

Manipulation und Regulation der Carotinoidbiosynthese  
in Cyanobakterien.

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie  
der Johann Wolfgang Goethe – Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Lutz Schäfer  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2003

DF1

vom Fachbereich Biologie / Informatik der

Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Osiewacz

Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Sandmann  
Prof. Dr. Jürgen Feierabend

Datum der Disputation:.....

## **ERKLÄRUNG**

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den 26.11.03

.....

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über

‘Manipulation und Regulation der Carotinoidbiosynthese in Cyanobakterien’

selbständig angefertigt und mich keiner anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 26.11.03

.....

## INHALTSVERZEICHNIS

I	Einleitung	1
II	Material und Methoden	13
1	Verwendete Organismen	13
1.1	Cyanobakterien Stämme	13
1.1.1	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	13
1.1.2	<i>Synechococcus</i> PCC 7942	13
1.2	<i>Escherichia coli</i> Stämme	15
2	Anzucht und Inkubationsbedingungen von Cyanobakterien	16
2.1	BG 11 Medium	16
2.2	Antibiotika	17
2.3	Anzuchtbedingungen	17
2.4	Inkubationsbedingungen	18
2.4.1	Hemmstoffversuche	18
3	Anzucht von <i>E. coli</i>	19
3.1	Luria-Bertani-Flüssigmedium (LB-Medium)	19
3.2	Antibiotika	20
3.3	Anzuchtbedingungen	20
4	Verwendete Vektoren	20
5	Molekularbiologische Methoden	22
5.1	Isolation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	22
5.1.1	DNA-Minipräparation	22
5.1.2	Plasmidisolation mit dem Concert DNA-Präparationskit	22
5.2	Isolation von genomischer DNA aus <i>Synechococcus</i> PCC 7942 (verändert; nach Sambrook et al., 1989).	23
5.3	Transformation von <i>E. coli</i>	24
5.3.1	Screening der Klone	24

5.3.2	Sequenzierung von DNA	25
5.4	Transformation von <i>Synechococcus</i> PCC 7942 R2 PIM8	25
5.5	RNA-Isolation aus <i>Synechococcus</i> PCC 7942 (Neuschaefer-Rube <i>et al.</i> , 2000)	26
5.6	Umschreiben von RNA in cDNA - Reverse Transkription	27
5.7	Reinigung der cDNA	27
5.8	PCR	28
5.8.1	Kontroll-PCR ( <i>E. coli</i> )	29
5.8.2	Kontroll-PCR ( <i>Synechococcus</i> PCC 7942)	29
5.8.3	Overlap Extension PCR	30
5.8.4	Real Time PCR	32
6	Messung der Promotoraktivität der putativen Promotorbereiche vor crt B und crt P mittels CAT-Assay	37
6.1	Herstellung der Extrakte	37
6.1.1	Inkubation und Ernte	37
6.1.2	Chloramphenicol Acetyltransferase-Assay (CAT-Assay)	38
6.1.3	Proteinbestimmung	38
7	Messung der Photosyntheserate von Cyanobakterien	38
7.1	Sauerstoffentwicklung	38
7.2	Messung der Chlorophyll a-Fluoreszenz	39
8	Bestimmung des Chlorophyllgehalts	40
8.1	Bestimmung des Trockengewichts	40
9	Extraktion und Analyse von Carotinoiden	40
9.1	Extraktion	40
9.2	Carotinoidanalyse mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	41
III	Ergebnisse	43
1	Einfluss der Carotinoidzusammensetzung und des Carotinoid-gehalts auf den Schutz des Photosyntheseapparates vor Starklichtschädigung	43

1.1	Integration von Genen aus dem Isoprenoidstoffwechsel in <i>Synechococcus</i> PCC 7942 und Charakterisierung der Transformanten	43
1.1.1	Klonierung des Isoprenoiddiphosphat Isomerase Gens (idi) aus <i>Rhodobacter capsulatus</i> in <i>Synechococcus</i> PCC 7942	44
1.1.2	Integration des Deoxyxylucose-5-Phosphat Synthase Gens (dxs) aus <i>E. coli</i> in <i>Synechococcus</i> PCC 7942	45
1.1.3	Klonierung der Geranylgeranylpyrophosphat Synthase (crtE) und der Phytoen Synthase (crtB) in <i>Synechococcus</i> PCC 7942	47
1.2	Herstellung von <i>Synechococcus</i> PCC 7942 Transformanten mit veränderter Carotinoidzusammensetzung	49
1.2.1	Integration des Zeaxanthin Epoxidase Gens (ZE) aus <i>Gentiana lutea</i> in <i>Synechococcus</i> PCC 7942	49
1.2.2	Klonierung des $\beta$ -Carotin Hydroxylase Gens (crtZ) aus <i>Erwinia uredovora</i> in <i>Synechococcus</i> PCC 7942	53
1.2.3	Charakterisierung der <i>Synechococcus</i> PCC 7942 PIM8 Transformanten pFP1-3ZE, pFP1-3crtZ und pFP1-3	53
1.3	Charakterisierung von <i>Synechocystis</i> PCC 6803 Deletionsmutanten, die bestimmte Carotinoide nicht mehr bilden können	59
1.3.1	HPLC-Analysen der Carotinoidextrakte	60
1.3.2	Auswirkungen von Starklicht und einer erhöhten Produktion von ROS auf den Pigmentgehalt von <i>Synechocystis</i> -Deletionsmutanten	65
1.3.3	Änderung des Chlorophyllgehalts	65
1.3.4	Änderungen des Carotinoidgehalts	66
1.3.5	Einfluss der Carotinoidzusammensetzung auf die Photosynthese	68
2	Regulation der Carotinoidbiosynthese in <i>Synechococcus</i> PCC 7942	72
2.1	Messung der Carotinoidneusynthese nach Schwach- bzw. Starklichtinkubation in Gegenwart von Norflurazon	72
2.2	Promotoruntersuchungen der untranslatierten DNA-Bereiche vor crtB und crtP	73
2.2.1	Sequenzvergleich von putativen Promotorbereichen vor crtB und crtP mit lichtregulierten cyanobakteriellen Promotoren	74

---

2.2.2	Herstellung von <i>Synechococcus</i> PCC 7942 Transformanten mit ins Genom integrierten Promotor-Reportergen-Konstrukten	76
2.2.3	Messung der Reportergenaktivität der Promotor-Reportergen-Konstrukte	79
2.3	Quantifizierung der Transkriptmenge aller Carotinoidgene aus <i>Synechococcus</i> PCC 7942 nach Schwach- bzw. Starklichtinkubation	81
2.3.1	Amplifizieren eines DNA-Fragments von crtQb aus <i>Synechococcus</i> PCC 7942	81
2.3.2	Amplifizieren eines DNA-Fragments von crtZ aus <i>Synechococcus</i> PCC 7942	83
2.3.3	Messung der Transkriptänderungen der Carotinoidgene in <i>Synechococcus</i> PCC 7942 nach Inkubation im Starklicht	85
2.4	Umwandlung von $\beta$ -Carotin zu Zeaxanthin in <i>Synechococcus</i> PCC 7942 nach kurzer Inkubationszeit im Starklicht	87
2.5	Untersuchungen der Regulationsmechanismen der Carotinoidbiosynthese in <i>Synechococcus</i> PCC 7942	88
IV	Diskussion	90
V	Zusammenfassung	104
VI	Anhang	106
1	Abbildungsverzeichnis	106
2	Tabellenverzeichnis	110
3	Literaturverzeichnis	112
4	Danksagung	126
5	Lebenslauf	127

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

A	Adenosin
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
Amp	Ampicillin (Antibiotikum)
bp	Basenpaare
C	Cytosin
Cm	Chloramphenicol (Antibiotikum)
crt	Gene der Carotinoidbiosynthese
DBMIB	2,5-Dibrom-3-Methyl-6-Isopropyl-p-Benzochinon
DCMU	3-(3,4 Dichlorphenyl)-1,1-Dimethylurea
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DTT <sub>red</sub>	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAM	6-Carboxy-Fluoreszin
g	Gramm
G	Guanin
GGPP	Geranylgeranyl Pyrophosphat
<sup>3</sup> H	Tritium
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
IBA	Iodbenzoeessigsäure
IPP	Isopentenyl Pyrophosphat
kb	Kilobasenpaare
Kn	Kanamycin (Antibiotikum)
l	Liter
LHCII	Lichtsammelkomplex II
mM	Millimolar
MCS	Multiple Klonierungsregion



---

MeOH	Methanol
m	Milli
min	Minute(n)
MV	Methylviologen
nm	Nanometer
NFZ	Norflurazon
ORF	Offenes Leseraster
PCC	Pasteur Culture Center
PCR	Polymerase Kettenreaktion
P I	Photoinhibition
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunde
T	Thymin
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethylrhodamin
TG	Trockengewicht
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierter Bereich
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol

## I EINLEITUNG

Während Carotinoide in nicht phototrophen Organismen als Membranstabilisatoren (Havaux, 1998) und allgemein als Antioxidantien wirken (Albrecht *et al.*, 2000), wächst mit dem Auftreten der oxygenen Photosynthese ihre Bedeutung. Photosynthese betreibende Organismen sind in ihren natürlichen Lebensräumen wechselnden Umwelteinflüssen ausgesetzt und müssen auf diese reagieren. So müssen sie einerseits in der Lage sein, bei schwacher Lichteinstrahlung die eintreffenden Lichtquanten optimal einzufangen und in chemische Energie umzuwandeln (Björkman & Demming, 1994; Demming-Adams *et al.*, 1996), andererseits müssen sie bei starker Lichteinstrahlung den Photosyntheseapparat vor Schädigungen durch überschüssige Anregungsenergie schützen. Diese beiden Anforderungen erfüllen unter den zellulären Komponenten nur die Carotinoide, da sie sowohl als Lichtsammelpigmente als auch als Schutzpigmente vor reaktiven Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species, ROS), die bei überschüssiger Lichteinstrahlung entstehen, dienen (Foote & Denny, 1968; Hirayama *et al.*, 1994; Britton, 1995; Edge *et al.*, 1997). Neben der Tatsache, dass Carotinoide in allen photosynthetisch aktiven Zellen vorkommen, macht gerade diese Doppelfunktion sie als Forschungsobjekte interessant.

Carotinoide gehören zur Stoffgruppe der Tetraterpene. In den meisten Fällen bestehen sie aus 40 Kohlenstoffatomen, die sich aus acht Isopreneinheiten zusammensetzen. Das C<sub>40</sub>-Molekül kann an einem oder an beiden Enden zyklisiert und durch verschiedene funktionelle Gruppen modifiziert werden (Sandmann, 2002). Enthalten die funktionellen Gruppen Sauerstoff, spricht man von Xanthophyllen. Die Absorptionseigenschaften der Carotinoide kommen durch die Größe des konjugierten Doppelbindungssystems und der Konformation der Kohlenwasserstoffkette zustande. Die Absorptionsspektren weisen in der Regel ein Hauptmaximum und zwei Nebenmaxima auf. Die Positionen der Maxima im Spektrum unterscheiden sich bei den einzelnen Carotinoiden und können somit zu deren Identifizierung genutzt werden. Mit steigender Anzahl an konjugierten Doppelbindungen verschieben sich die Absorptionsgipfel in den Bereich größerer Wellenlängen. In der Regel decken die Carotinoide den Spektralbereich von etwa 380 nm bis 550 nm ab. Aufgrund dieser Absorptionseigenschaften sind Carotinoide gelb, orange oder rot gefärbt.

Um als Lichtsammelpigmente (akzessorische Pigmente) dienen zu können, sind Carotinoide gemeinsam mit Chlorophyll in Pigment-Protein-Komplexen assoziiert (Siefermann-Harms,

1987). Durch das konjugierte Doppelbindungssystem, sind Carotinoide in der Lage, Licht bestimmter Wellenlängen aufzunehmen, dessen Anregungsenergie auf andere Moleküle zu übertragen und somit für chemische Reaktionen nutzbar zu machen. Sie erweitern dadurch den spektralen Wirkungsbereich der Photosynthese (Demming-Adams *et al.*, 1996; Frank & Cogdell, 1996). Außerdem können sie die, bei überschüssiger Lichteinstrahlung in den Lichtsammelkomplexen entstehenden, angeregten Spezies Triplettchlorophyll ( $^3\text{CHL}^*$ ) bzw. Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) durch direkte Interaktion quenchen. Carotinoide gehen bei dieser Reaktion selbst in den Triplettzustand über, können diesen aber durch Energieabgabe in Form von Wärme wieder verlassen (Foote & Denny, 1968; Krinsky & Deneke, 1982; Edge *et al.*, 1997).

Neben dem Quenchen von Singulett-Sauerstoff und Triplettchlorophyll können Carotinoide mit freien Radikalen reagieren und diese dabei unschädlich machen (Edge *et al.*, 1997). Auch für das Zusammenfügen des Photosyntheseapparates sind bestimmte Carotinoide erforderlich (Paulsen, 1999). So konnten Trebst & Depka (1997) zeigen, dass  $\beta$ -Carotin essentiell für das Einfügen des D1-Proteins in ein funktionelles Photosystem II ist.

Für die Untersuchungen zur Regulation der Carotinoidbiosynthese und der Korrelation von Carotinoiden und ihrer antioxidativen Wirkung *in vivo* wurden die Cyanobakterienstämme *Synechococcus* PCC 7942 und *Synechocystis* PCC 6803 verwendet. Cyanobakterien sind aerobe, phototrophe Prokaryonten. Aufgrund eines sehr ähnlichen Photosyntheseapparates wurden sie früher oft zu den Algen bzw. Pflanzen gezählt und als „Blaualgae“ bezeichnet (van den Hoek, 1993). Cyanobakterien gelten als größte, formenreichste und am weitesten verbreitete Gruppe der photosynthetisch aktiven Bakterien (Fay, 1983). Cyanobakterien besiedeln aquatische und terrestrische Lebensräume. An Land gehen sie häufig Symbiosen mit einigen Pilzspezies zu so genannten Cyano-Flechten ein. Die Fähigkeit an extremen Standorten wachsen zu können und molekularen Stickstoff zu fixieren, verleiht ihnen eine besondere Bedeutung im Naturhaushalt (Flores & Herreo, 1994).

Systematisch, nach morphologischen Merkmalen, teilt man die Cyanobakterien in fünf Gruppen ein (Rippka *et al.*, 1979). Als Gruppe 1, zu der auch die in dieser Arbeit verwendeten Stämme *Synechococcus* PCC 7942 und *Synechocystis* PCC 6803 gehören, bezeichnet man die chroococcalen Cyanobakterien, zu denen einzellige Stäbchen und Kokken gehören.

Betrachtet man die Morphologie von Cyanobakterien, fällt auf, dass der Aufbau der Zellwand der von Gram-negativen Bakterien ähnelt (Golecki, 1974), dass jedoch die chemische Zusammensetzung sowohl von Gram-negativen als auch von Gram-positiven Bakterienzellwänden verschieden ist (Jürgens & Weckesser, 1986). Die mechanische Stütze der Cyanobakterienzelle ist eine Peptidoglykanschicht (Mureinschicht), welche die äußere Membran trägt. Auf der äußeren Membran befindet sich als Schutz vor Austrocknung eine Lipopolysaccharidschicht. Bei vielen Cyanobakterien werden Exopolysaccharide ausgeschieden, welche die Zellen als Kapseln oder Scheiden umgeben. Innerhalb der Peptidoglykanschicht ist die Plasmamembran lokalisiert. Durch Abschnürung von dieser entsteht an deren Innenseite die Thylakoidmembran, welche die Proteine und Protein-Pigmentkomplexe des Photosyntheseapparates und die Komponenten der Atmungskette trägt (Gantt, 1994).

Hinsichtlich der Carotinoidzusammensetzung unterscheiden sich Cyanobakterien auffallend von den höheren Pflanzen. Während man in den Blättern von Pflanzen mit Lutein,  $\beta$ -Carotin, Zeaxanthin, Antheraxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin immer die gleiche Carotinoidzusammensetzung findet, variiert diese in der Gruppe der Cyanobakterien sehr stark (Goodwin, 1980). Als Endprodukte der Carotinoidbiosynthese findet man hier Hydroxy- und Ketoderivate des  $\beta$ -Carotins und Carotinoidglykoside (Goodwin, 1980; Chamovitz & Hirschberg, 1994). Cyanobakterien sind, mit Ausnahme von *Prochlorococcus*, im Gegensatz zu höheren Pflanzen nicht in der Lage,  $\alpha$ -Carotin und dessen Derivate zu bilden. So kommt das in Pflanzen in großen Mengen gebildete Lutein nicht in Cyanobakterien vor (Hertzberg & Liaaen-Jensen, 1971). Auch die im Xanthophyllzyklus der Pflanzen beteiligten Carotinoidepoxide Antheraxanthin und Violaxanthin können in Cyanobakterien nicht synthetisiert werden.

In *Abbildung I-1* und *Abbildung I-2* ist der Carotinoidbiosyntheseweg der in dieser Arbeit verwendeten Cyanobakterienstämme *Synechococcus* PCC 7942 und *Synechocystis* PCC 6803 dargestellt. Die Carotinoidbiosynthese zweigt vom Isoprenoidstoffwechsel ab. In Cyanobakterien werden die beiden Ausgangssubstanzen der Isoprenoidsynthese, Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) über den 1-Desoxy-Xylucose-5-Phosphat-Weg (DOXP-Weg) bereitgestellt (Lichtenthaler, 2000; Miller *et al.*, 2000; Ershov *et al.*, 2002; Rohdich *et al.*, 2002). Die Geranylgeranylpyrophosphat Synthase (codiert von *crtE*) fügt sukzessive drei IPP Moleküle an DMAPP an. Es entsteht

Geranylgeranylpyrophosphat. Anschließend werden zwei Moleküle Geranylgeranylpyrophosphat von der Phytoen Synthase zu dem ersten Carotinoid, dem farblosen Phytoen ( $C_{40}$ ), kondensiert (Sandmann, 1994b; Cunningham & Gantt, 1998). Phytoen besitzt drei konjugierte Doppelbindungen.

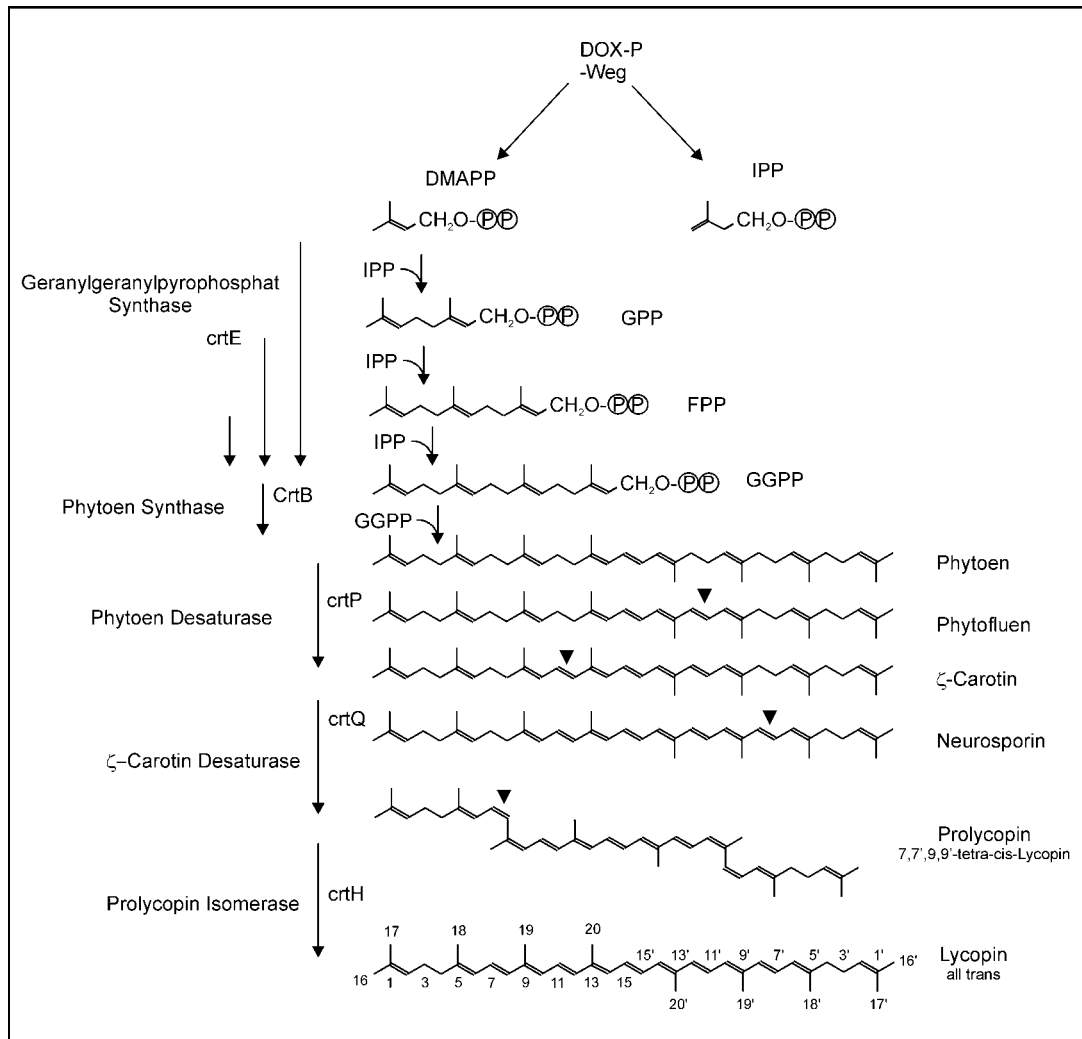


Abbildung I-1 Carotinoidbiosyntheseweg bis zum Lycopin in Cyanobakterien. DMAPP: Dimethylallylpyrophosphat; IPP: Isopentenylpyrophosphat; GGPP: Geranylgeranylpyrophosphat; FPP: Farnesylpyrophosphat.

In den folgenden Reaktionen wird das konjugierte Doppelbindungssystem auf bis zu 11 verlängert. Bei jedem Desaturierungsschritt werden zwei Wasserstoffatome entfernt und dadurch eine Doppelbindung in das Kohlenwasserstoffrückgrat eingeführt. In Cyanobakterien werden die Desaturierungsschritte von zwei Enzymen katalysiert. Die Phytoen Desaturase (crtP) katalysiert die Umwandlung von Phytoen zum ζ-Carotin (Chamovitz *et al.*, 1991). Die Desaturierung vom ζ-Carotin bis zum Prolycopin wird von der ζ-Carotin Desaturase (crtQb)

katalysiert (Albrecht *et al.*, 1995). Da Prolycopin aufgrund seines sterischen Arrangements (7,7', 9,9'-Z Konformation) nicht zyklisiert werden kann, muss es erst zu Lycopin (all-E Form) isomerisiert werden. Diese Reaktion, die *in vitro* auch unter Belichtung abläuft, wird in Cyanobakterien (Breitenbach *et al.*, 2001; Masamoto *et al.*, 2001) von der Prolycopin Isomerase (crtH) katalysiert.  $\beta$ -Carotin entsteht durch die Zyklisierung der beiden Enden des Lycopinmoleküls zu zwei  $\beta$ -Iononringen. Dieser Schritt wird von der Lycopin Zyklase (crtL) katalysiert (Cunningham *et al.*, 1993; Cunningham *et al.*, 1994). In *Synechococcus* PCC 7942 und *Synechocystis* PCC 6803 kann  $\beta$ -Carotin zu Zeaxanthin umgesetzt werden.

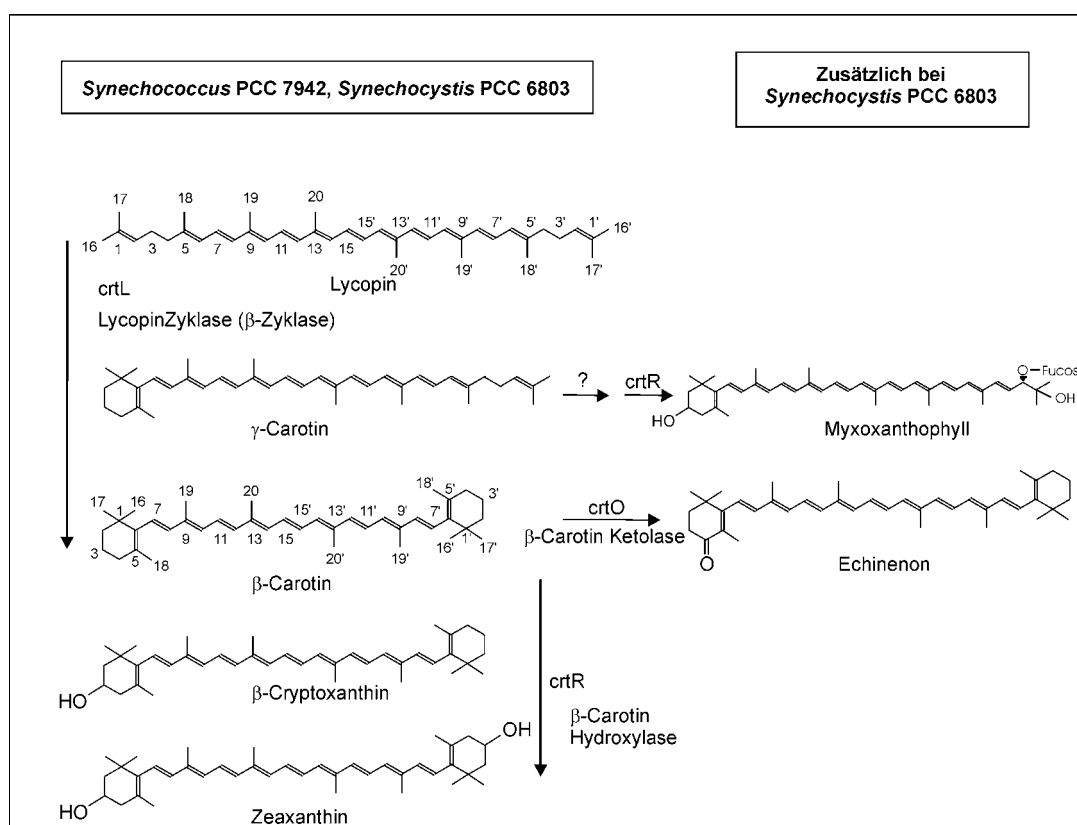


Abbildung I-2 Carotinoidbiosynthese ausgehend vom Lycopin in *Synechococcus* PCC 7942 und *Synechocystis* PCC 6803.

Das Einfügen der beiden Hydroxygruppen, jeweils an Position C<sub>3</sub> der beiden  $\beta$ -Iononringe, wird von der  $\beta$ -Carotin Hydroxylase (crtR) katalysiert. Zeaxanthin,  $\beta$ -Carotin sowie kleine Mengen an  $\beta$ -Cryptoxanthin, Caloxanthin und Nostoxanthin sind die einzigen nachweisbaren Carotinoide in *Synechococcus* PCC 7942 (Gombos & Vigh, 1986; Chamovitz *et al.*, 1993).

In *Synechocystis* PCC 6803 akkumulieren zusätzlich zwei weitere Carotinoide: das Monoketocarotinoid Echinenon, das eine Ketogruppe an Position C<sub>4</sub> des Iononrings trägt (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 1997), und Myxoxanthophyll, das einen Zuckerrest an Position

C<sub>2</sub> gebunden hat (Lagarde & Vermaas, 1999). Echinenon wird von der  $\beta$ -Carotin Ketolase aus  $\beta$ -Carotin gebildet. Im Gegensatz zu den bisher bekannten  $\beta$ -Carotin Ketolasen, die an beiden Ringen eine Ketogruppe einfügen, kann das Genprodukt von crtO in *Synechocystis* nur auf einer Seite des  $\beta$ -Carotin Moleküls in C<sub>4</sub>-Position eine Ketogruppe einführen. Die an der Synthese des Myxoxanthophylls beteiligten Gene sind, bis auf crtR, das für das Einfügen der Hydroxygruppe an C<sub>3</sub>-Position des  $\beta$ -Ringes benötigt wird, bislang nicht identifiziert worden (Lagarde & Vermaas, 1999).

Die gebildeten Carotinoide können in allen drei Membranen nachgewiesen werden. Vorwiegend sind sie in der Thylakoidmembran lokalisiert und mit den Protein-Pigment-Komplexen des Photosyntheseapparates assoziiert (Albrecht *et al.*, 2001). Die Thylakoidmembranen sind in konzentrischen Strukturen an der Peripherie der Zelle angeordnet. Granastrukturen, wie in den Chloroplasten der Pflanzen, kommen in Cyanobakterien nicht vor (Anderson & Andersson, 1988). Aufgrund der fehlenden Kompartimentierung sind in Cyanobakterien die photosynthetische und die respiratorische Elektronentransportkette auf der gleichen Membran lokalisiert und verwenden den gleichen Plastochinonpool bzw. Cytochrom b<sub>6</sub>/f-Komplex (Peschek, 1987).

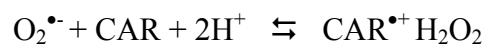
Im Gegensatz zu den Chlorophyll a/b-haltigen äußeren Antennen (light harvesting complex II, LHC II) der Pflanzen besitzen Cyanobakterien Phycobiline als Hauptlichtsammelpigmente. Phycobiline sind in Pigment-Protein-Komplexen, so genannten Phycobilisomen, organisiert und befinden sich an der Oberfläche der Thylakoidmembran assoziiert mit Photosystem II (Bryant, 1988). Von dort wird die Strahlungsenergie auf die Reaktionszentren von Photosystem I oder II geleitet (Glazer, 1989). Der Chromophor der Phycobiliproteide besteht aus einem offenkettigen Tetrapyrrolysystem, das wie eine prosthetische Gruppe kovalent an das Apoprotein gebunden ist (Sidler, 1994).

Bis auf die erwähnten Unterschiede betreiben Cyanobakterien Photosynthese wie höhere Pflanzen. Sie wurden deswegen als möglicher Kandidat für den „Ursymbionten“ in der Endosymbionten Theorie diskutiert.

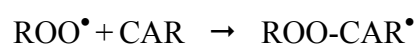
In allen photosynthetisch aktiven Zellen existieren diverse enzymatische und nicht-enzymatische Schutzsysteme, um den Photosyntheseapparat vor überschüssiger Anregungsenergie zu schützen. Wenn die vom Photosyntheseapparat absorbierte Lichtmenge die zur Photosynthese benötigte Lichtmenge übersteigt, entstehen an bevorzugten Stellen des

Photosyntheseapparates reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS). Die Entgiftung dieser ROS schützt zum einen die Zelle direkt vor schädigenden Oxidationsprozessen, zum anderen wird bei der Entfernung überschüssiges Reduktionspotential verbraucht, so dass die photosynthetische Elektronentransportkette in einem oxidiertem Zustand gehalten werden kann.

Ein bevorzugter Entstehungsort für ROS ist neben den oben erwähnten chlorophyllhaltigen Lichtsammelsystemen und dem Reaktionszentrum von Photosystem II die Akzeptorseite von Photosystem I. Dort können in der, nach ihrem Entdecker benannten Mehler-Reaktion überschüssige Elektronen auf Sauerstoff übertragen werden. Dies führt zur Bildung von Superoxidanionradikalen ( $O_2^{\bullet-}$ ) (Asada, 1994; Asada, 1996). In *Synechocystis* PCC 6803 wird das entstehende  $O_2^{\bullet-}$  von einer eisenhaltigen Superoxid Dismutase zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) disproportioniert. Das  $H_2O_2$ , welches bereits in geringen Konzentrationen Enzyme des Calvin-Zyklus inhibiert und zudem ein sehr langlebiges Oxidanz ist, wird in *Synechococcus* PCC 7942 und *Synechocystis* PCC 6803 von der Katalase Peroxidase und Thioredoxin Peroxidase zu  $H_2O$  und  $O_2$  entgiftet (Mutsuda *et al.*, 1996; Tichy & Vermaas, 1999). Als Elektronendonator fungiert Thioredoxin, das durch die Elektronentransportkette über die Ferredoxin:Thioredoxin Reduktase regeneriert wird (Baier & Dietz, 1997). Die Entfernung von  $O_2^{\bullet-}$  und  $H_2O_2$  verhindert außerdem, dass die beiden Substanzen zu dem hochtoxischen Hydroxylradikal ( $OH^{\bullet}$ ) reagieren können (Asada, 1996). Zusätzlich zu den enzymatischen Schutzsystemen verfügen photosynthetische Zellen über verschiedene antioxidativ wirksame Substanzen, wie z.B. Ascorbat, Glutathion,  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) und Carotinoide. Die Carotinoide sind von den beschriebenen Antioxidantien am vielseitigsten. In ihrer Funktion als Radikalfänger können sie ebenfalls die in der Mehler-Reaktion entstehenden Superoxidanion ( $O_2^{\bullet-}$ ) zu  $H_2O_2$  umwandeln (Edge *et al.*, 1997)

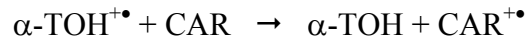


und die Membranen vor Lipidperoxidation schützen (Woodall *et al.*, 1997; Krinsky & Yeum, 2003).

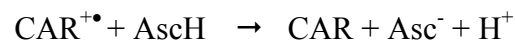




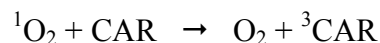
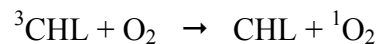
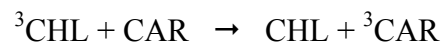
Außerdem können Carotinoide auch mit  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) und Ascorbat interagieren. Böhm (1997) zeigte, dass einige Carotinoide in polaren Umgebung protonierte  $\alpha$ -Tocopherolradikale wieder zu  $\alpha$ -Tocopherol regenerieren können, und somit dessen antioxidative Effizienz beim Schutz vor Lipidperoxidation erhöhen.



Das entstehende Carotinoidkation-Radikal kann wiederum von Ascorbinsäure entgiftet werden (Böhm *et al.*, 1997; Mortensen *et al.*, 2001).



Ein weiterer Entstehungsort für ROS in der Photosynthese sind die chlorophyllhaltigen Antennensysteme und das Reaktionszentrum von PS II. Dort quenchen Carotinoide das entstehende  $^3\text{Chl}$  und verhindern somit, dass in Gegenwart von  $\text{O}_2$  reaktiver  $^1\text{O}_2$  entsteht (Siefermann-Harms 1987, Vass *et al.* 1992; Edge *et al.*, 1997, Tinkler *et al.*, 1994, Hirayama *et al.*, 1994).



In Pflanzen und einigen Algen sind Carotinoide darüber hinaus an einem Mechanismus zur kurzfristigen Anpassung an Bedingungen mit überschüssiger Anregungsenergie beteiligt, der in Cyanobakterien nicht existiert. Im so genannten Xanthophyllzyklus spielt die reversible, enzymatische Umwandlung (De-Epoxidation) von Violaxanthin über Antheraxanthin zu Zeaxanthin bei einsetzender Belichtung eine entscheidende Rolle. Durch die Akkumulation von Zeaxanthin in Kombination mit dem Protonengradienten ( $\Delta\text{pH}$ ) über die Thylakoidmembran kommt es zur Ableitung der überschüssigen Anregungsenergie durch die äußeren Antennenkomplexe (LHCII) in Form von Wärme (Horton, 1996; Demming-Adams & Adams, 1996a). Über den Mechanismus, wie die überschüssige Anregungsenergie abgeleitet wird, existieren unterschiedliche Hypothesen. Gilmore (1997) favorisiert eine direkte Rolle des Zeaxanthins als Quencher. Laut Young *et al.* (1997) führt die Bindung von

Zeaxanthin an Untereinheiten der äußeren Antennenkomplexe zu deren Aggregatbildung und somit indirekt zu einem erhöhten Quenchen von Anregungsenergie in dieser Konformation.

Trotz der Schutzmechanismen vor überschüssiger Anregungsenergie und dem daraus resultierenden oxidativen Stress kommt es in Cyanobakterien ebenso wie in Pflanzen unter Starklichtbedingungen zu einer Verminderung der Photosyntheseleistung (Photoinhibition) (Aro *et al.*, 1993b). Die Abnahme der Photosyntheseleistung geht meistens mit einer Degradierung des D1-Proteins von Photosystem II, aber auch anderer Komponenten des Photosyntheseapparats, einher (Sandmann *et al.*, 1993). Das Ausmaß der Photoinhibierung ist von der Zerstörung des D1-Proteins und der Rate der Neusynthese abhängig (Mattoo *et al.*, 1984; Tyystjarvi *et al.*, 1996).

Cyanobakterien fehlt die schnelle Anpassung an hohe Lichtintensitäten via Xanthophyllzyklus. Sie scheinen keinen mit den Antennen assoziierten Mechanismus zur Wärmedissipation zu besitzen. Überschüssiges Licht wird von den Phycobilisomen direkt zu den Reaktionszentren von Photosystem II bzw. Photosystem I geleitet. Trotzdem sind Cyanobakterien in der Lage auch unter Lichtbedingungen, die das Anzuchtlicht um das mehrfache übersteigen, Photoinhibition zu vermeiden. Im Gegensatz zu Pflanzen, bei denen es unter diesen Bedingungen zu einem Schließen der Photosystem II Reaktionszentren kommt, bleiben in Cyanobakterien mehr als 80 % der Reaktionszentren geöffnet. Die sehr flexible Verteilung der Anregungsenergie zwischen Photosystem I und Photosystem II, ein Pflanzen gegenüber schnellerer D1-Reparatur-Zyklus und die Modulation der PSII Aktivität durch Einbau von photosynthetisch aktiveren D1-Isoformen scheinen für dieses Phänomen verantwortlich zu sein (Schaefer & Golden, 1989; Clarke *et al.*, 1993a; Campbell *et al.*, 1995). Außerdem deuten die verstärkte Hochregulation und der verstärkte Abbau von Carotinoiden im Starklicht darauf hin, dass Carotinoide in Cyanobakterien ein wichtiger Bestandteil des Schutzsystems des Photosyntheseapparates sind (Steiger *et al.*, 1999).

Das Genom von Cyanobakterien ist im Vergleich zu dem von Pflanzen relativ klein und übersichtlich. Die Sequenzdaten sind teilweise (*Synechococcus* PCC 7942) bzw. komplett (*Synechocystis* PCC 6803) bekannt (Kaneko & Tabata, 1997). Da sowohl *Synechococcus* als auch *Synechocystis* leicht transformierbar sind, eignen sich beide Stämme sehr gut, um die Auswirkungen einer gentechnisch veränderten Carotinoidkomposition auf den Schutz der Photosynthese bzw. die Regulation der Carotinoidbiosynthese zu erforschen.

Basierend auf einem etablierten System zur Integration von Genen in *Synechococcus* sollte der Carotinoidgehalt dieses Stamms erhöht bzw. die Carotinoidzusammensetzung erweitert werden. Die Expression von zusätzlichen Genen der Carotinoidbiosynthese in *Synechococcus* PCC 7942 ist von besonderem Interesse, um das antioxidative Schutzpotential verschiedener Carotinoide *in vivo* zu untersuchen. *Synechococcus* eignet sich für diese Untersuchungen besonders gut, da nur  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin in größeren Mengen in diesem Stamm akkumulieren.

Durch die Integration des Zeaxanthin Epoxidase-Gens (*zep* aus *Gentiana Lutea*) in das Genom von *Synechococcus* PCC 7942 sollte eine Transformante hergestellt werden, in der erstmalig in einem Cyanobakterium die beiden am Xanthophyllzyklus beteiligten Carotinoidepoxide Antheraxanthin und Violaxanthin synthetisiert werden.

Außerdem sollte durch Expression von Genen des allgemeinen Isoprenoidstoffwechsels der Carotinoidgehalt von *Synechococcus* PCC 7942 konstitutiv erhöht werden. Dazu wurden Transformanten, die entweder das Gen der Isopentenylidiphosphat Isomerase (*idi*) aus *Rhodobacter capsulatus* oder das Gen der Deoxyxylulose-5-Phosphat Synthase (*dxs*) aus *E. coli* in das Genom integriert haben, hergestellt. Durch Integration eines Konstruktes mit den Genen der Geranylgeranylpyrophosphat Synthase (*crtE*) und der Phytoen Synthase (*crtB*), sollte ebenfalls der Carotinoidgehalt erhöht werden, ohne dass dies zu einer Limitierung des Geranylgeranylpyrophosphat Pools führt.

Während sich das Carotinoidspektrum in *Synechococcus* PCC7942 sehr gut gentechnisch erweitern lässt, eignet sich der Cyanobakterienstamm *Synechocystis* PCC 6803, in dem mit Myxoxanthophyll und Echinenon zwei zusätzliche Carotinoide gebildet werden, dagegen sehr gut, um gezielt bestimmte Gene der Carotinoidbiosynthese auszuschalten. Durch das gezielte Ausschalten von Genen der Carotinoidbiosynthese sollte überprüft werden, ob sich das Fehlen von bestimmten Carotinoiden negativ auf die Photosyntheseleistung bzw. den Schutz des Photosyntheseapparates vor Starklichtschädigungen auswirkt. Durch Inkubation im Starklicht in Gegenwart von Radikalbildnern sollte in diesen Mutanten weiterhin untersucht werden ob bestimmte Carotinoide *in vivo* einen besseren Schutz vor bestimmten Radikalen verleihen.

Für diese Arbeit standen *Synechocystis* PCC 6803 Deletionsmutanten, die kein Echinenon, kein Zeaxanthin oder keines der beiden Carotinoide mehr synthetisieren können, zur Verfügung.

Die erhaltenen *Synechococcus*-Transformanten und *Synechocystis*-Deletionsmutanten wurden hinsichtlich ihrer Carotinoidzusammensetzung und ihres Carotinoidgehalts charakterisiert. Welchen Einfluss die Veränderungen in der Carotinoidkomposition auf die Photosyntheseleistung bzw. auf den Schutz der Photosynthese vor überschüssiger Anregungsenergie haben, wurde mittels Messungen der Sauerstoffentwicklung bzw. der Chlorophyll a-Fluoreszenz von Photosystem II untersucht.

Carotinoide werden besonders unter Starklichtbedingungen zum Schutz der Photosysteme vor überschüssiger Anregungsenergie und daraus resultierendem (photo-)oxidativen Prozessen benötigt. Über die Lichtregulation von Genen in Cyanobakterien lagen zu Beginn dieser Arbeit nur wenige Informationen vor. Um die Regulation der Carotinoidbiosynthese in *Synechococcus* zu untersuchen, wurden unterschiedliche Strategien verfolgt. Es wurde einerseits die Aktivität zweier putativer Promotorbereiche von *crtB* und *crtP* aus *Synechococcus* gemessen. Andererseits wurde die Transkriptmenge aller Carotinoidgene in *Synechococcus* PCC 7942 nach Schwachlicht- bzw. Starklichtinkubation bestimmt. Ob sich die Lichtregulation der Transkription tatsächlich auf die Neusynthese von Carotinoiden auswirkt, sollte in physiologischen Experimenten mit verschiedenen Hemmstoffen der Carotinoidbiosynthese bewiesen werden.

Um zu untersuchen, welches das auslösende Signal zur Hochregulation der Carotinoidbiosynthese in *Synechococcus* PCC 7942 ist, wurden weitere Hemmstoffversuche in Gegenwart von Substanzen, die den Redoxzustand des Plastochinonpools oder der gesamten Zelle beeinflussen, durchgeführt.

