

Charakterisierung der Anpassung an CO₂-Mangel in Cyanobakterien mittels Metabolom-Analysen

Dissertation

zur Erlangung

des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Doreen Schwarz, geb. am 14.01.1981 in Kühlungsborn

aus Rostock

Rostock, Januar 2014

Gutachter:

1. Gutachter: Apl. Prof. Dr. Martin Hagemann
Abteilung Pflanzenphysiologie
Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. Hermann Bauwe
Abteilung Pflanzenphysiologie
Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock

Datum der Einreichung: 14. Januar 2014

Datum der Verteidigung: 17. Oktober 2014

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
ZUSAMMENFASSUNG	IX
SUMMARY	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Oxygenase-Aktivität der Rubisco.....	4
1.2 Umgang der Cyanobakterien mit Variationen in der C _i -Verfügbarkeit.....	6
1.2.1 Mechanismus der intrazellulären Akkumulation von CO ₂	6
1.2.2 Mechanismus der photorespiratorischen Detoxifikation von 2PG.....	9
1.3 Zentraler Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus in Cyanobakterien.....	11
1.4 Anpassungsmechanismen an C _i -Mangelbedingungen.....	14
1.4.1 Modifikationen in der Morphologie	14
1.4.2 Modifikationen auf Transkriptom-Ebene	14
1.4.3 Modifikationen auf Metabolom-Ebene.....	15
1.5 Mechanismen zur Wahrnehmung der CO ₂ -Verfügbarkeit.....	15
2 ZIELSTELLUNG	17
3 MATERIALIEN UND METHODEN	18
3.1 Materialien	18
3.1.1 Organismen.....	18
3.1.2 Oligonucleotid-Primer	18
3.1.3 Nährmedium.....	19
3.1.4 Mediumzusätze	20
3.2 Kultivierung.....	21
3.2.1 Axenitätstest	21
3.2.2 Flüssigkultur.....	21
3.2.3 Batchkultur	21
3.2.4 Kultivierung auf Festmedium	22
3.2.5 Umgang mit Cryo-Erhaltungen	22
3.2.6 Bestimmung und Einstellung der optischen Dichte	22
3.2.7 Bestimmung der Wachstumsrate.....	23
3.2.8 Bestimmung der Pigmentverhältnisse	24
3.3 Molekularbiologische Methoden	24

3.3.1	Isolation chromosomaler DNA	24
3.3.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	24
3.3.3	Agarosegelelektrophorese	26
3.4	HC/LC-Shift-Experiment.....	27
3.4.1	Anzucht	27
3.4.2	Umstellung auf CO ₂ -Mangel	27
3.5	Transkriptom-Analysen	28
3.5.1	Probennahme	28
3.5.2	RNA-Extraktion mittels PGTX-Lösung.....	28
3.5.3	Überprüfung der RNA-Extrakte auf Kontaminationen mit DNA	29
3.5.4	Bestimmung der RNA-Konzentration	29
3.5.5	Qualitätskontrolle der RNA-Extrakte mittels Gelelektrophorese.....	30
3.5.6	RNA-Microarray.....	31
3.6	Metabolom-Analysen	31
3.6.1	Probennahme	31
3.6.2	Extraktion.....	31
3.6.3	Messung mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie	32
3.6.4	Metabolom-Datensätze.....	33
3.7	Glykogenbestimmung.....	34
3.7.1	Probennahme	34
3.7.2	Glykogenbestimmung mittels Anthron	34
3.8	<i>In silico</i> -Analyse	35
4	ERGEBNISSE	36
4.1	Vergleichende Metabolom- und Transkriptom-Analysen an <i>Synechocystis</i> und <i>Synechococcus</i>	36
4.1.1	Modulationen im Metabolom unter CO ₂ -Mangel.....	36
4.1.1.1	Intermediate des photorespiratorischen 2PG-Metabolismus	37
4.1.1.2	Intermediate des Calvin-Benson-Bassham Zyklus, des OPP-Weges und der Glykolyse	38
4.1.1.3	Intermediate des TCA-Zyklus und des GS/GOGAT-Weges	40
4.1.1.4	Glykogenbestimmung.....	43
4.1.2	Modulation im Transkriptom unter CO ₂ -Mangel.....	44
4.1.2.1	CO ₂ -Konzentrierungsmechanismus.....	44
4.1.2.2	Photorespiratorischer 2PG-Metabolismus.....	46
4.1.2.3	Calvin-Benson-Bassham Zyklus, OPP-Weg und Glykolyse.....	49

4.1.2.4	TCA-Zyklus und GS/GOGAT-Weg.....	51
4.2	Untersuchungen zu Transkriptom- und Metabolom-Veränderungen in der <i>Synechocystis</i> -Mutante $\Delta ndhR$	53
4.2.1	Verifizierung des Genotyps der Mutante $\Delta ndhR$	53
4.2.2	Physiologische Charakterisierung.....	54
4.2.3	Effekte der <i>ndhR</i> -Inaktivierung auf das Transkriptom unter variabler C_i -Verfügbarkeit	54
4.2.3.1	CO_2 -Konzentrierungsmechanismus.....	55
4.2.3.2	Photorespiratorischer 2PG-Metabolismus.....	58
4.2.3.3	Calvin-Benson-Bassham Zyklus, OPP-Weg und Glykolyse.....	60
4.2.3.4	TCA-Zyklus und GS/GOGAT-Weg.....	62
4.2.3.5	Beeinflussung der Transkription von weiteren Genen in der Mutante $\Delta ndhR$	64
4.2.3.6	Beeinflussung der Transkription von Genen für nicht-kodierende RNAs.....	67
4.2.4	Effekte der <i>ndhR</i> -Inaktivierung auf das Metabolom unter variabler C_i -Verfügbarkeit	68
4.2.4.1	Intermediate des photorespiratorischer 2PG-Metabolismus	68
4.2.4.2	Intermediate des Calvin-Benson-Bassham Zyklus, des OPP-Weges und der Glykolyse	70
4.2.4.3	Intermediate des TCA-Zyklus und des GS/GOGAT-Weges	71
5	DISKUSSION	73
5.1	Definition einer Metabolom-Signatur für die Anpassung von Cyanobakterien an C_i -Mangel.....	73
5.2	Korrelationen im Transkriptom und Metabolom unter CO_2 -Mangel	81
5.3	Auswirkungen der <i>ndhR</i> -Inaktivierung auf die Anpassung an CO_2 -Mangel.....	87
6	AUSBLICK	91
7	LITERATUR	93
	ANHANG.....	XII
	PUBLIKATIONEN	XVIII
	TAGUNGSBEITRÄGE UND FORSCHUNGSaufenthalt	XIXVIII

