Untersuchungen zur Plastochinon-Biosynthese in Cyanobakterien

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologe
Christian Pfaff
aus Aachen

Berichter: Universitätsprofessorin Dr. rer. nat. Margrit Frentzen
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Björn Usadel

Tag der mündlichen Prüfung: 10.4.2014

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Meinen über alles geliebten Großeltern

Margot und Dr. Herbert Eichmanns†

Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter folgenden Titeln zur Veröffentlichung eingereicht:

Sadre, R.; Pfaff, C.; Buchkremer, S. (2012) **Plastoquinone-9 biosynthesis in cyanobacteria differs from that in plants and involves a novel 4-hydroxybenzoate solanesyltransferase**. 442. *Biochemical Journal*. 621-629

Pfaff, C.; Glindemann, N.; Gruber, J. Frentzen, M.; Sadre R. (2014) **Chorismate Pyruvate-Lyase and 4-Hydroxy-3-Solanesylbenzoate Decarboxylase are required for Plastoquinone Biosynthesis in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803.** 289. *Journal of Biological Chemistry*. 2675-2686

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung 1

Kapitel 1 Einleitung 3

1.1 Cyanobakterien 3

1.2 Plastochinon 4

1.3 Plastochinon-Biosynthese 7

1.4 Ziel der Arbeit 15

Kapitel 2 Material und Methoden 16

2.1 Material 16

2.1.1 Geräte & Chemikalien 16

2.1.2 Verwendete Organismen 17

2.2 Methoden 18

2.2.1 Mikrobiologische Methoden 18

2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli* 18

2.2.1.2 Kultivierung von *Synechocystis* 19

2.2.1.3 Wachstumsexperimente mit *E. coli* Kulturen 20

2.2.1.4 Tropftests und Wachstumsraten von *Synechocystis* Kulturen . 20

2.2.1.5 GFP-Fluoreszenzmikroskopie 20

2.2.2 Molekularbiologische Methoden 21

2.2.2.1 Phylogenetische Analyse 21

2.2.2.2 Molekularbiologische Standardtechniken 21

2.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion 21

2.2.2.4 DNA-Reinigung über Spin-Säulchen 22

2.2.2.5 Isolation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse 22

2.2.2.6 Restriktion von DNA 23

2.2.2.7 Alkalische Phosphatasebehandlung von DNA-Fragmenten . . 24
2.2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten 24
2.2.2.9 Gateway-Klonierung 24
2.2.2.10 Agarosegelelektrophorese 24
2.2.2.11 DNA-Sequenzierung 25
2.2.2.12 Transformation von *E. coli* Zellen 25
2.2.2.13 Isolation von RNA aus *Synechocystis* 26
2.2.2.14 cDNA-Synthese 27
2.2.2.15 quantitative real time PCR 27
2.2.2.16 Transformation von *Synechocystis* 28
2.2.2.17 Herstellung von *Synechocystis* Insertionsmutanten 29
2.2.3 Biochemische und Chemische Methoden 30
2.2.3.1 Synthese von [^{14}C (Ring)]4-Hydroxybenzoesäure 30
2.2.3.2 *In vivo* Markierungsversuche mit *Synechocystis* Zellen 31
2.2.3.3 Induzierte Gen-Expression. 31
2.2.3.4 Präparation von *E. coli* und *Synechocystis* Zellfraktionen . . . 32
2.2.3.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen 32
2.2.3.6 SDS-PAGE 33
2.2.3.7 Coomassie-Färbung. 34
2.2.3.8 Western-Blot-Analyse 34
2.2.3.9 Immunodetektion von Fusionsproteinen. 35
2.2.3.10 Bestimmung des Ubichinon-Gehaltes 36
2.2.3.11 Bestimmung von Plastochinon- und Phyllochinon-Gehalten 36
2.2.3.12 Lipidextrakte aus Spinat 37
2.2.3.13 Affinitätschromatographische Reinigung von GST-Sll1797 . 38
2.2.3.14 Bestimmung der Chorismatlyase-Aktivität 38
2.2.3.15 Enzymatische Synthese von 4-Hydroxy-3-prenylbenzoat . . 39
2.2.3.16 Bestimmung von Decarboxylase-Aktivität 40
2.2.3.17 Chlorophyllbestimmung nach Lichtenthaler. 40
2.2.3.18 Messung der Photosyntheserate 41

Kapitel 3 Ergebnisse & Diskussion 42
3.1 Sequenzanalysen 42
3.1.1 *In silico* Analyse der Chorismatlyasen 43
3.1.2 *In silico* Analyse der Decarboxylasen 44
3.1.3 *In silico* Analyse der Hydroxylasen 47
3.2 4-Hydroxybenzoat ist für die Plastochinon-Biosynthese erforderlich . . 49
3.3 Komplementierungs-Studien in *E. coli* Mutanten 51
3.4 Versuche zur Herstellung einer Δ*ubiD* Insertionsmutante 55
3.5 Lokalisation von *Synechocystis* Proteine in *E. coli* 57
3.6 Charakterisierung von *Synechocystis* Mutanten 61
3.6.1 Herstellung von *Synechocystis* Insertionsmutanten 61
3.6.2 Analyse der Transkriptgehalte in *Synechocystis* Mutanten 63
3.6.3 Wachstumsanalysen der *Synechocystis* Mutanten 64
3.6.4 Analyse von Chinon-Gehalten und Photosyntheseraten 69
3.6.5 *In vivo* Markierung mit 4-Hydroxybenzoat in *Synechocystis* Mutanten 72
3.7 Beschreibung der Hydroxylase Mutante Δ*slr1300* 74
3.8 Lokalisation der Slr1099 Decarboxylase in *Synechocystis* 76
3.9 Untersuchung von Enzymeigenschaften 79
Fazit & Ausblick 85
Literaturverzeichnis 86
Abbildungsverzeichnis 98
Tabellenverzeichnis 100
Abkürzungsverzeichnis 102
Anhang 104
Lebenslauf 113
Erklärung 114
Danksagung 115

Zusammenfassung

Plastochinon ist ein redoxaktives Lipid, das in nahezu allen Organismen, die zur oxygenen Photosynthese befähigt sind, vorkommt. In Cyanobakterien vermittelt Plastochinon sowohl den photosynthetischen als auch den respiratorischen Elektronentransport. Nach den vorliegenden Daten synthetisieren Cyanobakterien Plastochinon über eine Reaktionssequenz, die der Ubichinon-Biosythese in Eubakterien ähnelt, sich aber von der Plastochinon-Biosynthese in Pflanzen deutlich unterscheidet.

Zur Aufklärung der cyanobakteriellen Plastochinon-Biosynthese wurden die Funktionen von *Synechocystis* sp. PCC 6803 Genen, die nach Sequenzanalysen wahrscheinlich für die Plastochinon-Biosynthese essentiell sind, mit Komplementationsstudien in *Escherichia coli* Ubichinon-Defektmutanten, Insertionsmutagenese in *Synechocystis*, *in vivo* Markierungsexperimenten und *in vitro* Enzymtests untersucht. Die Mutation im *sll1797* Gen führte zu einem vollständigen Verlust des Plastochinons in *Synechocystis*, war aber durch exogenes 4-Hydroxybenzoat komplementierbar. *In vivo* Markierungsversuche zeigten, dass 4-Hydroxybenzoat von *Synechocystis* in Plastochinon eingebaut wurde, Homogentisat, die Ausgangssubstanz in der pflanzlichen Plastochinon-Biosynthese, hingegen nicht. Darüber hinaus setzte das Sll1797-Protein bei *in vitro* Enzymtests Chorismat zu 4-Hydroxybenzoat um. Diese Versuchsergebnisse zeigten somit, dass *sll1797* eine Chorismatlyase kodiert, die den ersten entscheidenden Schritt in der cyanobakteriellen Plastochinon-Biosynthese katalysiert.

4-Hydroxybenzoat wird dann durch eine bereits charakterisierte 4-Hydroxybenzoat-Solanesyltransferase in 4-Hydroxy-3-solanesylbenzoat überführt, das im nächsten Schritt der Plastochinon-Biosynthese als Substrat für spezifische Decarboxylasen (Slr1099 und Sll0936) dient (Sadre et al, 2012). Mit Hilfe verschiedener unabhängiger Versuche gelang es, das Slr1099-Protein eindeutig als 4-Hydroxy-3-solanesylbenzoat-Decarboxylase zu identifizieren. Im Unterschied zum Slr1099-Protein war bei *in vitro* Enzymtests mit dem Sll0936-Protein keine Decarboxylaseaktivität nachweisbar. Weitere Versuchsergebnisse, insbesondere der Phänotyp der *Synechocystis* Mutante mit einem Defekt im *sll0936* Gen, lieferten aber klare Hinweise,

dass neben dem *slr1099* Gen auch das *sll0936* Gen für die Decarboxylierung von 4-Hydroxy-3-solanesylbenzoat im Plastochinon-Biosyntheseweg erforderlich ist. Schließlich deuteten Versuche mit dem *slr1300* Gen darauf hin, dass es eine Hydroxylase kodiert, die die Hydroxylierung von 2-Solanesylphenol zu 2-Solanesyl-1,4-benzochinon katalysiert.

Kapitel 1 Einleitung

1.1 Cyanobakterien

Die unmittelbaren Vorfahren rezenter Cyanobakterien waren vermutlich die ersten Organismen auf der Erde, die die fundamentale biochemische Eigenschaft besaßen Wasser als Quelle für Elektronen zu nutzen. Die daraus resultierende Anreicherung der Erdatmosphäre mit elementarem Sauerstoff ermöglichte schließlich die Entwicklung des Lebens auf der Erde, wie wir es heute kennen. Seit über 3,4 Milliarden Jahren besiedeln Cyanobakterien die unterschiedlichsten Ökosysteme der Erde, angefangen bei den Ozeanen über Süßwasserseen und Flüsse bis hin zu heißen Quellen (Knoll, 2008).

Besonders in den Zeiten des Klimawandels sind Cyanobakterien wieder in den Fokus der Forschung getreten, da sie für etwa die Hälfte der globalen CO_2-Fixierung verantwortlich sind (Bryant, 2003). Neben dem steigenden Interesse biotechnologischer Anwendungen zur Gewinnung von Biokraftstoffen, gelten Cyanobakterien auch als wichtige Modellorganismen in der Grundlagenforschung, da sie als einziger Bakterienstamm zur oxygenen Photosynthese befähigt sind. Insbesondere wegen ihrer Rolle als Vorgänger der Chloroplasten, sind sie im Bereich der Photosynthese und der Elekronenübertragung in der Photosynthese wissenschaftlich von besonderem Interesse. Die Thylakoidmembranen der Cyanobakterien und der Chloroplasten sind mit sehr ähnlichen Photosynthesesystemen ausgestattet, in denen Plastochinon einen der wichtigsten mobilen Elektronenüberträger darstellt. Im Unterschied zu den Chloroplasten sind in den Thylakoidmembranen der Cyanobakterien, neben den Photosynthesekomplexen, auch die Komplexe der Atmungskette lokalisiert (Schultze et al, 2009). In Pflanzen hingegen befinden sich die Atmungskettenkomplexe in den Mitochondrien zwischen

denen der Elektronentransport von Ubichinon vermittelt wird. Im Gegensatz zu den meisten Pro- und Eukaryoten, besitzen Cyanobakterien kein Ubichinon (Collins & Jones, 1981). In der cyanobakteriellen Atmungskette übernimmt stattdessen Plastochinon die Funktion des Ubichinons. Plastochinon gilt daher als der wichtigste, nichtproteinogene Elektronenüberträger innerhalb und zwischen dem respiratorischen und photosynthetischen Elektronentransport der Cyanobakterien.

1.2 Plastochinon

Plastochinon gehört zur Stoffgruppe der Isoprenoidchinone und besitzt einen 1,4-Benzochinonring mit zwei Methyl-Gruppen an den Positionen 2 und 3 und eine aliphatische Seitenkette an Position 5 (Abbildung 1). In Cyanobakterien besteht die Seitenkette in der Regel aus neun Isopren-Einheiten (Plastochinon-9), also 45-C-Atomen. Mit der Seitenkette ist das Molekül vermutlich so in der Biomembran verankert, dass sich die Kopfgruppe des Plastochinons außerhalb der lipophilen Biomembrandomäne befindet, wodurch sich das Molekül frei in der Lipidschicht bewegen kann. Der Elektronen- und Protonentransport wird durch die Oxidation von Plastochinon (PQ) bzw. durch die Reduktion von Plastochinol (PQH_2) ermöglicht (Abbildung 1). Neben den beiden dominanten Formen des Plastochinons (PQ, PQH_2) entstehen bei der Redoxreaktion verschiedene, weniger stabile Übergangsformen, wie z.B. das in Abbildung 1 dargestellte Semiplastochinon-Radikal.

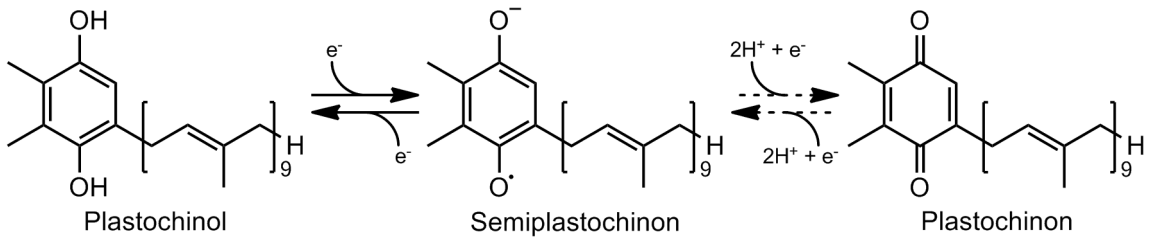


Abbildung 1: Oxidation und Reduktion von Plastochinon

Plastochinon besteht aus einer polaren Kopfgruppe und einer aliphatischen Isoprenoid-Seitenkette. In der cyanobakteriellen photosynthetischen und respiratorischen Elektronentransportkette wird Plastochinol über Semiplastochinon reversibel zu Plastochinon oxidiert.

Typischerweise besitzen die meisten Cyanobakterien neben der Plasmamembran auch Thylakoidmembranen, die sich innerhalb des Cytosols befinden und das Lumen umschließen. In beiden Membransystemen sind die Komplexe der Atmungskette lokalisiert, jedoch befinden sich nur in den Thylakoidmembranen die Komponenten der Photosynthese (Peschek, 2011). Die Elektronen werden in beiden Membransystemen, sowohl im respiratorischen als auch im photosynthetischen Elektronentransport, von Plastochinon übertragen.

In der Photosynthese wird die Lichtenergie zunächst von den, für Cyanobakterien typischen Lichtsammelkomplexen, bestehend aus Phycobillisomen und chlorophyll-/carotinoidhaltigen Antennenkomplexen, eingefangen. Die Energie wird vom Lichtsammelkomplex direkt auf das Photosystem II übertragen, wodurch Wasser in Sauerstoff, Protonen und Elektronen gespalten wird (Abbildung 2). Die Elektronen werden dann im Photosystem II auf Pheophytin transferiert und danach auf fest gebundenes Plastochinon an der Q_a-Seite des Photosystem II weitergeleitet. Ein weiteres Plastochinon an der Q_b-Seite stellt den terminalen Elektronenakzeptor im Photosystem II dar. Sobald das Plastochinon doppelt reduziert ist, nimmt es zwei Protonen aus dem Stroma auf und verlässt das Photosystem II als Plastochinol. Während die Q_b-Seite von einem neuen Plastochinon-Molekül aufgefüllt wird, diffundiert das Plastochinol zum Cytochrom b_6f-Komplex und wird dort im sogenannten Q-Zyklus wieder oxidiert. Dadurch werden die Protonen in das Lumen transferiert und die Hälfte der Elektronen auf ein weiteres Plastochinon-Molekül im Cytochrom b_6f-Komplex weitergeleitet (Peschek et al, 2011). Die andere Hälfte der Elektronen wird auf Cytochrom *c* (oder Plastocyanin) übertragen (Peschek et al, 1994), welches die Elektronen entweder auf die Terminale-Cytochrom *c*-Oxidase (aa_3-Cytochrom *c*-Oxidase, *ctaI*) oder auf das Photosystem I überträgt (Abbildung 2) (Pils & Schmetterer, 2001). Vom Photosystem I werden die Elektronen schließlich über Ferredoxin (oder Flavodoxin) auf die Ferredoxin-$NADP^+$-Reduktase transferiert, die Reduktionsäquivalente in Form von NADPH bereitstellt (Peschek et al, 2011).

Die Elektronen der Atmungskette werden in den Thylakoidmembranen, durch die Oxidation von Succinat zu Fumarat, über die Succinat-Dehydrogenase (SDH) und durch die Oxidation von NADPH zu $NADP^+$ über die NADPH-Dehydrogenase (NDH-1), bereitgestellt (Abbildung 2) (Cooley et al, 2001 ; Zang et al, 2004). Neben der NDH-1 gibt es in Cyanobakterien auch noch eine NADH-Dehydrogenase (NDH-2). Diese ist im Gegensatz zur NDH-1 aber nicht in der Lage Protonen zu pumpen (Howitt et al, 1999; Friedrich et al, 1995). Die Elektronen

der Atmungskette werden, wie die Elektronen aus der Photosynthese, in den gemeinsamen Plastochinon-Pool eingeschleust und auf Cytochrom $b_6 f$ übertragen. Durch die oxidative Phosphorylierung mit ATPasen wird schließlich ATP bereitgestellt.

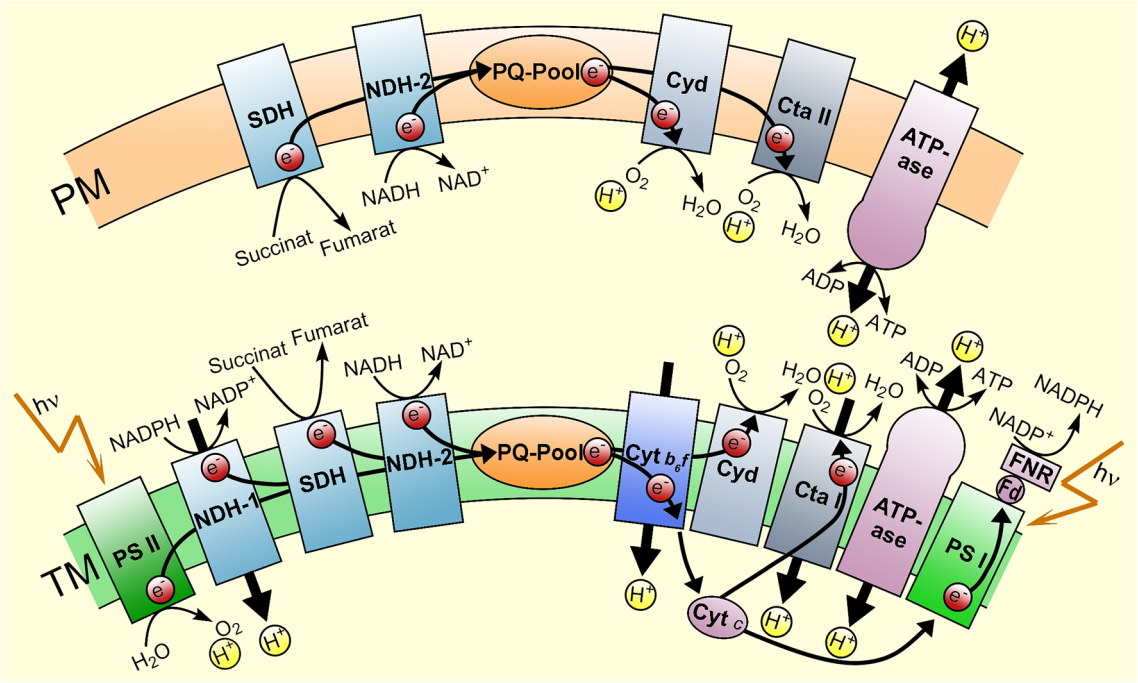


Abbildung 2: Photosynthetischer und respiratorischer Elektronentransport in Cyanobakterien
(Nach Schultze et al, 2009, Peschek, 2011) Die Elektronenübertragung und die ATP Synthese ist in Cyanobakterien auf zwei Membransysteme aufgeteilt. In der Plasmamembran (PM) befindet sich eine rudimentäre Atmungskette, die aus einer Succinat-Dehydrogenase (SDH) und einer Typ-2 NADH-Dehydrogenase (NDH-2) besteht. Die Elektonen werden von dort über den Plastochinon-Pool (PQ-Pool) zu einer aa_3-ähnliche Cytochrom *c*-Oxidase (*ctaII*) oder auf die Cytochrom *bd*-Oxidase (*cyd*) übertragen. In den Thylakoidmembranen werden die Komplexe der Atmungskette durch eine NADPH-Dehydrogenase (NDH-1) ergänzt, die im Gegensatz zu NDH-2 Protonen pumpt. Als Terminale-Cytochrom *c*-Oxidase dient in den TM eine aa_3-Cytochrom *c*-Oxidase (*ctaI*), die im Unterschied zu *ctaII* auch in der Lage ist Protonen zu pumpen. Neben den respiratorischen Komplexen befinden sich in den Thylakoidmembranen auch die Komplexe der Photosynthese. Plastochinon überträgt dort sowohl die Elektronen vom Photosystem II als auch die Elektronen der Atmungskette. Als Schnittstelle zwischen den beiden Elektronentransportwegen fungiert der Cytochrom $b_6 f$ Komplex (Cyt $b_6 f$), der die Elektronen über Cytochrom *c* (Cyt *c*) entweder auf *ctaI* oder das Photosystem I (PS I) weiterleitet. Vom PS I werden die Elektronen auf Ferredoxin (Fd) übertragen, die schließlich über die Ferredoxin-$NADP^+$-Reduktase (FNR) der NADPH Gewinnung dienen. In beiden Membransystemen wird durch oxidative Phosphorylierung mit ATPasen ATP bereitgestellt.

Im Gegensatz zu den Thylakoidmembranen befindet sich in der Plasmamembran weder der Cytochrom b_6f Komplex noch die NDH-1 (Schultze et al, 2009; Ohkawa et al, 2001). Daraus wurde geschlussfolgert, dass sich in der cyanobakteriellen Plasmamembran eine unvollständige Atmungskette befindet, die aus der SDH, der NDH-2 sowie einer Chinol Oxidase (Cytochrom *bd*-Oxidase, *cyd*) und einer terminalen Oxidase (aa_3-ähnliche Cytochrom *c*-Oxidase, *ctaII*) besteht (Schultze et al, 2009; Pils & Schmetterer, 2001; Ohkawa et al, 2001; Howitt et al, 1999). In der Plasmamembran sind außer den ATPasen keine weiteren protonenpumpenden Komplexe lokalisiert (Peschek, 2011). Neben den essentiellen Aufgaben in der Elektronenübertragung, fungiert Plastochinon auch als Effektor in der Carotinoid-Biosynthese, da in Pflanzen die Elektronen bei der Carotinoid-Desaturierungsreaktion auf Plastochinon übertragen werden (Norris et al, 1995). Durch die Veränderungen im Redoxstatus der Zellen ist Plastochinon indirekt in der Lage die Expression zahlreicher Gene zu beeinflussen (Pfannschmidt, 2003; Adamiec et al, 2008; Dietz & Pfannschmidt, 2011). Auch die Aktivierung spezifischer Kinasen wird mit dem Redoxstatus des Plastochinon-Pools in Verbindung gebracht (Vender et al, 1997). Mit einer cyanobakteriellen Phyllochinon-Mutante (*menB*) konnte zudem gezeigt werden, dass Phyllochinon von Plastochinon im Photosystem I partiell ersetzt werden kann, indem es dort an die A_1-Seite bindet und den Elektronentransport von der A_0-Seite zum FeS-Cluster vermittelt (Johnson et al, 2000; Chauvet et al, 2012). Ob auch Plastochinon von Phyllochinon ersetzt werden kann, wurde bisher nicht beschrieben.

1.3 Plastochinon-Biosynthese

Isoprenoidchinone finden sich, mit Ausnahme von wenigen obligat anaeroben gram-negativen Bakterien und manchen methanogenen Archaeen, in nahezu allen lebenden Organismen (Collins & Jones, 1981; Beifuss & Tietz, 2005). Obwohl sich die verschiedenen Isoprenoidchinone oftmals deutlich in ihren Funktion unterscheiden, sind sie strukturell sehr ähnlich aufgebaut. Typischerweise synthetisieren die meisten Organismen Isoprenoidchinone aus einer polaren Kopfgruppe und einer hydrophoben Seitenkette. So werden beispielsweise die Isoprenoide, in den Mitochondrien der Pflanzen und vielen anderen Eukaryoten, aus drei Acetyl-CoA-Einheiten über den Mevalonat-Biosyntheseweg hergestellt (Miziorko, 2011).

Cyanobakterien, Eubakterien, Algen und pflanzlichen Chloroplasten synthetisieren die Isoprenoid-Seitenkette hingegen über den Mevalonat-unabhängigen Biosyntheseweg (Abbildung 3) (Hunter, 2007). Dort beginnt die Isoprenoid-Synthese mit der Kondensation von Pyruvat und Glyceraldehyd-3-phosphat zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (Abbildung 3).

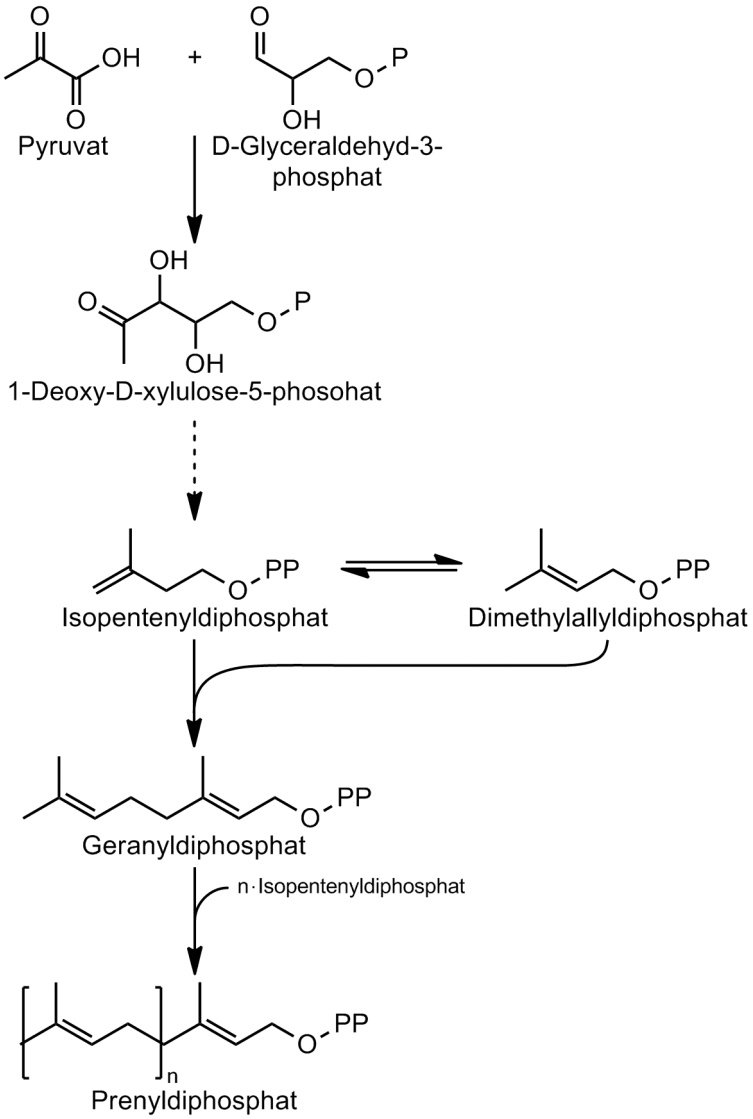


Abbildung 3: Isoprenoid-Biosynthese über den Mevalonat-unabhäniger Weg

1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat wird aus Pyruvat und Glyceraldehyd-3-phosphat synthetisiert. Danach folgen sieben weitere Schritte zum Isopenteyldiphosphat bzw. Dimethylallyldiphosphat. Beide Doppelbindungsisomere werden zu Geranyldiphosphat kondensiert. Durch weitere Kondensationsschritte mit Isopentenyldiphosphat kann die Geranyldiphosphatkette schrittweise verlängert werden (Hunter, 2007).

In sieben weiteren Schritten erfolgt die Katalyse zum Isopentenyldiphosphat bzw. zu Dimethylallyldiphosphat. Beide Substanzen werden dann zu Gernalydiphosphat kondensiert, das durch

weitere Kondesationsschritte mit Isopentenyldiphosphat verlängert werden kann (Hunter, 2007). Die Seitenketten der meisten Isoprenoidchinone bestehen aus zwei bis zehn Isopren-Einheiten. Dabei ist es auch möglich, dass ein Organismus eine Isoprenoidchinon-Spezies mit unterschiedlichen Seitenkettenlängen besitzt. Außerdem können die Seitenketten modifiziert werden, sodass zum Beispiel durch die Reduktion bestimmter Doppelbindungen aus Geranylgeranyldiphosphat Phytyldiphosphat synthetisiert wird (Keller et al, 1998). Im Unterschied zur Synthese der Isoprenoid-Seitenkette, ist die Synthese der Kopfgruppe um ein vielfaches komplexer. In nahezu allen Organismen ist Chorismat, das über den Shikimatweg-Weg synthetisiert wird, die Ausgangssubstanz für die Synthese der Kopfgruppen (Herrmann, 1995). In Abbildung 4 sind vom Chorismat ausgehend einige Syntheseschritte dargestellt, die für die Kopfgruppen-Synthese in den jeweiligen Organismen typisch sind. Pflanzen können auf verschiedenen Wegen Metabolite bereitstellen, die als Kopfgruppe dienen. So synthetisieren sie beispielsweise Phenylanlanin, das über den Phenylpropanoid-Weg schließlich zu 4-Hydroxybenzoat umgesetzt wird und als Vorstufe in die Ubichinon-Biosynthese einfließt (Löscher & Heide, 1994; Swiezewska, 2004). Homogentisat wird in Pflanzen über Tyrosin und Hydroxyphenylpyruvat hergestellt und dient als Vorstufe in der Plastochinon Biosynthese (Lopukhina et al, 2001; Löffelhardt & Kindl, 1979). Säugetiere besitzen keine Gene für den Shikimat-Weg und müssen daher die essentiellen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin mit der Nahrung aufnehmen, aus denen sie schließlich 4-Hydroxybenzoat für die Ubichinon-Biosynthese herstellen können (Olson et al, 1963; Parson & Rudney, 1964). Ebenso müssen Säugetiere einige weitere essentielle Substanzen aufnehmen, die aus dem Shikimat-Weg hervorgehen. Dazu gehören insbesondere die beiden Isoprenoidchinone Vitamin K1 (Phyllochinon) und Vitamin K2 (Menachinon) (Shearer, 1992). Um Phyllochinon zu synthetisieren, setzen Pflanzen und Cyanobakterien Chorismat zu Isochorismat um (Nowicka & Kruk, 2010). Auf gleichem Wege wird auch Menachinon in Bakterien synthetisiert, das nicht wie Phyllochinon eine Phytyl-Seitenkette besitzt, sondern eine Geranylgeranyl-Seitenkette (Meganathan, 2001a). Mit der direkten Umsetzung von Chorismat zu 4-Hydroxybenzoat über eine Chorismatlyase stellen Eubakterien hingegen die Vorstufe für die Ubichinon-Biosynthese her (Meganathan, 2001b).
Einige Organismen verwenden auch "untypische" Stoffwechselprodukte für die Synthese der Kopfgruppe. Hefen verwenden beispielsweise neben 4-Hydroxybenzoat auch 4-Aminobenzoat als Vorstufe für die Ubichinon-Biosynthese (Roux &Walsh, 1993; Ozeir etal, 2011).

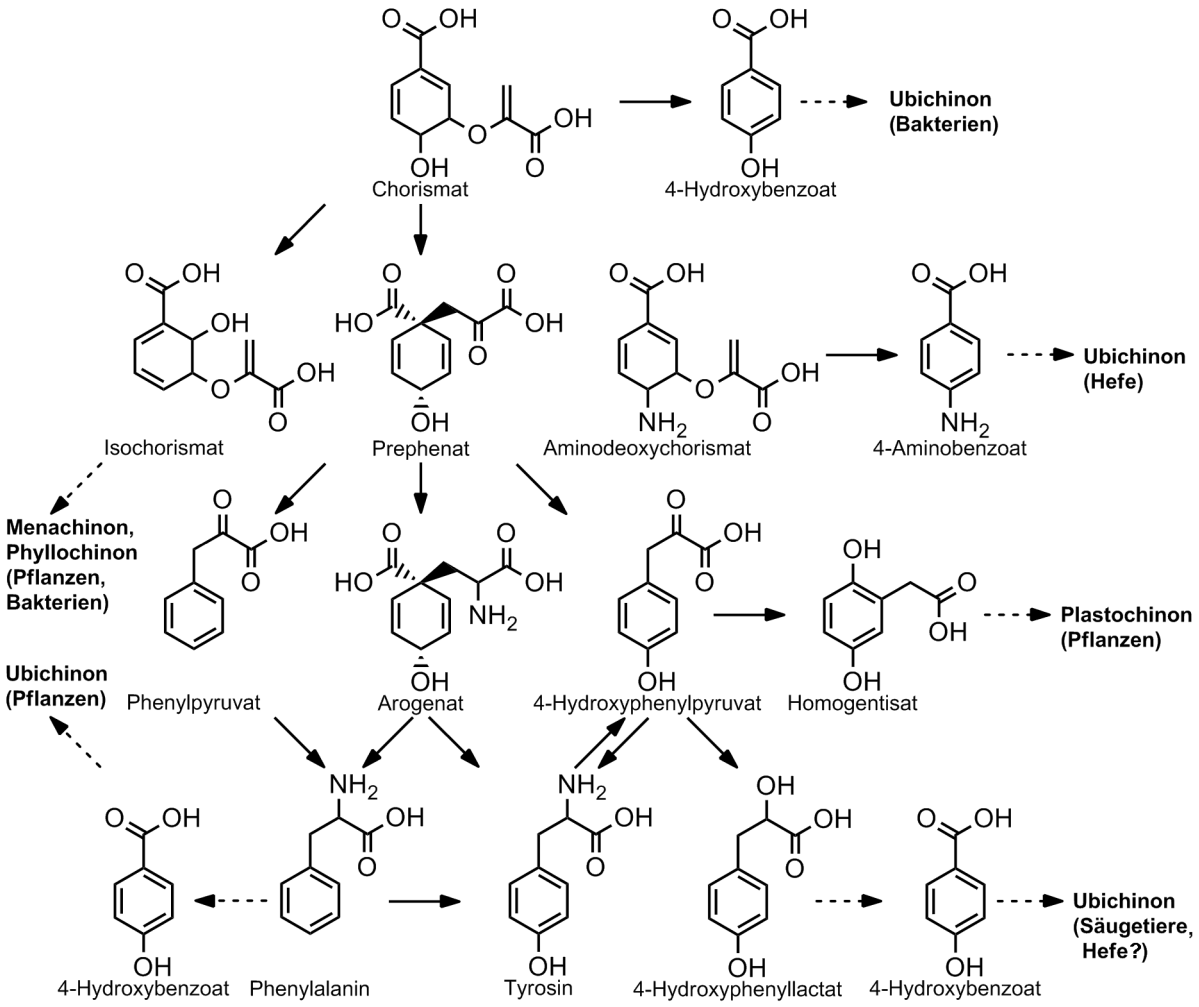


Abbildung 4: Biosynthesewege von Isoprenoidchinon-Kopfgruppen in unterschiedlichen Organismen
Chorisamt ist eine Verzweigungsstelle in den Biosynthesewegen verschiedener Organismen für unterschiedliche Isoprenoidchinone, wie beispielsweise Plastochinon, Ubichinon, Menachinon und Phyllochinon.

Welche Substanz die cyanobakterielle Plastochinon-Biosynthese initiiert, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit nicht bekannt. In der pflanzlichen Plastochinon-Biosynthese katalysiert eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase die Umsetzung von 4-Hydroxyphenylpyruvat zu Homogentisat, das dann sowohl als Vorstufe in der Tocopherol- als auch in der Plastochinon-Biosynthese dient (Abbildung 5) (Löffelhardt & Kindl, 1997; Norris et al, 1998). Für die Plastochinon-Biosynthese wird das Homogentisat von einer Solanesyltransferase prenyliert und gleichzeitig decarboxyliert (Norris et al, 1995). Im nächsten Schritt wird das Methylsolanesylbenzochinon (MSBQ) über eine Methyltransferase zu Plastochinon umgesetzt (Shintani et al, 2002). In der Tocopherol-Biosynthese wird von einer Phytyltransferase entsprechend eine Phytyl-Seitenkette auf Homogentisat übertragen und die Formyl-Gruppe

abgespalten (Collakova & DellaPenna, 2001). Das Methylphytylbenzochinon (MPBQ) wird anschließend über einen Zyklisierungsschritt und verschiedene Methylierungsschritt zu den entsprechenden Tocopherolen synthetisiert (Sattler et al, 2003; Shintani et al, 2002; Cheng et al, 2003).

