

**Regulation des Gehaltes der osmoprotektiven
Substanz Glucosylglycerol im Cyanobakterium
Synechocystis sp. PCC 6803**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Marit Stirnberg

aus Hemer/Westf.

Köln, Mai 2006

Berichterstatter:

Prof. Dr. Reinhard Krämer

Prof. Dr. Thomas Langer

Tag der Disputation: 30. Juni 2006

Regulation des Gehaltes der osmoprotektiven Substanz Glucosylglycerol im Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 kann sowohl in Süßwasser- als auch in Seewasserhabitaten wachsen. Dabei ist unter hyperosmotischen Bedingungen die Akkumulation von Glucosylglycerol (GG) als osmoprotektive Substanz essentiell. Das Heterosid kann durch Aufnahme oder *de novo*-Synthese in hohen Konzentrationen im Cytoplasma akkumuliert werden, wobei es die Zelle vor einem Wasserverlust schützt, ohne Stoffwechselfunktionen negativ zu beeinflussen. Die Menge des akkumulierten GG entspricht in akklimatisierten Zellen der externen osmotischen Belastung und wird durch die Aktivität des Schlüsselenzyms der GG-Synthese (GgpS) reguliert. Als Regulator des GgpS-Proteingehaltes konnte durch Anwendung einer Transposomutagenese eine FtsH-Protease identifiziert werden, die für den Abbau von inaktivem GgpS-Protein zuständig ist. Dadurch konnte die Verbindung zwischen Protein-Qualitätskontrolle und Osmoregulation in Cyanobakterien erstmals aufgezeigt und auf der molekularen Ebene analysiert werden. Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit ein neuer Mechanismus charakterisiert, der eine stabile, salzabhängige GG-Syntheserate sicherstellt. Dabei ist die biochemische Modulation der Aktivität des GgpS-Enzyms von entscheidender Bedeutung. Mittels *in vitro*-Enzymtests konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des gereinigten GgpS-Proteins durch hohe Konzentrationen von GG, wie sie auch in der salzakklimatisierten Zelle vorliegen, und anderer osmoprotektiver Substanzen gehemmt werden konnte. Dies ließ sich auch unter *in vivo*-Bedingungen durch den hemmenden Effekt der Akkumulation von Trehalose durch Aufnahme bzw. *de novo*-Synthese nachweisen. Die durch erhöhte GG-Konzentrationen bedingte Hemmung der GgpS-Aktivität konnte durch steigende NaCl-Konzentrationen moduliert werden. Auf der Grundlage der erhaltenen Ergebnisse wurde ein Modell erstellt, in dem die GG-Syntheserate der externen Salzkonzentration angepasst und eine energetisch ungünstige Überproduktion an GG vermieden werden kann. Dabei stellt das GgpS-Protein zugleich Osmosensor und Osmoregulator dar.

Regulation of the steady state content of the compatible solute glucosylglycerol in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

The cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is able to survive in fresh water as well as sea water habitats. For growth under hyperosmotic conditions accumulation of the compatible solute glucosylglycerol (GG) is essential. By uptake or *de novo* synthesis high cytoplasmic concentrations of this heteroside are accumulated resulting in protection of the cell against dehydration without causing deleterious effects on cellular metabolism. In salt acclimated cells the concentrations of accumulated GG depends on the extent of the osmotic challenge and the main regulatory level is the adjustment of GgpS activity, the key enzyme of GG synthesis. Applying a transposon mutagenesis approach an FtsH protease was identified as a regulatory component of the GgpS protein level by degradation of inactive GgpS molecules. Thus, for cyanobacteria a link between protein quality control and osmoregulation was demonstrated and analyzed at the molecular level for the first time. Furthermore, a new mechanism was characterized ensuring salt dependent GG synthesis by modulation of the GgpS enzyme activity. Using *in vitro* enzyme assays it was shown that the activity of the recombinant protein was inhibited by high concentrations of GG, as observed in salt acclimated cells and by other osmoprotective compounds. Under *in vivo* conditions the same inhibitory effect was observed after accumulation of trehalose either through uptake or *de novo* synthesis. The inhibition of GgpS activity could be modulated by increasing salt concentrations. Based on these observations a model for GgpS activity control was proposed where the GG synthesis rate can be adjusted in dependence on external salinity and hence, energetically unfavourable overproduction of GG can be avoided. In this model the GgpS protein comprises properties of both an osmosensor and an osmoregulator.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Salzanpassung von <i>Synechocystis</i>	3
1.1.1 Die Komponenten der Osmoadaptation in <i>Synechocystis</i>	4
1.1.2 Die Regulation der GG-Synthese in <i>Synechocystis</i>	8
1.2 Möglicher Einfluss der Osmolytaufnahme auf die Osmolytsynthese.....	12
1.3 Mögliche Mechanismen für die Modulation der GgpS-Aktivität.....	15
1.4 Zielsetzung.....	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Organismen.....	19
2.2 Plasmide.....	20
2.3 Oligonukleotide.....	21
2.4 Kultivierungsbedingungen.....	22
2.4.1 Kultivierung von <i>Synechocystis</i>	22
2.4.2 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	24
2.5 Molekularbiologische Techniken.....	25
2.5.1 Isolierung genomischer DNA aus <i>Synechocystis</i>	25
2.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	25
2.5.3 Amplifizierung und Isolierung von Cosmid-DNA aus <i>E. coli</i>	26
2.5.4 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	26
2.5.5 Restriktion.....	26
2.5.6 Agarosegelelektrophorese.....	27
2.5.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	27
2.5.8 Ligation.....	27
2.5.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
2.5.10 PCR Kolonie-Screening von <i>E. coli</i>	29
2.5.11 PCR Kolonie-Screening von <i>Synechocystis</i>	29
2.5.12 DNA-Sequenzanalyse.....	29
2.5.13 Isolierung von RNA aus <i>Synechocystis</i>	30
2.5.14 Konzentrationsbestimmung von RNA.....	31
2.5.15 Northern Blot (RNA/RNA-Hybridisierung).....	31
2.6 Techniken zur Manipulation von Zellen.....	33

2.6.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	33
2.6.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	33
2.6.3	Herstellung von <i>Synechocystis</i> -Insertionsmutanten.....	33
2.6.4	Herstellung von <i>Synechocystis</i> -Expressionsmutanten.....	34
2.6.5	Transformation von <i>Synechocystis</i>	34
2.6.6	Transposonmutagenese von <i>Synechocystis</i> -Zellen.....	35
2.7	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> zur Reinigung von rekombinantem GgpS-Protein.....	36
2.8	Proteinbiochemische Methoden.....	37
2.8.1	Extraktion cytoplasmatischer Proteine aus <i>E. coli</i> bzw. <i>Synechocystis</i>	37
2.8.2	Herstellung von invertierten Membranvesikeln aus <i>Synechocystis</i>	37
2.8.3	Proteinbestimmung.....	37
2.8.4	Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
2.8.5	Coomassie-Färbung.....	38
2.8.6	Western Blot.....	38
2.8.7	Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE).....	39
2.8.2	Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF-MS.....	40
2.9	Enzymtest zur Bestimmung der GgpS-Aktivität.....	40
2.9.1	Bestimmung der GgpS-Aktivität durch Detektion des gebildeten GG.....	41
2.9.2	Bestimmung der GgpS-Aktivität durch Detektion des gebildeten ADP.....	41
2.10	Enzymtest zur Bestimmung der FtsH-Aktivität.....	43
2.11	Nachweis niedermolekularer Substanzen mittels Gaschromatographie.....	43
3.	Ergebnisse	45
3.1	Die Ebene der Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen.....	45
3.2	Die Rolle des GG-Aufnahmesystems bei der Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen.....	48
3.2.1	Einfluss des Transports osmoprotektiver Substanzen auf die GG-Synthese.....	49
3.2.2	Einfluss der Synthese osmoprotektiver Substanzen auf die GG-Synthese.....	52
3.3	Identifizierung regulatorisch wirksamer Proteine der GG-Synthese.....	56
3.3.1	<i>In vitro</i> -Transposonmutagenese von <i>Synechocystis</i>	58
3.3.2	Selektion GG überproduzierender Mutanten.....	59
3.3.3	Genetische Charakterisierung GG überproduzierender Mutanten.....	62
3.3.4	Physiologische Charakterisierung GG überproduzierender Mutanten.....	64
3.4	Einfluss der Proteindegradation auf die GG-Synthese.....	66

3.4.1	Wachstum der FtsH-Mutante <i>slr0228::Km^R</i> nach einem Salzschock.....	67
3.4.2	Proteomanalyse der salzakklimatisierten FtsH-Mutante <i>slr0228::Km^R</i>	68
3.4.3	Charakterisierung der salzakklimatisierten FtsH-Mutante <i>slr0228::Km^R</i>	73
3.5	Identifizierung regulatorisch wirksamer Substanzen der GG-Synthese.....	77
4.	Diskussion	81
4.1	Die biochemische Modulation der GgpS-Aktivität vermittelt die „steady state“- Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen.....	81
4.2	Das GG-Aufnahmesystem spielt bei der Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen keine direkte Rolle.....	83
4.3	Die membrangebundene FtsH-Protease Slr0228 wurde als regulatives Element der GG-Synthese identifiziert.....	86
4.4	Die Proteindegradation beeinflusst die GG-Synthese.....	90
4.5	Der GG-Gehalt moduliert salzabhängig die Aktivität des GgpS-Proteins.....	101
4.6	Hypothetisches Modell für den Mechanismus einer salzabhängigen GG- Syntheserate in akklimatisierten <i>Synechocystis</i> -Zellen.....	103
5.	Zusammenfassung	106
6.	Literaturverzeichnis	108
7.	Anhang	121

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ad	auf, bis (hinzufügen)
ADP	Adenosin-5`-diphosphat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
Carb	Carbenicillin
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CIA	Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)
Cm	Chloramphenicol
CSPD	Dinatrium-3-(4-methoxyspiro(1,2-dioxymethan-3,2-[5`-chloro]-tricyclodecan-4-yl)phenylphosphat
DCMU	3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylharnstoff (-dimethylurea)
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DIG	Digoxygenin
DNA	Dexoyribonukleinsäure
dNTP	Dexoynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ϵ	Extinktionskoeffizient
G	Guanin
G3P	Glycerol-3-phosphat
GG	Glucosylglycerol
GGP	Glucosylglycerolphosphat
GgpP	Glucosylglycerolphosphat-Phosphatase
GgpS	Glucosylglycerolphosphatsynthase
H ⁺	Proton

IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-Galaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDA	Kilodalton
Km	Kanamycin
K_M	Michealis-Menten-Konstante
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulfonat
mRNA	messenger RNA
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilylfluor(o)acetamid
NAD(P)H	Nikotinamidadenindinukleotid(-phosphat)
NBT	p-Nitrotetrazoliumblauschlorid
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
Orf	offener Leserahmen
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG 600	Polyethylenglykol 600
PEP	Phosphoenolpyruvat
pI	isoelektrischer Punkt
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spec	Spectinomycin
StpA	„salt tolerant“ Protein
T	Thymin
TES	N-tris(Hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
(v/v)	Volumenanteile pro Volumeneinheit
(w/v)	Gewichtsanteile pro Volumeneinheit
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid

Es wurden die üblichen Abkürzungen des “Internationalen Einheitssystems” (Système international d’Unités, SI) verwendet.

1. Einleitung

Mikroorganismen sind in der Umwelt ständig wechselnden Einflüssen wie z.B. der Änderung der Konzentration osmotisch aktiver Substanzen im Habitat ausgesetzt. Für das Überleben von Einzellern ist deshalb die Regulation des zellulären Wassergehaltes von entscheidender Bedeutung. Das Wasserpotential ist die quantitative Beschreibung der freien Energie des Wassers und bestimmt das Volumen der Zelle und dessen inneren Druck, Turgor genannt. Für die Betrachtung von Einzellern setzt sich das Wasserpotential Ψ_W aus der Summe von osmotischem Potential, Druckpotential und Matrixpotential zusammen.

$$\Psi_W = \Psi_S + \Psi_P + \Psi_M$$

Das osmotische Potential Ψ_S beschreibt den Effekt gelöster Substanzen auf das Wasserpotential. Gelöste Stoffe setzen das Wasserpotential des Wassers herab, weshalb das osmotische Potential ein negatives Vorzeichen besitzt. Das osmotische Potential kann durch die van't Hoffsche Gleichung abgeschätzt werden.

$$\Psi_S = -RTc_S$$

R stellt in dieser Gleichung die allgemeine Gaskonstante, T die Temperatur und c_S die Konzentration aller gelösten osmotisch aktiven Stoffe, ausgedrückt als Osmolarität, dar. Da aber bei biologisch relevanten Konzentrationen die Wechselwirkungen der gelösten Teilchen untereinander ebenfalls eine Rolle spielt, muss ihre Aktivität berücksichtigt werden. Dies geschieht durch die Verwendung der Osmolalität, die nicht errechnet, sondern nur gemessen werden kann. Das Druckpotential Ψ_P beschreibt den hydrostatischen Druck innerhalb einer Zelle und wird auch Turgor genannt. Es besitzt ein positives Vorzeichen und wirkt durch elastische Eigenschaften der Zellhülle dem Wassereinstrom in die Zelle entgegen. Das Matrixpotential Ψ_M besitzt ein negatives Vorzeichen und beschreibt die Reduktion der freien Energie des Wassers durch dessen Bindung an strukturelle Bestandteile der Zelle. Es ist häufig vernachlässigbar.

Eine Bakterienzelle besitzt unter normalen Bedingungen im Vergleich zu ihrer Umwelt ein negativeres Wasserpotential, da Aminosäuren, Zucker, Ionen und andere Substanzen intern akkumuliert werden und osmotisch aktiv sind. Das umgebende Medium hat dagegen ein höheres Wasserpotential, da die Konzentration gelöster Stoffe geringer ist. Das Wasser strömt

entlang des Wasserpotentialgradienten in die Zelle ein. Der Turgor baut sich auf und wird von der Cytoplasmamembran im Zusammenspiel mit der äußeren Hülle abgefangen. Für Gram-positive Bakterien beträgt der Turgordruck etwa 20 bar (Whatmore *et al.*, 1990), für Gram-negative etwa 1-5 bar (Csonka und Epstein, 1996). Dieser Turgordruck ist für das Wachstum essentiell. Dabei diffundiert das Wasser nicht nur durch die Lipiddoppelschicht der Cytoplasmamembran, sondern strömt vornehmlich durch spezifische Wasserkanäle, sogenannte Aquaporine, die einen schnellen und selektiven Durchtritt erlauben (Calamita, 2000).

Sowohl pro- als auch eukaryontische Organismen haben Strategien entwickelt, um zu verhindern, dass die Zellen bei wechselnden osmotischen Bedingungen bersten oder austrocknen. Die einsetzende Regulation des internen Wasserpotentials wird als Osmoadaptation bezeichnet. Erhöht sich das externe Wasserpotential z.B. durch Verdünnung des Mediums stark, tritt Wasser in die Zelle ein. Es kommt zu einem hypoosmotischen Schock, der mit dem Abbau bzw. der Abgabe von Osmolyten beantwortet wird, um das Bersten der Zelle zu verhindern. Erniedrigt sich das externe Wasserpotential z.B. durch steigende Salzgehalte, liegt ein hyperosmotischer Schock vor. Dem Wasserausstrom aus der Zelle kann durch die Akkumulation von Osmolyten entgegengewirkt werden.

Die häufigste osmotische Herausforderung stellt die Anpassung an erhöhte Salzkonzentrationen dar, wobei Bakterien zwei verschiedene Strategien entwickelt haben (Galinski und Trüper, 1994). Einige Eubakterien und Archaeobakterien, aerobe *Halobacteriales* und die *Haloanaerobiales*, tolerieren hohe Ionenkonzentrationen im Cytoplasma durch spezielle Adaptationen des Stoffwechsels, die im Laufe der Evolution entstanden sind („salt in“-Strategie). Diese Strategie erlaubt den Bakterien ein Leben in Habitaten mit extrem hohen Salzkonzentrationen (Madigan und Oren, 1999). Die Mehrzahl der Bakterien, wie auch Cyanobakterien, aber auch eukaryontische Zellen sind allerdings bestrebt, die Ionenkonzentration im Cytoplasma gering zu halten („salt out“-Strategie). Ein entsprechend geringes Wasserpotential wird durch die Aufnahme oder Synthese niedermolekularer Substanzen, die als kompatibel oder osmoprotektiv bezeichnet werden, erzeugt. Osmoprotektive Substanzen können Aminosäuren (Prolin), Aminosäurederivate (Ectoin, Prolinbetain, Glutamatbetain), Methylamine (Glycinbetain), schwefelhaltige Amine (Dimethylsulfonium-Propionat), Polyole (Glycerol, Glucosylglycerol) oder Zucker (Trehalose, Saccharose) sein. Da sie keine Nettoladung tragen, gut in Wasser löslich, osmotisch aktiv sowie chemisch inert sind, können sie in hoher Konzentration im Cytoplasma akkumuliert werden und das Wasserpotential erniedrigen. Weiterhin werden sie aus der

Hydrathülle von Proteinen und Membranen ausgeschlossen und fördern dadurch deren Stabilität (Bremer und Krämer, 2000). Ionen zerstören hingegen meist die Hydrathülle von Proteinen und Membranen und begünstigen damit deren Denaturierung.

1.1 Die Salzanpassung von *Synechocystis*

Im Folgenden werden die Grundzüge der Osmoadaptation des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 dargestellt. Die Begriffe Salzchock oder hyperosmotischer Schock beschreiben im Folgenden die Applizierung von Salzstress durch die Zugabe von NaCl. Mit salzakklimatisierten Zellen sind Zellen gemeint, die sich an höhere Salzkonzentrationen angepasst haben und deren Wachstum mit stabiler Rate erfolgt.

Cyanobakterien sind in der Natur in terrestrischen, Süßwasser- und Meeresbiotopen weit verbreitet. Sie sind im Allgemeinen aufgrund vielfältiger Anpassungsstrategien tolerant gegenüber verschiedensten Umwelteinflüssen, weshalb sie oft die dominanten oder einzigen oxygenen phototrophen Mikroorganismen an extremen Standorten sind. Sie bieten somit die Möglichkeit des Studiums vielfältiger Anpassungsprozesse an verschiedene Umweltbedingungen. Viele dieser Untersuchungen wurden an dem Stamm *Synechocystis* sp. PCC 6803 (im Folgenden *Synechocystis* genannt) durchgeführt, da dieser Stamm eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von Fremd-DNA sowie ein gutes Rekombinationsvermögen aufweist. Von großem Vorteil ist, dass die Sequenz des Genoms seit 1996 bekannt ist (Kaneko *et al.*, 1996) und viele gut charakterisierte Mutanten vorliegen. Die Zellen des den *Chroococcales* zugeordneten Bakteriums weisen einen Durchmesser von 2-3 µm auf, sind beweglich und besitzen keine Gasvakuolen. *Synechocystis* kann sowohl photoautotroph als auch photoheterotroph wachsen, aber keinen Stickstoff fixieren.

Hinsichtlich ihrer Osmoadaptation sind Cyanobakterien in den letzten Jahren intensiv erforscht worden. Voraussetzung für das Überleben an Standorten mit wechselnden Bedingungen ist vor allem die Anpassung an verschiedene Salzgehalte. Das beinhaltet die Reizwahrnehmung des hypo- bzw. hyperosmotischen Stresses und die Vermittlung des Reizes zur Expression osmotisch regulierter Gene und zur Aktivierung osmotisch regulierter Proteine. Von Reed *et al.* (1986) wurde eine Einteilung der Cyanobakterien vorgenommen, bei der der Grad der Salztoleranz des jeweiligen Organismus mit der Art der akkumulierten osmoprotektiven Substanz korreliert. Nach dieser Einteilung akkumulieren gering

halotolerante Stämme Saccharose und Trehalose und können damit Salzkonzentrationen bis zu 0,7 M NaCl tolerieren. Cyanobakterien mit moderater Salztoleranz synthetisieren Glucosylglycerol und können NaCl-Konzentrationen bis max. 1,8 M tolerieren. Die halotolerantesten Cyanobakterienstämme akkumulieren vorrangig Glycin- oder Glutamatbetain und können in Medien mit Konzentrationen bis zu 2,7 M NaCl überleben. Die Akkumulation von Aminosäuren spielt in der cyanobakteriellen Salzanpassung keine bedeutende Rolle. Nomura *et al.* (1995) und Deshnum *et al.* (1995) zeigten, dass nach der Übertragung bakterieller Gene, die für die Enzyme der Glycinbetainsynthese kodieren, eine Verbesserung der Salztoleranz in dem Saccharose akkumulierenden Stamm *Synechococcus* sp. PCC 7942 erreicht werden konnte. Obwohl *Synechocystis* ursprünglich aus einem Süßwasserhabitat in Kalifornien isoliert wurde, handelt es sich bei diesem Stamm um ein moderat halotolerantes Cyanobakterium, das Salzkonzentrationen von bis zu 1,2 M NaCl (7%) toleriert.

1.1.1 Die Komponenten der Osmoadaptation in *Synechocystis*

Wie bei den meisten anderen Bakterien, so auch bei den bezüglich der Osmoadaptation gut untersuchten Organismen *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*, kann die Reaktion von *Synechocystis* auf einen hyperosmotischen Salzstress in drei Phasen eingeteilt werden (Reed *et al.*, 1985a). In der ersten Phase unmittelbar nach einem Salzschock kommt es durch die Differenz der osmotischen Potentiale von Cytoplasma und Medium zu einem Verlust von Wasser. Gleichzeitig dringen Na⁺- und Cl⁻-Ionen in die Zelle ein und üben eine toxische Wirkung auf den Zellstoffwechsel aus. In der zweiten Phase werden deshalb toxische Na⁺-Ionen gegen K⁺-Ionen ausgetauscht. Die dritte Phase stellt die Akkumulation osmoprotektiver Substanzen durch Aufnahme oder Synthese dar.

Im Folgenden werden die Komponenten beschrieben, die für die Osmoadaptation von *Synechocystis* nach einem hyperosmotischen Schock mit ionischen Substanzen wichtig sind. Sie sind in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt.

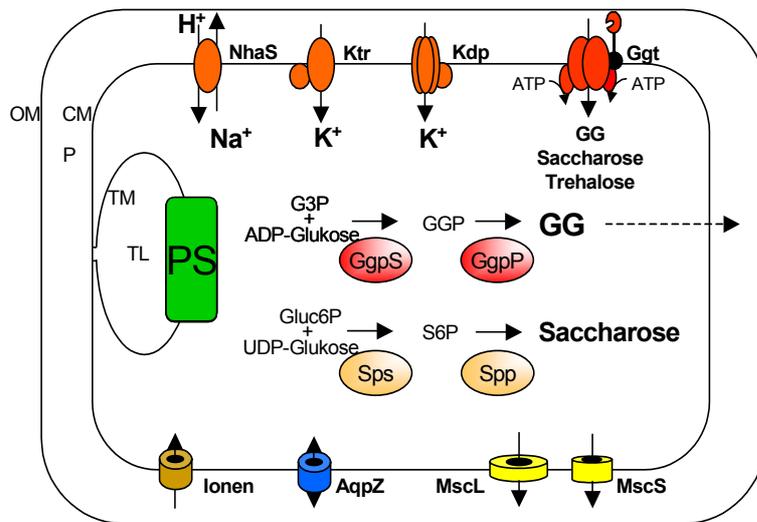


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der wichtigsten Komponenten der Salzanpassung in *Synechocystis*

OM: äußere Membran; CM: Cytoplasmamembran; P: Periplasma; TM: Thylakoidmembran; TL: Thylakoidlumen; PS: an der Photosynthese beteiligte Komponenten; G3P: Glycerol-3-Phosphat; Gluc6P: Glukose-6-Phosphat. Die Bezeichnung weiterer Komponenten ist im Text zu finden.

Der sehr schnelle Ausstrom von Wasser aus der Zelle unmittelbar nach einem Salzschock wird durch den schnellen Einstrom von Na^+ - und Cl^- -Ionen nach ca. 200 msec gestoppt. Das Wasser strömt wieder zurück ins Medium (Reed *et al.*, 1985a). Der Wasseraus- und -einstrom wird durch Aquaporine vermittelt (Shapiguzov *et al.*, 2005). Für das schnelle Eindringen der Na^+ - und Cl^- -Ionen sind wahrscheinlich Kanäle verantwortlich. Zwei für Kaliumkanäle kodierende Gene (*sll0536* und *sll0993*) wurden im Genom von *Synechocystis* annotiert. Ihre Rolle bei der Osmoadaptation ist ungeklärt, jedoch konnte für das verwandte Protein KcsA aus *Streptomyces coelicolor* die Funktion als Kaliumkanal und auch die Durchlässigkeit für Na^+ -Ionen gezeigt werden (Doyle *et al.*, 1998; LeMasurier *et al.*, 2001). Nach ca. 2 min ist die maximale Konzentration an Na^+ -Ionen im Cytoplasma erreicht und die Volumenregulation ist abgeschlossen (Blumwald *et al.*, 1983; Reed *et al.*, 1985a).

Nachdem die Na^+ - und Cl^- -Konzentration ihr Maximum erreicht hat, setzt die Aufnahme von K^+ -Ionen ein. Die Na^+ -Konzentration in der Zelle sinkt und erreicht nach 20-30 min einen Wert, wie er auch in akklimatisierten Zellen gemessen werden kann (Reed *et al.*, 1986). Die Unterbindung der K^+ -Aufnahme führt zum Verbleib der Na^+ -Ionen im Cytoplasma (Reed *et al.*, 1985b). Die Kaliumaufnahme findet auch unter Kontrollbedingungen statt, wird aber nach einem Salzschock aktiviert. Die Bedeutung der K^+ -Aufnahme als erste Anpassungsreaktion wird durch die Beobachtung bestätigt, dass sie auch nach einem osmotischen Schock mit nicht-ionischen Substanzen aktiviert wird (Reed und Stewart, 1985).

Die K^+ -Aufnahme ist abhängig vom Protonengradienten über der Cytoplasmamembran und wird ähnlich wie bei *B. subtilis* von einem Transporter vom Ktr-Typ durchgeführt (Berry *et al.*, 2003; Matsuda und Uozumi, 2006). In *Synechocystis* liegt jeweils eine Kopie des integralen Membranproteins KtrB (*slr1509*, *ntpJ*), der regulatorischen Komponente KtrA (*sll0493*) und der Komponente KtrE (*slr1508*) vor, die in keinem anderen Ktr-System zuvor gefunden werden konnte (Shibata *et al.*, 2002; Matsuda *et al.*, 2004). Das Ktr-System ähnelt funktionell dem Trk-System aus *E. coli*. Eine im *ntpJ*-Gen betroffene Mutante kann Salzkonzentrationen von über 300 mM NaCl nicht mehr tolerieren (Matsuda *et al.*, 2004; Matsuda und Uozumi, 2006). In Cyanobakterien wie auch in *B. subtilis* wird die Akkumulation von Kalium nicht von der Akkumulation von Glutamat wie in *E. coli* begleitet. Stattdessen verbleiben die Cl^- -Ionen im Cytoplasma (Reed *et al.*, 1985a).

Das auch in *Synechocystis* vorkommende ATP-abhängige Kdp-System besteht aus vier Membranproteinen (KdpA, KdpB, KdpC und KdpD). KdpD repräsentiert eine verkürzte Histidinkinase (Berry *et al.*, 2003). Das Kdp-System spielt aber keine bedeutende Rolle für die K^+ -Aufnahme nach einem Salzschock, da eine betreffende Mutante nicht salzsensitiv ist. (Berry *et al.*, 2003; Matsuda und Uozumi, 2006).

Der einsetzende Na^+ -Export wird wahrscheinlich, wie auch in anderen Bakterien, hauptsächlich durch Na^+/H^+ -Antiporter durchgeführt. In der Genomsequenz von *Synechocystis* wurden fünf Gene entdeckt, die als Na^+/H^+ -Antiporter annotiert wurden (*nhaS1-5*). Außer *NhaS3* konnten alle Transporter ausgeschaltet werden. Keine der erzeugten Mutanten wies jedoch einen salzsensitiven Phänotyp auf (Inaba *et al.*, 2001; Elanskaya *et al.*, 2002), was auf eine mögliche Redundanz dieser Systeme hinweist.

Die K^+ - und Cl^- -Konzentrationen im Cytoplasma sinken erst ca. 1 h nach einem Salzschock, wenn osmoprotektive Substanzen akkumuliert werden. Sie sind aber, wie auch die Na^+ -Konzentrationen, in akklimatisierten Zellen höher als unter Kontrollbedingungen und ab einem Schwellenwert von 300 mM NaCl im externen Medium abhängig von der externen NaCl-Konzentration (Blumwald *et al.*, 1983, Hagemann *et al.*, 1994).

Nach einem Salzschock akkumuliert *Synechocystis* die osmoprotektive Substanz Glucosylglycerol (im Folgenden GG genannt) und transient geringe Mengen Saccharose. Sind im umgebenden Medium Osmolyte verfügbar, kann *Synechocystis* über einen Transporter GG, Trehalose und Saccharose aufnehmen. Das GG-Aufnahmesystem Ggt gehört zu den ABC-Transportern und besteht aus vier Untereinheiten, wobei GgtA die ATP-bindende Einheit, GgtB das Substratbindeprotein und GgtC und GgtD die integralen Membranproteine darstellen (Mikkat *et al.*, 1996). Der Ausfall einer der vier Untereinheiten führt zum Verlust

der Transportaktivität. Neben GG kann auch mit etwas geringerer Affinität Saccharose und mit der geringsten Affinität Trehalose vom Substratbindeprotein erkannt und nachfolgend transportiert werden (Mikkat *et al.*, 1996; Mikkat *et al.*, 1997). Sowohl das *ggtA*-Gen als auch das *ggtBCD*-Operon werden nach einem Salzschock verstärkt transkribiert (Hagemann *et al.*, 1997; Mikkat und Hagemann, 2000). Für die Salztoleranz von Mutanten, die kein GG synthetisieren können, ist das Vorhandensein von GG und die Aktivität des Transporters Ggt ausreichend (Mikkat *et al.*, 1996). Aufgenommene Saccharose wird aufgrund einer vorhandenen Saccharase-Aktivität im Cytoplasma nicht in größeren Mengen akkumuliert (Mikkat *et al.*, 1997).

In Mineralmedium ist *Synechocystis* nach einem Salzschock in der Lage, in einer Zwei-Schritt-Reaktion GG *de novo* zu synthetisieren (Hagemann und Erdmann, 1994). Die Synthese erfolgt durch die enzymatische Kondensation von ADP-Glukose und Glycerol-3-Phosphat durch die Glucosylglycerolphosphat-Synthase GgpS und die anschließende Dephosphorylierung des Zwischenproduktes GG-Phosphat durch das Enzym Glucosylglycerolphosphat-Phosphatase GgpP, auch StpA genannt. Das GgpS-Protein stellt das Schlüsselenzym der GG-Synthese dar. Mutanten, die keine GG-Produktion mehr zeigen, sind im Mineralmedium salzsensitiv, wie z.B. die *ggpS⁻*-Mutante, die nicht in der Lage ist, ein aktives GgpS-Protein zu synthetisieren (Hagemann und Zuther, 1992; Hagemann *et al.*, 1996b; Marin *et al.*, 1998).

Die Synthese von Saccharose spielt in *Synechocystis* nach einem hyperosmotischen Schock nur eine untergeordnete Rolle, da sie nur in transient geringen Menge akkumuliert wird. Die Synthese von Saccharose ist bei Prokaryonten nur für Cyanobakterien bekannt (Lunn, 2002). Der erste Schritt der Synthese, die Kondensation von UDP-Glukose und Glukose-6-Phosphat, wird in *Synechocystis* durch die Saccharosephosphat-Synthase (Sps) katalysiert, während die Dephosphorylierung des Intermediats Saccharosephosphat durch die Saccharosephosphat-Phosphatase (Spp) katalysiert wird (Fieulaine *et al.*, 2005).

Nach einem hypoosmotischen Schock starken Ausmaßes (z.B. von 684 mM NaCl auf 18 mM NaCl) kommt es zur Abgabe der osmoprotektiven Substanz GG ins Medium. Da sich neben GG auch Aminosäuren und andere Kohlenhydrate unter den abgegebenen Komponenten befinden, kommt es wahrscheinlich zur unkontrollierten Abgabe durch mechanosensitive Kanäle (Fulda *et al.*, 1990). Jedoch konnte, anders als für *E. coli*, für *Synechocystis*-Mutanten, die kein aktives MscL- und MscS-Protein synthetisieren können, keine Verringerung der Überlebensrate nach einem hypoosmotischen Schock dokumentiert werden (Ribbeck, 2001).

Als Kaliumeffluxsystem könnte wie in *E. coli* ein Kef-Protein zur Verfügung stehen, denn im Genom von *Synechocystis* wurde das entsprechende Gen *slr1575* annotiert. Liegt ein hypoosmotischer Schock geringen Ausmaßes vor (z.B. von 684 mM NaCl auf 513 mM NaCl), so kann kein GG im Medium detektiert werden. Es scheint daher einen Abbauweg zu geben, der eventuell zum Glykogen führt.

Synechocystis stellt als phototrophes Bakterium eine Besonderheit dar. Der äußere Bereich des Cytoplasmas wird von Thylakoidmembranen durchzogen, wobei nicht klar ist, ob diese ein in sich geschlossenes Membransystem darstellen oder ein Kontinuum mit der Cytoplasmamembran bilden (Mullineaux, 1999). Die Annahme eines kontinuierlichen Membransystems wird durch neuere Befunde unterstützt, nach denen die Synthese in der Cytoplasmamembran stattfindet und sich ein Transport in die Thylakoidmembran anschließt (Zak *et al.*, 2001). Ob die Wasserströme im Zuge der Osmoadaptation in Richtung Medium und/oder dem Thylakoidlumen stattfinden ist unklar. Auch die Verteilung der osmoprotektiven Substanzen im Cytoplasma und Thylakoidlumen ist nicht verstanden.

1.1.2 Die Regulation der GG-Synthese in *Synechocystis*

Während die Komponenten, die an der Osmoadaptation beteiligt sind, für *Synechocystis* und viele andere Bakterien identifiziert sind, ist über den Mechanismus der Wahrnehmung des Salzstressses unmittelbar nach einem hyperosmotischen Schock und der „steady state“-Regulation der Synthese von osmoprotektiven Substanzen in akklimatisierten Bakterienzellen nur sehr wenig bekannt. *Synechocystis* stellt für diese Untersuchungen ein sehr gut geeignetes Modellsystem dar, da es im Gegensatz zu anderen Bakterien wie *E. coli*, *B. subtilis* oder *Corynebacterium glutamicum* nur ein Aufnahmesystem und ein *de novo*-Synthesesystem für osmoprotektive Substanzen besitzt. Im Folgenden wird beschrieben, was über die Regulation der GG-Synthese in *Synechocystis* zu Beginn dieser Arbeit bekannt war.

Unmittelbar nach einem hyperosmotischen Schock mit NaCl findet die Regulation der GG-Synthese sowohl auf der Ebene der Transkription des *ggpS*-Gens, welches das Schlüsselenzym GgpS kodiert, als auch durch biochemische Modulation von bereits in Kontrollzellen synthetisiertem GgpS-Protein statt (Marin *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Zweikomponentensysteme nicht an der Regulation der *ggpS*-Expression beteiligt sind (Marin *et al.*, 2003). Möglicherweise spielt der Sigmafaktor σ^F eine Rolle bei

der Induktion der *ggpS*-Genexpression, weil eine in diesem Sigmafaktor betroffene Mutante einen niedrigeren *ggpS*-Transkriptgehalt aufwies (Huckauf *et al.*, 2000; Marin *et al.*, 2002). Obwohl das GgpS-Protein in Kontrollzellen nachweisbar ist, zeigt es keine Aktivität, da GG nicht detektierbar ist (Abb. 1.2A). Zudem kann auch bei gehemmter Proteinbiosynthese bis zu 2 h nach einem hyperosmotischen Schock GG akkumuliert werden (Hagemann *et al.*, 1990; Hagemann *et al.*, 1996a). Die Steigerung der *ggpS*-Genexpression spielt somit in der ersten Phase nach einem Salzschock eine untergeordnete Rolle.

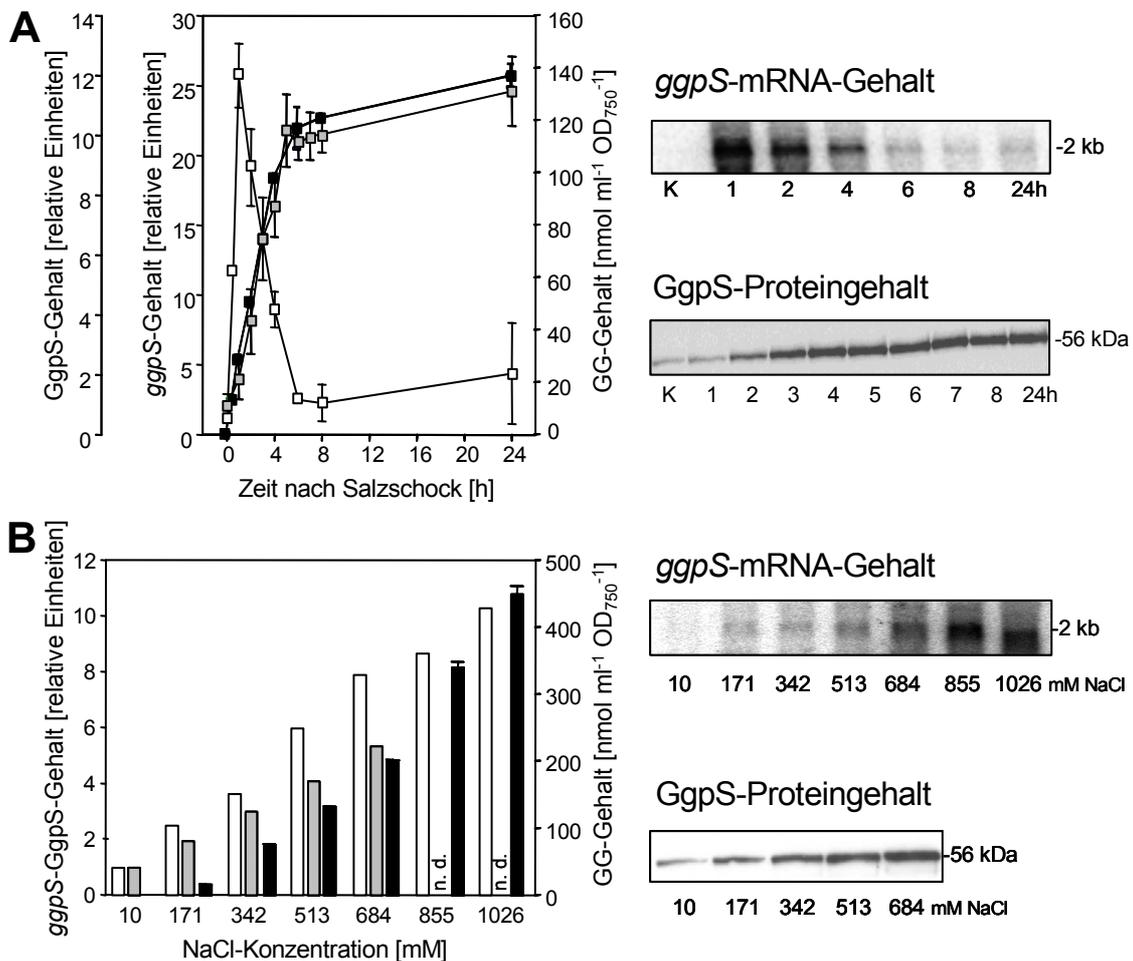


Abb. 1.2: Gehalt an *ggpS*-mRNA, GgpS-Protein und der osmoprotektiven Substanz GG in Zellen von *Synechocystis* nach einem Salzschock (A) bzw. nach Akklimationierung an verschiedene Salzkonzentrationen (B) nach Marin *et al.* (2002)

Der *ggpS*-mRNA-Gehalt (weiß) wurde durch Northern-Blot-Analysen, der GgpS-Proteingehalt (grau) durch Western-Blot-Analysen mit einem spezifischen Antikörper gegen GgpS und der interne GG-Gehalt (schwarz) von mit 684 mM NaCl geschockten Zellen (A) bzw. nach Akklimationierung an verschiedene Salzkonzentrationen (B) bestimmt.

Der Aktivierung von bereits vorhandenem GgpS-Protein kommt wahrscheinlich die wichtige Rolle der schnellen Anpassung an veränderte osmotische Bedingungen im Medium zu (Marin *et al.*, 2002). Die biochemische Modulation von Enzymaktivitäten scheint für die Induktion der Osmolytsynthese ein universelles Prinzip zu sein, denn sowohl die Trehalosesynthese in *E. coli* als auch die Prolinsynthese in *B. subtilis* wird nach einem hyperosmotischen Schock in Anwesenheit von Chloramphenicol aktiviert (Dinnbier *et al.*, 1988; Whatmore und Reed, 1990).

In *Synechocystis* besteht in der ersten Phase nach einem hyperosmotischen Schock keine unmittelbare Kopplung zwischen Transkription und Translation, wahrscheinlich als Folge einer geringeren Effizienz des Translationsapparates, da der anfängliche Anstieg des *ggpS*-mRNA-Gehaltes nicht direkt in einen gleichartigen Anstieg des GgpS-Proteingehaltes umgesetzt wird. Proteomanalysen von *Synechocystis*-Zellen unmittelbar nach einem Salzschock lassen auf eine stärkere Schädigung des Translationsapparates im Vergleich zum Transkriptionsapparat schließen (Fulda *et al.*, 2006). Dadurch erscheint die Bereitstellung von inaktivem GgpS-Protein unter Kontrollbedingungen für einen möglichen Salzschock sinnvoll. Die Modulation der GgpS-Aktivität als Reaktion auf sich verändernde NaCl-Konzentrationen kann auch *in vitro* in Zellextrakten von *Synechocystis* nachgestellt werden (Marin *et al.*, 1998; Schoor *et al.*, 1999; Hagemann *et al.*, 2001). Es wurde ein *in vitro*-GgpS-Enzymtest etabliert, der analog zum Biosyntheseweg von GG in *Synechocystis* abläuft (Schoor *et al.*, 1995). Eine Erhöhung der NaCl-Konzentration im Enzymtest führte bei Extrakten aus Zellen, die keiner erhöhten Salzkonzentration ausgesetzt waren, zur Aktivierung der GG-Synthese (Abb. 1.3).

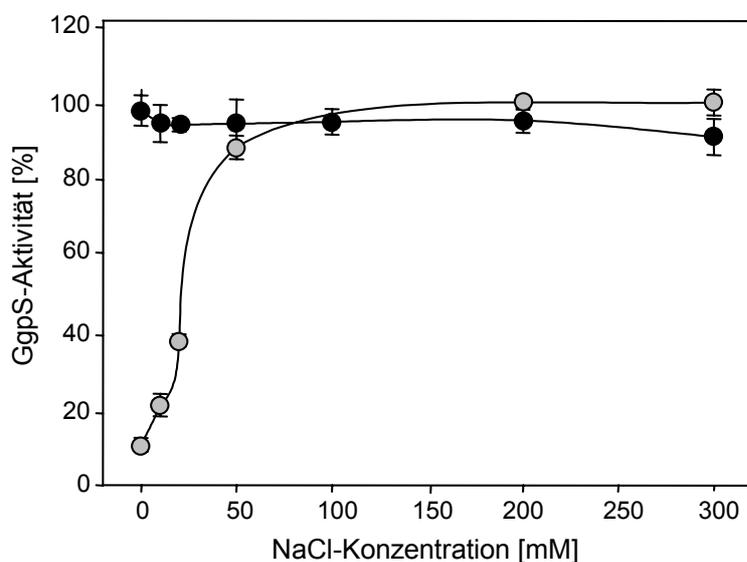


Abb. 1.3: Aktivität des GgpS-Proteins in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration nach Hagemann *et al.* (2001)

Die Aktivität des rekombinanten GgpS-His-Proteins (schwarz) bzw. des GgpS-Protein im Extrakt von *Synechocystis*-Zellen (grau) wurde durch einen *in vitro*-Enzymtest bestimmt.

Nach dem Entfernen von NaCl war das GgpS-Protein im Zellextrakt erneut inaktiv. Die Aktivierung durch NaCl ist somit reversibel und offenbar beliebig wiederholbar (Huckauf, 2003). Dabei bewirken verschiedene Ionen eine Aktivierung der GG-Synthese, wobei sich die Aktivierung durch Kationen proportional zur Hofmeister Reihe verhält (Schoor *et al.*, 1999). Nicht-ionische Osmolyte wie Sorbitol bewirken zwar wie NaCl eine Induktion der *ggpS*-Genexpression, nicht aber die Aktivierung der GG-Synthese *in vivo* bzw. *in vitro* (Marin *et al.*, 2002; Marin *et al.*, 2006). Die Aktivierung des GgpS-Proteins durch NaCl im *in vitro*-Enzymtest stellt einen weiteren Hinweis auf das Vorhandensein eines inaktiven GgpS-Proteins in Kontrollzellen dar.

Die Aktivitätssteigerung durch NaCl kann allerdings nicht auf die direkte Modifikation des GgpS-Enzyms durch die erhöhte Salzkonzentration zurückgeführt werden, denn das in *E. coli* exprimierte rekombinante GgpS-Protein mit C-terminalem His-tag war unabhängig von der im Test verwendeten Salzkonzentration maximal aktiv (Abb. 1.3; Kerstan, 1998; Hagemann *et al.*, 2001). Dies weist darauf hin, dass das GgpS-Protein in *Synechocystis* wahrscheinlich primär im aktiven Status synthetisiert wird. Außerdem führte der Zusatz von Extrakt aus nicht salzbehandelten Zellen zu einem Enzymtest mit heterolog exprimiertem GgpS-Protein zur Verminderung der GgpS-Aktivität, sofern der Enzymtest unter salzfreien Bedingungen durchgeführt wird. Es muss somit ein inhibitorischer Regulator im Extrakt von *Synechocystis*-Zellen existieren, der durch die Salzkonzentration modulierbar ist. In Abwesenheit eines Salzschocks wird das im aktiven Status synthetisierte GgpS-Protein somit zunächst inhibiert. Der inhibitorische Regulator ist jedoch in Anwesenheit von erhöhten Salzkonzentrationen inaktiv, was ein aktives GgpS-Protein zur Folge hat.