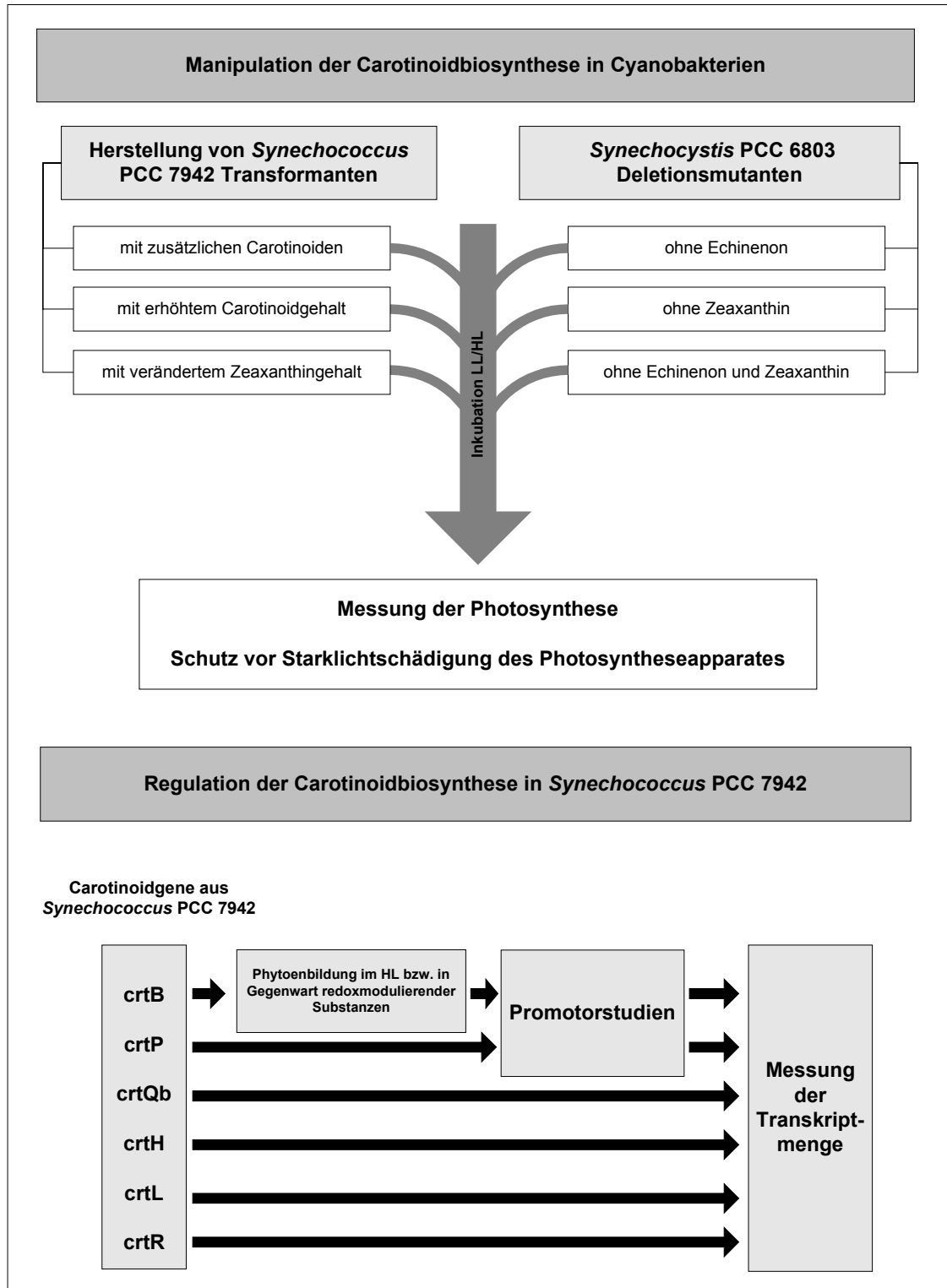


Abbildung I-3 Schematische Darstellung der in dieser Arbeit durchgeführten Arbeiten.. LL: Schwachlicht, HL: Starklicht, crtB: Gen der Phytoen Synthase, crtP: Gen der Phytoen Desaturase, crtQb: Gen der ζ-Carotin Desaturase, crtH: Gen der Lycopin Isomerase, crtL: Gen der Lycopin Zyklastase, crtR: Gen der β-Carotin Hydroxylase

## II MATERIAL UND METHODEN

### 1 Verwendete Organismen

#### 1.1 Cyanobakterien Stämme

##### 1.1.1 *Synechocystis* PCC 6803

Die in dieser Arbeit charakterisierten *Synechocystis* PCC 6803 Deletionsmutanten leiten sich von *Synechocystis* PCC 6803 Wildtyp ab und sind in *Tabelle II-1* zusammengefasst.

*Tabelle II-1 Verwendete Synechocystis PCC 6803 Transformanten*

Stamm	Kommentar
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	Wildtyp
<i>Synechocystis</i> PCC 6803 $\Delta$ crtO	inaktiviertes crtO Gen (codiert für $\beta$ -Carotin Ketolase)
<i>Synechocystis</i> PCC 6803 $\Delta$ crtR	inaktiviertes crtR Gen (codiert für $\beta$ -Carotin Hydroxylase)
<i>Synechocystis</i> PCC 6803 $\Delta$ crtRO	inaktiviertes crtR und crtRO Gen

Die *Synechocystis* PCC 6803 Deletionsmutanten wurden im Arbeitskreis von A. Vioque (Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universität Sevilla) durch Einfügen einer Kanamycin-Kassette in das  $\beta$ -Carotin Ketolase Gen bzw. einer Chloramphenicol-Kassette in das  $\beta$ -Carotin Hydroxylase Gen angefertigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

##### 1.1.2 *Synechococcus* PCC 7942

Alle in dieser Arbeit hergestellten und untersuchten *Synechococcus* Transformanten sind Abkömmlinge von *Synechococcus* PCC 7942 R2-PIM8 (*Tabelle II-2*).

*Tabelle II-2 Verwendete Synechococcus PCC 7942 Transformanten*

Stamm	Kommentar	Quelle
<i>Synechococcus</i> PCC 7942	Wildtyp	Pasteur Culture Centre
<i>Synechococcus</i> PCC 7942 R2-PIM8	trägt Integrationsplattform im Genom (metF-Gen)	van der Plas et al., 1990

Zur Integration von Fremd-DNA in *Synechococcus* PCC 7942 wurden von van der Plas *et al.*, (1990) Stämme konstruiert, die eine spezielle Integrationsplattform (platform of integration PIM) auf ihrem Genom tragen (*Synechococcus* PCC 7942 R2-PIM8 und *Synechococcus* PCC 7942 R2-PIM9). Die Integrationsplattform besteht aus dem promotorlosen Ampicillinresistenz-Gen ( $\beta$ -Lactamasegen, bla) und dem Replikationsursprung des pUC19 Vektors und einem dazwischen lokalisierten Resistenzmarker (bei PIM8 Streptomycinresistenz, (aad-Gen). Sie wurde in das chromosomale metF-Gen von *Synechococcus* PCC 7942 eingefügt. Die so erhaltenen Stämme können kein Methionin mehr synthetisieren, sind aber, wenn dem Medium L-Methionin beifügt wird, normal wachstumsfähig (van der Plas *et al.*, 1990).

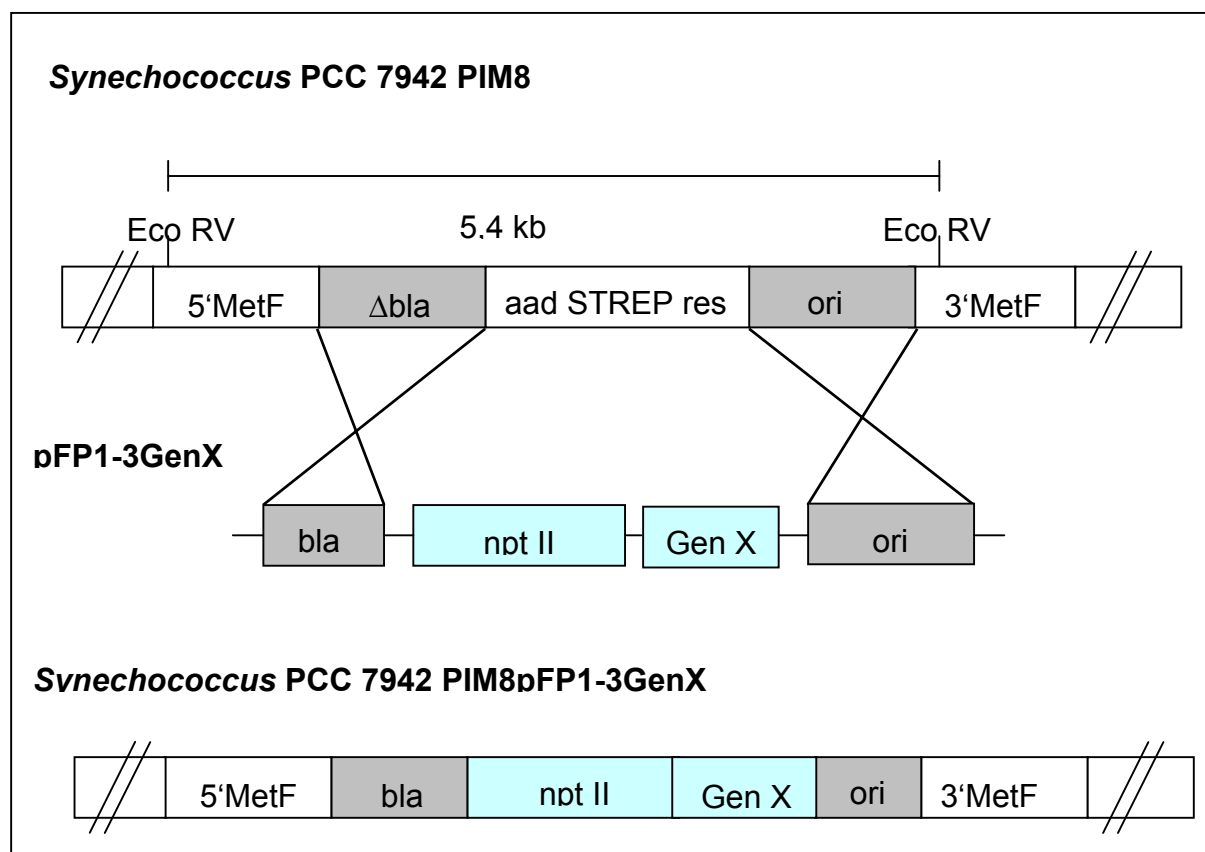


Abbildung II-1 DNA Integration in *Synechococcus* PCC7942 PIM8 nach Transformation mit pFP1-3GenX

Werden diese Stämme mit einem von pBR322 abgeleiteten Vektor transformiert, kommt es zu einem „double crossover“ zwischen den homologen Sequenzen des Vektors und der Integrationsplattform (Abbildung II-1). Bei diesem „double crossover“ Ereignis werden die DNA Bereiche zwischen den homologen Bereichen ausgetauscht. Auf der

Integrationsplattform wird das Resistenzgen durch das neueingefügte DNA-Fragment (npt II + GenX) ersetzt und das promotorlose Ampicillinresistenz Gen durch ein funktionsfähiges Ampicillinresistenz Gen restauriert.

In dieser Arbeit wurde der Integrationsvektor pFP1-3 verwendet (Götz *et al.*, 1999). Der Vektor pFP1-3 ist ein Abkömmling des Vektors pUC 19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), in den das Kanamycinresistenz-Gen (nptII-Gen) des Transposons Tn5 (Putnoky *et al.*, 1983) einkloniert wurde (Abbildung II-2). Mithilfe dieses Vektors ist es möglich, Gene in *Synechococcus* PCC 7942 stabil zu integrieren und zu exprimieren.

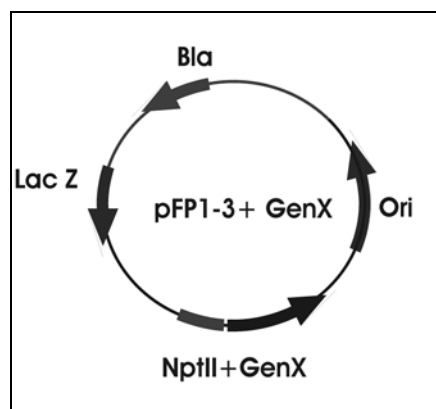


Abbildung II-2 Integrationsvektor pFP1-3 LacZ, Gen des  $\alpha$ -Peptids der  $\beta$ -Galaktosidase; nptII Gen der Neomycin Phosphotransferase II (Kanamycinresistenz); bla,  $\beta$ -Laktamase Gen (Ampicillinresistenz); ori, Replikationsursprung

## 1.2 *Escherichia coli* Stämme

Zur Vervielfältigung von Plasmiden und zur anschließenden DNA-Isolation wurde der *E. coli* Stamm XL1-blue MRF' (Stratagene, La Jolla, USA, Tabelle II-3) verwendet. Komplementierungsexperimente, um die Funktionalität von Carotinoidgenen in *E. coli* zu überprüfen, wurden mit dem *E. coli* Stamm JM 101 (Messing, 1983) durchgeführt. Komplementierung in *E. coli* bedeutet, dass durch Einklonierung eines bestimmten Sets an Carotinoidgenen ein so genanntes Substratcarotinoid gebildet wird. Kloniert man das zu untersuchende Gen ebenfalls in diesen „Substratproduzierer“, lässt sich feststellen, ob das Genprodukt in *E. coli* zu einer Umsetzung des Substrats führt. Eine weitere Möglichkeit ist, zu überprüfen, ob die Funktion eines vorher deletierten Carotinoidgens, durch eine Komplementierung mit einem anderen Gen, wiederhergestellt werden kann.



Tabelle II-3    *Verwendete E. coli-Stämme*

Stamm	Verwendung	Quelle
XL1-blue MRF'	DNA-Isolation	Stratagene, La Jolla, USA
JM 101	Komplementierung	Messing, 1979

## 2 Anzucht und Inkubationsbedingungen von Cyanobakterien

### 2.1 BG 11 Medium

Alle Arbeiten mit Cyanobakterien wurden steril durchgeführt.

Die Cyanobakterien wurden in BG11-Flüssigmedium (*Tabelle II-4*) oder auf BG 11 Festagarplatten kultiviert.

Tabelle II-4    *BG11 Medium (Rippka et al., 1979).*

Komponente	Konzentration	
NaNO <sub>3</sub>	18,00	mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	300,00	μM
CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	240,00	μM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	230,00	μM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	190,00	μM
Zitronensäure x H <sub>2</sub> O	31,00	μM
Fe(III) NH <sub>4</sub> Citrat	20,00	μM
Na <sub>2</sub> Mg EDTA	2,80	μM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	48,00	μM
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	9,10	μM
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	7,70	μM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,60	μM
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,32	μM
CO(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,17	μM
TES / NaOH pH 8,0	5,00	mM

Zur Anzucht von *Synechococcus* PCC 7942 R2-PIM8 und der daraus abgeleiteten Transformanten wurde dem BG11-Medium vor dem autoklavieren 30 µg/ml L-Methionin zugegeben.

Zur Herstellung der BG11-Agarplatten wurden zweifach konzentriertes BG11-Medium und 3% (w/v) Agar (Difco) in H<sub>2</sub>O getrennt autoklaviert. Das Medium und der Agar wurden nach dem Autoklavieren gemischt und es wurden 0,0001 Volumen steriles 1M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> zugegeben. Der Agar wurde vor dem Autoklavieren dreimal mit Bidest. gewaschen.

## 2.2 Antibiotika

Folgende Antibiotika wurden zur Selektion der Cyanobakterien Transformanten dem Medium in Form von sterilen Lösungen zugegeben (Tabelle II-5).

Tabelle II-5 Antibiotika zur Selektion von Cyanobakterien-Transformanten. WT: Wildtyp

Transformante	Antibiotika	[µg/ml Medium]
<i>Synechococcus</i> PCC 7942		
• PIM8 und alle mit pSE2 transformierten Abkömmlinge	Streptomycin	5
• alle mit pFP1-3 transformierten PIM8 Abkömmlinge	Kanamycin	10
<i>Synechocystis</i> PCC 6803 WT		
• ΔcrtO	Kanamycin	50
• ΔcrtR	Chloramphenicol	20
• ΔcrtRO	Kanamycin + Chloramphenicol	50 + 20

## 2.3 Anzuchtbedingungen

Die Anzucht der Cyanobakterien-Flüssigkulturen erfolgte in Knieseröhren in einem mit 40 µmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> „Weißlicht“ (Leuchtstoffröhren Philips TLD 36W-1/25) beleuchteten Anzuchtbecken bei 30°C. Die Knieseröhren wurden mit einem Gemisch aus Luft 98,5 % (v/v)

und CO<sub>2</sub> 1,5 % (v/v) begast. Die Kulturen auf Agarplatten wurden bei 30°C und einer Lichtintensität von 30  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Leuchtstoffröhren Philips TLD 36W-1/25) in einem Brutschrank angezogen. Die Lichtintensität wurde mit einem Quantensensor (LICOR Inc., Lincoln, Nebr., USA) gemessen. Die Anzucht diente zur Vermehrung und Erhaltung der Kulturen oder zum Bereitstellen von Vorkulturen für anschließende Experimente.

## 2.4 Inkubationsbedingungen

Für Inkubationen der Cyanobakterien Kulturen unter Schwach- bzw. Starklichtbedingungen wurden 2-3 Tage alte Vorkulturen (siehe 2.3 Anzuchtbedingungen), die sich in der exponentiellen Wachstumsphase (Chlorophyllgehalt ca. 10  $\mu\text{g/ml}$ ) befanden, auf folgende Chlorophyllgehalte verdünnt:

- 3  $\mu\text{g/ml}$  im Falle von physiologischen Experimenten
- 5  $\mu\text{g/ml}$  für RNA-Präparationen

Schwachlichtinkubationen wurden bei 50  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  durchgeführt.

Starklichtinkubationen wurden im Falle von *Synechococcus* PCC 7942 bei ca. 400  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Quecksilberdampflampe, Osram HQI T400) ebenfalls im Anzuchtsbecken durchgeführt oder im Falle von *Synechocystis* PCC 6803 bei 1200  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Halogenlampen EYC/CG 71W, 12V, Lightning General Electric Company, Cleveland, USA) in Glasschalen auf einem temperierten Schütteltisch bei ca. 30°C.

### 2.4.1 Hemmstoffversuche

Alle eingesetzten Hemmstoffe oder Substanzen zur Hemmung der Carotinoidbiosynthese, zur Modulation des Redoxzustandes der Elektronentransportkette oder zu verstärkter Radikalbildung in Cyanobakterien wurden aus Stammlösungen entnommen und zu den Flüssigkulturen pipettiert. Die mit Hemmstoff versehenen Kulturen wurden 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur vorinkubiert. Die verwendeten Substanzen sind in *Tabelle II-6* aufgelistet.

Die Stammlösungen für 1,4-Dithiothreitol (DTT<sub>red</sub>) und 2,5-Dibrom-3-Methyl-6-Isopropyl-p-Benzochinon (DBMIB) wurden jeweils frisch angesetzt. Beim Ansetzen der DBMIB-Stammlösung wurde Natriumborhydrid (NaBH<sub>4</sub>) zum Reduzieren des DBMIB zugefügt. Nach Beendigung der Reaktion wurden 5  $\mu\text{l}$  konzentrierter HCL zugegeben.

Tabelle II-6 Verwendete Carotinoidbiosynthese-, Photosynthesehemmstoffe und Radikalbildner

Substanz	Lösungsmittel	Stammlösung	Beschreibung
Norflurazon (NFZ) SAN 9789, Sandoz, Basel	MeOH	$10^{-2}$ M	Phytoen Desaturase Hemmstoff (Sandmann, 1989)
3-(3,4 Dichlorphenyl)-1,1-Dimethylurea (DCMU)	MeOH	$10^{-2}$ M	Photosynthese Hemmstoff (Krieger-Liszkay & Rutherford, 1998), (Vener <i>et al.</i> , 1998)
2,5-Dibrom-3-Methyl-6-Isopropyl-p-Benzochinon (DBMIB)	MeOH	$10^{-2}$ M	Photosynthese Hemmstoff (Escoubas <i>et al.</i> , 1995; Vener <i>et al.</i> , 1998)
1,4-Dithiothreitol (DTT <sub>red</sub> )	DMSO	$10^{-1}$ M	reduziert SH-Gruppen (Sippola & Aro, 1999)
Methylviologen (MV)	DMSO	$10^{-2}$ M	Radikalbildner, überträgt Elektronen auf O <sub>2</sub> (Asada, 1996)
Methylenblau (MB)	H <sub>2</sub> O	$10^{-2}$ M	Radikalbildner, verstärkte Bildung von <sup>1</sup> O <sub>2</sub> bei Belichtung (Fukuzawa <i>et al.</i> , 1997)

### 3 Anzucht von *E. coli*

#### 3.1 Luria-Bertani-Flüssigmedium (LB-Medium)

Die Anzucht von *E. coli*-Kulturen erfolgte in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten (Sambrook *et al.*, 1989). Die Zusammensetzung des LB-Mediums ist in *Tabelle II-7* beschrieben. Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Agar (Roth) zugegeben.

Tabelle II-7 Zusammensetzung von LB-Medium

Komponente	Konzentration [g/l]
Pepton aus Casein	10
Hefe-Extrakt	5
NaCl	10
1 ml 1 N NaOH	

### 3.2 Antibiotika

Zur Selektion der *E. coli*-Transformanten wurden folgende Antibiotika verwendet (Tabelle II-8).

Tabelle II-8 Antibiotika zur Selektion von *E. coli*-Transformanten nach Sambrook et al. 1989

Antibiotika	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Ampicillin	20
Chloramphenicol	34
Kanamycin	25

### 3.3 Anzuchtbedingungen

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in Flüssigkulturen oder auf LB-Platten im Brutschrank bei 37°C über Nacht. 5 ml Übernachtskulturen wurden entweder aus Dauerkulturen oder von Einzelkolonien inokuliert.

## 4 Verwendete Vektoren

Die in Tabelle 8 aufgeführten Vektoren wurden zur Transformation von Genen in *E. coli*, zur Transformation von Genen in *Synechococcus* PCC 7942 oder für Komplementierungsexperimente verwendet.

Tabelle II-9 Zur Transformation von *E. coli* bzw. *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 verwendete Vektoren.

Name	Kommentar	Resistenz	Quelle
pMonT	modifizierter pBSK+, besitzt T-Überhang für Klonierung von Taq-PCR-Produkten mit A-Überhang.	Amp	(Borovkov & Rivkin, 1997)
pUCBM20 dxs	pUC-Vektor, der das DXS-Gen aus <i>E. coli</i> trägt	Amp	(Sprenger et al., 1997)
pFP1-3dxs	Integrationsvektor zur Klonierung von dxs in <i>Synechococcus</i> .	Amp, Km	diese Arbeit
pACCAR25ΔX	crt Cluster von <i>Erwinia uredovora</i> in pACYC184, crtX deletiert → Zeaxanthin Produzent.	Cm	(Misawa et al., 1995)
pBSZE1	pBS mit Zeaxanthin Epoxidase Gen aus <i>Gentiana lutea</i> .	Amp	(Zhu et al., 2003)

Name	Kommentar	Resistenz	Quelle
pFP1-3	modifizierter pUC19, Integrationsvektor für <i>Synechococcus</i> PCC 7942 R2-PIM8.	Amp	(Götz <i>et al.</i> , 1999)
pFP1-3Zep <sub>G.L.</sub>	Vektor zur Integration des Zeaxanthin Epoxidase Gens in <i>Synechococcus</i> .	Amp, Km	diese Arbeit
pFP1-3crtZ <sub>EU</sub>	Vektor zur Integration des $\beta$ -Carotin Hydroxylase Gens in <i>Synechococcus</i> .	Amp, Km	(Götz <i>et al.</i> , 1999)
pFP1-3crtB	Vektor zur Integration des Phytoen Synthase Gens in <i>Synechococcus</i> .	Amp, Km	M. Sandmann
pFP1-3crtBE	Vektor zur Klonierung der Phytoen Synthase und Geranyl Geranyl Pyrophosphat Synthase Gene in <i>Synechococcus</i> .	Amp, Km	S. Römer
pK18+	modifizierter pUC18 für Integration von Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten in <i>Synechococcus</i> .	Amp, Km	M. Sandmann
pK18p crtP	Vektor zur Integration des crtP-Promotor-Reporter-Gen Konstrukts in <i>Synechococcus</i> .	Amp, Km, Cm	M. Sandmann
pK18p crtB	Vektor zur Integration von crtB-Promotor-Reporter-Gen Konstrukt in <i>Synechococcus</i> .	Amp, Km, Cm	diese Arbeit
pK18CAT	Vektor zur Integration von Reporter-Gen ohne Promotor (negativ Kontrolle) in <i>Synechococcus</i> .	Amp, Km	M. Sandmann
pk18CM4	zur Integration des Reporter-Gens + konstitutiven starken Promotor (positiv Kontrolle) in <i>Synechococcus</i> .	Amp, Km, Cm	M. Sandmann
pPDS del35PYS	Vektor der das crtBP-Operon trägt.	Amp	(Chamovitz <i>et al.</i> , 1993)
pACYC184	Vektor der zur Amplifizierung des CAT-Gens diente.	Cm	(Chang & Cohen, 1978)
pSE2	Vektor zur heterologen Genexpression in <i>Synechococcus</i>	Strep	(Aichi & Omata, 1997)

## 5 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie DNA-Restriktionsverdau, DNA-Ligation, Ethanol-fällung und Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gel-Elektrophorese wurden nach der Methodensammlung von Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Die Rückgewinnung von DNA aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem Elu-Quick kit (Schleicher & Schüll). Die verwendeten Restriktionsenzyme waren von GibcoBRL (Karlsruhe) oder MBI Fermentas, die T4-Ligase wurden von MBI Fermentas bezogen. Die Biotherm Taq Polymerase stammte von der Firma Genecraft.

### 5.1 Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli*

#### 5.1.1 DNA-Minipräparation

Diese Methode wurde verwendet, wenn es bei der Plasmidisolation nicht auf 100 %ige Ausbeute und Reinheit ankam, z.B. wenn die DNA für Restriktionsverdaue, um positive Klone zu identifizieren, isoliert wurde.

Aus einer *E. coli* 5 ml Übernachtskultur wurden 1,5 ml entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 14000 upm 1 min sedimentiert. Der Überstand wurde bis auf einen kleinen Rest verworfen und das Sediment darin rückgelöst. Zum Zellaufschluss wurden 300 µl TENS (10 mM Tris-HCl, 1mM Na-EDTA, 0,5 % SDS, 0,1 M NaOH, pH 8,0) zugegeben und die Probe mit einem Laborschüttler (Vortex) gemischt. Nach Zugabe von 150 µl 3-5 M Na-Acetat (pH 5) wurden die präzipitierten Zellwandtrümmer und Proteine durch eine 10 min Zentrifugation bei 14000 upm sedimentiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde anschließend durch Zugabe von 800 µl eiskaltem Ethanol und 10 min Zentrifugation gefällt, das Sediment mit 500 µl 80 % EtOH gewaschen und nach 5 min Trocknen in 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 rückgelöst. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

#### 5.1.2 Plasmidisolation mit dem Concert DNA-Präparationskit

Um reine Plasmid-DNA in möglichst hoher Ausbeute zu bekommen, wurde der Concert DNA-Präparationskit (GibcoBRL, Karlsruhe) verwendet. Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung geschickt wurde oder zur Transformation in *Synechococcus* PCC 7942

verwendet werden sollte, wurde mit dem DNA-Präparationskit aus *E. coli* Übernachtskulturen isoliert. In diesen DNA-Präparationskit bindet Plasmid-DNA spezifisch an eine Trennsäule und kann nach einem Waschschrift spezifisch in 10 mM Tris pH 8,0 von der Säule eluiert werden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

DNA, die zum Sequenzieren verwendet wurde, wurde anschließend mit einem Dialysefilter (Millipore 0,025 µm Porengröße) gegen 20 ml Bidest. + 100 µl 10 mM Tris pH 8,0 dialysiert.

## **5.2 Isolation von genomischer DNA aus *Synechococcus* PCC 7942 (verändert; nach Sambrook et al., 1989).**

30 ml einer *Synechococcus* PCC 7942 Kultur (Chlorophyllgehalt ca. 10 µg/ml) wurden geerntet, in 1,5 ml BG11 Medium resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe einer Spatelspitze Lysozym (Sigma) wurde der Ansatz, um die Zellwände zu verdauen, 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einer 2 minütigen Zentrifugation bei 14000 upm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 567 µl TE-Puffer resuspendiert und 30 µl 20 % SDS und 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation für 1 h bei 37°C. Danach wurden 100 µl 5 M NaCl und 80 µl CTAB zugegeben und die Probe für 10 min bei 65°C inkubiert.

Nach dem Abkühlen wurden 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 (v/v) zugegeben und der Ansatz gut gemischt. Dann erfolgte eine Zentrifugation für 5min bei 14000 upm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und eine Phenol-/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurden die Proben mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 (v/v/v) versetzt und gut gemischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde die obere Phase, welche die DNA enthält, abgenommen und in ein neues Gefäß überführt.

Es folgte eine Fällung der genomischen DNA mit Isopropanol. Die Proben wurden dazu mit 0,6 Volumen Isopropanol versetzt und gemischt, bis die DNA als weiße Flocken zu sehen war. Das Präzipitat wurde bei 14000 upm für 20 min sedimentiert und anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen. Die DNA wurde für 10 min getrocknet und in 100 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,5 über Nacht bei Raumtemperatur resuspendiert.



### 5.3 Transformation von *E. coli*

Um die zur Transformation von *Synechococcus* PCC 7942 hergestellten Genkonstrukte zu vermehren oder im Falle des Zeaxanthin Epoxidase Gens und des pFP1-3crtBE Konstrukts auf eine Aktivität in *E. coli* zu untersuchen, wurden die Vektoren, die das jeweilige Genkonstrukt trugen, in *E. coli* transformiert.

Um kompetente Zellen zu erhalten, wurde von einer Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli*-Stamms 100 ml LB-Medium 1:1000 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4-0,5 angezüchtet. Die Zellen wurden auf Eis heruntergekühlt und für 10 min (2600 x g) sedimentiert. Das Sediment wurde in 20 ml TFB1-Puffer (30 mM K-Acetat, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 400 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8, steril filtriert) rückgelöst und für 1,5 -2,5 Stunden auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 min zentrifugiert (650 x g), das Sediment vorsichtig in TFB2-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 15 % Glycerin, pH 7,0, steril filtriert) aufgenommen und die kompetenten Zellen in 200 µl-Aliquots bei -80°C gelagert.

Bei der Transformation wurde zu einem 200 µl Aliquot kompetenter Zellen 1 µg Plasmid-DNA oder 5 µl eines Ligationsansatzes pipettiert und die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 1 min Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad wurden die Zellen erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die Zellen zunächst für eine Stunde ohne Zugabe von Antibiotika bei 37°C im Wasserbad inkubiert, anschließend wurden bis zu 150 µl des Transformationsansatzes auf antibiotikahaltigen LB-Agar Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Für ein Blau-Weiss-Screening von Transformationsansätzen in *E. coli* XL 1 blue mit Konstrukten, die in den Klonierungsvektor pMONT kloniert waren, wurde auf den LB-Agarplatten 10 µl 26 mg/ml X-Gal und 10 µl 1 M IPTG ausgestrichen.

#### 5.3.1 Screening der Klone

Zum Identifizieren positiver *E. coli*-Transformanten nach Transformation von Ligationsansätzen, wurde eine Kontroll-PCR (III.5.8.1) durchgeführt. Aus positiven Transformanten wurde das transformierte Plasmid isoliert und Klone mit richtig orientierter DNA mittels Restriktionsverdau ermittelt. Plasmid-DNA aus positiven Klonen wurde zum Sequenzieren geschickt.

### 5.3.2 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der DNA erfolgte bei der Firma Scientific Research and Development GmbH Niederursel. Die folgenden Sequenzierprimer wurden verwendet (*Tabelle II-10*).

*Tabelle II-10 Verwendete Sequenzierprimer*

Primer	Sequenz 5'-3'	Klonierungsvektor
FP1-3 Sq	AGG TTG GGC TTC GGA ATC	pFP1-3
M13-rev	CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG	pMONT
M13-for	GTA AAA CGA CGG CCA GT	pMONT

Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit dem Programm DNASIS 0.1 (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.) editiert. Ähnlichkeitsvergleiche der sequenzierten Fragmente oder der zu untersuchenden Promotorbereiche vor crtB und crtP wurden mit Hilfe des Programms BLAST 2.0 (Altschul *et al.*, 1997) durchgeführt. Es wurden blastx und blastp mit ihren voreingestellten Parametern verwendet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 5.4 Transformation von *Synechococcus* PCC 7942 R2 PIM8

Da *Synechococcus* PCC 7942 von Natur aus zur Aufnahme von Plasmid-DNA fähig ist (Shestakov & Khyen, 1970), bedarf es keiner speziellen Vorbehandlung der Zellen. *Synechococcus* PCC 7942 R2 PIM8, der Stamm, der die Integrationsplattform im Genom trägt, wurde auf BG11-Platten angeimpft und für 2-3 Tage bei 30°C im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden mit 500µl BG11 Medium von der Platte gewaschen und in ein steriles 15 ml Kunststoffröhrchen (Greiner) gefüllt. Es wurden 2-4 µl Plasmid-DNA zugegeben, kurz gemischt und der Transformationsansatz für ca. 3 h in den Brutschrank bei 30°C gestellt. Danach wurden ca. 125 µl des Transformationsansatzes zur Selektion auf ampicilin- und kanamycinhaltigen BG11-Platten ausplattiert. Die Platten wurden unter leichter Beschattung für ca. 3 Tage und dann im Brutschrank bei 30 µmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> und 30°C kultiviert. Nach 2-3 Wochen waren grüne Kolonien sichtbar, die etwa 2 Wochen später abgenommen und auf eine frische Platte ausgestrichen wurden. Von diesen Platten konnten nach ca. 1 Woche Flüssigkulturen angeimpft werden.

## 5.5 RNA-Isolation aus *Synechococcus* PCC 7942 (Neuschaefter-Rube *et al.*, 2000)

Um die Degradierung der RNA durch RNasen zu verhindern, wurden alle benötigten Lösungen mit Dimethylpyrocarbonat (DPMC) behandeltem Aqua Bidest. angesetzt. Für die Präparation wurden sterile Einweggefäße verwendet. Alle Arbeiten wurden mit Handschuhen durchgeführt. Handschuhe, Laborbank und Pipetten wurden immer wieder mit Methanol oder RNase away (Molecular BioProducts inc., San Diego) abgewischt.

Aus im Schwach- bzw. Starklicht inkubierten *Synechococcus* PCC 7942-Kulturen wurden nach 15 min, 30 min, 60 min und 120 min jeweils 20 ml Kultur entnommen, die Zellen sedimentiert und in 1,5 ml BG11-Medium rückgelöst und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach einer 15 s Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Sediment sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zum Aufschluss der Zellen wurde 100 µl eiskalter AE-Puffer (20 mM NaAcetat, pH 5,5 mit Essigsäure einstellen, 1mM EDTA) auf das gefrorene Sediment gegeben und der Ansatz auf Eis aufgetaut. Das Einfrieren und Auftauen wurde 2-mal wiederholt, danach erfolgte die Extraktion der RNA. Dazu wurde 1,2 ml 65°C heißer PSAE Extraktionspuffer (17 ml Roti Aqua Phenol (Roth), 212,5 µl SDS 20 % (w/v), 7ml AE-Puffer) zu den aufgeschlossenen Zellen gegeben und die Proben 15 min unter Schütteln bei 65°C inkubiert. Danach wurden die Proben auf Eis abgekühlt und dann zur Phasentrennung 5 min in einer kühlbaren Eppendorfszentrifuge bei 14000 upm zentrifugiert. Die Oberphase, welche die RNA enthält, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 100 µl 2 M NaAcetat pH 5 vermischt. Die Proben wurden mit dem gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 v/v/v) gewaschen. Dieser Waschschrift wurde so oft wiederholt, bis keine Interphase mehr sichtbar war.

Um DNA Verunreinigungen in den Präparationen vollständig zu entfernen, wurden die Proben zuerst über Nacht bei -20°C mit dem gleichen Volumen 6 M LiCl gefällt. Das Sediment wurde nach 15-minütiger Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) bei 14000 upm zur Entfernung der Salze mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und nach kurzer Zentrifugation bei Raumtemperatur getrocknet. Das Präzipitat wurde in 20 µl 10 mM Tris pH 8 rückgelöst und die etwaigen DNA Verunreinigungen durch einen DNase Verdau (DNase 1 µg/ml GibcoBRL) entfernt. Zum Entfernen von Proteinresten wurden die Proben noch zweimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 v/v/v) ausgeschüttelt und

anschließend nach Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol 1 h auf Eis präzipitiert und nochmals bei 14000 upm zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 1 ml 70 % Ethanol und nach kurzer Zentrifugation wurde das Präzipitat 5-10 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 20 µl 10 mM Tris/HCl pH 8 auf Eis rückgelöst. Die RNA wurde in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Quantifizierung und Reinheitskontrolle:

Die Menge an isolierter RNA wurde photometrisch nach folgender Formel bestimmt.

$$\text{RNA } [\mu\text{g}] = \text{Extinktion}_{260} * 0,04 * \text{Verdünnung}$$

Als Maß für die Reinheit gilt, dass das Verhältnis der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm zu der Absorption bei 280nm optimalerweise zwei sein sollte.

$$\frac{\lambda_{260}}{\lambda_{280}} \approx 2$$

## 5.6 Umschreiben von RNA in cDNA - Reverse Transkription

Es wurden jeweils 5 µg gesamt RNA aus *Synechococcus* PCC 7942 nach 15 min, 30 min, 60 min und 120 min Inkubation im Schwach- bzw. Starklicht in einer Reverse Transkriptase Reaktion (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis kit, MBI Fermentas) in cDNA umgeschrieben. Die Reverse Transkriptase-Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurde für jedes Gen eine getrennte Reaktion mit genspezifischen Primern durchgeführt. Die Primer sind im Kapitel 5.8.4.1 aufgelistet.

## 5.7 Reinigung der cDNA

Die in der Reverse Transkriptase Reaktion erhaltenen cDNA Fragmente sind sehr klein (100-120 bp) und somit nur mit hohen Verlusten mit der üblichen DNA Reinigungsmethode (über Agarosegel und Rückgewinnung der DNA aus dem Gel) von den Primern zu trennen. Deshalb wurden die cDNA Fragmente in dieser Arbeit mit dem QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) gereinigt und so von den Primern getrennt. Das Trennprinzip basiert darauf, dass DNA-Fragmente < 50 bp nicht an das Säulenmaterial binden können und somit in einzelnen Waschschriften entfernt werden. Größere DNA-Fragmente binden an die Säule und können nach der Trennung eluiert werden. Laut Herstellerangaben liegt die Ausbeute bei DNA-Fragmenten um 100 bp noch bei > 90 % und die Trennung von Primern und Oligonukleotiden

ist vollständig gewährleistet. Dies ist Voraussetzung, um die cDNA in der Real Time PCR als reines Templat einsetzen zu können.

## 5.8 PCR

Zur Vervielfältigung von Genen oder DNA Fragmenten mit bekannter DNA-Sequenz oder zum „fischen“ von DNA-Fragmenten von crt-Genen aus *Synechococcus* PCC 7942, deren Sequenz noch nicht bekannt war, wurde die Polymerase Chain Reaction (PCR) verwendet (White, 1989). Folgende Substanzen wurden in den Standard 50 µl Reaktionsansätzen eingesetzt (*Tabelle II-11*).

*Tabelle II-11 Standard-PCR-Reaktionsansatz*

Substanz	Menge [µl]
Templat DNA	1
Primer Start 5'	5
Primer Ende 3'	5
Puffer (10fach)	5
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2,5
dNTP's 5 mM	2
H <sub>2</sub> O	29
Taq-Polymerase (5 u/µl)	0,5

In einzelnen Fällen wurde die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration variiert. Es wurde meistens die Biotherm Taq-Polymerase der Firma Genecraft verwendet.

Die PCR-Reaktion wurde in einem PCR-Gerät (Progene, Techne, Cambridge, UK) durchgeführt. Das Standard PCR Programm ist in *Tabelle II-12* dargestellt.

Tabelle II-12 Standard-PCR-Programm

ProgrammNr.	Temp	Zeit
1	40°C	2 min
2	94°C	3 min
25-30x 3	94°C	30 s
	50-58°C*	45 s
	72°C	90 s
4	72°C	10 min

\* Die Annealingtemperatur richtete sich nach dem verwendeten Primerpaar.

### 5.8.1 Kontroll-PCR (*E. coli*)

Eine schnelle Methode Klone auf eine erfolgreiche Transformation mit der eingesetzten DNA zu überprüfen, ist die Kontroll-PCR. Dafür wurden einzelne Klone mit einem sterilen Zahnstocher von der Platte genommen und auf einer neuen Platte ausgestrichen. Die am Zahnstocher verbliebenen Zellen werden als Templat in ein 500 µl Eppendorfgefäß mit 10 µl PCR-Mix gegeben. Mit diesen Ansätzen wurde eine PCR-Reaktion unter Standardbedingungen durchgeführt. Bei erfolgreicher Transformation erhält man nach Auftrennung des PCR-Produktes über ein Agarose-Gel eine DNA-Bande in der Größe des transformierten DNA-Abschnittes.

### 5.8.2 Kontroll-PCR (*Synechococcus* PCC 7942)

Zur Überprüfung, ob ein Fremdgen erfolgreich in das Genom von *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 integriert wurde, wurde in dieser Arbeit ein Schnelltest mittels einer Kontroll-PCR etabliert.

Tabelle II-13 Primer für Kontroll-PCR (*Synechococcus* PCC 7942)

PIM8 Transformante	Primer	Sequenz 5'-3'
pFP1-3crtBE	PCCBE1	TGACGG TCTGCGCAAAAAAAC
	PCCBE2	CTAGAGCGGGCGCTGCCAGAG
pFP1-3dxs	dxs-1	AAAGGATCCGTATTAAGGAGCCCCTGATGAG
	dxs-2	CAGGAGTGGAGTAGGAATTCTGCC
pFP1-3ZE	ZE-1	CATGGTCGACCTTAGGAATCCAAGATGGAG
	ZE-2	ACGCGTCGACGCTTGAGCTCTATCAGCTATTCCATCAGCA
pK18promcrtB	P1PcrtB	GCAGCGGTACCTCGCCAG
	P4 CAT Stop	GTTTTAAGGGGATCCATAACTGCC

Die zur Überprüfung der jeweiligen Gene verwendeten Primer sind in *Tabelle II-13* aufgelistet. Als Templat wurden 10 µl aus 1ml einer dichten Flüssigkultur des Klons (Chlorophyllgehalt >10), deren Zellwand über Nacht bei 37 °C mit Lysozym verdaut wurde, eingesetzt.

### 5.8.3 Overlap Extension PCR

Mittels dieser PCR Methode können zwei DNA-Fragmente basenpaargenau miteinander fusioniert werden (Ho *et al.*, 1989). Diese Methode wurde verwendet, um zu untersuchende Promotorbereiche mit einem Reporter-Gen zu fusionieren ().