Abkürzungsverzeichnis

μ	Wachstumsrate
2PG	2-Phosphoglykolat
2PGA	2-Phosphoglycerat
3PGA	3-Phosphoglycerat
6-P-Glukonat	6-Phosphoglykonat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	engl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
CA	Carbonatanhydrase
Car	Carotinoide
CCM	engl. <i>CO₂ concentrating mechanism</i>
Chl <i>a</i>	Chlorophyll <i>a</i>
C _i	anorganischer Kohlenstoff
CO ₂	Kohlendioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
engl.	englisch
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> , und andere
Fru-6-P	Fruktose-6-Phosphat
Glc	Glukose
Glc-6-P	Glukose-6-Phosphat
GS/GOGAT	Glutamin-Synthetase/Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase
HC	Hoch-CO ₂ (engl. <i>high CO₂</i>), 5 % [v/v] CO ₂
KEGG	Datenbank <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
Km ^R	Kanamycin-Resistenzkassette
LC	Niedrig-CO ₂ (engl. <i>low CO₂</i>), 0,038 % [v/v] CO ₂
Mbp	Mega-Basenpaare
n.d.	nicht detektiert
NADH	Nicotinamiddinucleotid, reduziert
NADPH	Nicotinamiddinucleotidphosphat, reduziert
NDH	NAD(P)H Oxidoreduktase
nm	Einheit der Wellenlänge, nanometer
OAA	Oxaloacetat

OD ₇₅₀	optische Dichte bei $\lambda = 750 \text{ nm}$
OPP	oxidativer Pentosephosphat Weg
PC	Phycocyanin
PCR	Polymerasekettenreaktion
RT-PCR	Real-Time-Polymerasekettenreaktion
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphat
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Tricarbonsäure (Zyklus)
WT	Wildtyp
λ	Wellenlänge, Lambda

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. Schematischer Aufbau des cyanobakteriellen CCM.....	8
Abbildung 2. Photorespiratorischer 2PG-Metabolismus.....	10
Abbildung 3. Zentraler Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus.....	13
Abbildung 4. Löslichkeit von CO ₂ in Abhängigkeit vom pH-Wert	19
Abbildung 5. Einstellung der optischen Dichte bei 750 nm (OD ₇₅₀).	23
Abbildung 6. Berechnungsgrundlage zur Bestimmung der Wachstumsrate μ	23
Abbildung 7. Relative Veränderungen in den Poolgrößen von Intermediaten der Photorespiration in <i>Synechocystis</i> und <i>Synechococcus</i>	38
Abbildung 8. Relative Veränderungen in den Poolgrößen von Intermediaten des Calvin-Benson-Bassham Zyklus, des OPP-Weges sowie der Glykolyse in <i>Synechocystis</i> und <i>Synechococcus</i>	40
Abbildung 9. Relative Veränderungen in den Poolgrößen von Intermediaten des TCA-Zyklus sowie des GS/GOGAT-Weges in <i>Synechocystis</i> und <i>Synechococcus</i>	42
Abbildung 10. Änderungen im Glykogengehalt in <i>Synechocystis</i>	43
Abbildung 11. Verifizierung des Genotyps der <i>Synechocystis</i> -Mutante $\Delta ndhR$	53
Abbildung 12. Physiologische Charakterisierung der <i>Synechocystis</i> -Mutante $\Delta ndhR$	54
Abbildung 13. Relativer Metabolitgehalt der Intermediate des photorespiratorischen 2PG-Metabolismus in <i>Synechocystis</i> (WT) und in der Mutante $\Delta ndhR$	69
Abbildung 14. Relative Metabolitgehalte von Ribulose-5-P in <i>Synechocystis</i> (WT) und in der Mutante $\Delta ndhR$	70
Abbildung 15. Relative Metabolitgehalte von Intermediaten der Glykolyse und des OPP-Weges in <i>Synechocystis</i> (WT) und in der Mutante $\Delta ndhR$	71
Abbildung 16. Relative Metabolitgehalte von Intermediaten des TCA-Zyklus und des GS/GOGAT-Weges in <i>Synechocystis</i> (WT) und in der Mutante $\Delta ndhR$	72
Abbildung 17. Modell zur Verdeutlichung der LC-Anwort in Cyanobakterien.....	86
Abbildung 18. Relative Metabolitgehalte der Aminosäuren Ornithin und Aspartat in <i>Synechocystis</i> (WT) und in der Mutante $\Delta ndhR$	XVI

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1. Oligonucleotid-Primer	18
Tabelle 2. Zusammensetzung des BG11-Mediums.....	20
Tabelle 3. PCR-Programme	26
Tabelle 4. Metabolom-Datensätze.....	34
Tabelle 5. Wachstumsraten von <i>Synechocystis</i> und <i>Synechococcus</i>	37
Tabelle 6. Realative Veränderungen im Transkriptgehalt CCM-assoziiierter Gene in <i>Synechocystis</i> und <i>Synechococcus</i>	45
Tabelle 7. Relative Veränderungen im Transkriptgehalt photorespiratorischer Enzyme in <i>Synechocystis</i> und <i>Synechococcus</i>	48
Tabelle 8. Relative Veränderungen im Transkriptgehalt von Enzymen des Calvin-Benson-Bassham Zyklus, des OPP-Weges und der Glykolyse in <i>Synechocystis</i> und <i>Synechococcus</i>	50
Tabelle 9. Relative Veränderungen im Transkriptgehalt von Enzymen des TCA-Zyklus und des GS/GOGAT-Weges in <i>Synechocystis</i> und <i>Synechococcus</i>	52
Tabelle 10. Relative transkriptionelle Veränderungen CCM-assoziiierter Gene in der <i>Synechocystis</i> -Mutante $\Delta ndhR$	57
Tabelle 11. Relative transkriptionelle Veränderungen von Genen des photorespiratorischen 2PG-Metabolismus in der Mutante $\Delta ndhR$	59
Tabelle 12. Relative transkriptionelle Veränderungen von Genen des Calvin-Benson-Bassham Zyklus, dem OPP-Weg und der Glykolyse in der Mutante $\Delta ndhR$	61
Tabelle 13. Relative transkriptionelle Veränderungen von Genen des TCA-Zyklus und des GS/GOGAT-Weges in der Mutante $\Delta ndhR$	63
Tabelle 14. Relativ erhöhte Transkriptmengen weiterer Gene in der Mutante $\Delta ndhR$	65
Tabelle 15. Verminderte Transkriptmengen weiterer Gene in der Mutante $\Delta ndhR$	66
Tabelle 16. Ähnlichkeiten zwischen den Aminosäuresequenzen von den im photorespiratorischen 2PG-Abbau involvierten Proteinen aus <i>Synechocystis</i> und <i>Synechococcus</i>	XII
Tabelle 17. Auflistung der Gene des zentralen C- und N-Metabolismus in <i>Synechocystis</i> und <i>Synechococcus</i> unter.	IXIII
Tabelle 18. Gegenüberstellung verschiedener Metabolom-Datensätze von <i>Synechocystis</i> und <i>Synechococcus</i>	XIV