Im Blickpunkt dieser Arbeit stand die „steady state“-Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen, über die weniger bekannt war als über die Regulation unmittelbar nach einem Salzschock. Zu Beginn dieser Arbeit war unbekannt, auf welcher Ebene diese Regulation stattfindet. Da zwischen zellinternem GG-Gehalt, GgpS-Protein, *ggpS*-mRNA und externer NaCl-Konzentration eine lineare Abhängigkeit in akklimatisierten Zellen existiert (Abb. 1.2B), wurde die Regulation der Transkription als wichtige Komponente für die Regulation diskutiert (Marin *et al.*, 2002). Die lineare Abhängigkeit zwischen dem internen Gehalt einer osmoprotektiven Substanz und der externen Salzkonzentration ist ein universelles Prinzip in akklimatisierten Zellen, die als Reaktion auf einen hyperosmotischen Schock eine osmoprotektive Substanz akkumulieren können.

Während des Akklimatisierungsprozesses von *Synechocystis* an erhöhte Salzkonzentrationen wird GG zunächst nach einem Schock unabhängig von dessen Stärke in maximaler Rate synthetisiert (Hagemann *et al.*, 1996a), was durch die Aktivitätsmodulation des GgpS-Proteins durch den vermuteten inhibitorischen Regulator realisiert werden könnte. Die GG-Syntheserate ist somit vorerst nur vom Gehalt des bereits vorhandenen GgpS-Proteins abhängig (Marin *et al.*, 2002). Gleichzeitig wird die GgpS-Proteinmenge erhöht. Die GG-Konzentration steigt jedoch während des Akklimatisierungsprozesses in der Zelle bei linear zunehmendem GgpS-Proteingehalt nicht wie erwartet exponentiell, sondern ebenfalls linear an (Abb. 1.2A). Dies deutet darauf hin, dass ein großer Teil des synthetisierten GgpS-Proteins im Verlauf der Anpassung in eine inaktive Form überführt wird, um eine Überschussproduktion an GG zu verhindern und um bei erneutem Bedarf biochemisch aktiviert zu werden. Die „steady state“-Regulation der GG-Synthese wäre damit durch eine biochemische Modulation der GgpS-Aktivität verwirklicht. Ein weiterer Hinweis für eine biochemische Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen ist, dass nach Aufnahme der osmoprotektiven Substanz Trehalose durch salzakklimatisierte Zellen die GG-Synthese unabhängig von der externen Salzkonzentration vollständig gehemmt wird (Mikkat *et al.*, 1997; Abschnitt 1.2 und Abschnitt 3.2.1).

1.2 Möglicher Einfluss der Osmolytaufnahme auf die Osmolytsynthese

Die *Synechocystis*-Zelle zeigt im Verlauf des Anpassungsprozesses an erhöhte Salzkonzentrationen zwei Regulationsvorgänge, die getrennt voneinander betrachtet werden müssen. Während die Induktion der GG-Synthese durch vollständige Aktivierung des gesamten vorhandenen GgpS-Proteins realisiert wird, liegt in akklimatisierten Zellen eine stabile GG-Syntheserate vor, die abhängig von der externen Salzkonzentration ist. In dieser Arbeit stand die Regulation der GG-Synthese in akklimatisierten Zellen im Blickpunkt. Es konnte bis jetzt für keinen Organismus gezeigt werden, was die Zelle als Stimulus wahrnimmt, um eine stabile, salzabhängige Osmolytsyntheserate zu gewährleisten. Prinzipiell könnten Veränderungen im Cytoplasma, der Membran oder im Periplasma wahrgenommen werden. Das Signal für eine stabile GG-Syntheserate in *Synechocystis* könnte damit die Wasseraktivität, die Osmolalität oder der Hydratationsstatus des Cytoplasmas sein sowie die Membranspannung oder der Turgordruck. Weiterhin könnte auch die Schutzwirkung von GG

im Wechselspiel mit der denaturierenden Wirkung von NaCl auf Komponenten des Cytoplasmas für die Regulation einer stabilen GG-Syntheserate von Bedeutung sein.

Auf der Grundlage vorhandener Ergebnisse wurde in den letzten Jahren eine attraktive Hypothese entwickelt, wie salzakklimatisierte Zellen von *Synechocystis* die „steady state“-Regulation der GG-Synthese realisieren könnten. Dabei wird die Beteiligung des Transporters Ggt diskutiert. Das Arbeitsmodell ist schematisch in Abbildung 1.4 dargestellt.

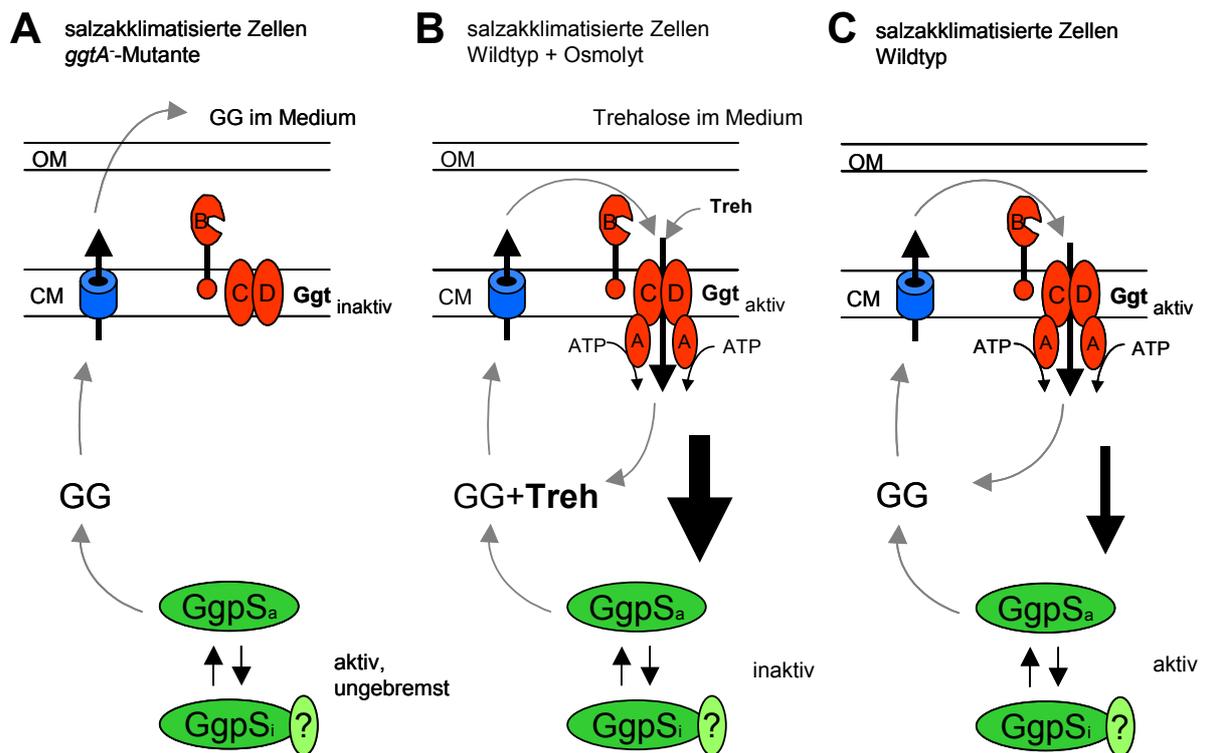


Abb. 1.4: Regulationsprinzip der GG-Synthese in Abhängigkeit von der GG-Aufnahme

Zellen der salzakklimatisierten *ggtA*-Mutante von *Synechocystis* synthetisieren wie der salzakklimatisierte Wildtyp GG mit Hilfe des GgpS-Proteins (A). Bei Zellen der *ggtA*-Mutante kann jedoch im Gegensatz zum Wildtyp GG im Medium nachgewiesen werden, was auf eine Abgabe von GG durch die Cytoplasmamembran (CM) hindeutet. Wird salzakklimatisierten Wildtypzellen zusätzlich Trehalose im Medium angeboten, erscheint kein GG im Medium. Trehalose wird aufgenommen während die intrazelluläre GG-Konzentration sinkt (B). Die GG-Synthese wird durch einen noch unbekanntem Mechanismus inhibiert, angedeutet durch den schwarzen Pfeil. In der salzakklimatisierten Wildtypzelle könnte die Wiederaufnahme von GG, das die Zelle an das Medium verliert, ein Signal für die Hemmung der GG-Synthese generieren (C). Eine Überschussproduktion an GG könnte auf diese Weise verhindert werden. Der vorgeschlagene Mechanismus würde eine stabile GG-Syntheserate in Abhängigkeit von der externen Salzkonzentration ermöglichen. OM: äußere Membran.

Für den Transporter Ggt wurde die Funktion als Rückgewinnungssystem für GG vorgeschlagen. Mutanten, die keine Aufnahmeaktivität mehr zeigen, da sie keine funktionelle, ATP-spaltende Untereinheit GgtA des Transporters synthetisieren können, verlieren im Gegensatz zum Wildtyp GG ins Medium (Hagemann *et al.*, 1996b; Abb. 1.4A). Der Mechanismus des Austritts von GG ist bis jetzt noch nicht charakterisiert worden. Da salzakklimatisierte Zellen der *ggtA*⁻-Mutante den gleichen internen GG-Gehalt wie salzakklimatisierte Zellen des Wildtyps aufweisen, muss die GG-Syntheserate in der Mutante größer sein als im Wildtyp. Dies stellt den ersten Hinweis auf die Beteiligung des Transporters Ggt bei der Regulation der GG-Syntheserate in salzakklimatisierten Zellen dar. Als zweiter Hinweis diente die Beobachtung, dass es während der Aufnahme von Trehalose durch Zellen des Wildtyps zum Austausch von GG gegen Trehalose kommt (Abb. 1.4B). Dabei kann GG nicht im Medium nachgewiesen werden, was auf eine Abschaltung der Synthese hinweist. Daher scheint die Aktivität des Transporters an der Hemmung der GG-Synthese beteiligt zu sein. Die Hemmung der GG-Synthese nach Aufnahme von Trehalose durch salzakklimatisierte Zellen deutet auf eine regulatorische Verbindung zwischen Osmolytsynthese und Osmolytaufnahme hin. Die Arbeitshypothese geht dabei von einem Regelkreis aus, bei dem zuviel produziertes GG aus der Zelle austritt und dort von dem Bindeprotein des Transporters Ggt erkannt wird (Abb. 1.4C). Der nachfolgende Transport in die Zelle generiert ein Signal, das zu einer biochemisch bedingten Hemmung der GgpS-Enzymaktivität führt. Bei jeder gegebenen externen Salzkonzentration könnte auf diese Weise durch biochemische Regulation der GgpS-Aktivität in Abhängigkeit von der Aktivität des Transporters Ggt der GG-Gehalt in der Zelle konstant gehalten werden. Diese Hypothese wurde nicht nur für *Synechocystis* diskutiert, sondern auch für die Regulation der Ectoinsynthese in salzakklimatisierten Zellen von *Halomonas elongata*, die durch den Ectoimporter beeinflusst werden könnte (Gramman *et al.*, 2002).

Durch Sequenzvergleiche konnte festgestellt werden, dass die ATP-spaltende Untereinheit GgtA des Transporters Ggt eine signifikant hohe Homologie zu MalK, der ATP-spaltenden Untereinheit des Maltose ABC-Transporters aus *Salmonella typhimurium*, besitzt. Für die C-terminale Domäne von MalK wurde eine regulatorische Aktivität beschrieben, die in der Interaktion von MalK mit dem Transkriptionsfaktor MalT besteht. Dadurch wird die Expression der *mal*-Gene aktiviert und der Abbau von Maltose induziert (Panagiotidis *et al.*, 1998; Schmees und Schneider, 1998). Weiterhin war in *E. coli* sogar eine Trennung der Transportaktivität von der regulatorischen Aktivität von MalK möglich (Schmees und Schneider, 1998). Im Genom von *Synechocystis* existiert kein MalT-Homolog, so dass die C-

terminale Domäne von GgtA mit einem Protein erfolgen könnte, das im postulierten Regelkreis von Bedeutung ist.

1.3 Mögliche Mechanismen für die Modulation der GgpS-Aktivität

Für den Stimulus einer salzabhängigen „steady state“-Regulation der GG-Synthese in *Synechocystis*-Zellen wurde ein Arbeitsmodell aufgestellt, bei dem die Beteiligung des Transporters Ggt diskutiert wird. Weiterhin muss aber auch berücksichtigt werden, an welche Komponente der GG-Synthese und auf welche Weise der Stimulus für eine salzabhängige GG-Syntheserate weitergeleitet wird. Wahrscheinlich wird eine stabile GG-Syntheserate durch die biochemische Modulation der Aktivität des Schlüsselenzyms der GG-Synthese, dem GgpS-Protein, eingestellt. Obwohl die biochemische Modulation von Enzymaktivitäten die bevorzugte Strategie für die Regulation der Synthese osmoprotektiver Substanzen in salzakklimatisierten Zellen von Bakterien zu sein scheint, konnte der Mechanismus für kein Bakterium vollständig aufgeklärt werden. Biochemische Regulationsmechanismen spielen wahrscheinlich in vielen zellulären Prozessen eine zentrale Rolle. Proteine können durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen in ihrer kinetischen Eigenschaft verändert werden, was sich z.B. in einer veränderten Substratbindung, einer veränderten Katalyse oder veränderten allosterischen Eigenschaften äußert. So können durch äußere Umwelteinflüsse Änderungen in der Konformation des Proteins, Protein-Phosphorylierungen bzw. -Dephosphorylierungen, proteolytische Modifikationen oder die Interaktion mit regulatorischen Proteinen ausgelöst und dadurch die Aktivität eines Proteins verändert werden. Theoretisch könnten die hier genannten Mechanismen bei der biochemischen Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen von *Synechocystis* beteiligt sein. Trotz umfangreicher *in vivo*- und *in vitro*-GgpS-Phosphorylierungsexperimenten und einer Analyse einer Vielzahl von Proteinkinase- bzw. Proteinphosphatase-Mutanten, die fast alle Proteinkinasen bzw. Proteinphosphatasen aus *Synechocystis* darstellten, konnte eine Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung des GgpS-Proteins als Mechanismus für die GG-Synthese nicht eindeutig dokumentiert werden (Huckauf, 2003). Die Beteiligung regulatorischer Proteine konnte nicht nachgewiesen werden (Huckauf, 2003), wobei sich die Untersuchungen bis jetzt auf die Regulation der GG-Synthese unmittelbar nach einem Salzschock und auf die mögliche Beteiligung eines cytoplasmatischen Proteins konzentrierten.

Für viele Bakterien wurde die Beteiligung von membrangebundenen FtsH-Proteasen bei der Salzanpassung beschrieben. So sind in *ftsH*-Genen betroffene Mutanten von *Lactococcus lactis*, *B. subtilis*, *Caulobacter crescentus* und *Staphylococcus aureus* als salzsensitiv beschrieben worden (Nilsson *et al.*, 1994, Deuerling *et al.*, 1997, Fischer *et al.*, 2002, Lithgow *et al.*, 2004). Die Beteiligung der FtsH-Protease an der Vermittlung der Salztoleranz von *Synechocystis* ist noch nicht diskutiert worden. Bisher ist für *Synechocystis* nur bekannt, dass FtsH-Proteasen möglicherweise an der Degradation des D1-Proteins des Photosystems II (PSII) beteiligt sind (Silva *et al.*, 2003; Nixon *et al.*, 2005).

Allgemein sind FtsH-Proteasen durch zwei N-terminale Transmembranhelices in der Membran verankert und besitzen eine Zn^{2+} -Metalloprotease- und eine ATPase-Domäne (Langer, 2000; Ito und Akiyama, 2005). FtsH-Proteasen gehören zu den AAA-Proteasen und sind in Eubakterien und eukaryontischen Organellen wie Mitochondrien und Chloroplasten verbreitet. Sie sind für das schnelle und vollständige Entfernen von Proteinen und nicht für die proteolytische Spaltung an definierten Stellen von Proteinen zur Modulation von Proteinaktivitäten zuständig (Asahara *et al.*, 2000). Die Spaltprodukte sind kleiner als 3 kDa. In *E. coli* liegt FtsH als komplexes Holoenzym vor, das aus einem ringähnlichen FtsH-Homohexamer und einem HflKC-Heterohexamer besteht (Saikawa *et al.*, 2004). Dies stellt wahrscheinlich den größten Membrankomplex in *E. coli* dar. Für die Aktivität der FtsH-Protease wird HflKC nicht zwangsläufig benötigt. HflKC verzögert sogar den Abbau einiger Membranproteine im *in vitro*-Test (Kihara *et al.*, 1997). Möglicherweise stabilisiert HflKC neu synthetisierte Membranproteine (Nijtmans *et al.*, 2000). Die Funktion von FtsH-Proteasen wird in erster Linie in der Eliminierung von denaturierten Membranproteinen gesehen. Aber auch cytoplasmatische Proteine konnten als Substrate für die FtsH-Protease aus *E. coli* beschrieben werden. Ein gut untersuchtes Beispiel ist die Deacetylase LpxC, deren Degradation die Synthese von Phospholipiden und Lipopolysacchariden in *E. coli* beeinflusst (Ogura *et al.*, 1999; Führer *et al.*, 2006). FtsH kann somit auch eine regulatorische Funktion durch die Kontrolle von Proteininstabilitäten ausüben. Ob die bei FtsH-Mutanten vieler Bakterien beobachtete Salzsensitivität auf die Beteiligung der FtsH-Protease am Abbau eines regulatorischen Elements zurückgeführt werden kann, ist unklar, da die molekularen Ursachen der Salzsensitivität bisher unbekannt sind.

1.4 Zielsetzung

Der Induktion der GG-Synthese nach einem Salzschock steht die „steady state“-Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten *Synechocystis*-Zellen gegenüber. Sie ist für den fein abgestimmten Ausgleich der Wasserpotentiale von Cytoplasma und Medium verantwortlich. Als Schwerpunkt dieser Arbeit sollte der Mechanismus der „steady state“-Regulation untersucht werden. Das beinhaltet zum einen die Charakterisierung des Stimulus, der das Signal für eine konstante salzabhängige GG-Syntheserate generiert, als auch die Analyse der biochemischen Modulation des GgpS-Proteins, die wahrscheinlich eine stabile GG-Syntheserate realisiert.

Es musste zunächst eindeutig geklärt werden, auf welcher Ebene die Regulation in salzakklimatisierten *Synechocystis*-Zellen stattfindet. Da eine lineare Abhängigkeit von externer Salzkonzentration und internem *ggpS*-mRNA-, GgpS-Protein- und GG-Gehalt existiert, war sowohl eine Regulation auf Ebene der Transkription als auch durch biochemische Modulation der GgpS-Aktivität möglich.

Anschließend sollte überprüft werden, ob Osmolytsynthese und Osmolytaufnahme regulatorisch verknüpft sind. Die Hemmung der GG-Synthese nach Aufnahme von Trehalose durch salzakklimatisierte Zellen deutete auf die Beteiligung der Aktivität des Transporters Ggt an der Regulation der GG-Synthese hin und sollte zunächst bestätigt werden. Dabei sollte der Einfluss verschiedener Osmolyte, die vom Transporter Ggt aufgenommen werden können, auf die GG-Synthese analysiert werden. Nachfolgend sollte die Synthese von Trehalose in *Synechocystis* etabliert werden, um die Akkumulation einer von GG verschiedenen osmoprotektiven Substanz unabhängig vom Transport zu ermöglichen und den Effekt auf die GG-Synthese zu untersuchen. Dadurch sollte die Unterscheidung zwischen der direkten Beteiligung des GG-Transportsystems und der indirekten Beteiligung durch die Akkumulation einer weiteren osmoprotektiven Substanz an der Regulation der GG-Synthese erreicht werden.

Durch eine gerichtete Strategie sollten in einem parallelen Ansatz mögliche Regulatoren der GG-Synthese identifiziert werden. Dafür sollte eine Transposonmutagenese durchgeführt und ein Screeningsystem etabliert werden, das die Anreicherung von Mutanten erlaubt, die in der Osmoregulation betroffen sind.

Ebenfalls sollte die Möglichkeit untersucht werden, ob Protein-unabhängige Komponenten einen regulativen Einfluss auf die GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen haben können.

Da sich Zellen unter Kontrollbedingungen und salzakklimatisierte Zellen nicht nur durch die NaCl-Konzentration im Cytoplasma unterscheiden, sondern auch durch die Konzentration osmoprotektiver Substanzen, sollte der Einfluss verschiedener osmotisch wirksamer Substanzen auf die GG-Synthese untersucht werden. Dafür sollte ein *in vitro*-System etabliert werden, das die Bestimmung der GgpS-Aktivität in Abhängigkeit von der Konzentration osmoprotektiver Substanzen und der NaCl-Konzentration zulässt.

2. Material und Methoden

2.1 Organismen

Synechocystis: Untersucht wurde der Glukose-tolerante Wildtyp des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 (im Folgenden *Synechocystis*), der freundlicherweise von Professor N. Murata (NIBB, Okazaki, Japan) zur Verfügung gestellt wurde. Dabei handelte es sich um den für die Sequenzierung des Genoms verwendeten Stamm (Kaneko *et al.*, 1996; CyanoBase: <http://www.kazusa.or.jp/cyano/Synechocystis/>).

Escherichia coli: Für alle Klonierungen und Amplifizierungen von Plasmid- bzw. Cosmid-DNA wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α mcr (Grant *et al.*, 1990) verwendet.

In der nachfolgenden Tabelle 2.1 sind alle verwendeten und in dieser Arbeit hergestellten Mutanten von *Synechocystis* bzw. von *E. coli* aufgelistet.

Tabelle 2.1: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten bzw. erzeugten *Synechocystis*- und *E. coli*-Mutanten

Bezeichnung	Charakteristika	Referenz
sp. PCC 6803:		
Δ GS2	durch Einfügen des Spec ^R -Resistenzgens in die <i>Sna</i> BI/ <i>Stu</i> I-Deletion inaktiviertes <i>gppS</i> -Gen	Marin <i>et al.</i> , 1998
<i>gppS</i> ⁺	durch Transformation des Wildtyps mit dem Vektor pAll- <i>gppS</i> -Spec erzeugt	diese Arbeit
<i>ggtA</i> ^S	durch Transformation des Wildtyps mit dem Vektor pGEM [®] -T- <i>ggtA</i> -Spec erzeugt	diese Arbeit
<i>ggtA</i> ^K	durch Transformation des Wildtyps mit dem Vektor pDrive [®] - <i>ggtA</i> -Km erzeugt	diese Arbeit
<i>otsALB</i> ⁺	durch Transformation des Wildtyps mit dem Vektor <i>ptac-otsALB</i> erzeugt	diese Arbeit
<i>otsALB</i> ⁺ <i>ggtA</i> ⁻	durch Transformation der <i>otsALB</i> ⁺ -Mutante mit dem Vektor pGEM [®] -T- <i>ggtA</i> -Spec erzeugt	diese Arbeit
<i>slr0228::Km</i> ^R	durch Transformation des Wildtyps mit dem Vektor pGEM [®] -T- <i>slr0228</i> -Km erzeugt	diese Arbeit
<i>slr0228::Cm</i> ^R	durch Transformation des Wildtyps mit dem Vektor pGEM [®] -T- <i>slr0228</i> -Cm erzeugt	diese Arbeit
<i>E. coli</i>:		
DH5 α /pIBA3- <i>gppS</i>	durch Transformation von <i>E. coli</i> mit dem Vektor pIBA5- <i>gppS</i> erzeugt	diese Arbeit
DH5 α /pIBA5- <i>gppS</i>	durch Transformation von <i>E. coli</i> mit dem Vektor pIBA5- <i>gppS</i> erzeugt	diese Arbeit

2.2 Plasmide

In der folgenden Tabelle 2.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide bzw. Cosmide aufgelistet.

Tabelle 2.2: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide/Cosmide

Plasmid/Cosmid	Charakteristika	Referenz
pDrive	Klonierungsvektor, Carb ^R	Qiagen, Hilden
pGEM [®] -T	Klonierungsvektor, Carb ^R	Promega, Madison, USA
pUC4K	pBluescript, Carb ^R , Km ^R	New England Biolabs, Frankfurt/Main
pUC4S	pBluescript, Carb ^R , Spec ^R	New England Biolabs, Frankfurt/Main
pDrive [®] - <i>ggtA</i>	Klonierungsvektor pDrive [®] mit <i>ggtA</i> -Gen aus <i>Synechocystis</i> , Carb ^R	diese Arbeit
pDrive [®] - <i>ggtA</i> -Km	pDrive [®] mit <i>aphII</i> -Gen, das in den <i>HincII</i> -Ort entgegengesetzt der Leserichtung des <i>ggtA</i> -Gens aus <i>Synechocystis</i> inseriert ist, Carb ^R , Km ^R	diese Arbeit
pGEM [®] -T- <i>ggtA</i>	Klonierungsvektor pGEM [®] -T mit <i>ggtA</i> -Gen aus <i>Synechocystis</i> , Carb ^R	diese Arbeit
pGEM [®] -T- <i>ggtA</i> -Spec	pGEM [®] -T mit Spec ^R -Gen, das in den <i>HincII</i> -Ort entgegengesetzt der Leserichtung des <i>ggtA</i> -Gens aus <i>Synechocystis</i> inseriert ist, Carb ^R , Spec ^R	diese Arbeit
pASK-IBA5	Vektor zur konditionalen Expression von Genen in <i>E. coli</i> , Carb ^R	IBA, Göttingen
pASK-IBA3	Vektor zur konditionalen Expression von Genen in <i>E. coli</i> , Carb ^R	IBA, Göttingen
pIBA5- <i>ggsS</i>	pASK-IBA5 mit <i>ggsS</i> -Gen aus <i>Synechocystis</i> , das in den <i>BsaI</i> -Ort inseriert ist, Carb ^R	diese Arbeit
pIBA3- <i>ggsS</i>	pASK-IBA3 mit <i>ggsS</i> -Gen aus <i>Synechocystis</i> , das in den <i>BsaI</i> -Ort inseriert ist, Carb ^R	diese Arbeit
pDrive- <i>ggsS</i>	Klonierungsvektor pDrive mit <i>ggsS</i> -Gen aus <i>Synechocystis</i> als <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment, Carb ^R	diese Arbeit
pAll	Vektor zur Expression von Genen unter der Kontrolle des <i>psbA2</i> -Promotors in <i>Synechocystis</i> , Carb ^R	Lagarde <i>et al.</i> , 2000
pAll- <i>ggsS</i>	pAll mit <i>ggsS</i> -Gen aus <i>Synechocystis</i> , das in die <i>NdeI/BamHI</i> -Deletion inseriert ist, Carb ^R	diese Arbeit
pAll- <i>ggsS</i> -Spec	pAll- <i>ggsS</i> mit Spec ^R -Gen, das in den <i>BamHI</i> -Ort inseriert ist, Carb ^R , Spec ^R	diese Arbeit
pCONEX	Vektor zur konditionalen Expression homologer bzw. heterologer Gene unter der Kontrolle des <i>tac</i> -Promotors in <i>Synechocystis</i> , Carb ^R	Gierga, 2004
pGEM [®] -T- <i>otsA</i> -Link	pGEM [®] -T mit <i>otsA</i> -Gen aus <i>Mycobacterium tuberculosis</i> und artifiziereller Linkersequenz als <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment, Carb ^R	diese Arbeit
pGEM [®] -T- <i>otsB</i>	pGEM [®] -T mit <i>otsB</i> -Gen aus <i>E. coli</i> als <i>BamHI</i> -Fragment, Carb ^R	diese Arbeit
<i>ptac-otsALB</i>	pCONEX mit <i>otsALB</i> -Genkonstrukt, das in den <i>NdeI/BamHI</i> -Ort inseriert ist, und <i>aphII</i> -Gen, das in den <i>BamHI</i> -Ort inseriert ist, Carb ^R , Km ^R	diese Arbeit
pGEM [®] -T- <i>slr0228</i>	pGEM [®] -T mit <i>slr0228</i> -Gen aus <i>Synechocystis</i> , Carb ^R	diese Arbeit
pGEM [®] -T- <i>slr0228</i> -Km	pGEM [®] -T- <i>slr0228</i> mit <i>aphII</i> -Gen, das in den <i>MscI</i> -Ort entgegengesetzt der Leserichtung des <i>slr0228</i> -Gens inseriert ist, Carb ^R , Km ^R	diese Arbeit

Plasmid/Cosmid	Charakteristika	Referenz
pGEM [®] -T-slr0228-Cm	pGEM [®] -T-slr0228 mit Cm ^R -Gen, das in den <i>Sma</i> I-Ort entgegengesetzt der Leserichtung des <i>slr0228</i> -Gens inseriert ist, Carb ^R , Cm ^R	diese Arbeit
mutierte Cosmidbank von <i>Synechocystis</i>	Cosmidbank, die zur Sequenzierung des Genoms von <i>Synechocystis</i> hergestellt wurde (Kotani <i>et al.</i> , 1994), wurde <i>in vitro</i> mit Hilfe des „Genome Priming System“ von New England Biolabs, Frankfurt/ Main, mutiert, Carb ^R , Cm ^R	T. Ogawa, Universität Nagoya, Japan

2.3 Oligonukleotide

Die Tabelle 2.3 beinhaltet alle Oligonukleotide, die für die Amplifizierung oder Sequenzierung von Genen verwendet wurden. Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Qiagen, Hilden, bzw. Operon, Köln, synthetisiert. Fett gedruckte Basen geben die angefügte Erkennungssequenz der jeweiligen Restriktionsenzyme wider. Das Start- bzw. Stopcodon der zu amplifizierenden Gene ist unterstrichen. Die Oligonukleotide sind jeweils in 5'-3'-Richtung angegeben.

Tabelle 2.3: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
M13forward	CAAAGGGTCAAGTGTGCTGC
M13reverse	TTCACACAGGAACAGCTATGACC
<i>ggsS</i> 5' <i>Nde</i> I	GGCCGGCC CATATGA AATTCATCCCTTGTGAT
<i>ggsS</i> 3' <i>Bam</i> HI	AT GGATCCT TACATTTGGGGGGGCTCTC
<i>ggsS</i> 5' UE IBA3	GCTCCCGGTCTCGAATGAATTCATCCCTTGTGATC
<i>ggsS</i> 3' UE IBA3	TTATATGGTCTCAGCGCTCATTTGGGGGGGCTCTCCC
<i>ggsS</i> 5' UE IBA5	GCTCCCGGTCTCAGCGCCAATTCATCCCTTGTGATCC
<i>ggsS</i> 3' UE IBA5	GCGCCTGGTCTCATATCACTACATTTGGGGGGGCTC
pAll_up	AAACCGCCAGGTAAACTC
pAll_down	GGCGATCGATGGCAATCA
<i>psb</i> All-up-5'	CACAACGTGGCTAGAGCGTTCCAG
<i>psb</i> All-up-3'	GACGCGTATAGGCCTAGGATGCATCATA
pAll up2	CCCCAAAACGCCCTCTGTTTAC
pAll down2	CACCCCCATTGAAGGAGAGTG
RS1_ <i>Kpn</i> I	GGTACCA AGTGGGGCACATTGAACG
RS2_ <i>Xba</i> I+	CTTAGAT ATCCACCACCAACGGGCCTACT
RS2_ <i>Xho</i> I	GCTCGAG GGGACCATTCTCTGGATCAT
<i>otsA</i> 5' <i>Myct</i> u <i>Nde</i> I	ACATATG GCTCCCTCGGGAGGC
<i>otsA</i> _Link_3' <i>Bam</i> HI	GGATCCT AATTCGGCACTTCTACTACCTAAGCCTTGGCCCCTCGGGTG
<i>otsB</i> 5' <i>Bam</i> HI K12	GGATCC ATGACAGAACCGTTAACCG
<i>otsB</i> 3' <i>Bam</i> HI K12	GGATCCT TAGATACTACGACTAAACG
2040as	CAGTAGCGGTAAACGGCAGAC
fw	GAGTTATTTTACCACTCCCT
<i>ggsS</i> 5' Sonde	CGACATTGCCTGGATCACTC
<i>ggsS</i> 3' Sonde	AAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGCTACATTTGGGGGGGCTCTC
<i>rnpb</i> 5' Sonde	GAGAGTTAGGGAGGGAGTTGC
<i>rnpb</i> 3' Sonde	AAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGAAAAAAGAGAGTTAGTCG

Bezeichnung	Sequenz
<i>otsA</i> 3' Sonde	AAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGGCGACGCGGCCTCGGCAAAG
<i>slr0228</i> 3' Sonde	AAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGTGTGCTGGAACGGCGGAAG
<i>slr0228</i> 5'	ATGAAATTTTCCTGGAGAACTG
<i>slr0228</i> 3'	TTATAGTTGGGGAATTAAGT

2.4 Kultivierungsbedingungen

2.4.1 Kultivierung von *Synechocystis*

Die Kultivierung von *Synechocystis* erfolgte unter phototrophen Bedingungen bei einer Temperatur von 30°C entweder auf BG11-Agarplatten bei kontinuierlicher Belichtung mit 30 µE, in BG11-Flüssigmedium bei einer Lichtintensität von 30 µE und kontinuierlichem Schütteln von 150 Upm (r = 35 mm) oder in BG11-Flüssigmedium bei einer Lichtintensität von 100 µE und einer kontinuierlichen Begasung mit einem 3%igen (v/v) CO₂/Luftgemisch. Zur Erhaltung der Zellen in Flüssigmedium über einen längeren Zeitraum erfolgte die Kultivierung bei einer Temperatur von 20°C und einer Lichtintensität von ca. 15 µE. Nach Zugabe von 200 µl DMSO zu 800 µl Zellmedium wurden die Bakterien bei -80°C gelagert.

BG11-Medium:

Stocklösung 1:

Citronensäure, Monohydrat	0,3 g
Ammonium-Eisen(III)-Citrat (braun)	0,3 g
Na ₂ EDTA	0,05 g
	ad 100 ml A. dest

Stocklösung 2:

NaNO ₃	30 g
K ₂ HPO ₄	0,78 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,5 g
	ad 1000 ml A. dest

Stocklösung 3:

CaCl ₂ x H ₂ O	1,9 g
	ad 100 ml A. dest

A₆-Lösung:

H ₃ BO ₃	2,86 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,81 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,22 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,08 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,021 g
Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O	0,0494 g
	ad 1000 ml A. dest

1 M TES-KOH (pH 8,0):

TES 114,625g
in 400 ml A. dest lösen, mit KOH auf pH 8,0 einstellen und auf 500 ml A. dest auffüllen

Flüssig BG11-Medium (pH 8,0):

Stocklösung 1 2 ml
Stocklösung 2 50 ml
Stocklösung 3 2 ml
A₆-Lösung 1 ml
1 M TES-KOH (pH 8,0) 20 ml
ad 1000 ml A. dest

BG11-Agar (pH 8,0):

Für das Gießen der Agarplatten wurden zwei doppelt konzentrierte Lösungen angesetzt, die nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von etwa 50°C miteinander gemischt und ausplattiert wurden.

Lösung 1:

Stocklösung 1 1 ml
Stocklösung 2 25 ml
Stocklösung 3 1 ml
A₆-Lösung 0,5 ml
Na₂S₂O₃ x 5H₂O 1,5 g
1 M TES-KOH (pH 8,0) 10 ml
ad 250 ml A. dest

Lösung 2:

Agar 7,5 g
ad 250 ml A. dest

Gegebenenfalls wurde den Medien vor dem Autoklavieren NaCl mit einer Endkonzentration von 1 % (w/v) bis 6 % (w/v) zugesetzt. Wenn in dieser Arbeit von salzakklimatisierten Zellen die Rede ist, sind damit Zellen gemeint, die mindestens vier Tage einem ionischen osmotischen Stress mit NaCl ausgesetzt waren.

Zur Selektion von *Synechocystis*-Mutanten wurde dem Medium der Resistenz entsprechende Antibiotika mit folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

Streptomycin 50 µg/ml
Kanamycin 100 µg/ml
Chloramphenicol 15 µg/ml

Das Wachstum von *Synechocystis* wurde durch Bestimmung der Extinktion der Kulturen bei 750 nm gegen H₂O dokumentiert.

Der axenische Charakter einer *Synechocystis*-Kultur wurde nach Ausstrich von ca. 200 µl Zellsuspension auf LB-Agarplatten und mindestens 48stündiger Inkubation im Dunkeln bei 30°C überprüft.

2.4.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte über Nacht bei 37°C entweder in LB-Flüssigmedium unter ständigem Schütteln bei 125 Upm oder auf LB-Agarplatten bei 37°C im Brutschrank. Zur Erhaltung von *E. coli*-Stämmen wurden 800 µl Zellkultur mit 200 µl Glycerol (96 %) versetzt und bei -80°C gelagert.

LB (Luria Bertani)-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
ad 1000 ml A. dest	

Für die Kultivierung von *E. coli* auf LB-Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren Agar (15 g/l) zugesetzt. Zur Selektion plasmidtragender *E. coli*-Zellen wurde dem Medium entsprechende Antibiotika in den folgenden Konzentration zugesetzt:

Carbenicillin	50 µg/ml
Streptomycin	50 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Chloramphenicol	50 µg/ml

Für die Blau-Weiß-Selektion wurde dem Agar vor dem Gießen zusätzlich 50 µM IPTG und 80 g/ml X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktopyranosid) zugesetzt.

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden die Zellen in SOB-Medium kultiviert.

SOB-Medium:

Trypton	5 g
Hefeextrakt	1,25 g
NaCl	0,125 g
1M KCl	625 µl
ad 250 ml A. dest	

Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von 1,25 ml steriler 2 M MgCl₂-Lösung.

Um die Zelldichte von *E. coli*-Kulturen zu bestimmen, wurde die Extinktion bei 600 nm gemessen (Sambrook *et al.*, 1989). Eine optische Dichte von 1 entspricht einer Zelldichte von 8×10^8 Zellen/ml.

2.5 Molekularbiologische Techniken

2.5.1 Isolierung genomischer DNA aus *Synechocystis*

Zur Isolierung genomischer DNA aus *Synechocystis* wurde entweder 1 ml Zellkultur bei 11 000 g abzentrifugiert und anschließend in 200 µl H₂O resuspendiert oder es wurden direkt Zellen mit der Impföse von einer BG11-Agarplatte in 200 µl H₂O überführt.

Nach Zugabe von 200 µl saurem Phenol wurde die Zellsuspension gut gemischt und 10 min zum Aufschluß der Zellen bei 65°C inkubiert. Nach einer anschließenden Inkubation von 2 min auf Eis wurden 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt und der Ansatz gut gemischt. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 20 000 g bei 4°C für 5 min. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, und es erfolgte zur vollständigen Entfernung des Phenols eine erneute Zugabe von Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), wiederholte Zentrifugation, Zugabe von Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zum Überstand und nochmalige Zentrifugation. Der wässrige Überstand mit der gelösten DNA stand weiteren Experimenten wie einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Verfügung.

Eine PCR konnte ebenfalls nach Zugabe von durch Ultraschall aufgeschlossene Zellextrakte durchgeführt werden (Abschnitt 2.5.11).

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit Hilfe des Kits Nucleo-Spin[®] Plasmid Quick Pure der Firma Macherey und Nagel, Düren, durchgeführt. Diese Methode kombiniert die alkalische Lyse der Bakterienzelle mit der Aufreinigung der Plasmid-DNA durch Bindung an eine Kieselgel-Matrix, die sich in einer kleinen Säule befindet. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte mit H₂O. Die auf diese Weise erhaltene DNA konnte aufgrund ihrer Reinheit für weitere Experimente einschließlich der Sequenzierung verwendet werden.

2.5.3 Amplifizierung und Isolierung von Cosmid-DNA aus *E. coli*

Zur Amplifizierung der mutierten Cosmidbank von *Synechocystis* (T. Ogawa, Universität Nagoya, Japan) wurde *E. coli* mit der Cosmid-DNA transformiert (Abschnitt 2.6.3) und auf LB-haltigen Agarplatten, die Carbenicillin (50 µg/ml) und Chloramphenicol (50 mg/ml) enthielten, ausgestrichen. Nach Inkubation der Agarplatte über Nacht wurden alle Kolonien von der Platte gewaschen und in 500 ml LB-Medium überführt. Nach 24stündiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Isolierung der Cosmide mittels Qiagen-tip 100 nach dem Protokoll „very low-copy Plasmid/Cosmid Purification“ (Qiagen, Hilden). Durch die Amplifikation von 15 Genen, die auf verschiedenen Cosmiden liegen, wurde die Vollständigkeit der mutierten Cosmidbank abgeschätzt.

2.5.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA wurde entweder durch Vergleich mit dem Längenstandard (λ DNA/*Eco91I* (*BstEII*)-Marker, MBI Fermentas, St. Leon-Roth) auf einem Agarosegel oder photometrisch bestimmt. Bei 260 nm gegen H₂O als Referenz entspricht eine Absorption von 1 einer Konzentration von 50 µg DNA/ml. Der Quotient der Absorption bei 260/280 lässt Rückschlüsse auf die Reinheit der DNA zu. Der Wert sollte zwischen 1,6 und 2 liegen, wobei ein Wert von 2 für absolut reine DNA steht.

2.5.5 Restriktion

Der enzymatische Verdau der DNA wurde durch Restriktionsendonukleasen der Firmen New England Biolabs (Frankfurt/Main), MBI Fermentas (St. Leon-Roth) oder Roche Diagnostics (Mannheim) in den mitgelieferten Puffern durchgeführt. Plasmid-DNA wurde mit 1-2 Units/µg DNA mindestens 1 h, genomische DNA mit bis zu 5 Units/µg DNA mindestens 3 h verdaut. Um eine mögliche Religation der verdauten DNA-Fragmente zu verhindern, wurde eine gleichzeitige Dephosphorylierung der 5'-Enden der DNA durch Zusatz von alkalischer Phosphatase („calf intestine alkaline phosphatase“, New England Biolabs, Frankfurt/Main) durchgeführt.

2.5.6 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe erfolgte über Flachbrett-elektrophoresen mit 0,8%igen TAE-Agarosegelen. Die DNA-Proben wurden nach Zusatz von 6 x Gel-Beladungspuffer (0,25 % Bromphenolblau, 40 % (w/v) Saccharose in H₂O) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einer maximalen Spannung von 5 V/cm. Nach Beendigung der Auftrennung wurde das Gel in eine wässrige Lösung mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/µl gegeben. Durch die Einlagerung des Ethidiums in die Doppelhelix konnte die DNA auf einem UV-Licht-Transilluminator sichtbar gemacht werden. Als Größenstandard diente in der Regel der λ DNA/*Eco*91I (*Bst*EII)-Marker der Firma MBI Fermentas, St. Leon-Roth.

TAE-Puffer:

40 mM Tris-Acetat
1 mM Natrium-Acetat
0,1 mM EDTA
ad pH 7,8

2.5.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des Nucleo Spin[®] Extract Kits der Firma Macherey und Nagel, Düren, wobei die selektive Adsorption der DNA an Glasperlen in Anwesenheit chaotroper Agentien genutzt wird.

Die gewünschte Bande wurde unter UV-Bestrahlung mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und entsprechend der Angaben des Kits behandelt. Die gereinigte DNA wurde mit 25 µl H₂O von der Säule eluiert.

2.5.8 Ligation

Die kovalente Verknüpfung zweier DNA-Enden wird als Ligation bezeichnet. Mittels der T4-Ligase wird eine Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe des einen DNA-Fragments und der 3'-OH-Gruppe des anderen Endes geschlossen.

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten in die Vektoren pDrive[®] der Firma Qiagen, Hilden, oder pGem[®]-T der Firma Promega, Madison, USA, wurden diese nach gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Extraktion aus dem Gel mit den bereits linearisierten Vektoren ligiert. Die linearisierten Vektoren besitzen 3'-terminale Thymin-Überhänge. Bei

der PCR von DNA-Fragmenten entstehen bei Verwendung der *Taq*-Polymerase 3'-Adenin-Überhänge, so dass eine Ligation der Vektoren und der PCR-Fragmente möglich war. Die Ligation erfolgte in einem Reaktionsansatz mit 2 x Ligationspuffer und T4-DNA-Ligase (Promega, Madison, USA) bei Raumtemperatur für 2 h. Insert und linearisiertes Plasmid wurden im Verhältnis 3:1 in den Ligationsansatz gegeben.

2.5.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können spezifisch DNA-Fragmente, die von zwei Oligonukleotid-Bindestellen flankiert werden, durch die *Taq*-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) amplifiziert werden. Diese Methode wurde von Mullis (1987) entwickelt.

Die Reaktion erfolgte in drei Schritten mit unterschiedlicher Inkubationstemperatur, die 25-35 Mal wiederholt wurden. Beim ersten Schritt wurde die doppelsträngige DNA durch Hitze denaturiert (Denaturierungsphase). Während der zweiten Phase konnten die Primer (kurze, einzelsträngige DNA-Oligonukleotide) durch Absenken der Temperatur spezifisch an die DNA binden (Annealing). Im darauffolgenden Schritt wurde ausgehend von den freien 3'-OH-Enden der Primer jeweils ein vollständig komplementärer DNA-Strang synthetisiert (Extension). Die zyklische Wiederholung von Denaturierung, Annealing und Extension ermöglichte eine exponentielle Amplifikation der Ziel-DNA, da auch die synthetisierte DNA jeweils als neues Zielmolekül fungierte.

Für die PCR wurden 0,1-0,5 µg Template-DNA und je 10 pmol der beiden Primer mit einem Ansatz der Firma Qiagen, Hilden, vermischt, der bereits dNTP's, Puffer mit Mg²⁺-Ionen und die thermostabile *Taq*-Polymerase enthielt.

Standard-PCR-Programm:

5 min	94°C	Denaturierung	} 25-35x
30-45 sec	94°C	Denaturierung	
30-45 sec	52°C	Annealing	
		Temperatur wurde der Schmelztemperatur der Primer angepasst	
0,5-2 min	72°C	Extension	
		Zeit wurde der Länge des zu amplifizierenden Fragments und der Aktivität des Enzyms angepasst	
7 min	72°C	Extension	
Unendl.	4°C	Vervollständigung von unfertigen DNA-Fragmenten	
		Ende der Reaktion	

Nach Beendigung der PCR konnten die Amplifikate durch Auftragen von 1/10 Volumen des PCR-Ansatzes auf ein Agarosegel identifiziert werden.

2.5.10 PCR Kolonie-Screening von *E. coli*

Die Durchmusterung sehr vieler plasmidtragender *E. coli*-Klone erfolgte durch PCR-Analyse. Die Bakterien mussten vorher weder in Flüssigmedium angeimpft noch angezogen werden. Mit einem Zahnstocher wurden Bakterienzellen von der Platte direkt in den PCR-Ansatz gegeben. Dabei konnte gleichzeitig die Überimpfung auf eine Masterplatte oder in Flüssigkultur erfolgen. Bei der anfänglichen Denaturierungsphase wurden die Zellen aufgeschlossen und die enthaltenen Plasmide wurden für die Primer zugänglich.