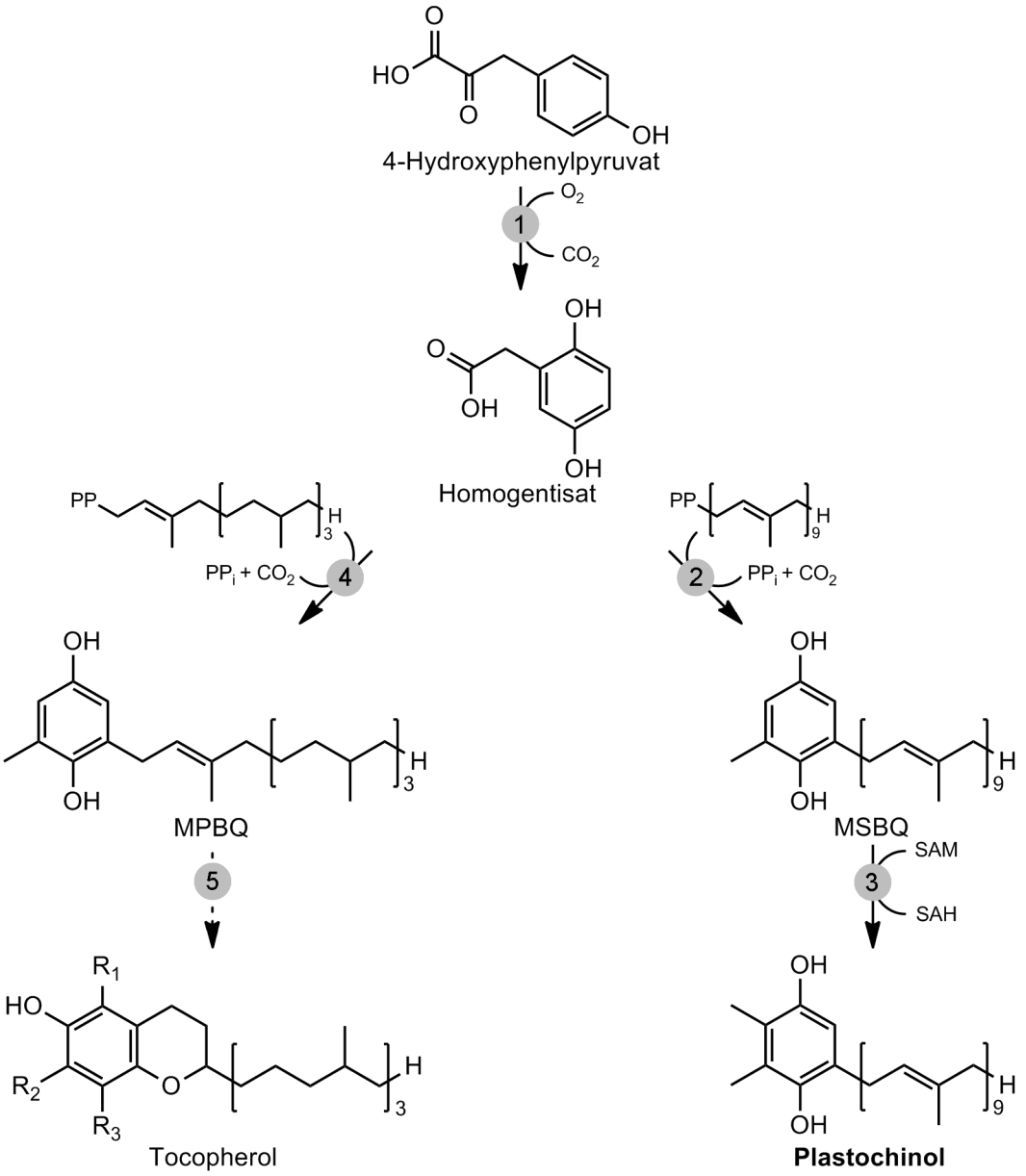


Abbildung 5: Tocopherol-Biosynthese in Pflanzen und Cyanobakterien und Plastochinon-Biosynthese in Pflanzen
4-Hydroxyphenylpyruvat wird von einer Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (1) zu Homogentisat umgesetzt und dann mit einer Homogentisat-Solanesyltransferase (2) zu 2-Methyl-6-solanesyl-1,4-benzochinon (MSBQ) synthetisiert. MSBQ wird mit S-Adenosylmethionin (SAM) durch eine MSBQ-Methyltransferase (3) zu Plastochinon methyliert, SAM reagiert dabei zu S-Adenosyl-L-homocystein (SAH). In der Tocopherol-Synthese wird Homogentisat über eine Homogentisat-Phytyltransferase (4) zu 2-Methyl-6-phytyl-1,4-benzochinon MPBQ) umgesetzt, zyklisiert und an verschiedenen Stellen methyliert (5) (α-Tocopherol: R_1, R_2, R_3: -CH_3; β-Tocopherol: R_1, R_3: -CH_3, R_2: -H; γ-Tocopherol: R_1: -H, R_2, R_3: -CH_3; δ-Tocopherol: R_1, R_2: -H, R_3: -CH_3).(PP_i, Diphosphat)

Diese Daten haben auch gezeigt, dass der Tocopherol-Biosyntheseweg zwischen Cyanobakterien und Pflanzen konserviert ist. Im Gegensatz zu Pflanzen zeigte eine cyanobakterielle Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Mutante erstaunlicherweise, dass Homogentisat zwar für die Tocopherol-Biosynthese notwendig ist, nicht aber für die Plastochinon-Biosynthese (Dähnhardt et al, 2002). Daher muss es in Cyanobakterien einen alternativen oder zusätzlichen Plastochinon-Biosyntheseweg geben, der sich von dem in Pflanzen deutlich unterscheidet. Obwohl in Cyanobakterien kein Ubichinon nachweisbar ist (Collins & Jones, 1981), besitzen Cyanobakterien dennoch Gene mit Ähnlichkeiten zu *E. coli* Genen, die für Enzyme der Ubichinon-Biosynthese kodieren. Daher schlugen Dähnhardt et al (2002) vor, dass die Plastochinon-Biosynthese in Cyanobakterien ähnlich ablaufen könnte wie die Ubichinon-Biosynthese in *E. coli*. Die Untersuchungen zur Ubichinon-Biosynthese in *E. coli* begannen Mitte der 1960er Jahre und sind bis heute Bestandteil aktueller Forschung. *In vivo* Markierungsversuche, die Analyse von Ubichinon-Intermediaten in Ubichion-Defektmutanten und Enzymaktivitätstests, ermöglichten dabei eine nahezu vollständige Aufklärung des Ubichion-Biosynthesewegs (Abbildung 6) (Cox et al, 1968; Cox et al, 1969; Alexander & Young, 1978). Eines der am besten untersuchten Enzyme in der Ubichinon-Biosynthese ist die Chorismatlyase (UbiC), die gleichzeitig auch den ersten entscheidenden Schritt von Chorisamt zu 4-Hydroxybenzoat katalysiert (Siebert et al, 1994). Die Prenylierung von 4-Hydroxybenzoat zu 4-Hydroxy-3-prenylbenzoat wird über eine membrangebundene 4-Hydroxybenzoat-Prenyltransferase (UbiA) ausgeführt (Hachimi et al, 1974), die als Substrat Seitenketten mit zwei bis zehn Isopren-Einheiten akzeptiert (Melzer & Heide, 1993). Das entstandene 4-Hydroxy-3-prenylbenzoat wird dann zu 2-Prenylphenol decarboxyliert. Für diesen Schritt sind die beiden Enzyme UbiX und UbiD verantwortlich (Gulmezian et al, 2007; Zhang & Javor, 2000). Im nächsten Schritt wird 2-Prenylphenol von der kürzlich beschriebenen Hydroxylase, UbiI, zu 2-Hydroxy-6-Prenylphenol umgesetzt (Chehade et al, 2013). Bisher wurde vermutet, dass UbiB diesen Schritt katalysiert, da eine Δ*ubiB* Mutante 2-Octaprenylphenol akkumulierte (Poon et al, 2000). Allerdings wurde auch beobachtet, dass eine Δ*ubiG* Mutante 2-Octaprenylphenol akkumuliert. Von UbiG wird die Hydroxy-Gruppe aus dem vorangegangenen Synthese-Schritt zu 2-Methoxy-6-prenylphenol methyliert (Hsu et al, 1996). Anschließend finden alternierend noch je zwei Hydroxylierungen (UbiH und UbiF) und Methylierungen (UbiE und UbiG) bis zum Ubichinon statt (Nakahigashi et al, 1992; Kwon et al, 2000; Lee et al, 1997).

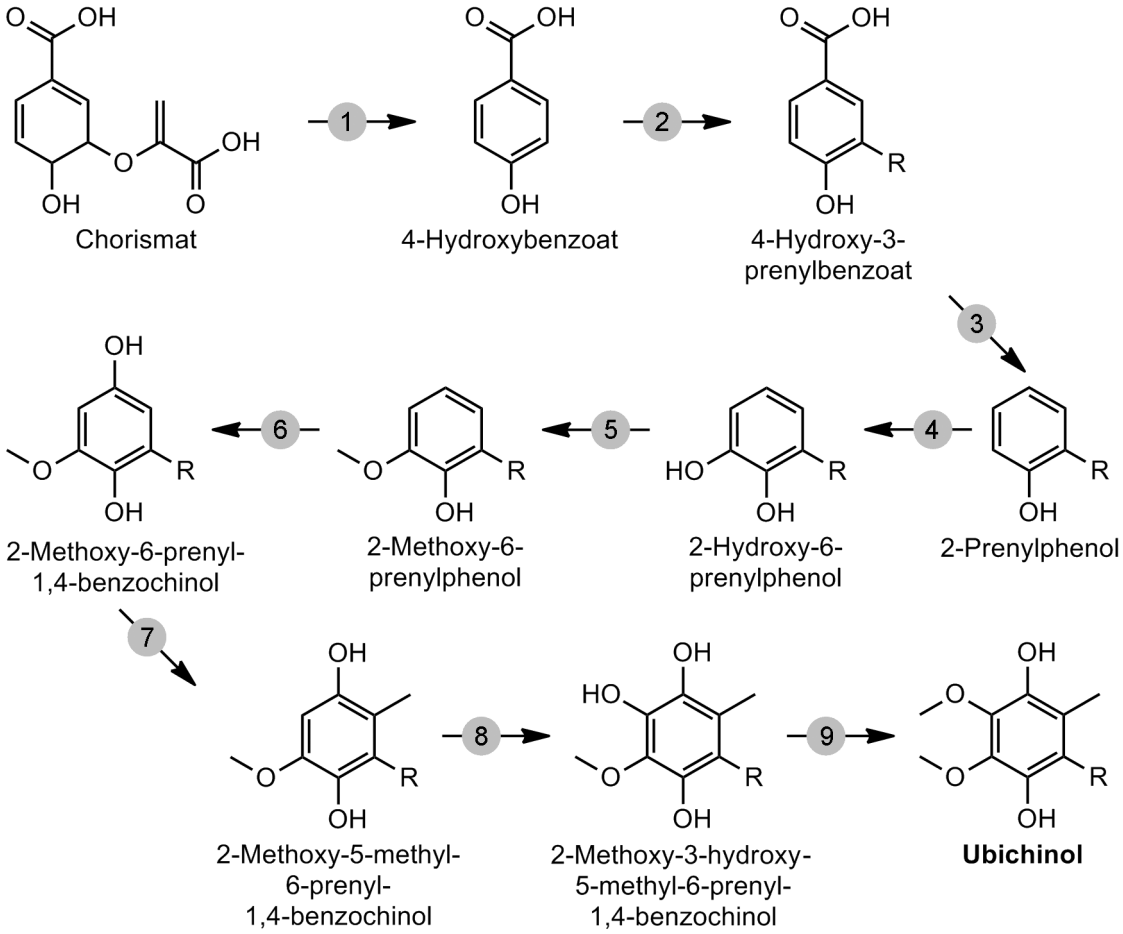


Abbildung 6: Ubichinon-Biosynthese in *E. coli*

Ausgehend von Chorismat wird 4-Hydroxybenzoat über eine Chorismatlyase (UbiC) (1) synthetisiert. Danach wird 4-Hydroxybenzoat von einer Prenyltransferase (UbiA) (2) prenyliert und anschließend über eine oder mehrere Decarboxylasen (UbiX/UbiD) (3) decarboxyliert. Im nächsten Schritt wird 2-Prenylphenol an Position 6 hydroxyliert (UbiI) (4). Darauf folgen alternierend drei Methylierungsschritte (UbiG (5), UbiE (7), UbiG(9)) und zwei weitere Hydroxylierungsschritte (UbiH (6), UbiF (8)).

Obwohl *Synechocystis* kein Ubichinon synthetisieren, besitzt das *Synechocystis* Genom Sequenzen die deutliche Ähnlichkeiten zu den beschrieben *ubi*-Gene von *E. coli* aufweisen. Basierend auf diesen Daten, sowie den beschriebenen Analysedaten der *Synechocystis* Mutante (Dähnhardt et al, 2002), wurde der in Abbildung 7 dargestellte Plastochinon-Biosyntheseweg in Cyanobakterien vorgeschlagen, der sich deutlich von dem in Pflanzen unterscheidet (Abbildung 5). Demnach verwenden Cyanobakterien anstelle von Homogentisat 4-Hydroxybenzoat zur Biosynthese, das wahrscheinlich aus Chorismat produziert wird (Abbildung 6, Schritt 1; [Abb. 6, (1)]).

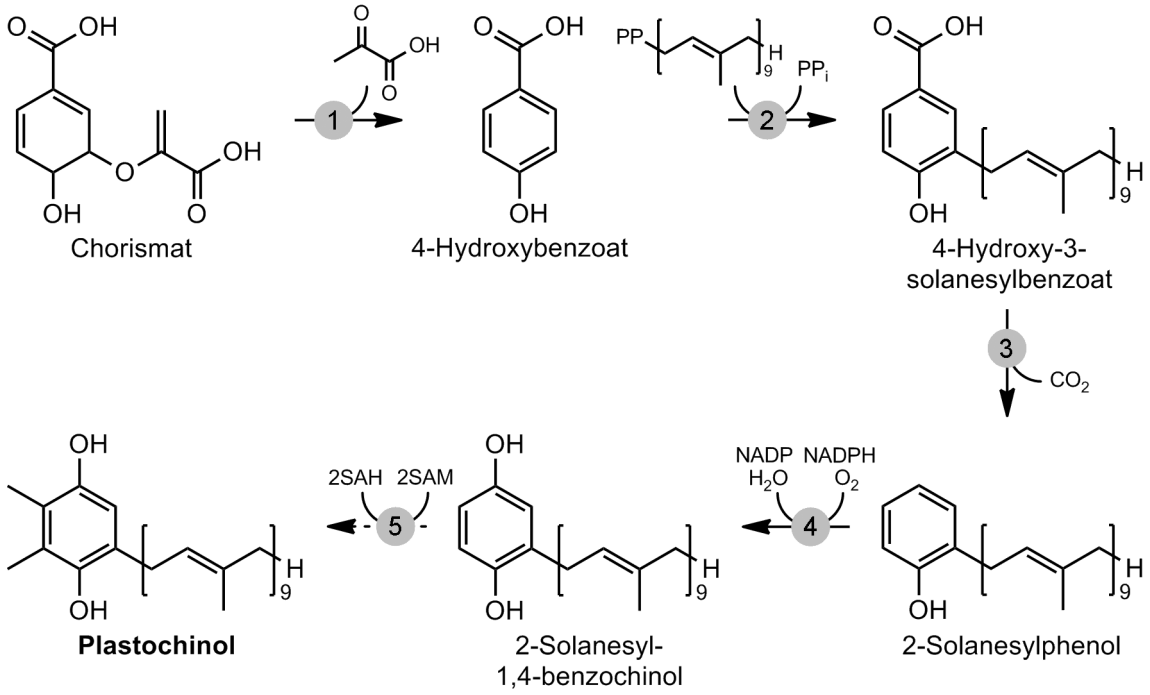


Abbildung 7: Postulierter Plastochinon-Biosyntheseweg in Cyanobakterien

Ausgehend von Chorismat könnte in Cyanobakterien 4-Hydroxybenzoat über eine Chorismatlyase (1) synthetisiert werden. 4-Hydroxybenzoat kondensiert dann mit Solanesyldiphosphat über eine 4-Hydroxybenzoat-Solanesyltransferase (2) zu 4-Hydroxy-3-solanesylbenzoat. Anschließend folgt ein Decarboxylierung (3) und eine Hydroxylierung (4). In den letzten beiden Schritten werden die Methyl-Gruppen von zwei S-Adenosylmethionin (SAM) über verschiedenen Methyltransferasen (5) an die Positionen 2 und 3 gebunden. Das SAM reagiert dabei zu S-Adenosyl-L-homocystein (SAH). (PP_i, Diphosphat)

Entsprechend zu der *E. coli* Ubichinon-Biosnythese wird dann 4-Hydroxybenzoat von einer Prenyltransferase zu 2-Solanesylphenol prenyliert [Abb. 6, (2)]. Die Sequenzvergleiche zwischen Cyanobakterien und *E. coli* deuten darauf hin, dass anschließend die Decarboxylierung von 4-Hydroxy-3-solanesylbenzoat zu 2-Solanesylphenol über zwei verschiedene Decarboxylasen ablaufen könnte [Abb. 6, (3)]. Im Gegensatz zu Ubichinon besitzt Plastochinon an den Positionen 2 und 3 keine Methoxy-Gruppen sondern Methyl-Gruppen, daher folgt vermutlich auf den Decarboxylase-Schritt eine Hydroxylierung von 2-Solanesylphenol zu 2-Solanesyl-1,4-benzochinol [Abb. 6, (4)]. Anschließend folgen zwei Mehtylierungsschritt, wobei der zweite Schritt von der Sll0418 Methyltransferase katalysiert wird (Shintani et al, 2002) [Abb. 6, (5)].

1.4 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit sollte Aufschluss über den Ablauf der cyanobakteriellen Plastochinon-Biosynthese geben. Es war bekannt, dass es in Cyanobakterien einen Plastochinon-Biosyntheseweg geben muss, der sich von dem in Pflanzen deutlich unterscheidet (Dähnhardt et al, 2002). Mit dem bereits vollständig sequenzierten Cyanobakterienstamm *Synechochystis* sp. PCC 6803 (Kaneko et al, 1996) sollte zunächst in *in vivo* Markierungsversuchen überprüft werden, welche aromatische Vorstufe in Plastochinon eingebaut wurde. Die Informationen zur cyanobakteriellen Plastochinon-Biosynthese wurden zusätzlich mit den Ergebnissen aus Datenbank-Analysen und *in silico* Vorhersagemodellen ergänzt. Komplementationsstudien in *E. coli* Ubichinon-Defektmutanten sollten zeigen, ob die *Synechocystis* Gene die Aufgabe der ausgeschalteten *E. coli* Gene übernehmen können. Es war außerdem geplant die *Synechocystis* Gene heterolog in *E. coli* zu exprimieren, um die katalytischen Eigenschaften der Enzyme und die Lokalisation von Fusionsproteinen in den unterschiedlichen Zellfraktionen auch *in vitro* zu bestimmen. In *Synechocystis* Zellen sollten die Gene durch genetische Manipulation ausgeschaltet werden, um ihren Einfluss auf die Plastochinon-Biosynthese *in situ* zu untersuchen.

Kapitel 2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte & Chemikalien

Tabelle 1: Geräteverzeichnis mit Herstellerangaben

Bezeichnung	Hersteller
StepOne Plus Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Liquid phase oxygen electrode chamber	Hansatech
A1R-A1 Confocal Microscope System	Nikon
Mikroskop VHX-600	Keyence
Photometer Smartspec	Biorad
pH-Meter HI9321	Hanna Instruments
Thermocycler Mastercycler Gradient R	Eppendorf
Thermocycler Primus96	Mwg-Biotech
Micro Pulse-Elektroporator	Biorad
Genepulser Xcell	Biorad
Homogenisator	Fastprep
UV-Transilluminator UVT-20M	Herolab
Ultraschallstab Sonoplus GM70	Bandelin
Thermomixer comfort	Eppendorf
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf
Kühlzentrifuge RC-5B	Sorvall
Optima L-100 XP Ultrazentrifuge	Beckman-Coulter
Rotavapor R-200	Büchi
Vakuumpumpe	Ilmvac
Rotoren 60.Ti, 70.Ti	Beckman

Fortsetzung Tabelle 1

Rotor Fiberlite F10S-6x500y	Thermo Scientific
Flüssigkeitsszintillationszähler LS 6500	Beckman-Coulter
Bio-Imager FLA-3000	Fujifilm
LAS-1000	Fujifilm
HPLC-System:	
Series 1100	Hewlett Packard
Ramona 2000	Raytest

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Applichem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Soilgen (Aachen) und Duchefa (Haarlem, Niederlande) bezogen, Radioaktivchemikalien von Hartmann-Analytic (Braunschweig). Antikörper wurden von Roche (Grenzach-Wyhlen) und GE-Healthcare (Freiburg) erworben. DNA- und RNA-Modifizierende Enzyme wurden von den Firmen NEB (Frankfurt), Biozym (Hessisch Oldendorf) und Thermo Scientific (Schwerte) erworben, Oligonukleotide von Eurofins MWG Operon (Ebersberg). Produkte für die Chromatographie sowie Protein- und DNA-Aufreinigung wurden von Macherey-Nagel (Düren) bezogen.

2.1.2 Verwendete Organismen

Tabelle 2: Verwendete Organismen

Spezies	Stamm	Referenz/Quelle
Escherichia coli	TOP10	Life technologies, Darmstadt
Escherichia coli	BL21AI	Life technologies, Darmstadt
Escherichia coli	BW25113	Baba et al, 2006
Escherichia coli	AN66	Cox et al, 1969
Escherichia coli	JW2308-4	Baba et al, 2006
Escherichia coli	JW2875-1	Baba et al, 2006
Escherichia coli	JW5713-1	Baba et al, 2006
Synechocystis	PCC 6803	Pasteur Culture Collection, Paris

Genotypen: siehe Anhang

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli Bakterienstämme wurden entweder in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten angezogen. Die Kultivierung unter Minimal-Bedingungen erfolgte in M56-Minimal-Medium mit Bernsteinsäure als einzige Kohlenstoff-Quelle (Monod, 1951). Standardmäßig erfolgte die Kultivierung bei 37°C unter selektiven Bedingungen, je nach *E. coli* Stamm mit 50 µg/ml Kanamycin, 50 µg/ml Carbenicillin, 50 µg/ml Streptomycin oder 35 µg/ml Chloramphenicol. Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden *E. coli* Flüssigkulturen, in einem Volumen von 1 ml mit 40% (Endkonzentration) Glycerin, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Zelldichte der Bakterienkulturen wurde bei einer Absorptionswellenlänge von 600 nm (OD_{600}) ermittelt.

Tabelle 3: *E. coli* Kulturmedien

LB-Medium:	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
	15 g/l	Agar (Festmedium)
M56-Medium:	2,7 g/l	KH_2PO_4
	8,2 g/l	Na_2HPO_4
	50 µg/l	$CaCl_2$
	1 g/l	$(NH_4)_2SO_4$
	25 µl	$FeSO_4$ (einer 1%igen Lösung)
	0,1 g/l	$MgSO_4$
	3,5 g/l	Bernsteinsäure
	15 g/l	Agar (Festmedium)

2.2.1.2 Kultivierung von *Synechocystis*

Synechocystis Kulturen wurden photoautotroph, in BG11-Medium bei 28°C und einem Photonenfluss von ca. 50 µmol·m^{-2}·s^{-1}, mit einer Beleuchtungsdauer von 16 h pro Tag, kultiviert (Rippka, 1988). Entweder wurden die *Synechocystis* Kulturen in Flüssigmedium auf einem Rundschüttler oder auf Weichagar-Platte (0,6% Agar) vermehrt. Die *Synechocystis* Mutantenstämme wurden selektiv mit 50 µg/ml Kanamycin angezogen. Optische Dichten von Cyanobakterien-Suspensionen wurden bei einer Wellenlänge von 730 nm (OD_{730}) ermittelt. Das Anlegen von Dauerkulturen erfolgte durch schockgefrieren einer exponentiell wachsenden *Synechocystis* Kultur in flüssigem Stickstoff mit 10% Glycerin (Endkonzentration).

Tabelle 4: *Synechocystis* Kulturmedium

BG11	1,5 g/l	$NaNO_3$
	0,04 g/l	K_2HPO_4
	0,075 g/l	$MgSO_4$
	0,036 g/l	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$
	0,006 g/l	Zitronensäure
	0,006 g/l	$(NH_4)_2$Fe-Citrat
	0,001 g/l	EDTA
	0,02 g/l	Na_2CO_3
	1 ml	Spurenelemente (s.u.)
	6 g/l	Agar 6 g/l (Festmedium)
Spurenelemente-Lösung	2.86 g/l	H_3BO_3
	1.81 g/l	$MnCl_2$
	0.222 g/l	$ZnSO_4$
	0.391 g/l	Na_2MoO_4
	0.079 g/l	$CuSO_4$
	0.049 g/l	$Co(NO_3)_2$

2.2.1.3 Wachstumsexperimente mit *E. coli* Kulturen

Zur Bestimmung der Wachstumsraten von *E. coli* Zellen wurden 200 ml LB-Medium oder M56-Minimal-Medium mit 30 mM Bernsteinsäure mit einer Über-Nacht-Kultur auf eine OD_{600} von 0,5, angemipft. Unter selektiven Bedingungen wurde unmittelbar nach dem Animpfen des Mediums die Genexpression durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Der Wachstumsfortschritt wurde durch photometrische Messung der OD_{600} in definierten Zeitabständen bestimmt.

2.2.1.4 Tropftests und Wachstumsraten von *Synechocystis* Kulturen

Die verschiedenen *Synechocystis* Stämme wurden, zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens, auf BG11-Agarplatten für eine Woche in BG11-Flüssigmedium kultiviert. Die Kulturmedien der Mutanten enthielten 50 µg/ml Kanamycin, das Medium der Δ*sll1797* Mutante (Chorismatlyase) enthielt zusätzlich 100 µM 4-Hydroxybenzoat. Die Kulturen wurden mittels Zentrifugation sedimentiert (15 min, 3.500 *g*, 20°C). Die Zellpellets wurden dreimal mit frischem BG11-Medium gewaschen. Danach wurden die Pellets auf eine OD_{730} von 0,1 verdünnt und in einer seriellen Zehnfachverdünnung in 2-µl-Tropfen auf eine nichtselektive Agarplatte aufgebracht. Die Kultivierung erfolgte für mindestens zwei Wochen unter Standardbedingungen.
Die Wachstumsraten der *Synechocystis* Stämme wurden in einem Kulturvolumen von 25 ml in einem 250 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt. Dazu wurden *Synechocystis* Kulturen analog zu den Kulturen für die Tropftests angezogen und gewaschen. Die Zellpellets wurden anschließend auf eine OD_{730} von 0,5 verdünnt. Zur Bestimmung der Wachstumsraten wurde in definierten Zeitabständen die OD_{730} der Kulturen gemessen.

2.2.1.5 GFP-Fluoreszenzmikroskopie

Konfokalmikroskopische Aufnahmen wurden mit dem A1R-A1 Mikroskop (Nikon) und einer 1000-fachen Vergrößerung erstellt. Zur Fixierung der Zellen wurde ein Tropfen 1%ige Agarose

auf einen Objektträger ausgestrichen. Danach wurde die zu untersuchende Zellsuspension auf den Objektträger getropft und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Autofluoreszenz der *Synechocystis* Zellen und die Fluoreszenz des GFPs wurden mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Phylogenetische Analyse

Zur Durchführung von Sequenzvergleichen und phylogenetischen Analysen diente die MEGA 5.10 Software (Tamura et al, 2011). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden mit dem ClustalW-Algorithmus verglichen (Larkin et al, 2007). Zur Erstellung des phylogenetischen Baumes wurde die Sequenzdaten mit der Maximum Likelihood statistisch analysiert. Mit dem Jonas-Taylor-Thompson Modell wurden die Aminosäure-Substitutionen ermittelt. Die Berechnung der Bootstrap-Werte erfolgte mit 1.000 Replikaten.

2.2.2.2 Molekularbiologische Standardtechniken

Molekularbiologische Standardtechniken wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Sambrook et al. (2002) durchgeführt.

2.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels PCR in einem Eppendorf Thermocycler. Für diagnostischen Versuche (Colony-PCR) wurde eine *Taq*-DNA-Polymerase (Genecraft) verwendet. Zur Amplifizierung von DNA-Fragmente, die zu Klonierungszwecken genutzt wurden, diente die Phusion-DNA-Polymerase (Biozym). In Tabelle 5 sind die entsprechenden Zyklen und die verwendeten Konzentrationen pro Reaktionsansatz angegeben.

Tabelle 5: PCR-Programme

Zyklus standard (diagnostische) PCR

Zyklus			Komponente	Endkonzentration
95°C	3 min		dNTP	25 mM
95°C	35 sec		Oligonukleotide (je)	10 µM
T_m-4°C	40 sec	x35	Polymerase	0,05 U/µl
72°C	1 min/kB		Puffer	1x
72°C	3 min		Template DNA	2 ng/µl
4°C	∞		ad 25 µl Wasser	

Zyklus präparative PCR

Zyklus			Komponente	Endkonzentration
98°C	3 min		dNTP	25 mM
98°C	10 sec		Oligonukleotide (je)	10 µM
T_m+4°C	30 sec	x35	Polymerase	0,02 U/µl
72°C	15-30 sec/kB		HF/GC Puffer	1x
72°C	10 min		Template DNA	2 ng/µl
4°C	∞		ad 25 µl Wasser	

Die verwendeten Oligonukleotide sind der Tabelle 25 zu entnehmen.

2.2.2.4 DNA-Reinigung über Spin-Säulchen

PCR-, Restriktions-, Dephosphorylierungs- und Ligationsansätze wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Spin-Säulchen (Stratec) nach Herstellerangaben von DNA-modifizierenden Enzymen gereinigt.

2.2.2.5 Isolation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse

Von einer *E. coli* Über-Nacht-Kultur wurden 2 ml für 20 sec sedimentiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 250 µl Puffer I resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl Puffer II und

sechsmaligem Invertieren wurden die Zellen lysiert. Nach einer Inkubationsdauer von 5 min wurde die Lösung mit 250 µl Puffer III versetzt und durch mehrfaches Invertieren gemischt. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 20.000 *g*, 4°C). Der Überstand wurde mit 40 µg RNase A (Thermo Scientific) für 15 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol präzipitiert und durch Zentrifugation sedimentiert (15 min, 20.000 Upm, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend in 30-50 µl Wasser aufgenommen. Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit dem Nucleobond xtra Plus Kit (Macherey-Nagel) isoliert.

Tabelle 6: Puffer für alkalische Lyse

Puffer I	50 mM	Glucose
	10 mM	EDTA
	25 mM	Tris-HCl (pH 8,)0
Puffer II	1% (w/v)	SDS
	0,2 M	NaOH
	25 mM	TRIS-HCl (pH 8,0)
Puffer III	3 M	Kaliumacetat
	1,8 M	Ameisensäure

2.2.2.6 Restriktion von DNA

Ein Restriktionsverdau von Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten wurde entweder zu analytischen oder zu präparativen Zwecken durchgeführt. Dazu wurden in der Regel 0,5 bis 1 µl Enzymlösung mit dem, nach Herstellerangaben geeigneten Puffer und bis zu 1 µg DNA in einem Volumen von 20 µl für 1 bis 3 h bei 37°C (30°C) inkubiert. Bei größeren DNA-Mengen wurden die Ansätze entsprechen vergrößert.

2.2.2.7 Alkalische Phosphatasebehandlung von DNA-Fragmenten

Zur Verhinderung einer Religation wurden die 5'-Enden eines bereits linearisierten Vektors mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (fastAP, Fermentas) dephosphoryliert. Die DNA wurde dazu mit 1 µl Enzym und 2 µl Puffer für 10 min bei 37°C inkubiert.

2.2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Um linearisierte Vektoren mit den gewünschten DNA-Fragmenten zu verbinden wurden diese in einem Volumen von 20 µl mit 1 µl T4-Ligase (Fermentas) und 2 µl Ligasepuffer über Nacht bei 16°C inkubiert. Das Verhältnis von Vektor zu inserierendem DNA-Fragment betrug dabei zwischen 1:3 und 1:6, wobei etwa 50 bis 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt wurden.

2.2.2.9 Gateway-Klonierung

Zur Herstellung der Gateway-Expressionskonstrukte wurde das gewünschte Gen mit einem CACC am 5'-Ende des Vorwärts-Oligonukleotides amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde nach Herstellerangaben über eine Topoisomerase-Klonierung in den pENTR/SD/D-TOPO-Vektor kloniert und in den *E. coli* Stamm TOP10 transformiert. Nach erfolgreicher Klonierung wurde der pENTR-*Gen*-Vektor mit dem gewünschten pDEST-Vektor und dem Clonase-Mix nach Herstellerangaben inkubiert und in den *E. coli* BL21AI Expressionsstamm transformiert.

2.2.2.10 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung und Konzentrationsabschätzung von DNA-Fragmenten wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese nach ihre Größe und Ladung aufgetrennt. Je nach Größe des DNA-Fragments wurden entweder 1%ige oder 1,5%ige Agarosegele mit 30 µg/l Ethidiumbromid verwendet. Entsprechend der Dicke des Gels wurden die Proben bei einer Feldstärke

von 5 V/cm bis 10 V/cm aufgetrennt. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte anhand eines DNA-Größenstandard durch Bestrahlung mit UV-Licht.

2.2.2.11 DNA-Sequenzierung

Alle verwendeten DNA-Konstrukte wurden anhand von Sequenzanalysen auf ihre Richtigkeit überprüft. Standarmäßig erfolgte die Kontrolle der Sequenzdaten durch Sequenzvergleiche mit Datenbanksequenzen (Quelle: NCBI, Keio Collection).

2.2.2.12 Transformation von *E. coli* Zellen

Die *E. coli* Zellen wurden mittels Elektroporation transformiert. Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 200 ml LB-Medium mit einer entsprechenden *E. coli* Über-Nacht-Kultur auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,8 kultiviert. Das Wachstum der Bakterienkultur wurde durch Inkubieren für 20 min auf Eis gestoppt, anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation sedimentiert (10 min, 3.500 *g*, 4°C). Das Zellpellet wurde in 200 ml eiskalter 10%iger Glycerin-Lösung (v/v) resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 3.500 *g*, 4°C). Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt, wobei die Zellpellets erst in 100 ml, 50 ml und dann in 10 ml 10%iger Glycerin-Lösung resuspendiert wurden. Zuletzt wurde das Pellet in 500 µl Glycerin-Lösung aufgenommen und in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Zur Elektrotransformation wurden etwa 10 ng bis 100 ng Plasmid-DNA auf die noch gefrorenen Zellen pipettiert und auf Eis langsam aufgetaut. Die Zellen wurden gründlich mit der Plasmid-DNA gemischt und in eine 1-mm-Elektroporationsküvette überführt. Die Zellen wurden dann einer Spannung von etwa 2,5 kV für wenige Millisekunden ausgesetzt. Die transformierten Zellen wurden in 1 ml frischem LB-Medium aufgenommen und für 45 min bei 37°C regeneriert. Anschließend wurden 100 µl der Zellsuspension auf Selektions-Agarmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.2.2.13 Isolation von RNA aus *Synechocystis*

Synechocystis Zellen einer exponentiell wachsenden Flüssigkultur wurden mittels Zentrifugation sedimentiert (15 min, 9.000 *g*, 4°C) und die Zellpellets bei -20°C eingefroren. Das Pellet wurde später auf Eis aufgetaut und in 500 µl Trizol resuspendiert (Chomczynski & Sacchi, 1987). Die Zellsupension wurde in ein 2 ml Schraubdeckelgefäß mit Keramikperlen (1mm) überführt und in einem Homogenisator zweimal für 30 sec bei 6500 Upm aufgeschlossen. Der Zellextrakt wurden danach in 500 µl 1-Brom-3-chloropropan für 10 min inkubiert und anschließend zur Phasentrennung zentrifugiert (10 min, 10.000 *g*, 4°C). Die wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml Gefäß überführt und mit 1 ml 2-Propanol für 5 min auf Eis inkubiert. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch Zentrifugation (20 min, 20.000 *g*, 4°C). Das Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und in 50 µl Wasser gelöst. Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurde die RNA mit RNA-Ladepuffer versetzt und gelelektrophoretisch mit einem 1,5%igen Agarosegel mit 2% Formaldehyd aufgetrennt.

Tabelle 7: Puffer für RNA-Isolation

RNA-Ladepuffer:	0.02%	SDS
	0.02%	Bromphenol Blau
	0.01%	Xylen Cyanol
	1 mM	EDTA
	95%	Formamid
Trizol:	0,8 M	Guanidinthiocyanat
	0,4 M	Ammoniumthiocyanat
	5% (w/v)	Glycerin
	0,1 M	Phenol (wassergesättigt)

2.2.2.14 cDNA-Synthese

Vor der cDNA Synthese wurden mögliche Rückstände genomischer DNA durch DNase-Verdau in der RNA-Probe degradiert. Dazu wurde die Probe für 15 min bei 37°C mit DNase (ThermoFisher) inkubiert. Anschließen wurde die DNase für 20 min bei 70°C inaktiviert. Die Probe wurde danach direkt auf Eis gekühlt und mit zufallsgenerierten Hexamernukleotiden (10 µM Endkonzentration) versetzt. Zum Anlagern der Hexamernukleotide wurden die Proben für 5 min bei 70°C inkubiert und unmittelbar danach wieder auf Eis gekühlt.
Die cDNA-Synthese wurde nach folgendem Schema mit einer AMV RT-Polymerase (ThermoFisher) durchgeführt:

Tabelle 8: Schema cDNA Synthese

Endkonzentration	Komponente
100 ng	RNA
25 mM	dNTP
4 µl	RT-Puffer
0,5 µl	±RT-Polymerase
ad 25 µl	Wasser

Die Reaktionsansätze wurden für die cDNA-Synthese für 37 min bei 37°C inkubiert und danach für 10 min bei 70°C, um die RT-Polymerase zu inaktivieren. Um später auszuschließen, dass genomische DNA als Matrizenstrang für die RT-Polymerase diente, wurde zu jeder Probe eine Kontrolle ohne RT-Polymerase durchgeführt.

2.2.2.15 quantitative real time PCR

Zur Bestimmung der Transkriptmengen wurden zunächst die PCR Bedingungen mittels Standard-PCR (Oligonukleotide siehe Tabelle 25, Anhang) ermittelt. Für die quantitative real time PCR wurde ein SYBR green PCR-Mastermix (Applied Biosysthems) verwendet und pro Probe 1 µl des cDNA-Syntheseansatzes, sowie 10 µM der genspezifischen Oligonukleotide in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Um Kontaminationen mit genomischer DNA auszuschließen,

wurden die Reaktionsansätze, die nicht revers transkribiert wurden, als Kontrollen eingesetzt. In Tabelle 9 ist das für alle Proben verwendete Temperaturprofil angegeben.

Tabelle 9: Zyklus quantitative realtime PCR

95°C	10 min	
95°C	10 sec	x40
54°C	1 min	

Die mit der Amplifizierung verbundene Fluoreszenz, wurde nach jedem PCR-Zyklus gemessen. Für jede Probe wurden mindestens vier biologische Replikate gemessen von denen wiederum je zwei technische Replikate durchgeführt wurden. Im Anschluss wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, um die Größe der DNA-Fragmente zu überprüfen. Die Expression der Zielgene wurde mit den Refernzgenen *lysC* (Aspartatkinase) und *trpA* (Tryptophansynthase, α-Untereiheit) abgeglichen, um mögliche Abweichungen feststellen zu können.

2.2.2.16 Transformation von *Synechocystis*

Zur Elekrotransformation von *Synechocystis* Zellen wurden 50 ml einer *Synechocystis* Flüssigkultur mit einer OD_{730} von 0,5 mittels Zentrifugation sedimentiert (6 min, 3.500 *g*, 20°C) und in sterilem HEPES-Puffer (pH 7,5) resuspendiert. Nach dreimaliger Wiederholung des Waschschrittes wurde das Zellpellet in 100 µl HEPES (pH 7,5) resuspendiert. Für die Elektroporation wurden 60 µl der *Synechocystis* Zellsuspension mit bis zu 16 µg Plasmid-DNA gemischt und in einer Elektroporationsküvette bei 12 kV /cm und einer Pulsdauer von 9 ms transformiert (Ludwig et al, 2008). Anschließend wurden die Zellen in 50 ml BG11-Flüssigmedium überführt und für fünf Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Danach erfolgte die Selektion der transformierten *Synechocystis* Zellen auf BG11-Agarmedium mit einer Kanamycin-Konzentration von 30 µg/ml.

