Rolle der P-Typ Ca^{2+}-ATPasen in *Synechocystis* PCC 6803

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Birgit Tober

aus Geldern

2000

I Einleitung 1

1 Calcium in Eukaryoten 1

2 Calcium in Prokaryoten 5

3 Calcium in *Synechocystis* PCC 6803 9

II Material und Methoden 12

1 Biologisches Material und Anzucht: 12

1.1 Escherichia coli 12

1.1.1 Genotyp des verwendeten *E.coli*-Stammes 12

1.1.2 Anzucht von *Escherichia coli* Bakterien 12

1.2 Synechocystis sp PCC6803 13

1.2.1 Nicht-motiler Stamm von *Synechocystis* sp. PCC 6803 13

1.2.2 Mutanten von *Synechocystis* 6803nm 13

1.2.2.1 Überexpressionsmutante *Synechocystis* 6803nmMRP 13

1.2.2.2 Deletionsmutanten von *Synechocystis* 6803nm 13

1.2.3 Originalstamm von *Synechocystis* sp. PCC 6803 14

1.2.4 Deletionsmutanten von *Synechocystis* PCC 6803 15

1.2.5 Flüssigkultur von *Synechocystis* 6803 15

1.2.6 Anzucht von *Synechocystis* 6803 auf Agarplatten: 16

2 Methoden 16

2.1 Allgemeine molekularbiologische Arbeitsweisen 16

2.2 Isolierung genomischer DNA aus *Synechocystis* 16

2.3 Spektralphotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren 17

2.4 PCR mit genomischer DNA 17

2.5 Klonierung 18

2.5.1 Enzymatische Restriktion von DNA 18

2.5.2 DNA-Elektrophorese 18

2.5.3 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 19

2.5.4 Ligation 19

2.5.5 Herstellung gefrierkompetenter Bakterienzellen 19
2.5.6 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA 20
2.5.7 Selektion rekombinanter Bakterien 20
2.6 Sequenzierung 20
2.6.1 Anlagerung und Verlängerung der Startmoleküle 20
2.6.2 Elektrophorese und Autoradiographie 21
2.7 Transformation von *Synechocystis* 6803: 21
2.8 Arbeiten mit RNA 22
2.8.1 Native RNA-Elektrophorese 22
2.8.2 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) 23
2.9 Sedimentationstest: 24
2.10 Chlorophyllbestimmung 24
2.11 Isolierung von Cytoplasma- und Thylakoidmembranen aus *Synechocystis* 24
2.12 Nachweis filtergebundener Proteine 25
2.12.1 Proteinbestimmung 25
2.12.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 25
2.12.3 Transfer auf Nitrocellulose (Western-Blot) 25
2.12.4 Immunodetektion der Proteine 25
2.13 cAMP-Bestimmung 26

III Ergebnisse 27

1 Benachbarte offene Leseraster der vier Calcium-ATPasen 27
2 Untersuchungen an *Synechocystis* 6803nm 28
2.1 Einfluß von Calcium auf den Transkriptgehalt der Calcium-ATPasen 28
2.2 Ca^{2+}-ATPase Transkripte in Deletions- und Überexpressionsmutanten von `sll1614` 30
2.3 Ausschalten der Ca^{2+}-ATPase- und Ca^{2+}-Austauscher-Gene 31
2.3.1 Klonierung der Gene aus *Synechocystis* 6803 31
2.3.2 Herstellung der Transformationsplamide 32
2.3.3 Überprüfung der Segregation der eingebrachten Resistenzkassetten 35
2.3.4 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten 39

2.3.4.1 Effekt von Calcium auf das Wachstum 39
2.3.4.2 Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit 40
3 Untersuchungen am Stamm des Pasteur-Instituts von *Synechocystis* 6803 42
3.1 Immunologischer Nachweis von P-ATPasen 42
3.2 Ausschalten der Ca^{2+}-ATPase- und Ca^{2+}-Austauscher-Gene 43
3.2.1 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten von *Synechocystis* 6803 46
3.2.1.1 Effekt von Calcium auf das Wachstum 46
3.2.1.2 Zellaggregation nach Calciumzugabe 47
3.2.1.3 Beschreibung der Kolonieform 48
3.2.1.4 Bestimmung des cAMP-Gehaltes 48

IV Diskussion 52

1 Informationen aus der Sequenz der potentiellen Ca^{2+}-ATPasen 52
2 Expression der potentiellen Ca^{2+}-ATPasen 53
3 Phänotypische Charakterisierung der P-ATPase-Mutanten 56
3.1 Wachstum unter Calcium-Streß 56
3.2 Zellaggregation nach Ca^{2+}-Zugabe 57
3.3 Bewegung auf festem Untergrund 59
3.4 cAMP-Gehalt 61
4 Theorie zu einer Signaltransduktionskette in *Synechocystis* PCC 6803 64

V Zusammenfassung 66

VI Literatur 67

VII Anhang 72

Abkürzungen 72

I Einleitung

1 Calcium in Eukaryoten

In eukaryotischen Zellen sind Calciuminonen, Ca^{2+}, an der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt. Sie wirken als sekundärer Botenstoff, der ein extrazelluläres Signal innerhalb der Zelle weiterleitet. In nicht angeregten Zellen liegt die Konzentration an freien Calciumionen in Cytoplasma im Bereich von 100-200 nM (Carafoli 1991). Diese niedrige Calciumkonzentration wird durch den Export von Calciumionen aus dem Cytoplasma ins umgebende Medium der Zelle oder in calciumspeichernde Kompartimente der Zelle wie das endoplasmatische und sarcoplasmatische Reticulum aufrecht erhalten. Der transmembrane Transport der Calciumionen ins extrazelluläre Medium oder in die intrazellulären Kompartimente erfolgt über gradientengetriebene Antiporter mit Na^+ oder H^+ als Gegenion oder über ATP-getriebene Calciumpumpen. Als Reaktion auf externe Stimuli werden Calciumkanäle in der Cytoplasmamembran oder in den Membranen der calciumspeichernden Kompartimente vorübergehend geöffnet und Calcium strömt dem Gradienten folgend ins Cytoplasma ein (Rasmussen 1989). In Nervenzellen beispielsweise führt ein ankommendes Aktionspotential zur Depolarisierung der Cytoplasmamembran, was die Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen in der Cytoplasmamembran bewirkt und somit den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} ermöglicht. Für den Einstrom von Calcium aus den intrazellulären Kompartimenten muß das Signal, z.B. die extrazelluläre Bindung eines Hormons an einen membrangebundenen Rezeptor, von der Cytoplasmamembran zu den calciumspeichernden Kompartimenten weitergeleitet werden. Dies erfolgt über einen weiteren sekundären Botenstoff, dem Inositoltriphosphat. Durch die Bindung des Signalmoleküls an den Rezeptor wird ein G-Protein aktiviert, das wiederum die Phospholipase C aktiviert, die daraufhin Phosphoinositolbiphosphat in Inositoltriphosphat und Diacylglycerin spaltet. Das Inositoltriphosphat gelangt zu den calciumspeichernden Kompartimenten und bewirkt dort die Öffnung der Calciumkanäle, was wiederum zum Calciumeinstrom ins Cytoplasma führt. Das bei der Spaltung des Phosphoinositolbiphosphats ebenfalls entstandene Diacylglycerin aktiviert eine calciumabhängige Proteinkinase, die Proteinkinase C, die verschiedenste Zellproteine phosphorylieren kann. Eine Weiterleitung des Ca^{2+}-Signals nach Öffnen der

Kanäle erfolgt durch Bindung der Calciumionen an Ca^{2+}-modulierte Proteine. Die Bindung des Calciums bewirkt Konformationsänderungen, wodurch auch die Aktivität des Calcium-modulierten Proteins beeinflußt wird (Moncrief 1990). Intracelluläre Ca^{2+}-bindendende Proteine können in drei Gruppen unterteilt werden (Niki 1996). 1. EF-Hand Proteine: Sie besitzen 1-4 der namensgebenden EF-Hand-Domänen, die für die Calciumbindung verantwortlich sind. Proteine dieser Gruppe bewirken Ca^{2+}-abhängige Reaktionen vorwiegend im Kern oder im Cytoplasma der Zelle. 2. Ca^{2+}/phospholipidbindende Proteine: sie halten sich vorwiegend im Cytoplasma auf und heften sich als Reaktion auf eine erhöhte cytoplasmatische Calciumkonzentration an die Plasmamembranen an und wirken in der Nähe der Membran. 3. Ca^{2+}-speichernde Proteine: sie befinden sich im sarco- bzw. endoplasmatischen Reticulum und sind für die hohe Ca^{2+}-Kapazität der calciumspeichernden Kompartimente verantwortlich. Die intrazelluläre Lokalisation der verschiedenen Ca^{2+}-bindenden Proteine wird in Abbildung 1 veranschaulicht.

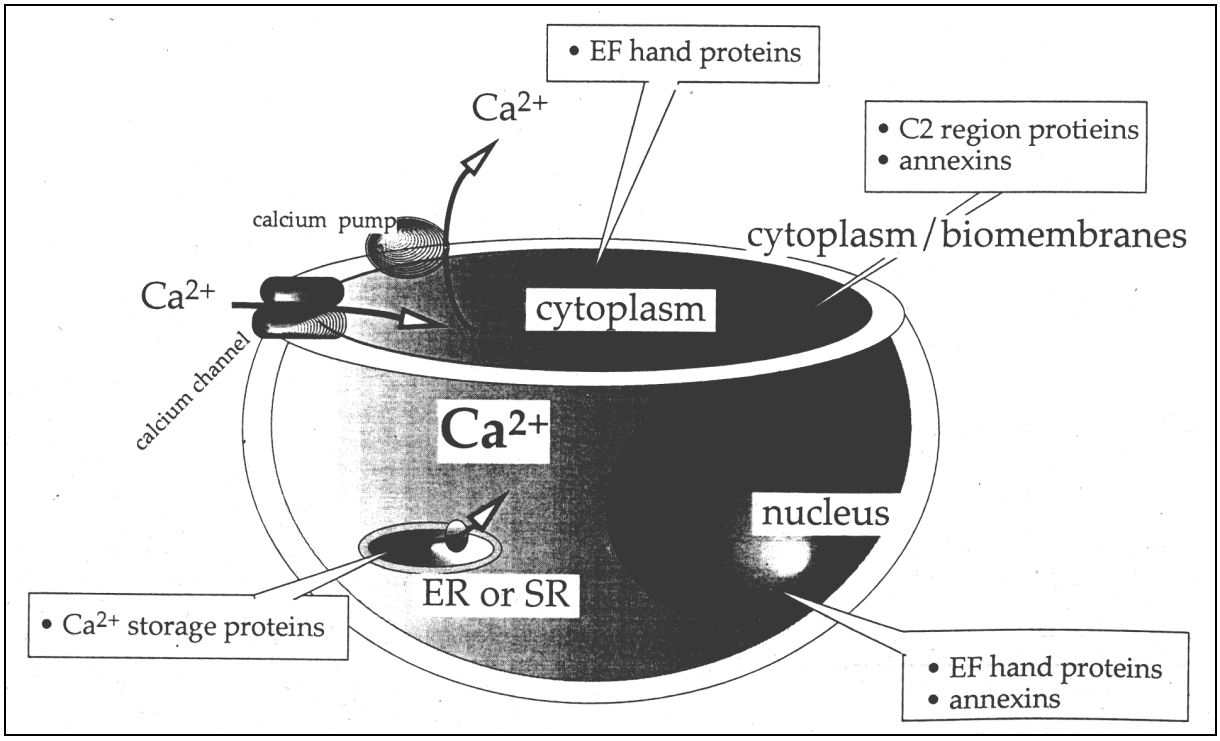


Abb. 1: Schematische Darstellung der Verteilung intracellulärer Ca^{2+}-bindender Proteine (aus Niki 1996)

Den bekanntesten Vertreter der Calcium-modulierten Proteine stellt das Calmodulin dar. Es wurde ursprünglich in tierischen Zellen entdeckt, ist aber vermutlich in allen eukaryotischen

Zellen vorhanden (Klee & Vanaman 1982, Klee 1988). Es ist ein hitzestabiles globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von 15-22 kDa und gehört zur Gruppe der EF-Hand Proteine. Calmodulin selber besitzt keine enzymatische Aktivität; Bindung von Ca^{2+} verändert die Konformation des Calmodulins, wodurch die Bindung des Ca^{2+}-Calmodulin-Komplexes an ein Zielprotein ermöglicht wird. Diese Bindung wiederum verursacht Konformations- und Aktivitätsänderungen des Zielproteins. Auf diese Weise können Enzyme direkt von Calmodulin aktiviert oder inaktiviert werden (LaPorte et al. 1980). Das vom Calmodulin regulierte Protein muß nicht Endpunkt der Signaltransduktionskette sein. Handelt es sich beispielsweise um eine Proteinkinase, so kann diese wiederum nach Aktivierung durch den Ca^{2+}-Calmodulin-Komplex andere Proteine durch Phosphorylierung aktivieren. Ein weiteres Ziel einer Signaltransduktionskette, an der Calciumionen oder andere *second messenger* wie beispielsweise cAMP beteiligt sein können, ist die Förderung der Transkription bestimmter Gene. Hierfür werden zum Ende der Signaltransduktionskette Transkriptionsfaktoren aktiviert, die daraufhin spezifisch die Transkription der Zielgene bewirken (Karin & Smeal 1992).

Grundvoraussetzung für die Wirkung des Calciums als *second messenger* ist die Aufrechterhaltung einer sehr niedrigen Konzentration an freien Calciumionen. In eukaryotischen Zellen ist der primäre Export von Calciumionen über P-ATPasen der grundlegende Mechanismus (Carafoli 1987). Vertreter der P-Typ ATPasen nutzen die chemische Energie, die in der Anhydridbindung des ATP gespeichert ist, für den transmembranen Transport von ein- und zweiwertigen Kationen (Pedersen und Carafoli 1987). Charakteristisch für P-Typ ATPasen ist die Ausbildung eines kovalenten β-Aspartylphosphat-Intermediates während der katalysierten Transportreaktion (Serrano 1988). Diese kann spezifisch durch mikromolare Konzentrationen von ortho-Vanadat gehemmt werden (Macara 1980). Eukaryotische Calcium-ATPasen werden in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation in Plasmamembran Ca^{2+}-ATPasen (PMCA) oder Ca^{2+}-ATPasen des Sarco- bzw. Endoplasmatischen Reticulums (SERCA) aufgeteilt. In Abbildung 2 ist beispielhaft für die Gruppe der SER-Ca^{2+}-ATPasen die abgeleitete Sekundärstruktur der Calcium-ATPase des Endoplasmatischen Reticulums aus Kaninchenmuskeln dargestellt.

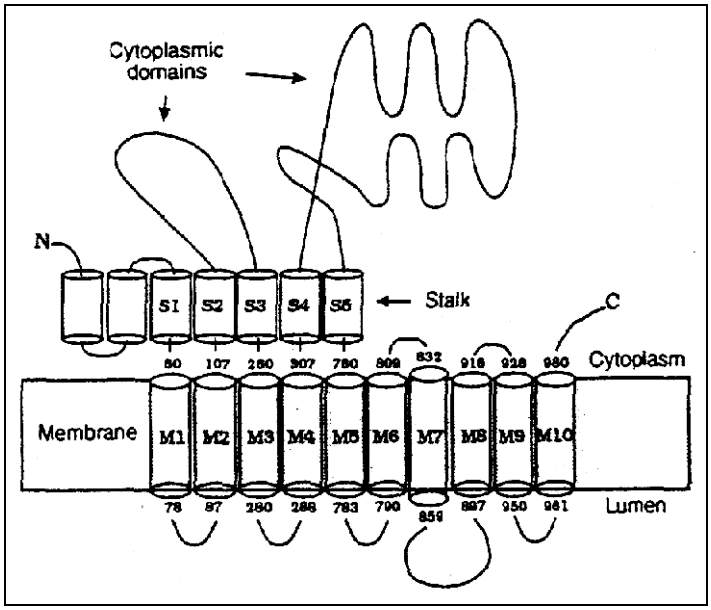


Abb. 2: Abgeleitete Sekundärstruktur der Ser Ca^{2+}-ATPase

Die Abbildung zeigt die aus der Aminosäuresequenz abgeleitete Sekundärstruktur mit 10 transmembranen Helices (M1 - M10) und 5 stalk Helices (S1 - S5) (nach Brandl et al. 1986). Die Nummern über und unter der Membran geben die Positionen an beiden Enden der transmembranen Helices für die Ca^{2+}-ATPase des Endoplasmatischen Reticulums aus Kaninchenmuskeln an (aus Toyoshima et al. 1993).

Die Plasmamembran Calcium-ATPasen und die Ca^{2+}-ATPasen des Sarco- bzw. Endoplasmatischen Reticulums unterscheiden sich nicht nur in der Lokalisation sondern auch in der Regulation (Abbildung 3). Die PMCA besitz am C-Terminus eine autoinhibitorische Domäne, die mit dem aktiven Zentrum der ATPase interagiert und diese hemmt (James et al. 1995). Die Bindung von Calmodulin, calciumabhängige kontrollierte Proteolyse durch Calpain oder Phosphorylierung durch Proteinkinase A oder C führen zu Konformations-änderungen, die das aktive Zentrum freilegen und somit die ATPase aktivieren. Die Rolle der autoinhibitorischen Domäne wird in der SERCA durch ein gesondertes Protein, dem Phospholamban, übernommen. Im dephosphorylierten Zustand bindet Phospholamban an die ATPase und unterdrückt ihre Aktivität. Wird Phospholamban durch Proteinkinase A oder einer Ca^{2+}/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase phosphoryliert, so wird in Analogie zur Phosphorylierung der inhibitorischen Domäne der PMCA das aktive Zentrum der ATPase freigelegt, was zur Aktivierung des Enzyms führt.

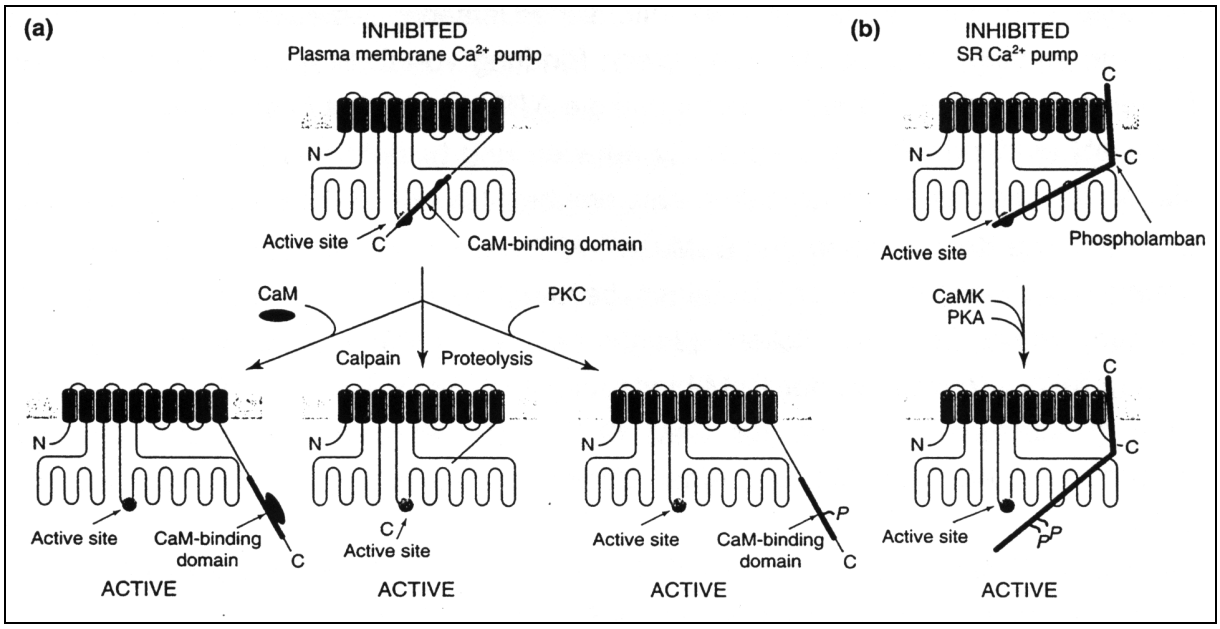


Abb. 3: Analoge Regulation der Plasmamembran und SER Ca^{2+}-ATPasen

Die SERCA wird durch eine externe inhibitorische Domäne, das membrangebundene Phospholamban, in der Nähe des aktiven Zentrums inhibiert (b). Phosphorylierung durch Proteinkinasen führt zu einer Dissoziation des Phospholambans und Aktivierung der Pumpe. Die Phosphorylierung der Calmodulin-bindenden Domäne der PMCA (a) führt ebenfalls zu einer Dissoziation der C-terminal lokalisierten autoinhibitorischen Domäne. Calmodulin und Proteolyse durch Calpain führen ebenfalls zur Aktivierung (aus James et al. 1995).

2 Calcium in Prokaryoten

Im Gegensatz zu der beschriebenen Wirkung von Calcium als *second messenger* in Eukaryoten ist die Beteiligung von Calcium an regulatorischen Prozessen in Prokaryoten noch nicht eindeutig geklärt (Onek und Smith 1992). Jedoch nehmen die Berichte über calciumabhängige Regulation und die Entdeckung der hierfür erforderlichen Proteine auch in Prokaryoten in den letzten Jahren deutlich zu (Norris et al. 1996, Herbaud et al. 1998). So konnte beispielsweise in verschiedenen Bakterien die Beteiligung von Calcium an Bewegungsvorgängen beobachtet werden. In *Escherichia coli* führt ein veränderter Calciumgehalt der Zellen zu Störungen des chemotaktischen Verhaltens (Tisa und Adler 1995). Ebenso wird die Phototaxis von *Halobacterium halobium* von Calcium beeinflußt (Schimz und Hildebrand 1986). Sowohl für die gleitende Bewegung auf festem Untergrund als auch für das freie Schwimmen von Cyanobakterien konnte ein Einfluß von Calcium ermittelt werden. Für die Gleitbewegung von *Phormidium unicatum* ist ein extrazelluläres Ca^{2+}-bindendes Glycoprotein, das Oscillin, essentiel (Hoiczyk und Baumeister 1997). Das

Schwimmen von *Synechococcus* WH8113 erfordert Calcium (Pitta et al 1997). Aber auch bewegungsunabhängige Vorgänge wie die Bildung von Heterocysten (Haselkorn 1978) oder die Stickstoff-Fixierung in Cyanobakterien (Chen et al. 1988) werden von Calcium beeinflußt. Neben diesen beobachteten Effekten von Calcium auf Bakterien liefert die ansteigende Zahl an sequenzierten bakteriellen Genomen immer mehr Informationen über die Verbreitung von Genen, die an calciumabhängigen Regulationsprozessen in Prokaryoten beteiligt sein könnten. Der experimentelle Beweis für die aus den Sequenzen abgeleiteten Funktionen steht in den meisten Fällen allerdings noch aus.

Die cytoplasmatische Calciumkonzentration in Prokaryoten muß ähnlich wie in Eukaryoten schon aufgrund der geringen Löslichkeit von Calciumphosphat auf einen sehr niedrigen Wert eingestellt werden (Kretsinger 1979). Für den prokaryotischen Modellorganismus *Escherichia coli* wurde ein Wert an freien Ca^{2+}-Ionen im Cytoplasma von 90 nM mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 (Gangola und Rosen 1987) und ein vergleichbarer Wert von 100 nM unter Verwendung des lumineszierenden Proteins Aequorin (Watkins et al. 1995) ermittelt. Die Konzentration an freien Calciumionen in *Escherichia coli* liegt somit im Bereich von eukaryotischen Zellen. Das Aufrechterhalten des Calciumgradienten gegenüber dem umgebenden Medium scheint in Prokaryoten überwiegend durch sekundäre Antiporter wie Ca^{2+}/H^{+} Austauscher (Ivey et al. 1993) und $Ca^{2+}HPO_4^{-}/H^{+}$ Austauscher (Ambudkar et al. 1984) zu erfolgen (Rosen 1987). In letzter Zeit wurden aber auch in prokaryotischen Organismen Calcium-Pumpen gefunden, die große Übereinstimmungen mit eukaryotischen P-Typ-Calcium-ATPasen aufweisen. Hierzu gehören Ca^{2+}-ATPasen aus *Flavobakterium odoratum* (Peiffer et al. 1996), *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942 (Berkelman et al. 1994, Kanamaru et al. 1993) und *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Geisler et al. 1993, 1998). Das Vorhandensein von Calcium-ATPasen in prokaryotischen Organismen lassen im Gegensatz zu früheren Vorstellungen darauf schließen, daß sich calciumtransportierende P-ATPasen bereits im prokaryotischen Stadium entwickelt haben. Die phylogenetischen Beziehungen der Mitglieder der P-ATPasen wurden von Mϕller (1996) wie in Abbildung 4 dargestellt zusammengefaßt.

Demnach erfolgte bereits in prokaryontischen Organismen eine Aufteilung in Typ I und Typ II P-ATPase. Typ I P-ATPasen transportieren Schwermetallionen wie Cu^{+}, Cd^{2+} und Ag^{+} und sind charakterisiert durch eine Schwermetallbindestelle im N-Terminus des Proteins. Typ II P-ATPasen katalysieren den Transport von Kationen mit geringerem Atomgewicht wie H^{+}, Na^{+}, K^{+}, Mg^{2+} und Ca^{2+}. Diese teilten sich wiederum in zwei Unterklassen mit dem Typ IIA

(Na^+,K^+-ATPase, H^+,K^+-ATPase, SERCA ATPase und andere Ca^{2+} transportierende ATPasen) und Typ IIB (Plasmamembran Ca^{2+}-ATPase und H^+-ATPase).