ZUSAMMENFASSUNG

Durch den Prozess der Photosynthese kam es im Verlauf der Erdgeschichte zu dramatischen Veränderungen des atmosphärischen CO_2/O_2 -Verhältnisses. Die geringe Affinität und Substratspezifität der RubisCO für CO_2 begünstigten die Ausbildung von Anpassungsmechanismen wie den cyanobakteriellen CO_2 -Konzentrierungsmechanismus (CCM) und den photorespiratorischen 2-Phosphoglykolat (2PG)-Metabolismus. Temperatur- sowie pH-Wert-Änderungen beeinflussen weiterhin die Verfügbarkeit von anorganischem Kohlenstoff (C_i). Diesen kurzfristigen Schwankungen im C_i -Angebot begegnen photosynthetisch aktive Organismen unter anderem durch Anpassungen auf transkriptioneller und Metabolom-Ebene. Um das Wissen über C_i -induzierte, kurzfristige Adaptationsmechanismen in Cyanobakterien zu vertiefen, wurden nach Umstellung des C_i -Angebotes von 5 % [v/v] (engl. *high carbon*, HC) auf 0,038 % [v/v] (engl. *low carbon*, LC) an *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Synechococcus elongatus* PCC 7942 vergleichende Metabolom- und Transkriptom-Analysen durchgeführt.

Stamm-übergreifende Metabolom-Veränderungen als Reaktion auf das Vorliegen einer C_i -Mangelbedingung betrafen primär den Anstieg des intrazellulären 2PG-Gehaltes, gefolgt von einem Anstieg der 2-Phosphoglycerat (2PGA)- und der Phosphoenolpyruvat (PEP)-Poolgrößen sowie einer Abnahme in der Speicherung von Glykogen. Unter LC-Bedingungen verwendet die RubisCO verstärkt O_2 als Substrat. Aus der Oxygenase-Aktivität der RubisCO geht direkt 2PG hervor. Der Anstieg im 2PG-Level ist eine direkte Folge der Oxygenase-Reaktion der RubisCO. Das 2PG wirkt inhibitorisch auf Enzyme des Calvin-Benson-Bassham Zyklus. Ein Anstieg der Poolgrößen von 2PGA und PEP ist ein Indikator für die Verschiebung des Kohlenstoff-Metabolismus von der Glykogen-Speicherung in Richtung der Synthese von Kohlenstoff-Bausteinen durch den oxidativen Pentosephosphatweg sowie den Tricarbonsäurezyklus. Ein Anstieg in den Poolgrößen aller drei Metabolite (2PG, 2PGA, PEP) lässt auf einen HC/LC-Wechsel schließen und stellt eine Metabolom-Signatur für die LC-Adaptation dar.

Die Transkriptom-Analyse an *Synechocystis* und *Synechococcus* spiegelt die im Metabolom beobachtete LC-induzierte Verschiebung des Kohlenstoff-Metabolismus wieder. Das Transkriptom weist auf die verstärkte Expression von Enzymen für die Detoxifikation von 2PG

hin. Die Daten lassen weiterhin erkennen, dass unter LC-Bedingungen der 2PG-Abbau vermehrt über die beiden alternativen, photorespiratorischen Wege, dem Glycerat-Weg sowie der vollständigen Dekarboxylierung von Glyoxylat, von statten geht. Die Expression von Genen des Calvin-Benson-Bassham Zyklus ist herabgesetzt. Ferner deuten die Transkriptom-Analysen auf eine Reduktion des Stickstoff-Stoffwechsels hin.

Untersuchungen zur Wahrnehmung von C_i -Mangelbedingungen und der Regulation der LC-Antwort in Cyanobakterien führten in den letzten Jahren zur Identifizierung der Regulatorproteine NdhR, CcmR und AbrB. Dabei fungiert NdhR unter HC-Bedingungen primär als Repressor für die Gene des CCM wie z. B. denen der CO_2/HCO_3^- -Aufnahmesysteme. Über kombinierte Transkriptom- und Metabolom-Analysen wurden in dieser Arbeit weitergehende Untersuchungen zur Rolle von NdhR bei der LC-Antwort durchgeführt. Beobachtete transkriptionelle Veränderungen in der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhR$ bestätigten bereits bekannte Zielproteine von NdhR, führten aber auch zur Identifizierung von weiteren NdhR kontrollierten Genen. Darunter befand sich das *sll0680-sll0684* Operon, welches die Genprodukte eines Phosphattransporters kodiert. Aufgrund des Vorliegens eines Transkriptomsmusters unter HC, das dem des *Synechocystis* Wildtyp unter LC-Bedingungen entsprach, ist die Mutante beim Eintreten einer C_i -Mangelbedingung besser vorbereitet als der WT. Die Metabolom-Analysen stützen diese Beobachtung. Die LC-Antwort in $\Delta ndhR$ ist schwächer ausgeprägt als im WT.

SUMMARY

In the history of Earth the biological process known as photosynthesis had a major impact on the atmospheric CO₂/O₂ ratio. The low affinity and substrate specificity of RubisCO for CO₂ favored the development of adaptation mechanisms such as the cyanobacterial CO₂ concentration mechanism (CCM) and the photorespiratory 2-phosphoglycolate (2PG) metabolism. Short-term fluctuations in the availability of inorganic carbon (C_i) lead to a variety of modification processes on e.g. transcriptomic and metabolic level. To investigate the cyanobacterial adaptation mechanisms in more detail, comparative transcriptome and metabolome analyses were carried out by growing the strains *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus elongatus* PCC 7942 under the availability of 5 % [v/v] CO₂ (high carbon, HC) or 0.038 % [v/v] CO₂ (low carbon, LC).

In both strains adaptations of the metabolism to C_i limitation were characterized by an increase of the intracellular concentrations of the metabolites 2PG, 2-phosphoglycerate (2PGA) and phosphoenolpyruvate (PEP) and a decrease in the storage of glycogen. The metabolite 2PG is a product of the oxygenase activity of the RubisCO and has an inhibitory effect on the Calvin-Benson-Bassham cycle, a central pathway of the carbon metabolism. Under LC conditions the carbon metabolism switches from the storage of glycogen to the synthesis of carbon building blocks by the oxidative pentosephosphate pathway and the tricarboxylic acid cycle. This observation is indicated by the increased level of 2PGA and PEP. Consequently, a shift from HC to LC conditions is characterized by this metabolic signature or fingerprint and is easily identified.