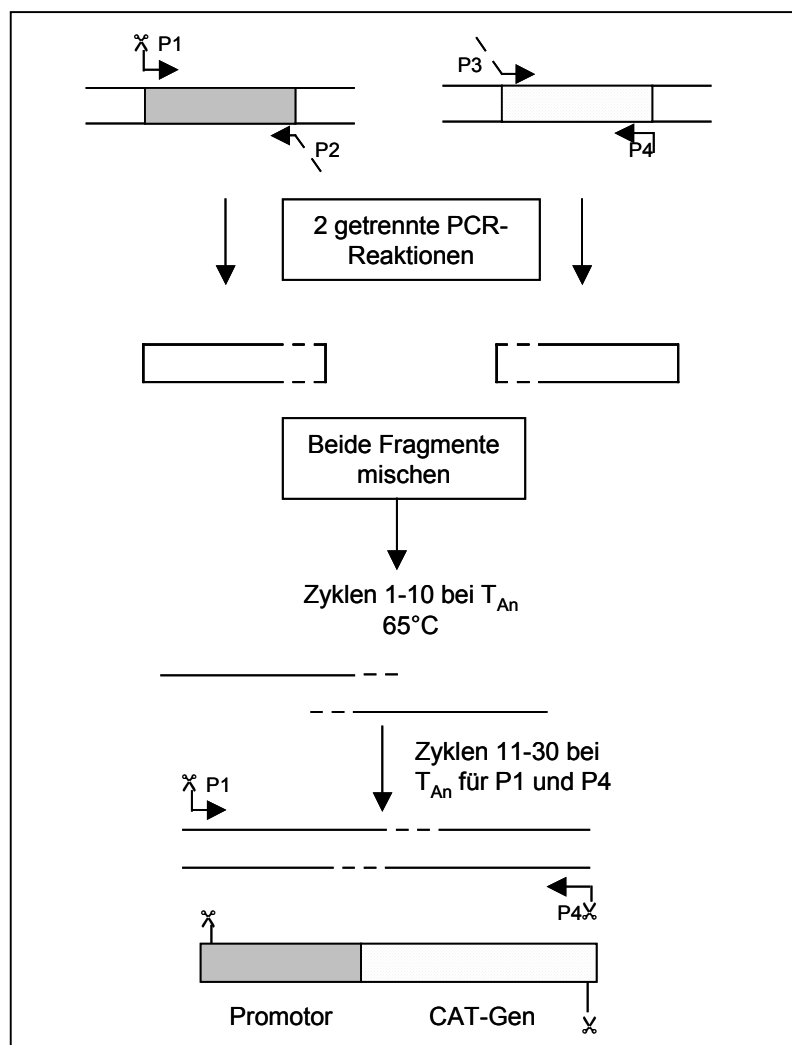


Abbildung II-3 Schematische Darstellung der Overlap Extension PCR (Erläuterungen im Text) P1-4: Primer 1-4.

Bei der Overlap Extension PCR wurden zuerst in zwei getrennten PCR-Reaktionen ein Fragment des putativen Promotors und ein promotorloses Fragment des Chloramphenicol Aminotransferase Gens (CAT-Gens) amplifiziert. Es wurde Pwo-Polymerase (Sawaday, peqlab, Erlangen), die keinen A-Überhang am 3'-Ende anhängt, verwendet. Primer2 und Primer3 haben jeweils eine überhängende Sequenz, die homolog zum jeweiligen 5'-Ende des anderen Primers ist. Deswegen können in einer folgenden PCR-Reaktion die beiden gereinigten Amplifikate aus den ersten PCR-Reaktionen aneinander binden. Diese Aggregate fungieren in den ersten 10 Zyklen dieser PCR-Reaktion gleichzeitig als Templat und als Primer. Die Annealingtemperatur wurde so gewählt, dass Primer1 und Primer4 unter diesen Bedingungen nicht binden können. Das in den ersten 10 PCR-Zyklen gebildete Amplifikat dient in den folgenden PCR-Zyklen (11-30) als Templat. Die Annealingtemperatur in den Zyklen 11-30 ist niedriger, so dass Primer1 und Primer4 binden können und die fusionierten DNA-Fragmente amplifiziert werden. In Primer1 und Primer4 wurden geeignete Restriktionsschnittstellen für die anschließende Klonierung des Promotor-CAT-Gen Konstrukts in den Integrationsvektor pK18 konstruiert. Die zur Herstellung der verschiedenen Fusionsprodukte verwendeten Primer sind in Tabelle II-14 dargestellt.

*Tabelle II-14 Zur Herstellung der putativen Promotorbereich-Reportergen-Konstrukte verwendete Primer. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt. Tan: Annealingtemperatur der Primer; RE-Schnitt.: Restriktionsschnittstelle.*

<b>Konstrukt</b>		<b>Promotorbereich crtP mit promotorlosen CAT-Gen</b>	
<b>Fragmentgröße [bp]</b>		<b>825</b>	
<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>	<b>Tan [°C]</b>	<b>RE-Schnittst.</b>
P1 Pcrtp	TATGGCGGTACCTAGATTTTAG	57	<i>KpnI</i>
P2 Pcrtp	TTTTTTTCTCCATGGCTTTTGGCTGGAAGG	57	
P3 Pcrtp	CCAAAAGCCATGGAGAAAAAATCACTGGATA	55	
P4 CAT Stop	GTTTTAAGGGGATCCATAACTGCC	55	<i>BamHI</i>



Konstrukt		Promotorbereich crtB mit promotorlosen CAT-Gen	
Fragmentgröße [bp]		936	
Primer	Sequenz 5'-3'	Tan[ °C]	RE-Schnittst.
P1 PcrB	GCAGCGGTACCTCGCCAG	53	<i>KpnI</i>
P2 PcrB	TTTTTTTCTCCATCAGACAGACGGTGCGA	55	
P3 PcrB	CGTCTGTCTGATGGAGAAAAAATCACTGGATA	55	
P4 CAT Stop	GTTTTAAGGGGATCCATAACTGCC	55	<i>BamHI</i>

Konstrukt		Cat-Gen (promotorlos)	
Fragmentgröße [bp]		665	
Primer	Sequenz 5'-3'	Tan[ °C]	RE-Schnittst.
P5 CAT Start	GAGCTAAGGTACCTAAAATGGAG	55	<i>KpnI</i>
P4 CAT Stop	GTTTTAAGGGGATCCATAACTGCC	55	<i>BamHI</i>

#### 5.8.4 Real Time PCR

Die Real Time PCR ist die zur Zeit sensitivste Methode zur Quantifizierung des DNA- oder RNA-Gehalts einer Probe. Es existieren verschiedene Systeme, die sich in der Art der Fluoreszenzfarbstoffe und den dazugehörigen Quenchern und, ob diese an Primer oder an eine spezielle Sonde gebunden sind, unterscheiden (Buston, 2000). Außerdem gibt es auch Farbstoffe die unspezifisch an doppelsträngiger DNA binden. In dieser Arbeit wurde das Taq-Man-System (Heid *et al.*, 1996) verwendet. Beim Taq-Man-System ist der Fluoreszenzfarbstoff FAM (6-Carboxy-Fluoreszin) an das 5'-Ende einer genspezifischen DNA-Sonde gebunden und der Quencher TAMRA (6-Carboxy-Tetramethylrhodamin) an das 3'-Ende der Sonde. Die genspezifischen Primer sind nicht markiert (*Abbildung II-4*).

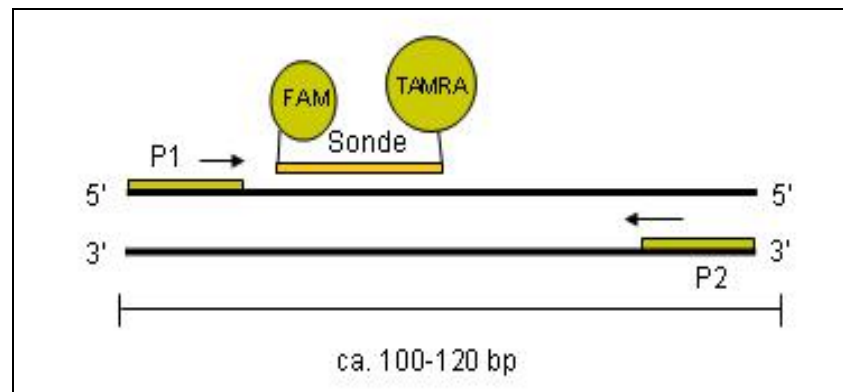


Abbildung II-4 Real Time PCR Primer und Sonde. P1 und P2: Primer 1 und 2; FAM: 6-Carboxy-Fluoreszin ; TAMRA: 6-Carboxy-Tetramethylrhodamin.

Im Gegensatz zu anderen quantitativen PCR Methoden (z.B. RT-PCR), bei denen nur eine Quantifizierung der gebildeten DNA am Ende der PCR-Reaktion möglich ist (Endpunktbestimmung), misst man bei der Real Time PCR die während der einzelnen PCR-Zyklen gebildete Menge an amplifizierter DNA (Amplikonmenge). Dies geschieht durch Detektieren eines spezifischen Fluoreszenzsignals, das je nach verwendetem System auf andere Art und Weise zustande kommt. Beim Taq Man-System sind der Fluoreszenzfarbstoff und der dazugehörige Quencher an eine genspezifische DNA-Sonde gebunden. In diesem Zustand ist der Fluoreszenzfarbstoff gelöscht. Während der Real Time PCR-Reaktion kommt es durch Bindung der ebenfalls genspezifischen Primer zur Amplifizierung des zu detektierenden DNA-Fragments. Während der Amplifizierung zerstört die 5'Exonuklease Untereinheit der Taq-Polymerase die gebundene Sonde und der Abstand zwischen Fluoreszenzfarbstoff und Quencher vergrößert sich. Der Fluoreszenzfarbstoff emittiert sein spezifisches Signal, das von dem Real Time PCR Gerät detektiert wird. Aus dem gemessenen Signal berechnet die Auswertungssoftware den so genannten CT-Wert der Probe. Der CT-Wert gibt an in welchem PCR-Zyklus das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert übersteigt. Je niedriger der CT-Wert einer Probe ist, desto höher ist die Ausgangsmenge an Templat-DNA in dieser Probe.

Die Zunahme bzw. Abnahme der unter Starklichtbedingungen gebildeten mRNAs der Carotinoidgene aus *Synechococcus* PCC 7942 wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der Real Time PCR bestimmt. Dazu wurde aus *Synechococcus* PCC7942 nach Inkubation unter Schwach- bzw. Starklichtbedingungen RNA isoliert und jeweils 5 µg der RNA mit genspezifischen

Primern in cDNA umgeschrieben (siehe 5.5 und 5.6). Die gereinigte cDNA von jedem crt-Gen (siehe 5.7) wurde als Templat in die Real Time PCR-Reaktion eingesetzt. Die in *Tabelle II-17* aufgelisteten Primer und Sonden wurden für die Quantifizierung eingesetzt.

Die Real Time PCR-Reaktionen wurden in einer Real Time PCR-Maschine ABI Prism 7700 Instrument (Applied Biosystems) durchgeführt. Auf einer Platte konnten 96 Proben gemessen werden. Von jeder Probe wurden Doppelbestimmungen gemacht. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in *Tabelle II-15* dargestellt.

*Tabelle II-15 10 µl Reaktionsansätze für die Real Time PCR-Reaktion. Universal MM: Universal Master Mix*

Substanz	Volumen [µl]	Kommentar
Templat	4	cDNA von crt-Genen
Primer1	0,15	300 nM Endkonzentration
Primer2	0,15	300 nM Endkonzentration
Sonde	0,5	200 nM Endkonzentration
Universal MM	5	2 fach
ROX	0,2	Referenzfarbstoff
total	10	

Die Templat cDNA wurde für die Reaktionen 1:10, die cDNA des 16sRNA Gens 1:10<sup>5</sup> verdünnt. Für jedes Gen wurde eine Verdünnungsreihe mit bekannten DNA-Konzentrationen (500 pg – 0,05 pg) angefertigt. Es wurden die zu messenden Proben eines Gens und die dazugehörige Verdünnungsreihe auf die gleiche Real Time PCR Platte aufgetragen. Als interner Standard wurde die Menge an gebildetem 16s rRNA Transkript bestimmt, deren Expression unter Bedingungen, die die Expression anderer Gene beeinflussen, konstant ist (Barbu & Dautry, 1989). Die Ergebnisse wurden auf den internen Standard normalisiert. Die Primer und Sonden wurden von der Firma MWG-Biotech hergestellt. Der Universal Master Mix stammt von Invitrogen. Er enthält den PCR-Puffer, KCl, MgCl, die dNTP's, die Taq-Polymerase und den Referenzfarbstoff ROX.

Tabelle II-16 Real Time PCR Reaktionsbedingungen

Zyklen	Temp [°C]	Zeit
1x	50	2 min
1x	95	5 min
40x	95	15 s
	60	1 min

#### 5.8.4.1 Primer und Sonden für die Real Time PCR und die Reverse Transkriptase Reaktion

Die folgenden, in zusammengestellten, Primer und Sonden wurden für das Umschreiben der RNA in cDNA sowie für die Real Time PCR-Reaktion verwendet.

Beim Kreieren der Sonden und Primer muss um, optimale Reaktionsbedingungen zu erreichen, Folgendes beachtet werden (Buston, 2000).

Am 5'Ende der Sonde sollte kein Guanin sein, da ein Guanin in dieser Position zu einem löschen des Fluoreszenzfarbstoffs führen kann. Außerdem sollten alle Strukturen, die die Flexibilität der Sonde herabsetzen, vermieden werden, damit ein optimales Löschen des Fluoreszenzfarbstoffs durch den Quencher gewährleistet ist. Die Sonde sollte keine zu sich selbst oder zu den Primern komplementären Strukturen besitzen und vier oder mehr aufeinander folgende Basen sollten vermieden werden. Die Annealingtemperatur der Sonde sollte zwischen 68-70°C liegen und die Sonde nicht länger als 30 bp sein. Die Annealing Temperatur der Primer muss mindestens 10°C unter der Annealingtemperatur der Sonde liegen. Unter den ersten 5 Nukleotiden am 3'-Ende sollten nicht mehr als zwei Guanin oder Cytosin sein.

Tabelle II-17 Primer und Sonden die in der RT-Reaktion, bzw. in der Real Time PCR eingesetzt wurden. Tan: Annealingtemperatur der Primer.

Gen crtB (Phytoen Synthase)		
Fragmentgröße [bp] 94 (290-384)		
Primer	Sequenz 5'-3'	Tan [°C]
Forward Primer: B-F	CCGAAGACGACTGCGATGTT	57
Reverse Primer: B-R	ATCCGCTGCCCTTCGATCAT	57
Sonde: B-P	ATACCTTGGCTCGCTATCCTCTCGAT	73

<b>Gen</b>		<b>crtP (Phytoen Desaturase)</b>
<b>Fragmentgröße [bp]</b>		<b>103 (867-969)</b>
<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>	<b>Tan [°C]</b>
Forward Primer: P-F	TACGTCGAAGAGATGGATCAATA	59
Reverse Primer: P-R	ATTTTCGTCCGGGTCAATAAAGTT	59
Sonde: P-P	TCAACGATGAAGTCTTCATCGCCATG	71

<b>Gen</b>		<b>crtQb (ζ-Carotin Desaturase)</b>
<b>Fragmentgröße [bp]</b>		<b>87 (331-418)</b>
<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>	<b>Tan [°C]</b>
Forward Primer: Qb-F	CCGTGCCCTTGATCGGATCA	59
Reverse Primer: Qb-R	GAAATGTTCTCGGTATCGATGAA	59
Sonde: Qb-P	CCTCAAACGGATGTGGAACCCGATC	73

<b>Gen</b>		<b>crtH (Lycopin Isomerase)</b>
<b>Fragmentgröße [bp]</b>		<b>100 (209-308)</b>
<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>	<b>Tan [°C]</b>
Forward Primer: H-F	CGTGCAATATCACCAACATTCT	57
Reverse Primer: H-R	CGAGTGTTGGCAGGTGTTCAA	59
Sonde: H-P	ACATTGAACAGATACTTCGGTTCCTC	69

<b>Gen</b>		<b>crtL (Lycopin Zyklase)</b>
<b>Fragmentgröße [bp]</b>		<b>101 (179-279)</b>
<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>	<b>Tan [°C]</b>
Forward Primer L-F	AAGCGGCCTACGGCATCATT	57
Reverse Primer: L-R	GGCGTTCTTCAGGTGAGAGAT	59
Sonde: L-P	CCATCAGTTTGTGCTGATGGACTAC	69

Gen		crtR ( $\beta$ -Carotin Hydroxylase)
Fragmentgröße [bp]		164 (57-220)
Primer	Sequenz 5'-3'	Tan [°C]
Forward Primer: R-F	GCTTCTTCTATCACGAGATCTA	57
Reverse Primer: R-R	TGGAGCCAGCCAGTAGTTCAT	59
Sonde: R-P	AATTACTCGAATGGTTCCTCAGTCGC	71

Gen		16sRNA (interner Standard)
Fragmentgröße [bp]		138bp (219-356)
Primer	Sequenz 5'-3'	Tan [°C]
Forward Primer: 16s-F	TAGCTGGTCTGAGAGGATGAT	57
Reverse Primer: 16s-R	GCGTTGCTCCGTCAGGCTTT	59
Sonde: 16s-P	ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA	71

## 6 Messung der Promotoraktivität der putativen Promotorbereiche vor crt B und crt P mittels CAT-Assay

### 6.1 Herstellung der Extrakte

#### 6.1.1 Inkubation und Ernte

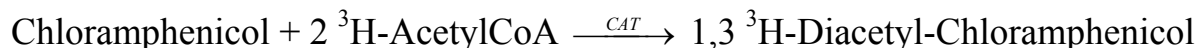
*Synechococcus* PCC 7942 wurde unter Standard-Anzuchtbedingungen bis zu einem Chlorophyllgehalt von 5  $\mu\text{g/ml}$  angezogen. Dann wurde eine Hälfte der Kultur Starklichtbedingungen (400  $\mu\text{E}$ ) ausgesetzt, die andere Hälfte blieb im Schwachlicht. Es wurden zu folgenden Zeitpunkten je 25 ml der Kulturen geerntet: 0 min, 15 min, 30 min, 1 h, und 24 h.

Die geernteten Kulturen wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 5000 upm in einer Zentrifuge der Firma Hettich (Universal 16 a) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 5 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,8 resuspendiert.

Der Zellaufschluss der Probe wurde in einer auf 4°C vorgekühlten French Pressure Cell Press (SLM AMINCO, Urbana Illinois, USA) bei 30 MPa durchgeführt. Danach wurden die Zellbestandteile durch 10 min Zentrifugation (Sorvall RC5b plus, Du Pont) bei 15000 upm im SS-34 Rotor sedimentiert. Für Chloramphenicol Acetyltransferase-Assay und Proteinbestimmung wurden aus dem Überstand Aliquots entnommen.

### 6.1.2 Chloramphenicol Acetyltransferase-Assay (CAT-Assay)

Im CAT-Assay wurde die Chloramphenicol Acetyltransferase Aktivität anhand des gebildeten  $^3\text{H}$  1,3-Diacetyl-Chloramphenicol gemessen (Eastman, 1987).



Das  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA wurde von der Firma American Radiolabeled Chemicals inc. (St. Louis, USA) bezogen. Es wurden 194  $\mu\text{l}$  Reaktionsmix (500  $\mu\text{l}$  0,5 M Tris/HCl pH 7,8, 500  $\mu\text{l}$  0,5M Chloramphenicol und 940  $\mu\text{l}$  Bidest) in ein 5ml Szintillationsvial (Zinsser, Frankfurt/Main) vorgelegt und 50  $\mu\text{l}$  Extrakt + 6  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA (0,3  $\mu\text{Ci}$ ) dazu pipettiert und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde mit 4,8 ml lipophilem Szintillationscocktail (Rotiszint eco plus, Roth, Darmstadt) überschichtet und in den Szintillationszähler (2000 CA Tri-Carb liquid scintillation analyser, Packard) gestellt. Nur das acetylierte Reaktionsprodukt 1,3  $^3\text{H}$ -Diacetyl-Chloramphenicol kann in den Szintillationscocktail diffundieren und somit vom Szintillationszähler gemessen werden. Ein Kontrollansatz mit 50  $\mu\text{l}$  10 mM Tris/HCl pH 7,8 anstelle des Messextrakts diente zur Bestimmung des „Hintergrundrauschens“. Dieser Wert wurde von den Messwerten mit Extrakt subtrahiert. Für jede Probe wurde eine Kinetik über eine Stunde aufgenommen. Anhand der Steigung konnte die spezifische Enzymaktivität des Reportergens als Maß für die Promotoraktivität berechnet werden. Als Eichwert, um zu bestimmen, wie viele Ausschläge pro Minute welcher Konzentration an  $^3\text{H}$ -AcetylCoA entsprechen, dienten Ansätze mit bekannter  $^3\text{H}$ -AcetylCoA Konzentration in einem hydrophilen Szintillationscocktail.

### 6.1.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem Protein Microassay der Firma Biorad (München) durchgeführt. Die Eichreihe wurde mit BSA in Konzentrationen von 1 bis 25  $\mu\text{g/ml}$  (Mittelwert der Doppelbestimmung) angefertigt.

## 7 Messung der Photosyntheserate von Cyanobakterien

### 7.1 Sauerstoffentwicklung

Die Sauerstoffentwicklung der Cyanobakterienkulturen wurde mit einer Platin-Silber-Elektrode (Clark Typ) gemessen (Böger *et al.*, 1981; Gombos & Vigh, 1986). Das

Funktionsprinzip beruht auf der Fähigkeit bestimmter Metalle, Sauerstoff elektrochemisch zu reduzieren (Fork, 1972).

Die Messkammer wurde speziell für Flüssigkulturen angefertigt, sie fasst 2 ml Kultur, ist mit einem Magnetrührer versehen und wurde auf 30°C temperiert. Zur Belichtung wurde ein Diaprojektor verwendet. Die Lichtintensität der Lampe wurde über einen Transformator reguliert. Die Aufzeichnung des Signals erfolgte mit einem xy-Schreiber (Millipore CR112).

Die Proben wurden vor der Messung 15 min dunkel adaptiert. Zur Messung der Sauerstoffentwicklung der gesamten Elektronentransportkette wurde 5 mM Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) als Elektronenakzeptor zur Cyanobakterienkultur zugegeben, zur Messung der Sauerstoffentwicklung von Photosystem II wurden 1 mM Benzochinon und 1 mM Kaliumferricyanid als Elektronenakzeptoren zugegeben.

## 7.2 Messung der Chlorophyll a-Fluoreszenz

Die Chlorophyll a-Fluoreszenzmessung ist eine nichtinvasive, sehr empfindliche Methode zur Untersuchung der Photosynthese. Da die Fluoreszenz aus den gleichen Anregungszuständen der Chlorophylle stammt, die alternativ zur Photochemie genutzt werden oder Ausgangsstufen für strahlungslose Wärmedissipation sind, bestehen zwischen der Quantenausbeute der Fluoreszenz einerseits und der photochemischen Energieumwandlung und Wärmedissipation andererseits gesetzmäßige Beziehungen.

Die Chlorophyll a Fluoreszenzinduktion wurde mit einem Pulse Amplitude Modulated Fluorometer (PAM 101 Walz, Effeltrich) gemessen (Schreiber *et al.*, 1986). 1 ml Cyanobakteriensuspension (Chlorophyllgehalt 3-5  $\mu\text{g/ml}$ ) wurden zur Messung in eine PAM-kompatible Messküvette mit Magnetrührer gefüllt. Die Grundfluoreszenz  $F_0$  der für 15 min dunkel adaptierten Zellen wurde durch ein schwaches Messlicht ( $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Meßpulsfrequenz 1,6 kHz) ausgelöst. Nach Zuschalten von aktinischem Licht (200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 15 V, 150 Watt Kaltlichtlampen Typ 6423) wurde durch die Gabe von Lichtpulsen (alle 30 s für 1s) mit einer Intensität von  $8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  die maximale Fluoreszenz  $F_M$  bestimmt. Zur Messung der wirklichen maximalen Fluoreszenz in Cyanobakterien gibt man zum Abschluss der Messung 10  $\mu\text{M}$  DCMU zur Hemmung der Elektronentransportkette durch eine Injektionsöffnung zur Probe (Campbell *et al.*, 1998). Durch die Zugabe von  $\text{NaHCO}_3$  (Endkonzentration 10 mM) wurde für ausreichend  $\text{CO}_2$  während der Messung gesorgt. Als



Maß für die maximale Quantenausbeute von Photosystem II wurde das  $F_V/F_M$ -Verhältnis ( $F_M - F_O/F_M$ ) bestimmt (Kitajima & Butler, 1975; Krause & E., 1991; Campbell *et al.*, 1998).

## 8 Bestimmung des Chlorophyllgehalts

Der Chlorophyllgehalt der Cyanobakteriensuspensionen wurde nach der Methode von McKinney (1941) bestimmt. Dazu wurden 1 ml Cyanobakterienkultur zur Zentrifugation in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach 5 min Zentrifugation in einer Eppendorfsentrifuge bei 12000 upm, wurde der Überstand verworfen, die sedimentierten Zellen in 20 µl Wasser resuspendiert und mit 980 µl MeOH versetzt. Durch 10-minütige Inkubation im Wasserbad bei 60° C wurde das Chlorophyll aus den Zellen gelöst. Nach erneuter Zentrifugation, 10 min Eppendorfsentrifuge 14000 upm, wurde der Überstand in eine 1 ml Glasküvette gefüllt und die Extinktion bei 650 nm und 665 nm im Zweistrahlphotometer (Shimadzu UV-160 A) gemessen. Der Chlorophyllgehalt wurde mit folgender Formel berechnet.

$$\text{Chlorophyllgehalt } [\mu\text{g/ml}] = (E_{650} * 25,5 + E_{665} * 4) * \text{Vol.}_{\text{MeOH}} / \text{Vol. der Probe}$$

### 8.1 Bestimmung des Trockengewichts

Zur Trockengewichtbestimmung wurden 10 ml Cyanobakterienkultur über einen Rundfilter (Schleicher und Schuell, Dassel) mit einer Vakuumpumpe (Vacubrand) abgenutscht. Der Filter, der die Cyanobakterien zurückhält, wurde über Nacht im Heizofen (5067, Heraeus) bei 80° C getrocknet. Anschließend wurde mit der Feinwaage (0,1 mg – 200 g, Sartorius) das Gewicht des Filters mit der getrockneten Kultur bestimmt.

$$\text{Trockengewicht} = (\text{Trockengewicht Filter} + \text{getrockneter Kultur}) - \text{Trockengewicht Filter}$$

## 9 Extraktion und Analyse von Carotinoiden

### 9.1 Extraktion

10 ml einer Cyanobakterienkultur (Chlorophyllgehalt 3-5 µg/ml) wurden sedimentiert, der Überstand verworfen und das Sediment in etwas Wasser rückgelöst. Zur Extraktion der Carotinoide und zur Verseifung der Lipide wurden 20 ml Methanol und 2 ml 60 % KOH (v/v) zugegeben und die Proben 20 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden die Carotinoide

im Falle von *Synechococcus* PCC 7942 mit 10 % (v/v) Diethylether in Petroleumbenzin /Sdp. 40 – 60°C) oder im Falle von *Synechocystis* PCC 6803 mit 50 % (v/v) Diethylether in Petroleumbenzin unter Wasserzugabe ausgeschüttelt. Die Proben wurden bei 30°C unter Stickstoffbegasung bis zur Trockenheit eingengt und bis zur Messung unter Stickstoffatmosphäre bei -20°C im Dunkeln gelagert.

## 9.2 Carotinoidanalyse mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Es wurde folgende HPLC-Trennsäule verwendet:

Nucleosil 120-3 C<sub>18</sub> (poröses Kieselgel (SiO<sub>2</sub>) als kugelförmige Teilchen, chemisch modifiziert), von Macherey & Nagel (Düren), Phase Octadecyl  $-(\text{CH}_2)_{17}\text{-CH}_3$ , Korngröße 3 µm, Länge X ID = 250 x 4,6 mm.

Die verwendete HPLC-Apparatur besteht aus einer HPLC-Pumpe (ERC Modell 64), die über eine Vorsäule und eine Trennsäule mit einem Diode Array Detektor (Kontron, Straubenhard) verbunden ist. Die zu messenden Proben wurden in Aceton gelöst und mit einer 50 µl KloeHN Mikroliterspritze in ein Rheodyne-Injektionsventil mit 20 µl Probenschleife aufgetragen. Das Laufmittel bestand aus Acetonitril : Methanol : Isopropanol im Verhältnis 85:10:5 (v/v/v). Das Laufmittel wurde durch einen Degaser (ERC 3217) entgast.

Tabelle II-18 Erhaltene Flächeneinheit pro µg Carotinoid nach Eichung der Trennsäule.

Carotinoid	Flächeneinheit pro µg Carotinoid	Wellenlänge [nm]	Quelle
Echinenon	165880	460	isoliert aus <i>Synechocystis</i> PCC 6803
Myxoxanthophyll	182254	473	isoliert aus <i>Synechocystis</i> PCC 6803
Phytoen	101045	285	JM101 pACrtEB
β-Carotin	163300	450	Sigma
Zeaxanthin	163300	450	Isoliert aus JM101 pACCAR25ΔcrtX (Zhu <i>et al.</i> , 2003)
Violaxanthin	155200	444	Isoliert aus JM101 pACCAR25ΔcrtXZE1 (Zhu <i>et al.</i> , 2003)
Antheraxanthin	152343	444	Isoliert aus JM101 pACCAR25ΔcrtXZE1 (Zhu <i>et al.</i> , 2003)

Die HPLC Elutionsdiagramme wurden vom Diode Array Detektor über eine Digitalisierungskarte auf einen Personal Computer übertragen und konnten mit der Software Ramona (Version 11.5 (c) Nuclear Interphase GmbH, Münster) aufgezeichnet und ausgewertet werden. Die vom Diode Array Detektor aufgenommenen Carotinoidspektren konnten mit dem Programm WATERS 994 SPEKTRUM (Version 1.61) auf einen Personal Computer übertragen und gespeichert werden. Die Trennsäule wurde mit Standards der jeweiligen Carotinoide geeicht. Dazu wurde eine definierte Menge (1-5 µg) des Carotinoidstandards mit der Säule aufgetrennt und die erhaltene Elutionsbande in Ramona integriert. Es wurden die Flächeneinheiten (Fc) pro µg Carotinoid berechnet (*Tabelle II-18*). Die Carotinoidmenge der Proben wurde wie folgt berechnet:

$$m [\mu\text{g}] = F / F_c$$

m: Carotinoidmasse

F: Gemessene Flächeneinheiten

Fc: Flächeneinheiten pro µg Carotinoid

### III ERGEBNISSE

#### 1 Einfluss der Carotinoidzusammensetzung und des Carotinoidgehalts auf den Schutz des Photosyntheseapparates vor Starklichtschädigung

Carotinoide spielen eine essentielle Rolle als Schutzpigmente des Photosyntheseapparates vor photodynamischen Reaktionen und Radikalen. Es ist bekannt, dass Carotinoide aufgrund ihrer unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften ein unterschiedliches antioxidatives Schutzpotential besitzen (Britton, 1995; Woodall *et al.*, 1997). Cyanobakterien sind ein guter Organismus, um die Schutzwirkung verschiedener Carotinoide in einer funktionellen, photosynthetisch aktiven Zelle zu bestimmen.

Bisher konnte sowohl durch Anreicherung eines „neuen“ zusätzlichen Carotinoids als auch durch die Erhöhung des Zeaxanthingehalts ein verbesserter Schutz der Photosynthese vor UV-B Schädigung in *Synechococcus* PCC 7942 Transformanten nachgewiesen werden. Auch eine Erhöhung des Carotinoidgehalts bei unverändertem Zeaxanthingehalt durch zusätzliche Expression eines Phytoen Desaturase Gens in *Synechococcus* PCC 7942, führt zu einem verbesserten Schutz dieser Transformante vor UV-B-Schädigungen des Photosyntheseapparates (Götz *et al.*, 1999; Albrecht *et al.*, 2001).

Die Integration von weiteren Carotinoidgenen, die zu einer Erhöhung des Carotinoidgehalts, zur Expression von zusätzlichen Carotinoiden oder zu einer Veränderung des Zeaxanthingehalts in *Synechococcus* führen, und die Charakterisierung dieser Transformanten ist daher von großem Interesse.

##### 1.1 Integration von Genen aus dem Isoprenoidstoffwechsel in *Synechococcus* PCC 7942 und Charakterisierung der Transformanten

Durch die Integration von verschiedenen Genen des Isoprenoidstoffwechsels in das Genom von *Synechococcus* PCC 7942 sollten Transformanten mit einem erhöhten Carotinoidgehalt hergestellt werden.

### 1.1.1 Klonierung des Isoprenoiddiphosphat Isomerase Gens (idi) aus *Rhodobacter capsulatus* in *Synechococcus* PCC 7942

Die Überexpression von exogenen Isopentenylidiphosphat Isomerase-Genen (ipi oder idi) führt zu einem bis zu vierfach erhöhten Carotinoidgehalt in einem carotinoidproduzierendem *E. coli*-Stamm (Kajiware *et al.*, 1997). Die Isopentenylidiphosphat Isomerase reguliert die Einstellung des Gleichgewichts von Isopentenylidiphosphat (IPP) zu Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) im Isoprenoidstoffwechsel.

Ob es möglich ist die, Carotinoidmenge in *Synechococcus* PCC 7942 durch das Einbringen von Genen aus dem Isoprenoidstoffwechsel zu erhöhen, sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Dazu wurde das idi-Gen aus *Rhodobacter capsulatus* (Hahn *et al.*, 1996) mit einem autonom replizierenden Vektor (pSE2) in *Synechococcus* PIM8 pFP1-3 exprimiert. Außerdem wurde versucht, den durch die Integration von Phytoen Synthase Genen aus *Erwinia Uredovora*, crtB, (Neudert *et al.*, 1998) bzw. *Synechocystis* PCC 6803, pys, (Martinez-Ferez *et al.*, 1994) erhöhten Carotinoidgehalt der *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 Transformanten pFP1-3crtB bzw. pFP1-3pys (Windhövel *et al.*, 1994) durch zusätzliche Expression des idi Gens, weiter zu erhöhen.

Dazu wurden *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3, *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3crtB und *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3pys (Windhövel *et al.*, 1994) ebenfalls mit pSE2idi transformiert. Es resultierten die in *Tabelle III-1* gezeigten Transformanten. Der Carotinoidgehalt der *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 Kulturen pFP1-3, pFP1-3crtB und pFP1-3pys dienten jeweils als Kontrollen.

*Tabelle III-1* Carotinoidgehalt von *Synechococcus* PCC 7942 Transformanten nach Anzucht im Schwachlicht.  
n=3.

<b><i>Synechococcus</i> PCC 7942 PIM8-Transformante</b>	<b>Resistenz</b>	<b>Carotinoidgehalt [µg/mgTG]</b>
pFP1-3	Km, Amp	3,03 ± 0,33
pFP1-3 + pSE2idi	Km, Amp, Strep	3,08 ± 0,42
pFP1-3crtB	Km, Amp	3,4 ± 0,36
pFP1-3crtB + pSE2idi	Km, Amp, Strep	3,1 ± 0,21
pFP1-3pys	Km, Amp	2,64 ± 0,14
pFP1-3pys + pSE2idi	Km, Amp, Strep	2,6 ± 0,27

Die erfolgreich mit dem Vektor pSE2idi transformierten Kulturen wuchsen auf streptomycinhaltigen Agarplatten bzw. Flüssignährmedium. Nach 2 Tagen Anzucht der Transformanten im Schwachlicht und anschließender Carotinoidextraktion wurde der Carotinoidgehalt der Transformanten und der Kontrollstämmen gemessen. Es konnte keine signifikante Erhöhung des Carotinoidgehalts in den mit dem idi-Gen transformierten Cyanobakterien gemessen werden (*Tabelle III-1*). Der Carotinoidgehalt war mit 3 µg/mgTG in *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3 + pSE2idi genauso hoch wie der von *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3. In *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3pys +pSE2idi war der Carotinoidgehalt mit ca. 2,6 µg/mgTG ebenfalls nicht höher als in der korrespondierenden Kontrolle *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3pys. In *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3crtB war der Carotinoidgehalt mit 3,1 µg/mgTG niedriger als in der Kontrolle *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3crtB mit 3,4 µg/mgTG.

### **1.1.2 Integration des Deoxyxyluose-5-Phosphat Synthase Gens (dxs) aus *E. coli* in *Synechococcus* PCC 7942**

In Cyanobakterien wird das für die Carotinoidbiosynthese benötigte IPP über den DOXP-Weg bereitgestellt. Miller *et al.* (2000) konnten mittels Überexpression der Deoxyxyluose-5-Phosphat Synthase (DXS-Synthase) in *E. coli* zeigen, dass die DXS-Synthase-Reaktion der limitierende Schritt in der „Nonmevalonat“-Isoprenoidbiosynthese ist. Durch Integration des dxs-Gens aus *E. coli* in das Genom von *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 sollte ebenfalls der Carotinoidgehalt in diesen Transformanten konstitutiv erhöht werden.

Das dxs-Gen aus *E. coli* wurde mittels PCR von dem Vektor pUCBM20dxs (Sprenger *et al.*, 1997) Vektor amplifiziert und in pMON<sub>T</sub> kloniert. Positive Klone wurden durch Kontroll-PCR und durch Restriktionsverdau von pMON<sub>T</sub>dxs identifiziert. Zum Einbringen des dxs-Gens in *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 wurde das dxs-Gen *Bam*HI/*Eco*RI in den ebenso geschnittenen Integrationsvektor pFP1-3 umklont. Das daraus resultierende Konstrukt pFP1-3dxs ist 1905 bp groß und trägt die geeignete Ribosomenbindestelle (RBS) und den geeigneten Translationsstart (*Abbildung III-1*).

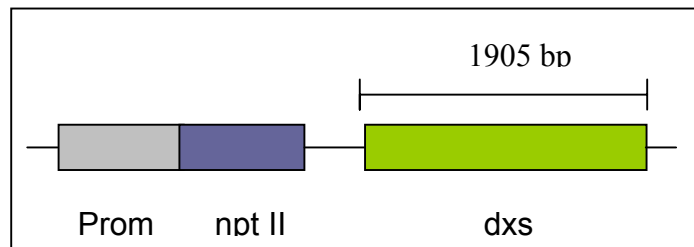


Abbildung III-1 Integrationskonstrukt pFP1-3dxs, Prom und npt II: Kanamycin Resistenzgen mit starkem konstitutiven Promotor des Phagens Tn5

Das erhaltene Konstrukt pFP1-3dxs wurde in *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 transformiert. Kanamycinresistente Klone wurden isoliert und mittels Kontroll-PCR auf eine erfolgreiche Integration des dxs-Gens untersucht.

Es konnten Klone isoliert werden, die das dxs-Gen in das Genom integriert hatten. Nach Untersuchungen von Carotinoidextrakten aus verschiedenen *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3dxs-Transformanten konnte keine signifikante Erhöhung des Carotinoidgehalts im Vergleich zum Kontrollstamm *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3 festgestellt werden (Tabelle III-2). Der Carotinoidgehalt betrug in allen Transformanten ca. 3 µg/mgTG.

Tabelle III-2 Carotinoidgehalt von *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 pFP1-3 und verschiedenen *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3dxs Transformanten.

<b><i>Synechococcus</i> PCC 7942 PIM8-Transformante</b>	<b>Carotinoidgehalt [mg/gTG]</b>
pFP1-3	3,03 ± 0,33
pFP1-3dxs4	3,08 ± 0,33
pFP1-3dxs5	3,10 ± 0,36
pFP1-3dxs11	2,80 ± 0,22
pFP1-3dxs12	3,06 ± 0,23
pFP1-3dxs13	2,90 ± 0,12

### 1.1.3 Klonierung der Geranylgeranylpyrophosphat Synthase (crtE) und der Phytoen Synthase (crtB) in *Synechococcus* PCC 7942

Die Phytoen Synthase-Reaktion gilt als limitierender Schritt in der Carotinoidbiosynthese. Die Überexpression von Phytoen Synthase-Genen führt zu einem erhöhten Carotinoidgehalt in *Synechococcus* (Götz *et al.*, 1999; Windhövel *et al.*, 1999). Durch eine simultane Integration der Gene crtE und crtB in das Genom von *Synechococcus* sollte untersucht werden, ob der gegenüber dem Wildtyp erhöhte Carotinoidgehalt der Transformante *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3crtB durch die zusätzliche Integration des für die GGPP Synthase kodierenden Gens (crtE) noch weiter erhöht werden kann.

Um dies zu überprüfen, wurde das 6113 bp große Konstrukt pFP1-3crtBE, das die Gene crtB und crtE, beide aus *Erwinia uredovora*, trägt, in *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 transformiert (Abbildung III-2). Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Dr. Susanne Römer, Universität Konstanz, zur Verfügung gestellt.

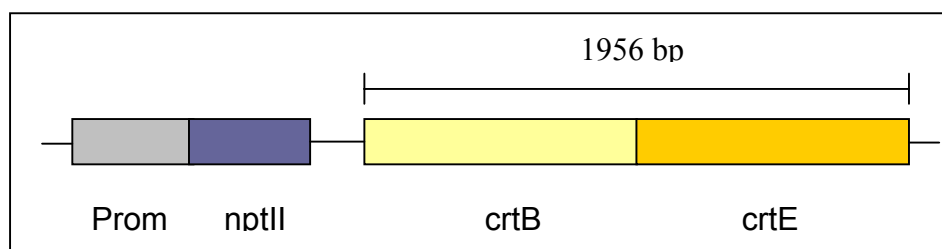


Abbildung III-2 Integrationskonstrukt pFP1-3 crtBE, Prom und npt II: Kanamycin Resistenzgen mit starkem konstitutiven Promotor des Phagens Tn5.

Durch Komplementierung von pFP1-3crtBE in Deletionsmutanten eines Zeaxanthin produzierenden *E. coli* Stamms konnte gezeigt werden, dass das Konstrukt in *E. coli* aktiv ist und die kodierten Enzyme gebildet werden (Tabelle III-3).

Die Deletionsmutanten des Zeaxanthin produzierenden *E. coli* Stamms JM101-pACCAR25, JM101-pACCAR25ΔB und JM101-pACCAR25ΔE wachsen, da sie nicht mehr in der Lage sind Zeaxanthin zu bilden, als farblose Kolonien.



Tabelle III-3 Komplementierungsexperimente: XL1-Blue pACCAR25ΔB bzw. ΔE mit pFP1-3crtBE

Stamm	Kommentar	Farbe der Kolonien	produziertes Carotinoid
XL1-blue pACCAR25ΔB	crtB deletiert	farblos	---
XL1-blue pACCAR25ΔE	crtE deletiert	farblos	---
XL1-blue pACCAR25ΔB + pFP1-3crtBE	crtB deletiert, mit crtBE komplementiert	orange	Zeaxanthin
XL1-blue pACCAR25ΔE + pFP1-3crtBE	crtE deletiert, mit crtBE komplementiert	orange	Zeaxanthin

Wurde das pFP1-3crtBE-Konstrukt in diese beiden Deletionsmutanten transformiert, waren die Kolonien in beiden Fällen orange. Das heißt, durch Komplementierung mit pFP1-3crtBE wurde sowohl eine funktionell aktive Phytoen Synthase als auch eine funktionell aktive GGPP Synthase in *E. coli* gebildet.

Nach Transformation des pFP1-3crtBE Konstruktes in *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 konnten auf kanamycinhaltigen Agarplatten zahlreiche Klone (ca. 200 pro Platte) selektiert werden. In Kontroll-PCR Reaktionen konnten positive Klone, die das 1956 bp große crtBE-Konstrukt enthielten, nachgewiesen werden. Ca. 90 % der untersuchten Klone hatten das Gen in das Genom integriert.

Tabelle III-4 Carotinoidgehalt von *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 pFP1-3 und unterschiedlichen Transformanten *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 crtBE nach 2 Tagen Anzucht unter Schwach- bzw. Starklichtbedingungen.

<i>Synechococcus</i> PCC 7942	Carotinoidgehalt [μg/mgTG]	
PIM8-Transformante	LL 50 [μmolm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]	HL 150 [μmolm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]
pFP1-3	3,03 ± 0,33	3,22 ± 0,36
pFP1-3crtBE5	3,12 ± 0,48	3,18 ± 0,44
pFP1-3crtBE7	2,92 ± 0,58	3,05 ± 0,38
pFP1-3crtBE8	2,93 ± 0,43	3,20 ± 0,21
pFP1-3crtBE9	3,07 ± 0,35	3,25 ± 0,35
pFP1-3crtBE10	3,10 ± 0,30	3,30 ± 0,52

Nach photometrischer Bestimmung des Carotinoidgehalts von 5 verschiedenen positiven Transformanten konnte in keinem der Extrakte eine Veränderung des Carotinoidgehalts festgestellt werden (*Tabelle III-4*). HPLC-Analysen dieser Carotinoidextrakte zeigten keine Veränderung in der Carotinoidzusammensetzung im Vergleich zu der mit dem leeren Vektor transformierten Kontroll-Transformante *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 pFP1-3 (Daten nicht gezeigt).

