energy in photosynthesis

Nature **184**, 10-21 (1959)

Bald D., Kruij J., Rögner M.:

Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes: How is the phycobilisome connected with the photosystems?

Photosyn. Res. **49**, 103-118 (1996)

Bancroft I., Wolk C.P., Oren E.V.:

Physical and genetic maps of the genome of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120

J. Bacteriol. **171**, 5940-5948 (1989)

Barber J., Andersson B.:

Too much of a good thing: Light can be bad for photosynthesis

Trend Biochem. Sci. **17**, 61-66 (1992)

Barten R., Lill H.:

DNA uptake in the naturally competent cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

FEMS Microbiol. Lett. **129**, 83-88 (1995)

Beale S.I., Cornejo J.:

Biosynthesis of phycobilins. Ferredoxin-mediated reduction of biliverdin catalyzed by extracts of *Cyanidium caldarium*

J. Biol. Chem. **266**, 22328-22332 (1991)

Berks B.C.:

A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors?

Mol Microbiol **22**, 393-404 (1996)

Berzborn R.J.:

Antibody approach to membrane architecture

in: Methods in Enzymology **69**, 429-502

San Pietro A., Colowick P., Kaplan N.O. (eds); Academ. Press N.Y. (1980)

Betts S.D., Ross J.R., Pichersky E., Yocum C.F.:

Mutation Val235Ala weakens binding of the 33-kDa manganese stabilizing protein of photosystem II to one of two binding sites

Biochem. **36**, 4047-4053 (1997)

Bhaya D., Grossman A.:

Targeting proteins to diatom plastids involves transport through an endoplasmic reticulum

Mol. Gen. Genet. **229**, 400-404 (1991)

Birnboim H., Doly J.:

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA

Nucl. Acids Res. **7**, 1513-1523 (1979)

Blum H., Beier H., Gross H.J.:

Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels

Electroph. **9**, 93-99 (1987)

Bogsch E.G., Sargent F., Stanley N.R., Berks B.C., Robinson C., Palmer T.:

An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria.

J. Biol. Chem. **273**, 18003-18006 (1998)

Boudreau E., Takahashi Y., Lemieux C., Turmel M., Rochaix J.:

The chloroplast ycf3 and ycf4 open reading frames of *Chlamydomonas reinhardtii* are required for the accumulation of the photosystem I complex

EMBO J. **16**, 6095-6104 (1997)

Boston R.S., Vittanen P.V., Vierling E.:

Molecular chaperones and protein folding in plants

Plant Mol. Biol. **32**, 191-222 (1996)

Bricker T.:

Oxygen evolution in the absence of the 33-Kilodalton manganese-stabilizing protein

Biochem. **31**, 4623-4628 (1992)

Bryant D.A., Tandeau de Marsac N.:

Isolation of genes encoding components of photosynthetic apparatus

Meth. Enzym. **167**, 755-765 (1988)

Bryant D.A.:

Genetic analysis of phycobilisome biosynthesis, assembly, structure and function in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7002

In: Stevens S.E. Jr., Bryant D.A. (Eds.): Light-energy transduction in Photosynthesis: higher plants and bacterial models, 62-90

Am. Soc. Plant Phys., Rockville (1988)

Bryant D.A.:

Cyanobacterial phycobilisomes: progress toward complete structural and functional analysis via molecular genetics

In: Bogorad L., Vasil I.L. (Eds.): Cell culture and somatic cell genetics of plants, Vol. 7B:

The photosynthetic apparatus: molecular biology and operation, 257-300

Academic Press, San Diego (1991)

Bryant D.A.:

Molecular biology of photosystem I

In: The photosystems: structure, function and molecular biology

Barber J. (Ed.) Elsevier Press, Amsterdam, 501-549 (1992)

Bryant D.A. (Ed.):

The Biology of Cyanobacteria

Kluwer Acad. Publ. (1994)

Burnap R.L., Sherman L.A.:

Deletion mutagenesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803 indicates that the Mn-stabilizing protein of photosystem II is not essential for O₂ evolution

Biochem. **30**, 440-446 (1991)

- Burnap R.L., Qian M., Pierce C.:
The manganese-stabilizing protein of photosystem II modifies the *in vivo* deactivation and photoactivation kinetics of the H₂O oxidation complex in *Synechocystis* sp. PCC6803
Biochem. **35**, 874-882 (1996)
- Canaani O., Schuster G., Ohad I.:
Photoinhibition in *Chlamydomonas reinhardtii*: effect on state transition, intersystem energy distribution, and photosystem I cyclic electron flow
Photosynth. Res. **20**, 129-146 (1989)
- Cavalier-Smith T.:
The origin of plastids
Biol. J. Linn. Soc. **17**, 289-306 (1982)
- Chen X., Widger W.R.:
Physical and genome map of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC7002
J. Bacteriol. **175**, 5106-5116 (1993)
- Chu H.A., Nguyen A.P., Debus R.J.:
Site-directed photosystem II mutants with perturbed oxygen-evolving properties. 2. Increased binding or photooxidation of manganese in the absence of the extrinsic 33-kDa polypeptide *in vivo*.
Biochemistry. **33**, 6150-6157 (1994)
- Collier J.L., Grossman A.R.:
Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same.
J Bacteriol. **174**, 4718-26 (1992)
- Confalonieri F., Duguet M.:
A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function
BioEssays **17**, 639-650 (1995)

Cornejo J., Willows R.D., Beale S.I.:

Phytobilin biosynthesis: cloning and expression of a gene encoding soluble ferredoxin-dependent heme oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803

Plant J. **15**, 99-107 (1998)

Cruciat C., Hell K., Fölsch H., Neupert W., Stuart R.A.:

Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome *bc₁* complex

EMBO J. **18**, 5226-5233 (1999)

De Lorimier R., Bryant D.A., Porter R.D., Liu W-Y., Jay E., Stevens S.E.:

Genes for the α and β subunits of phycocyanin

Proc. Natl. Acad. Sci USA **81**, 7946-7950 (1984)

De Vitry C., Olive J., Drapier D., Recouvreur M., Wollman F.:

Posttranslational events leading to the assembly of photosystem II protein complex: a study using photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*

J. Cell. Biol. **109**, 991-1006 (1989)

Douglas S.E.:

Chloroplast origins and evolution

In: Bryant D.A. (Ed.): The molecular biology of cyanobacteria

Kluwer Acad. Publ., 91-118 (1994)

Droux M., Miginiac-Maslow M., Jaquot J.P., Gadal P., Crawford N.A., Kosower N.S., Buchanan B.B.:

Ferredoxin-thioredoxin reductase: a catalytically active dithiol group links photoreduced ferredoxin to thioredoxin functional in photosynthetic enzyme regulation

Arch. Biochem. Biophys. **256**, 372-380 (2000)

Dubbs J.M., Bryant D.A.:

Molecular cloning and transcriptional analysis of the *cpeBA* operon of the cyanobacterium *Pseudoanabaena* sp. PCC7409

Mol. Microbiol. **5**, 3073-3085 (1991)

Dzelzkalns V.A., Bogorad L.:

Molecular analysis of a mutant defective in photosynthetic oxygen evolution and isolation of a complementing clone by a novel screening procedure
EMBO J. **7**, 333-338 (1988)

Dzelzkalns V.A., Bogorad L.:

Spectral properties and composition of reaction center and ancillary polypeptide complexes of photosystem II deficient mutants of *Synechocystis* 6803
Plant. Phys. **90**, 617-623 (1989)

Elhai J., Wolk C.P.:

A versatile class of positive-selection vectors based on nonviability of palindrome-containing plasmids that allow cloning into long polylinkers
Gene **68**, 119-138 (1988)

Ellis R.J.:

Chloroplast proteins: synthesis, transport and assembly
Annu. Rev. Plant Physiol. **32**, 111-137 (1981)

Ellis R.J.:

The nuclear domination of chloroplast development
Sci. Prog. **69**, 129-142 (1984)

Ermankova-Gerdes S., Vermaas W.:

Inactivation of the open reading frame *slr0399* in *Synechocystis* sp. PCC 6803 functionally complements mutations near the Q_A niche of photosystem II
J. Biol. Chem. **274**, 30540-30549 (1999)

Ferino F., Chauvet F.:

A promoter-probe vector-host system for the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803
Gene **84**, 257-266 (1989)

Finazzi G., Furia A., Barbagallo P.R., Forti G.:

State transitions, cyclic and linear electron transport and photophosphorylation in

Chlamydomonas reinhardtii

Biochim. et Biophys. Acta **1413**, 117-129 (1999)

Fork D.C., Herbert S.K.:

Electron transport and photophosphorylation by photosystem I in vivo in plants and cyanobacteria

Photosynth. Res. **36**, 149-168 (1993)

Freier U.:

Sequenz, Gene und phylogenetische Analyse der SSC- und IR-Regionen im Plastidengenom der Kieselalge *Odontella sinensis*

Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (1995)

Funk C., Schröder W.P., Salih G., Wiklund R., Jansson C.:

Engineering of N-terminal threonines in the D1 protein impairs photosystem II energy transfer in *Synechocystis* 6803.

FEBS Lett. **436**, 434-438 (1998)

Gantt E., Conti S.F.:

The ultrastructure of *Phorphyridium cruentum*

J. Cell. Biol. **26**, 365-380 (1966)

Gantt E., Conti S.F.:

Ultrastructure of blue-green algae

J. Bacteriol. **97**, 1486-1493 (1969)

Gantt E.:

Phycobiliproteins of cryptophyceae

in: Biochemistry and physiology of protozoa 2nd ed.

Lewandowsky M., Hunter S.A. (eds.), Vol 1, 121-137 (1979)

Academic Press, New York

Gantt E.:

Photosynthetic cryptophytes

in: Phytoflagellates: form and function

Cox E. (ed.), 381-405 (1980)

Elsevier, Amsterdam

Giovannoni S.J., Turner S., Olsen G.J., Barns S., Lane D.J., Pace N.R.:

Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts

J. Bacteriol. **170**, 3584-3592 (1988)

Goldbeck J.H., Bryant D.A.:

Photosystem I

Curr. Top. Bioenerg. **16**, 83-177 (1991)

Golden S S., Brusilan J., Haselkorn R.:

Genetic engineering of the cyanobacterial chromosome

in: Abelson J.N., Simon M.I. (Eds.): Recombinant DNA

Methods Enzymol. **153**, Chapter 12 (1987)

Hager M., Biehler K., Illerhaus J., Ruf S., Bock R.:

Targeted inactivation of the smallest plastid genome-encoded open reading frame reveals a novel subunit of the cytochrome *b₆f* complex

EMBO J. **18**, 5834-5842 (1999)

Hallick R.B., Hong L., Drager R.G., Favreau M., Monfort A., Orsat B., Spielmann A.,

Stutz E.:

Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA

Nucl. Acids Res. **21**, 3537-3544 (1993)

Hallick R.B., Bairoch A.:

Proposals for the naming of chloroplast genes. III. Nomenclature for open reading frames encoded in chloroplast genomes

Plant. Mol. Biol. Rep. **1**, 33-43 (1994)

Halliwell B., Gutteridge J.M.C.:

Free radicals in biology and medicine

Clarendon, Oxford (1989)

Herdman M., Janvier M., Rippka R., Stanier R.Y.:

Genome size of cyanobacteria

J. Gen. Microbiol. **111**, 73-85 (1979)

Hibino T., Lee B.H., Rai A.K., Ishikawa H., Kojima H., Tawada M., Shimoyama H.,

Tabake T.:

Salt enhances photosystem I content and cyclic electron flow via NAD(P)H dehydrogenase in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halolytica*

Aust. J. Plant Physiol. **23**, 321-330 (1996)

Hideg E., Kalai T., Hideg K., Vass I.:

Photoinhibition of photosynthesis in vivo results in singlet oxygen production detection via nitroxide-induced fluorescence quenching in broad bean leaves

Biochem. **37**, 11405-11411 (1998)

Hirano M., Satoh K., Katoh S.:

Plastiquinone as a common link between photosynthesis and respiration in a blue-green alga

Photosynth. Res. **1**, 149-162 (1980)

Hiratsuka J., Shimada H., Whittier R., Ishibashi T., Sakamoto M., Mori M., Kondo C.,

Honji Y., Sun C., Meng B., Li Y., Nishizawa Y., Hirai A., Shinotaki K., Sugiura M.:

The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes account for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals

Mol. Gen. Genet. **217**, 185-194 (1989)

Hormann H., Neubauer C., Schreiber U.:

An active Mehler-peroxidase reaction sequence can prevent cyclic PSI electron transport in the presence of dioxygen in intact spinach chloroplasts

Photosynth. Res. **41**, 429-437 (1994)

Hübschmann T., Wilde A., Elanskaya I., Shestakov S.V., Börner T.:

A putative cytochrome *c* biogenesis gene in *Synechocystis* sp. PCC 6803

FEBS Lett. **408**, 201-205 (1997)

Ingram K., Hiller R.G.:

Isolation and characterization of a major chlorophyll *a/c*₂ light-harvesting protein from a *Chroomonas* species (Cryptophyceae)

Biochim. Biophys. Acta. **722**, 310-319 (1983)

Inoue K., Dreyfuss B.W., Kindle K., Stern D., Merchant S., Sodiende O.A.:

Ccs1, a nuclear gene required for the posttranslational assembly of chloroplast cytochromes

J. Biol. Chem. **272**, 31747-31754 (1997)

Jeanjean R., Matthijs H.C.P., Onana B., Havaux M., Joset F.:

Exposure of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 to salt stress induces concerted changes in respiration and photosynthesis

Plant Cell Physiol. **34**, 1073-1079 (1993)

Jeanjean R., Bedu S., Havaux M., Matthijs H.C.P., Joset F.:

Salt-induced PSI cyclic electron transfer restores growth on low inorganic carbon in a type 1 NAD(P)H-dehydrogenase-deficient mutant of *Synechocystis* PCC6803

FEMS Microbiol. Lett. **167**, 131-137 (1998)

Jones, D. T., Taylor, W. R., Thornton, J. M.:

A model recognition approach to the predication of all-helical membrane protein structure and topology

Biochem. **33**, 3038-3049 (1994)

Kaneko T., Sato S., Kotani H., Tanaka A., Asamizu E., Nakamura Y., Miyajima N., Hirosawa M., Sugiura M., Sasamoto S., Kimura T., Hosoushi 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.:

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 Res. **3**, 109-136 (1996)

Kok B., Forbush B., McGloin M.:

Cooperation of changes in photosynthetic O₂ evolution: a linear four-step mechanism
Photochem. Photobiol. **11**, 457-475 (1970)

Kowallik K.V.:

Origin and evolution of plastids from chlorophyll-_{a+c}-containing algae: suggested ancestral relationships to red and green algal plastids
in: Origin of plasids, Lewin R.A. (ed.)
Chapman & Hall, New York and London (1992)

Kowallik K.V., Stöbe B., Schaffran I., Kroth-Pancic P., Freier U.:

The chloroplast genome of a chlorophyll a+c containing alga, *Odontella sinensis*
Plant Mol. Biol. Rep. **13**, 336-342 (1995)

Kunau W.H., Beyer A., Franken T., Gotte K., Marzioch M., Saidowsky J., Skalettz-Rorowski A., Wiebel F.F.:

Two complementary approaches to study peroxisome biogenesis in *Sacharomyces cerevisiae*. Forward and reverse genetics
Biochim. **75**, 209-224 (1993)

Labarre J., Chauvat F., Thuriaux P.:

Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803
J. Bacteriol. **171**, 3449-3457 (1989)

Latterich M., Fröhlich K. Schekmann R.:

Membrane fusion and cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes

Cell **82**, 885-893 (1995)

Lea P.J., Mifflin B.J.:

The occurrence of glutamate synthase in algae

Biochem. Biophys. Res. Comm. **64**, 856-862 (1975)

Lehrach H., Diamond D., Wozney J.M., Boedtke H.:

RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination

Biochem. **16**, 4743 (1977)

Leitsch C.E.W.:

Molekulare Evolution der ATPase-Gene in Chloroplasten grüner und nicht-grüner Algen

Inaugural Dissertation, Heinrich Heine Universität (1994)

Lemieux C., Otis C., Turmel M.:

Ancestral chloroplast genome in *Mesostigma viride* reveals an early branch of green plant evolution

Nature **403**, 649-652 (2000)