2.2.2.17 Herstellung von *Synechocystis* Insertionsmutanten

Zur Herstellung von *Synechocystis* Insertionsmutanten wurden zunächst die Gene *sll1797*, *slr1099*, *sll0936* und *slr1300* mittels PCR amplifiziert (Oligonukleotide, siehe Tabelle 25) und in den pQE60 Vektor kloniert. Fragmente der erhaltenen DNA-Konstrukte wurden mit den DNA-Restriktionsenzymen *Aar*I (pQE60-sll1797), *Nae*I und *Spe*I (pQE60-slr1099), *Cla*I und *Not*I (pQE60-sll0936) und *Kpn*I und *Pac*I (pQE60-slr1300) aus den Plasmiden herausgeschnitten, um eine Kanamycin-Resistenzkassette (*kan*R), mit den entsprechenden Überhängen, in die offenen Leserahmen zu inserieren. Die DNA-Konstrukte pQE60-sll1797-kanR, pQE60-slr1099-kanR, pQE60-sll0936-kanR und pQE60-slr1300-kanR wurden anschließend mit *Xba*I linearisiert.

Für die Transformation wurde eine *Synechocystis* Flüssigkultur bis zu einer OD_{730} von 0,5 angezogen und mittels Zentrifugation sedimentiert (15 min, 3.500 *g*, 20°C). Das Zellpellet wurde in frischem BG11-Medium resuspendiert und auf eine OD_{730} von 5,0 verdünnt. Jeweils 100 µl der Zellsupension wurden mit 1 µg der linearisierten DNA für 4 h bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf einem Nylon-Membranfilter (Millipore) ausplattiert, der vorher auf eine BG11-Agarplatte gelegt wurde. Nach etwa 18 Stunden wurde die Nylon Membran auf eine neue BG11-Agarplatte transferiert, welche 5 µg/ml Kanamycin enthielt (Williams, 1988). Die ersten transformierten *Synechocystis* Zellen waren nach etwa zwei Wochen sichtbar. Wenn die Kolonien einen Durchmesser von ca. 0,5 mm bis 1 mm aufwiesen, wurden sie mit der Nylon-Membran auf eine BG11-Agarplatte mit 10 µg/ml Kanamycin transferiert. Nach weiteren zwei Wochen wurden die Kolonien mit einer Impföse auf einer BG11-Agarplatte mit 15 µg/ml Kanamycin ausgestrichen. Daraufhin erfolgte die Steigerung der Kanamycin-Konzentration schrittweise bis zu einem Gehalt von 75 µg/ml. Das Kulturmedium der Chorismatlyase Mutante (Δ*sll1797*) enthielt zusätzlich 100 µM 4-Hydroxybenzoat.

Die vollständige Segregation der mutierten Allele wurde mittels PCR überprüft. Zudem wurden die Daten durch die Analyse der Transkriptmenge mittels quantitativer real time PCR validiert.

2.2.3 Biochemische und Chemische Methoden

2.2.3.1 Synthese von [^{14}C (Ring)]4-Hydroxybenzoesäure

Das [^{14}C (Ring)]4-Hydroxybenzoat wurde in einer alkalischen Schmelze, ausgehend von [^{14}C (U)]L-Tyrosin, in abgewandelter Form nach Ashby & Edward (1990) synthetisiert. Dazu wurden 20 µCi einer [^{14}C U]L-Tyrosin-Lösung in einem 2-ml-Glasgefäß bis zur Trockne unter einem Stickstoffstrom eingeengt. Der Rückstand wurde mit 34,8 µl einer 10 M NaOH-Lösung und 48,8 µl einer 10 M KOH-Lösung gründlich vermischt. Das Reaktionsgefäß wurde mit einem Kunststoff-Schraubdeckel verschlossen und für 8 min in einen, auf 272°C vorgeheizten, Aluminium-Block gestellt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und dann auf Eis gestellt. Zum Ansäuern des Reaktionsgemisches wurden 104 µl einer 25%igen H_2SO_4-Lösung auf die Schmelze pipettiert. Das entstandene [^{14}C (Ring)]4-Hydroxybenzoat wurde dreimal mit 1 ml Ethylacetat aus der Schmelze extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint und mit 2 ml Wasser gewaschen. Das Produkt wurde anschließend bis zur Trockne unter einem Stickstoffstrom eingeengt und in 200 µl reinstem Ethanol aufgenommen.

Zur Reinigung wurde das Reaktionsgemisch mittels HPLC über eine präparative C18-Säule (250/10, H-Tec, 5 µm; Macherey-Nagel) aufgetrennt. Als Laufmittel diente Acetonitril/(Wasser mit 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v)) (1:1, v/v) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die Detektion radioaktiver Substanzen erfolgte mit einem Radiodetektor (Raytest), die Detektion von einem unmarkierten 4-Hydroxybenzoat Standard erfolgte bei einer UV-Absorption von 254 nm. Die Retentionszeit von 4-Hydroxybenzoat betrug 8,9 min. Es wurde eine Reinheit (HPLC) von mindestens 98% erzielt (Abbildung 8). Zudem wurde das Reaktionsgemisch mittels Dünnschichtchromatographie, mit einem Laufmittelsystem aus Isopropanol/NH_4OH/H_2O (8:1:1, v/v/v), aufgetrennt. Parallel wurden die unmarkierten Standards 4-Hydroxybenzoat, 2-Hydroxybenzoat und L-Tyrosin aufgetrennt und mit einer alkalischen $KMnO_4$-Lösung (0,5 g $KMnO_4$ in 100 ml 1 M NaOH) nachgewiesen. Das radioaktiv markierte Produkt wurde mit einem Bio-Imager detektiert. Zur Quantifizierung wurde das 4-Hydroxybenzoat aus dem Kieselgel der Dünnschichtchromatographieplatte extrahiert und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler bestimmt.

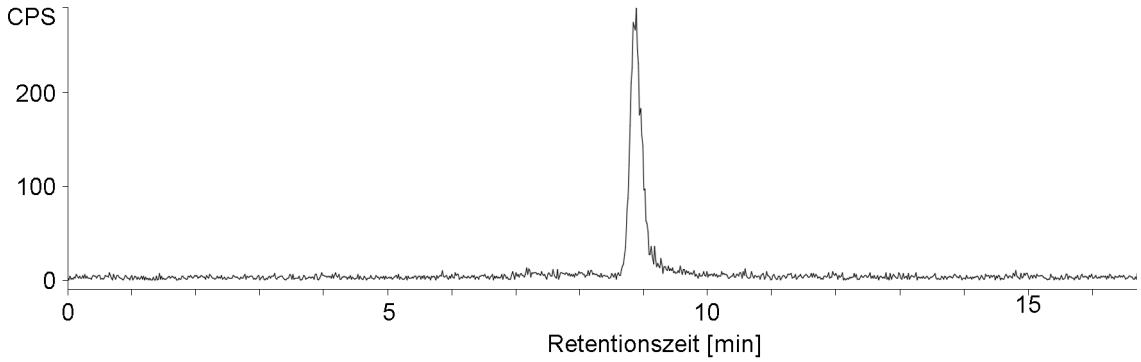


Abbildung 8: HPLC-Analyse von [^{14}C (Ring)]4-Hydroxybenzoat

Der Reaktionsansatz wurde mit einer C18-Säule (250/4, H-Tec, 5 µm; Macherey-Nagel) und einem Laufmittelsystem bestehend aus Acetonitril/(Wasser mit 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v)) (1:1, v/v) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetrennt. Als Standardsubstanzen wurden unmarkiertes 4-Hydroxybenzoat und 2-Hydroxybenzoat analysiert. (CPS, Kernzerfälle pro Sekunde)

2.2.3.2 *In vivo* Markierungsversuche mit *Synechocystis* Zellen

Für die *in vivo* Markierung von *Synechocystis* Stoffwechselprodukten wurden die entsprechenden Stämme in Flüssigmedium bis zu einer OD_{730} von 0,5 angezogen. 25 ml der Kulturen wurden mit 4 µCi [^{14}C (Ring)]4-Hydroxybenzoat für fünf Tage inkubiert. Danach wurden die Lipidextraktion, wie unter Punkt 2.2.3.11 beschrieben, durchgeführt. Die Radioaktivität der Lipidextrakte wurde mit einem Szintillationszähler quantifiziert. Zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung wurden die radioaktiv markierten Lipidextrakte auf eine Kieselgelplatte (Macherey-Nagel) aufgetragen und mit Aceton/Petrolether (3:7, v/v) als mobiler Phase entwickelt. Die radioaktiv markierten Produkte wurden mit einem Bio-Imager detektiert.

2.2.3.3 Induzierte Gen-Expression

Für die induzierte Gen-Expression wurde zunächst LB-Flüssigmedium mit einer Über-Nacht-Kultur von *E. coli* Zellen, die den pDEST-Vektor mit dem zu untersuchenden Gen trugen, auf eine OD_{600} von 0,05 angeimpft. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und bei einer OD_{600} zwischen 0,5 bis 0,6 wurde die Genexpression, durch Zugabe von 0,2% (w/v)

Arabinose, induziert. Nach einer Kultivierungsdauer von 1 h bis 3 h wurden die Kulturen auf Eis gestellt, um das Wachstum der Bakterien zu stoppen.
Die Gen-Expression in den Zellen, die den pQE60-Vektoren trugen, wurde mit 1 mM IPTG induziert. Der Startpunkt und die Dauer der Gen-Expression erfolgte analog zur Gen-Expression der Zellen die den pDEST-Vektoren trugen.

2.2.3.4 Präparation von *E. coli* und *Synechocystis* Zellfraktionen

Die Bakterien-Zellen wurden zur Präparation von Zellfraktionen in Flüssigkultur angezogen und anschließend mittels Zentrifugation sedimentiert (8 min, 3.500 *g*, 4°C). Das Zellpellet wurde in 4°C kaltem Bis-Tris-Propan-Puffer (pH 7,5) resuspendiert. Mit einer Ultraschall-Sonde wurden die Zellen dreimal für 1 min mit einer Pulsleistung von 50% aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation sedimentiert (12 min, 9.000 *g*, 4°C). Mittels Ultrazentrifugation (40 min, 140.000 *g*, 4°C) des Überstandes (Zellextrakt) wurde die lösliche Fraktion (Überstand) von der Membranfraktion (Sediment) getrennt. Anschließend wurde das Sediment in 50 mM Bis-Tris-Propan-HCl-Puffer (pH 8,0) resuspendiert. Alle Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

2.2.3.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Eine Kalibrierungsreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) diente als Referenz zur Quantifizierung der zu messenden Proteinkonzentrationen. Das Bradford-Reagenz wurde über Nacht auf einem Magnetrührer gerührt und am nächsten Tag zweimal mit einem Faltenfilter filtriert.

Tabelle 10: Bradford-Reagenz:

Bradford-Reagenz:	100 mg/l	Coomassie G-250
	50 ml/l	Ethanol
	100 ml/l	85%ige Phosphorsäure

2.2.3.6 SDS-PAGE

Zur Probenvorbereitung wurden die Proteine zunächst mit Aceton (80% Endkonzentration, v/v) für 10 min auf Eis gefällt und mittels Zentrifugation sedimentiert ((2 min, 10.000 *g*, 4°C). Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und verworfen. Das Pellet wurde in SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 5 min bei 99°C unter Schütteln (750 Upm) inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die denaturierten Proteine wurden mittles SDS-PAGE aufgetrennt, dazu wurden entweder 12%- oder 16%-SDS-Fertiggele (Nusep, Wasserburg) verwendet. Die Gele wurden in eine vertikale Elektrophoreseapparatur eingespannt und die Kammer mit Elektrophoresepuffer befüllt. Zwischen 5 µg und 20 µg Protein wurden pro Geltasche aufgetragen, parallel wurde zusätzlich ein Marker (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für ca 15 min bei 100 V, dann bei 200 V bis die Front des Probenpuffers aus dem Gel heraus lief. In der Regel wurde ein Gel für die Coomassie-Färbung verwendet, das zweite Gel für die Western-Blot-Analyse.

Tabelle 11: Puffer SDS-PAGE

SDS-Probenpuffer:	3,7 ml	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
	7,5 ml	20% SDS
	24 µl	0,5 M EDTA (pH 8,0)
	18 g	Saccharose
	15 mg	Bromphenol Blau
	30 µl/ml	2,6 M DTT (wurde kurz vor Gebrauch zugegeben)
	ad 50 ml	Wasser
Elektrophoresepuffer:	25 mM	Tris-HCl (pH 8,3)
	0,1% (w/v)	SDS

2.2.3.7 Coomassie-Färbung

Zur Sichtbarmachung der, mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine, wurde das Gel für 1 h in Coomassie-Lösung gefärbt. Im Anschluss wurde das Gel über Nacht in Entfärbe-Lösung entwickelt (Meyer & Lamberts, 1965).

Tabelle 12: Coomassie-Färbung

Coomassie-Lösung:	Methanol:Essigsäure:Wasser (3:1:6, v/v/v)
	0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250
Entfärbe-Lösung:	Methanol:Essigsäure:Wasser (3:1:6, v/v/v)

2.2.3.8 Western-Blot-Analyse

Zur spezifischen Detektion von Proteinen mit Antikörpern wurden, die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine, auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurden zwei Lagen Watman-Papier, das mit Blotting-Puffer getränkt war, auf die Anode einer Semidryblot-Vorrichtung gelegt. Darauf wurde die PVDF-Membran gelegt, die zuvor in Methanol aktiviert wurde. Danach wurde das SDS-Gel mit den aufgetrennten Proteinen aufgelegt. Zwischen das SDS-Gel und die Kathode wurden zwei weitere Lagen Watman-Papier gelegt, welches ebenfalls mit Blotting-Puffer getränkt war. Der Proteintransfer erfolgte bei 95 mA für 35 min (12%ige Gele) oder 1 h (16%ige Gele).

Tabelle 13: Blotting-Puffer

Blotting-Puffer:	48 mM	Tris
	39 mM	Glycin
	1,3 mM	SDS
	20% (v/v)	Methanol

2.2.3.9 Immunodetektion von Fusionsproteinen

Zur immunologischen Detektion, der zu untersuchenden Epitope, wurde die PVDF-Membran zweimal für 10 min in TBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die PVDF-Membran für 1 h in Blockierungs-Lösung inkubiert. Darauf folgten zwei weitere Waschschritte der Membran mit TTBS-Puffer für jeweils 10 min. Die Antikörperlösungen wurden nach Herstellerangaben verdünnt und mit der Membran inkubiert. Im Anschluss wurden ungebundene Antikörper durch zweimaliges waschen mit TTBS-Puffer für jeweils 10 min von der PVDF-Membran entfernt. Die Detektion erfolgte mit dem Lumi-Light-Western-Blotting-Substrat (Roche, Grenzach-Wyhlen) nach Herstellerangaben, visualisiert wurde die Chemilumineszenz mit dem LAS1000.

Tabelle 14: Antikörper und Lösungen für Immunodetektion

verwendete Antikörper:	Anti-GST/HRP-konjugiert (GE-Healthcare, Freiburg)	
	Anti-GFP/Primärantikörper (Roche, Grenzach-Wyhlen)	
	Anti Rabbit/Sekundärantikörper, HRP-konjugiert (GE-Healthcare)	
Blockierungs-Lösung:	5% (w/v) Milchpulver in TBS-Puffer	
TBS-Puffer:	10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	150 mM	NaCl
TTBS-Puffer:	20 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	500 mM	NaCl
	0,05% (v/v)	Tween 20

2.2.3.10 Bestimmung des Ubichinon-Gehaltes

Zur Bestimmung der Ubichinon-Gehalte von *E. coli* Zellen wurden die Bakterien unter Standardbedingungen kultiviert und anschließend mittels Zentrifugation geerntet (8 min, 3.500 *g*, 4°C). Die Zellpellets wurden mit Wasser gewaschen, in 1 ml Wasser resuspendiert und mit Ubichinon-4 als Internem Standard versetzt. Die Extraktion der *E. coli* Lipide erfolgte analog zu der von *Synechocystis* Lipiden (siehe Punkt 2.2.3.11).
Mittels HPLC-Analyse wurden die Ubichinon-Gehalte der *E. coli* Zellen quantifiziert. Dazu wurde eine Kieselgelsäule (Nucleosil 100-5; 250/4; Macherey-Nagel) ohne Modifikationen verwendet. Als Laufmittel diente 2,2% t-Butylmethylether in Hexan mit einer Flussrate von 1 ml/min. Ubichinon wurde mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 275 nm nach 31 min detektiert, Ubichinon-4 nach 39 min.

2.2.3.11 Bestimmung von Plastochinon- und Phyllochinon-Gehalten

Die zu analysierenden *Synechocystis* Kulturen wurden mittels Zentrifugation sedimentiert (10 min, 9.000 *g*, 4°C). Die Zellpellets wurden mit Wasser gewaschen, in 1 ml Wasser resuspendiert und in ein Glasschliffröhrchen überführt. Das Gefäß wurde mit dem gleichen Volumen Keramikperlen (Soilgene) befüllt und für 30 sec gevortext. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 6 ml Aceton und 4 ml Petrolether und erneutes vortexen für 3 min vollständig aufgeschlossen. Zur Phasentrennung wurden die Extrakte zentrifugiert (2 min, 4.500 *g*, 20°C). Nach dem Überführen der organischen Phase in ein neues Gefäß, wurde die wässrige Phase mit 4 ml Petrolether nachextrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockne eingeengt und in einem definierten Volumen Hexan aufgenommen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.
Mittels HPLC-Analyse wurden die Phyllochinon- bzw. Plastochinon-Gehalte quantifiziert. Dazu wurde eine Kieselgelsäule (Nucleosil 100-5; 250/4; Macherey-Nagel) ohne Modifikationen verwendet. Als Laufmittel diente Heptan/Isopropanol (99,95:0,05; v/v) mit einer Flussrate von 1 ml/min. Plastochinon und Phllochinon wurden mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 255 nm nach 6,9 bzw. 8,2 min detektiert. Als Standards dienten Plastochinon-9 aus Spinatblättern (siehe Punkt 2.2.3.12), Decylplastochinon und Phyllochinon.

2.2.3.12 Lipidextrakte aus Spinat

Zur Gewinnung eines Plastochinon-9-Standards wurden die Gesamtlipide aus 100 g Spinatblättern extrahiert. Von den Blättern wurde die Mittelrippe entfernt und verworfen, der Rest des Blattes wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Blattmaterial wurde fein gemörsert und in 50 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8) resuspendiert. Danach wurde die Suspension mit Methanol auf 0,5 l aufgefüllt und für 10 min unter Lichtabschluss gründlich geschüttelt. Diese Lösung wurde anschließend mit 0,5 l 0,1 M Tris-HCl-Puffer, 1 M NaCl (pH 8) aufgefüllt und für weitere 10 min unter Lichtabschluss gründlich geschüttelt. Durch Zugabe von 2 l Chloroform und erneutes Schütteln unter Lichtabschluss wurden die lipophilen Substanzen extrahiert. Die organische Phase wurde mit Glaswolle filtriert und in einen Scheidetrichter überführt, um mit dem 0,1 M Tris-HCl-Puffer, 1 M NaCl (pH 8) den Lipidextrakt mehrfach auszuschütteln. Der Extrakt wurde anschließend mit einem Rotationsverdampfer eingeengt und in 2 ml Chloroform /Methanol (2:1, v/v) aufgenommen. Die Proben wurde anschließend mittels Dünnschichtchromatographie und Dichlormethan als mobiler Phase aufgetrennt, sodass das Plastochinon-9 aus dem Kieselgel der Dünnschichtchromatographieplatte extrahiert werden konnte. Zum qualitativen Nachweis des Plastochinons wurde ein Teil der Dünnschichtchromatographieplatte mit diazotiertem p-Nitranilin besprüht (Stahl, 1967). Bei Anwesenheit von Plastochinon und anderen phenolischen Verbindungen kam es zu einem gelb-rötlichen Farbumschlag.

Tabelle 15: Sprühreagenz für phenolische Verbindungen

Diazotiertes p-Nitranilin
a) i) p-Nitranilin, 0,3% in 8% HCl (w/v)
ii) $NaNO_2$ 5% (w/v)
vor gebrauch mischen
b) Na-Acetat (20%) (w/v)
zuerst a) dann b)
a) i) 5 ml
ii) 0,5 ml
b) 15 ml

2.2.3.13 Affinitätschromatographische Reinigung von GST-Sll1797

E. coli BL21AI Zellen, die den pDEST15-sll1797-GST Vektor trugen, wurden unter Standardbedingungen kultiviert und mittels Zentrifugation geerntet (8 min, 3.500 *g*, 4°C). Das Zellpellet wurde in 10 ml 50 mM Bis-Tris-Propan-HCl-Puffer (pH 8,0) resuspendiert und die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen (3x 1 min, 50% Pulsleistung). Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt (25 min, 9.000 *g*, 4°C). Der Überstand wurde mit Glutathion-Agarose bei 4°C für 15 min in einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Glutathion-Agarose auf eine Säule geladen und mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Das Fusionsprotein wurde anschließend mit 2 Säulenvolumen Elutionspuffer eluiert.

Tabelle 16: Puffer für affinitätschromatographische Reinigung

Waschpuffer:	50 mM	Bis-Tris-Propan-HCl (pH 7,2)
	150 mM	NaCl
Elutionspuffer:	50 mM	Bis-Tris-Propan-HCl (pH 8,0)
	0,4 M	NaCl
	50 mM	Glutathion (reduziert)
	0.10%	Trition X-100

2.2.3.14 Bestimmung der Chorismatlyase-Aktivität

In einem Reaktionsansatz von 200 µl wurde die Chorismatlyase-Aktivität bestimmt. Standardmäßig wurde die zu testende Proteinprobe in 50 mM Bis-Tris-Propan-HCl (pH 8,0) und 450 µM Chorismat bei 30°C für 5 min inkubiert. Der Enzymaktivitätstest wurde mit 300 µl eines 3 M Acetat-Puffers (pH 4,0) gestoppt. Danach wurde dem Reaktionsansatz 2-Hydroxybenzoat als Interner Standard zugegeben, um die Extraktionseffizienz zu bestimmen. Das entstandene 4-Hydroxybenzoat sowie der Interne Standard wurden mit 500 µl Ethylacetat aus dem Reaktionsansatz extrahiert. Das 4-Hydroxybenzoat wurde mittels HPLC-Analyse mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert.

Dazu wurde eine C18-Säule (250/4, H-Tec, 5 µm; Macherey-Nagel) verwendet und ein Laufmittel bestehend aus Acetonitril/(Wasser mit 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v)) (1:1, v/v) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min. Unter diesen Bedingungen wurde 4-Hydroxybenzoat nach 8,9 min detektiert, 2-Hydroxybenzoat nach 15,3 min. Die Peakflächen des 4-Hydroxybenzoats wurde mit denen von Standardkurven verglichen. Um den nichtenzymatischen Zerfall von 4-Hydroxybenzoat während der Inkubation im Reaktionsansatz zu bestimmen, wurde zu jedem Ansatz ein Kontrollansatz ohne Protein gemessen.

2.2.3.15 Enzymatische Synthese von 4-Hydroxy-3-prenylbenzoat

Zur Herstellung von 3-Farnesyl-4-hydroxybenzoat und 3-Geranylgernyl-4-hydroxybenzoat wurde die Membranfraktion von *E. coli* Zellen verwendet, die das *slr0926* Gen (Prenyltransferase) exprimierten. Die enzymatische Synthese wurde in einem Gesamtvolumen von 1 ml mit 50 mM Bis-Tris-Propan-HCl-Puffer (pH 7,5), 5 mM Magnesiumacetat, 50 µM [^{14}C (U)]4-Hydroxybenzoat (ca. 850 dpm·pmol^{-1}), 50 µM Prenyldiphosphat und 20 µg Membran-Protein für 30 min bei 30°C durchgeführt. Die Synthese wurde durch Zugabe von 1 ml 0,9% NaCl-Lösung gestoppt. Das radioaktive Produkt wurde anschließend mit 3 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v) extrahiert (Sadre et al, 2012).

Die Synthese von 4-Hydroxy-3-octaprenylbenzoat erfolgte *in situ*. Dazu wurde die Δ*ubiX* Mutante in Gegenwart von 4 µCi [^{14}C (U)]4-Hydroxybenzoat kultiviert, da die Mutante das Ubichinon-Intermediat 4-Hydroxy-3-octaprenylbenzoat akkumuliert (Gulmezian et al, 2007). Die Extraktion des 4-Hydroxy-3-octaprenylbenzoats erfolgte analog zur Ubichinon-Extraktion (siehe Punkt 2.2.3.11)

Zum Nachweis der synthetisierten Verbindungen wurden die Reaktionsansätze dünnschichtchromatographisch analysiert. Dazu wurden die Proben auf die Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen und die Platte mit Aceton/Petrolether (3:7, v/v) entwickelt. Die radioaktiv markierten Substanzen wurden mit einem Bio-Imager detektiert.

2.2.3.16 Bestimmung von Decarboxylase-Aktivität

Zur Bestimmung der Decarboxylase-Aktivität wurden 1,25 mg Protein, der zu untersuchenden Probe, in einem Reaktionsansatz von 400 µl mit 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) und 1 µM [^{14}C (Ring)]4-Hydroxy-3-prenylbenzoate für 45 min bei 30°C inkubiert. Der Enzymaktivitätstest wurde durch Zugabe von 800 µl Chloroform/Methanol (2:1, v/v) gestoppt. Zur besseren Phasentrennung von organischer und wässriger Phase wurden dem Ansatz 100 µl einer 0,9%igen NaCl-Lösung zugegeben, sodass die lipophilen Reaktionsprodukte sich in der organischen Phase befanden. Zur Analyse der Reaktionsprodukte wurde die organische Phase auf eine Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen und mit einem Laufmittel bestehend aus Aceton/Petrolether (3:7, v/v) entwickelt. Die radioaktiv markierten Reaktionsprodukte wurden anschließend mit dem FLA3000-Bio-Imager sichtbar gemacht.
Zur Quantifizierung wurden die radioaktiven Substanzen aus dem Kieselgel der Dünnschichtchromatographieplatte extrahiert und mit einem Szintillationszähler die Kernzerfälle pro Minute bestimmt.

2.2.3.17 Chlorophyllbestimmung nach Lichtenthaler

Zur Bestimmung des Chlorophyllgehaltes von *Synechocystis* Flüssigkulturen wurde 1 ml der Kultur in siedendem Wasser für 10 sec erhitzt und nach dem Abkühlen mit 4 ml Aceton versetzt. Die Lösung wurde 30 min im Dunkeln gelagert und anschließend bei 9.000 *g* zentrifugiert. Die Absorption der Lösung wurde in einer Quarzglasküvette (Schichtdicke, 1 cm) bei 664 nm (x-Wert) und 750 nm (y-Wert) bestimmt. Mit der Formel:

$$[c] = (y-x)/0{,}0809$$

wurde die Chlorophyllkonzentration in [µg/ml] berechnet (Lichtenthaler, 1987).

2.2.3.18 Messung der Photosyntheserate

Synechocystis Kulturen wurden zur Messung der Sauerstoffproduktionsrate bei einer OD_{730} von 2,0 geerntet (3500g, 15min, 20°C) und anschließend in einer definierten Menge frischem BG11-Medium resuspendiert, sodass die Zellsuspensionen einen Chlorophyllgehalt von 2 µg/ml besaßen. Die Messkammer der Sauerstoffelektrode (Silber-Platin-Elektroden) wurde mit 1 ml der Zellsuspension befüllt und mit Weißlicht einer Lichtstärke von etwa 50 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ bestrahlt. Die Messung erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 30°C, unter kontinuierlichem Rühren, bis ein linearer Anstieg der Sauerstoffproduktionsrate gemessen werden konnte.

Kapitel 3 Ergebnisse & Diskussion

3.1 Sequenzanalysen

Basierend auf Sequenzvergleichen zwischen *Synechocystis* Sequenzen und Sequenzen von *E. coli* Enzymen, die an der Ubichinon-Biosynthese beteiligt sind, wurde ein Biosyntheseweg für Plastochinon in Cyanobakterien vorgeschlagen (siehe Einleitung), der in allen bereits sequenzierten Cyanobakterien konserviert ist (Dähnhardt et al, 2002; Sakuragi & Bryant, 2006).
Um weitere Anhaltspunkte, in Bezug auf die Funktion und den Mechanismus der *Synechocystis* Enzyme zu finden, die möglicherweise an der Plastochinon-Biosynthese beteiligt sind, wurden die abgeleiteten Aminosäuresequenzen aus *Synechocystis* mit Sequenzen unterschiedlichster Organismen verglichen. Tabelle 17 fasst die Daten für die *Synechocystis* Proteine, wie die Masse, den isoelektrischen Punkt, die Anzahl der Transmembrandomänen sowie die Übereinstimmung zu den *E. coli* Sequenzen zusammen.

Tabelle 17: Eigenschaften von *Synechocystis* Proteinen

Synechocystis	Enzym-Bezeichnung	Masse [kDa]	TMD	pI	E. coli	Sequenz-identitäten zu *E. coli*	Referenzen
sll1797	Chorisamtlyase	16,4	0	9,06	*ubiC*	16%	diese Arbeit
slr0926	Prenyltransferase	32,6	9	6,81	*ubiA*	32%	Sadre, 2012
slr1099	Decarboxylase	22,2	0	5,76	*ubiX*	40%	diese Arbeit
sll0936	Decarboxylase	55,2	0	5,02	*ubiD*	43%	diese Arbeit
slr1300	Hydroxylase	45,6	1	7,68	*ubiH*	30%	diese Arbeit
sll0418	Methyltransferase	34,9	2	4,96	*ubiG*	18%	Cheng, 2003

TMD, Transmembrandomänen (Krogh et al, 2001)

3.1.1 *In silico* Analyse der Chorismatlyasen

Die Aminosäuresequenz des *Synechocystis* Gens *sll1797* besteht aus 139 Aminosäureresten und besitzt eine berechnete Masse von 16,4 kDa. Das Gen ist als "hypothetical chloroplast open reading frame" (ycf) annotiert und gehört zu der *ycf*21 Genfamilie, welche in Cyanobakterien hochkonserviert ist. Die Sequenz der *E. coli* Chorismatlyase (UbiC) zeigte zwar nur eine 16%ige Übereinstimmung mit der Sequenz des *Synechocystis* Proteins Sll1797, zwei Aminosäurereste sind jedoch hochkonserviert, die sich mit Hilfe des DELTA-BLAST auch in allen anderen gezeigten Sequenzen wiederfanden (Abbildung 9).

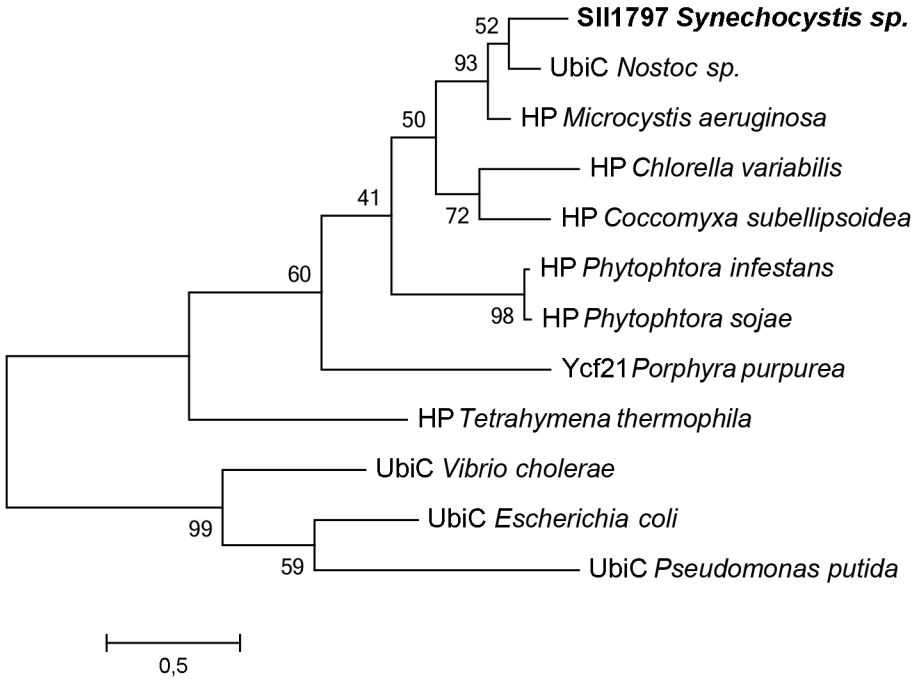


Abbildung 9: Phylogenetische Analyse von Sll1797 Homologen aus verschiedenen Pro- und Eukaryoten

Alle analysierten Polypeptidsequenzen besitzen zwei hoch konservierte Aminosäurereste (Arg76, Glu155), welche für die Produktkoordinierung verantwortlich sind (Smith, 2006). Die Sequenzenvergleiche wurden zunächst mit dem ClustalW Algorithmus durchgeführt, anschließend wurde der phylogenetische Baum mit dem Maximum-Likelihood-Algorithmus (MEGA 5) berechnet (Larkin, 2007; Tamura, 2011). Die Bootstrap Werte wurden mit 1.000 Replikaten ermittelt (Zahlenwerte nahe den Gabelungen). *Synechocystis* sp., Sll1797 NP_440671; *Escherichia coli*, UbiC NP_418463; *Phytophtora infestans*, h.P. XP_002905693; *Phytophtora sojae*, h.P. EGZ23447; *Vibrio cholerae*, h.P. YP_004938445; *Pseudomonas putida*, UbiC YP_007232093; *Chlorella variabilis*, UbiC EFN54688; *Nostoc* sp., UbiC YP_007049400; *Microcystis aeruginosa*, h.P. ZP_18850280; *Porphyra purpurea*, Ycf21 NP_053990; *Coccomyxa subellipoida*, h.P. EIE20228 und *Tetrahymena thermophila*, h.P. XP_001011395. h.P., hypothetisches Protein.

Wie Kristallstrukturanalysen der *E. coli* Chorismatlyase (UbiC) zeigten, sind diese beiden Aminosäurereste (Arg76 und Glu155) für die Produktkoordination in dem Enzym verantwortlich (Smith et al, 2006, Gallagher et al, 2001). Die phylogenetische Analyse der Sequenzen veranschaulicht, dass die *Synechocystis* Sequenz zu plastidären Proteinen aus Algen wie *Chlorella variabilis*, *Coccomyxa subellipoida* und der Rotalge *Porphyra purpurea* höhere Ähnlichkeiten aufweist, als zu den näher verwandten Proteobakterien. Ähnliche Sequenzen wurden auch in Pflanzenpathogenen wie den Oomyceten *Phytophtora infestans* und *Phytophotora sojae* gefunden. In Samenpflanzen wird 4-Hydroxybenzoat meist über den Phenylpropanoid Syntheseweg bereitgestellt (Pennock, 1983), was erklärt, warum diese Organismen keine homologen Sequenzen zu Sll1797, mit den typischen konservierten Aminosäureresten, besitzen. Das gleiche gilt für Tiere, in Hinblick auf die Ubichinon-Biosynthese in Mitochondrien, in denen auch keine homologen Sequenzen nachweisbar waren (Parson & Rudney, 1964). Interessanterweise wurde in dem Modellorganismus *Tetrahymena termophila*, der Eigenschaften höherer Eukaryoten besitzt, eine Polypeptidsequenz identifiziert, die die genannten konservierten Aminosäuren besitzt.

3.1.2 *In silico* Analyse der Decarboxylasen

Die phylogenetische Analyse der *Synechocystis* Gene führte zur Identifizierung der Gene *slr1099* und *sll0936*. Die Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz von Slr1099 zu UbiX (*E. coli*) betragen 40% und die von Sll0936 zu UbiD (*E. coli*) 43%. Untereinander sind Slr1099 und Sll0936 nur zu 12% identisch. Neben den *E. coli* 4-Hydroxy-3-octaprenylbenzoat-Decarboxylasen (UbiX und UbiD) der Ubichinon-Biosynthese zeigen die *Synechocystis* Sequenzen auch große Ähnlichkeiten zu Aminosäuresequenzen von Enzymen, die an der 4-Hydroxybenzoat Decarboxylierung beteiligt sind (Abbildung 10). Typischerweise bestehen diese Decarboxylasen aus drei Untereinheiten und sind in Operons organisiert (Lupa et al, 2005; Chow et al, 1999; Huang et al, 1999). Die Untereinheiten wurden mit B (UbiX-Gruppe), C (UbiD-Gruppe) und D (?) bezeichnet. Interessanterweise besitzen die Gene in den untersuchten Organismen wie *Bacilus subtillis*, *Streptomyces* sp. und *Sedimentibacter hydroxybenzoicus* alle eine konservierte Größe von ca. 0,6 kBp für B, 1,4 kBp für C und 0,2 kBp für D. Die Größen

der *Synechocystis* Gene *slr1099* (0,621 kBp) und *sll0936* (1,506 kBp) stimmen in hohem Maße mit den Genen dieser 4-Hydroxybenzoat-Decarboxylasen überein, jedoch sind die beiden *Synechocystis* Gene nicht in einem Operon organisiert. Auch die Aminosäuresequenz der dritten Untereinheit (C) war mit Hilfe von *in silico* Analysen in *Synechocystis* oder anderen Cyanobakterien nicht nachweisbar.