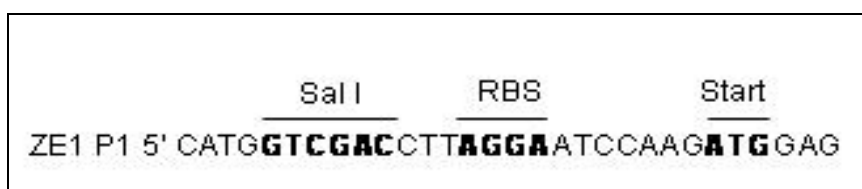
## 1.2 Herstellung von *Synechococcus* PCC 7942 Transformanten mit veränderter Carotinoidzusammensetzung

### 1.2.1 Integration des Zeaxanthin Epoxidase Gens (ZE) aus *Gentiana lutea* in *Synechococcus* PCC 7942

Durch Integration des Zeaxanthin Epoxidase Gens in *Synechococcus* PCC 7942 sollten erstmalig die beiden, am Xanthophyllzyklus in höheren Pflanzen beteiligten Carotinoidepoxide Violaxanthin und Antheraxanthin, in einem Cyanobakterium synthetisiert und die Auswirkungen auf die Photosyntheserate und auf den Schutz der Photosynthese vor Starklichtschädigungen untersucht werden.

Das Ausgangsplasmid, welches das Zeaxanthin Epoxidase Gen aus *Gentiana lutea* trägt (pBSZE1), wurde freundlicherweise von Dr. Changfu Zhu zur Verfügung gestellt (Zhu et al., 2003). Es stammt aus einer cDNA-Bibliothek und enthält daher keine Introns mehr. Zur Integration in das Genom von *Synechococcus* PCC 7942 wurde das Gen in den Integrationsvektor pFP1-3 kloniert.

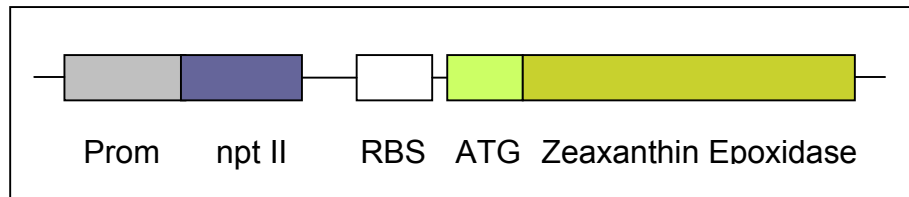
Das 2010 bp große Konstrukt enthält eine künstlich eingefügte Ribosomenbindestelle (RBS) und einen neuen Translationsstart (*Abbildung III-3*), da der geneigene mit den für die Chloroplastentransitsequenz kodierenden ersten 90 Nukleotiden entfernt wurde.



*Abbildung III-3 Startprimer zur Amplifizierung des Zeaxanthin Epoxidase-Gens ohne Chloroplasten Transitsequenz mit RBS und Transkriptionsstart*

In einer PCR-Reaktion mit pBSZE1 als Templat wurde das Zeaxanthin Epoxidase-Gen amplifiziert. Das gereinigte DNA-Fragment mit A-Überhang wurde in den T-Überhang

Vektor (pMON<sub>T</sub>) kloniert. Der Zeaxanthin Epoxidase-Genkonstrukt wurde *SalI/BamHI* in den ebenfalls *SalI/BamHI* geschnittenen pFP1-3-Vektor ligiert. Es resultiert das 6162 bp große Integrationskonstrukt pFP1-3ZE1 (*Abbildung III-4*).



*Abbildung III-4 Integrationskonstrukt pFP1-3 ZE für Synechococcus PCC 7942 PIM8. Prom und npt II: Kanamycin Resistenzgen mit starkem konstitutiven Promotor des Phagens Tn5, RBS: Ribosomenbindestelle, ATG: Translationsstart.*

Das Konstrukt wurde in *Synechococcus* PCC 7942 PIM8, den Stamm, der die Integrationsplattform enthält, transformiert. Positive Klone wurden mittels Kontroll-PCR ermittelt. Die Elutionsprofile der über C18-HPLC aufgetrennten Carotinoidextrakte aus *Synechococcus* PCC 7942 sind in *Abbildung III-5* dargestellt.

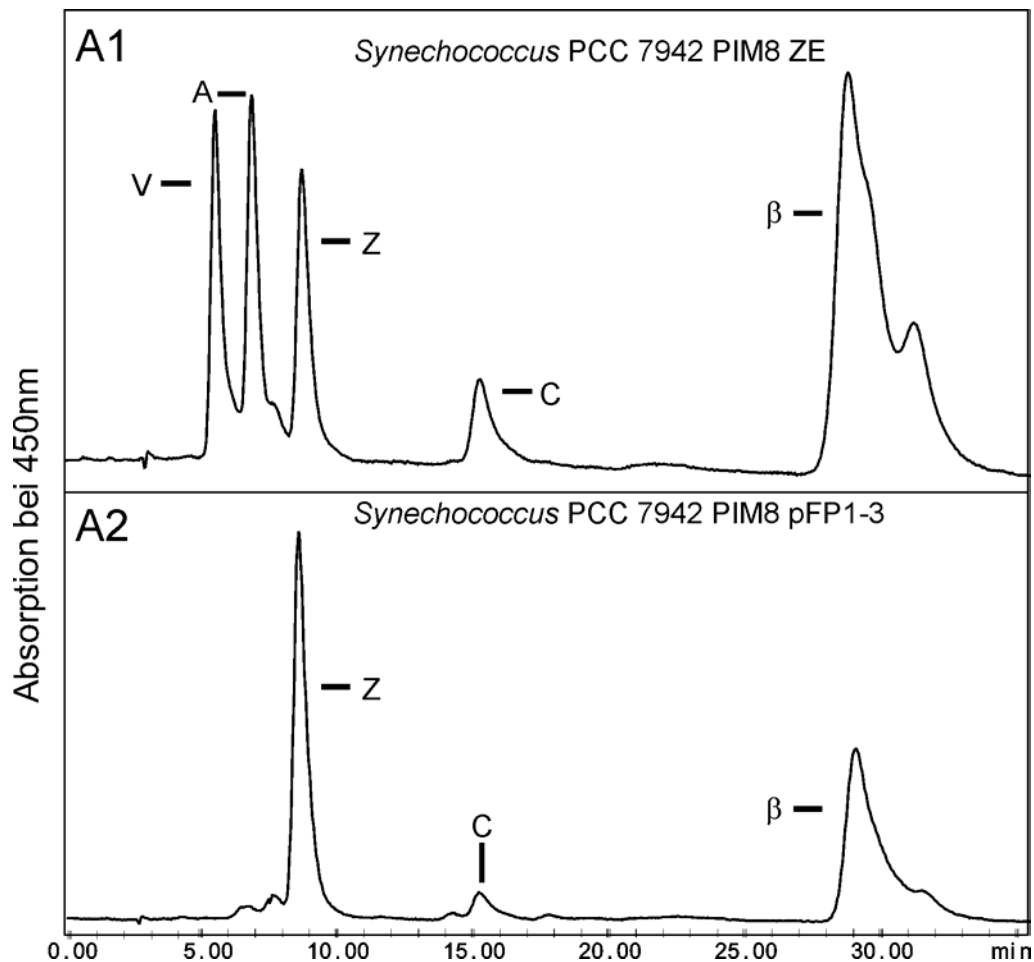


Abbildung III-5 C18-HPLC Elutionsprofil von Carotinoidextrakten aus: **A1**: *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 ZE; **A2**: Kontrolle *Synechococcus* PCC 7942 pFP1-3. A: Antheraxanthin, C:  $\beta$ -Cryptoxanthin, V: Violaxanthin, Z: Zeaxanthin und  $\beta$ :  $\beta$ -Carotin.

In dem Extrakt aus *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3, dem nur mit der Kanamycinresistenz transformierten Kontrollstamm, ist ein Elutionsgipfel bei einer Retentionszeit von ca. 8 min und ein Elutionsgipfel bei einer Retentionszeit von ca. 29 min vorhanden. Beide Elutionsgipfel haben ein Absorptionsspektrum mit Maxima bei 429 nm, 452 nm und 478 nm. Ein Vergleich mit bekannten Carotinoidstandards zeigte eindeutig, dass es sich um Zeaxanthin bzw. um  $\beta$ -Carotin handelt. Der kleine Elutionsgipfel nach einer Retentionszeit von ca. 15 min hat das gleiche Absorptionsspektrum, es handelt sich um  $\beta$ -Cryptoxanthin, das nur an einem Ring hydroxylierte Intermediat der  $\beta$ -Carotin Hydroxylase-Reaktion.

Die beiden kleinen Elutionsgipfel nach 7-8 min haben ebenfalls das gleiche Absorptionsspektrum. Es handelt sich um die in Spuren vorkommenden hydroxylierten Zeaxanthinderivate Caloxanthin und Nostoxanthin.

Wenn das Zeaxanthin Epoxidase Gen erfolgreich in das Genom von *Synechococcus* integriert und exprimiert wurde, sollte Zeaxanthin ganz oder teilweise zu den Epoxi-Derivaten Antheraxanthin und Violaxanthin umgewandelt werden. In der Transformanten *Synechococcus* PCC 7942 PIM8ZE1 waren zwei zusätzliche Elutionsgipfel mit einer Retentionszeit von ca. 5.5 min und ca. 7 min im Vergleich zu PIM8pFP1-3 nachweisbar. Die Maxima der beiden Absorptionsspektren lagen bei 423 nm , 447 nm und 474 nm, bzw. 417 nm, 442 nm und 471 nm. Ein Vergleich mit einem Violaxanthin- und Antheraxanthinstandard zeigte, dass es sich bei den beiden neusynthetisierten Carotinoiden um Antheraxanthin bzw. Violaxanthin handelt.

Tabelle III-5 Nachweisbare Carotinoide in *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 pFP1-3 und *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 ZE1.

Carotinoid	Absorptionsmaxima [nm]			Retentionszeit [min]
β-Carotin	429	452	478	30
β-Cryptoxanthin	429	452	478	15
Zeaxanthin	429	452	478	8
Caloxanthin	429	452	478	6-7
Nostoxanthin	429	452	478	7-8
Antheraxanthin	423	446	474	6-7
Violaxanthin	417	442	471	5

Die HPLC Analyse von Carotinoidextrakten aus *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3ZE zeigte, dass das Zeaxanthin Epoxidase-Gen aus *Gentiana lutea* erfolgreich in das Genom integriert wurde. Das integrierte Konstrukt mit abgespaltener Chloroplasten Transitsequenz und eingefügtem Transkriptionsstart und Ribosomenbindestelle führt zur Expression der Zeaxanthin Epoxidase in *Synechococcus* PCC 7942 PIM8. Ca. 60 % des Zeaxanthins wird zu Antheraxanthin bzw. Violaxanthin umgesetzt.

Es wurde eine *Synechococcus*-Transformante hergestellt, die mit Antheraxanthin und Violaxanthin zwei bislang nicht in Cyanobakterien vorkommende Carotinoide synthetisiert.

Der Zeaxanthingehalt dieser Transformante ist mit 0,3 µg/mgTG im Vergleich zu *Synechococcus* PIM8 pFP1-3 mit 0,9 µg/mgTG deutlich niedriger (Tabelle III-6).

### **1.2.2 Klonierung des $\beta$ -Carotin Hydroxylase Gens (crtZ) aus *Erwinia uredovora* in *Synechococcus* PCC 7942**

Durch zusätzliche Integration des  $\beta$ -Carotin Hydroxylase Gens (crtZ) aus *Erwinia uredovora* in *Synechococcus* PCC 7942PIM8 konnten (Götz *et al.*, 1999) den Zeaxanthingehalt dieser Transformante erhöhen. Die *Synechococcus* PCC 7942 PIM8crtZ-Transformante wurde von Susanne Römer aus Konstanz freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Analyse eines Carotinoideextraktes aus *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3crtZ zeigte, dass die Transformante einen signifikant höheren Zeaxanthingehalt als *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3 hat (Tabelle III-6).

### **1.2.3 Charakterisierung der *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 Transformanten pFP1-3ZE, pFP1-3crtZ und pFP1-3**

Mittels Messungen der Sauerstoffentwicklung der photosynthetischen Elektronentransportkette bzw. des  $F_v/F_m$ -Verhältnisses sollten einerseits die Auswirkungen der zwei neuen Carotinoide in *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3ZE und andererseits die Auswirkungen des niedrigeren Zeaxanthingehalts in *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3ZE bzw. höheren Zeaxanthingehalts in *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3crtZ im Vergleich zu *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3 auf die Photosyntheseleistung sowie auf den Schutz des Photosyntheseapparates vor Starklichtschädigung gezeigt werden.

### 1.2.3.1 Carotinoidzusammensetzung, Carotinoid- und Chlorophyllgehalt

Der Carotinoidgehalt und die Carotinoidzusammensetzung der *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 Transformanten nach Anzucht bei  $20\text{--}30\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  wurde mittels HPLC-Analyse von Carotinoidextrakten ermittelt (Tabelle III-6). In der Transformante pFP1-3ZE wurden  $0,27\ \mu\text{g/mgTG}$  Antheraxanthin und  $0,22\ \mu\text{g/mgTG}$  Violaxanthin gebildet. Das waren 9,1 bzw. 7,3 % vom Gesamtcarotinoidgehalt dieser Transformante. Der Zeaxanthingehalt nahm von 32,5 % in pFP1-3 auf nur noch 10 % in dieser Transformante ab.

Tabelle III-6 Carotinoidzusammensetzung von *Synechococcus* PCC 7942 Transformanten nach Anzucht bei  $30\text{--}50\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ;  $n = 4$ .

<i>Synechococcus</i> PCC 7942	gesamt Carotinode	Verteilung in [%]				
PIM8-Transformante 0h	[ $\mu\text{g mgTG}^{-1}$ ]	Zeaxanthin	$\beta$ -Cryptoxanthin	$\beta$ -Carotin	Antheraxanthin	Violaxanthin
pFP1-3	$3,1 \pm 0,31$	$32,5 \pm 4,0$	$3,2 \pm 0,3$	$64,1 \pm 5,2$	---	---
pFP1-3ZE (Zeaxanthin Epoxidase)	$3,0 \pm 0,37$	$10,0 \pm 2,2$	$4,7 \pm 0,24$	$68,9 \pm 5,7$	$9,1 \pm 3,1$	$7,3 \pm 2,7$
pFP1-3crtZ ( $\beta$ -Carotin Hydroxylase)	$3,3 \pm 0,26$	$47,3 \pm 3,9$	$4,6 \pm 0,35$	$48,1 \pm 4,5$	---	---
5h HL						
pFP1-3	$3,2 \pm 0,22$	$58,0 \pm 1,3$	$2,6 \pm 0,2$	$39,4 \pm$	---	---
pFP1-3ZE	$2,95 \pm 0,24$	$26,7 \pm 8,0$	$5,8 \pm 1,4$	$50,9 \pm$	$11,7 \pm 2,3$	$4,9 \pm 2,4$
pFP1-3crtZ	$3,6 \pm 0,3$	$70,8 \pm 7,4$	$2,7 \pm 0,1$	$26,5 \pm$	---	---

In pFP1-3crtZ war der Zeaxanthingehalt mit ca. 47,3 % deutlich höher als in pFP1-3, der  $\beta$ -Carotingehalt war dafür mit 48,1 %, im Vergleich zu 64,1 % in pFP1-3, wesentlich geringer. Im Gesamtcarotinoidgehalt waren keine signifikanten Unterschiede zwischen pFP1-3 ( $3,1\ \mu\text{g/mgTG}$ ) und pFP1-3ZE ( $3,0\ \mu\text{g/mgTG}$ ) feststellbar. Der Gesamtcarotinoidgehalt von pFP1-3crtZ war mit  $3,2\ \mu\text{g/mgTG}$  geringfügig höher.

Der Carotinoidgehalt von pFP1-3 und pFP1-3ZE änderte sich nach fünfstündiger Inkubation bei  $350\text{--}400\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  nicht signifikant. Der Carotinoidgehalt von pFP1-3crtZ stieg dagegen um 12 % auf  $3,6\ \mu\text{g/mgTG}$  an. Um zu überprüfen, ob sich die Carotinoidzusammensetzung

der Transformanten im Starklicht ändert, wurden Carotinoideextrakte der Transformanten nach Inkubation unter Schwach- bzw. Starklichtbedingungen mittels HPLC analysiert (Tabelle III-7). Nach Inkubation im Schwachlicht bleibt der Zeaxanthinanteil am Gesamtcarotinoidgehalt in pFP1-3ZE und pFP1-3crtZ nahezu unverändert, in pFP1-3 steigt er um 3,7 % auf 36,2 % leicht an.

Tabelle III-7 Zeaxanthingehalt der *Synechococcus* PCC 7942 Transformanten nach 5h Inkubation bei 300-350  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ;  $n = 4$ .

<b><i>Synechococcus</i> PCC 7942</b>		<b>Zeaxanthingehalt [<math>\mu\text{g}/\text{mgTG}</math>]</b>	
		<b>in Klammern % von Gesamtcarotinoidgehalt</b>	
<b>PIM8-Transformante</b>	<b>0h</b>	<b>5h LL</b>	<b>5h HL</b>
pFP1-3	1,0 $\pm$ 0,12 (32,5 %)	1,1 $\pm$ 0,04 (36,2%)	1,8 $\pm$ 0,050 (58,0 %)
pFP1-3ZE	0,3 $\pm$ 0,08 (10,0 %)	0,3 $\pm$ 0,07 (10,3%)	0,8 $\pm$ 0,061 (26,7 %)
pFP1-3crtZ	1,6 $\pm$ 0,12 (47,3 %)	1,6 $\pm$ 0,056(48,0 %)	2,54 $\pm$ 0,023 (70,8 %)
		<b>Viola- + Antheraxanthin [<math>\mu\text{g}/\text{mgTG}</math>]</b>	
		<b>in Klammern % von Gesamtcarotinoidgehalt</b>	
pFP1-3ZE	0,5 $\pm$ 0,04 (16,4 %)	0,6 $\pm$ 0,05 (18,7 %)	0,5 $\pm$ 0,04 (16,6 %)

Nach 5h Starklichtinkubation dagegen nimmt der Zeaxanthingehalt in allen Transformanten deutlich zu. Er steigt in pFP1-3 um 0,8  $\mu\text{g}/\text{mgTG}$  auf 1,8  $\mu\text{g}/\text{mgTG}$ , in pFP1-3ZE um 0,5  $\mu\text{g}/\text{mgTG}$  auf 0,8  $\mu\text{g}/\text{mgTG}$  und in pFP1-3crtZ um 0,95  $\mu\text{g}/\text{mgTG}$  auf 2,54  $\mu\text{g}/\text{mgTG}$  an. Der Antheraxanthin- und Violaxanthingehalt von pFP1-3ZE ändert sich nicht nach Starklichtbehandlung. Er bleibt bei 0,5  $\mu\text{g}/\text{mgTG}$ , was einem Anteil von 16,6 % entspricht.

Der Chlorophyllgehalt unterscheidet sich in *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3 und den beiden Transformanten nach Anzucht im Schwachlicht nicht signifikant. Er beträgt in pFP1-3 17,4  $\mu\text{g}/\text{mgTG}$ , in pFP1-3ZE 16,8  $\mu\text{g}/\text{mgTG}$  und in pFP1-3crtZ 17,3  $\mu\text{g}/\text{mgTG}$  (Tabelle III-8).

Tabelle III-8 Chlorophyllgehalt und Chlorophyll- bzw. Carotinoidgehalt der *Synechococcus* PCC 7942 Transformanten nach 5h Inkubation bei 350-400  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ;  $n = 4$

<b>PIM8-Transformante</b>	<b>Chlorophyll 0h [<math>\mu\text{g mg/TG}</math>]</b>	<b>Chlorophyll 5h HL [<math>\mu\text{g mg/TG}</math>]</b>
pFP1-3	17,4 $\pm$ 2,4	16,0 $\pm$ 1,2 (92,1 %)
pFP1-3ZE	16,8 $\pm$ 3,2	14,0 $\pm$ 0,94 (87,1%)
pFP1-3crtZ	17,3 $\pm$ 1,9	16,7 $\pm$ 0,73 (96,5%)



Der Chlorophyllgehalt nimmt nach Starklichtbehandlung in allen 3 Transformanten etwas ab. Am stärksten ist die Abnahme in pFP1-3ZE (12,9 %), und am geringsten in pFP1-3 crtZ (3,5 %).

### 1.2.3.2 Photosyntheserate und Schutz der Photosynthese unter Starklichtbedingungen

Um die Auswirkungen von Veränderungen in der Carotinoidzusammensetzung und des Zeaxanthingehalts auf photosynthetische Parameter hin zu untersuchen, wurden die Sauerstoffentwicklung der gesamten Elektronentransportkette und von Photosystem II sowie das  $F_v/F_m$ -Verhältnis der *Synechococcus* PCC 7842 PIM8-Transformanten nach Schwachlicht- bzw. Starklichtinkubationen gemessen.

Nach Anzucht bei  $30\text{--}50\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ist die maximale Sauerstoffentwicklung und die relative Quantenausbeute in allen Transformanten gleich (Abbildung III-6).

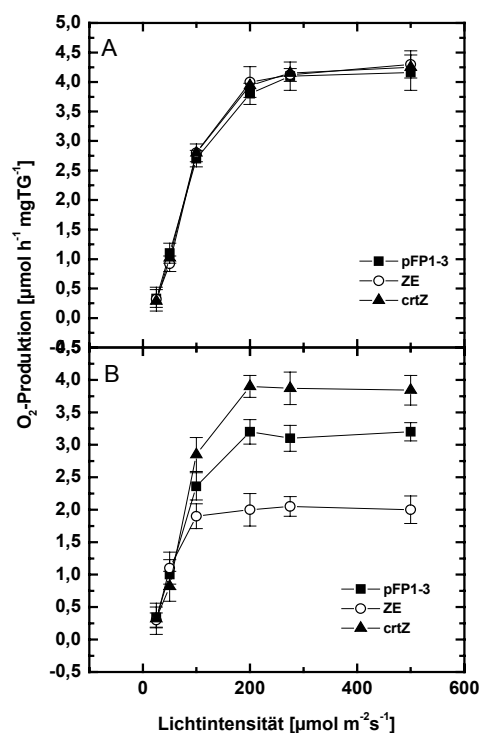


Abbildung III-6 Photosyntheserate von *Synechococcus* PCC 7942 Transformanten in Abhängigkeit zur Lichtintensität gemessen als Sauerstoffentwicklung der gesamten Elektronentransportkette. (A): nach Anzucht bei  $30\text{--}40\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  zum Zeitpunkt  $t=0$  und (B): nach 5h Inkubation bei  $350\text{--}400\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . pFP1-3: *Synechococcus* PCC 7942 pFP1-3; ZE: *Synechococcus* PCC 7942 pFP1-3 ZE; crtZ: *Synechococcus* PCC 7942 pFP1-3 crtZ.  $n = 3$

Die maximale Sauerstoffentwicklung liegt in allen Transformanten bei ca.  $4,2\ \mu\text{mol h}^{-1}\text{mgTG}^{-1}$ . Nach 5h Inkubation bei  $350\text{--}400\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  nimmt die maximale

Sauerstoffentwicklung in allen Transformanten ab. Während in pFP1-3crtZ der Rückgang der Sauerstoffentwicklung um  $0,3 \mu\text{mol h}^{-1}\text{mgTG}^{-1}$  (5 %) am geringsten ist, nimmt die Sauerstoffentwicklung in pFP1-3 um  $1 \mu\text{mol h}^{-1}\text{mgTG}^{-1}$  (22%) stärker ab. Am größten ist der Rückgang in pFP1-3ZE, dort geht die Sauerstoffentwicklung um etwa die Hälfte, um  $2,2 \mu\text{mol h}^{-1}\text{mgTG}^{-1}$ , zurück (Abbildung III-6 und Abbildung III-7).

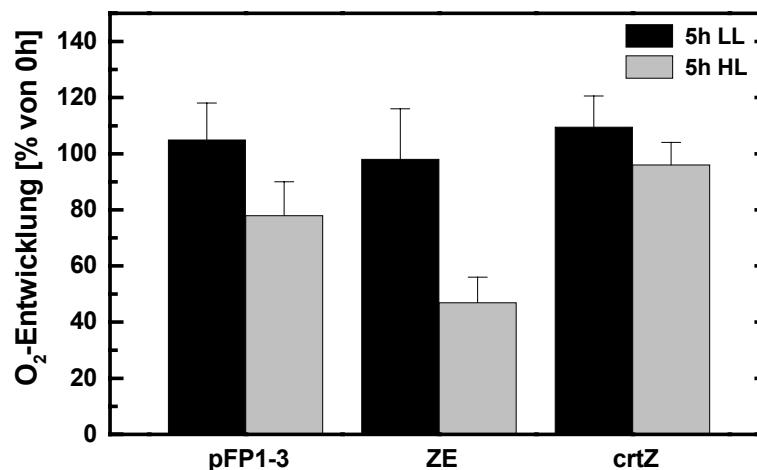


Abbildung III-7 Änderung der maximalen Photosyntheserate (% von  $t = 0$ ) von *Synechococcus* PCC 7942 Transformanten nach 5h Inkubation bei  $30\text{-}50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  bzw.  $350\text{-}400 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  gemessen als Sauerstoffentwicklung der gesamten Elektronentransportkette. pFP1-3 = *Synechococcus* PCC 7942 pFP1-3; ZE = *Synechococcus* PCC 7942 pFP1-3 ZE; *Synechococcus* PCC 7942 pFP1-3 crtZ.  $n = 3$

Die Photosystem II Aktivität wurde durch Messung der Sauerstoffproduktion von Photosystem II und durch Bestimmung des  $F_V/F_M$ -Verhältnisses bestimmt. Die maximale Sauerstoffentwicklung von Photosystem II ist nach Anzucht im Schwachlicht bei pFP1-3 und pFP1-3ZE gleich. Sie liegt bei  $7,8\text{-}8,2 \mu\text{mol h}^{-1}\text{mgTG}^{-1}$ . Nach 5h Inkubation im Schwachlicht steigt sie in den Transformanten pFP1-3 und pFP1-3crtZ um 10 % und bleibt in pFP1-3ZE konstant. Dagegen nimmt die maximale Sauerstoffentwicklung von Photosystem II nach 5h Starklichtbehandlung in den Transformanten pFP1-3 und pFP1-3crtZ um fast die Hälfte, um 46 %, ab. In pFP1-3ZE ist ein Verlust der Aktivität von 65 % messbar (Abbildung III-8).

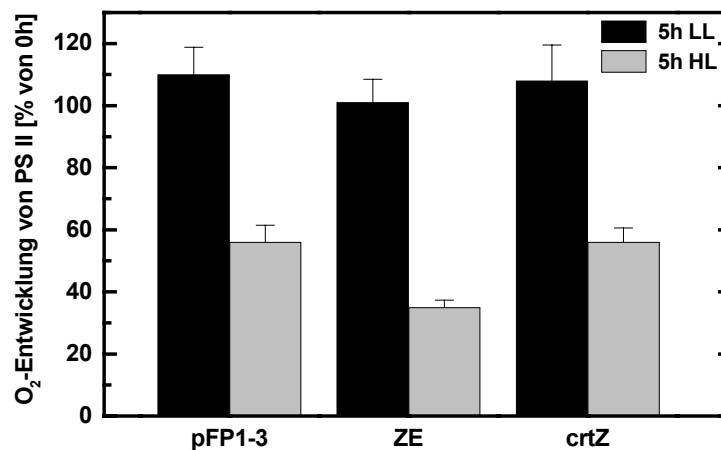


Abbildung III-8 Relative Änderung der Sauerstoffentwicklung von PSII in *Synechococcus* PCC 7942 Transformanten nach 5h Inkubation bei  $30\text{--}50\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  bzw.  $350\text{--}400\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . pFP1-3 = *Synechococcus* PCC 7942 pFP1-3; ZE = *Synechococcus* PCC 7942 pFP1-3 ZE; *Synechococcus* PCC 7942 pFP1-3 crtZ. Sauerstoffentwicklung  $t=0\text{h}$  pFP1-3  $7,8\ \mu\text{mol h}^{-1}\text{mgTG}^{-1}$ , pFP1-3ZE  $7,9\ \mu\text{mol h}^{-1}\text{mgTG}^{-1}$  und pFP1-3crtZ  $8,2\ \mu\text{mol h}^{-1}\text{mgTG}^{-1}$ .  $n = 4$ .

In Pflanzen spiegelt das Verhältnis  $F_v/F_M$  [ $F_M - F_0/F_M$ ] die maximale photochemische Effizienz von Photosystem II wider.  $F_v$  ist die variable Fluoreszenz, die sich aus der Differenz der maximalen Fluoreszenz ( $F_M$ ) und der Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) berechnet. Das  $F_v/F_M$  Verhältnis ist bei Pflanzen unter optimalen Bedingungen ungefähr bei 0,8. In Cyanobakterien muss der Parameter  $F_v/F_M$  vorsichtig interpretiert werden, da ein Anteil der Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) von den Phycobiliproteinen stammt. Durch den größeren  $F_0$  Wert liegt das  $F_v/F_M$ -Verhältnis in Cyanobakterien typischerweise zwischen 0,4-0,6 (Campbell *et al.*, 1998). In einer *Synechococcus* Mutante, die kein Plastocyanin mehr synthetisieren kann, liegt das  $F_v/F_M$ -Verhältnis bei 0,75 (Zhou & Gustafsson, nichtpublizierte Ergebnisse). Dennoch ist das  $F_v/F_M$ -Verhältnis in Proben mit relativ konstantem Pigmentgehalt ein nützlicher Parameter und korreliert nach Campbell *et al.* (1995) und Clarke *et al.* (1995) mit der Sauerstoffentwicklung von Photosystem II. Eine Abnahme des  $F_v/F_M$ -Verhältnisses kommt durch Photoinhibition von Photosystem II zustande (Björkman & Demming, 1987).

Das  $F_v/F_M$ -Verhältnis von pFP1-3 und pFP1-3ZE liegt nach 0h und nach 5h Inkubation im Schwachlicht bei 0,45 bzw. 0,46. Das von pFP1-3crtZ ist mit 0,5 etwas höher (Abbildung III-9). Nach 5h Inkubation bei  $300\text{--}350\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  geht das  $F_v/F_M$ -Verhältnis in pFP1-3 und pFP1-3crtZ um 14 bzw. 16 % zurück. In pFP1-3ZE ist ein Rückgang um 39 % zu verzeichnen.

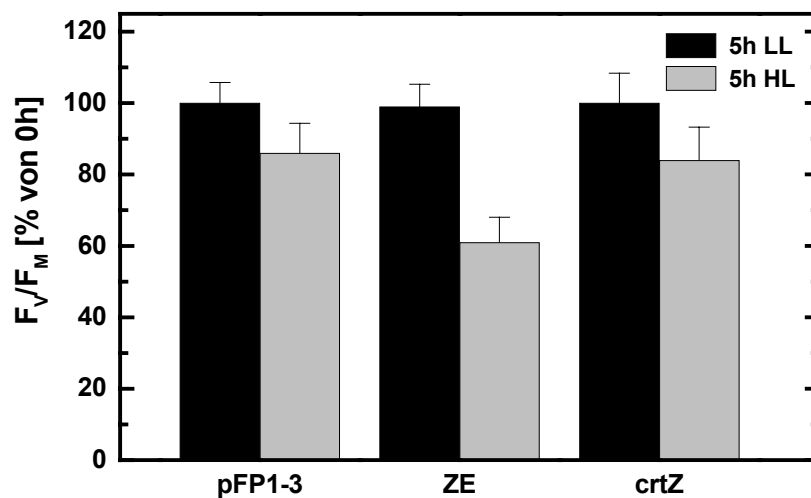


Abbildung III-9 Relative Änderung des  $F_v/F_m$ -Verhältnisses von PSII in *Synechococcus* PCC 7942 Transformanten nach 5h Inkubation bei  $30\text{--}50\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  bzw.  $300\text{--}350\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ . pFP1-3 = *Synechococcus* PCC 7942 pFP1-3; ZE = *Synechococcus* PCC 7942 pFP1-3 ZE; *Synechococcus* PCC 7942 pFP1-3 crtZ.  $F_v/F_m\ t=0$ : pFP1-3 0,45; pFP1-3ZE 0,46; pFP1-3crtZ 0,5.  $n = 4$ .

In den Schwachlichtproben konnte war hingegen in keiner der Transformanten eine Abnahme des  $F_v/F_m$ -Verhältnisses zu beobachten. Generell ist die Abnahme des  $F_v/F_m$ -Verhältnisses in den Transformanten nicht so stark ausgeprägt wie die Abnahme der Sauerstoffentwicklung von Photosystem II.

### 1.3 Charakterisierung von *Synechocystis* PCC 6803 Deletionsmutanten, die bestimmte Carotinoide nicht mehr bilden können

*Synechocystis* PCC 6803 hat eine komplexere Carotinoidzusammensetzung als *Synechococcus*. Neben  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin wird das Monoketocarotinoid Echinenon und über einen noch nicht im Detail bekannten Syntheseweg Myxoxanthophyll synthetisiert (Lagarde & Vermaas 1999; Fernadez-Gonzales et al., 1997). Myxoxanthophyll ist eine Myxol 2'-Dimethylfucose, d.h. am C2 Atom des Myxols ist ein 2'-Dimethylfucose Molekül gebunden (Takaichi et al. 2001). Aufgrund dieser Carotinoidzusammensetzung eignet sich *Synechocystis* PCC 6803 besonders, um die Auswirkungen, die das Fehlen einzelner oder mehrerer Carotinoide auf die Photosynthese und den Schutz des Photosyntheseapparates vor Starklichtschädigung hat, zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden in *Synechocystis* PCC 6803 die für die  $\beta$ -Carotin Ketolase (crtO) und die  $\beta$ -Carotin Hydroxylase (crtR) codierenden Gene oder beide Gene simultan inaktiviert. Zur Inaktivierung wurden die jeweiligen Gene durch Einführung eines Antibiotikaresistenzgens unterbrochen. Anstelle des Carotinoidgens wird in den resultierenden Mutanten das jeweilige Antibiotikaresistenzgen exprimiert. Die daraus resultierenden Deletionsmutanten *Synechocystis* PCC 6803  $\Delta$ crtO, *Synechocystis* PCC 6803  $\Delta$ crtR und *Synechocystis* PCC 6803  $\Delta$ crtRO wurden im Arbeitskreis von A. Vioque (Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universität Sevilla, Spanien) angefertigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten diese Deletionsmutanten charakterisiert werden und die Auswirkungen des modifizierten Carotinoidgehalts auf die Photosyntheseleistung und den Schutz vor Starklichtschädigungen des Photosyntheseapparates untersucht werden.

### 1.3.1 HPLC-Analysen der Carotinoidextrakte

Zur Charakterisierung der *Synechocystis*-Deletionsmutanten wurden nach Anzucht unter Schwachlichtbedingungen Carotinoidextraktionen durchgeführt. In *Abbildung III-10* sind die HPLC-Elutionsprofile von Carotinoidextrakten der *Synechocystis* Deletionsmutanten und des Wildtyps abgebildet. Im Wildtyp sind die in *Tabelle III-9* aufgelisteten Carotinoide nachweisbar.

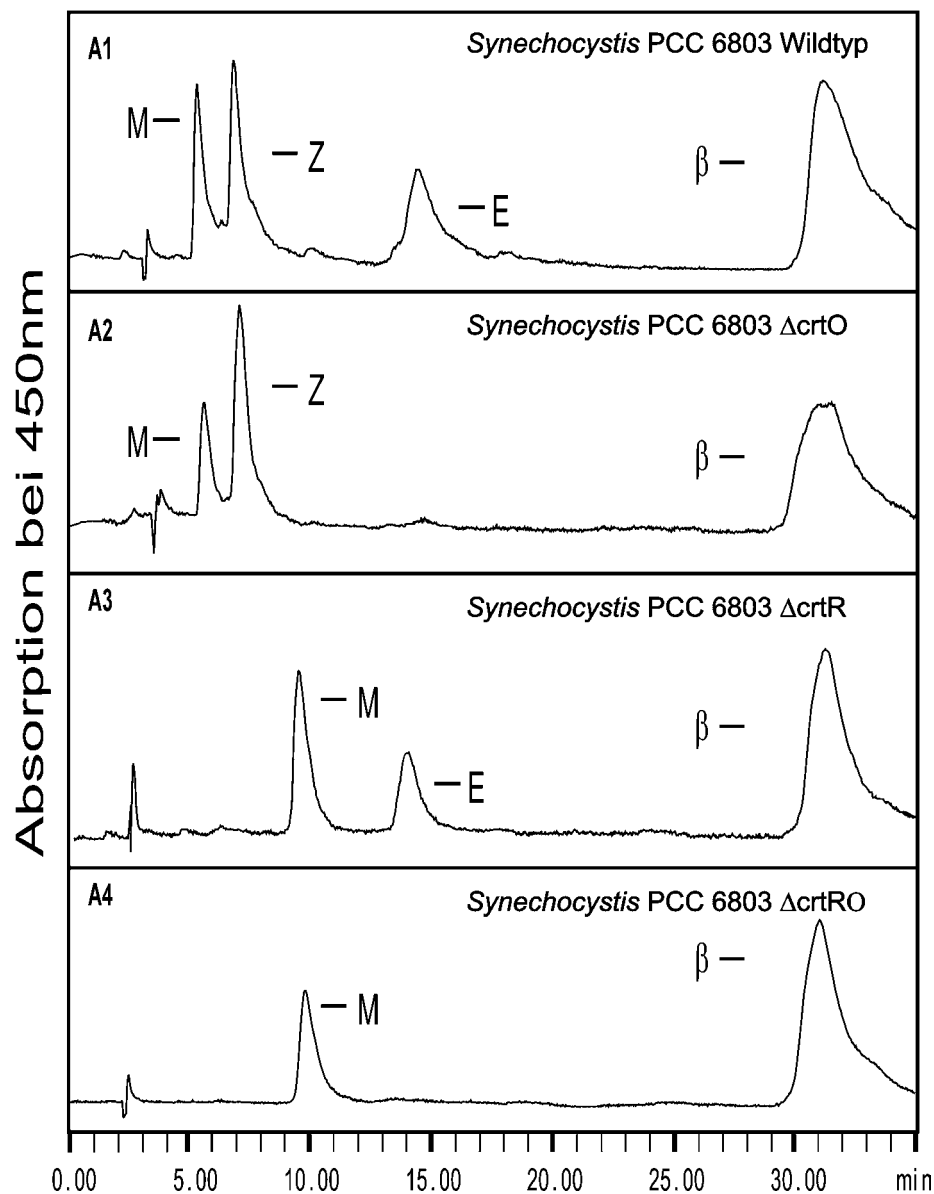


Abbildung III-10 C18-HPLC Elutionsprofile von Carotinoidextrakten nach Anzucht bei  $50 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  aus: **A1:** *Synechocystis* PCC 6803 Wildtyp (Kontrolle); **A2:** *Synechocystis* PCC 6803  $\Delta\text{crtO}$ ; **A3:** *Synechocystis* PCC 6803  $\Delta\text{crtR}$ ; **A4:** *Synechocystis* PCC 6803  $\Delta\text{crtRO}$ ;  $\beta$ :  $\beta$ -Carotin, Z: Zeaxanthin; E: Echinenon; M: Myxoxanthophyll bzw. Desoxy-Myxoxanthophyll

Wie in den HPLC-Läufen zu sehen ist, führt die Inaktivierung des crtO-Gens zum Verlust von Echinenon (Retentionszeit 15 min, 460 nm, im WT) in den Transformanten *Synechocystis* PCC 6803  $\Delta\text{crtO}$  und *Synechocystis* PCC 6803  $\Delta\text{crtRO}$  (Abbildung III-10 A2 und A4). Die Zerstörung von crtR führt in den Transformanten *Synechocystis* PCC 6803  $\Delta\text{crtR}$  und *Synechocystis* PCC 6803  $\Delta\text{crtRO}$  dazu, dass kein Zeaxanthin (Retentionszeit 8 min, 429 nm, 452 nm, 478 nm, im WT) mehr nachweisbar ist (Abbildung III-10 A3 und A4). Darüber hinaus

scheint das Genprodukt von crtR, die  $\beta$ -Carotin Hydroxylase, ebenfalls an der Synthese von Myxoxanthophyll beteiligt zu sein. Denn in den  $\Delta$ crtR und  $\Delta$ crtRO Transformanten wird kein Myxoxanthophyll (Retentionszeit 5 min, 450 nm, 476 nm, 507 nm, im WT) gebildet. Stattdessen ist in diesen Transformanten ein im Wildtyp nicht vorhandener Elutionsgipfel nach einer Retentionszeit von 10 min nachweisbar. Das dazugehörige Absorptionsspektrum des Elutionsgipfels nach 10 min ist mit dem Absorptionsspektrum von Myxoxanthophyll identisch. Lagarde & Vermaas (1999) identifizierten dieses Carotinoid als Myxoxanthophyll, dem die OH-Gruppe am C3-Atom  $\beta$ -Rings fehlt (Desoxy-Myxoxanthophyll).

Tabelle III-9 Absorptionsmaxima und Retentionszeiten der in *Synechocystis* PCC 6803 nachweisbaren Carotinoide

Carotinoid	Absorptionsmaxima [nm]			Retentionszeit [min]
$\beta$ -Carotin	429	452	478	30
Echinenon		460		15
Zeaxanthin	429	452	478	8
Myxoxanthophyll	450	476	507	5

Um den Carotinoidgehalt und die Carotinoidzusammensetzung von *Synechocystis* PCC 6803 und der Deletionsmutanten zu bestimmen wurden nach fünfstündiger Inkubation im Schwachlicht- bzw. im Starklicht Carotinoidextrakte angefertigt. HPLC-Analysen, der aus den Deletionsmutanten erhaltenen Carotinoidextrakten, ergab die in *Tabelle III-10* abgebildeten Ergebnisse.

Der Carotinoidgehalt bezogen auf das Trockengewicht ist nach Inkubation im Schwachlicht im Wildtyp und in  $\Delta$ crtO etwa gleich. Er beträgt bei beiden ca. 3,2  $\mu$ g/mgTG. Der Carotinoidgehalt der Zeaxanthin defizienten Transformanten  $\Delta$ crtR und  $\Delta$ crtRO ist geringfügig niedriger und liegt bei ca. 3  $\mu$ g/mgTG bzw. 2,92  $\mu$ g/mgTG.

Im Wildtyp setzt sich der Gesamtcarotinoidgehalt aus 0,67  $\mu$ g/mgTG (21 %) Myxoxanthophyll, 0,89  $\mu$ g/mgTG (28 %) Zeaxanthin, 0,32  $\mu$ g/mgTG (10 %) Echinenon und 1,3  $\mu$ g/mgTG (41 %)  $\beta$ -Carotin zusammen.

Tabelle III-10 Carotinoidzusammensetzung in *Synechocystis* PCC 6803 nach 5 h Inkubation im Schwachlicht ( $50 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) Starklicht ( $1200 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ). WT: Wildtyp,  $\Delta\text{crtO}$ :  $\Delta\text{crtO}$ ,  $\Delta\text{crtR}$ :  $\Delta\text{crtR}$ ,  $\Delta\text{crtRO}$ :  $\Delta\text{crtR}$ ; Myxo: Myxoxanthophyll; desoxy-Myxo: Desoxymyxoxanthophyll,  $n = 3$ .