Leonhard K., Stiegler A., Neupert W., Langer T.:

Chaperone-like activity of the AAA domain of the yeast Yme1 AAA protease

Nature **398**, 348-351 (1999)

Leuscher C., Bricker T.M.:

Interaction of the 33kDa extrinsic protein with photosystem II: rebinding of two 33 kDa extrinsic protein to photosystem II membranes which contain four, two or zero manganese per photosystem II reaction center

Biochem. **35**, 4551-4557 (1996)

Lichtenthaler H.K.:

Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes

Meth. Enzym. **148**, 350-382 (1987)

Lugtenberg B., Meijers J., Peters R., van der Hook P., van der Alpen L.:

Electrophoretic resolution of the outer membrane protein of *Escherichia coli* K 12 into four bands

FEBS Letters **58**, 254-258 (1975)

Lydakis-Simantiris N., Hutchison R.S., Betts S.D., Barry B.A., Yocum C.F.:

Manganese stabilizing protein of photosystem II is a thermostable, natively unfolded polypeptide

Biochem. **38**, 404-414 (1999)

MacKinney G.:

Absorption of light by chlorophyll solutions

J. Biol. Chem. **140**, 315-322 (1941)

Maier U.G., Hofmann C.J.B., Eschbach S., Wolters J., Igloi G.L.:

Demonstration of nucleomorph-encoded eucaryotic small subunit ribosomal RNA in cryptomonads

Mol. Gen. Genet. **230**, 155-160 (1991)

Maier R.M., Neckermann K., Igloi G.L., Kössel H.:

Complete sequence of maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing

J. Mol. Biol. **251**, 614-628 (1995)

Manzano C., Candau P., Gomez-Moreno C., Relimpio A.M., Losada M.:

Ferredoxin-dependent photosynthetic reduction of nitrate and nitrite by particles of *Anacystis nidulans*

Mol. Cell Biochem. **10**, 161-169 (1976)

Martin A.P., Palumbi S.R.:

Body size, metabolic rate, generation time and the molecular clock

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 4087-4091 (1993)

Mayer A., Wickner W., Haas A.:

Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (α -SNARE) can precede docking and fusion of yeast vacuoles

Cell **85**, 83-94 (1996)

Mayfield S.P., Bennuon P., Rochaix J.:

Expression of the nuclear encoded OEE1 protein is required for oxygen evolution and stability of photosystem II particles in *Chlamydomonas reinhardtii*

EMBO J. **6**, 313-318 (1987)

Mereschkowsky C.:

Über Natur und Ursprung der Chromophoren im Pflanzenreich

Biol. Centralblatt **25**, 593-604 (1905)

Meurer J., Plücken H., Kowallik K.V., Westhoff P.:

A nuclear-encoded protein of prokaryotic origin is essential for the stability of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*

EMBO J. **17**, 5286-5297 (1998)

Miernyk J.A.:

The 70 kDa stress-related proteins as molecular chaperones

Trends Plant Sci. **2**, 80-87 (1997)

Miernyk J.A.:

Protein folding in the plant cell

Plant Physiol. **121**, 695-703 (1999)

- Monod C., Takahashi Y., Goldschmidt-Clermont M., Rochaix J.:
The chloroplast *ycf8* open reading frame encodes a photosystem II polypeptide which maintains photosynthetic activity under adverse growth conditions
EMBO J. **13**, 2747-2754 (1994)
- Morand L.Z., Cheng R.H., Ho K.K., Krogmann D.W.:
Soluble electron transfer catalysts of cyanobacteria
In: Bryant D.A. (Ed.): The molecular biology of cyanobacteria
Kluwer Acad. Publ., 381-407 (1994)
- Mullet J.E.:
Chloroplast development and gene expression
Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **39**, 475-502 (1988)
- Murata N., Miyao M., Omata T., Matsunami H., Kuwabata T.:
Stoichiometry of components in the photosynthetic oxygen evolution system of photosystem II particles prepared with Triton X-100 from spinach chloroplasts
Biochim. Biophys. Acta **765**, 363-369 (1984)
- Netzer W.J., Hartl F.U.:
Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms
Trends Biochem. Sci. **23**, 68-73 (1998)
- Nield J., Kruse O., Ruprecht J., da Fonseca P., Büchel C., Barber J.:
3D structure of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechococcus elongatus* photosystem II complexes allows for comparison of their OEC organisation
J. Biol. Chem. **275**, 27940-27946 (2000)
- Nilsson F., Simpson D.J., Jansson C., Andersson B.:
Ultrastructural and biochemical characterization of a *Synechocystis* 6803 mutant with inactivated *psbA* genes
Arch. Biochem. Biophys. **295**, 340-347 (1992)

Nishiyama Y., Los D.A., Murata N.:

PsbU, a protein associated with photosystem II, is required for the acquisition of cellular thermotolerance in *Synechococcus species* PCC 7002

Plant Physiol. **120**, 310-308 (1999)

Ohyama K., Fukuzawa H., Kohchi T., Shirai H., Sano T., Sano S., Umesono K., Shiki Y., Takeuchi M., Chang Z., Aota S., Inokushi H., Ozeki H.:

Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA

Nature **322**, 572-574 (1986)

Onda Y., Matsumura T., Kimata-Arigo Y., Sakakibara H., Suiyama T., Hase T.:

Differential interaction of maize root ferredoxin:NADP(+) oxidoreductase with photosynthetic and non-photosynthetic ferredoxin isoproteins

Plant Physiol. **123**, 1037-1046 (2000)

Patel S., Latterich M.:

The AAA team: related ATPases with diverse functions

Trends Cell Biol. **8**, 65-71 (1998)

Pelroy R.A., Rippka R., Stanier R.Y.:

Metabolism of glucose by unicellular blue-green algae

Arch. Mikrobiol. **87**, 303-22 (1972)

Perkin-Elmer

Protocol for DNA preparation for Taq DyeDeoxy terminator cycle sequencing (1995)

Poncelet M., Cassier-Chauvet C., Leschelle X., Bottin H., Chauvet F.:

Targeted deletion and mutational analysis of the essential (2Fe-2S) plant-like ferredoxin in *Synechocystis* PCC6803 by plasmid shuffling

Mol. Microbiol. **28**, 813-821 (1998)

Prasil O., Adir N. Ohad I.:

Dynamics of photosystem II: mechanism of photoinhibition and recovery processes

In: Topics in photosynthesis, 295-348

Elsevier Science Publ. (1992)

Prentki P., Krisch H.M.:

In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment

Gene **29**, 303-13 (1984)

Qian M., Al-Kahaldi S.F., Putnam-Evans C., Bricker T.M., Burnap R.L.:

Photoassembly of the photosystem II (Mn)₄ cluster in site-directed mutants impaired in the binding of the manganese-stabilizing protein

Biochem. **36**, 15244-15252 (1997)

Race H.L., Herrmann R.G., Martin W.:

Why have organelles retained genomes?

Trends Genet. **15**, 364-370 (1999)

Raven J.A., Johnson A.M., Parsons R., Kübler J.E.:

The influence of natural and experimental high O₂ concentrations on O₂-evolving phototrophs

Biol. Rev. **69**, 61-94 (1994a)

Raven J.A., Johnson A.M., Parsons R., Kübler J.E.:

The occurrence, and influence on photolithotrophs, of high O₂ concentrations

Proc. R. Soc. Edinb. **102B**, 193-201 (1994b)

Reith M., Munholland J.:

Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome

Plant Mol. Biol. Rep. **13**, 320-326 (1995)

Robinson C.V., Gross M., Eyles S.J., Ewbank J.J., Mayhew M., Hartl F.U., Dobson C.M., Radford S.E.:

Conformation of GroEL-bound alpha-lactalbumin probed by mass spectrometry

Nature **372**, 646-51 (1994)

- Rosenberg C., Christian J., Bricker T.M., Putnam-Evans C.:
Site-directed mutagenesis of glutamate residues in the large extrinsic loop of the
photosystem II protein CP43 affects oxygen-evolution activity and PS II assembly
Biochem. **38**, 15994-16000 (1999)
- Ruf S., Kössel H., Bock R.:
Targeted inactivation of a tobacco intron-containing open reading frame reveals a novel
chloroplast-encoded photosystem I-related gene
J. Cell. Biol. **139**, 95-102 (1997)
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.:
Molecular Cloning: a laboratory manual
Nolan C. ed.; 2nd Edition Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.:
DNA sequencing with chain terminating inhibitors
Proc. Nat. Acad. Sci. **74**, 5463-5467 (1977)
- Sargent F., Bogsch E.G., Stanley N.R., Wexler M., Robinson C., Berks B.C., Palmer T.:
Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export
pathway
EMBO J. **17**, 3640-3650 (1998)
- Sato S., Nakamura Y., Kaneko T., Asamizu E., Tabata S.:
Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*
DNA Res. **6**, 283-290 (1999)
- Schyns G., Rippka R., Namane A., Campbell D., Herdman M., Hounard J.:
Prochlorothrix hollandica PCC 9006: genomic properties of an axenic representative of
the chlorophyll *a/b*-containing oxyphotobacteria
Res. Microbiol. **148**, 345-354 (1997)

Settles A.M., Martienssen R.:

Old and new pathways of protein export in chloroplasts and bacteria

Trends Cell Biol. **8**, 494-501 (1998)

Shen J., Inoue Y.:

Binding and functional properties of two new extrinsic components, cytochrome *c*-550 and a 12-kDa protein, in cyanobacterial photosystem II

Biochem. **32**, 1825-1832 (1993)

Shen J., Vermaas W., Inoue Y.:

The role of cytochrome *c*-550 as studied through reverse genetics and mutant characterization in *Synechocystis* sp. PCC 6803

J. Biol. Chem. **270**, 6901-6907 (1995)

Shen J., Qiu M., Inoue Y., Burnap R.L.:

Functional characterization of *Synechocystis* sp. PCC 6803 $\Delta psbU$ and $\Delta psbV$ mutants reveals important roles of cytochrome *c*-550 in cyanobacterial oxygen evolution

Biochem. **37**, 1551-1558 (1998)

Shestakov S.V., Khyen N.T.:

Evidence for genetic transformation in blue green alga *Anacystis nidulans*

Mol. Gen. Genet. **107**, 372-375 (1970)

Shine J., Dalgarno L.:

The 3' terminal sequence of E. coli 16S ribosomal RNA: complementary to non-sense triplets and ribosome binding sites

Proc. Natl. Acad. Sci. **71**, 1342-1346 (1974)

Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M., Wakasugi M., Hayashida M., Matsubayashi T., Zaita M., Chungwongse J., Obokata J., Yamgushi-Shinozaki K., Ohto C., Torazawa K., Meng B., Sugita M., Deno H., Kamogashira T., Yamada K., Kusuda J., Takaiwa F., Kato A., Tohdoh N., Shimada H., Sugiura M.:

The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression

EMBO J. **5**, 2043-2049 (1986)

Shutova T., Irrgang K.-D., Klimov V.V., Renger G.:

Is the manganese stabilizing 33kDa protein of photosystem II attaining a 'natively unfolded' or 'molten globule' structure in solution?

FEBS Lett. **467**, 137-140 (2000)

Sigler P.B., Xu Z., Rye H.S., Burston S.G., Fenton W.A., Horwich A.L.:

Structure and function in GroEL-mediated protein folding

Annu. Rev. Biochem. **67**, 581-607 (1998)

Singh A.K., Sherman L.A.:

Identification of iron-responsive, differential gene expression in the cyanobacterium

Synechocystis sp. strain PCC 6803 with a customized amplification library

J. Bacteriol. **182**, 3536-3543 (2000)

Smith J.H.C., French C.S.:

The major and accessory pigments in photosynthesis

Annu. Rev. Plant Physiol. **14**, 181-224 (1963)

Stegemann H., Frankens H., Macko V.:

Potato Proteins: genetic and physiological changes, evaluated by one- and twodimensional PAA-gel techniques

Zeit. f. Naturf. **28 c**, 722-732 (1983)

Stevens S.E. Jr., Patterson C.O.P., Myers J.:

The production of hydrogen peroxide by blue-green algae: A survey

J. Phycol. **9**, 427-430 (1973)

Stirewalt V., Mochalowski C.B., Löffelhardt W., Bohnert H.J., Bryant D.A.:
Nucleotide sequence of the cyanelle genome from *Cyanophora paradoxa*
Plant Mol. Biol. Rep. **13**, 327-332 (1995)

Stöbe B., Martin W., Kowallik K.V.:
Distribution and nomenclature of protein-coding genes in 12 sequenced chloroplast
genomes
Plant. Mol. Rep. **16**, 234-255 (1998)

Strehl B., Holtendorff J., Partensky F., Hess W.R.:
A small and compact genome in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus*
CCMP 1375: lack of an intron in the gene for tRNA(Leu)^{UAA} and a single copy of the
rRNA operon
FEMS Microbiol. Lett. **181**, 261-266

Su X., Bogorad L.:
A residue substitution in phosphoribulokinase of *Synechocystis* PCC 6803 renders the
mutant light-sensitive
J. Biol. Chem. **266**, 23698-23705 (1991)

Summer E.J., Mori H., Settles M., Cline K.:
The thylakoid Δ pH-dependent pathway machinery facilitates RR-independent N-tail protein
integration
J. Biol. Chem. **275**, 23483-23490 (2000)

Takahashi Y., Rahire M., Breyton C., Popot L., Joliot P., Rochaix J.:
The chloroplast *ycf7* (*petL*) open reading frame of *Chlamydomonas reinhardtii* encodes a
small functionally subunit of the cytochrome *b₆f* complex
EMBO J. **15**, 3498-3506 (1996)

Tcherkasskaya O., Ptitsyn O.P.:
Molten globule versus variety of intermediates: influence of anions on pH-denatured
apomyoglobin
FEBS Lett. **455**, 325-331 (1999)

Telfer A., Bishop S.M., Philips D., Barber J.:

Isolated photosynthetic reaction center of photosystem II as a sensitizer for the formation of singlet oxygen. Detection and quantum yield determination using chemical trapping technique

J. Biol. Chem. **269**, 13244-13253 (1994)

Thornber J.P.:

Chlorophyll proteins: Light-harvesting and reaction center components of plants

Annu. Rev. Plant Physiol. **26**, 127-158 (1971)

Towbin H., Staehelin T., Gordon J.:

Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 4350-4354 (1975)

Turmel M., Otis C., Lemieux C.:

The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Nephroselmis olivacea*: insights into the architecture of ancestral chloroplast genomes

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 10248-10253 (1999)

Vale R.D.:

AAA proteins: Lords of the ring

J. Cell Biol. **150**, F13-F19 (2000)

Voelker R., Barkan A.:

Two nuclear mutations disrupt distinct pathways for targeting proteins to the chloroplast thylakoid

EMBO J. **14**, 3905-3914 (1995)

Wada H., Gombos Z., Murata N.:

Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation

Nature **347**, 200-203 (1990)

Wada H., Schmidt H., Heinz E., Murata N.:

In vitro ferredoxin-dependent desaturation of fatty acids in cyanobacterial thylakoid membranes

J. Bacteriol. **175**, 544-547 (1993)

Wada H., Gombos Z., Murata N.:

Contribution of membrane lipids to the ability of the photosynthetic machinery to tolerate temperature stress

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 4273-4277 (1994)

Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J., Gay N.J.:

Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide

EMBO J. **1**, 945-951 (1982)

Weiner J.H., Bilous P.T., Shaw G.M., Lubitz S.P., Frost L., Thomas G.H., Cole J.A., Turner R.J.:

A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins.