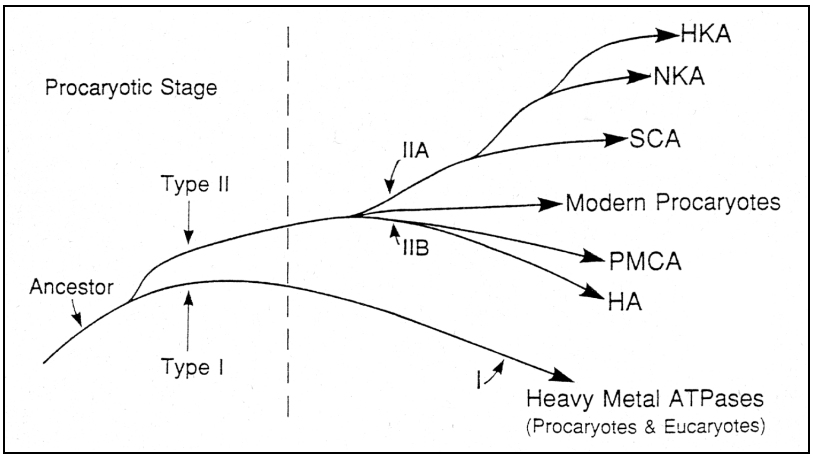


Abb. 4: Phylogenetische Darstellung der P-Typ ATPasen

HKA: H^+, K^+-ATPase, NKA: Na^+ , K^+-ATPase, SCA: Ca^{2+}-ATPase des Sarco- Endoplasmatischen Retikulums, PMCA: Plasmamembran Ca^{2+}-ATPasen, HA: Protonen ATPasen (aus MØller et al. 1996).

Prokaryotische Organismen besitzen durch calciumexportierende Austauscher und zum Teil auch durch Calcium-Pumpen die Möglichkeit, die cytoplasmatische Calciumkonzentration auf einen niedrigen Wert einzustellen. Wird die extrazelluläre Calciumkonzentration plötzlich erhöht, so steigt in *Escherichia coli* (Knight et al. 1991) und *Bacillus subtilis* (Herbaud et al. 1998) die Konzentration an freien Calciumionen im Cytoplasma schlagartig auf das bis zu 200-fache an. Innerhalb von rund 40 Sekunden sinkt die Konzentration wieder deutlich ab und nähert sich im Laufe von Minuten wieder dem Ausgangswert.

Für eine Wirkung des Calciums als Signalmolekül in Bakterien müssen zusätzlich zu den calciumexportierenden Proteinen auch Systeme vorhanden sein, die einen kontrollierten Ca^{2+}-Influx ermöglichen. An *right-side-out* Vesikeln von *Bacillus subtilis* konnte eine proteinvermittelte Aufnahme von Calcium gemessen werden, die der von eukaryotischen spannungsabhängigen Kanälen ähnelt. (Matsushita 1989). Die entsprechende Gensequenz konnte bislang noch nicht ermittelt werden. Ein vollkommen andersartiger Aufbau eines Calciumkanals wurde von Reusch et al. (1995) beschrieben. Dieser Kanal in der Plasmamembran von *Escherichia coli* besteht nicht aus Proteinen sondern aus einem Poly-3-Hydroxybutyrat/Polyphosphat-Komplex. Er besitzt viele Eigenschaften von Protein-Calcium-Kanälen wie spannungsabhängige Aktivierung, Selektivität für zweiwertige Kationen gegenüber einwertigen Kationen, Durchlässigkeit für Ca^{2+}, Sr^{2+} und Ba^{2+} und Hemmung

durch La^{3+}, Co^{2+}, Cd^{2+} Mg^{2+}. Welches der beiden beschriebenen Ca^{2+}-Influxsysteme in Bakterien vorwiegend genutzt wird oder ob beide Systeme parallel arbeiten ist noch unklar.

Für eine Weiterleitung des durch einströmendes Calcium entstandenen Ca^{2+}-Signals innerhalb der Zelle müssen Ca^{2+}-bindende Proteine vorhanden sein. Die Existenz von Calmodulin-ähnlichen Proteinen in Bakterien, die nach Calciumbindung andere Proteine aktivieren können, würde die Theorie einer calciumvermittelten Signalübertragung in Prokaryoten unterstützen. Tatsächlich konnten Proteine mit Calmodulin-ähnlichen Eigenschaften in den verschiedensten Bakterien wie *Halobacterium salinarium* (Rotharmel et al. 1995), *Myxococcus xanthus* (Inouye et al. 1983), *Bacillus subtilis* (Fry et al. 1991), *Saccharopolyspora erythraea* (Swan et al 1987), *Escherichia coli* (Harmon et al. 1985) und den Cyanobakterien *Oscillatoria limnetica* (Kerson et al 1984), drei Stämmen von *Anabaena* (Pettersson und Bergmann 1989, Bianchini et al. 1990) und *Nostoc* sp. PCC 6720 (Onek et al. 1994) gefunden werden. Diese Proteine wurden vorwiegend auf ihre Fähigkeit, Calcium zu binden und andere Enzyme (wie die NAD-Kinase) zu aktivieren, untersucht. Eine Analyse der Sequenzdaten dieser Proteine, falls vorhanden, ergab lediglich für das calciumbindende Protein Calerythrin aus *Saccharopolyspora erythraea* die für eukaryotisches Calmodulin charakteristischen EF-Hand-Ca^{2+}-Bindedomänen. Auch die systematische Suche nach EF-Hand Domänen in den genomischen Datenbanken von *Bacillus subtilis* (Kunst et al. 1997) und *Escherichia coli* lieferte kein weiteres bakterielles EF-Hand Protein (Herbaud et al. 1998, Holland et al. 1999). Beide Organismen besitzen aber mehrere Proteine, die Ca^{2+} binden können. In *Bacillus subtilis* wurden vier dieser Proteine ansequenziert und der entsprechenden DNA-Sequenz zugeordnet. Es handelt sich hierbei um Flagellin, Alkyl Hydroperoxid Reduktase C (`Aphc`), ribosomales Protein B-L9 und ein Kälteschockprotein (`CspB`). Über eine mögliche regulative Funktion dieser calciumbindenden Proteine wird spekuliert (Herbaud et al. 1998). Ein interessantes Ergebnis in Bezug auf potentielle Zielproteine der Ca^{2+}-bindenden Proteine lieferte das Calmodulin-ähnliche Protein aus *Anabaena* sp. strain ATCC 29151. Extrakte des Ca^{2+}-bindenden Proteins aktivieren sowohl die cAMP Phosphodiesterase aus Rinderhirn als auch die eigene (*Anabaena*) Adenylatcyclase (Bianchini et al. 1990). Dieses eröffnet die Möglichkeit, daß ähnlich den Eukaryoten auch in Bakterien die beiden *second messenger* Ca^{2+} und cAMP interagieren.

3 Calcium in *Synechocystis* PCC 6803

Synechocystis PCC 6803 ist ein einzelliger phototropher Prokaryot, der zur Gruppe der Cyanobakterien gehört. Vertreter dieser Gruppe besitzen drei Membransysteme: die äußere Membran, die Plasmamembran und Thylakoidmembranen. Die Anordnung der drei verschiedenen Membranen wird in Abbildung 5 dargestellt.

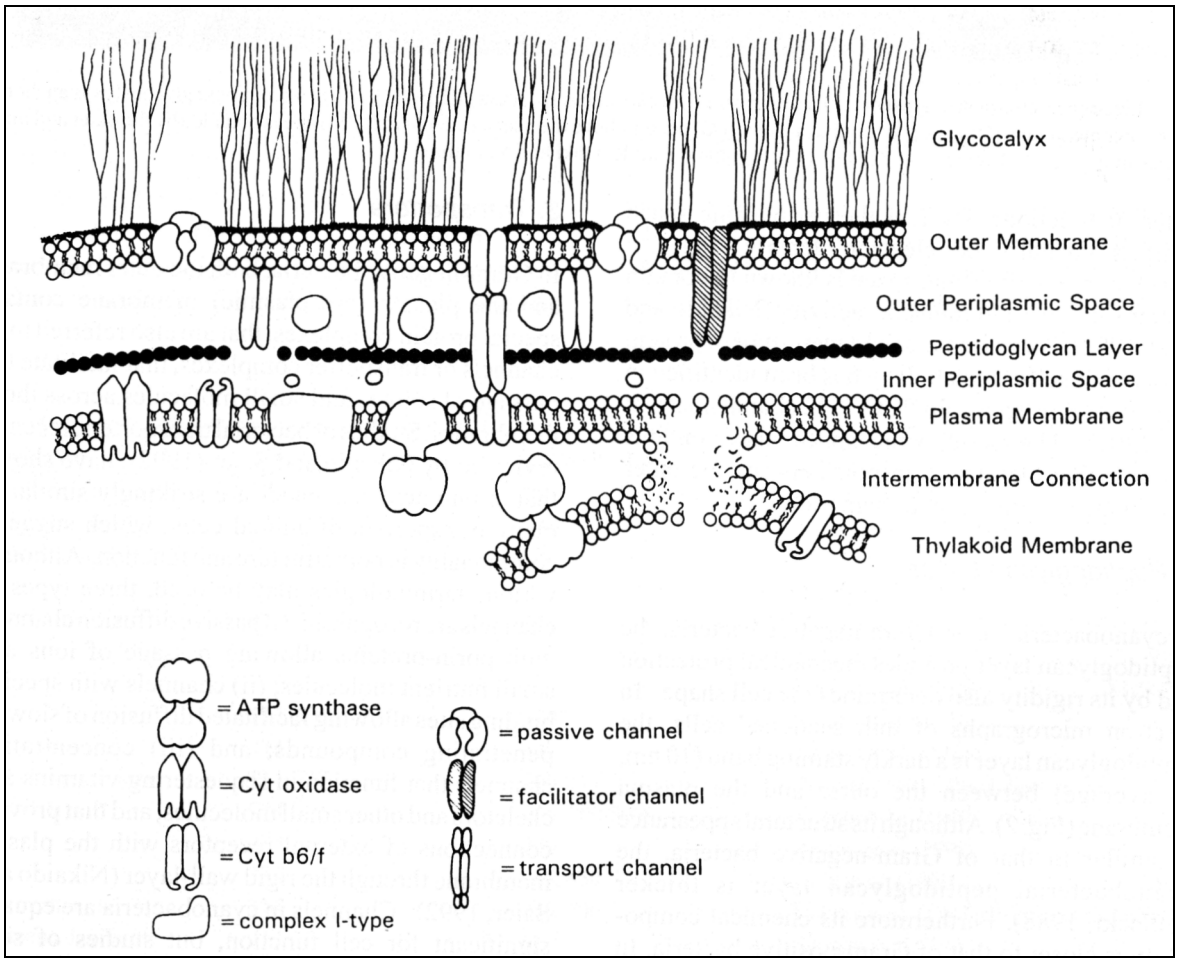


Abb. 5: Modell der Membransysteme einer cynabakteriellen Zelle
(aus Gantt 1994)

Cyanobakterien zeichnen sich wie die Chloroplasten der Pflanzen durch zwei in Reihe geschaltete Photosysteme aus. Phylogenetische Studien haben gezeigt, daß sich die Chloroplasten der Pflanzen durch Endosymbiose von phototrophen Prokaryoten entwickelt haben (Margulis 1981). Aufgrund seiner leichten Transformierbarkeit dient *Synechocystis* als Modellorganismus für Untersuchungen zur pflanzlichen Photosynthese. Seit der kompletten Sequenzierung des Genoms von *Synechocystis* PCC 6803 im Jahr 1996 (Kaneko et al. 1996)

und der daraus resultierenden Zugänglichkeit aller Sequenzinformationen (Cyanobase) werden an *Synechocystis* aber auch zunehmend Untersuchungen auf anderen Gebieten wie der Aufklärung von regulatorischen Prozessen in Prokaryoten durchgeführt. Von den 3168 potentiell codierende Regionen der 3573 kb großen Nukleotidsequenz besitzen mindestens 80 ORFs hohe Homologie zu Proteinen des Zwei-Komponenten-Systems der Signaltransduktion (Mizuno et.al 1996). Es konnten aber auch typisch eukaryotischen Signalproteinen gefunden werden; so besitzt *Synechocystis* 6803 jeweils sieben ORFs mit Homologien zu Serin/Threonin Kinasen bzw. Serin/Threonin- und Tyrosin-Phosphatasen (Zhang et al. 1998).
Im Genom von *Synechocystis* befinden sich 9 Gene für P-Typ-ATPasen, die hohe Homologien zu P-ATPasen aus Pro- und Eukaryoten besitzen. Von den 9 P-Typ-ATPasen wurde eine (`Slr1729`) dem Typ I A mit einer Spezifität für K^+ und vier dem Typ IB mit einer Ionenspezifität für Cd^{2+} (`Slr0797` und `Slr0798`) bzw. Cu^{2+} (`Sll1920` und `Slr1950`) zugeordnet (Axelsen und Palmgren 1998). Es überrascht, daß die restlichen vier P-ATPasen (`Sll1614`, `Slr0822`, `Sll0672`, `Sll1076`) im phylogenetischen Stammbaum (Abbildung 6) alle in der Gruppe des Typs IIA mit einer vermuteten Spezifität für Ca^{2+} stehen (Palmgren und Axelsen 1998).

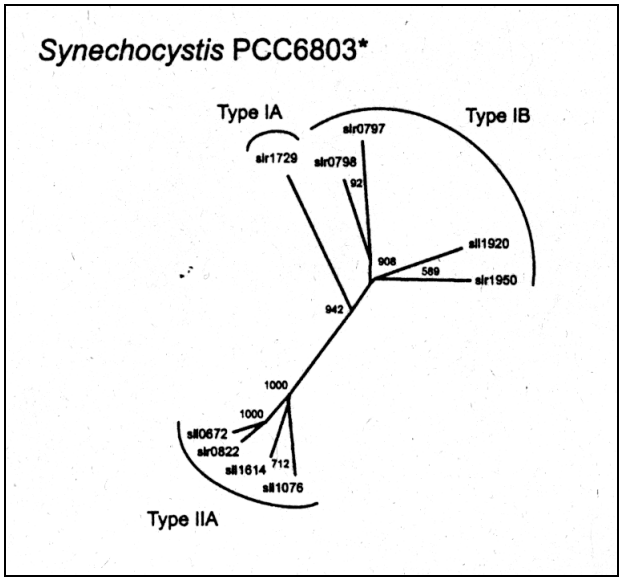


Abb. 6: Phylogenetischer Stammbaum der P-Typ ATPasen von *Synechocystis* 6803

Für den Sequenzvergleich wurden konservierte Bereiche mit insgesamt 265 Aminosäuren eingesetzt (aus Palmgren und Axelsen 1998).

Für eine der vier potentiellen Ca^{2+}-ATPasen (`Sll1614`) konnten bereits experimentelle Hinweise auf die vermutete Ca^{2+}-Spezifität des Enzyms ermittelt werden (Geisler et al. 1998). Zur biochemischen Charakterisierung der Ca^{2+}-ATPase `Sll1614` wurde sie in einem

heterologen Expressionssystem in *Escherichia coli* überexprimiert. Das auf diese Weise gewonnene Protein wurde zur Herstellung von Antiseren und für physiologische Messungen eingesetzt. Das isolierte Enzym konnte durch den typischen Hemmstoff der Familie der P-Typ ATPasen, dem Vanadat, sowie durch Inhibitoren der SERCAs gehemmt werden. Für die Bildung des phosphorylierten Enzymintermediates konnte eine Calciumabhängigkeit beobachtet werden. Die eindeutige Lokalisation der Ca^{2+}-ATPase in der Cytoplasmamembran gelang durch immunologischen Nachweis des Proteins in isolierten Cytoplasmamembranen einer *Synechocystis* –Mutante (*Synechocystis* 6803MRP), in der die Ca^{2+}-ATPase `Sll1614` überexpremiert wird (Schnorr 1996). Zu den drei übrigen potentiellen Ca^{2+}-ATPasen liegen noch keine experimentellen Daten vor.

Neben den vier P-ATPasen ist im Genom noch ein weiteres Gen für den vermutlichen Export von Calciumionen vorhanden. ORF `slr1336` weist die höchste Homologie zu einem H^+/Ca^{2+}-Austauscher aus *Saccharomyces cerevisiae* auf (Cyanobase). Somit besitzt *Synechocystis* PCC 6803 sowohl Systeme zum primären Export von Ca^{2+} über P-ATPasen, wie er in eukaryotischen Zellen vorwiegend genutzt wird, als auch für den in Prokaryoten grundlegenden Mechanismus des sekundären Exportes über einen gradientengetriebenen Austauscher.

Über die Wirkung von Calcium in *Synechocystis* 6803 ist sehr wenig bekannt. Untersuchungen zur Photosynthese haben gezeigt, daß Ca^{2+}-Ionen an das D1 Protein des Photosystem II binden und die Photoaktivierung und H_2O-Oxidation beeinflussen (Qian et al. 1999). Weitere calciumbindenden Proteine aus *Synechocystis* 6803 sind noch nicht beschrieben worden. Das Vorhandensein von vier potentiellen Ca^{2+}-ATPasen und eines Ca^{2+}-Austauschers lassen aber vermuten, daß eine feine Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration in *Synechocystis* sehr wichtig ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die physiologische Bedeutung der vier potentiellen Ca^{2+}-ATPasen aus *Synechocystis* 6803 ermittelt werden. Die bekannten Funktionen anderer P-Typ-Ca^{2+}-ATPasen lassen vermuten, daß sie für den Export von Calciumionen aus dem Cytoplasma verantwortlich sind und somit die intrazelluläre Calciumkonzentration regulieren. Ob der Export der Calciumionen lediglich verhindern soll, daß bei zu hohen Calciumkonzentrationen im umgebenden Medium die intrazelluläre Konzentration zu weit ansteigt und es zum Ausfallen von Calciumphospat kommen könnte, oder ob Calcium eine regulatorische Funktion in *Synechocystis* besitzt, ist noch vollkommen unklar. Eine Rolle des Calciums als *second messenger* würde eine Feinregulation der cytoplasmatischen Calciumkonzentration durch die Ca^{2+}-ATPasen erfordern.

II Material und Methoden

1 Biologisches Material und Anzucht:

1.1 *Escherichia coli*

1.1.1 Genotyp des verwendeten *E.coli*-Stammes

XL1 Blue: rec A^- (recA1, lac^-, endA1, gyrA96, thi; hsdR17, supE44, relA1, {F' proAB, $lacI^q$, lacZ ΔM15, Tn10}) (Bullock et al. 1987)

1.1.2 Anzucht von *Escherichia coli* Bakterien

Flüssigkulturen wurden in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 50 µg/ml, Streptomycin 25 µg/µl oder Kanamycin 25µg/ml) bei 37°C über Nacht auf einem Rundschüttler mit 180 - 200 rpm angezogen. Zur Herstellung von Agar-Platten wurde dem LB-Medium 1,5% Agar-Agar zugesetzt. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50°C wurde das Medium mit dem Antibiotikum versetzt und in Petrischalen gegossen. Mit Bakterien beimpfte Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert.

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

Ampicillin-Lösung: 50 mg/ml Ampicillin in H_2O pH 7,5 - 8,0
Chloramphenicol-Lösung: 25 mg/ml Chloramphenicol in Ethanol
Spectinomycin-Lösung: 10 mg/ml Spectinomycin in H_2O
Kanamycin-Lösung: 50 mg/ml Kanamycin in H_2O

1.2 *Synechocystis* sp PCC6803

1.2.1 Nicht-motiler Stamm von *Synechocystis* sp. PCC 6803

Dieser Stamm wurde freundlicherweise von Dr. K. Steinmüller überlassen; er stammt aus dem Labor von Prof. Bogorad. Hierbei handelt es sich um einen Stamm, der aus dem Originalstamm von *Synechocystis* sp. PCC 6803 isoliert worden ist und wegen seiner hohen Glucosetoleranz häufig für Photosyntheseuntersuchungen eingesetzt wurde (Williams 1988). Dieser Stamm ist im Gegensatz zum Wildtyp, der vom Pasteur Institut konserviert und verschickt wird, nicht beweglich. Leider werden beide Stämme in der Literatur als *Synechocystis* sp. PCC 6803 bezeichnet, so daß unklar ist, welcher Stamm untersucht wurde. Der nicht-motile Stamm wird im Folgenden auch als *Synechocystis* 6803nm (für nicht-motil) bezeichnet.

1.2.2 Mutanten von *Synechocystis* 6803nm

1.2.2.1 Überexpressionsmutante *Synechocystis* 6803nmMRP

Für die Überexpression der Ca^{2+}-ATPase `Sll1614` wurde ein 185 bp Fragment des `psbA`-Promotors aus Spinatplastiden (Zurawski et al. 1982) vor den ORF `sll1614` ins Genom inseriert, was eine Steigerung des Transkritgehaltes von `sll1614` zur Folge hatte (Jakobs 1996). Zudem wurde die thermodynamische Stabilität eines möglicherweise translationshemmenden *stem loops* in der 5‘-UTR der sll1614 mRNA durch den Austausch einer Base herabgesetzt, wodurch die Translation erleichtert werden sollte (Richter & Schumann, unveröffentlicht).

1.2.2.2 Deletionsmutanten von *Synechocystis* 6803nm

Es wurden Mutanten hergestellt, bei denen die Gene für vermutliche Calcium-ATPasen (`sll1614`, `slr0822`, `sll0672` und `sll1076`), und eines Calcium-Austauschers (`slr1336`) gezielt ausgeschaltet wurden. Dies wurde durch Transformation mit einem Plasmid, auf dem ein Teil des codierenden Bereiches des jeweiligen Gens durch eine

Antibiotika-resistenzkassette ersetzt wurde, erreicht. Nach Linearisierung und Aufnahme des Plasmids kommt es zur homologen Rekombination mit den passenden Sequenzen im Genom von Synechocystis 6803. Es wurden Ein- bis Vierfachmutanten hergestellt. Für die Bezeichnung der Mutanten wurde jeweils die Nummer des ausgeschalteten Leserasters verwendet: z.B. ORF `sll1614` ausgeschaltet ⇒ Bezeichnung der Mutante: `1614`. Bei Mehrfachmutanten werden die Nummern aller ausgeschalteten ORFs angegeben. Für die Transformationen wurde zunächst der nicht-motile Stamm von *Synechocystis* PCC 6803 eingesetzt, später auch der Wildtypstamm *Synechocystis* PCC 6803, der vom Pasteur-Institut bezogen wurde.

Einfach-mutanten	**Doppel-mutanten**	**Dreifach-mutanten**	**Vierfach-Mutanten**
1614nm	1614/0822nm	1614/0822/0672nm	1614/0822/0672/1076nm
0822nm	1614/0672nm	1614/0822/1076nm	1614/0822/0672/1336nm
0672nm	1614/1076nm	1614/0822/1336nm	1614/0822/1076/1336nm
1076nm	1614/1336nm	1614/0672/1076nm	1614/0672/1076/1336nm
1336nm	0822/0672nm	0822/0672/1076nm	0822/0672/1076/1336nm
	0822/1076nm		
	0672/1076nm		

1.2.3 Originalstamm von *Synechocystis* sp. PCC 6803

Dieser Stamm wurde vom Pasteur-Institut bezogen (Rippka et al. 1979). Auf der Platte wächst dieser Stamm in diffusen, nicht scharf begrenzten Kolonien.

1.2.4 Deletionsmutanten von *Synechocystis* PCC 6803

Einfach-mutanten	Doppel-mutanten	Dreifach-mutanten	Vierfach-Mutanten
1614	1614/0822	1614/0822/0672	1614/0822/0672/1076
0822	1614/0672	1614/0822/1076	
0672	1614/1076	1614/0672/1076	
1076	0822/0672	0822/0672/1076	
1336	0822/1076		
	0672/1076		

1.2.5 Flüssigkultur von *Synechocystis* 6803

Die Anzucht von *Synechocystis* erfolgte in Erlenmeyerkolben (250 ml), die mit 100 ml Medium gefüllt und mit einem Zellstoffstopfen verschlossen waren. In einem klimatisierten Raum wurde die Temperatur auf 26°C eingestellt. Die Kulturen wurden unter Dauerlicht angezogen. Um eine gute Durchmischung zu gewährleisten, wurden die Kulturen auf einem Rundschüttler inkubiert. Als Kulturmedium wurde das BG11 Medium verwendet.

Standardbedingungen:

Temperatur: 26°C, Licht: 30 µmol Photonen/(m^2·s) Dauerlicht,Schüttlergeschwindigkeit: 150 rpm, Kulturmedium: BG11

BG11 Medium (Castenholz 1988):

17,6 mM $NaNO_3$
29 µM Citronensäure
0,18 mM K_2HPO_4
0,3 mM $MgSO_4$
0,19 mM Na_2CO_3
30 µM FeIII NH_4-Citrat
245 µM $CaCl_2$
3 µM EDTA

Spurenelemente

46,3 µM H_3BO_3
9,15 µM $MnCl_2$
772 nM $ZnSO_4$
1,6 µM Na_2MoO_4
316 nM $CuSO_4$
170 nM $Co(NO_3)_2$

1.2.6 Anzucht von *Synechocystis* 6803 auf Agarplatten:

Für die Anzucht von *Synechocystis* 6803 auf Agarplatten wurde BG11-Medium vor dem Autoklavieren mit 1,2% Agar und 5mM Natriumthiosulfat versetzt. Das auf ca. 50°C abgekühlte Medium wurde bei Bedarf mit der entsprechenden Menge Antibiotikum versetzt und zu je 50 ml in Petrischalen gegossen. Nach Animpfen der Agarplatten wurden die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und unter Standardbedingungen, jedoch ohne Schütteln, inkubiert.

2 Methoden

2.1 Allgemeine molekularbiologische Arbeitsweisen

Zum Ansetzen und Verdünnen von Lösungen wurde ausschließlich bidestilliertes Wasser verwendet, welches im Folgenden als H_2O bezeichnet wird. Alle für molekularbiologische Techniken eingesetzten Lösungen, Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden durch Autoklavieren für 25 Minuten bei 121°C und 100 kPa sterilisiert. Animpfen und Ausplattieren von Bakterien fand stets an einer sterilen Werkbank statt.