2.5.11 PCR Kolonie-Screening von *Synechocystis*

Zur schnellen Durchmusterung von *Synechocystis*-Mutanten wurde eine Methode von Gierga (2004) entwickelt. Zellen einer Kolonie wurden einer Platte entnommen und in 50 µl H₂O resuspendiert. Durch Ultraschallbehandlung mittels Sonifier 250 (Branson, Raleigh, USA) wurden die Zellen 3 min auf Eis aufgeschlossen (output control: 3, duty cycle: 30 %, pulsierend). Vom entstehenden Lysat konnten 2 µl direkt in einen PCR-Ansatz gegeben werden. Es konnte das oben genannte Standard-PCR-Programm genutzt werden.

2.5.12 DNA-Sequenzanalyse

Das BigDye™ Sequenzierungs-System verwendet die Methode des „Cycle Sequencings“, die eine Kombination der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977) und der PCR-Reaktion darstellt. Es wird die Zielsequenz, ausgehend von einem spezifischen Oligonukleotid, durch die *Taq*-Polymerase amplifiziert, wobei gleichzeitig zufallsgemäß Didesoxynukleotide (ddNTPs) eingebaut werden. Da dem Didesoxynukleotid eine freie 3'-OH-Gruppe zur weiteren Reaktion fehlt, wird der DNA-Strang nicht weiter verlängert. Um den Abbruch der Kettenverlängerung nicht in jedem Zyklus an dergleichen Base zu verursachen, müssen die ddNTPs in einer viel geringeren Konzentration (1000 mal geringer) zugesetzt werden als die dNTPs. Bei dieser Methode sind die ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Die Detektion der vier unterschiedlichen Fluoreszenz-

Farbstoffe und die Umsetzung in Chromatogramme erforderte einen Computer-gestützten Kapillar-Sequenzierer (ABI Prism 310) mit entsprechender Software.

Probenvorbereitung:

200-500	ng	Template-DNA
10	pmol	Oligonukleotid
3	µl	RRM (Ready Reaction Mix)
ad 15	µl	H ₂ O

Der RRM (Ready Reaction Mix) des Kits BigDye™ Sequenzierung der Firma Perkin Elmer, Boston, USA, enthielt die vier dNTPs, die Polymerase und die vier Arten Fluoreszenz-glabelter ddTNP.

Sequenzierungsprogramm:

Denaturierung	96°C	10 sec	} 25x
Annealing	60°C	5 sec	
Extension	60°C	4 min	
Abkühlen	4°C	unendl.	

Zur Entfernung überschüssiger Nukleotide wurde nach der PCR-Reaktion eine Ethanol-Fällung durchgeführt. Anschließend wurde das DNA-Pellet in 20 µl TSR-Puffer (Template-Suppression-Reagent) bei 37°C gelöst.

Alternativ wurde die DNA-Sequenzierung durch das ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin Köln) nach derselben Methode durchgeführt.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurde mit Hilfe der Chromas-Software (Version, 1.45, Southport, Queensland, Australia) und dem Sci.Ed.Central-Packet für PC analysiert und bearbeitet. Nachfolgend wurden mit Hilfe der Online-Dienstprogramme BLASTX und BLASTN die erhaltenen Sequenzen mit bekannten Sequenzen aus verschiedenen Internet-Datenbanken (z.B. CyanoBase) verglichen.

2.5.13 Isolierung von RNA aus *Synechocystis*

Gesamt-RNA aus *Synechocystis*-Zellen wurde mit Hilfe des NucleoSpin® RNAII kit von Macherey und Nagel, Düren, isoliert. 10 ml Zellen (OD₇₅₀ von ca. 1) wurden abzentrifugiert (4 000 g bei 4°C) und das Pellet in 200 µl 1 x PBS und 350 µl Lysis-Puffer (50 g

Guanidiniumchlorid in 10 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5 lösen und auf 100 ml mit H₂O auffüllen, vor Gebrauch wurde 1 % β -Mercaptoethanol zugegeben) resuspendiert. Durch Zugabe von 350 μ l saurem Phenol und Inkubation des Ansatzes für 10 min bei 65°C wurden die Zellen aufgeschlossen. Anschließend wurden 300 μ l Chloroform zugesetzt und der Ansatz bei 10 000 g, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut mit 500 μ l Chloroform ausgeschüttelt. Nachfolgend wurde die RNA nach den Angaben des Kit-Protokolls isoliert. Die Elution der RNA von der Säule erfolgte mit 80 μ l H₂O.

2.5.14 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Bestimmung der Konzentration von Gesamt-RNA erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption verdünnter RNA gegen H₂O als Referenz bei 260 nm bzw. 280 nm. Eine Absorption von 1,0 bei 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40 μ g/ml. Der Quotient beider Messwerte zeigte die Reinheit der isolierten Nukleinsäure an.

Die Konzentration und die Qualität der isolierten RNA konnte neben der photometrischen Bestimmung auch durch Elektrophorese in 0,8%igen TAE-Agarosegelen abgeschätzt werden.

2.5.15 Northern Blot (RNA/RNA-Hybridisierung)

Die Detektion DIG-markierter Sonden, die an komplementäre RNA-Fragmente auf der Nylonmembran gebunden haben, erfolgte immunologisch mit Hilfe von Anti-DIG-Antikörpern, die an das eingebaute Steroid-Hapten Digoxigenin (DIG) der Sonde binden konnten. An die Antikörper ist eine alkalische Phosphatase gekoppelt, die das Substrat CSPDTM unter Freisetzung von Chemilumineszenz umsetzte.

Herstellung einer RNA-Sonde durch *in vitro*-Transkription

RNA-Sonden wurden von einer RNA-Polymerase durch *in vitro*-Transkription unter Zugabe von unmarkierten Nukleotiden und DIG-gelabeltem UTP synthetisiert und markiert. Das Fragment, das als Sonde hergestellt werden sollte, wurde in einer PCR so amplifiziert, dass ein Promotor für eine RNA-Polymerase (T7-Polymerase) durch einen Primer angefügt wurde. Die Sonde entsprach der komplementären Sequenz des nachzuweisenden Transkripts.

Ansatz für die *in vitro*-Transkription:

- 5 µg Template-DNA
- 2 µl RNA-Labeling Mix (Roche Diagnostics, Mannheim)
- 2 µl 10 x Transkriptionspuffer
- 2 µl T7-RNA-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt/Main)
- ad 20 µl H₂O

Die Transkription erfolgte bei 37°C. Nach 2 h wurde RNase freie DNase (Roche Diagnostics, Mannheim) zum Abbau der Template-DNA hinzugegeben und erneut bei 37°C für mindestens 20 min inkubiert.

Jeweils 4 µg Gesamt-RNA wurden in 10 x SSC-Puffer (1,5 M NaCl, 0,15 M tri-Natriumcitrat, pH 7,0) verdünnt und mittels einer Slot-Blot-Apparatur (Fisher Scientific, Schwerte) unter langsamem Durchsaugen der Lösung auf eine Nylonmembran (BioBondTM Nylon Membrane, Sigma, Taufkirchen) aufgetragen. Nach dem Trocknen der Membran erfolgte die Fixierung der RNA durch UV-Bestrahlung im Cross-Linker (Bio-Link, LTF-Labortechnik, Wasserburg) bei der Einstellung „preset 0“ und 125 mJ/cm² und die Blockierung der Membran in 1 x Blocking-Reagenz (Boehringer, Ingelheim). Zu diesem Zweck wurde die Membran 1 h bei 50°C in Hybridisierungslösung (2 % Blocking-Reagenz, 5 x SSC, 0,1 % Na-Laurylsarkosinat, 0,02 % SDS, 50 % Formamid) blockiert. Nach der Erwärmung auf 68°C folgte die Zugabe einer DIG-markierten RNA-Sonde und die Hybridisierung über Nacht. Anschließend wurde die Membran zweimal 15 min bei 20°C mit Waschpuffer 1 (2 x SSC, 0,1 % SDS (w/v)), anschließend zweimal 25 min bei 68°C in Waschpuffer 2 (0,2 x SSC, 0,1 % SDS (w/v)) gewaschen und nach kurzer Inkubation bei 20°C in Waschpuffer 3 (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, 0,3 % Tween 20, pH 7,5) für 30 min bei 20°C mit 20 ml 1x Blocking-Reagenz blockiert. Es wurden 2 µl Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Roche Diagnostics, Mannheim) zugegeben und die Membran für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dem dreimaligen Waschen in Waschpuffer 3 für je 20 min folgte die dreiminütige Inkubation in Detektionspuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5) die Benetzung mit Chemilumineszenzsubstrat CSPDTM (Roche Diagnostics, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:200 in Detektionspuffer und das abschließende Einschweißen in Klarsichtfolie. Nach 15minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Lichtemission im „luminescent image analyser“ LAS1000 (Fuji, Tokio, Japan) während einer 2-60minütigen Exposition der Membran detektiert.

Es wurde jeweils durch Detektion der *rnpB*-RNA, die die RNA-Untereinheit der RNase P darstellt, sichergestellt, dass gleiche Mengen an Gesamt-RNA für die Northern Blot-Analyse eingesetzt wurden.

2.6 Techniken zur Manipulation von Zellen

2.6.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Induktion der Kompetenz von *E. coli*-Zellen wurde erstmals von Sambrook *et al.* (1989) beschrieben. Durch Zugabe des Salzes CaCl₂ in der exponentiellen Wachstumsphase erhöht sich die Zellpermeabilität für Fremd-DNA und inaktiviert wahrscheinlich membranassoziierte Nukleasen. Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der Methode von Inoue *et al.* (1990) hergestellt und bei -80°C gelagert.

2.6.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Die bei -80°C gelagerten *E. coli* DH5α *mcr*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und zur Fremd-DNA gegeben. Der Ansatz wurde auf Eis mindestens 0,5 h inkubiert, bevor die Zellen einem Hitzeschock von 42°C für 1 min ausgesetzt wurden. Anschließend wurden 800 µl LB-Flüssigmedium hinzugefügt und der Ansatz wurde bei 37°C für 45 min inkubiert. Die Selektion der vektortragenden Zellen erfolgte durch das Ausstreichen auf antibiotikahaltigen Agarplatten.

2.6.3 Herstellung von *Synechocystis*-Insertionsmutanten

Zur Inaktivierung von Genen wurden Insertionsmutanten von *Synechocystis* durch das Einfügen einer Resistenzgenkassette hergestellt.

Zu diesem Zweck wurden Plasmide konstruiert, die das zu inaktivierende Gen enthielten und anschließend wurde in diese Sequenz eine Resistenzgenkassette inseriert. Die Resistenzgenkassetten stammten entweder aus dem Plasmid pUC4K (New England Biolabs, Frankfurt/Main), das eine Resistenz gegenüber Kanamycin vermittelt, oder aus dem Plasmid pUC4S (New England Biolabs, Frankfurt/Main), das eine Resistenz gegenüber

Spectinomycin vermittelt. Für die nach der Transformation von *Synechocystis* mit diesem Plasmid stattfindenden homologen Rekombination waren jeweils genügend große homologe DNA-Bereiche (ca. 500 bp) notwendig, die sich im Plasmid vor und nach der integrierten Resistenzgenkassette befanden.

2.6.4 Herstellung von *Synechocystis*-Expressionsmutanten

Zur Expression homologer bzw. heterologer Gene wurde der Vektor pAII (Lagarde *et al.*, 2000), der eine Expression von Genen unter der Kontrolle des *psbA2*-Promotors aus *Synechocystis* ermöglichte, bzw. der Vektor pCONEX (Gierga, 2004), der eine Expression von Genen unter der Kontrolle des *tac*-Promotors aus *E. coli* ermöglichte, verwendet. Während der *psbA2*-Promotor ein starker, lichtinduzierter Promotor ist und damit unter den hier gewählten Kultivierungsbedingungen für *Synechocystis* konstitutiv aktiv war, sollte ein Gen unter der Kontrolle des *tac*-Promotors in seiner Expression durch IPTG induzierbar sein (Sandström *et al.*, 2001). Die Expression dieser Gene fand aber im fast gleichen Maße auch ohne Zugabe von IPTG statt.

Die Promotorsequenz, das zu exprimierende Gen und die Resistenzgenkassette wurde in den Vektoren von homologen DNA-Bereichen aus *Synechocystis* flankiert, die die Rekombination ermöglichen und den Integrationsort des Promotors, des Gens und der Resistenzgenkassette bestimmen. Das bedeutete, dass mit der Rekombination der DNA-Bereich am Integrationsort inaktiviert wurde, so dass es nach Transformation von *Synechocystis* mit einem auf pAII basierenden Plasmids zur Inaktivierung des *psbA2*-Gens kommt. Dieses Gen liegt jedoch in drei Kopien im Genom vor, so dass die Inaktivierung einer der Kopien keinen negativen Effekt auf das Wachstum der aus der Transformation resultierenden Mutanten hat. Eine andere Strategie war die Auswahl neutraler DNA-Bereiche wie die flankierenden Rekombinationssequenzen RS1 und RS2 im Vektor pCONEX (Kunert *et al.*, 2000).

2.6.5 Transformation von *Synechocystis*-Zellen

Synechocystis besitzt eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von Fremd-DNA, so dass eine Vorbehandlung der Zellen nicht notwendig war.

Zur Transformation von *Synechocystis* wurden 2 ml einer Kultur mit einer OD₇₅₀ von ca. 2 (mind. 10⁹ Zellen) zentrifugiert (1000 g, 30°C, 2 min). Ein Großteil des Überstandes wurde verworfen und die Zellen in ca. 200 µl Rücklauf resuspendiert. Plasmid-DNA wurde in einer

Menge von 50-100 ng zugesetzt und die Zellen wurden anschließend bei 30°C im Dunkeln über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf BG11-Agarplatten ausplattiert und nach ca. 2-3 Tagen mit dem entsprechenden Antibiotikum in einer Endkonzentration von 15 µg/ml unterschichtet (bei Verwendung von Chloramphenicol nur 5 µg/ml). Durch nochmaliges Unterschichten mit Antibiotikum wurde der Selektionsdruck nach weiteren 2-3 Tagen erhöht. Während Wildtypzellen in der Regel nach 14 Tagen lysiert waren, wurden die ersten resistenten Zellkolonien auf der Agarplatte sichtbar.

Die vollständige Segregation der Mutation in alle Kopien des Genoms von *Synechocystis* konnte durch PCR-Analyse überprüft werden.

2.6.6 Transposonmutagenese von *Synechocystis*-Zellen

Die Transposonmutagenese konnte mit Hilfe einer mutierten Cosmidbank von *Synechocystis* (T. Ogawa, Universität Nagoya, Japan) durchgeführt werden. Als Ausgangsbasis für die mutierte Cosmidbank wurde die Cosmidbank verwendet, die für die Sequenzierung des Genoms von *Synechocystis* hergestellt wurde (Kotani *et al.*, 1996).

Zur Transformation wurden 15 ml Kultur mit einer maximalen OD₇₅₀ von 0,1 abzentrifugiert, das Pellet wurde im Rücklauf (ca. 300-400 µl) resuspendiert und 1 µl der amplifizierten Cosmidbank (Abschnitt 2.5.3) wurde zugesetzt. Nachdem die Zellen 30 min bei 30°C im Licht inkubiert wurden, wurde die Zellsuspension auf vier Filter (HATF08250, Ø 82 mm, Millipore, Bedford, USA), ausgestrichen, die vorher auf BG11-Agarplatten gelegt worden waren. Spätestens nach zweitägiger Inkubation im Licht bei 30°C wurden die Filter auf BG11-Agarplatten mit 5 µg/ml Chloramphenicol transferiert. Nach einer Woche waren die ersten Klone auf der Platte sichtbar, nach ca. 1,5 Wochen wurden alle Klone von der Platte abgewaschen und für das „Screenen“ auf Mutanten mit deregulierter GG-Synthese in BG11 Flüssigmedium mit 350 mM Maltose und Chloramphenicol (maximal 15 µg/ml) überführt. Nach mehreren Überimpfungen in Maltose- und Chloramphenicol-haltigem BG11 Flüssigmedium wurden die Zellen zur Vereinzelung auf BG11-Agarplatten mit 350 mM Maltose und Chloramphenicol (15 µg/ml) ausgestrichen. Nach einer Woche waren die ersten Kolonien sichtbar (Abschnitt 3.3.2).

2.7 Heterologe Genexpression in *E. coli* zur Reinigung von rekombinantem GgpS-Protein

Für die Aufreinigung des GgpS-Proteins aus *Synechocystis* wurde die *ggpS*-Gensequenz mit einer *Strep*-tag[®]-kodierenden Gensequenz (IBA GmbH, Göttingen) ausgestattet und in *E. coli* DH5a mcr heterolog exprimiert. Durch selektive Bindung des *Strep*-tag II-Fusionsproteins an eine Streptavidin- (*Strep*-Tactin-) Matrix erfolgte die Reinigung des nativen Fusionsproteins (Affinitätschromatographie). Es wurde sowohl ein GgpS-Protein mit einem *Strep*-tag am C-Terminus (GgpS-*Strep*) sowie am N-Terminus (*Strep*-GgpS) aufgereinigt.

Die Vorkultivierung von *E. coli* pIBA3-*ggpS* bzw. *E. coli* pIBA5-*ggpS* erfolgte über Nacht in 50 ml LB-Medium mit Carbenicillin (50 µg/ml) bei 37°C. Dazu wurden 500 ml carbenicillinhaltiges LB-Medium mit ca. 6 ml Vorkultur inokuliert und kultiviert, bis eine OD₆₀₀ von etwa 1 erreicht war. Es erfolgte die Zugabe von Anhydrotetracyclin (200 ng/ml) zur Induktion der Genexpression. Nach ca. 6 h wurden die *E. coli*-Zellen abzentrifugiert und Gesamtproteinextrakt hergestellt wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben.

Gesamtproteinextrakt in Waschpuffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) wurde anschließend auf eine *Strep*-Tactin-Säule (Säulenvolumen 3 ml) gegeben und 5 mal mit jeweils 6 ml Waschpuffer mit einer NaCl-Konzentration von 500 mM gewaschen, um alle nicht bzw. unspezifisch gebundenen Proteine zu entfernen. Anschließend wurde die Säule 3 mal mit 6 ml Waschpuffer ohne NaCl gewaschen, um das GgpS-Protein danach 6 mal mit jeweils 1,5 ml Elutionspuffer (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin, pH 8,0) in Abwesenheit von NaCl eluieren zu können. Dies war für den sich anschließenden GgpS-Enzymtest (Abschnitt 2.9) von Bedeutung, da die Aktivität des GgpS-Proteins in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration im Test untersucht werden sollte. Desthiobiotin verdrängte hierbei das *Strep*-getaggte GgpS-Protein von der *Strep*-Tactin-Matrix. GgpS-*Strep* bzw. *Strep*-GgpS befand sich hauptsächlich in der dritten bzw. vierten Elutionsfraktion.

Nach Isolierung des rekombinanten GgpS-Proteins wurde die Säule durch Zugabe von 45 ml Regenerationspuffer (Waschpuffer mit 1 mM HABA (Hydroxy-azaphenyl-benzoesäure)) regeneriert und stand nach mehrmaligem Waschen mit Waschpuffer für eine erneute Aufreinigung zur Verfügung.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Extraktion cytoplasmatischer Proteine aus *E. coli* bzw. *Synechocystis*

Alle Proteinarbeiten erfolgten unter ständiger Kühlung auf Eis. Zur Gewinnung von cytoplasmatischen Proteinen wurden die Zellen abzentrifugiert, zweimal mit einem entsprechenden Puffer gewaschen (für *Synechocystis*-Zellen mit GgpS-Enzymtestpuffer, Abschnitt 2.9 und für *E. coli*-Zellen mit Waschpuffer, Abschnitt 2.7) und anschließend in diesem Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte im FastPrep-Gerät FP120 (QBiogene, Heidelberg), wobei die Zellen dreimal 30 s bei 6,5 m/s in Aufschlussgefäßen mit 300 mg Glasperlen (\varnothing 0,2–0,3 mm) geschüttelt wurden. Zwischen den Zyklen wurden die Proben für 5 min auf Eis gekühlt. Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden abzentrifugiert (30 min, 4°C, 14 000 g). Die sich im Überstand befindenden Proteine wurden entweder direkt verwendet oder bei -80°C gelagert.

Für die Verwendung von *Synechocystis*-Proteinextrakt für einen GgpS-Aktivitätstest wurden die Proteine nach den Angaben des Herstellers mit Hilfe einer PD 10 Desalting column (Amersham Biosciences, Freiburg) von niedermolekularen Substanzen befreit.

2.8.2 Herstellung von invertierten Membranvesikeln aus *Synechocystis*

Invertierte Membranvesikel („inside out-vesicles“) wurden durch den Zellaufschluss mittels French Press (FRENCH[®] Pressure 40K Cell, Heinemann, Schwäbisch Gmünd) mit einem maximalen Druck von 40 000 psi bei 4°C hergestellt. Der Rohextrakt wurde anschließend bei 8 000 g zentrifugiert, um Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen abzutrennen. Die Membranfraktion wurde von der cytoplasmatischen Fraktion durch Ultrazentrifugation des Rohextraktes bei 250 000 g für 30 min bei 4°C getrennt. Nach Resuspension des Membranpellets in FtsH-Enzymtestpuffer (Abschnitt 2.9) wurde erneut zentrifugiert und anschließend die resuspendierte Membranfraktion bei -80°C gelagert.

2.8.3 Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden entweder nach Bradford (1976) oder mit der Amido Black-Methode bestimmt, wobei letztere eine exaktere Bestimmung des Proteingehaltes zuließ. Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde mit Hilfe des Roti[®]-Nanoquant-Reagenz (Carl Roth

GmbH, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proteinkonzentration mit Amido Black wurde nach Schaffner und Weissmann (1973) durchgeführt. Zur Herstellung einer Kalibriergeraden diente jeweils Rinderserumalbumin (BSA).

2.8.4 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben erfolgte in 10-12%igen SDS-Polyacrylamidgelen (Schägger und von Jagow, 1987) in einer BlueVertical 101-Apparatur (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg). Je nach weiterem Verwendungszweck wurden die Gele anschließend einer Coomassie-Färbung (Abschnitt 2.8.5) oder einer Western Blot-Analyse (Abschnitt 2.8.6) unterzogen.

2.8.5 Coomassie-Färbung

Ein- und zweidimensionale SDS-Gele wurden nach der Elektrophorese einer Coomassie-Färbung nach Sambrook *et al.* (1989) unterzogen. Zunächst wurden die Proteine 1 h in 45 % Methanol und 10 % Essigsäure fixiert und anschließend 1 h mit 45 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,2 % Coomassie Brilliant Blue G-250 gefärbt. Die Entfärbung des Hintergrunds erfolgte über Nacht in 10 % Essigsäure.

2.8.6 Western Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinextrakten wurden die Proteine gegebenenfalls mit Hilfe eines semi-dry-Blots aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Porengröße 0,45 μm , Millipore, Bedford) übertragen. Dazu wurde die Membran wenige Minuten in Methanol inkubiert, in Transferpuffer (10 mM CAPS, 0,9 % NaCl, 10 % Methanol, pH 11) äquilibriert und dann in einer semi-dry-Blotapparatur (Amersham Biosciences, Freiburg) auf einen Stapel aus fünf in Transferpuffer getränkten Whatman 3 mm-Papieren (Schleicher & Schüll, Dassel) gelegt. Darauf wurde das Proteingel luftblasenfrei gelegt und mit einem weiteren Stapel bestehend aus fünf Whatman-Papieren bedeckt. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte bei 0,8 mA/cm² Oberfläche für 1 h. Nach dem Transfer wurde die Membran über Nacht bei 4°C in Blockierungslösung (3 % BSA in Waschpuffer) inkubiert, der gewünschte erste Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000

bis 1:50 000 in Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, 0,9 % NaCl, pH 7,5) zugegeben und für weitere 60 min geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für je 20 min wurde Waschpuffer mit dem entsprechenden zweiten Antikörper (Verdünnung 1:10 000) auf die Membran gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Für die spätere Detektion wurde die an Anti-Meerschweinchen- oder Anti-Kaninchen-IgG konjugierte alkalische Phosphatase (Sigma-Aldrich, Darmstadt) genutzt. Nach dreimaligem Waschen wurde auf die Membran ein NBT/BCIP-Gemisch (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in Inkubationspuffer gegeben und im Dunkeln bis zur gewünschten Signalstärke inkubiert. Als Kontrolle, dass gleiche Mengen an Protein in jeder Spur aufgetragen wurden, wurde das Gel nach dem semi-dry-Blot mit Coomassie gefärbt.

2.8.7 Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE)

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE) ermöglicht die Trennung komplexer Proteingemische durch die sequentielle Anwendung zweier unabhängiger Methoden. In der ersten Dimension werden die Proteine mittels isoelektrischer Fokussierung in einem pH-Gradientengel nach ihrem spezifischen isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Die zweite Dimension ermöglicht durch eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese die zusätzliche Trennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes.

300 µg der in Lösung vorliegenden, denaturierten und reduzierten Proteine wurden mit 400 µl Rehydratisierungslösung (8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 1 % CHAPS, 19,4 % DTT, 0,5 % Pharmalyte 3-10, wenig Bromphenolblau) versetzt. Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) von cytoplasmatischen Proteinen wurden 18 cm-IPG-Streifen im pH-Bereich von 4-7 (Immobiline® DryStrips, Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Die Proteinprobe wurde in die Rinne einer Reswelling box pipettiert und der IPG-Streifen wurde mit der Gelseite nach unten auf die Lösung gelegt, ohne dass Flüssigkeit auf die Rückseite gelangte. Nach Inkubation für ca. 20 h wurde der IPG-Streifen mit der Gelseite nach oben in die Rinne des IPGphor™ Isoelectric Focussing System (Amersham Biosciences, Freiburg) überführt. Die Fokussierung erfolgte über 5 h bei 500 V, 5,5 h bei 3500 V und 10 h bei 35 000 bei 20°C. Die fokussierten Streifen wurden direkt für die zweite Dimension eingesetzt.

Vor dem Einsatz in die zweite Dimension mussten die fokussierten Streifen zur Reduktion der Proteine 15 min in Äquilibrierungslösung (50 mM Tris-HCl, 6 M Harnstoff, 30 % Glycerol, 4 % SDS, 1 % DTT, pH 6,8) inkubiert werden. Um überschüssiges DTT zu entfernen und die reduzierten Cysteinreste durch Alkylierung zu stabilisieren, wurden die IPG-Streifen

anschließend 15 min in Äquibrierungslösung mit 4 % Iodacetamid inkubiert, mit A. dest abgespült, kurz auf angefeuchtetem Filterpapier getrocknet und auf 12,5%ige SDS-Polyacrylamidgele gelegt. Die SDS-PAGE der zweiten Dimension lief zunächst 1 h bei 500 V, 16 000 mW und nach Einlaufen der Proteine ins Gel für ca. 20 h bei 500 V, 1200-2000 mW in einer Millipore-Apparatur (Bedford, USA). Die Analyse über 2D-PAGE wurde durch die Anfertigung von fünf Replikaten für jede Probe validiert.

Der Vergleich von Coomassie-gefärbten 2D-Gelen erfolgte computergestützt durch die Erstellung einer Falschfarbendarstellung von zwei übereinander gelagerten 2D-Gelen mit dem Programm Delta2D (Version 3.2, Decodon, Greifswald). Zur Quantifizierung von Proteinen auf 2D-Gelen wurde die Quantifizierungsfunktion des Programms verwendet. Als Bezugsgröße wurde die relative Intensität ausgedrückt als Volumen eines Proteinspots bei verschiedenen Bedingungen verglichen, d.h. das Volumen des betrachteten Proteinpunktes bezogen auf das Gesamtvolumen aller Proteinpunkte des Gels. Eine Akkumulation eines Proteins im Vergleich wurde angenommen, wenn der ermittelte Faktor der relativen Volumina größer als 2,0 und dies in allen Replikaten nachweisbar war.

2.8.8 Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF-MS

Interessante Spots wurden aus Coomassie-gefärbten 2D-Gelen ausgeschnitten und durch Aufnahme eines Peptidmassenspektrums via „matrixassisted laser desorption/ionisation time-of-flight“- (MALDI-TOF-) Massenspektrometrie durch das ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin Köln) analysiert und anschließend mit Hilfe von vergleichenden Datenbankanalysen identifiziert.

2.9 Enzymtest zur Bestimmung der GgpS-Aktivität

Der GgpS-Enzymtest diente zum Nachweis der GgpS-Enzymaktivität *in vitro* und basierte auf einer Entwicklung nach Schoor (1996), wobei die Reaktionen analog zum Biosyntheseweg von GG in *Synechocystis* ablaufen. ADP-Glukose und G3P reagierten in einem geeigneten Enzymtestpuffer unter Zusatz des Enzyms miteinander zu GGP (Primärreaktion). Die erste Reaktion wurde nach 30 min durch zehninütiges Erhitzen der Proben auf 100°C abgebrochen. Die Aktivität der GgpS konnte anschließend durch die Detektion des gebildeten ADP bestimmt werden (Abschnitt 2.9.2) oder es erfolgte in einem zweiten Schritt

(Sekundärreaktion) die Dephosphorylierung des gebildeten GGP zu GG durch Zusatz alkalischer Phosphatase (CIAP, MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Abschnitt 2.9.1). Die Detektion des GG erfolgte dabei nach entsprechender Probenaufarbeitung mittels GC.

Enzymtestpuffer: 20 mM Tris-Maleat, 10 mM $MgCl_2 \times 6 H_2O$, 0,1 mM EDTA, pH 7,5, versuchsabhängig 0-400 mM verschiedene ionische bzw. nicht-ionische Osmolyte

ADP-Glukose: 2,25 mM Endkonz. im Enzymtestpuffer ohne NaCl

G3P: 2,25 mM Endkonz. im Enzymtestpuffer ohne NaCl

Protein: 0,5-1 μg rekombinante GgpS oder 50-100 μg Gesamtproteinextrakt aus *Synechocystis*

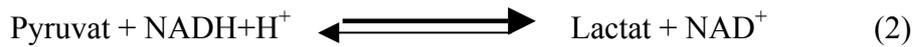
2.9.1 Bestimmung der GgpS-Aktivität durch Detektion des gebildeten GG

Nachdem das in der Primärreaktion entstandene GGP durch Zusatz von alkalischer Phosphatase zu GG dephosphoryliert wurde, wurden die Proben mit 400 μl 80%igem Aceton, welches den internen Standard enthielt, versetzt und ca. 2 h bei $-20^\circ C$ inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation wurde der Überstand mit Hilfe der „SpeedVac“ (Eppendorf Concentrator 5301) eingedampft. Um eventuell vorhandene Salze zu entfernen, wurde das Pellet in 200 μl absolutem Ethanol aufgenommen, resuspendiert und der Ansatz erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein GC-Glasvial überführt, unter einem Luftstrom getrocknet und entsprechend der Vorschrift zum Nachweis von niedermolekularen Substanzen mittels GC derivatisiert (Abschnitt 2.11).

2.9.2 Bestimmung der GgpS-Aktivität durch Detektion des gebildeten ADP

Bei der Kondensation von ADP-Glukose und G3P durch das GgpS-Protein entsteht neben GGP auch ADP, dessen Konzentration durch einen gekoppelten enzymatischen Test bestimmt werden konnte.

Zur enzymatischen Bestimmung von ADP wurden folgende Enzymreaktionen benutzt, wobei Reaktion (1) durch die Pyruvatkinase und Reaktion (2) durch die Lactatdehydrogenase katalysiert werden:



Durch Koppeln der Reaktion (1) mit der Indikatorreaktion (2), einem Dehydrogenasesystem, kann die ADP-Konzentration durch einen optischen Test ermittelt werden. Da die Gleichgewichte beider Reaktionen auf der rechten Seite liegen, ist eine quantitative Umsetzung von ADP in ATP und von Pyruvat in Lactat gewährleistet. Aus den Reaktionsgleichungen (1) und (2) ist ersichtlich, dass pro mol umgesetztes ADP 1 mol NADH verbraucht wird. Die verbrauchte NADH-Konzentration konnte aus der Extinktionsänderung der Inkubationslösung berechnet werden.

Der Messansatz enthielt folgende Komponenten:

720 μl 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5

40 μl 0,5 M MgSO_4

40 μl 1 M KCl

16 μl PEP (6,4 mg/ml)

80 μl der zu untersuchenden ADP-Lösung

40 μl LDH (0,1 mg/ml Tris-Puffer)

Es wurde gründlich gemischt und anschließend bei 365 nm der Startpunkt definiert.

24 μl NADH (7,5 mg/ml)

Nach nochmaligem Mischen wurde die Extinktion bei 365 nm solange verfolgt, bis sich ein konstanter Wert einstellte (E1).

40 μl PK-Lösung (0,1 mg/ml Tris-Puffer)

Es wurde gründlich gemischt und die Extinktion bei 365 nm erneut bis zum Erreichen eines konstanten Wertes verfolgt (E2).

ΔE_{365} wurde aus E1 und E2 bestimmt und die Konzentration an umgesetztem NADH bzw. ADP mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für NADH ($\epsilon_{365} = 3,4 \cdot 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bestimmt.

2.10 Enzymtest zur Bestimmung der FtsH-Aktivität

Zur Bestimmung der FtsH(Slr0228)-Aktivität wurden invertierte Membranvesikel aus *Synechocystis*-Zellen hergestellt (Abschnitt 2.8.2), die Slr0228 als Membranprotein enthielten. 25 µg Membranprotein in Membranvesikeln wurden mit 1 µg rekombinanter *Strep*-GgpS (Abschnitt 2.7) bei 30°C in FtsH-Enzymtestpuffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 25 µM Zink-Acetat, 4,5 mM Succinat, pH 8,1) in Anwesenheit von 5 mM ATP inkubiert (Akiyama, 2002). Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Inkubation bei 100°C abgestoppt und der GgpS-Proteingehalt im Ansatz mit Hilfe des Western Blots analysiert (Abschnitt 2.8.6).

2.11 Nachweis niedermolekularer Substanzen mittels Gaschromatographie

Zur Messung des Gehaltes interner Osmolyte wurden 1-2 ml einer Kultur 5 min bei 20 000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellpellets bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Waren im Außenmedium hohe Mengen an Osmolyten vorhanden, dessen Gehalt in den Zellen bestimmt werden sollte, wurde zwei Mal mit Medium gleicher Osmolarität (z.B. mit ionischen Osmolyten wie NaCl) gewaschen. Die Pellets wurden in 500 µl EtOH (abs.) mit internem Standard resuspendiert. Es folgte eine dreistündige Inkubation bei 65°C, anschließend wurden nach Abkühlung der Proben 250 µl Chloroform zugesetzt, gut gemischt und 500 µl H₂O zugegeben. Nach einer Zentrifugation (20 000 g, 4°C, 30 min) wurden ca. 700 µl des Überstandes in ein neues Gefäß überführt und in der SpeedVac (Eppendorf Concentrator 5301) bei 65°C getrocknet. Zur Entsalzung der Proben wurde das Pellet in 500 µl EtOH (abs.) gelöst und anschließend die Probe zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein GC-Glasvial überführt und im Heizblock bei 65°C unter einem Luftstrom getrocknet.

Zur Derivatisierung wurden die Proben in je 35 µl Pyridin mit 20 mg/ml O-Methoxylamin gelöst und 90 min bei 30°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Dabei bewirkte O-Methoxylamin die Stabilisierung der offenkettigen Form enthaltener Zucker, damit alle Hydroxylgruppen bei der anschließenden Behandlung mit 65 µl MSTFA für 1 h bei 65°C für die Silylierung zugänglich waren.

Anschließend wurden die Proben durch einen Gaschromatographen (TRACE GC 2000 *series* der Firma Thermo Finnigan, Mailand, Italien) analysiert. Zur Auftrennung wurde eine Kapillarsäule des Typs SE-54 der Firma Mega, Legnano, Italien, verwendet, wobei als mobile

Phase bzw. Trägergas Stickstoff diente. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors.

Die Trennung erfolgte bei folgendem Temperaturprogramm:

2 min 60°C

Anstieg von 30°C/min

3 min 280°C

Anstieg von 30°C/min

5 min 320°C

Die Menge des zu analysierenden Osmolyts konnte durch die Fläche des Peaks bestimmt werden, die in ein Verhältnis zur Peakfläche des internen Standards gesetzt wurde, dessen Menge bekannt war. Die Osmolytmengen wurden anschließend auf das analysierte Zellkulturvolumen und die optische Dichte der Proben bei 750 nm bezogen.

3. Ergebnisse

Während die Komponenten der Osmoregulation meistens identifiziert und charakterisiert sind, ist der Mechanismus dieses Prozesses weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit wurden deshalb zwei Regulationsvorgänge der Synthese der osmoprotektiven Substanz GG in *Synechocystis*-Zellen untersucht. Zum einen wurde die Regulation der GG-Synthese unmittelbar nach einem Salzschock analysiert, und zum anderen wurde als Schwerpunkt dieser Arbeit die „steady state“-Regulation der GG-Synthese in vollständig salzakklimatisierten Zellen betrachtet. Die lineare Abhängigkeit des Gehaltes einer osmoprotektiven Substanz in akklimatisierten Zellen von der externen Salzkonzentration ist ein universelles Prinzip bei Bakterien, die als Reaktion auf einen osmotischen Stress eine osmoprotektive Substanz synthetisieren oder aufnehmen können. Der Mechanismus der „steady state“-Regulation konnte bis jetzt jedoch für kein Bakterium aufgeklärt werden.

Für *Synechocystis* musste zunächst gezeigt werden, auf welcher Ebene die „steady state“-Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen stattfindet. Denkbar wäre, dass die Regulation der GG-Synthese durch die salzabhängige Transkription des *ggsS*-Gens oder durch biochemische Modulation der Aktivität des Schlüsselenzyms GgpS vermittelt wird. Weiterhin sollte der Einfluss des Transporters Ggt auf die GG-Synthese in akklimatisierten Zellen charakterisiert werden. Regulatorische Proteine bzw. Substanzen, die die GG-Synthese nach einem Salzschock bzw. in akklimatisierten Zellen beeinflussen, sollten in einem dritten Ansatz identifiziert werden.

3.1 Die Ebene der Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass die Regulation der GG-Synthese in *Synechocystis*-Zellen unmittelbar nach einem osmotischen Schock mit NaCl durch biochemische Aktivierung des bereits unter Kontrollbedingungen vorliegenden Schlüsselenzyms GgpS vermittelt wird, da auch bei gehemmter Proteinbiosynthese die Induktion der GG-Synthese stattfinden kann (Hagemann *et al.*, 1990; Hagemann *et al.*, 1996a). Zudem ist die Modulation der GgpS-Aktivität im *Synechocystis*-Zellextrakt in

Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration im Enzymtest *in vitro* darstellbar (Schoor *et al.*, 1999; Marin *et al.*, 1998; Hagemann *et al.*, 2001).

Im Gegensatz dazu war die Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen noch nicht dahingehend charakterisiert worden, auf welcher Ebene die Regulation stattfindet. Es wurde vermutet, dass die Regulation der GG-Synthese in akklimatisierten Zellen hauptsächlich durch die Transkription vermittelt wird (Marin *et al.*, 2002), da eine lineare Abhängigkeit von externer Salzkonzentration, *ggsS*-mRNA-Gehalt, GgpS-Proteingehalt und GG-Gehalt besteht (Abb. 1.2).

Um den internen Gehalt an GG unabhängig von der *ggsS*-Expression in salzakklimatisierten *Synechocystis*-Zellen betrachten zu können, wurde eine *ggsS*⁺-Mutante hergestellt, die das *ggsS*-Gen unter der Kontrolle des starken, durch Licht induzierbaren Promotors des *psbA2*-Gens exprimiert. Das *psbA2*-Gen kodiert das D1-Protein des Photosystems II in *Synechocystis*. Der Promotor wurde bereits erfolgreich für die Expression verschiedener homologer und heterologer Gene verwendet (Lagarde *et al.*, 2000) und war bei den hier gewählten Kultivierungsbedingungen konstitutiv aktiv.

Die *ggsS*⁺-Mutante zeigte weder unter Kontrollbedingungen noch nach einem Salzschock eine Beeinträchtigung im Wachstum im Vergleich zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnten in der *ggsS*⁺-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp bereits vor dem Salzschock geringe Mengen an GG detektiert werden (Abb. 3.1). Unmittelbar nach einem Salzschock stieg der GG-Gehalt in der *ggsS*⁺-Mutante stärker als im Wildtyp an, während 24 Stunden nach dem Salzschock ein vergleichbarer GG-Gehalt in der Mutante erreicht wurde.

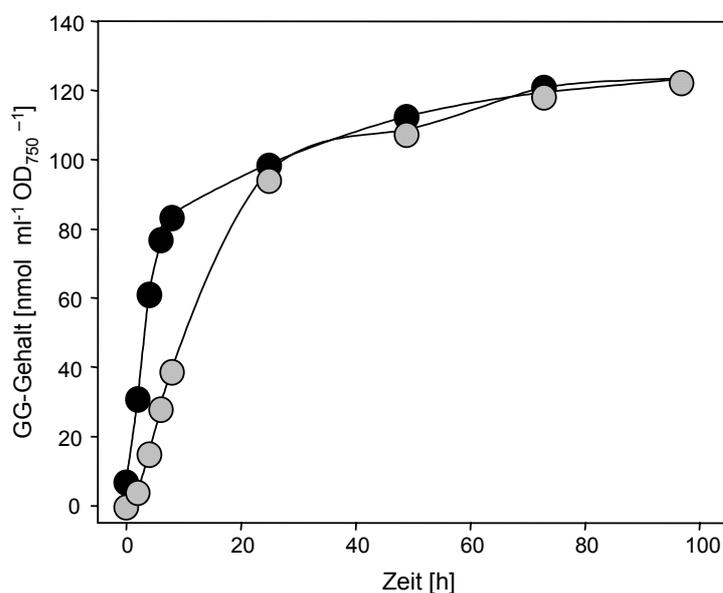


Abb. 3.1: Charakterisierung von Zellen des Wildtyps und der *ggsS*⁺-Mutante unmittelbar nach einem Salzschock

Zellen des Wildtyps (grau) und der *ggsS*⁺-Mutante (schwarz) wurden einem osmotischen Schock mit 684 mM NaCl ausgesetzt. Die interne Akkumulation der osmoprotektiven Substanz GG wurde über einen Zeitraum von vier Tagen verfolgt.

In der salzakklimatisierten *ggpS*⁺-Mutante war die Expression des *ggpS*-Gens im Gegensatz zur Expression des *ggpS*-Gens im Wildtyp unabhängig von der externen Salzkonzentration, da bei verschiedenen externen Salzkonzentrationen ein vergleichbarer erhöhter GgpS-Proteingehalt in *ggpS*⁺-Zellen detektiert werden konnte (Abb. 3.2A). Jedoch konnte trotz des erhöhten GgpS-Proteingehalts in akklimatisierten *ggpS*⁺-Zellen die gleiche GG-Menge wie im akklimatisierten Wildtyp gemessen werden (Abb. 3.2B). Da im Medium der *ggpS*⁺-Mutante bei allen Bedingungen kein GG nachweisbar war (Daten nicht gezeigt), war die GG-Syntheserate in der akklimatisierten *ggpS*⁺-Mutante mit der des Wildtyps bei den verschiedenen Salzkonzentrationen vergleichbar. Allerdings wurde unter Kontrollbedingungen (18 mM NaCl) in der *ggpS*⁺-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp GG detektiert, was auch schon in Abbildung 3.1 gezeigt wurde. Unter Kontrollbedingungen und unmittelbar nach einem Salzschock hat der erhöhte GgpS-Proteingehalt somit Einfluss auf die GG-Syntheserate, während er keinen Einfluss auf die GG-Syntheserate in salzakklimatisierten Zellen der Mutante hat.

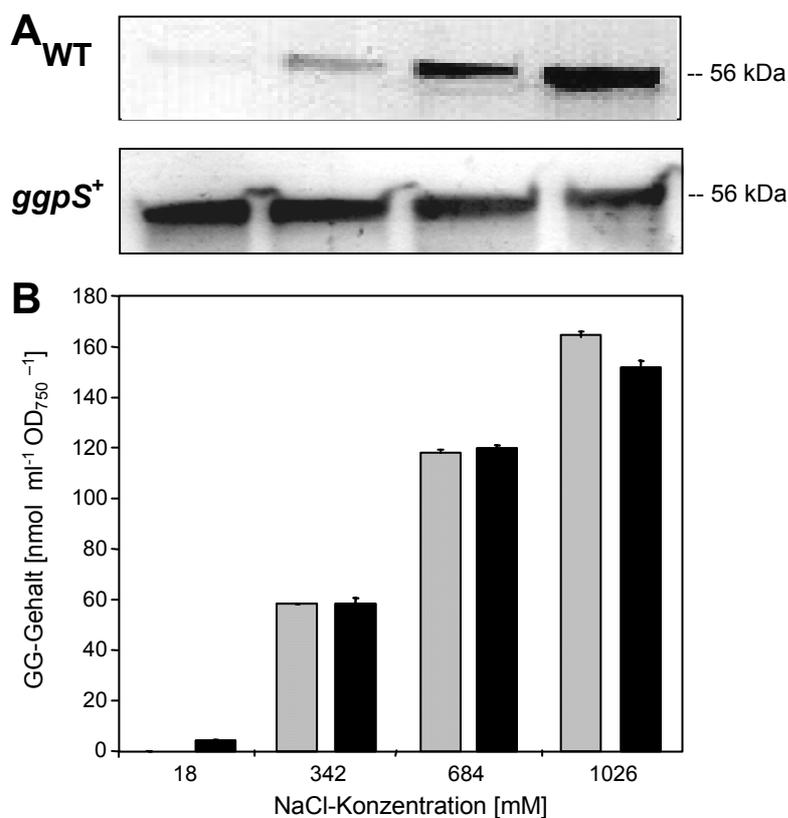


Abb. 3.2: Charakterisierung von Zellen des Wildtyps und der *ggpS*⁺-Mutante nach Akklimatisierung an verschiedene NaCl-Konzentrationen

Zellen des Wildtyps (grau) und der *ggpS*⁺-Mutante (schwarz) wurden an Medium unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen für vier Tage akklimatisiert. Der GgpS-Proteingehalt wurde mittels Western Blot-Analyse (A) bzw. der interne GG-Gehalt wurde gaschromatographisch (B) bestimmt.