Cell **93**, 93-101 (1998)

Wexler M., Sargent F., Jack R.L., Stanley N.R., Bogsch E.G., Robinson C., Berks B.C., Palmer T.:

TatD is a cytoplasmatic protein with DNase activity

J. Biol. Chem. **275**, 16717-16722 (2000)

Vass I., Styring S., Hundal T., Koivuniemi A., Aro E., Andersson B.:

Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: Stable reduces Q_A species promote chlorophyll triplet formation

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 1408-1412 (1992)

von Heijne G.:

Why mitochondria need a genome

FEBS Lett. **188**, 1-4 (1986)

Wakasugi T., Tsudzuki J., Ito S., Nakashima K., Tsudzuki T., Sugiura M.:
Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of black
pine *Pinus thunbergii*

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 9794-9798 (1994)

Wakasugi T., Nagai T., Kapoor M., Sugita M., Ito M., Ito S., Tsudzuki J., Nakashima K.,
Tsudzuki T., Suzuki Y., Hamada A., Ohta T., Inamura A., Yoshingana K., Sugiura M.:
Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella*
vulgaris: the existence of genes possibly involved in chloroplast division

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 5967-5972 (1997)

Wakasugi T., Sugita M., Tsudzuki T., Sugiura M.:

Updated gene map of tobacco chloroplast DNA

Plant Mol. Biol. Rep **16**, 231-241 (1998)

Williams J.G.K.:

Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by
genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803

Meth. Enzymol. **167**, 766-778 (1986)

Wollman F., Minai L., Nechushtai R.:

The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes

Biochim. Biophys. Acta **1411**, 21-85 (1999)

Xie Z., Merchant S.:

The plastid-encoded *ccsA* gene is required for Heme attachment to chloroplast c-type
cytochromes

J. Biol. Chem. **271**, 4632-4639 (1996)

Xu Q., Bricker T.M.:

Structural organization of proteins on the oxidizing side of photosystem II. Two molecules
of the 33-kDa manganese-stabilizing proteins per reaction center

J. Biol. Chem. **267**, 25816-21 (1992)

Yanisch-Peron C., Vierra J., Messing J.:

Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 and pUC19 vectors

Gene **33**, 103-119 (1985)

Yonekura-Sakakibara K., Onda Y., Ashikari T., Tanaka Y., Kusuki T., Hase T.:

Analysis of reductant supply systems for ferredoxin-dependent sulfite reductase in photosynthetic and nonphotosynthetic organs of maize

Plant Physiol. **122**, 887-894 (2000)

Yu J., Vermaas W.F.:

Synthesis and turnover of photosystem II reaction center polypeptides in cyanobacterial D2 mutants

J. Biol. Chem. **268**, 7407-7413 (1993)

Zak E., Pakrasi H.B.:

The BtpA protein stabilizes the reaction center proteins of photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 at low temperatures

Plant Physiol. **123**, 215-222 (2000)

Zhao J., Snyder W.B., Mühlenhoff U., Riehl E., Warren P.V., Goldbeck J.H., Bryant D.A.:

Cloning and characterization of the *psaE* gene of the cyanobacterium *Synechococcus* sp.

PCC 7002: characterization of a *psaE* mutant and overproduction of the protein in

Escherichia coli

Mol. Microbiol. **9**, 183-194 (1993)

Zuber H., Bruinsholz R.A.:

Structure and function of antenna polypeptides and chlorophyll-protein complexes: principles and variability

In: Scheer H.: Chlorophylls, 627-703 (1991)

CRC Press, Boca Raton

Anhang A1: Sequenzen der *Synechococcus* sp. PCC7002 KloneSequenz des *Synechococcus* sp. PCC 7002 ycf35 Klons

```

GGATCCAGCAGAATTAATCACTGAGAACTCTATTCCAGTCGGCCGATCTATACAGCTTT
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
  CCTAGGTCGTCCTAATTAGTGACTCTTTGAGATAAGGTCAGCCGGCTAGATATGTCGAAA

orf > D P A E L I T E K L Y S S R P I Y T A F -

TCGCCCGAACCAATTTGGAATTTCTCTACGTGTTACTTGCAGGGGGCCAGTGATTGT
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
  AGCGGGCTTGGTGTAAACCTTAAAGAGATGCACAATGAACGCCCCCGGTCACTAACA

  R P N H N L E F L Y V L L A G G P V I V -

GCGGAGTACCCCCCGACCGCATTCTAGCGATCACCTATACGGGCAGTTGTTTTGGGAT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
  CGCCTCATGCGGGAGCTGGCGTAAGATCGCTAGTGGATATGCCCGTCAACAAAACCCTA

  R S T P L D R I L A I T Y T G S C F G M -

GCGCAATCTTCCCGTTGGGTTTGGGCAGGTGAGTCGGAGTTTTCCAGTTTGGTGAAGC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
  CGCGTTAGAAGGGCAACCCAAACCCGTCCACTCAGCCTCAAAGGGTCAAACCACCTTCG

  R N L P V G F G Q V S R S F P S L V E A -

CTACAAAACCTACCGATGTGCTGAAAATTCGGTAGCAACGGTACAACGGATCTATGACCA
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
  GATGTTTTGATGGCTACACGACTTTTAAGGCCATCGTTGCCATGTTGCCTAGATACTGGT

  Y K T T D V L K I P V A T V Q R I Y D Q -

                                     35-3
GAGTGTGATTTTTCGCGATCGCTATAACCTGAGTTTCGAGTTACGGGAAAAATTCCAGTA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
  CTCACGACTAAAAGCGCTAGCGATATTGGACTCAAAGCTCAATGCCCTTTTTAAGGTCAT

  S A D F R D R Y N L S F E L R E K F Q Y -

CCATCTGCTGAACTGTAGTACCTACCCACCCCTCAGGCCGTCGCTTCCCTGCTGCGGGC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
  GGTAGACGACTTGACATCATGGATGGGTGGGGAGTCCGGCAGCGAAGGGACGACCCCCG

  H L L N C S T Y P P P Q A V A S L L R A -

TTTGATTTACCAAGAGCGATCGCTGGCCAATCAACCCAGAGTAATGGCGTTTTTAGCTT
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
  AAACATAAATGGTTCTCGCTAGCGACCGGTTAGTTGGGGTCTCATTACCGCAAAAATCGAA

  L I Y Q E R S L A N Q P Q S N G V F S F -

TGATCTCCCCGTAGATATCATTGCCCATGCCTGCCAGTTAAATCACCGCACTGTGGAACA
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
  ACTAGAGGGGCATCTATAGTAACGGGTACGGACGGTCAATTTAGTGGCGTGACACCTTGT

  D L P V D I I A H A C Q L N H R T V E Q -

GGTGTGAAGGGGATGACGAAGGTGGAACCTGATCAAGACAGAAAAATCCGCTGAGGGACA
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
  CCACAACCTCCCTACTGCTTCCACCTTGACTAGTTCGTCTTTTTAGGGGACTCCCTGT

  V L K G M T K V E L I K T E K S A E G Q -

```

AGGGGATCTGATCCATGTGCTGAATCCAGAAGGCCTCAAGGAAGTCTATAGTCCGACCCG
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 TCCCCTAGACTAGGTACACGACTTAGGTCTTCCGGAGTTCCTTCAGATATCACGCTGGGC

 G D L I H V L N P E G L K E V Y S A T R -

GGATAAAGTGGCTTGGTGGCCATTGCGCTAGGCGAGGGAGTCAACCATTGGGGCGATCGC
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
 CCTATTTACCGAACCCCGGTAACGCGATCCGCTCCCTCAGTTGGTAACCCCGCTAGCG

 D K V A W W P L R *

 CTAATCACCATTGAAAATCATCTATTTAGCCACCTAAAAATGAAAGGAATCTTACGATTT
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
 GATTAGTGGTAACTTTTAGTAGATAAATCGGTGGATTTTACTTTTCCTTAGAATGCTAAA

 GCGGCGGCAAGCTACCCCCCATTTGTCGAGATTTGTTAAACTGCTGTAAACACAAATGTG
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
 CGCCGCCGTTTCGATGGGGGGTAAACAGCTCTAAACAATTTGACGACATTTGTGTTTACAC

 CTGGAAGTTAAGGGCAAAATTCCTATATTTGCCCGCCAAATGGTCAACTTTCCCA
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
 GACCTTTCAATTCCCGTTTTAAGGCATATAACAGGGGCGGTTTAAACAGTTGAAAGGGT

 CCATGCCAATGAGGAAGCGCACCC**ATGAACATGGAGACATTAGAATTCATCATTTATCCT**
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
 GGTACGGTTACTCCTTCGCGTGGTACTTGTACCTCTGTAATCTTAAGTAGTAAATAGGA

 orf69 > M N M E T L E F I I Y P -

GAGGCCGTTGCCAAGAAAAGGTCACAGGCATTGTCCGGTCTTCATGCCAAGAAGTGACC
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
 CTCCGGGCACAGGTTCTTTTCCAGTGTCCGTAACAGCCAGAAGTACGGTTCTTCACTGG

 E A R V Q E K V T G I V G S S C Q E V T -

 35-5
ACTGCGATCGAAGAGCAACTGGGCGTTGTTCTTCCAAAGAACAAACCTCGGAATATTTT
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
 TGACGCTAGCTTCTCGTTGACCCGCAACAAGAGAAGGTTCTTGTGTTGGAGCCTTATAAAA

 T A I E E Q L G V V L F Q E Q T S E Y F -

GCCCCACCGGTAAGCCTAAGCTGCAACGACGAACCCCGTCCAAAGCAATTGGTGAATTTTT
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
 CGGGTTGGCCATTCGGATTGACGTTGCTGCTTGGGGCAGGTTTCGTTAACCCTAAAAAA

 A Q P V S L T A T T N P V Q S N W *

 TTGCAAACCTCTATAAATAGCCCGTTAAATCCT**ATGTCTCATTTCAGCAATATCAAAC**
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
 AACGTTTGGAGATATTTATCGGGGCAATTTAGGATACAGAGTAAAGTCGTTATAGTTTTG

 ycf35 > M S H F S N I K T -

CAAAATCCGTAATTTGACTTCCCTCAAGTCTGCCCTCAAGGACATGGACATTGAGTGAA
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
 GTTTTAGGCATTA**AACTGAAGGGAGTTCAGAC**GGGAGTTCCTGTACCTGTAACCTCACCTT
 10-86

 K I R N L T S L K S A L K D M D I E W K -


```

AGAAGGCCCCAGTGTCTGTGCGGGGTTATAAAGGCGATCGCCGCACCGCTGAAGTTGTCAT
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
TCTTCCGGGGTACGACACGCCCAATATTTCCGCTAGCGGGCGTGGCGACTTCAACAGTA

  E G P S A V R G Y K G D R R T A E V V I -

CCAACAGAACAATGACTACGATATCGGCTTTAGCTGGAATGGCCATGAATACGAACTCGT
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
GGTTGTCTTGTTACTGATGCTATAGCCGAAATCGACCTTACCGGTACTTATGCTTGAGCA

  Q Q N N D Y D I G F S W N G H E Y E L V -

CGCTGACTTGCAATATTGGCAGCAACCCCTAACCGTTGATGGCTTCCTCCAACGTCTCAC
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
GCGACTGAACGTTATAACCGTCGTTGGGGATTGGCAACTACCGAAGGAGGTTGCAGAGTG

  A D L Q Y W Q Q P L T V D G F L Q R L T -

CCAGGGCTATGCTTACCACACCATCCTAAATGAAACCAACAACAAGGCTTCCAAGTCAG
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
GGTCCCGATACGAATGGTGTGGTAGGATTTACTTTGGTTGTTTCCGAAGGTTTCAGTC

  Q G Y A Y H T I L N E T N K Q G F Q V S -

TGAACAGCAGAAAAACGAAGATGGCTCGATTTCGCTCGTCCAACGCTGGAGCTAATG
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
ACTTGTCTCTTTTTGCTTCTACCGAGCTAAGCGGAGCAGAGGTTGCGACCTCGATTAC

  E Q Q K N E D G S I R L V V Q R W S *

                                10-87
TATGACCTTTGAAAATTCCCCCCAGCGTCTGGTTTTGAGCCGAGTTGGGGGGCTTTTT
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
ATACTGGAAACTTTTAAGGGGGTTCGCCAGACCAAAACTCGGCCTCAACCCCCGAAAAA

orf141 > M T F E N S P Q R S G F E P E L G G F L -

AAGAAATGACACGGAACGGTCTGGGTTTGAACCGGAAGTGGCTGCTGCGCCAAAA
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
TTCTTTACTGTGCCTTGCCAGACCCAAACTTGGCCTTGATCCACCGGACGACGCGTTTT

  R N D T E R S G F E P E L G G L L R Q K -

AGGGGTGTATGTGGATGAAACCACCTGCATCGGCTGCAAAACATTGCGCCACACGGCCCC
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
TCCCCACATACCTACTTTGGTGGACGTAGCCGACGTTTGTAAACGCGGTGTGCCGGG

                                35-6
  G V Y V D E T T C I G C K H C A H T A P -

CAACACCTTTTATATCGAAGAAGAACATGGTTCGGGCCCGGGCCTATCGCCAGGATGGAGA
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
GTTGTGGAAAATATAGCTTCTTCTGTACCAGCCCGGGCCCGGATAGCGGTCTCTACTCT

  N T F Y I E E E H G R A R A Y R Q D G D -

TGCTGAGGAAATTGTCCAAGAGGCGATTGATACCTGTCCGGTAGACTCGATCCATTGGCT
1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
ACGACTCCTTTAACAGGTTCTCCGCTAACTATGGACAGGCCATCTGAGCTAGGTAACCGA

  A E E I V Q E A I D T C P V D S I H W L -

AGATTACACGGAACTAAAGGCCAAAGAAGCAGCCAGGAAAACAGGTGATTCGGCCCTT
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
TCTAATGTGCCTTGATTTCCGGTTCTTCGTCGGTCTTTTGGTCCACTAAGCCGGGGA

  D Y T E L K A K E A A R K N Q V I R P L -

```

CGGTTTTTCCCCAGGATGGCGGGTCAGGCGATCGGCCCGCAAACCTAAACCTCCCGGAA
 1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980
 GCCAAAAAGGGTCTACCGCCAGTCCGCTAGCCGGGCGTTTGGATTGGGAGGGCCTT
 G F S P G W R V R R S A R K P K P S R K -
ACCTAAGCATTAAAAATTTGCTTGGCTTATGGGTCTTCTGTAGCGGTGACAGCTTGAT
 1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040
 TGGGATTCGTAAATTTTAAAACGAACCGAATACCCAGAAGACATCGCCACTGTGCGAACTA
 P * * P D E T A T V A Q -
 ATTTGGCTTGGCAATAATCATTAAAGGGCTTGGCCGATGGTTTGTCTTCGGTGCCTGCGG
 2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100
TAAACCGAACCGTTATTAGTAATCCCGAACCGGCTACCAAACAAGAAGCCACGGACGCC
 Y K A Q C Y D N L A Q G I T Q E E T G A -
 TCTGGCTCAGGGATTGGGCAGTTGGGCCGCTTCTAGGTCTTTGTTCTGGCGCGCTTTTA
 2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160
AGACCGAGTCCCTAACCCGCTCAAACCCGGCGAAGATCCAGAAACAAGACCGCGCGAAAAT
 T Q S L S Q A T Q A A E L D K N Q R A K -
 CCATGGCATAGGTGGCTTCGGCCTGACGTTGGTAAATATCGCTAATTTGCGTTTGGTAGG
 2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220
GGTACCGTATCCACCGAAGCCGGACTGCAACCATTTATAGCGATTAACGCAAACCATCC
 V M A Y T A E A Q R Q Y I D S I Q T Q Y -
 TTTTCATCTGGCTATCCCCTAAGCGCAGTTGGGCGATCGCCTCGGCCCCCATTTTCAGGG
 2221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280
AAAAGTAGACCGATAGGGCATTGCGCTCAACCCGCTAGCGGAGCCGGGGTAAAAGTCCC
 T K M Q S D R L R L Q A I A E A G M K L -
 CATCGGCCGCTGGAGCCAACGCTCAAAATTTAAAAGTTTGGGGAGCTTCTGCCGTTGGTT
 2281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340
GTAGCCGGCGGACCTCGGTTGCGAGTTTTAATTTTCAAACCCCTCGAAGACGGCAACCAA
 A D A A Q L W R E F N F T Q P A E A T P -
 CGTTCTGGACAAGAGTCTGGGCTTCCGTGACGGTGCTTTGGATTGCGCCAAAAGTTTTT
 2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400
GCAAGACCTGTTCTCAGACCCGAAGGCCTGCCACGAAACCTAAACGCGGTTTTCAA
 E N Q V L T Q A E T V T S Q I Q A L L K -
 GACAGTCGTAGAGGGCCGGTCAATCCTTTGGCAAGGCCAAGGCTCAAAGACTGGTGC
 2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460
CTGTCAGCATCTCCCGGCCAGTTAGGAAACCGTTCCGGGTTCCGAGTTTTCTGACCAG
 35-4
 Q C D Y L A P D I R Q C P G L S L L S T -
 AACCGATGAGAGAAATCAGACGAAAGGGCGAGAACAAGGACATTACAGACGAACACTCAA
 2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520
TTGGTACTCTCTTTAGTCTGCTTTCCCGCTTTGTTCTGTAATGTCTGCTTGTGAGTT
 C G I L S I L R F P S F L S M < orf164
 CATCGGCAGTGTAGCGAATTTTGTAGAATTTAGACAATCAGATCAATCCGGAGATATTT
 2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580
 GTAGCCGTACATCGCTTAAAAATCTTGTAAATCTGTTAGTCTAGTTAGGCCTCTATAAA
 11-10
 TTTCAGGAATAAACGAAAGATGGCGTTAACAGAATTTTAGAACCGGAAGTGATGGACGA
 2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
 AAAGTCCTTATTTGCTTTCTACCGCAATTGTTCTTAAAACTTGGCCTTCACTACCTGCT
 orf > M A L T R I L E P E V M D D -

```

TCCCGCCGAGGCGATCGCCTACGATGCGATGGACTTTCGGGCGGTGAATCAAGATTTG
2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700
AGGGCGGCTCCGCTAGCGGATGCTACGCTACCTGAAAGCCCGCCACTTAGTTCATAAACG

  P A E A I A Y D A M D F R A V N Q D F A -

GGATCTCGTGGTTACGACTTACTCCCAAGAAACCGCTTTCGTTTTAGATTTGGGCACAGG
2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760
CCTAGAGCACCAATGCTGAATGAGGGTTCCTTTGGCGAAAGCAAATCTAAACCCGTGTCC

  D L V V T T Y S Q E T A F V L D L G T G -

GACAGCACAAATTCGATTTTGTAGGGCAACAGCGCCCCCAATGGCAGATTAAGGCAC
2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820
CTGTCGTGTTTTAAGGCTAAAACAATCCCGTTGTGCGGGGGTTACCGTCTAATTTCCGTG

  T A Q I P I L L G Q Q R P Q W Q I K G T -

CGATTTAGCGCAGTCGATGCTCGCCCTAGGACAAAAAACGTTGTGGCCGAGGTTTAAAC
2821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880
GCTAAATCGCGTCAGCTACGAGCGGGATCCTGTTTTTTTTGCAACACCGCGTCCAAATTG

  D L A Q S M L A L G Q K N V V A A G L T -

AGCACAAATCGAGTTGGTTTTATGCCGATGCGAAAAATTTGCCCTGGCCCGACCAAAGCTT
2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2940
TCGTGTTTAGCTCAACCAAATACGGCTACGCTTTTTTAAACGGGACCGGGCTGGTTTCGAA

  A Q I E L V Y A D A K N L P W P D Q S -