2.2 Isolierung genomischer DNA aus *Synechocystis*

10^8 bis 10^9 Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 7500g, 4°C), in 350 µl TE-Pufer resuspendiert und mit 350 µl 2 x Extraktionspuffer versetzt. Es wurde 600 µl Phenol (H_2O gesättigt) hinzugegeben und 15 min bei 65°C in einem Thermomixer unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 600 µl Chloroform zugeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Die Proben wurden 10 min bei 14000g und 4°C zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde mit 1 ml Chloroform ausgeschüttelt und erneut zentrifugiert. Die Nukleinsäuren der wäßrige Phase wurde mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetatlösung und 2,5 Volumen Ethanol über Nacht bei –20°C gefällt. Die präzipitierten Nukleinsäuren wurden durch eine 15 minütige Zentrifugation bei 14000g und 4°C pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert. Zum Entfernen der RNA wurde ein Verdau mit DNase-freier RNase durchgeführt. Hierzu wurde der Ansatz mit 10U RNase versetzt und 2 h bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde erneut eine Phenol-Chloroform-

Extraktion sowie eine Ethanolfällung durchgeführt. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

TE-Puffer:	2 x Extraktionspuffer:
10 mM Tris/HCl pH 8	100 mM Tris/HCl pH 8,6
1 mM EDTA	20 mM EDTA
	20 mM EGTA
	2 % SDS
	1 % β-Mercaptoethanol

2.3 Spektralphotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Mit Hilfe des Spektralphotometers war eine genaue Konzentrationsbestimmung reiner Nukleinsäurelösungen möglich. Die Absorption eines Aliquots der Nukleinsäurelösung wurde bei 260 nm und 280 nm gemessen. Lag der Quotient aus A_{260}/A_{280} zwischen 1,8 und 2,0, so war die Lösung frei von Proteinen und Phenol, und die Konzentration konnte nach folgenden Formeln berechnet werden:

Für DNA-Lösungen: $[DNA] = A_{260} \cdot 50\ \mu g/ml$

Für RNA-Lösungen: $[RNA] = A_{260} \cdot 40\ \mu g/ml$

2.4 PCR mit genomischer DNA

Für die Amplifikation von Bereichen genomischer DNA aus *Synechocystis* wurden 0,5 µg genomische DNA mit 5 µl Reaktionspuffer, 1 µl Deoxynukleotidgemisch mit dATP, dCTP, dGTP, dTTP (final je 1 mM), je 25 pmol Primer, 2,5 U Taq DNA-Polymerase versetzt und mit H_2O ad 50 µl aufgefüllt. Die Amplifikation erfolgte mit folgenden Zyklen:

Zyklus 1	Zyklus 2 - 30	Zyklus 31
5 Minuten 93°C	1 Minute 93°C	1 Minute 93°C
1,5 Minuten 55°C	1,5 Minuten 55°C	1,5 Minuten 55°C
2,5 Minuten 72°C	2,5 Minuten 72°C	10 Minuten 72°C

2.5 Klonierung

2.5.1 Enzymatische Restriktion von DNA

Alle Restriktionen wurden nach den Angaben der Herstellerfirmen der Restriktionsenzyme unter Verwendung der mitgelieferten Reaktionspuffer durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 1 - 2 Stunden.

2.5.2 DNA-Elektrophorese

DNA-Fragmente wurden durch native Elektrophorese in Ethidiumbromid-haltigen Agarosegelen (Sambrook et al., 1989) aufgetrennt. 0,7 - 1,5 % Agarose, in Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden Fragmente, wurde in TBE-Puffer unter Aufkochen im Mikrowellenofen gelöst und mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die verflüssigte Agarose wurde in eine horizontale Gelapparatur gegossen und nach dem Erkalten mit TBE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit TE-Puffer auf 10 µl aufgefüllt, mit 1 µl DNA-Probenpuffer versetzt und in die Probentaschen pipettiert. Parallel wurden DNA-Standards mit bekannten Fragmentgrößen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 40 - 50 mA durchgeführt. Je nach Prozentigkeit des Gels und gewünschter Auftrennung lag die Dauer bei 1 - 4 Stunden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel im UV-Licht fotografiert (Polaroidfilm 665, Fa. Polaroid).

Ethidiumbromid-Lösung:	TBE-Puffer:	DNA-Probenpuffer:
10 mg/ml Ethidiumbromid	0.1 M Tris	50 % (v/v) Glycerin
in H_2O	0,1 M Borsäure	0,1 % (w/v) Bromphenolblau
	2,5 mM EDTA	

DNA-Molekulargewichtsmarker III (in bp):

21226 / 5148 / 4973 / 4277 / 3530 / 2027 / 1904 / 1584 / 1330 / 983 / 831 / 564 / 125

DNA-Molekulargewichtsmarker VI (in bp):

2176 / 1766 / 1230 / 1033 / 653 / 517 / 453 / 394 / 298 / 298 / 234 / 234 / 220 / 154 / 154

2.5.3 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung konnten DNA-Fragmente aus dem Gel isoliert werden. Die Elution wurde unter Verwendung des *QIAEX II Gel Extraktion Kits* (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und nach den Angaben von Quiagen bearbeitet. Die eluierte DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen.

2.5.4 Ligation

Bei einer Ligation werden 3'-Hydroxylgruppen mit 5'-Phosphatgruppen der DNA zu einer Phosphodiesterbindung verknüpft. Diese Reaktion wird unter ATP-Verbrauch von der DNA-Ligase katalysiert. Hierbei können zwei DNA-Fragmente mit passenden Enden miteinander verbunden werden. Für die Ligation wurde geleluierte Vektor- und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von ca. 1:5 mit 1 µl 10 x Ligationspuffer und 5 U T4 DNA-Ligase versetzt und mit H_2O auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 15°C.

2.5.5 Herstellung gefrierkompetenter Bakterienzellen

Um die Aufnahmebereitschaft der Bakterienzellen für Plasmid-DNA zu steigern, wurden sie einer Behandlung nach Hanahan (1983) unterzogen. 5 ml Kulturen des Stammes XL1-Blue wurden über Nacht in 2YT-Medium (10 g/l Pepton, 10 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl) angezogen. Ein Aliquot dieser Vorkultur wurde 1:20 mit 2YT-Medium verdünnt und bis Erreichen einer OD_{550} von 0,5 angezogen. Die Kultur wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert und dann 10 Minuten bei 4°C und 2000 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 1/3 des Ausgangsvolumens RFI (30 mM K-Acetat, 100 mM $RbCl_2$, 10 mM $CaCl_2$, 50 mM $MnCl_2$, 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure) resuspendiert, erneut 15 Minuten auf Eis inkubiert und wie oben abzentrifugiert. Nach Aufnahme der Bakterien in 1/12 des Ausgangsvolumens RFII (10 mM MOPS, 10 mM $RbCl_2$, 75 mM $CaCl_2$, 15 % (v/v) Glycerin, pH 6,8 mit NaOH) wurde wiederum 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.5.6 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

100 µl gefrierkompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 10 µl des Ligationsansatzes hinzupipettiert und mit der Pipettenspitze gemischt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien einem Hitzeschock von 90 Sekunden bei 42°C unterzogen. Der Transformationsansatz wurde 2 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit 800 µl LB-Medium versetzt. Während der folgenden Anzucht für 30 Minuten bei 37°C sollten die Bakterien ihre neuerworbene Antibiotikumresistenz ausbilden. Der Ansatz wurde zu 50 µl, 100 µl, 200 µl und 500 µl auf Antibiotikum-haltigen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Agarplatten, die Kolonien enthielten, wurden bei 4°C aufbewahrt.

2.5.7 Selektion rekombinanter Bakterien

Auf den Antibiotikum-haltigen LB-Platten konnten nur Bakterien wachsen, die durch Aufnahme des Vektors das entsprechende Gen der Antibiotikumresistenz erhalten hatten. Ob die Ligation jedoch wie geplant erfolgt war, konnte durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung der isolierten Plasmide überprüft werden.

2.6 Sequenzierung

2.6.1 Anlagerung und Verlängerung der Startmoleküle

Für die Sequenzierung wurde das *T7 Sequencing Kit* von Pharmacia (Freiburg) eingesetzt. Das Reaktionsprinzip beruht auf der Didesoxymethode von Sanger (1977). 3 µg DNA wurden mit H_2O auf 8 µl aufgefüllt und durch Mischen mit 2 µl 2 M NaOH für 10 Minuten bei Raumtemperatur denaturiert. Die DNA wurde mit 3 µl 3 M Na-Acetat, 7 µl H_2O und 60 µl Ethanol versetzt und 15 Minuten bei -20°C gefällt. Nach 15-minütiger Zentrifugation mit 14000 rpm bei 4°C wurde die präzipitierte DNA mit 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µl H_2O gelöst. Die denaturierte DNA wurde mit 2 µl Annealing-Puffer und 2 µl Primer-Lösung (50 pmol) versetzt und 20 Minuten bei 37°C und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Verlängerung der an die Matrize gebundenen Oligonukleotide wurde 1 µl [α-^{32}P]-dATP (3000 Ci/µmol), 2 µl verdünnte T7 DNA-Polymerase und 3 µl Labelling Mix hinzugegeben. Nach 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden je 4,5 µl in ein auf 37°C

vorgewärmtes Eppendorfgefäß mit 2,5 µl des entsprechenden Basenmixes (enthält Didesoxynukleotide) überführt und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl Stop-Puffer beendet. Alle Ansätze wurden unmittelbar vor der Auftragung auf das Gel 3 Minuten bei 85°C denaturiert.

2.6.2 Elektrophorese und Autoradiographie

Die DNA wurde in einem 4% Polyacrylamidgel mit 50% (w/v) Harnstoff aufgetrennt. Um nach erfolgter Elektrophorese ein Haften des Gels auf der kleineren Gelplatte zu gewährleisten, wurde diese mit Bind-Silan, die größere Gelplatte mit Repel-Silan (s.u.) silikonisiert. Die Sequenzgellösung wurde durch Mischen von 16 ml Sequenziergelkonzentrat, 74 ml Sequenziergelverdünner und 10 ml Pufferkonzentrat hergestellt und vor Gebrauch entgast. Alle Sequenzgellösungen stammten von der Firma Roth (Karlsruhe). Polymerisierung erfolgte nach Zugabe von 35 µl 10% Ammoniumpersulfat und 35 µl TEMED (N ,N ,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin) innerhalb einer Stunde. Das auspolymerisierte Gel wurde in die Elektrophoreseapparatur (BRL, Modell S2) eingebaut. Als Elektrophoresepuffer wurde TBE-Puffer verwendet. Nach einem halbstündigen Vorlauf wurde die Elektrophorese für 1,5 - 3 Stunden bei konstant 60 Watt durchgeführt. Das an der Bind-Platte haftende Gel wurde 30 Minuten in 10% Essigsäure fixiert, kurz gewässert und bei 80°C getrocknet. Die Expositionszeit der Röntgenfilme (Kodak X-Omat AR) betrug zwischen 15 Stunden und 5 Tagen.

<u>Bind-Silan:</u>
60 µl γ-Methacryloxypropyltrimethyloxysilan
60 µl Essigsäure
20 ml Ethanol

<u>Repel-Silan:</u>
600 µl Dimethyldichlorsilan
20 ml Chloroform

2.7 Transformation von *Synechocystis* 6803:

Wildtypkulturen oder –für Mehrfachdeletionen bereits komplett segregierte Mutanten- wurden mit einer OD_{730} von 0,02 in 100 ml Kulturen angeimpft. Bei einer OD_{730} zwischen 0,5 und 0,8 wurden $5 \cdot 10^8$ Zellen durch Zentrifugation (10 min., 6000g bei Raumtemperatur) geerntet, in 250 µl BG11 Medium resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und

mit ca. 5 µg ungeschnittener Plasmid-DNA versetzt. Die Ansätze wurden 4 Stunden bei 30°C im Licht inkubiert und anschließend auf 1,5%ige BG11 Agarplatten zu 25 µl, 50 µl, 75 µl und 100 µl ausplattiert. Nach ca. 40 Stunden wurden die BG11 Agarplatten mit dem selektierenden Antibiotikum in einem Volumen von 400 µl unterschichtet. Es wurden jeweils mehrere Konzentrationen bezogen auf das Volumen des Agarmediums pro Platte (50 ml) eingesetzt: Kanamycin: 5-20 µg/ml, Chloramphenicol: 2,5-20 µg/ml, Streptomycin: 1-2µg/ml und Erythromycin 5-20 µg/ml. Die gewachsenen Kolonien wurden auf Platten mit erhöhter Antibiotikakonzentration umgestrichen. Hiervon wurden erneut Einzelkolonien auf frische Platten umgestrichen. Die daraus resultierenden Kolonien wurden in Flüssigkultur überführt und auf die komplette Segregation der eingeführten Mutation überprüft.

2.8 Arbeiten mit RNA

Alle Lösungen wurden falls möglich über Nacht mit 0,1% DEPC bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend autoklaviert. Gefäße und Pipettenspitzen wurden ebenfalls mit 0,1% DEPC in demineralisiertem Wasser über Nacht inkubiert und anschließend autoklaviert. Gereinigte RNA-Präparationen wurden bei der Arbeit immer auf Eistemperatur gehalten.

2.8.1 Native RNA-Elektrophorese

MOPS-Puffer mit 1,2% Agarose wurde mit 0,1% DEPC versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Agarose im Mikrowellenherd verflüssigt, 1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und in die Gelapparatur gegossen. Nach dem Erkalten wurde das Gel mit MOPS-Puffer überschichtet. Die Proben (ca. 2 µg RNA) wurden mit H_2O auf 6 µl aufgefüllt und mit 1 µl 10 x MOPS-Puffer, 2 µl Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml) und 2 µl RNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 50 mA durchgeführt. Nach Erreichen der gewünschten Auftrennung wurde das Gel im UV-Licht fotografiert (Polaroidfilm 665, Fa. Polaroid).

MOPS-Puffer:	RNA-Probenpuffer:
20 mM MOPS pH 7,0	90 % deionisiertes Formamid
5 mM NaAc	10 mM EDTA
1 mM EDTA	0,01 % Bromphenolblau

2.8.2 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR stellt eine gute Methode zur Untersuchung seltener RNAs dar. Ist die Sequenz des zu untersuchenden Gens bekannt, so kann mit Hilfe eines sequenzspezifischen Primerpaars an der mRNA-Matrize der erste Strang cDNA synthetisiert und durch anschließende PCR amplifiziert werden.

RNA-Präparationen, die in eine RT-PCR eingesetzt werden, müssen vollkommen frei von DNA-Resten sein, da selbst geringe Mengen in der PCR amplifiziert werden. Deshalb wurde nach erfolgter Isolierung der RNA ein Dau mit DNAse I , RNase frei, durchgeführt. Die in TE-Puffer gelöste RNA wurde mit 30 µl 10 x Reaktionspuffer und 50 U DNase I, RNase frei, versetzt und mit H_2O auf 300 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurde 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt, mit Ethanol gefällt und in TE-Puffer gelöst.

Für die Synthese des ersten Strangs cDNA wurde das *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* von Boehringer (Mannheim) eingesetzt. 2 µg Gesamt-RNA in 5 µl Volumen wurden 10 Minuten bei 65°C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Es wurde ein „Master Mix“ für alle gleichzeitig bearbeiteten Ansätze angefertigt. Er enthielt pro Ansatz 2 µl 10 x Reaktionspuffer, 4 µl 25 mM $MgCl_2$ (final 5 mM), 2 µl Deoxynukleotidgemisch mit dATP, dCTP, dGTP, dTTP (final je 1 mM), 25 pmol 3’-Primer, 50 U RNase Inhibitor, 0,5 µl Gelatine, 20 U AMV Reverse Transkriptase und H_2O ad 15 µl. Hiervon wurden jeweils 15 µl zur frisch denaturierten RNA pipettiert, gemischt und kurz zentrifugiert. Die Ansätze wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur und 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Währenddessen wurde ein „PCR Master Mix“ für die sich anschließende Amplifikation der cDNA vorbereitet. Er beinhaltete pro Ansatz 8 µl 10 x Reaktionspuffer, 25 pmol 5’-Primer, 0 oder 2 µl 25 mM $MgCl_2$, 2,5 U Taq DNA Polymerase und H_2O ad 80 µl. Direkt nach Beendigung der cDNA Synthese wurden die Ansätze mit je 80 µl des „PCR Master Mixes“ versetzt, mit 50 µl Mineralöl überschichtet und in einem DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer & Co GmbH, Überlingen) mit folgenden Zyklen inkubiert:

Zyklus 1	Zyklus 2 - 30	Zyklus 31
5 Minuten 93°C	1 Minute 93°C	1 Minute 93°C
1,5 Minuten 55°C	1,5 Minuten 55°C	1,5 Minuten 55°C
2,5 Minuten 72°C	2,5 Minuten 72°C	10 Minuten 72°C

Die Produkte der RT-PCR wurden in einem 1,5%igen Agarosegel analysiert. Es wurden Aliquots von 10 µl eingesetzt.

2.9 Sedimentationstest:

Die Geschwindigkeit, mit der Cyanobakterien in einer Flüssigkultur ohne Schütteln absinken, wurde photometrisch bestimmt. Aus Flüssigkulturen mit einer OD_{730} von rund 0,8 wurden Aliquots entnommen und auf eine OD_{730} von 0,25 eingestellt. Hiervon wurden 700 µl in eine Küvette gegeben und die OD_{730} in regelmäßigen Abständen in einem Spektralphotometer gemessen. Zwischen den Messungen wurden die Küvetten im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

2.10 Chlorophyllbestimmung

Für die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes intakter Cyanobakterien wurden 0,1-1 ml der Flüssigkultur entnommen und 10 min bei 14000g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 50 µl abpipettiert und das Pellet resuspendiert. Es wurde 950 µl 80%iges Aceton zugegeben und die Ansätze wurden 15 min bei 50°C im Dunkeln geschüttelt. Danach wurden die festen Bestandteile durch eine 10 minütige Zentrifugation mit 14000xg abgetrennt und der Überstand bei einer Wellenlänge von 663 nm in einem Spektralphotometer gemessen.
Die Chlorophyllkonzentration berechnet sich nach folgender Formel: (Mc Kinney 1941)

$$C_{Chl}[\mu g / ml] = 12{,}19 \cdot E_{663} \cdot VF$$

2.11 Isolierung von Cytoplasma- und Thylakoidmembranen aus *Synechocystis*

Die Isolation reiner Cytoplasma- und Thylakoidmembranen erfolgte mit einen Zweiphasen-System bestehend aus Dextran und Polyethylenglykol (Norling et al. 1998). In Abwandlung zur Vorschrift wurde eine Anfangsprozentigkeit des Zweiphasensystems von 6,2% (statt 5,8%), eine Endprozentigkeit von 6,4% (statt 6,2%) verwendet und der Zweiphasen-Puffer mit 3 mM KCl versetzt. Auf den zweiten Schritt der Aufreinigung über einen Saccharose-Dichtegradienten wurde verzichtet.

2.12 Nachweis filtergebundener Proteine

2.12.1 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden mit dem BCA Protein Assay (Pierce) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (Boehringer Mannheim) verwendet.

2.12.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gele (Fling und Gregerson 1986) verwendet. Die Acrylamid-Prozentigkeit des Sammelgels betrug 5%, die des Trenngels 7,5%. Die Gelläufe erfolgten bei 110 V für eine Dauer von 2-3 Stunden. Die Proteinmenge betrug 10-15 µg Protein/Slot. Als Größenstandard wurde 10 µg des High-Molecular Weight Markers (Merck) eingesetzt.

2.12.3 Transfer auf Nitrocellulose (Western-Blot)

Die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden in einer Nova-Blot-Apparatur von LKB bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm^2 für 90 min auf eine nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schuell) transferiert. Zur Markierung des Größenstandards wurden die membrangebundenen Proteine mit Ponceau S gefärbt und die Markerbanden mit einem Kugelschreiber nachgezogen. Anschließend wurde die Membran mit H_2O entfärbt, 2x15 min in Casein-Puffer abgesättigt und 10 min in TN-Medium gewaschen.

2.12.4 Immunodetektion der Proteine

Der Erstantikörper wurde in Casein-Puffer verdünnt und mit der Membran über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3x10 min mit TNT-Puffer und 15 min mit TN-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem in Casein-Puffer verdünnten Zweitantikörper erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch Waschen in TNT-Puffer (3 x 20 min) und TN-Puffer (1 x 15 min) entfernt. Die

Detektion der markierten Proteinbanden erfolgte mit dem BM Chemiluminescence Blotting substrate (POD) der Firma Boehringer Mannheim.

Casein-Puffer	TNT-Puffer	TN-Puffer
1% Casein	1% (w/v) Triton X-100	10 mM Tris/HCl pH 8,0
10 mM Tris/HCl pH 8,0	10 mM Tris/HCl pH 8,0	150 mM NaCl
150 mM NaCl	150 mM NaCl	

2.13 cAMP-Bestimmung

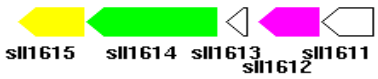
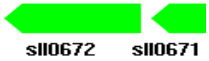
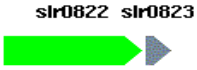
Für die Bestimmung des gesamten cAMP-Gehaltes wurden 1,5 ml Proben von Zellkulturen mit einer OD_{730} von 0,5 bzw. 0,8 entnommen, sofort mit 375 µl 25 %iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt (Endkonzentration 5%) und über Nacht bei 4°C gelagert. TCA-unlösliches Material wurde 15 min bei 14000g abzentrifugiert. Zur Entfernung der TCA wurden 1,5 ml des Überstandes entnommen und 5 mal mit 5 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wurde durch Vacuumzentrifugation eingetrocknet. Der cAMP-Gehalt der getrockneten Proben wurde mit dem cAMP enzymeimmunoassay system (EIA) von Amersham Pharmacia Biotech ermittelt. Für die Bestimmung des extracellulären cAMPs wurden die Zellkulturproben direkt nach Entnahme durch einen Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße filtriert und das Filtrat mit TCA versetzt. Die weitere Bearbeitung entsprach der für die Bestimmung des gesamten cAMP-Gehaltes. Durch Subtraktion des extrazelluären cAMP-Gehaltes vom gesamten cAMP-Gehalt ergibt sich der intrazelluläre cAMP-Gehalt.

III Ergebnisse

Die Analyse der kompletten Sequenzdaten des Genoms von *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko et al. 1996) ergab 9 Gene für P-Typ-ATPasen. Vier dieser P-ATPasen (`Sll1614`, `Slr0822`, `Sll0672`, `Sll1076`) wurden von Palmgren und Axelsen (1998) dem Typ IIA mit einer vermuteten Spezifität für Calcium-Ionen zugeordnet. Für eine der P-ATPasen (`Sll1614`) konnten bereits experimentelle Hinweise auf eine Calciumspezifität gesammelt werden (Geisler et al. 1998). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun die physiologische Funktion der potentiell Calcium-transportierenden P-ATPasen von *Synechocystis* PCC6803 ermittelt werden.

1 Benachbarte offene Leseraster der vier Calcium-ATPasen

In prokaryotischen Organismen werden häufig mehrere hintereinander liegende Gene gemeinsam transkribiert. Die in einer Transkriptionseinheit zusammengefaßten Gene können an einer gemeinsamen Funktion beteiligt sein. Daher war es von Interesse, welche benachbarten Gene mit gleicher Orientierung bei den vier Calcium-ATPasen vorhanden sind.

	sll1611+sll1613: keine Homologie sll1612: Folyl-Polyglutamat Synthetase aus *Bacillus subtilis* sll1615: GTPase aus *Bacillus subtilis*
	sll0671: Magnesium und Cobalt transportierendes Protein aus *Mycobacterium leprae*
	slr0823: hypothetisches Protein aus *Cyanophora paradoxa*
	Sll1074: Leucyl-tRNA-Synthetase aus *Haemophilus influenzae*

Tab. 1: Benachbarte offene Leseraster der vier Calcium-ATPase-Gene `sll1614`, `sll0672`, `slr0822` und `sll1076`

Dargestellt sind Ausschnitte der „Open Reading Frame“-Karte des Genoms von *Synechocystis* 6803. Die einzelnen offenen Leseraster sind als Balken dargestellt, deren Spitze die Richtung des Leserasters angibt. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Leseraster wurden für Homologievergleiche eingesetzt (CyanoBase).

Für die Gene `sll1611-1615` konnte eine Kotranskription experimentell nachgewiesen werden, jedoch kein funktioneller Zusammenhang (Ahring 1998, Geisler et al. 1996). Bei den drei weiteren Calcium-ATPasen befindet sich jeweils nur ein Gen mit gleicher Orientierung in direkter Nachbarschaft. Kotranskription und ein möglicher funktioneller Zusammenhang mit den Calcium-ATPasen sind hier noch ungeklärt.

2 Untersuchungen an *Synechocystis* 6803nm

Zu Beginn der Arbeit wurde eine nicht bewegliche Form von *Synechocystis* PCC 6803 eingesetzt, die in dieser Arbeit als *Synechocystis* 6803 nm (für nicht-motil) bezeichnet wird. Hierbei handelt es sich um einen Stamm, der aus dem Originalstamm von *Synechocystis* spez. PCC 6803 isoliert worden ist und wegen seiner hohen Glucosetoleranz häufig für Photosyntheseuntersuchungen eingesetzt wurde. Dieser Stamm ist im Gegensatz zum Wildtyp des Pasteur-Instituts nicht beweglich. Leider werden beide Stämme in der Literatur als *Synechocystis* sp. PCC 6803 bezeichnet, so daß eine Auswertung der entsprechenden Literatur nicht möglich ist.

2.1 Einfluß von Calcium auf den Transkriptgehalt der Calcium-ATPasen

Die mögliche Funktion der vier potentiellen Calcium-ATPasen als Regulatoren der cytoplasmatischen Calciumkonzentration ließ vermuten, daß die Expression der Gene mit dem Calciumgehalt des Mediums in Zusammenhang steht. Einer von vielen Faktoren, der die Expression eines Gens beeinflußt, ist der Transkriptgehalt. Er wird seinerseits durch die Häufigkeit der Transkription und der Stabilität des Transkripts bestimmt. Im folgenden Versuch wurde der Transkriptgehalte der vier vermutlichen Ca^{2+}-ATPase-Gene nach Anzucht in Standard-BG11 Medium (enthält 250 µM Ca^{2+}) vor und nach 2-stündiger Inkubation mit 50 mM $CaCl_2$ im Kulturmedium verglichen. Hierdurch sollte ein möglicher Einfluß von Calcium auf die Transkriptionshäufigkeit oder Stabilität der Calcium-ATPase-Transkripte untersucht werden. Der Vergleich der Transkriptgehalte erfolgte durch RT-PCR (Abbildung 7).