Stamm	Myxo	desoxy-Myxo	Zeaxanthin	Echinenon	$\beta$ -Carotin	Carotinoide (gesamt)
5h LL	[ug/mgTG] in Klammern %					[ug/mgTG]
WT	0,67 (21)	0	0,89 (28)	0,32 (10)	1,3 (41)	$3,18 \pm 0,24$
$\Delta\text{O}$	0,6 (19)	0	0,93 (29)	0	1,67 (52)	$3,21 \pm 0,18$
$\Delta\text{R}$	0	0,79 (26)	0	0,52 (17)	1,73 (57)	$3,04 \pm 0,31$
$\Delta\text{RO}$	0	0,38 (13)	0	0	2,54 (87)	$2,92 \pm 0,27$
5h HL	[ug/mgTG] in Klammern %					[ug/mgTG]
WT	0,73 (25)	0	0,68 (23,4)	0,38 (13)	1,12 (39)	$2,90 \pm 0,3$
$\Delta\text{O}$	0,55 (19)	0	0,67 (23)		1,54 (53)	$2,90 \pm 0,22$
$\Delta\text{R}$	0	0,48 (20)	0	0,43 (18)	1,49 (62)	$2,40 \pm 0,16$
$\Delta\text{RO}$	0	0,41 (18)	0	0	1,81 (82)	$2,30 \pm 0,21$

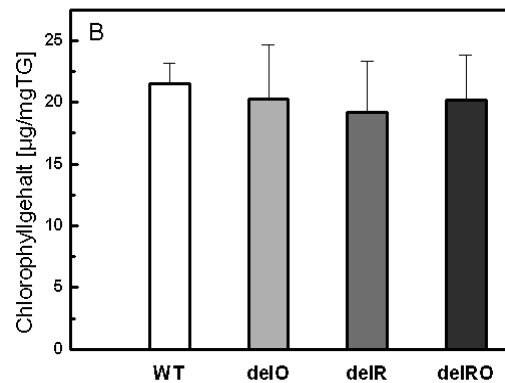
In *Synechocystis* PCC 6803 $\Delta\text{crtO}$  ist die Carotinoidzusammensetzung  $0,6 \mu\text{g/mgTG}$  (16 %) Myxoxanthophyll,  $0,93 \mu\text{g/mgTG}$  (29 %) Zeaxanthin, und  $1,67 \mu\text{g/mgTG}$  (52 %)  $\beta$ -Carotin. Es wird, wie bereits erwähnt, kein Echinenon synthetisiert, dafür steigt der Anteil an  $\beta$ -Carotin im Vergleich zum Wildtyp um 21 % an. In *Synechocystis* PCC 6803  $\Delta\text{crtR}$  akkumulieren nach Anzucht im Schwachlicht  $0,79 \mu\text{g/mgTG}$  (26 %) Desoxy-Myxoxanthophyll,  $0,52 \mu\text{g/mgTG}$  (17 %) Echinenon und  $1,73 \mu\text{g/mgTG}$  (87 %)  $\beta$ -Carotin. Aufgrund des Fehlens der  $\beta$ -Carotin Hydroxylase werden weder Zeaxanthin noch Myxoxanthophyll gebildet. Der Anteil an Desoxy-Myxoxanthophyll dieser Mutante ist  $0,12 \mu\text{g/mgTG}$  (15 %) höher als der Myxoxanthophyllanteil im Wildtyp. Der Echinenonanteil steigt um ca.  $0,2 \mu\text{g/mgTG}$  (38 %) im Vergleich zum Wildtyp deutlich an. Auch in  $\Delta\text{crtR}$  steigt der Anteil an  $\beta$ -Carotin um  $0,43 \mu\text{g/mgTG}$  (25 %) im Vergleich zum Wildtyp an. Anders als in der  $\beta$ -Carotin Ketolase defizienten Mutante führt das Fehlen der  $\beta$ -Carotin Hydroxylase zu einem erhöhten Anteil an Desoxy-Myxoxanthophyll und Echinenon, also an Carotinoiden, die in Reaktionen, die in Konkurrenz zur  $\beta$ -Carotin Hydroxylase Reaktion stehen, gebildet werden. In *Synechocystis* PCC 6803  $\Delta\text{crtRO}$  werden nur noch Desoxy-



Myxoxanthophyll und  $\beta$ -Carotin gebildet. Es werden nur 13 % Desoxy-Myxoxanthophyll gegenüber 87 %  $\beta$ -Carotin gebildet.

Nach 5 h Inkubation unter Starklichtbedingungen geht der Carotinoidgehalt in allen Proben zurück (*siehe auch Abschnitt III-1.3.4*). Die Carotinoidzusammensetzung hat sich in *Synechocystis* PCC 6803 und in den Deletionsmutanten nach fünfstündiger Starklichtbehandlung ebenfalls verändert. Im Wildtyp erhöhten sich der Myxoxanthophyll- und der Echinenongehalt um 16 % auf 25 % bzw. um 13 % auf 13 %, im Vergleich zu den Proben, die im Schwachlicht inkubiert wurden. Der Zeaxanthin- und  $\beta$ -Carotingehalt gingen dagegen um 17 % auf 23,4 % bzw. um 14 % auf 39 % zurück. In *Synechococcus* PCC 6803  $\Delta$ crtO ging der Zeaxanthingehalt um 11 % auf 23 % zurück, der  $\beta$ -Carotingehalt stieg um 2 % auf 53 % an. Der Anteil an Myxoxanthophyll war nach Inkubation im Schwachlicht genauso groß wie nach Inkubation im Starklicht. Nach fünfstündiger Inkubation von *Synechococcus* PCC 6803  $\Delta$ crtR im Starklicht ging der Anteil an Desoxy-Myxoxanthophyll um 25 % auf 20 % zurück. Der Anteil an  $\beta$ -Carotin stieg dagegen um 6 % auf 62 % im Vergleich zur Probe, die im Schwachlicht inkubiert wurde, an. In *Synechococcus* PCC 6803  $\Delta$ crtRO stieg dagegen der Anteil an Desoxy-Myxoxanthophyll um 28 % auf 18 % an, während der  $\beta$ -Carotinanteil um 6 % auf 82 % zurückging.

Der Chlorophyllgehalt von *Synechocystis* PCC 6803 und der Deletionsmutanten wurde nach fünfstündiger Inkubation im Schwachlicht gemessen. Er liegt bei allen Transformanten und im Wildtyp ungefähr bei 20 µg/mgTG (*Abbildung III-11*).



*Abbildung III-11 Chlorophyllgehalt der Synechocystis PCC 6803 Deletionsmutanten und des Wildtyps nach Anzucht im Schwachlicht. WT = Wildtyp, delO =  $\Delta crtO$ , delR =  $\Delta crtR$ , delRO =  $\Delta crtRO$ . n = 5.*

### 1.3.2 Auswirkungen von Starklicht und einer erhöhten Produktion von ROS auf den Pigmentgehalt von *Synechocystis*-Deletionsmutanten

Um zu überprüfen, welche Auswirkungen das Fehlen von Echinenon, Zeaxanthin bzw. beider Carotinoide auf den Schutz vor Starklichtschädigung oder Starklichtschädigung, kombiniert mit erhöhtem oxidativen Stress auf die *Synechocystis*-Transformanten, hat, wurden Inkubationen unter Starklicht (5h bei 1200 µmols<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup>) oder Starklicht + 10 µM Methylviologen bzw. + 10 µM Methylenblau durchgeführt. Methylviologen ist ein Elektronenakzeptor, der an der Akzeptorseite von Photosystem I Elektronen aufnehmen und diese auf Sauerstoff übertragen kann. Dies erhöht die Produktion von Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) und Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) im Licht (Asada, 1996). In Gegenwart des Photosensitizers Methylenblau kommt es zu verstärkter Bildung von <sup>1</sup>O<sub>2</sub> bei Belichtung mit Starklicht (Fukuzawa *et al.*, 1997). Der Chlorophyll- bzw. Carotinoidabbau ist ein Zeichen für auftretende photooxidative Schäden in der Zelle.

### 1.3.3 Änderung des Chlorophyllgehalts

Wie in *Abbildung III-12* zu sehen ist, nimmt der Chlorophyllgehalt nach Inkubation im Starklicht in allen Proben ab. Die Abnahme beträgt im Wildtyp 20 % auf 17,2 µg/mgTG, in  $\Delta crtO$  23% auf 15,6 µg/mgTG, in  $\Delta crtR$  27 % auf 13,9 µg/mgTG und in  $\Delta crtRO$  34% auf 12,9 µg/mgTG bezogen auf die 0h-Werte. Der Chlorophyllabbau nach fünfstündiger

Starklichtinkubation ist in der Transformante, die weder Zeaxanthin noch Echinenon synthetisieren kann, am größten. Allerdings sind die Unterschiede gering. Ein drastisch reduzierter Chlorophyllgehalt ist in  $\Delta crtR$  und  $\Delta crtRO$  nach 5 h Behandlung mit Starklicht + 10  $\mu M$  des Sauerstoffradikalbildners Methylviologen bzw. 10  $\mu M$  Methylenblau zu beobachten. Der Chlorophyllgehalt in den Methylviologen behandelten Proben nahm um 65 % auf 6,7  $\mu g/mg$  TG ( $\Delta crtR$ ) bzw. 75 % auf 5  $\mu g/mg$  TG ( $\Delta crtRO$ ) ab, also etwa drei mal so stark wie im WT (24%) oder  $\Delta crtO$  (25%).

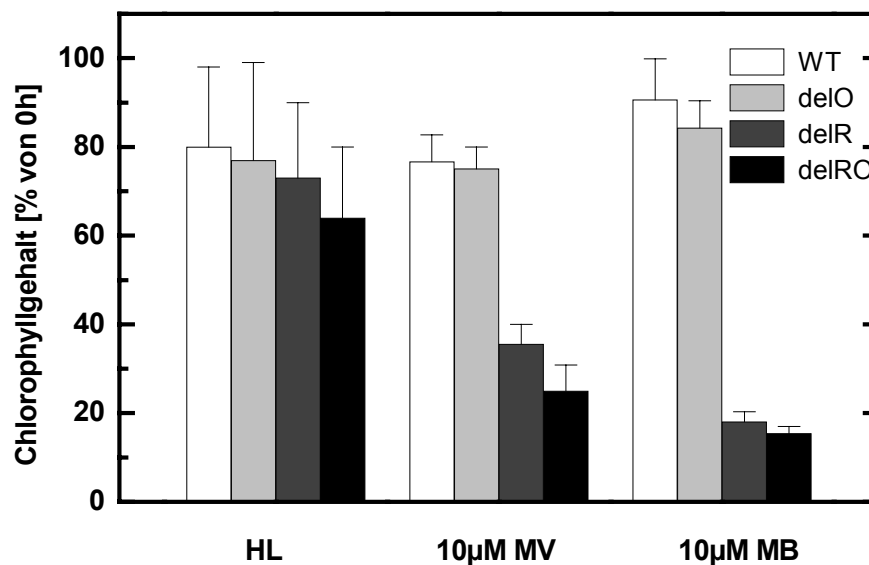


Abbildung III-12 Chlorophyllgehalt [% von 0h] von *Synechocystis* PCC 6803 Deletionsmutanten nach 5h Inkubation im Starklicht oder im Starklicht + 10  $\mu M$  Methylviologen(MV) bzw. 10  $\mu M$  Methylenblau (MB). Chlorophyllgehalt nach 0h: WT 20  $\mu g/mg$  TG,  $\Delta crtO$  18,7  $\mu g/mg$  TG,  $\Delta crtR$  17,6  $\mu g/mg$  TG und  $\Delta crtRO$  17,2  $\mu g/mg$  TG. WT = Wildtyp, delO =  $\Delta crtO$ , delR =  $\Delta crtR$ , delRO =  $\Delta crtRO$ . n = 3

In den mit Methylenblau behandelten Proben nahm der Chlorophyllgehalt von  $\Delta crtR$  und  $\Delta crtRO$  noch stärker als in den mit Methylviologen behandelten Proben ab. Der Chlorophyllgehalt ging in  $\Delta crtR$  um 82 % auf 3,2  $\mu g/mg$  TG bzw. in  $\Delta crtRO$  um 85 % auf 2,7  $\mu g/mg$  TG zurück.

### 1.3.4 Änderungen des Carotinoidgehalts

Carotinoide werden unter Starklichtbedingungen verstärkt abgebaut. Dieser Abbau sollte durch eine erhöhte Carotinoidneusynthese weitgehend ausgeglichen werden. Übersteigt der Carotinoidabbau die Carotinoidneusynthese ist eine Abnahme des Carotinoidgehalts messbar. Der Carotinoidabbau ist ebenfalls ein Maß für unspezifische Schädigungen der Zelle.

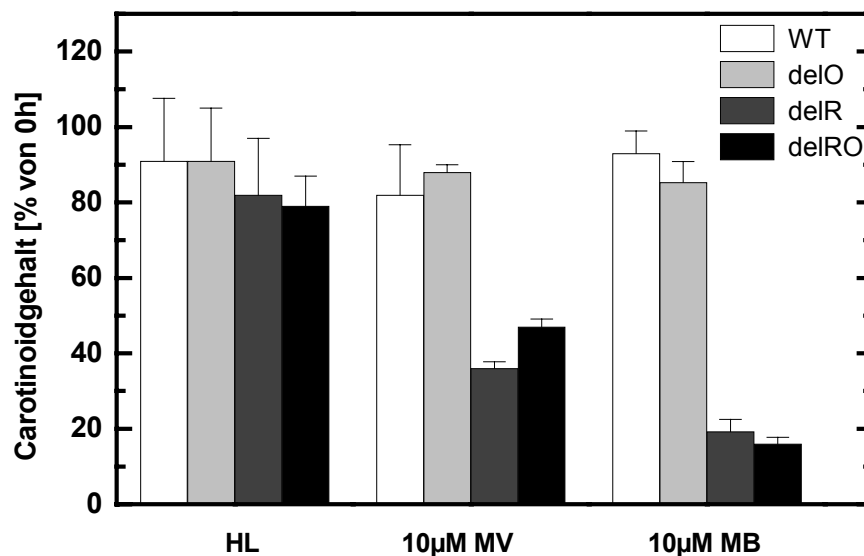


Abbildung III-13 Carotinoidgehalt in % von 0 h von *Synechocystis* PCC 6803 Deletionsmutanten nach 5h Inkubation unter Starklichtbedingungen bzw. Starklicht + 10 µM Methylviologen (MV) bzw. 10 µM Methylenblau (MB). Carotinoidgehalt nach 0h: WT 3,1 µg/mgTG,  $\Delta crtO$  3,1 µg/mgTG,  $\Delta crtR$  2,5 µg/mgTG und  $\Delta crtRO$  2,4 µg/mgTG. WT = Wildtyp,  $\Delta crtO$  =  $\Delta crtO$ ,  $\Delta crtR$  =  $\Delta crtR$ ,  $\Delta crtRO$  =  $\Delta crtRO$ . n = 3.

Nach 5h Inkubation unter Starklichtbedingungen ist ein schwacher Carotinoidabbau in *Synechocystis* PCC 6803 messbar. Im WT und in der  $\Delta crtO$ -Transformante geht der Carotinoidgehalt um 9 % auf 2,9 µg/mgTG, in  $\Delta crtR$  und  $\Delta crtRO$  mit 18 bzw. 21 % auf 2,1 bzw. 2 µg/mgTG etwas stärker zurück. Analog zum Chlorophyllgehalt nimmt auch der Carotinoidgehalt nach 5 h Starklicht + 10 µM Methylviologen bzw. 10 µM Methylenblau-Behandlung bei  $\Delta crtR$  und bei  $\Delta crtRO$  im Gegensatz zum WT und  $\Delta crtO$  drastisch ab.

Die Abnahme des Carotinoidgehalts ist in Gegenwart von Methylenblau in  $\Delta crtR$  und  $\Delta crtRO$  deutlich höher als in Gegenwart von Methylviologen. Der Carotinoidgehalt nimmt in Gegenwart von Methylviologen in  $\Delta crtR$  um 64 % auf 0,9 µg/mg TG und in  $\Delta crtRO$  um 53 % auf 1,2 µg/mg TG ab. Im WT und in  $\Delta crtO$  ist eine Abnahme um nur 18 bzw. 12 % zu beobachten. Nach 5h Inkubation im Starklicht in Gegenwart von Methylenblau nahm der Carotinoidgehalt von  $\Delta crtR$  um 80 % auf 0,48 µg/mgTG und der von  $\Delta crtRO$  um 84 % auf nur noch 0,4 µg/mgTG ab (Abbildung III-13).

### 1.3.5 Einfluss der Carotinoidzusammensetzung auf die Photosynthese

In den folgenden Experimenten sollten die Auswirkungen des Fehlens einzelner Carotinoide auf spezifische photosynthetische Parameter gezeigt werden. Dazu wurden die Sauerstoffentwicklung der gesamten Elektronentransportkette bzw. die Sauerstoffentwicklung von Photosystem II als Maß für die Photosyntheserate, sowie das  $F_V/F_M$ -Verhältnis als Maß für Photoinhibition von Photosystem II herangezogen.

#### 1.3.5.1 Messung der Sauerstoffentwicklung

Die Photosyntheserate der Cyanobakterien wurde über die Messung der Sauerstoffentwicklung bestimmt. Es wurden die Sauerstoffentwicklung der gesamten Elektronentransportkette sowie die Sauerstoffentwicklung von Photosystem II gemessen.

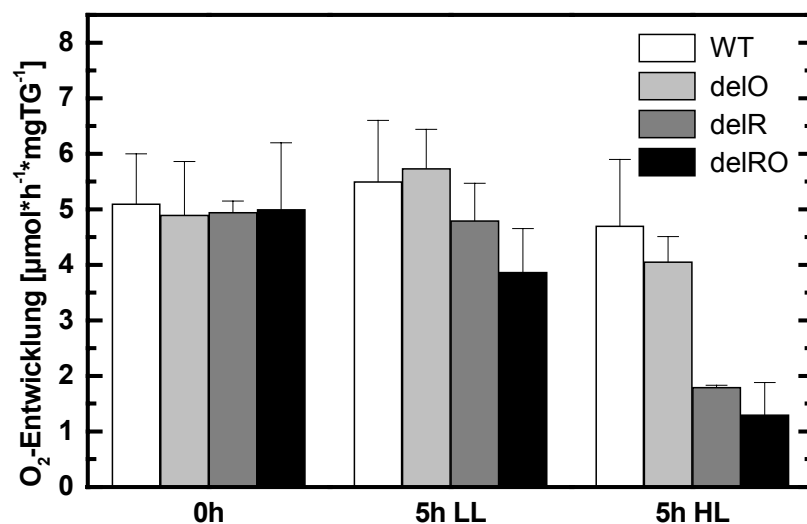
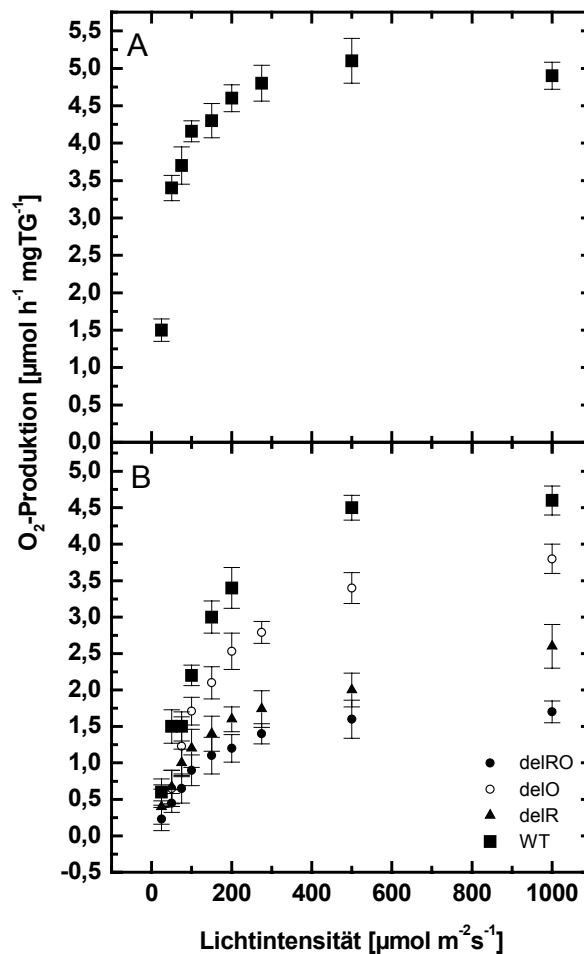


Abbildung III-14 Maximale Photosyntheserate der *Synechocystis* PCC 6803 Deletionsmutanten unter sättigendem Licht ( $500 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) zum Zeitpunkt  $t=0$  und nach 5h Inkubation im Schwach bzw. Starklicht. WT = Wildtyp, delO =  $\Delta\text{crtO}$ , delR =  $\Delta\text{crtR}$ , delRO =  $\Delta\text{crtRO}$ .  $n = 5$

Nach Anzucht unter Schwachlichtbedingungen ist die maximale Photosyntheseleistung von den *Synechocystis* Transformanten und dem Wildtyp gleich. Sie beträgt  $5 \mu\text{mol h}^{-1} \text{mgTG}^{-1}$  (Abbildung III-14). Auch bei den Lichtsättigungskurven waren nach Anzucht im Schwachlicht keine Unterschiede messbar, die Kurven verliefen nahezu identisch (Abbildung III-15). Nach 5h Inkubation im Starklicht waren deutliche Unterschiede in der Photosyntheseleistung messbar.

Im Wildtyp geht die Sauerstoffentwicklung um 8 % auf  $4,7 \mu\text{mol h}^{-1}\text{mgTG}^{-1}$  im Vergleich zum Ausgangswert zurück. In  $\Delta\text{crtO}$  ist die Abnahme mit 19 % auf  $4 \mu\text{mol h}^{-1}\text{mgTG}^{-1}$  etwas größer. In  $\Delta\text{crtR}$  und  $\Delta\text{crtRO}$  führt die Starklichtinkubation zu einem deutlichen Verlust der Photosynthesekapazität. Sie geht in  $\Delta\text{crtR}$  um 64 % auf  $1,8 \mu\text{mol h}^{-1}\text{mgTG}^{-1}$  und in  $\Delta\text{crtRO}$  sogar um 74 % auf nur noch  $1,3 \mu\text{mol h}^{-1}\text{mgTG}^{-1}$  zurück (*Abbildung III-14*). Dieses Ergebnis wird auch von den nach 3h Starklichtinkubation aufgenommenen Lichtsättigungskurven bestätigt (*Abbildung III-15*).



*Abbildung III-15 Photosyntheserate von Synechocystis Transformanten in Abhängigkeit zur Lichtintensität zum Zeitpunkt  $t=0$  (A) bzw. nach 3h Starklichtbehandlung (B). Die dargestellte Kurve in A steht für alle 4 Synechocystis Kulturen, die anderen 3 Kurven verliefen identisch. WT = Wildtyp, delO =  $\Delta\text{crtO}$ , delR =  $\Delta\text{crtR}$ , delRO =  $\Delta\text{crtRO}$ .  $n = 3$ .*

Die maximale Photosyntheserate nimmt vom Wildtyp  $4,6 \mu\text{mol h}^{-1}\text{mgTG}^{-1}$ , über  $\Delta\text{crtO}$   $3,8 \mu\text{mol h}^{-1}\text{mgTG}^{-1}$ , und  $\Delta\text{crtR}$   $2,6 \mu\text{mol h}^{-1}\text{mgTG}^{-1}$  auf  $1,7 \mu\text{mol h}^{-1}\text{mgTG}^{-1}$  in  $\Delta\text{crtRO}$  ab. Auch die relative Quantenausbeute, d.h. die Lichtmenge, die für eine bestimmte Photosyntheseleistung benötigt wird (Steigung der Kurven), nimmt in den Carotinoid

defizienten Transformanten ab. Auch hier ist die Abnahme in  $\Delta crtO$  nur sehr schwach und in  $\Delta crtR$  und  $\Delta crtRO$  deutlich stärker. Das Fehlen von sowohl Zeaxanthin als auch Echinenon wirkt sich additiv auf die Inhibierung der Photosynthese unter Starklichtbedingungen aus. Die Abnahme der Photosyntheseleistung von  $\Delta crtRO$  nach Starklichtbehandlung ist etwa so groß wie die Abnahme von  $\Delta crtO$  und  $\Delta crtR$  zusammen.

Ein ähnliches Bild ergibt sich, bei Betrachtung der Sauerstoffentwicklung von Photosystem II. Die Photosystem II Aktivität ist beim WT und den Transformanten ungefähr gleich. Sie liegt bei ca.  $10\text{--}10,5 \mu\text{mol h}^{-1} \text{mg TG}^{-1}$  und ist somit etwa zweimal so hoch wie die der gesamten Elektronentransportkette (Abbildung III-16).

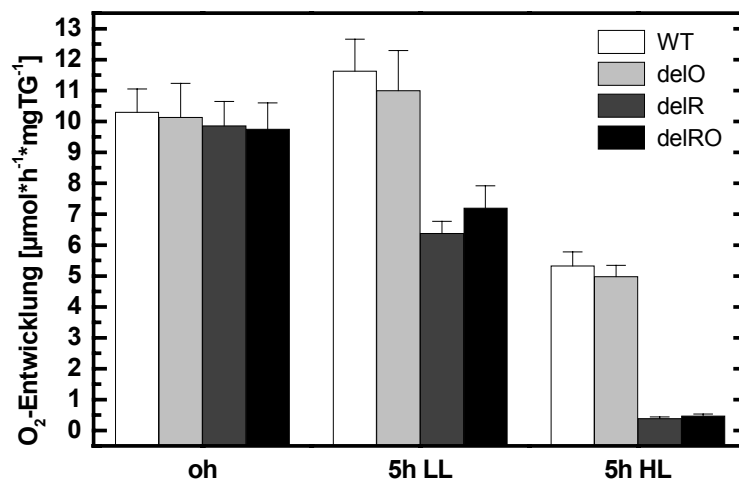


Abbildung III-16 Maximale Sauerstoffentwicklung von Photosystem II der *Synechocystis* PCC 6803 Deletionsmutanten unter sättigendem Licht ( $500 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) zum Zeitpunkt  $t=0$  und nach 5h Inkubation im Schwach- bzw. Starklicht. WT: Wildtyp, delO:  $\Delta crtO$ , delR:  $\Delta crtR$ , delRO:  $\Delta crtRO$ .  $n = 4$

Die Photosystem II-Aktivität geht nach 5h Starklichtbehandlung in allen *Synechocystis* Kulturen stark zurück. Im WT und in  $\Delta crtO$  geht die Aktivität auf 5,3 bzw. 5,0  $\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg TG}^{-1}$  im Vergleich zum Inkubationsbeginn zurück. Das ist in beiden Fällen ein Rückgang um ca. 50 %. Allerdings ist die Sauerstoffentwicklung von Photosystem II im Wildtyp und in  $\Delta crtO$  immer noch höher als die Sauerstoffentwicklung der gesamten Elektronentransportkette. Noch stärker ist der Rückgang bei  $\Delta crtR$  und  $\Delta crtRO$ , hier geht die Aktivität um 97 bzw. 96 % auf nur noch 0,4 bzw. 0,47  $\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg TG}^{-1}$  zurück. Der Rückgang der Sauerstoffentwicklung von Photosystem II nach 5h Starklichtbehandlung ist in  $\Delta crtRO$ , anders als bei der Aktivität der gesamten Elektronentransportkette, nicht stärker als in  $\Delta crtR$ .

### 1.3.5.2 Messung der Chlorophyllfluoreszenz von Photosystem II

Die  $F_V/F_M$ -Verhältnisse in den *Synechocystis*-Transformanten und im Wildtyp unterscheiden sich nach Anzucht im Schwachlicht geringfügig. Die Echinenon-defizienten Transformanten weisen mit 0,37 bzw. 0,35 ein etwas geringeres  $F_V/F_M$ -Verhältnis als der WT mit 0,43 oder  $\Delta crtR$  mit 0,41 auf (Abbildung III-17). Nach 5h Inkubation unter Schwachlichtbedingungen sind die Unterschiede allerdings nur noch marginal.

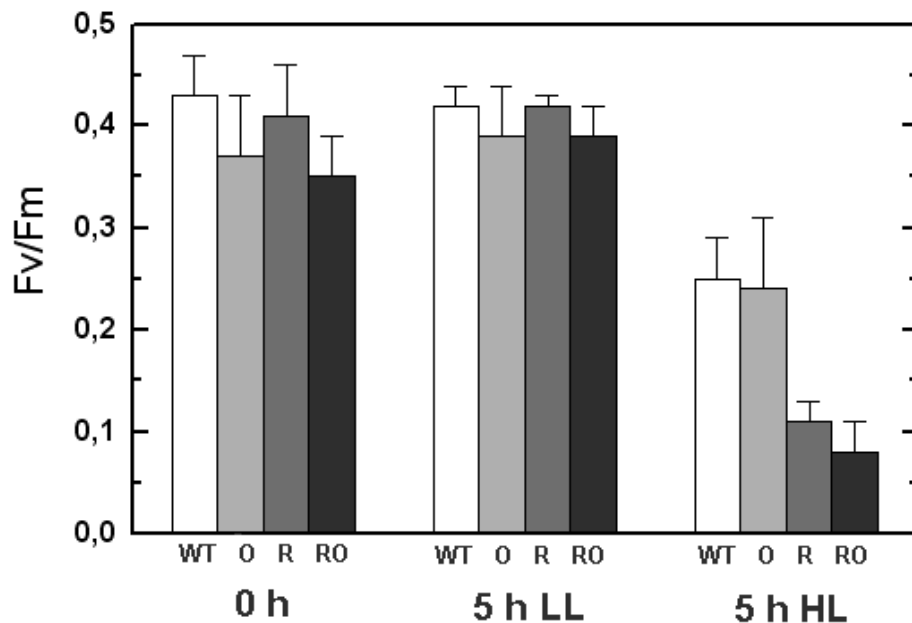


Abbildung III-17 Änderung des  $F_V/F_M$ -Verhältnisses als Maß für Photoinhibition von Photosystem II in *Synechocystis* Deletionsmutanten nach 5 h Inkubation unter Schwach- bzw. Starklichtbedingungen. WT = Wildtyp, O =  $\Delta crtO$ , R =  $\Delta crtR$ , RO =  $\Delta crtRO$ . n = 5.

Nach 5h Inkubation unter Starklichtbedingungen korrespondiert die Abnahme des  $F_V/F_M$ -Verhältnisses mit der Abnahme der Sauerstoffentwicklung sowohl in den *Synechocystis* PCC 6803 Deletionsmutanten als auch im Wildtyp. Allerdings sind auch hier der Wildtyp und die  $\Delta crtO$  Transformante deutlich besser als die Zeaxanthin-defizienten Transformanten  $\Delta crtR$  und  $\Delta crtRO$  vor Photoinhibition geschützt. Im Wildtyp geht das  $F_V/F_M$ -Verhältnis um 42 % vom 0h Wert zurück, in  $\Delta crtO$  um 36 %. In den beiden Zeaxanthin-defizienten Transformanten sinkt das  $F_V/F_M$ -Verhältnis um 73 bzw. 78 %. Auch hier reagiert die Transformante, die weder Echinenon noch Zeaxanthin synthetisieren kann, am empfindlichsten auf Starklichtbestrahlung.



## **2 Regulation der Carotinoidbiosynthese in *Synechococcus* PCC 7942**

Carotinoide werden besonders unter Starklichtbedingungen zum Schutz vor überschüssiger Anregungsenergie und daraus resultierenden (photo-)oxidativen Prozessen benötigt. Ob ein erhöhter Bedarf an Carotinoiden unter diesen Bedingungen durch eine Steigerung der Carotinoidbiosynthese in *Synechococcus* PCC 7942 gedeckt wird und welche Gene an diesem Prozess beteiligt sind, wurde in dieser Arbeit untersucht.

### **2.1 Messung der Carotinoidneusynthese nach Schwach- bzw. Starklichtinkubation in Gegenwart von Norflurazon**

Da besonders „farbige“ Carotinoide, wie die in *Synechococcus* akkumulierenden Carotinoide Zeaxanthin und  $\beta$ -Carotin, unter Starklichtbedingungen verstärkt abgebaut werden, ist eine Steigerung der Carotinoidbiosynthese unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar (Steiger *et al.*, 1999). Um die Carotinoidneusynthese sichtbar zu machen, wurde die Carotinoidbiosynthese mit dem Phytoen Desaturase Hemmstoff Norflurazon (NFZ) inhibiert (Sandmann, 1989). Dies führt zur Akkumulation des sonst nicht in *Synechococcus* nachweisbaren Phytoens. Da Phytoen im Starklicht nicht so schnell abgebaut wird wie die „farbigen“ Carotinoide, kann man anhand der Phytoenakkumulation auf die Carotinoidneusynthese schließen. Durch Inkubationen von *Synechococcus* PCC 7942 im Schwach- bzw. Starklicht wurde zunächst untersucht, ob die Phytoenneusynthese lichtreguliert ist.

Die Versuche mit dem Phytoen Desaturase Hemmstoff NFZ zeigten, dass nach Starklichtinkubation mehr Phytoen gebildet wird als nach Inkubation im Schwachlicht (*Abbildung III-18*). Nach fünfstündiger Inkubation im Starklicht wurden 0,67  $\mu\text{g}/\text{mgTG}$  Phytoen gebildet. Das ist ungefähr doppelt soviel wie im Schwachlicht. Nach achtestündiger Inkubation ist der Phytoengehalt auf 1,52  $\mu\text{g}/\text{mgTG}$  gestiegen. Das ist ein dreimal so hoher Phytoengehalt wie in der Schwachlichtprobe.

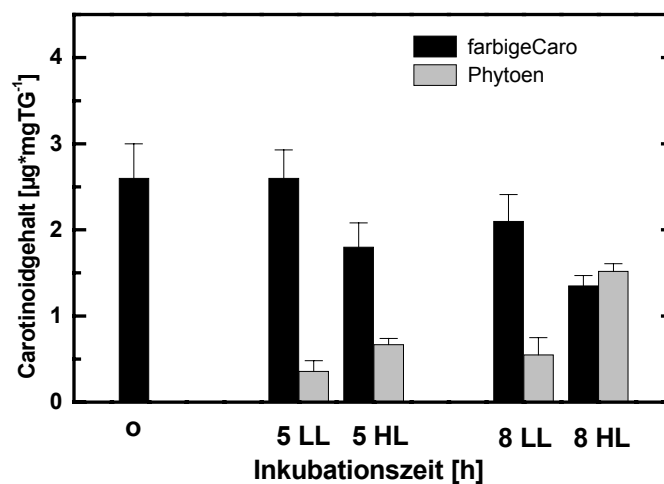


Abbildung III-18 Neubildung von Phytoen und Abbau der farbigen Carotinoide nach Inkubation von *Synechococcus* PCC 7942 in Gegenwart des Phytoen Desaturase Hemmstoffes Norflurazon (7,5 µM) unter Schwach- bzw. Starklichtbedingungen.  $n = 5$ .

Der Abbau der vorhandenen farbigen Carotinoide ist im Starklicht ebenfalls stärker. Der Gehalt an  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin geht im Starklicht von 2,6 µg/mgTG zum Zeitpunkt  $T_0$  auf 1,8 µg/mgTG nach 5h und auf 1,35 µg/mgTG nach 8 h zurück. Im Schwachlicht ist erst nach 8 h eine Abnahme auf 2,1 µg/mg TG messbar.

## 2.2 Promotoruntersuchungen der untranslatierten DNA-Bereiche vor crtB und crtP

Eine mögliche Ursache für die verstärkte Phytoenbildung im Starklicht ist eine erhöhte Promotoraktivität des DNA-Bereiches vor crtB. In Cyanobakterien liegen die Gene für die Phytoen Synthase (crtB) und für die Phytoen Desaturase (crtP) aufeinander folgend im Genom. Das 3'Ende von crtP und das 5'Ende von crtB überlappen sich (Abbildung III-19).

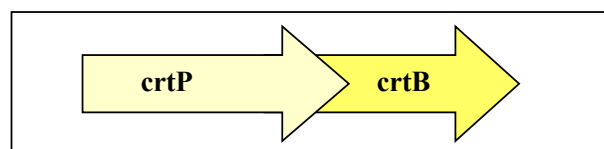


Abbildung III-19 Anordnung der Gene crtB und crtP in Cyanobakterien

Fernandez-Gonzales et al. (1998) konnten in *Synechocystis* PCC 6803 zeigen, dass sowohl der stromaufwärts von crtB gelegene DNA-Bereich als auch der DNA-Bereich stromaufwärts von crtP für eine Erhöhung der Transkriptmenge im Starklicht verantwortlich sind. Steiger et al., (1999) zeigten, dass dieser Anstieg der Transkriptmenge zu einer erhöhten

Phytoenbildung in *Synechocystis* PCC 6803 unter Starklicht führt. In *Synechococcus* PCC 7942 sind die Sequenzen von crtB und crtP und die DNA Bereiche stromaufwärts der jeweiligen Translationsstarts bekannt (Chamovitz *et al.*, 1991; Chamovitz *et al.*, 1992).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese beiden DNA-Bereiche ebenfalls lichtregulierte Promotoren sind oder ob beide Gene als Operon organisiert sind und unter der Kontrolle eines gemeinsamen Promotors vor crtP stehen. Deshalb wurden die DNA-Bereiche stromaufwärts von crtB und crtP mit einem Reportergen fusioniert und in das Genom von *Synechococcus* PCC 7942 integriert. Die Reportergenaktivität der erhaltenen Transformanten wurde als Maß für die Promotoraktivität nach Inkubation im Schwach- bzw. im Starklicht gemessen.

### **2.2.1 Sequenzvergleich von putativen Promotorbereichen vor crtB und crtP mit lichtregulierten cyanobakteriellen Promotoren**

Zuerst sollte untersucht werden, ob in den beiden putativen Promotoren von crtB und crtP Sequenzhomologien zu anderen lichtregulierten Promotoren aus Cyanobakterien oder zu dem  $\phi_{70}$ -Standardpromotor aus *E. coli* vorliegen.

Ein Vergleich der putativen Promotorbereiche vor crtB und crtP mit Promotorstrukturen anderer lichtregulierter cyanobakterieller Gene zeigte, dass sowohl stromaufwärts von crtB als auch von crtP Sequenzhomologien zu anderen lichtregulierten cyanobakteriellen Promotoren vorhanden sind. Es wurden Homologien zu den LR1-5 aus *Synechocystis* PCC 6803 und dem lichtregulierten Promotors des psbDII Gens aus *Synechococcus* PCC 7942 gefunden.

Das GGN<sub>2</sub>TGAAAC-Motiv, das in LR1-5 zweimal vorkommt und in LR3 einmal, konnte auch vor crtB zweimal (-131 bis -121 bp und -88 bis -78 bp) gefunden werden. Im untranslatierten Bereich (UTR) vor crtP kommt das Motiv ohne die beiden konservierten Guanine einmal vor (-140 bis -150 bp). Auch vor dem lichtregulierten psbDII Gen (Bustos & Golden, 1991) findet sich ein ähnliches Motiv (*Abbildung III-20* grau unterlegte Sequenzen). Anandan *et al.* (1997) zeigten, dass durch Deletion eines DNA-Abschnitts (bs-1) 99 bp vor dem Transkriptionsstart des psbDII Gens dessen Hochregulation im Starklicht verloren geht.

**A:**

LR1-1	GATCACCAAAGAGGGCTTTTAACATGGGACTTG
LR2-1	AATGTTTGCCGATGGCTTGAAACTGTTTTTCCC
LR3-1	GAATGCGGATGAAGATGGCAAAC TGCAATCTTT
LR4-1	TATTTTATTGATC GGTCTGAAAC ATATCGGCTT
LR5-1	AATGTCCTCCCGG GGGATGGAAC GCGATACAT
psbDII	CATGGAAGCCTGC GAGACA CAAC GCAGCGATC
crtP	ACTCGCAGACGGACCG CTGAAAC GTCTCCATCA
crtB	TGCTCGCCAAGAT GAGTTGCAAC GTCGCAGCGG

**B:**

LR1-2	GGAATTTAAC
LR2-2	GGGCATCAAC
LR4-2	GGGCAAGAAC
LR5-2	GGGCATAAAC
crtB	AGGCATAGAC

Abbildung III-20 Sequenzvergleich von lichtregulierten Promotoren und putativen Promotorsequenzen von Carotinoidgenen aus *Synechococcus* PCC 7942.

**A:** LR 1-1 bis LR 5-1 = erster homologer Bereich der LR 1-5, psbDII = Basen -95 bis -63 stromaufwärts des Transkriptionsstarts des psbDII (Bustos & Golden, 1991); crtP = Basen -139 bis -115 des putativen Promotorbereichs vor crtP und crtB = Basen -144 bis -108 des putativen Promotorbereichs vor crtB. **B:** LR 1-2 und LR 2-2 sowie LR 4-2 und LR 5-2 = zweiter homologer Bereich der LR 1 und 2 sowie LR 3 und 4, crtB = Basen -88 bis -78 des putativen Promotorbereichs vor crtB.

Die, mit der Mehrheit der LR 1-5 homologen Basen wurden fett dargestellt, Basen mit Homologie zu einzelnen LR's bzw. DII wurden fett und farbig dargestellt. Längere identische Sequenzen wurden nochmals unterstrichen.

Ein Sequenzvergleich mit den putativen Promotoren von crtB und crtP ergab, dass in beiden DNA-Bereichen (crtB -121 bis -136 bp bzw. crtP -123 bis -138 bp) jeweils die ersten 5 Basen (AACGT) mit der bs-1 Sequenz übereinstimmen (Abbildung III-21).

bs-1	<b>AACGT</b> TAAGCTGCGA
crtP	<b>AACGT</b> CTCCATCATT
crtB	<b>AACGT</b> CGCAGCAGCG

Abbildung III-21 Sequenzvergleich von bs-1, einer Struktur aus dem UTR des psbDII Gens aus *Synechococcus*, (mit deren Fehlen die Starklicht Hochregulation des Reportergens verloren geht), mit DNA Sequenzen aus den UTRs von crtB und crtP.

Eine Untersuchung der putativen Promotoren von crtB und crtP nach Sequenzhomologien zur -10 und -35 Region des klassischen  $\sigma_{70}$ -Promotors aus *E. coli* ergab Folgendes:

Im UTR von crtB konnten keine Sequenzen analog zu dem *E. coli*-Standardpromotor ( $\sigma_{70}$ -Promotor) gefunden werden. Im putativen Promotorbereich von crtP gibt es sowohl eine -10 als auch eine -35 Region. Allerdings liegen diese Regionen vor crtP weiter stromaufwärts und weiter voneinander entfernt als bei dem  $\sigma_{70}$ -Promotor aus *E. coli*. Die -35 Region liegt bei -84 bp und die -10 Region liegt bei -47 bp. Bei *E. coli* variiert der Abstand der beiden Regionen zwischen 16 und 18 bp. Im Falle von crtP beträgt der Abstand 37 bp.

	-35		-10
Standard $\sigma_{70}$ -Promotor	<b>TCTTGAC</b>	16–18bp	<b>TATAAT</b>
Putativer Promotor- bereich vor crtP	<b>GCTTGAC</b>	37bp	<b>TATACT</b>
	-84		-47

Abbildung III-22 Homologe Bereiche der putativen Promotorsequenz stromaufwärts von crtP in *Synechococcus* PCC 7942 mit den -35 und -10 Regionen des  $\sigma_{70}$  Promotors aus *E. coli*. Homologe Basen hervorgehoben.

In den putativen Promotorbereichen beider Gene gibt es Homologien zu lichtregulierten cyanobakteriellen Promotoren, aber nur im UTR von crtP findet man Elemente des  $\sigma_{70}$ -Promotors aus *E. coli*.