```

fett: codierender Strang

unterstrichen: Sequenzier-Primer

Sequenz des *Synechococcus* sp. PCC7002 ycf43 Klons

```

TTGACCCTTTACGCCAGCTTTCTAACAACGCCAAAAAGGCTGACCAACTGGATCCGCAA
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
AACTGGGAAATGCGGTCGAAAGATTGTTGCGGTTTTTCCAGACTGGTTGACCTAGGCGTT

  S G K R W S E L L A L F T Q G V P D A -

ACACCCCTGAAAAATCAGTAAAGATGCAATTTGCGGATAAAGTAGCCTGGTGGAAATTG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
TGTGGGGGACTTTTTAGTCATTCTACGTTAAACGCCTATTTTCATCGGACCACCTTTAAAC

  F V G Q F I L L S A I Q P Y L L R T S I -

TGTTTGAAGCGGGAGCAACCATAAAAAATATCTGCCGATGTAATGGGCTAGAAGAATCCAG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
ACAAACTTCGCCCTCGTTGGTATTTTTATAGACGGCTACATTACCCGATCTTCTTAGGTC

  T N S A P A V M < clpP

ATGAACTGTGCTGATAGCGCTATACCATTCTGCTAAGAATTTACCGCATTGGGGAAATGG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TACTTGACACGACTATCGCGATATGGTAAGACGATTCTTAAATGGCGTAACCCCTTTACC

CGGTATGTATTCTCAGCATCCTTTACATTTTCTCAATCTGGATCAGATGGCATATTGG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
GCCATAACATAAGGAGTCGTAGGAAATGTAAAAGAGTTAGACCTAGTCTACCGTATAACC

  orf143 > M A Y W -

```

CTTTTCAAGGGAACCCCGCTATCATCGTGTACTTGATGCCATCCGTGAACAAACGGAA
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 GAAAAAGTTCCCTTGGGGGCGATAGTAGCACATGAACTACGGTAGGCACTTGTTTGCCTT
 L F Q G N P R Y H R V L D A I R E Q T E -

ATGCCCTGGCTTGTGACCCGCTACAAAAACAAAATTCAAGTCGGTGATGGCGTTTTAATT
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 TACGGGACCGAACACTGGGCGATGTTTTGTTTTAAGTTCAGCCACTACCGCAAAATTA
 M P W L V T R Y K N K I Q V G D G V L I -

TGGATGGCCGGTGAAGCTGCCGGCATTATGCGATCGCCGAAATCATTAGTCTCCCCACA
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 ACCTACCGGCCACTTCGACGGCCGTAATACGCTAGCGGCTTTAGTAATCAGAGGGGTGT
 W M A G E A A G I Y A I A E I I S L P T -

GTTATTTCCCCAAAGACATTCAAGACCTCGACTATTGGACGGATCCCAAGCGACTCCGA
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
 CAATAAAGGGGTTTCTGTAAGTTCGAGCTGATAACCTGCCTAGGGTTCGCTGAGGCT
 V I S P K D I Q D L D Y W T D P K R L R -

11-01

GCCGATAAACCCCGCAGTCAGATCCGCTTTATTTCGCAAGCTCCTCGGTCAACCCCTACGC
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
 CGGCTATTTGGGGCGTCAGTCTAGGCGAAATAAGCGTTCGAGGAGCCAGTTGGGGATGCG
 A D K P R S Q I R F I R K L L G Q P L R -

AAGATAGAATTGCGATTTGATGGCATCCTGCGCGATCTTGATGTTATCCACACGCCCAGC
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 TTCTATCTTAACGCTAAACTACCGTAGGACGCGCTAGAACTACAATAGGTGTGCGGGTGC
 K I E L R F D G I L R D L D V I H T P S -

AGTACCAATTTCAAATCACCCCGAACAAATGGCTGCGGGTGCATCAACTGAAAGGGTGA
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
 TCATGGTTAAAGTTTTAGTGGGGCTTGTTACCGACGCCACGTTAGTTGACTTTCCCACT
 S T N F K I T P E Q W L R V H Q L K G * -

TCTCTGACCTCGACCCAAAGTAAATGCCCCCAACCCGAGTCCCAGATCCATGCGGGAG
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
 AGAGACTGGAGCTGGGTTTCATTTTACGGGGTTGGGCTCAGGGTCTAGGTACGCCCTC
 ycf43 > M P P T R V P R S M R E -

ATTCCCAGTGAAGCAGAAATGTCCTTTTTTCGATCACCTCGAAGAACTCCGCTGGCGCATT
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
 TAAGGCTACTTTCGTCTTTACAGGAAAAGCTAGTGGAGCTTCTTGAGGCGACCGCGTAA
 I P D E A E M S F F D H L E E L R W R I -

TTTTATTCGCTGATTTCCGTTGTTGTCGGTTGGGTTCGGTTGTTTCTTTTTTGTCAAACCC
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
 AAAATAAGCGACTAAAGGCAACAACAGCCAACCCAGCCAACAAAGAAAAACAGTTTGGG
 F Y S L I S V V V G W V G C F F F V K P -

CATCGTCCAGATCTTAGAAGCGCTGCTGTGGGGTGAATTCATCCAGGTGGCCCCCGGC
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
 GTAGCAGGTCTAGAATCTTCGCGGACGACACCCCACTTTAAGTAGGTCCACCGGGGGCCG
 H R P D L R S A C C G V K F I Q V A P G -

```

GAATTTTCTTTCTCTCGTTTAAGGTGGCGGGCTACACCGGCGCTTTACTGGCGAGTCTCT
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
CTTAAAAAGAAAGAGAGCAAATTCCACCGCCCGATGTGGCCGCGAAATGACCGCTCAGGA
    11-12
E F F F L S F K V A G Y T G A L L A S P -

TTTATCCTGTACCAAATTATTCAAGTTTGTGTTTGGCGGGGCTAACCAGGGGAGAACGGCGT
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
AAATAGGACATGGTTTAATAAGTCAAACAAAACGGCCCCGATTGGTCCCCTCTTGCCGCA
F I L Y Q I I Q F V L P G L T R G E R R -

CTCCTCGCTCCCGTTGTCTTGGGGTCTGGTGTGCTGTTTTTTGGCGGGCTTGGCCTTTGGC
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
GAGGAGCGAGGGCAACAGAACCCAGACCACGACAAAAAACGCCGAACCGGAAACGG
L L A P V V L G S G V L F F A G L A F A -

TACGTTGCTTTGATTCCAGCGGCTCTGAATTTTTTCATTACCTATGGTGTGATGTTCGTA
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
ATGCAACGAAACTAAGGTCGCCGAGACTTAAAAAGTAATGGATAACCAGACTACAGCAT
Y V A L I P A A L N F F I T Y G A D V V -

GAGGCGGCTGGTCTATTGAACGGTATTTTGGAGTTGGTGTGGGCTGATGTTTTTTACG
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
CTCCGCCGACCAGATAACTTGCCATAAACTCAACCACGACCCAGACTACAAAAATGC
E A A W S I E R Y F E L V L G L M F F T -

GGGCTAGCGTTTCAGGTGCCGTGGTGCAAATGATCTTGTCTTGGTTGGGGATTGTTTCT
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
CCCGATCGCAAAGTCCACGGACACCACGTTTACTAGAACAGAACCAACCCCTAACAAAGA
G L A F Q V P V V Q M I L S W L G I V S -

TCGAGCTGATGCTCAAGGGTGGCGCTTTGTGCTTCTGGGGGAGTGGTGTCTCGGCGG
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
AGCTCGGACTACGAGTTCCCAACCGCGAAACAGCAAGACCCCGTCACCACGAGCCGCGC
S S L M L K G W R F V V L G A V V L G A -

GTGATTACGCCCTCGACAGATCCGATGACCCAATCACTCTTGGCTGGGGCCGTCATGGG
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
CACTAATGCGGGAGCTGTCTAGGCTACTGGGTTAGTGAGAACCACCCCGGCAGTACCCG
V I T P S T D P M T Q S L L A G A V M G -

TTATATTTTGGCGGCATTGGCATTGTGAACTTTTCAAGACGCTAGGGGCTTGGCGATCGC
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
AATATAAACCGCCGTAACCGTAACACTTTGAAAGTCCTGCGATCCCGAACCGCTAGCG
L Y F G G I G I V K L S G R *

```

fett: codierender Strang

unterstrichen: Sequenzier-Primer

Anhang A2: Alignments der Proteinsequenzen

Alle Alignments wurden mit dem Programm Pileup des GCG-Pakets erstellt, wobei folgende Einstellungen verwendet wurden: Gab weight: 8; Gab length weight: 2.

Die konservierten Aminosäuren sind mit Hilfe des Genedoc Programms (Nicholas K.B. & Nicholas H.B., 1997) wie folgt gekennzeichnet:

- 100% konserviert: schwarzer Hintergrund mit weißen Buchstaben
 70% konserviert: dunkelgrauer Hintergrund mit schwarzen Buchstaben
 50% konserviert: hellgrauer Hintergrund mit schwarzen Buchstaben

Alignments der ycf Sequenzen

- 7002: *Synechococcus* sp. PCC7002 (AF05229 und diese Arbeit)
 6803: *Synechocystis* sp. PCC6803 (Kaneko et al., 1996)
 ara: *Arabidopsis thaliana* (BAB09022, AFF18659, AFF18718)
 cyacal: *Cyanidium caldarium* (AF022186)
 cyapa: *Cyanophora paradoxa* (U30821)
 dic: *Dictyota dichotoma* (Leitsch, 1994)
 gui: *Guillardia theta* (AF041468)
 odo: *Odontella sinensis* (Z67753)
 por: *Porphyra purpurea* (U38804)
 skelco: *Skeletonema costatum* (AJ132264)

Alignment der ycf35 Sequenzen

```

                                *           20           *           40           *
7002   : MSHF SNIKTKIRN L T S L K S A L K D M D I E W K E G P S A V R - G Y K G D R R T A E V V I
6803   : MSHF SNIKTKIRN L D V L K T T L T N L G L D W K E G P A T V R - G Y Q G L T A K A A V V I
cyapa  : MSH L T Q V Q T N I V N E E A L K K A L N A L N I K W Q D G P Q N I K - N L Y G Q E Q T V D I L I
por    : MSH F T K I Q T T I K D L N L L K H A L T D L G L I W N T N S F N V K - V G E N S Q H K V D I L I
odo    : MSH F T N I E T R F Q N L F Y L E K A L N K L D I N H K P Q K K V T N I N S K S Y D I D I N L M I
gui    : MSH F S K I K T A L K D L D L L K Q S L N D L A I K W Y V K D N I V K - G Y K D Q I T F A N I V I
skelco : MSH F T N L K T S F K N L F H L E N A L N K L E I P Y K R E K K A I D A N N S K H H - N V N L V I

                                60           *           80           *           100
7002   : Q Q N N D Y D I G F S W N G H E Y E L V A D L Q Y W Q Q P L T V D G F L Q R L T Q G Y A Y H T I L N
6803   : E Q S N D Y D L G F S W N G Q E Y E L V T D L Q Y W Q Q P L S V E G F L Q K I T Q G Y A L E T V L N
cyapa  : K Q K N N F D I G F V K E E L E Y K L I A D L Q Y W E Q P Y T V E T F L Q Q L K Q Q Y A Y Q I I L D
por    : K Q G N L S H I G F V W N D N Q Y H L V A D L Q L W E Q P W S L E V F L D K L S Q K Y A Y H S I I E
odo    : S Q P N G Y D I E F C W N G Q E Y E L I A D T S F W Q Q K D S I K G F I N N I A K Q Y A G E V I I G
gui    : P Q N N N Y D I G F V W N G V E Y Q L V A D L Q F W Q Q P W S V E F F L N K L T Q R Y A Y N S I L K
skelco : P Q S N N Y D I T F N W N G E E Y E L V L D A S F W I Q P Y P V E S F I N K L S Q H Y A N D V I I T

```

```

          *           120           *
7002   : ETNKQGFQVSEQQKNEDGSIRLVVQRWS~~~
6803   : ESAKQGFVAVTEQQKNEDGSVRLLVVQRWSA~~~
cyapa  : ETINKGFEKLEEEYDKDGSIRLVVQRWRY~~~
por    : ETKKQGFEKAEQVYQKDGSIKLIVQRWNY~~~
odo    : ESKKIGFQPIKYQQNKDGSNTCYFTTLE~~~
gui    : MANDTGFHPVNETVKENGLIKLTLQRWRP~~~
skelco : ESQKIGFQPVKSKQHVDGSNTITLATLEFKK

```

Alignment der ycf36 Sequenzen

```

          *           20           *           40           *
7002   : ~~~~~~
6803   : ~~~~~~
cyapa  : ~~~~~~
por    : ~~~~~~
gui    : ~~~~~~
ara    : MLRLIVNYPLIPKISHRVCNSSSSKLGSYYDSSSI IKYGGISDVVGKKQE

```

```

          60           *           80           *           100
7002   : ~~~~~~MNNSPTTFCPVPEEQQPLNEYDQLK
6803   : ~~~~~~MKPMRESSPQICPVPIDQQPVNEYEALK
cyapa  : ~~~~~~MCTFCPIPTEQQPLNEYQILN
por    : ~~~~~~MNLYNNQCPVPLEQQPVNEYNSLK
gui    : ~~~~~~MNCPVPENQLPINEYNKLT
ara    : LFLSVSVKAVEDKGNNGGSMSFSGQSWDPSSEIEVPSDQRPVNEYSSLK