ORF	5‘-Primer	3‘-Primer	PCR-Produkt
sl1614	GCGGTGGGTTGGGGACGGGG	GGCCGCCGAAGCTAGCAGTG	485 bp
slr0822	GAACAACTACAAAGCGA	GCGACGCTTCATAATATTTG	492 bp
sll0672	ACCCTCCGCAAACAACATGA	AATGGTTGGGGGTATAGTTG	526 bp
sll1076	GCTTATCAGGGCTTGGGGCA	GTGATGGAGAATACTTGTCG	567 bp

Tab. 2: Sequenzen der RT-PCR-Primer

Alle Sequenzen sind in 5‘-3‘-Orientierung angegeben.

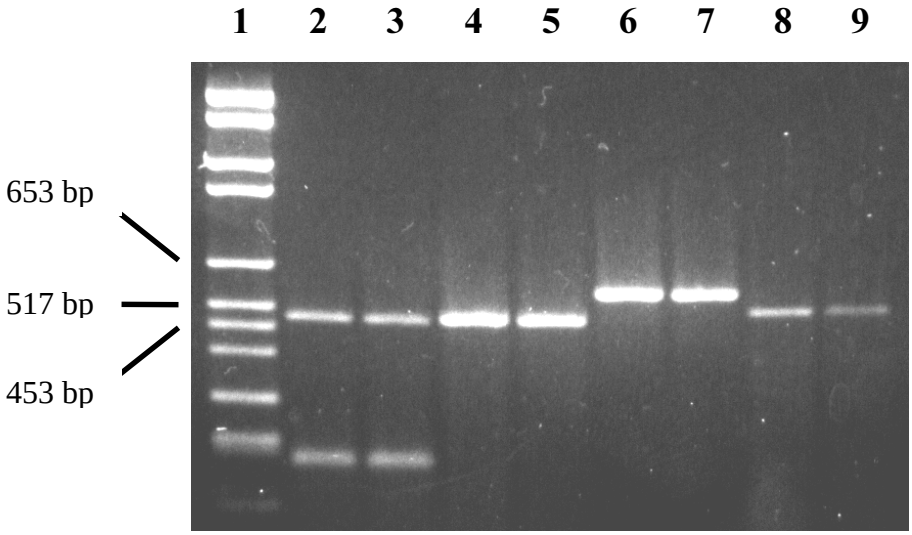


Abb. 7: Transkriptgehalte der Calcium-ATPasen vor und nach Ca^{2+}-Zugabe

Kulturen von *Synechocystis* 6803nm wurden unter Standardbedingungen angezogen. Bei Erreichen einer OD_{730} von 0,8 wurde ein Teil der Kultur geerntet, der Rest wurde mit 50 mM $CaCl_2$ versetzt und 2 weitere Stunden inkubiert. In der isolierten Gesamt-RNA aus *Synechocystis* 6803nm wurde der Transkriptgehalt der vier Calcium-ATPasen mittels RT-PCR verglichen. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt. **1**: DNA Marker VI, **2**: 1614-Transkript **3**: 50mM Ca^{2+} 1614-Transkript, **4**: 0822-Transkript **5**: 50mM Ca^{2+} 0822-Transkript, **6**: 1076-Transkript, **7**: 50mM Ca^{2+} 1076-Transkript, **8**: 0672-Transkript, **9**: 50mM Ca^{2+} 0672-Transkript

Vergleicht man jeweils den Transkriptgehalt der einzelnen Ca^{2+}-ATPasen vor und nach 2-stündiger Inkubation mit 50 mM Ca^{2+} (Spuren 2+3, 4+5, 6+7, 8+9), so lassen sich keine deutlichen Unterschiede erkennen; Calcium scheint keinen Einfluß auf den Transkriptgehalt der vier potentiellen Calcium-ATPasen zu haben.

2.2 Ca^{2+}-ATPase Transkripte in Deletions- und Überexpressionsmutanten von `sll1614`

Vermutlich sind alle vier potentiellen Ca^{2+}-ATPasen an der Regulation der Calciumkonzentration beteiligt. Daher besteht die Möglichkeit, daß sie sich gegenseitig beeinflussen. Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob das Ausschalten oder die Überexpression einer der vier Calcium-ATPasen (`Sll1614`) den Transkriptgehalt der anderen Calcium-ATPasen verändert. In der Überexpressionsmutante *Synechocystis* 6803nmMRP wurden die Transkription des Ca^{2+}-ATPase-Gens `sll1614` durch das Vorschalten eines starken Promotors und die Translation durch das Einbringen einer Punktmutation in eine möglicherweise translationshemmende Sekundärstruktur im 5‘- nicht translatierten Bereich des Gens verstärkt. In dieser Mutante konnte im Gegensatz zu *Synechocystis* 6803nm die Calcium-ATPase immunologisch in isolierten Cytoplasmamembranen nachgewiesen werden (Schnorr).

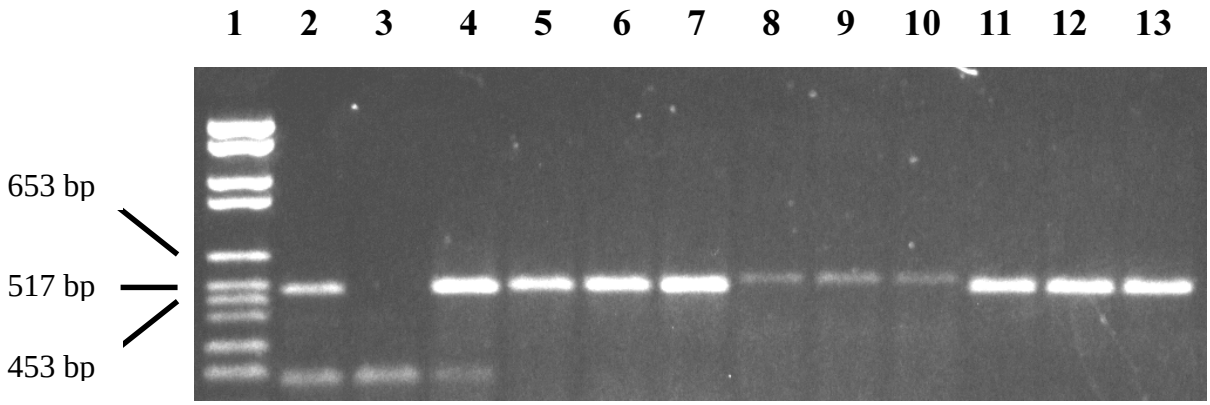


Abb. 8: Transkriptlevel der vier Calcium-ATPasen in Expressionsmutanten von `sll1614`

Kulturen von *Synechocystis* 6803nm, Deletionsmutante von `sll1614` (`1614nm`)- und Überexpressionsmutante von `sll1614` (*Synechocystis* 6803nmMRP) wurden unter Standardbedingungen angezogen und bei einer OD_{730} von 0,8 geerntet. Die isolierten Gesamt-RNAs wurden in RT-PCR-Reaktionen mit Primern gegen die vier Calcium-ATPase-Gene `sll1614` (Spuren 2-4), `sll0672` (Spuren 5-7), `sll1076` (Spuren 8-10) und `slr0822` (Spuren 11-13) eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt. **1**: DNA Marker VI, **2**: *Synechocystis* 6803nm `1614`-Transkript **3**: `1614nm` `1614`-Transkript **4**: *Synechocystis* 6803nmMRP `1614`-Transkript, **5**: *Synechocystis* 6803nm `0672`-Transkript **6**: `1614nm` `0672`-Transkript **7**: *Synechocystis* 6803nmMRP `0672`-Transkript, **8**: *Synechocystis* 6803nm `1076`-Transkript, **9**: `1614nm` `1076`-Transkript, **10**: *Synechocystis* 6803nmMRP `1076`-Transkript, **11**: *Synechocystis* 6803nm `0822`-Transkript **12**: `1614nm` `0822`-Transkript **13**: *Synechocystis* 6803nmMRP `0822`-Transkript

Der `1614`-Transkriptgehalt war erwartungsgemäß in *Synechocystis* 6803nm (Spur 2) Deletionsmutante `1614nm` (Spur 3) und Überexpressionsmutante *Synechocystis* 6803nmMRP (Spur 4) unterschiedlich. In der Deletionsmutante `1614nm` (Spur 3) wurde kein PCR-Produkt

auf Höhe der Wildtypbande erhalten, da die verwendeten Primer in der RT-PCR-Reaktion so gewählt wurden, daß sie die inserierte Kanamycinresistenz flankieren. Theoretisch müßte bei dieser Reaktion ein 1792 bp großes PCR-Produkt, das die Kanamycinresistenzkassette enthält, gebildet werden. Für das Fehlen dieses PCR-Produktes ist vermutlich eine zu geringe Ausbeute des 1792 bp großen cDNA-Fragmentes nach der reversen Transkription verantwortlich. In der Überexpressionsmutante *Synechocystis* 6803nmMRP (Spur 4) war eine deutliche Erhöhung des Transkriptgehaltes zu erkennen, was durch die verstärkte Transkription ausgehend vom eingebrachten Promotor erklärt werden kann (Jakobs). Vergleicht man nun die Transkriptgehalte der übrigen Calcium-ATPasen zwischen Wildtyp, Deletions- und Überexpressionsmutante von `sll1614` (Spuren 5+6+7, 8+9+10, 11+12+13), so lassen sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp und den beiden Mutanten erkennen. Das Ausschalten bzw. das Überexpremieren von `sll1614` hatte keinen Einfluß auf den Transkriptgehalt der anderen Calcium-ATPasen.

2.3 Ausschalten der Ca^{2+}-ATPase- und Ca^{2+}-Austauscher-Gene

Nachdem keine Faktoren ermittelt werden konnten, die die Transkription der potentiellen Ca^{2+}-ATPasen beeinflussen und auch kein immunologischer Nachweis der entsprechenden Proteine in isolierten Cytoplasmamembranen möglich war (Schnorr 1996), wurde ein neuer Weg zur Aufklärung der physiologischen Bedeutung der Calcium-ATPasen beschritten. Durch das gezielte Ausschalten der vier potentiellen Calcium-ATPase Gene sollte eine phänotypische Veränderung auftreten, die Hinweise auf die Funktion der ausgeschalteten P-ATPasen liefert.

Erster Schritt für das Ausschalten der P-ATPase-Gene `sll1614`, `slr0822`, `sll0672` und `sll1076` und des Austauschers `slr1336` war die Klonierung der Gene. Dies erfolgte durch PCR mit sequenzspezifischen Primern und isolierter genomischer DNA aus *Synechocystis* 6803nm.

2.3.1 Klonierung der Gene aus *Synechocystis* 6803

Die codierenden Bereiche der Gene `sll1614`, `slr0822`, `sll0672`, `sll1076` und `slr1336` wurden mittels PCR aus genomischer DNA von *Synechocystis* 6803nm amplifiziert und in den Klonierungsvektor pBluescript II KS- ligiert. Die Primer wurden so

konzipiert, daß um das ATG-Startcodon eine NdeI-Schnittstelle und stromabwärts des Stoppcodons eine SalI-Schnittstelle vorhanden ist (Tabelle 3). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit SalI verdaut, in den SalI/SmaI geöffneten Vektor ligiert und mit pBs1614, pBs0822 usw. bezeichnet.

ORF	5‘-PRIMER	3‘-PRIMER
sll1614	K1sll1614: CAAATC**CATATG**GATTTCCC	K2sll1614: AGG**GTCGAC**AAATCCCCAAC
slr0822	K1slr0822: TACTTT**CATATG**TCTGACCC	K2slr0822: CCTTTA**GTCGAC**TGTTTGCC
sll0672	K1sll0672: TT**CATATG**AAAGCTTGTTGC	K2sll0672: CTTACT**GTCGAC**TTTAGCGT
sll1076	K1sll1076: AC**CATATG**GGATGGAAAACCATCT	K2sll1076: GT**GTCGAC**AATGGTAGTCATTCAA
slr1336	K1slr1336: CGCCAG**CATATG**TCCACCAA	K2slr1336: CACTC**GTCGAC**TACTAGACC

Tab. 3: Sequenzen der Klonierungsprimer

Alle Sequenzen sind in 5‘-3‘-Orientierung angegeben. Die NdeI- und SalI-Schnittstellen sind hervorgehoben.

2.3.2 Herstellung der Transformationsplamide

Aus den codierenden Bereichen der klonierten Gene wurde jeweils ein Fragment herausgeschnitten und durch eine Antibiotikaresistenz-Kassette als Selektionsmarker ersetzt. In Abbildung 9 wird beispielhaft das Ausschalten des Gens sll1614 mit einer Kanamycinresistenz-Kassette dargestellt. Das neue Plasmid wurde mit 1614Kan bezeichnet.

Plasmid 1614Kan zum Ausschalten des Gens sll1614

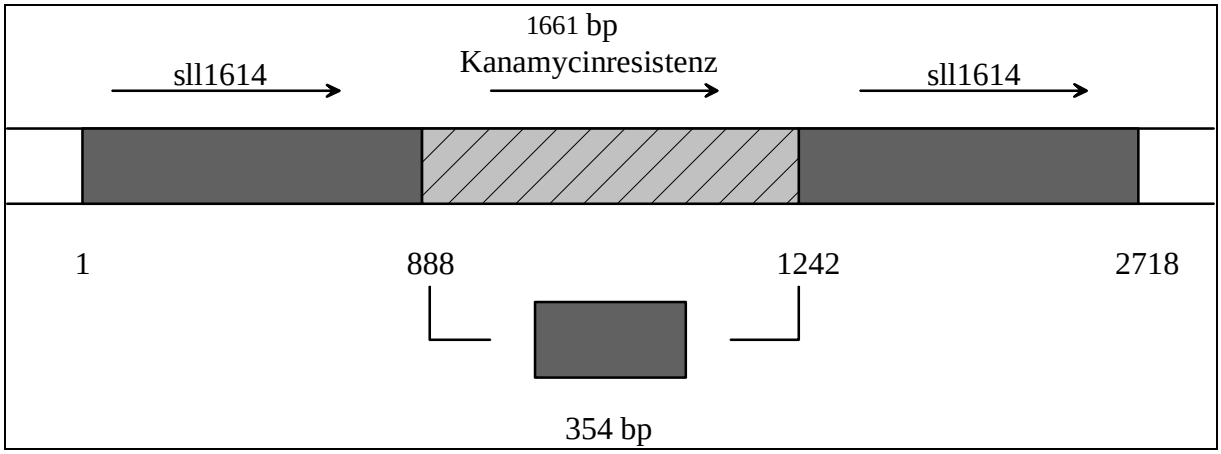


Abb. 9: Plasmid 1614Kan zum Ausschalten des Gens sll1614

Ein 354 bp großes Fragment wurde mit BstEII(888)/BamHI(1242) aus pBsc.4H-8 (Geisler et al. 1993) herausgeschnitten und durch eine 1661 bp große Kanamycinresistenz-Kassette (Beck et al. 1982) aus dem Plasmid pKS-NPTII (freundlicherweise von Dr. K. Steinmüller zur Verfügung gestellt) in gleicher Orientierung ersetzt. Die Zahlen geben die Basenpaare vom ATG-Startcodon stromabwärts gezählt an. Dieses Plasmid wurde von Jutta Richter in unserer Arbeitsgruppe hergestellt.

Plasmid 0822aad zum Ausschalten des Gens slr0822

Ein 128 bp großes Fragment wurde mit BglII(261)/HindIII(389) aus pBs0822 herausgeschnitten und durch eine 927 bp große Spectinomycinresistenz-Kassette ersetzt. Diese wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer pUCBglII: ATGATT**AGATCT**TCGCCGTCGTTCAA und M13 revers: AACAGCTATGACCATG aus dem Plasmid pUC-16S-aad (Koop et al. 1996, freundlicherweise von Dr. K. Steinmüller zur Verfügung gestellt) amplifiziert, mit BglII/HindIII geschnitten und in gleicher Orientierung inseriert.

Plasmid 0672Cat zum Ausschalten des Gens sll0672

Ein 100 bp großes Fragment wurde mit BstEII(2313)/SmaI(2413) aus pBs0672 herausgeschnitten und durch das 1461 bp große Chloramphenicoltransferase-Gen ersetzt. Dieses wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer pBsBstEII: AAGCT**GGTCACC**GGGCCCCC und T7: GTAATACGACTCACTATAGGGC aus dem

Plasmid pKS-CAT (freundlicherweise von Dr. K. Steinmüller zur Verfügung gestellt) amplifiziert, mit BglII/HindIII geschnitten und in entgegengesetzter Orientierung inseriert.

Plasmid 1076Kan zum Ausschalten des Gens sll1076

Ein 1142 bp großes Fragment wurde mit BstEII(888)/HindIII(2030) aus pBs1076 herausgeschnitten und durch die 1662 bp große Kanamycinresistenz-Kassette ersetzt. Diese wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer pBsBstEII: AAGCT**GGTCACC**GGGCCCCC und T7: GTAATACGACTCACTATAGGGC aus dem Plasmid pKS-NPTII (freundlicherweise von Dr. K. Steinmüller zur Verfügung gestellt) amplifiziert, mit BstEII/HindIII geschnitten und in entgegengesetzter Orientierung inseriert.

Plasmid 1076Cat zum Ausschalten des Gens sll1076

Ein 1142 großes Fragment wurde mit BstEII(888)/HindIII(2030) aus pBs1076 herausgeschnitten und durch das 1394 bp große SmaI/HindIII ausgeschnittene Chloramphenicoltransferase-Gen aus dem Plasmid pKS-CAT (freundlicherweise von Dr. K. Steinmüller zur Verfügung gestellt) in gleicher Orientierung ersetzt. Zunächst wurden die HindIII-Enden ligiert, dann das überstehende BstEII-Ende mit Klenow-Enzym augefüllt und anschließend mit dem SmaI-Ende ligiert.

Plasmid 1076aad zum Ausschalten des Gens sll1076

Ein 369 bp großes Fragment wurde mit XmnI(1661)/HindIII(2030) aus pBs1076 herausgeschnitten und durch eine 938 bp große Spectinomycinresistenz-Kassette ersetzt. Diese wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer pUCBglII: ATGATTAGATCTTCGCCGTCGTTCAA und M13 revers: AACAGCTATGACCATG aus dem Plasmid pUC-16S-aad (Koop et al. 1996, freundlicherweise von Dr. K. Steinmüller zur Verfügung gestellt) amplifiziert, mit HindIII geschnitten und mit gleicher Orientierung inseriert.

Plasmid 1076Ery zum Ausschalten des Gens sll1076

Ein 369 großes Fragment wurde mit XmnI(1661)/HindIII(2030) aus pBs1076 herausgeschnitten und durch eine 1474 bp große EcoRV/HindIII Erythromycinresistenz-Kassette aus dem Plasmid pRL425 (Elhai & Wolk 1988, freundlicherweise von Dr. C.P. Wolk zur Verfügung gestellt) in gleicher Orientierung ersetzt.

Plasmid 1336Cat zum Ausschalten des Gens sll1336

Ein 175 großes Fragment wurde mit AccI(518)/AvrII(693) aus pBs1336 herausgeschnitten und durch das 1421 bp große AccI/XbaI geschnittene Chloramphenicoltransferase-Gen aus dem Plasmid pKS-CAT (freundlicherweise von Dr. K. Steinmüller zur Verfügung gestellt) mit entgegengesetzter Orientierung ersetzt.

Plasmid 1336Ery zum Ausschalten des Gens sll1336

Ein 175 großes Fragment wurde mit AccI(518)/AvrII(693) aus pBs1336 herausgeschnitten und durch eine 1496 bp große Erythromycinresistenz-Kassette aus dem Plasmid pRL425 (Elhai & Wolk 1988, freundlicherweise von Dr. C.P. Wolk zur Verfügung gestellt) ersetzt. Diese wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer XbaI-Ery:
CTTTCGTCT**TCTAGA**ATTCTCAT und AccI-Ery:
ATCCTCTAGA**GTCTAC**CTGCAGGCAT amplifiziert und vor der Insertion in entgegengesetzter Orientierung mit XbaI/AccI geschnitten.

2.3.3 Überprüfung der Segregation der eingebrachten Resistenzkassetten

Synechocystis 6803 besitzt mehrere Genomkopien pro Zelle. Deshalb mußte nach der Transformation und Selektion auf die eingebrachte Antibiotikaresistenz überprüft werden, ob noch Wildtypkopien in den Zellen vorhanden waren. Dies erfolgte durch PCR mit isolierter genomischer DNA unter Verwendung von Primerpaaren, von denen jeweils der 5‘-Primer vor und der 3‘-Primer hinter der eingebrachten Resistenzkassette bindet. Die Mutanten wurden so konzipiert, daß immer das ausgeschnittene Fragment des Gens kleiner war als die eingesetzte Resistenzkassette. Somit ergibt sich bei vorhandener Wildtypkopie ein kleineres PCR-Produkt im Vergleich zur Kopie mit inserierter Resistenzkassette.

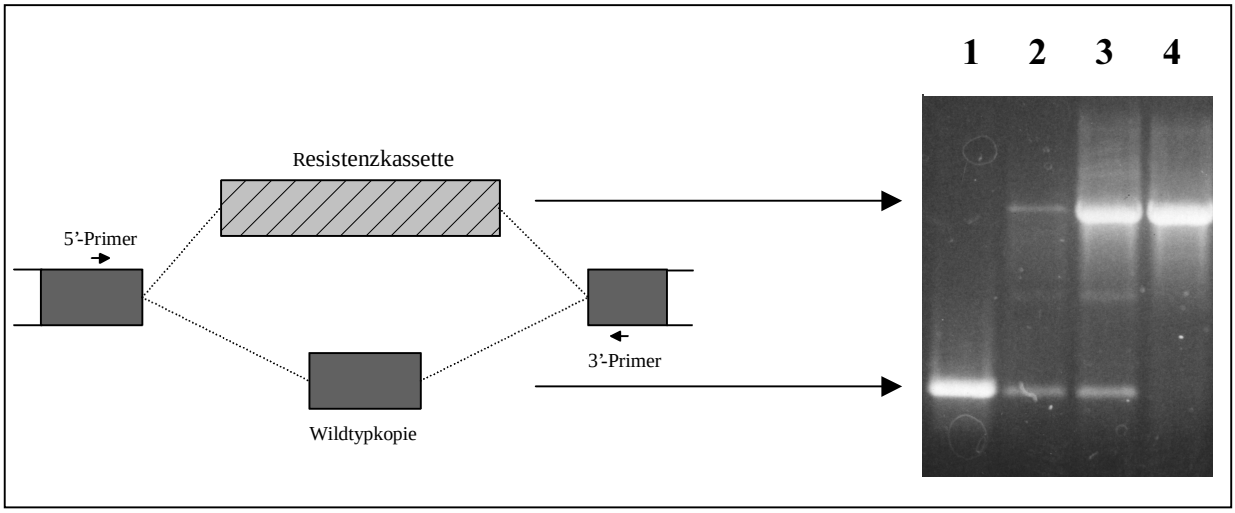


Abb. 10: Überprüfung der kompletten Segregation durch PCR

Die verwendeten Primer wurden jeweils so gewählt, daß sie links und rechts von der inserierten Resistenzkassette binden. Wird genomische DNA des Wildtyps eingesetzt, so entsteht nur das kleine PCR-Produkt (**1**). Sind in der genomischen DNA sowohl Wildtypkopien als auch Kopien mit der eingesetzten Resistenzkassette vorhanden, so werden in der PCR zwei Produkte unterschiedlicher Größe gebildet (**2** + **3**). Ist die Resistenzkassette komplett segregiert, so sind keine Wildtypkopien mehr vorhanden und es entsteht nur das größere PCR-Produkt mit der Resistenzkassette (**4**).

Für die Herstellung von Mehrfachmutanten mußte vor jeder Transformation sichergestellt werden, daß von allen bereits ausgeschalteten Genen keine Wildtypkopien mehr im Genom vorhanden waren.