The comparative transcriptome analysis of *Synechocystis* and *Synechococcus* confirmed the observed metabolic changes under LC conditions. Genes encoding enzymes for the two alternative photorespiratory pathways, the glycerate pathway and the complete decarboxylation of glyoxylate, showed an increased transcription, whereas genes coding for enzymes of the Calvin-Benson-Bassham cycle and the nitrogen metabolism displayed a decreased transcription.

Recently, the regulator proteins NdhR, CcmR and AbrB were identified in cyanobacteria and shown to be involved in the sensing and signaling of C_i limitation and the regulation of the

response to C_i limitation. Thereby, NdhR was shown to act as a repressor for genes of the CCM under HC, such as the CO_2/HCO_3^- uptake systems. Under LC conditions these genes exhibit an increase transcription. This work investigated the effect of a NdhR deletion on the C_i response on transcriptomic and metabolomic level in more detail. In the transcriptome analysis of the *Synechocystis* $\Delta ndhR$ mutant new NdhR regulated proteins were identified. Among these genes is the operon *sll0680-sll0684*, that encodes proteins for a phosphate transporter. The metabolome analysis shows a weaker LC response of the $\Delta ndhR$ mutant in comparison to the WT. This observation could indicate that the mutant is already partly prepared under HC for the conditions of C_i limitation.

1 EINLEITUNG

Das Erscheinungsbild der Erde unterlag und unterliegt im Laufe ihrer Entwicklungsgeschichte zahlreichen Umgestaltungsprozessen ehe ihr heutiges Antlitz entstand. Von fundamentaler Bedeutung für alle heutigen Lebewesen war die Entstehung einer oxidativen Erdatmosphäre. Die Umwandlung der ehemals Sauerstoff-freien in die gegenwärtig Sauerstoff-haltige Atmosphäre und somit die Voraussetzung für die Ausbildung aerober Lebensformen wird zum größten Teil Photosynthese-betreibenden Ur-Organismen zugeschrieben (HOLLAND, 2006; KASTING, 1993; KERR, 2005; POLLACK, 1991, SHAW, 2008;). Die oxygene Photosynthese führt unter Nutzung von Lichtenergie und über die Hydrolyse von Wasser zur Freisetzung von molekularem Sauerstoff (O_2) als Abfallprodukt. Daneben wird in der oxygenen Photosynthese im ersten Schritt aus Lichtenergie chemische Energie in Form von ATP und dem Reduktionsmittel NAD(P)H generiert, die in einem zweiten Schritt über den Calvin-Benson-Bassham Zyklus zur Umsetzung von anorganischem Kohlenstoffdioxid (CO_2) in organische Kohlenstoffverbindungen genutzt wird. Organische Kohlenstoffverbindungen sind für heterotrophe Lebewesen essentielle Nährstoffe. Frühere photosynthetisch aktive Organismen waren folglich über zwei ihrer primären Eigentümlichkeiten maßgeblich an der Ausprägung des gegenwärtigen Lebens beteiligt: 1. über die Freisetzung von O_2 , und 2. über die Bereitstellung organischer Kohlenstoffverbindungen.

Die Cyanobakterien nehmen in diesem Zusammenhang als älteste Lebensform, die zur oxygenen Photosynthese befähigt war, eine Schlüsselposition ein. Sie besiedelten vermutlich bereits vor 3,5 Milliarden Jahren die Erde und gelten als Urahnen aller heute existierenden photosynthetisch aktiven Eukaryoten (DISMUKES *et al.*, 2001; FIELD *et al.*, 1998). In der Endosymbiontentheorie werden frühere Cyanobakterien als evolutionärer Ursprung der heutigen Plastiden der photosynthetischen Eukaryoten angesehen (DOUGLAS, 1994; MERESCHKOWSKY, 1905). Jüngste phylogenetische Analysen unter Nutzung von Genomdaten heutiger Cyanobakterien und Algen sowie Pflanzen bestätigen diese These (DEUSCH *et al.*, 2008; KERN *et al.*, 2011). Gleichmaßen kommt den Cyanobakterien in der Gegenwart eine globale Relevanz bei der Bereitstellung von atmosphärischem O_2 und organischen Kohlenstoff- sowie Stickstoff-Assimilaten zu (CAPONE *et al.*, 1997; PARTENSKY *et al.*, 1999; ZEHR *et al.*,

2001). Zunehmend wichtig wird auch ihre Rolle als CO₂-Sink im Ozean, die möglicherweise den anthropogen bedingten Anstieg der atmosphärischen CO₂-Konzentration begrenzen könnte. Die archaische Natur der Cyanobakterien bildet die Basis, aber stellt nicht den alleinigen Grund für das steigende Interesse an der Erforschung biochemischer und physiologischer Prozesse dieser Mikroorganismen dar. Die Cyanobakterien bilden innerhalb der Domäne der Eubakterien ein eigenes, monophyletisches Phylum, das morphologisch sowie physiologisch sehr heterogene Arten umfasst (SHI und FALKOWSKI, 2008). Das Genom von zahlreichen Cyanobakterien ist heute bereits sequenziert und online verfügbar (z.B.: <http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/>). Ihre Genomgröße variiert zwischen 1,6 und 12,5 Mbp (SHI *et al.*, 2013). Ebenso abwechslungsreich ist die Lebensweise, die von marinen über Süßwasser-bewohnende bis hin zu Erdreich-besiedelnden Arten reicht. Darüber hinaus ist die Erschließung von extrem heißen, wasserarmen und salinen Standorten wie Thermalquellen, dem arktischen Eis, Salzseen oder Wüstenregionen durch Cyanobakterien nicht außergewöhnlich. Das Fundament für diese bemerkenswerten Leistungen einiger Arten sind spezielle morphologische sowie physiologische Anpassungsmechanismen. Weiterhin kommt den Cyanobakterien wachsende Bedeutung bei der Entwicklung alternativer Herstellungsverfahren von Biotreibstoffen und biologisch abbaubaren Plastikverpackungen zu (ABED *et al.*, 2009; ANEMAET *et al.*, 2010; ATSUMI *et al.*, 2009; DISMUKES *et al.*, 2008; GHIRARDI *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2011; SUMERFIELD und SHERMAN, 2008). Nicht zu unterschätzen ist die Nutzung von Cyanobakterien als Quelle für pharmakologisch nutzbare Wirkstoffe (WILLIAMS, 2008). Voraussetzung für das effektive Ausschöpfen der unterschiedlichsten Nutzungsmöglichkeiten und des biotechnologischen Potentials von Cyanobakterien ist ein grundlegendes Verständnis über den Metabolismus und dessen Variabilität in Bezug auf sich verändernde Umweltbedingungen.