Da die GG-Syntheserate in der *ggsS*⁺-Mutante mit der des Wildtyps im salzakklimatisierten Zustand vergleichbar war, findet in salzakklimatisierten *Synechocystis*-Zellen eine Regulation der GG-Synthese statt, die unabhängig ist vom Gehalt des GgpS-Proteins bzw. der *ggsS*-mRNA, sofern genügend GgpS-Protein vorhanden ist. Auf der Ebene der Transkription bzw. Translation findet keine Regulation in *Synechocystis*-Zellen statt, um den internen Gehalt an GG der externen NaCl-Konzentration zum Ausgleich der Osmolalitäten des Mediums und des Cytoplasmas anzupassen. Die Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten *Synechocystis*-Zellen wird folglich biochemisch vermittelt, wobei nicht benötigtes GgpS-Protein gehemmt wird, um eine Überproduktion an GG zu verhindern.

3.2 Die Rolle des GG-Aufnahmesystems bei der Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen

Die Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen von *Synechocystis* wird durch biochemische Modulation des GgpS-Proteins vermittelt, wodurch eine energetisch ungünstige Überproduktion von GG durch Hemmung der GgpS-Aktivität verhindert wird (Abschnitt 3.1). Der Mechanismus der Hemmung der GgpS-Aktivität in salzakklimatisierten Zellen sollte im Folgenden näher charakterisiert werden.

Eine attraktive Hypothese für die Regulation des GG-Gehaltes in salzakklimatisierten *Synechocystis*-Zellen stellte ein bereits in der Einleitung beschriebener Regelkreis dar, in dem zunächst zuviel produziertes GG aus der Zelle austritt. Der Austritt von GG aus der Zelle konnte für die *ggtA*⁻-Mutante beobachtet werden, die keinen funktionell aktiven Transporter Ggt synthetisieren kann, da die ATP-bindende Untereinheit des Transporters mutiert ist. Abbildung 3.3A zeigt, dass salzakklimatisierten Zellen der *ggtA*⁻-Mutante den gleichen internen GG-Gehalt aufwiesen wie Wildtypzellen, jedoch GG nach einem osmotischen Schock nur im Medium der *ggtA*⁻-Mutante akkumulierte (Abb. 3.3B). Da keine Veränderung der *ggsS*-Expression in der *ggtA*⁻-Mutante nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt), muss folglich die GG-Syntheserate in der Mutante im Gegensatz zum Wildtyp erhöht sein, was auf eine erhöhte Aktivität des GgpS-Enzyms zurückgeführt werden kann. Aufgrund der Akkumulation von GG im Medium von *ggtA*⁻-Kulturen wurde dem Transporter Ggt die Funktion eines Rückgewinnungssystems für GG eingeräumt, das durch die Cytoplasmamembran abgegebenes GG wieder in die Zelle transportiert (Hagemann *et al.*, 1996b).

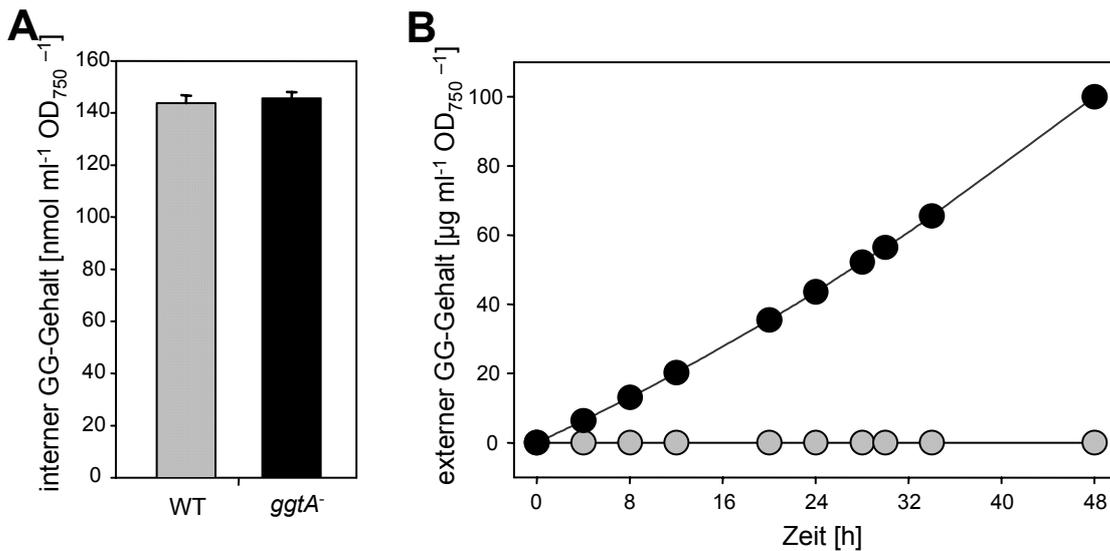


Abb. 3.3: Interner und externer GG-Gehalt in Kulturen von salzakklimatisierten Wildtypzellen und Zellen der *ggtA*⁻-Mutante

Wildtypzellen (grau) bzw. Zellen der *ggtA*⁻-Mutante (schwarz) wurden in Medium mit 684 mM NaCl kultiviert. Der GG-Gehalt wurde sowohl intern (A) als auch im Medium (B) gaschromatographisch vier Tage nach osmotischem Schock bestimmt.

Im Periplasma vorhandenes GG wird von dem Bindeprotein GgtB des Transporters Ggt erkannt. Der nachfolgende Transport in die Zelle könnte ein Signal generieren, das zu einer Hemmung der GG-Synthese führt. Die GG-Syntheserate würde dann in Abhängigkeit von der Aktivität des Transporters Ggt moduliert. Für jede gegebene externe Salzkonzentration könnte durch die biochemische Modulation der GgpS-Aktivität der GG-Gehalt in Abhängigkeit von der Aktivität des Transporters Ggt in der Zelle eingestellt und konstant gehalten werden.

3.2.1 Einfluss des Transports osmoprotektiver Substanzen auf die GG-Synthese

Um die regulative Rolle des GG-Aufnahmesystems für die GG-Synthese zu klären, wurde die GG-Synthese in Abhängigkeit von der Aktivität des Transporters Ggt durch Zugabe von Osmolyten wie Trehalose und Saccharose, die ebenfalls vom Transporter Ggt erkannt und transportiert werden können, zu salzakklimatisierten Wildtypzellen untersucht. Zellen des Wildtyps von *Synechocystis* und der *ggtA*⁻-Mutante wurden an Medium mit 684 mM NaCl für vier Tage akklimatisiert und mit 10 mM Trehalose bzw. Saccharose versetzt. Über einen Zeitraum von 48 h wurde die interne und externe GG-Menge gaschromatographisch

bestimmt. Nach Trehalosezugabe konnten steigende Mengen dieses Osmolyts in Wildtypzellen gemessen werden. Die *ggtA*⁻-Mutante zeigte hingegen aufgrund des nicht vorhandenen GgtA-Proteins keine Aufnahmeaktivität (Abb. 3.4A).

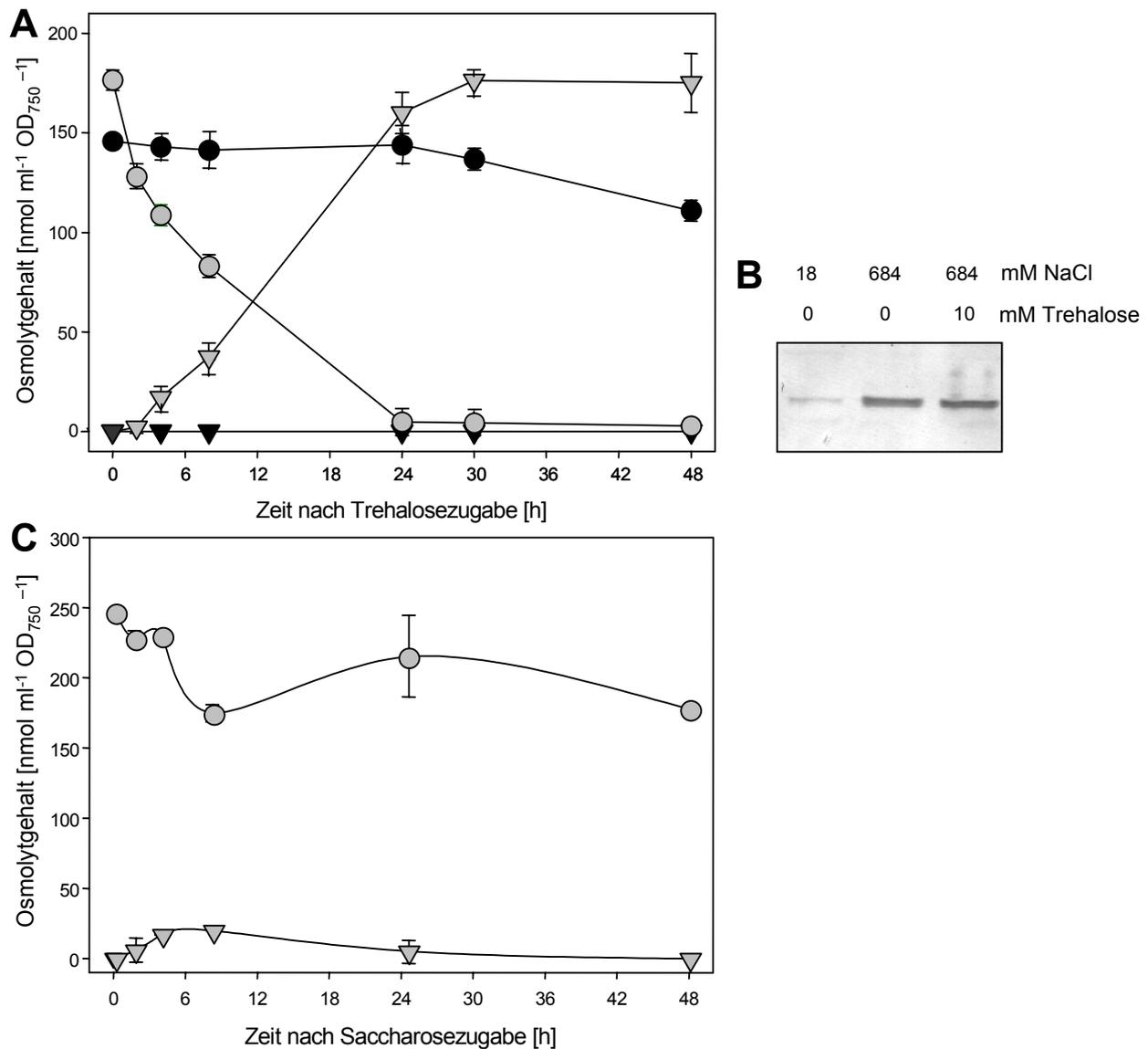


Abb. 3.4: Charakterisierung von salzakklimatisierten Wildtypzellen bzw. Zellen der *ggtA*⁻-Mutante nach Zugabe der Osmolyte Trehalose bzw. Saccharose

Wildtypzellen (grau) bzw. Zellen der *ggtA*⁻-Mutante (schwarz) wurden für vier Tage an Medium mit 684 mM NaCl akklimatisiert. Nach Zugabe von 10 mM Trehalose bzw. 10 mM Saccharose wurde über 48 h der Gehalt an GG (○, ●) und Trehalose (▽, ▼) (A) bzw. an GG (○) und Saccharose (▽) (C) gaschromatographisch bestimmt. Außerdem wurde der GgpS-Proteingehalt in salzakklimatisierten Wildtypzellen nach Zugabe von Trehalose mit Hilfe der Western Blot-Analyse bestimmt (B).

Da der GG-Gehalt mit der Aufnahme von Trehalose in Wildtypzellen sank, GG aber nicht im Medium detektiert wurde (Daten nicht gezeigt), wurde die Synthese von GG unter diesen Bedingungen gehemmt. Nach 24 h konnte nahezu kein GG mehr in den akklimatisierten Zellen detektiert werden, was neben dem vollständigen Abschalten der GG-Synthese auf eine Verstoffwechslung des Osmolyts hindeutete. Die Hemmung der GG-Synthese nach Trehalosezugabe in salzakklimatisierten Wildtypzellen war dabei nicht auf Veränderungen im GgpS-Proteingehalt zurückzuführen (Abb. 3.4B), so dass auf eine biochemische Modulation der GgpS-Aktivität geschlossen wurde.

Die Hemmung der GG-Synthese nach Zugabe von Trehalose zu salzakklimatisierten Zellen stand im Einklang mit der Hypothese, dass der Transporter Ggt eine direkte Rolle bei der biochemischen Modulation des GgpS-Proteins in akklimatisierten Zellen spielt. Allerdings konnte nicht unterschieden werden, ob die biochemische Modulation der GgpS-Aktivität tatsächlich auf die Aktivität des Transporters oder auf die durch die Aufnahme bedingte Konzentrationserhöhung eines Osmolyts in der Zelle zurückzuführen ist.

Um weitere Erkenntnisse zu sammeln, wurde der Einfluss der Saccharoseaufnahme auf die GG-Synthese analysiert. Neben GG kann der Transporter Ggt auch Saccharose mit höherer Affinität als Trehalose binden und transportieren (Mikkat *et al.*, 1997). Wie in Abbildung 3.4C gezeigt, konnte keine Akkumulation von Saccharose im Cytoplasma von salzakklimatisierten Wildtypzellen nach Saccharosezugabe detektiert werden. Allerdings kann Saccharose im Cytoplasma hydrolytisch gespalten werden (Mikkat *et al.*, 1997), weshalb die Abnahme der externen Saccharosekonzentration als Indikator für die Saccharoseaufnahme diente. Parallel zur Aufnahme von Saccharose war nur eine geringe Abnahme des GG-Gehaltes in der ersten Phase nach Zugabe beobachtbar, obwohl der Transporter Ggt auch unter diesen Bedingungen aktiv war.

Da trotz eines aktiven Transporters Ggt die GG-Synthese nach Saccharosezugabe nicht gehemmt wurde, zeigten diese Daten, dass die Aktivität des Transporters Ggt wahrscheinlich keinen direkten Einfluss auf die Aktivität des GgpS-Proteins nimmt und nur die Konzentration intern akkumulierter Osmolyte eine Rolle bei der Hemmung der GG-Synthese spielt. Da Saccharose anders als Trehalose intern nicht akkumuliert wird, wird kein Signal durch die Aktivität des Transporters generiert, das eine Hemmung der GG-Synthese nach Saccharosezugabe bewirkt.

3.2.2 Einfluss der Synthese osmoprotektiver Substanzen auf die GG-Synthese

Um den Einfluss der Akkumulation osmoprotektiver Substanzen näher zu charakterisieren, war die Etablierung eines Trehalose synthetisierenden Systems in *Synechocystis* von Bedeutung. *Synechocystis* ist nicht in der Lage, Trehalose zu synthetisieren. Die Synthese von Trehalose in *E. coli* bzw. *Mycobacterium tuberculosis* verläuft ähnlich wie die Synthese von GG in *Synechocystis*. Nach der enzymatischen Kondensation von Glukose-6-Phosphat und UDP-Glukose bzw. ADP-Glukose durch die Trehalose-6-Phosphat-Synthase (OtsA) wird das Zwischenprodukt Trehalose-6-Phosphat durch die Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase (OtsB) dephosphoryliert. In *M. tuberculosis* liegen die Gene *otsA* und *otsB* im Gegensatz zu *E. coli* nicht in einem Operon vor. In *Synechocystis* steht ADP-Glukose als Substrat für die GG-Synthese zur Verfügung (Hagemann und Erdmann, 1994). Während in *E. coli* UDP-Glukose als Substrat für die Synthese von Trehalose dient, wurde für die Trehalosesynthese von *M. tuberculosis* unter anderem ADP-Glukose als Substrat beschrieben (Pan *et al.*, 2002). Da nicht bekannt ist, ob in *Synechocystis* geeignete Mengen an UDP-Glukose für die Synthese von Trehalose zur Verfügung stehen würden, wurde das *otsA*-Gen aus *M. tuberculosis* für die heterologe Expression verwendet. Da im Genom von *M. tuberculosis* zwei Leserahmen existieren, deren abgeleitete Proteinsequenzen hohe Ähnlichkeiten zu OtsB aus *E. coli* aufweisen (De Smet *et al.*, 2000), wurde *otsB* aus *E. coli* für die heterologe Expression in *Synechocystis* gewählt.

Als Expressionssystem wurde ein Vektor verwendet, in den die Gene *otsA* aus *M. tuberculosis* und *otsB* aus *E. coli* stromabwärts des konditional aktiven *tac*-Promotors aus *E. coli* durch Ligation eingebracht wurden, der durch den LacI-Repressor reguliert wird und durch IPTG induzierbar ist. Dieses System wurde bereits erfolgreich für die konditionale Expression des *psbA2*- und des *isiA*-Gens in *Synechococcus* sp. PCC 7942 benutzt (Sandström *et al.*, 2001). Um die Expression beider Gene sicherzustellen, wurde das 3'-Ende des *otsA*-Gens ohne das Stopkodon mit dem 5'-Ende des *otsB*-Gens ligiert. Die richtige Faltung beider Proteine im Proteinkomplex sollte durch eine „Linker“-Sequenz zwischen beiden Genen, die für acht Aminosäuren kodiert, ermöglicht werden (Seo *et al.*, 2000), analog zur homologen Expression eines Proteinkomplexes, bestehend aus OtsA und OtsB in *E. coli*. Das so generierte chimäre Genkonstrukt wird im Folgenden *otsALB* genannt. Nach Transformation von *Synechocystis*-Zellen mit diesem Vektor wurden der *tac*-Promotor und die Gene *otsA* und *otsB* durch homologe Rekombination in einen neutralen Bereich des Genoms integriert (Kunert *et al.*, 2000). Abbildung 3.5 zeigt die Anordnung des chimären Genkonstrukts *otsALB* im Genom der auf diese Weise generierten Mutante *otsALB*⁺.

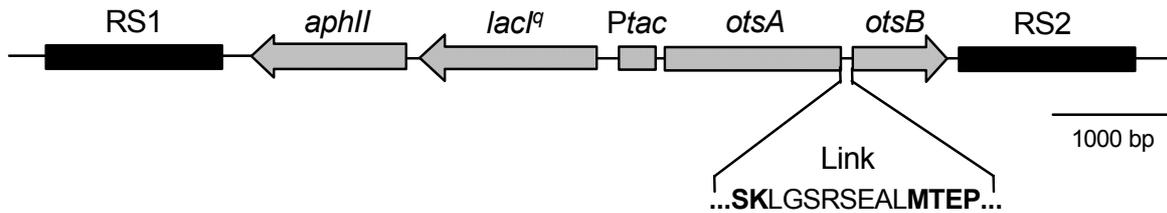


Abb. 3.5: Schematische Darstellung des Insertionsortes für das chimäre Genkonstrukt *otsALB* im Genom der *Synechocystis*-Mutanten *otsALB*⁺ bzw. *ggtA*⁻*otsALB*⁺

Die graue Sequenz zwischen den beiden neutralen Bereichen RS1 und RS2 (schwarz) wurde durch homologe Rekombination in das Genom von *Synechocystis* integriert. Durch die Kanamycinresistenz vermittelnde Genkassette *aphII* wurde der Selektionsdruck für die Integration hervorgerufen. Das Gen *lacI^q* kodiert den Repressor LacI aus *E. coli*, der ohne IPTG die Expression der unter der Kontrolle des *tac*-Promotors (*P_{tac}*) stehenden Gene inhibiert. Die abgeleiteten Proteinsequenzen des C-Terminus von OtsA aus *M. tuberculosis* und des N-Terminus von OtsB aus *E. coli* sind fett dargestellt, dazwischen befindet sich die „Linker“-Sequenz, bestehend aus acht Aminosäuren.

Zusätzlich wurde die *ggtA*⁻-Mutante mit diesem Vektor transformiert. Die *ggtA*⁻*otsALB*⁺-Mutante wurde generiert, um auszuschließen, dass die synthetisierte Trehalose möglicherweise von der salzakklimatisierten Zelle bei Überproduktion ausgeschleust und vom Transporter Ggt erneut aufgenommen werden würde, wie das für GG gezeigt werden konnte (Abb. 3.3). Die erfolgreiche genomische Modifikation der beiden Mutanten wurde durch PCR-Analyse verifiziert. Da sich hinsichtlich des Gehalts osmoprotektiver Substanzen die Mutante *ggtA*⁻*otsALB*⁺ ähnlich wie die Mutante *otsALB*⁺ verhielt, werden im Folgenden nur die Ergebnisse der Mutante *otsALB*⁺ beschrieben.

Im Gegensatz zum Wildtyp von *Synechocystis* konnte das *otsALB*-Transkript in der *otsALB*⁺-Mutante nachgewiesen werden (Abb. 3.6C). Die Mutante *otsALB*⁺ war zudem unter Kontrollbedingungen und akklimatisiert an verschiedene Salzkonzentrationen in der Lage, Trehalose bereits ohne Zugabe des Induktors IPTG zu synthetisieren (Abb. 3.6A). Geringe Mengen an Trehalose wurden sogar ins Medium abgegeben (Abb. 3.6B). Das chimäre Fusionsprotein OtsALB war somit in *Synechocystis* funktionell aktiv. Da die Zugabe von IPTG die Expression des chimären *otsALB*-Genkonstruktes nur gering verstärkte (Daten nicht gezeigt), wurde auf die Zugabe in allen weiteren Experimenten verzichtet.

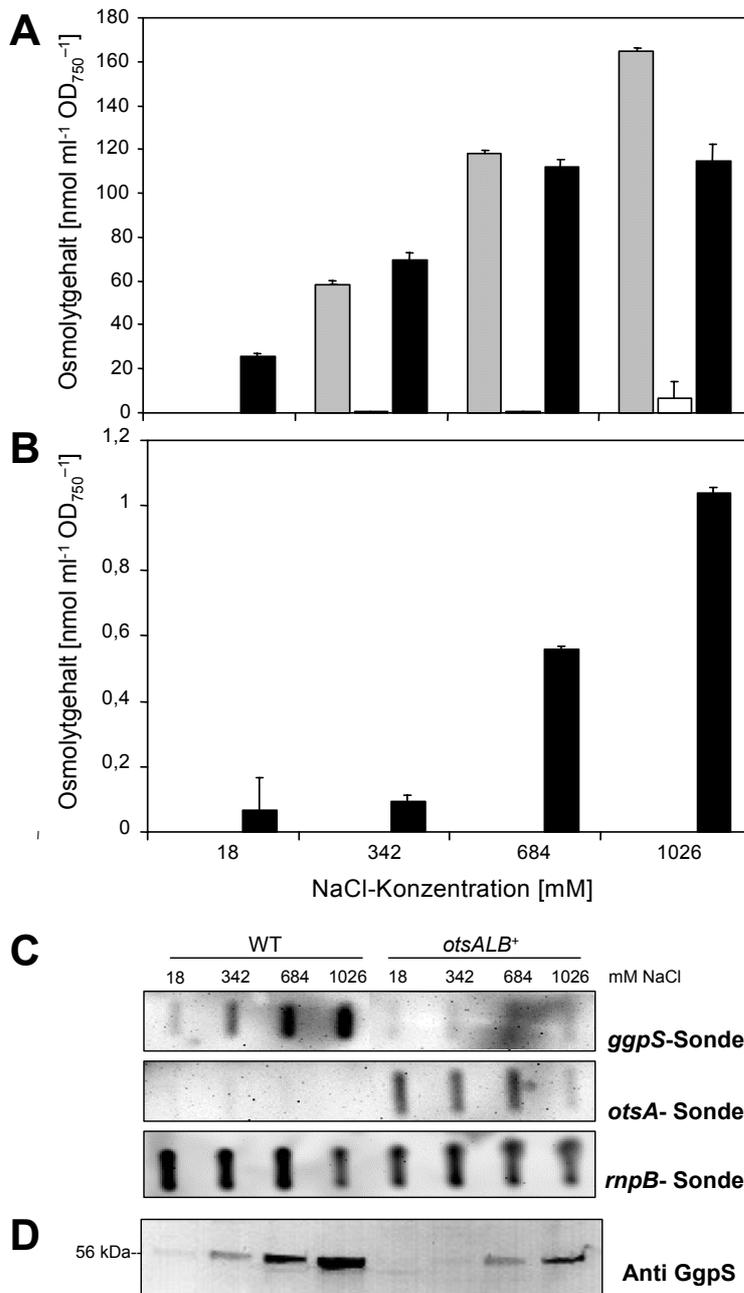


Abb. 3.6: Charakterisierung von Zellen des Wildtyps bzw. der *otsALB*⁺-Mutante nach Akklimation an verschiedene NaCl-Konzentrationen

Zellen des Wildtyps und der *otsALB*⁺-Mutante wurden an Medium unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen akklimatisiert. Der interne (A) und der externe (B) GG-Gehalt des Wildtyps (grau) und der *otsALB*⁺-Mutante (weiß) bzw. der Trehalosegehalt der *otsALB*⁺-Mutante (schwarz) wurden vier Tage nach Salzschock gaschromatographisch bestimmt. Der Gehalt an *ggpS*-mRNA, *otsA*-mRNA (C) und GgpS-Protein (D) wurde ebenfalls vier Tage nach Salzschock bestimmt. Die Detektion der *rnpB*-RNA diente als Kontrolle, dass gleiche Mengen an GesamtmRNA aufgetragen wurden.

Weiterhin konnte nach Akklimation der Zellen an verschiedene Salzkonzentrationen im Gegensatz zum Wildtyp bei der Mutante *otsALB*⁺ weder intern (Abb. 3.6A) noch im Medium (Abb. 3.6B) GG detektiert werden. Nur nach Akklimation an 1026 mM NaCl konnten geringe Mengen an GG in der *otsALB*⁺-Mutante nachgewiesen werden. Die Synthese von Trehalose zog somit eine Hemmung der GG-Synthese nach sich. Da in der Mutante *ggtA*⁻*otsALB*⁺ die Aktivität des Transporters Ggt ausgeschlossen wurde, ist der Transporter

nicht an der Hemmung der GG-Synthese beteiligt. Weiterhin wird die Hemmung auch in diesem Fall durch biochemische Modulation des GgpS-Proteins vermittelt, da in der *otsALB⁺*-Mutante *ggpS*-mRNA bzw. GgpS-Protein nachweisbar war (Abb. 3.5C und D). Der Gehalt an *ggpS*-mRNA bzw. GgpS-Protein war zwar im Vergleich zum Wildtyp in der Mutante geringer, aber dadurch kann nicht erklärt werden, dass in der Mutante bei moderaten Salzkonzentrationen kein GG detektiert werden konnte. Es ist bekannt, dass auch bei gehemmter Proteinbiosynthese die GG-Synthese im Wildtyp stattfinden kann und somit der geringe GgpS-Proteingehalt von Zellen, die bei Kontrollbedingungen kultiviert wurden, für die GG-Synthese ausreicht.

Auffällig war weiterhin, dass die Mutante in der Lage war, intern Trehalose in ähnlicher Konzentration zu akkumulieren wie Wildtypzellen GG bei den jeweiligen NaCl-Konzentrationen. Nur bei Kultivierung unter Kontrollbedingungen (18 mM NaCl) konnten intern höhere Trehalosemengen gemessen werden, während bei 1026 mM NaCl geringere Trehalosemengen detektiert wurden als jeweils GG im Wildtyp. Der geringere Trehalosegehalt bei 1026 mM NaCl war möglicherweise auf eine verringerte Expression des *otsALB*-Genkonstrukts (Abb. 3.6C) und die dadurch bedingte Abnahme der Trehalosesyntheseleistung zurückzuführen. Wie Wachstumsmessungen und eine geringere Photosyntheseeffizienz deutlich machten, befanden sich die Zellen der *otsALB⁺*-Mutante bei 1026 mM NaCl in einem schlechteren physiologischen Zustand (Daten nicht gezeigt). Da Trehalose im Medium der *otsALB⁺*-Mutante nachweisbar war (Abb. 3.6B), wurde Trehalose im Überschuss produziert und ins Medium abgegeben. Jedoch hing der Gesamt-Trehalosegehalt nicht von der Expressionsstärke des *otsALB*-Genkonstrukts ab, denn die Expression war bei den verschiedenen Kultivierungsbedingungen, bis auf in Zellen, die an 1026 mM NaCl akklimatisiert waren, immer gleich (Abb. 3.6C). Folglich ist *Synechocystis* interessanterweise in der Lage, die Trehalosekonzentration der externen Salzkonzentration anzupassen.

Das vollständige Fehlen der GgpS-Aktivität bei gleichzeitiger Synthese von Trehalose bzw. nach Trehalosezugabe ist demzufolge alleine auf eine Konzentrationserhöhung der Osmolyte in der Zelle zurückzuführen. Somit hat der Transporter Ggt nur einen Einfluss auf die Synthese von GG, da durch ihn intern Osmolyte wie Trehalose akkumuliert werden können. Damit konnte die Funktion des Transporters Ggt als Rückgewinnungssystems bestätigt werden, nicht aber die in der Einleitung formulierte Hypothese einer „steady state“-Regulation der GG-Synthese in Abhängigkeit von der Aktivität des Transporters Ggt. Es

existiert folglich ein Sensorsystem, das in der Lage ist, die interne Osmolytkonzentration in Abhängigkeit von der externen Salzkonzentration zu messen. Möglich ist dabei, dass die Information über den Osmolytstatus der Zelle durch regulatorische Proteine an das GgpS-Protein vermittelt wird oder dass Osmolyte wie Trehalose einen direkten, hemmenden Einfluss auf die GG-Synthese haben. Während die Identifizierung eines regulatorischen Proteins durch eine Transposonmutagenese erreicht werden sollte (Abschnitt 3.3), wurde der direkte Einfluss von Trehalose auf die GgpS-Aktivität *in vitro* nach Zugabe von Trehalose analysiert (Abschnitt 3.5).

3.3 Identifizierung regulatorisch wirksamer Proteine der GG-Synthese

Da geklärt werden konnte, dass eine biochemische Modulation der GgpS-Aktivität sowohl für die Induktion der GG-Synthese als auch für die Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen von Bedeutung ist, sollte die mögliche Beteiligung regulatorischer Proteine an der Modulation des GgpS-Proteins näher charakterisiert werden.

Wie in der Einleitung beschrieben, lieferte der GgpS-Enzymtest unter *in vitro*-Bedingungen den stärksten Hinweis auf die Existenz einer regulatorischen Komponente, die möglicherweise ein Protein ist. Für die Aufreinigung des GgpS-Proteins wurde das *ggpS*-Gen aus *Synechocystis* in *E. coli* mit Hilfe des *Strep*-tag® Expressions-Systems heterolog exprimiert. Durch Genfusion wurde das kurze Peptid *Strep*-tag II, bestehend aus acht Aminosäuren, an das GgpS-Protein endständig angefügt. Das rekombinante Protein wurde anschließend affinitätschromatographisch durch Bindung an eine *Strep*-Tactin-Matrix isoliert. Das GgpS-Protein konnte mit einem *Strep*-tag sowohl am N- als auch am C-Terminus aufgereinigt werden und war unabhängig von der Position des *Strep*-tags im GgpS-Enzymtest *in vitro* aktiv. Die Aktivität entsprach dem zuvor gereinigten GgpS-Protein mit C-terminalem His-tag (Kerstan, 1998; Hagemann *et al.*, 2001). Für alle folgenden Experimente wurde das rekombinante GgpS-Protein mit N-terminalem *Strep*-tag verwendet.

Das rekombinante *Strep*-GgpS-Protein zeigte eine Aktivität, die unabhängig von der NaCl-Konzentration im Enzymtest war (Abb. 3.7). Die Aktivität des *Strep*-GgpS-Proteins wird somit nicht direkt durch die NaCl-Konzentration beeinflusst. Nach Zugabe von Gesamtzellextrakt aus *Synechocystis*, der zuvor von allen niedermolekularen Substanzen mittels Gelfiltration befreit wurde, war die Aktivität des rekombinanten *Strep*-GgpS-Proteins durch die NaCl-Konzentration im Test modulierbar. Ohne NaCl-Zugabe konnte das *Strep*-

GgpS-Protein in seiner Aktivität gehemmt werden. Das deutet auf die Existenz eines inhibitorischen Regulators, möglicherweise eines Proteins, im Gesamtzellextrakt von *Synechocystis* hin. Die Aktivität des Strep-GgpS-Proteins spiegelt damit die Aktivitätsregulation eines zuvor aufgereinigten GgpS-His-Proteins wider (Kerstan, 1998; Hagemann *et al.*, 2001).

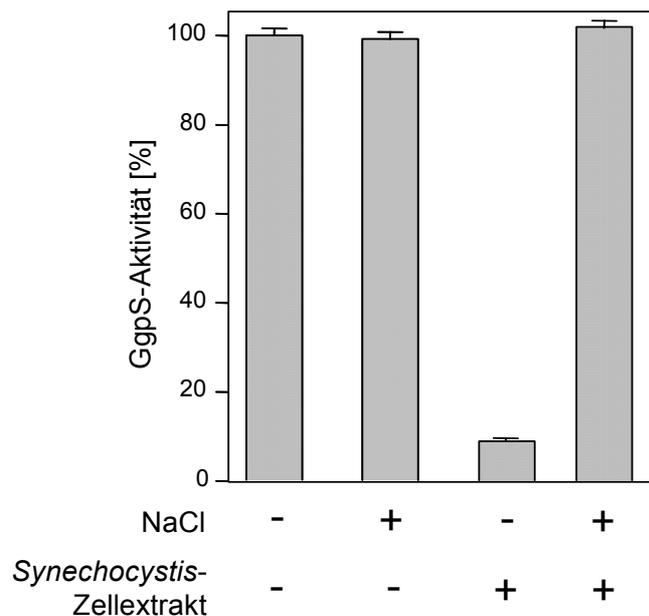


Abb. 3.7: Aktivität des rekombinanten Strep-GgpS-Proteins in Abhängigkeit von der Salzkonzentration im Enzymtest und des Zellextrakts aus *Synechocystis*

Die Aktivität des rekombinanten Strep-GgpS-Proteins wurde direkt oder nach Zugabe von Wildtypzellextrakt bei 0 bzw. 200 mM NaCl im Testansatz bestimmt. Der Extrakt wurde jeweils aus Zellen, die keinem osmotischen Stress ausgesetzt waren, gewonnen und von niedermolekularen Substanzen durch Gelfiltration befreit. Die maximale Aktivität der rekombinanten GgpS wurde auf 100 % gesetzt und entsprach einem absoluten Wert von 60 nkatal mg Protein⁻¹.

Durch diesen *in vitro*-Test konnte die Situation *in vivo* nach einem osmotischen Schock mit NaCl nachgestellt werden, die ein unter Kontrollbedingungen vorhandenes inaktives GgpS-Protein forderte, das nach einem Salzschock aktiviert wird. Da das rekombinante GgpS-Protein im Enzymtest aktiv war, wird das GgpS-Protein in *Synechocystis* wahrscheinlich in einem aktiven Status synthetisiert. Durch einen inhibitorischen Regulator wird es unter Kontrollbedingungen allerdings sofort in einen inaktiven Status überführt und erst nach einem Salzschock aktiviert, wobei möglicherweise die Freisetzung des inhibitorischen Regulators erfolgt.

Eine biochemische Modulation des GgpS-Proteins konnte auch in salzakklimatisierten Zellen als Regulationsmechanismus ermittelt werden. Auch hier spielt wahrscheinlich eine Hemmung des GgpS-Proteins eine bedeutende Rolle, damit eine energetisch ungünstige Überproduktion an GG verhindert werden kann. Diese Hemmung konnte insbesondere in der das GgpS-Protein überproduzierenden Mutante *ggpS*⁺ (Abschnitt 3.1) oder nach Zugabe bzw. Synthese der osmoprotektiven Substanz Trehalose zu salzakklimatisierten Wildtypzellen

demonstriert werden (Abschnitt 3.2), so dass auch hier ein regulatorischer Faktor das GgpS-Protein hemmen könnte. Ob der postulierte Regulator für die Hemmung der GG-Synthese unter Kontrollbedingungen mit dem putativen Regulator für die Hemmung der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen identisch ist, ist unklar.

Versuche, den Regulator zu charakterisieren bzw. als Protein zu isolieren, sind bis jetzt fehlgeschlagen (Huckauf, 2003), wobei sich alle Ansätze hauptsächlich auf die Isolierung eines Regulators durch direkte Interaktionsstudien mit dem GgpS-Protein konzentrierten. In dieser Arbeit wurde ein indirekter Ansatz gewählt, indem durch Transposonmutagenese das *Synechocystis*-Genom modifiziert werden sollte, um Proteine mit einem regulatorischen Einfluss auf die GG-Synthese in *Synechocystis*-Zellen zu identifizieren.

3.3.1 *In vitro*-Transposonmutagenese von *Synechocystis*

Für die Identifizierung eines möglichen regulatorischen Proteins durch *in vitro*-Transposonmutagenese wurde eine Genbank verwendet, die für die Sequenzierung des gesamten Genoms von *Synechocystis* eingesetzt wurde (Kaneko *et al.*, 1996). Diese Genbank, die auf 110 verschiedene in *E. coli* stabil replizierten Cosmiden verteilt ist (Kotani *et al.*, 1994), bot eine gute Ausgangsbasis für die Identifizierung regulatorisch wirksamer Proteine, da sie einen sehr großen Teil des gesamten Genoms abdeckt. Durch Integration eines Chloramphenicolresistenz vermittelnden Transprimerelements in die Genomfragmente des Cosmids wurde die Genbank *in vitro* mutiert und von T. Ogawa (Universität Nagoya, Japan) bereitgestellt. Durch Anwendung dieser Cosmidbank konnten bereits Gene identifiziert werden, die essentiell für die Aufnahme von CO₂ sind (Shibata *et al.*, 2001; Shibata *et al.*, 2002).

Die Vollständigkeit der verwendeten mutierten Cosmidbank konnte durch PCR-Analyse einiger ausgewählter Genbereiche, die sich auf verschiedenen Cosmiden befinden, weitgehend bestätigt werden. Anschließend wurden Wildtypzellen von *Synechocystis* mit dieser mutierten Cosmidbank transformiert. Durch homologe Rekombination integrierte das Transposon in das Genom von *Synechocystis*. Nach Selektion mit Chloramphenicol konnten zahlreiche Mutanten (>20 000 Mutanten) generiert werden. Das Genom von *Synechocystis* besitzt ca. $3,6 \cdot 10^6$ bp. Um alle Gene mindestens einmal zu inaktivieren, müsste das Transposon wenigstens alle 1000-1500 Basen in das Genom integrieren. Somit überstieg die Zahl der generierten Mutanten die theoretisch notwendige Zahl um ein vielfaches und sollte damit die statistisch abgesicherte Inaktivierung aller Gene erlauben.

3.3.2 Selektion GG überproduzierender Mutanten

Da sowohl unter Kontrollbedingungen als auch im Verlauf der Anpassung an erhöhte Salzkonzentrationen eine Inhibition der GG-Synthese zu beobachten war, sollte nach GG überproduzierenden Mutanten gesucht werden, in denen der postulierte Regulator nicht mehr aktiv ist. Um die Analyse aller Mutanten hinsichtlich der GG-Akkumulation zu vermeiden, wurde eine Selektionsstrategie etabliert, die die Isolation von GG überproduzierenden Mutanten erlaubte. Für die Selektion mussten deshalb Bedingungen gefunden werden, unter denen die GG-Synthese in Wildtypzellen nicht induziert wird, GG überproduzierende Mutanten aber einen Wachstumsvorteil besitzen. Die Aktivierung des GgpS-Proteins durch erhöhte Salzkonzentrationen musste somit vermieden werden.

Wildtypzellen von *Synechocystis* können Maltose nicht aufnehmen. Durch Maltose wird ein osmotischer Stress appliziert, der nicht mit der Synthese der osmoprotektiven Substanz GG beantwortet wird (Marin *et al.*, 2006). So konnten in an hohe Maltosekonzentrationen akklimatisierten Wildtypzellen nur sehr geringe GG-Mengen gemessen werden (Abb. 3.8C), die nicht den GG-Mengen in Zellen entsprachen, die einem vergleichbaren osmotischen Schock mit NaCl ausgesetzt waren. Bei Konzentrationen über 320 mM Maltose konnte kein GG detektiert werden. Wahrscheinlich aus diesem Grund stellten Wildtypzellen das Wachstum bei hohen Maltosekonzentrationen vollständig ein (Abb. 3.8A). Auch konnte Maltose die Inhibition des GgpS-Proteins im Gesamtzellextrakt von *Synechocystis* nicht *in vitro* aufheben, wohingegen NaCl eine Aktivierung des GgpS-Proteins im Extrakt bewirkte (Abb. 3.8D).

Anders verhielt sich die *ggpS*⁺-Mutante, die unter Kontrollbedingungen GG überproduzieren kann (Abb. 3.1 und 3.2B), da die Hemmung des GgpS-Proteins wahrscheinlich unvollständig ist. Diese Mutante zeigte auf Maltose-haltigem Medium bei einer Konzentration von 350 mM im Gegensatz zum Wildtyp noch Wachstum (Abb. 3.8A), da mehr GG in der Mutante akkumulierte (Abb. 3.8C). Dies konnte auf den unter diesen Bedingungen erhöhten GgpS-Proteingehalt zurückgeführt werden (Abb. 3.8B).

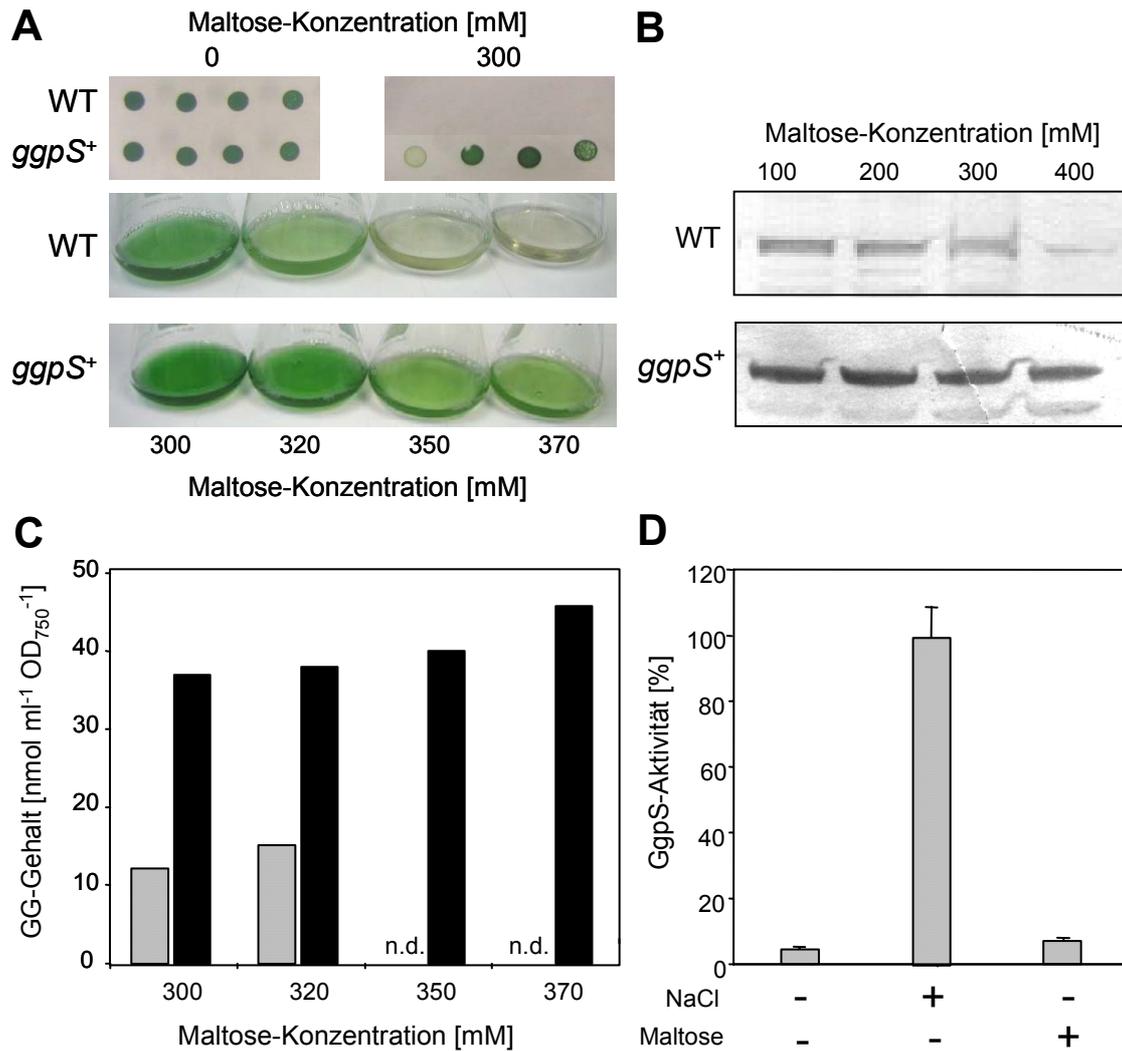


Abb. 3.8: Charakterisierung von Zellen des Wildtyps bzw. der *ggpS*⁺-Mutante nach Akklimatisierung an verschiedene Maltosekonzentrationen

Das Wachstum des Wildtyps bzw. der *ggpS*⁺-Mutante wurde auf BG11-Agarplatten bzw. in BG11-Flüssigmedium bei hohen Maltosekonzentrationen dokumentiert (A). Weiterhin wurde der GgpS-Proteingehalt (B) und der GG-Gehalt (C) in akklimatisierten Zellen des Wildtyps (grau) bzw. der *ggpS*⁺-Mutante (schwarz) und die Aktivität des GgpS-Proteins in 100 µg Wildtyp-Gesamtzellextrakt in Anwesenheit von 200 mM NaCl bzw. 200 mM Maltose (D) bestimmt. Die maximale Aktivität der GgpS im Gesamtzellextrakt wurde auf 100 % gesetzt und entsprach einem absoluten Wert von 0,04 nktal mg Protein⁻¹.

Die *ggpS*⁺-Mutante eignete sich folglich als Modellsystem für das Verhalten GG überproduzierender Mutanten nach Applikation eines osmotischen Stresses durch nicht-ionische Substanzen. Alle Mutanten, die wie die *ggpS*⁺-Mutante ohne Salzschock GG produzieren können, sollten in Anwesenheit hoher Maltosekonzentrationen einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp besitzen. Mutanten könnten deshalb zum einen

durch den fehlenden psotulierten Regulator der GG-Synthese, aber auch durch fehlende Regulatoren der *ggsS*-Genexpression einen GG überproduzierenden Phänotyp zeigen.