### 2.2.2 Herstellung von *Synechococcus* PCC 7942 Transformanten mit ins Genom integrierten Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten

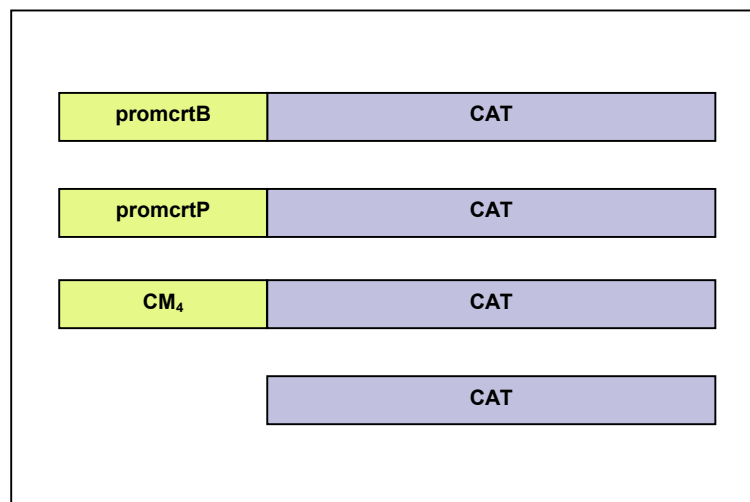
Um die DNA-Bereiche vor den Genen crtB und crtP auf eine lichtregulierte Promotoraktivität hin zu untersuchen, wurden die putativen Promotorbereiche der beiden Gene mittels Overlap Extension PCR mit einem Reporter-Gen fusioniert. Die Konstrukte wurden anschließend in einen geeigneten Integrationsvektor kloniert und in das Genom von *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 integriert.

Als Reporter-Gen diente das Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT-Gen), dessen Genprodukt, die Chloramphenicol Acetyltransferase, dem Organismus eine Resistenz gegen Chloramphenicol verleiht. Die CAT-Aktivität kann in einem sehr sensitiven Test bestimmt werden. Die zur Amplifizierung des CAT-Gens für die Promotoruntersuchungen eingesetzten Primer wurden so kreiert, dass das CAT-Gen ohne den geneigenen Promotor amplifiziert wurde.

Mit dem promotorlosen CAT-Gen (665 bp) wurde ein 177 bp großes, stromaufwärts von crtP gelegenes DNA-Fragment (-177 bis 0 bp) bzw. ein 273 bp großes (-270 bis 3 bp), stromaufwärts von crtB gelegenes DNA-Fragment fusioniert. Beide DNA-Bereiche enthalten

die oben beschriebenen Sequenzhomologien zu lichtregulierten, cyanobakteriellen Promotoren und im Falle des DNA-Bereichs vor crtP die homologen Regionen zur -10 und -35 Region von *E. coli* Standardpromotoren.

Es wurde ebenfalls ein Konstrukt mit dem CAT-Gen mit einem konstitutiv exprimiertem Promotor hergestellt. Dieses Konstrukt diente als Kontrolle, ob ein starker Promotor zu einer nachweisbaren Expression des Reportergens in *Synechococcus* führt. Als Negativkontrolle diente ein Konstrukt das nur das promotorlose CAT-Gen beinhaltete. Die Promotor-CAT-Gen Konstrukte sind in *Abbildung III-23* schematisch dargestellt.



*Abbildung III-23 Promotor-Reportergen-Konstrukte zur Klonierung in den Integrationsvektor pK18. promcrtB: Promotorbereich von crtB, promcrtP: Promotorbereich vor crtP, CM<sub>4</sub>: konstitutiver starker Promotor.*

Zur Integration der Promotor-Cat-Genkonstrukte in *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 wurde ein spezieller Vektor (pk18) konstruiert (*Abbildung III-24*).

Der Vektor pK18 ist ein Abkömmling des pUC18 Vektors, dem durch partiellen *EcoRI/PvuII* Verdau und anschließender Religation der LacZ-Promotor entfernt wurde. In pUC18  $\Delta P_{lacZ}$  wurde, als zusätzlicher Resistenzmarker neben der Ampicillinresistenz, für die Transformation von *Synechococcus* PCC 7942 das Kanamycin Resistenzgen (*nptII*) aus dem Phagen Tn5 eingefügt. Es resultierte ein Vektor, pK18, der für die Integration von DNA in die Integrationsplattform von *Synechococcus* PCC 7942PIM8 geeignet ist, und dessen multiple Klonierungsstelle (MCS) nicht von einem vektoreigenen Promotor abgelesen wird.

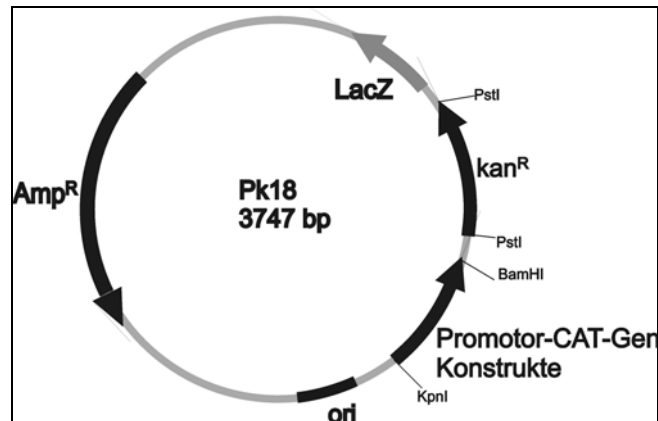


Abbildung III-24 Vektor *pk18* zur Integration von Promotor-CAT-Genkonstrukten in das Genom von *Synechococcus* PCC 7942 PIM8.

Die mittels Extension Overlap PCR hergestellten Fusionsprodukte *p crtB-CAT* (936 bp) und *p crtP-CAT* (825 bp) wurden in den Vektor *pMON<sub>T</sub>* kloniert und anschließend zur Vermehrung in *E. coli* XL1 blue transformiert. Positive Klone wurden durch eine Kontroll-PCR ermittelt und die richtige Orientierung des DNA-Fragments durch einen Restriktionsverdau überprüft.

Das *p crtB-CAT* Fragment wurde aus *pMON<sub>T</sub>* *BamHI/KpnI* herausgeschnitten und in den ebenfalls *BamHI/KpnI* geschnittenen Integrationsvektor *pk18* umkloniert. Das *p crtP-CAT* Fragment wurde ebenfalls *BamHI/KpnI* in den ebenso geschnittenen Integrationsvektor *pK18* kloniert. Positive Klone wurden selektiert und die Korrektheit der beiden Fusionskonstrukte durch Sequenzierung überprüft. Die daraus resultierenden Integrations-Konstrukte *pk18p crtB* (4688 bp) und *pK18p crtP* (4577 bp) wurden in *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 transformiert und auf kanamycin- und ampicillinhaltigen BG11-Agarplatten ausplattiert. Die auf diesen Platten gewachsenen Klone wurden mittels Kontroll-PCR auf eine erfolgreiche Integration des *p crtB-CAT*- bzw. des *p crtP-CAT*-Konstruktes in das Genom von *Synechococcus* PCC 7942 untersucht. Es konnten Transformanten, die das *p crtB-CAT* Konstrukt und Transformanten, die das *p crtP-CAT* Konstrukt erfolgreich in das Genom integriert hatten, nachgewiesen werden. Für die anschließenden Versuche wurden die Transformanten verwendet, die in Flüssigkultur in Gegenwart von 20 µg/ml Chloramphenicol unter Starklichtbedingungen das beste Wachstum zeigten.

Die Transformante *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 *pK18p crtB* wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Die anderen Transformanten, *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 *pK18p crtP*, *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 *pK18CM<sub>4</sub>* und *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 *pK18ΔP*

wurden von Dr. Manuela Sandmann analog angefertigt und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

### 2.2.3 Messung der Reportergenaktivität der Promotor-Reportergen-Konstrukte

Die Ergebnisse der CAT-Gen-Aktivitätsmessungen der einzelnen Transformanten nach unterschiedlich langen Inkubationen im Schwach- bzw. Starklicht, sind in *Abbildung III-25* dargestellt. In der Transformante mit dem putativen crtB-Promotor-CAT-Gen Konstrukt ist zu allen Messzeitpunkten eine schwache CAT-Aktivität messbar. Die Aktivität beträgt ca.  $0,01 \mu\text{mol s}^{-1}$ . Es sind keine signifikanten Unterschiede in der CAT-Aktivität der Schwachlicht- und Starklichtproben feststellbar. Der DNA-Bereich von -270 bis -3 bp vor dem crtB-Gen besitzt eine schwache Promotoraktivität, die nicht von den Lichtbedingungen abhängt.

In der Transformante mit dem putativen Promotorbereich vor crtP (-177 bis 0 bp) ist im Gegensatz dazu eine deutliche Aktivitätssteigerung der CAT im Starklicht nachweisbar. Im Schwachlicht liegt die CAT-Aktivität des pcrtp-CAT Konstruktes zu allen Messzeitpunkten mit  $0,012 \mu\text{mol s}^{-1}$  etwa im Bereich der Aktivität des pcrtb-CAT Konstruktes. Im Starklicht steigt die CAT-Aktivität nach 15 min auf  $0,035 \mu\text{mol s}^{-1}$  an, erreicht nach 30 min mit  $0,074 \mu\text{mol s}^{-1}$  die höchste Aktivität und fällt nach 60 min bzw. 120 min wieder auf  $0,036 \mu\text{mol s}^{-1}$  ab. Nach 15 min bzw. 30 min ist die CAT-Aktivität nach Inkubation im Starklicht ca. 7 mal höher als nach Schwachlichtinkubation, nach 60 bzw. 120 min ist sie ca. 3 mal so hoch. Die CAT-Aktivität des pcrtp-cat Konstruktes erreicht nach 30 min fast den Wert der CAT-Aktivität der Transformante mit dem CM<sub>4</sub>-CAT Konstrukt ( $0,083 \mu\text{mol s}^{-1}$ ). Die CAT-Aktivität in der Transformante mit dem CM<sub>4</sub>-CAT Konstrukt beträgt bei allen Messzeitpunkten nach Schwach- oder Starklichtinkubation ca.  $0,086 \mu\text{mol s}^{-1}$ .



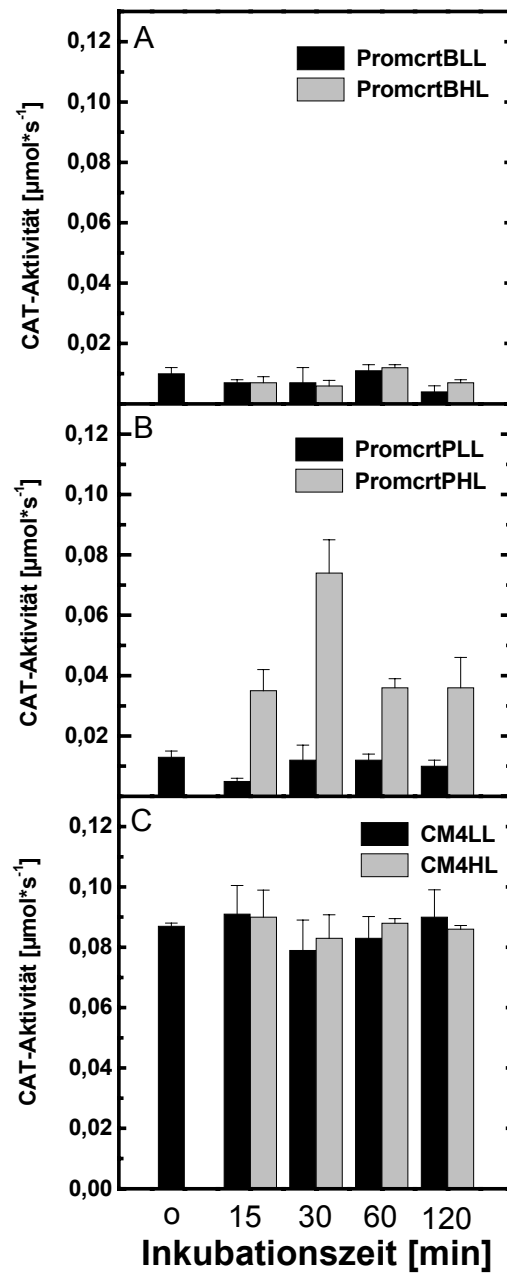


Abbildung III-25 CAT- Aktivität der Promotor-CAT-Gen Konstrukte nach Inkubation unter Schwach- bzw. Starklichtbedingungen zu verschiedenen Messzeitpunkten. Fusionskonstrukte des CAT-Gens mit dem zu untersuchendem Promotorbereich vor dem crtB-Gen (A); dem zu untersuchenden Promotorbereich vor dem crtP-Gen (B) und dem CAT-Gen mit einen konstitutiv stark exprimierten Promotor CM<sub>4</sub> (C). LL: Schwachlicht, HL: Starklicht; n = 3.

## **2.3 Quantifizierung der Transkriptmenge aller Carotinoidgene aus *Synechococcus* PCC 7942 nach Schwach- bzw. Starklichtinkubation**

Um zu untersuchen, welche Gene der Carotinoidbiosynthese in *Synechococcus* auf Ebene der Transkription lichtreguliert sind, wurden die unter Schwach- bzw. Starklichtbedingungen nach verschiedenen Zeitpunkten gebildeten Transkriptmengen quantifiziert. Mit diesem Versuche sollte außerdem überprüft werden, ob die erhöhte Aktivität des Promotors vor crtP im Starklicht nur zu einer Erhöhung der Transkriptmenge von crtP oder zu einer Erhöhung der Transkriptmenge von crtP und crtB führt.

Da Carotinoidgene nur sehr schwach exprimiert werden, wurde als Quantifizierungsmethode die Real Time PCR verwendet (Buston, 2000). Die Real Time PCR gilt als die sensitivste Methode zur Quantifizierung des DNA- oder RNA-Gehalts einer Probe. Man benötigt für die Quantifizierung genspezifische Primer und eine genspezifische Sonde.

Zur Konstruktion von genspezifischen Primern und genspezifischen Sonden muss die Sequenz des betreffenden Gens bzw. ein Teil der Sequenz bekannt sein. In *Synechococcus* waren zum Zeitpunkt dieser Arbeit die Sequenzen von crtB (Chamovitz *et al.*, 1992), crtP (Chamovitz *et al.*, 1991), crtH und crtL (Cunningham *et al.*, 1994) bekannt. Da die cyanobakteriellen Gene der 16sRNA sehr konserviert sind (97% Identität auf Nukleotidebene), wurden die Primer und Sonden gegen die bekannte Sequenz der 16sRNA aus *Synechococcus* PCC 7920 kreiert (Robertson *et al.*, 2001).

Für die Herstellung von genspezifischen Primern und Sonden sollten DNA-Fragmente von crtQb und crtR aus *Synechococcus* PCC 7942 amplifiziert werden.

Beim so genannten „fischen“ von Genen vergleicht man die DNA- oder die Proteinsequenz von bekannten Genen aus nahe verwandten Organismen miteinander, um homologe Bereiche zu suchen. Gegen diese homologen Bereiche wurden PCR-Primer kreiert. Mit diesen Primern und der genomischen DNA des Organismus mit der unbekannten Gen-Sequenz als Templat, soll ein Fragment des unbekannten Gens in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden.

### **2.3.1 Amplifizieren eines DNA-Fragments von crtQb aus *Synechococcus* PCC 7942**

Die DNA- und die Proteinsequenz der  $\zeta$ -Carotin Desaturase (ZDS) aus den Cyanobakterien *Synechocystis* PCC 6803 und *Anabaena* PCC 7120 (Mann *et al.*, 1994; Kaneko & Tabata, 1997) sind bekannt. Ein Nucleinsäuren-Alignment ergab keine ausreichende Übereinstimmung um geeignete PCR-Primer zum Fischen eines Fragments der  $\zeta$ -Carotin

Desaturase aus *Synechococcus* zu kreieren. Ein Aminosäuren-Alignment der beiden ZDS-Proteine ergab eine Identität von 64 % mit mehreren konservierten Bereichen von bis zu acht identischen Aminosäuren hintereinander.

Die degenerierten Primer zur Amplifizierung eines Fragments der  $\zeta$ -Carotin Desaturase aus *Synechococcus* PCC 7942 wurden komplementär zu zwei solchen homologen Bereichen entworfen (*Abbildung III-26*). Wenn mehr als ein Codon für eine Aminosäure codiert, wurde die Basenfolge, die in *Synechococcus* PCC 7942 am häufigsten vorkommt verwendet (codon usage Tabelle; Cyanobase <http://www.kazusa.or.jp>, (Nakamura *et al.*, 1998).

<b>A: Aminosäuren 43-51</b>		
	<i>Anabaena</i> PCC 7120	<b>WIDGDGNH</b>
	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	<b>WVDGDGNH</b>
<b>B: Aminosäuren 448-456 bzw. 452-460</b>		
	<i>Anabaena</i> PCC 7120	<b>YTQQDYID</b>
	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	<b>YTQQDYID</b>

*Abbildung III-26 Identische Aminosäurebereiche von crtQb aus Synechocystis PCC 6803 und Anabaena PCC 7120, die als Vorlage zum Entwerfen der degenerierten PCR-Primer zum Amplifizieren eines Fragments von crtQb aus Synechococcus PCC 7942 dienten. A: Vorlage für Primer1 Aminosäuren 43-51, B: Vorlage für Primer2 Aminosäuren 448-456 bei Anabaena PCC 7120 und Aminosäuren 452-460 bei Synechocystis PCC 6803. Identische Aminosäuren sind fett hervorgehoben. AS: Aminosäuren*

In einer PCR-Reaktion mit den degenerierten Primern und genomischer DNA von *Synechococcus* als Templat, konnte ein DNA-Fragment mit der erwarteten Größe von ca. 1239 bp amplifiziert werden. Das DNA-Fragment wurde in den Vektor pMON<sub>T</sub> kloniert und in *E. coli* XL1 blue MRF1 transformiert. Die isolierte DNA eines positiven Klon wurde zum Sequenzieren geschickt.

In der Sequenzierungsreaktion wurden 503 der ca. 1239 bp identifiziert. Die Basenpaarfolge dieses DNA-Fragments ist in (*Abbildung III-27*) dargestellt.

```

CTGTTGGCAGGCTCTCCGCTGCACGTCTTCTTCTTCAACTACGCCAACCTCTTCGCCCTGATGCGCA
AAGTGGGGGCCTTCGAGAATCTACTGCCAAAAGCCCATACCCACACCTTCATCAACAAAGGCGGC
GAAGTCGGTGAGCTGGATTTCCGCTTCCCGATCGGCGCTCCTTTCAATGGCCTCAAGGCCTTCTTCA
CCACCAGCCAACTGACCTGGCTGGACAAGCTGCAAAAACGCACTGGCACTGGGCACTAGCCCCCTCG
TGCGCGGCATCCTTGACTACGAAGGGGCGATGAAAATCATCCGTGCCCTTGATCGGATCAGCTTTG
CCGATTGGTTCCGCAGTCACGGCGGCAGCGAAGGCAGCCTCAAACGGATGTGGAACCCGATCGCC
TATGCCCTAGGCTTCATCGATACCGAGAACATTTCAgCGCGCTGCATGCTGACGGTCTTcCAgATGTT
CGCCGCAAAGACTGAAgCCTCgAAACTGAATCTGTTGGC

```

Abbildung III-27 DNA-Sequenz 1 bis 503 bp des 1239 bp großen Fragments, das mit degenerierten Primern gegen homologe Bereiche cyanobakterieller  $\zeta$ -Carotin Desaturasen von der genomischen DNA aus *Synechococcus* amplifiziert wurde.

Eine Sequenzanalyse mit BLAST (Nucleotid zu Protein, Altschul et al., 1997) ergab eine sehr hohe Identität ( $E\text{-Wert} = e^{-108}$ ) mit der  $\zeta$ -Carotin Desaturase aus *Synechococcus leopolinensis* und weiteren  $\zeta$ -Carotin Desaturasen aus Cyanobakterien. Es handelt sich bei dem amplifizierten DNA-Fragment um ein Fragment des crtQb-Gens aus *Synechococcus* PCC 7942.

Tabelle III-11 Ergebnisse des blastX-Alignments (Nukleotid zu Protein) der obigen DNA-Sequenz. Treffer 1-5.  $E\text{-Wert} = 0$  entspricht einer 100 %igen Identität der verglichenen Proteine.

Organismus	Protein	E-Wert
<i>Synechococcus leopolinensis</i>	$\zeta$ -Carotin Desaturase	$e^{-108}$
<i>Synechococcus</i> WH8102	hypothetisches Protein	$2e^{-87}$
<i>Thermococcus elongatus</i>	$\zeta$ -Carotin Desaturase	$e^{-86}$
<i>Prochlorococcus marinus</i> MED4	hypothetisches Protein	$8e^{-85}$
<i>Nostoc</i> PCC 7120	$\zeta$ -Carotin Desaturase	$2e^{-82}$

### 2.3.2 Amplifizieren eines DNA-Fragments von crtZ aus *Synechococcus* PCC 7942

Zum Fischen von crtZ aus *Synechococcus* PCC 7942 wurden die Nucleotidsequenzen von drei cyanobakteriellen crtZ-Genen verglichen. Die drei Nucleotidsequenzen wiesen ausreichend viele homologe Bereiche auf, um Primer direkt gegen die homologen DNA-

Bereiche zu kreieren. Die homologen DNA-Bereiche und die daraus abgeleiteten Primer sind in *Abbildung III-28* dargestellt.

<b>A:</b>	
<i>Synechocystis</i> PCC 6301	<b>ACAT</b> <u>CACGCC</u> <b>CACGTCAACGATC</b>
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	<b>ACACCACGCCAACGTCAATGACC</b>
<i>Synechococcus</i> WH 8102	<b>ACAT</b> <u>CACGCC</u> <b>CATGTGAATGATC</b>
Primer crtZstart	<b>ACAT</b> <u>CACGCC</u> <b>CATGTGAATGATC</b>
<b>B:</b>	
<i>Synechocystis</i> PCC 6301	<b>ACT</b> <u>TACCTAGTCCACT</u> <b>TATCAAGAC</b>
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	<b>ACCACCTAGTCCACCATTAAAC</b>
<i>Synechococcus</i> WH 8102	<b>ACT</b> <u>ACTTGGTCCACT</u> <b>TATCAAGAC</b>
Primer crtZend	<b>TGATGAAC</b> <u>CAGGTGATAGTTCTG</u>

*Abbildung III-28* Homologe DNA-Bereiche aus drei cyanobakteriellen crtZ-Genen gegen welche die Primer zur Amplifizierung von crtZ aus *Synechococcus* PCC 7942 konstruiert wurden. **A:** Vorlage für crtZ Startprimer; **B:** Vorlage für crtZ Endprimer. In allen Sequenzen identische Nukleotide sind fett dargestellt, teilweise homologe Nukleotide sind grau unterlegt.

In einer PCR-Reaktion mit genomischer DNA aus *Synechococcus* PCC 7942 konnte das erwartete 375 bp große DNA-Fragment amplifiziert werden. Eine Sequenzierung des DNA-Fragments nach erfolgreicher Klonierung in pMON<sub>T</sub> ergab folgende DNA-Sequenz (*Abbildung III-29*).

```
CCAAGAACGATCCCGACCACATCGTTTCCACCTTTGGGCCGCTGTGGTTGATCGCACCGCGC
TTCTTCTATCACGAGATCTATTTCTTCCAGCGCCGCTTTGGAAGAAATTTGAATTACTCGA
ATGGTTCCTCAGTCGCGCTGTGGTCATCGGCATCTcTGCCTGCGGCGTCAAGTTTGGCTTCC
TGGGCTTCCTGATGAACTACTGGCTGGCTCCAGCCTTGGTCGTTGGCATTGCCCTAGGACTC
TTCTTCGACTATTTACCCACCGCCCCCTTCCAAGAGCGCAACCGCTGGCGCAATGCACGGGT
CTATCCCGGTGAGGTGATGAACATCCTGATCATGGGT
```

*Abbildung III-29* DNA-Sequenz des 375 bp großen Fragments, das mit Primern gegen homologe Bereiche von crtZ und genomischer DNA aus *Synechococcus* PCC 7942 amplifiziert wurde.

Eine Sequenzanalyse mit BLAST (Nucleotid zu Protein, Altschul et al., 1997 #136) ergab eine sehr hohe Identität (E-Wert =  $e^{-56}$ ) zur  $\beta$ -Carotin Hydroxylase aus *Synechocystis* PCC 6803 und gegen weitere cyanobakterielle hypothetische Proteine. Bei dem amplifizierten DNA-Fragment handelt es sich um ein Fragment der  $\beta$ -Carotin Hydroxylase aus *Synechococcus* PCC 7942.

Tabelle III-12 Ergebnisse des blastX-Alignments (Nukleotid zu Protein) des mit den Primern gegen homologe Regionen aus cyanobakteriellen crtZ-Genen amplifizierten DNA-Fragments aus *Synechococcus* PCC 7942. Treffer 1-4. E-Wert = 0 entspricht einer 100 %igen Identität der verglichenen Proteine.

Organismus	Protein	E-Value
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	$\beta$ -Carotin Hydroxylase	$e^{-56}$
<i>Nostoc</i> PCC 7120	hypothetisches Protein	$e^{-56}$
<i>Synechococcus</i> WH8102	hypothetisches Protein	$3e^{-55}$
<i>Nostoc punctiforme</i>	hypothetisches Protein	$6e^{-55}$

### 2.3.3 Messung der Transkriptänderungen der Carotinoidgene in *Synechococcus* PCC 7942 nach Inkubation im Starklicht

Nachdem die kompletten Gen-Sequenzen, oder Teile davon, aller crt-Genen aus *Synechococcus* PCC7942 bekannt waren, wurden genspezifische Primer und Sonden für die RT-Reaktion bzw. die Real Time PCR entworfen. *Synechococcus* wurde unter Schwach- bzw. Starklichtbedingungen inkubiert, zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und daraus RNA isoliert.

Das Verhältnis  $\lambda_{260}/\lambda_{280}$  der isolierten RNAs lag bei allen Proben zwischen 1,7 und 2. Die extrahierte RNA war hinreichend sauber um photometrisch die genaue Menge zu bestimmen. Für das Umschreiben der RNA in cDNA wurden pro Probe jeweils 5  $\mu$ g RNA eingesetzt. Diese wurden mit den genspezifischen Primern in cDNA umgeschrieben. Die gereinigte cDNA wurde als Templat in der Real Time PCR eingesetzt. Die erhaltenen Daten wurden auf die 16sRNA, die als interner Standard verwendet wurde, bezogen.

In Abbildung III-30 ist der Zuwachs bzw. die Abnahme der Transkriptmenge der einzelnen Carotinoidgene aus *Synechococcus* dargestellt. Eine Zunahme des Transkripts im Starklicht wurde bei den Genen crtB (Phytoen Synthase), crtP (Phytoen Desaturase), crtQb ( $\zeta$ -Carotin Desaturase) und crtR ( $\beta$ -Carotin Hydroxylase) gemessen. Bei crtH (Lycopin Isomerase) war fast keine Änderung, bei crtL (Lycopin Zyklase) eine Abnahme der Transkriptmenge feststellbar.

Die Transkriptmenge von crtB war zu allen Messzeitpunkten in den Starklichtproben größer als in den Schwachlichtproben. Der Zuwachs beträgt 10 % nach 15 min, 37 % nach 30 min,

68 % nach 60 min und 38 % nach 120 min Starklichtinkubation. Die Transkriptmenge von crtP steigt im Starklicht nach 60 min um 27 % bzw. nach 120 min um 42 % ebenfalls gegenüber der Transkriptmenge im Schwachlicht an. Die Transkriptmenge von crtQb steigt nach 60 min Starklichtinkubation drastisch um 171 % gegenüber der Schwachlichtprobe an.

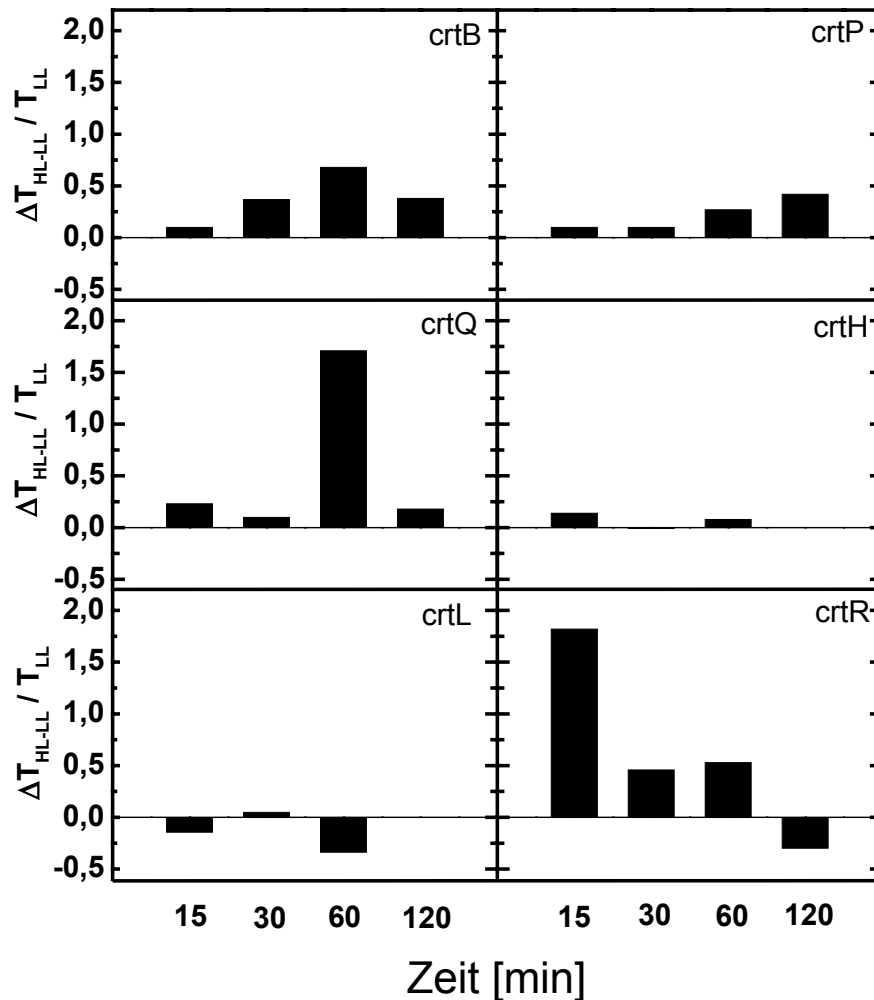


Abbildung III-30 Änderung der Transkriptmenge von crt-Genen in *Synechococcus* PCC 7942 nach Inkubation unter Schwach- bzw. Starklichtbedingungen. Aufgetragen ist der Zuwachs bzw. die Abnahme der Transkriptmenge im Starklicht im Vergleich zu der Transkriptmenge im Schwachlicht.  $n = 2$ .

Die Transkriptmenge von crtR ist bereits nach 15 min Starklichtinkubation um 120 % höher als die Transkriptmenge nach 15 min Schwachlichtinkubation. Nach 30 min und 60 min sinkt die Transkriptmenge in den Starklichtproben etwas ab, ist aber noch um 51 bzw. 45 % höher als in den Schwachlichtproben. Nach 120 min Starklichtinkubation ist die Transkriptmenge im Starklicht etwa so hoch wie die im Schwachlicht.

## 2.4 Umwandlung von $\beta$ -Carotin zu Zeaxanthin in *Synechococcus* PCC 7942 nach kurzer Inkubationszeit im Starklicht

Durch einstündige Inkubation von *Synechococcus* PCC 7942 sollte gezeigt werden, ob der bereits nach 15 min messbare Anstieg der Transkriptmenge von crtR mit einer schnellen Umwandlung von  $\beta$ -Carotin zu Zeaxanthin korreliert. Dazu wurde der Zeaxanthingehalt von Carotinoidextrakten aus *Synechococcus* PCC 7942 nach einstündiger Schwach- bzw. Starklichtinkubation gemessen. Die in diesem Versuch eingesetzten Kulturen wurden für zwei Tage bei einer Lichtintensität von  $15 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  vorinkubiert, um den Zeaxanthingehalt zu Versuchsbeginn zu senken.

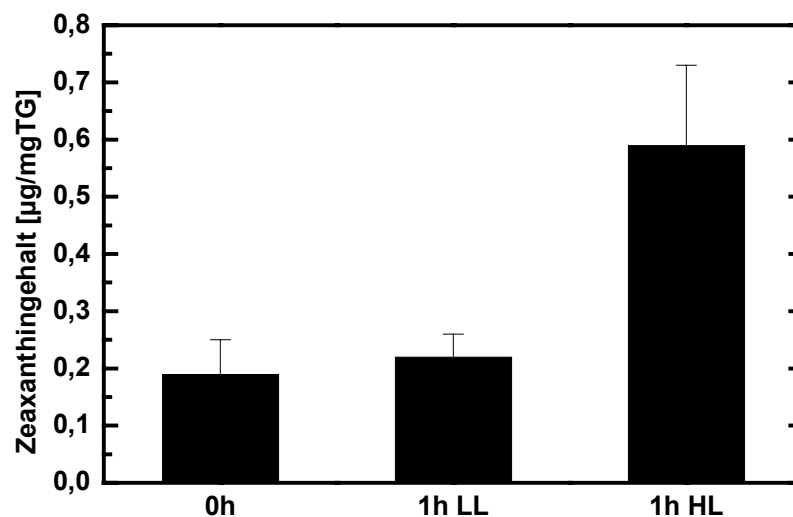


Abbildung III-31 Zeaxanthingehalt von *Synechococcus* PCC 7942 nach 1h Inkubation im Schwach bzw. Starklicht.  $n = 4$ .

Die Analyse der Carotinoidextrakte zeigte, dass bereits nach 1h Inkubation im Starklicht der Zeaxanthingehalt deutlich zunahm (Abbildung III-31). Er war mit  $0,6 \mu\text{g/mgTG}$  drei mal so hoch wie nach Inkubation im Schwachlicht. Im Gegensatz dazu wurde ein Anstieg der Phytoenmenge im Starklicht um ca.  $0,6 \mu\text{g/mgTG}$  erst nach 4-5 h erreicht (Abbildung III-18). Der Gesamtcarotinoidgehalt war nach Schwach- bzw. Starklichtbehandlung mit ca.  $3 \mu\text{g/mgTG}$  unverändert.



## 2.5 Untersuchungen der Regulationsmechanismen der Carotinoidbiosynthese in *Synechococcus* PCC 7942

Die Carotinoidbiosynthese in *Synechococcus* PCC 7942 ist unter Starklichtbedingungen hochreguliert. Der Reiz, der diese Hochregulation bewirkt, könnte die über einen Photorezeptor aufgenommene Lichtmenge oder Veränderungen des Redoxzustandes der Zelle bzw. bestimmter Komponenten des photosynthetischen Elektronentransports bei erhöhter Belichtung sein. Es konnte gezeigt werden, dass in Pflanzen und Cyanobakterien einige Gene die für photosynthetische Proteine codieren, redox-reguliert sind (Allen *et al.*, 1995; Alfonso *et al.*, 1999; Sippola & Aro, 1999; Li & Sherman, 2000; Sippola & Aro, 2000).

Um zu untersuchen welches, der auslösende Reiz für die Steigerung der Carotinoidbiosynthese unter Starklichtbedingungen ist, wurde *Synechococcus* PCC 7942 in Gegenwart von Norflurazon und Substanzen, die den Redoxzustand des Plastochinonpools (DCMU und DBMIB) oder des Thioredoxinsystems (DTT<sub>red</sub>, Jodobenzoesäure) modulieren, inkubiert. DCMU blockiert die Bindungstasche von QB und verhindert somit eine Reduktion des Plastochinonpools (Escoubas *et al.*, 1995; Krieger-Liszkay & Rutherford, 1998; Vener *et al.*, 1998). DBMIB hemmt die Elektronentransportkette zwischen dem Plastochinonpool und dem Cytochrom<sub>b6f</sub>-Komplex. Dies verhindert die Rückoxidation von QA und der Plastochinonpool wird schon bei geringen Lichtintensitäten reduziert (Escoubas *et al.*, 1995; Vener *et al.*, 1998). Jodobenzoesäure (IBA) oxidiert Thioldisulfid-Gruppen und DTT<sub>red</sub> ist in der Lage Thiolgruppen zu reduzieren. Dadurch lässt sich der Redoxzustand von Thioldisulfid-Gruppen in der Zelle modulieren (Li & Sherman, 2000; Sippola & Aro, 2000; Herranen *et al.*, 2001). Durch Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde überprüft, ob eine erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration der Zelle als auslösender Reiz zur Erhöhung der Carotinoidbiosynthese dient. Als Maß für die Carotinoidneusynthese wurde die in den Proben akkumulierende Phytoenmenge gemessen.

Die *Synechococcus* PCC 7942 Proben, die mit 7,5 µM NFZ 6h im Schwach- bzw. Starklicht inkubiert wurden, dienten als Schwach- bzw. Starklichtkontrolle (*Abbildung III-32*). In der Schwachlichtkontrolle wurden 0,34 µg/mgTG Phytoen gebildet, in der Starklichtkontrolle mit 0,64 µg/mgTG etwa doppelt so viel. Während sich die akkumulierende Phytoenmenge in den Proben mit 7,5 µM Norflurazon + 1mM DTT bzw. 5 µM Norflurazon + 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach 6h Inkubation im Schwachlicht nicht signifikant änderte, ging die Phytoenbildung in den Proben mit 7,5 µM NFZ + 3 µM DBMIB bzw. 1 µM DCMU bzw. 1 mM IBA deutlich

zurück. In Gegenwart von 3  $\mu\text{M}$  DBMIB nahm der Phytoengehalt im Vergleich zur Schwachlichtkontrolle ab um ca. 45 % auf 0,19  $\mu\text{g}/\text{mgTG}$  ab.

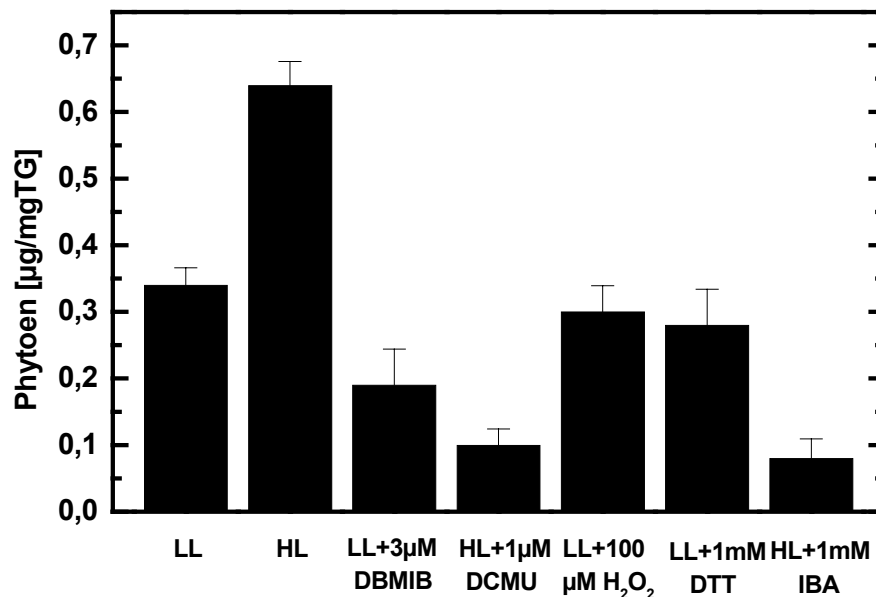


Abbildung III-32 Gebildete Phytoenmenge in *Synechococcus* PCC 7942 in Gegenwart von redoxmodulierenden Substanzen und 7,5  $\mu\text{M}$  Norflurazon nach 6h Inkubation unter Schwach- bzw. Starklichtbedingungen.  $n = 3$ .

In den mit 1  $\mu\text{M}$  DCMU bzw. 1 mM IBA behandelten Proben wurde die im Starklicht beobachtete Erhöhung des Phytoengehalts mehr als aufgehoben. In diesen Proben wurde mit 0,1  $\mu\text{g}/\text{mgTG}$  nur noch ein Viertel der Phytoenmenge im Vergleich zur Schwachlichtkontrolle gebildet. Die parallel gemessene Photosystem II-Aktivität war in den Proben mit 1  $\mu\text{M}$  DCMU bzw. 3  $\mu\text{M}$  DBMIB um ca. 50-60 % verringert (Daten nicht gezeigt).

## IV DISKUSSION

Carotinoide sind im Bakterien-, Pilz- und Pflanzenreich weit verbreitete Pigmente (Sandmann, 1994a). In verschiedenen Spezies sind unterschiedliche Carotinoide zu finden. Vor allem in photosynthetisch aktiven Zellen spielen Carotinoide als Bestandteil des Schutzsystems des Photosyntheseapparates vor überschüssiger Lichteinstrahlung eine wichtige Rolle. Cyanobakterien betreiben mit einem sehr ähnlichen Mechanismus wie höhere Pflanzen oxygene Photosynthese und benötigen, wie diese, Carotinoide als Lichtschutzpigmente. Cyanobakterien sind als prokaryotischer Organismus sehr gut gentechnisch manipulierbar, das heißt Stoffwechselwege können schnell und einfach modifiziert werden. Deshalb eignen sich Cyanobakterien bestens, die Funktion einzelner Carotinoide als Lichtschutzkomponenten zu untersuchen.

Eine Strategie, die in dieser Arbeit verfolgt wurde, ist das Einbringen von Carotinoidgenen in *Synechococcus* PCC 7942, um in diesen Transformanten Carotinoide, die sich strukturell von den im Wildtyp vorkommenden unterscheiden, zu synthetisieren. Ein derart modifiziertes Cyanobakterium eignet sich sehr gut, um die Auswirkungen von bestimmten Carotinoiden mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen auf die Photosyntheseleistung und den Schutz des Photosyntheseapparates vor Starklichtschädigung *in vivo* zu untersuchen.

Frühere Untersuchungen zeigten, dass ein erhöhter Zeaxanthingehalt in *Synechococcus* PCC 7942 sowie in *Nicotiana tabacum* durch die zusätzliche Expression des  $\beta$ -Carotin Hydroxylase-Gens aus *Erwinia uredovora*, zu einem erhöhten Schutz des Photosyntheseapparates vor UV-B-Strahlung führt (Götz *et al.*, 1999; Götz *et al.*, 2002). Einen noch stärkeren Schutz des Photosyntheseapparates vor Starklicht- bzw. UV-B-Schädigung konnte in einer *Synechococcus* Transformante, die zusätzlich das sonst nicht in diesem Stamm vorkommende Diketocarotinoid Canthaxanthin synthetisieren kann, festgestellt werden (Albrecht *et al.*, 2001).

Um den Einfluss von weiteren Carotinoiden, die natürlicherweise nicht in *Synechococcus* vorkommen, zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit das für die Zeaxanthin Epoxidase (ZE) kodierende Gen (*zep*) aus *Gentiana lutea* (Zhu *et al.*, 2003) in das Genom von *Synechococcus* PCC 7942 integriert. Es wurde eine *Synechococcus* Transformante (*Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3ZE) hergestellt, in der zum erstenmal in einem Cyanobakterium, die beiden am pflanzlichen Xanthophyllzyklus beteiligten Epoxide Antheraxanthin und Violaxanthin, synthetisiert wurden (Abbildung III-5). Aufgrund der Umwandlung von Zeaxanthin in die

beiden Epoxide hat die Transformante einen deutlich geringeren Zeaxanthingehalt als *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3, der Gesamtcarotinoidgehalt unterscheidet sich hingegen nicht signifikant (*Tabelle III-6*).

Mit den beiden letztgenannten Transformanten und *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3crtZ (Götz *et al.*, 1999) konnten die Auswirkungen von unterschiedlichen Zeaxanthingehalten und die Präsenz der Carotinoidepoxide Violaxanthin und Antheraxanthin auf die Photosyntheseleistung bzw. den Schutz vor Schädigungen des Photosyntheseapparates vor Starklichtschädigungen vergleichend untersucht werden.

Nach Anzucht bei schwacher Lichtintensität zeigten die Messungen der Sauerstoffentwicklung und der Chlorophyll a-Fluoreszenz, dass der geringere Zeaxanthingehalt bzw. die Akkumulation von Antheraxanthin und Violaxanthin in der Transformante PIM8pFP1-3ZE keine Auswirkungen auf die Effizienz der Photosynthese oder die Photosyntheseleistung hat. Auch der höhere Zeaxanthingehalt in *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3crtZ führt diesbezüglich zu keinen Änderungen (*Abbildung III-6*).