Das Genom der Cyanobakterien-Stämme *Synechocystis* sp. PCC 6803 (im Weiteren als *Synechocystis* bezeichnet) und *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (im Weiteren als *Synechococcus* bezeichnet) ist vollständig sequenziert und online verfügbar. Sie bieten sich daher zur Charakterisierung der Abhängigkeit und der Anpassung hinsichtlich der Verfügbarkeit von anorganischem Kohlenstoff (C_i) auf Metabolom- und Transkriptom-Ebene an. Des Weiteren stellen *Synechocystis* und *Synechococcus* etablierte Modellorganismen in der Cyanobakterien-Forschung dar. An ihnen wurden bereits umfangreiche Untersuchungen

zur Aufklärung des cyanobakteriellen CO₂-Konzentrierungsmechanismus (engl. *carbon-concentrating mechanism*, CCM) und deren Regulationsmechanismen sowie des zentralen Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus durchgeführt (Kaplan *et al.*, 2008; Price, 2011).

Ferner liegen Microarray-Analysen zur Enthüllung der transkriptionellen Anpassung an sich verändernde C_i- und Lichtverhältnisse vor (EISENHUT *et al.*, 2008; HIHARA *et al.*, 2001; MITSCHKE *et al.*, 2011; NODOP *et al.*, 2008; SCHWARZ *et al.*, 2011; SUGITA *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2004; WOODGER *et al.*, 2003).

Synechocystis und *Synechococcus* sind einzellige, nicht-diazotrophe Cyanobakterien, d.h. sie sind nicht zur N₂-Fixierung befähigt und somit an die Anwesenheit von leicht verfügbaren Stickstoffquellen, wie NH₄⁺ und NO₃⁻ gebunden. *Synechocystis* wurde 1963 aus Süßwasser isoliert und durch RIPPKA *et al.* (1979) charakterisiert. Der hier verwendete japanische Wildtyp von *Synechocystis* ist – im Gegensatz zum Originalstamm aus der französischen Pasteursammlung (KANESAKI *et al.*, 2011) – durch eine Glukose-Toleranz gekennzeichnet und somit fakultativ heterotroph (ANDERSON und McINTOSH, 1991; HAIMOVICH-DAYAN *et al.*, 2011). Bezüglich der Anpassung an C_i-Mangelbedingungen bietet *Synechocystis* zusätzlich den Vorteil, dass speziell an diesem Stamm der Nachweis für das Vorliegen eines aktiven cyanobakteriellen 2-Phosphoglykolat-(2PG)-Abbaus über den photorespiratischen C₂-Zyklus sowie zweier assoziierter Wege bereits erbracht worden ist (EISENHUT *et al.*, 2006, 2008). Entsprechend der Klassifikation von GUPTA und MATHEWS (2010) zählt *Synechocystis* zum Clade B, welches eine Vielzahl unterschiedlicher Cyanobakterien umfasst und in dem sich Vertreter der Gattungen *Thermosynechococcus*, *Acaryochloris*, *Chroococcales*, *Anabaena* sowie *Oscillatoriales* wiederfinden lassen. Im Gegensatz dazu nimmt *Synechococcus* – zusammen mit dem nahezu identischen Stamm *Synechococcus* sp. PCC 6301 – eine zwischen Clade A und Clade C lokalisierte Position ein. Das Clade A umfasst die als ursprünglich angesehenen Cyanobakterien *Gloeobacter violaceus*, *Synechococcus* JA-2-3B'a und *Synechococcus* JA-3-3'b, während Clade C vorrangig die marinen Cyanobakterien der Gattungen *Synechococcus* und *Prochlorococcus* enthält. Die Cyanobakterien des Clade C repräsentieren den dominierenden Anteil des ozeanischen Picoplanktons. Vertreter dieser Gruppierung sind durch ein stark reduziertes Genom charakterisiert (LARSSON *et al.*, 2011; SCANLAN *et al.*, 2009).

Synechocystis verfügt neben einem großen zirkulären Chromosom zusätzlich über mindestens vier Plasmide. Das Genom in seiner Gesamtheit erreicht in *Synechocystis* eine Größe von 3,9 Mbp. *Synechococcus* weist ein Chromosom sowie ein weiteres Plasmid auf, die zusammen eine Genomgröße von 2,7 Mbp ausmachen. Ferner ist *Synechococcus* nicht zur Verwertung organischer Kohlenstoffverbindungen wie beispielsweise Glukose in der Lage und folglich an die Verfügbarkeit von CO₂ bzw. HCO₃⁻ gebunden (McEWEN *et al.*, 2013). Dieser Umstand führt zu Einschränkungen in der metabolischen Flexibilität von *Synechococcus* unter variablen C_i-Bedingungen und gleichzeitig zu einer Reduzierung möglicher Anpassungsmechanismen an eine limitierte C_i-Verfügbarkeit. Mit dem Vergleich der beiden sich physiologisch unterscheidenden Cyanobakterien-Stämme *Synechocystis* und *Synechococcus* wird ein guter Grundstein für die Identifizierung von Stamm-übergreifenden Adaptationswegen an C_i-Mangel auf Transkriptom- und Metabolom-Ebene gelegt.

1.1 Oxygenase-Aktivität der Rubisco

Das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphate-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) katalysiert während der Carboxylierung von Ribulose-1,6-bisphosphat (RuBP) die irreversible Eingangsreaktion des Calvin-Benson-Bassham Zyklus. Aus der Kondensation von CO₂ an das Akzeptormolekül RuBP gehen zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat (3PGA) hervor, welche im weiteren Verlauf des Kohlenstoffmetabolismus zur Regeneration von RuBP oder zum Aufbau von Stärke und anderen Zuckern verwendet werden. Die Besonderheit der RubisCO liegt in dem Charakteristikum, neben CO₂ auch O₂ als Substrat heranziehen zu können. Die Oxygenase-Aktivität, d.h. die Übertragung von O₂ auf RuBP mündet in der Generierung von einem Molekül 3PGA und einem Molekül 2PG. Das Intermediat 2PG nimmt im Metabolismus photosynthetisch aktiver Organismen eine entscheidende Position ein. Grund ist die toxische Wirkung von 2PG auf bestimmte Stoffwechselwege. Die negativen Effekte von 2PG auf die Aktivase der RubisCO sowie auf Enzyme des Calvin-Benson-Bassham Zyklus, wie der Phosphofruktokinase (KELLY und LATZKO, 1977) und der Triosephosphat-Isomerase (HUSIC *et al.*, 1987; NORMAN und COLMAN, 1991), resultieren in einer Inhibition der CO₂-Fixierung und einer damit assoziierten Einschränkung des Aufbaus von organischen Kohlenstoffverbindungen. Dieses führt folglich zu einer Wachstumsreduktion. Die RubisCO stellt als das ratenlimitierende Enzym der Photosynthese einen guten Angriffspunkt für

gezielte gentechnische Manipulationen zur Verbesserung des Biomasseertrags landwirtschaftlicher Nutzpflanzen dar. Allerdings sind bisher alle Bemühungen gescheitert, eine RubisCO ohne Oxygenase-Aktivität zu erzeugen.