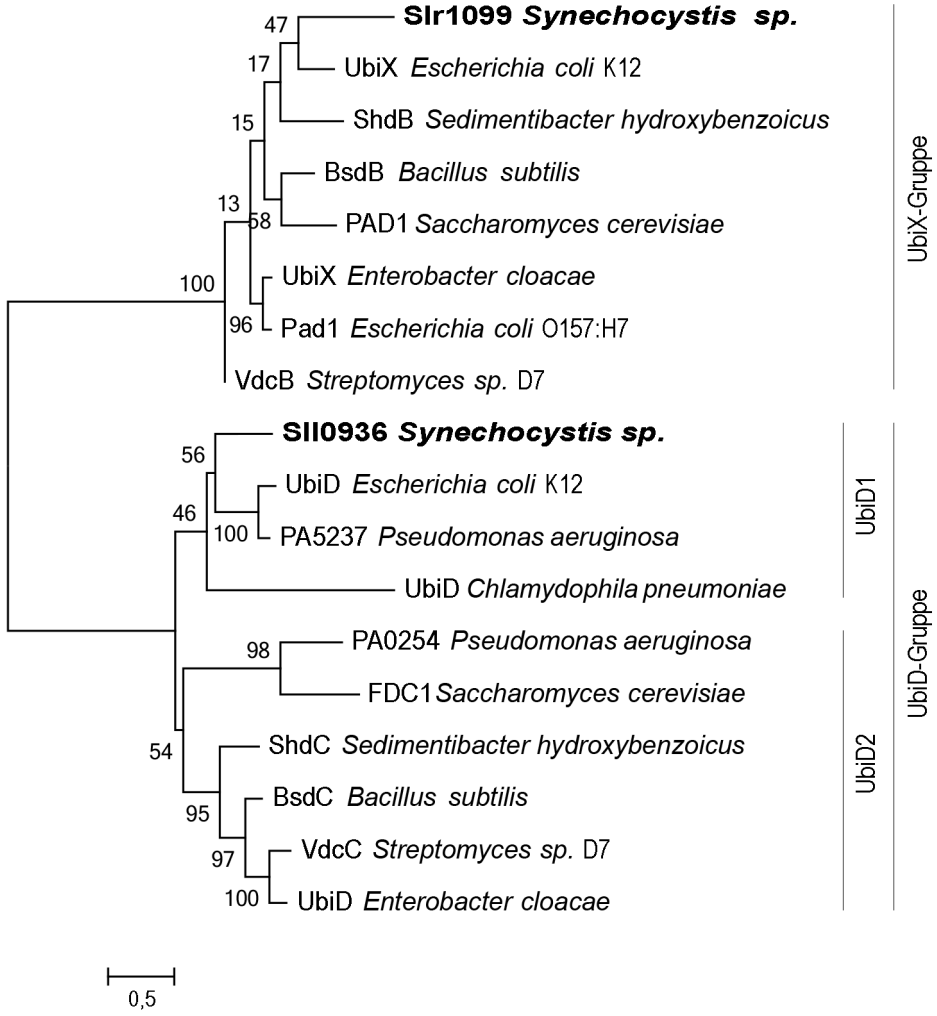


Abbildung 10: Phylogenetische Analyse verschiedener Decarboxylasen

Die Polypeptidsequenzvergleiche verschiedener nicht-oxidativer Decarboxylasen wurden zunächst mit dem ClustalW Algorithmus erstellt (Larkin et al, 2007). Anschließend wurde der phylogenetische Baum mit dem Maximum-Likelihood-Algorithmus (MEGA 5) berechnet (Tamura et al, 2011). Die Bootstrap Werte wurden mit 1.000 Replikaten ermittelt (Zahlenwerte nahe den Gabelungen). *Sedimentibacter hydroxybenzoicus*, ShdB AAY67850, ShdC AAD50377; *Bacillus subtilis*, BsdB CAB12157, BsdC CAB12158; *Enterobacter cloacae*, UbiX CAD19476, UbiD CAD19477; *Streptomyces* sp., VdcB AAD28781, VdcC AAD28782; *Escherichia coli*, UbiX NP_288885, UbiD NP_418285; *Synechocystis* sp., Slr1099 NP_440078, *sll0936* NP_440197; *Chlamydophila pneumoniae*, UbiD NP_300323; *Pseudomonas aeruginosa*, UbiD YP_005984193; *Saccaromyces cerevisiae*, PAD1p NM_001180846, FDC1p NM_001180847; *Escherichia coli*, Pad1 NP_311620.

Im Gegensatz zur UbiX-Gruppe finden sich in der UbiD-Gruppe zwei Untergruppen, und zwar die UbiD1-Untergruppe und die UbiD2-Untergruppe. Zu der UbiD2-Untergruppe gehört das kürzlich kristallisierte Protein PA0254 aus *Pseudomonas aeruginosa* (Jacewicz et al, 2013). Dieses zeigt etwa eine 24%ige Sequenz-Übereinstimmung mit der Sequenz von Sll0936 und bildet bei der Kristallisation ein Homodimer aus. Für die Enzyme dieser Gruppe konnte zwar gezeigt werden, dass sie unter anderem 4-Hydroxybenzoat decarboxylieren, es war jedoch nicht nachweisbar, dass sie auch eine Rolle in der Ubichinon-Biosynthese spielen. Die Enzyme beider Gruppen besitzen Bindestellen für zweiwertige Metall-Kationen, wobei nur für die UbiD1-Untergruppe eine Steigerung der Enzymaktivität durch die Zugabe von Metall-Kationen gezeigt wurde (Jacewicz et al, 2013, Liu et al, 2007, Leppik et al, 1976, Matsui et al, 2006). Auch die Kristalldaten zu den Proteinen der beiden Untergruppen weisen Unterschiede auf, so kristallisiert PA5237 aus *Pseudomonas aeruginosa*, welches 46% Sequenzübereinstimmung zu Sll0936 aufweist, in einem Homo-Hexamer (Jacewicz et al, 2013). Zudem deuten die Daten zu UbiD aus *E. coli* und *Chlamydophila pneumoniae* darauf hin, dass die Enzyme der UbiD1-Untergruppe an der Ubichinon-Biosynthese bzw. Plastochinon-Biosynthese beteiligt sind (Liu et al, 2007, Leppik et al, 1976).

3.1.3 In silico Analyse der Hydroxylasen

Die Aminosäuresequenz der *Synechocystis* Hydroxylase Slr1300, die vermutlich 2-Solanesylphenol am C1-Atom hydroxyliert, wurde mit Sequenzen bereits untersuchter Hydroxylasen verglichen. Die Sequenzen der Enzyme stammen alle aus unterschiedlichen Pro- und Eukaryoten, die die Hydroxylierung verschiedener Vorstufen des Ubichinons katalysieren. Im Gegensatz zum Plastochinon wird Ubichinon an drei Positionen (C1, C5, C6) hydroxyliert, wobei die Hydroxy-Gruppen an Position C5 und C6 anschließend methyliert werden (Abbildung 11).

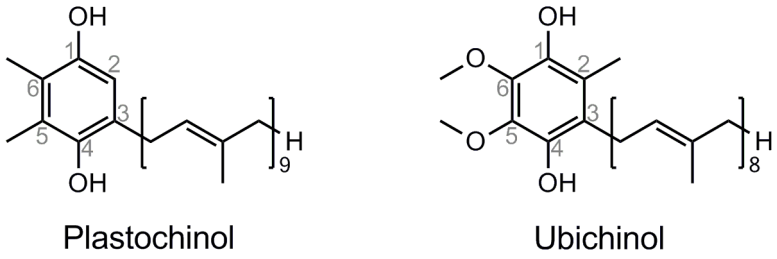


Abbildung 11: Nummerierung der C-Atome von Plastochinol und Ubichinol

Anhand der Sequenzvergleiche lassen sich die Hydroxylasen in drei Gruppen einteilen (Abbildung 12). Die dargestellten Enzyme der Coq7-Gruppe katalysieren alle die Hydroxylierung an der Position C6, die Enzyme der UbiB-Gruppe hydroxylieren das C5-Atom am Ubichinon (Vajo et al, 1999; Adachi et al, 2003; Padilla et al, 2009; Stenmark et al, 2001; Poon et al, 2000). Im Gegensatz dazu hydroxylieren die Enzyme der Coq6-Gruppe die C1-, die C5- oder die C6-Position (Abbildung 11) (Kwon et al, 2000; Meganathan, 2001b; Chehade et al, 2013; Ozeir et al, 2011; Heeringa et al, 2011). Trotz der unspezifischen Hydroxylierungs-Positionen besitzen alle Enzyme der Coq6-Gruppe, einschließlich Slr1300, drei konservierte Regionen: eine ATP-Binderegion, ein Motiv mit einer FAD/NADH Bindestelle und eine Konsensussequenz, die den Ribitylrest des FAD bindet (Gin et al, 2003). Allerdings ist UbiF aus *E. coli* das einzige bekannte Enzym, das zur Coq6-Gruppe gehört und die C6-Position hydroxyliert. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass Coq7p aus *Caenorhabditis elegas*, Coq7p aus *Thiobacillus ferrooxidans* und Coq7p aus *Pseudomonas aeruginosa* in der Lage sind eine *E. coli* Δ*ubiF* Mutante zu komplementieren (Adachi, 2003; Stenmark et al, 2001). Ob die Enzyme der UbiB-Gruppe auch den Phänotyp anderer Gruppen komplementieren können, wurde bisher nicht gezeigt. Nach kürzlich veröffentlichten Ergebnissen ist es sogar fraglich, ob es sich bei UbiB

tatsächlich um Hydroxylasen handelt, denn eine *E. coli* Δ*ubiI*-Mutante akkumulierte 4-Hydroxy-3-octaprenylphenol, ein Intermediat, das nicht an C5 hydroxyliert war (Chehade et al, 2013).

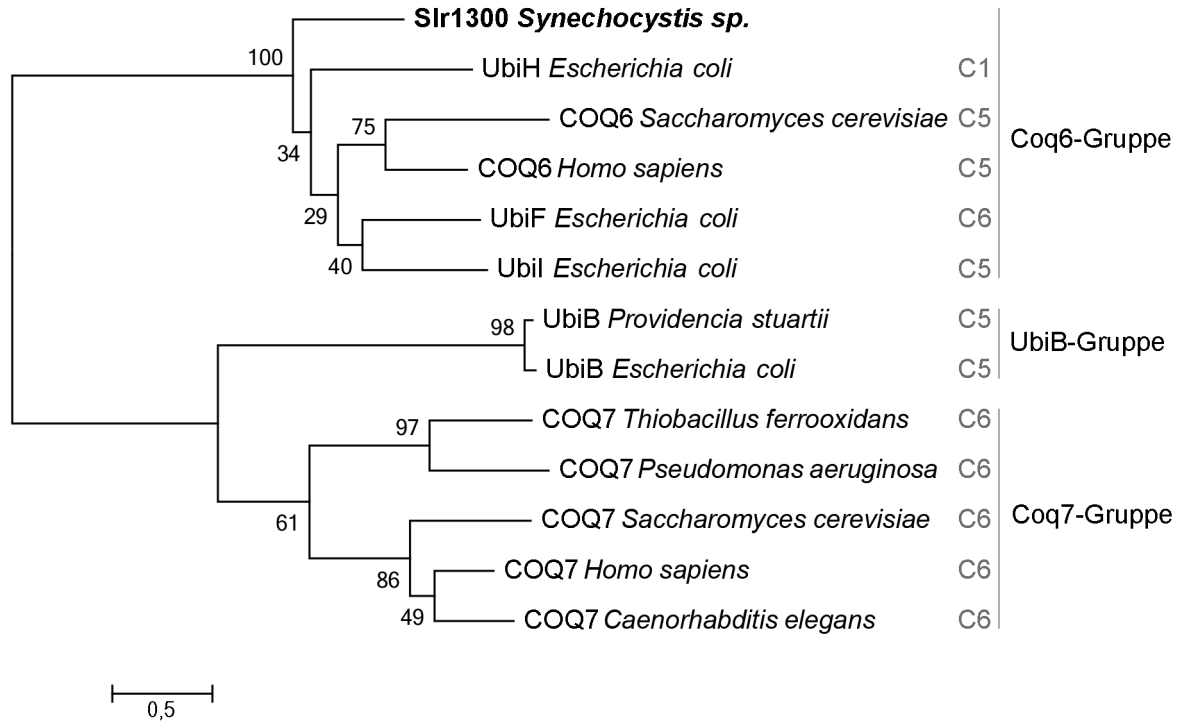


Abbildung 12: Phylogenetische Analyse von Hydroxylasen

Polypeptidsequenzen wurden mit dem ClustalW-Algorithmus verglichen und anschließend einer phylogenetischen Analyse mit dem Maximum-Likelihood-Algorithmus unterzogen (Larkin, 2007; Tamura, 2011). Die Bootstrap Werte wurden mit 1.000 Replikaten ermittelt (Zahlenwerte nahe den Gabelungen). Die Kennzeichnung hinter den Artbezeichnungen geben die Position der Hydroxylierung an (siehe Abbildung 11). *Synechocystis* sp., Slr1300 NP_440170; *Escherichia coli*, UbiH NP_417383, UbiB YP_491607, UbiF YP_488953, UbiI ABJ02335; *Saccharomyces cerevisiae*, COQ6 NP_011771, COQ7 NP_014768; *Homo sapiens*, COQ6 NM_182476, COQ7 NM_016138; *Caenorhabditis elegans*, COQ7 NP_498128; *Providencia stuartii*, UbiB YP_006216108; *Pseudomonas aeruginosa*, COQ7 AAG04044; *Thiobacillus ferrooxidans*, COQ7 NC_011761

3.2 4-Hydroxybenzoat ist für die Plastochinon-Biosynthese erforderlich

Im Gegensatz zu Pflanzen ist in Cyanobakterien die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase nicht für die Plastochinon-Biosynthese in Cyanobakterien notwendig (Dähnhardt et al, 2002). Es wurde postuliert, dass einer der entscheidenden Schritte in der cyanobakteriellen Plastochinon-Biosynthese die Prenylierung von 4-Hydroxybenzoat ist (Abbildung 7 Einleitung). Um zu überprüfen, ob 4-Hydroxybenzoat anstelle von Homogentisat in Plastochinon eingebaut wird, wurden *Synechocystis* Flüssigkulturen für vier Tage mit radioaktiv markiertem [^{14}C (Ring)]4-Hydroxybenzoat bzw. mit [^{14}C (Ring)]Homogentisat inkubiert. Anschließend wurden die Lipidextrakte der Zellen mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die radioaktiv markierten Produkte mit einem Bio-Imager detektiert (Abbildung 13).

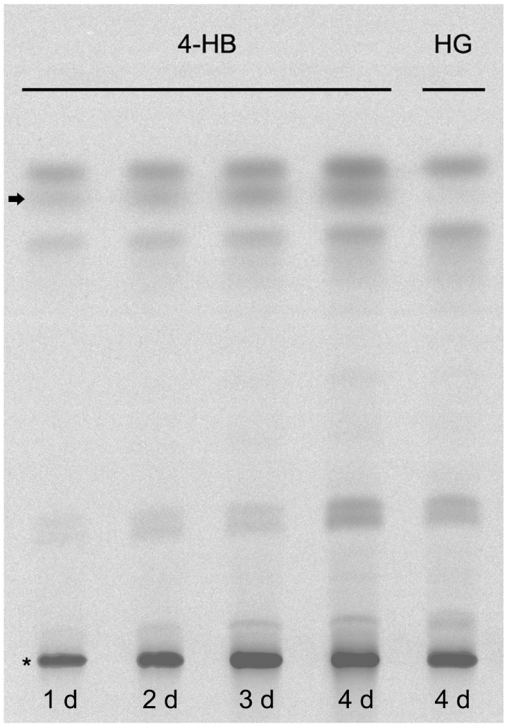


Abbildung 13: *In vivo* Markierung von Plastochinon in *Synechocystis*

Synechocystis Flüssigkulturen wurden für 1 bis 4 Tage mit [^{14}C (Ring)]4-Hydroxybenzoat (4-HB) inkubiert, bzw. für 4 Tage mit [^{14}C (Ring)]Homogentisat (HG). Die Lipidextrakte wurden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und die radioaktiv markierten Produkte mit einem Bio-Imager detektiert. Die Plastochinonbande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Identität des radioaktiv markiertem Plastochinons wurde mit unmarkiertem Plastochinon aus Spinatextrakt überprüft. Der Startpunkt auf der Dünnschichtchromatographieplatte ist mit einem Stern gekennzeichnet.

Im Radiogramm (Abbildung 13) sind die lipophilen, radioaktiv markierten Produkte zu erkennen, die bei der *in vivo* Markierung der *Synechocystis* Zellen gebildet wurden. In den ersten vier Spuren sind die Lipidextrakte der Zellen aufgetrennt worden, die mit [^{14}C (Ring)]4-Hydroxybenzoat für 1 bis 4 Tage inkubiert wurden. In der fünften Spur ist der Lipidextrakt der Zellen aufgetrennt worden, die für 4 Tage mit [^{14}C (Ring)]Homogentisat inkubiert wurden. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die Inkubation der Zellen mit [^{14}C (Ring)]4-Hydroxybenzoat zu einer Markierung im Plastochinon führte. Im Gegensatz dazu konnte in den Lipidextrakten der *Synechocystis* Zellen, die mit Homogentisat inkubiert wurden, kein radioaktiv markiertes Plastochinon nachgewiesen werden.

Da der Defekt im Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Gen keinen Einfluss auf den Plastochinon-Gehalt hatte (Dähnhardt et al, 2002) und Homogentisat nicht *in vivo* in Plastochinon eingebaut wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass Homogentisat, im Gegensatz zu Pflanzen, in Cyanobakterien nicht für die Plastochinon-Biosynthese notwendig ist. Zudem wurden in Cyanobakterien keine Aminosäuresequenzen gefunden, die Ähnlichkeiten zu den Sequenzen von Enzymen aufwiesen, die in Pflanzen an der Plastochinon-Biosynthese beteiligt sind. Demnach muss es in Cyanobakterien einen alternativen Plastochinon-Biosyntheseweg, zu dem in höheren Pflanzen, geben. Die Sequenzvergleiche mit *E. coli* Aminosäuresequenzen weisen darauf hin, dass die cyanobakterielle Plastochinon-Biosynthese deutlich mehr Ähnlichkeiten zur Ubichinon-Biosynthese in *E. coli* besitzt, als zur Plastochinon-Biosynthese in Pflanzen. Da auch in *E. coli* 4-Hydroxybenzoat als aromatische Vorstufe für die Ubichinon-Biosynthese benötigt wird (Bräuer et al, 2008), deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Plastochinon-Biosynthese in *Synechocystis* ähnlich zur Ubichinon-Biosynthese in *E. coli* abläuft.

3.3 Komplementierungs-Studien in *E. coli* Mutanten

Bereits in den 1970er Jahren wurde begonnen die *E. coli* Ubichinon-Biosynthese unter anderem mit Mutanten aufzuklären, die einen Defekt in der Ubichinon-Biosynthese aufwiesen. Die Mutanten mit einem solchen Gendefekt zeigten typischerweise einen verminderten Ubichinon-Gehalt und ein deutlich reduziertes Wachstum (Young et al, 1972; Gulmezian et al, 2007; Lawrence et al, 1974; Newton et al, 1972; Young et al, 1973).

In dieser Arbeit wurden Komplementierungsversuche mit diesen Mutanten durchgeführt, um Hinweise zu finden, ob die Funktion der *E. coli* Gene von den postulierten *Synechocystis* Genen übernommen werden kann. Dazu wurden die entsprechenden *Synechocystis* Gene, unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promoters, in den jeweiligen *E. coli* Mutanten exprimiert (Tabelle 18). Die Gene der *E. coli* Mutanten wurden durch Insertionsmutagenese hergestellt, indem die entsprechenden Gene durch Kanamycin-Resistenzkassetten ausgetauscht wurden (Baba et al, 2006). Die Δ*ubiD* Mutante besaß im Gegensatz dazu nur eine Punktmutation im *ubiD*-Gen (Zhang & Javor, 2000). Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens der *E. coli* Zellen erfolgte durch die Messung der Wachstumsraten in Flüssigmedium. Um die Ubichinon-Gehalte zu bestimmen, wurden die Lipidextrakte der *E. coli* Zellen mittels HPLC analysiert.

Tabelle 18: Komplementierung von *E. coli* Ubichinon-Defektmutanten

Bezeichnung des ausgeschalteten Enzyms	Stamm	Resistenz	Art der Mutation	Expressionskonstrukt
-	Wildtyp	keine	keine	pQE60
Chorismatlyase	Δ*ubiC*	Kanamycin	Insertion	pQE60-*sll1797*
Decarboxylase	Δ*ubiX*	Kanamycin	Insertion	pQE60-*slr1099*; pQE60-*sll0936*
Decarboxylase	Δ*ubiD*	keine	Punktmutation	pQE60-*sll0936*; pQE60-*slr1099*
Hydroxylase	Δ*ubiH*	Kanamycin	Insertion	pQE60-*slr1300*

Verglichen mit der Wildtyp-Kontrolle, führte die Kultivierung der *E. coli* Chorismatlyase-Mutante (Δ*ubiC*) in LB-Flüssigmedium zu keinem messbaren Unterschied bezüglich des Wachstumsverhaltens und des Ubichinon-Gehaltes (Daten nicht gezeigt). Denn die 4-Hydroxybenzoat-Konzentration im LB-Medium reichte bereits aus, um für die Ubichinon-Biosynthese genügend Substrat bereitzustellen. Im Gegensatz dazu führte die Kultivierung in M56-Minimal-Medium mit Bernsteinsäure als einziger Kohlenstoffquelle zu einem sehr deutlichen Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp. Wurde aber in der *E. coli* Chorismatlyase-Mutante das *Synechocystis* Gen *sll1797* exprimiert, zeigte die Mutante Wachstumsraten, die deutlich höher waren, als die des Wildtyps (Abbildung 14 A). Die Ubichinon-Gehalte erreichten dabei fast den Wildtyp-Gehalt, wohingegen in der *E. coli* Δ*ubiC* Mutante fast kein Ubichinon nachweisbar war (Abbildung 16).

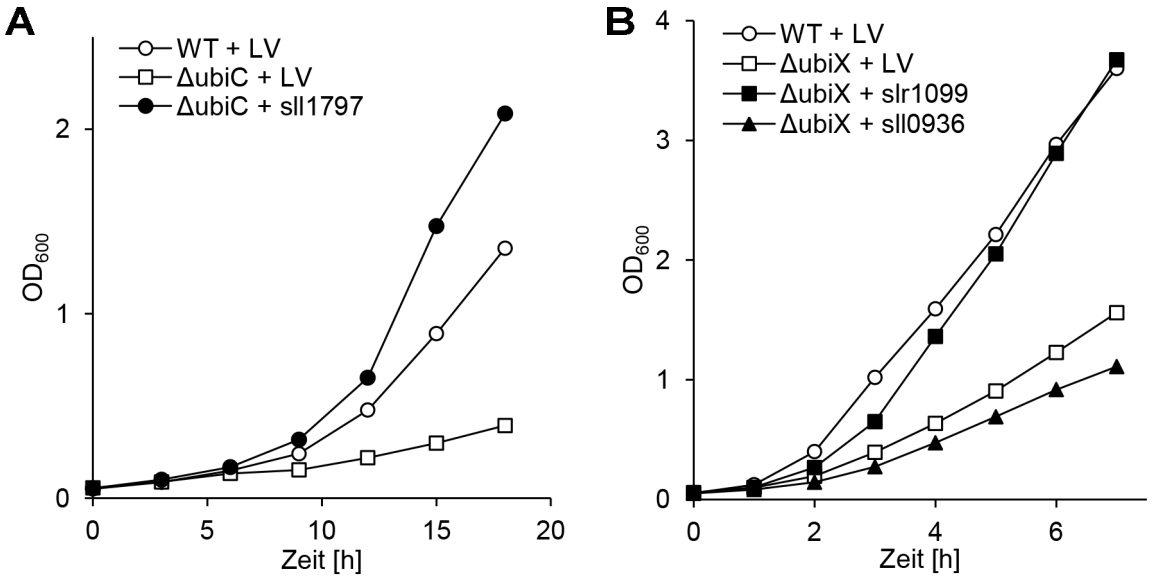


Abbildung 14: Komplementierung der *E. coli* Δ*ubiC* und Δ*ubiX* Mutante

A. Die Versuche zur Bestimmung der Wachstumsraten wurden in M56-Minimal-Medium mit Bernsteinsäure als einziger C-Quelle durchgeführt. Die Wachstumsraten der mit *sll1797* komplementierten Δ*ubiC* Mutante (Δ*ubiC* + *sll1797*) wurden mit der Δ*ubiC* Mutante und dem *E. coli* Wildtyp verglichen. B. Versuche zur Bestimmung der Wachstumsraten wurden in LB-Medium durchgeführt. Die Δ*ubiX* Mutante besaß entweder den Leervektor (LV) oder exprimierte eines der beiden *Synechocystis* Gene (*slr1099* bzw. *sll0936*). Die Daten wurden in zwei unabhängigen Versuchen bestimmt (Standardabweichung < 0,01)(LV, Leervektor).

Im Gegensatz zur Δ*ubiC* Mutante konnte das geringe Wachstum und der niedrige Ubichinon-Gehalt der *E. coli* Decarboxylase-Mutante (Δ*ubiX*) auch in Zellkulturen beobachtet werden, die in LB-Medium kultiviert wurden. In der Δ*ubiX* Mutante führte die Expression des *Synechocystis*

Gens *slr1099* auch zu einer Komplementierung des Mutanten-Phänotyps, sodass dadurch die Wachstumsrate und der Ubichinon-Gehalt auf ein Niveau, vergleichbar mit dem des Wildtyps, gesteigert werden konnte (Abbildung 14 B und 16). Obwohl angenommen wurde, dass es sich bei dem *Synechocystis* Gen *sll0936* auch um eine 4-Hydroxy-3-prenylbenzoat-Decarboxylase handelte, führte die Expression von *sll0936* in der Δ*ubiX* Mutante weder zu einer Steigerung der Wachstumsrate noch zu einer Erhöhung des Ubichinon-Gehaltes. Das Gleiche galt für das *E. coli* eigene *ubiD* Gens (Daten nicht gezeigt).

Neben der *E. coli* Δ*ubiX* Mutante wurde auch versucht die zweite Decarboxylase-Mutante durch Expression der *Synechocystis* Gene *slr1099* und *sll0936* zu komplementieren. Weder durch die Expression von *ubiD* aus *E. coli* noch durch die beiden genannten *Synechocystis* Gene war es möglich das Wachstum (Abbildung 15) oder den Ubichinon-Gehalt der Mutante signifikant zu beeinflussen. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Mutante in Vollmedium oder in Minimal-Medium kultiviert wurde. Im Gegensatz zu allen anderen verwendeten *E. coli* Mutanten, handelte es sich bei der Δ*ubiD* Mutante um eine Punktmutante. Daher wurde versucht das *E. coli ubiD* Gen durch Insertionsmutagenese auszuschalten (siehe Kapitel 3.4).

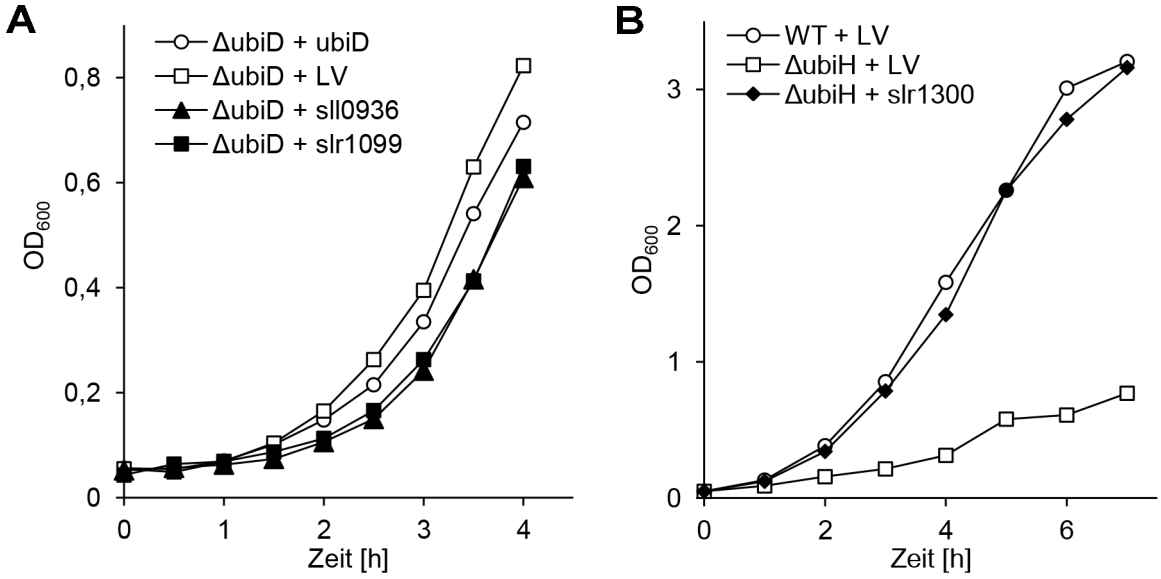


Abbildung 15: Komplementierung der *E. coli* Δ*ubiD* und Δ*ubiH* Mutanten

A. Die Versuche zur Bestimmung der Δ*ubiD* Wachstumsraten wurden in M56-Minimal-Medium mit Bernsteinsäure als C-Quelle durchgeführt. Die Δ*ubiD* Punktmutante besaß entweder den Leervektor (LV) oder exprimierte eines der beiden *Synechocystis* Gene (*slr1099* bzw. *sll0936*). Als Positivkontrolle wurde die Δ*ubiD* Punktmutante mit dem *E. coli* eigenen *ubiD* Gen transformiert. B. Die Versuche zur Bestimmung der Δ*ubiH* Wachstumsraten wurden in LB-Medium durchgeführt. Die Δ*ubiH* Mutante besaß entweder den LV oder exprimierte das *Synechocystis* Gen *slr1300*. Die Daten wurden in zwei unabhängigen Versuchen bestimmt (Standardabweichung < 0,01).

Zur Untersuchung des *Synechocystis* Gens *slr1300* wurde dieses in der *E. coli* Hydroxylase-Mutante (Δ*ubiH*) exprimiert. Dadurch konnte eine Wachstumsrate erzielt werden, die der des Wildtyps entsprach. Auch der Ubichinon-Gehalt konnte durch die Expression von *slr1300* signifikant erhöht werden. Im Vergleich zu den anderen Komplementierungen wurde hierbei der Ubichinon-Gehalt des Wildtyps zu etwa 35% erreicht. Dagegen war in der Δ*ubiH* Mutante überhaupt kein Ubichinon mehr nachweisbar (Abbildung 16).

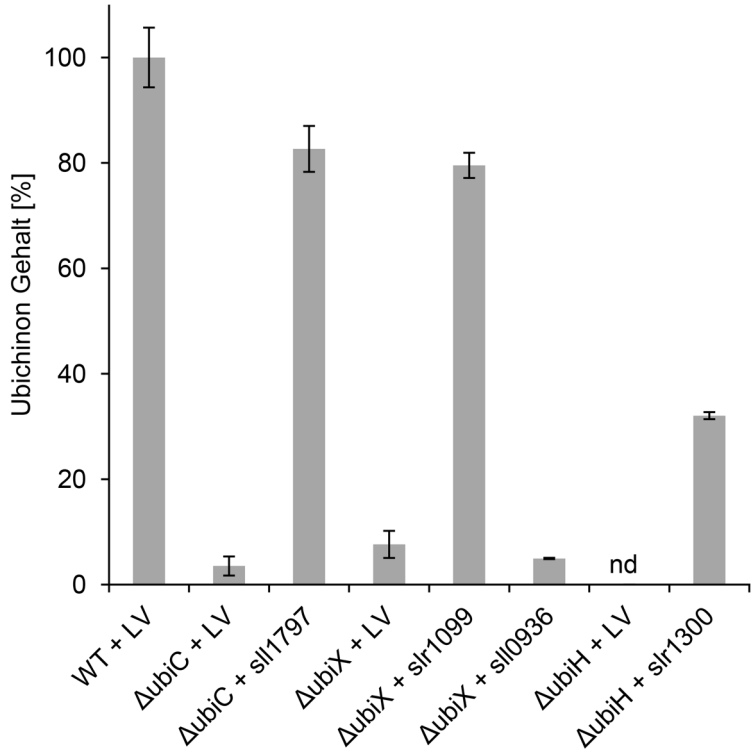


Abbildung 16: Bestimmung der Ubichinon-Gehalte in *E. coli* Mutanten

Zur Bestimmung der Ubichinon-Gehalte wurden die Zellen entweder in M56-Minimal-Medium (WT, Δ*ubiC*, Δ*ubiC* + *sll1797*) oder in LB-Medium (WT, Δ*ubiX*, Δ*ubiX* +*slr1099*, Δ*ubiX* +*sll0936*, Δ*ubiH*, *ubiH* + *slr1300*) kultiviert. Die Lipidextrakte der entsprechenden Stämme wurden mittels HPLC analysiert. Als interner Standard diente Ubichinon-4. 100% entspricht bei allen Messungen ungefähr 80 (nmol Ubichinon)/(g Frischgewicht). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen. (LV, Leervektor, nd, nicht detektierbar)

3.4 Versuche zur Herstellung einer Δ*ubiD* Insertionsmutante

Die *E. coli* Δ*ubiD* Punktmutante AN66 zeigte unter den getesteten Versuchsbedingungen einen Phänotyp, der mit dem des Wildtyps vergleichbar war (Abbildung 15 A). Daher wurde versucht das *ubiD* Gen in *E. coli* durch die Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette auszuschalten. Dazu wurde das *E. coli ubiD* Gen in den pQE60 Vektor kloniert, um dann einen Teil des *ubiD* Gens mit der Kanamycin-Resistenzkassette auszutauschen (pQE60-ubiD-kanR). Als Ausgangsstamm für die Mutagenese diente der BW25113-Stamm, welcher auch zur Herstellung der Keio-Collection verwendet wurde (Baba et al, 2006). Der Wildtypstamm wurde mit dem pQE60-ubiD-kanR Vektor transformiert, sodass eine homologe Rekombination zwischen mutiertem Gen und Wildtypgen stattfinden konnte. Dabei gelang es zwar das Wildtypgen auszuschalten, jedoch konnte der Vektor, auch nach mehrtägiger Kultivierung, nicht aus den Zellen entfernt werden. Der Vektor, der nach der homologen Rekombination das Wildtypgen trug, konnte somit das Wildtypgen wieder in das Bakteriengenom einbringen. Dies führte entsprechend zu einer nicht vollständigen Segregation des mutierten Allels. Um die Selektion von Zellen zu erleichtern, die bereits den Vektor verloren hatten, wurde das Levansucrase-Gen (*sacB*) aus *Bacillus subtilis* in den pQE60-ubiD-kanR Vektor kloniert (pQE60-ubiD-kanR-sacB) (Abbildung 44, Anhang) (Blomfield et al, 1991; Link et al, 1997). Wenn das Kulturmedium 30 mM Saccharose enthielt, wurde Saccharose mit (2,6-β-D-Fructosyl)$_n$ zu Glucose und (2,6-β-D-Fructosyl)$_{n+1}$ umgesetzt. Das entstandene Levan konnte von *E. coli* Zellen nicht sezerniert werden, sodass es zur Vergiftung der Zellen kam, die das *sacB* Gen besaßen. Der Einsatz des Suizidgens bewirkte jedoch nicht, dass Zellen ohne den Vektor selektiert werden konnten. Ein Grund dafür könnte die hohe Mutationsrate des *sacB* Gens mit einer Frequenz von 10^{-5} sein (Blomfield et al, 1991). Die *E. coli* Zellen, die den pQE60-ubiD-kanR-sacB Vektor besaßen, wurden nun zusätzlich mit dem pKD46-Helferplasmid transformiert (Abbildung 45, Anhang) (Datsenko & Wanner, 2000). Dadurch wurde versucht die Zahl der Rekombinationsereignisse zu erhöhen. Im Einzelnen verhindert dabei das β-Gen, dass linearisierte doppelsträngige DNA durch die *E. coli* eigenen Nukleasen RecBCD und SbcCD degradiert wird. Das *exo*-Gen kodiert für eine λ-Exonuklease, welche die doppelsträngige-DNA in 5'-3'-Richtung degradiert und einzelsträngige DNA hinterlässt. Das β-Genprodukt bindet an die einzelsträngige DNA und erleichtert somit die Rekombination, indem es die Anlagerung der homologen Genbereiche unterstützt (Mosberg et al, 2010).

Das pKD46 Plasmid besitzt einen temperatursensitiven Replikationsursprung, sodass nach erfolgter Rekombination das Plasmid durch die Kultivierung bei 43°C nicht mehr repliziert werden kann. Mit dem Helferplasmid war es zwar möglich die Zahl der Rekombinationsereignisse zu erhöhen, eine vollständige Segregation des mutierten Gens konnte aber nicht nachgewiesen werden. Auch mit dieser Methode war es nicht möglich den pQE60-ubiD-kanR-sacB Vektor vollständig aus den Zellen zu entfernen.

In einem weiteren Versuch zur Herstellung der Δ*ubiD* Insertionsmutante wurde in den *E. coli* Wildtypstamm zusätzlich zum pQE60-ubiD-kanR-sacB Vektor und dem pKD46-Helferplasmid der pBAD28-*sll0936* Vektor transformiert (Abbildung 46, Anhang) (Guzman et al, 1995). Mit dem *sll0936* Genprodukt wurde versucht die Mutation im *ubiD* Gen direkt zu komplementieren. Auch dieser Versuch führte nicht dazu, dass die Zellen den pQE60-ubiD-kanR-sacB Vektor verloren. Um auszuschließen, dass der Replikationsursprung des pQE60 Vektors für den Verbleib des Vektors in den Zellen verantwortlich war, wurde der "*ubiD-kan*R" DNA-Bereich aus dem pQE60-ubiD-kanR Vektor in den pKOV-Vektor kloniert (Abbildung 47, Anhang) (Link et al, 1997). Dieser Vektor enthielt einen temperatursensitiven Replikationsursprung und das *sacB* Gen. Eine Vielzahl an Versuchen das Plasmid aus den Zellen zu entfernen, führte ebenfalls nicht zu einer vollständigen Segregation des mutierten Allels. Durch die Transformation von linearisierter DNA in die *E. coli* Zellen wurde versucht das Entfernen des Vektors zu umgehen. Da die Rekombinationseffizienz mit linearisierter DNA viel geringer war als mit zyklisierter DNA und ein Teil der linearisierten DNA in den Zellen wieder rezyklisierte, führten auch diese Versuche zu keiner vollständigen Segregation des mutierten Allels.

In vorangegangenen Arbeiten war es möglich alle nicht-essentiellen *E. coli* Gene durch Einzelgen-Deletionen, mit einer Kanamycin-Resistenzkassette, auszuschalten. Dabei wurden 303 essentielle Gene identifiziert. Zu denen gehörte auch das *ubiD* Gen (Baba et al, 2006). Im gleichen Jahr wurde allerdings eine Δ*ubiD* Mutante beschrieben, die durch Insertionsmutagenese hergestellt wurde (Liu & Liu, 2006). Da die von Liu & Liu produzierte Mutante nicht erhältlich war, wurde in dieser Arbeit versucht eine Δ*ubiD* Insertionsmutante herzustellen. Diese Versuche deuten, wie die Ergebnisse von Baba et al (2006), darauf hin, dass es sich bei *ubiD* aller Wahrscheinlichkeit nach um ein essentielles Gen handelt.

3.5 Lokalisation von *Synechocystis* Proteine in *E. coli*

Die *Synechocystis* Gene *sll1797*, *slr1099*, *sll0936* und *slr1300* wurden am 5'-Ende mit dem *gst* Gen fusioniert und in *E. coli* exprimiert, um anschließend in den subzellulären Fraktionen die Lokalisation der GST-Fusionsproteine mittels Immunodetektion nachzuweisen. Dazu wurden die Gene in den pDEST15 Vektor kloniert, in den *E. coli* Stamm BL21AI transformiert und die Genexpression durch Zugabe von Arabinose induziert. Danach wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen und bei 5.000 *g* von Zelltrümmern befreit. Die *E. coli* Zellmembranen (140.000 *g* Sediment) wurden danach durch Ultrazentrifugation des Zellextraktes (5.000 *g* Überstand) von den löslichen Proteinen (140.000 *g* Überstand) separiert. Die Proteine der jeweiligen Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Antikörper gegen das GST-Epitop analysiert (Abbildung 17).