Dass ein erhöhter Zeaxanthingehalt in Pflanzen zu einer Abnahme der photosynthetischen Effizienz unter limitierenden Lichtbedingungen führen kann, konnten Niyogi *et al.* (1998) an einer konstitutiv Zeaxanthin akkumulierenden *Arabidopsis* Mutante zeigen. In Pflanzen gilt die Dissipation von überschüssiger Anregungsenergie als wichtiger Mechanismus zur Regulation des photosynthetischen Elektronentransports und der Vermeidung von photooxidativen Schäden (Niyogi *et al.*, 1998). Die Bildung des Protonengradienten ( $\Delta pH$ ) über die Thylakoidmembran löst die ungefährliche Dissipation von überschüssiger Anregungsenergie in Form von Wärme (nicht photochemisches Quenchen, NPQ) in den Antennenkomplexen aus (Demming-Adams & Adams, 1992b; Horton, 1996; Gilmore, 1997). Das Ausmaß des NPQ in Pflanzen korreliert stark mit den Zeaxanthin- und Antheraxanthinmengen, die im Xanthophyllzyklus bei steigender Belichtung aus Violaxanthin gebildet werden. Ein möglicher Nachteil eines hohen Zeaxanthingehalts unter limitierenden Lichtbedingungen könnte in Pflanzen eine erhöhte Dissipation von Anregungsenergie, verursacht durch eine langsamere Abnahme des NPQ nach einer Phase mit überschüssiger Lichteinstrahlung, sein (Niyogi *et al.*, 1998).

Cyanobakterien fehlt ein solcher mit den Antennen assoziierter Mechanismus zur Ableitung von überschüssiger Anregungsenergie als Wärme, da sie anstelle von chlorophyllhaltigen äußeren Antennen Phycobilisomen besitzen. Der Zeaxanthingehalt scheint keinen Einfluss auf

die Effizienz der Photosynthese und die maximale Photosynthesekapazität bei limitierenden Lichtbedingungen zu haben.

Hingegen ist in *Synechococcus* nach Inkubation im Starklicht ( $300\text{--}350\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) eine Korrelation zwischen dem Zeaxanthingehalt der Transformanten und ihrem Schutz vor Schädigungen des Photosyntheseapparates zu beobachten. Mit abnehmendem Zeaxanthingehalt der Transformanten (*Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3crtZ > *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3 > *Synechococcus* PCC 7942 PIM8pFP1-3ZE) nimmt die maximale Photosynthesekapazität der gesamten Elektronentransportkette nach Inkubation im Starklicht ab. Nur die PIM8pFP1-3crtZ-Transformante mit einem gegenüber dem Kontrollstamm erhöhten Zeaxanthingehalt ist vor einem Rückgang der Photosynthesekapazität nach Starklichtbehandlung vollständig geschützt (*Abbildung III-7*).

Auch der Rückgang der maximalen Photosynthesekapazität von Photosystem II (PSII), die als Abnahme der Sauerstoffproduktion von Photosystem II bzw. des  $F_v/F_m$ -Verhältnisses gemessen wurde, ist in der pFP1-3ZE-Transformante stärker ausgeprägt als in den Transformanten mit einem höheren Zeaxanthingehalt (*Abbildung III-8 und Abbildung III-9*). Der Rückgang der maximalen Sauerstoffentwicklung von PSII kann durch Photoinhibition von PSII Reaktionszentren sowie der Umverteilung von Anregungsenergie von PSII zu PSI zustande kommen. Der Rückgang des  $F_v/F_m$ -Verhältnisses ist ein Maß für die Photoinhibition von PSII (Björkmann & Demming, 1987; Campbell *et al.*, 1998).

In *Synechococcus* PCC 7942PIM8pF1-3ZE führten die neusynthetisierten Carotinoidepoxide Antheraxanthin und Violaxanthin zu keinem verbesserten Schutz vor Photoinhibition nach Inkubation im Starklicht. Es konnte im Gegenteil eine erhöhte Sensitivität gegenüber Starklicht nachgewiesen werden, die höchstwahrscheinlich auf den geringeren Zeaxanthingehalt dieser Transformante zurückzuführen ist.

Die Bedeutung von Zeaxanthin als Schutzpigment der Photosynthese vor überschüssiger Anregungsenergie wurde durch Experimente mit *Synechocystis* PCC 6803-Deletionsmutanten (*Abbildung II-1 und Tabelle III-10*), die kein Echinenon ( $\Delta\text{crtO}$ ), kein Zeaxanthin und Myxoxanthophyll ( $\Delta\text{crtR}$ ) bzw. keins dieser drei Carotinoide synthetisieren konnten, noch weiter unterstützt. Die Ergebnisse zeigten, dass die maximale Sauerstoffentwicklung in den  $\beta$ -Carotin Hydroxylase-defizienten *Synechocystis*-Mutanten ( $\Delta\text{crtR}$  und  $\Delta\text{crtRO}$ ) nach Starklichtbehandlung stark herabgesetzt war, während im Wildtyp fast keine Abnahme der maximalen Photosyntheseleistung messbar war (*Abbildung III-14*). In der Echinenon-defizienten Mutante wurde ein schwacher Rückgang gemessen. Der Verlust von Carotinoiden in  $\Delta\text{crtRO}$  wirkte sich additiv auf den Rückgang der Sauerstoffentwicklung von *Synechocystis*

aus. Diese Versuche zeigten, dass die Empfindlichkeit des Photosyntheseapparates gegenüber Starklichtbedingungen durch Ausschalten von Carotinoidgenen und dem daraus resultierenden Verlust der korrespondierenden Carotinoide erhöht wurde. Während das Fehlen von Echinenon nur zu einer leichten Erhöhung der Empfindlichkeit führte, war in der Mutante ohne Zeaxanthin und Myxoxanthophyll ein massiver Verlust der photosynthetischen Aktivität nach Inkubation im Starklicht messbar.

Während die Sauerstoffentwicklung der gesamten Elektronentransportkette im Wildtyp und in  $\Delta crtO$  nach Starklichtbehandlung nur wenig zurückging, nahm die Sauerstoffentwicklung von PS II in diesen Proben um ca. die Hälfte, in den Zeaxanthin- und Myxoxanthophyll-defizienten Mutanten fast vollständig ab (*Abbildung III-15 und Abbildung III-16*). Im Wildtyp und in  $\Delta crtO$  lag sie aber noch höher als die Aktivität der gesamten Elektronentransportkette. In Cyanobakterien führt ein Verlust an PSII-Aktivität nicht zwangsläufig zu einer geringeren Photosyntheseleistung der gesamten Elektronentransportkette. Ein Rückgang der PSII Aktivität kommt sowohl durch Photoinhibition als auch durch Umverteilung von Anregungsenergie auf PSI zustande (Bruce & Biggins, 1985; Campbell, 1996). Nur in  $\Delta crtR$  und  $\Delta crtRO$ , den Mutanten, in denen die Photosystem II-Aktivität fast vollständig zurückging, konnte eine Abnahme der Photosynthesekapazität festgestellt werden. Dies bedeutet, dass der Rückgang der Photosyntheseleistung in diesen Transformanten durch Photoinhibition von PSII zu Stande kommt. Diese Ergebnisse konnten durch Messungen des  $F_V/F_M$ -Verhältnisses bestätigt werden. Die drastische Abnahme des  $F_V/F_M$ -Verhältnisses in  $\Delta crtR$  und  $\Delta crtRO$  nach Starklichtbehandlung zeigt, dass in diesen Mutanten ein großer Teil des Aktivitätsverlusts durch Photoinhibition von PSII verursacht wird (*Abbildung III-17*).

In *Synechocystis* und *Synechococcus* ist das Schutzsystem gegen Schädigungen des Photosyntheseapparates vor Starklicht äußerst effizient. Beide Organismen sind in der Lage, unter Lichtintensitäten, die das typische Anzuchtlicht um das mehrfache (ca. 25fach bei *Synechocystis* PCC 6803) übersteigen, den photosynthetischen Elektronentransport aufrecht zu erhalten.

Neben der sehr flexiblen Verteilung der Anregungsenergie zwischen Photosystem I und II, einem sehr effizienten D1-Reparatur-Zyklus (Campbell *et al.*, 1995) und der Modulation der PSII Aktivität durch den Einbau von D1-Isoformen (Schaefer & Golden, 1989; Clarke *et al.*, 1993b; Clarke *et al.*, 1993a; Öquist *et al.*, 1995), ist die Hochregulation der Carotinoidbiosynthese ein wichtiger Teil der Anpassungsstrategie an Starklichtbedingungen. Der wichtige Beitrag, den Carotinoide, insbesondere Zeaxanthin, in diesem Schutzsystem leisten, konnte mittels der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an

Transformanten mit geringerem Zeaxanthingehalt bzw. Zeaxanthin defizienten Mutanten, deutlich gezeigt werden.

Einen Hinweis, dass nicht nur Zeaxanthin, sondern auch Myxoxanthophyll, die Photoinhibition im Starklicht verhindert, gaben Untersuchungen an *Plectonema boryanum* UTEX 485. In diesem Cyanobakterium konnte eine verstärkte Akkumulation dieser beiden Carotinoide (besonders Myxoxanthophyll) als eine Reaktion auf eine Erhöhung der Lichtintensität bei niedrigen Temperaturen beobachtet werden (Miskiewicz *et al.*, 2000). Auch die Ergebnisse der *in vitro*-Experimente, in denen das antioxidative Schutzpotential der in *Synechocystis* PCC 6803 vorkommenden Carotinoide bestimmt wurde (Steiger *et al.*, 1999), sprechen dafür, dass sowohl das Fehlen von Zeaxanthin als auch das Fehlen von Myxoxanthophyll für die deutlich größere Empfindlichkeit gegenüber Starklichtschädigung verantwortlich sind. Ob Zeaxanthin oder Myxoxanthophyll einen größeren Anteil am Schutz vor Starklichtschädigung haben, lässt sich mit den *Synechocystis* Mutanten  $\Delta$ crtR und  $\Delta$ crtRO nicht zeigen. Um dies zu zeigen, müsste eine *Synechocystis*-Mutante, die aufgrund der Deletion eines anderen Gens des Myxoxanthophyllsynthesewegs nicht mehr in der Lage ist, Myxoxanthophyll zu bilden, Zeaxanthin jedoch weiterhin bilden kann, hergestellt werden. Da außer crtR kein weiteres Gen der Myxoxanthophyllsynthese bekannt ist, lässt sich diese Deletion bisher nicht durchführen. Vermutlich führte bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten der Verlust beider Carotinoide zu der beobachteten drastischen Abnahme der photosynthetischen Aktivität bei Starklichtstress.

Vergleicht man die Empfindlichkeit von *Synechococcus* PCC 7942 pFP1-3 mit *Synechocystis* PCC 6803 fällt auf, dass *Synechocystis* PCC 6803 wesentlich toleranter gegenüber hohen Lichtintensitäten ist. Während in *Synechococcus* PCC 7942 pFP1-3 die maximale Photosyntheseleistung nach fünfstündiger Inkubation bei einer Lichtintensität von  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  um 20 % zurückgeht, ist in *Synechocystis* 6803 nach gleicher Inkubationsdauer bei  $1200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  noch kein Verlust messbar. Beide Stämme haben mit 3,1- 3,2  $\mu\text{g/mgTG}$  den gleichen Carotinoidgehalt. Dieser setzt sich in *Synechococcus* PCC 7942 pFP1-3 aus 32,5 % Zeaxanthin, 3,2 %  $\beta$ -Cryptoxanthin und 64,1 %  $\beta$ -Carotin zusammen. In *Synechocystis* PCC 6803 akkumulieren dagegen 21 % Myxoxanthophyll, 28 % Zeaxanthin, 10 % Echinenon und nur 41,1 %  $\beta$ -Carotin. Das heißt, dass der Anteil an Carotinoiden, der sich nicht aus  $\beta$ -Carotin zusammensetzt, in *Synechocystis* mit ca. 59 % deutlich höher ist als in *Synechococcus* mit nur 36 %. Möglicherweise hängt der besonders gute Schutz vor hohen Lichtintensitäten in *Synechocystis* PCC 6803 mit dieser besonderen Carotinoidzusammensetzung zusammen.

Um zu untersuchen, ob die Schutzfunktion von Zeaxanthin bzw. Myxoxanthophyll auf einer Interaktion mit bestimmten ROS beruht, wurden die *Synechocystis*-Deletionsmutanten unter Starklichtbedingungen mit unterschiedlichen Radikalbildnern inkubiert. Durch Inkubation in Gegenwart von Methylenblau bzw. Methylviologen sollten verstärkt  $^1\text{O}_2$  (Fukuzawa *et al.*, 1997) bzw.  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{OH}^{\bullet}$  (Asada, 1994; Asada, 1996) in den Zellen generiert werden. Die Schädigungen der Zellen wurden anhand des oxidativen Abbaus der Carotinoide bzw. des Chlorophylls bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuche unterstreichen die wichtige Rolle von Zeaxanthin und Myxoxanthophyll als Antioxidantien in Cyanobakterien. In den Zeaxanthin- und Myxoxanthophyll-defizienten Mutanten war die Abnahme des Chlorophyll- bzw. Carotinoidgehalts sowohl in Gegenwart von Methylviologen als auch von Methylenblau deutlich größer als im Wildtyp oder  $\Delta\text{crtO}$  (Abbildung III-12 und Abbildung III-13). Das Fehlen von Zeaxanthin und Myxoxanthophyll scheint sich besonders negativ auf den Schutz vor  $^1\text{O}_2$  auszuwirken. In Gegenwart von Methylenblau war in  $\Delta\text{crtR}$  und  $\Delta\text{crtRO}$  die Abnahme des Chlorophyll- und Carotinoidgehalts stärker als in Gegenwart von Methylviologen. Diese Ergebnisse zeigen, dass Zeaxanthin und Myxoxanthophyll nicht bevorzugt gegen spezielle ROS wirken, sondern dass sie die Zelle sowohl vor  $^1\text{O}_2$  als auch vor den in der Mehler-Reaktion gebildeten ROS ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{OH}^{\bullet}$ ) schützen. Die besonders drastische Auswirkung, die das Fehlen von Zeaxanthin und Myxoxanthophyll auf Schädigungen vor  $^1\text{O}_2$  hat, könnte damit zusammenhängen, dass Carotinoide der einzige Schutz der Zelle gegen  $^1\text{O}_2$  sind. Gegen die in der Mehler-Reaktion gebildeten ROS existieren dagegen neben den Carotinoiden weitere antioxidativ wirksame Substanzen, die das Fehlen von Zeaxanthin und Myxoxanthophyll teilweise kompensieren könnten.

Die antioxidativen Eigenschaften von Carotinoiden hängen von der Struktur der Kohlenstoffkette, der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen sowie von der Struktur der funktionellen Gruppen ab. Die Fähigkeit, freie Radikale und vor allem  $^1\text{O}_2$  zu quenchen, steigt in *in vitro*-Systemen mit der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen (Hirayama *et al.*, 1994; Edge *et al.*, 1997; Woodall *et al.*, 1997; Steiger *et al.*, 1999; Albrecht *et al.*, 2000). Die Struktur der Endgruppen kann weitere Einflüsse auf die antioxidativen Eigenschaften und die Photostabilität des Carotinoids haben, vor allem bestimmt sie aber die Orientierung des Carotinoids in der Membran. Zyklische Carotinoide mit hydrophilen Gruppen an den terminalen Ringen (Zeaxanthin, Canthaxanthin) durchspannen die Membran und verankern sich mit den polaren Enden an den polaren Gruppen der Lipiddoppelschicht, während unpolare Carotinoide ( $\beta$ -Carotin) diffus in den unpolaren Bereichen der Membran verteilt sind (Havaux, 1998).



Die Untersuchungen an Cyanobakterien mit veränderter Carotinoidkomposition zeigten, dass besonders Carotinoide mit hydrophilen Gruppen an den terminalen Ringstrukturen wie z.B. Zeaxanthin, Myxoxanthophyll oder Canthaxanthin (Albrecht *et al.*, 1999) essentiell für den Schutz vor Schädigungen unter Bedingungen mit hohen Lichtintensitäten waren. Dagegen war das antioxidative Schutzpotential des unpolaren  $\beta$ -Carotins sowie des nur an einem Molekülende polaren Echinenons *in vivo* deutlich geringer. Das antioxidative Schutzpotential vor Starklichtschäden der Zelle scheint *in vivo* ab einem konjugierten Doppelbindungssystem  $n > 10$  deutlich stärker von den funktionellen Gruppen abzuhängen als von der Größe des konjugierten Systems. Die konjugierten Doppelbindungssysteme von Zeaxanthin und  $\beta$ -Carotin ( $n=11$ ) bzw. Myxoxanthophyll und Desoxy-Myxoxanthophyll ( $n=12$ ) sind identisch. Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Studien zeigen, dass das antioxidative Schutzpotential der hydroxylierten Carotinoide Zeaxanthin bzw. Myxoxanthophyll jedoch sehr viel höher ist als das des nicht hydroxylierten  $\beta$ -Carotins oder Desoxy-Myxoxanthophyll. Auch das antioxidative Schutzpotential von Canthaxanthin ( $n=11+2$ ) ist weitaus größer als das von Echinenon ( $n=11+1$ ), das nur an einem Molekülende eine hydrophile Ketogruppe trägt. Vergleicht man das Schutzpotential von Zeaxanthin und Echinenon, fällt auf, dass das an beiden Enden hydrophile Zeaxanthin das wesentlich bessere Schutzpigment *in vivo* ist, obwohl sich das konjugierte Doppelbindungssystem nur durch die zusätzliche Doppelbindung der Ketogruppe des Echinenon unterscheidet. Die Doppelbindungen der Ketogruppen bringen, aufgrund des elektronenziehenden Effektes der Sauerstoffgruppe, nicht in dem Maße wie Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen, Elektronen in das  $\pi$ -System ein.

Neben dem Entfernen von ROS könnte auch der stabilisierende Effekt von polaren Carotinoiden auf die Membran vor Starklichtschädigung des Photosyntheseapparates schützen. Eine in Gegenwart von z.B. Zeaxanthin rigidere Membran vermindert das Eindringen von  $O_2$  in die Membran (Subczynski *et al.*, 1991). Dadurch könnte die Bildung von  $^1O_2$  vermieden werden bzw. der Schutz vor Lipidperoxidation erhöht werden.

Es fällt auf, dass sowohl in Pflanzen als auch in Cyanobakterien der Zeaxanthingehalt unter Schwachlichtbedingungen niedrig ist. In Pflanzen scheint dies im Schwachlicht einen Verlust von Anregungsenergie durch NPQ vorzubeugen, um eine effiziente Photosynthese zu gewährleisten (Niyogi *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu scheint ein niedriger Zeaxanthingehalt in Cyanobakterien unter Schwachlichtbedingungen keinen positiven Effekt auf die Photosyntheseleistung zu haben. Hingegen sind Cyanobakterien-Transformanten mit einem niedrigen Zeaxanthingehalt deutlich schlechter vor Starklichtschädigungen des Photosyntheseapparates geschützt. Was könnten die Vorteile eines niedrigen

Zeaxanthingehalts in *Synechococcus* und *Synechocystis* sein? Beide Stämme leben in Gewässern, d.h. ihre natürliche Umgebungstemperatur liegt in der Regel zwischen 10°C und 20°C. Das ist viel niedriger als unter Laborbedingungen (30°C). Möglicherweise führt ein zu hoher Zeaxanthingehalt zu Nachteilen, die durch eine gesenkte Membranfluidität (Havaux, 1998) bei Temperaturen zwischen 10°C und 20°C, verursacht werden könnten. Es könnte z.B. der in Cyanobakterien sehr effiziente Reparaturmechanismus des D1-Proteins (Campbell *et al.*, 1995) bei einer starrer Membran herabgesetzt sein. Dies könnte photoinhibitorische Effekte bei niedrigen Temperaturen fördern. Weitere Experimente mit den *Synechococcus* Transformanten mit verändertem Zeaxanthingehalt könnten den Einfluss des Zeaxanthingehalts auf die Photosynthese bei niedrigeren Temperaturen zeigen und mit zur Klärung beitragen, warum der Zeaxanthingehalt in *Synechococcus* und *Synechocystis* nicht konstitutiv höher ist, obwohl das Vorteile beim Schutz vor Starklichtschädigungen bringt.

Eine weitere in dieser Arbeit verfolgte Strategie war es den Carotinoidgehalt in *Synechococcus* PCC 7942 konstitutiv zu erhöhen. In früheren Experimenten mit *Synechococcus* PCC 7942 Transformanten konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Einführung des Phytoen Synthase Gens aus dem Bakterium *Erwinia uredovora* (*crtB*) oder aus *Synechocystis* PCC 6803 (*pys*) zu einer Erhöhung des Carotinoidgehalts führt (Götz *et al.*, 1999). Ein erhöhter Carotinoidgehalt korreliert mit einem verbesserten Schutz vor Schädigungen des Photosyntheseapparates dieser Transformanten vor UV-B Strahlung (Götz *et al.*, 1999; Windhövel *et al.*, 1999). Allerdings hat die Transformante mit der zusätzlichen Phytoen Synthase aus *Synechocystis* neben dem erhöhten Carotinoidgehalt auch einen niedrigeren Chlorophyllgehalt und eine niedrigere maximale Photosyntheseleistung als der Wildtyp. Der reduzierte Chlorophyllgehalt in dieser Transformante könnte durch eine Limitierung von Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) in Folge der erhöhten Carotinoidbiosynthese zustande kommen. Das könnte die Phytolsynthese und somit die Chlorophyllbildung beeinträchtigen (Windhövel *et al.*, 1995).

Um den Carotinoidgehalt in *Synechococcus*-Transformanten noch weiter zu erhöhen und gleichzeitig einer Limitierung von Geranylgeranylpyrophosphat für andere Synthesewege vorzubeugen, wurde das für die IPP Isomerase kodierende Gen (*idi*) aus *Rhodobacter capsulatus* zusätzlich in *Synechococcus* exprimiert. Frühere Arbeiten von Kajiwara *et al.*, (1997) zeigten, dass die Überexpression der IPP Isomerase in einer carotinoidproduzierenden *E. coli*-Transformante zu einer drastischen Erhöhung des Carotinoidgehalts führt. Obwohl in dieser Arbeit die Transformation des *idi*-Gens aus *Rhodobacter capsulatus* in die

*Synechococcus* PCC 7942 PIM8 Transformanten pFP1-3, pFP1-3crtB und pFP1-3pys erreicht wurde, konnte keine Erhöhung des Carotinoidgehalts in diesen Transformanten festgestellt werden (*Tabelle III-1*). Ein Grund dafür könnte sein, dass in Cyanobakterien das IPP und das DMAPP nicht über den Mevalonat-Weg, sondern parallel über den so genannten DOXP-Weg gebildet werden (Rohdich *et al.*, 2002). So konnte in *Synechocystis* PCC 6803 kein Gen, das für die IPP Isomerase kodiert, gefunden werden (Ershov *et al.*, 2002). Um zu untersuchen, ob dies der Grund war, weshalb sich die Carotinoidsynthese in *Synechococcus* nicht erhöhen ließ, wurden weitere Gene des Isoprenoidstoffwechsels in das Genom von *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 integriert.

Durch Integration der Deoxyxylulose-5-Phosphat Synthase (DXS) aus *E. coli* in das Genom von *Synechococcus* sollte ein Enzym aus dem DOXP-Weg zusätzlich exprimiert werden. Die DXS-Reaktion gilt als limitierender Schritt in der „Nonmevalonat“-Isoprenoidbiosynthese in *E. coli* (Miller *et al.*, 2000). Die Integration dieses Gens in das Genom von *Synechococcus* führte ebenso wie die Transformation des idi-Gens nicht zu einer Erhöhung des Carotinoidgehalts (*Tabelle III-2*).

Durch die Integration eines Konstruktes der Gene crtB und crtE aus *Erwinia uredovora* in das Genom von *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 sollten die Geranylgeranylpyrophosphat Synthase und die Phytyl Synthase zusätzlich zu den *Synechococcus*-eigenen Proteinen exprimiert werden. Auch die Integration dieses Konstruktes führte zu keiner Erhöhung des Carotinoidgehalts, obwohl mit Komplementierungsexperimenten die Funktionalität des pFP1-3crtBE Konstruktes in *E. coli* nachgewiesen wurde (*Tabelle III-3* und *Tabelle III-4*).

Die Ergebnisse zeigten, dass eine zusätzliche Expression von Genen des Isoprenoidstoffwechsels zu keiner Erhöhung des Carotinoidgehalts in *Synechococcus* führten. Eine Ursache dafür könnte sein, dass in Cyanobakterien erst spätere Schritte der Carotinoidbiosynthese reguliert sind. In *Synechococcus* scheint die Isoprenoidsynthese keinen limitierenden und regulierenden Einfluss auf die Carotinoidbiosynthese auszuüben.

Die Carotinoidbiosynthese in Cyanobakterien ist ein wichtiger Bestandteil des zellulären Schutzsystems vor Schädigungen des Photosyntheseapparates, die durch hohe Lichtintensitäten verursacht werden können. Um einen verstärkten Abbau der Carotinoide unter diesen Bedingungen zu kompensieren, muss die Carotinoidneusynthese erhöht werden (Steiger *et al.*, 1999). Da die Isoprenoidsynthese nicht limitierend für die Carotinoidbiosynthese in *Synechococcus* zu sein scheint, muss die Regulation, später, im Carotinoidstoffwechsel erfolgen. Die Steigerung der Carotinoidneusynthese ist unter Starklichtbedingungen aufgrund des unter diesen Bedingungen ebenfalls erhöhten

Carotinoidabbau nicht messbar. Hemmt man die Carotinoidbiosynthese mit Norflurazon (NFZ), akkumuliert das sonst nicht nachweisbare farblose Zwischenprodukt Phytoen. Da Phytoen im Starklicht nicht so schnell abgebaut wird wie die „farbigen“ Carotinoide, kann man anhand der Phytoenakkumulation auf die Carotinoidneusynthese schließen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart des Phytoen Desaturase-Hemmstoffs Norflurazon (NFZ) in *Synechococcus* PCC 7942 ein kontinuierlicher Abbau von  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin bei Inkubation im Starklicht stattfindet. Die dreifach gesteigerte Akkumulation von Phytoen nach Inkubation im Starklicht zeigte, dass die Phytoenbildung unter diesen Bedingungen erhöht wurde, um diesen Verlust an Carotinoiden durch Neusynthese auszugleichen (*Abbildung III-18*). Die gleichen Befunde erhielten Steiger *et al.* (1999) in Experimenten mit *Synechocystis* PCC 6803.

Ob die erhöhte Phytoenbildung im Starklicht durch eine erhöhte Transkription von *crtB* zustande kommt, wurde in dieser Arbeit mittels Promotorstudien untersucht. Eine verstärkte Promotoraktivität führt zu einer verstärkten Transkription des betreffenden Gens d.h. zu einer verstärkten mRNA-Bildung. Da die bakterielle mRNA ein sehr kurzlebiges Molekül ist, kann ein prokaryotischer Organismus auf Transkriptionsebene effektiv auf sich verändernde Umwelteinflüsse reagieren (Simons & Kleckner, 1988). Ein erhöhter mRNA-Gehalt führt in Bakterien in der Regel zu einer gesteigerten Bildung des korrespondierenden Proteins (Li & Sherman, 2000; Navarro *et al.*, 2000; Sippola & Aro, 2000).

In Cyanobakterien sind die Gene *crtB* und *crtP*, die für die Phytoen Synthase bzw. Phytoen Desaturase kodieren nacheinander im Genom angeordnet. *CrtP* ist in Leserichtung vor *crtB* lokalisiert. Das 3'Ende von *crtP* und das 5'Ende von *crtB* überlappen sich. Sequenzvergleiche der DNA-Bereiche vor *crtP* und *crtB* aus *Synechococcus* mit konservierten DNA-Motiven zeigten, dass in den putativen Promotorbereichen von *crtB* und *crtP* zwei homologe Motive, die als lichtregulierende Elemente in Frage kommen, vorhanden sind. Zu Beginn dieser Arbeit waren nur wenige lichtregulierte cyanobakterielle Promotoren bekannt. Sie kontrollieren die Transkription der Gene *psbAII* und *psbAIII* aus *Synechococcus* PCC 7942 (Li & Golden, 1993) bzw. *Synechocystis* PCC 6803 (Mohamed *et al.*, 1993), die für unter Starklichtbedingungen verstärkt gebildete Isoformen des D1-Proteins kodieren (Schaefer & Golden, 1989; Clarke *et al.*, 1993b; Clarke *et al.*, 1993a; Campbell *et al.*, 1995; Öquist *et al.*, 1995). Außerdem konnte in *Synechocystis* ein konserviertes DNA-Motiv identifiziert werden, das in fünf verschiedenen DNA-Abschnitten, die eine lichtregulierte Promotoraktivität besitzen, vorkommt (Marraccini *et al.*, 1994). Außerdem konnten stromaufwärts von *crtP*

zwei Promotorelemente analog zu der -10 und -35 Region des *E.coli*- $\sigma^{70}$ -Promotors gefunden werden, die in der Regel zur Grundausstattung eines Basispromotors gehören, in cyanobakteriellen Promotorbereichen aber fehlen können (Marraccini *et al.*, 1994). Anhand dieser Sequenzvergleiche könnten sowohl der DNA-Bereich stromaufwärts von crtP als auch der DNA-Bereich stromaufwärts von crtB lichtregulierte Promotoren sein. Da stromaufwärts von crtB aber keine Strukturen mit Ähnlichkeiten zum *E.coli*- $\sigma^{70}$ -Promotor gefunden werden konnten, könnten crtP und crtB, wie es die Anordnung dieser beiden Gene suggeriert, auch als Operon organisiert sein. Die durchgeführten Promotorstudien, in denen die beiden DNA-Bereiche vor crtB und crtP jeweils mit einem Reportergen fusioniert wurden, ergaben, dass die Reportergenaktivität in dem Konstrukt mit dem 177 bp großen DNA Abschnitt stromaufwärts von crtP und dem Reportergen nach Inkubation im Starklicht stark erhöht war. Die Fusion des 273 bp großen DNA Abschnitts vor crtB mit dem Reportergen führte dagegen zu keiner Erhöhung der Reportergenaktivität nach Inkubation im Starklicht. In diesem Konstrukt war nach Inkubation im Schwach- bzw. im Starklicht nur eine schwache Aktivität des Reportergens messbar (*Abbildung III-25*). Die Ergebnisse belegten, dass es sich bei dem DNA-Bereich stromaufwärts von crtP um einen lichtregulierten Promotor handelt. Dass eine erhöhte Aktivität der Phytoen Synthase, dem Genprodukt von crtB, im Starklicht nachgewiesen wurde, der DNA-Bereich vor crtB jedoch kein lichtregulierter Promotor zu sein scheint, lässt darauf schließen, dass crtB gemeinsam mit crtP unter der Kontrolle des lichtregulierten Promotors von crtP steht, d.h. beide Gene als Operon organisiert sind. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Regulation der Phytoen Synthase-Aktivität nicht durch eine erhöhte Promotoraktivität im Starklicht zu Stande kam. Ebenso könnte es sein, dass nicht der gesamte Promotorbereich vor crtB mit dem Reportergen fusioniert wurde und deshalb die Lichtregulation verloren ging. In *Synechocystis* PCC 6803 scheinen crtB und crtP hingegen jeweils von einem eigenen lichtregulierten Promotor kontrolliert zu werden (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 1998).

Durch die Messung der Transkriptmenge der für die Phytoen Synthase (crtB), Phytoen Desaturase (crtP),  $\zeta$ -Carotin Desaturase (crtQb), Lycopin Isomerase (crtH), Lycopin Zyklase (crtL) bzw.  $\beta$ -Carotin Hydroxylase (crtR) kodierenden Gene aus *Synechococcus* nach Schwach- bzw. Starklichtinkubation wurde untersucht, ob Syntheseschritte der Carotinoidbiosynthese auf Transkriptionsebene lichtreguliert sind. Da Carotinoidgene generell nur sehr schwach exprimiert werden, wurde als Quantifizierungsmethode die sehr sensitive Real Time PCR verwendet (Buston, 2000). Mittels degenerierter Primer, die gegen konservierte Aminosäure Bereiche der  $\zeta$ -Carotin Desaturase bzw. Primern gegen konservierte

DNA-Bereiche von crtR aus anderen Cyanobakterien kloniert wurden, gelang es in dieser Arbeit je ein DNA-Fragment von crtQb und crtR aus *Synechococcus* PCC 7942 zu amplifizieren und zu identifizieren (*Abbildung III-27/29 und Tabelle III-11/12*).

Die mit der Real Time PCR erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass die Transkriptmenge der Gene crtB, crtP, crtQb und crtR in *Synechococcus* nach Inkubation im Starklicht im Vergleich zur Transkriptmenge nach Inkubation im Schwachlicht deutlich erhöht waren (*Abbildung III-30*). Dies deutet darauf hin, dass die Hochregulation der Carotinoidbiosynthese im Starklicht durch eine Erhöhung der Transkriptmenge zustande kommt. Vor allem die Erhöhung der Transkriptmenge der Gene crtB, crtP und crtQb, der ersten drei Enzyme des Carotinoidstoffwechsels, kommt für die Steigerung der Carotinoidbiosynthese in Frage, während die Hochregulation von crtR auf eine verstärkte Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin hindeutet. Es konnte gezeigt werden, dass korrespondierend zu der nach 15 min nachweisbaren Erhöhung der Transkriptmenge von crtR im Starklicht, bereits nach kurzer Inkubation (1 h) im Starklicht deutlich mehr  $\beta$ -Carotin zu Zeaxanthin umgesetzt wird als im Schwachlicht (*Abbildung III-31*). Eine vergleichbare Menge an Phytoen wird erst nach vier- bis fünfstündiger Inkubation gebildet, was zeigt, dass eine generelle Steigerung der Carotinoidbiosynthese erst später einsetzt.

Die Erhöhung der Transkriptmenge scheint zumindest bei den Genen crtB und crtP durch eine verstärkte Promotoraktivität, also eine Steigerung der Transkription verursacht zu sein. Dass die Transkriptmenge beider Gene im Starklicht ansteigt, stützt die Hypothese, dass crtB und crtP unter der Kontrolle des gemeinsamen Promotors, der vor crtP lokalisiert ist, stehen.

Für die Gene crtH und crtL konnte keine Erhöhung der Transkriptmenge nachgewiesen werden. Entweder sind die Bildung und Zyklisierung von Lycopin auch im Starklicht keine limitierenden Schritte der Carotinoidbiosynthese oder es erfolgt eine Regulation dieser Gene auf Translationsebene bzw. posttranslational. Das Gen crtH codiert für die Lycopin Isomerase, welche die Isomerisierung von Prolycopin zu Lycopin katalysiert (Breitenbach *et al.*, 2001). In einer *Synechocystis* PCC 6803-Transformante konnte gezeigt werden, dass die Isomerisierung im Licht auch ohne Katalyse eines Enzyms stattfindet (Masamoto *et al.*, 2001). Das könnte der Grund dafür sein, dass crtH unter Starklichtbedingungen nicht hochreguliert werden muss.

Die Ergebnisse zeigten außerdem, dass die Transkriptmenge von den für die Phytoen Synthase, Phytoen Desaturase und  $\zeta$ -Carotin Desaturase kodierenden Genen erst nach 60-120 min Inkubation im Starklicht signifikant erhöht war. Das lässt darauf schließen, dass zwei

unabhängige Regulationsprinzipien der Gene der Carotinoidbiosynthese in *Synechococcus* existieren. Als schnelle Antwort auf steigende Lichtintensitäten wird verstärkt das im Vergleich zum  $\beta$ -Carotin deutlich bessere Schutzpigment Zeaxanthin gebildet. Eine generelle Erhöhung der Carotinoidbiosynthese durch eine verstärkte Expression der „frühen“ Gene des Synthesewegs dient als längerfristige Anpassung zum Wiederauffüllen des „ $\beta$ -Carotin-Pools“. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass eine Erhöhung der Lichtintensität zu einer Erhöhung der Transkriptmenge von Genen der Carotinoidbiosynthese führt, welche wiederum zu einer verstärkten Carotinoidneusynthese führt. Wie nehmen Cyanobakterien Veränderungen der Lichtintensität wahr, und was ist das Signal, das zur Hochregulation der Carotinoidbiosynthese führt? Cyanobakterien verfügen über ein ganzes Set an Lichtsensoren, mit denen sie in der Lage sind verschiedene Lichtqualitäten wahrzunehmen (Mullineaux, 2001). Phytochrome absorbieren im roten und eventuell auch im grünen Spektralbereich (Grossman & Kehoe, 1997; Schmitz *et al.*, 2000; Yoshihara *et al.*, 2000). Man vermutet, dass Rhodopsin grünes Licht perzipieren kann (Hoff *et al.*, 1995) und Cryptochrom den Blaulichtbereich abdeckt (Hitomi *et al.* 2000). Darüber hinaus wird der gesamte Lichtsammelkomplex als Lichtsensor, der im Rot-, Grün- sowie im Blaulichtbereich absorbiert, angesehen (Mullineaux, 2001). Man geht heute davon aus, dass an der Photosynthese beteiligte Gene nicht durch Licht direkt, sondern indirekt, redoxreguliert sind. So wird ein veränderter Redoxzustand der Elektronentransportkette (Navarro *et al.*, 2000), des Plastochinonpools (Escoubas *et al.*, 1995; Li & Sherman, 2000), der Thioldisulfid-Gruppen (Sippola & Aro, 1999) oder der gesamten Zelle als mögliches Signal oder Bestandteil der Transduktionskette (Allen *et al.*, 1995) diskutiert.

Während Li & Sherman (2000) Redoxzustand des Plastochinonpools als auslösendes Signal für eine Hochregulation von PSII-Genen unter Starklichtbedingungen in *Synechocystis* identifizierten, ist laut Sippola & Aro (2000) der Redoxzustand von Thioldisulfid-Gruppen in *Synechococcus* das Signal, das zu einer verstärkten Bildung von Isoformen des D1-Proteins (psbAII und psbAIII) unter Starklichtbedingungen führt. Es konnte jeweils gezeigt werden, dass auch unter Schwachlichtbedingungen in Gegenwart von Substanzen, die eine Reduktion des Plastochinonpools (DBMIB) bzw. der zellulären Thioldisulfid-Gruppen ( $\text{DTT}_{\text{red}}$ ) bewirken, die Transkriptmengen dieser Gene erhöht sind. Umgekehrt ließ sich die Hochregulation im Starklicht durch Substanzen, die den Plastochinonpool bzw. die zellulären Thioldisulfid-Gruppen oxidieren (DCMU oder IBA), verhindern.

In *Synechococcus* PCC 7942 ist weder der Redoxzustand des Plastochinonpools noch der der zellulären Thioldisulfid-Gruppen oder des Thioredoxinsystems das Signal, dass eine

Steigerung der Carotinoidbiosynthese bewirkt. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die Zugabe von DBMIB als auch von  $\text{DTT}_{\text{red}}$  keine Steigerung der Phytoenbildung nach Inkubation im Schwachlicht im Vergleich zur unbehandelten Probe bewirkten (*Abbildung III-32*). Die Inkubationen fanden in Gegenwart von NFZ statt, so dass die Menge an gebildetem Phytoen als Maß für die Carotinoidneusynthese verwendet werden konnte. Dass die über einen Lichtrezeptor aufgenommene Lichtmenge der Reiz ist, der zu einer Erhöhung der Carotinoidbiosynthese führt konnte, auch ausgeschlossen werden. Die geringere Phytoenbildung in den mit DBMIB oder DCMU behandelten Proben zeigte, dass ein funktionierender photosynthetischer Elektronentransport für die Carotinoidsynthese notwendig ist. Ähnliche Ergebnisse erhielten Navarro et al. (2000). Sie konnten in *Synechocystis* PCC 6803 zeigen, dass die Transkriptmenge eines Thioredoxin Gens (*trxA*) nach Inkubation in Gegenwart von DCMU bzw. DBMIB drastisch zurück geht. Die Autoren diskutieren den Redoxzustand des Cytochrom<sub>b<sub>6</sub>/f</sub>-Komplexes als putativen Redoxsensor in *Synechocystis*. Als weitere mögliche Auslöser für eine Hochregulation der Carotinoidbiosynthese kommen ROS in Frage, die unter Starklichtbedingungen in der Mehler-Reaktion gebildet werden. Da die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  keinen Effekt auf die Phytoenbildung im Schwachlicht hatte, kann ausgeschlossen werden, dass eine verstärkte Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  das auslösende Signal zur Steigerung der Carotinoidbiosynthese im Starklicht ist. Die verstärkte Bildung von  $\text{O}_2^{\bullet-}$  oder  $\text{OH}^{\bullet}$  wäre ein weiteres mögliches Signal, dass zu einer Hochregulation der Carotinoidbiosynthese führt.



## V ZUSAMMENFASSUNG

Durch Integration beziehungsweise Deletion einzelner oder mehrerer Gene der Carotinoidbiosynthese wurden Cyanobakterien-Transformanten mit einem vom Wildtyp abweichenden Carotinoidgehalt oder einer veränderten Carotinoidzusammensetzung hergestellt. Anhand dieser Transformanten wurden die Auswirkungen der geänderten Carotinoidkomposition auf die Photosyntheseleistung und besonders auf den Schutz der Photosynthese vor Schädigungen durch Starklicht untersucht.

Die Integration des Zeaxanthin Epoxidase-Gens aus *Gentiana lutea* in das Genom von *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 führte zu einer Transformante *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 pFP1ZE, in der erstmalig die am Xanthophyllzyklus der höheren Pflanzen beteiligten Carotinoidepoxide Violaxanthin und Antheraxanthin gebildet wurden. Diese beiden zusätzlich gebildeten Carotinoidepoxide hatten keine Auswirkungen auf die Photosyntheseleistung und die Quantenausbeute von *Synechococcus* PCC 7942 PIM8 pFP1ZE unter Schwachlichtbedingungen. Allerdings ging in dieser Transformante die maximale Photosyntheseleistung nach Inkubation im Starklicht deutlich stärker zurück als in der Kontroll-Transformante. Diese erhöhte Sensitivität gegenüber Starklicht korreliert mit dem signifikant niedrigeren Zeaxanthingehalt dieser Transformante.

Die wichtige Schutzfunktion von Zeaxanthin vor Starklichtschädigungen des Photosyntheseapparates wurde durch Experimente mit *Synechocystis* PCC 6803 bestätigt. Es wurden durch Inaktivierung des Ketolase-Gens, des  $\beta$ -Carotin Hydroxylase-Gens bzw. beider Gene zusammen, Mutanten hergestellt, die entweder kein Echinenon, kein Zeaxanthin oder keines der beiden Carotinoide synthetisieren konnten. Darüber hinaus wurde in den  $\beta$ -Carotin Hydroxylase-defizienten Mutanten ein nicht hydroxyliertes Myxoxanthophyllderivat anstelle von Myxoxanthophyll gebildet.

In den Zeaxanthin defizienten *Synechocystis* Mutanten ist die Photosynthese nach Inkubation im Starklicht deutlich stärker inhibiert als im Wildtyp und der Mutante ohne Echinenon. Besonders empfindlich gegenüber Starklicht erwiesen sich die Kulturen ohne Zeaxanthin und Myxoxanthophyll, wenn in Gegenwart von Methylenblau oder Methylviologen verstärkt  $^1\text{O}_2$  bzw.  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{OH}^{\bullet}$  generiert wurden. In diesen Mutanten war ein drastisch erhöhter Chlorophyll- und Carotinoidabbau messbar.