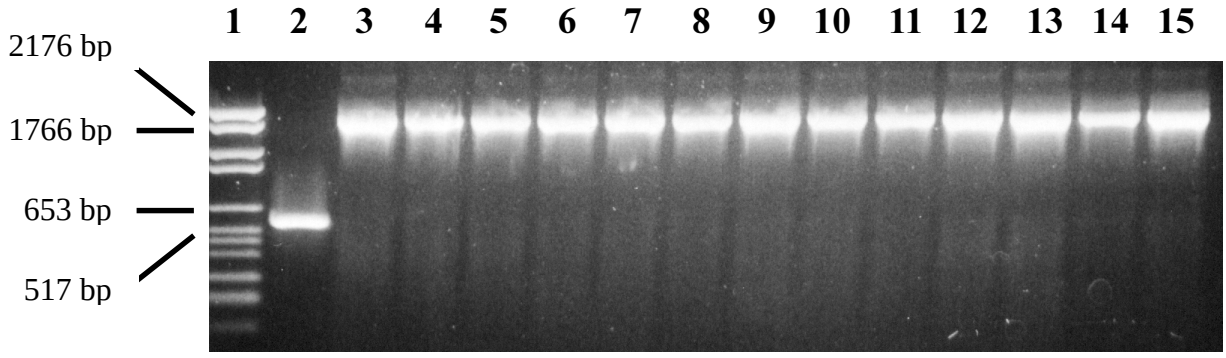


Abb. 11: Segregation der Kanamycinresistenzkassette in 1614nm-Mutanten

5'-Primer: P1.2 1614: GCCACACACTGCTCTACGTA, 3'-Primer: P2.2 1614: CTTGCCAAACCGGCTTGACT, PCR-Produkt der Wildtypkopie: 565 bp, PCR-Produkt mit inserierter Resistenzkassette: 1872 bp. Die Überprüfung der kompletten Segegration erfolgte durch PCR mit isolierter genomischer DNA der Mutanten. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. **1**: DNA-Marker VI, **2**: *Synechocystis* 6803nm, **3**: 1614nm, **4**: 1614/0822nm, **5**: 1614/0672nm, **6**: 1614/1076nm, **7**: 1614/1336nm, **8**: 1614/0822/0672nm, **9**: 1614/0822/1076nm, **10**: 1614/0822/1336nm, **11**: 1614/0672/1076nm, **12**: 1614/0822/0672/1076nm, **13**: 1614/0822/0672/1336nm, **14**: 1614/0822/1076/1336nm, **15**: 1614/0672/1076/1336nm

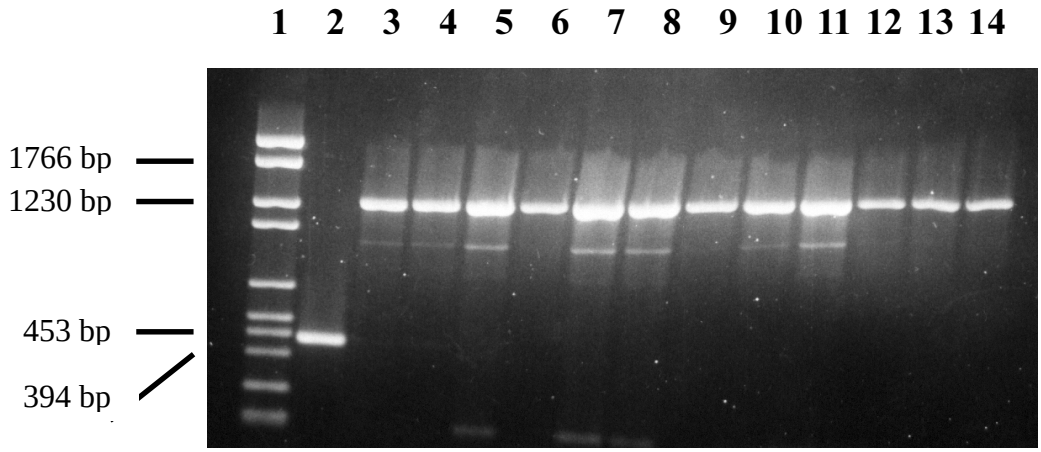


Abb. 12: Segregation der Spectinomycinresistenzkassette in 0822nm-Mutanten

5‘.Primer:K1 slr0822:TACTTTCATATGTCTGACCC, 3‘-Primer: P3 0822: CGCAGTACCTGGACTTTG, PCR-Produkt der Wildtypkopie: 449 bp, PCR-Produkt mit inserierter Resistenzkassette: 1248 bp. Die Überprüfung der kompletten Segregation erfolgte durch PCR mit isolierter genomischer DNA der Mutanten. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. **1**: DNA-Marker VI, **2**: *Synechocystis* 6803nm, **3**: 0822nm, **4**: 1614/0822nm, **5**: 0822/0672nm, **6**: 0822/1076nm, **7**: 1614/0822/0672nm, **8**: 1614/0822/1076nm, **9**: 1614/0822/1336nm, **10**: 0822/0672/1076nm, **11**: 1614/0822/0672/1076nm, **12**: 1614/0822/0672/1336nm, **13**: 1614/0822/1076/1336nm, **14**: 0822/0672/1076/1336nm

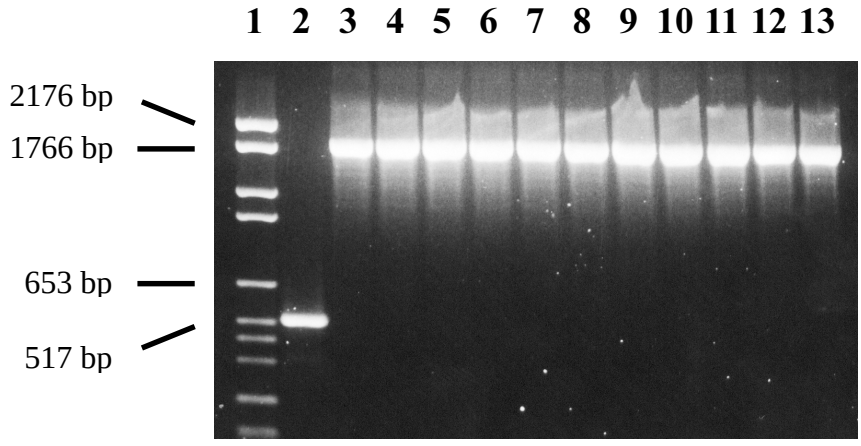


Abb. 13: Segregation des Chloramphenicoltransferasegens in 0672nm-Mutanten:

5‘-Primer: P1 0672: ACCCTCCGCAAACAACATGA, 3‘-Primer: P2 0672: AATGGTTGGGGGTATAGTTG, PCR-Produkt der Wildtypkopie: 525 bp, PCR-Produkt mit inserierter Resistenzkassette: 1856 bp. Die Überprüfung der kompletten Segregation erfolgte durch PCR mit isolierter genomischer DNA der Mutanten. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. **1**: DNA-Marker VI, **2**: *Synechocystis* 6803nm, **3**: 0672nm, **4**: 1614/0672nm, **5**: 0822/0672nm, **6**: 0672/1076nm, **7**: 1614/0822/0672nm, **8**: 1614/0672/1076nm, **9**: 0822/0672/1076nm, **10**: 1614/0822/0672/1076nm, **11**: 1614/0822/0672/1336nm, **12**: 1614/0672/1076/1336nm, **13**: 0822/0672/1076/1336nm

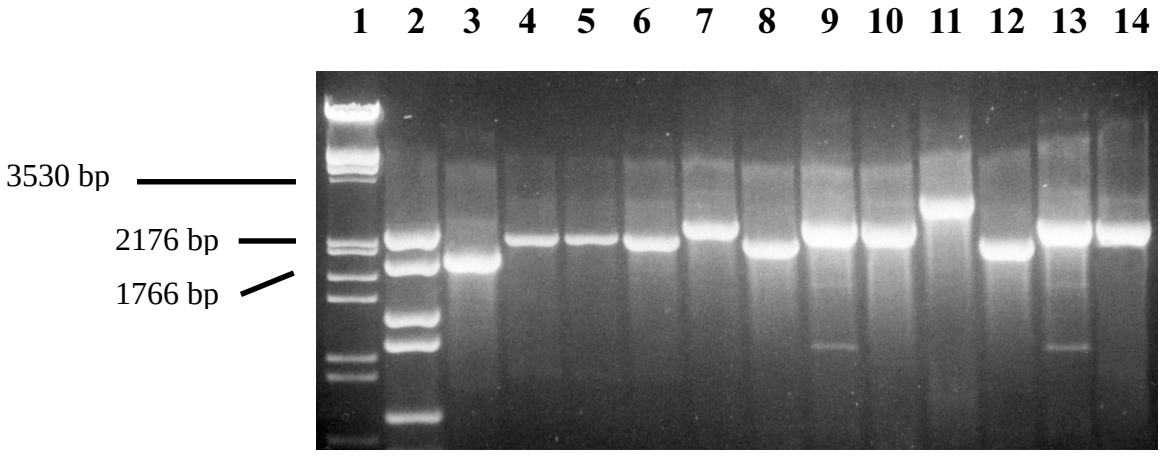


Abb. 14: Segregation der verschiedenen Resistenzgene in 1076nm-Mutanten:

5‘-Primer: P3 1076: CCAATGTTAAGCGGGAAC, 3‘-Primer: P2 1076: GTGATGGAGAATACTTGTCG, PCR-Produkt der Wildtypkopie: 1823 bp, PCR-Produkt mit inserierter Chloramphenicolresistenzkassette: 2075 bp, PCR-Produkt mit inserierter Kanamycinresistenzkassette: 2343 bp, PCR-Produkt mit inserierter Spectinomycinresistenzkassette: 2392 bp, PCR-Produkt mit inserierter Erythromycinresistenzkassette: 2928 bp. Die Überprüfung der kompletten Segregation erfolgte durch PCR mit isolierter genomischer DNA der Mutanten. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. **1**: DNA-Marker III, **2**: DNA-Marker VI **3**: *Synechocystis* 6803nm, **4**: 1076nm, **5**: 1614/1076nm, **6**: 0822/1076nm, **7**: 0672/1076nm, **8**: 1614/0822/1076nm, **9**: 1614/0672/1076nm, **10**: 0822/0672/1076nm, **11**: 1614/0822/0672/1076nm, **12**: 1614/0822/1076/1336nm, **13**: 1614/0672/1076/1336nm, **14**: 0822/0672/1076/1336nm

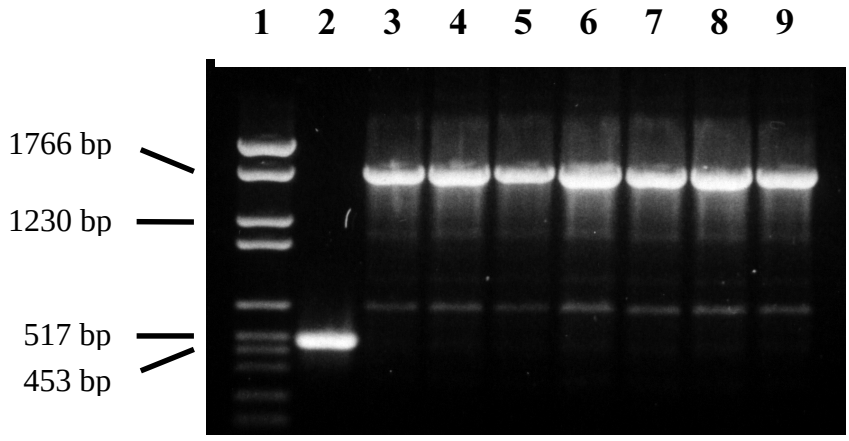


Abb. 15: Segregation des Chloramphenicoltransferasegens oder der Erythromycin-resistenkassette in 1336nm-Mutanten

5‘-Primer: P1 1336: TTGCAATACACCTCCACGGG, 3‘-Primer: P2 1336: CCGACGATGACCAAGACTGG, PCR-Produkt der Wildtypkopie: 493 bp, PCR-Produkt mit inseriertem Cloramphenicoltransferasegen: 1739 bp, PCR-Produkt mit inserierter Erythromycinresistenzkassette: 1814 bp. Die Überprüfung der kompletten Segegration erfolgte durch PCR mit isolierter genomischer DNA der Mutanten. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. **1**: DNA-Marker VI, **2**: *Synechocystis* 6803nm, **3**: 1336nm, **4**: 1614/1336nm, **5**: 1614/0822/1336nm, **6**: 1614/0822/0672/1336nm, **7**: 1614/0822/1076/1336nm, **8**: 1614/0672/1076/1336nm, **10**: 0822/0672/1076/1336nm

Die Abbildungen 11-15 zeigen, daß in keiner der Mutanten Banden auf Höhe der Wildtypsequenzen der jeweils ausgeschalteten Gene vorhanden sind. Somit konnten die erhaltenen Mutanten für Untersuchungen zu den Auswirkungen des Ausschaltens der verschiedenen Gene eingesetzt werden.

2.3.4 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten

In der Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076nm sollten durch das Fehlen aller vier potentiellen Ca^{2+}-ATPasen die zu beobachtenden Effekte am stärksten sein; sie wurde daher für die ersten Untersuchungen verwendet.

2.3.4.1 Effekt von Calcium auf das Wachstum

Die ersten Untersuchungen zu den Auswirkungen des Fehlens der vier P-ATPasen richteten sich auf das Wachstum. Durch die Aufnahme einer Wachstumskurve mit und ohne Ca^{2+}-Zugabe sollte überprüft werden, wie *Synechocystis* 6803nm und die Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076 unter Standardbedingungen wachsen und ob sie unterschiedlich auf eine plötzliche Erhöhung der Calcium-Konzentration im Anzuchtmedium reagieren.

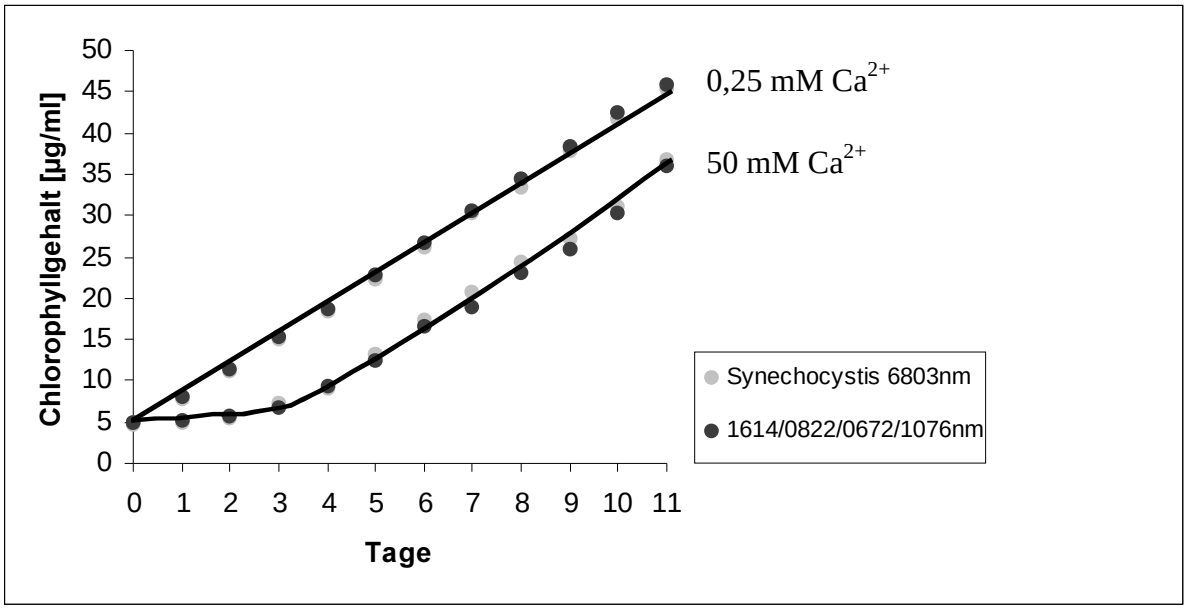


Abb. 16: Effekt von Calcium auf das Wachstum

Aus Vorkulturen vom *Synechocystis* 6803nm und der Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076nm mit einer OD730 von 0,8 wurden jeweils zwei Kulturen in BG11 Medium mit der Standard-Calciumkonzentration von 0,25 mM angeimpft. Hatten diese Kulturen eine Chlorophyllkonzentration von 5 µg/ml erreicht, wurde jeweils eine der beiden Kulturen mit 50 mM $CaCl_2$ versetzt (Tag 0).

Unter Standardbedingungen wuchsen *Synechocystis* 6803nm und die Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076nm vollkommen identisch. Auf die Zugabe von 50 mM $CaCl_2$ reagierten *Synechocystis* 6803nm und die Vierfachmutante zunächst mit einem Wachstumsstop. Im Laufe von vier Tagen erholten sich die Zellen wieder und wuchsen anschließend mit der gleichen Geschwindigkeit wie bei normalen Anzuchtbedingungen weiter. Alle Einfach, Doppel- und Dreifachmutanten der vermutlichen Calcium-ATPase-Gene und des Calcium-Austauschers zeigten ein vergleichbares Wachstumsverhalten (Daten nicht gezeigt).

2.3.4.2 Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit

Bei den Wachstumsuntersuchungen konnte beobachtet werden, daß die plötzliche Zugabe von $CaCl_2$ ins Kulturmedium zu einer langsamen Aggregation der Einzelzellen zu Zellansammlungen führte, die nach mehreren Stunden mit dem bloßen Auge erkennbar waren. Dies bewirkte ein schnelleres Absinken der Zellen in Abhängigkeit von der Größe der Zellaggregate. Zum Vergleich der Sedimentationsgeschwindigkeit zwischen *Synechocystis* 6803nm und der Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076nm bei verschiedenen Calciumkonzentrationen wurde die optische Dichte der Flüssigkulturen ohne Schütteln über einen längeren Zeitraum gemessen.

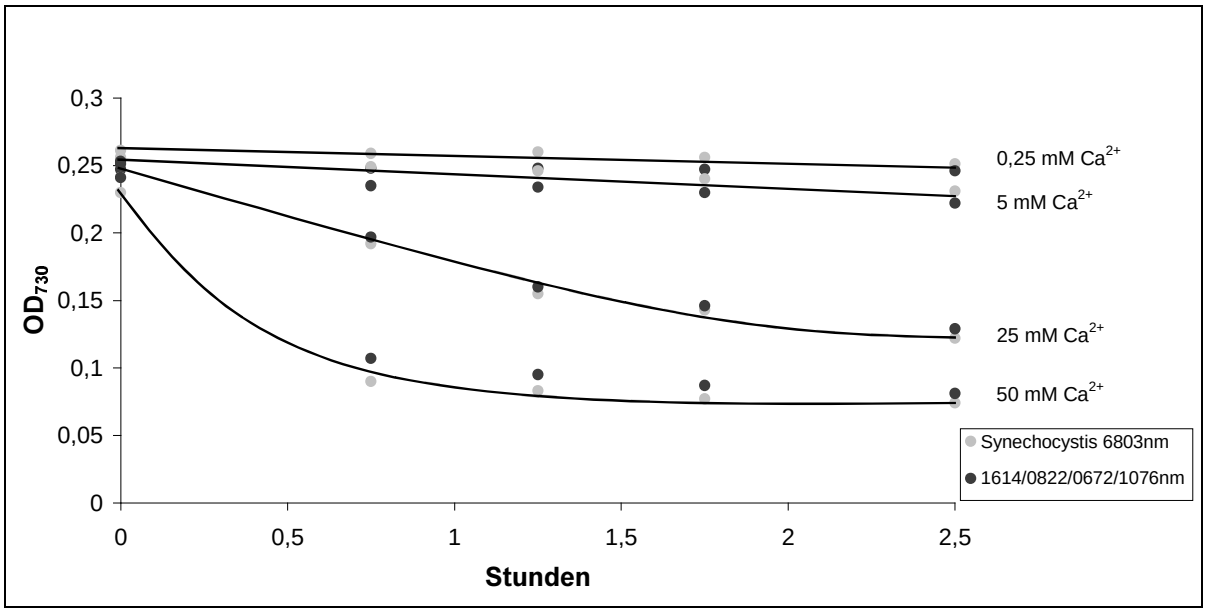


Abb. 17: Effekt von Calcium auf die Sedimentationsgeschwindigkeit

Kulturen von *Synechocystis* 6803nm und der Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076nm wurden in BG 11 Medium mit der Standardcalciumkonzentration von 0,25 mM angezogen, bei einer OD_{730} von 0,8 mit verschiedenen Mengen Calciumchlorid versetzt und für weitere 24 Stunden kultiviert. Danach wurden Aliquots entnommen, die OD_{730} auf 0,25 eingestellt und zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen.

Unter Standardbedingungen angezogene Zellen sanken nur sehr langsam ab. Über den untersuchten Zeitraum von 2,5 h blieb die optische Dichte der Flüssigkultur mehr oder weniger konstant. Mikroskopische Untersuchungen der Flüssigkultur zeigten, daß alle Zellen als Einzelzellen oder sich gerade teilende Zellen vorlagen. Mit ansteigender Ca^{2+}-Konzentration sanken die Zellen schneller ab. Bei einer Ca^{2+}-Konzentration von 5 mM bildeten sich bereits kleine Zellaggregate, neben denen aber auch noch viele Einzelzellen vorhanden waren. Die Größe der Zellaggregate nahm bei *Synechocystis* 6803nm und der Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076nm in gleichem Maß mit ansteigender Calciumkonzentration zu, die Zahl der Einzelzellen ab. Eine weitere Erhöhung der Calciumkonzentration über 50 mM hinaus bewirkte weder bei *Synechocystis* 6803nm noch bei der Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076nm eine weitere Steigerung der Sedimentationsgeschwindigkeit.

3 Untersuchungen am Stamm des Pasteur-Instituts von *Synechocystis* 6803

Die bisherigen Untersuchungen an *Synechocystis* 6803nm hatten keine phänotypischen Unterschiede zwischen *Synechocystis* 6803nm und der daraus hergestellten Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076nm ergeben. Bei der Suche nach weiteren Eigenschaften, die durch Calcium beeinflußt werden könnten, stellte sich heraus, daß der bisher verwendete Stamm von *Synechocystis* PCC6803 nicht dem Originalwildtyp entsprach. Der Originalstamm von *Synechocystis* PCC 6803 ist motil und besitzt die Fähigkeit zur phototaktischen Bewegung auf festem Untergrund (Choi et al. 1999). Nach einer persönlichen Mitteilung von Young Mok Park ist die Bewegung von *Synechocystis* 6803 calciumabhängig. Diese Nachricht führte zu der Überlegung, daß für eine Untersuchung des Einflusses von Calcium auf die Beweglichkeit der Originalstamm verwendet werden sollte; dieser Stamm wird im Folgenden als *Synechocystis* 6803 oder Wildtyp bezeichnet.

3.1 Immunologischer Nachweis von P-ATPasen

Es bestand die Möglichkeit, daß die Veränderung, die zum Verlust der Beweglichkeit in *Synechocystis* 6803nm geführt hatte, auch die Expression der P-ATPasen beeinflußt. In isolierten Membranen des unbeweglichen Stammes *Synechocystis* 6803nm konnte bislang keine der vier möglichen Calcium-ATPasen immunologisch nachgewiesen werden (Schnorr 1996). Hierfür waren der polyvalente Antikörper S2926, der gegen die in *Escherichia coli* überexprimierte Calcium-ATPase Sll1614 gerichtet ist, und der Peptid-Antikörper S2416, der gegen 15 konservierte Aminosäuren der ATP-Bindestelle von P-ATPasen gerichtet ist, eingesetzt worden (Geisler et al. 1998). Mit Hilfe dieser Antikörper wurden nun isolierte Cytoplasma- und Thylakoidmembranen des Originalstammes, die über ein Zweiphasensysten aufgereinigt wurden, untersucht.

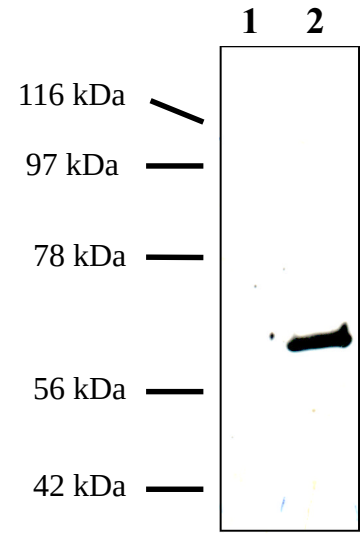


Abb. 18: Immunodetektion und Lokalisation von P-ATPasen in *Synechocystis*-Membranen

Isolierte Gesamtmembranen von *Synechocystis* 6803 wurden über ein Zweiphasensystem (Dextran/Polyethylenglycol) in Cytoplasma- und Thylakoidmembranen aufgetrennt. Jeweils 15 µg Protein der beiden Fraktionen wurde in einem 7,5 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die Detektion der P-ATPasen erfolgte durch den Peptid-Antikörper S2416. **1**: Cytoplasmamembranen, **2**: Thylakoidmembranen

In den Cytoplasmamembranen des Wildtyps konnte mit Hilfe des Peptid-Antikörpers S2416 keine P-ATPase detektiert werden. In der Spur der Thylakoidmembranen wurde eine Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 65 kDa markiert. Hierbei kann es sich nicht um eine der vier potentiellen Ca^{2+}-ATPasen handeln, da diese ein Molekulargewicht von rund 100 kDa besitzen. Auch unter Verwendung des polyvalenten Antiserums gegen die Calcium-ATPase `Sll1614` konnte keine P-ATPase in den isolierten Cytoplasmamembranen nachgewiesen werden (nicht gezeigte Daten).

3.2 Ausschalten der Ca^{2+}-ATPase- und Ca^{2+}-Austauscher-Gene

Zur Aufklärung der vermuteten Beteiligung der Calcium-ATPasen an der Bewegung oder an der Ca^{2+}-Toleranz wurden die Gene der P-ATPasen `sll1614`, `sll0822`, `sll0672`, `sll1076` und des Calcium Austauschers `sll1336` im Originalwildtypstamm von *Synechocystis* PCC 6803 ausgeschaltet. Für die Transformation wurden die selben Plasmide wie unter III.2.3.2 (Seite32) beschrieben verwendet. Die erhaltenen Transformanden wurden wiederum mittels PCR auf komplette Segregation der eingebrachten Resistenzkassette überprüft (Abbildungen 19-23).