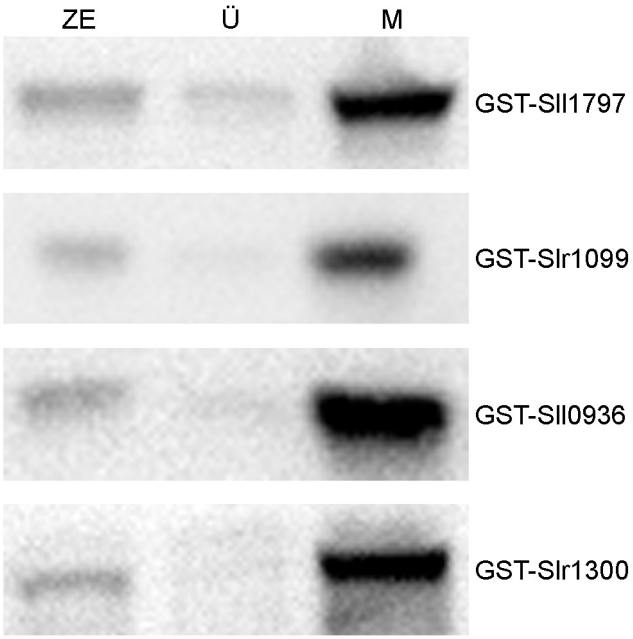


Abbildung 17: Lokalisation der *Synechocystis* GST-Fusionsproteinen in *E. coli*

Die Gene *gst-sll1797* (Chorismatlyase), *gst-slr1099* (Decarboxylase), *gst-sll0936* (Decarboxylase) und *gst-slr1300* (Hydroxylase) wurden in *E. coli* exprimiert. Von jeder Fraktion (ZE, Zellextrakt (5.000 *g* Überstand); Ü, Überstand (140.000 *g* Überstand); M, Membranfraktion (140.000 *g* Sediment)) wurden 10 µg Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und mit einem Antikörper (HRP-Konjugiert) gegen das GST-Epitop detektiert.

Alle untersuchten Fusionsproteine wurden dabei in der Membranfraktion (140.000 *g* Sediment) detektiert. Auch in der Mischfraktion, dem Zellextrakt (5.000 *g* Überstand), konnten die Fusionsproteine nachgewiesen werden. In der löslichen Fraktion (140.000 *g* Überstand) war hingegen nur ein sehr schwaches Signal zu detektieren. Vergleichbare Ergebnisse wie in Abbildung 17 dargestellt, wurden auch erzielt, wenn das N-terminale GST-Epitop mit einem N-terminalen His-Epitop ausgetauscht wurde (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise wiesen die hier untersuchten *Synechocystis* Proteine im Vorhersagemodell keine typischen Transmembrandomänen auf (Abbildung 18) (Krogh et al, 2001).

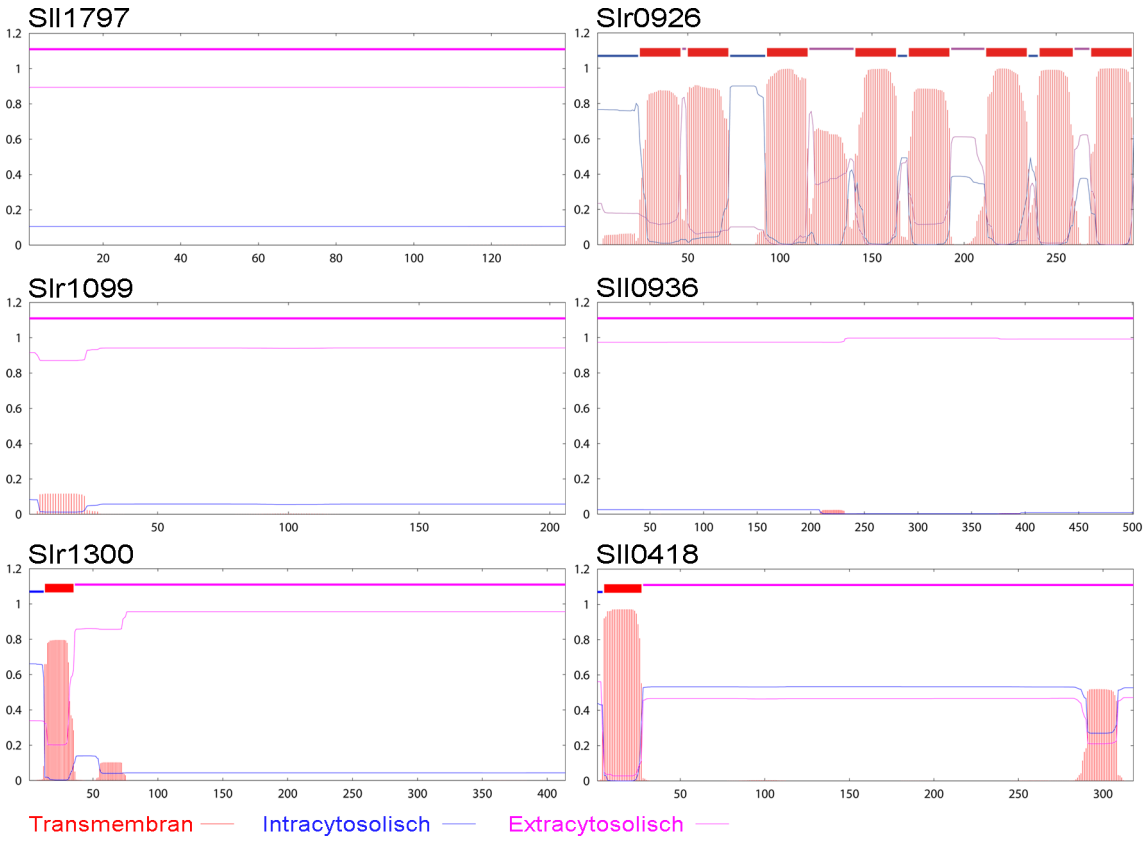


Abbildung 18: Vorhersagemodell der Transmembrandomänen von *Synechocystis* Proteinen

Der Hydrophobizitäts-Plot gibt an mit welcher Wahrscheinlichkeit Transmembrandomänen in einem Protein vorliegen (Krogh, 2001).

Sie unterscheiden sich damit von der bereits charakterisierte 4-Hydroxybenzoat-Solanesyltransferase (Slr0926), die über typische Transmembrandomainen verfügt und wahrscheinlich über acht solcher Domainen in der Biomembran verankert ist (Sadre et al, 2012). Bei der Hydroxylase (Slr1300) und der bereits beschriebenen Methyltransferase (Sll0418) scheint es sich um N-terminal verankerte Proteine zu handeln (Cheng et al, 2003). Trotz fehlender Transmembrandomainen

waren die Chorismatlyase (Sll1797) und die beiden Decarboxylasen (Slr1099, Sll0936) in der Biomembran verankert (Abbildung 17). Dies deuten darauf hin, dass die an der Plastochinon-Biosynthese beteiligten *Synechocystis* Proteine in einem membranassoziierten Komplex organisiert sind, sodass das lipophile Plastochinon leichter in die Membranen diffundieren kann.
Proteinkomplexe mit verschiedenen Enzymen und Prenyllipiden wurden in *E. coli* beschrieben (Gulmezian, 2007 et al ; Leppik et al, 1975; Knöll, 1979). Um Hinweise zu erhalten, wie die *Synechocystis* Proteine in *E. coli* mit der Biomembran interagieren, wurden die *E. coli* Membranfraktionen, die das GST-Slr1099 bzw. GST-Sll0936 Fusionsprotein enthielten, mit hohen Salzkonzentrationen (3M NaCl bzw. Guanidiniumthiocyanat) oder mit 1% Triton X-100 behandelt. Unter den getesteten Versuchsbedingungen was es allerdings nicht möglich die Membranproteine aus den Membranen herauszulösen (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde versucht die Lokalisation der *Synechocystis* Proteine anhand der Enzymaktivität in den einzelnen subzellulären *E. coli* Fraktionen zu bestimmen. Dazu wurden die *Synechocystis* Gene in den entsprechenden *E. coli* Ubichinon-Defektmutanten exprimiert. Für das Slr1099-Protein war dabei nur eine Decarboxylase-Aktivität in den Zellextrakten nachweisbar (Abbildung 19).

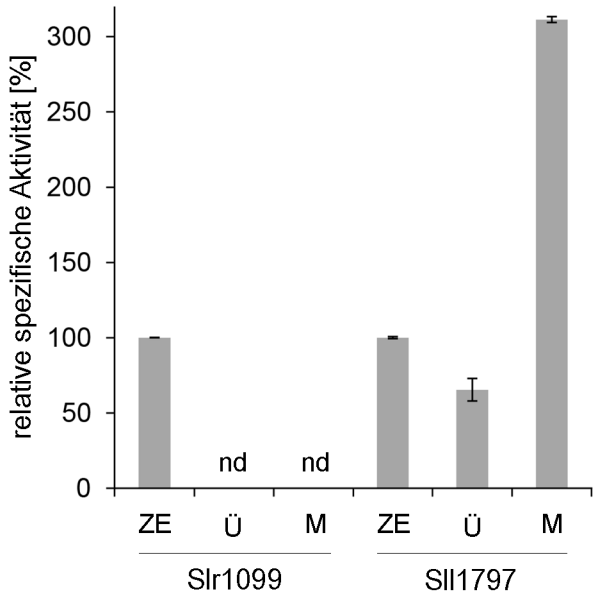


Abbildung 19: Enzymaktivitäten von *Synechocystis* Proteinen in subzellulären *E. coli* Fraktionen
Slr1099 (Decarboxylase) bzw. Sll1797 (Chorismatlyase) wurde in der *E. coli* Δ*ubiX* bzw. Δ*ubiC* Mutante exprimiert und die Enzymaktivität in den subzellulären Fraktionen gemessen (ZE, Zellextrakt (5.000 *g* Überstand); Ü, Überstand (140.000 *g* Überstand); M, Membranfraktion (140.000 *g* Sediment)). 100% entspricht einer spezifischen Aktivität von 1,2 pmol/min/mg (Slr1099) und 4,5 $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot \mu g^{-1}$ (Sll1797); nd, nicht detektierbar.

Da weder in der Membranfraktion noch in der löslichen Fraktion die Decarboxylase-Aktivität gemessen werden konnte, ist vermutlich ein löslicher Cofaktor für die Enzmyaktivität notwendig, der während der Zentrifugation aus dem Komplex herausgelöst wurde (siehe auch Kapitel 3.9). Für eine *E. coli* Decarboxylase, die an der Ubichinon-Biosynthese beteiligt ist, wurde bereits beschrieben, dass diese ebenfalls mit der Zellmembran assoziiert ist und ein löslicher Cofaktor für die Aktivität benötigt wird (Leppik et al, 1976).

Im Gegensatz zu der Decarboxylase war es möglich in der Membranfraktion der Zellen, die das Chorismatlyase-Gen exprimierten, die Enzymaktivität *in vitro* zu messen (Abbildung 19). Neben der Aktivität im Zellextrakt wurde auch in der löslichen Fraktion Chorismatlyase-Aktivität gemessen, die aber um ein vielfaches niedriger war als die der Membranfraktion. Möglicherweise löste sich die Chorismatlyase etwas leichter von der Membran ab als die Decarboxylase (Abbildung 17) und war dadurch in der löslichen Fraktion messbar. Bei der *E. coli* eigenen Chorismatlyase (UbiC) handelt es sich, im Unterschied zur *Synechocystis* Chorismatlyase, um ein lösliches Protein, welches nicht mit der Zellmembran assoziiert ist (Nichols & Green, 1992).

Obwohl die Enzymaktivitäten der Decarboxylase (Sll0936) und der Hydroxylase (Slr1300), unter den getesteten Bedingungen, bisher nicht gemessen werden konnten, deutet neben der Lokalisation der *Synechocystis* Fusionsproteine in *E. coli* auch die Enzymaktivitäten der Chorismatlyase und der 4-Hydroxybenzoat-Solanesyltransferase (Sadre et al, 2012) darauf hin, dass die Plastochinon-Biosynthese auch in *Synechocystis* an der Membran abläuft.

3.6 Charakterisierung von *Synechocystis* Mutanten

3.6.1 Herstellung von *Synechocystis* Insertionsmutanten

Ob die offenen Leserahmen *sll1797*, *slr1099*, *sll0936* und *slr1300* an der Plastochinon-Biosynthese in Cyanobakterien beteiligt sind, wurde durch die Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette, in den entsprechenden offenen Leserahmen, überprüft. Dazu wurde das jeweilige *Synechocystis* Gen in den pQE60-Vektor kloniert, ein Teil des Gens ausgeschnitten und durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt. Der Tabelle 19 sind die Fragmentgrößen zu entnehmen, die aus den jeweiligen Genen herausgeschnitten wurden, sowie die daraus resultierenden Fragmentgrößen der homologen Bereiche am 5'- bzw. am 3'-Ende.

Tabelle 19: Größe der deletierten Bereiche der mutierten Gene

Gen	Restriktionsenzyme	entfernte Bp	länge homol. Bereich 5‘-Ende [Bp]	länge homol. Bereich 3‘-Ende [Bp]
sll1797	*Aar*I	0	89	331
slr1099	*Nae*I,*Spe*I	166	285	170
sll0936	*Cla*I, *Not*I	934	392	180
slr1300	*Kpn*I, *Pac*I	522	284	439

Da *Synechocystis* Zellen, aufgrund ihrer natürlichen Kompetenz, in der Lage sind DNA aus dem umgebenden Kulturmedium aufzunehmen (Yoshihara et al, 2001), wurden die Zellen mit linearisierter Plasmid-DNA inkubiert, sodass eine homologe Rekombination zwischen der Plasmid-DNA und dem Wildtypgen stattfinden konnte. Zum Nachweis der homologen Rekombination wurden sowohl die Wildtypgene als auch die mutierten Gene von genomischer DNA mittels PCR amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 20). Für die Mutantenstämme Δ*sll1797*, Δ*slr1099* und Δ*sll0936* gelang es eine vollständige Segregation der mutierten Allele zu erzielen. Der Unterschied zwischen mutiertem *sll0936* Allel und dem entsprechenden Wildtypallel konnte erst durch einen Restriktionsverdau des PCR-Produkts gezeigt werden, da das DNA-Fragment des mutierten Allels in etwa die gleiche Größe wie die des Wildtyp Allels aufwies. Die Analyse der Δ*slr1300* Mutante zeigte, neben dem DNA-Fragment des mutierten Gens, zudem noch ein DNA-Fragment mit der Größe des Wildtyp Gens (Abbildung 20 D). Auch die Erhöhung des Selektionsdrucks auf bis zu 100 µg Kanamycin/ml führte,

im Unterschied zur Δ*slr1099* und Δ*sll0936* Mutante, bei der Δ*slr1300* Mutante zu keiner vollständigen Segregation. Dies deutete darauf hin, dass das *slr1300* Gen für *Synechocystis* essentiell ist. Die partielle Mutante wird daher im Folgenden getrennt von den Knockout-Mutanten behandelt (siehe Kapitel 3.7).

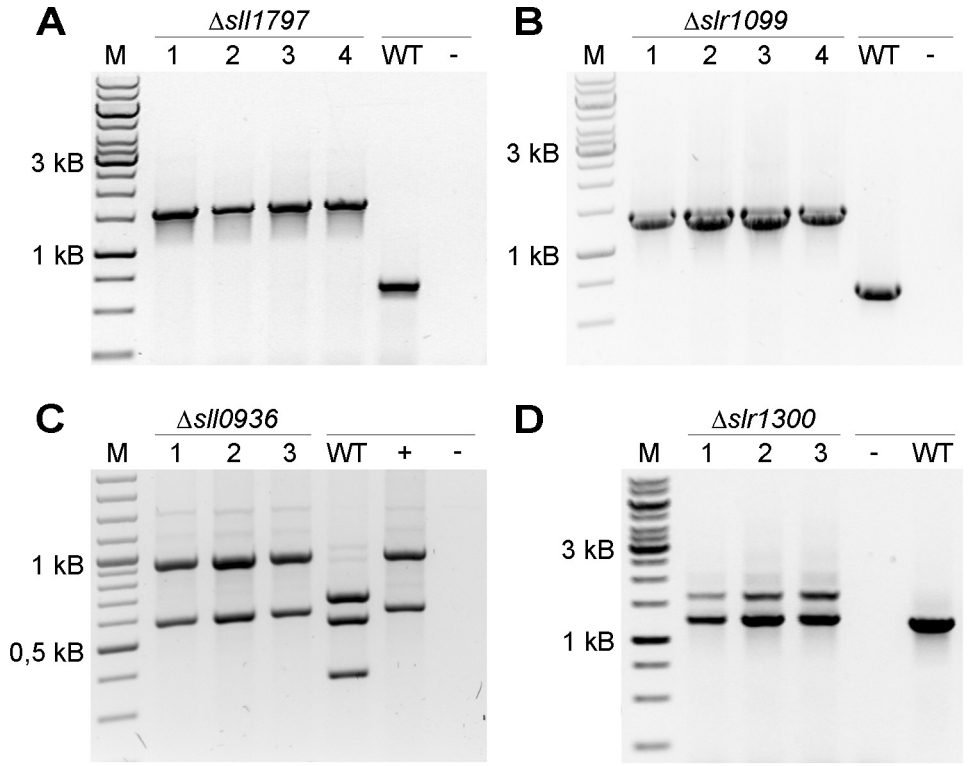


Abbildung 20: PCR-Analyse der mutierten *Synechocystis* Gene

Mittels PCR-Analyse wurden die mutierten Gene bzw. die Wildtypgene von genomischer DNA amplifiziert und mittels Agarose-Gelelekrophorese aufgetrennt. Jeweils 4 Klone der Δ*sll1797* (A) und Δ*slr1099* (B) Mutantenstämme wurden auf vollständige Segregation hin untersucht. Die PCR-Produkte von Δ*sll0936* und *sll0936* waren in etwa gleich groß und wurden zusätzlich mit *Pvu*I verdaut, sodass der WT anhand eines anderen Bandenmusters nachgewiesen werden konnte (C). In allen drei Klonen der Δ*slr1300* Mutante wurde neben dem mutierten Gen auch das Wildtypgen nachgewiesen (D). (M, Marker; WT, Wildtyp; +, Kontrollverdau des Genproduktes, welches vom pQE60-sll0936-kanR Vektor amplifiziert wurde; -, Kontroll-PCR ohne DNA-Matrize)

3.6.2 Analyse der Transkriptgehalte in *Synechocystis* Mutanten

Die Transkriptanalyse der Gene *sll1797*, *slr1099* und *sll0936* wurden in den *Synechocystis* Mutanten und im Wildtyp mittels quantitativer realtime PCR überprüft. Als Referenzgene dienten die konstitutiv exprimierten Gene *lysC* und *trpA*. Die DNA-Fragmente der quantitativen realtime PCR wurden nach 40 Zyklen gelelektrophoretisch aufgetrennt, um zu überprüfen, ob die Produkte mit den erwarteten Fragmentgrößen synthetisiert wurden (Abbildung 21).
Wie in Abbildung 21 dargestellt, waren die Transkripte aller untersuchten Wildtypgene nachweisbar, nicht aber die der mutierten Gene. Somit konnten die Ergebnisse der Genomanalysen auch auf RNA-Ebene bestätigt werden. Mit der quantitativen realtime PCR wurde zudem untersucht, ob die Mutation im *slr1099* Gen einen Einfluss auf den Transkriptgehalt von *sll0936* hat, beziehungsweise welchen Einfluss die Mutation im *sll0936* Gen besitzt. Dabei wurden die Transkriptgehalte der Mutanten relativ zu *lysC* in Abbildung 22 dargestellt. Verglichen mit dem *Synechocystis* Wildtyp zeigten die Mutantenstämme keine signifikante Änderung in den Transkriptgehalten. Die traf auch auf die relativen Transkriptgehalte bezogen auf *trpA* zu. Auch die Transkriptanalyse der Δ*sll1797* Mutante lieferten keinen Unterschied zur Wildtypkontrolle.

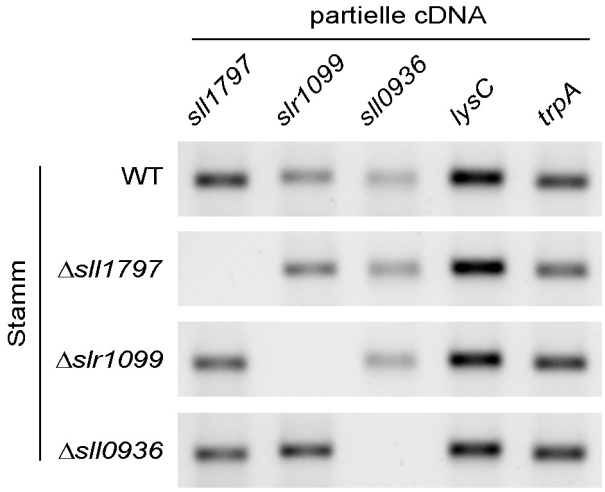


Abbildung 21: Expressionsanalyse der *Synechocystis* Mutanten

Die Gesamt-RNA aus den *Synechocystis* Mutanten und dem Wildtyp (WT) wurde mit zufallsgenerierten Hexamernukleotiden in cDNA umgeschrieben und Teile der cDNA wurden mit genspezifischen Oligonukleotiden mittels quantitativer realtime PCR amplifiziert. Nach 40 Zyklen erfolgte die gelelektrophoretische Analyse der PCR -Produkte. Als Referenzgene dienten die konstitutiv exprimierten Gene *lysC* und *trpA*.

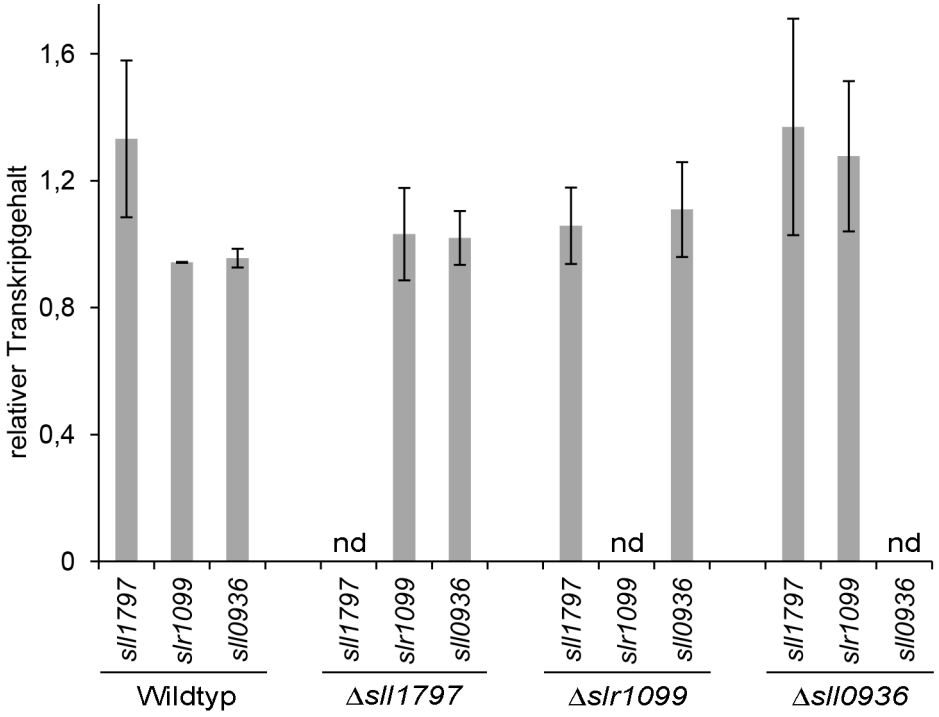


Abbildung 22: Relative Transkriptgehalte in verschiedenen *Synechocystis* Stämmen

Mittels quantitativer realtime PCR wurden die Transkriptgehalte ausgehend von Gesamt-RNA analysiert. Als Referenzgen diente das konstitutiv exprimierte *Synechocystis* Gen *lysC*. Die Werte wurden durch vier unabhängigen Versuche mit je zwei technischen Replikaten ermittelt.

3.6.3 Wachstumsanalysen der *Synechocystis* Mutanten

Um zu klären, welchen Einfluss die Mutationen auf den Phänotypen der *Synechocystis* Zellen hatten, wurden zunächst die Wachstumsraten, der Mutanten in Flüssigmedium und auf Agar-Platten vergleichend, untersucht. Abbildung 23 zeigt die Wachstumsraten der *Synechocystis* Mutanten und des Wildtyps unter Standardbedingungen in BG11-Flüssigmedium. Unter diesen Bedingungen war bei der Δ*sll1797* Mutante nur ein äußerst geringes Wachstum nachweisbar. Allerdings konnte dieser Phänotyp, durch die Zugabe von 100 µM 4-Hydroxybenzoat, komplementiert werden (Abbildung 23). Die beobachtete Komplementierung der Mutante lieferte somit einen weiteren Hinweis darauf, dass *sll1797* für eine *Synechocystis* Chorismatlyase kodiert. Interessanterweise führte die Kultivierung, in Gegenwart von 4-Hydroxybenzoat, zu einem deutlich stärkeren Wachstum als beim Wildtypstamm, wohingegen das Wachstum des Wildtyps durch 4-Hydroxybenzoat nicht stimuliert wurde.

Die beiden Mutantenstämme Δ*slr1099* und Δ*sll0936* zeigten unter Standardbedingungen zwar ein stärkeres Wachstum als die Δ*sll1797* Mutanten, jedoch ein signifikant niedrigeres Wachstum als der Wildtyp. Die Zugabe von bis zu 50 µM Dodecyl-Plastochinon, Methyl-Plastochinon oder Geranylgeranyl-Plastochinon in das Kulturmedium führte weder bei der Δ*slr1099* Mutante noch bei der Δ*sll0936* Mutante zu einer Komplementierung des Phänotyps. Möglicherweise konnten, die zum Teil stark hydrophoben Substanzen, nur in sehr geringem Maße von den Zellen aufgenommen werden, sodass eine Komplementierung des Phänotyps aufgrund der geringen Aufnahmeraten nicht erzielt wurde.

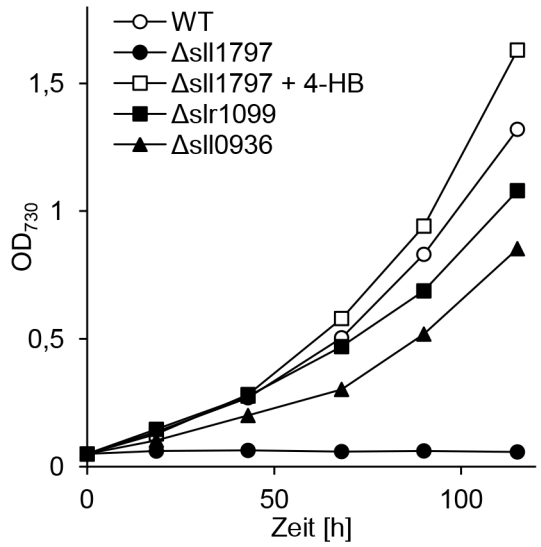


Abbildung 23: Verminderte Wachstumsraten von *Synechocystis* Mutanten

Synechocystis Mutanten und *Synechocystis* Wildtypzellen wurden unter nicht selektiven Standardbedingungen in BG11-Flüssigmedium kultiviert. Der Wachstumsdefekt, der Δ*sll1797* Mutante wurde durch Zugabe von 100 µM 4-Hydroxybenzoat, komplementiert. Dargestellt sind Durchschnittswerte mit einer Standardabweichung kleiner 0,01 von zwei unabhängigen Experimenten mit je zwei technischen Replikaten. (WT, Wildtyp; 4-HB, 4-Hydroxybenzoat)

Zur Veranschaulichung des unterschiedlichen Wachstumsverhaltens wurden die *Synechocystis* Mutantenstämme auch auf BG11-Agarplatten unter Standardbedingungen kultiviert (Abbildung 24). Ausgehend von einer OD_{730} = 0,1 wurden die Kulturen seriell in Zehnerpotenzen verdünnt und auf BG11-Agarplatten aufgetropft. Bereits nach einer fünftägigen Kultivierung waren beim Wildtyp in der 10^2-Verdünnung Kolonien mit bloßem Auge zu erkennen. Solche Kolonien bildete die Δ*sll1797* Mutante selbst während einer achtwöchigen Kultivierung nicht aus.

Ähnlich dem Wachstumsverhalten in BG11-Flüssigmedium zeigten, die beiden Mutantenstämme Δ*slr1099* und Δ*sll0936* auch auf Agarplatten unter Standardbedingungen ein stärkeres Wachstum als die Δ*sll1797* Mutante, jedoch ein deutlich niedrigeres Wachstum als der Wildtyp. Unabhängig von den Kultivierungsbedingungen war der Defekt bei der Δ*sll0936* Mutante etwas stärker ausgeprägt als bei der Δ*slr1099* Mutante. Diese Ergebnisse unterstreichen die essentielle Bedeutung der *Synechocystis* Gene *sll1797*, *slr1099* und *sll0936* für die vitalen Funktionen der Cyanobakterien.

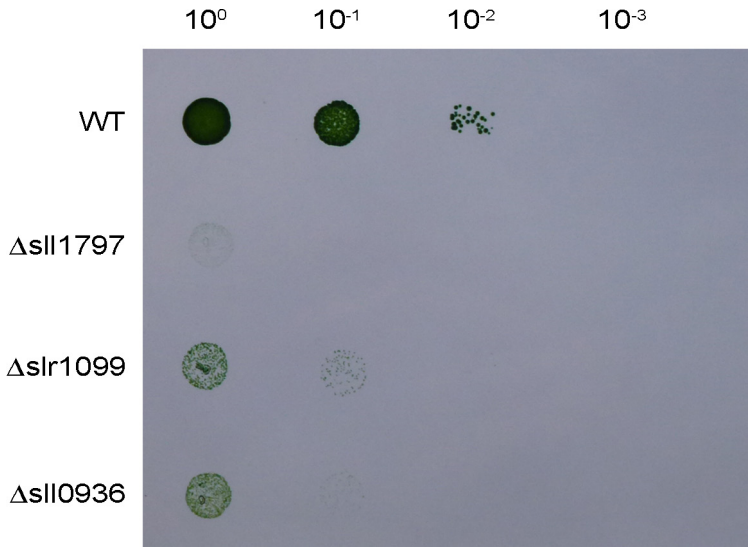


Abbildung 24: Wachstumsverhalten der *Synechocystis* Mutanten auf Agarplatten

Serielle Zehnfach-Verdünnungen von *Synechocystis* Mutanten und Wildtyp wurden ausgehen von einer Start-OD_{730} von 0,1 (10^0) auf BG11-Agarplatten aufgetropft und für zwei bis drei Wochen unter Standardbedingungen kultiviert.

Neben der makroskopischen Untersuchung des Mutanten-Wachstums, wurden die Bakterienkolonien auch mikroskopisch auf Größe und Form hin untersucht. Abbildung 25 zeigt die Kolonien der verschiedenen *Synechocystis* Stämme nach zehn tägiger Kultivierung unter Standardbedingungen. Beim Wildtyp konnten, bei einer etwa 200-fachen Vergrößerung, Kolonien mit einem Durchmesser von ca. 50 µm und einer runden Form beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Δ*sll1797* Mutante lediglich einen sehr dünnen Bakterien-Rasen, bestehend aus winzig kleinen Kolonien mit einer variablen Form. Wurden die Δ*sll1797* Zellen aber auf BG11-Agarmedium mit 100 µM 4-Hydroxybenzoat kultiviert, bildeten sie Kolonien mit einem Durchmesser von über 150 µm und einem scharf abgegrenzten Rand aus (Abbildung 25).

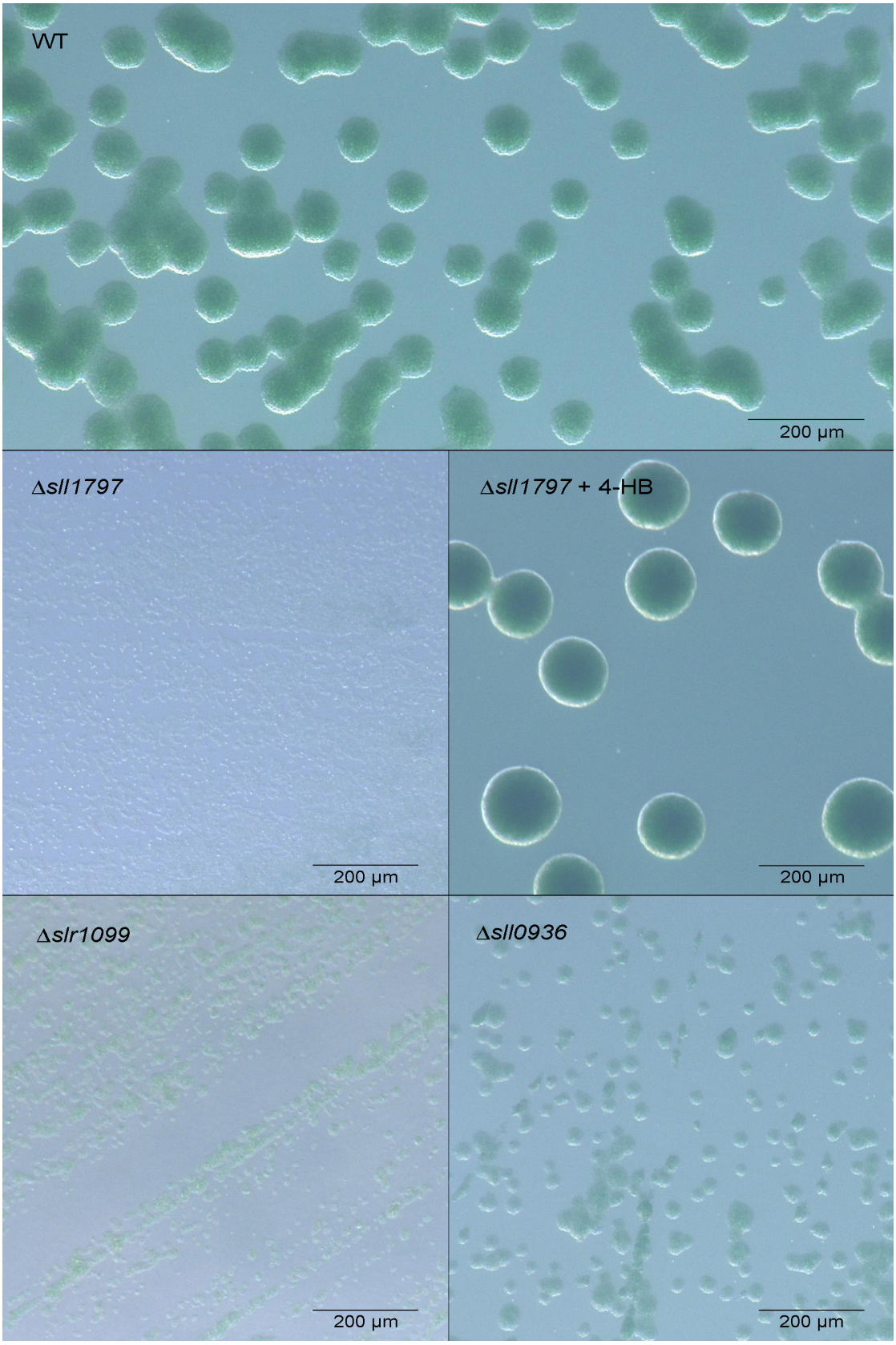


Abbildung 25: Kolonie-Form und -Größe der *Synechocystis* Mutanten

Synechocystis Wildtypzellen und Mutanten wurden 10 Tage auf BG11-Agarplatten kultiviert und bei einer 200-fachen Vergrößerung mit Auflicht mikroskopiert.

Da 4-Hydroxybenzoat weder das Wachstum noch die Koloniegröße des Wildtyps signifikant beeinflusste, scheint nicht das Reaktionsprodukt sondern eher das Substrat oder die Chorismatlyase selbst bei der Zellproliferation eine Rolle zu spielen. In diesem Zusammenhang sind die Transkriptanalysen von Shoumskaya et al (2005) interessant, die eine regulierte Expression des *sll1797* unter bestimmten Wachstumsbedingungen, wie Salzstress, nachwiesen. Die Änderungen im Wachstumsverhalten unter Salzbedingungen (bis 0,5 M NaCl) waren jedoch vergleichbar mit den Änderungen im Wachstumsverhalten des Wildtyps.

Wie in Abbildung 25 dargestellt, bildeten auch die beiden Mutantenstämme Δ*slr1099* und Δ*sll0936* nur recht kleine Kolonien mit einem inhomogenen Rand. Jedoch waren diese größer als die der Δ*sll1797* Mutante. Die Form und Größe der Kolonien wurde, wie das Wachstum in Flüssigkultur, auch durch die Zugabe von Dodecyl-Plastochinon, Methyl-Plastochinon oder Geranylgeranyl-Plastochinon nicht sichtbar beeinflusst. Die deutlich kleineren Kolonien der Δ*slr1099* Mutante verglichen mit denen der Δ*sll0936* Mutante deuten darauf hin, dass zumindest bei diesen Mutanten die Koloniegröße nicht allein durch die Wachstumsraten der Zellen bedingt wird.

3.6.4 Analyse von Chinon-Gehalten und Photosyntheseraten

Die Gesamtlipidextrakte aus den *Synechocystis* Zellen wurden mittels HPLC analysiert, um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen den Plastochinon-Gehalten und dem Wachstumsverhalten der *Synechocystis* Mutanten besteht. Wie Abbildung 26 veranschaulicht, war es, mit dem gewählten Trennverfahren möglich, Plastochinon von Phyllochinon zu trennen. Ein Einfluss auf den Phyllochinon-Gehalt konnte jedoch für keinen der Mutantenstämme nachgewiesen werden (Abbildung 26). Die Mutanten enthielten, wie der Wildtyp, einen Phyllochinon-Gehalt von ca. 120 µg/OD_{730}. Der Plastochinon-Gehalt war hingegen in allen drei Mutantenstämmen, verglichen mit dem Wildtyp, stark reduziert (Abbildung 26).

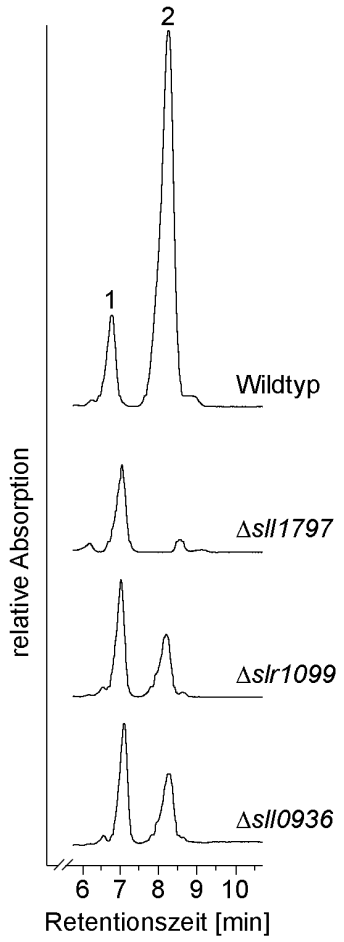


Abbildung 26: HPLC-Chromatogramme von *Synechocystis* Gesamtlipidextrakten

Darstellung ausgewählter HPLC-Chromatogramme der untersuchten *Synechocystis* Mutanten und dem Wildtypstamm. Plastochinon (2) wurde nach einer Retentionszeit von 8,2 min bei einer Absorptionswellenlänge von 255 nm detektiert. Die Retentionszeit von Phyllochinon (1) lag bei 6,9 min. Als Referenzsubstanzen wurde für Plastochinon entweder Decyl-Plastochinon (Sigma) oder, Plastochinon-9 aus Spinatextrakt verwendet. Für Phyllochinon wurde Vitamin K1 (Sigma) verwendet.