Um den verstärkten Abbau an Carotinoiden unter Starklichtbedingungen zu kompensieren, muss die Carotinoidbiosynthese unter diesen Bedingungen erhöht werden. In Hemmstoffversuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Bildung von Phytoen, dem ersten Carotinoid im Syntheseweg, unter Starklichtbedingungen erhöht ist. Messungen der Transkriptmenge aller Carotinoidgene aus *Synechococcus* zeigten, dass die Gene der Phytoen Synthase (crtB), der Phytoen Desaturase (crtP),  $\zeta$ -Carotin Desaturase (crtQb) sowie der  $\beta$ -Carotin Hydroxylase (crtR) im Starklicht hochreguliert werden. Die Gene der Lycopin Isomerase (crtH) und der Lycopin Zyklase (crtL) werden nicht auf Ebene der Transkription reguliert.

Während die Erhöhung der Transkriptmenge von crtR bereits nach 15 min erfolgt und somit bereits nach 60 min eine deutlich gesteigerte Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in das antioxidativ wirksamere Zeaxanthin nachgewiesen wurde, erfolgt ein Anstieg der Transkriptmenge der Gene crtB, crtP und crtQb erst nach ca. 60 min und führt damit erst wesentlich später zu einer generellen Steigerung der Carotinoidbiosynthese, um den verstärkten Carotinoidabbau im Starklicht zu kompensieren.

Inkubationen von *Synechococcus* in Gegenwart von Substanzen, die den Redoxzustand der photosynthetischen Elektronentransportkette oder des Thio-redoxsystems modulieren, zeigten, dass nicht Licht direkt der auslösende Reiz für die Hochregulation der Carotinoidsynthese im Starklicht ist. Ein funktionierender photosynthetischer Elektronentransport ist für eine Hochregulation der Carotinoidbiosynthese erforderlich. Weder die Reduktion des Plastochinonpools noch die der zellulären Thioldisulfid-Gruppen erwiesen sich als Signal, dass in *Synechococcus* PCC 7942 zur Hochregulation der Carotinoidbiosynthese im Starklicht führt. Möglicherweise ist der Redoxzustand des Cytochromb6/f-Komplexes oder eine der unter Starklichtbedingungen verstärkt gebildeten ROS, wie z. B.  $O_2^{\bullet}$  oder  $OH^{\bullet}$ , der Reiz, der eine Steigerung der Carotinoidbiosynthese auslöst.

## VI ANHANG

### 1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung I-1	Carotinoidbiosyntheseweg bis zum Lycopin in Cyanobakterien.....	4
Abbildung I-2	Carotinoidbiosynthese ausgehend vom Lycopin in <i>Synechococcus PCC 7942</i> und <i>Synechocystis PCC 6803</i> .....	5
Abbildung I-3	Schematische Darstellung der in dieser Arbeit durchgeführten Arbeiten.	12
Abbildung II-1	DNA Integration in <i>Synechococcus PCC7942 PIM8</i> nach Transformation mit pFP1-3GenX .....	14
Abbildung II-2	Integrationsvektor pFP1-3 .....	15
Abbildung II-3	Schematische Darstellung der Overlap Extension PCR .....	30
Abbildung II-4	Real Time PCR Primer und Sonden.....	33
Abbildung III-1	Integrationskonstrukt pFP1-3dxs .....	46
Abbildung III-2	Integrationskonstrukt pFP1-3 crtBE.....	47
Abbildung III-3	Startprimer zur Amplifizierung des Zeaxanthin Epoxidase-Gens .....	49
Abbildung III-4	Integrationskonstrukt pFP1-3 ZE für <i>Synechococcus PCC 7942 PIM8</i> ..	50
Abbildung III-5	C18-HPLC Elutionsprofil von Carotinoidextrakten aus: <b>A1</b> : <i>Synechococcus PCC 7942 PIM8</i> ZE; <b>A2</b> : Kontrolle <i>Synechococcus PCC 7942</i> pFP1-3 .....	51
Abbildung III-6	Photosyntheserate von <i>Synechococcus PCC 7942</i> Transformanten in Abhängigkeit zur Lichtintensität gemessen als Sauerstoffentwicklung der gesamten Elektronentransportkette .....	56
Abbildung III-7	Änderung der maximalen Photosyntheserate (% von $t = 0$ ) von <i>Synechococcus PCC 7942</i> Transformanten nach 5h Inkubation bei 30-50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ bzw. 350-400 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ gemessen als Sauerstoffentwicklung der gesamten Elektronentransportkette. ....	57
Abbildung III-8	Relative Änderung der Sauerstoffentwicklung von PSII in <i>Synechococcus PCC 7942</i> Transformanten nach 5h Inkubation bei 30-50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ bzw. 350-400 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ .....	58

Abbildung III-9	Relative Änderung des $F_V/F_M$ -Verhältnisses von PSII in <i>Synechococcus PCC 7942</i> Transformanten nach 5h Inkubation bei 30-50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ bzw. 300-350 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ..... 59
Abbildung III-10	C18-HPLC Elutionsprofile von Carotinoidextrakten nach Anzucht bei 50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ aus: <b>A1:</b> <i>Synechocystis PCC 6803</i> Wildtyp (Kontrolle); <b>A2:</b> <i>Synechocystis PCC 6803</i> $\Delta\text{crtO}$ ; <b>A3:</b> <i>Synechocystis PCC 6803</i> $\Delta\text{crtR}$ ; <b>A4:</b> <i>Synechocystis PCC 6803</i> ..... 61
Abbildung III-11	Chlorophyllgehalt der <i>Synechocystis PCC 6803</i> Deletionsmutanten und des Wildtyps nach Anzucht im Schwachlicht. .... 65
Abbildung III-12	Chlorophyllgehalt [% von 0h] von <i>Synechocystis PCC 6803</i> Deletionsmutanten nach 5h Inkubation im Starklicht oder im Starklicht + 10 $\mu\text{M}$ Methylviologen(MV) bzw. 10 $\mu\text{M}$ Methylenblau (MB). .... 66
Abbildung III-13	Carotinoidgehalt in % von 0 h von <i>Synechocystis PCC 6803</i> Deletionsmutanten nach 5h Inkubation unter Starklichtbedingungen bzw. Starklicht + 10 $\mu\text{M}$ Methylviologen (MV) bzw. 10 $\mu\text{M}$ Methylenblau (MB). .... 67
Abbildung III-14	Maximale Photosyntheserate der <i>Synechocystis PCC 6803</i> Deletionsmutanten unter sättigendem Licht (500 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) zum Zeitpunkt $t=0$ und nach 5h Inkubation im Schwach bzw. Starklicht. .... 68
Abbildung III-15	Photosyntheserate von <i>Synechocystis</i> Transformanten in Abhängigkeit zur Lichtintensität zum Zeitpunkt $t=0$ (A) bzw. nach 3h Starklichtbehandlung (B). .... 69
Abbildung III-16	Maximale Sauerstoffentwicklung von Photosystem II der <i>Synechocystis PCC 6803</i> Deletionsmutanten unter sättigendem Licht (500 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) zum Zeitpunkt $t=0$ und nach 5h Inkubation im Schwach- bzw. Starklicht. .... 70
Abbildung III-17	Änderung des $F_V/F_M$ -Verhältnisses als Maß für Photoinhibition von Photosystem II in <i>Synechocystis</i> Deletionsmutanten nach 5 h Inkubation unter Schwach- bzw. Starklichtbedingungen. .... 71

Abbildung III-18	Neubildung von Phytoen und Abbau der farbigen Carotinoide nach Inkubation von <i>Synechococcus PCC 7942</i> in Gegenwart des Phytoen Desaturase Hemmstoffes Norflurazon (7,5 $\mu$ M) unter Schwach- bzw. Starklichtbedingungen .....	73
Abbildung III-19	Anordnung der Gene crtB und crtP in Cyanobakterien .....	73
Abbildung III-20	Sequenzvergleich von lichtregulierten Promotoren und putativen Promotorsequenzen von Carotinoidgenen aus <i>Synechococcus PCC 7942</i> .. .....	75
Abbildung III-21	Sequenzvergleich von bs-1, einer Struktur aus dem UTR des psbDII Gens aus <i>Synechococcus</i> , (mit deren Fehlen die Starklicht Hochregulation des Reportergens verloren geht), mit DNA Sequenzen aus den UTRs von crtB und crtP. ....	75
Abbildung III-22	Homologe Bereiche der putativen Promotorsequenz stromaufwärts von crtP in <i>Synechococcus PCC 7942</i> mit den -35 und -10 Regionen des $\sigma_{70}$ Promotors aus <i>E. coli</i> . ....	76
Abbildung III-23	Promotor-Reportergen-Konstrukte zur Klonierung in den Integrationsvektor pK18.....	77
Abbildung III-24	Vektor pk18 zur Integration von Promotor-CAT-Genkonstrukten in das Genom von <i>Synechococcus PCC 7942</i> PIM8.....	78
Abbildung III-25	CAT- Aktivität der Promotor-CAT-Gen Konstrukte nach Inkubation unter Schwach- bzw. Starklichtbedingungen zu verschiedenen Messzeitpunkten.....	80
Abbildung III-26	Identische Aminosäurebereiche von crtQb aus <i>Synechocystis PCC 6803</i> und <i>Anabaena PCC 7120</i> , die als Vorlage zum Entwerfen der degenerierten PCR-Primer zum Amplifizieren eines Fragments von crtQb aus <i>Synechococcus PCC 7942</i> dienen.....	82
Abbildung III-27	DNA-Sequenz 1 bis 503 bp des 1239 bp großen Fragments, das mit degenerierten Primern gegen homologe Bereiche cyanobakterieller $\zeta$ -Carotin Desaturasen von der genomischen DNA aus <i>Synechococcus</i> amplifiziert wurde. ....	83
Abbildung III-28	Homologe DNA-Bereiche aus drei cyanobakteriellen crtZ-Genen gegen welche die Primer zur Amplifizierung von crtZ aus <i>Synechococcus PCC 7942</i> konstruiert wurden.....	84

Abbildung III-29	DNA-Sequenz des 375 bp großen Fragments, das mit Primern gegen homologe Bereiche von crtZ und genomischer DNA aus <i>Synechococcus PCC 7942</i> amplifiziert wurde. ....	84
Abbildung III-30	Änderung der Transkriptmenge von crt-Genen in <i>Synechococcus PCC 7942</i> nach Inkubation unter Schwach- bzw. Starklichtbedingungen. ....	86
Abbildung III-31	Zeaxanthingehalt von <i>Synechococcus PCC 7942</i> nach 1h Inkubation im Schwach bzw. Starklicht .....	87
Abbildung III-32	Nach 6h Inkubation unter Schwach- bzw. Starklichtbedingungen gebildete Phytoenmenge in <i>Synechococcus PCC 7942</i> in Gegenwart von redoxmodulierenden Substanzen und 7,5 µM Norflurazon. ....	89

## 2 Tabellenverzeichnis

Tabelle II-1	Verwendete <i>Synechocystis</i> PCC 6803 Transformanten .....	13
Tabelle II-2	Verwendete <i>Synechococcus</i> PCC 7942 Transformanten .....	13
Tabelle II-3	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme .....	16
Tabelle II-4	BG11 Medium (Rippka et al., 1979) .....	16
Tabelle II-5	Antibiotika zur Selektion von Cyanobakterien-Transformanten. WT: Wildtyp .....	17
Tabelle II-6	Verwendete Carotinoidbiosynthese-, Photosynthesehemmstoffe und Radikalbildner .....	19
Tabelle II-7	Zusammensetzung von LB-Medium .....	19
Tabelle II-8	Antibiotika zur Selektion von <i>E. coli</i> -Transformanten .....	20
Tabelle II-9	Zur Transformation von <i>E. coli</i> bzw. <i>Synechococcus</i> PCC 7942 PIM8 verwendete Vektoren .....	20
Tabelle II-10	Verwendete Sequenzierprimer .....	25
Tabelle II-11	Standard-PCR-Reaktionsansatz .....	28
Tabelle II-12	Standard-PCR-Programm .....	29
Tabelle II-13	Primer für Kontroll-PCR ( <i>Synechococcus</i> PCC 7942) .....	29
Tabelle II-14	Zur Herstellung der putativen Promotorbereich-Reportergen-Konstrukte verwendete Primer .....	31
Tabelle II-15	10 µl Reaktionsansätze für die Real Time PCR-Reaktion .....	34
Tabelle II-16	Real Time PCR Reaktionsbedingungen .....	35
Tabelle II-17	Primer und Sonden die in der RT-Reaktion, bzw. in der Real Time PCR eingesetzt wurden. ....	35
Tabelle II-18	Erhaltene Flächeneinheit pro µg Carotinoid nach Eichung der Trennsäule .....	41
Tabelle III-1	Carotinoidgehalt von <i>Synechococcus</i> PCC 7942 Transformanten nach Anzucht im Schwachlicht .....	44
Tabelle III-2	Carotinoidgehalt von <i>Synechococcus</i> PCC 7942 PIM8 pFP1-3 und verschiedenen <i>Synechococcus</i> PCC 7942 PIM8pFP1-3dxs Transformanten. .	46

Tabelle III-3	Komplementierungsexperimente: XL1-Blue pACCAR25ΔB bzw. ΔE mit pFP1-3crtBE .....	48
Tabelle III-4	Carotinidgehalt von <i>Synechococcus PCC 7942</i> PIM8 pFP1-3 und unterschiedlichen Transformanten <i>Synechococcus PCC 7942</i> PIM8 crtBE nach 2 Tagen Anzucht unter Schwach- bzw. Starklichtbedingungen.....	48
Tabelle III-5	Nachweisbare Carotinoide in <i>Synechococcus PCC 7942</i> PIM8 pFP1-3 und <i>Synechococcus PCC 7942</i> PIM8 ZE1. ....	52
Tabelle III-6	Carotinoidzusammensetzung von <i>Synechococcus PCC 7942</i> Transformanten nach Anzucht bei 30-50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . ....	54
Tabelle III-7	Zeaxanthingehalt der <i>Synechococcus PCC 7942</i> Transformanten nach 5h Inkubation bei 300-350 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .....	55
Tabelle III-8	Chlorophyllgehalt und Chlorophyll- bzw. Carotinidgehalt der <i>Synechococcus PCC 7942</i> Transformanten nach 5h Inkubation bei 350-400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .....	55
Tabelle III-9	Absorptionsmaxima und Retentionszeiten der in <i>Synechocystis PCC 6803</i> nachweisbaren Carotinoide.....	62
Tabelle III-10	Carotinoidzusammensetzung in <i>Synechocystis PCC 6803</i> nach 5 h Inkubation im Schwachlicht (50 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) Starklicht (1200 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ).. ....	63
Tabelle III-11	Ergebnisse des blastX-Alignments (Nukleotid zu Protein) der obigen DNA-Sequenz. Treffer 1-5. E-Wert = 0 entspricht einer 100 %igen Identität der verglichenen Proteine. ....	83
Tabelle III-12	Ergebnisse des blastX-Alignments (Nukleotid zu Protein) des mit den Primern gegen homologe Regionen aus cyanobakteriellen crtZ-Genen amplifizierten DNA-Fragments aus <i>Synechococcus PCC 7942</i> .....	85



### 3 Literaturverzeichnis

- Aichi, M. & T. Omata (1997).** Involvement of NtcB, a LysR family transcription factor, in nitrite activation of the nitrate assimilation operon in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* **179**, 4671-4675.
- Albrecht, M., N. Misawa & G. Sandmann (1999).** Metabolic engineering of the terpenoid biosynthetic pathway of *Escherichia coli* for production of the carotenoids  $\beta$ -carotene and zeaxanthin. *Biotechnol. Lett.* **21**, 791-795.
- Albrecht, M., S. Steiger & G. Sandmann (2001).** Expression of a ketolase gene mediates the synthesis of canthaxanthin in *Synechococcus* leading to tolerance against photoinhibition, pigment degradation and UV-B sensitivity of photosynthesis. *Photochem Photobiol* **73**, 551-555.
- Albrecht, M., A. Klein, P. Hugueney, G. Sandmann & M. Kuntz (1995).** Molecular cloning and functional expression in *E. coli* of a novel plant enzyme mediating  $\zeta$ -carotene desaturation. *FEBS Lett* **372**, 199-202.
- Albrecht, M., S. Takaichi, S. Steiger, Z.Y. Wang & G. Sandmann (2000).** Novel hydroxycarotenoids with improved antioxidative properties produced by gene combination in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* **18**, 843-846.
- Alfonso, M., I. Perewoska, S. Conctant & D. Kirilovski (1999).** Redox control of psbA expression in cyanobacteria *Synechocystis* strains. *J Photobiol* **48**, 104-113.
- Allen, J.F., K. Alexciev & G. Hakansson (1995).** Photosynthesis. Regulation by redox signalling. *Curr Biol* **5**, 869-872.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D.J. Lipman (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Anandan, S. & S.S. Golden (1997).** cis-Acting sequences required for light-responsive expression of the psbDII gene in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* **179**, 6865-6870.

- Anderson, J.M. & B. Andersson (1988).** The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. *Trends Biochem Sci* **13**, 351-355.
- Aro, E.M., I. Virgin & B. Andersson (1993b).** Photoinhibition of photosystem II, inactivation, protein damage and turnover. *BBA* **1143**, 113-134.
- Asada, K. (1994).** Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, C.H. Foyer & Mullineaux, eds (CRC Press), pp. 7-104.
- Asada, K. (1996).** Radical production and scavenging in the chloroplasts. In *Photosynthesis and the environment*, N.R. Baker, ed (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. 123-150.
- Baier, M. & K.J. Dietz (1997).** The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. *Plant J* **12**, 179-190.
- Barbu, V. & F. Dautry (1989).** Northern blot normalization with a 28S rRNA oligonucleotide probe. *Nucleic Acids Res* **17**, 7115.
- Björkman, O. & B. Demming. (1994).** Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, and dissipation in leaves of higher plants. In *Ecophysiology of Photosynthesis*, E.-D. Schulze & M. Caldwell, eds (Berlin: Springer Verlag), pp. 17-47.
- Björkman, O. & B. Demming (1987).** Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **170**, 489-504.
- Böger, P., G. Sandmann & R. Miller (1981).** Herbicide resistance in a mutant of the microalga *Bumilleriopsis filiformis*. *J Bacteriol* **125**, 616-625.
- Böhm, F., R. Edge, E.J. Land, D.J. Mcgarvey & T.G. Truscott (1997).** Carotenoids enhance Vitamin E anti-oxidant efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 621-622.
- Borovkov, A.Y. & M.I. Rivkin (1997).** XcmI-Containing Vector for direct cloning of PCR Products. *BioTechniques* **22**, 812-814.

- Breitenbach, J., A. Vioque & G. Sandmann (2001).** Gene sll0033 from *Synechocystis* 6803 encodes a carotene isomerase involved in the biosynthesis of all-E lycopene. *Z Naturforsch [C]* **56**, 915-917.
- Britton, G. (1995).** Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* **9**, 1551-1558.
- Bruce, D. & J. Biggins (1985).** Mechanism of the light-state transition in photosynthesis. V. 77K linear dichroism of *Anacystis nidulans* in State I and State II. *Acta* **810**, 237-246.
- Bryant, D.A. (1988).** Cyanobacterial phycobilisomes: Proccess towards complete structural and functional analysis via molecular genetics. In *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, L. Bogorad & I.L. Vasil, eds (San Diego: Academic Press), pp. 257-300.
- Buston, S.A. (2000).** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* **25**, 169-193.
- Bustos, S.A. & S.S. Golden (1991).** Expression of the psbDII gene in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 requires sequences downstream of the transcription start site. *J Bacteriol* **173**, 7525-7533.
- Campbell, D. (1996).** Complementary chromatic adaption alters photosynthetic strategies in the cyanobacterium *Calothrix*. *Microbiology* **142**, 1255-1263.
- Campbell, D., G. Zhou, P. Gustafsson, G. Oquist & A.K. Clarke (1995).** Electron transport regulates exchange of two forms of photosystem II D1 protein in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Embo J* **14**, 5457-5466.
- Campbell, D., V. Hurry, A.K. Clarke, P. Gustafsson & G. Oquist (1998).** Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 667-683.
- Chamovitz, D. & J. Hirschberg. (1994).** Carotenoids in Cyanobacteria. In *Advances in Photosynthesis*, D.A. Bryant, ed (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. 559-579.

- Chamovitz, D., I. Pecker & J. Hirschberg (1991).** The molecular basis of resistance to the herbicide norflurazon. *Plant Mol Biol* **16**, 967-974.
- Chamovitz, D., G. Sandmann & J. Hirschberg (1993).** Molecular and biochemical characterization of herbicide-resistant mutants of cyanobacteria reveals that phytoene desaturation is a rate-limiting step in carotenoid biosynthesis. *J Biol Chem* **268**, 17348-17353.
- Chamovitz, D., N. Misawa, G. Sandmann & J. Hirschberg (1992).** Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene coding for phytoene synthase, a carotenoid biosynthesis enzyme. *FEBS Lett* **296**, 305-310.
- Chang, A.C.Y. & S.N. Cohen (1978).** Construction and characterisation of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15a cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**, 235-241.
- Clarke, A.K., A. Soitamo, P. Gustafsson & G. Oquist (1993a).** Rapid interchange between two distinct forms of cyanobacterial photosystem II reaction-center protein D1 in response to photoinhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 9973-9977.
- Clarke, A.K., V.M. Hurry, P. Gustafsson & G. Oquist (1993b).** Two functionally distinct forms of the photosystem II reaction-center protein D1 in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 11985-11989.
- Cunningham, F.X. & E. Gantt (1998).** Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* **49**, 557-583.
- Cunningham, F.X., Jr., D. Chamovitz, N. Misawa, E. Gantt & J. Hirschberg (1993).** Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of  $\beta$ -carotene. *FEBS Lett* **328**, 130-138.
- Cunningham, F.X., Jr., Z. Sun, D. Chamovitz, J. Hirschberg & E. Gantt (1994).** Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp strain PCC7942. *Plant Cell* **6**, 1107-1121.
- Demming-Adams, B. & W. Adams (1992b).** Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**, 599-626.

- Demming-Adams, B. & W.W. Adams (1996a).** The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci* **1**, 21-26.
- Demming-Adams, B., A. Gilmore & W.W. Adams (1996).** Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* **10**, 403-412.
- Eastman, A. (1987).** An improvement of the novel rapid assay for chloramphenicol acetyltransferase gene expression. *BioTechniques* **5**, 730-731.
- Edge, R., D.J. Mc Garvey & T.G. Truscott (1997).** The carotenoids as anti-oxidants - a review. *J Photochem Photobiol B* **41**, 189-200.
- Ershov, Y.V., R.R. Gantt, F.X. Cunningham & E. Gantt (2002).** Isoprenoid biosynthesis in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is stimulated by compounds of the pentose phosphat cycle but not by pyruvate or deoxyxylulose-5-phosphate. *J Bacteriol* **184**, 5045-5051.
- Escoubas, J.M., M. Lomas, J. Laroche & P.G. Falkowski (1995).** Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10237-10241.
- Fay, P. (1983).** The Blue-Greens. In *Biology*, E. Arnold, ed (London: The Institute of Biology's Studies), pp. 32-40.
- Fernandez-Gonzalez, B., G. Sandmann & A. Vioque (1997).** A new type of asymmetrically acting  $\beta$ -carotene ketolase is required for the synthesis of echinenone in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **272**, 9728-9733.
- Fernandez-Gonzalez, B., I.M. Martinez-Ferez & A. Vioque (1998).** Characterization of two carotenoid gene promoters in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim Biophys Acta* **1443**, 343-351.
- Flores, E. & A. Herreo. (1994).** Nitrogen Metabolism. In *Advances in Photosynthesis*, D.A. Bryant, ed (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. 487-517.
- Foote, C.S. & R.W. Denny (1968).** Chemistry of singlet oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 6233-6235.
- Fork, D.C. (1972).** Oxygen electrode. *Methods Enzymol* **24**, 113-122.

- Frank, H.A. & R.J. Cogdell (1996).** Carotenoids in photosynthesis. *Photochem Photobiol* **63**, 257-264.
- Fukuzawa, K., K. Matsuura, A. Tokumura, A. Suzuki & J. Terao (1997).** Kinetics and dynamics of singlet oxygen scavenging by alpha-tocopherol in phospholipid model membranes. *Free Radic Biol Med* **22**, 923-930.
- Gantt, E. (1994).** Supramolecular membrane organisation. In *Advances in Photosynthesis*, D.A. Bryant, ed (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. 119-138.
- Gilmore, A. (1997).** Mechanistic aspects of xanthophyll cycle dependent photoprotection in higher plants and leaves. *Physiol Plant* **99**, 197-209.
- Glazer, A.N. (1989).** Light guides. *J Biol Chem* **264**, 1-4.
- Golecki, J.R. (1974).** Fine structure of the cell wall in various Cyanophyceae. In *Zentralblatt Bakteriologie [Orig A]*, pp. 189-192.
- Gombos, Z. & L. Vigh (1986).** Primary role of the cytoplasmatic membrane in thermal acclimation evidenced in nitrate-starved cells of the blue-green algae, *Anacystis nidulans*. *Plant Physiol* **80**, 415-419.
- Goodwin, T.W. (1980).** The biochemistry of the carotenoids. (London, New York: Chapman and Hall).
- Götz, T., G. Sandmann & S. Römer (2002).** Expression of a bacterial carotene hydroxylase gene (crtZ) enhances UV tolerance in tobacco. *Plant Mol Biol* **50**, 129-142.
- Götz, T., U. Windhövel, P. Böger & G. Sandmann (1999).** Protection of photosynthesis against ultraviolet-B radiation by carotenoids in transformants of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Plant Physiol* **120**, 599-604.
- Grossman, A.R. & D.M. Kehoe (1997).** Phosphorelated control of phycobilisome biogenesis during complementary chromatic adaptation. *Photosynth Res* **53**, 95-108.
- Hahn, F.M., J.A. Baker & C.D. Poulter (1996).** Open reading frame 176 in the photosynthesis gene cluster of *Rhodobacter capsulatus* encodes idi, a gene for isopentenyl diphosphate isomerase. *J Bacteriol* **178**, 619-624.

- Havaux, M. (1998).** Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends Plant Sci* **3**, 147-151.
- Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak & P.M. Williams (1996).** Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6**, 986-994.
- Herranen, M., E.M. Aro & T. Tyystjarvi (2001).** Two distinct mechanisms regulate the transcription of photosystem II genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Physiol Plant* **112**, 531-539.
- Hertzberg, S. & S. Liaaen-Jensen (1971).** The carotenoids of blue-green algae. *Phytochemistry* **10**, 3121-3127.
- Hirayama, O., K. Nakamura, S. Hamada & Y. Kobayasi (1994).** Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. *Lipids* **29**, 149-150.
- Ho, S.N., H.D. Hunt, R.M. Horton, J.K. Pullen & L.R. Pease (1989).** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.
- Hoff, W.D., H.C.P. Matthijs, H. Schubert, W. Crielaard & K.J. Hellingwerf (1995).** Rhodopsin(s) in eubacteria. *Biophys Chem* **56**, 193-199.
- Horton, P. (1996).** Nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. In Light as an energy source and information carrier in plant physiology., R.C. Jennings, G. Zuccelli, F. Ghatti & G. Colombetti, eds (New York: Plenum Press), pp. 99-111.
- Jürgens, U.J. & J. Weckesser (1986).** Polysaccharide covalently linked to the peptidoglycan of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6714. *J Bacteriol* **168**, 568-573.
- Kajiwara, S., P.D. Fraser, K. Kondo & N. Misawa (1997).** Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem J* **324** ( Pt 2), 421-426.
- Kaneko, T. & S. Tabata (1997).** Complete genome structure of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol* **38**, 1171-1176.

- Kitajima, M. & W.L. Butler (1975).** Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim Biophys Acta* **376**, 105-115.
- Krause, G.H. & W. E. (1991).** Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 313-349.
- Krieger-Liszkay, A. & A.W. Rutherford (1998).** Influence of herbicide binding on the redox potential of the quinone acceptor in photosystem II: relevance to photodamage and phytotoxicity. *Biochemistry* **37**, 17339-17344.
- Krinsky, N.I. & S.M. Deneke (1982).** Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. *J Natl Cancer Inst* **69**, 205-210.
- Krinsky, N.I. & K.J. Yeum (2003).** Carotenoid-radical interactions. *Biochem Biophys Res Commun* **305**, 754-760.
- Lagarde, D. & W. Vermaas (1999).** The zeaxanthin biosynthesis enzyme  $\beta$ -carotene hydroxylase is involved in myxoxanthophyll synthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett* **454**, 247-251.
- Li, H. & L.A. Sherman (2000).** A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *J Bacteriol* **182**, 4268-4277.
- Li, R. & S.S. Golden (1993).** Enhancer activity of light responsive regulatory elements in the untranslated leader regions of cyanobacterial *psbA* genes. *Proc. Natl. Sci. USA* **90**, 11678-11682.
- Lichtenthaler, H.K. (2000).** Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors. *Biochem Soc Trans* **28**, 785-789.
- Mann, V., I. Pecker & J. Hirschberg (1994).** Cloning and characterization of the gene for phytoene desaturase (Pds) from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Mol Biol* **24**, 429-434.



- Marraccini, P., C. Cassier-Chauvat, S. Bulteau & F. Chauvat (1994).** Light-regulated promoters from *Synechocystis* PCC 6803 share a consensus motif involved in photoregulation. *Mol Microbiol* **12**, 1005-1012.
- Martinez-Ferez, I.M., B. Fernandez-Gonzalez, G. Sandmann & A. Vioque (1994).** Cloning and expression in *E. coli* of the gene coding for phytoene synthase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim Biophys Acta* **1218**, 145-152.
- Masamoto, K., H. Wada, T. Kaneko & S. Takaichi (2001).** Identification of a gene required for cis-to-trans carotene isomerization in carotenogenesis of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **42**, 1398-1402.
- Mattoo, A.K., U. Pick, A. Hoffmann-Falk & M. Edelman (1984).** Regulation of protein metabolism: Coupling of photosynthetic electron transport to *in vivo* degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1380-1384.
- Messing, J. (1983).** New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol* **101**, 20-78.
- Miller, B., T. Heuser & W. Zimmer (2000).** Functional involvement of a deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene harboring locus of *Synechococcus leopoliensis* in isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett* **481**, 221-226.
- Misawa, N., Y. Satomi, K. Kondo, A. Yokoyama, S. Kajiwar, T. Saito, T. Ohtani & W. Miki (1995).** Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J Bacteriol* **177**, 6575-6584.
- Miskiewicz, E., A.G. Ivanov, J.P. Williams, M.U. Khan, S. Falk & N.P. Huner (2000).** Photosynthetic acclimation of the filamentous cyanobacterium, *Plectonema boryanum* UTEX 485, to temperature and light. *Plant Cell Physiol* **41**, 767-775.
- Mohamed, A., J. Eriksson, H.D. Osiewacz & C. Jansson (1993).** Differential expression of the psbA genes in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Mol Gen Genet* **238**, 161-168.
- Mortensen, A., L.H. Skibsted & T.G. Truscott (2001).** The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Arch Biochem Biophys* **385**, 13-19.

- Mullineaux, C.W. (2001).** How do cyanobacteria sense and respond to light? *Molecular Microbiology* **41**, 965-971.
- Mutsuda, M.T., T. Ishikawa, T. Takeda & S. Shigeoka (1996).** The catalase-peroxidase of *Synechococcus* sp. PCC 7942: purification, nucleotide sequence analysis and expression in *Escherichia coli*. *Biochem J* **316**, 251-257.
- Nakamura, Y., T. Kaneko, M. Hirose, N. Miyajima & S. Tabata (1998).** CyanoBase, a www database containing the complete nucleotide sequence of the genome of *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Nucleic Acids Res* **26**, 63-67.
- Navarro, F., E. Martin-Figueroa & F.J. Florencio (2000).** Electron transport controls transcription of the thioredoxin gene (*trxA*) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol* **43**, 23-32.
- Neudert, U., I.M. Martinez-Ferez, P.D. Fraser & G. Sandmann (1998).** Expression of an active phytoene synthase from *Erwinia uredovora* and biochemical properties of the enzyme. *Biochim Biophys Acta* **1392**, 51-58.
- Neuschaefter-Rube, O., M. Westermann, M. Bluggel, H.E. Meyer & A. Ernst (2000).** The blue-colored linker polypeptide L55 is a fusion protein of phycobiliproteins in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain BO 8402. *Eur J Biochem* **267**, 3623-3632.
- Niyogi, K.K., A.R. Grossman & O. Bjorkman (1998).** Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* **10**, 1121-1134.
- Öquist, G., D. Campbell, A.K. Clarke & P. Gustafsson (1995).** The cyanobacterium *Synechococcus* modulates PS II function in response to excitation stress through D1 exchange. *Photosynth Res* **46**, 151-158.
- Paulsen, H. (1999).** Carotenoids and the assembly of light-harvesting complexes. In *Advances in Photosynthesis*, Govindjee, ed (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. 123-135.
- Peschek, G.A. (1987).** Respiratory electron transport. In *The Cyanobacteria*, P. Fay & C. Van Baalen, eds (New York: Elsevier), pp. 119-161.

- Putnoky, P., G.B. Kiss, I. Ott & A. Kondorosi (1983).** Tn5 Carries a Streptomycin Resistance Determinant Downstream from the Kanamycin Resistance Gene. *Mol Gen Genet* **191**, 288-294.
- Rippka, R., J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman & R.Y. Stanier (1979).** Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol* **111**, 1-61.
- Robertson, B.R., N. Tezuka & M.M. Watanabe (2001).** Phylogenetic analysis of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 861-871.
- Rohdich, F., S. Hecht, K. Gartner, P. Adam, C. Krieger, S. Amslinger, D. Arigoni, A. Bacher & W. Eisenreich (2002).** Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1158-1163.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. (1989).** Molecular cloning, a laboratory manual. (New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Sandmann, G. (1989).** Inhibition of carotenoid biosynthesis by herbicides. In Target Sites of Herbicide Action, P. Böger & G. Sandmann, eds (Boca Raton FL, USA: CRC Press), pp. 25-44.
- Sandmann, G. (1994a).** Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur J Biochem* **223**, 7-24.
- Sandmann, G. (1994b).** Phytoene Desaturase - Genes, Enzymes and Phylogenetic Aspects. *J. Plant Physiol.* **143**, 444-447.
- Sandmann, G. (2002).** Molecular evolution of carotenoid biosynthesis from bacteria to plants. *Physiologia Plantarum* **116**, 431-440.
- Sandmann, G., M. Kuhn & P. Böger (1993).** Carotenoids in photosynthesis - protection of D1 degradation in the light. *Photosynth. Res.* **35**, 185-190.

- Schaefer, M.R. & S.S. Golden (1989).** Differential expression of members of a cyanobacterial psbA gene family in response to light. *J Bacteriol* **171**, 3973-3981.
- Schmitz, O., M. Katayama, S.B. Williams, T. Kondo & S.S. Golden (2000).** CikA, a bacteriophytochrome that resets the cyanobacterial circadian clock. *Science* **289**, 765-768.
- Schreiber, U., U. Schliwa & W. Bilger (1986).** Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* **10**, 51-62.
- Shestakov, S.V. & N.T. Khyen (1970).** Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Mol Gen Genet* **107**, 372-375.
- Sidler, W.A. (1994).** Phycobilisomes and Phycobiliprotein Structures. In *Advances in Photosynthesis*, D.A. Bryan, ed (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. 139-216.
- Siefermann-Harms, D. (1987).** The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol. Plant.* **69**, 561-568.
- Simons, R.W. & N. Kleckner (1988).** Biological regulation by antisense RNA in prokaryotes. *Annu Rev Genet* **22**, 567-600.
- Sippola, K. & E.M. Aro (1999).** Thiol redox state regulates expression of psbA genes in *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Plant Mol Biol* **41**, 425-433.
- Sippola, K. & E.M. Aro (2000).** Expression of psbA genes is regulated at multiple levels in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Photochem Photobiol* **71**, 706-714.
- Sprenger, G.A., U. Schorken, T. Wiegert, S. Grolle, A.A. De Graaf, S.V. Taylor, T.P. Begley, S. Bringer-Meyer & H. Sahm (1997).** Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12857-12862.

- Steiger, S., L. Schäfer & G. Sandmann (1999).** High-light-dependant upregulation of carotenoids and their antioxidative properties in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *J Photochemistry and Photobiology B: Biology* **52**, 14-18.
- Subczynski, W.K., E. Markowska & J. Siewiewsiuk (1991).** Effect of polar carotenoids on the oxygen diffusion-concentration product in lipid bilayers. An EPR spin label study. *Biochim Biophys Acta* **1068**, 68-72.
- Tichy, M. & W. Vermaas (1999).** In vivo role of catalase-peroxidase in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **181**, 1875-1882.
- Trebst, A. & B. Depka (1997).** Role of carotene in the rapid turnover and assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* **400**, 359-362.
- Tyystjarvi, T., P. Mulo & P. Mäenpää (1996).** D1 polypeptide degradation may regulate psbA gene expression at transcriptional and translational levels in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth Res* **47**, 111-120.
- Van Den Hoek, C. (1993).** Algen, Einführung in die Phykologie 3. Aufl. (Stuttgart: Georg Thieme Verlag).
- Van Der Plas, J., H. Hegeman, G. De Vrieze, M. Tuyl, M. Borrias & P. Weisbeek (1990).** Genomic integration system based on pBR322 sequences for the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942: transfer of genes encoding plastocyanin and ferredoxin. *Gene* **95**, 39-48.
- Vener, A.V., I. Ohad & B. Andersson (1998).** Protein phosphorylation and redox sensing in chloroplast thylakoids. *Curr Opin Plant Biol* **1**, 217-223.
- White, T.C. (1989).** The polymerase chain reaktion. *Trends in Genetics* **5**, 185-188.
- Windhövel, U., S. Gatzek & P. Böger. (1995).** A foreign phytoen synthase gene modifies the photosynthesis rate of *Synechococcus* PCC 7942. (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers).
- Windhövel, U., G. Sandmann & P. Böger (1999).** Genetic engineering of resistance to bleaching herbicides affecting phytoene desaturase and lycopene cyclase in cyanobacterial carotenogenesis. *Pest. Biochem. Physiol.* **57**, 68-78.

- Windhövel, U., B. Geiges, G. Sandmann & P. Böger (1994).** Expression of *Erwinia uredovora* phytoene desaturase in *Synechococcus* PCC7942 leading to resistance against a bleaching herbicide. *Plant Physiol* **104**, 119-125.
- Woodall, A.A., S.W. Lee, R.J. Weesie, M.J. Jackson & G. Britton (1997).** Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. *Biochim Biophys Acta* **1336**, 33-42.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira & J. Messing (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yoshihara, S., F. Suzuki, H. Fujita, X.X. Geng & M. Ikeuchi (2000).** Novel putative photoreceptor and regulatory genes required for the positive phototactic movement of the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **41**, 1299-1304.
- Zhu, C., S. Yamamura, M. Nishihara, H. Koiwa & G. Sandmann (2003).** cDNAs for the synthesis of cyclic carotenoids in petals of *Gentiana lutea* and their regulation during flower development. *Biochim Biophys Acta* **1625**, 305-308.

## 4 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Sandmann für das interessante Thema dieser Arbeit und für die Hilfe bei Fragen, die in Zusammenhang mit ihrer Bewältigung auftauchten.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Feierabend, der die Aufgabe des Zweitgutachters übernommen hat.

Frau Dr. Manuela Sandmann danke ich für die gute Betreuung zu Beginn dieser Arbeit und zur Hilfe bei den Real Time PCR-Experimenten.

Dem ganzen Arbeitskreis von Prof. Dr. Sandmann danke ich für das sehr gute Arbeitsklima das gute Teamwork und die vielen schönen Stunden „im und ums Labor“.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Sabine Steiger für die vielen fruchtbaren dienstlichen und privaten Diskussionen, für das Korrekturlesen dieser Arbeit und zauberhaften Cappuccino, Tanja Geerjets für das Korrekturlesen dieser Arbeit, Martin Feußner für das tadellose Computernetzwerk im AK und die vielen „bundesligatauglichen“ Gespräche und Per Stickforth ...“Yeah! - oben unterm Dach...!“

und ein ganz besonderes Dankeschön an die ehemalige gute Fee der Arbeitsgruppe, Frau Marianne Flechsel.

## 5 Lebenslauf

Lutz Schäfer

geb. 12.07.71 in Frankfurt am Main

ledig

Burgstrasse 138

D – 60389 Frankfurt

Tel: +49 69 46999383

Mobil: 0160 8841008

E-mail: L.schaefer@em.uni-frankfurt.de



### BERUFLICHER WERDEGANG

---

04 / 2002 – 04 / 2003	Wissenschaftlicher Consultant bei science & network consulting für ein globales Projekt bei Aventis Pharma DI & O I/S
Projektmanagement	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Planung und Durchführung der Implementierung und Validierung einer pharmakologischen Statistiksoftware (WinNonLin) auf Windows Terminal Server, unter Verwendung von Validierungskonzepten von Price Waterhouse Cooper.</li> <li>• Anwender Support</li> <li>• Konzeption, Ausarbeitung und Durchführung der Anwenderschulungen in deutsch und englisch</li> <li>• Data Warehouse Konzepte – Rohdaten Management - Datenbanken</li> <li>• Qualitätssicherung nach GLP, 21 CFR Part 11</li> </ul>
10 / 1998 – 03 / 2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Botanik, Arbeitskreis Prof. Dr. G. Sandmann, J. W. Goethe Universität Frankfurt
06 / 1998 – 08 / 1998	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Botanik, Arbeitskreis Prof. Dr. J. Feierabend, J. W. Goethe Universität Frankfurt
studienbegleitend	Betreuung pflanzenphysiologischer Praktika als studentische Hilfskraft



studienbegleitend	Betreuung und Pflege von körperlich behinderten Menschen beim Club Behinderter und ihrer Freunde (CeeBeeEff)
studienbegleitend	Aushilfstätigkeit im Hotel Restaurant „Zur schönen Aussicht“ in Frankfurt am Main. Einsatzbereich: Buffet, Service und Rezeption.

## HOCHSCHULSTUDIUM

---

10 / 1998 – 01 / 2004	Promotionsstudium der Biologie im Institut für Botanik, Arbeitskreis Prof. Dr. Sandmann, J. W. Goethe Universität Frankfurt Abschluss: Dr. phil. nat (im Januar 2004) Dissertation: Regulation und Manipulation der Carotinoidbiosynthese in Cyanobakterien“
03 / 1998	Abschluss: Diplom Thema der Diplomarbeit: „Zur Rolle der Katalase beim Schutz von Glykolat Oxidase gegen Photoinaktivierung in Blättern und <i>in vitro</i> “
10 / 1992 – 03 / 1998	Biologiestudium an der J. W. Goethe Universität in Frankfurt am Main

## STUDIENSCHWERPUNKTE

---

Hauptfach:	Botanik (Biochemie, Physiologie und Molekularbiologie)
Nebenfächer:	Pharmakologie Mikrobiologie
Methoden:	Molekularbiologische Methoden insbesondere spezielle PCR-Techniken sowie Transformation von E. Coli und Cyanobakterien, chromatographische Trennverfahren, HPLC-Analytik Proteinreinigung

---

**VERÖFFENTLICHUNGEN**

---

Steiger S., Schäfer L. and Sandmann G. (1999)

High-light dependent upregulation of carotenoids and their antioxidative properties in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. J. Photochem. Photobiol. B.: Biol. 52, 14-18

Schäfer L. & Feierabend J. (2000)

Photoinactivation and protection of glycolate oxidase in vitro and in leaves. Zeitschrift für Naturforschung: 55 (5-6), 361-372

---

**ZIVILDIENT**

---

1991 – 1992

Frankfurter Verband für Alten- und Behindertenpflege e.V.

---

**SCHULABSCHLUSS**

---

06 / 1991

Abitur, Schule am Ried (Additive Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe) in Frankfurt

---

**FREMDSPRACHEN**

---

Englisch: fließend in Wort und Schrift  
Französisch: gute Kenntnisse

---

**EDV-KENNTNISSE**

---

MS Office, Microcal Origin, DNASIS, Corel Draw, DNA und Protein Datenbanken, Literatur Datenbanken, WinNonLin, NuGenesis Archive, NuGenesis Vision, Creon Lab Control

---

**FREIZEIT**

---

Literatur, Volleyball, Radfahren, Kanufahren,