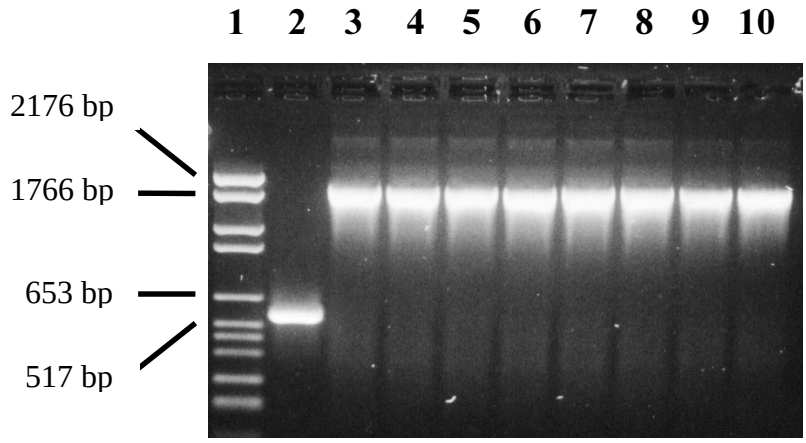


Abb. 19: Segregation der Kanamycinresistenzkassette in 1614-Mutanten

5‘-Primer: P1.2 1614: GCCACACACTGCTCTACGTA, 3‘-Primer: P2.2 1614: CTTGCCAAACCGGCTTGACT, PCR-Produkt der Wildtypkopie: 565 bp, PCR-Produkt mit inserierter Resistenzkassette: 1872 bp. Die Überprüfung der kompletten Segegration erfolgte durch PCR mit isolierter genomischer DNA der Mutanten. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. **1**: DNA-Marker VI, **2**: *Synechocystis* 6803, **3**: 1614, **4**: 1614/0822, **5**: 1614/0672, **6**: 1614/1076, **7**: 1614/0822/0672, **8**: 1614/0822/1076, **9**: 1614/0672/1076, **10**: 1614/0822/0672/1076

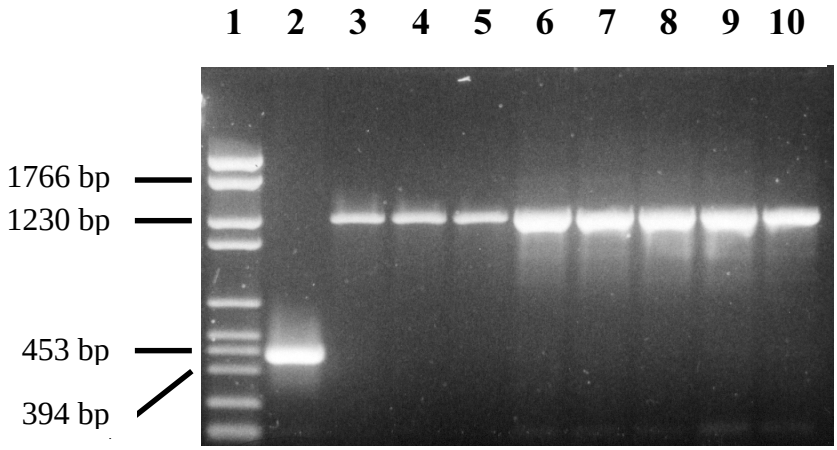


Abb. 20: Segregation der Spectinomycinresistenzkassette in 0822-Mutanten

5‘.Primer:K1 slr0822:TACTTTCATATGTCTGACCC, 3‘-Primer: P3 0822: CGCAGTACCTGGACTTTG, PCR-Produkt der Wildtypkopie: 449 bp, PCR-Produkt mit inserierter Resistenzkassette: 1248 bp. Die Überprüfung der kompletten Segregation erfolgte durch PCR mit isolierter genomischer DNA der Mutanten. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. **1**: DNA-Marker VI, **2**: *Synechocystis* 6803, **3**: 0822, **4**: 1614/0822, **5**: 0822/0672, **6**: 0822/1076, **7**: 1614/0822/0672, **8**: 1614/0822/1076, **9**: 0822/0672/1076, **10**: 1614/0822/0672/1076

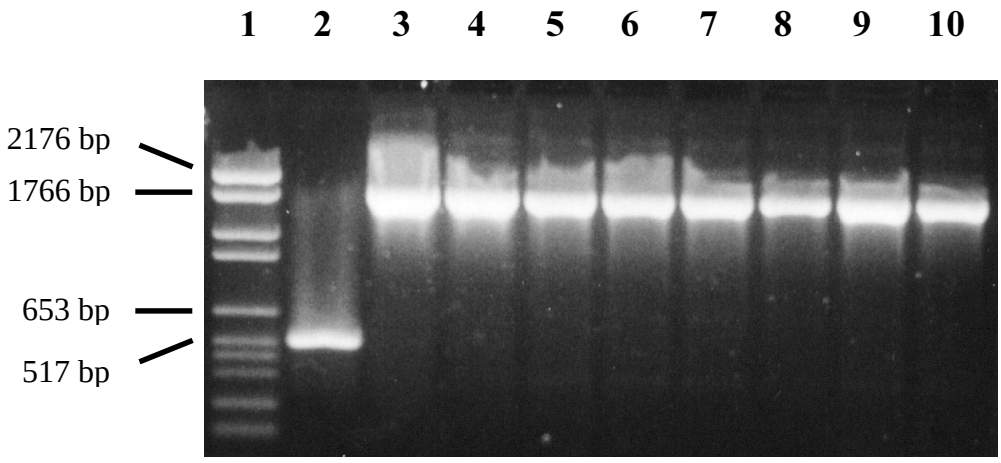


Abb.21 : Segregation des Chloramphenicoltransferasegens in 0672-Mutanten:

5‘-Primer: P1 0672: ACCCTCCGCAAACAACATGA, 3‘-Primer: P2 0672: AATGGTTGGGGGTATAGTTG, PCR-Produkt der Wildtypkopie: 525 bp, PCR-Produkt mit inserierter Resistenzkassette: 1856 bp. Die Überprüfung der kompletten Segregation erfolgte durch PCR mit isolierter genomischer DNA der Mutanten. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. **1**: DNA-Marker VI, **2**: *Synechocystis* 6803, **3**: 0672, **4**: 1614/0672, **5**: 0822/0672, **6**: 0672/1076, **7**: 1614/0822/0672, **8**: 1614/0672/1076, **9**: 0822/0672/1076, **10**: 1614/0822/0672/1076

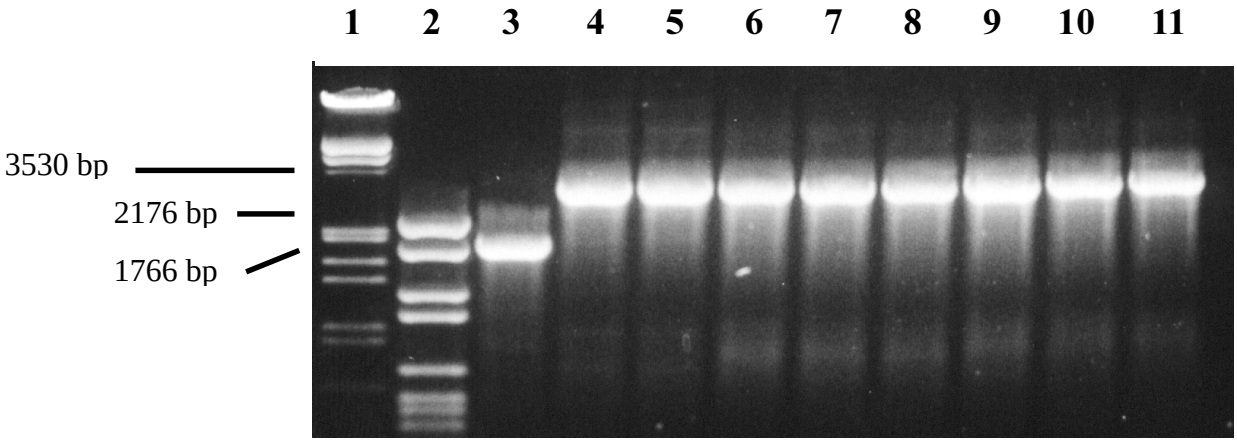


Abb. 22: Segregation der Erythromycinresistenzkassette in 1076-Mutanten:

5‘-Primer: P3 1076: CCAATGTTAAGCGGGAAC, 3‘-Primer: P2 1076: GTGATGGAGAATACTTGTCG, PCR-Produkt der Wildtypkopie: 1823 bp, PCR-Produkt mit inserierter Erythromycinresistenzkassette: 2928 bp. Die Überprüfung der kompletten Segregation erfolgte durch PCR mit isolierter genomischer DNA der Mutanten. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. **1**: DNA-Marker III, **2**: DNA-MarkerVI, **3**: *Synechocystis* 6803, **4**: 1076, **5**: 1614/1076, **6**: 0822/1076, **7**: 0672/1076, **8**: 1614/0822/1076, **9**: 1614/0672/1076, **10**: 0822/0672/1076, **11**: 1614/0822/0672/1076

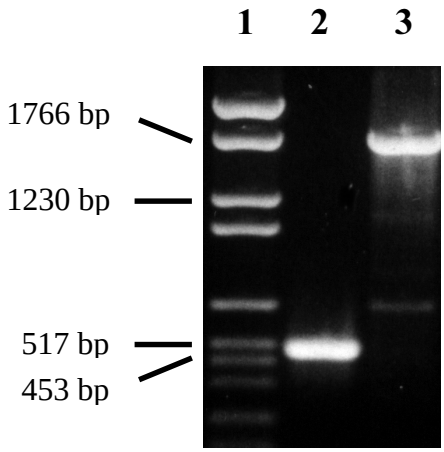


Abb. 23: Segregation der Erythromycinresistenkassette in 1336-Mutanten

5‘-Primer: P1 1336: TTGCAATACACCTCCACGGG, 3‘-Primer P2 1336: CCGACGATGACCAAGACTGG, PCR-Produkt der Wildtypkopie: 493 bp, PCR-Produkt mit inserierter Erythromycinresistenzkassette: 1814 bp. Die Überprüfung der kompletten Segegration erfolgte durch PCR mit isolierter genomischer DNA der Mutanten. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. **1**: DNA-MarkerVI, **2**: *Synechocystis* 6803, **3**: 1336

Auch bei der Transformation des Originalwildtyps von *Synechocystis* 6803 konnten Mutanten erhalten werden, in denen keine Wildtypsequenzen der jeweils ausgeschalteten Gene mittels PCR mehr nachweisbar waren.

3.2.1 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten von *Synechocystis* 6803

3.2.1.1 Effekt von Calcium auf das Wachstum

Als erster Punkt zur phänotypischen Charakterisierung der Mutanten wurde das Wachstum von Flüssigkulturen des Wildtyps, der Ca^{2+}-Austauschermutante 1336 und der Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076 verglichen. Alle Kulturen wurden zunächst unter Standardbedingungen angezogen. Bei Erreichen einer OD_{730} von 0,8 wurde ein Teil der Kulturen mit 2 mM $CaCl_2$ bzw. 100 mM $CaCl_2$ versetzt. Dies führte zu einer sofortigen Aggregation der Zellen, d.h. zu großen Zellansammlungen, was eine exakte Entnahme der Proben zur Bestimmung der Chlorophyllkonzentration verhinderte. Nach mehreren Tagen hatten sich die Zellaggregate aber wieder soweit aufgelöst, daß die Chlorophyllkonzentration als Maß für das Wachstum bestimmt werden konnte. Es zeigten sich im weiteren Verlauf keine deutlichen Unterschiede zwischen den Wildtypkulturen und Kulturen der Mutanten.

Auch bei den unter Standardbedingungen wachsenden Kulturen konnte kein verändertes Wachstum beobachtet werden.

3.2.1.2 Zellaggregation nach Calciumzugabe

Die bei der Aufnahme von Wachstumskurven beobachtete Aggregation der Zellen nach Calciumzugabe wurde im Folgenden genauer untersucht. Hierbei wurden die Reaktionen von *Synechocystis* 6803nm, *Synechocystis* 6803 und der Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076 auf die Zugabe von 2 mM $CaCl_2$ bzw. 10 mM $CaCl_2$ beobachtet. Die Ca^{2+}-Zugabe erfolgte zu zwei unterschiedlichen Wachstumszeitpunkten der Kulturen. Als Kontrolle für die Ca^{2+}-Spezifität der Aggregation wurden Kulturen mit 2 mM $MgCl_2$ versetzt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Stamm	**Zusatz**	**OD_{730} = 0,5**	**OD_{730} = 0,8**
Synechocystis 6803nm	Ohne Zusatz	-	-
Synechocystis 6803		-	-
1614/0822/0672/1076		-	-
Synechocystis 6803nm	2 mM $CaCl_2$	-	-
Synechocystis 6803		+	++
1614/0822/0672/1076		+	+++
Synechocystis 6803nm	10 mM $CaCl_2$	-	+
Synechocystis 6803		+	++
1614/0822/0672/1076		+	+++
Synechocystis 6803nm	2 mM $CaCl_2$ anschließend 5 mM EGTA	-	-
Synechocystis 6803		-	-
1614/0822/0672/1076		-	-
Synechocystis 6803nm	2 mM $MgCl_2$	-	-
Synechocystis 6803		-	-
1614/0822/0672/1076		-	-

Tab. 4: Zellaggregation nach Calciumzugabe

Kulturen von *Synechocystis* 6803nm, *Synechocystis* 6803 und 1614/0822/0672/1076 wurden unter Standardbedingungen angezogen und bei einer OD_{730} von 0,5 bzw. 0,8 mit den angegeben Zusätzen versetzt. Die Stärke der Aggregation wurde subjektiv mit – für keine Aggregation bis +++ für sehr schnelle Bildung großer Zellaggregate bewertet.

Beim nicht-motilen Stamm *Synechocystis* 6803nm war das Aggregationsverhalten nur sehr schwach ausgeprägt. Erst bei einer Ca^{2+}-Konzentration von 10 mM und einer OD_{730} von 0,8 bildeten sich kleine Zellaggregate. Der Wildtypstamm *Synechocystis* 6803 und die Vierfachmutante `1614/0822/0672/1076` dagegen reagierten bei der gleichen optischen Dichte der Kultur bereits bei niedrigerer Ca^{2+}-Konzentration mit der sofortigen Bildung von Zellaggregaten. Diese bildeten sich bei `1614/0822/0672/1076` noch etwas schneller und bestanden aus mehr Zellen als beim Wildtyp *Synechocystis* 6803. Die Zugabe der gleichen Menge $MgCl_2$ hatte keine Aggregation der Zellen zur Folge. Die nach Calciumzugabe entstandenen Zellaggregate konnten durch einen Überschuß des Calcium-Chelators EGTA innerhalb von Sekunden wieder aufgelöst werden.

3.2.1.3 Beschreibung der Kolonieform

Die Fähigkeit des Wildtyps von *Synechocystis* 6803, sich auf Agarplatten bewegen zu können, hat Auswirkungen auf die Kolonieform. Im Gegensatz zum nicht-motilen Stamm *Synechocystis* 6803nm, der kreisrunde, feste Kolonien bildet, zeichnet sich *Synechocystis* 6803 durch aufgelockerte, z.T. ungleichmäßig auslaufende Kolonien aus. Bei der Beobachtung von heranwachsenden Kolonien der Vierfachmutanten `1614/0822/0672/1076` fiel auf, daß die einzelnen Zellen einer Kolonie bereits nach den ersten Teilungen einen größeren Abstand zueinander hatten, was ein noch diffuseres Koloniebild im Vergleich zum Wildtyp zur Folge hatte. Einschränkend muß darauf hingewiesen werden, daß sowohl beim Wildtyp als auch bei der Vierfachmutante auf den Agarplatten Bereiche mit festeren Kolonien als auch weit auslaufende Kolonieformen beobachtet wurden. Jedoch traten bei der Mutante `1614/0822/0672/1076` die diffusen und weiter auslaufenden Kolonien deutlich häufiger auf als beim Wildtyp.

3.2.1.4 Bestimmung des cAMP-Gehaltes

Die beobachtete stärkere Beweglichkeit der Mutante `1614/0822/0672/1076` im Vergleich zum Wildtyp war ein subjektiver Eindruck, der sich nicht in Zahlen messen ließ. Die Beweglichkeit der Zellen jedoch soll im Zusammenhang mit der intrazellularen cAMP

Konzentration stehen (Terauchi & Ohmori 1999). Sowohl der nicht-motile Wildtyp *Synechocystis* 6803nm als auch die Mutante cya1 des motilen Wildtyps, in der ein von zwei vorhandenen Adenylatcyclase-Genen im Genom von *Synechocystis* 6803 ausgeschaltet wurde, zeigten eine drastisch verringerte intrazellulare cAMP Konzentration und einen nicht-motilen Phänotyp. In dem folgenden Versuch wurde untersucht, ob neben der gesteigerte Beweglichkeit der Mutanten auch der cAMP-Gehalt im Vergleich zum Wildtyp verändert ist.

Stamm	**fmol cAMP/µg Chlorophyll bei OD730=0,5**	**fmol cAMP/µg Chlorophyll bei OD730=0,8**
Synechocystis 6803nm	2 ± 1	n.d.
Synechocystis 6803	37 ± 17	841 ± 31
0822/0672/1076	n.d.	1469 ± 103
1614/0822/0672/1076	243 ± 73	n.d.

Tab. 5: cAMP Gehalt unter Standardbedingungen

Kulturen des nicht-motilen Stammes *Synechocystis* 6803nm, des Wildtyps, der Dreifachmutante 0822/0672/1076 und der Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076 wurden unter Standardbedingungen angezogen. Bei Erreichen der OD_{730} von 0,5 bzw. 0,8 wurde der intrazellulare cAMP Gehalt bestimmt. n.d.: nicht durchgeführt

Der cAMP Gehalt von *Synechocystis* 6803nm, *Synechocystis* 6803 und der P-ATPase-Mutanten war sehr unterschiedlich. Im unbeweglichen Stamm *Synechocystis* 6803nm konnte nur sehr wenig cAMP festgestellt werden. Die Drei- bzw. Vierfachmutanten zeigten bei gleicher optischer Dichte der Kultur im Vergleich zum Originalwildtyp einen deutlich erhöhten cAMP-Gehalt. Bei einer OD_{730} von 0,8 war der cAMP Gehalt der Dreifachmutante ungefähr doppelt so hoch wie beim Originalwildtyp. Der Unterschied zwischen Originalwildtyp und der Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076 bei einer OD_{730} von 0,5 war noch deutlicher. Hier war der cAMP Gehalt der Vierfachmutante um den Faktor 6,5 höher als beim Wildtyp. Zudem fällt auf, daß der cAMP Gehalt des Originalwildtyps mit zunehmender Dichte der Kultur sehr stark anstieg. Bei einer Erhöhung der OD_{730} von 0,5 auf 0,8 war der cAMP Gehalt auf mehr als das Zwanzigfache angestiegen.

Zur Überprüfung, ob die externe Zugabe von Ca^{2+} den cAMP-Gehalt beeinflussen kann, wurde unter Standardbedingungen wachsenden Kulturen 2 mM $CaCl_2$ zugesetzt und der cAMP Gehalt zu mehreren Zeitpunkten nach der Zugabe bestimmt. Als Kontrolle für die

Calciumspezifität der Reaktion wurden in einem Parallelansatz Kulturen mit 2 mM $MgCl_2$ versetzt.

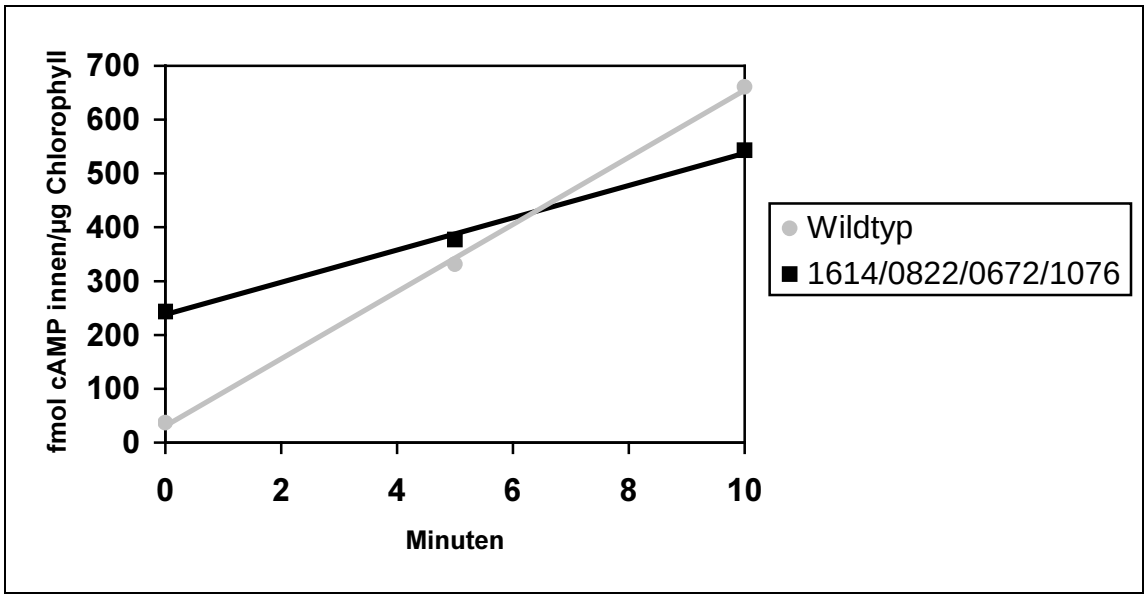


Abb. 24: cAMP Gehalt nach Ca^{2+}-Zugabe

Unter Standardbedingungen wachsenden Kulturen des Wildtyps und der Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076 wurden bei einer OD_{730} von 0,5 mit 2 mM $CaCl_2$ versetzt. Der cAMP Gehalt wurde unmittelbar vor sowie 5 und 10 Minuten nach der Calciumzugabe bestimmt.

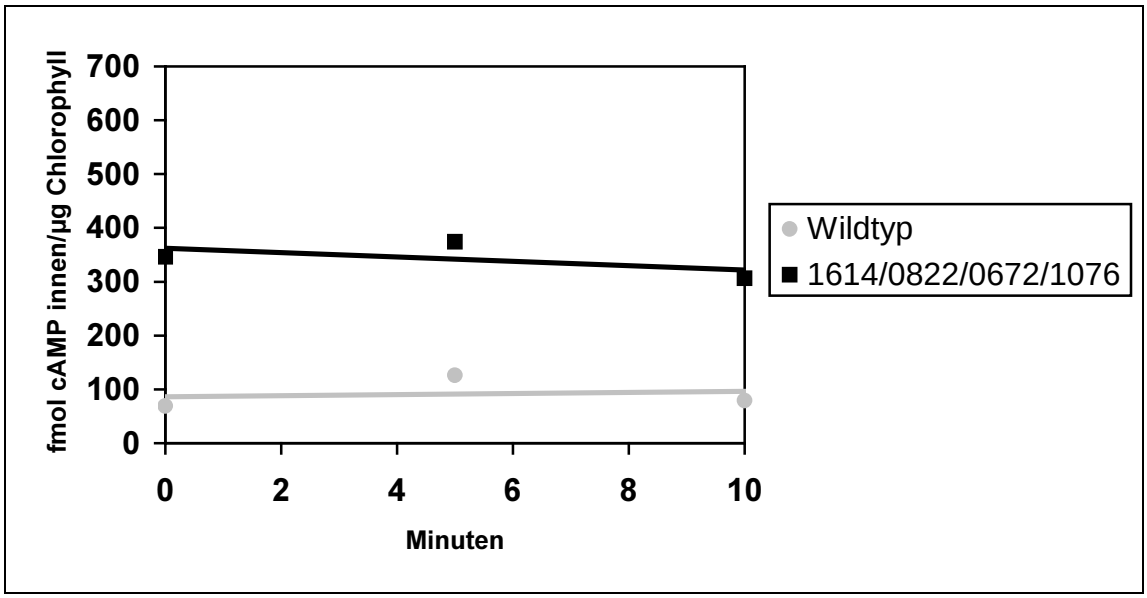


Abb. 25: cAMP Gehalt nach Mg^{2+}-Zugabe

Unter Standardbedingungen wachsenden Kulturen des Wildtyps und der Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076 wurden bei einer OD_{730} von 0,5 mit 2 mM $MgCl_2$ versetzt. Der cAMP Gehalt wurde unmittelbar vor sowie 5 und 10 Minuten nach der Magnesiumzugabe bestimmt.

Die plötzliche Erhöhung der Calciumkonzentration im Kulturmedium von 250 µM auf 2 mM führte sowohl beim Wildtyp als auch bei der Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076 zu einem starken Anstieg des intracellulären cAMP Gehaltes. Die cAMP Zunahme war beim Wildtyp mit 62 fmol cAMP/(µg Chlorophyll · min) ungefähr doppelt so hoch wie bei der Vierfachmutante mit 30 fmol cAMP/(µg Chlorophyll · min). Bei einer Messung des cAMP Gehaltes zu späteren Zeitpunkten nach der Calciumzugabe konnte beobachtet werden , daß in Wildtyp und Vierfachmutante der cAMP Spiegel nach Erreichen des Maximums bei 10 min. langsam wieder absinkt (nicht gezeigt). Die Zugabe von $MgCl_2$ zum Anzuchtmedium wirkte sich nicht auf den cAMP Spiegel aus (Abbildung 25).

IV Diskussion

1 Informationen aus der Sequenz der potentiellen Ca^{2+}-ATPasen

Die komplette Sequenzierung des Genoms von *Synechocystis* PCC 6803 hatte 9 Gene für P-Typ-ATPasen ergeben (Cyanobase), wovon die vier P-ATPasen `Sll1614`, `Slr0822`, `Sll0672` und `Sll1076` dem Typ IIA der Ca^{2+}-transportirenden P-ATPasen zugeordnet wurden (Abb. 6, S. 10, Palmgren und Axelsen 1998). Das berechnete Molekulargewicht beträgt jeweils rund 100 kDa. In den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der vier potentiellen Ca^{2+}-ATPasen sind keine Bindestellen für die regulatorischen Proteine eukaryotischer Ca^{2+}-ATPasen - Calmodulin und Phospholamban – vorhanden. Da auch im Genom von *Synechocystis* 6803 keine Calmodulin- oder Phospholambangene gefunden werden konnten, muß sich die Regulation der Ca^{2+}-ATPase-Aktivitäten aus *Synechocystis*, falls überhaupt erforderlich, von den typischen Regulationsmechanismen eukaryotischer Ca^{2+}-ATPasen unterscheiden.

Neben den codierenden Bereichen der P-ATPase-Gene können auch die flankierenden, nicht codierenden Bereiche sowie benachbarte Leseraster interessante Informationen enthalten. In prokaryotischen Organismen sind häufig mehrere Gene, die an einer gemeinsamen Funktion beteiligt sind, in Genclustern direkt hintereinander angeordnet. Dies ermöglicht eine gemeinsame Transkription und Regulation der benachbarten Gene. Auf dem Genom von *Synechocystis* 6803 sind bei allen vier potentiellen Ca^{2+}-ATPase-Genen unmittelbar benachbarte offene Leseraster mit gleicher Orientierung vorhanden (Tab. 1 S. 27). Für die ORFs `sll1611` bis `sll1615` konnte eine vermutete Kotranskription experimentell bestätigt werden (Geisler et al. 1996, Ahring 1998); zu den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der ORFs `sII1613` und `sII1611` konnten allerdings keine Homologien ermittelt werden. ORF `sll1612` weist 38 % Übereinstimmung mit der Folyl-Polyglutamat Synthetase (`FolC`) aus *Bacillus subtilis* auf (Mohan et al. 1989). Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von Folat zu Polyglutamatderivaten (Bognar et al. 1987); diese Reaktion steht in keinem erkennbaren Zusammenhang mit der Funktion der P-ATPase. In *Bacillus subtilis* befindet sich `folC` in einem Cluster mit Genen, die an der Sporulation beteiligt sind (Margolis et al. 1993); auch darin ist kein direkter Zusammenhang zur P-ATPase zu erkennen. ORF `sll1615` codiert

eine GTPase mit einem Molekulargewicht von rund 50 kDa (Geisler et al 1996). Alle Mitglieder der GTPase-Superfamilie sind konservierte molekulare Schalter, die durch GTP-Bindung kurzfristig angeschaltet werden (Bourne et al. 1991). In seiner Funktion als biologischer Schalter könnte die GTPase `Sll1615` aus *Synechocystis* theoretisch an der Regulation der P-ATPase `Sll1614` beteiligt sein.