Die Δ*sll1797* Mutante zeigte einen sehr niedrigen Plastochinon-Gehalt, der weniger als 8% des Wildtypgehaltes betrug. Möglicherweise ist der Gehalt noch geringer, da bei der Cochromatographie mit Lipidextrakten der Mutante der kleine Peak nicht zweifelsfrei als Plastochinon identifiziert werden konnte (Abbildung 26).

Im Unterschied zur Δ*sll1797* Mutante war Plastochinon in den beiden Mutantenstämmen Δ*slr1099* und Δ*sll0936* klar nachweisbar. Der Gehalt war allerdings in den Mutanten drastisch reduziert und lag nur bei 20% bzw. 30% des Wildtypgehaltes. Da die Einfachmutanten sowohl von Δ*slr1099* als auch von Δ*sll0936* einen typischen Phänotyp zeigten, wird deutlich, dass Sll0936 den Defekt der *slr1099* Mutante nicht kompensieren kann und umgekehrt. Somit sind die beiden Decarboxylase-Gene *slr1099* und *sll0936* in *Synechocystis* nicht redundant. Dafür spricht auch, dass *sll0936* nicht in der Lage war die *E. coli* Δ*ubiX* zu komplementieren (siehe Kapitel 3.3).

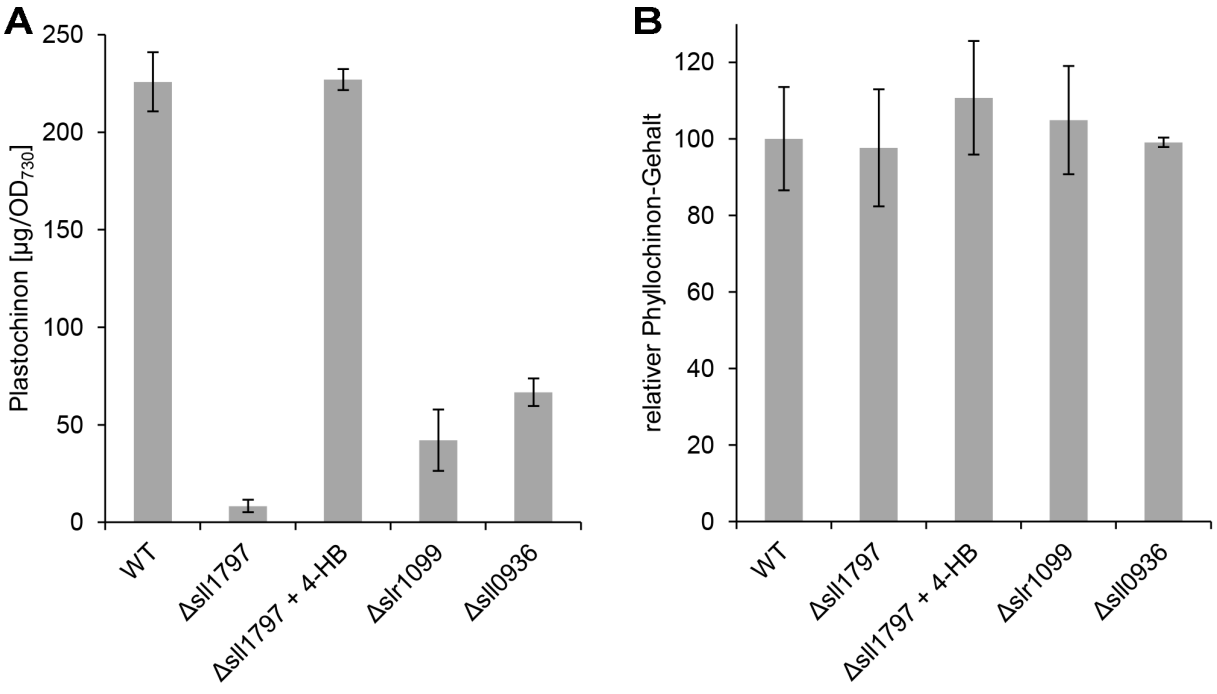


Abbildung 27: Plastochinon- und Phyllochinon-Gehalte der *Synechocystis* Mutanten

Plastochinon-Gehalte (A) und Phyllochinon-Gehalte (B) aus Lipidextrakten von *Synechocystis* Mutanten wurden mittels HPLC-Analyse ermittelt. Die Werte wurden anhand einer Standardreihe mit Decyl-Plastochinon bzw. Phyllochinon errechnet. Die Werte wurden aus mindestens fünf biologischen Replikaten ermittelt. 100% Phyllochinon entsprachen ca. 120 µg/OD_{730}. (WT, Wildtyp)

In beiden Mutanten lag der Plastochinon-Gehalt zwar deutlich unter dem des Wildtyps, ein vollständiges Plastochinon-Defizit konnte jedoch nicht beobachtet werden. Eine Δ*slr1099*/*sll0936* Doppelmutante könnte Aufschluss darüber geben, ob eine weitere Decarboxylase für den Restgehalt an Plastochinon verantwortlich ist oder durch geringe Decarboxylase-Aktivität von Sll0936 in der Δ*slr1099*-Mutante bzw. von Slr1099 in der Δ*sll0936*-Mutante bedingt wird.
Anhand von Sauerstoffproduktionsraten wurde überprüft, ob der geringe Plastochinon-Gehalt in den *Synechocystis* Mutanten auch zu einer verminderten Photosyntheserate führte (Abbildung 28). Für die Δ*slr1099* und Δ*sll0936* Mutantenstämme lag diese, mit etwa 83% beziehungsweise 92%, leicht unter der des Wildtyps. Im Gegensatz dazu lag die Photosyntheserate der Δ*sll1797* Mutante bei unter 4% der Wildtyprate, was mit dem sehr geringen Plastochinon-Gehalt der Mutante korreliert.

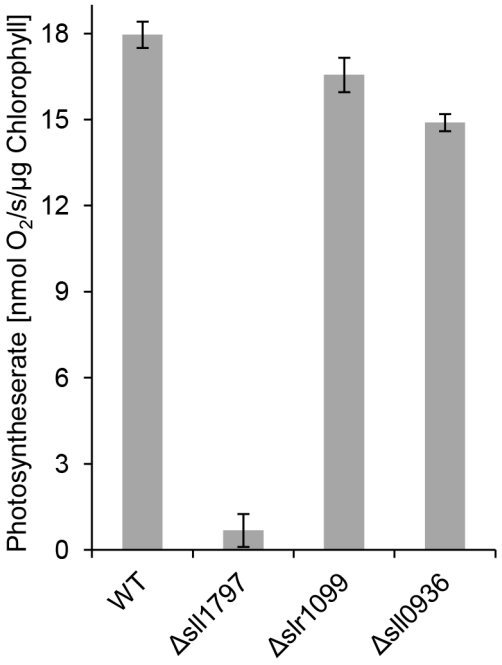


Abbildung 28: Photosyntheseraten von *Synechocystis* Mutanten

Die Photosyntheseraten wurden bezogen auf den Chlorophyll-Gehalt der Bakterienkulturen gemessen. Die Messung erfolgte in einem Volumen von 1 ml bei 30°C mit einer Silber-Platin-Elektrode und einer Weißlichtbestrahlung von etwa 50 µmol·m^{-2}·s^{-1}. Die Werte ergeben sich aus mindestens vier biologischen Replikaten.

Das Plastochinon die Funktion von Phyllochinon übernehmen kann, konnte bereits in einigen Versuchen gezeigt werden (Johnson et al, 2000; Lefebvre-Legendre et al, 2007; Chauvet et al, 2012). Das Phyllochinon die Funktion von Plastochinon übernehmen kann ist eher

unwahrscheinlich, da die Chorismatlyase Mutanten praktisch kein Plastochinon mehr besaß und gleichzeitig auch nicht mehr in der Lage war Photosynthese zu betreiben. Demnach ist Plastochinon in Cyanobakterien wahrscheinlich der einzige diffundierbare Elektronenüberträger in der Photosynthese und in der Atmungskette.

Als Maß für die Zellgröße der Mutantenzellen wurde die Zellzahl pro optischer Dichte ermittelt (Tabelle 20). Dabei zeigte die Δ*sll1797* Mutante mit Abstand die kleinsten Zellen, gefolgt von der Δ*sll0936* Mutante und der Δ*slr1099* Mutante. Die Absorptionsspektren vom *Synechocystis* Wildtyp und den Mutanten wiesen keine deutlichen Unterschiede in der Pigmentzusammensetzung auf. Lediglich der Chlorophyll-Gehalt der Δ*sll1797* Mutante lag unterhalb von dem des Wildtyps.

Tabelle 20: Metabolische und physiologische Parameter von *Synechocystis* Mutanten

	WT	**Δ*sll1797***	**Δ*slr1099***	**Δ*sll0936***
Zellen·OD$_{730}^{-1}$	$0{,}81 \cdot 10^7$	$2{,}5 \cdot 10^7$	$1{,}17 \cdot 10^7$	$1{,}91 \cdot 10^7$
Chlorophyll [µg·OD$_{730}^{-1}$]	1,8 ± 0,51	1,3 ± 0,08	2,0 ± 0,63	2,4 ± 0,1

Die Daten wurden aus fünf biologischen Replikaten ermittelt.

3.6.5 *In vivo* Markierung mit 4-Hydroxybenzoat in *Synechocystis* Mutanten

Die Δ*slr1099* und Δ*sll0936* Mutanten wurden für zwei Tage in BG11-Flüssigmedium mit [^{14}C (U)]4-Hydroxybenzoat inkubiert, um anschließend die Lipidextrakte der Mutanten mittels Dünnschichtchromatographie auf mögliche Plastochinon-Intermediate hin zu analysieren. Zur Bestimmung der Einbauraten radioaktiver Substanzen in lipophile Stoffwechselprodukte, wurde die Radioaktivität der Lipidextrakte mit einer Szintillationszählung quantifiziert. Die Gesamteinbauraten der beiden Mutanten lag bei etwa 85% verglichen mit dem Wildtyp. Dünnschichtchromatographische Analysen der Lipidextrakte lieferten erste Hinweise darauf, dass beide Mutanten Plastochinon-Intermediate akkumulieren (Abbildung 29).

Die Mutaten zeigten eine ^{14}C-markierte Substanz auf der Höhe von 4-Hydroxy-3-Solanesylbenzoat (HSB), was auch anhand des postulierten Biosynthesewegs angenommen wurde (Abbildung 7). In dem Lipidextrakt des Wildtyps konnte zwar auch eine Substanz auf gleicher

Höhe detektiert werden, jedoch in einer deutlich niedrigeren Konzentration. Mit den beiden Standardsubstanzen 3-Geranylgeranyl-4-hydroxybenzoat (GGHB) und 4-Hydroxy-3-octaprenylbenzoat (HOB) konnte gezeigt werden, dass *Synechocystis* keine Plastochinon-Intermediate akkumuliert, die eine kürzere Seitenkette besitzen als die Solanesly-Seitenkette.
In allen drei Proben wurde auch radioaktiv markiertes Plastochinon detektiert. Im Wildtyp lag der Plastochinon-Gehalt etwa um das Fünffache über dem der Mutanten. Diese Werte entsprechen denen der in Abbildung 22 (Tabelle 26, Anhang) angegebenen Gehalte für die Mutanten und den Wildtyp. Die Identität der anderen markierten Substanzen konnte bisher jedoch nicht geklärt werden.

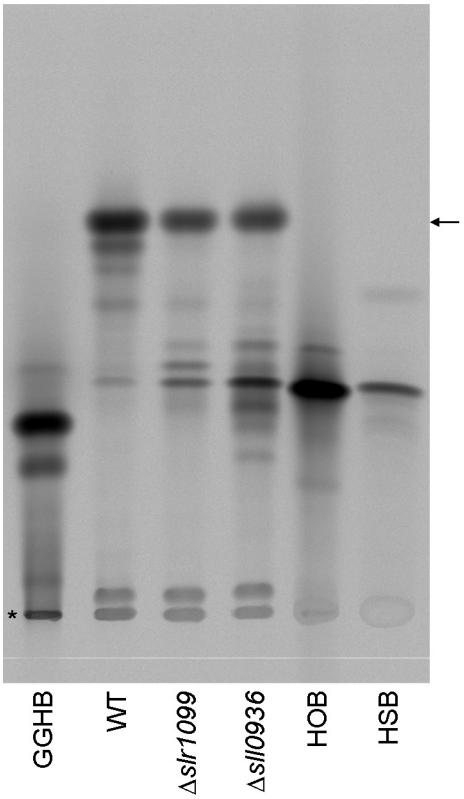


Abbildung 29: *In vivo* Markierung mit 4-Hydroxybenzoat in *Synechocystis* Mutanten
Synechocystis Flüssigkulturen wurden für zwei Tage mit jeweils 8 µCi [^{14}C (Ring)]4-Hydroxybenzoat inkubiert. Die Lipidextrakte der *in vivo* markierten *Synechocystis* Zellen wurden mittels Dünnschichtchromatographie analysiert (Laufmittel: Aceton:Benzin (3:7, v/v)). Der Startpunkt auf der Dünnschichtchromatographieplatte ist mit einem Stern gekennzeichnet, die Plastochinon-Bande mit einem Pfeil. (GGHB, 3-Geranylgeranyl-4-hydroxybenzoat; WT, Wildtyp; HOB, 4-Hydroxy-3-octaprenylbenzoat; HSB, 4-Hydroxy-3-Solanesylbenzoat)

3.7 Beschreibung der Hydroxylase Mutante Δ*slr1300*

Im Gegensatz zu den anderen beschriebenen *Synechocystis* Insertionsmutanten, konnte keine vollständige Segregation des mutierten *slr1300* Allels identifiziert werden (Abbildung 20). Dennoch zeigte diese Mutante einen deutlich verminderten Plastochinon-Gehalt, der etwa 56% von dem des Wildtyps entsprach (Tabelle 21, Abbildung 30).

Tabelle 21: Phänotyp der Δ*slr1300* Mutante

	WT	**Δ*slr1300***
Zellen·OD_{730}^{-1}	$0{,}81 \cdot 10^7$	$0{,}85 \cdot 10^7$
Chlorophyll [µg·OD_{730}^{-1}]	1,8 ± 0.51	2,1 ± 0,39
Plastochinon [µg·OD_{730}^{-1}]	226 ± 15	127 ± 2
Phyllochinon [µg·OD_{730}^{-1}]	120 ± 16	125 ± 0,6
Photosyntheserate [nmol $O_2 \cdot s^{-1} \cdot$(µg Chl.) $^{-1}$]	17,9 ± 0,45	17,1 ± 0,47

Die Daten wurden aus fünf biologischen Replikaten ermittelt. (Chl., Chlorophyll)

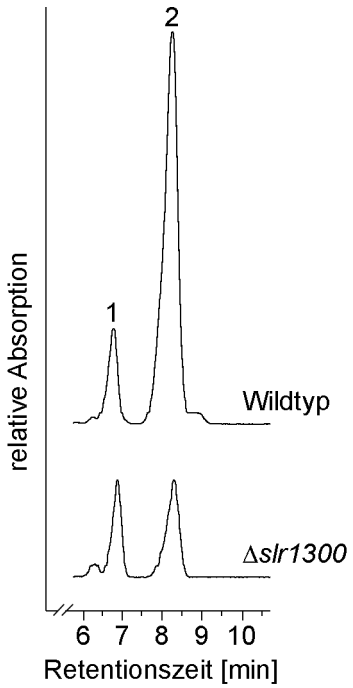


Abbildung 30: HPLC-Chromatogramm von *Synechocystis* Gesamtlipidextrakten

Darstellung ausgewählter HPLC-Chromatogramme der untersuchten Δ*slr1300* Mutante und dem Wildtypstamm. Plastochinon (2) wurde nach einer Retentionszeit von 8,2 min bei einer Absorptionswellenlänge von 255 nm detektiert. Die Retentionszeit von Phyllochinon (1) lag bei 6,9 min. Als Referenzsubstanzen wurde für Plastochinon Decyl-Plastochinon (Sigma). Für Phyllochinon wurde Vitamin K1 (Phyllochinon) verwendet.

Genauso wie bei den anderen untersuchten Mutanten, führte die Mutation nicht zu einer Veränderung des Phyllochinon-Gehaltes. Zum Vergleich zwischen der Δ*slr1300* Mutante und den anderen Synechocystis Mutanten, sind die Daten in Tabelle 26 (Anhang) zusammengefasst. Eine Änderung in der Sauerstoffproduktionsrate (Tabelle 21) und im Wachstumsverhalten der Δ*slr1300* Mutante war nicht nachweisbar (Abbildung 31). Auch die Größe der Kolonien und die Zellzahl pro optischer Dichte wurde durch die Mutation im *slr1300* Gen nicht messbar beeinflusst.

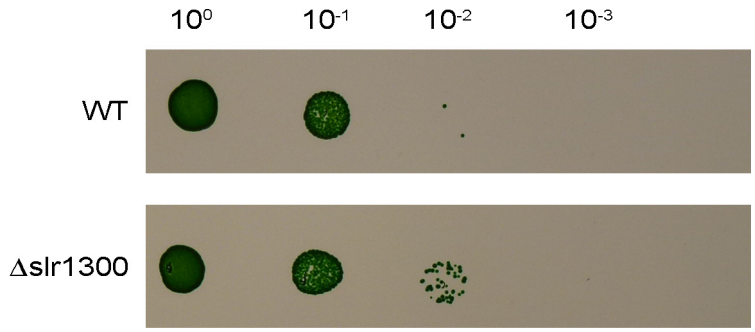


Abbildung 31: Wachstumsverhalten der Δ*slr1300 Synechocystis* Mutanten auf BG11-Agarplatten
Serielle Zehnfach-Verdünnungen der *Synechocystis* Mutante und vom Wildtyp wurden, ausgehend von einer Start-OD_{730} = 0,1 (100), auf BG11-Agarplatten aufgetropft und für zwei bis drei Wochen unter Standardbedingungen kultiviert.

Die Versuche zur Herstellung der Δ*slr1300* Mutante wurden analog zu denen der anderen, in Kapitel 3.6.1 beschriebenen Mutanten, durchgeführt. Sogar die Erhöhung der Kanamycin-Konzentration auf bis zu 100 µg/ml im Kulturmedium, erbrachte keine vollständige Segregation des mutierten Allels. Die Zugabe des Stoffwechselprodukts (2-Octaprenyl-1,4-benzochinon) der putativen Hydroxylase führte ebenfalls nicht zum gewünschten Erfolg, da neben dem mutierten Gen auch das *slr1300* Wildtypgen nachweisbar war. Da aber selbst die unvollständige Segregation des mutierten *slr1300* Gens zu einer deutlichen Minderung des Plastochinon-Gehaltes führte, ist eine Beteiligung von *slr1300* an der Plastochinon-Biosynthese sehr wahrscheinlich. Zudem sprechen die Schwierigkeiten der Herstellung einer Δ*slr1300* Mutante dafür, dass das Gen eine wichtige Rolle in der Zelle spielt, die vermutlich nicht von einem anderen Gen ersetzt werden kann.

3.8 Lokalisation der Slr1099 Decarboxylase in *Synechocystis*

Neben der Lokalisation der *Synechocystis* Proteine in den subzellulären *E. coli* Fraktionen wurde versucht die Lokalisation der *Synechocystis* Decarboxylase Slr1099 *in situ* zu zeigen. Dazu wurde das *slr1099* Gen am 5'-Ende mit dem *gfp* Gen fusioniert, dessen DNA-Sequenz auf die *codon usage* von Bakterien angepasst war (Karunakaran et al, 2005). Das chimäre Genkonstrukt wurde anschließend in den *Synechocystis* Expressionsvektor pRL59-Ω kloniert, der sowohl in *E. coli* als auch in *Synechocystis* stabil replizierbar war (Froehlich et al, 2001). Um zu überprüfen, ob das Genprodukt funktional exprimiert wurde, wurde der pRL59-Ω-gfp-*s*lr1099 Vektor zunächst in die *E. coli* Δ*ubiX* Mutante transformiert. Wie in Abbildung 32 A dargestellt, war es möglich den Wachstumsdefekt der Δ*ubiX* Mutante mit dem GFP-Fusionsprotein zu komplementieren. Zusätzlich wurde das GFP-Fusionsprotein in *E. coli* mittels SDS-PAGE und anschließender Western-Blot-Analyse, mit einem Antikörper gegen das GFP-Epitop, untersucht (Abbildung 32 B). Auch die Fluoreszenz des GFP-Fusionsproteins war in den *E. coli* Zellen mit einem Konfokal-Mikroskop nachweisbar (Abbildung 32 C).

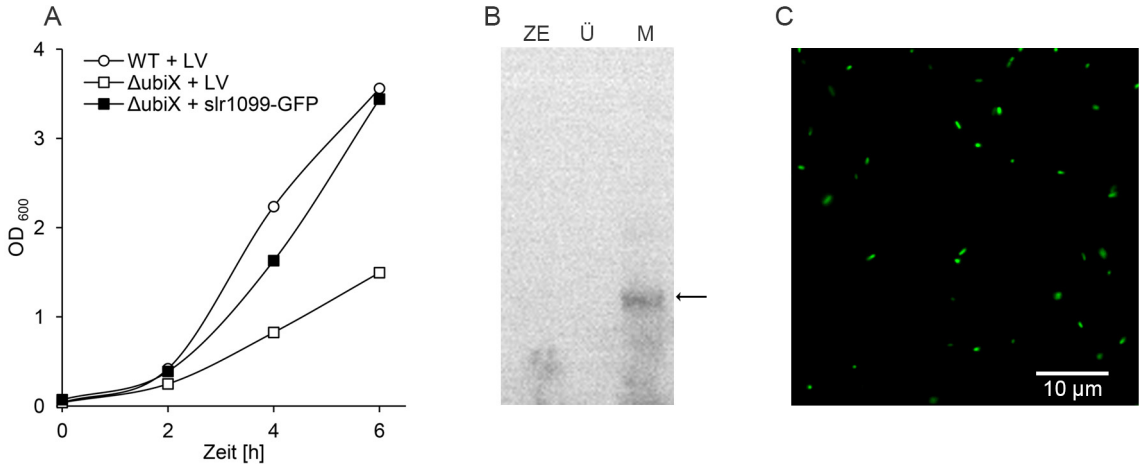


Abbildung 32: Überprüfung der Expression von GFP-Slr1099 in *E. coli*

(A) Komplementation der *E. coli* Δ*ubiX*-Mutante mit dem GFT-Slr1099 Fusionsprotein. Als Kontrolle wurde der *E. coli* Wildtyp (WT) und die Δ*ubiX*-Mutante mit dem pRL59-Ω Leervektor (LV) transformiert. (B) Western-Blot-Analyse der subzellulären Fraktion ((ZE, Zellextrakt (5.000 g Überstand); Ü, Überstand (140.000 g Überstand); M, Membranfraktion (140.000 g Sediment)) von *E. coli* Zellen die das *gfp-slr1099* Gen exprimierten. Je 10 µg Protein wurden pro Fraktion mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen das GFP-Epitop analysiert (Der Pfeil zeigt die Bande des GFP-Fusionsproteins an). (C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *E. coli* Zellen, die das *gfp-slr1099* Gen exprimierten.

Mittels Elektrotransformation wurde das DNA-Konstrukt in den *Synechocystis* Wildtypstamm eingebracht. Mit einem Konfokal-Mikroskop und einer 1.000-fachen Vergrößerung konnten die Fluoreszenzsignale des GFPs in den *Synechocystis* Zellen detektiert werden (Abbildung 33). Typischerweise traten die Fluoreszenzsignale punktuell an der Zellperipherie in der Nähe der Plasmamembran auf. Nach der Überlagerung der GFP-Fluoreszenzsignale mit der Autofluoreszenz des Chlorophylls war das Fusionsprotein nicht, oder nur zu einem sehr geringen Anteil, mit dem Chlorophyll colokalisiert. Die chlorophyllhaltigen Thylakoidmembranen durchziehen die *Synechocystis* Zelle ähnlich wie Girlanden (Liberton et al, 2006). Da aber keine GFP-Fluoreszenzsignale im Inneren der Zellen beobachtet wurden, ist das Fusionsprotein vermutlich nur mit der Plasmamembran und nicht mit den Thylakoidmembranen assoziiert. An bestimmten Punkten sind in den *Synechocystis* Zellen die Thylakoidmembranen mit der Plasmamembran verbunden, die zusammen ein großes Membrankompartiment ausbilden. Verschiedene Modelle besagen, dass Protein- und Pigmentkomplexe an den Schnittstellen zwischen Plasmamembran und Thylakoidmembran zusammengebaut werden, woraufhin die Einschleusung in die photosynthetischen Membranen erfolgt (Nickelsen et al, 2011). Möglicherweise befinden sich die punktuellen GFP-Signale des Fusionsproteins an den Schnittstellen der beiden Membransysteme, sodass in einem dort lokalisieten Proteinkomplex die Plastochinon-Biosynthese ablaufen kann. Dies würde einerseits dem Plastochinon ermöglichen schnell in beide Membransysteme zu diffundieren. Zum anderen könnte dadurch gewährleistet werden, dass kein Platz auf den Thylakoidmembranen von Proteinkomplexen verbraucht würde, die nicht unmittelbar am Elektronentransport beteiligt sind.

Die Protein-Analytik zur *in situ* Lokalisation von Fusionsproteinen in den Biomembranen der *Synechocystis* Zellen wurden durch die Instabilität des Fusionsproteins während der Zentrifugationsschritte erschwert, sodass es bisher nicht gelang das Slr1099-Protein der Plasmamembran eindeutig zuzuordnen. Versuche die Stabilität des Fusionsproteins zu steigern, indem das GFP-Epitop an den C-Terminus fusioniert wurde, führten zu einer nicht funktionalen Expression, da es nicht in der Lage war das Wachstumsdefizit der *E. coli* Δ*ubiX* Mutante zu komplementieren (Daten nicht gezeigt). Eine Alternative, zur Analyse der einzelnen Membranfraktionen, wäre eine immunologische *in situ* Untersuchung zur Colokalisation von Slr1099 und PratA, welches an den Schnittstellen zwischen Plasma- und Thylakoidmembran lokalisiert ist (Nickelsen et al, 2011).

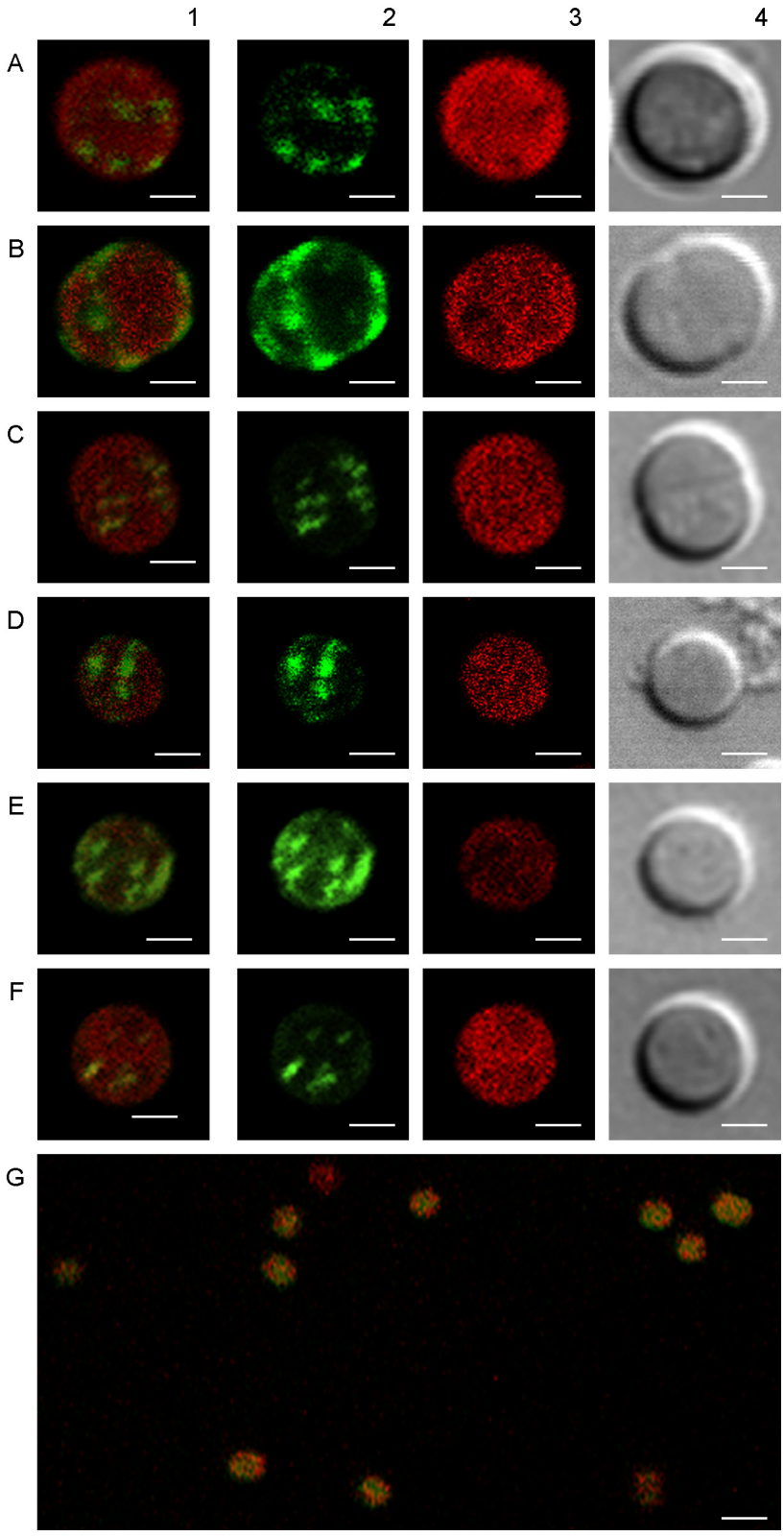


Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskopmische Aufnahme von *gfp-slr1099* exprimierenden *Synechocystis* Zellen
Die Bilder A-F zeigen verschiedene *Synechocystis* Zellen bei einer 1000-fachen Vergrößerung. (1) zeigt die Überlagerung von GFP- und die Autofluoreszenz des Chlorophylls, (2) GFP-Fluoreszenz, (3) Chlorophyll Autofluoreszenz und (4) das Durchlichtbild. Bild G zeigt das Überlagerungsbild von Zellen bei einer kleineren Vergrößerung. (Skalierungsbalken: A-F, 1 µm; G, 5 µm)

3.9 Untersuchung von Enzymeigenschaften

Die bisherigen Ergebnisse lieferten klare Hinweise, dass die offenen Leserahmen *sll1797*, *slr1099*, *sll0936* und *slr1300* an der Plastochinon-Biosynthese in *Synechocystis* beteiligt sind. Welche Aufgabe sie in der Biosynthese spielen und ob sie tatsächlich die vorhergesagten Reaktionen katalysieren, wurde mit *in vitro* Enzymaktivtätstests untersucht.

Im ersten Schritt der Biosynthese entfernt die Chorismatlyase die Enolpyruvyl-Gruppe des Chorismats und produziert 4-Hydroxybenzoat (Abbildung 34), das mittels HPLC-Analyse quantifiziert wurde. Wie bereits in Kapitel 3.5 beschrieben, wurde die *Synechocystis* Chorismatlyase heterolog in der *E. coli* Δ*ubiC* Mutante exprimiert, um anschließend die Chorismatlyase-Aktivität in den subzellulären Fraktionen zu messen. Dabei zeigte sich die höchste Aktivität in der Membranfraktion (Abbildung 19).

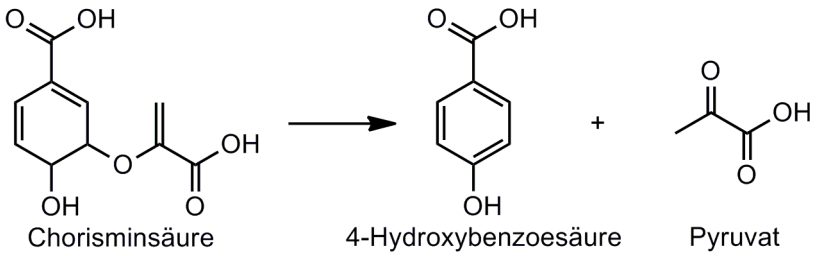


Abbildung 34: Reaktionsgleichung Chorismatlyase

Für die Analyse der Enzymeigenschaften erfolgte eine affinitätschromatographische Reinigung des N-terminalen GST-Sll1797-Fusionsproteins mit Glutathion-Agarose aus dem *E. coli* Zellextrakt (Abbildung 35 A). Die angereicherte Fraktion zeigte, im Vergleich zum Zellextrakt, eine fast 35-fach höhere Aktivität (Abbildung 35 B). Mit einer Western-Blot-Analyse wurde eine etwa 30-fache Anreicherung des Fusionsproteins gemessen (Abbildung 35 C). Während der Reinigung der Chorismatlyase löste sich das Fusionsprotein von der Membran ab, sodass es sich unter den getesteten Bedingungen wie ein lösliches Protein verhielt.

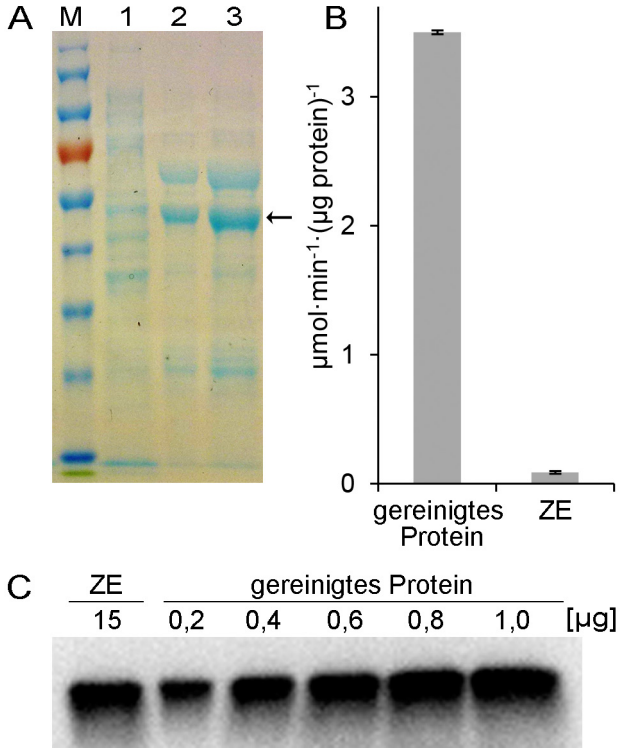


Abbildung 35: Reinigung des *Synechocystis* Chorismatlyase-GST-Fusionsproteins

(A) Mittels GST-Affinitätschromatographie gereinigtes Sll1797-GST Fusionsprotein aus *E. coli* Zellextrakt und anschließender SDS-PAGE. In Spur 1 wurde der Größenmarker aufgetrennt, in Spur 2 der *E. coli* Zellextrakt und in den Spuren 3 und 4 das angereicherte Sll1797-GST-Fusionsprotein (der Pfeil zeigt die Sll1797-GST-Bande). (B) Bestimmung der Chorismatlyase-Aktivität des gereinigten Proteins und des Zellextraktes (ZE). (C) SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mit dem gereinigten Fusionsprotein und einem Antikörper gegen das GST-Epitop.

Zur Bestimmung des pH-Optimums, sowie der Proteinlinearität und der Substratabhängigkeit wurde das Protein für 5 min mit dem Substrat in einem 50 mM Bis-Tris-Propan/HCl Puffer bei 30°C inkubiert (Abbildung 36). Anschließend wurde das Reaktionsprodukt aus dem Reaktionsansatz extrahiert und quantifiziert. Zur Bestimmung der Extraktionseffizienz wurde 2-Hydroxybenzoat als interner Standard eingesetzt. Da das Chorismat sich auch beim nicht enzymatischen Zerfall in 4-Hydroxybenzoat und Pyruvat zersetzte, wurde zu jeder Probe eine Kontrolle ohne Enzym durchgeführt. Die höchste Chorismatlyase-Aktivität wurde bei einem pH-Wert um 8 gemessen (Abbildung 36 A). Bis zu einer Proteinkonzentration von 25 µg Protein war der Substratumsatz linear (Abbildung 36 B). Bei der Bestimmung der Substratabhängigkeit wurde ein V_{max}-Wert von 15,47 ± 2,37 (µmol·min^{-1}·µg^{-1} Protein) und ein K_m-Wert von 0,55 µM ± 0,25 berechnet (Abbildung 36 C). Im deutlichen Unterschied dazu, zeigte die *E. coli* eigene Chorismatlyase einen K_m-Wert von 29 µM (Smith et al, 2006).

Hierbei muss aber beachtet werden, dass die Kinetiken der *E. coli* Chorismatlyase mit einem Enzym durchgeführt wurden, das zuvor von bereits gebundenem 4-Hydroxybenzoat durch die Inkubation mit Vanillinsäure verdrängt wurde (Holden et al, 2002). Die Zugabe von 4-Hydroxybenzoat zum Reaktionsansatz bei der *Synechocystis* Chorismatlyase führte zu keiner signifikanten Minderung der Enzymaktivität. Zudem wurde die Enzymaktivität weder von zweiwertigen Kationen noch durch die Erhöhung der Ionenstärke mit NaCl oder Bis-Tris-Propan-Puffer stimuliert. Dies steht im Gegensatz zur *E. coli* eigenen Chorismatlyase, da bei dieser zum einen die Aktivität durch Zugabe von 4-Hydroxybenzoat inhibiert wurde (Holden et al, 2002). Zum anderen konnte die Aktivität sowohl durch die Zugabe von $MgCl_2$ als auch durch die Erhöhung der Ionenstärke gesteigert werden (Siebert et al, 1994).