```

```

          *           120           *           140           *
7002   : ESWFFSWGNMEMVCYIRKVAWVFWA-TLIFTPIAWASFPFDR--YPIKL
6803   : SAWLYSWGQVDLLSYGKNLTRLALLI-SFIVSPIASASFSVEK--QPVQC
cyapa  : NSVLFNWPSQKLKIYFFYL--FTIYSIGFLLT-FLITFYNDLFIVHPNI
por    : NSWFFCWPTLSSHSYNKKIT-ITLIATCFLVSPVLLSIFPIAKL--PLKF
gui    : SAWDFSWACKIGKLYYKFLLKMQLCLFLFFCICL-----NFLDSKYET
ara    : EGMLYSWGELGPSEFFIRLGLLWLVTFTVLGVPVAAASFNPSR--EPLRF

```

```

          160           *           180           *           200
7002   : VLSANLGGMFLLSLVLLRLYLGWRYIRDRLQTEKLTYEESGWYDGQIWRK
6803   : GFLIVLGICLLLSLFVLRLMLGWRYVGDRLGAETVTYEESGWYDGQVWRK
cyapa  : FVHGIGGNFVLILDLLRLYLGWSYICQRLSATVSYEESGWYDGQIWVK
por    : FFSEFIISSLITCFILIRLYLGWSYVVKRLSATVFYEESGWYDGQIWVK
gui    : GLYSLILSTLFICLICLRTYLGFRYIYVRLLKSALPYEESSWYDGQVWVK
ara    : ILAAGTGTLFLVSLIVLRIYLGWSYVGDRLLSAVIPYEESGWYDGQMWVK

```

```

                *           220           *           240           *
7002   : PEAVLQQRDRLIVSYQIAPILARIQQTSLIVVGDHRHFDQRSVAAINP~~~
6803   : PLEVQTRDQLILRYQVNPVLQRWQNT-LKLLGATMAIDILIWTIFRFLH~
cyapa  : SSEVLIQDRLIGIYQVRPVLNRLKQT-LGVVILILGFTLLIQ~~~~~
por    : PSEILVKDRFIGLYEVFPLLNKIKNT-LSCLSLMTTAPAILFFYF~~~~~
gui    : NINYLIKDRLVADYTVLPILSRLKISFTINFSFLICLLLRFIF~~~~~
ara    : PPEVLARDRLLGSKYKVKPVKMLKQT-LIGTGALLVSAFVLFVFATPVED

```

```

                260           *           280           *           300
7002   : ~~~~~~
6803   : ~~~~~~
cyapa  : ~~~~~~
por    : ~~~~~~
gui    : ~~~~~~
ara    : FFKTTLGSTENQPEVSI SRTSNKFNIRKEQLLRLPVDVVTDDDLAAAAAE

```

```

                *           320           *
7002   : ~~~~~~
6803   : ~~~~~~
cyapa  : ~~~~~~
por    : ~~~~~~
gui    : ~~~~~~
ara    : AADGRPVYCRDRYYRALAGGQYCKWEDLVK

```

Alignment der ycf43 Sequenzen

```

                *           20           *           40           *
7002   : ~~~~~~
6803   : ~~~~~~
por    : ~~~~~~
odo    : ~~~~~~
gui    : ~~~~~~MLFNLTVLVMKT
dic    : ~~~~~~
ara    : MTEIESRRKQGSTYSSFARAARA EKQHRVVASLRDRALNDDDSPTETTPG
Ecoli  : ~~~~~~

```

```

                60           *           80           *           100
7002   : ~~~~~~MPPTRVPRSMREIPDEA-EM
6803   : ~~~~~~MSTQLDNITSAETAPDYLDVDDV-EM
por    : ~~~~~~MSLEPQNNLLANINTNSENLPEN-DV-PM
odo    : ~~~~~~MFNYPLYIYRQDVKSKLMVTNSDFNFTIKETVTL-EL
gui    : FKFHYKFILLFSNKFRFYLYYMKTRSNSVLI---PYTLNFKQ-VEA-EM
dic    : ~~~~~~MALTRKPNNYLNFEFYSTRGINYSSFSLT-EL
ara    : VGSAVEDRPPVSDDELHTAAVADSSSEDRSSSVYEFYPRK-EELPDDK-EM
Ecoli  : ~~~~~~MSVEDTQ

```



```

*           120           *           140           *
7002 : SFFDHLEELRWRIFYSLSVVGWVGCFFFKPHRPDLRSA--C---CGV
6803 : SLFDHLDELRTRIFLSLGAVLVGVVACFIFVKPLVQWLQVP--A---GTV
por  : SITEHLEELRQRTVVFVIFFLAATISFTQIKIIVEIFQAPAI-----GI
odo  : PFSEHIEELKQRLFHTFWIILILTFISLCEVKLLVKILELPVN-----NV
gui  : SLAEHLEEIRQRAFWSFSVLTTMIISCIIFVKNIVKTLQEPAA-----GI
dic  : YSFEHFSEIRHRALYSLGFFLCTTIVIFSNIKFVVKILKNSVSM-----I
ara  : TIFDHLEELRERIFVSVLAVGAAILGCFAFSKDLIVFLEAPVKT---QGV
Ecoli : PLITHLIELRKRLLNCIIAVIVIFLCLVYFANDIYHLVSAPLIKQLPQGS

```

```

           160           *           180           *           200
7002 : KFIQVAPGEFFFLSFKVAGYTGALLASPFILYQIIQFVLPGLTRGERRLL
6803 : KFLQLSPGEFFFVSVKVAGYSGILVMSPFILYQIIQFVLPGLTRRERRLL
por  : KFLQLAPGEYFESSIKIAIYCGIVATTPFGVYQVILYILPGLTKKERKVI
odo  : KFFQLSPGEYFVSTVKISFYTGFLFGSPFAIGQIILFLLPGLTKKETKII
gui  : KFLQFAPGEYFFASIKVAAYSGILISSPFIVYQILLFVLPGMTKDERKTL
dic  : QFFQSSPDEYFISTFIISISAGFIFSIPFLLGQIIFFFRPALNFREKKII
ara  : RFLQLAPGEFFFTTTLKVSGYCGLLLGSPVILYEIIAFVLPGLTRAERRFL
Ecoli : TMIATDVASPFTPIKLTFMVSLILSAPVILYQVWAFIAPALYKHERRLV

```

```

*           220           *           240           *
7002 : APVVLGSGVLFFAGLAFAYVALIPAALNFFITYGADVVEAAWSIERYFEL
6803 : GPVVLGSSVLFFAGLGFAYYALIPAALKFFVSYGADVVEQLWSIDKYFF
por  : LPILIGSIVLFIVGGIFAYFVLAPAALNFFLISYGADIVEPLWSFEQYFF
odo  : LPLLLSSLGLFGFGLVFSYYALIPAALNFFLNYSDEVIEPLWSFDQYFF
gui  : LPIIIGSMILFLLGLIFGYIILVPASLNFFIKYGSDVVEPFWSFEQYFF
dic  : TILISSSIMLFFTGLLFSYFLLIPAALNFFVFYSSEVLEPFLSSFEEYNF
ara  : GPIVFGSSLLFYAGLAFSYWVLTPAALNFFVNYAEGVVESLWSIDQYFF
Ecoli : VPLLVSSSLLFYIGMAFAYFVVFPLAFGFLANTAPEGVQVSTDIASYLSF

```

```

           260           *           280           *           300
7002 : VLGLMFFTGLAFQVPVVMILSWLGIVSSSLMLKGWRFVVLGAVVLGAVI
6803 : VLLLMFSTTGLAFQIPIIQVVLGFLGIVSSEQMLKGWRFVILGAMVLGAIL
por  : ILLLLFSTTGLAFEIPIIQLLLGISGTVSSASQMLLAWRYIIIIISTIIGAVL
odo  : ILVLFYSTTGLAFQIPIIQILLGLLNIISAKQMLAAWRYIILVSTIIGAIL
gui  : ILVLLFGTALAFQLPVLQLVLGFLRIVSGKTMFSIWRYVILLSTVVGAVL
dic  : VASLFITTGLVFQLPVIQIILSLNLINPTQLLSLWRPILVISTILSAIL
ara  : VLVLMFSTTGLSFQVPVIQLLLGQVGVVSGQMLSIWRYVVVGAVVAAAVV
Ecoli : VMALFMAFGVSEFVPVVAIVLLCWMGITSPEDLRKKRPYVLVGAFVVGMLL

```

```

                *           320           *           340           *
7002  : TPSTDPMTQSLLAGAVMGLYFGGIGIVKLSGR~~~~~
6803  : TPSTDPLTQSLLAGAVLGLYFGGIGCVRLGK~~~~~
por   : TPSTDPVTQIIMSSAVLALYFSGVILFLLRK~~~~~
odo   : TPSTDPLTQLLLSIAILMLYFSGVGILFLIKN~~~~~
gui   : TPSVDPLTQIILLSSIIILILYFGGASLVLVVEGSQKNNN~~~~~
dic   : TPSSDPITQIILLSSALFVLYSMGTLVAISLTKNTKFSN~~~~~
ara   : TPSTDPVTQMLLATPLLGLYLGGAWMVKLTGR~~~~~
Ecoli : TPP-DVFSQTLLAIPMYCLFEIGVFFSRFYVGKGRNREEENDAEAESEKT

```

```

7002  : ~~
6803  : ~~
por   : ~~
odo   : ~~
gui   : ~~
dic   : ~~
ara   : ~~
Ecoli : EE

```

Arabidopsis thaliana und *Escherichia coli*: tatC

Alignment der ycf45 Sequenzen

```

                *           20           *           40           *
6803  : ~~~~~
por   : ~~~~~
odo   : ~~~~~
cyacal : ~~~~~
ara   : MSLSLSNHVPPLTLLSHERRILKLQSRSSILFHQLFHTKFLLLSNSSSL

```

```

                60           *           80           *           100
6803  : ~~~~~MSELSLAHQDYPVDDLEQLLSILPKPIQAIIAEHP
por   : ~~~~~MLIADLEKLEILPHFVREPLKQHS
odo   : ~~~~~MVRDELDNLIKNLPLFLIRQINQHP
cyacal : ~~~~~MLIFNDRHFPLPVVPRFVYKSLKKHP
ara   : SSSHGVVAISASPSSVAVPELEDEDHFDDELRRILALVPEEIRQTLKEHP

```

```

                *           120           *           140           *
6803  : QRQQLVEVVMDLGRLEPEARFPPGTAVYLGHEPIAKEDLQYAIDRVGLFSSD
por   : NRKNLIEVVMDLGRRPEARFPGNPEYLSQRSISWQDLDYCVKKKVGNFSGD
odo   : SKQKLIEIVIDLGRRPEARFTTGPEYLSQKVISWQDINHFTKRISKFNSD
cyacal : RKFGLTEIVLDNGRRAEGRWREKTENLTHKKITKKHLLRCIKKIGIENED
ara   : EISELIEIVLDLGRKPLARFPSGDFVISDDAVRVKDLEFAVSQVGEFTND

```

```

                160          *          180          *          200
6803 : NRAGIERTLHRISAIRNRRTNEIIGLTCRVGRAVFGTINLIQDLVETGESL
por   : NRAGIEKTLHRISSMRNREGSIIIGLTCRVGRAVFGTISIIIRDLEQGDSI
odo   : NRAGIERTLHRISCIRNRQFLINGLTCRIGRAIFGTISSVRDLLESQQSI
cyacal : NRAGIYQTLHRISCIKNRYGNIVGLTYRIGREFIGIGPIIRDLESNQST
ara   : NRAGISRTLHRISAIRNRKGEIIGLTCRVGRSVRGSANLLRDLVQDGNLSL

```

```

                *          220          *          240          *
6803 : LLLGRPGVGKTTALREIARVLAADDLHKRVVIIDT SNEIAGDGDIPHPAIG
por   : LLLGKPGVGKTTAVREIARVLSDEMEKRVVIIDT SNEIAGDGDIPHPAIG
odo   : LLLGKPGVGKTTIIREIARVLSDEMEKRVVIVDT SNEIAGDSDIPHPAIG
cyacal : LLIGRPGIGKTSFIREISRILSNEIMKRVVIIVDSANEISGEGCCPHISTG
ara   : LLIGPPGVGKTTMIREVARMLGNDYEKRVMIIVDT SNEIAGDGDIPHPGIG

```

```

                260          *          280          *          300
6803 : RARRMQVARPELQHQVMIEAVENHMPEVIVIDEIGTELEALAARTIAERG
por   : RARRMQVAQPDLQHQVMIEAVENHMPEVIIIDEIGTELEALAARTIAERG
odo   : RARRMQVATTDLQHQIMIEAVENHMPQVIVIDEIGTELEALAARTIAEKG
cyacal : KARRMEVQSINSQHEVMIEAIEENHTPEIIIIDEIGTEYESQAAISISQRG
ara   : NARRMQVPNSDIQHKVLEAVENHMPQVIVIDEIGTKLEAIAASTIAERG

```

```

                *          320          *          340          *
6803 : VQLVGTAHGNRLENLIKNP TLSDLVGGIQAVTLGDEEARRRGSQKTVLER
por   : VQLVGTAHGNYLESLIKNP TLADLIGGIQYVTLGDEAKRRGTQKSILER
odo   : VQLVGTTHGNCLLENLIKNP LSLDLIGGIQSVTLSDDEAKRRGTQKSIER
cyacal : IRLIGSAHSSDLFNLAKNP TLCKLVGGIESVTLSDTQAILRKTKKTILER
ara   : IQLVATAHGATILENLIKNP SLDLLVGGVQSVTLGDEEATRRGGQKTVLER

```

```

                360          *          380          *          400
6803 : KAPPTFSMAVEMLERQKWTIHSDVALTIDNLLRGRPPVEQLRYMNEQGEL
por   : KAAPAFQIAIEIHDRKAWIVHEKVEETIDQILQGHQPFVQKRQIQDNGRI
odo   : KAYPAFQIAIEINTENSWTIHEDIKSSIDLLRKSFTGTQVRELFLDKRT
cyacal : KGCSCFNATIEINKKRTVKVYTSVEQSIDAILEGRVNNSQIRSMKLNGEI
ara   : KGPSTFNCGAEIVSKTEVRVHRSLEATVDAILAGRLPNVEIRKIKSHGVE

```

```

                *          420          *          440          *
6803 : QIETVEAQPOERTPQPPPYFSLGLVDDRQLRPRPTGLRSTGRMKPQAPLH
por   : LIKCYPSQ-STEVL-----STNSSSLQKMSSLKQKTHFLQQREVKN
odo   : FIKYKKLQIDTFTL-----LKDSNSL-KIQ TINRSNNWF-TRSQKS
cyacal : TISLNYQDE~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~
ara   : VIMEKEPFIDEKTVDKK--HEEETLDVSKITKEETVS-----

```

```

                460          *          480          *          500
6803 : ANADQVRDFERLLEQSWQQWEGDDEPKIRVPGPNGEDLPVYVYPYGVGRS
por   : KTFDLNKLENR--DTSLLSTTINTPVNINNHSFQVEASIQYLYAYSLSWQ
odo   : LFYFQNS-----KAKKCFIFIYSLPSN
cyacal : ~~~~~
ara   : -----EVLQTKTEITEAESSEKDTLMYLYVYG-----
    
```

```

                *          520          *          540          *
6803 : QLDQVIDILQLPVAVTKDQVHQADAVLALRSHVKGKQKLRQMAKGIQVPIY
por   : HITSVISALDLPIILTKETIEKSDAILALRSQVKQNTKLRQIAKSRQIIIIY
odo   : LISEILNKLKFOYVLTKELEKSSLIVGSKVSLNQNFKLKCLAQQCSIPVY
cyacal : ~~~~~
ara   : -----METAVELTDDISEAEALLALQAKIRKNPRIKSFATSHGIPVY
    
```

```

                560          *          580          *          600
6803 : GVKSNTIPQISRALKRILGMDEPHKAEAADLRLFTRSGSNDELEALEEAR
por   : TIQNSTVPIITRALRKILNINTSSDLNWVKL---CKSKKFYEIQALQEAK
odo   : SVNKENIYQII-SLVKLFK~
cyacal : ~~~~~
ara   : VTKTNSGIQVAKAIRALL---TDYEDGLGEFGSEDRLKLSEKMDALEEAR
    
```

```

                *          620          *          640          *
6803 : LAVEQIVIPTGQPVELLPRSPHVRKMQHELVEHYRLQSDSFGDEPNRRRLR
por   : LAIEIIIILNENSIVQLTPRSAYIRKMQHNLIIDNYQLRARSFGGEEPYRKLK
odo   : ~~~~~
cyacal : ~~~~~
ara   : LAIERIVIPKKETDILLPRPPRIVSLQGLVVRKYNLRSERKWRGDEMYLR
    
```

```

                660          *          680          *          700
6803 : IYPA~
por   : IYPE~
odo   : ~
cyacal : ~
ara   : ILPYSTEEDRDDREDEGEFGGEANGEELDELGFATGESNDSPSGIDRLPLL
    
```

```

6803 : ~~
por   : ~~
odo   : ~~
cyacal : ~~
ara   : PD
    
```