Das benachbarten ORF des P-ATPase-Gens `sll0672` besitzt höchste Homologien zu einem Magnesium und Kobalt-transportierenden Protein; das ORF neben `sll0822` zu einem hypothetischen Protein aus *Cyanophora paradoxa*, dessen Funktion noch unbekannt ist. Sie liefern jedoch keine Hinweise auf eine Beziehung zu den potentiellen Ca^{2+}-ATPasen.

Auf den ersten Blick ist auch bei der Leucyl-t-RNA-Synthetase des ORFs `sll1074` kein Zusammenhang mit der Regulation der Calciumkonzentration zu erkennen. In *Escherichia coli* aber konnte gezeigt werden, daß ein einziger Basenaustausch in der Leucyl-tRNA zur Resistenz gegen den Calmodulin-Inhibitor 48/80 führte (Chen et al. 1991). Die Autoren vermuten, daß durch die Veränderung der sehr seltenen Leucyl-$tRNA_{CUA}$ die Translation von mRNAs mit vielen CUA-Codons herabgesetzt wird. Die synthetisierten Proteine wiederum der CUA-reichen mRNA könnten calciumbindende Proteine sein, die ein Target für den Calmodulin-Inhibitor 48/80 darstellen. Über eine mögliche Regulation der Expression durch tRNA-Spiegel wird spekuliert (Chen et al. 1991). In *Synechocystis* könnten die potentielle Ca^{2+}-ATPase `Sll1076` als calciumexportierendes Enzym und die Leucyl-tRNA-Synthetase als Voraussetzung für die effiziente Translation CUA-reicher mRNAs calciumbindender Proteine gemeinsam transkribiert werden. Beide Enzyme stünden somit in Verbindung zu Calcium und könnten bei den gleichen Bedingungen in der Zelle benötigt werden.

2 Expression der potentiellen Ca^{2+}-ATPasen

Die Ermittlung von Faktoren, die die Expression eines Gens beeinflussen, kann Hinweise auf die Funktion des Proteins liefern. Bisherige Untersuchungen zur Expression der potentiellen Ca^{2+}-ATPasen aus *Synechocystis* bezogen sich ausschließlich auf `sll1614` im nicht-motilen Stamm *Synechocystis* 6803nm; bei diesen Untzersuchungen konnte das `sll1614`-Transkript nur mittels der sehr sensitiven Methode der RT-PCR reproduzierbar nachgewiesen werden (Jakobs 1996). Ein immunologischer Nachweis der P-ATPase in aufgereinigten Cytoplasma- und Thylakoidmembranen unter Verwendung eines gegen die ATPase `Sll1614` gerichteten Antikörpers war nicht möglich. Erst durch den radioaktiven Nachweis eines phosphorylierten

Enzymintermediates in aufgereinigten Cytoplasmamembranen von *Synechocystis* 6803nm konnte die Existenz einer P-ATPase von rund 100 kDa in *Synechocystis* belegt werden (Geisler et al.1998). Da aber alle vier potentiellen Ca^{2+}-ATPasen von *Synechocystis* ein Molekulargewicht um die 100 kDa besitzen, ist mit dieser Methode keine Unterscheidung zwischen den vier P-ATPasen möglich. Der schwierige Nachweis sowohl der `sll1614` mRNA als auch des `Sll1614` Proteins lassen somit auf eine sehr schwache Expression von `sll1614` unter Standardbedingungen schließen.

Die Variation der Ca^{2+}-Konzentration im Anzuchtmedium bewirkte nur geringe Veränderungen des `sll1614` Transkriptgehalts. Bei Zusatz von 100 mM Ca^{2+} zum Anzuchtmedium war der `sll1614` Transkriptgehalt in *Synechocystis* 6803nm leicht verringert. Dies könnte in einer herabgesetzten Stabilität der `sll1614` mRNA in Gegenwart von 100 mM Ca^{2+} begründet sein, die die Translation allerdings beschleunigen könnte (Jakobs 1996).

Nach der Sequenzierung der drei weiteren potentiellen Ca^{2+}-ATPase-Gene `sll0822`, `sll0672` und `sll1076` wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression dieser P-ATPasen untersucht. RT-PCR-Untersuchungen mit isolierter RNA aus *Synechocystis* 6803nm zeigten bei keiner der potentiellen Ca^{2+}-ATPasen einen veränderten Transkriptgehalt als Reaktion auf die zweistündige Zugabe von 50 mM $CaCl_2$ (Abb. 7 S. 29); die Ergebnisse deuten darauf hin, daß der Transkriptgehalt der potentiellen Ca^{2+}-ATPasen nicht von der Calciumkonzentration des Anzuchtmediums abhängt.

In *Dictyostelium* wurde ein Anstieg der mRNA einer Ca^{2+}-ATPase nach Anzucht in Gegenwart von 80 mM Ca^{2+} beobachtet (Moniakis et al. 1995). Man kann vermuten, daß bei *Dictyostelium* die Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration im Anzuchtmedium eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration zur Folge hat; so wurde beispielsweise für die PMCA aus Endothelzellen der Ratte gezeigt, daß an einer Signaltransduktionskette, die zur Induktion der PMCA mRNA führt, intrazelluläre Calciumsignale beteiligt sind (Kuo et al. 1993).

Bei *Synechocystis* muß die Zugabe von $CaCl_2$ zum Außenmedium nicht unbedingt zu einer Veränderung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration führen, womit die fehlenden Effekte erklärt werden könnten. Da vermutet wurde, daß durch die Deletion oder Überexpression von `sll1614` in den Mutanten `1614`nm und *Synechocystis* 6803nmMRP die Calciuminnenkonzentration verändert ist, wurde überprüft, ob sich in diesen Mutanten der mRNA-Gehalt der drei anderen potentiellen Ca^{2+}-ATPasen im Vergleich zu *Synechocystis* 6803nm unterscheidet.

Abbildung 8 (S. 30) zeigt allerdings, daß der Transkriptgehalt der P-ATPasen Sll0822, Sll0672 und Sll1076 in *Synechocystis* 6803nm, 1614nm und *Synechocystis* 6803nmMRP jeweils identisch war. Demnach bewirkte das Ausfallen einer der Ca^{2+}-ATPasen (Sll1614) keine Veränderung der Transkriptgehalte der anderen potentiellen Ca^{2+}-ATPasen.

Alle bisherigen Untersuchungen zur Expression von sll1614 sind am nicht-motilen Stamm *Synechocystis* 6803nm durchgeführt worden. Da die Fähigkeit zur Bewegung auf festem Untergrund vermutlich calciumabhängig ist (Park, persönliche Mitteilung) und *Synechocystis* 6803nm diese Fähigkeit verloren hat, könnte auch die Regulation der Expression der Ca^{2+}-ATPasen durch Ca^{2+} in diesem Stamm beeinträchtigt sein. Deshalb wurden Cytoplasmamembranen und Thylakoidmembranen aus dem beweglichen Wildtypstamm *Synechocystis* 6803 isoliert und eine Immundetektion mit Antikörpern gegen das aktive Zentrum von P-ATPasen und gegen die in *Escherichia coli* überexpremierte ATPase Sll1614 durchgeführt (Abb. 18, S. 43).

Es ergab sich, daß auch im Wildtypstamm weder in der Cytoplasmamembran noch in der Thylakoidmembran eine der potentiellen Ca^{2+}-ATPasen mit einem Molekulargewicht von rund 100 kDa nachgewiesen werden konnte. Die einzige Proteinbande, die von den Antikörpern detektiert wurde, befand sich in der Thylakoidmembran. Aufgrund der geringen Größe von ca. 65 kDa konnte es keine der potentiellen Ca^{2+}-ATPasen sein. Nach der Größe des markierten Proteins zu urteilen müßte es sich um die P-ATPase Sll0797 handeln. Diese wurde von Axelsen und Palmgren (1998) dem Typ IB mit einer Spezifität für Cd^{2+} zugeordnet. Eine P-ATPase (PacS) in *Synechococcus* PCC 7942 konnte in der Thylakoidmembran lokalisiert werden (Kanamaru et al. 1994); PacS besitzt zwar eine Spezifität für Cu^{2+}, gehört aber wie Sll0797 dem Typ IB der P-ATPase Familie an. Über die Lokalisation der potentiellen Ca^{2+}-ATPasen kann aus diesem Experiment keine Aussage getroffen werden, da ihre Expression auch im Originalwildtyp von *Synechocystis* 6803 unter Standardbedingungen so gering ist, daß sie mit Hilfe der verwendeten Antikörper nicht nachgewiesen werden können. Erst durch Überexpression von sll1614 in der Mutante *Synechocystis* 6803nmMRP konnte diese Ca^{2+}-ATPase in der Cytoplasmamembran von *Synechocystis* lokalisiert werden (Schnorr 1996). Bedingungen, unter denen die Expression der Ca^{2+}-ATPasen im Wildtyp von *Synechocystis* 6803 gesteigert wird, konnten nicht ermittelt werden; wahrscheinlich reichen sehr geringe Mengen der Ca^{2+}-ATPasen für die Ausübung ihrer Funktion aus, und eine Regulation wäre nicht erforderlich.

3 Phänotypische Charakterisierung der P-ATPase-Mutanten

Für die Aufklärung der physiologischen Bedeutung der Ca^{2+}-ATPasen aus *Synechocystis* konnten die Untersuchungen zur Expression der vier potentiellen Ca^{2+}-ATPasen keinen Beitrag leisten. Daher wurden die Gene `sll1614`, `sll0822`, `sll0672` und `sll1076` gezielt ausgeschaltet; durch das Fehlen der Genprodukte sollten phänotypische Veränderungen in den Mutanten auftreten, die Rückschlüsse auf die Funktion der P-ATPase erlauben. Da die Möglichkeit bestand, daß sich die vier potentiellen Ca^{2+}-ATPasen gegenseitig ersetzen können, mußten neben den Einfachmutanten, in denen jeweils nur ein Gen ausgeschaltet wurde, auch Mehrfachmutanten hergestellt werden. Nach jedem Transformationsschritt wurde die komplette Segregation aller bisher ausgeschalteter Gene mittels PCR überprüft. Es überraschte, daß sowohl für den nicht-motilen Stamm *Synechocystis* 6803nm als auch für den Wildtypstamm *Synechocystis* 6803 komplett segregierte Vierfachmutanten erhalten werden konnten, in denen alle Gene für potentielle Ca^{2+}-ATPasen ausgeschaltet waren (Abb. 11-15, S. 36-38 / Abb. 19-23, S. 44-46). Auch die Wachstumsgeschwindigkeiten unter Standardbedingungen waren für Wildtyp und Mutanten gleich. Demnach sind für ein normales Wachstum von *Synechocystis* unter Standardbedingungen keine Ca^{2+}-ATPasen notwendig. Dieses Ergebnis läßt sich gut mit der ermittelten extrem schwachen Expression der potentiellen Ca^{2+}-ATPasen unter Standarbedingungen vereinbaren.

3.1 Wachstum unter Calcium-Streß

Ca^{2+}-ATPasen dienen dem Export von Calciumionen aus dem Cytoplasma. Daher konnte vermutet werden, daß bei einer Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration des Anzuchtmediums und einem möglicherweise darauf folgenden Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration die Ca^{2+}-exportierenden P-ATPasen benötigt werden.

Zugabe von 2-100 mM $CaCl_2$ zu unter Standardbedingungen wachsenden Kulturen zeigten jedoch keine Wachstumsunterschiede zwischen dem Wildtyp (bzw. *Synechocystis* 6803nm) und den entsprechenden Vierfachmutanten (Abb. 16, S. 39 / Abschnitt III.3.2.1.1. S. 46). Die Ca^{2+}-ATPasen von *Synechocystis* sind somit selbst für ein Wachstum bei stark erhöhten Ca^{2+}-Außenkonzentrationen entbehrlich. Ein ähnliches Ergebnis erhielten Berkelmann et al. (1994) für die Deletionsmutante ΔPacL von *Synechococcus* PCC7942. Sie schalteten ebenfalls ein

Gen einer P-Typ-Ca^{2+}-ATPase aus; der Verlust der Calcium-ATPase wirkte sich nicht auf das Wachstum auch bei Ca^{2+}-Konzentrationen von bis zu 100 mM aus. Isolierte Cytoplasmamembranen aus ΔPacL zeigten im Gegensatz zum Wildtyp keine ATP-abhängige Ca^{2+}-Transportaktivität mehr, so daß weitere Gene für Ca^{2+}-ATPasen in *Synechococcus* 7942 eher unwahrscheinlich sind. Die Autoren vermuten, daß das Fehlen eines Ca^{2+}-sensitiven Phänotyps entweder in einem fehlenden toxischen Effekt von erhöhten cytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentrationen oder im Vorhandensein alternativer Ca^{2+}-exportierender Enzyme wie $Ca^{2+}/H^{+}(Na^{+})$-Austauscher begründet ist.

In *Synechocystis* 6803 ist ein solcher Ca^{2+}-Austauscher vorhanden. ORF sll1336 besitzt hohe Homologie zu einem Ca^{2+}/H^{+}-Austauscher aus *Saccharomyces cerevisiae* (CyanoBase). Aber auch das alleinige Ausschalten dieses Gens in der *Synechocystis* 6803 Mutante 1336 führte nicht zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Ca^{2+}. Demnach reicht das Vorhandensein entweder des Calcium-Austauschers oder der vier potentiellen Ca^{2+}-ATPasen aus, um ein normales Wachstum bei erhöhten Calciumkonzentrationen zu ermöglichen.

3.2 Zellaggregation nach Ca^{2+}-Zugabe

Die Zugabe von Ca^{2+} zu wachsenden Flüssigkulturen von *Synechocystis* bewirkte eine Aggregation der Zellen (Tab. 4, S. 47) und hatte in Abhängigkeit von der Größe der Zellaggregate ein deutlich schnelleres Absinken der Zellen zur Folge (Abb. 17, S. 41). Ein ähnliches Verhalten wurde beim fruchtkörperbildenden Bakterium *Myxococcus xanthus* beobachtet (Kim et al. 1999). Bei schlechten Umweltbedingungen lagern sich die einzelnen Zellen zu Fruchtkörpern zusammen, in deren Innern sich die Myxosporen entwickeln. Für die Aggregation der Zellen sind an die Zelloberfläche assoziierte Fibrillen - bestehend aus Proteinen und Polysacchariden - verantwortlich. Die Synthese der Fibrillen steigt deutlich an, wenn die Zellen in die stationäre Wachstumsphase eintreten. Durch die Zugabe von Ca^{2+} kann aber auch in logarithmisch wachsenden Kulturen die Synthese der Fibrillen und die daraus folgende Aggregation der Zellen induziert werden. Auch beim Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* ist die Zusammenlagerung der Zellen zu Fruchtkörpern calciumabhängig (Wong et al. 1996). Das Adhäsionsprotein (DdCAD-1) bindendet Calcium und kann sowohl im Cytoplasma als auch an der Zelloberfläche lokalisiert sein. Besonders häufig ist es an Zell-Zell-Kontaktstellen zu finden. Die Expression des entsprechenden cadA-Gens wird zu Beginn des Entwicklungszyklus induziert (Yang et al. 1997).

Auch im Genom von *Synechocystis* 6803 ist ein ORF (`sll1951`) vorhanden, dessen Protein Homologien zu extrazellulären Ca^{2+}-bindenden Proteinen besitzt (Bhaya et al. 1999). Im C-Terminus des Proteins befindet sich eine für diese Enzymklasse typische, aus 9 Aminosäuren bestehende Calcium-Bindestelle mit der Sequenz: **LVGGRGNDT**. Es können durchaus auch noch weitere calciumbindende Proteine vorhanden sein. Befinden sich solche Proteine an der Zelloberfläche, kann es durch die Zugabe von Calcium zu Konformationsänderungen kommen, die bei Zell-Zell-Kontakt zum gegenseitigen „Anhaften“ der Zellen führen. Dies würde die sofortige Aggregation von *Synechocystis* 6803 nach Calciumzugabe erklären. Die Zellaggregate werden durch den Ca^{2+}-Chelator EGTA innerhalb von Sekunden wieder aufgelöst; vermutlich werden die Calciumionen wieder aus den Proteinbindestellen entfernt und die Ablösung der Zellen voneinander wäre wieder möglich.

Die beobachteten Unterschiede im Aggregationsverhalten zwischen dem nicht-motilen Stamm *Synechocystis* 6803nm, dem Wildtypstamm *Synechocystis* 6803 und der Vierfachmutante `1614/0822/0672/1076` (Tab. 4, S. 47) könnten auf unterschiedliche Mengen der calciumbindenden Proteine an der Zelloberfläche zurückgehen und sind letztendlich auf unterschiedliche Expression ihrer Gene einschließlich ihres Transports zur Zelloberfläche zurückzuführen. Man kann vermuten, daß im nicht-motilen Stamm *Synechocystis* 6803nm nur sehr wenige calciumbindenden Proteine an der äußeren Membran vorhanden sind, wodurch die Zellen nur sehr langsam zu kleineren Ansammlungen aggregieren. Der Wildtypstamm *Synechocystis* 6803 könnte eine größere Anzahl dieser Proteine an der Zelloberfläche besitzen, die in der Vierfachmutante `1614/0822/0672/1076` noch etwas erhöht wäre. Für den Zusammenhang des Aggregationsverhaltens mit der optischen Dichte der Kultur (Tab. 4, S. 47) könnte eine wachstumsphasenabhängige Expression der calciumbindenden extrazellulären Proteine verantwortlich sein. Mit zunehmender Zelldichte der Kultur werden die äußeren Bedingungen schlechter, was eine Steigerung der Expression der calciumbindenden Proteine bewirken könnte. Möglicherweise kann auch in *Synechocystis* 6803 die Expression der extrazellulären Ca^{2+}-bindenden Proteine ähnlich wie in *Myxococcus xanthus* durch die Zugabe von Ca^{2+} zum Medium induziert werden.

Über den Sinn der Aggregation bei hohen Ca^{2+}-Konzentrationen kann nur spekuliert werden. Vielleicht dient die Aggregation lediglich dem Schutz einzelner Zellen vor zu hohen Calciumkonzentrationen des Mediums; die inneren Zellen eines Aggregats wären durch die umgebenden Zellen vom Medium abgeschirmt.

3.3 Bewegung auf festem Untergrund

Ähnlich wie beim Aggregationsverhalten traten auch bei der Bewegung auf Agarplatten deutliche Unterschiede zwischen dem nicht-motilen Stamm *Synechocystis* 6803nm und dem Wildtypstamm *Synechocystis* 6803 auf; leichte Unterschiede wurden auch zwischen *Synechocystis* 6803 und der daraus hergestellten Vierfachmutante `1614/0822/0672/1076` beobachtet. *Synechocystis* 6803nm hat die Fähigkeit zur Bewegung verloren. Dieser Stamm bildete bei der Anzucht auf Agarplatten feste, kreisrunde Kolonien. Der Wildtypstamm dagegen ist beweglich und bildete aufgelockerte, auslaufende Kolonien. Bei der Vierfachmutante `1614/0822/0672/1076` waren noch häufiger als beim Wildtyp stark auseinanderlaufende Bereiche zu erkennen.

Der genaue Bewegungsmechanismus gleitender Bakterien ohne Flagellen ist noch nicht geklärt. In *Myxococcus xanthus* sind rund 100 Gene an der Regulation und Ausübung der gleitenden Bewegung beteiligt (MacNeil et al. 1994, Youderian 1998). Beim Cyanobakterium *Phormydium unicatum* wird während der Bewegung durch spezielle Poren ein Heteropolysaccharid ausgeschieden. Die entstehenden Polysaccharidfibrillen sind zunächst über das calciumbindende Glykoprotein Oscillin mit der Zelle verbunden. Der Polysaccharidschleim haftet auf der festen Oberfläche und die Zellen schieben sich durch die fortlaufende Polysaccharidsynthese innerhalb der Schleimhülle vorwärts (Hoiczyk und Baumeister 1997, 1998).

Die Zelloberfläche von *Synechocystis* 6803 ist im Gegensatz zu *Phormidium unicatum* mit Pili besetzt. Diese sind für die phototaktischen Bewegung der Zellen essentiell, was auf einen anderen Bewegungsmechanismus von *Synechocystis* hindeutet. Das Ausschalten der beiden benachbarten Pilin-Gene `pilA1` (`sll1694`) und `pilA2` (`sll1695`) in *Synechocystis* führte zum Bewegungsverlust. Auch die Deletion des `sigF`-Gens (`sll1564`), das für einen alternativen Sigma-Faktor mit höchster Homologie zum streßaktivierten Sigmafaktor `sigB` aus *Bacillus subtilis* codiert, führte durch das Fehlen sämtlicher Pili zum nicht-motilen Phänotyp. Die `sigF`-Mutante zeichnete sich zusätzlich durch die Produktion von gelb-braunen und UV-absorbierenden Pigmenten aus, die gemeinsam mit einem 200-kDa-Protein ins Medium abgegeben werden. Durch N-terminale Sequenzierung des abgelösten Proteins konnte es dem ORF `sll1951` von *Synechocystis* 6803 zugeordnet werden. Es besitzt Homologien zu extrazellulären calciumbindenden Proteinen wie dem an der Bewegung beteiligten Oscillin aus *Phormidium unicatum* (Bhaya et al. 1999). Die Autoren schließen aus

ihren Ergebnissen, daß `sigF` in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor sowohl für die Expression der Pilingene `pilA1` und `pilA2` als auch für die Aktivierung von Genen, die für den korrekten Aufbau der Zellhülle wichtig sind, verantwortlich ist. Ähnlich wie `SigB` in *Bacillus subtilis* könnte `SigF` aus *Synechocystis* die Anpassung an Streßbedingungen regulieren. In *Synechocystis* 6803 könnte dies durch die Veränderung der Zelloberfläche einschließlich der für die Bewegung notwendigen Pilisynthese erfolgen (Bhaya et al. 1999). Solche Streßbedingungen könnten beispielsweise der Nährstoff- und Lichtmangel beim Wachstum auf Agarplatten sein. Läßt man Kolonien von *Synechocystis* 6803 über mehrere Wochen wachsen, so bilden sich zunächst Kolonien, in denen die Zellen auch in großer Zahl übereinander wachsen. Dann kommt es plötzlich zu einem flächigen „Ausschwärmen“ von Zellen in die Umgebung (Abbildung 26), wodurch sich die Grundfläche der Kolonie innerhalb von mehreren Tagen vervielfachen kann.

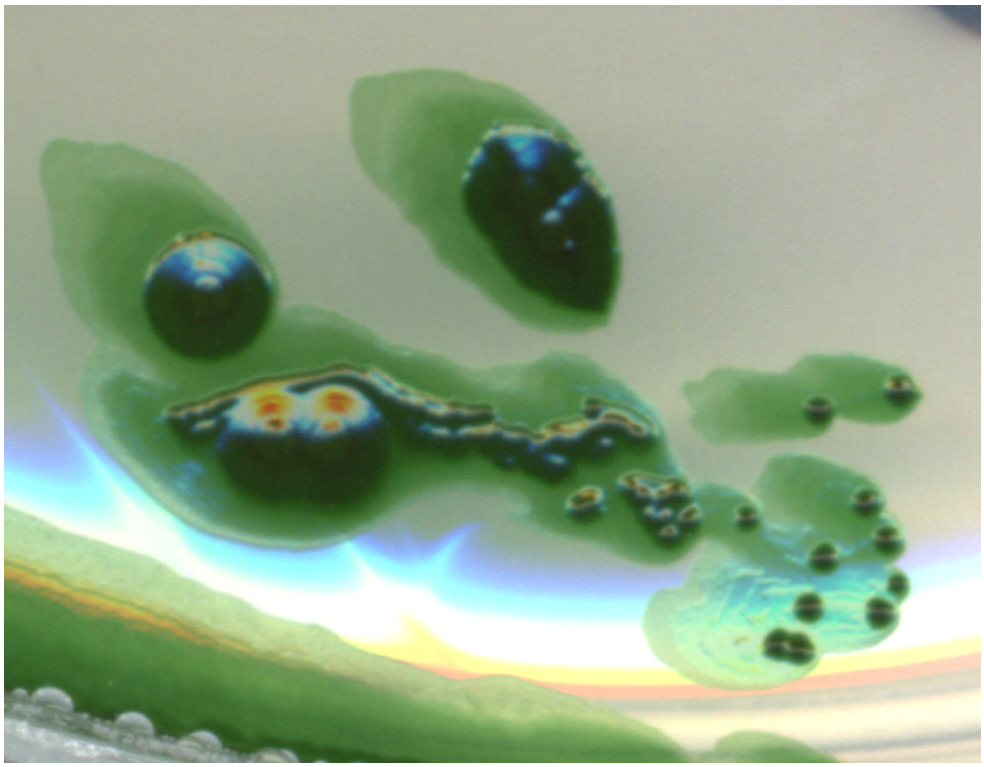


Abb. 26: „Ausschwärmen“ der Zellen in der stationären Wachstumsphase

Gezeigt sind 6 Wochen alte Kolonien von *Synechocystis* 6803 auf BG11-Agarplatten vier Tage nach Beginn des „Ausschwärmens“. Die dunkelgrünen Bereiche zeigen die aus übereinander gewachsenen Zellen bestehenden Kolonien. Die umgebenden hellgrünen Bereiche sind erst vor vier Tagen aus den dunkelgrünen Kolonien entstanden. Sie bestehen nur aus einer bzw. 2 Zellschichten.

Für das plötzliche „Ausschwärmen“ der Zellen könnte eine Aktivierung von `SigF` ausgelöst durch die schlechter gewordenen Umweltbedingungen verantwortlich sein. Dies würde

wiederum die Pilisynthese und die Expression von Genen, die für den korrekten Einbau des calciumbindenden Proteins Sll1951 in die Zellhülle verantwortlich sind, steigern. Bereits bei der Diskussion des Aggregationsverhaltens von *Synechocystis* (S.57-58) wurde eine mögliche Regulation extrazellulärer calciumbindender Proteine (z.B. Sll1951) angesprochen. In diesem Regulationsmechanismus könnte der alternativen Sigmafaktor SigF eine Schlüsselrolle spielen. In der Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076 könnte SigF früher und / oder stärker aktiviert sein, was zu einer höheren Präsenz calciumbindender Proteine an der Zellöberfläche und zu einer verstärkten Pilisynthese führen würde. Dies würde sowohl das stärkere Aggregationverhalten als auch die höhere Beweglichkeit von 1614/0822/0672/1076 im Vergleich zum Wildtyp erklären.