Zur Zeit der Entstehung der Cyanobakterien stellte die geringe Substratspezifität der RubisCO gegenüber CO₂ vermutlich auf Grund der CO₂-reichen Erdatmosphäre bzw. der geringen O₂-Konzentration noch kein gravierendes Problem für den Organismus dar (GRIFFIN und SEEMANN, 1996). Die heutigen atmosphärischen Verhältnisse mit einem CO₂-Anteil von nur noch 0,038 % und einem O₂-Gehalt von ca. 20 % begünstigen jedoch die Oxygenase-Aktivität der RubisCO und somit die Bildung von 2PG.

Entsprechend der Endosymbionten-Theorie geht die Entwicklung der Chloroplasten eukaryotischer photosynthetisch aktiver Organismen auf Vorläufer der heutigen Cyanobakterien zurück. Auch die RubisCO höherer Pflanzen und der Cyanobakterien sind homolog, sie weisen starke Ähnlichkeiten in Funktion und Struktur auf (TAKABE *et al.*, 1976; TAKABE, 1977; VALENTIN und ZETSCHKE, 1990). Dennoch unterscheidet sich die RubisCO der Cyanobakterien von der RubisCO höherer Pflanzen in ihrer katalytischen Aktivität. Die cyanobakterielle RubisCO aus *Anabena variabilis* weist mit einem K_m-Wert von 293 µmol CO₂ im Vergleich zur RubisCO aus *Spinacea oleracea* mit einem K_m = 27 µmol CO₂ eine um rund das 100-fache verminderte Substrataffinität gegenüber CO₂ auf (BADGER *et al.*, 1980; SPREIZER *et al.*, 2005). Bei Betrachtung des Spezifitätsfaktors τ , der das Verhältnis zwischen Carboxylase und Oxygenase-Reaktion beschreibt und somit ein Maß für die Substratspezifität der RubisCO darstellt, schwankt der Wert für die RubisCO höherer Pflanzen wie *Spinacea oleracea* und *Nicotiana tabacum* um $\tau \approx 100$, während die cyanobakterielle RubisCO z. B. aus *Synechococcus* sp. PCC 6301 und *Thermosynechococcus elongates* einen Wert von $\tau \approx 50$ aufweist (GUBERNATOR *et al.*, 2008; JORDAN und OGREN, 1983; READ und TABITA, 1994). Je höher der Spezifitätsfaktor, desto spezifischer ist die RubisCO gegenüber CO₂. Diese Eigentümlichkeit, d.h. die geringere CO₂-Substratspezifität der cyanobakteriellen RubisCO begünstigt zusätzlich die Verwendung von O₂ als Substrat und somit die 2PG-Bildung.

1.2 Umgang der Cyanobakterien mit Variationen in der C_i -Verfügbarkeit

Die Verfügbarkeit von C_i stellt für oxygene Photosynthese betreibende Cyanobakterien einen wesentlichen Umweltfaktor dar. Im aquatischen System ist für Cyanobakterien C_i in Form von CO_2 , dessen Gehalt im Wasser sehr viel geringer als in der Luft ist, oder gelöst in Form von HCO_3^- zugänglich. Das Angebot an C_i fluktuiert in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert. Dementsprechend sind aquatische Cyanobakterien mit einer sich laufend verändernden C_i -Verfügbarkeit konfrontiert, die nicht selten unzureichend für eine optimale Carboxylase-Funktion der RubisCO ist. Im Verlaufe der Evolution haben sich parallel zur Entwicklung der Cyanobakterien unterschiedliche Anpassungsstrategien entwickelt, die es den Cyanobakterien ermöglichen, langfristig mit variablen C_i -Konzentrationen umgehen zu können. Ein Problem bei sich verändernden C_i -Bedingungen stellt, wie bereits unter Abschnitt 1.1 ausführlich dargelegt, das im Zuge der Oxygenase-Aktivität der RubisCO gebildete 2PG dar. Die cyanobakteriellen Strategien zum Umgang mit 2PG beruhen 1. auf der Vermeidung von dessen Entstehung und 2. auf der effektiven Beseitigung von bereits vorliegendem 2PG im Organismus.

1.2.1 Mechanismus der intrazellulären Akkumulation von CO_2

Der negative Effekt der geringen CO_2 - und hohen O_2 -Konzentrationen sowie die Akkumulation von 2PG auf den Calvin-Benson-Bassham Zyklus ausüben, ist ein möglicher Grund für Entwicklung des pflanzlichen CCM bei C_4 - und CAM-Pflanzen im Zuge der Evolution. biochemische CO_2 -Anreicherung durch räumliche bzw. zeitliche Trennung der CO_2 - und der CO_2 -Fixierung in diesen beiden Spezialisierungsformen dient der Oxygenase-Aktivität der RubisCO. In Cyanobakterien erfüllt der CCM ebenfalls diesen Zweck. Hier basiert der CCM auf einem System bestehend aus 1. in die Plasmamembran eingebetteten Aufnahmesystemen für CO_2 und HCO_3^- zur intrazellulären Anreicherung von C_i (KAPLAN und REINHOLD, 1999) sowie 2. der Ausbildung von Carboxysomen (2001; KERFELD *et al.*, 2005). Über die membranständigen Transportsysteme gelangen CO_2 und HCO_3^- über Membranverbindungen in das Cytoplasma der cyanobakteriellen Zelle (→ Abbildung 1. Schematischer Aufbau des cyanobakteriellen CCM. Darstellung der C_i -Aufnahmesysteme sowie der Carboxysomen nach PRICE (2011, modifiziert). Die Pfeile kennzeichnen den Fluss von CO_2/HCO_3^- in dem Cyanobakterium.