— Walker Motive

Alignment der ycf46 Sequenzen

```

          *           20           *           40           *
6803 : ~~~~~~MTFSEEFELLLRACYPLLYIPTQEEERLEMAIAS
por   : ~~~~~~MNF IQDLRLLKSRYP IILINTREEERLEYI IKN
odo   : ~~~~~~MKFNDELI LLLKARYPIIYINTIEEDRVEYI IIRK
gui   : MNNFELILLYYGKKIFMSFVKDFKLLLKARYPIIYINTYEEERVEYVIKS

```

```

          60           *           80           *           100
6803 : SAQRLGNRSVYYWDFVEGYQGNPNGANVGRRNPLQALEFIEKLPASSNGI
por   : QLFCLDNEKVYCWDFVDGYTSNPNDNGYAKRNPLLALEFIEKLDTPYLN
odo   : HIKANLNRSIYSWDFVDGYTNNPNNEGFAKRNPLQALELIERLTSETPAL
gui   : AIQSFTNRAVYSWDFIEGYCNPNDNGYAIRNPLQALEFIDKFTLETPLL

```

```

          *           120           *           140           *
6803 : FVLRDFENRFLDDVSI SRKLRNLARRLKAFAKNLVIVAPQIYIPNELAEI I
por   : FILKDFDSFFNDLGLIRKLRNLSQI IKTQSKNIIIVSCKVNIPYTLSDVI
odo   : FLLKDFENRFLTDISI SRKLRNLSRIILKLPKTI IIGSDFQIPKELQDLI
gui   : VLLKDFHLFLNDISVSRKLRNLAKSLRNQSKTIVIIASDLTIPLNLSDSI

```

```

          160           *           180           *           200
6803 : TVMD FPLPSSAEIQGEIERLLTGLGQKVESSLRDEWSRAAQGLSMERIRR
por   : TIVDLPLPNLSEIKKEITRLSIALGIVLDIELVNNLAKSCQGLSVERIRK
odo   : TVLQFNLPVENEITQELTRLVNSLNLTIIDPSLFESLTRACQGLSLEIRRR
gui   : TILHFPLPKNSEIKKELLRIQESLGYSLPEHSLDNLVKAQGLSLEKIRR

```

```

          *           220           *           240           *
6803 : VLARCLADHGQLGADDVELMLEEKRQSIRQTQILDFYPASERISDIGGLD
por   : TITKTIAQYGQLDSRSLPIIIEEKRQLINQTRLLEFYYPYKKATEDIGGLD
odo   : VLSKIIATHKTIDENSISILLSSEKQIISQTEILEYWSVNEKMGNIIGVD
gui   : VLAKIIATYKEINVESLIDLVFKKQQLISQTQILEFYNPVTKISDIGGLN

```

```

          260           *           280           *           300
6803 : NLKDWLLRRGGAFFSEQARRYGLPYPRGLLLAGIQGTGKSLTAKAIAHHWH
por   : ALKSWLKKRSRSFSKQSFNYGIPTPKGLLLVGIQGTGKSLTAKAIAANDWT
odo   : NLKDWLKKRKT SFTIQASNYGLPTPRGLLLIGIQGTGKSLTAKAIA TEWQ
gui   : ELKSWLKFRAASFSKRAEEYGLPIPKGLLLVGIQGTGKSLTAKSIANEWN

```

```

          *           320           *           340           *
6803 : LPLLRLDVGR LFGGLVGESEARTROMINLAEALAPCVFWIDEIDKAFGSM
por   : LPLLRLDIGK LFGGLVGESESRMREMTIAEGLSPCVLWIDEIDKAFSNL
odo   : LPLLKLDVGR LFGGIVGESESR LRQ MIDVAETLSPCILWIDEMDKAFSNN
gui   : LPLLKLDVGR LFGGIIGESEARVRQMIQFAETISPCILWIDEIDKAFTGS

```

```

360          *          380          *          400
6803 : DSHGDG G T T S R V F G A F I T W L A E K T S P V F V V A T A N N V Q S L P P E L L R K G R F D
por   : Y S Q G D S G T S A R V F G T F I T W L S E K T T P V F V V A T A N T I Q N L P S E M L R K G R F D
odo   : D S R G D S G T S N R V L A T F I S W L S E K T K P V F V V A T A N N V D L L P L E I I R K G R F D
gui   : N F N N D S G T T K R V F G T F I T W L S E K K S P V F V V A T A N N I D S L P P E L L R K G R F D

```

```

          *          420          *          440          *
6803 : E I F F V G L P N K T E R E A I F S V H L N R L R P H K M A D Y D I H R L A Y E T P D F S G A E I E
por   : E I F F L D L P N N E E R E L I F Q I H L A R I R P K S W Q N Y N I K Q L S L L C N K F S G A E I E
odo   : E I F F L D L P E L E E R K E I F K I H I Q E F R P N S W K L F D Y K K L A Q L S E S F S G A E I R
gui   : E V F F I G L P D L K E R E C I F K V H L K K I R P K S W S T Y D T E I L S A Q S N R F S G A E I E

```

```

460          *          480          *          500
6803 : Q I L V E A M H I G F S Q N R E F T T D D I L S A A S Q V V P L A R T A K E Q I Q F L Q E W A A A G
por   : Q A I V E S M H T A F S E E R E F S T E D I K I A L E Q F I P L A Y T D K E Q V E S L Q A W A G N G
odo   : Q S I I E A M Y Q A F D Q Q R E F T T D D I C L A L K Q L I P L A Q L E N S Q T L K L Q S W A S S G
gui   : E S I Y E A M H I A F N E N R E F T T S D I L N S L K R V V P L A Y T S Q K N I E E L E D W A S A G

```

```

          *
6803 : K A R L A S R D S G F P A I S
por   : R A R N A S L ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~
odo   : R I R L A S K R I S I N ~ ~
gui   : K I R L A S ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~

```

 AAA-Box
 Walker Motive

Alignment von Ycf46 und Srl0374 von *Synechocystis* sp. PCC8603

```

          *          20          *          40          *
srl0374 : ~ ~ M Q E E L S V L L K A Q Y P L I Y L V T S E E E R A E Q A V Y R I V Q E V T R H Q R L F V W T V
ycf46   : M T F S E E F E L L R A C Y P L L Y I P T Q E E E R L E M A I A S S A Q R L - G N R S V Y Y W D F

```

```

          60          *          80          *          100
srl0374 : T H G F R E Y G V A Q Q K T H H N T I S P E A A I E W V V R Q E P G I F I F K D L H P F I S S P A V
ycf46   : V E G Y Q G N P N G A N V G R R N P L Q A L E F I E K L P A S S N G I F V L R D F N R F L D D V S I

```

```

          *          120          *          140          *
srl0374 : T R W L R E A I A S F K G T E K A I I L M S P Y Q E T P I E L E K D V V V L D F A L P D L V T L D G
ycf46   : S R K L R N L A R R L K A E A K N L V I V A P Q I Y I P N E L A E I I T V M D F P L P S S A E I Q G

```

slr0374 : VLGQQLGKSRHALGEDSR160REKLLKAAL*GLTKDEAEKVYRKAYVKA180QQLTEG
 ycf46 : EIERLLTGLGQKVESSLRDEWSRAAQGLSMERIRRVLARCLADHGQLGAD200

slr0374 : EVEIVLSEKKQLIRRN220GILDYIEEDETIRAVGGLEELKKWLTQRSDAFIE*
 ycf46 : DVELMLEEKROSIRQTOILDFYPASERISDIIGLDNLKDWLLRRGGAFSE240

slr0374 : RAREYGLPQPKGMLILGVPGC260GKSLIAKTTSRLWGLPLLRLDMGRVYDGS*
 ycf46 : QARRYGLPYPRGLLLAGIQGTGKSLTAKAIAHHWHLPLLRLDVGRLE-GG300

slr0374 : MVGRSEANLRNALKTAESISPAILFIDELDKAFAGGAGSGDSDGGTSSRI320
 ycf46 : LVGESEARTRQMINLAEALAPCVFWIDEIDKAF--GSMDSHGDTTSRV340

slr0374 : FGSFLTWMQEKTSVPFVMATANRVDRLPGEFLRKGRFDEIFFVDLPSSEE360
 ycf46 : FGAFITWLAEKTSVPFVVATANNVQSLPPELLRKGRFDEIFFVGLPNKTE380

slr0374 : REAIFRIHLHK-RRKDTSRFDLGEARTSDGFSGAEIEQAIVAAMYEAFA420
 ycf46 : REAIFSVHLNRLRPHKMADYDIHRLAYETPDFSGAEIEQILVEAMHIGFS440

slr0374 : QEREFNQLDIIAAIKSTLPLSRMVEQVTALRDWARQ-RARPASASVAEY460
 ycf46 : QNREFTTDDILSAAASQVPLARTAKEQIQFLQEWAAAGKARLASRD-SGF480

slr0374 : QRLEF
 ycf46 : PAIS~

Alignments der sequenzierten *Synechococcus* orf-Sequenzen mit *Synechocystis*

Alignments der orf-Sequenzen des ycf35 Klons

Orf1

orf1 : ~~~~~~DP40AELITEKLYSSRP*
 sl11367 : MAKRSPALSPALPERLVQESYLFRGMDLPLVADYLASAELKIEKLFSSNRP*

```

      60          *          80          *          100
orf1      : IYTAFRPNHNLEFLYVLLAGGPVIVRSTPLDRILAITYTGSCFGMRNLPV
sll1367   : IYTAFLPDQTLDNLYVMLDDGVVITRSTPLDRILAINYAGSCFGWRSLPF

      *          120          *          140          *
orf1      : GFGQVSRSFPSLVEAYKTTDVLKIPVATVQRIYDQSADFRDYRNLSEFLR
sll1367   : SYGLASKSFPCSEVEVYKTTTHVIKIPLATVEQIYENSEIFRERYRFLFELQ

      160          *          180          *          200
orf1      : EKFAQYHLLNCSTYPPQAVASLLRALIYQERSLIANQPQSNQVFSFDLPVD
sll1367   : QKFEYHLLNCSTYPPQAVASLLRALIYQERELGNQPDROGNYIFDLPID

      *          220          *          240          *
orf1      : IIAHACQLNHRRTVEQVLKGMTKVELIKTEKSAEGQGDLIHVLNPEGLKEV
sll1367   : MIARACQLNQRTVEQVLKGMQKHHLIAIPKGE--KEDLIQILAPEGLKEV

      260
orf1      : YSATRDKVAWWPLR
sll1367   : YSATREKVNWWPLK

```

Orf69

```

      *          20          *          40          *
orf69     : ~~~~MNMETLEFIIYPEARVQEKVTGIVGSSCQEVTTAIEEQLGVVLFQ
ss11263   : MGGLTVNLETLEFVIYPDGRVKETVTGIVGRSCQEVTTAIEAELGVVLTQ

      60          *          80
orf69     : EQTSEYFAQ--PVSLTATTNPVQSNW~~~~
ss11263   : QTTSEFFAQTSPLNQSVQSQTLSSWPGG

```

Orf141

```

      *          20          *          40          *
orf141    : ~~~~MTFENSPQRSGFEPGLGGFLRNDTERSGFEPGLGGLLRQKGVYVD
sll0662   : MVIADLNFPPDHRSGLEPELGGDWRNFDDRSGLPELGGELRERGVYVD

      60          *          80          *          100
orf141    : EETCIGCKHCAHTAPNTFYIEEEHGRARAYRQDGDAAEIVQEAIDTCPVD
sll0662   : EVTCIGCKNCAHVAPNTFTIEQEHGRSRAFSQNGDDEAVIQEAIDTCPVD

```



```

                *           120           *           140
orf141  : SIHWLDYTELKAKEAARKNQVIRPLGF---SPGWRVRRSARKPKPSRKP
s110662 : CIHWVPYDELKHLLEKRRKHQQIRPLGYPQINPHL~~~~~

```

Orf164

```

                *           20           *           40           *
orf164  : ~~~~~~MSLFSPPFRLISLI-GCTSLLSLGPCQRIDPALYDCQKLLA-Q
s110361 : MPMSPSVRFTGFLPRRLMGLSWGIVILMLAL-----NQGLISCGASKADQ

```

```

                60           *           80           *           100
orf164  : IQSTVTEAQTLVQNEPTAEAPQTFNFERWLQAADALKMGAEATAQIRLRD
s110361 : CRQLILITKQMA--EEGAKYRDTTSTEEVLNMADAFDATATKIERINLED

```

```

                *           120           *           140           *
orf164  : SQMKTYQTQISDIYQRQAEATYAMVKARQNKDLEAAQTAQSLSQTACTEE
s110361 : PVLANYQGELVSIYQGNAAEATRTMVKALESKDILTACLACKQVATIGQQE

```

```

                160           *
orf164  : QTIGQALNDYCQAKYQAVTATEDP
s110361 : QQVITNINVHCQQP~~~~~

```

Orf2

```

                *           20           *           40           *
orf2    : MALTRILEPEVMDDPAAEALAYDAMDFRAVNQDFADLVVTTYSETAFVLD
slr1039 : ~MLERILEPEVMDTEAEAMDYDAMDFQAVNLAFAR-ACQLGPSKATVLD

```

```

                60           *           80           *           100
orf2    : LGTGTAQIPILLGQQRPQWQIKGTDLAQSMLALGQKNVVAAGLTAQIEIV
slr1039 : AGTGTARIPILLAQLRPAWQITAIIDFARSMLAIAKENVIAAGCETQICLE

```

```

                *           120           *           140           *
orf2    : YADAKNLPWPDQS~~~~~
slr1039 : FVDAKQLPYANGSFDGVIANSLCHHLPRLDFLREVKRVLKPHGFLLRD

```

```

                160           *           180           *           200
orf2    : ~~~~~~
slr1039 : LIRPESPEKLADFVTAIGSDYNDQQRKLFADSLHASLTIAEIQDYLQHLG

```

```

                *           220           *
orf2      : ~~~~~
slr1039   : WVGDDGPNLELHLYQSSDRHWTLEKKFQSSTIVQR

```

Alignments der orf-Sequenzen des ycf43 Klons

ClpP

```

                *           20           *           40           *
clpP      : MVA[PASNTI]---[STRLLYPQ]IA[SLLI]FQGVFADPVGQ[TF]LALLESWRKGS
slr0930   : [MTV]PYP[TP]LLAT[SSK]ALYHQV[S]LLLYQGI[F]DNPIGEA[F]DLRLRCLHHNG

```

```

                60           *           80           *           100
clpP      : ~~~~~
slr0930   : TNQKPEATVCLQAYGVWFRHLAEAGQSWQDFLLDRLLEDENPFVSRVQRE

```

```

                *           120           *           140           *
clpP      : ~~~~~
slr0930   : ELAQLPTSLQDAARHDLNLIQMVYQCPPEQILQWVIIASQTPVALKAWQV

```

```

                160           *           180           *           200
clpP      : ~~~~~
slr0930   : PNQLEFPAEGGQNWGENLAYLVAHYRQKGVGAVAHYRAFRWRGKNLQGV

```

```

                *           220           *           240           *
clpP      : ~~~~~
slr0930   : QIDGVRLADLVGYDDPQKILCQNTQCLLQGLPALNVLLYGSRGSGKSSLV

```

```

                260           *           280           *           300
clpP      : ~~~~~
slr0930   : KALVNQYGDRGLRLVEVSPRDLITLPLLVGKLRRTYPQKFIIFVDDLSFEE

```

```

                *           320           *           340           *
clpP      : ~~~~~
slr0930   : EDERFKSLKVVLEGLDVARPANVVIYATSNRRHLIREFFGDRPSPQDADE