Es wurde eine Anreicherung gewünschter Transformanten für die Selektion von GG Überproduzenten in Flüssigmedium mit erhöhter Maltosekonzentration durchgeführt. Nachdem eine geeignete Konzentration an Maltose von 350 mM für die Anreicherung GG überproduzierender Mutanten in Flüssigmedium mit Hilfe der *ggsS⁺*-Mutante gefunden worden war, konnte die Effektivität der Anreicherung überprüft werden. Dazu wurden Schüttelkolben, die Medium mit 350 mM Maltose enthielten, mit verschiedenen Konzentrationen an Wildtyp- und *ggsS⁺*-Zellen beimpft. Die Anreicherung der *ggsS⁺*-Mutante konnte durch die Messung des GG-Gehaltes sieben Tage nach jeder weiteren Überimpfung verfolgt werden (Daten nicht gezeigt). Nur die *ggsS⁺*-Mutante sollte in der Lage sein, bei diesen Wachstumsbedingungen signifikante Mengen an GG zu synthetisieren und daher zu überleben. Auch bei einer sehr geringen Konzentration der *ggsS⁺*-Zellen im Gegensatz zur Konzentration der Wildtypzellen (Mischungsverhältnis 1:10 000) erfolgte eine Anreicherung der *ggsS⁺*-Mutante. Eine Maltosekonzentration von 350 mM eignete sich somit sehr gut für die Selektion GG überproduzierender Transformanten in Flüssigmedium.

Für die Selektion wurden deshalb alle durch Transformation des *Synechocystis*-Wildtyps mit der mutierten Cosmidbank auf Filtern erzeugten Klone vereinigt und in Flüssigmedium mit 350 mM Maltose überführt (Abb. 3.9A). Nach fünf Tagen wurde der GG-Gehalt bestimmt und ein Aliquot zur Inokulation von neuem Flüssigmedium mit 350 mM Maltose eingesetzt. Durch das dreimalige Wiederholen dieser Prozedur konnte eine Anreicherung GG überproduzierender Mutanten durch den Anstieg des zellinternen GG-Gehaltes in diesen Kulturen verfolgt werden (Abb. 3.9B). Auf zwei Filtern, die in unterschiedlichen Transformationsansätzen hergestellt worden waren, waren GG überproduzierende Mutanten vorhanden, die in Medium mit 350 mM Maltose angereichert werden konnten, da der GG-Gehalt nach jeder Überimpfung auf ähnliche Werte anstieg wie bei der *ggsS⁺*-Mutante unter den gleichen Bedingungen. Dabei befanden sich womöglich auf dem einen Filter mehr GG überproduzierende Mutanten, da die Zellen schon nach der ersten Überimpfung einen höheren GG-Gehalt zeigten.

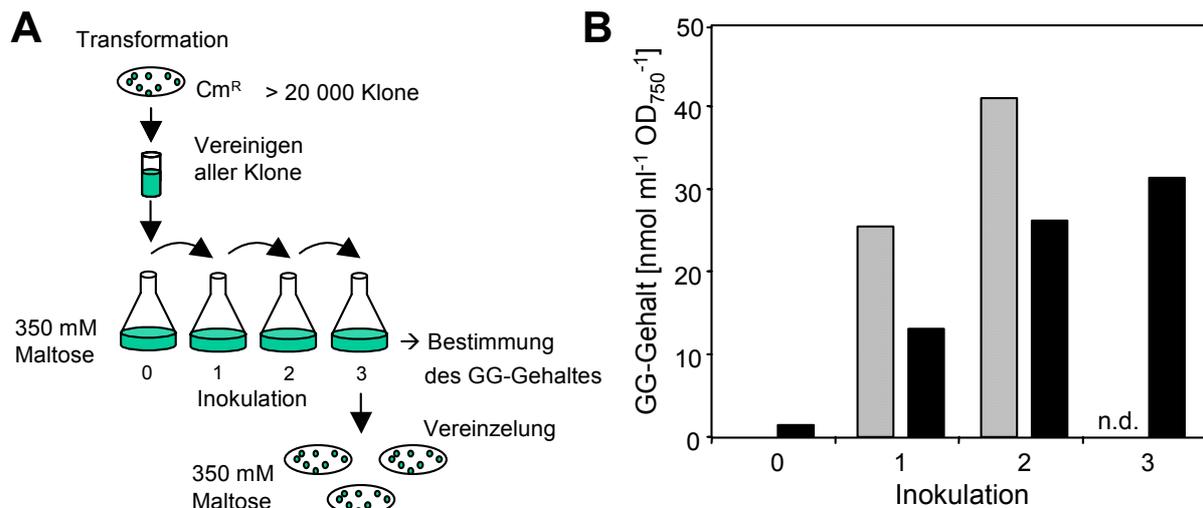


Abb. 3.9: Anreicherungsstrategie für GG überproduzierende Mutanten in BG11-Flüssigmedium mit 350 mM Maltose

Durch Transformation des Wildtyps mit der mutierten Cosmidbank generierte Mutanten wurden nach der Selektion auf Chloramphenicol von Filtern abgewaschen und in Flüssigmedium mit 350 mM Maltose überführt (A). Nach fünftägigem Wachstum wurden die Kulturen zur Beimpfung von neuem Flüssigmedium eingesetzt. Die Anreicherung GG überproduzierender Mutanten wurde durch gaschromatographische Bestimmung des zellinternen GG-Gehaltes vor jeder Überimpfung in frisches Medium in zwei unabhängigen Ansätzen dokumentiert (B). Nach der dritten Überimpfung wurden die Zellen zur Vereinzelnung auf Maltose-haltigen BG11-Agarplatten ausgestrichen.

Nach Vereinzelnung der Klone durch Ausstreichen der Zellsuspension auf Maltose-haltigen BG11-Agarplatten wurden die einzelnen Kolonien in Flüssigmedium angeimpft, das keine Maltose enthielt, um den GG-Gehalt unter Kontrollbedingungen messen zu können. Tatsächlich konnten einige Mutanten mit einem erhöhten GG-Gehalt unter Kontrollbedingungen identifiziert werden (Tab. 3.1), wobei jedoch die Mehrzahl der Mutanten, die angereichert wurden, keinen erhöhten GG-Gehalt unter Kontrollbedingungen aufwiesen und wahrscheinlich einen unabhängig von der erhöhten GG-Produktion begründbaren Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp besaßen.

3.3.3 Genetische Charakterisierung GG überproduzierender Mutanten

Der Genbereich, in den das Transposon integriert wurde, konnte durch PCR-Analyse identifiziert werden. Dazu wurde die genomische DNA isoliert und mit dem Restriktionsenzym *HhaI* verdaut, das nicht innerhalb des Transposons schneidet. Nach

anschließender Ligation aller entstehender Fragmente konnte eine PCR-Analyse mit Oligonukleotiden durchgeführt werden, die am 5'- bzw. am 3'-Ende des Transposons binden und die Elongation in Richtung der genomischen DNA zulassen. Der betroffene Genlocus konnte anschließend durch Sequenzierung des PCR-Produktes identifiziert werden.

Aus 22 verschiedenen Transformanten, die die Fähigkeit besaßen, auf Maltose-haltigem Medium bei einer Konzentration von 350 mM zu wachsen, konnten drei verschiedene Genfragmente amplifiziert werden, wobei der Integrationsort in den Mutanten M1/2, M1/6, M1/11, M2/2, M3/19 und M3/21 durch die oben beschriebene Methode nicht identifiziert werden konnte (Tab. 3.1). Jedoch konnte für diese Mutanten durch PCR-Analyse die Inaktivierung der bereits identifizierten Genloci ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Tab. 3.1: Genotypische Charakterisierung GG überproduzierender Mutanten

Der Integrationsort des Transprimerelements wurde mit Hilfe der PCR-Analyse von Mutanten identifiziert, die unter Kontrollbedingungen GG überproduzieren konnten. Die Mutanten wurden in drei unabhängigen Transformationsansätzen generiert (Mutanten der Linien M1, M2 und M3) und anschließend durch hohe Maltosekonzentrationen selektiert.

Mutante	Integrationsort	Genfunktion
M1/1, M1/12, M2/1, M3/4, M3/8	<i>s//0445</i>	unbekannt
M1/3, M1/4	<i>slr0230</i>	putative Transposase
M1/10, M2/9, M2/10, M2/13, M3/7, M3/9, M3/10, M3/16, M3/33	<i>slr0228</i>	FtsH-Homolog
M1/2, M1/6, M1/11, M2/2 M3/19, M3/21	Genotypische Charakterisierung war nicht erfolgreich	

Durch die Selektion konnten verschiedene Mutanten, die in drei unterschiedlichen Transformationen generiert worden waren, mit dem gleichen Genotyp angereichert werden, was ein Hinweis für die Effektivität der Selektionsstrategie war. Die Mutanten, die eine Mutation in *Slr0230*, einer putativen Transposase, aufzeigten, wurden nicht weiter berücksichtigt, da es unwahrscheinlich ist, dass eine Transposase bei der Regulation der GG-Synthese beteiligt sein könnte. Es wurden bei der Selektion weiterhin Mutanten mit einem Genotyp angereichert, bei dem das Transprimerelement in das Gen *s//0445* integriert worden war, dessen Funktion unbekannt ist. Bei anderen GG synthetisierenden Cyanobakterien konnte kein ähnliches Protein durch Blast-Analysen gefunden werden. Die Mutanten, die

nach der Selektion am zahlreichsten vertreten waren und somit wahrscheinlich einen deutlichen Wachstumsvorteil gegenüber allen anderen Mutanten besaßen, wiesen eine Inaktivierung des Gens *slr0228* auf, das eine von vier in *Synechocystis* vorkommenden und zu FtsH homologen Proteasen kodiert.

3.3.4 Physiologische Charakterisierung GG überproduzierender Mutanten

Da zwei verschiedene Integrationsorte identifiziert werden konnten, wurde zunächst die Beteiligung der von diesen Genen kodierenden Proteinen an der Regulation der GG-Synthese im *in vitro*-Testsystem untersucht. Zu diesem Zweck wurde Gesamtzellextrakt aus der Mutante M3/7, die eine Inaktivierung des Gens *slr0228*, und aus der Mutante M1/1, die eine Inaktivierung des Gens *sll0445* aufwies, isoliert. Die Aktivität des rekombinanten Strep-GgpS-Proteins wurde anschließend in Anwesenheit des Zellextrakts mit oder ohne NaCl-Zugabe zum Testansatz bestimmt (Abb. 3.10).

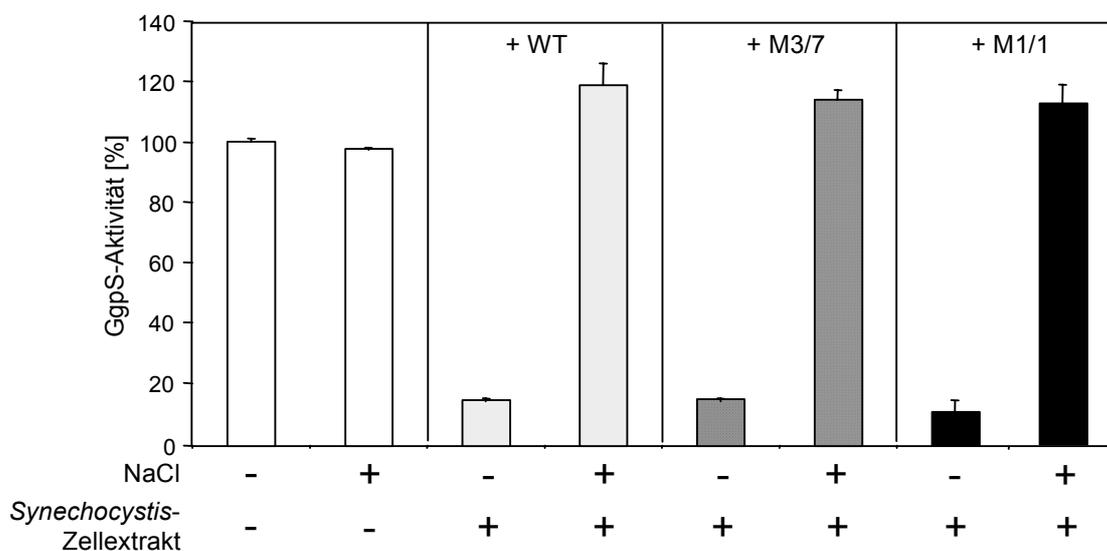


Abb. 3.10: Aktivität des rekombinanten Strep-GgpS-Proteins in Abhängigkeit von der Salzkonzentration und des Zellextrakts aus verschiedenen Zelllinien im *in vitro*-Enzymtest

Die Aktivität des rekombinanten GgpS-Proteins wurde direkt (weiß) oder nach Zugabe von Gesamtzellextrakt aus dem Wildtyp (hellgrau), aus der Mutante M3/7 (dunkelgrau) oder aus der Mutante M1/1 (schwarz) bei 0 bzw. 200 mM NaCl im Testansatz bestimmt. Der Zellextrakt wurde jeweils aus Zellen, die keinem osmotischen Stress ausgesetzt waren, gewonnen und von niedermolekularen Substanzen durch Gelfiltration befreit. Die maximale Aktivität der rekombinanten GgpS ohne Zugabe von Zellextrakt wurde auf 100 % gesetzt und entsprach einem absoluten Wert von 60 nkatal mg Protein⁻¹.

Der Zusatz von Zellextrakten der ausgewählten Mutanten bewirkte ebenso wie der Wildtypzellextrakt eine salzabhängige Hemmung des rekombinanten Strep-GgpS-Proteins. Somit sind die Proteine Sll0445 und Slr0228 nicht an der Inhibition der GgpS-Aktivität unter Kontrollbedingungen beteiligt.

Zusätzlich wurde untersucht, warum diese beiden Mutanten auf Maltose-haltigem Medium einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp besaßen. Dazu wurde der Gehalt an GG und GgpS der beiden Mutanten M1/1 und M3/7 nach Akklimation an verschiedene Maltosekonzentrationen bestimmt. Während die Mutante M1/1 im Vergleich zum Wildtyp einen gering erhöhten GG-Gehalt aufwies, zeigte die Mutante M3/7 einen stark erhöhten GG-Gehalt nicht nur unter Kontrollbedingungen, sondern vor allem bei hohen Maltosekonzentration (Abb. 3.11A). Ein erhöhter GgpS-Proteingehalt konnte zusätzlich für die Mutante M3/7 detektiert werden (Abb. 3.11B). Der erhöhte GG-Gehalt in der Mutante M3/7 unter diesen Bedingungen ist somit entweder die Konsequenz einer erhöhten GgpS-Syntheserate oder einer größeren Stabilität des GgpS-Proteins.

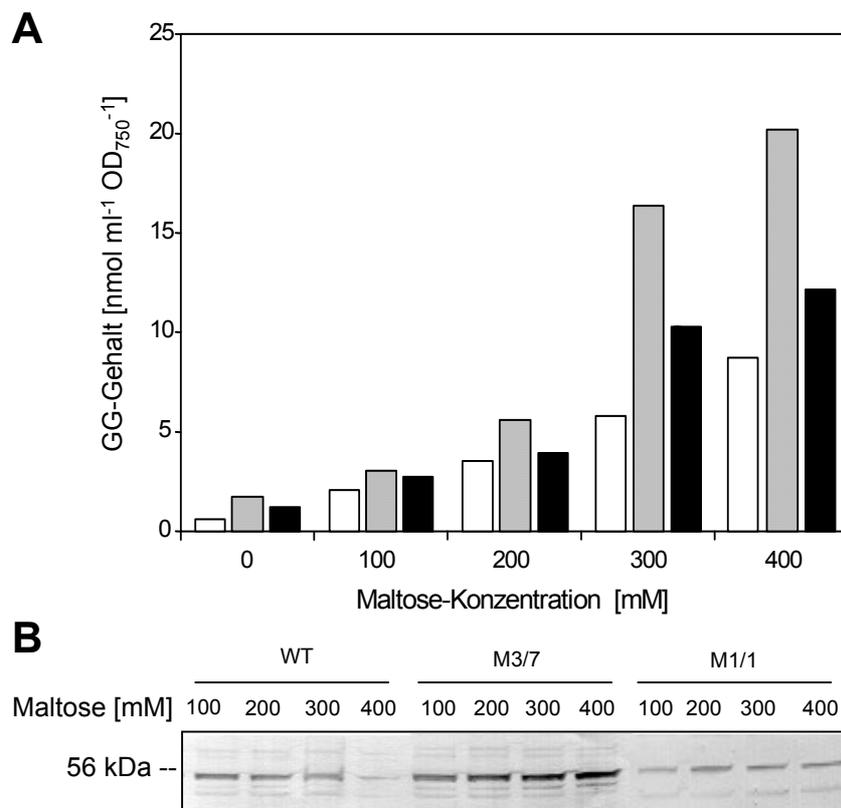


Abb. 3.11: Charakterisierung von Zellen des Wildtyps, der Mutante M3/7 und der Mutante M1/1 nach Akklimation an verschiedene Maltose-Konzentrationen

Zellen des Wildtyps (weiß), der Mutante M3/7 (grau) und der Mutante M1/1 (schwarz) wurden an Medium unterschiedlicher Maltosekonzentrationen akklimatisiert und der interne GG-Gehalt wurde gaschromatographisch bestimmt (A). Weiterhin wurde der Gehalt an GgpS-Protein mittels Western Blot-Analyse untersucht (B).

Mit Hilfe des hier etablierten Screeningsystems konnten somit zwei verschiedene Mutanten generiert und identifiziert werden, die sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach Applikation eines osmotischen Schocks mit Maltose GG überproduzieren können. Dies stellte einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp bei hohen Maltosekonzentrationen dar. Weiterhin konnte in der Mutante M3/7 der erhöhte GG-Gehalt, wie in der *ggpS⁺*-Mutante, auf einen erhöhten GgpS-Proteingehalt zurückgeführt werden. Die direkte Beteiligung der Proteine Sll0445 und Slr0228 an der biochemischen Modulation der GgpS-Aktivität konnte jedoch ausgeschlossen werden.

3.4 Einfluss der Proteindegradation auf die GG-Synthese

Bei der Selektion GG überproduzierender Mutanten nach zufälliger Mutation des Genoms von *Synechocystis* durch Transposonmutagenese wurden FtsH-Mutanten wie die Mutante M3/7 angereichert, die eine Inaktivierung des Gens *slr0228* aufwiesen (Abschnitt 3.3). Die Mutante M3/7 zeigte nach einem osmotischen Schock mit Maltose einen erhöhten GgpS-Proteingehalt, der wahrscheinlich für die verstärkte GG-Synthese unter diesen Bedingungen, wie bei der *ggpS⁺*-Mutante, verantwortlich ist. Im Folgenden wurden die Gründe für eine GgpS-Akkumulation und die Rolle der FtsH-Protease Slr0228 bei der Osmoadaptation näher untersucht.

Im Genom von *Synechocystis* wurden vier FtsH-Protease kodierende Gene identifiziert (*slr0228*, *sll1463*, *slr1930* and *slr1604*). Die Proteine stellen Homologe zur membrangebundenen AAA-Protease FtsH aus *E. coli* dar, wobei in früheren Arbeiten nur für die Proteasen Slr0228 und Sll1463 Mutanten generiert werden konnten (Mann *et al.*, 2000). FtsH-Mutanten verschiedenster Bakterien wurden untersucht und zeigten einen pleiotropen Phänotyp, der eine Sensitivität gegenüber verschiedene Arten von Stress, unter anderem auch Salzstress, aufwies. Die Rolle der FtsH-Protease bei der Vermittlung der Stresstoleranz und die molekulare Basis für die Sensitivität einer FtsH-Mutante gegenüber einer Stresssituation ist jedoch unklar. Als möglicher Auslöser für die Hypersensitivität wurde die Akkumulation von Proteinen diskutiert, die bei Stressbedingungen denaturieren, dadurch toxisch wirken und in einer FtsH-Mutante nicht mehr abgebaut werden können (Fischer *et al.*, 2002). Eine Beteiligung der FtsH-Protease an salzstressspezifischen Regulationsmechanismen wurde zuvor noch für kein Bakterium diskutiert.

3.4.1 Wachstum der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* nach einem Salzschock

Es wurde zunächst die Insertionsmutante *slr0228::Km^R* hergestellt, um durch die Transposonmutagenese eventuell hervorgerufene Sekundäreffekte auszuschließen. Durch PCR-Analyse und dem Unvermögen, *slr0228*-mRNA synthetisieren zu können, konnte die vollständige Segregation der Mutation bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde die Toleranz dieser FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* gegenüber einem osmotischen Schock mit 513 mM NaCl untersucht. Während unter Kontrollbedingungen das Wachstum der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* kaum beeinträchtigt war, konnte bei erhöhter Salzkonzentration, wie schon für andere Bakterien beschrieben, ein Wachstumsdefekt beobachtet werden (Abb. 3.12A, B).

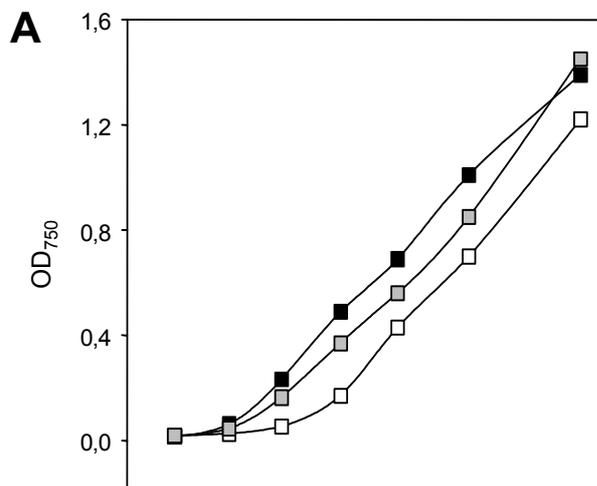
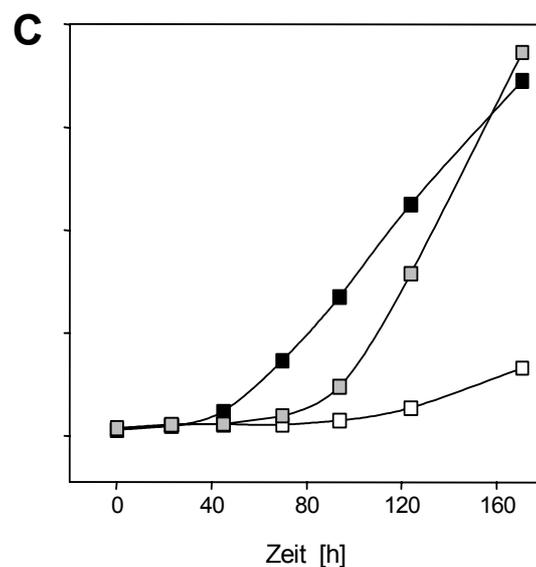
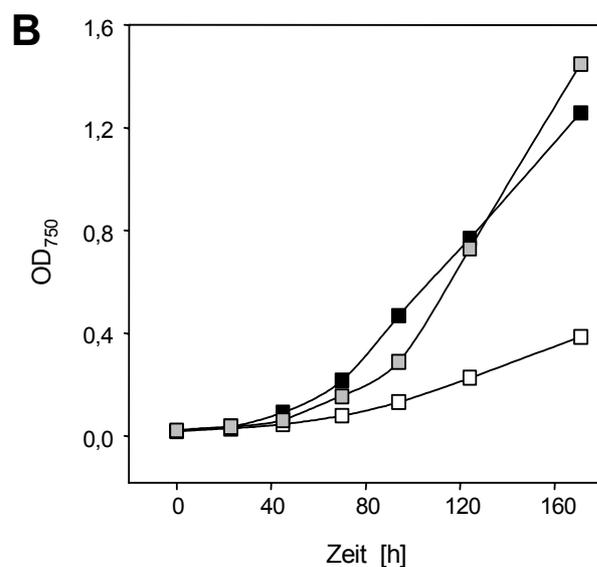


Abb. 3.12: Wachstum von Zellen des Wildtyps, der Mutante *slr0228::Km^R* und der Mutante *ggpS⁻* nach einem osmotischen Schock mit NaCl

Die optische Dichte von Zellen des Wildtyps (A), der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* (B) und der Mutante *ggpS⁻* (C) wurde bei 750 nm ohne Zugabe von NaCl (■), nach einem osmotischen Schock mit 513 mM NaCl (□) bzw. nach einem osmotischen Schock mit 513 mM NaCl bei gleichzeitiger Zugabe von 3 mM GG (◻) bestimmt.



Die gleichzeitige Zugabe von 3 mM GG konnte die Salzsensitivität jedoch vollständig aufheben. GG kann durch den Transporter Ggt, der ebenfalls salzabhängig aktiviert wird, von der Zelle aufgenommen werden. Dabei zeigte die FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* den gleichen Phänotyp wie die Mutante *ggs^S*, die durch das Fehlen eines funktionalen GgpS-Proteins nicht in der Lage ist, GG zu synthetisieren. Auch hier konnte die Intoleranz gegenüber Salz durch Zugabe von 3 mM GG aufgehoben werden (Abb. 3.12C).

Dies war ein erster Hinweis darauf, dass die molekulare Basis für die Salzsensitivität einer FtsH-Mutante möglicherweise ein Mangel an GG unter diesen Bedingungen sein könnte, ebenso wie das bei der *ggs^S*-Mutante der Fall ist.

3.4.2 Proteomanalyse der salzakklimatisierten FtsH-Mutante *slr0228::Km^R*

Durch extern zur Verfügung gestelltes GG konnte der salzsensitive Phänotyp der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R*, wie oben beschrieben, aufgehoben werden. GG ist als osmoprotektive Substanz nach einem osmotischen Schock in der Lage Proteine und Membranen direkt vor der Denaturierung und damit dem Abbau zu schützen (Hincha und Hagemann, 2004). Ob eine Akkumulation von Proteinen in der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* auftritt, weil die FtsH-Protease, wie in früheren Arbeiten bereits diskutiert wurde (Fischer *et al.*, 2002), möglicherweise beim Abbau von denaturierten Proteinen beteiligt ist, sollte zunächst durch globale Analyse des Vergleichs der Proteinmuster des Wildtyps und der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* untersucht werden. Weiterhin sollte mit diesem Ansatz ermittelt werden, welche Proteine akkumulieren. In Abwesenheit der proteolytischen Aktivität einer Protease akkumulieren Proteine, weil sie entweder direktes Substrat der Protease sind oder die Protease die Synthese der Proteine beeinflusst. Damit stellen akkumulierte Proteine putative Substrate für die FtsH-Protease Slr0228 dar.

Zu diesem Zweck wurde das Proteom von Zellen des Wildtyps und der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* sowohl unter Kontrollbedingungen (18 mM NaCl) als auch akklimatisiert an 684 mM NaCl miteinander verglichen. Durch den Vergleich der Proteinmuster mit einem Mastergel von Fulda *et al.* (2006), in dem in 499 Spots 338 verschiedene Proteine durch MALDI-TOF-MS-Analyse identifiziert wurden, konnten in 84 Spots 56 verschiedene Proteine identifiziert werden (Anhang). Es konnten überwiegend die gleichen Proteinspots des Wildtyps identifiziert werden, die von Fulda *et al.* (2006) als in ihrer Intensität nach Applikation eines Salzstress verändert beschrieben wurden, was als positive Kontrolle der computergestützten Auswertung der Proteinmuster zu werten war. Die Spotintensitäten der

Proteinmuster von Wildtyp und FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* wurden computergestützt miteinander verglichen, wobei unter Berücksichtigung des experimentellen Fehlers nur Spots mit einer Erhöhung der Intensität um den Faktor von mindestens zwei als akkumuliert in der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* angesehen wurden. Die Ergebnisse wurden durch den Vergleich von jeweils vier 2D-Gelen von jedem Zelltyp und jeder Kultivierungsbedingung validiert. Die Abbildungen 3.13A und 3.14A zeigen jeweils eine computergestützte Überlagerung von einem 2D-Gel mit aufgetrennten Proteinen des Wildtyps und einem 2D-Gel mit aufgetrennten Proteinen der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* aus Zellen, die unter den angegebenen Bedingungen kultiviert wurden. Proteine des Wildtyps sind rot, während Proteine der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* grün dargestellt sind. Bei gleichen Spotintensitäten erscheinen übereinanderliegende Proteine gelb.

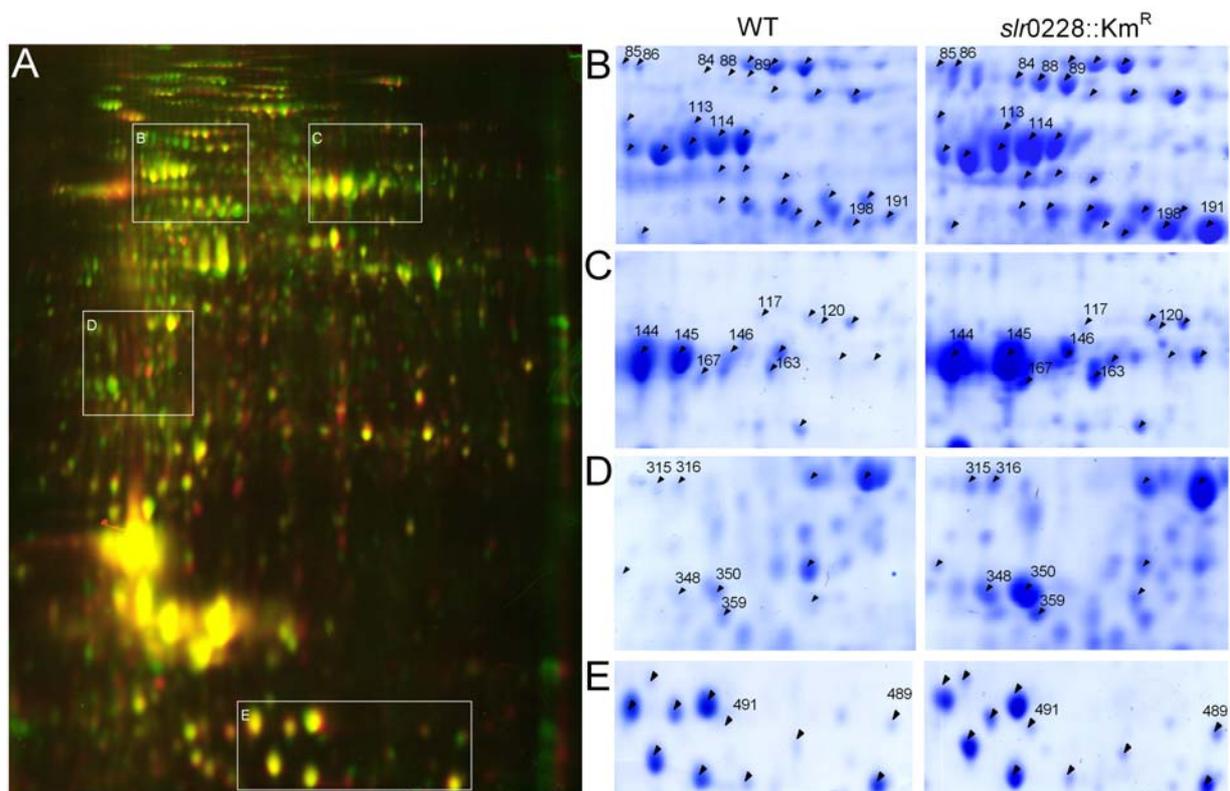


Abb. 3.13: Proteomanalyse des Wildtyps und der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* nach Kultivierung unter Kontrollbedingungen (18 mM NaCl)

Cytoplasmatische Proteine wurden aus Zellen des Wildtyps bzw. der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R*, die unter Kontrollbedingungen kultiviert wurden, isoliert und mittels 2D-PAGE (1. Dimension: pH 4-7; 2. Dimension: 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel) aufgetrennt. Zwei beispielhafte Coomassie-gefärbte Gele wurden computergestützt übereinandergelegt (A). rot: Proteine des Wildtyps; grün: Proteine der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R*; gelb: übereinandergelegte Proteine beider Zelltypen mit gleichen Spotintensitäten. B, C, D und E stellen Ausschnitte der beiden Gele dar, deren Position in A gezeigt ist. Pfeile geben die nach Fulda *et al.* (2006) identifizierten Proteinspots wieder. Mit einer Zahl markierte Spots akkumulierten in der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R*. Die Nomenklatur wurde dabei von Fulda *et al.* (2006) übernommen (Tab. 3.2).

Die Abbildungen 3.13A und 3.14A zeigen zudem Ausschnitte, die in den Abbildungen 3.13B-E bzw. 3.14B-E vergrößert dargestellt sind. Dabei konnten alle Proteinspots, die mit einer Pfeilspitze markiert sind, durch den Vergleich eines 2D-Gels von Fulda *et al.* (2006) identifiziert werden, während solche, die zusätzlich mit einer Zahl markiert sind, in der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* bei den angegebenen Bedingungen akkumulierten. Die Nummerierung der Spots wurde von Fulda *et al.* (2006) übernommen. Die zugehörigen Akkumulationsfaktoren sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Da eine große Anzahl von grünen Spots in Abbildung 3.13A zu erkennen ist, akkumulierten viele Proteine in Abwesenheit der proteolytischen Aktivität der FtsH-Protease Slr0228 in Zellen der Mutante, die unter Kontrollbedingungen kultiviert wurden. Es konnten 27 verschiedene Proteine von den insgesamt 56 identifizierten Proteinen als akkumuliert identifiziert werden (Anhang). Eine Auswahl von akkumulierten Proteinen wird in den Abbildungen 3.13B-C und in der Tabelle 3.2 gezeigt. Die meisten akkumulierten Proteine sind an der Energieumsetzung beteiligt, wie verschiedene Formen der α -Untereinheit der ATP-Synthase (Abb. 3.13B, Tab. 3.2), der großen Untereinheit der RubisCO (Abb. 3.13C, Tab. 3.2), der Ferredoxin-NADP-Reduktase (Abb. 3.13C, Tab. 3.2) oder der Untereinheit Sll0427 des wasserspaltenden Komplexes (Abb. 3.13D, Tab. 3.2). Weiterhin akkumulierten verschiedene Stressproteine wie GroEL1, GroEL2 (Abb. 3.13B, Tab. 3.2), GrpE (Abb. 3.13D, Tab. 3.2) und eine Form des P_{II}-Proteins (Abb. 3.13E, Tab. 3.2), das eine wichtige Rolle bei der N-Kontrolle in *Synechocystis* spielt.

Im Vergleich zu der Situation unter Kontrollbedingungen akkumulierten in an 684 mM NaCl akklimatisierte Zellen der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* weniger Proteine, weshalb in Abbildung 3.14A weniger grüne Spots zu erkennen sind als in Abbildung 3.13A. Es konnten insgesamt nur 13 akkumulierte Proteine von den 56 mit Hilfe des Mastergels identifizierten Proteinen in der FtsH-Mutante detektiert werden, die in der Mehrzahl auch unter Kontrollbedingungen akkumulierten (Anhang). Während Formen der Stressproteine GroEL2 (Abb. 3.14B, Tab. 3.2) und GrpE (Abb. 3.14D, Tab. 3.2) und der Untereinheit Sll0427 des wasserspaltenden Komplexes (Abb. 3.14D, Tab. 3.2) nicht akkumulierten, konnten zusätzlich höhere Spotintensitäten für die β - und ϵ -Untereinheit der ATP-Synthase detektiert werden (Abb. 3.14B und D, Tab. 3.2).

Das GgpS-Protein konnte im Proteinmuster beider Zelltypen in zwei Spots (117 und 120) mit unterschiedlichem pI-Wert, aber gleichem Molekulargewicht identifiziert werden. Proteine, die in 2D-Gelen in mehreren Spots mit unterschiedlichem pI-Wert vorkommen, reflektieren entweder posttranslationale Modifikationen oder Modifikationen, die durch die

Probenbehandlung zustande kommen. Posttranslationale Modifikationen des GgpS-Proteins konnten im Rahmen dieser Arbeit durch MALDI-TOF-MS-Analyse nicht identifiziert werden. Überraschenderweise akkumulierte das GgpS-Protein besonders in salzakklimatisierten Zellen der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* (Abb. 3.14C, Tab. 3.2). Da das GgpS-Protein im Mittelpunkt des Interesses steht, wurde es auch in Tabelle 3.2 aufgelistet bzw. in Abbildung 3.13C mit Zahlen markiert, obwohl der Akkumulationsfaktor des GgpS-Proteins in Zellen der FtsH-Mutante, die unter Kontrollbedingungen kultiviert wurden, kleiner als zwei war.

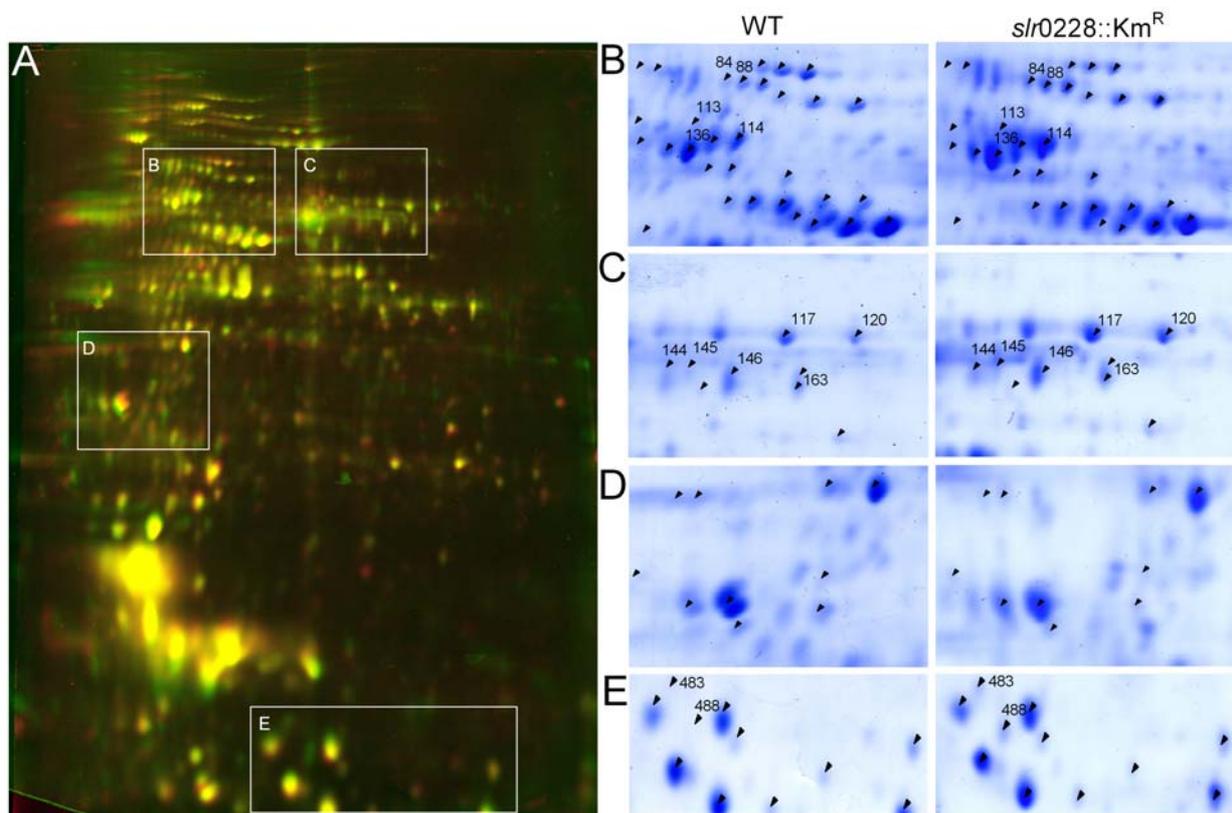


Abb. 3.14: Proteomanalyse des Wildtyps und der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* nach Akklimation an 684 mM NaCl

Cytoplasmatische Proteine wurden aus akklimatedierten Zellen des Wildtyps bzw. der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R*, isoliert und mittels 2D-PAGE (1. Dimension: pH 4-7; 2. Dimension: 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel) aufgetrennt. Zwei beispielhafte Coomassie-gefärbte Gele wurden computergestützt übereinandergelegt (A): rot: Proteine des Wildtyps; grün: Proteine der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R*; gelb: übereinandergelegte Proteine beider Zelltypen mit gleichen Spotintensitäten. B, C, D und E stellen Ausschnitte der beiden Gele dar, deren Position in A gezeigt wird. Pfeile geben die nach Fulda *et al.* (2006) identifizierten Proteinspots wieder. Mit einer Zahl markierte Spots akkumulierten in der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R*. Die Nomenklatur wurde dabei von Fulda *et al.* (2006) übernommen (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Auswahl akkumulierter Proteine der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* bei Kultivierung unter Kontrollbedingungen (18 mM NaCl) bzw. nach Akklimatisierung an 684 mM NaCl im Vergleich zum Wildtyp

Proteinspots konnten mit Hilfe von Fulda *et al.* (2006) identifiziert werden, wobei die Nomenklatur übernommen wurde.

Ausschnitt in Abb. 3.17/3.18	Spot Nr.	orf	Proteinfunktion	Akk. (18 mM NaCl)	Akk. (684 mM NaCl)
B	84	<i>slI2076</i>	60 kDa Chaperonin 1, GroEL1	∞	2,1 ± 0,8
	85	<i>slI0416</i>	60 kDa Chaperonin 2, GroEL2	3,7 ± 0,7	-
	86	<i>slI0416</i>	60 kDa Chaperonin 2, GroEL2	∞	-
	88	<i>slI2076</i>	60 kDa Chaperonin 1, GroEL1	∞	2,2 ± 0,6
	89	<i>slI2076</i>	60 kDa Chaperonin 1, GroEL1	∞	-
	113	<i>slI1326</i>	ATP-Synthase, α-Untereinheit	3,3 ± 1,7	1,6 ± 0,8
	114	<i>slI1326</i>	ATP-Synthase, α-Untereinheit	2,1 ± 1,2	2,0 ± 1,0
	136	<i>slr1329</i>	ATP-Synthase, β-Untereinheit	-	2,1 ± 0,2
	191	<i>slI1099</i>	Elongationsfaktor Tu	6,8 ± 2,4	-
	198	<i>slI1099</i>	Elongationsfaktor Tu	6,5 ± 2,5	-
C	117	<i>slI1566</i>	GgpS	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,3
	120	<i>slI1566</i>	GgpS	1,6 ± 0,8	2,7 ± 0,5
	144	<i>slr0009</i>	RubisCO, große Untereinheit	2,9 ± 1,5	4,5 ± 2,9
	145	<i>slr0009</i>	RubisCO, große Untereinheit	3,1 ± 2,2	5,5 ± 2,3
	146	<i>slr0009</i>	RubisCO, große Untereinheit	4,2 ± 0,9	3,7 ± 2,0
	163	<i>slr1643</i>	Ferredoxin-NADP-Reduktase	4,5 ± 1,1	2,0 ± 0,7
	167	<i>slr1643</i>	Ferredoxin-NADP-Reduktase	2,9 ± 0,8	-
D	315	<i>slr1485</i>	Protein Slr1485	3,3 ± 1,1	-
	316	<i>slI0057</i>	GrpE (Hsp70-Kofaktor)	2,2 ± 0,3	-
	348	<i>slI0427</i>	Untereinheit des wasserspaltenden Komplexes	14,3 ± 7,1	-
	350	<i>slI0427</i>	Untereinheit des wasserspaltenden Komplexes	5,0 ± 1,4	-
	359	<i>slI1784</i>	Protein SlI1784	5,9 ± 0,8	-
E	483	<i>slr1330</i>	ATP-Synthase, ε-Untereinheit	-	2,4 ± 0,2
	488	<i>ssI0707</i>	Signaltransduktionsprotein P _{II} der N-Kontrolle	-	∞
	489	<i>ssI0707</i>	Signaltransduktionsprotein P _{II} der N-Kontrolle	2,6 ± 0,6	-
	491	<i>ssI0707</i>	Signaltransduktionsprotein P _{II} der N-Kontrolle	∞	-

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass vor Einwirkung des osmotischen Stresses viel mehr Proteine in der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* akkumulierten als nach einem osmotischen Schock. Weiterhin konnten mögliche Substrate von FtsH identifiziert werden, wobei berücksichtigt werden muss, dass Veränderungen im Proteinpuster auch durch den Wachstumsdefekt der FtsH-Mutante hervorgerufen werden können. Unter den akkumulierten Proteinen und damit als mögliches Substrat für die FtsH-Protease Slr0228 konnte das Schlüsselenzym der GG-Synthese, das GgpS-Protein, identifiziert werden. Das wies auf eine Verknüpfung von Proteindegradation und Osmoregulation hin.

3.4.3 Charakterisierung der salzakklimatisierten FtsH-Mutante *slr0228::Km^R*

Mit Hilfe der Proteomanalyse konnte das GgpS-Protein in der salzakklimatisierten FtsH-Mutante als akkumuliert identifiziert werden. Es sollte zunächst untersucht werden, ob das GgpS-Protein in Abwesenheit von FtsH akkumuliert, weil es ein direktes Substrat von FtsH ist oder weil FtsH die Synthese des GgpS-Proteins beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden Zellen des Wildtyps und der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* an verschiedene NaCl-Konzentrationen akklimatisiert und der *ggpS*-mRNA-Gehalt wurde durch Northern Blot-Analyse bestimmt. Da jedoch die Expression des *ggpS*-Gens in der salzakklimatisierten FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* unverändert war (Abb. 3.15A), konnte ein regulativer Einfluss der Protease auf die *ggpS*-Expression ausgeschlossen werden. Weiterhin konnte der erhöhte GgpS-Proteingehalt in salzakklimatisierten Zellen der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* durch Western Blot-Analyse betätigt werden (Abb. 3.15B). Es wird somit nicht die Synthese des GgpS-Proteins durch Proteolyse kontrolliert, sondern die Stabilität des Proteins.

Da die Zugabe von GG die Salzsensitivität der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* aufhob (Abschnitt 3.4.1), kann möglicherweise ein Mangel an GG die molekulare Grundlage für den salzsensitiven Phänotyp darstellen. Deswegen wurde der GG-Gehalt in salzakklimatisierten Zellen der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* bestimmt. Tatsächlich wies die FtsH-Mutante einen GG-Mangel in salzakklimatisierten Zellen auf (Abb. 3.15C). Zusätzlich konnte kein GG im Medium der Mutante detektiert werden (Daten nicht gezeigt), so dass die molekulare Basis für die Salzsensitivität dieser Mutante eine beeinträchtigte GG-Synthese unter diesen Bedingungen war. In Zellen der Mutante, die bei 855 mM NaCl kultiviert wurden, konnte kein GG nachgewiesen werden. Kurz nach einem Salzschock mit 684 mM NaCl ist die GG-Synthese in der FtsH-Mutante zunächst jedoch nicht beeinträchtigt. Erst acht Stunden nach Salzzugabe stieg der GG-Gehalt in der FtsH-Mutante nicht mehr wie im Wildtyp an und

verblieb bei einem konstanten Wert, der deutlich geringer war als der für Wildtypzellen. Somit beeinflusst die FtsH-Protease Slr0228 nicht die Induktion der GG-Synthese und spielt ausschließlich eine regulatorische Rolle im Akklimatisierungsprozess.