3.4 cAMP-Gehalt

Neben dem Vorhandensein von Pili und des alternativen Sigmafaktors SigF ist auch der intrazelluläre cAMP-Gehalt wichtig für die Bewegung von *Synechocystis* 6803. Im Genom sind zwei Gene gefunden worden, die jeweils im C-Terminus eine Region mit Homologie zur katalytischen Domäne von Adenylatcyclasen besitzen; sie wurden daher mit cya1 (sll1991) und cya2 (sll0646) bezeichnet (Terauchi und Ohmori 1999). Im N-terminalen Bereich, der vermutlich regulatorische Elemente enthält, weisen die beiden Adenylatcyclasen kaum Übereinstimmungen untereinander auf. Cya2 besitzt im Gegensatz zu Cya1 hydrophobe Regionen, die vermutlich eine Membran durchspannen. Die Deletion von cya1 führte zu einem stark reduzierten intrazellulären cAMP-Gehalt (cya1 Mutante: 8 pmol cAMP/mg Chl, Wildtyp: 193 pmol cAMP/mg Chl) und zu einem nicht-motilen Phänotyp. Ausschalten von cya2 dagegen bewirkte nur eine sehr geringe Abnahme des intrazellulären cAMP-Gehaltes (176 pmol cAMP/mg Chl) und keine Veränderung der Beweglichkeit. Messungen am nicht-motilen Stamm *Synechocystis* 6803nm ergaben auch hier einen sehr geringen cAMP-Gehalt vergleichbar dem der Cya1-Mutante. Die Autoren vermuten, daß cAMP als *second messenger* dient, der Umweltsignale weiterleitet und die Aktivität von an der Bewegung beteiligten Proteinen wie z.B. dem extrazellulärem Glycoprotein Sll1951 reguliert. Eine Reaktion des intrazellulären cAMP-Gehaltes auf äußere Einflüsse wie Licht-Dunkelheit oder den pH-Wert wurde bereits 1989 im Cyanobakterium *Anabaena cylindrica* gemessen (Ohmori 1989).

Die Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076, in der alle potentiellen Ca^{2+}-ATPasen ausgeschaltet sind, machte im Vergleich zum Wildtyp von *Synechocystis* 6803 einen beweglicheren Eindruck. Der von Terauchi und Ohmori festgestellte Zusammenhang zwischen intrazellulärem cAMP-Gehalt und der Bewegung von *Synechocystis* 6803 ließ vermuten, daß neben der gesteigerten Beweglichkeit der Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076 auch ihr cAMP-Gehalt verändert ist.

Beim Vergleich des intrazellulären cAMP-Gehaltes zwischen Wildtyp und der Vierfachmutante in unter Standardbedingungen angezogenen Zellen konnte tatsächlich ein deutlicher Unterschied festgestellt werden (Tab. 5, S. 49). Der intrazelluläre cAMP-Gehalt der Vierfachmutante war um den Faktor 6,5 höher als beim Wildtyp. Zusätzlich zum deutlichen Unterschied zwischen Wildtyp und 1614/0822/0672/1076 konnte auch eine extreme Abhängigkeit des cAMP-Gehaltes von der Wachstumsphase gemessen werden. Bei einer Erhöhung der OD_{730} von 0,5 auf 0,8 war der cAMP Gehalt in *Synechocystis* 6803 von 37 pmol cAMP/µg Chl auf 841 pmol cAMP/µg Chl angestiegen.

Worin könnte nun der Zusammenhang zwischen dem Fehlen aller potentiellen Ca^{2+}-ATPasen und dem erhöhten cAMP-Gehalt bestehen? Es ist gut vorstellbar, daß in der Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076 die cytoplasmatische Ca^{2+}-Konzentration im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist. Sie besitzt für den Export von Calciumionen nur einen Ca^{2+}-Austauscher, der für die Grobregulation der Calciumkonzentration verantwortlich sein könnte; die hochaffinen P-ATPasen für die Feinregulation fehlen. Durch die erhöhte cytoplasmatische Ca^{2+}-Konzentration könnte die Adenylatcyclase aktiviert werden. Eine aus *Anabaena* sp ATCC 29151 isolierte Adenylatcyclase konnte durch Zusatz von Ca^{2+} zum Reaktionsansatz aktiviert werden (Faktor2). Die zusätzliche Zugabe eines aus dem gleichen Organismus isolierten calmodulinähnlichen Proteins führte sogar zu einer Steigerung der Adenylatcyclaseaktivität um den Faktor 33 (Bianchini et al. 1990). Somit könnte in *Synechocystis* 6803 eine Erhöhung der cytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration über eine Aktivierung der Adenylatcyclase zu einem erhöhten cAMP-Gehalt führen.

Die Messung des cAMP-Gehaltes nach plötzlicher Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration im Anzuchtmedium (Abb. 24, S. 50) ergab in der Tat einen Zusammenhang zwischen Calciumkonzentration und cAMP-Gehalt. In *Synechocystis* 6803 und der Vierfachmutante 1614/0822/0672/1076 führte die Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration im Anzuchtmedium zu einem deutlichen Anstieg des cAMP-Gehalts mit einem Maximum nach ca. 10 Minuten. Anschließend sank der cAMP-Gehalt wieder ab. Die als Kontrolle für die Calciumspezifität

der Reaktion durchgeführte Zugabe der gleichen Menge Mg^{2+} hatte keinen Effekt auf den cAMP-Gehalt der Zellen (Abb. 25, S. 50). Dieses Ergebnis unterstützt die Theorie einer calciumabhängigen Regulation der Adenylatcyclase. Der Anstieg des cAMP-Gehalts im Wildtyp verlief steiler als bei der Vierfachmutante `1614/0822/0672/1076`; man muß aber berücksichtigen, daß der cAMP-Gehalt des Wildtyps im Moment der Calciumzugabe deutlich geringer war als beim Wildtyp. Der höhere cAMP-Gehalt der Vierfachmutante `1614/0822/0672/1076` könnte auch von einer höheren Aktivität der cAMP-abbauenden Phosphodiesterase begleitet gewesen sein. So aktiviert beispielsweise das calmodulinähnliche Protein aus *Anabaena* nicht nur die endogene Adenylatcyclase, sondern auch die cAMP-Phosphodiesterase aus Rinderhirn (Bianchini et al. 1990). Eine durch das Fehlen der Ca^{2+}-ATPasen bedingte höhere cytoplasmatische Calciumkonzentration in `1614/0822/0672/1076` bereits vor der Erhöhung der Calciumkonzentration im Anzuchtmedium könnte somit nicht nur die Adenylatcyclase aktiviert haben sondern auch die cAMP-Phosphodiesterase. Diese könnte den schwächeren Anstieg des cAMP-Gehalts nach Calciumzugabe in der Vierfachmutante `1614/0822/0672/1076` verursacht haben. Welche der beiden Adenylatcyclasen aus *Synechocystis* 6803 für den erhöhten cAMP-Gehalt der Vierfachmutante `1614/0822/0672/1076` und nach Calciumzugabe verantwortlich ist, kann aus diesem Versuch nicht geschlossen werden.

Mit der Messung des intrazellulären cAMP-Gehaltes konnte gezeigt werden, daß der cAMP-Gehalt unter Standardbedingungen in der Vierfachmutante `1614/0822/0672/1076` deutlich erhöht ist im Vergleich zum Wildtyp. Der cAMP-Gehalt steigt in *Synechocystis* mit zunehmender Dichte der Kultur langsam an, kann aber auch durch die plötzliche Zugabe von Calciumionen innerhalb weniger Minuten deutlich erhöht werden.

Es kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, daß die beobachteten Effekte der Vierfachmutante `1614/0822/0672/1076` und die Reaktionen nach Ca^{2+}-Zugabe auf eine erhöhte cytoplasmatische Calciumkonzentration zurückzuführen sind. Untersuchungen an *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* haben ergeben, daß beide Organismen auf die Zugabe von Ca^{2+} mit einem starken Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration innerhalb von Sekunden und einer anschließend über mehrere Minuten verlaufenden Regulierung auf das Ausgangsniveau reagieren (Knight et al. 1991, Herbaud et al. 1998). Diese mit Hilfe des lumineszierenden Proteins Aequorin erhaltenen Ergebnnisse lassen vermuten, daß auch *Synechocystis* 6803 mit einem transienten Anstieg der cytoplasmatischen Calciumkontentration auf eine Erhöhung der externen Ca^{2+}-Konzentration reagiert. Versuche,

das Aequorinsystem für die Messung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration in Cyanobakterien zu verwenden, führten zu keinem Ergebnis. Die beobachteten Einflüsse der Deletion aller potentieller Ca^{2+}-ATPase-Gene und der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration auf den cAMP-Gehalt erlauben aber dennoch Spekulationen über eine Verknüpfung der beiden *second messenger* Ca^{2+} und cAMP in *Synechocystis* 6803.

4 Theorie zu einer Signaltransduktionskette in *Synechocystis* PCC 6803

Ausgelöst durch schlechte Umweltbedingungen wie Licht- oder Nährstoffmangel könnten in *Synechocystis* 6803 Ca^{2+}-spezifische Kanäle in der Cytoplasmamembran geöffnet werden und Calciumionen würden entlang des Konzentrationsgradienten vom periplasmatischen Raum ins Cytoplasma einströmen. Für diesen Einstrom könnte sowohl das von ORF `sll0875` codierte Protein mit sehr hoher Homologie zu mechanosensitiven Calciumkanälen als auch ein Polyhydroxybutyrat/Polyphosphatkomplex, der in Plasmamembranen von *Escherichia coli* spannungsabhängige Calciumkanäle bildet, verantwortlich sein. Interessanterweise steigt der Gehalt an Polyhydroxybutyrat/Polyphosphatkomplexen in *Escherichia coli* beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase stark an (Reusch et al. 1995). Der Calciumeinstrom aus dem periplasmatischen Raum würde einen Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration bewirken, was zur Aktivierung der Adenylatcyclase führen könnte. Als Folge würde der cAMP-Gehalt in der Zelle ansteigen. Dieser Anstieg könnte die Proteinkinase A aktivieren, die durch Phosphorylierung bestimmte Zielproteine regulieren kann. Das cAMP könnte auch vom cAMP-Rezeptorprotein, codiert von ORF `sll1371`, gebunden werden und die Transkription bestimmter Gene aktivieren. Die Zielsequenzen des cAMP-Rezeptorproteins aus *Synechocystis* 6803 sind bislang noch unbekannt, Untersuchungen hierzu laufen aber bereits (Yoshimura et al. 2000). Es ist vorstellbar, daß das cAMP-Rezeptorprotein gemeinsam mit dem alternativen Sigmafaktor `SigF` (Bhaya et al. 1999) die Transkription von Bewegungsgenen, wie den Pilingenen oder des extrazellulären Ca^{2+}-bindenden Glycoproteins `Sll1951`, aktiviert. Am Ende der Signaltransduktionskette würden die P-ATPasen durch Export der Calciumionen und die Phosphodiesterase durch Hydrolyse des cAMPs das Signal beenden. Ausgelöst durch schlechte Umweltbedingungen würde zunächst die Calciumkonzentration und darauf folgend der cAMP-Gehalt in der Zelle ansteigen, was zur Transkription bewegungsfördernder Gene führt. Somit wäre die Zelle in der Lage, einen neuen Lebensraum zu „erobern“, in dem die Umweltbedingungen besser sind.

Im nicht-motilen Stamm *Synechocystis* 6803nm hat eine noch unbekannte Veränderung zum Verlust der Beweglichkeit geführt. Messungen des intrazellulären cAMP-Spiegels hatten ergeben, daß fast kein cAMP in den Zellen vorhanden ist. Dies würde dazu führen, daß die für die Bewegung wichtigen Gene nicht transkribiert werden und somit keine Bewegung möglich ist. Auch die Expression des extrazellulären Ca^{2+}-bindenden Proteins `Sll1951` oder sein Transport zur Zelloberfläche könnten duch den niedrigen cAMP-Gehalt beeinflußt werden, was die beobachtete schwächere Aggregation der Zellen nach Calciumzugabe erklären würde.
In der Vierfachmutante `1614/0822/0672/1076` dagegen könnte die cytoplasmatische Ca^{2+}-Konzentration durch das Fehlen der potentiellen Ca^{2+}-ATPasen erhöht sein, was über die Aktivierung der Adenylatcyclase den gemessenen höheren cAMP-Gehalt verursachen würde. Hierdurch würde die Transkription bewegungsfördernden Gene stärker aktiviert und die Zellen wären beweglicher. Zudem wäre das extrazelluläre Glycoprotein `Sll1951` häufiger an der Zelloberfläche vorhanden, wodurch die starke Aggregation der Zellen nach Ca^{2+}-Zugabe erklärt werden könnte.
Eine langsame Erhöhung des Gehaltes an cAMP, und vermutlich auch des Glycoproteins `Sll1951` an der Zelloberfläche, findet im Wildtyp mit zunehmender Dichte der Kultur statt. Dies könnte durch die schlechter werdenden Bedingungen verursacht sein. Hierbei steigt jedoch der cAMP-Gehalt der Vierfachmutante `1614/0822/0672/1076` bereits zu einem früheren Zeitpunkt der Wachstumsphase an, sodaß in ihr der cAMP-Gehalt bei gleicher Dichte im Vergleich zur Wildtypkultur immer höher ist. In ihr würde somit schon früher das Signal „ungeeignete Umwelt“ die Bewegung aktivieren.

V Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die physiologische Bedeutung der P-Typ-Ca^{2+}-ATPasen aus *Synechocystis* 6803 untersucht. Die Analyse der kompletten Genomsequenz hat neun Gene für P-Typ ATPasen ergeben, von denen die vier ORFs `sll1614`, `slr0822`, `sll0672` und `sll1076` dem Typ IIa Calcium-ATPasen zugeordnet werden können. Untersuchungen zur Expression der potentiellen Ca^{2+}-ATPasen ergaben einen sehr geringen Gehalt der vier mRNAs. Ein Nachweis der Proteine unter Verwendung von P-ATPase spezifischen Antikörpern war nicht möglich. Dies läßt auf eine sehr schwache Expression der potentiellen Ca^{2+}-ATPase-Gene unter Standardbedingungen schließen. Eine starke Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration des Anzuchtmediums beeinflußte den Transkriptgehalt der vier Ca^{2+}-ATPasen nicht. Auch die Deletion oder Überexpression einer der vier potentiellen Ca^{2+}-ATPase-Gene (`sll1614`) bewirkte keine Veränderung im Transkriptgehalt der drei anderen Ca^{2+}-ATPasen. Das Ausschalten aller vier potentiellen Ca^{2+}-ATPase-Gene im nicht-motilen Stamm *Synechocystis* 6803nm und im Wildtypstamm *Synechocystis* 6803 führte nicht zu der vermuteten Sensitivität gegenüber erhöhten Ca^{2+}-Konzentrationen im Anzuchtmedium. Für ein Wachstum bei hohen Ca^{2+}-Außenkonzentrationen sind demnach keine P-Typ-Calcium-ATPasen erforderlich. Der Export von Calciumionen erfolgt beim Fehlen der Ca^{2+}-ATPasen vermutlich über einen Calcium-Austauscher (`Sll1336`).

Die Deletion aller vier Ca^{2+}-ATPase-Gene (`sll1614`/`slr0822`/`sll0672`/`sll1076`) führte zu einer höheren Beweglichkeit auf Agarplatten. Diese korrelierte mit einem stark erhöhten intrazellulären cAMP-Gehalt im Vergleich zum Wildtyp. Der cAMP-Gehalt der Zellen konnte durch die externe Zugabe von Ca^{2+} gesteigert werden. Sowohl der erhöhte cAMP-Gehalt in der Vierfach-Deletionsmutante als auch die Steigerung des cAMP-Gehaltes nach Erhöhung der externen Ca^{2+}-Konzentration kann durch eine calciumabhängige Regulation der Adenylatcyclase erklärt werden: der erhöhte cytoplasmatische Ca^{2+}-Spiegel wirkt aktivierend auf die Adenylatcyclase. Die Funktion der Ca^{2+}-ATPasen bestünde demnach in der Feineinstellung einer niedrigen cytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration als Voraussetzung für eine Wirkung des Calciums als intrazellulärer Signalüberträger. Bei verschlechterten Umweltbedingungen und daraus folgendem erhöhten Ca^{2+}-Spiegel in den Zellen führt ein erhöhter cAMP-Spiegel zu einer gesteigerten Beweglichkeit, was ein Erreichen günstigerer Lebensräume ermöglicht.

VI Literatur

Ahring I (1998) Examensarbeit HHU Düsseldorf

Ambudkar S V, Zlotnik G., Rosen BP (1984) *J. Biol. Chem.* **259**: 6142

Axelsen KB, Palmgren MG (1998) *J. Mol. Evol.* **46**: 84

Beck E, Ludwig G, Auerswald EA, Reiss B, Schaller H (1982) *Gene* **19**: 327

Berkelman T, Garret-Engele P, Hoffman NE (1994) *J. Bacteriol.* **176**: 4430

Bhaya D, Watanabe N, Ogawa Teruo, Grossman AR (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **96**: 3188

Bianchini GM, Pastini AC, Muschietti JP, Téllez-Inón MT, Martinetto HE, Torres HN, Flawiá MM (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1055**: 75

Bognar AW. Osborne C, Shane B (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 12337

Bourne HR, Sanders DA, McCormick H (1991) *Nature* **349**:117

Brandl CJ, Green NM, Korczak B, MacLennan DH (1986) *Cell* **44**: 597

Bullock WO, Fernandez JM, Short JM (1987) *Biotechniques* **5**: 376

Carafoli E (1987) *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 359

Carafoli E (1991) *Phys. Rev.* **71**: 129

Chen MX, Bouquin N, Norris V, Casaregola S, Seror S, Holland BI (1991) *EMBO J.* **10**: 3113

Chen TH, Huang TC, Chow TJ (1988) *Planta* **173**: 253

Choi JS, Chung YH, Moon YJ, Kim C, Watanabe M, Song PS, Joe CO, Bogorad L, Park YM (1999) *Photochem. and Photobiol.* **70**: 95

Cunningham KW, Fink G (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**: 2226

CyanoBase: The genome Database for *Synechocystis* sp. Strain PCC6803, http://www.kazusa.or.jp/cyano

Elhai J, Wolk CP (1988) *Gene* **68**: 119

Gantt E, Bryant DA (ed) (1994): The Molecular Biology of Cyanobacteria, Kluwer Academic Publishers: 119

Fling SP, Gregerson DS (1986) *Anal. Biochem.* **155**: 83

Fry IJ, Becker-Hapak M, Hageman JH (1991) *J. Bacteriol.* **173**: 2506

Gangola P, Rosen BP (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 12570

Geisler M, Richter J, Schumann J (1993) *J. Mol. Biol.* **243**: 1284

Geisler M, Jakobs B, Richter J, Schumann J (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1309**: 189

Geisler M, Koenen W, Richter J, Schumann J (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1368**: 267

Hanahan D (1983) *J. Mol. Biol.* **166**: 557

Harmon AC, Prascher D, Cormier MJ (1985) *Biochem Biophys Res Commun* **127**: 31

Haselkorn R (1978) *Ann. Rev. Plant Physiology* **29**: 319

Herbaud MR, Guiseppi A, Denizot F, Haiech J, Kilhoffer MC (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1448**: 212

Hoiczyk E, Baumeister W (1997) *Mol. Microbiology* **26**: 699

Hoiczyk E, Baumeister W (1998) *Current Biology* **8**: 1161

Holland BI, Jones HE, Campbell AK, Jacq A (1999) *Biochimie* **81**: 901

Inouye S, Franceschini T, Inouye M (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 6829

Ivey DM, Guffanti AA, Zemsky J, Pinner E, Karpel R, Padan E, Schuldiner S, Krulwich TA (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 11296

Jakobs B (1996) Diplomarbeit HHU Düsseldorf

James P, Vorherr T, Carafoli E (1995) *TIBS* **20**: 38

Kanamaru K, Kashiwagi S, Mizuno T (1993) *FEBS Lett.* **330**: 99

Kanamaru K, Kashiwagi S, Mizuno T (1994) *Mol. Microbiol.* **13**: 369

Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hisouchi 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 (1996) *DNA Res.* **3**: 109

Karin M, Smeal T (1992) *TIBS* **17**: 418

Kerson GW, Miernyk JA, Budd K (1984) *Plant Physiol.* **75**: 222

Kim SH, Ramaswamy S, Downard J (1999) *J. Bacteriol.* **181**: 1496

Klee CB (1988) in: Calmodulin (ed. Cohen P, Klee CB): 35, Elsevier, Amsterdam

Klee CB, Vanaman TC (1982) *Adv. Protein Chem.* **35**: 213

Knight MR, Campbell AK, Smith SM, Trewavas AJ (1991) *FEBS* **282**: 405

Koop HU, Steinmüller K, Rößler C, Eibl C Sacher L (1996) *Planta* **199**: 193

Kretsinger, RH (1979) *Cyclic Nucleotide Res.* **11**: 1

Kunst F et al. (1997) *Nature* **390**: 249

Kuo TH, Liu BF, Diglio C, Tsang W (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **350**: 428

LaPorte DC, Wierman BM, Storm DR (1980) *Biochemistry* **19**: 3814

Macara IG (1980) *TIBS* **92**

MacNeil SD, Calara F, Hartzell PL (1994) *Mol. Microbiol* **14**: 61

Margolis PS, Driks A, Losick R (1993) *J. Bacteriol.* **175**: 528

Margulis L (1981) in: Symbiosis in Cell Evolution (ed. Freeman HW) San Francisco

Matsushita T, Hirata M, Kusaka I (1989) *N. Y. Acad. Sci* **560**: 426

McKinney C (1941) *J. Biol. Chem.* **140**: 315

Mizuno T, Kaneko T, Tabata S (1996) *DNA Res.* **3**: 407

Mohan S, Aghion J, Guilen N, Dubnau D (1989) *J. Bacteriol.* **171**: 6043

M∅ller JV, Juul B, Maire M (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1286**: 1

Moncrief ND, Kretsinger RH, Goodman M (1990) *J. Mol. Evol.* **30**: 522

Moniakis J, Coukell MB, Forer A (1995) *J. Biol. Chem.* **270**: 28276

Niki I, Yokukura H, Sudo T, Kato M, Hidaka H (1996) *J. Biochem.* **120** 685

Norling B, Zak E, Andersson B, Pakrasi H (1998) *FEBS Letters* **436**: 189

Norris V, Grant S, Freestone P, Canvin J, Sheikh FN, Toth I, Trinei M, Mohda K, Norman RI (1996) *J. Bacteriol.* **178**: 3677

Ohmori M (1989) *Plant Cell Physiol.* **30**: 911

Onek LA, Lea PJ, Smith RJ (1994) *Arch. Microbiol.* **161**: 352

Onek LA, Smith J (1992) *J. General Microbiol.* **138**: 1039

Palmgren MG, Axelsen KB (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1365**: 37

Pedersen PL, Carafoli E (1987) *TIBS* **12**: 146

Peiffer WE, Desrosiers MG, Menick DR (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 5095

Pettersson A, Bergman B (1989) *FEMS Microbiol Letters* **60**: 95

Pitta TP, Sherwood EE, Kobel AM, Berg HC (1997) *J. Bacteriol.* **179**: 2524

Qian M, Dao L, Debus RJ, Burnap RL (1999) *Biochemestry* **38**: 6070

Rasmussen H (1989) *Scientific American* **261**: 44

Reusch RN, Huang R, Bramble LL (1995) *Biophys. Journal.* **69**: 754

Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979) *J. Gen. Microbiol.* **11**:

Rosen BP (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **906**: 101

Rotharmel T, Wagner G (1995) *J. Bacteriol.* **177**: 864

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour, NY

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463

Schimz A, Hildebrand E (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **923**: 222

Schnorr O (1996) Diplomarbeit HHU-Düsseldorf

Serrano R (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **947**: 1

Swan DG, Hale RS, Dhillon N, Leadley PF (1987) *Nature* **329**: 84

Swan DG, Cortes J, Hale RS, Leadley PF (1989) *J. Bacteriol.* **171**: 5614

Terauchi K, Ohmori M (1999) *Plant Cell Physiol.* **40**: 248

Tisa LS, Adler J (1995) *J. Bacteriol.* **177**: 7112

Toyoshima C, Sasabe H, Stokes DL (1993) *Nature* **362**: 469

Watkins NJ, Knight MR, Trewavas AJ, Campbell AK (1995) *Biochem. Journal* **306**: 865

Williams JGK (1988) *Methods Enzymol.* **167**: 766

Wong EFS, Brar SK, Sesaki H, Yang C, Siu CH (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 16399

Yang C, Brar SK, Desbarats L, Siu CH (1997) *Differentiation* **61**: 275

Yoshimura H, Hisabori T, Yanaagisawa S, Ohmori M (2000) *J. Biol. Chem.* **275**: 6241

Youderian P (1998) *Current Biology* **8**: R408

Zhang CC, Gonzales L, Phalip V (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**: 3619

Zurawski G, Bohnert HJ, Whitfeld PR, Bottomley W (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 7699

VII Anhang

Abkürzungen

A	Adenin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophospat
Da	Dalton (g pro mol)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
G	Guanin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
kb	Kilo-Basenpaare
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
PMCA	Plasmamembran Ca^{2+}-ATPase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerse-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERCA	Ca^{2+}-ATPase des Sarco- und/oder Endoplasmatischen Retikulums
T	Thymin
TEMED	N ,N ,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Enzymeinheit (*unit*)
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumenanteile pro Volumen
w/v	Gewichtsanteile pro Volumen

Danksagung

Bei allen Personen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich herzlich bedanken. Mein besonderer Dank gilt:

Anna-Maria und Alfred Jakobs, Nicole Körtgen, Dr. Jürgen Schumann, Dr. Klaus Steinmüller, Prof. Heinrich Strotmann, Marc Tober, Prof. Peter Westhoff, Prof. C. Peter Wolk sowie allen Mitgliedern des Instituts für Biochemie der Pflanzen