```

```

                360           *           380           *           400
clpP      : ~~~~~
slr0930   : VQAWDTVQEKL[S]FSDRFGLTLTFPPANQDTYLMIVHHLAKQAQINLSETE

```

```

                *           420           *
clpP      : ~~~~~
slr0930   : LDFRAKQWATRHNGRSGRTARQFVDYLIQEQLTSP

```

Orf143

```

                *           20           *           40           *
orf143    : MAYWLFQGNPRYHRVLD AIREQTE MPWLVTRYK NKIQVGDGVLIWMAGEA
sll1897   : MAYWLFQGNPKYYRILQ AIEEQEELP WLVTRYSK EIQVGDRA LIWMAGPE

```

```

                60           *           80           *           100
orf143    : AGIYAIAEIIISLPTVISPKDIQDL DYWTD PKRLRADKPRS QIRFIRKLLG
sll1897   : AGIYAIAE-VTKPPEIYP-ELPDGQYWLMSDQAKL DKPRVQLRFLR KLLG

```

```

                *           120           *           140
orf143    : QPLRKIELRFDGILRDL DVIHTPSSTNFKITPEQWLRVHQLKG
sll1897   : QPLRRHELKQDQILRDL LVIRAPNSTNFRVTEEQWQRVYSLKG

```

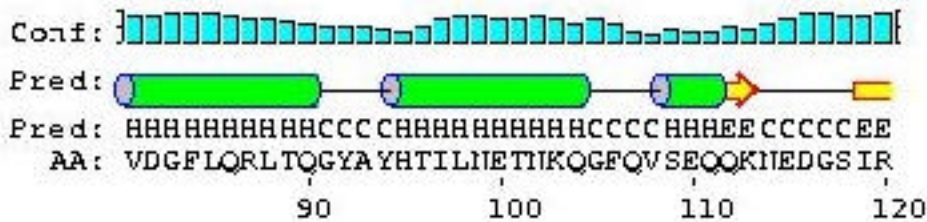
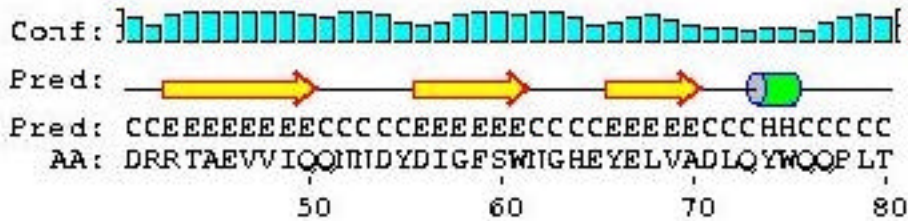
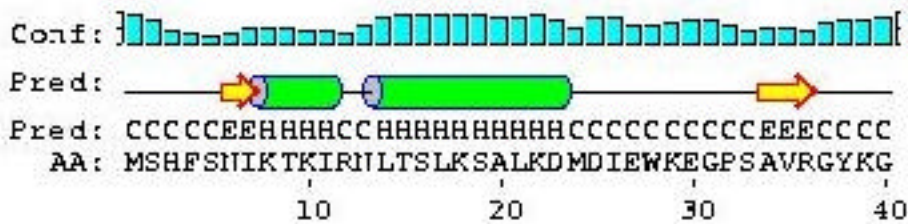
Anhang A3: Sekundärstrukturberechnungen

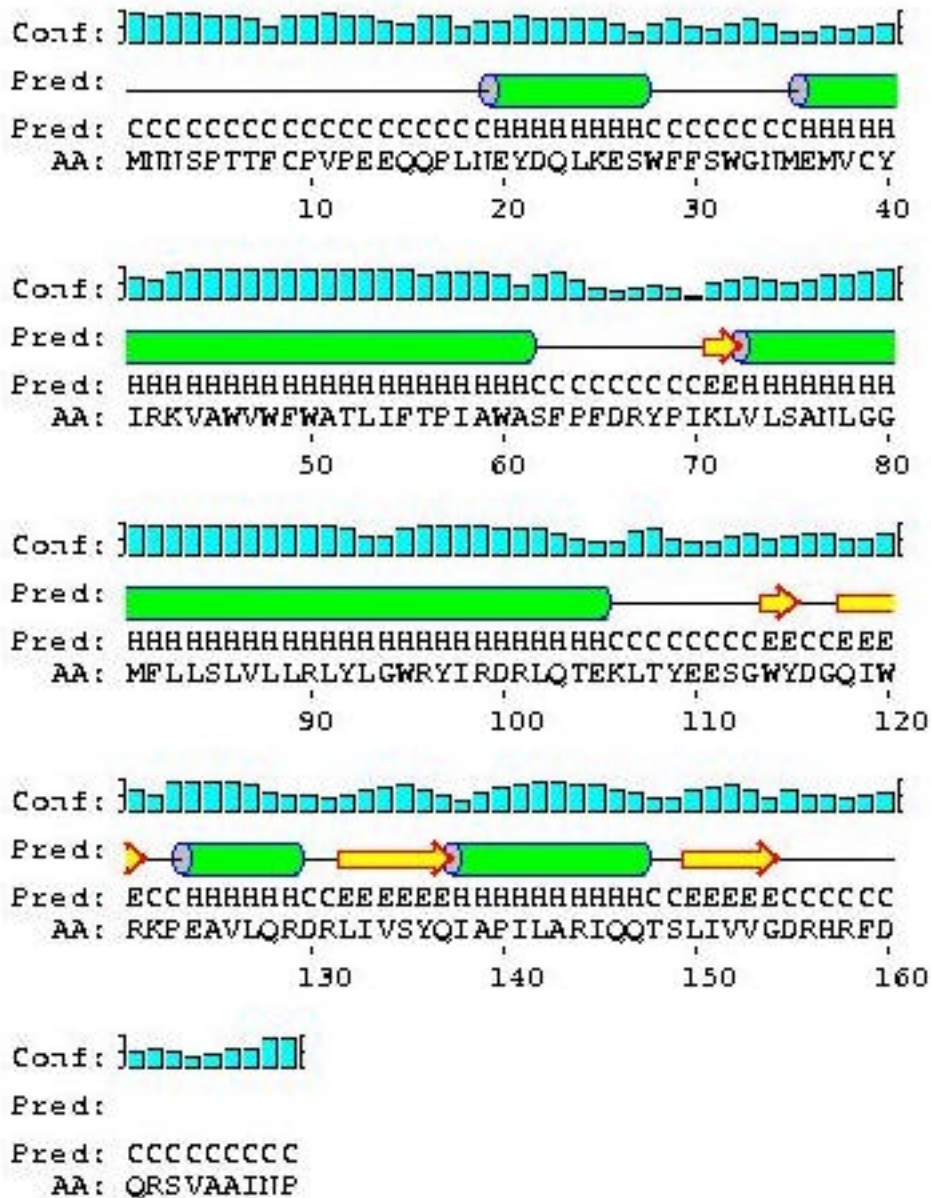
Die Sekundärstrukturberechnungen wurden mit dem PSI-Pred 2.0 Programm (Brunel University) durchgeführt.

Legende:

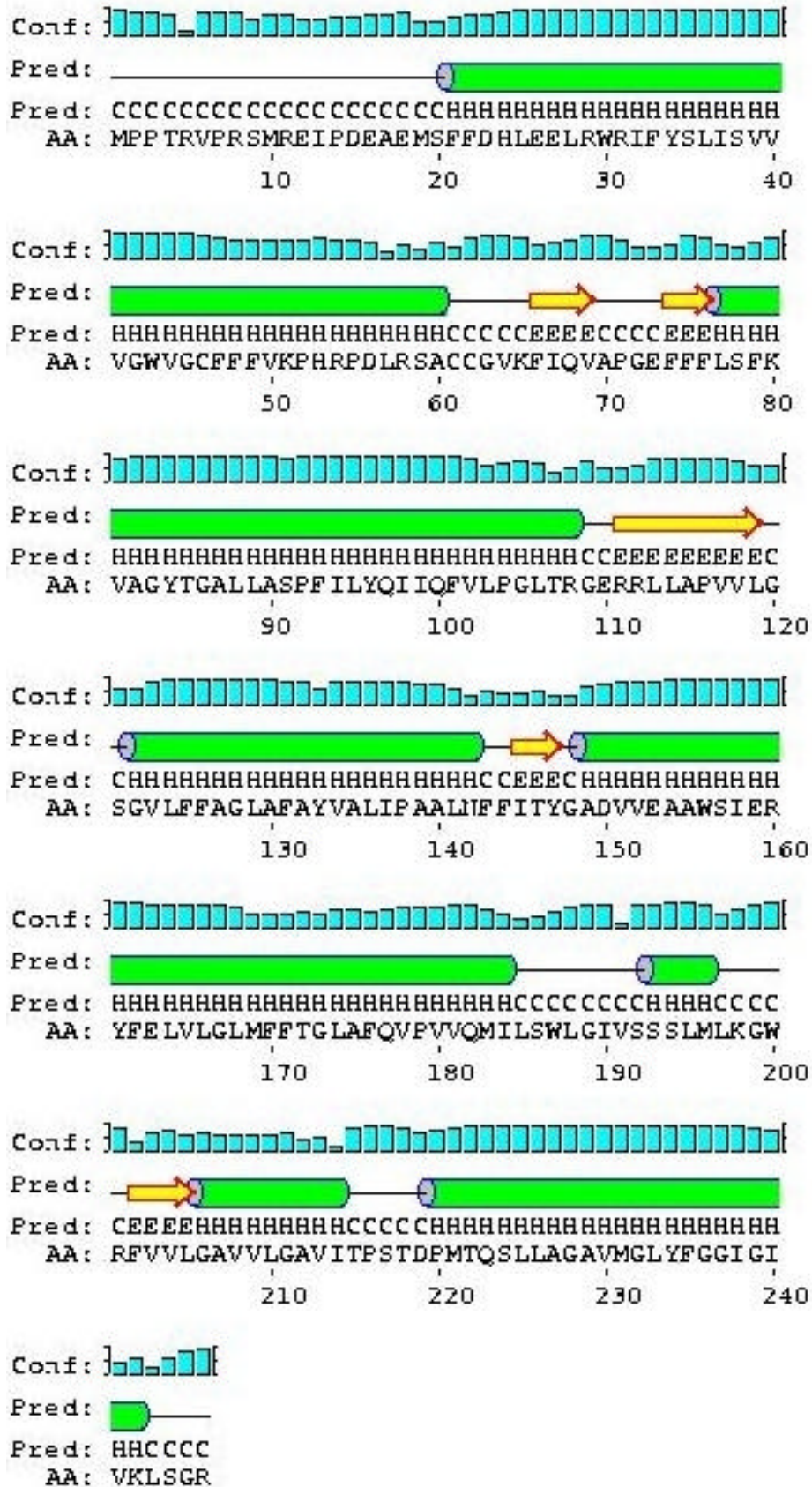


Sekundärstrukturberechnung für den *Synechococcus* ycf 35

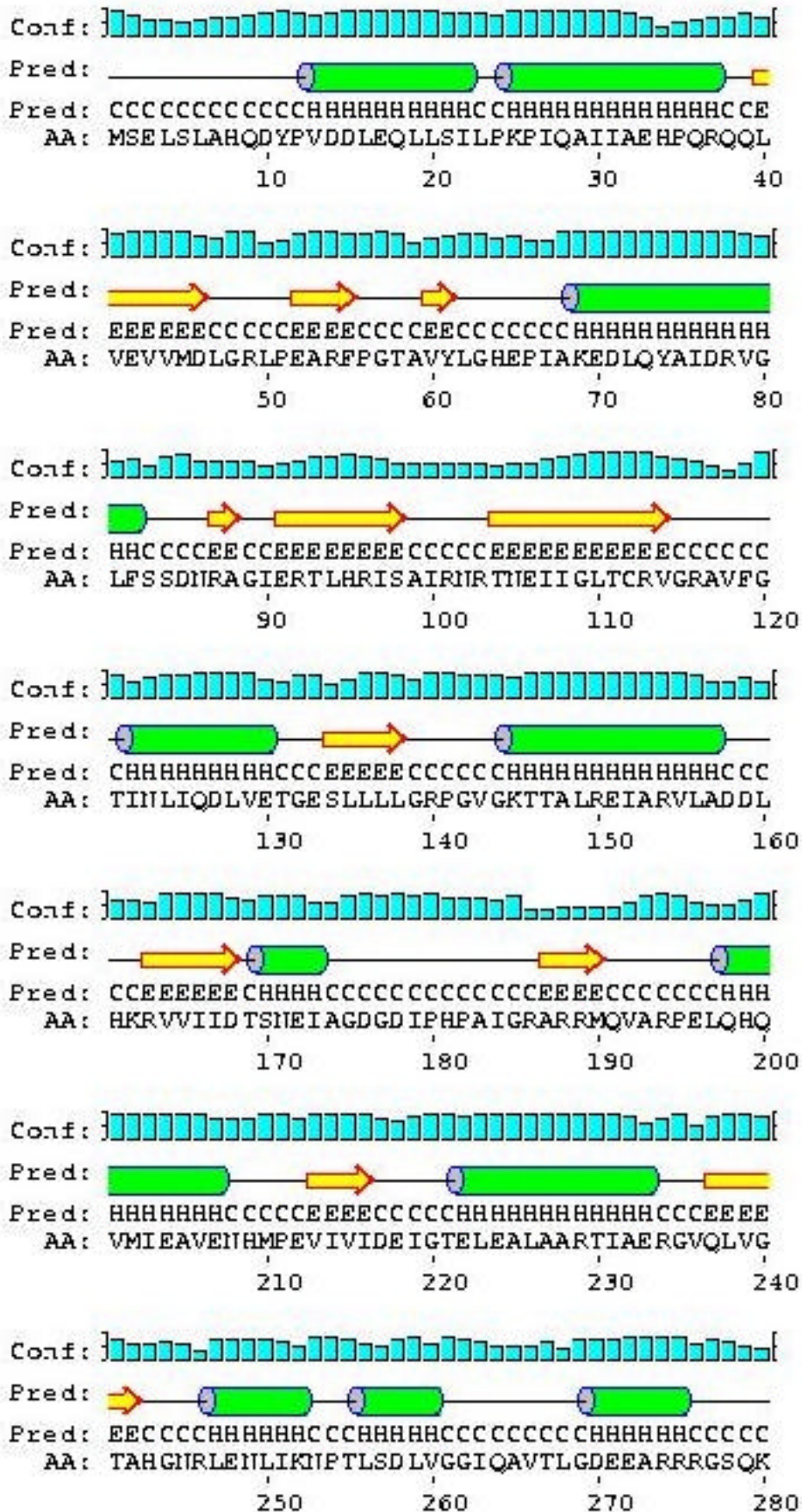


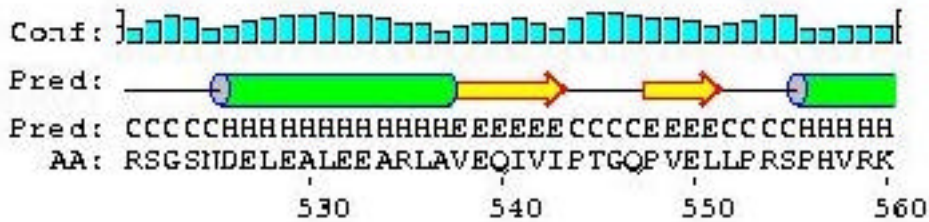
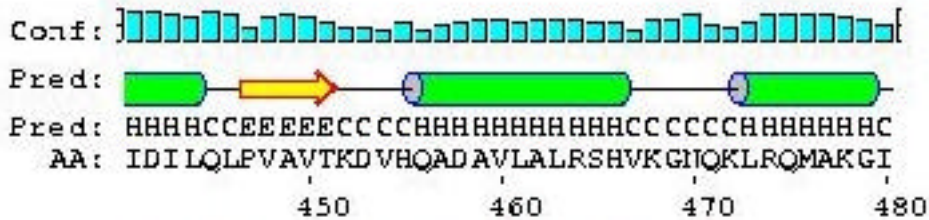
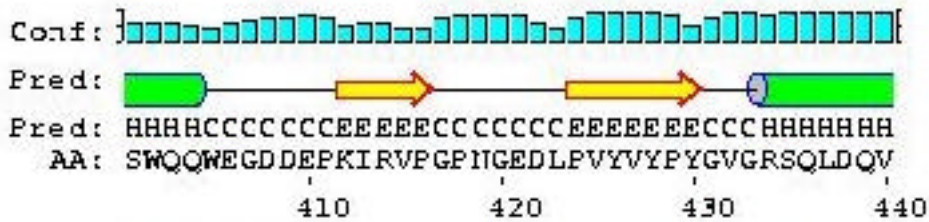
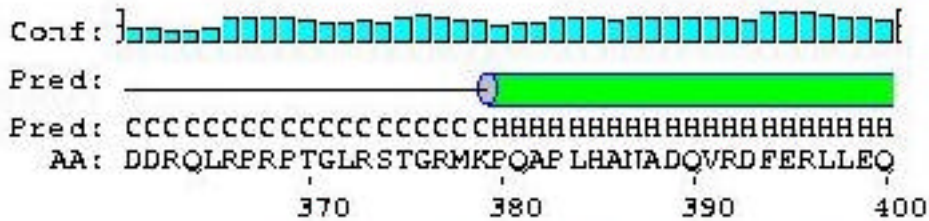
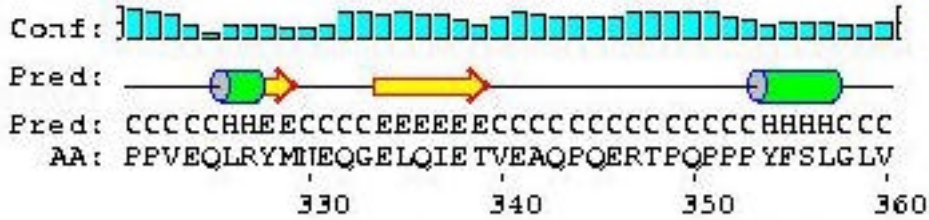
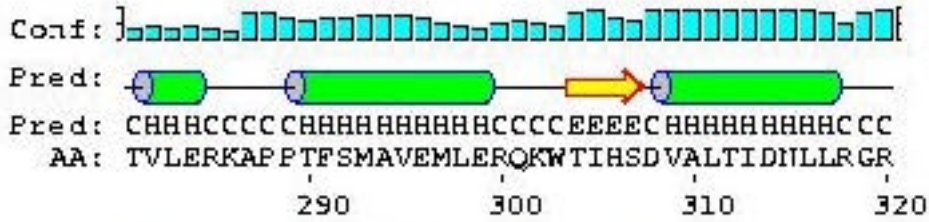
Sekundärstrukturberechnung für der *Synechococcus* sp. PCC7002 ycf36

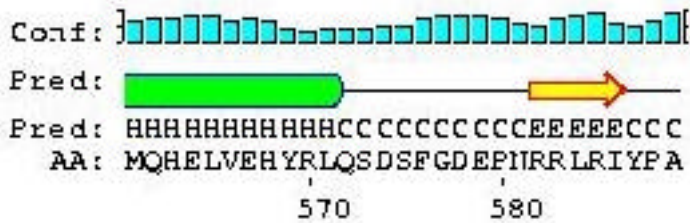
Die Helices 2 und 3 wurden vom MEMSAT (Jones et al., 1994) als Transmembranspan ausgewiesen.

Sekundärstrukturberechnung für den *Synechococcus* sp. PCC7002 ycf43

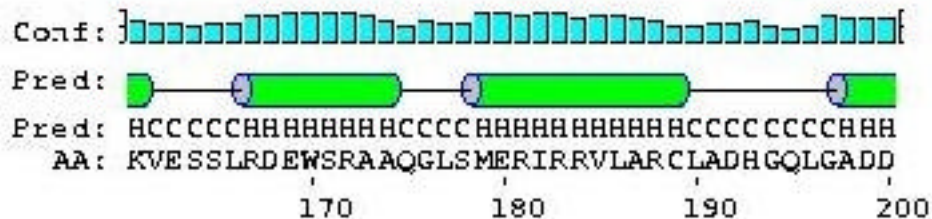
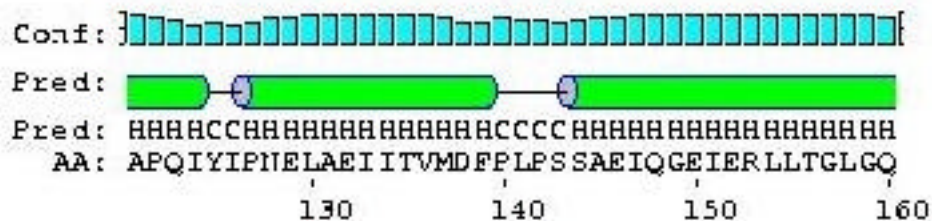
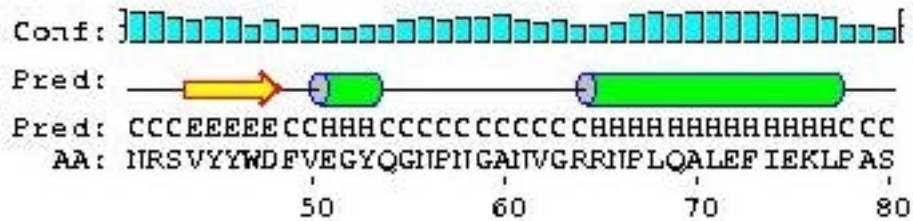
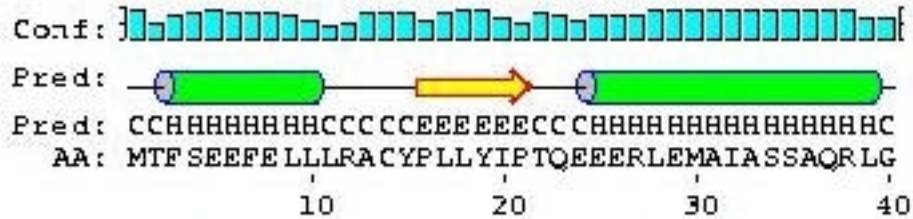
Bis auf den kleinen helicalen Bereich von 193-196 sind alle Helices als Transmembranregionen vorhergesagt; MEMSAT (Jones et al., 1994)

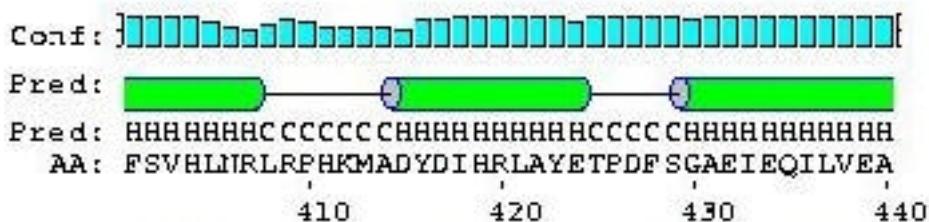
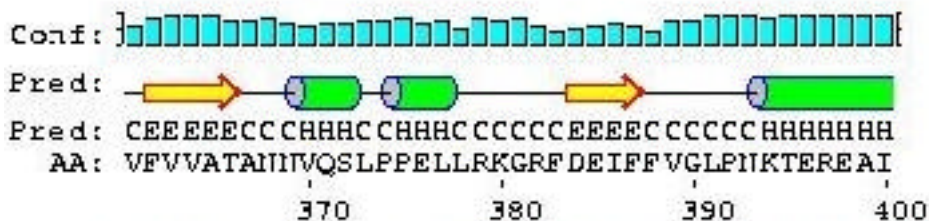
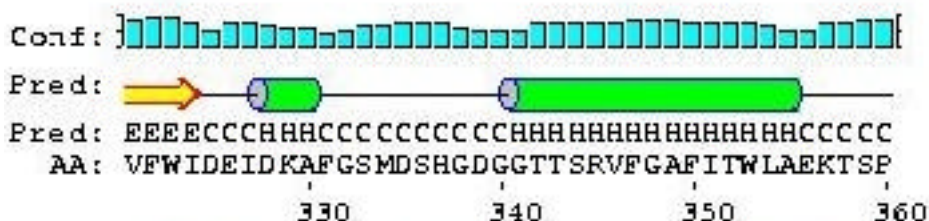
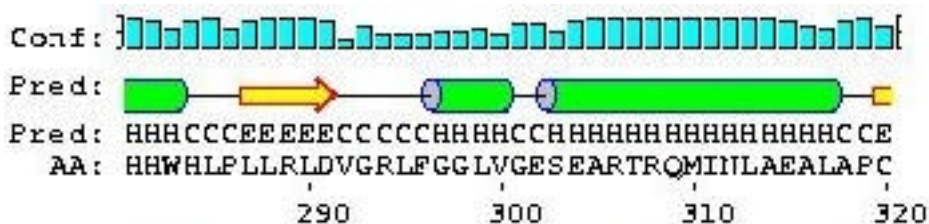
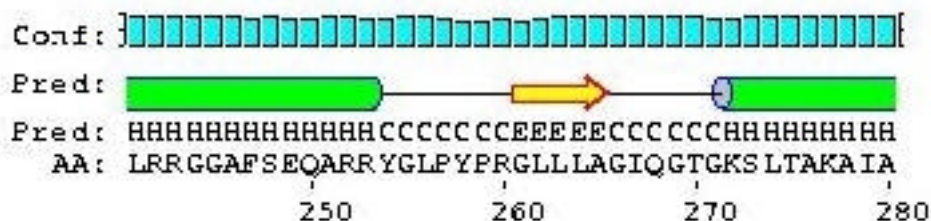
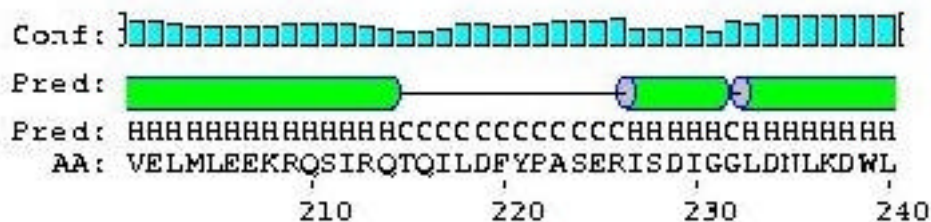
Sekundärstrukturberechnung für den *Synechocystis* sp. PCC6803 ycf45





Sekundärstrukturberechnung für den Synechocystis sp. PCC6803 ycf46





Anhang A4: Proteinsequenzen der Expressionsproteine

Zusätzliche bzw. modifizierte Aminosäuren in Fettdruck

Proteinsequenz des exprimierten N-Terminus von *Synechocystis* ycf46

1 MTFSEEFELL LRACYPLLYI PTQEEERLEM AIASSAQLRG NRSVYYWDFV
 51 EGYQGNPNGA NVGRRNPLQA LEFIEKLPAS SNGIFVLRDF NRFLDDVSIS
 101 RKLRLNLRRL KAEAKNLVIV APQIYIPNEL AEIITVMDFP LPSSAEIQGE
 151 IERLLTGLGQ KVESSLRDEW SRAAQGLSME RIRRVLARCL ADHGQLGADD
 201 VELMLEEKRQ SIRQTQILDF YPASERISDI GGLDNLKDWL LRRGGAFSEQ
 251 ARRYGLLEHH **HHHH**

Proteinsequenz des exprimierten ycf46 von *Synechocystis*

1 MTFSEEFELL LRACYPLLYI PTQEEERLEM AIASSAQLRG NRSVYYWDFV
 51 EGYQGNPNGA NVGRRNPLQA LEFIEKLPAS SNGIFVLRDF NRFLDDVSIS
 101 RKLRLNLRRL KAEAKNLVIV APQIYIPNEL AEIITVMDFP LPSSAEIQGE
 151 IERLLTGLGQ KVESSLRDEW SRAAQGLSME RIRRVLARCL ADHGQLGADD
 201 VELMLEEKRQ SIRQTQILDF YPASERISDI GGLDNLKDWL LRRGGAFSEQ
 251 ARRYGLPYPR GLLLAGIQGT GKSLTAKAIA HHWHLPLLRL DVGRLFGLV
 301 GESEARTRQM INLAEALAPC VFWIDEIDKA FGSMDSHGDG GTTSRVFGAF
 351 ITWLAEKTSP VFVVATANNV QSLPPELLRK GRFDEIFFVG LPNKTEREAI
 401 FSVHLNRLRP HKMADYDIHR LAYETPDFSG AEIEQILVEA MHIGFSQRE
 451 FTDDILSAA SQVVPLARTA KEQIQFLQEW AAAGKARLAS **RDLEHHHHHH**

Abkürzungsverzeichnis

AAA	mit verschiedenen zellularen Aktivitäten assoziierte ATPasen
aphII	Aminoglykosid-3'-phosphotransferase II
APS	Amminiumsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
Chl	Chlorophyll
CP43	Chlorophyll bindendes 43kDa Protein (psbC Genprodukt)
CP47	Chlorophyll bindendes 47kDa Protein (psbB Genprodukt)
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
D ⁺ /Z ⁺	Mn-Cluster reduzierende Tyrosine des PS II
D1	Reaktionszentrumsprotein (psbA Genprodukt)
D2	Reaktionszentrumsprotein (psbD Genprodukt)
dA/C/G/TTP	deoxyAdenosin/Cytosin/Guanosin/Thymidintriphosphat
DCQB	2,6-Dichloro- <i>p</i> -benzoquinon
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithio-L-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasenpaar
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MSP	Mangan stabilisierendes Protein (psbO Genprodukt)
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
OD	optische Dichte
OEC	Wasserspaltungskomplex
orf	offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PS	Photosystem
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Q _A /Q _B	Chinone des Photosystems II
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
Rubisco	Ribulosebisphosphat-carboxylase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton-X 100	[4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenyl]-deca(ethylenglycol)ether
ycf	hypothetischer Chloroplastenleserahmen

Danksagung

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Klaus V. Kowallik danke ich für die Überlassung des Themas, die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit und besonders für die außergewöhnliche Chance, einen Teil der Versuche an der Pennsylvania State University durchzuführen.

Bei Herrn Prof. Dr. Heinrich Strotmann möchte ich mich für die Übernahme des Korreferates bedanken.

Prof. Dr. Donald A. Bryant (Pennsylvania State University) bin ich zu großem Dank verpflichtet, da er mich für fast ein Jahr in seine Arbeitsgruppe aufnahm.

Herrn Dr. Peter Kroth danke ich für die Bereitstellung der Sauerstoffelektrode und der Elektroelutionskammer sowie für die stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. William F. Martin danke ich für die zeitweise Anstellung an seinem Lehrstuhl und sein Interesse an meinem beruflichen Werdegang.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Richard J. Berzborn (Ruhr-Universität Bochum) und Frau Regina Oworah-N'kruma (BTA) für die Immunisierung der Kaninchen und das Interesse an meiner Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch Frau Ina Schaffran (BTA), Frau Dr. Bettina Stöbe und den Drs. *in spe* Petra Fink und Thomas Laatsch sowie Herrn Dr. Wilfried Behn, die mir immer mit Rat und Tat beistanden und deren Freundschaft mir viel bedeutet.

Bei Frau Christine von der Lippe (BTA) möchte ich mich für die Durchführung der Sequenzierungen und ihre stete Hilfsbereitschaft bedanken.

Meiner Familie und meinen Freunden, die mich in den letzten Jahren immer wieder ermutigt haben, möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Die Arbeit wurde aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ko 439/10-1) finanziert und das Stipendium für den Auslandsaufenthalt wurde vom Industrie Club Düsseldorf e.V. zur Verfügung gestellt.

Die vorgelegte Dissertation wurde von Oktober 1996 bis Oktober 2000 am Institut für Botanik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angefertigt. Dieser Zeitraum beinhaltet einen Aufenthalt am Department of Biochemistry and Molecular Biology der Pennsylvania State University (USA) von Dezember 1997 bis Oktober 1998.

Aus dieser Arbeit bereits veröffentlicht:

Schlink K., Kowallik K.V. and Bryant D.A.:

Synechococcus PCC7002 Ycf35 (ycf35) gene, complete cds; and unknown genes

Genbank, direct submission, Accession: AF136577 (1999)

Schlink K., Kowallik K.V. and Bryant D.A.:

Synechococcus PCC7002 Clp protease proteolytic subunit (clpP) gene, partial cds; Ycf43 (ycf43) gene, complete cds; and unknown gene

Genbank, direct submission, Accession: AF136578 (1999)