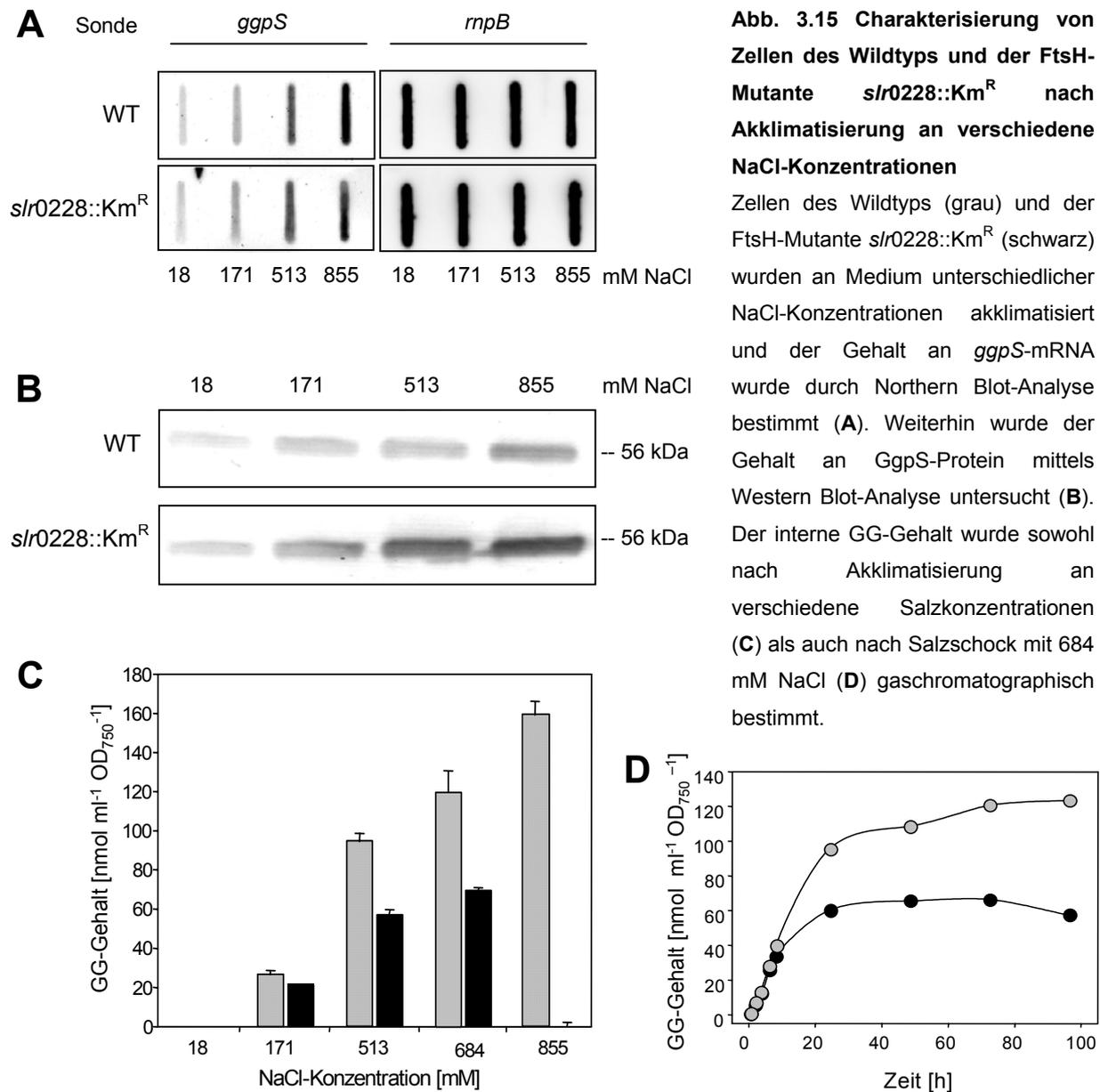


Abb. 3.15 Charakterisierung von Zellen des Wildtyps und der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* nach Akklimatisierung an verschiedene NaCl-Konzentrationen

Zellen des Wildtyps (grau) und der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* (schwarz) wurden an Medium unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen akklimatisiert und der Gehalt an *ggpS*-mRNA wurde durch Northern Blot-Analyse bestimmt (A). Weiterhin wurde der Gehalt an GgpS-Protein mittels Western Blot-Analyse untersucht (B). Der interne GG-Gehalt wurde sowohl nach Akklimatisierung an verschiedene Salzkonzentrationen (C) als auch nach Salzschock mit 684 mM NaCl (D) gaschromatographisch bestimmt.

Die beeinträchtigte GG-Synthese bei gleichzeitiger Akkumulation des GgpS-Proteins in salzakklimatisierten Zellen der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* wies darauf hin, dass das GgpS-Protein in dieser Mutante wahrscheinlich in inaktiver Form akkumulierte. Für einen *in vitro*-Enzymtest wurden die Zellextrakte von allen niedermolekularen Substanzen befreit und mit 200 mM NaCl versetzt, um die maximale Aktivierung des GgpS-Proteins im

Gesamtzellextrakt zu gewährleisten. Das GgpS-Protein konnte im Extrakt aus salzakklimatisierten Zellen der FtsH-Mutante nicht im gleichen Maße durch NaCl aktiviert werden wie im Extrakt aus Wildtypzellen (Abb. 3.16). In der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* akkumulierte folglich defektes GgpS-Protein, was eine beeinträchtigte GG-Syntheserate zur Folge hatte.

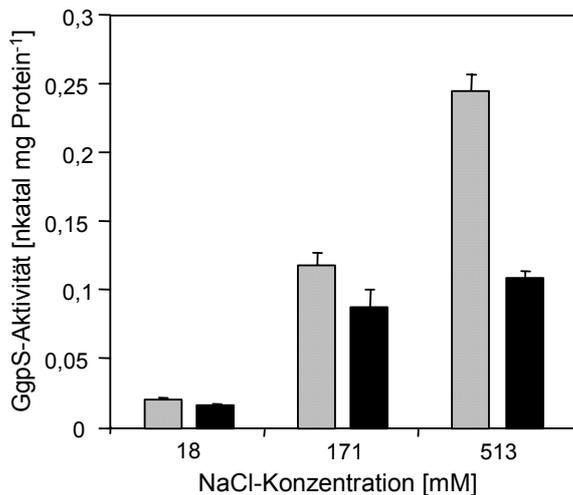


Abb. 3.16: *In vitro*-Aktivität des GgpS-Proteins im Extrakt von Zellen des Wildtyps bzw. der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* nach Akklimation an verschiedene Salzkonzentrationen

Die Aktivität des GgpS-Proteins im Proteinextrakt von Zellen des Wildtyps (grau) bzw. der Mutante *slr0228::Km^R* (schwarz), die an unterschiedliche Salzkonzentrationen akklimationiert waren, wurde nach dem Entfernen aller niedermolekularer Substanzen bei 200 mM NaCl im Testansatz bestimmt.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die FtsH-Protease Slr0228 direkt den Abbau des GgpS-Proteins durchführt oder ob möglicherweise eine andere Protease die Proteolyse des GgpS-Proteins bewirkt und bei Inaktivierung der FtsH-Protease Slr0228 den Abbau durch Überlastung nicht mehr bewerkstelligen kann. Um diesen Aspekt zu untersuchen, wurde ein *in vitro*-System etabliert, bei dem der Abbau des rekombinanten Strep-GgpS-Proteins in Anwesenheit von invertierten Membranvesikeln, die aus Wildtypzellen bzw. aus Zellen der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* isoliert wurden, analysiert wurde. Invertierte Wildtyp-Membranvesikel beinhalten aktives FtsH-Protein Slr0228, wobei das aktive Zentrum der Protease nach außen gerichtet ist. Ein spezifischer Abbau des zugegebenen rekombinanten Strep-GgpS-Proteins durch die FtsH-Protease Slr0228 konnte im Verlauf der Inkubation bei 30°C in Anwesenheit von Zn²⁺-Ionen und ATP, Substanzen die von FtsH als energieabhängige Metalloprotease zur Aktivität benötigt werden, mit Hilfe der Western Blot-Analyse beobachtet werden (Abb. 3.17A). Wurden die invertierten Membranvesikel jedoch aus Zellen der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* isoliert, konnte kein Abbau des rekombinanten Strep-GgpS-Proteins detektiert werden (Abb. 3.17A). Zudem fand der Abbau durch Wildtyp-Membranvesikeln nur in Anwesenheit von ATP statt (Daten nicht gezeigt). Die Inkubation

des rekombinanten Strep-GgpS-Proteins mit der cytoplasmatischen Fraktion beider Zelltypen hatte keinen Einfluss auf die Stabilität des Strep-GgpS-Proteins (Abb. 3.17B). Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass rekombinantes Strep-GgpS-Protein ohne Zugabe von Wildtyp-Membranvesikeln degradiert wird, da auch nach 24stündiger Inkubation bei 30°C kein schwächeres Signal nach anschließender Western Blot-Analyse zu erkennen war (Abb. 3.17B, Spur 2). Das im Cytoplasma des Wildtyps und der FtsH-Mutante vorkommende GgpS-Protein hatte zudem keinen Einfluss auf die Detektion des rekombinanten Strep-GgpS-Proteins im Western Blot, weil es in der cytoplasmatischen Fraktion nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.17B, Spur 1). In der Membranfraktion konnte hingegen kein GgpS-Protein detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

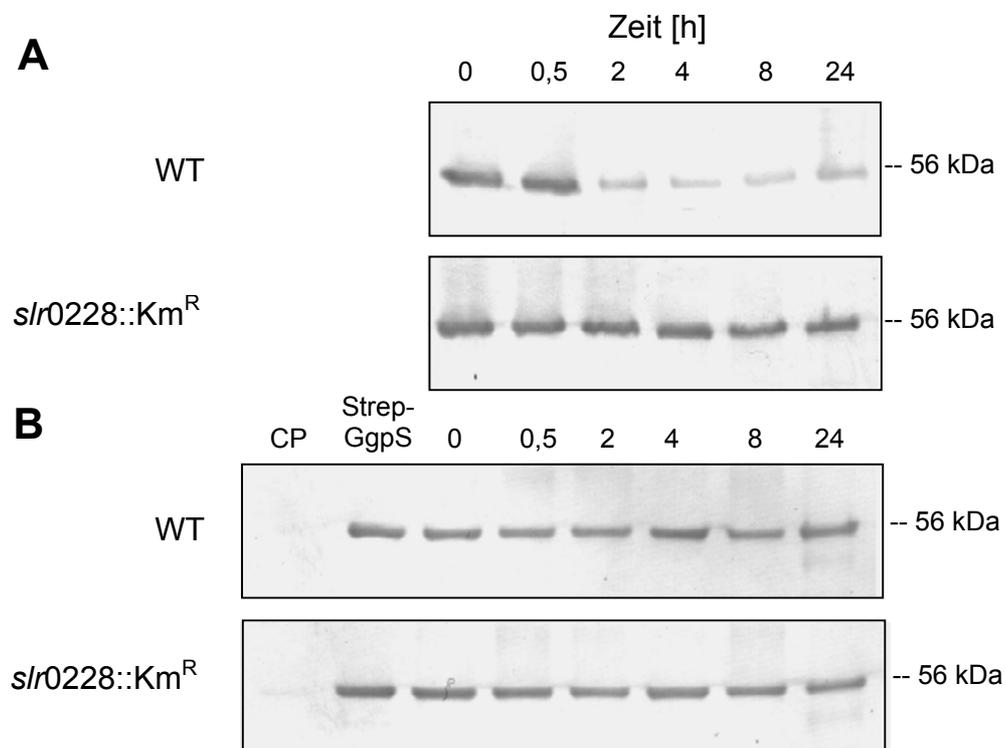


Abb. 3.17: Abbau des rekombinanten GgpS-Proteins durch Membranvesikel des Wildtyps im *in vitro*-Testsystem

Invertierte Membranvesikel (**A**) bzw. cytoplasmatische Proteine (**B**) wurden aus Zellen des Wildtyps bzw. der FtsH-Mutante *s/r0228::Km^R* isoliert und je 25 µg Protein mit 1 µg rekombinantes Strep-GgpS-Protein bei 30°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde der Gehalt an Strep-GgpS-Protein mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen GgpS bestimmt. Strep-GgpS: für 24 h bei 30°C inkubiertes Strep-GgpS-Protein ohne Zugabe von *Synechocystis*-Protein; CP: cytoplasmatische Fraktion des Wildtyps bzw. der FtsH-Mutante *s/r0228::Km^R* ohne Zugabe von rekombinantes Strep-GgpS-Protein.

Da der Abbau des rekombinanten Strep-GgpS-Proteins ATP-abhängig war und nur nach Zusatz von Membranvesikeln des Wildtyps erfolgte, wird die Stabilität im *in vitro*-Testsystem durch eine membrangebundene, energieabhängige Protease beeinflusst. Folglich ist das GgpS-Protein wahrscheinlich ein spezifisches Substrat der FtsH-Protease Slr0228 in *Synechocystis*, die neben den anderen drei FtsH-Proteasen die einzige membrangebundene, energieabhängige Protease in *Synechocystis* darstellt (Sokolenko *et al.*, 2002). Bei diesem System muss aber berücksichtigt werden, dass der Strep-tag die Erkennung des für dieses Experiment verwendeten rekombinanten Strep-GgpS-Proteins durch FtsH beeinflussen könnte.

Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass Zellen der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* salzsensitiv sind, da die GG-Syntheserate durch die Akkumulation von überwiegend nicht funktionalem GgpS-Protein erniedrigt ist. Der Abbau des defekten GgpS-Proteins ist für die Regulation des GG-Gehaltes in salzakklimatisierten Zellen notwendig. Die molekulare Basis des salzsensitiven Phänotyps einer FtsH-Mutante konnte damit zum ersten Mal aufgeklärt und eine direkte regulatorische Beteiligung einer FtsH-Protease an der Osmoadaptation in Bakterien dokumentiert werden. Zudem konnte mit dem GgpS-Protein das erste cytoplasmatische Protein als Substrat für eine FtsH-Protease in Cyanobakterien vorgeschlagen werden.

3.5 Identifizierung regulatorisch wirksamer Substanzen der GG-Synthese

Da auch der ungerichtete Ansatz der Transposonmutagenese nicht zur Identifizierung eines Regulators der GG-Synthese führte (Abschnitt 3.3), wurde in einem neuen Ansatz die Beteiligung Protein-unabhängiger Komponenten untersucht. Unter Kontrollbedingungen kultivierte Zellen und salzakklimatisierte Zellen unterscheiden sich nicht nur durch eine auch im akklimatisierten Zustand erhöhte NaCl-Konzentration im Cytoplasma (Hagemann *et al.*, 1994), sondern ebenfalls durch den Gehalt osmoprotektiver Substanzen voneinander. Es sollte untersucht werden, ob osmoprotektive Substanzen in Konzentrationen, wie sie in salzakklimatisierten Zellen vorliegen, eine Hemmung der GG-Synthese bewirken. Einen ersten Hinweis auf einen derartigen Mechanismus lieferte das Abschalten der GG-Synthese nach Zugabe von Trehalose zu salzakklimatisierten Wildtypzellen oder nach *de novo*-Synthese von Trehalose (Abschnitt 3.2).

Daher wurde überprüft, ob verschiedene osmoprotektive Substanzen die GgpS-Aktivität auch im *in vitro*-Enzymtest direkt hemmen können. Dafür wurden zum einen die osmoprotektiven Substanzen GG, Saccharose oder Trehalose ausgewählt, die durch den Transporter Ggt in die Zelle gelangen können, aber auch Osmolyte wie Glycinbetain, die in *Synechocystis* nicht als osmoprotektive Substanz vorkommen. Es wurde zuvor ausgeschlossen, dass die Enzyme, die für den Nachweis von GG bzw. ADP wie die alkalische Phosphatase, die LDH bzw. PK im *in vitro*-Test nötig sind (Abschnitt 2.9), durch diese Osmolyte in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Alle Abweichungen im GG- bzw. ADP-Gehalt nach Zugabe der Osmolyte waren deshalb auf eine Modulation der GgpS-Aktivität zurückzuführen. Während der Zusatz steigender NaCl- bzw. Saccharose-Konzentrationen keinen Einfluss auf die GgpS-Aktivität hatte, bewirkte die Zugabe von Trehalose, Glycinbetain oder GG eine Hemmung der GgpS-Aktivität (Abb. 3.18).

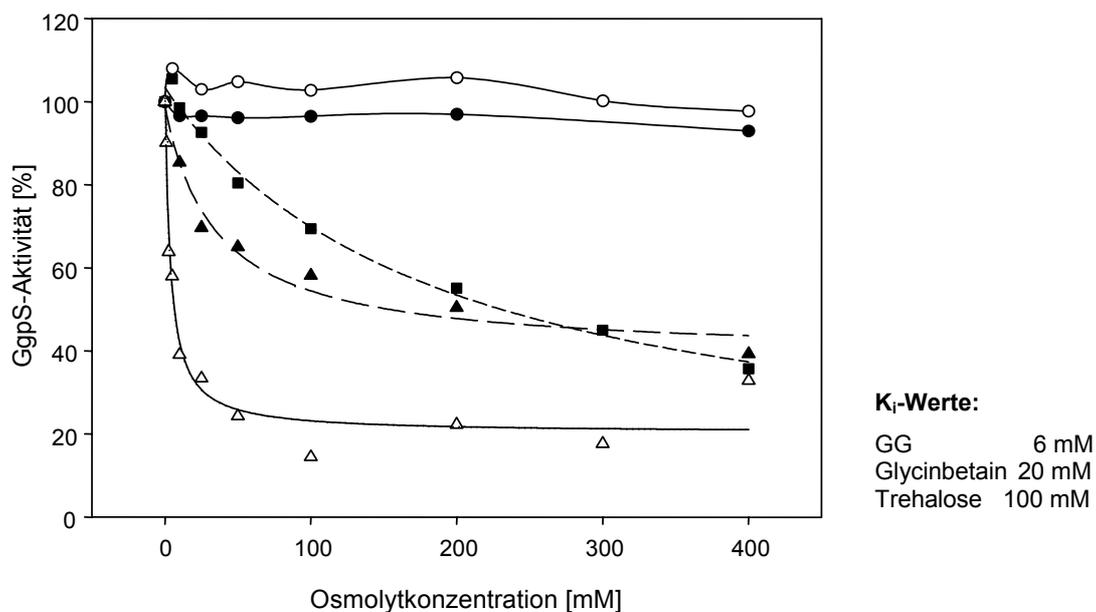


Abb. 3.18: Aktivität des rekombinanten Strep-GgpS-Proteins in Abhängigkeit von der Konzentration verschiedener Osmolyte im *in vitro*-Enzymtest

Die Aktivität des rekombinanten Strep-GgpS-Proteins wurde nach Zugabe steigender Konzentrationen an NaCl (●), Saccharose (○), Trehalose (■), Glycinbetain (▲) bzw. GG (△) bestimmt. Die maximale Aktivität der rekombinanten GgpS wurde auf 100 % gesetzt und entsprach einem absoluten Wert von 60 nkatal mg Protein⁻¹.

Für Trehalose konnte dieser Effekt, wie schon erwähnt, auch *in vivo* gezeigt werden (Abschnitt. 3.2). Neben den hier genannten Osmolyten zeigten auch Glukose, Maltose und

PEG 600 einen hemmenden Effekt, während Prolin die GgpS-Aktivität nur schwach hemmte (Daten nicht gezeigt).

Die hemmenden Substanzen modulierten die Aktivität des GgpS-Proteins unterschiedlich stark. GG stellte die Substanz dar, die die stärkste hemmende Wirkung auf das GgpS-Protein besaß. Dabei war für die Hemmung durch GG unerheblich, ob das in der Zelle vorkommende α -GG oder das nicht vorkommende β -GG für den Test verwendet wurde. Der K_i -Wert für GG betrug ungefähr 6 mM, während Glycinbetain eine halbmaximale Hemmung der GgpS-Aktivität bei 20 mM und Trehalose erst bei 100 mM zeigte.

Da NaCl keinen Einfluss auf die Aktivität der rekombinanten GgpS hat, aber nach Zugabe von *Synechocystis*-Zellextrakt das GgpS-Protein aktiviert, wurde die Aktivität der GgpS in Abhängigkeit steigender NaCl-Konzentrationen in Anwesenheit von 6 mM GG analysiert. Der Zusatz steigender Konzentrationen an NaCl bewirkte eine Aufhebung des hemmenden Effekts von GG (Abb. 3.19).

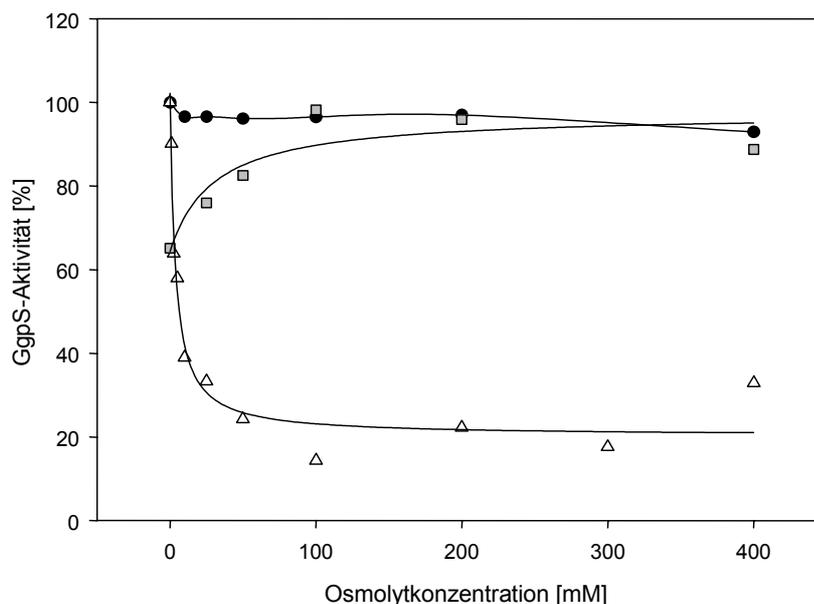


Abb. 3.19: Aktivität des rekombinanten Strep-GgpS-Proteins in Abhängigkeit von der NaCl- und GG-Konzentration im *in vitro*-Enzymtest

Die Aktivität des rekombinanten Strep-GgpS-Proteins wurde nach Zugabe steigender Konzentrationen an NaCl (●) bzw. GG (△) oder nach Zugabe steigender Konzentrationen an NaCl in Anwesenheit von 6 mM GG (□) bestimmt. Die maximale Aktivität der rekombinanten GgpS wurde auf 100 % gesetzt und entsprach einem absoluten Wert von 60 nkatal mg Protein⁻¹.

Durch Konzentrationen an NaCl von über 200 mM wurde die Hemmung sogar vollständig aufgehoben. Diese Aufhebung durch NaCl konnte ebenfalls nach der Hemmung durch Trehalose und Glycinbetain beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Folglich kann die Aktivität des rekombinanten Strep-GgpS-Proteins durch die osmotischen Verhältnisse in der Umgebung direkt beeinflusst werden, wobei NaCl aktivierend und osmoprotektive Substanzen wie GG hemmend wirken. Das GgpS-Protein verhält sich damit antagonistisch zu allen bisher untersuchten Enzymen, die durch hohe NaCl-Konzentrationen gehemmt und durch osmoprotektive Substanzen stabilisiert werden (Yancey, 2005). Die NaCl-abhängige Modulation der GgpS-Aktivität durch die osmoprotektiven Substanzen GG bzw. Trehalose könnte als Mechanismus für die Regulation der GG-Synthese auch unter *in vivo*-Bedingungen formuliert werden, denn in Abschnitt 3.2 wurde die Hemmung der GG-Synthese durch Zugabe oder Synthese von Trehalose in salzakklimatisierten Zellen dokumentiert. Die Beteiligung eines regulatorischen Proteins, das unter Kontrollbedingungen oder in akklimatisierten Zellen die GG-Synthese hemmt, wäre dabei nicht mehr erforderlich. Während die Hemmung der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen eindeutig durch die Akkumulation von GG erklärt werden kann, die zusätzlich abhängig von der durch die externe Ionenkonzentration vorgegebene NaCl-Konzentration im Cytoplasma moduliert wird, könnte die Hemmung der GG-Synthese unter Kontrollbedingungen durch im Zellextrakt vorhandene Substanzen verursacht werden. Die Regulation des GgpS-Proteins wäre völlig unabhängig von anderen Proteinen und könnte auf die jeweilige externe Salzkonzentration reagieren. Damit wäre das GgpS-Protein sowohl Osmosensor als auch Osmoregulator.

4. Diskussion

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Charakterisierung der „steady state“-Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen von *Synechocystis*. Der Mechanismus der Regulation eines Osmolyt-synthetisierenden Systems konnte noch für kein Bakterium gezeigt werden. Anhand verschiedener Experimente konnte in dieser Arbeit dokumentiert werden, dass der Osmolytstatus der Zelle ein wichtiger Aspekt der Regulation ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Proteindegradation die GG-Synthese direkt beeinflusst.

4.1 Die biochemische Modulation der GgpS-Aktivität vermittelt die „steady state“-Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen

Während die biochemische Modulation der GgpS-Aktivität für die Induktion der GG-Synthese nach einem Salzschock entscheidend ist, war die Ebene der „steady state“-Regulation in salzakklimatisierten Zellen von *Synechocystis* unklar. Die lineare Abhängigkeit von externer Salzkonzentration, *ggpS*-mRNA-Gehalt, GgpS-Proteingehalt und GG-Gehalt (Abb. 1.2) führte zur Schlussfolgerung, dass die Regulation der GG-Synthese in akklimatisierten Zellen hauptsächlich durch die Transkription vermittelt wird (Marin *et al.*, 2002). Um die Bedeutung der Transkription für die „steady state“-Regulation der GG-Synthese in akklimatisierten Zellen zu untersuchen, wurde die *ggpS*⁺-Mutante erzeugt, die eine von der Salzkonzentration unabhängig hohe Expressionsrate des *ggpS*-Gens aufwies. In Zellen der *ggpS*⁺-Mutante konnte nach Akklimatisierung an verschiedene Salzkonzentrationen ein konstitutiv hoher GgpS-Proteingehalt gemessen werden, der sich jedoch nicht in einem im Vergleich zum Wildtyp gesteigerten GG-Gehalt äußerte (Abb. 3.2). Daraus folgte, dass der GG-Gehalt durch biochemische Modulation der GgpS-Aktivität reguliert wird. Die Transkription spielt somit nur eine Rolle bei der Bereitstellung von GgpS-Protein. Über den Aktivitätsstatus des GgpS-Proteins und damit über den GG-Gehalt bestimmt die biochemische Modulation.

Mit Hilfe der Analyse des GG-Gehaltes der *ggpS*⁺-Mutante unter Kontrollbedingungen und unmittelbar nach einem Salzschock ließ sich zudem die Regulation der Induktion der GG-Synthese verdeutlichen. Durch *in vitro*-Experimente mit dem rekombinanten GgpS-Protein war bereits bekannt, dass das GgpS-Protein in *Synechocystis* wahrscheinlich in einem aktiven

Status synthetisiert und durch einen unbekanntem Regulator unter Kontrollbedingungen gehemmt wird (Abb. 1.3; Abb. 3.7; Kerstan, 1998; Hagemann *et al.*, 2001). Nach einem Salzschock wird das GgpS-Protein aktiviert. Unter Kontrollbedingungen wie auch unmittelbar nach einem Salzschock konnte in der *ggsS⁺*-Mutante eine erhöhte GG-Syntheserate im Vergleich zum Wildtyp dokumentiert werden (Abb. 3.1). Der erhöhte GgpS-Proteingehalt beeinflusste unter diesen Bedingungen die GG-Syntheserate. Erst in akklimatisierten Zellen, 24 h nach einem Salzschock, entsprach der GG-Gehalt der Mutante dem des Wildtyps. In Übereinstimmung mit den *in vitro*-Experimenten konnte geschlossen werden, dass das GgpS-Protein unter Kontrollbedingungen durch einen Regulator gehemmt wird. Da unter Kontrollbedingungen in der *ggsS⁺*-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp GG nachweisbar war, ist die Hemmung der GgpS-Aktivität unvollständig. Möglicherweise liegt der Regulator in einer zu geringen Konzentration vor, um das in der Mutante vorhandene GgpS-Protein zu inaktivieren.

Unmittelbar nach einem Salzschock wird das GgpS-Protein maximal aktiviert, da die GG-Syntheserate im Wildtyp unabhängig von der Stärke des Salzschocks ist (Hagemann *et al.*, 1996a). Da mehr GgpS-Protein in Zellen der *ggsS⁺*-Mutante bereits vor einem Salzschock vorlag, war die GG-Syntheserate in der Mutante nach maximaler Aktivierung des vorhandenen GgpS-Proteins zunächst erhöht. Nach dem Akklimatisierungsprozess zeigten beide Zelltypen den gleichen GG-Gehalt, was ein Hinweis darauf ist, dass die Aktivität des GgpS-Proteins erneut gehemmt wird, um möglicherweise eine Überproduktion an GG zu verhindern. Dabei spielte die stark erhöhte Menge des GgpS-Proteins, beispielsweise in Zellen der *ggsS⁺*-Mutante, die an 342 mM NaCl akklimatisiert waren, keine Rolle.

Mit Hilfe der *ggsS⁺*-Mutante konnte zum einen geklärt werden, dass die Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen auf der Ebene der biochemischen Modulation der GgpS-Aktivität stattfindet. Zum anderen konnte durch die Analyse dieser Mutante deutlich gemacht werden, dass in *Synechocystis*-Zellen im Verlauf des Anpassungsprozesses an erhöhte Salzkonzentrationen zwei Regulationsvorgänge aktiv sind. Nach einem Salzschock wird das unter Kontrollbedingungen inaktiv vorliegende GgpS-Protein durch biochemische Modulation maximal aktiviert, während zumindest ein Teil des GgpS-Proteins in salzakklimatisierten Zellen erneut durch biochemische Modulation in einen inaktiven Status überführt wird.

4.2 Das GG-Aufnahmesystem spielt bei der Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen keine direkte Rolle

Zu Beginn dieser Arbeit existierte ein attraktives Arbeitsmodell für den Mechanismus der „steady state“-Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen von *Synechocystis* (Abschnitt 1.2). Danach wird GG nach einem Salzschock zunächst mit maximaler Rate synthetisiert (Hagemann *et al.*, 1996a). Kommt es zu einer Überproduktion an GG, geben die Zellen von *Synechocystis* GG an das umgebende Medium ab, wobei mechanosensitive Kanäle involviert sein könnten. Der Transporter Ggt ist an der Rückgewinnung von GG beteiligt (Hagemann *et al.*, 1996b) und könnte bei Aktivität ein Signal generieren, das die GG-Synthese hemmt. Die Aufnahme und Akkumulation von Trehalose durch akklimatisierte Wildtypzellen war mit dem vollständigen Abschalten der GG-Synthese verbunden (Mikkat *et al.*, 1997), was für ein solches Modell sprach.

Im Gegensatz zur Aufnahme von Trehalose bewirkt die Aufnahme von Saccharose durch den Transporter Ggt keine Hemmung der GG-Synthese

Der Verlust von GG und die Funktion des Transporters Ggt als Rückgewinnungssystem für GG konnte gezeigt werden, da im Medium der salzakklimatisierten Mutante *ggtA*⁻ GG detektierbar war (Abb. 3.3; Hagemann *et al.*, 1996b). Diese Mutante kann keinen funktionellen Transporter synthetisieren, da die ATP-spaltende Untereinheit GgtA des Transporters fehlt. Salzakklimatisierte Zellen dieser Mutante wiesen somit eine erhöhte GG-Syntheserate auf.

Bei Mikkat *et al.* (1997) führte das Zusetzen von 3 mM Trehalose zu salzakklimatisierten Wildtypzellen nach 48 h zu einer Reduktion des GG-Gehaltes um 90 %. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Zugabe von 10 mM Trehalose führte innerhalb von 24 h zu einem kompletten Austausch von GG gegen Trehalose (Abb. 3.4A). Wahrscheinlich findet nach Zugabe von Trehalose nicht nur die vollständige Abschaltung der GG-Synthese statt, sondern ebenfalls die Verstoffwechselung von GG, wie sie auch nach einem hypoosmotischen Schock geringen Ausmaßes gefordert wird, da GG nicht im Medium detektierbar war und der Gehalt an GG nicht durch Zellteilung innerhalb von 24 h in dem beobachteten Maße verringert werden konnte. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass trotz veränderter GG-Syntheserate der Gehalt des GgpS-Proteins nicht verändert war (Abb. 3.4B). Auch hier ist somit die Veränderung der GG-Syntheserate auf eine biochemische Modulation der GgpS-Aktivität zurückzuführen.

Die erhöhte GG-Syntheserate von salzakklimatisierten Zellen der *ggtA*-Mutante und die Abnahme der GG-Syntheserate in Zellen des Wildtyps nach Trehalosezugabe wiesen zunächst auf eine direkte Beteiligung der Aktivität des Transporters Ggt an der Regulation des GG-Gehaltes, wie in Abschnitt 1.2 erläutert und in Abbildung 1.4 zusammengefasst, hin. Die Hemmung des GgpS-Proteins *in vitro* durch Zugabe unterschiedlicher Zellextrakte aus salzakklimatisierten Wildtypzellen, die 48 h mit oder ohne Trehalose inkubiert wurden, konnte allerdings nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Durch diese Experimente konnte nicht unterschieden werden, ob die Akkumulation der internen Osmolyte oder die Aktivität des Transporters Ggt ein Signal zur Modulation der GgpS-Aktivität generiert. Da aber keine Hemmung der GG-Synthese nach Zugabe von Saccharose zu salzakklimatisierten Wildtypzellen messbar war (Abb. 3.4C), obwohl auch in diesem Fall der Transporter Ggt aktiv war und zudem die Akkumulation von Trehalose nach *de novo*-Synthese ohne Beteiligung des Transporters Ggt das Abschalten der GG-Synthese bewirkte (Abb. 3.6A), konnte die Aktivität des Transporters Ggt als regulatives Element der GG-Synthese ausgeschlossen werden. Die Inaktivierung der GG-Synthese korrelierte somit mit der Akkumulation osmoprotektiver Substanzen im Cytoplasma.

Die Akkumulation von Trehalose durch *de novo*-Synthese oder Aufnahme bewirkt eine Hemmung der GG-Synthese

Die Synthese von Trehalose in *Synechocystis* konnte durch die Konstruktion der Mutanten *otsALB*⁺ bzw. *ggtA*⁻*otsALB*⁺ ermöglicht werden, die die Gene *otsA* aus *M. tuberculosis* und *otsB* aus *E. coli* heterolog exprimieren und ein chimäres, aktives Fusionsprotein synthetisieren können. Das Fusionsprotein OtsAB aus *E. coli* zeigte im *in vitro*-Enzymtest eine höhere Aktivität als die einzeln vorliegenden Proteine OtsA und OtsB (Seo *et al.*, 2000). Die räumliche Nähe der aktiven Zentren der Enzyme begünstigt somit die effektive Weitergabe des Intermediats Trehalose-6-Phosphat. Für die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte nachgewiesen werden, dass die Proteine für die Trehalosesynthese in einem Multienzymkomplex vorliegen (Vuorio *et al.*, 1993). Durch einen Yeast-Two-Hybrid-Ansatz konnte ebenfalls eine mögliche Interaktion von GgpS mit dem zweiten Enzym der GG-Synthese, dem GgpP-Protein, nachgewiesen werden (Huckauf, 2003).

Das Genkonstrukt *otsALB* wurde in den Mutanten *otsALB*⁺ bzw. *ggtA*⁻*otsALB*⁺ von *Synechocystis* unter der Kontrolle des durch IPTG induzierbaren *tac*-Promotors exprimiert. Jedoch fand eine Expression des heterologen Genkonstrukts bereits ohne Zugabe des Induktors IPTG statt, so dass Trehalose konstitutiv in den Mutanten *otsALB*⁺ bzw. *ggtA*⁻

otsALB⁺ synthetisiert wurde. Dies hatte zur Folge, dass kein GG in salzakklimatisierten Zellen der Mutanten detektiert werden konnte. Die Hemmung der GG-Synthese nach Induktion der Trehalosesynthese konnte somit nicht wie die Hemmung der GG-Synthese nach Aufnahme von Trehalose im Prozess dargestellt werden. Dass eine Expression eines unter der Kontrolle des *tac*-Promotors stehenden Gens in *Synechocystis* bereits ohne Zugabe von IPTG stattfindet, konnte auch von Sandström *et al.* (2001) beobachtet werden. Ein streng kontrollierbares Expressionssystem ist für *Synechocystis* noch nicht etabliert worden.

Erstaunlich war, dass trotz einer bei moderaten Salzkonzentrationen unabhängig hohen Expression des *otsALB*-Genkonstrukts (Abb. 3.6C) der Trehalosegehalt abhängig von der externen Salzkonzentration war. *Synechocystis* ist somit in der Lage, die Trehalosekonzentration der externen Salzkonzentration anzupassen. Möglicherweise wird dazu in *Synechocystis* die Trehalosesynthese ebenso wie die GG-Synthese reguliert und diese Regulation stellt ein universelles Prinzip dar.

Durch die beobachtete Regulation des GG-Gehaltes in Zellen der Mutante *ggtA⁻otsALB⁺* konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Aktivität des Transporters Ggt nicht direkt an der Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen beteiligt ist. Allein die Akkumulation von Osmolyten im Cytoplasma von *Synechocystis* generiert das Signal für eine Hemmung der GgpS-Aktivität. Der Transporter ist an der Regulation der GG-Synthese nur dadurch beteiligt, dass durch ihn osmoprotektive Substanzen wie Trehalose im Cytoplasma akkumulieren. Die zu Beginn dieser Arbeit formulierte und auch für andere Bakterien wie *H. elongata* diskutierte Hypothese (Gramman *et al.*, 2002) konnte zumindest für *Synechocystis* widerlegt werden. Es muss aber ein Sensorsystem in *Synechocystis* existieren, das in der Lage ist, die interne Osmolytkonzentration in Abhängigkeit von der externen Salzkonzentration zu messen. Es ist möglich, dass die Zelle den internen Osmolytstatus indirekt durch die Membranspannung oder durch den Hydratationsstatus von Proteinen bzw. Membranen sensiert, da so auch direkt die Differenz der Wasserpotentiale von Cytoplasma und externem Medium wahrgenommen werden kann. Weiterhin wäre auch möglich, dass *Synechocystis* sowohl direkt den Gehalt einer osmoprotektiven Substanz als auch die von der externen Salzkonzentration abhängige Ionenkonzentration im Cytoplasma misst.

4.3 Die membrangebundene FtsH-Protease Slr0228 wurde als regulatives Element der GG-Synthese identifiziert

Es konnte gezeigt werden, dass der Osmolytstatus der Zelle entscheidend für die Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen von *Synechocystis* ist (Abschnitt 3.2). Wie die Information über den Osmolytstatus an das GgpS-Protein vermittelt wird, ist unbekannt. Möglicherweise sind ein oder mehrere regulatorische Proteine an der Modulation der GgpS-Aktivität beteiligt.

Mit Hilfe eines *in vitro*-Enzymtests mit den rekombinanten Proteinen GgpS-His (Kerstan, 1998; Hagemann *et al.*, 2001) oder Strep-GgpS (Abb. 3.7) konnte die Regulation der GgpS-Aktivität unter Kontrollbedingungen und unmittelbar nach einem osmotischen Schock mit NaCl deutlich gemacht werden. Die Hemmung der Aktivität des rekombinanten GgpS-Proteins durch *Synechocystis*-Zellextrakt im *in vitro*-Enzymtest deutet auf einen inhibitorischen Regulator hin, möglicherweise ein Protein, das das GgpS-Protein unter Kontrollbedingungen in Abwesenheit von NaCl hemmen kann. Nach Zugabe von NaCl findet keine Hemmung der Aktivität des rekombinanten GgpS-Proteins durch den Zellextrakt im Enzymtest statt. Möglicherweise wird in der Zelle das GgpS-Protein durch Freisetzung des inhibitorischen Regulators nach einem Salzschock aktiviert.

In salzakklimatisierten Zellen kommt es ebenfalls zu einer biochemischen Modulation der GgpS-Aktivität, um eine energetisch ungünstige Überproduktion an GG zu verhindern und um eine „steady state“-Regulation der GG-Synthese zu ermöglichen. Die biochemische Modulation der GgpS-Aktivität wird zum einen durch die Regulation der GG-Synthese in der *ggpS⁺*-Mutante und zum anderen durch die Hemmung der GG-Synthese nach Akkumulation von Trehalose im Cytoplasma des Wildtyps deutlich. Auch diese biochemische Modulation könnte durch ein regulatorisches Protein vermittelt werden.

Inwieweit der Regulator, der unter Kontrollbedingungen die GgpS-Aktivität hemmt, mit jenem Regulator übereinstimmt, der in salzakklimatisierten Zellen eine Überproduktion an GG verhindert, ist unklar. Falls Identität vorliegt, muss der Regulator auf zwei unterschiedliche Sensorsysteme reagieren können. Während der letztbeschriebene inhibitorische Regulator durch die Wahrnehmung einer Differenz der Wasserpotentiale von Medium und Cytoplasma und vom Osmolytstatus der Zelle beeinflusst wird, kann der erstbeschriebene alleine durch die vorhandene NaCl-Konzentration im Cytoplasma moduliert werden, da diese Situation *in vitro* bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen nachgestellt werden kann (Abb. 1.3 und Abb. 3.7).

Um den postulierten Protein-abhängigen Regulator zu identifizieren, wurde eine Transposonmutagenese durchgeführt. Dafür konnte auf eine relativ vollständige Genbank zurückgegriffen werden. Diese Genbank wurde bereits für die Sequenzierung des Genoms von *Synechocystis* verwendet und deckte einen sehr großen Teil des gesamten Genoms ab (Kaneko *et al.*, 1996).

Durch Transposonmutagenese konnten mindestens drei verschiedene Mutanten nach der Selektion unter nicht-induzierenden Bedingungen generiert werden

Da sowohl unter Kontrollbedingungen als auch in salzakklimatisierten Zellen die GG-Synthese gehemmt wird, wurden nach Mutation des postulierten inhibitorischen Regulators GG überproduzierende Mutanten erwartet. Für die Identifizierung GG überproduzierender Mutanten wurde eine Selektionsstrategie angewendet, deren Effizienz zuvor durch die GG überproduzierende Mutante *ggpS⁺* getestet werden konnte. Die GG-Synthese wird in Wildtypzellen nach einem osmotischen Schock mit nicht-ionischen Substanzen wie z.B. Maltose nicht induziert (Abb. 3.8; Marin *et al.*, 2006). Die geringe GG-Menge, die im Wildtyp bei moderaten Maltosekonzentrationen detektiert werden konnte, kommt wahrscheinlich durch eine sehr geringe Induktion der GG-Synthese durch eine Erhöhung der NaCl-Konzentration des Cytoplasmas zustande, da sich nach Zugabe von Maltose das Volumen der Zelle zunächst verkleinert (Marin *et al.*, 2006). Da in Zellen der *ggpS⁺*-Mutante erhöhte GG-Gehalte unter nicht-induzierenden Bedingungen detektiert werden konnten, sind die Zellen der Mutante in der Lage, höhere externe Maltosekonzentrationen zu tolerieren als Wildtypzellen (Abb. 3.8). Während des darauf basierenden Screeningverfahrens konnte die Anreicherung GG überproduzierender Mutanten in Maltose-haltigem Medium durch gaschromatographische Bestimmung des internen GG-Gehaltes dokumentiert werden (Abb. 3.9B). Nach Vereinzelung der Kolonien konnten einige Mutanten auch unter Kontrollbedingungen und nicht nur bei erhöhten Maltosekonzentrationen als GG überproduzierend charakterisiert werden (Tab. 3.1). Die Selektionsstrategie war somit erfolgreich.

Mit dieser Selektionsstrategie sollten zum einen Mutanten isoliert werden, die GG überproduzieren können, da der postulierte inhibitorische Regulator inaktiv ist. Weiterhin wurde erwartet, dass Mutanten angereichert würden, deren GG-Überproduktion wie bei der *ggpS⁺*-Mutante auf einen erhöhten GgpS-Proteingehalt zurückgeführt werden kann. Ein erhöhter GgpS-Proteingehalt könnte die Folge einer gesteigerten *ggpS*-Expression sein oder auf eine größere Stabilität des GgpS-Proteins zurückgeführt werden. Tatsächlich konnten

durch genetische Charakterisierung der GG überproduzierenden Kolonien mindestens drei verschiedene Genotypen identifiziert werden. Die Identifizierung weiterer Insertionsmutanten gelang bisher nicht, da möglicherweise die Schnittstellen des Restriktionsenzym *HhaI* um das integrierte Transprimerelement im Genom der Mutanten zu weit auseinanderliegen, so dass kein PCR-Produkt entstehen konnte.