Abbildung 2. Photorespiratorischer 2PG-Metabolismus. Wege der Detoxifikation von 2PG nach EISENHUT *et al.* (2006, modifiziert) in *Synechocystis*. Abbildung 1). Dadurch wird der intrazelluläre C_i -Pool um das bis zu 1000-fache gegenüber dem Außenmedium angehoben (KAPLAN und REINHOLD, 1999). Das aufkonzentrierte, cytoplasmatische HCO_3^- diffundiert in ein prokaryotisches Kompartiment, das Carboxysom. Carboxysomen sind intrazelluläre Einschlusskörper, die von einer Proteinhülle umgeben sind und in denen sich die Carbonatanhydrase (CA) sowie die RubisCO befinden. Nach dem Eintritt von HCO_3^- in die Carboxysomen erfolgt über die Aktivität der CA zunächst dessen Dehydratisierung zu CO_2 . Das CO_2 kann durch die Proteinhülle die Carboxysomen nicht verlassen und wird von der RubisCO direkt zu 3PGA umgesetzt (YEATES *et al.*, 2006). Die durch den CCM hervorgerufene intrazelluläre Akkumulation von C_i und die räumliche Nähe zur RubisCO begünstigen die Carboxylase-Aktivität der RubisCO und kompensieren dessen hohen K_m -Wert für CO_2 (BADGER *et al.*, 2006; BADGER & PRICE, 2003; COT *et al.*, 2008; KAPLAN *et al.*, 2008; KAPLAN & REINHOLD, 1999).

Synechocystis verfügt über zwei konstitutiv exprimierte C_i -Aufnahmesysteme, NDH-14 (NADPH-abhängige Aufnahme von CO_2) und BicA (HCO_3^-/Na^+ -Symporter). Zusätzlich existieren drei weitere Transportsysteme, die verstärkt unter C_i -Mangelbedingungen exprimiert werden: NDH-13 (NADPH-abhängige Aufnahme von CO_2), SbtA (HCO_3^-/Na^+ -Symporter) und BCT1 (ATP-abhängige HCO_3^- -Aufnahme) (KAPLAN *et al.*, 2008). In *Synechococcus* fehlt dagegen BicA. Über die Ausbildung des CCM ist die cyanobakterielle Zelle in der Lage, die Bilanz der Carboxylase-Aktivität der RubisCO zu verbessern und die Oxygenase-Funktion der RubisCO weitgehend zu unterdrücken. Die Bildung des toxischen 2PG wird somit reduziert, aber nicht vollständig unterbunden (Huege *et al.*, 2011).

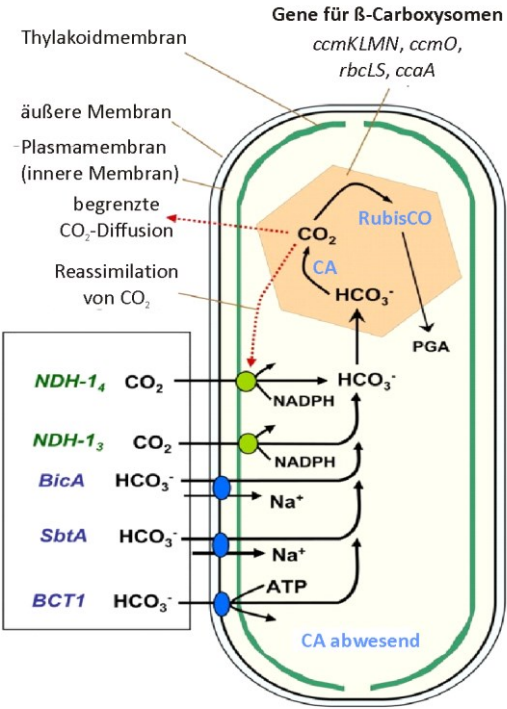


Abbildung 1. Schematischer Aufbau des cyanobakteriellen CCM. Darstellung der C_i -Aufnahmesysteme sowie der Carboxysomen nach PRICE (2011, modifiziert). Die Pfeile kennzeichnen den Fluss von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ in dem Cyanobakterium.

1.2.2 Mechanismus der photorespiratorischen Detoxifikation von 2-Phosphoglycolat

Der Abbau von bereits gebildetem 2PG erfolgt in Pflanzen über den Prozess der Photorespiration, an dem die drei Kompartimente Chloroplasten, Peroxisomen und Mitochondrien beteiligt sind (TOLBERT, 1997). In Cyanobakterien war die Existenz 2PG-abbauenden Stoffwechselwegs lange umstritten. Wie bereits im Vorfeld angenommen, dass der CCM die Oxygenase-Aktivität der Rubisco beinahe vollständig unterdrückt, so dass die Bildung von 2PG durch die Anwesenheit des CCM ausgeschaltet ist (Colman, 1989). Eingehende Untersuchungen von (2008) bestätigten jedoch das Vorliegen von 2PG-Abbauprozessen in *Synechocystis*. konnten Gene im Genom von *Synechocystis* identifiziert werden, die offensichtlich in 2PG-Abbau involvierte Enzyme kodieren. Das war ein erstes Indiz dafür, dass die cyanobakteriellen Zellen über die Fähigkeit zum Abbau von 2PG über einen der Photorespiration ähnlichen Weg verfügen könnten (→ Abbildung 2. Photorespiratorischer 2PG-Metabolismus. Wege der Detoxifikation von 2PG nach EISENHUT *et al.* (2006, modifiziert) in *Synechocystis*.

Abbildung 3. Zentraler Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus. Photorespiratorischer 2PG-Metabolismus, Glykolyse, OPP und offener TCA-Zyklus sowie der GS/GOGAT-Weg in *Synechocystis* nach EISENHUT *et al.* (2008, modifiziert). Abbildung 2). Darüber hinaus stehen *Synechocystis* zwei zusätzliche Wege für die Detoxifikation von 2PG zur Verfügung. Der Glycerat-Weg führt ebenfalls zur Bildung von 3PGA, während bei der vollständigen Dekarboxylierung Glyoxylat, ein Zwischenprodukt des 2PG-Abbaus, schrittweise über Oxalat und Format zu zwei Molekülen CO₂ umgewandelt wird. In der prokaryotischen Cyanobakterien-Zelle laufen alle diese Stoffwechselwege parallel im Cytoplasma bzw. an den Thylakoidmembranen ab und sind räumlich nicht durch Membransysteme voneinander getrennt. In wie fern die alternativen photorespiratorischen Prozesse den Abbau von 2PG gleichzeitig vermitteln oder ob unter bestimmten Wachstumsbedingungen der 2PG-Metabolismus vorrangig über einen dieser Wege von statten geht, ist noch nicht abschließend geklärt.