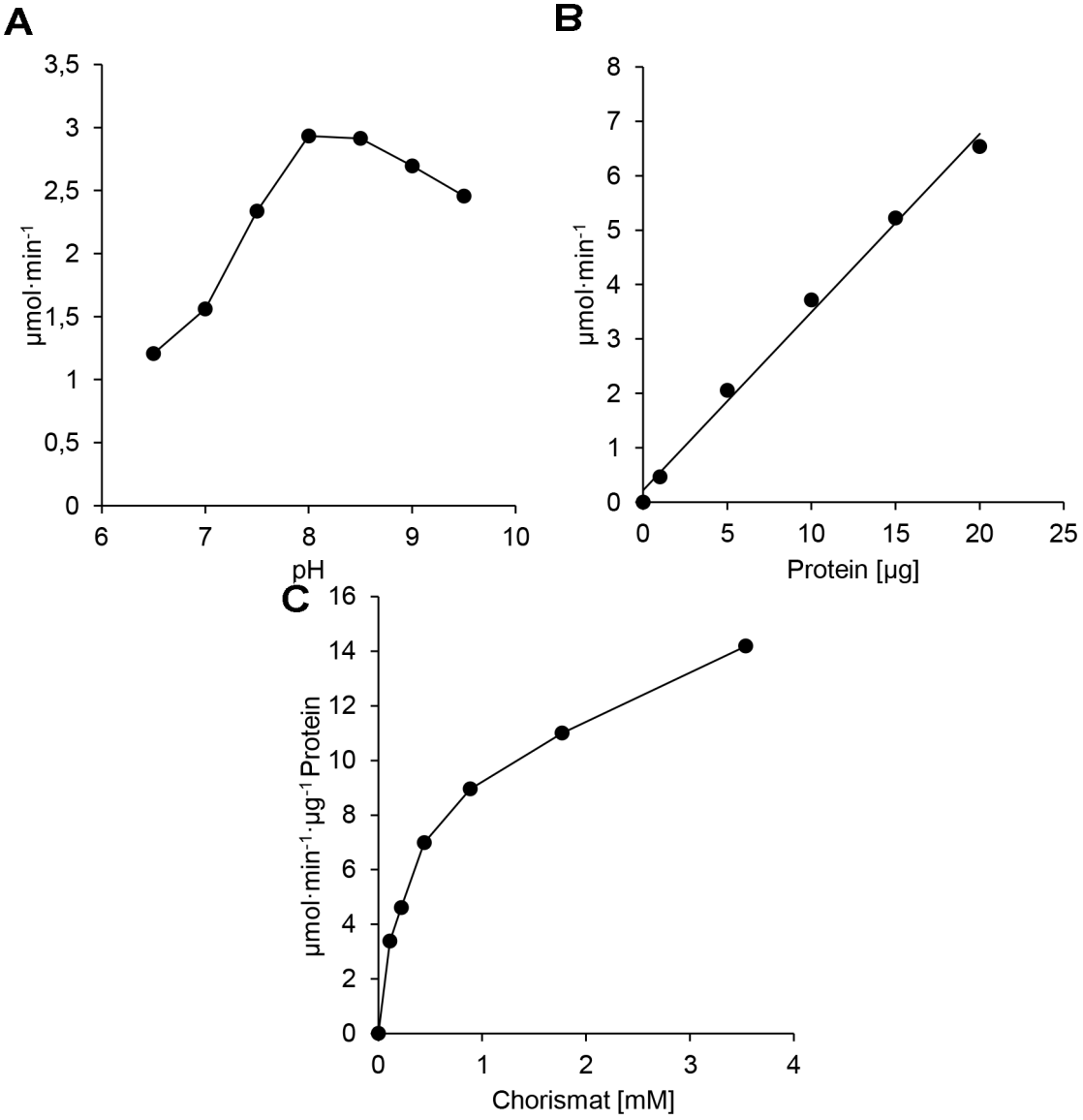


Abbildung 36: Enzymeigenschaften der Chorismatlyase Sll1797-GST

(A) pH-Abhängigkeit. (B) Proteinlinearität. (C) Substratabhängigkeit

Nach dem Chorismatlyase-Schritt erfolgt die Prenylierung des 4-Hydroxybenzoates durch die 4-Hydroxybenzoat-Solanesyltransferase zum 4-Hydroxy-3-solanesylbenzoat (Sadre et al, 2012). Für den darauf folgenden Biosyntheseschritt wurde postuliert, dass das Produkt der Prenyltransferase durch eine Decarboxylase zu 2-Solanesylphenol umgesetzt wird (Abbildung 37).

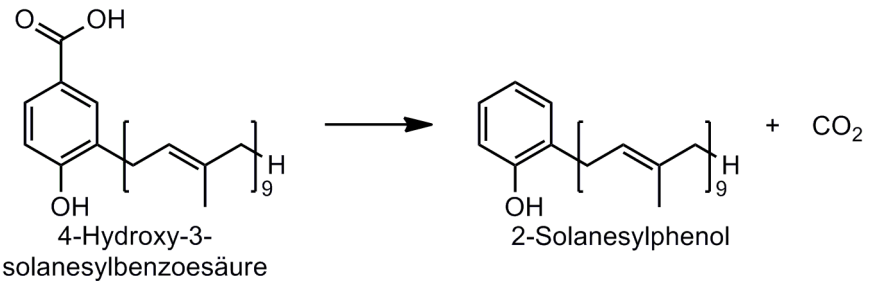


Abbildung 37: Reaktionsgleichung Decarboxylase

Wie in Kapitel 3.5 beschrieben, wurde die Decarboxylase-Aktivität in den subzellulären Fraktionen der *E. coli* Δ*ubiX* Mutane untersucht, die das *slr1099* Gen exprimierte. Dabei konnte nur im Zellextrakt eine Decarboxylase-Aktivität gemessen werden. Weder die Membranfraktion noch die löslichen Proteinfraktion zeigten Decarboxylase-Aktivität. Da auch das affinitätschromatographisch gereinigte Slr1099 Fusionsprotein mit einem His-Epitop oder einem GST-Epitop keine Aktivität zeigte, wurden die Enzymeigenschaften mit dem *E. coli* Zellextrakt durchgeführt. Als Kontrolle diente dabei der Zellextrakt von *E. coli* Δ*ubiX* Mutantenzellen, die den Leervektor trugen. Bei einer Inkubationsdauer von 45 min bei 30°C und 450 µM [^{14}C (Ring)]3-Geranylgeranyl-4-Hydroxybenzoat als Substrat wurde ein pH-Optimum von 8,5 ermittelt (Abbildung 38 A). Die Zugabe von zweiwertigen Kationen, FMN oder FAD in den Reaktionsansatz führte zu keiner Steigerung der Decarboxylase-Aktivität. Der Substratumsatz war bis zu einer Proteinkonzentration von 3 mg Protein linear (Abbildung 38 B). Bei der Messung der Substratabhängigkeit wies das Enzym etwas höhere Aktivität mit [^{14}C (Ring)]3-Farnesyl-4-Hydroxybenzoat als mit [^{14}C (Ring)]3-Geranylgeranyl-4-Hydroxybenzoat auf (Abbildung 38 C). Neben den beiden genannten Substraten wurde auch ein Substrat verwendet, welches eine Prenylseitenkette mit 40-C-Atomen (Octaprenyl) besaß (Abbildung 38 D). Da die Versuche zeigten, dass die Slr1099 Decarboxylase recht unspezifisch für die Länge des Prenylrestes war, ist davon auszugehen, dass die Decarboxylase

auch das native Substrat mit einer Solanesylseitenkette (45-C-Atome) umsetzt. Die Herstellung des [^{14}C (Ring)]4-Hydroxy-3-octaprenylbenzoats bzw. [^{14}C (Ring)]4-Hydroxy-3solanesylbenzoats war in ausreichender Menge sehr schwierig, sodass die Substratabhängigkeiten mit diesen Substraten nicht durchgeführt wurden.

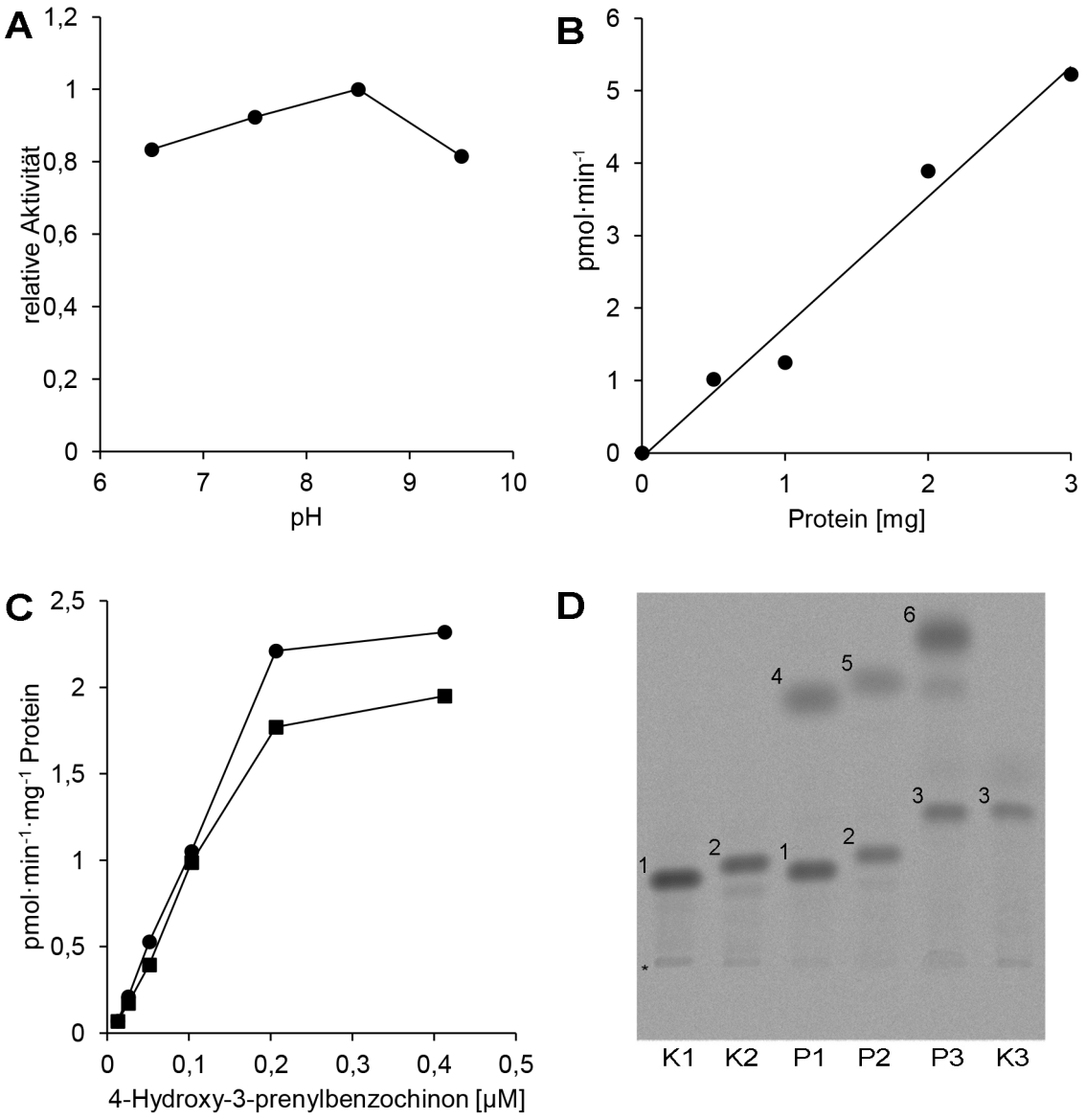


Abbildung 38: Enzymeigenschaften der Slr1099 Decarboxylase

(A) pH-Abhängigkeit. (B) Proteinlinearität. (C) Substratabhängigkeiten von [^{14}C (Ring)]3-Farnesyl-4-Hydroxybenzoat (Kreis) und [^{14}C (Ring)]3-Geranlygeranyl-4-Hydroxybenzoat (Quadrat). (D) Dünnschichtchromatographische Analyse der Reaktionsprodukte von den getesteten Substraten [^{14}C (Ring)]3-Farnesyl-4-Hydroxybenzoat (Spur 1, Kontrolle 1), [^{14}C (Ring)]3-Geranlygeranyl-4-Hydroxybenzoat (Spur 2, Kontrolle 2) und [^{14}C (Ring)]4-Hydroxy-3-octaprenylbenzoat (Spur 3, Kontrolle 3). Als Kontrollen dienten Zellextrakte der *E. coli* Δ*ubiX* Mutante (* makiert den Startpunkt).

Die vorhergehenden Versuche legten nahe, dass die Decarboxylase vermutlich in einem membranassoziierten Enzymkomplex lokalisiert ist. Möglicherweise wurde dieser Enzymkomplex während der Ultrazentrifugation zerstört, wodurch keine Aktivität mehr messbar war. Weitere Enzymuntereinheiten oder Cofaktoren sind vermutlich für die Decarboxylase-Aktivität notwendig. Als Kandidat für einen solchen Cofaktor kam die Sll0936 Decarboxylase in Frage, die im Gegensatz zu Slr1099 keine Decarboxylase-Aktivität unter den getesteten Bedingungen zeigte. Weder das Mischen der jeweiligen Zellextrakte, noch die Coexpression beider Gene in einer Zelle, führte zu einer Steigerung der Enzymaktivität.

Vergleiche mit bereits untersuchten Decarboxylasen zeigten einerseits, dass bei Aromaten-Decarboxylasen mindestens zwei Untereinheiten notwendig sind, um Enzymaktivität zu messen. Andererseits wurde aber eine deutliche Steigerung der Aktivität beobachtet, wenn eine dritte Untereinheit mit exprimiert wurde (Lupa et al, 2005; Lupa et al, 2008). Im Gegensatz dazu stehen die Aktivitäten der gereinigten *sll0936*-ähnlichen Decarboxylasen aus *Chlamydophyla pneumoniae* und *Enterobacter cloacae*, für deren Aktivität keine weiteren Untereinheiten beschrieben wurden (Liu et al, 2007; Matsui et al, 2006).

Fazit & Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden vier, bisher unbekannte Gene identifiziert und charakterisiert, die an der cyanobakteriellen Plastochinon-Biosynthese beteiligt sind. So konnte für den ersten entscheidenden Schritt in der Biosynthese gezeigt werden, dass *sll1797* eine Chorismatlyase kodiert und die Umsetzung von Chorismat zu 4-Hydroxybenzoat katalysiert. Im nachfolgenden Schritt wird 4-Hydroxybenzoat von der 4-Hydroxybenzoat-Solanesyltransferase zu 4-Hydroxy-3-Solanesylbenzoat prenyliert und dient dann als Substrat für die darauf folgende Decarboxylierung, bei der die beiden Proteine Slr1099 und Sll0936 eine entscheidende Rolle spielen. Obwohl nur für Slr1099 Decarboxylaseaktiviät nachweisbar war, besaßen *Synechocystis* Mutanten, die entweder einen Defekt im *slr1099* Gen oder im *sll0936* Gen aufwiesen, einen vergleichbaren Restgehalt an Plastochinon. Außerdem deuteten Komplementationsstudien in *E. coli* darauf hin, dass Slr1099 und Sll0936 nicht redundant sind. Daher ist vermutlich ein weiteres Protein an der Decarboxylierung beteiligt, das für den besagten Restgehalt an Plastochinon verantwortlich ist. Aufschluss darüber könnte eine Δ*slr1099*/*sll0936*-Doppelmutante geben, mit der gleichzeitig auch die Rolle des Sll0936 näher untersucht werden könnte. Versuche mit dem *slr1300* Gen deuteten darauf hin, dass es eine Hydroxylase kodiert und 2-Solanesylphenol zu 2-Solanesyl-1,4-benzochinon hydroxyliert. Zwei Methylierungs-Schritte vervollständigen schließlich die Biosynthese zum Plastochinon, wobei der zweite Schritt von der Sll0418 Methyltransferase katalysiert wird (Shintani et al, 2002).
Insbesondere mit der Δ*sll1797* Mutante wurde die Grundlage für weiterführende Untersuchungen geschaffen, da in ihr kein Plastochinon nachweisbar war. Hinweise über die Rolle des Plastochinons als Regulator Redox-abhängiger Gene, könnten Transkript-Analysen dieser Mutante liefern. Ebenso wäre es möglich mit nichtinvasiven Methoden, kinetische Studien an der Q_a- und Q_b-Seite des Photosystem II durchzuführen, um die bereits bekannten *in vitro* Daten zur Elektronenweiterleitung mit *in vivo* Daten zu ergänzen. Interessant wären in diesem Zusammenhang auch Untersuchungen zu der Funktion von Phyllochinon unabhängig von Plastochinon, um weitere Aufgaben des Phyllochinons nachzuweisen.

Literaturverzeichnis

Adachi, A.; Shinjyo, N.; Fujita, D.; Miyoshi, H.; Amino, H.; Watanabe, Y.-i. und Kita, K. (2003) Complementation of *Escherichia coli ubiF* mutation by Caenorhabditis elegans CLK-1, a product of the longevity gene of the nematode worm. 543. *FEBS Letters*. 174–178.

Adamiec, M.; Drath, M. und Jackowski, G. (2008) Redox state of plastoquionone pool regulates expression of *Arabidopsis thaliana* genes in response to elevated irradiance. 55. *Acta Biochimica Polonia*. 161–173.

Alexander, K. und Young, I. G. (1978) Three hydroxylations incorporating molecular oxygen in the aerobic biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli*. 17. *Biochemistry*. 4745–4750.

Ashby, M. N. und Edwards, P. A. (1990) Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants. Characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetase. 5. *Journal of Biological Chemistry*. 13157-13164

Baba, T.; Ara, T.; Hasegawa, M.; Takai, Y.; Okumura, Y.; Baba, M.; Datsenko, K. A.; Tomita, M.; Wanner, B. L. und Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*. 1–11.

Beifuss, U. und Tietze, M. (2005) Methanophenazine and other natural biologically active phenazines. 244. *Topics in Current Chemistry*. 77-113

Blomfield, I. C.; Vaughn, V.; Rest, R. F. und Eisenstein, B. I. (1991) Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. 5. *Molecular Microbiology*. 1147–1457.

Bräuer, L.; Brandt, W.; Schulze, D.; Zakharova, S. und Wessjohann, L. (2008) A structural model of the membrane-bound aromatic prenyltransferase UbiA from *E. coli*. 9. *ChemBioChem*. 982–992.

Bryant, D. A. (2003) The beauty in small things revealed. 100. *PNAS*. 9647-9649

Chauvet, A.; Dashdorj, N.; Golbeck, J. H.; Johnson, T. W. und Savikhin, S. (2012) Spectral resolution of the primary electron acceptor A 0 in photosystem I. 116 *The Journal of Physical Chemistry* B. 3380–3386.

Chehade, M. H.; Loiseau, L.; Lombard, M.; Pecqueur, L.; Ismail, A.; Smadja, M.; Golinelli-Pimpaneau, B.; Mellot-Draznieks, C.; Hamelin, O.; Aussel, L.; Kieffer-Jaquinod, S.; Labessan, N.; Barras, F.; Fontecave, M. und Pierrel, F. (2013) *ubiI*, a New gene in *Escherichia coli* coenzyme Q biosynthesis, is involved in aerobic C5-hydroxylation. 288. *The Journal of Biological Chemistriy*. 20085–20092.

Cheng, Z.; Sattler, S.; Maeda, H.; Sakuragi, Y.; Bryant, D. A. und DellaPenna, D. (2003) Highly divergent methyltransferases catalyze a conserved reaction in tocopherol and plastoquinone synthesis in cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes. 15. *The Plant Cell*. 2343–2356.

Chomczynski, P. und Sacchi, N.(1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. 162. *Analytical Biochemistry*. 156–159.

Chow, T. C.; Pope, M. K. und Davies, J. (1999) Characterization of a vanillic acid non-oxidative decarboxylation gene cluster from *Streptomyces* sp. D7. 145. *Microbiology*. 2393–2403.

Collakova, E. und DellaPenna, D. (2001) Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and Arabidopsis. 127. *Plant Physiology*. 1113–1124.

Collins, M. D. und Jones D. (1981) Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. 45. *Microbiological Reviews*. 316–354.

Cooley, J. W. und Vermaas, W. F. J. (2001) Succinate dehydrogenase and other respiratory pathways in thylakoid membranes of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: Capacity comparisons and physiological function. 183. *Journal of Bacteriology*. 4251–5258.

Cox, G. B.; Gibson, F. und Pittard, J. (1968) Mutant Strains of *Escherichia coli* K-12 Unable to form ubiquinone. 95. *Journal of Bacteriology*. 1591–1598.

Cox, G. B.; Young, I. G.; McCann, L. M. und Gibson, F. (1969) Biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli* K-12 location of genes affecting the metabolism of 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoic acid and 2-octaprenylphenol. 99. *Journal of Bacteriology*. 450–458.

Dähnhardt, D.; Falk, J.; Appel, J.; van der Kooij, T.; Schulz-Friedrich, R. und Krupinska, K. (2002) The hydroxyphenylpyruvat dioxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 is not required for plastoquinone biosynthesis. 523. *FEBS Journal*. 177–181.

Datsenko, K. A. und Wanner, B. L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. 97. *PNAS*. 6640–6645.

Dietz, K.-J. und Pfannschmidt, T. (2011) Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression. 155. *Plant Physiology*. 1477–1485.

El Hachimi, Z.; Samuel, O. und Azerad, R. (1974) Biochemical study on ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli*. 56. *Biochimie*. 1239–1247.

Friedrich, T.; Steinmüller, K. und Weiss, H. (1995) The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. 367. *FEBS Letters*. 107–111.

Froehlich, J. E.; Benning, C. und Dörmann, P. (2001) The digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase DGD1 is inserted into the outer envelope membrane of chloroplasts in a manner independent of the general import pathway and does not depend on direct interaction with monogalactosyldiacylglycerol synthase for DGDG biosynthesis. 276. *Journal of Biological Chemistry*. 31806–31812.

Gallagher, D. T.; Mayhew, M. P.; Holden, M. J.; Howard, A.; Kim, K. und Vilker, V. L. (2001) The crystal structure of chorismate lyase shows a new fold and a tightly retained product. 44. *Proteins: Structure, Function and Genetics*. 304–311.

Gin, P.; Hsu, A. Y.; Rothman, S. C.; Jonassen, T.; Lee, P. L.; Tzagoloff, A. und Clarke, C. F. (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* COQ6 gene encodes a mitochondrial flavin-dependent monooxygenase required for coenzyme Q biosynthesis. 278. *Journal of Biological Chemistry*. 25308–25316.

Gulmezian, M.; Hyman, K. R.; Marbois, B. N.; Clark, C. F. und Javor, T. G. (2007) The role of UbiX in *Escherichia coli* coenzyme Q biosynthesis. 467. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 144–153.

Guzman, L. M.; Belin, D.; Carson, M. J. und Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. 177. *Journal of Bacteriology*. 4121–4130.

Heeringa, S. F.; Chernin, G.; Chaki, M.; Zhou, W.; Sloan, A. J.; Ji, Z.; Xie, L. X.; Salviati, L.; Hurd, T. W.; Vega-Warner, V.; Killen, P. D.; Raphael, Y.; Ashraf, S.; Ovunc, B.; Schoeb, D. S.; McLaughlin, H. M.; Airik, R.; Vlangos, C. N.; Gbadegesin, R.; Hinkes, B.; Saisawat, P.; Trevisson, E.; Doimo, M.; Casarin, A.; Pertegato, V.; Giorgi, G.; Prokisch, H.; Rötig, A.; Nürnberg, G.; Becker, C.; Wang, S.; Ozaltin, F.; Topaloglu, R.; Bakkaloglu, A.; Bakkaloglu, S. A.; Müller, D.; Beissert, A.; Mir, S.; Berdeli, A.; ɷzen, S.; Zenker, M.; Matejas, V.; Santos-Ocaña, C.; Navas, P.; Kusakabe, T.; Kispert, A.; Akman, S.; Soliman, N. A.; Krick, S.; Mundel, P.; Reiser, J.; Nürnberg, P.; Clarke, C. F.; Wiggins, R. C.; Faul, C. und Hildebrandt, F. (2011) COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. 121. *Journal of Clinical Investigation*. 2013–2024.

Herrmann, K. M. (1995) The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. 107. *Plant Physiology*. 7–12.

Holden, M. J.; Mayhew, M. P.; Gallagher, D. T. und Vilker, V. L. (2002) Chorismate lyase: kinetics and engineering for stability. 1594. *Biochemica et Biophysica Acta*. 160–167.

Howitt, C. A.; Udall, P. K. und Vermaas, W. F. J. (1999) Type 2 NADH dehydrogenases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 are involved in regulation rather than respiration. 181. *Journal of Bacteriology*. 3994–4003.

Hsu, A. Y.; Poon, W. W.; Shepherd, J. A.; Myles, D. C. und Clark, C. F. (1996) Complementation of coq3 mutant yeast by mitochondrial targeting of the Escherichia coli UbiG polypeptide: Evidence that UbiG catalyzes both O-Methylation steps in ubiquinone biosynthesis. 35. *Biochemistry*. 9797–9806.

Huang, J.; He, Z. und WIEGEL, J. (1999) Cloning, characterization and expression of a novel gene encoding a reversible 4-hydroxybenzoate decarboxylase from *Clostridium hydroxybenzoicum*. 181. *Journal of Bacteriology*. 5119–5122.

Hunter, W. N. (2007) The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. 282. *Journal of Biological Chemistry*. 21573–21577.

Jacewicz, A.; Izumi, A.; Brunner, K.; Schnell, R.; Schneider, G. und Kursula, P. (2013) Structural insights into the UbiD protein family from the crystal structure of PA0254 from *Pseudomonas aeruginosa*. 5. *plos one*. e63161.

Johnson, T. W.; Shen, G.; Zybailov, B.; Kolling, D.; Reategui, R.; Beauparlant, S.; Vassiliev, I. R.; Bryant, D. A.; Jones, A. D.; Golbeck, J. H. und Chitnis, P. R. (2000) Recruitment of a foreign quinone into the A1 site of photosystem I. 275. *Journal of Biological Chemistry*. 8523–8530.

Kaneko, T.; Sato, S.; Kotani, H.; Tanaka, A.; Asamizu, E.; Nakamura, Y.; Miyajima, N.; Hirosawa. M.; Sugiura, M.; Sasamoto, S.; Kimura, T.; Hosouchi, T.; Matsuno, A.; Muraki, A.; Nakazaki, N.; Naruo, K.; Okumura, S.; Shimpo, S.; Takeuchi, C.; Wada, T.; Watanabe, A.; Yamada, M.; Yasuda, M. und Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential proteincoding regions. 3. *DNA Research*. 109–136.

Karunakaran, R.; Mauchline, T. H.; Hosie, A. H. F. und Poole, P. S. (2005) A family of promoter probe vectors incorporating autofluorescent and chromogenic reporter proteins for studying gene expression in Gram-negative bacteria. 151. *Microbiology*. 3249–3256.

Keller, Y.; Bouvier, F.; d'Harlingue, A. und Camara, B. (1998) Metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesis. 251. *FEBS Letters*. 413–417.

Knöll, H. E. (1981) Isolation of a soluble enzyme complex comprising the ubiquinone-8 synthesis apparatus from the cytoplasmatic membrane of *Escherichia coli*. 91. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 919–925.

Knoll, A. H. (2008) Cyanobacteria and earth history. *Caister Academic Press*. 1-20

Krogh, A.; Larsson, B.; Heijne, G. v. und Sonnhammer, E. L. L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a Hidden Markov Model: Application to complete genomes. 305. *Journal of Molecular Biology*. 567–580.

Kwon, O.; Kotsakis, A. und Meganathan, R. (2000) Ubiquinone (coenzyme Q) biosynthesis in *Escherichia coli*: Identification of the ubiF gene. 50. *FEMS Microbiology Letters*. 157-161

Larkin, M.; Blackshields, G.; Brown, N.; Chenna, R.; McGettigan, P.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J.; Gibson, T. und Higgins, D. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. 23. *Bioinformatics*. 2947–2948.

Lawrence, J.; Cox, G. B. und Gibson, F. (1974) Biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli* K-12: biochemical and genetic characterization of a mutant unable to convert chorismate into 4-hydroxybenzoate. 118. *Journal of Bacteriology*. 41–45.

Lee, P. L.; Hsu, A. Y.; Ha, H. T. und Clark, C. F. (1997) A C-methyltransferase involved in both ubiquinone and menaquinone biosynthesis: Isolation and identification of the *Escherichia coli ubiE* gene. 179. *Journal of Bacteriology*. 1748–1754.

Lefebvre-Legendre, L.; Rappaport, F.; Finazzi, G.; Ceol, M.; Grivet, C.; Hopfgartner, G. and Rochaix, J.-D (2007) Loss of phylloquinone in *Chlamydomonas* affects plastoquinone pool size and photosystem II synthesis. 282. *Journal of Biological Chemistry*. 13250-13263.

Leppik, R. A.; Stroobant, P.; Shineberg, B.; Young, I. G. und Gibson, F. (1976) Membrane-associated reactions in ubiquinone biosynthesis. 428. *Biochimica et Biophysica Acta*. 146–156.

Leppik, R. A.; Young, I. G. und Gibson, F. (1975) Membrane-associated reactions in ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli*. 436. *Biochimica et Biophysica Acta*. 800–810.

Liberton, M.; Howard Berg, R.; Heuser, J.; Roth, R. und Pakrasi, H. B. (2006) Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. 227. *Protoplasma*. 129–138.

Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophyll and carotenoids pigments of photosynthetic biomembranes. 148. *Methods in Enzymology*. 350-382

Link, A. J.; Phillips, D. und Church, G. M. (1997) Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: Application to open reading frame characterization. 179. *Journal of Bacteriology*. 6228–6237.

Liu, J. und Liu, J.-H. (2006) Ubiquinone (Coenzyme Q) Biosynthesis in *Chlamydophila pneumoniae* AR39: Identification of the *ubiD* gene. 38. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 725–730.

Liu, J.; Zhang, X.; Zhou, S. und Tao, P. (2007) Purification and characterization of a 4-hydroxybenzoate decarboxylase from *Chlamydophila pneumoniae* AR39. 54. *Current Microbiology*. 102–107.

Löffelhardt, W. und Kindl, H. (1979) Conversion of 4-hydroxyphenylpyruvic acid into homogentisic acid at the thylakoid membrane of *Lemna gibba*. 104. *FEBS Letters*. 332–334.

Lopukhina, A.; Dettenberg, M.; Weiler, E. W. und Holländer-Czytko, H. (2001) Cloning and characterization of a coronatine-regulated tyrosine aminotransferase from *Arabidopsis*. 126. *Plant Physiology*. 1678–1687.

Löscher, R. und Heide, L. (1994) Biosynthesis of p-hydroxybenzoate from p-coumarate and p-coumaroyl-coenzyme A in cell-free extracts of *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. 106. *Plant Physiology*. 271–279.

Ludwig, A.; Heimbucher, T.; Gregor, W.; Czerny, T. und Schmetterer, G. (2008) Transformation and gene replacement in the facultatively chemoheterotrophic, unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6714 by electroporation. 4. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 729–735.

Lupa, B.; Lyon, D.; Gibbs, M.; Reeves, R. und Wiegel, J. (2005) Distribution of genes encoding the microbial non-oxidative reversible hydroxyarylic acid decarboxylases / phenol carboxylases. 86. *Genomics*. 342–351.

Lupa, B.; Lyon, D.; Shaw, L. N.; Sieprawska-Lupa, M. und Wiegel, J. (2008) Properties of the reversible nonoxidative vanillate / 4-hydroxybenzoate decarboxylase from *Bacillus subtilis*. 54. *Canadian Journal of Microbiology*. 75–81.

Matsui, T.; Yoshida, T.; Hayashi, T. und Nagasawa, T. (2006) Purification, characterization, and gene cloning of 4-hydroxybenzoate decarboxylase of *Enterobacter cloacae* P240. 186. *Archives of Microbiology*. 21–29.

Meganathan R. (2001a) Biosynthesis of menaquinone (vitamin K2) and ubiquinone (Coenzyme Q): A perspective on enzymatic mechanisms. 61. *Vitamins and Hormons*. 173–218.

Meganathan R. (2001b) Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. 203. *FEMS Microbiology Letters*. 131–139.

Melzer, M. und Heide, L. (1993) Characterization of polyprenyldiphosphate: 4-Hydroxybenzoate polyprenyltransferase from *Escherichia coli*. 1212. *Biochimica et Biophysica Acta*. 93–102.

Miziorko, H. M. (2011) Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. 505. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 131–143.

Monod, J., Cohen-Bazire, S. and Cohn M. (1951) Sur la biosynthése de la p-galactosidase (lactase) chez *Escherichia coli*. La spécificité de l'induction. 7. *Biochimica et Biophysica Acta*. 585-599.

Mosberg, J. A.; Lajoie, M. J. und Church, G. M. (2010) Lambda red recombineering in *Escherichia coli* occurs through a fully single-stranded intermediate. 186. *Genetics*. 791–799.

Nakahigashi, K.; Miyamoto K.; Nishimura K. und Inokuchi, H. (1992) Isolation and characterization of light-sensitive mutants of *Escherichia coli* K12 with a mutation in a gene that is required for the biosynthesis of ubiquinone. 174. *Journal of Bacteriology*. 7352–7359.

Newton, N. A.; Cox, G. B. und Gibson, F. (1972) Function of ubiquinone in *Escherichia coli* a mutant strain forming a low level of ubiquinone. 109. *Journal of Bacteriology*. 69–73.

Nichols, B. P. und Green, J. M. (1992) Cloning and sequencing of *Escherichia coli ubiC* and purification of chorismate lyase. 174. *Journal of Bacteriology*. 5309–5316.

Nickelsen, J.; Rengstl, B.; Stengel, A.; Schottkowski, M.; Soll, J. und Ankele, E. (2011) Biogenesis of the cyanobacterial thylakoid membrane system - an update. 315. *FEMS Microbiology Letters*. 1–5.

Norris, S. R.; Barrette, T. R. und DellaPenna, D. (1995) Genetic dissection of carotinoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. 7. *The Plant Cell*. 2139–2149.

Norris, S. R.; Shen, X. und DellaPenna, D. (1998) Complementation of the *Arabidopsis* pds1 mutation with the gene encoding p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. 117. *Plant Physiology*. 1317–1323.

Nowicka, B. und Kruk, J. (2010) Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. 1797. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1587–1605.

Ohkawa, H.; Sonoda, M.; Shibata, M. und Ogawa, T. (2001) Localization of NAD(P)H dehydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. 183. *Journal of Bacteriology*. 4938–4939.

Olson, R. E.; Bentley, R.; Aiyar, A. S.; Dialameh, G. H. und Gold, P. H. (1963) Benzoate derivatives as intermediates in the biosynthesis of coenzyme Q in the rat. 238. *Journal of Biological Chemistry*. 3146–3148.

Ozeir, M.; Mühlenhoff, U.; Webert, H.; Lill, R.; Fontecave, M. und Pierrel, F. (2011) Coenzyme Q biosynthesis: Coq6 is required for the C5-hydroxylation reaction and substrate analogs rescue Coq6 deficiency. 18. *Chemistry & Biology*. 1134–1142.

Padilla, S.; Tran, U. C.; Jiménez-Hidalgo, M.; López-Martín, J. M.; Martín-Montalvo, A.; Clarke, C. F.; Navas, P. und Santos-Ocaña, C. (2009) Hydroxylation of demethoxy-Q6 constitutes a control point in yeast coenzyme Q6 biosynthesis. 66. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 173–186.

Parson, W. W. und Rudney, H. (1964) The biosynthesis of the benzoquinone ring of ubiquinone from p-hydroxybenzaldehyd and p-hydroxybenzoic acid in rat kidney, *Azetobacter vinelandii* and baker's yeast. 51. *Biochemistry*. 444.

Pennock, J. F. (1983) The biosynthesis of chloroplastidic terpenoid quinones and chromanols. 5. *Biochemical Society Transactions*. 505-510

Peschek, G. A.; Bernroitner, M.; Sari, S.; Pairer, M. und Obinger, C. (2011) Bioenergetic processes of cyanobacteria. *Springer*. 3-70.

Peschek, G. A.; Obinger, C. und Paumann, M. (1994) The respiratory chain of blue-green algae (cyanobacteria). 120. *Physiologia Plantarum*. 358-369

Pfannschmidt, T. (2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. 8. *Trends in Plant Science*. 33–41.

Pils, D. und Schmetterer, G. (2001) Characterization of three bioenergetically active respiratory terminal oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. 203. *FEMS Microbiology Letters*. 217–222.

Poon, W. W.; Davis, D. E.; Ha, H. T. und Jonassen, T. (2000) Identification of *Escherichia coli ubiB*, a gene required for the first monooxygenase step in ubiquinone biosynthesis. 182. *Journal of Bacteriology*. 5139–5146.

Rippka, R. (1988) Isolation and purification of cyanobacteria. 167. *Methods in Enzymology*. 3-27

Roux, B. und Walsh, C. T. (1993) p-Aminobenzoate synthesis in *Escherichia coli*: Mutational analysis of three conserved amino acid residues of the amidotransferase PabA. 14. *Biochemistry*. 3763-3768

Sadre, R.; Pfaff, C. und Buchkremer, S. (2012) Plastoquinone-9 biosynthesis in cyanobacteria differs from that in plants and involves a novel 4-hydroxybenzoate solanesyltransferase. 442. *Biochemical Journal*. 621–629.

Sakuragi, Y. und Bryant, D. A. (2006) Genetic manipulation of quinone biosynthesis in cyanobacteria. *Springer*. 205–222.

Sambrook, J. und Russel, D.W. 2002. Molecular cloning: a laboratory manual, Vol. 1-3, 3. Edt., *Cold Spring Habour Laboratory Press*

Sattler, S. E. (2003) Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. 132. *Plant Physiology*. 2184–2195.

Schultze, M.; Forberich, B.; Rexroth, S.; Dyczmons, N. G.; Roegner, M. und Appel, J. (2009) Localization of cytochrome b6f complexes implies an incomplete respiratory chain in cytoplasmic membranes of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. 1787. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1479–1485.

Shearer, M. J. (1992) Vitamin K metabolism and nutriture. 6. *Blood Reviews*. 92-104

Shintani, D.; Cheng, Z. und DellaPenna, D. (2002) The role of 2-methyl-6phytylbenzoquinone methyltransferase in determining tocopherol composition in *Synechocystis* sp. PCC6803. 511. *FEBS Letters*. 1–5.

Shoumskaya, M. A.; Paithoonrangsarid, K.; Kanesaki, Y.; Los, D. A.; Zinchenko, V. V.; Tanticharoen, M.; Suzuki, I. und Murata, N. (2005) Identical Hik-Rre systems are involved in perception and transduction of salt signals and hyperosmotic signals but regulate the expression of individual genes to different extents in *Synechocystis*. 280. *Journal of Biological Chemistry*. 21531–21538.

Siebert, M.; Severin, K. und Heide, L. (1994) Formation of 4-hydroxybenzoate in *Escherichia coli*: Characterization of the *ubiC* gene and its encoded enzyme chorismate pyruvate-lyase. 140. *Microbiology*. 897–904.

Smith, N.; Roitberg, A.; Rivera, E.; Howard, A.; Holden, M.; Mayhew, M.; Kaistha, S. und Gallagher, D. (2006) Structural analysis of ligand binding and catalysis in chorismate lyase. 445. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 72–80.

Stahl, E. (1967) Dünnschichtchromatographie Ein Laboratoriumsbuch 2. Auflage. *Springer*

Stenmark, P.; Grünler, J.; Mattsson, J.; Sindelar, P. J.; Nordlund, P. und Berthold, D. A. (2001) A new member of the family of di-iron carboxylate proteins. 276. *Journal of Biological Chemistry*. 33297–33300.

Swiezewska, E. (2004) Ubiquinone and plastoquinone metabolism in plants. 378. *Methods in Enzymology*. 124–131.

Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. und Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. 28. *Molecular Biology and Evolution*. 2731–2739.

Vajo, Z.; King, L. M.; Jonassen, T.; Wilkin, D. J.; Ho, N.; Munnich, A.; Clarke, C. F. und Francomano, C. A. (1999) Conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene clk-1 from yeast to human: A gene required for ubiquinone biosynthesis with potential implications for aging. 10. *Mammalian Genome*. 1000-1004.

Vender, A. V.; van Kan, P. J. M.; Rich, P. R.; Ohad, I. und Andersson, B. (1997) Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome bf mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: Thylakoid protein kinase deactivation by a single-turnover flash. 94. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1585–1590.

Williams, J. G. K. (1988) Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. 167. *Molecular Genetics*. 766–779.

Yoshihara, S.; Geng, X. X.; Okamoto, S.; Yura, K.; Murata, T.; Go, M.; Ohmori, M. und Ikeuchi, M. (2001) Mutational analysis of genes involved in pilus structure, motility and transformation competency in the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. 42. *Plant and Cell Physiology*. 63–73.

Young, I. G.; Leppik, R. A.; Hamilton, J. A. und Gibson, F. (1972) Biochemical and genetic studies on ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: 4-Hydroxybenzoate octaprenyltransferase. 110. *Journal of Bacteriology*. 18–25.

Young, I. G.; Stroobant, P.; MacDonald, C. G. und Gibson, F. (1973) Pathway for ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli* K-12 gene-enzyme relationships and intermediates. 114. *Journal of Bacteriology*. 42–52.

Zhang, P.; Battchikova, N.; Jansen, T.; Appel, J.; Ogawa, T. und Aro, E. (2004) Expression and functional roles of the two distinct NDH-1 complexes and the carbon acquisition complex NdhD3/NdhF3/CupA/Sll1735 in *Synechocystis* sp PCC 6803. 16. *The Plant Cell*. 3326–3340.

Zhang, H. und Javor, G. (2000) Identification of the *ubiD* Gene on the *Escherichia coli* chromosome. 182. *Journal of Bacteriology*. 6243–6246.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Oxidation und Reduktion von Plastochinon 4
Abbildung 2: Photosynthetischer und respiratorischer Elektronentransport in Cyanobakterien 6
Abbildung 3: Isoprenoid-Biosynthese über den Mevalonat-unabhäniger Weg 8
Abbildung 4: Biosynthesewege von Isoprenoidchinon-Kopfgruppen in unterschiedlichen Organismen 10
Abbildung 5: Tocopherol-Biosynthese in Pflanzen und Cyanobakterien und Plastochinon-Biosynthese in Pflanzen. 11
Abbildung 6: Ubichinon-Biosynthese in *E. coli*. 13
Abbildung 7: Postulierter Plastochinon-Biosyntheseweg in Cyanobakterien 14
Abbildung 8: HPLC-Analyse von [^{14}C (Ring)]4-Hydroxybenzoat 31
Abbildung 9: Phylogenetische Analyse von Sll1797 Homologen aus verschiedenen Pro- und Eukaryoten . 43
Abbildung 10: Phylogenetische Analyse verschiedener Decarboxylasen. 45
Abbildung 11: Nummerierung der C-Atome von Plastochinol und Ubichinol 47
Abbildung 12: Phylogenetische Analyse von Hydroxylasen 48
Abbildung 13: In vivo Markierung von Plastochinon in *Synechocystis*. 49
Abbildung 14: Komplementierung der *E. coli* Δ*ubiC* und Δ*ubiX* Mutante 52
Abbildung 15: Komplementierung der *E. coli* Δ*ubiD* und Δ*ubiH* Mutanten 53
Abbildung 16: Bestimmung der Ubichinon-Gehalte in *E. coli* Mutanten 54
Abbildung 17: Lokalisation der *Synechocystis* GST-Fusionsproteinen in *E. coli* 57
Abbildung 18: Vorhersagemodell der Transmembrandomänen von *Synechocystis* Proteinen. . 58
Abbildung 19: Enzymaktivitäten von *Synechocystis* Proteinen in subzellulären *E. coli* Fraktionen . 59
Abbildung 20: PCR-Analyse der mutierten *Synechocystis* Gene 62
Abbildung 21: Expressionsanalyse der *Synechocystis* Mutanten. 63
Abbildung 22: Relative Transkriptgehalte in verschiedenen *Synechocystis* Stämmen 64
Abbildung 23: Verminderte Wachstumsraten von *Synechocystis* Mutanten 65

Abbildung 24: Wachstumsverhalten der *Synechocystis* Mutanten auf Agarplatten. 66
Abbildung 25: Kolonie-Form und -Größe der *Synechocystis* Mutanten 67
Abbildung 26: HPLC-Chromatogramme von *Synechocystis* Gesamtlipidextrakten 69
Abbildung 27: Plastochinon- und Phyllochinon-Gehalte der *Synechocystis* Mutanten. 70
Abbildung 28: Photosyntheseraten von *Synechocystis* Mutanten 71
Abbildung 29: In vivo Markierung mit 4-Hydroxybenzoat in *Synechocystis* Mutanten 73
Abbildung 30: HPLC-Chromatogramm von *Synechocystis* Gesamtlipidextrakten 74
Abbildung 31: Wachstumsverhalten der Δ*slr1300 Synechocystis* Mutanten auf Agarplatten . . 75
Abbildung 32: Überprüfung der Expression von GFP-Slr1099 in *E. coli* 76
Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskopmische Aufnahme von *gfp-slr1099* exprimierenden *Synechocystis* Zellen 78
Abbildung 34: Reaktionsgleichung Chorismatlyase. 79
Abbildung 35: Reinigung des *Synechocystis* Chorismatlyase-GST-Fusionsproteins 80
Abbildung 36: Enzymeigenschaften der Chorismatlyase Sll1797-GST 81
Abbildung 37: Reaktionsgleichung Decarboxylase 82
Abbildung 38: Enzymeigenschaften der Slr1099 Decarboxylase 83
Abbildung 39: DNA-Sequenz *sll1797* 112
Abbildung 40: DNA-Sequenz *slr1099* 112
Abbildung 41: DNA-Sequenz *slr1300* 112
Abbildung 42: DNA-Sequenz *sll0936* 113
Abbildung 43: DNA-Sequenz gftmut3.1. 113
Abbildung 44: Vektorkarte pQE60-ubiD-kanR-sacB 114
Abbildung 45: Vektorkarte pKD46 114
Abbildung 46: Vektorkarte pBAD28 115
Abbildung 47: Vektorkarte pBAD28 115

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräteverzeichnis mit Herstellerangaben 16
Tabelle 2: Verwendete Organismen 17
Tabelle 3: *E. coli* Kulturmedien 18
Tabelle 4: *Synechocystis* Kulturmedium 19
Tabelle 5: PCR-Programme 22
Tabelle 6: Puffer für alkalische Lyse 23
Tabelle 7: Puffer für RNA-Isolation 26
Tabelle 8: Schema cDNA Synthese 27
Tabelle 9: Zyklus quantitative realtime PCR 28
Tabelle 10: Bradford-Reagenz: 32
Tabelle 11: Puffer SDS-PAGE 33
Tabelle 12: Coomassie-Färbung 34
Tabelle 13: Blotting-Puffer 34
Tabelle 14: Antikörper und Lösungen für Immunodetektion 35
Tabelle 15: Sprühreagenz für phenolische Verbindungen 37
Tabelle 16: Puffer für affinitätschromatographische Reinigung 38
Tabelle 17: Eigenschaften von *Synechocystis* Proteinen 42
Tabelle 18: Komplementierung von *E. coli* Ubichinondefekt-Mutanten 51
Tabelle 19: Größe der deletierten Bereiche der mutierten Gene 61
Tabelle 20: Metabolische und physiologische Parameter von *Synechocystis* Mutanten 72
Tabelle 21: Phänotyp der Δ*slr1300* Mutante 74
Tabelle 22: Verwendete Organismen 105
Tabelle 23: Verwendete Ausgangsvektoren 105
Tabelle 25: Verwendete Oligonukleotide 106

Tabelle 24: Erzeugte Plasmid und ihre Verwendung 108
Tabelle 26: Phänotypen der *Synechocystis* Mutanten 113

Abkürzungsverzeichnis

4-HB	4-Hydroxybenzoat
Bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre DNA
Chl.	Chlorophyll
DELTA-BLAST	Domain Enhanced Lookup Time Accelerated Basic Local Alignment Search Tool
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPP	Farnesyldiphosphat
g	Erdbeschleunigung (Zentrifugation)
GFP	green fluorescent protein
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LB-Medium	Luria Broth-Medium
LV	Leervektor
MPBQ	Methylphytylbenzochinon
MSBQ	Methylsolanesylbenzochinon
nd	nicht detektierbar
OD_{730}	Optische Dichte bei 730 nm
PP_i	Diphosphat

PQ	Plastochinon
PQH_2	Plastochinol
Q	Ubichinon
RT	Reverse Transkriptase
s, sec	Sekunde
SDS-PAGE	Na-Dodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
SPP	Solanesyldiphosphat
T_m	Schmelztemperatur
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uniforme ^{14}C-Markierung
U/µl	Units pro µl
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
ycf	Hypothetical chloroplast open reading frame
ZE	Zellextrakt

Anhang

Tabelle 22: Verwendete Organismen

Escherichia coli		
TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	(Life technologies, Darmstadt)
BL21AI	F- ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm araB::T7RNAP-tetA	(Life technologies, Darmstadt)
BW25113	F- Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(::rrnB-3) λ- rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514	(Baba et al, 2006)
AN66	thr-1 leuB6(Am) lacZ4 glnV44(AS) P1+ rpsL8 ubiD410	(Cox et al, 1969)
JW2308-4	F- Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(::rrnB-3) λ- rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514 ΔubiX732::kan	(Baba et al, 2006)
JW2875-1	F- Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(::rrnB-3) λ- rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514 ΔubiH758::kan	(Baba et al, 2006)
JW5713-1	F- Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(::rrnB-3) λ- rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514 ΔubiC736::kan	(Baba et al, 2006)
Synechocystis		
	Synechocystis sp. PCC 6803	(Pasteur Culture Collection, Paris)

Tabelle 23: Verwendete Ausgangsvektoren

Plasmidbezeichnung	Herkunft
pQE60	Qiagen
pENTR/SD/D-TOPO	Invitrogen
pDEST14	Invitrogen
pDEST15	Invitrogen
pDEST17	Invitrogen
pRL59-Ω	Georg Hölzl, Bonn
pBAD28	Guzman et al, 1995
pKD46	Datsenko & Wanner, 2000
pKOV	Link et al, 1997

Tabelle 25: Verwendete Oligonukleotide

Verwendung	Bezeichnung	Sequenz
Gateway	sll1797 F GW	5‘-CAC CAT GAA GCT TTC TCC GGC CGT TTC C-3‘
	sll1797 R GW	5‘-TTA CTC AAA TTT TGG CCT AGG CAA TTC-3‘
	slr1099 F GW	5‘-CAC CAT GGC ACA ACC TTT GAT TTT GG-3‘
	slr1099 R GW	5‘-TCA CTC CCC TTC CAT ACC CCC TTG CCA AC-3‘
	sll0936 F GW	5‘-CAC CAT GGC CAG AGA TTT ACG GGG ATT C-3‘
	sll0936 R GW	5‘-TTA CAC GTC ATA GCC AAA CAA GTT G-3‘
	slr1300 F GW	5‘-CAC CAT GAC CTT TGT AGC CGC TTC CA-3‘
	slr1300 R GW	5‘- CTA CTG ACT CAC TAA GGA TTG C-3‘
Expression und Mutagenese	sll1797 F	5‘-AGG ATC CAT GAA GCT TTC TCC GGC CGT TTC C-3‘
	sll1797 R	5‘-AGG ATC CTT ACT CAA ATT TTG GCC TAG GCA ATT C-3‘
	Kan F-AarI	5‘-GAC AGT CAG GCA GGT GGT GTC TCA AAA TCT CTG ATG-3‘
	Kan R-AarI	5‘-GAA CCT CAG GCA GGT GTT AGA AAA ACT CAT CGA GCA TC-3‘
Expression und Mutagenese	slr1099 F	5‘-CTA GAT CTA TGG CAC AAC CTT TGA TTT TGG GGG TC-3‘
	slr1099 R	5‘-CTA GAT CTT CAC TCC CCT TCC ATA CCC CCT TG-3‘
	Kan F	5‘-GTG TCT CAA AAT CTC TGA TGT TAC A-3‘
	Kan R-SpeI	5‘-GGC CAC TAG TTA GAA AAA CTC ATC GAG CAT-3‘
Expression und Mutagenese	sll0936 F	5‘-CTA GAT CTA TGG CCA GAG ATT TAC GGG GAT TC-3‘
	sll0936 R	5‘-CTA GAT CTT TAC ACG TCA TAG CCA AAC AAG TTG-3‘
	Kan F-ClaI	5‘-GCT AAT CGA TGT GTC TCA AAA TCT CTG ATG TTA C-3‘
	Kan R-NotI	5‘-GTC AGC GGC CGC TTA GAA AAA CTC ATC GAG CAT C-3‘
Expression und Mutagenese	slr1300 F	5‘-GAC TAG ATC TAT GAC CTT TGT AGC CGC TTC C-3‘
	slr1300 R	5‘- GAC TAG ATC TCT ACT GAC TCA CTA AGG ATT GCC C-3‘
	Kan F-KpnI	5‘-GCT AGG TAC CGT GTC TCA AAA TCT CTG ATG TTA C-3‘
	Kan R-PacI	5‘-GTC ATT AAT TAA TTA GAA AAA CTC ATC GAG CAT C-3‘

Fortsetzung Tabelle 25

Expression und Mutagenese	ubiD F BglII	5‘-CAC CAG ATC TAT GGA CGC CAT GAA ATA TAA CG-3‘
	ubiD R BglII	5‘-AGA TCT TCA GGC GCT TTT ACC GTT G-3‘
	sll0936 F SalI	5‘-CAC CGT CGA CAT GGC CAG AGA TTT ACG GGG ATT C-3‘
	sll0936 R SalI	5‘-GTC GAC TTA CAC GTC ATA GCC AAA CAA G-3‘
	Kan F PauI	5‘-GCG CGC ATG AGC CAT ATT CAA CGG GAA ACG-3‘
	Kan R PauI	5‘-GCG CGC TTA GAA AAA CTC ATC GAG CAT C-3‘
	sacB F	5‘-GCA CTA GCT AGC GCC GTT CAC TAT TAT TTA GTG AAA TGA G-3‘
	sacB R	5‘-GCA CTT GCT AGC ATC GGC ATT TTC TTT TGC GTT TTT ATT TG-3‘
Fluoreszenz	GFP F EcoRI	5‘-GCG AGA ATT CAT GCG TAA AGG AGA AGA ACT TTT CAC TG-3‘
	slr1099 F linker	5‘-CTA TAC AAA GCC GCT GGT GCT GCC GGT ATG GCA CAA CCT TTG ATT TTG G-3‘
	GFP R linker	5‘-GCC ATA CCG GCA GCA CCA GCG GCT TTG TAT AGT TCA TCC ATG CCA TGT GT-3‘
	slr1099 R BamHI	5‘-GAC TGG ATC CTC ACT CCC CTT CCA TAC CCC CTT G-3‘
	slr1099 F BamHI	5‘-GTC AGG ATC CAT GGC ACA ACC TTT GAT TTT-3‘
	GFP F linker	5‘-GGA GGC CGC CGG TGC CGG TGG TAT GCG TAA AGG AGA AGA ACT TTT CAC-3‘
	slr1099 R linker	5‘-TTA CGC ATA CCA CCG GCA CCG GCG GCC TCC CCT TCC ATA CCC CCT TG-3‘
	GFP R Bam-HI	5‘-GCG CGG ATC CTC ATT TGT ATA GTT CAT CCA TGC CAT GTG-3‘
quantitative realtime PCR	trpA F RT	5’-AGT CCC AGG GCT TTG TTT AC-3’
	trpA R RT	5’-CTT AAC CAT GGC GCT TCC TA-3’
	lysC F RT	5’-CCG CAA TTA TGG CAT TCC C-3’
	lysC R RT	5’-TTG GCA ATT TCA AGC CCT AC-3’
	1099 F RT	5’-CAG AAT TTT GGC GCT CTC AG-3’
	1099 R RT	5’-CCA CCA AGG GTT TAC CTT CT-3’
	0936 F RT	5’-AAC CAA ATC CCC TTG ATC CG-3’
	0936 R RT	5’-GGC GAT CGC CAC TTC TAA TT-3’
	1797 F RT	5’-CTC CCC CCC AAA TTA ACA CG-3’
	1797 R RT	5’-CCG ATT ATG GCC GCA GTA T-3’

Tabelle 24: Erzeugte Plasmid und ihre Verwendung

Plasmidbezeichung	Verwendung
pQE60-sll1797	Expression in *E. coli*
pQE60-slr1099	Expression in *E. coli*
pQE60-sll0936	Expression in *E. coli*
pQE60-slr1300	Expression in *E. coli*
pQE60-sll1797-KanR	*Synechocystis* Insertionsmutagenese
pQE60-slr1099-KanR	*Synechocystis* Insertionsmutagenese
pQE60-sll0936-KanR	*Synechocystis* Insertionsmutagenese
pQE60-slr1300-KanR	*Synechocystis* Insertionsmutagenese
pQE60-ubiD	Expression in *E. coli*
pBAD28-ubiD	Expression in *E. coli*
pQE60-ubiD-KanR	*E. coli* Insertionsmutagenese
pKOV-ubiD-KanR	*E. coli* Insertionsmutagenese
pENTR-sll1797	Ausgangsvektor für Gatewayclonierung
pENTR-slr1099	Ausgangsvektor für Gatewayclonierung
pENTR-sll0936	Ausgangsvektor für Gatewayclonierung
pENTR-slr1300	Ausgangsvektor für Gatewayclonierung
pDEST14-sll1797	Expression in *E. coli*
pDEST15-sll1797 (GST)	Expression in *E. coli*
pDEST17-sll1797 (HIS)	Expression in *E. coli*
pDEST14-slr1099	Expression in *E. coli*
pDEST15-slr1099 (GST)	Expression in *E. coli*
pDEST17-slr1099 (HIS)	Expression in *E. coli*
pDEST14-sll0936	Expression in *E. coli*
pDEST15-sll0936 (GST)	Expression in *E. coli*
pDEST17-sll0936 (HIS)	Expression in *E. coli*
pDEST14-slr1300	Expression in *E. coli*
pDEST15-slr1300 (GST)	Expression in *E. coli*
pDEST17-slr1300 (HIS)	Expression in *E. coli*
pRL59-Ω-slr1099-gfp	Expression in *Synechocystis*
pRL59-Ω-gfp-slr1099	Expression in *Synechocystis*

ATGAAGCTTTCTCCGGCCGTTTCCCCTTCCCTTGCTTGGCATTCACTGGACCTACTCTGGCAGGGG-
GATCAACACGACGTTAGGCATGGTCTACCCCACAGCGTCCTGCCCCCTCCATGGCAGATCCTCATC-
CTCGGGGATGGTTCCCCCACCAGGCACCTGCAACTACTCACCGGGGAAAAGACAGAGGTGGATGT-
GATTGACATGGCTCCAGTGAGCCCCAGGGACGACGGCGCTCCCCCCCAAATTAACACGGTGCCCG-
GCCCCCACCTGCGGCGACAGGTATGGCTAAGGACCAAGTCTGGCCAAAGACTGGCCTATGCGGTTTC-
CTGGTGGGATGCTAGCCATGTGGACGAGTATTTGCAAAATCGTAGTTTACCCATTTGGGACAGCCTTT-
CCCGGTTGCACACCGAGCTGTATCGGGATATCCAAGCCATATACTGCGGCCATAATCGGACCCTAGC-
TAAGGCTTTTGGCCAAGAAGGGCCTTTTTGGGGCCGTCATTACCTTTTCTGGCATGACCGTAAACCC-
CTAACCCTAATTTACGAAATTTTTTCCCCCTACCTATCCCGCTACCTAGGCGAATTGCCTAGGCCAAAA-
TTTGAGTAA

Abbildung 39: DNA-Sequenz *sll1797*

Die annotierte Sequenz (NP_440671) begann mit einem GTG-Codon, das durch ein ATG-Codon ausgetauscht wurde

ATGGCACAACCTTTGATTTTGGGGGTCAGCGGTGCCTCTGGGCTAATTTATGCCGTCAGAGC-
CATCAAGCATTTACTGGCGGCGGATTACACCATCGAACTGGTGGCTTCCCGAGCCAGCTAC-
CAAGTTTGGCAAGCGGAACAAAATATTCAAATGCCAGGGGAACCCTCCGCCCAGGCAGAATTTTG-
GCGCTCTCAGGCTGGGGTAGAAAAGGGTGGCAAATTGATTTGTCACCGTTGGGGAGATGTGGGG-
GCCACCATTGCCAGTGGTTCCTACCGTTGCGCCGGCATGGTGGTGCTGCCCTGTAGCATGAGCAC-
CGTGGCTAAATTGGCGGTGGGCATGAGTTCCGATCTATTGGAGCGGGCGGCGGATGTGCAAATCAAA-
GAAGGTAAACCCTTGGTGGTGGTGCCCAGGGAAACGCCCTTAAGTTTGATCCATCTGCGCAATCTC-
ACTAGTTTGGCCGAGGCTGGAGTCCGCATTGTGCCCGCCATTCCCGCTTGGTATCATCAGCC-
CCAATCGGTGGAAGATTTAGTGGATTTTGTGGTGGCTAGGGCCTTGGATCAATTGGCGATCGAC-
TGTGTGCCCCTCCAGCGTTGGCAAGGGGGTATGGAAGGGGAGTGA

Abbildung 40: DNA-Sequenz *slr1099*

ATGACCTTTGTAGCCGCTTCCATAACTGATAACCAATTCGATGTGGCGATCGCCGGGGGAG-
GCGTTGTGGGGCTGGTACTAGCGGCGGGTTTGCGTCATACGGGGCTGAAAATTGCCATTATCGAAGC-
TTTACCGAAGGAACAGGCCCTAACTAAGCCCCAGGCCTATGCCATTTCCCTGCTGTCGGGCAAAATC-
TTAGCGGGACTGGGGGTCTGGGAAAATATTAAGGACTCCATCGGTCATTTCGAACGCATCCAAATTT-
CCGATAATGACTATCGGGGTACCGTTCCCTTTGCCAAGGAAGATGTGGACGAACTGGCCCTGGGC-
CATGTGGCGGAGCATCCAGTCATTCTGCAGGCGCTGGAAAATTGTGTAGAGCAATGTCCCCGCATT-
GCCTGGTTTCGTCCCGCTGAGTTGATCAGTTTTACGGCGGGAGAGAACCACAAACAGGTCACCCTA-
CAACAGGAAGGCAGAGAAATTACCCTACAAACCAAATTGTTGGTGGCGGCGGATGGAGCCCGTT-
CCCACACCCGTTCCCTGGCGGGGATTCAAACCAAGGGGTGGAAATATTGGCAATCCTGTGTGGC-
TTTCACCATCCAGCATCAAGCCCCTGACAATACCACTGCCTTTGAGCGTTTTTGTGACACTGGTCC-
CATGGGGATTTTGCCCCTACCCGGCGATCGAGCCCAGATTGTCTGGACCATGCCCCACCATAAGGC-
CCATACCCTAGTGAATCTACCGGAAGCGGATTTTATTACAGAACTGCGCCAACGCATTGGCGATCGC-
CTAGGGGAATTTCATTTAATTAATGCCCGCCGTTTATTTCCGGTGCAACTAATGCAGAGCGATTGT-
TATGTGCAACCCCGCTTGGCATTAGTGGGGGATGCGGCCCACTGTTGCCATCCGGTGGGGGGT-
CAGGGTTTAAATTTGGGCATTCGGGACGGAGCCGCCCTGGCCCAGGTTATTGCCACGGCC-
CACAGCCAAGGGGAAGATTGGGGTTCCCTAGCAGTGCTGAAACGTTATGAACATTGGCGTAAACCA-
GAAAATTGGCTCATTTTGGGCTTCACTGACCTGCTAGATCGTTTCTTTTCCAGTCATTGGCTGCCGGC-
GATCGCCTTGAGAAGGTTTGGCCTAGAGGTATTGCGCCTAGTGCCTCCAGCGAAAAAGCTGGCCCTC-
CGTTTGATGACCGGTTTGCTCGGTCGGAAACCCCAATTGGCCACAGGGCAATCCTTAGTGAGTCAG-
TAG

Abbildung 41: DNA-Sequenz *slr1300*

ATGGCCAGAGATTTACGGGGATTCATCCAGTTGTTGGAAACACGGGGGCAGTTGCGCCGCAT-
TACCGCTGAGGTGGATCCCGATTTGGAAGTGGCGGAAATCTCTAACCGGATGCTACAGGCCGGTG-
GCCCAGGGCTGTTATTTGAGAATGTCAAAGGCTCCCCTTTCCCGGTGGCGGTGAATTTGATGG-
GCACAGTGGAGCGCATCTGTTGGGCCATGAATATGGACCATCCTCTGGAGTTGGAGGATTTGG-
GCAAAAAGCTAGCCCTGTTGCAACAGCCTAAGCCGCCCAAGAAAATTTCCCAGGCCATT-
GATTTTGGCAAAGTGTTGTTTGATGTGCTCAAGGCCAAACCAGGGCGTAACTTCTTTCCCCCCT-
GCCAAGAAGTAGTCATCGATGGTGAAAATCTCGATTTAAACCAAATCCCCTTGATCCGGCCCTATC-
CCGGTGATGCGGGCAAAATTATTACCCTTGGTTTAGTGATCACCAAGGACTGTGAAACGGGCAC-
CCCCAATGTGGGGGTTTATCGTCTGCAACTGCAATCCAAAACCACCATGACGGTCCATTGGCTGT-
CGGTGCGGGGAGGGGCCAGGCATTTACGCAAAGCGGCGGAACAGGGCAAAAAATTAGAAGTGGC-
GATCGCCTTGGGGGTAGATCCATTAATTATTATGGCGGCGGCCACACCGATCCCGGTGGATTTGT-
CAGAATGGTTATTTGCGGGGTTATACGGTGGTTCTGGGGTGGCCCTAGCTAAATGTAAAACCGTC-
GATTTGGAAGTGCCGGCGGACTCAGAATTTGTGCTGGAAGGTACCATTACCCCCGGCGAAATGTTAC-
CCGATGGCCCCTTTGGCGATCACATGGGCTACTACGGCGGCGTGGAGGATTCTCCCCTAGTGCGGTTC-
CAGTGTCTGACCCACCGCAAAAATCCCGTTTATTTAACTACTTTCAGCGGTCGTCCCCCCAAAGAA-
GAAGCCATGATGGCGATCGCCTTGAACCGGATTTATACGCCAATTTTGCGGCAACAGGTTTCG-
GAAATCACCGACTTCTTTTTGCCCATGGAAGCGTTGAGTTACAAAGCTGCCATTATTTCCATTGA-
CAAAGCTTATCCGGGGCAAGCTAAGCGGGCGGCCCTGGCTTTTTGGAGTGCTCTACCCCAATTTACC-
TACACCAAATTCGTCATTGTGGTGGATAAGAGTATTAACATCCGCGATCCCCGCCAGGTGGTCTGGGC-
CATCAGCTCCAAAGTTGACCCGGTGCGGGACGTGTTTATTTTGCCGGAAACCCCCTTTGACAGCCT-
CGATTTTGCCAGTGAAAAAATTGGTTTGGGCGGCCGCATGGGTATTGATGCCACCACCAAAATTCCC-
CCGGAAACGGATCATGAATGGGGAGAAGTATTGGAGTCCGATCCAGCCATGGCGGAGCAGGTCAGC-
CAACGCTGGGCCGAGTACGGTTTGGGGGATATTAATTTAACCGAAGTTAATCCCAACTTGTTTGGC-
TATGACGTGTAA

Abbildung 42: DNA-Sequenz *sll0936*

ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGT-
GATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAAC-
TTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTAC-
TTTCGGTTATGGTGTTCAATGCTTTGCGAGATACCCAGATCATATGAAACGGCATGACTTTTT-
CAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGACGG-
GAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGT-
TAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGACACAAATTGGAATACAACTATAACT
CACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGA-
CACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATG-
GCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAAC-
GAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTC TTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGTAA

Abbildung 43: DNA-Sequenz gftmut3.1

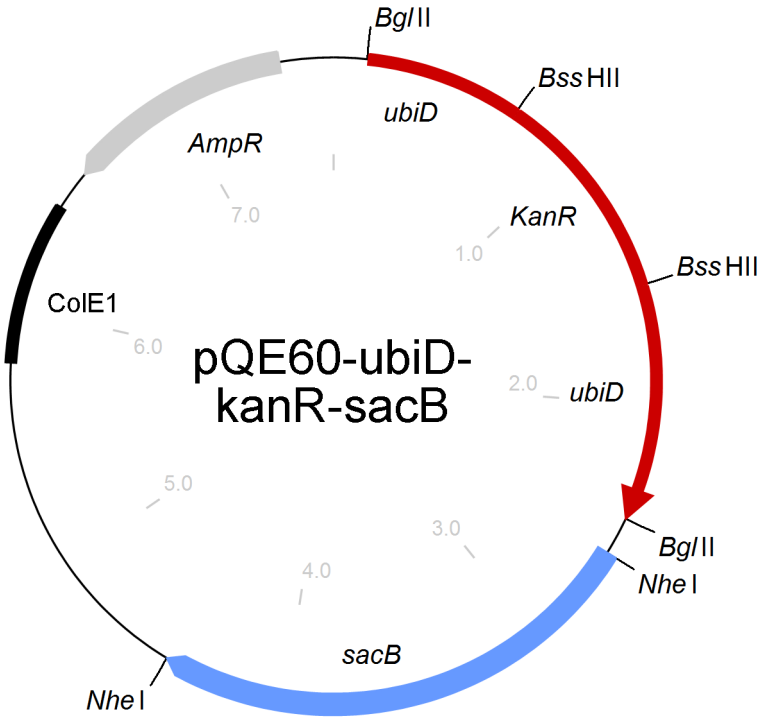


Abbildung 44: Vektorkarte pQE60-ubiD-kanR-sacB

*Amp*R, Ampicillin Resistenzgen; Col E1, Replikationsursprung; *sacB*, kodiert für Levansucrase aus Bacillus subtilis; *Kan*R, Kanamycin Resistenzgen.

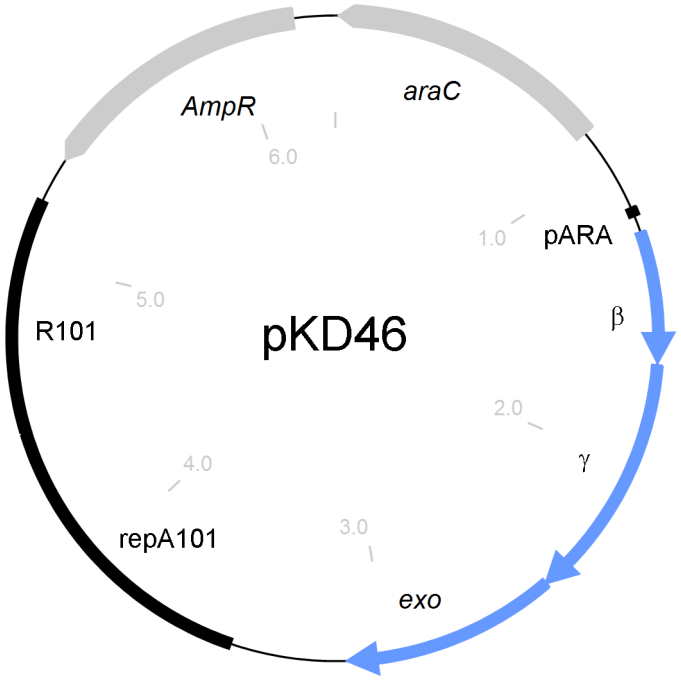


Abbildung 45: Vektorkarte pKD46

*Amp*R, Ampicillin Resistenzgen; *araC*, Regulator Gen; pARA, Arabinose Promoter; γ, DNA-Nuklease Inhibitor; β, β-Protein; *exo*, λ- Exonuklease; repA101, Temperatursensitiver Replikationsursprung; R101, Replikationsursprung.

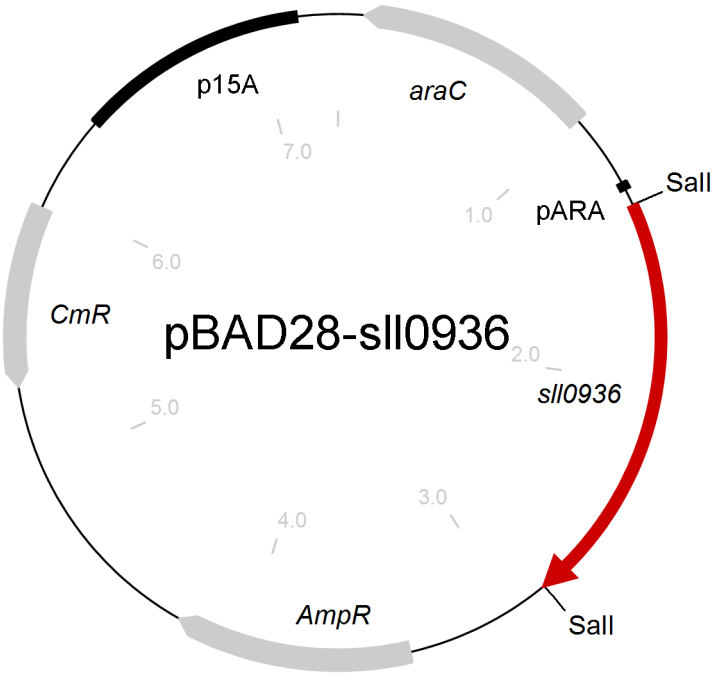


Abbildung 46: Vektorkarte pBAD28

*Amp*R, Ampicillin Resistenzgen; *Cm*R, Chloramphenicol Resistenzgen; p15A, Replikationsursprung; *araC*, Regulator Gen; pARA, Arabinose Promoter.

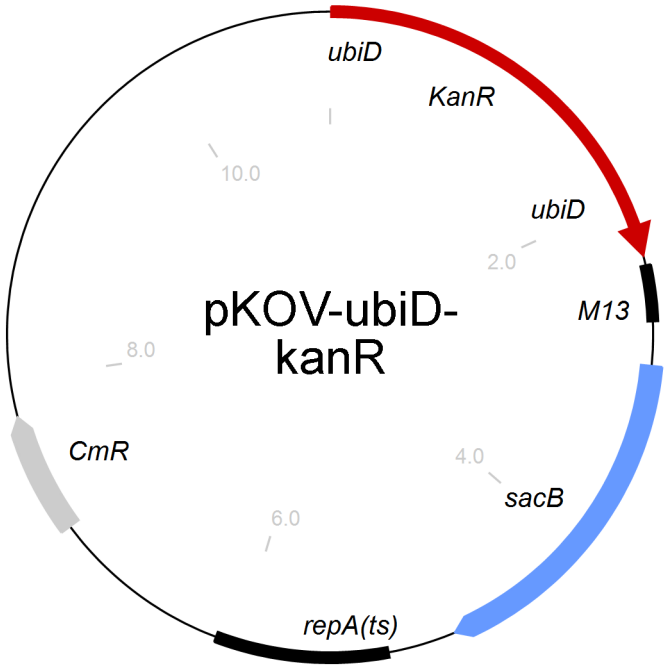


Abbildung 47: Vektorkarte pBAD28

*Amp*R, Ampicillin Resistenzgen; *Cm*R, Chloramphenicol Resistenzgen; p15A, Replikationsursprung; *araC*, Regulator Gen; pARA, Arabinose Promoter.

Tabelle 26: Phänotypen der *Synechocystis* Mutanten

	WT	**Δ*sll1797***	**Δ*slr1099***	**Δ*sll0936***	**Δ*slr1300***
Zellen·OD_{730}^{-1}	$0{,}81 \cdot 10^7$	$2{,}5 \cdot 10^7$	$1{,}17 \cdot 10^7$	$1{,}91 \cdot 10^7$	$0{,}85 \cdot 10^7$
Chlorophyll [µg·OD_{730}^{-1}]	1,8 ± 0,51	1,3 ± 0,08	2,0 ± 0,63	2,4 ± 0,1	2,1 ± 0,39
Plastochinon [µg·OD_{730}^{-1}]	226 ± 15	8 ± 3	42 ± 16	67 ± 7	127 ± 2
Phyllochinon [µg·OD_{730}^{-1}]	120 ± 16	117 ± 18	126 ± 17	119 ± 1	125 ± 1
Photosyntheserate [nmol $O_2 \cdot s^{-1} \cdot$(µg Chl.)$^{-1}$]	17,9 ± 0,45	0,7 ± 0,57	16,5 ± 0,59	14,9 ± 0,29	17,1 ± 0,47

Chl., Chlorophyll

Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name	Pfaff
Vorname	Christian
Geburtsdatum	20.09.1980
Geburtsort	Aachen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Promotion	
seit 07/2009	am Institut für Spezielle Botanik der RWTH Aachen
	Thema der Arbeit: Plastochinon Biosynthese in Cyanobakterien
Studium	
04/2003-06/2009	RWTH Aachen
	Diplom Biologie
	Thema der Abschlussarbeit: Untersuchungen zur Plastochinon-Biosynthese in *Synechocystis* sp. PCC6803
10/2001-03/2003	RWTH Aachen
	Chemiestudium
Schulische Ausbildung	
1995-2001	Gesamtschule Aachen Brand
1991-1995	Ritzefeld-Gymnasium Stolberg
1987-1991	Gemeinschafts-Grundschule Breinig

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, dass alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Quellen übernommen wurden, als solche kenntlich gemacht sind und dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Christian Pfaff

Danksagung

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde von 2009 bis 2013 in der Abteilung Spezielle Botanik am Institut für Biologie I der RWTH Aachen unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Margrit Frentzen durchgeführt.

Mein ganz besonderer Dank gilt daher Frau Prof. Dr. Margrit Frentzen für das entgegengebrachte Vertrauen und für die beste Betreuung, die man sich wünschen kann.

Herrn Prof. Dr. Björn Usadel danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Frau Dr. Radin Sadre danke ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung zu Beginn der Arbeit.

Niels Glindemann, Thorsten Neuss, Stefan Esser und Stefan Buchkremer danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit während meiner Doktorarbeit und die gute gemeinsame Zeit im Labor.

Jenny Bräunig danke ich für die Hilfe bei der quantitativen realtime PCR.

Dr. Matthias Buntru danke ich besonders für gute Ideen, für Bier und für Freundschaft.

Julia Zenner und Jessica Albrecht gilt mein besonderer Dank für die vielen Korrekturvorschläge.

Mein aller größter Dank gilt meiner Schwester Dr. Anke Pfaff und meinem Vater Dr. Ulrich Pfaff für die immerwährende Unterstützung.