Bei den drei verschiedenen Genotypen war das Transprimerelement in die Leserahmen *sll0445*, *slr0230* bzw. *slr0228* integriert. Die Funktion von *sll0445* ist unbekannt. Das Protein, das von diesem Leserahmen abgeleitet werden kann, weist keine Ähnlichkeiten zu einem bereits bekannten Protein auf und besitzt wahrscheinlich keine Transmembranhelix. Nur die Cyanobakterien *Gloeobacter violaceus* PCC7421 und *Trichodesmium erythraeum* IMS101 besitzen jeweils ein sehr ähnliches hypothetisches Protein. Bei anderen GG synthetisierenden Cyanobakterien, wie *Synechococcus* WH8102 oder *Prochlorococcus marinus* konnte kein ähnliches Protein durch Blast-Analysen gefunden werden. Jedoch sollte das Vorkommen des Inhibitors eher bei anderen GG produzierenden Cyanobakterien zu vermuten sein. Das Gen *slr0230* kodiert eine putative Transposase. Da unwahrscheinlich ist, dass eine Transposase an der Regulation der GG-Synthese beteiligt ist, wurden Mutanten mit diesem Genotyp nicht weiter berücksichtigt. Der Leserahmen *slr0228* kodiert eine FtsH-Protease. FtsH-Proteasen können die Stabilität sowohl von Membranproteinen als auch von cytoplasmatischen Proteinen kontrollieren (Langer, 2000; Ito und Akiyama, 2005). Sie kommen in allen Cyanobakterien vor, somit auch in allen GG synthetisierenden Cyanobakterien. Als Besonderheit kommen in Cyanobakterien vier FtsH-Proteasen vor (Slr1390, Slr0228, Slr1604 und Sll1463), während alle bisher untersuchten heterotrophen Bakterien nur eine FtsH-Protease besitzen. Das Vorhandensein von mehreren FtsH-Proteasen korreliert mit dem Vorkommen einer oxygenen Photosynthese. Auch in den Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana* kommen neun FtsH-Proteasen vor, während drei FtsH-Proteasen in den Mitochondrien dieses Organismus lokalisiert sind (Sokolenko *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2005). In *Synechocystis* stellen FtsH-Proteasen die einzigen membrangebundenen, energieabhängigen Proteasen dar (Sokolenko *et al.*, 2002). Die FtsH-Proteasen Slr1390 und Slr1604 sind essentiell (Mann *et al.*, 2000). Eine Mutation von Sll1463 zeigte keinen offensichtlichen Phänotyp, wohingegen die Mutation der FtsH-Protease Slr0228 eine veränderte Pigmentzusammensetzung bewirkte, da die Mutante in der Biogenese des Photosystems I betroffen war (Mann *et al.*, 2000). Weiterhin wird die Beteiligung von Slr0228 an der Degradation des D1-Proteins des Photosystems II (PSII) diskutiert, das als primäres Angriffsziel durch Starklicht geschädigt wird und aus dem PSII-Komplex im Rahmen des

PSII-Reparaturzyklus entfernt werden muss (Silva *et al.*, 2003; Nixon *et al.*, 2005). Neben dem selektiven Abbau des geschädigten D1-Proteins ist die FtsH-Protease Slr0228 aber auch für den Abbau nicht-assemblierter PSII-Untereinheiten bzw. nicht-funktionaler, nur teilweise assemblierter PSII-Komplexe verantwortlich (Komenda *et al.*, 2005). Cytoplasmatische Substrate einer FtsH-Protease aus *Synechocystis* wurden bis jetzt noch nicht beschrieben.

Die Mutanten M1/1 und M3/7 zeigen bei nicht-induzierenden Bedingungen einen erhöhten GG-Gehalt, der bei der Mutante M3/7 auf einen erhöhten GgpS-Proteingehalt zurückzuführen ist

Die Mutante M1/1 mit einer Inaktivierung des Gens *sll0445* wies im Vergleich zum Wildtyp einen leicht erhöhten GG-Gehalt sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach Akklimatisierung an erhöhte Maltosekonzentrationen auf. Dieser Effekt war bei der Mutante M3/7, bei der das FtsH-kodierende Gen *slr0228* mutiert war, unter Kontrollbedingungen und bei erhöhten Maltosekonzentrationen stärker ausgeprägt (Abb. 3.11A). Der erhöhte GG-Gehalt korrelierte in der Mutante M3/7 mit einem erhöhten GgpS-Proteingehalt unter diesen Bedingungen (Abb. 3.11B). Wie die Mutante *ggs^r* besaß die FtsH-Mutante M3/7 bei hohen Maltosekonzentrationen im Medium wahrscheinlich einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp, weil das GgpS-Protein in einer größeren Menge vorlag, was wiederum einen erhöhten GG-Gehalt bedingte. Die direkte Beteiligung der Proteine Sll0445 und Slr0228 an der Regulation der GG-Synthese zumindest unter Kontrollbedingungen konnte ausgeschlossen werden, da das GgpS-Protein auch in Abwesenheit der Proteine im Zellextrakt ohne Zugabe von NaCl im Enzymtest hemmbar war (Abb. 3.10).

Zusätzlich zeigten viele Mutanten nach Akklimatisierung an hohe Maltosekonzentrationen einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp, obwohl sie keinen erhöhten GG-Gehalt bei diesen Bedingungen aufwiesen. Denkbar wäre, dass diese Mutanten einen osmotischen Ausgleich durch eine veränderte Regulation der Ionenhomöostase oder des Wasserhaushalts realisieren können.

Wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, ist der erhöhte GgpS-Proteingehalt in einer FtsH-Mutante auf eine größere Stabilität des GgpS-Proteins zurückzuführen. Es konnte aber keine Mutante isoliert werden, die in der Regulation der *ggs*-Genexpression oder im postulierten inhibitorischen Regulator betroffen ist. Dies könnte auf die Unvollständigkeit der Genbank zurückgeführt werden. Allerdings gibt es bis jetzt keinen Hinweis darauf, dass die Regulation

der *ggsS*-Expression überhaupt durch ein Protein vermittelt wird. Weiterhin könnte auch die Regulation der GgpS-Aktivität auf einem Protein-unabhängigen Mechanismus beruhen.

4.4 Die Proteindegradation beeinflusst die GG-Synthese

Durch *in vitro*-Transposonmutagenese und anschließende Selektion wurde eine Mutante mit einer Inaktivierung des Leserahmens *slr0228* identifiziert. Daher wurde eine mögliche Beteiligung der FtsH-Protease Slr0228 an der Osmoregulation in *Synechocystis* untersucht. Sekundäre Effekte der Integration des Transposons in das Gen *slr0228* konnten ausgeschlossen werden, da die spezifische Mutante *slr0228::Km^R* den gleichen Phänotyp zeigte wie die Transposonmutante M3/7.

Die FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* von *Synechocystis* zeigt einen salzsensitiven Phänotyp, der auch für FtsH-Mutanten anderer Bakterien beschrieben wurde

Für *Synechocystis* konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass Zellen nach Inaktivierung des FtsH-kodierenden Leserahmens *slr0228* bei erhöhten NaCl-Konzentrationen einen Wachstumsdefekt aufweisen (Abb. 3.12). Das war zunächst überraschend, da die FtsH-Mutante M3/7 bei hohen Maltosekonzentrationen einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp besaß (Abschnitt 3.3), und belegte, dass ein osmotischer Schock mit der ionischen Substanz NaCl andere Anforderungen an die Zelle stellt als ein osmotischer Schock mit der nicht-ionischen Substanz Maltose wie auch bei Marin *et al.* (2006) postuliert.

Bei der Toleranz von Bakterien gegenüber verschiedenen Stresssituationen wird der AAA-Protease FtsH eine bedeutende Rolle zugeschrieben. Mutanten von *L. lactis*, *B. subtilis*, *C. crescentus* und *S. aureus*, die keine funktionale FtsH-Protease synthetisieren können, wurden unter anderem als salzsensitiv beschrieben (Nilsson *et al.*, 1994, Deuerling *et al.*, 1997, Fischer *et al.*, 2002, Lithgow *et al.*, 2003). Die Beteiligung der FtsH-Protease bei der Vermittlung der Salztoleranz von *Synechocystis* wurde allerdings noch nicht diskutiert. In verschiedenen Bakterien wie *B. subtilis* und *Oenococcus oeni* konnte zudem eine Induktion der *ftsH*-Genexpression nach einem osmotischen Schock mit NaCl beobachtet werden (Deuerling *et al.*, 1995, Bourdineaud *et al.*, 2003), was die Bedeutung von FtsH bei der Ausbildung der Salztoleranz unterstreicht. Durch DNA-Chip-Experimente konnte auch für den ebenfalls FtsH-kodierenden Leserahmen *slr1604* aus *Synechocystis* eine Induktion der

Expression nach hyperosmotischem Schock mit NaCl dokumentiert werden (Kanesaki *et al.*, 2002; Murata und Suzuki, 2006), nicht aber für den Leserahmen *slr0228*.

Der salzsensitive Phänotyp der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* kann auf einen GG-Mangel zurückgeführt werden

Allerdings ist für keinen Organismus bekannt, was die FtsH-Protease zur Vermittlung der Stresstoleranz beiträgt. Da FtsH-Mutanten meist einen pleiotropen Phänotyp mit einer allgemeinen Stresssensitivität aufweisen, wird als molekulare Basis für die Hypersensitivität gegenüber Stress eine generelle Funktion bei der Qualitätskontrolle von Proteinen vermutet, wobei die Abwesenheit der proteolytischen Aktivität von FtsH zur Akkumulation denaturierter Polypeptide durch Einwirken eines Stresses und zu einem Wachstumsdefekt führt (Fischer *et al.*, 2002). Eine Beteiligung der FtsH-Protease an stressspezifischen Regulationsmechanismen, die für die Vermittlung der spezifischen Stresstoleranz wichtig sind, konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Die Beobachtung, dass die Überproduktion von FtsH eine erhöhte Salztoleranz in *C. crescentus* hervorruft, wurde als Beleg für die generelle Rolle von FtsH bei der Vermittlung der Stresstoleranz interpretiert. Selbst bei der gut untersuchten Hitzeschockantwort in *E. coli* ist das regulatorische Element σ^{32} (RpoH) zwar Substrat für die FtsH-Protease (Herman *et al.*, 1995), der temperatursensitive Phänotyp einer FtsH-Mutante ist aber wahrscheinlich nicht auf die Akkumulation des Sigmafaktors σ^{32} sondern möglicherweise auf die Akkumulation denaturierter Proteine zurückzuführen. Die Erkennung von σ^{32} durch FtsH erfolgt nur unter Kontrollbedingungen bei gleichzeitiger Interaktion mit dem DnaK-DnaJ-GrpE-Chaperonsystem (Tomoyasu *et al.*, 1998). Die Degradation von σ^{32} stellt somit nur den Abbau von nicht benötigtem Protein unter Kontrollbedingungen dar und beeinflusst nicht die Aktivität von σ^{32} nach einem Hitzeschock. Die Hitzeschockantwort kann somit auch in Abwesenheit von FtsH ablaufen. FtsH ist bei diesem Beispiel nicht spezifisch am Regulationsmechanismus beteiligt, der nach dem Hitzeschock zur Ausbildung der Toleranz aktiviert wird. Auch bei der einzigen in *Synechocystis* bis jetzt näher charakterisierten Funktion von FtsH (*Slr0228*) kann keine Unterscheidung getroffen werden, ob der selektive Abbau von geschädigtem D1-Protein und/oder die Akkumulation anderer missgefalteter bzw. unassemblierter Membranproteine des PSII-Komplexes nach Einwirken hoher Lichtintensitäten (Komenda *et al.*, 2005) den Wachstumsdefekt der FtsH-Mutante auslöst. Eine spezifische Funktion übernimmt FtsH jedoch in *E. coli* beim Abbau der cytoplasmatischen Deacetylase LpxC, dem Schlüsselenzym der Lipid A-Synthese (Führer *et al.*, 2006). Die Akkumulation von LpxC bewirkt die

Überproduktion an Lipopolysacchariden auf Kosten der Synthese an Phospholipiden. Erst nach Stimulation der Phospholipidsynthese durch eine Supressormutation ist eine FtsH-Mutante von *E. coli* lebensfähig (Ogura *et al.* 1999). Die Letalität einer *ftsH*-Null-Mutante von *E. coli* kann somit ausschließlich auf die Akkumulation von LpxC zurückgeführt werden. Jedoch ist FtsH hier nicht an einem stressspezifischen Regulationsmechanismus beteiligt, da die *ftsH*-Null-Mutation in *E. coli* auch ohne Stresseinwirkung letal ist. Für *Synechocystis* sollte geklärt werden, ob die FtsH-Protease Slr0228 bei der Vermittlung der Salztoleranz eine generelle Rolle durch den Abbau missgefalteter Polypeptide, die durch einen osmotischen Schock mit ionischen Substanzen entstehen, spielt und/oder ob sie möglicherweise an spezifischen Regulationsmechanismen für die Ausbildung der Salzstresstoleranz wie der Kontrolle der Syntheserate der osmoprotektiven Substanz GG beteiligt ist.

Es konnte gezeigt werden, dass der salzsensitive Phänotyp der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* von *Synechocystis* durch Zugabe von GG vollständig aufgehoben werden kann ebenso wie für die *ggsS*-Mutante, die nicht in der Lage ist, GG zu synthetisieren. Durch Bestimmung des internen GG-Gehaltes in salzakklimatisierten Zellen der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* konnte ein Mangel an GG bestätigt werden (Abb. 3.15C). Somit ist die molekulare Grundlage für den salzsensitiven Phänotyp einer FtsH-Mutante in *Synechocystis* eine erniedrigte GG-Syntheserate. Die FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* ist daher möglicherweise nicht in der Lage, nach einem osmotischen Schock mit NaCl das Wasserpotential des Cytoplasmas durch Synthese der osmoprotektiven Substanz GG dem Wasserpotential des Mediums anzugleichen. Gleichzeitig hat der GG-Mangel wahrscheinlich einen negativen Einfluss auf die Protein- und Membranstabilität (Hincha und Hagemann, 2004).

Auch für *B. subtilis* wurde beschrieben, dass osmoprotektive Substanzen wie Prolin, Glycinbetain und Trehalose das Wachstum einer FtsH-Mutante nach Salzstress positiv beeinflussen (Deuerling *et al.*, 1995). Für *B. subtilis* wurde allerdings der veränderte Gehalt eines Transkriptionsfaktors als Auslöser für den salzsensitiven Phänotyp diskutiert (Deuerling *et al.*, 1995; Lysenko *et al.*, 1997). Ebenso wie für *Synechocystis* könnte jedoch der Mangel an osmoprotektiver Substanz die Hypersensitivität gegenüber Salzstress der FtsH-Mutante von *B. subtilis* bewirken.

FtsH2 (VAR2) aus *A. thaliana* zeigt eine hohe Ähnlichkeit zur FtsH-Protease Slr0228 aus *Synechocystis*. Für beide Proteasen ist die Beteiligung beim Abbau des D1-Proteins des PSII-Komplexes beschrieben worden (Lindhal *et al.*, 2000; Sakamoto *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003). Interessant wäre deshalb, ob FtsH2-Mutanten von *A. thaliana* ebenfalls wie Slr0228-Mutanten aus *Synechocystis* einen salzsensitiven Phänotyp aufweisen, was bis jetzt noch nicht

untersucht wurde.

Der GG-Mangel der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* von *Synechocystis* deutet auf eine Beteiligung der FtsH-Protease am stressspezifischen Regulationsmechanismus für die Synthese von GG nach einem Salzschock hin. Da der salzsensitive Phänotyp der FtsH-Mutante durch Zugabe von GG aufgehoben werden kann, ist der Wachstumsdefekt der FtsH-Mutante nach einem Salzschock wahrscheinlich ausschließlich auf den GG-Mangel zurückzuführen und nicht auf eine fehlende Qualitätskontrolle von Proteinen durch FtsH. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass FtsH nach einem Salzschock auch eine generelle Rolle bei der Qualitätskontrolle von Proteinen übernimmt. Die möglicherweise fehlende Qualitätskontrolle ist aber bei Abwesenheit der proteolytischen Aktivität von FtsH nicht der Auslöser der Salzsensitivität.

Die FtsH-Protease Slr0228 ist an der Qualitätskontrolle von Proteinen beteiligt

Mit Hilfe einer globalen Proteomanalyse der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* unter Kontrollbedingungen und nach Akklimation an erhöhte Salzkonzentrationen konnte die Bedeutung der Qualitätskontrolle von Proteinen durch FtsH anhand der Zahl der akkumulierten Proteine abgeschätzt werden. Dieser Ansatz bot zudem die Möglichkeit der Identifizierung cytoplasmatischer Substrate der FtsH-Protease Slr0228 von *Synechocystis*, denn diese sollten in Abwesenheit der proteolytischen Aktivität von FtsH (Slr0228) akkumulieren. Dabei konnte nicht unterschieden werden, ob Proteine akkumulieren, weil FtsH die Synthese des Proteins beeinflusst oder weil das Protein direkt Substrat der Protease ist. Zudem muss berücksichtigt werden, dass salzakklimatisierte Zellen der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* ein beeinträchtigtes Wachstum zeigten und Veränderungen im Proteinmuster möglicherweise auch auf diesen Effekt zurückgeführt werden können.

Auffällig war, dass in ungestressten Zellen der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* im Vergleich zum Wildtyp eine viel größere Anzahl von Proteinen akkumulierte als nach Akklimation an erhöhte Salzkonzentrationen (Tab. 3.2; Anhang). Die Akkumulation zahlreicher Proteine in Zellen bereits ohne Einwirkung des osmotischen Stresses hatte jedoch keinen Wachstumsdefekt zur Folge, da die Zellen der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* ein ähnliches Wachstumsverhalten zeigten wie Wildtypzellen (Abb. 3.12). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der Wachstumsdefekt wahrscheinlich nicht auf die Akkumulation vieler missgefalteter Proteine durch den Verlust einer generellen Qualitätskontrolle von FtsH zurückgeführt werden kann. Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass keine Aussage über

die Zahl akkumulierter Membranproteine in der Mutante gemacht werden kann. Außerdem kann nichts über den physiologischen Status der akkumulierten Proteine ausgesagt werden. Es akkumulieren zwar mehr Proteine unter Kontrollbedingungen, jedoch könnte diese Akkumulation nicht toxisch sein, weil sich die Proteine noch im nativen Zustand befinden. Nach Applikation des Salzstresses denaturieren viele Proteine, deren Akkumulation toxisch wirken könnte. Die Bestimmung der Aktivität einzelner akkumulierter Proteine in der FtsH-Mutante könnte Aufschluss darüber geben, ob inaktive Proteine vorliegen.

Um mögliche cytoplasmatische Substrate für die FtsH-Protease in *B. subtilis* zu identifizieren, wurde eine Proteomanalyse von Zellmeier *et al.* (2003) durchgeführt. Die Akkumulation keines der vier von ihnen beschriebenen Proteinen konnte auch in der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* von *Synechocystis* als akkumuliert detektiert werden. Entweder konnten die Proteine im Proteinmuster von *Synechocystis* nicht zugeordnet werden, weil diese Proteine nicht von Fulda *et al.* (2006) identifiziert worden waren, oder die Proteine wiesen keine Ähnlichkeiten zu Proteinen aus *Synechocystis* auf. Das Protein Slr0315, das Ähnlichkeiten zu YfmJ aus *B. subtilis* aufwies, konnte auf den Proteingelen zwar identifiziert werden, akkumulierte hingegen in der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* von *Synechocystis* nicht.

Es konnten jedoch Parallelen zu bereits beschriebenen cytoplasmatischen Substraten für die FtsH-Protease aus *E. coli* bzw. postulierten Substraten für die FtsH-Protease in *C. glutamicum* entdeckt werden. Es akkumulierte in der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* von *Synechocystis* die α -Untereinheiten des F₁-Segmentes der F₀F₁-ATPase (Tab. 3.2). Die α -Untereinheit des F₀-Segmentes der F₀F₁-ATPase (F_{0a}) wurde als Substrat von FtsH in *E. coli* beschrieben (Akiyama *et al.*, 1996a, b). Da nur lösliche Proteine mittels 2D-PAGE untersucht wurden, konnte nur die Akkumulation von Untereinheiten des F₁-Segments der ATP-Synthase beobachtet werden. Die Akkumulation des P₁₁-Proteins, das den Masterregulator der Signaltransduktion der N-Kontrolle in *Synechocystis* darstellt (Forchhammer, 2004), zeigte die Bedeutung dieses Ansatzes für die Identifizierung möglicher Substrate der FtsH-Protease, da das P₁₁-Protein aus *C. glutamicum* (GlnK) möglicherweise auch Substrat von FtsH ist (Strösser *et al.*, 2004). Eine Beteiligung von FtsH bei der N-Kontrolle wurde in *Synechocystis* jedoch noch nicht diskutiert. Die Akkumulation der großen Untereinheit der RubisCO sowie der Untereinheit des wasserspaltenden Komplexes Sll0427 wies auf die Beteiligung der FtsH-Protease Slr0228 an der Regulation der Photosynthese hin.

FtsH beeinflusst somit die Stabilität vieler Proteine und spielt eine generelle Rolle bei der Proteinqualitätskontrolle nach einem Salzschock. Die Akkumulation genereller Stressproteine

wie GroEL1, GroEL2 und GrpE zeigt die Beteiligung von FtsH bei der Proteinqualitätskontrolle, jedoch scheint diese Beteiligung kein essentieller Bestandteil für die Vermittlung der Salztoleranz in *Synechocystis* zu sein, da die molekulare Grundlage für den salzsensitiven Phänotyp der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* von *Synechocystis* eine verminderte GG-Konzentration ist.

Das GgpS-Protein stellt ein direktes cytoplasmatisches Substrat für die FtsH-Protease Slr0228 dar

Die wichtigste Beobachtung stellte die Akkumulation des GgpS-Proteins in der salzakklimatisierten FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* dar (Tab. 3.2). Diese konnte durch Western Blot-Analysen bestätigt werden (Abb. 3.15C). Die Expression des *ggsS*-Gens wird durch den alternativen Sigmafaktor σ^F verstärkt (Huckauf *et al.*, 2000; Marin *et al.*, 2002), so dass die Stabilisierung dieses Transkriptionsfaktors einen erhöhten GgpS-Proteingehalt zur Folge haben könnte. Ein erhöhter GgpS-Proteingehalt durch Veränderung im Gehalt eines Transkriptionsfaktors nach Inaktivierung von FtsH (Slr0228) konnte jedoch ausgeschlossen werden, da die Transkriptmenge des *ggsS*-Gens in der salzakklimatisierten FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* nicht verändert war (Abb. 3.15A). Somit war die Translation nach Mutation von *slr0228* verstärkt oder das GgpS-Protein ist direktes Substrat der FtsH-Protease Slr0228. Der Ausfall von Slr0228 könnte aber auch zur Überlastung anderer Proteasen führen, die eine GgpS-Akkumulation bedingt. Dann wäre das GgpS-Protein möglicherweise Substrat einer anderen Protease.

Um diesen Aspekt zu klären, wurde ein einfaches *in vitro*-System etabliert, das die Analyse des Abbaus des rekombinanten GgpS-Proteins erlaubte. Dabei konnte durch Zusatz der cytoplasmatischen Fraktion des Wildtyps oder invertierter Membranvesikel der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* kein Abbau des GgpS-Protein induziert werden (Abb. 3.17). Im Gegensatz dazu konnte der Abbau des rekombinanten GgpS-Protein durch Wildtyp-Membranvesikel in Anwesenheit von ATP im Testansatz dokumentiert werden. Daher ist für die Degradation eine energieabhängige, membrangebundene Protease verantwortlich. Im Genom von *Synechocystis* konnten nur vier Gene, unter anderem *slr0228*, beschrieben werden, die eine energieabhängige, membrangebundene Protease kodieren (Sokolenko *et al.*, 2002). Alle vier Leserahmen kodieren FtsH-homologe Proteasen. Es wird vermutet, dass die FtsH-Protease Slr0228 in der Thylakoidmembran von *Synechocystis* lokalisiert ist (Komenda *et al.*, 2005). Abbauprodukte von GgpS waren nach Western Blot-Analyse nicht sichtbar, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass FtsH-Proteasen prozessiv und die

Spaltprodukte kleiner als 3 kDa sind (Ito und Akiyama, 2005). Zumindest *in vitro* ist GgpS somit ein direktes Substrat der FtsH-Protease Slr0228.

Im Testansatz konnte ein nur langsamer Abbau des GgpS-Proteins beobachtet werden. Wahrscheinlich könnte der Effekt durch Überexpression von *slr0288* verstärkt werden. Der zeitliche Rahmen des GgpS-Abbaus korreliert aber mit der benötigten Zeit für den Abbau der α -Untereinheit des F_0 -Segments der F_0F_1 -ATPase bzw. des Membranproteins YccA aus *E. coli* durch invertierte Membranvesikel im *in vitro*-Test (Akiyama und Ito, 2003).

Dass die Funktion von Slr0228 nicht von den anderen drei FtsH-Proteasen übernommen werden kann, konnte zwar im *in vitro*-Test gezeigt werden, kann aber *in vivo* nicht ausgeschlossen werden. Beim Abbau des D1-Proteins des PSII-Komplexes scheinen neben Slr0228 auch andere FtsH-Proteasen beteiligt zu sein, denn diese konnten ebenfalls mit His-getagtem CP47 bei einer Affinitätschromatographie koeluiert (Silva *et al.*, 2003) bzw. die FtsH-Proteasen Slr0228 und Slr1604 im PSII-Komplex durch Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Kashino *et al.*, 2002). Es ist zudem unklar, ob auch Heterooligomere von FtsH existieren können, ähnlich wie für die FtsH-Protease VAR2 (FtsH2) in *A. thaliana* diskutiert. Diese kommt möglicherweise sowohl im Homo- als auch im Heterokomplex mit VAR1 (FtsH1) vor (Sakamoto *et al.*, 2003). Weiterhin konnte in *A. thaliana* eine Überproduktion von FtsH8 eine Mutation von *ftsH2* (*var2*) komplementieren (Yu *et al.*, 2005). Über mögliche Heterokomplexe ist in *Synechocystis* nichts bekannt. Möglicherweise wäre die Akkumulation des GgpS-Proteins *in vivo* nach Inaktivierung der ebenfalls nicht essentiellen FtsH-Protease Sll1463 deutlicher ausgeprägt.

Weiterhin muss bei dem verwendeten *in vitro*-Test berücksichtigt werden, dass der N-terminale Strep-tag des rekombinanten GgpS-Proteins die Erkennung von FtsH (Slr0228) beeinflussen könnte. So kann ein SsrA-tag am C-Terminus von λ cI dieses Protein zum Substrat von FtsH aus *E. coli* machen (Herman *et al.*, 1998). Im allgemeinen wird angenommen, dass FtsH hydrophobe Aminosäurereste präferiert (Ito und Akiyama, 2005). Der Strep-tag besitzt jedoch keine unpolaren Aminosäureresten und zudem konnte gezeigt werden, dass dieser Tag den Abbau des LpxC-Proteins *in vivo* nicht beeinflusst (Führer *et al.*, 2006). Wie in Abbildung 4.1 gezeigt, weist der C-Terminus des GgpS-Proteins Ähnlichkeiten zu dem unpolaren SsrA-tag und dem C-Terminus des als Substrat von FtsH beschriebenen Proteins LpxC aus *E. coli* auf (Führer *et al.*, 2006). Der C-Terminus von λ cII wurde ebenfalls als wichtig bei der Erkennung des Proteins durch FtsH in *E. coli* beschrieben (Kobiler *et al.*, 2002), wobei dieses Protein nur geringe Ähnlichkeiten zu dem C-Terminus von GgpS und LpxC bzw. zum SsrA-tag aufweist. Unterstrichene Aminosäuren in Abbildung 4.1 sind für die

Erkennung essentiell, da z.B. ein Austausch durch andere Aminosäuren die Stabilisierung des Proteins zur Folge hatte (Kobiler *et al.*, 2002; Führer *et al.*, 2006).

```

SsrA :                               -AANDENYALAA-COOH
LpxC :   -AWEYVTFQDDAELPLAFKAPSAVLA-COOH
GgpS :   -AAIKRYDVQQWANHLLREAYADVVLGEPPQM-COOH
λ cII :  -QVAAILTNKKRPAATERSEQIQMEF-COOH

```

Abb. 4.1: C-terminale Aminosäuresequenzen von putativen FtsH-Substraten
 Dargestellt sind der SsrA-tag und 25 bzw. 31 C-terminale Aminosäuren von LpxC, λ cII bzw. GgpS. Unpolare Aminosäuren sind fett dargestellt, unterstrichene Aminosäuren geben bereits als essentiell identifizierte Aminosäuren an.

Auffällig dabei war, dass immer die C-terminale Aminosäure essentiell war. Ob dies auch für die unpolare Aminosäure Methionin im GgpS-Protein gilt, könnte durch Punktmutation des für das Methionin kodierenden Basentriplets analysiert werden. Möglich ist aber auch, dass der N-Terminus oder eine interne Region des GgpS-Proteins bei einer Erkennung durch FtsH eine wichtige Rolle spielt, wie für den Sigmafaktor σ^{32} oder auch verschiedene Membranproteine aus *E. coli* beschrieben (Tomoyasu *et al.*, 1998; Shotland *et al.*, 2000; Chiba *et al.*, 2002). Es wird zudem vermutet, dass das Substrat für FtsH eine thermodynamische Instabilität aufweisen muss, da FtsH im Gegensatz zu anderen ATP-abhängigen Proteasen nur eine geringe Fähigkeit besitzt, Proteine zu entfalten (Herman *et al.*, 2003). Eine präzise Konsensussequenz für die Erkennung durch FtsH konnte bis jetzt nicht beschrieben werden, wodurch die Vorhersage von putativen Substraten durch *in silico*-Analysen schwierig ist.

Beim Sequenzvergleich der C-Termini von putativen Substraten der FtsH-Protease Slr0228 aus *Synechocystis*, die mittels 2D-PAGE gefunden werden konnten (Tab. 3.2), war auffällig, dass sie ebenfalls wie das GgpS-Protein einen hohen Anteil an unpolaren Aminosäuren besitzen. Während 47 % der putativen FtsH-Substrate in den 30 C-terminalen Aminosäuren vier unpolare Aminosäuren in Folge, entweder Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin oder Methionin, aufwiesen, konnte diese Sequenz nur in 21 % aller Proteine aus *Synechocystis* nachgewiesen werden.

Eine *in vivo*-Degradation von GgpS zu zeigen, wäre nur schwer möglich, weil die Halbwertszeit von GgpS in salzakklimatisierten Zellen nach Zugabe des die Proteinbiosynthese hemmenden Antibiotikums Lincomycin 24 h beträgt, während das GgpS-

Protein in Zellen, die unter Kontrollbedingungen kultiviert wurden, dauerhaft stabil war (Marin *et al.*, 2002). Unter Kontrollbedingungen findet der Abbau von GgpS-Protein folglich im nicht-messbaren Maße statt, was physiologisch Sinn macht, denn die Zelle benötigt für einen plötzlich eintretenden osmotischen Schock bereits vorliegendes aktivierbares GgpS-Protein. Jedoch kann bei einer so langen Halbwertszeit des GgpS-Proteins in salzakklimatisierten Wildtypzellen kein Vergleich zu einer noch längeren Halbwertszeit des GgpS-Proteins in salzakklimatisierten Zellen der FtsH-Mutante gezogen werden, da die Zellen bei einer dauerhaften durch Lincomycin gehemmten Proteinbiosynthese sterben würden. Das GgpS-Protein unterscheidet sich somit hinsichtlich des Protein-Turnovers von anderen FtsH-Substraten, deren Halbwertszeit meist nur ein paar Minuten beträgt. Man könnte jedoch das *ggpS*-Gen stromabwärts eines induzierbaren Promotors klonieren. Nach Entfernen des Induktors könnte dann die Abnahme des GgpS-Proteins in Wildtypzellen mit der von Zellen der FtsH-Mutante über einen längeren Zeitraum betrachtet werden, ohne eine gleichzeitige Letalität durch ein Antibiotikum zu bewirken.

Weiterhin wäre die Koelution von FtsH und Strep-GgpS nach Affinitätsaufreinigung ein weiterer Hinweis darauf, dass FtsH möglicherweise auch *in vivo* mit GgpS direkt interagiert, eine notwendige Voraussetzung für den Abbau von GgpS durch FtsH. Dabei könnte auch mit Hilfe eines Antikörpers, der prinzipiell alle vier FtsH-Proteasen erkennen kann (Silva *et al.*, 2003), überprüft werden, ob neben Slr0228 auch andere FtsH-Proteasen mit GgpS interagieren, wenn der Proteinextrakt der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* nach Bindung von Strep-GgpS auf eine *Strep*-Tactin-Matrix gegeben wird.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass im Rahmen dieser Arbeit wahrscheinlich das erste lösliche Protein als Substrat für FtsH in *Synechocystis* beschrieben werden konnte, da in Abwesenheit der proteolytischen Aktivität der FtsH-Protease Slr0228 der GgpS-Proteingehalt in salzakklimatisierten Zellen erhöht war und das GgpS-Protein Substrat von FtsH (Slr0228) im *in vitro*-Test ist.

Die Stabilität des GgpS-Proteins hängt vom Aktivitätsstatus des Proteins ab, wobei primär defektes GgpS-Protein als Substrat für die FtsH-Protease Slr0228 dient

Anders als bei der salzakklimatisierten, GgpS akkumulierenden *ggpS⁺*-Mutante ist die salzakklimatisierte, ebenfalls GgpS akkumulierende FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* nicht in der Lage, den gleichen GG-Gehalt wie der salzakklimatisierte Wildtyp zu synthetisieren (Abb. 3.15). Das GgpS-Protein kann deswegen in der FtsH-Mutante nicht in dem gleichen

Aktivitätsstatus vorliegen wie in der *ggsS*⁺-Mutante. Für die FtsH-Mutante *slr0228::Km*^R konnte die Akkumulation von inaktivem GgpS-Protein gezeigt werden. Im Enzymtest war das GgpS-Protein aus Zellen der Mutante nicht im gleichen Maße durch Zusatz von NaCl aktivierbar wie das GgpS-Protein aus Wildtypzellen (Abb. 3.16). Daher akkumuliert offenbar defektes GgpS-Protein, das unter *in vivo*-Bedingungen von FtsH abgebaut wird. Durch die Bestimmung der GgpS-Aktivität im *in vitro*-Experiment konnte zudem eine mögliche Substratlimitierung in salzakklimatisierten Zellen der FtsH-Mutante ausgeschlossen werden. Diese Substratlimitierung könnte aus der beschriebenen beeinträchtigten Photosynthese in Abwesenheit von FtsH (Slr0228) resultieren (Mann *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2003).

Da außerdem ein Abbau des GgpS-Proteins nur in salzakklimatisierten Zellen beobachtet werden konnte (Marin *et al.*, 2002), hängt die Stabilität des GgpS-Proteins offenbar vom Aktivitätsstatus des Proteins ab, wobei drei Zustände unterschieden werden müssen. Das unter Kontrollbedingungen vorliegende GgpS-Protein ist zwar inaktiv, aber aktivierbar. Es ist wahrscheinlich nicht Substrat der FtsH-Protease Slr0228, da nur eine sehr geringe Akkumulation des GgpS-Proteins in Abwesenheit von FtsH (Slr0228) dokumentiert werden konnte und nach Zugabe von Lincomycin das GgpS-Protein in nicht gestressten Wildtypzellen stabil ist. Nach einem osmotischen Schock mit ionischen Substanzen wird das GgpS-Protein in einen aktiven Status versetzt (Abschnitt 1.1.2). Wahrscheinlich ist auch diese Form der GgpS kein Substrat für FtsH (Slr0228), da das GgpS-Protein in der FtsH-Mutante defekt akkumulierte. Im Laufe des Einwirkens des osmotischen Stresses mit ionischen Substanzen muss es deshalb zu einer Schädigung des GgpS-Proteins kommen. Das korreliert mit der Beobachtung, dass die GG-Synthese in der FtsH-Mutante *slr0228::Km*^R unmittelbar nach einem osmotischen Schock zunächst wie im Wildtyp induziert werden kann und der GG-Gehalt erst acht Stunden nach Salzzugabe erniedrigt war (Abb. 3.15C). Warum das GgpS-Protein bei anhaltender Aktivität während der Akklimatisierung geschädigt wird, ist unklar. Möglicherweise führt die Aktivität des GgpS-Proteins verbunden mit der hohen Ionenkonzentration im Cytoplasma, die auch andere Proteine beeinträchtigt, zu einer irreversiblen Schädigung. Veränderungen des GgpS-Proteins beispielsweise durch biochemische Modifikation konnten in 2D-Gelen nicht beobachtet werden.

Da das GgpS-Protein in drei verschiedenen Zuständen vorliegen kann und wahrscheinlich nur das defekte GgpS-Protein Substrat der FtsH-Protease Slr0228 ist, wird verständlich, warum es nicht möglich ist, eine *in vivo*-Degradation von GgpS in Wildtypzellen zu zeigen. Mit Hilfe der Western Blot-Analyse kann nicht zwischen defektem, aktivierbarem und aktivem Protein unterschieden werden.

Der erniedrigte GG-Gehalt in der salzakklimatisierten FtsH-Mutante kann somit auf die Akkumulation von inaktivem GgpS-Protein zurückgeführt werden. Die molekulare Grundlage des salzsensitiven Phänotyps dieser Mutante konnte dadurch vollständig aufgeklärt werden. Die FtsH-Protease Slr0228 ist damit direkt am Regulationsmechanismus der GG-Synthese in akklimatisierten Zellen beteiligt.

Ein Modell für die Beteiligung der FtsH-Aktivität an der Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen von *Synechocystis*

Die Frage, die sich aus diesen Experimenten stellte, war, warum der Abbau von defektem GgpS-Protein in salzakklimatisierten Zellen notwendig ist, um einen bestimmten GG-Gehalt aufrechtzuerhalten. In Abbildung 4.2 wird ein Modell vorgeschlagen, das eine mögliche Beteiligung der FtsH-Protease Slr0228 an der Regulation der GgpS-Aktivität in salzakklimatisierten Zellen von *Synechocystis* beschreibt.

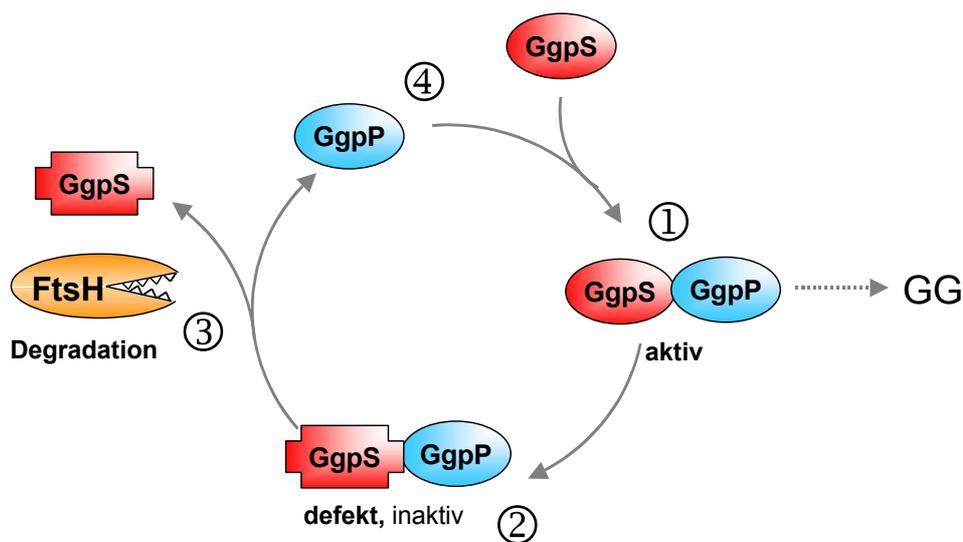


Abb. 4.2: Hypothetisches Modell zur Beteiligung der FtsH-Protease Slr0228 an der Regulation der GgpS-Aktivität in salzakklimatisierten Zellen von *Synechocystis*

Nach einem osmotischen Schock mit NaCl wird die GG-Synthese induziert, GgpS und GgpP formen einen aktiven Komplex (1). Durch Einwirken des osmotischen Stresses wird das GgpS-Protein im Komplex inaktiviert (2). Die Degradation von GgpS durch FtsH ist notwendig (3), damit GgpP wieder für ein neu synthetisiertes, aktivierbares GgpS-Protein zur Verfügung steht (4).

Es konnte auch für die Beteiligung von FtsH am PSII-Reparaturzyklus in *Synechocystis* beschrieben werden, dass trotz erhöhtem D1-Proteingehalt die Aktivität des PSII abnimmt (Silva *et al.*, 2003). Auch in diesem Fall ist der Abbau des defekten Proteins notwendig, um die Aktivität von neu synthetisiertem Protein zu ermöglichen. Dieses macht Sinn, wenn das Protein, wie im Falle des D1-Proteins, in einem Komplex aktiv ist, aus dem es durch die FtsH-Protease entfernt werden kann (Nixon *et al.*, 2005). Durch einen Yeast-Two-Hybrid-Ansatz konnte eine mögliche Interaktion von GgpS mit dem zweiten Enzym der GG-Synthese, dem GgpP-Protein, nachgewiesen werden (Huckauf, 2003). Wenn im Verlauf des Anpassungsprozesses an erhöhte Salzkonzentrationen das GgpS-Protein geschädigt wird, könnte FtsH (Slr0228) notwendig sein, GgpS aus dem Komplex zu entfernen. Dadurch wird GgpP für die Interaktion mit einem neu synthetisierten, nativen GgpS-Protein frei. Findet keine Entfernung von GgpS aus diesem Komplex statt, würde im Laufe des Einwirkens des osmotischen Stresses immer mehr GgpP-Protein durch inaktives GgpS-Protein besetzt sein, was eine Abnahme der GG-Syntheserate zur Folge hätte. Dieses Modell könnte durch die Bestimmung des GGP- und des GgpP-Proteingehaltes überprüft werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Proteinqualitätskontrolle an der Osmoregulation direkt beteiligt ist. Die molekulare Basis für die Salzsensitivität einer FtsH-Mutante in *Synechocystis* konnte eindeutig auf eine erniedrigte GG-Akkumulation zurückgeführt werden, weil die Zugabe von GG den Wachstumsdefekt der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* vollständig aufheben konnte. Die erniedrigte GG-Syntheserate ist die Folge einer Akkumulation von inaktivem GgpS-Protein. Das GgpS-Protein repräsentiert damit das erste cytoplasmatische Substrat einer FtsH-Protease aus *Synechocystis*. Die FtsH-Protease Slr0228 ist somit am spezifischen Regulationsmechanismus der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen durch den Abbau defekten GgpS-Proteins beteiligt. Mittels 2D-PAGE konnten weitere putative FtsH-Substrate nachgewiesen werden.

4.5 Der GG-Gehalt moduliert salzabhängig die Aktivität des GgpS-Proteins

In Abschnitt 3.2 konnte gezeigt werden, dass der Osmolytstatus der Zelle entscheidend für die Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen von *Synechocystis* ist. Es ist jedoch unbekannt, wie die Information über den Osmolytstatus der Zelle an das GgpS-Protein

vermittelt wird. Da eine Beteiligung eines Protein-abhängigen Mechanismus an der Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen durch verschiedene Ansätze nicht bestätigt werden konnte, wurde der Einfluss Protein-unabhängiger Komponenten auf die GG-Synthese im *in vitro*-Enzymtest untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass das rekombinante GgpS-Protein direkt durch erhöhte Konzentrationen verschiedener osmoprotektiver Substanzen wie GG, Glycinbetain oder Trehalose im Enzymtest gehemmt werden kann, nicht aber durch NaCl oder Saccharose (Abb. 3.18). Das GgpS-Protein könnte folglich in der Lage sein, den Osmolytstatus der Zelle direkt ohne die Beteiligung weiterer Komponenten wahrzunehmen.

Der biochemische Mechanismus der Hemmung der GgpS-Aktivität ist unklar. Da die hemmenden Substanzen eine ganz unterschiedliche chemische Struktur aufweisen, ist die Bindung eines Osmolyts an das GgpS-Protein zwar möglich, jedoch muss diese relativ unspezifisch sein. Die Bindung eines Osmolyts an das GgpS-Protein könnte durch spektroskopische Methoden wie die Messung der Tryptophanfluoreszenz analysiert werden, da die Bindung eines Liganden die Konformation des GgpS-Proteins verändern sollte. In ersten Experimenten konnte eine Signalverstärkung der Tryptophanfluoreszenz nach Zugabe von Trehalose dokumentiert werden (Gaffry, mündliche Mitteilung), was auf eine mögliche Konformationsänderung des GgpS-Proteins hindeutet. Möglicherweise könnte auch die Plasmonresonanz genutzt werden, bei der die Massenzunahme des immobilisierten rekombinanten GgpS-Proteins nach erfolgter Bindung des Osmolyts durch Änderung des Drehwinkels von reflektiertem Licht dokumentiert werden könnte. Voraussetzung ist allerdings die Bindung mehrerer Osmolytmoleküle, um die Nachweisgrenze zu überschreiten. Die hemmende Wirkung auf die GgpS-Aktivität kann nicht durch eine Erhöhung der Osmolalität hervorgerufen werden, da sonst auch NaCl oder Saccharose einen hemmenden Einfluss haben müssten. Außerdem ist die Hemmung nicht von einem ionischen Charakter des Osmolyts abhängig, denn NaCl als ionisches Osmolyt und Saccharose als nicht-ionisches Osmolyt haben beide keinen Einfluss auf die GgpS-Aktivität. Dass Saccharose die GgpS-Aktivität nicht hemmt ist physiologisch sinnvoll, da Saccharose wichtiges Intermediat der Photosynthese ist und deshalb die GG-Synthese nicht beeinflussen sollte.

Es ist zudem unklar, warum die Osmolyte die GgpS-Aktivität verschieden stark modulieren können. Möglicherweise modulieren die osmoprotektiven Substanzen die GgpS-Aktivität durch veränderte Wechselwirkungen des Proteins mit der Umgebung. Dies könnte ebenfalls durch Messung der Tryptophanfluoreszenz des GgpS-Proteins nach Zugabe eines hemmenden

Osmolyts festgestellt werden. Falls eine Oligomerisierung des GgpS-Proteins eine Rolle spielt, könnte diese durch „light scattering“-Experimente nachgewiesen werden.

Da auch *in vivo* eine Hemmung der GgpS-Aktivität durch die osmoprotektive Substanz Trehalose (Abschnitt 3.2) in salzakklimatisierten Zellen gezeigt werden konnte, können die *in vitro*-Daten wahrscheinlich auf die *in vivo*-Situation übertragen werden. Die bereits beschriebene Modulation der GgpS-Aktivität durch den hemmenden Einfluss der osmoprotektiven Substanz GG erklärt aber nicht die Einstellung des GG-Gehaltes in salzakklimatisierten Zellen von *Synechocystis* in Abhängigkeit von der externen Salzkonzentration. Daher muss die Hemmung der GgpS-Aktivität durch GG zusätzlich durch NaCl moduliert werden. Es konnte tatsächlich nachgewiesen werden, dass die Hemmung der GgpS-Aktivität durch GG durch steigende NaCl-Konzentrationen im Enzymtest aufgehoben werden konnte (Abb. 3.19). Da die interne Ionenkonzentration im Cytoplasma salzakklimatisierter Zellen abhängig von der externen Salzkonzentration ist (Blumwald *et al.*, 1983; Hagemann *et al.*, 1994), kann die GgpS-Aktivität durch die osmotischen Verhältnisse im Cytoplasma moduliert werden, wobei osmoprotektive Substanzen das GgpS-Protein hemmen und NaCl das GgpS-Protein aktiviert. Die unterschiedliche Wirkung von osmoprotektiven Substanzen und Salzen könnte den Mechanismus der „steady state“-Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten *Synechocystis*-Zellen darstellen. Dabei würde sich GgpS-Protein antagonistisch zu den meisten anderen Proteinen verhalten, die in ihrer Aktivität durch NaCl gehemmt und durch osmoprotektive Substanzen stabilisiert werden.

4.6 Hypothetisches Modell für den Mechanismus einer salzabhängigen GG-Syntheserate in akklimatisierten *Synechocystis*-Zellen

Der Regulation der GG-Synthese unmittelbar nach einem Salzschock steht die Regulation der GG-Synthese in vollständig akklimatisierten *Synechocystis*-Zellen gegenüber. Beide Prozesse können möglicherweise auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt werden. Die Induktion der GG-Synthese nach einem Salzschock bleibt allerdings weiterhin unklar. Ob regulatorische Proteine beteiligt sind, wie durch *in vitro*-Experimente angedeutet (Abschnitt 3.3), muss durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden. Das rekombinante GgpS-Protein ist im Enzymtest nicht direkt durch NaCl modulierbar, wird aber durch Zugabe von Zellextrakt gehemmt. Diese Hemmung kann durch NaCl aufgehoben werden. Neben der Möglichkeit der

Hemmung des GgpS-Proteins durch ein regulatorisches Protein ist durchaus denkbar, dass im Extrakt ein Protein-unabhängiger Faktor vorhanden ist, der das GgpS-Protein direkt nach seiner Synthese unter Kontrollbedingungen hemmt. Der Charakter der hemmenden Substanz im Extrakt von *Synechocystis* könnte beispielsweise durch die Behandlung mit hydrolysierenden Agenzien untersucht werden. Nach der Behandlung sollte das GgpS-Protein durch den Zellextrakt nicht mehr im Enzymtest hemmbar sein.

Für den Mechanismus der Regulation einer stabilen, salzabhängigen GG-Syntheserate in salzakklimatisierten *Synechocystis*-Zellen kann hingegen ein Modell formuliert werden. Da das GgpS-Protein im *in vitro*-Enzymtest durch osmoprotektive Substanzen wie GG hemmbar ist, aber steigende Konzentrationen an NaCl diese Hemmung aufheben, kann ein Protein-unabhängiger Mechanismus für die „steady state“-Regulation der GG-Synthese in akklimatisierten Zellen vorgeschlagen werden.

Nach einem hyperosmotischen Schock steigt die NaCl-Konzentration im Cytoplasma von *Synechocystis*-Zellen an und das GgpS-Protein wird durch einen weiterhin unbekanntem Mechanismus maximal aktiviert. Im Verlauf der Anpassung an die erhöhte Salzkonzentration sinkt zunächst die Na⁺-Konzentration durch den Austausch gegen K⁺-Ionen im Cytoplasma (Reed *et al.*, 1985a; Abschnitt 1.1.1). Parallel zur Akkumulation der osmoprotektiven Substanz GG sinken dann ebenfalls die K⁺- und Cl⁻-Konzentrationen im Cytoplasma. Nach dem vorgeschlagenen Modell wird die GgpS-Aktivität durch die Akkumulation von GG und das Ausschleusen der Ionen aus der Zelle gehemmt bis die zum Ausgleich der Wasserpotentiale notwendige interne GG-Menge erreicht ist. Dadurch würde eine Überproduktion an GG vermieden werden. Da die Ionenkonzentration im Cytoplasma akklimatisierter Zellen abhängig von der externen Salzkonzentration ist (Blumwald *et al.*, 1983; Hagemann *et al.*, 1994), kann die GG-Syntheserate in Abhängigkeit von der externen Salzkonzentration eingestellt werden. Somit wäre *Synechocystis* in der Lage, für jede externe Salzkonzentration eine konstante GG-Syntheserate durch die Modulation der GgpS-Aktivität durch die Konzentrationen von GG und Ionen im Cytoplasma einzustellen. Damit könnte die „steady state“-Regulation der GG-Synthese in salzakklimatisierten Zellen von *Synechocystis* vollständig erklärt werden. In diesem Modell ist das GgpS-Protein Osmosensor und Osmoregulator zugleich, da die Information über die Ionen- und Osmolytkonzentration direkt vom GgpS-Protein wahrgenommen und in eine veränderte Aktivität umgesetzt wird. Proteine, denen ebenfalls sowohl osmosensorische als auch osmoregulatorische Eigenschaften zugesprochen wurden, sind die Transporter BetP aus *C. glutamicum*, OpuA aus *L. lactis* und

ProP aus *E. coli* (Rübenhagen *et al.*, 2000; Van der Heide und Poolman, 2000; Wood *et al.*, 2005).

Möglicherweise stellt der hier vorgeschlagene Mechanismus für die Regulation der Osmolytsynthese sogar ein universelles Prinzip dar, um in salzakklimatisierten Bakterienzellen den Gehalt einer osmoprotektiven Substanz der externen Salzkonzentration anzupassen, da erstaunlicherweise in *Synechocystis* der Trehalosegehalt ebenfalls abhängig von der externen Salzkonzentration war (Abschnitt 3.2). Somit würde das Tps-Protein ebenso wie das GgpS-Protein einen Osmosensor und einen Osmoregulator zugleich darstellen.

5. Zusammenfassung

Die Akkumulation der osmoprotektiven Substanz Glucosylglycerol (GG) ist ein essentieller Bestandteil der Osmoadaptation des Cyanobakteriums *Synechocystis*. Dabei findet die Induktion der GG-Synthese unmittelbar nach einem Salzschock durch einen biochemischen Aktivierungsmechanismus des Schlüsselenzyms GgpS statt und sorgt nach der Stresseinwirkung für eine schnelle GG-Akkumulation zur Regeneration zellulärer Stoffwechselfvorgänge. Zur vollständigen Akklimatisierung müssen die Zellen nachfolgend eine stabile, der äußeren Salzkonzentration angepasste GG-Syntheserate einstellen. Der Mechanismus dieser Regulation wurde als Schwerpunkt in dieser Arbeit analysiert.

Durch die Herstellung und Charakterisierung der *ggpS*⁺-Mutante, die einen konstitutiv hohen Gehalt des GgpS-Enzyms aufwies, konnte gezeigt werden, dass die „steady state“-Regulation in akklimatisierten Zellen biochemisch vermittelt wird, wobei nicht benötigtes GgpS-Protein inaktiviert wird.

Während die Hemmung der GG-Synthese nach Aufnahme der osmoprotektiven Substanz Trehalose durch salzakklimatisierte *Synechocystis*-Zellen auf eine direkte Beteiligung des Transporters Ggt an der Regulation der GG-Synthese schließen ließ, zeigte der gleichbleibende GG-Gehalt nach Aufnahme von Saccharose durch den Transporter Ggt und der hemmende Einfluss nach Etablierung eines *de novo*-Synthesystems für Trehalose, dass die Aktivität des Transporters Ggt kein Signal für die Regulation der GG-Syntheserate darstellt. Damit konnte die Hypothese der regulativen Verknüpfung von Osmolytaufnahme und Osmolytsynthese für *Synechocystis* eindeutig widerlegt werden.

Durch eine Transposonmutagenese konnte die FtsH-Protease Slr0228 als regulatives Element der GG-Synthese charakterisiert werden. Die Protease kontrolliert die Stabilität einer Reihe von löslichen Proteinen, die mittels 2D-PAGE identifiziert und als Substrate für den proteolytischen Abbau durch FtsH neu vorgeschlagen wurden. Darunter war das GgpS-Protein, das in salzakklimatisierten Zellen der Insertionsmutante Mutante *slr0228::Km*^R im inaktiven Zustand akkumulierte. Durch einen neu entwickelten Test konnte der Abbau des GgpS-Proteins durch das Membranprotein FtsH verdeutlicht werden. Damit stellt das GgpS-Protein das erste cytoplasmatische Protein in Cyanobakterien dar, das Substrat einer FtsH-Protease ist. Die Akkumulation von inaktivem GgpS-Protein in Zellen der FtsH-Mutante *slr0228::Km*^R konnte als molekulare Ursache für deren Salzsensitivität identifiziert werden. Damit ist die FtsH-Protease Slr0228 am salzstressspezifischen Regulationsmechanismus der

GG-Synthese in akklimatisierten Zellen von *Synechocystis* direkt beteiligt. Hierdurch wurde für Cyanobakterien erstmals eine Verbindung von Proteinqualitätskontrolle und Osmoregulation nachgewiesen.

Neben der Beteiligung einer Protease wurde der Einfluss hoher Konzentrationen von osmoprotektiven Substanzen auf die GgpS-Aktivität als Möglichkeit der nicht Protein-abhängigen Regulation untersucht. In einem *in vitro*-Testsystem konnte die Hemmung der GgpS-Aktivität durch hohe Konzentrationen an GG demonstriert werden. Durch gleichzeitigen Zusatz von NaCl konnte die durch GG hervorgerufene Hemmung der GgpS-Aktivität aufgehoben werden. Da die Ionenkonzentration im Cytoplasma akklimatisierter *Synechocystis*-Zellen abhängig von der externen Salzkonzentration ist, konnte als Mechanismus für die „steady state“-Regulation der GG-Synthese in vollständig salzakklimatisierten Zellen vorgeschlagen werden, dass das GgpS-Protein als Osmosensor und Osmoregulator fungiert. In Abhängigkeit von der internen Ionenkonzentration kann die GgpS-Aktivität moduliert und dadurch der GG-Gehalt der externen Salzkonzentration angepasst werden. Das vorgeschlagene Modell ist möglicherweise auf andere Organismen übertragbar und könnte ein universelles Prinzip darstellen.

6. Literaturverzeichnis

Akiyama, Y. (1999) Self-processing of FtsH and its implication for the cleavage specificity of this protease. *Biochemistry* **38**:11693-11699

Akiyama, Y. und Ito, K. (2003) Reconstitution of membrane proteolysis by FtsH. *J. Biol.Chem.* **278**: 18146-18153

Akiyama, Y., Kihara, A. und Ito, K. (1996a) Subunit a of proton ATPase F₀ sector is a substrate of the FtsH protease in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **399**: 26-28

Akiyama, Y., Kihara, A., Tokuda, H. und Ito, K. (1996b) FtsH (HflB) is an ATP-dependent protease selectively acting on SecY and some other membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **271**: 31196-31201

Akiyama, Y. (2002) Proton-motive force stimulates the proteolytic activity of FtsH, a membrane-bound ATP-dependent protease in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 8066-8071

Asahara, Y., Atsuta, K., Motohashi, K., Taguchi, H., Yohda, M. und Yoshida, M. (2000) FtsH recognizes proteins with unfolded structure and hydrolyzes the carboxyl side of hydrophobic residues. *J. Biochem.* **127**: 931-937

Berry, S., Esper, B., Karandashova, I., Teuber, M., Elanskaya, I., Rögner, M. und Hagemann, M. (2003) Potassium uptake in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 mainly depends on a Ktr-like system encoded by *slr1509 (ntpJ)*. *FEBS Letters* **548**: 53-58

Blumwald E., Mehlhorn, E., Mehlhorn, R. und Packer, L. (1983) Ionic osmoregulation during salt adaptation of the cyanobacterium *Syechococcus* 6311. *Plant Physiol.* **73**: 377-380

Bourdineuad, J.-P., Nehmé, B., Tesse, S. und Lonvaud-Funel, A. (2003) The *ftsH* gene of the wine bacterium *Oenococcus oeni* is involved in protection against environmental stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(5): 2512-2520

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254

- Bremer, E. und Krämer, R. (2000)** Coping with osmotic challenges. In: Storz, G. und Hengge-Aronis, R. (eds). *Bacterial Stress Responses. Washington DC:ASM Press.* pp. 79-97
- Calamita, G. (2000)** The *Escherichia coli* aquaporin-Z water channel. *Mol. Microbiol.* **37**: 254-62
- Chiba, S., Akiyama, Y. und Ito, K. (2002)** Membrane protein degradation by FtsH can be initiated from either end. *J. Bacteriol.* **184**: 4775-4782
- Csonka, L. N. und Epstein, W. (1996)** Osmoregulation. In: Neidhardt, F. C. (eds). *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology. Washington DC: ASM Press.* pp. 1210-1223
- De Smet, K., Weston, A., Brown, N., Young, D. und Robertson, B. (2000)** Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiology* **146**: 199-208
- Deshnium, P., Los, D. A., Hayashi, H., Mustardy, L. und Murata, N. (1995)** Transformation of *Synechococcus* with a gene for choline oxidase enhances tolerance to salt stress. *Plant Molec. Bio.* **29**: 897-907
- Deuerling, E., Mogk, A., Richter, C., Purucker, M. und Schumann, W. (1997)** The *ftsH* gene of *Bacillus subtilis* is involved in major cellular processes such as sporulation, stress adaptation and secretion. *Mol. Microbiol.* **23**(5): 921-933
- Deuerling, E., Paeslack, B. und Schumann, W. (1995)** The *ftsH* gene of *Bacillus subtilis* is transiently induced after osmotic and temperature upshift. *J. Bacteriol.* **177**(4): 4105-4112
- Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R. und Bakker, E. P. (1988)** Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch. Microbiol.* **150**: 348-57
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. und MacKinnon, R. (1998)** The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**: 69-77
- Elanskaya, I. V., Karandashova, I. V., Bogachev, A. V., Hagemann, M. (2002)** Functional analysis of the Na⁺/H⁺ antiporter encoding genes of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Biochemistry (Mosc)* **67**: 432-40

Fioulaine, S., Lunn, J. E., Borel, F. und Ferrer, J.-L. (2005) The structure of a cyanobacterial sucrose-phosphatase reveals the sugar tongs that release free sucrose in the cell. *The Plant Cell* **17**: 2049-2058

Fischer, B., Rummel, G., Aldridge, P. und Jenal, U. (2002) The FtsH protease is involved in development, stress response and heat shock control in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* **44**(2): 461-478

Forchhammer, K. (2004) Global carbon/nitrogen control by PII signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**(3): 319-333

Führer, F., Langklotz, S. und Narberhaus, F. (2006) The C-terminal end of LpxC is required for degradation by the FtsH protease. *Mol. Microbiol.* **59**(3): 1025-1036

Fulda, S., Hagemann, M. und Libbert, E. (1990) Release of glucosylglycerol from the cyanobacterium *Synechocystis* spec. SAG 92.79 by hypoosmotic shock. *Arch. Microbiol.* **153**: 405-408

Fulda, S., Mikkat, S., Huang, F., Huckauf, J., Norling, B. und Hagemann, M. (2006) Proteome analysis of salt stress response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Proteomics* **6**: im Druck

Galinski, E. A. und Trüper, H. G. (1994) Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**: 95-108.

Gierga, G. (2004) Untersuchungen zur heterologen und konditionalen Expression der Gene *betP* und *proP* in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Diplomarbeit, Universität zu Köln, Institut für Biochemie

Grammann, K., Volke, A. und Kunte, H. J. (2002) A new type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the Bacteria domain: TRAP-transporter TeaABC mediates the uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *J. Bacteriol.* **184**(11): 3078-3085

Grant, S. G. N., Jessee, J., Bloom, F. R. und Hanahan, D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4645-4649.

Hagemann, M. und Erdmann, N. (1994) Activation and pathway of glucosylglycerol synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology*. **140**: 1427-1431

Hagemann, M. und Zuther, E. (1992) Selection and characterization of mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 unable to tolerate high salt concentrations. *Arch. Microbiol.* **158**: 429-434

Hagemann, M., Effmert, U., Kerstan, T., Schoor, A. und Erdmann, N. (2001) Biochemical characterization of glucosylglycerol-phosphate synthase of *Synechocystis* sp. Strain PCC6 802: comparison of crude, purified and recombinant enzymes. *Curr. Microbiol.* **43**: 278-283

Hagemann, M., Fulda, S., und Schubert, H. (1994) DNA, RNA, and protein synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 adapted to different salt concentrations. *Curr. Microbiol.* **28**: 201-207

Hagemann, M., Richter, S. und Mikkat, S. (1997) The *ggtA* gene encodes a subunit of the transport system for the osmoprotective compound glucosylglycerol in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Bacteriol.* **179**: 714-720

Hagemann, M., Richter, S., Zuther, E. und Schoor, A. (1996b) Characterization of a glucosylglycerol-phosphate-accumulating, salt-sensitive mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Arch. Microbiol.* **166**: 83-91

Hagemann, M., Schoor, A. und Erdmann, N. (1996a) NaCl acts as a direct modulator in the salt adaptive response: Salt-dependent activation of glucosylglycerol synthesis *in vivo* and *in vitro*. *FEMS Microbiol. Letters* **113**: 205-210

Hagemann, M., Wölfel, L. und Krüger, B. (1990) Alteration of protein biosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 after a salt shock. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1393-1399

Herman, C., Prakash, S., Lu, C. Z., Matouschek, A. und Gross, C. A. (2003) Lack of a robust unfoldase activity confers a unique level of substrate specificity to the universal AAA protease FtsH. *Mol. Cell* **11**: 659-669

Herman, C., Thevenet, D., Bouloc, P., Walker, G. C., D'Ari, R. (1998) Degradation of carboxyterminal-tagged cytoplasmic proteins by the Escherichia coli protease HflB (FtsH). *Genes Dev.* **12**: 1348-5135

Herman, C., Thevenet, D., D'Ari, R. und Boulloc, P. (1995) Degradation of sigma 32, the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3516–20

Hincha, D. H. und Hagemann, M. (2004) Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. *Biochem. J.* **383**: 277-283

Huckauf, J. (2003) Posttranslationale Regulation der Glucosylglycerolphosphat Synthase im Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Dissertation, Universität Rostock, FB Biologie

Huckauf, J., Nomura, C., Forchhammer, K. und Hagemann, M. (2000) Stress responses of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 mutants impaired in genes encoding putative alternative sigma factors. *Microbiology* **146**: 2877-2889

Inaba, M., Sakamoto, A. und Murata, N. (2001) Functional expression in *Escherichia coli* of low-affinity and high-affinity (Na⁺ / Li⁺) / H⁺ antiporters of *Synechocystis*. *J. Bacteriol.* **183**: 1376-84

Inoue, H., Nojima, H. und Okajama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.

Ito, K. und Akiyama, Y. (2005) Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**: 211-231

Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *J. DNA Res.* **3**: 109-136

Kanesaki, Y., Suzuki, I., Allakhverdiev, S. I., Mikami, K. und Murata, N. (2002) Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **290**: 339-348

Kashino, Y., Lauber, W. M., Carroll, J. A., Whitmarsh, J., Satoh, K. und Pakrasi, H. B. (2002) Proteomic analysis of a highly active PSII preparation from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 reveals the presence of novel polypeptides. *Biochemistry* **41**: 8004-8012

Kerstan, T. (1998) Überexpression des für die Glucosylglycerolphosphat-Synthase codierenden Gens aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 in *Escherichia coli* und biochemische Charakterisierung des Proteins. Diplomarbeit, Universität Rostock, FB Biologie

Kihara, A., Akiyama, Y. und Ito, K. (1997) Host regulation of lysogenic decision in bacteriophage lambda: transmembrane modulation of FtsH (HflB), the cII degrading protease, by HflKC (HflA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5544-5549

Kobiler, O., Koby, S., Teff, D., Court, D. und Oppenheim, A. B. (2002) The phage lambda CII transcriptional activator carries a C-terminal domain signaling for rapid proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 14964-14969

Komenda, J., Barker, M., Kuvikova, S., de Vries, R., Mullineaux, C. W., Tichy, M. und Nixon, P. J. (2005) The FtsH protease, Slr0228, is important for quality control of photosystem two in the thylakoid membrane of *Synechocystis* PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **281**(2): 1145-1151

Kotani, H., Kaneko, T., Matsubayashi, T., Sato, S., Sugiura, M. und Tabata, S. (1994) A physical map of the genome of a unicellular cyanobacterium *synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. DNA Res.* **1**: 303-307

Kunert, A., Hagemann, M. und Erdmann, N. (2000) Construction of promoter probe vectors for *Synechocystis* sp. PCC 6803 using light emitting reporter systems Gfp and LuxA. *J. Microbiol. Methods* **41**(3): 185-94

Lagarde, D., Beuf, L. und Vermaas, W. (2000) Increased production of zeaxanthin and other pigments by application of genetic engineering techniques to *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 64-72

Lagarde, D., Beuf, L. und Vermaas, W. (2000) Increased production of zeaxanthin and other pigments by application of genetic engineering techniques to *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (1): 64-72

Langer, T. (2000) AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 247-251

LeMasurier, M., Heginbotham, L. und Miller, C. (2001) KscA: it's a potassium channel. *J. Gen. Physiol.* **118**: 303-314

- Lindhal, M., Spetea, C., Hundal, T. Oppenheim, A. B., Adam, Z. und Andersson, B. (2002)** The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell* **12**: 419-431
- Lithgow, J. K., Ingham, E. und Foster, S. J. (2004)** Role of the *hprT-ftsH* locus in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **150**: 373-381
- Lunn, J. E. (2002)** Evolution of sucrose synthesis. *Plant Physiol.* **128**: 149-1500
- Lysenko, E., Ogura, T. und Cutting, S. M. (1997)** Characterization of the *ftsH* gene of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **143**: 971-978
- Madigan, M. T. und Oren, A. (1999)** Thermophilic and halophilic extremophiles. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:265-269
- Mann, N. H., Novac, N., Mullineaux, C. W., Newman, J., Bailey, S. und Robinson, C. (2000)** Involvement of an FtsH homologue in the assembly of functional photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Letters* **479**: 72-77
- Marin, K. (2002)** Osmoadaptation in *Synechocystis* sp. PCC 6803: Regulation der Expression des *ggsS*-Gens. Dissertation, Universität Rostock, FB Biologie
- Marin, K., Huckauf, J., Fulda, S. und Hagemann, M. (2002)** Salt-dependent expression of glucosylglycerol-phosphate synthase, involved in osmolyte synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **184**: 2870-2877
- Marin, K., Stirnberg, M., Eisenhut, M., Krämer, R. und Hagemann, M. (2006)** Osmotic stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803: low tolerance towards nonionic osmotic stress results from lacking activation of glucosylglycerol accumulation. *Microbiology*, im Druck
- Marin, K., Suzuki, I., Yamaguchi, K., Ribbeck, K., Yamamoto, H., Kanesaki, Y., Hagemann, M. und Murata, N. (2003)** Identification of histidine kinases that act as sensors in the perception of salt stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**(15): 9061-9066
- Marin, K., Zuther, E., Kerstan, T., Kunert, A. und Hagemann, M. (1998)** The *ggsS* gene from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 encoding glucosyl-glycerol-phosphatase synthase is involved in osmolyte synthesis. *J. Bacteriol.* **180** (18): 4843-4849

- Matsuda, N. und Uozumi, N. (2006)** Ktr-mediated potassium transport, a major pathway for potassium uptake, is coupled to a proton gradient across the membrane in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**(1), 273-275
- Matsuda, N., Kobayashi, H., Katoh, H., Ogawa, T., Futatsugi, L., Nakamura, T., Bakker, E. und Uozumi, N. (2004)** Na⁺ dependent K⁺ uptake Ktr system from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and its role in the early phases of cell adaptation to hyperosmotic shock. *J. Biol. Chem.* **279**(52): 54952-54962
- Mikkat, S. und Hagemann, M. (2000)** Molecular analysis of the *ggtBCD* gene cluster of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 encoding subunits of an ABC transporter for osmoprotective compounds. *Arch. Microbiol.* **174**: 273-282
- Mikkat, S., Effmert, U. und Hagemann, M. (1997)** Uptake and use of the osmoprotective compounds trehalose, glucosylglycerol and sucrose by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch. Microbiol.* **167**: 112-118
- Mikkat, S., Hagemann, M. und Schoor, A. (1996)** Active transport of glycosylglycerol is involved in salt adaptation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* **142**: 1725-1732
- Mullineaux, C. W. (1999)** The thylakoid membranes of cyanobacteria : structure, dynamics and function. *Aust. J. Plant Physiol.* **26**: 671-677
- Mullis, K. B. (1987)** Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion. *Spektrum der Microbiol.* **42**: 465-488
- Murata, N. und Suzuki, I. (2006)** Exploitation of genomic sequences in a systematic analysis to access how cyanobacteria sense environmental stress. *J. Exp. Botany* **57**(2): 235-247
- Nijtmans, L. G., de Jong, L., Artal Sanz, M., Coates, P. J., Berden, J. A., Back, J. W., Muijsers, A. O., van der Spek, H. und Grivell, L. A. (2000)** Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO J.* **19**: 2444-2451
- Nilsson, D., Lauridsen, A. A., Tomoyasu, T. und Ogura, T. (1994)** A *Lactococcus lactis* gene encodes a membrane protein with putative ATPase activity that is homologous to the essential *Escherichia coli* *ftsH* gene product. *Microbiology* **140**: 2601-2610

- Nixon, P. J., Barker, M., Boehm, M., de Vries, R. und Komenda, J. (2005)** FtsH-mediated repair of the photosystem II complex in response to light stress. *J. Exp. Botany* **56**(411): 357-362
- Nomura, M., Ishitani, M., Takabe, T., Rai, A. und Takabe, T. (1995)** *Synechococcus* sp. PCC 7942 transformed with *E. coli bet* genes produces glycine betaine from choline and acquires resistance to salt stress. *Plant Physiol.* **107**: 703-708
- Ogura, T., Inoue, K., Tatsuta, T., Suzaki, T., Karata, K., Young, K., Su, H.-L., Fierke, C. A., Jackman, J. A., Raetz, C. R. H., Coleman, J., Tomoyasu, T. und Matsuzawa, H. (1999)** Balanced biosynthesis of major membrane components through regulated degradation of the committed enzyme of lipid A biosynthesis by the AAA protease FtsH (HflB) in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **31**: 833-844
- Pan, Y. T., Carroll, J. D. und Elbein, A. D. (2002)** Trehalose-phosphate synthase of *Mycobacterium tuberculosis*: Cloning, expression and properties of the recombinant enzyme. *Eur. J. Biochem.* **269**: 6091-6100
- Panagiotidis, C. H., Boos, W. und Shuman H. A. (1998)** The ATP-binding cassette subunit of the maltose transporter MalK antagonizes MalT, the activator of the *Escherichia coli mal* regulon. *Mol. Microbiol.* **30** (3): 535-546
- Reed, R. H. und Stewart, W. D. P. (1985)** Evidence for turgor-sensitive K⁺ influx in the cyanobacteria *Anabaena variabilis* ATCC 29413 and *Synechocystis* PCC 6714. *Biochim. Biophys. Acta* **812**: 155-162
- Reed, R. H., Borowitzka, L. J., Mackay, M. A., Chudek, J. A., Foster, R., Warr, S. R. C., Moore, D. J. und Stewart, W. D. P. (1986)** Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 51-56
- Reed, R. H., Richardson, D. L. und Stewart, W. D. P. (1985b)** Na⁺ uptake and extrusion in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714 in response to hypersaline treatment. Evidence for transient changes in plasmalemma Na⁺ permeability. *Biochim. Biophys. Acta* **814**: 347-355.
- Reed, R. H., Warr, S. R. C., Richardson, D. L., Stewart, W. D. P. (1985a)** Multiphasic osmotic adjustment in a euryhaline cyanobacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* **28**: 225-229

- Ribbeck, K. (2001)** Sind mechanosensitive Kanäle bzw. Histidinkinasen bei der Osmosensierung in *Synechocystis* sp. PCC 6803 beteiligt? Diplomarbeit, Universität Rostock, FB Biologie
- Rübenhagen, R., Rönsch, H., Jung, H., Krämer, R. und Morbarch, S. (2000)** Osmosensor and osmoregulator properties of the Betaine Carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in Proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* **275**(2): 735-741
- Saikawa, N., Akiyama, Y. und Ito, K. (2004)** FtsH exists as an exceptionally large complex containing HflKC in the plasma membrane of *Escherichia coli*. *J. Struct. Biol.* **146**: 123-129
- Sakamoto, W., Zaltsman, A., Adam, Z. und Takahashi, Y. (2003)** Coordinated regulation and complex formation of YELLOW VARIEGATED1 and YELLOW VARIEGATED2, chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in Arabidopsis thylakoid membranes. *Plant Cell* **15**: 2843-2855
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989)** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sandström, S., Park, Y., Öquist, G. und Gustafsson, P. (2001)** CP43', the *isiA* gene product, functions as an excitation energy dissipator in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Photochem. Photobiol.* **74**(3): 431-7
- Sanger, F., Nickelen, S. und Coulson, A. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467
- Schaffner, W. und Weissmann, C. (1973)** A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.* **56**: 502-514
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987)** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379
- Schmees, G. und Schneider, E. (1998)** Domain structure of the ATP-Binding-Cassette Protein MalK of *Salmonella typhimurium* as Assessed by Coexpressed Half Molecules and LacK'-MalK Chimeras. *J. Bacteriol.* **180**(20): 5299-5305

Schoor, A. (1996) Die Synthese des Heterosides Glucosylglycerol im Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803; Methodische und praktische Untersuchungen. Dissertation, Universität Rostock, FB Biologie

Schoor, A., Erdmann, N., Effmert, H. und Mikkat, S. (1995) Determination of the cyanobacterial osmolyte glucosylglycerol by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography A* **704**: 755-762

Schoor, A., Hagemann, M. und Erdmann, N. (1999) Glucosylglycerol-phosphate synthase: target for ion-mediated regulation of osmolyte synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Arch. Microbiol.* **171**: 101-6

Seo, H. S., Koo, Y. J., Lim, J. Y., Song, J. T., Kim, C. H., Kim, J. k. Lee, J. S. und Choi, Y. D. (2000) Characterization of a bifunctional enzyme fusion of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(6): 2484-2490

Shapiguzov, A., Lyukevich, A. A., Allakhverdiev, S. I., Sergeyenko, T. V., Suzuki, I., Murata, N. und Los, D. A. (2005) Osmotic shrinkage of cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803 by water efflux via aquaporins regulates osmostress-inducible gene expression. *Microbiology* **151**: 447-455

Shibata, M., Katoh, H., Sonoda, M., Ohkawa, H., Shimoyama, M., Fukuzawa, H., Kaplan, A. und Ogawam, T. (2002) Genes essential to sodium-dependent bicarbonate transport in cyanobacteria: function and phylogenetic analysis. *J. Biol. Chem.* **277**: 18658-18664

Shibata, M., Ohkawa, H., Kaneko, T., Fukuzawa, H., Tabata, S., Kaplan, A. und Ogawa, T. (2001) Distinct constitutive and low-CO₂-induced CO₂ uptake systems in cyanobacteria: genes involved and their relationship with homologous genes in other organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98**(20): 11789-11794

Shotland, Y., Shifrin, A., Ziv, T., Teff, D., Koby, S., Kobilier, O. und Oppenheim, A. B. (2000) Proteolysis of bacteriophage lambda CII by *Escherichia coli* FtsH (HflB). *J. Bacteriol.* **182**: 3111-3116

Silva, P., Thompson, E., Bailey, S., Kruse, O., Mullineaux, C. W., Robinson, C., Mann, N. H. und Nixon, P. J. (2003) FtsH is involved in the early stages of repair of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The Plant Cell* **15**: 2152-2164

Sokolenko, A., Pojidaeva, E., Zinchenko, V., Panichkin, V., Glaser, V. M., Herrmann, R. G. und Shstakov, S. V. (2002) The gene complement for proteolysis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Curr. Genet.* **41**: 291-310

Strösser, J., Lüdke, A., Schaffer, S., Krämer, R. und Burkovski, A. (2004) Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **54**(1): 132-147

Tomoyasu, T., Ogura, T., Tatsuta, T. und Bukau, B. (1998) Levels of DnaK and DnaJ provide tight control of heat shock gene expression and protein repair in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **30**: 567–81

Van der Heide, T. und Poolman, B. (2000) Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 7102-7106

Vuorio, O. E., Kalkkinen, N. und Londesborough, J. (1993) Cloning of two related genes encoding the 56-kDa and 123-kDa subunits of trehalose synthesis from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **216**(3): 849-861

Whatmore, A. M., Chudek, J. A. und Reed, R. H. (1990) The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2527-2535

Whatmore, A. M., Chudek, J. A. und Reed, R. (1990) The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J. of General Microbiology* **136**: 2527-2535

Wood, J. M., Culham, D. E., Hillar, A., Vernikovska, Y. I., Liu, F., Boggs, J. M. und Keates, R. A. B. (2005) A structural model for the osmosensor, transporter, and osmoregulator ProP of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **44**: 5634-5646

Yancey, P. H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biology* **208**: 2819-2830

Yu, F., Park, S. und Rodermel, S. R. (2005) Functional redundancy of AtFtsH metalloproteases in thylakoid membrane complexes. *Plant Physiol.* **138**(4): 1957-1966

Zak, E., Norling, B., Maitra, R., Huang, F., Andersson, B. und Pakrasi, H. B. (2001) The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 13443-13448

Zellmeier, S., Zuber, U., Schumann, W. und Wiegert, T. (2003) The absence of FtsH metalloprotease activity causes overexpression of the σ^W -controlled *pbpE* gene, resulting in filamentous growth of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **185**(3): 973-982

7. Anhang

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Proteomanalyse von Zellen des Wildtyps und der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* lieferte die Identifizierung von 56 verschiedenen Proteinen in 84 Spots. Die Zuordnung der Proteinspots erfolgte mit Hilfe eines Mastergels von Fulda *et al.* (2006). Tabelle 6.1 zeigt alle identifizierten Proteinspots und deren Akkumulationsfaktoren in der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* unter Kontrollbedingungen bzw. nach Akklimatisierung an erhöhte Salzkonzentrationen im Vergleich zum Wildtyp.

Tab. 6.1: Identifizierte Proteine auf den 2D-Gelen und deren Akkumulationsfaktoren in der FtsH-Mutante *slr0228::Km^R* bei Kultivierung unter Kontrollbedingungen (18 mM NaCl) bzw. nach Akklimatisierung an 684 mM NaCl im Vergleich zum Wildtyp

Proteinspots konnten mit Hilfe von Fulda *et al.* (2006) identifiziert werden, wobei die Nomenklatur übernommen wurde.

Spot Nr.	orf	Proteinfunktion	Akk. (18 mM NaCl)	Akk. (684 mM NaCl)
20	<i>slI1043</i>	Polyribonucleotidnucleotidyltransferase	1,2 ± 0,1	2,0 ± 0,2
21	<i>slI1044</i>	Polyribonucleotidnucleotidyltransferase	3,7 ± 1,2	1,9 ± 0,2
84	<i>slr2076</i>	60 kDa Chaperonin 1, GroEL1	∞	2,1 ± 0,8
85	<i>slI0416</i>	60 kDa Chaperonin 2, GroEL2	3,7 ± 0,7	1,2 ± 0,2
86	<i>slI0416</i>	60 kDa Chaperonin 2, GroEL2	∞	0,8 ± 0,1
88	<i>slr2076</i>	60 kDa Chaperonin 1, GroEL1	∞	2,2 ± 0,6
89	<i>slr2076</i>	60 kDa Chaperonin 1, GroEL1	∞	1,9 ± 0,3
100	<i>slI1676</i>	4-alpha-Glucanotransferase	1,8 ± 0,4	0,9 ± 0,1
105	<i>slI1908</i>	D-3-Phosphoglyceratdehydrogenase	0,9 ± 0,4	0,5 ± 0,3
106	<i>slI1908</i>	D-3-Phosphoglyceratdehydrogenase	1,1 ± 0,1	0,7 ± 0,5
110	<i>slr1756</i>	Glutaminsynthetase	0,8 ± 0,1	6,7 ± 1,1
113	<i>slI1326</i>	ATP-Synthase, alpha-Untereinheit	3,3 ± 1,7	1,6 ± 0,8
114	<i>slI1326</i>	ATP-Synthase, alpha-Untereinheit	2,1 ± 1,2	2,1 ± 1,2
117	<i>slI1566</i>	Glucosylglycerolphosphatsynthase	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,3
120	<i>slI1567</i>	Glucosylglycerolphosphatsynthase	1,6 ± 0,8	2,7 ± 0,5
121	<i>slI0726</i>	Phosphoglucomutase	6,3 ± 2,3	0,7 ± 0,4
131	<i>slr0898</i>	Ferredoxin-nitrite-Reduktase	4,9 ± 2,2	0,9 ± 0,3
133	<i>slr1908</i>	Protein Slr1908	1,1 ± 0,2	1,7 ± 0,2
136	<i>slI1329</i>	ATP-Synthase, beta-Untereinheit	1,1 ± 0,2	2,1 ± 0,2
139	<i>slr0374</i>	Zellteilungsprotein	3,2 ± 2,7	1,1 ± 0,1
140	<i>slr1329</i>	ATP-Synthase, beta-Untereinheit	3,1 ± 2,6	1,1 ± 0,2
144	<i>slr0009</i>	RubisCO, große Untereinheit	2,9 ± 1,5	4,5 ± 2,9
145	<i>slr0009</i>	RubisCO, große Untereinheit	3,1 ± 2,2	5,5 ± 2,3
146	<i>slr0009</i>	RubisCO, große Untereinheit	4,2 ± 0,9	3,7 ± 2,0
163	<i>slr1643</i>	Ferredoxin-NADP-Reduktase	4,5 ± 1,1	2,0 ± 0,7
167	<i>slr1643</i>	Ferredoxin-NADP-Reduktase	2,9 ± 0,8	1,1 ± 0,2
177	<i>slr0863</i>	Protein Slr0863	1,6 ± 0,2	1,0 ± 0,5
180	<i>slr0752</i>	Enolase	1,4 ± 0,6	1,7 ± 0,3
181	<i>slr0585</i>	Argininosuccinat-Synthase	2,6 ± 1,2	1,7 ± 0,5

Spot Nr.	orf	Proteinfunktion	Akk. (18 mM NaCl)	Akk. (684 mM NaCl)
191	<i>sII1099</i>	Elongationsfaktor Tu	6,8 ± 2,4	1,1 ± 0,1
192	<i>sII2001</i>	Putative cytosol. Aminopeptidase	3,0 ± 1,3	0,9 ± 0,5
195	<i>sII1099</i>	Elongationsfaktor Tu	4,6 ± 1,5	1,8 ± 0,9
198	<i>sII1099</i>	Elongationsfaktor Tu	6,5 ± 2,5	1,2 ± 0,2
221	<i>sII0373</i> und <i>slr0746</i>	Gamma-glutamylphosphatreduktase und Glucosylglycerolphosphat-Phosphatase	1,0 ± 0,3	1,3 ± 0,3
256	<i>slr1020</i>	Sulfolipid-Biosyntheseprotein; SqdB	1,6 ± 0,5	1,2 ± 0,2
270	<i>sII1342</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphat- Dehydrogenase 2	2,5 ± 1,8	4,5 ± 2,6
273	<i>sII1342</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphat- Dehydrogenase 2	2,4 ± 1,7	2,1 ± 1,2
274	<i>sII1342</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphat- Dehydrogenase 2	4,9 ± 0,3	3,0 ± 1,5
280	<i>sII0408</i>	Protein SII0408	5,4 ± 2,9	0,4 ± 0,1
281	<i>slr1356</i>	30S ribosomal. Protein S1 Homolog A	3,8 ± 1,2	1,0 ± 0,1
296	<i>sII1363</i>	Ketol-Acid-Reductoisomerase	3,9 ± 1,0	1,7 ± 0,1
298	<i>sII1363</i>	Ketol-Acid-Reductoisomerase	1,5 ± 0,3	1,0 ± 0,1
300	<i>sII1363</i>	Ketol-Acid-Reductoisomerase	5,2 ± 2,3	1,0 ± 0,2
302	<i>slr0513</i>	Periplasmat. Eisenbindeprotein	1,0 ± 0,3	1,4 ± 0,3
305	<i>slr0513</i>	Periplasmat. Eisenbindeprotein	2,1 ± 1,1	2,4 ± 0,4
315	<i>slr1485</i>	Protein Slr1485	3,3 ± 1,1	0,4 ± 0,1
316	<i>sII0057</i>	GrpE (HSP-70 Kofaktor)	2,2 ± 0,3	0,2 ± 0,1
323	<i>slr1963</i>	Protein Slr1963	1,1 ± 0,5	0,9 ± 0,2
336	<i>sII1099</i>	Elongationsfaktor Tu	0,3 ± 0,0	0,7 ± 0,3
348	<i>sII0427</i>	Untereinheit des wasserspaltenden Komplexes	14,3 ± 7,1	1,0 ± 0,2
350	<i>sII0427</i>	Untereinheit des wasserspaltenden Komplexes	5,0 ± 1,4	0,6 ± 0,2
359	<i>sII1784</i>	Protein SII1784	5,9 ± 0,8	0,7 ± 0,1
369	<i>sII1261</i>	Elongationsfaktor Ts	1,3 ± 0,6	0,7 ± 0,1
401	<i>sII1626</i>	SOS-Protein	1,0 ± 0,4	1,5 ± 0,3
402	<i>sII1626</i>	SOS-Protein	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,2
405	<i>slr1783</i>	NarL-Familie	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,3
410	<i>slr1852</i>	Protein Slr1852	1,4 ± 0,7	0,8 ± 0,2
419	<i>sII1663</i>	Protein SII1663	1,8 ± 1,4	0,9 ± 0,2
420	<i>slr1622</i>	Anorgan. Pyrophosphatase	1,3 ± 0,3	1,2 ± 0,1
423	<i>slr1719</i>	Protein DrgA	1,1 ± 0,5	0,8 ± 0,2
426	<i>sII1621</i>	Putative Peroxiredoxin SII1621	1,1 ± 0,2	0,8 ± 0,1
438	<i>slr0001</i>	Protein Slr0001	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,2
446	<i>slr1251</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase Slr1251	4,9 ± 0,4	1,1 ± 0,2
459	<i>sII1852</i>	Nucleosidediphosphatkinase	2,7 ± 1,1	1,9 ± 0,4
465	<i>sII0258</i>	Cytochrom c-550 [Vorläufer]	2,3 ± 0,8	2,0 ± 0,2
470	<i>slr1894</i> und <i>sII1578</i>	Protein Slr1894 und C-Phycocyanin, alpha-Untereinheit	1,3 ± 0,2	2,5 ± 0,8
471	<i>sII1578</i>	C-Phycocyanin, alpha-Untereinheit	1,0 ± 0,1	0,2 ± 0,1
476	<i>slr1986</i>	Allophycocyanin, beta-Untereinheit	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,3
477	<i>slr1986</i>	Allophycocyanin, beta-Untereinheit	3,6 ± 0,4	1,0 ± 0,3
481	<i>slr0623</i>	Thioredoxin	1,2 ± 0,5	0,8 ± 0,2
482	<i>slr1780</i>	Ycf54-ähnliches Protein	1,5 ± 0,6	1,0 ± 0,1
483	<i>slr1330</i>	ATP-Synthase, epsilon-Untereinheit	1,4 ± 0,8	2,4 ± 0,2

Spot Nr.	orf	Proteinfunktion	Akk. (18 mM NaCl)	Akk. (684 mM NaCl)
484	<i>slr0012</i>	RubisCO, kleine Untereinheit	0,8 ± 0,2	1,3 ± 0,1
485	<i>slr0013</i>	RubisCO, kleine Untereinheit	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,2
488	<i>ssl0707</i>	Signaltransduktionsprotein P _{II} der N-Kontrolle	0,6 ± 0,1	∞
489	<i>ssl0707</i>	Signaltransduktionsprotein P _{II} der N-Kontrolle	2,6 ± 0,6	1,3 ± 0,3
490	<i>ssr1480</i>	RNA-Bindeprotein	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1
491	<i>ssl0707</i>	Signaltransduktionsprotein P _{II} der N-Kontrolle	∞	1,1 ± 0,4
493	<i>sll1863</i>	Protein Sll1863	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,3
494	<i>slr1839</i>	CO ₂ -Konzentrierungsmechanismus-Protein ccmK4	1,8 ± 0,7	1,0 ± 0,3
495	<i>sll1028</i>	CO ₂ -Konzentrierungsmechanismus-Protein ccmK2	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1
496	<i>sll1029</i>	CO ₂ -Konzentrierungsmechanismus-Protein ccmK1	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,2
497	<i>sll1029</i>	CO ₂ -Konzentrierungsmechanismus-Protein ccmK1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2
498	<i>sll0199</i>	Plastocyanin-Vorläufer	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,1

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer danke ich für die Möglichkeit der Bearbeitung und Durchführung der Promotion an seinem Lehrstuhl, die Bereitstellung des spannenden Themas sowie für sein reges Interesse an der Arbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Thomas Langer danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Meinem Betreuer Dr. Kay Marin danke ich für die außerordentlich gute Betreuung und seine stete Offenheit für Fragen und Probleme. Durch seine vielen Anregungen, Diskussionen, seinen Optimismus in allen Phasen der Arbeit und die Gewährung wertvoller Freiräume ist es ihm immer gelungen hervorragende Arbeitsbedingungen zu schaffen. Ich danke ihm auch für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Meiner „Laborwelt“ – Jeannine, Martin, Christian, Thomas und Tobias – danke ich für die angenehme und entspannte Arbeitsatmosphäre, für die vielen wertvollen Ratschläge, Diskussionen und die kritischen Fragen in unserem „Miniseminar“, für die Hilfsbereitschaft bei methodischen Problemen und die leckeren Kuchen.

Klaus danke ich für die vielen nützlichen Hilfestellungen bei der GC-Analyse.

Den Kolleginnen und Kollegen der anderen „Welten“ sowie allen Ehemaligen wie Astrid, Gregor, Suna, Frank und Christian danke ich für das gute Arbeitsklima während der gesamten Doktorarbeitszeit.

Dr. Sabine Fulda und PD Dr. Martin Hagemann von der Universität Rostock danke ich für das Ermöglichen der Proteomanalysen. Ein besonderer Dank gilt auch Marion Eisenhut für die schönen Tage in Rostock und Spanien.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Krämer am Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln betreut worden.

Teilpublikationen:

Marin, K., Stirnberg, M., Eisenhut, M., Krämer, R. und Hagemann, M. (2006) Osmotic stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803: low tolerance towards nonionic osmotic stress results from lacking activation of glucosylglycerol accumulation. *Microbiology* **152**: im Druck

Datum: Köln, Mai 2006

Unterschrift:

Lebenslauf

Marit Stirnberg

Beethovenstr. 1

53115 Bonn

Geboren am 07.01.1978 in Hemer/Westf.

Staatsangehörigkeit: deutsch

verheiratet

April 2003 – Juni 2006

Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Krämer

Thema: „Regulation des Gehaltes der osmoprotektiven Substanz Glucosylglycerol im Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803“

Januar 2002 – November 2002

Diplomarbeit am botanischen Institut, Abt. Biochemie der Pflanzen der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Thema: „Promotoranalyse des *hydA*-Gens aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*“

Oktober 1997 – Dezember 2001

Diplomstudiengang Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn mit den Schwerpunkten Botanik, Mikrobiologie, Biochemie

August 1988 – Juni 1997

Besuch des Walburgisgymnasiums Menden/Sauerland

August 1984 – Juli 1988

Besuch der Grundschule Iserlohn/Sümmern