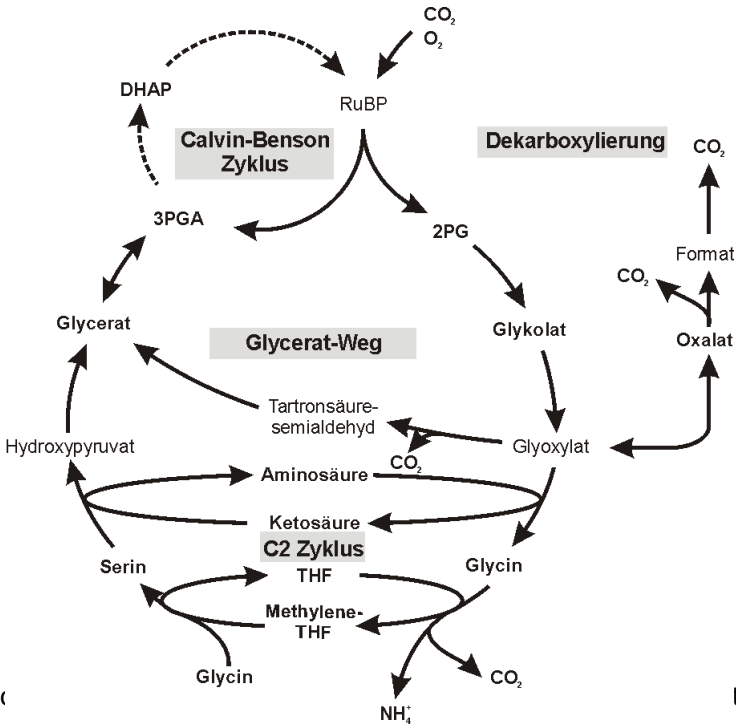


Abbildung 4. Photo
EISENHUT *et al.* (2006, modifiziert) in *Synechocystis*.

tion von 2PG nach

1.3 Zentraler Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus in Cyanobakterien

Der photorespiratorische 2PG-Abbau ist in Cyanobakterien in den zentralen Kohlenstoff- und Stickstoff- Metabolismus eingebettet und weist somit direkte und indirekte den primären Stoffwechselwegen auf (→ Abbildung 3. Zentraler Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus. Photorespiratorischer 2PG-Metabolismus, Glykolyse, OPP und offener TCA-Zyklus sowie der GS/GOGAT-Weg in *Synechocystis* nach EISENHUT *et al.* (2008, modifiziert).

Abbildung 4. Löslichkeit von CO₂ in Abhängigkeit vom pH-Wert (Abbildung 3). Das über den C₂-Zyklus sowie den Glycerat-Weg aus der Photorespiration hervorgehende 3PGA kann über den Calvin-Benson-Bassham Zyklus wieder zum Aufbau von RuBP oder anderen Kohlenstoffverbindungen herangezogen werden. Diese bilden die Basis für die Biosynthese von verschiedenen zellulären Bestandteilen sowie der Speichermoleküle Saccharose und Glykogen. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass 3PGA über die katalytische Aktivität der Phosphoglyceratmutase in 2-Phosphoglycerat (2PGA) umgewandelt wird. Das 2PGA seinerseits ist Substrat für die Phosphoglycerat-Hydratase, die die Umsetzung von 2PGA in PEP vermittelt. Dementsprechend kann 3PGA photorespiratorischen Ursprungs sowohl in den Calvin-Benson-Bassham Zyklus als auch in die Glykolyse und in den oxidativen Pentosephosphat (OPP)-Weg eingeschleust werden.

Die Citrat-Synthase generiert aus den Intermediaten Oxaloacetat (OAA) und Acetyl-CoA Citrat und stellt dementsprechend eine Verknüpfungsstelle zum Tricarbonsäure-(TCA)-Zyklus dar. Das Fehlen eines 2-Oxoglutarat-(2OG)-Dehydrogenase Komplexes, der die Umwandlung von Succinat zu 2OG katalysiert, bedingt den weitgehend offenen Charakter des cyanobakteriellen TCA-Zyklus (Pearce *et al.*, 1967; PEARCE *et al.*, 1969; SMITH *et al.*, 1967). Dem TCA-Zyklus wird bei Dunkelheit sowie unter C_i-Mangel eine besondere Bedeutung bei der Bereitstellung von Kohlenstoffverbindungen zugeschrieben (COOLEY *et al.*, 2000; MENDZHUL *et al.*, 2000). Unter diesen Wachstumsbedingungen kommt es zu einem vermehrten Abbau von Glykogen über die Glykolyse und den OPP-Weg. Ferner ist 2OG ein Akzeptor für die N-Assimilation über den Glutamin-Synthetase/Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase-(GS/GOGAT)-Weg. Vor diesem Hintergrund stellt 2OG in der cyanobakteriellen Zelle einen wichtigen Signalgeber für

die Wahrnehmung und die Einstellung des C/N-Haushaltes dar (FLORES und HERRERO, 2005; FORCHHAMMER, 2008). Die Interaktion zwischen dem TCA-Zyklus und dem GS/GOGAT - Weg über 2OG ist die wichtigste Verknüpfungsstelle zwischen dem primären C- und N-Metabolismus. Jüngste Studien weisen darauf hin, dass der cyanobakterielle TCA-Zyklus ebenfalls geschlossen werden kann (COOLEY *et al.*, 2000; ZHANG und BRYANT, 2011). Das Vorliegen der putativen Enzyme 2OG-Dehydrogenase (2OGDC) und Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase (SSADH) führt durch Umsetzung von 2OG über Succinatsemialdehyd (SSA) zu Succinat ebenfalls – alternativ zum 2OG-Dehydrogenase Komplex – zum Ringschluß. STEINHAUSER *et al.*(2012) beschreiben in diesem Zusammenhang die Möglichkeit, dass ein Wechsel zwischen offenem und geschlossenem TCA-Zyklus in Cyanobakterien einen Anpassungsmechanismus an sich verändernde C/N-Verhältnisse darstellen könnte. Darüber hinaus besteht über die Reassimilation von NH_4^+ , das über die Aktivität des Glycin-Dehydrogenase-Komplexes im photorespiratorischen Metabolismus bei der Umsetzung von Glycin zu Serin freigesetzt wird, eine Interaktion zwischen dem 2PG-Abbau und dem GS/GOGAT-Weg. Über die katalytische Aktivität der Glutamin-Synthetase wird unter ATP-Verbrauch aus Glutamat und NH_4^+ Glutamin generiert.

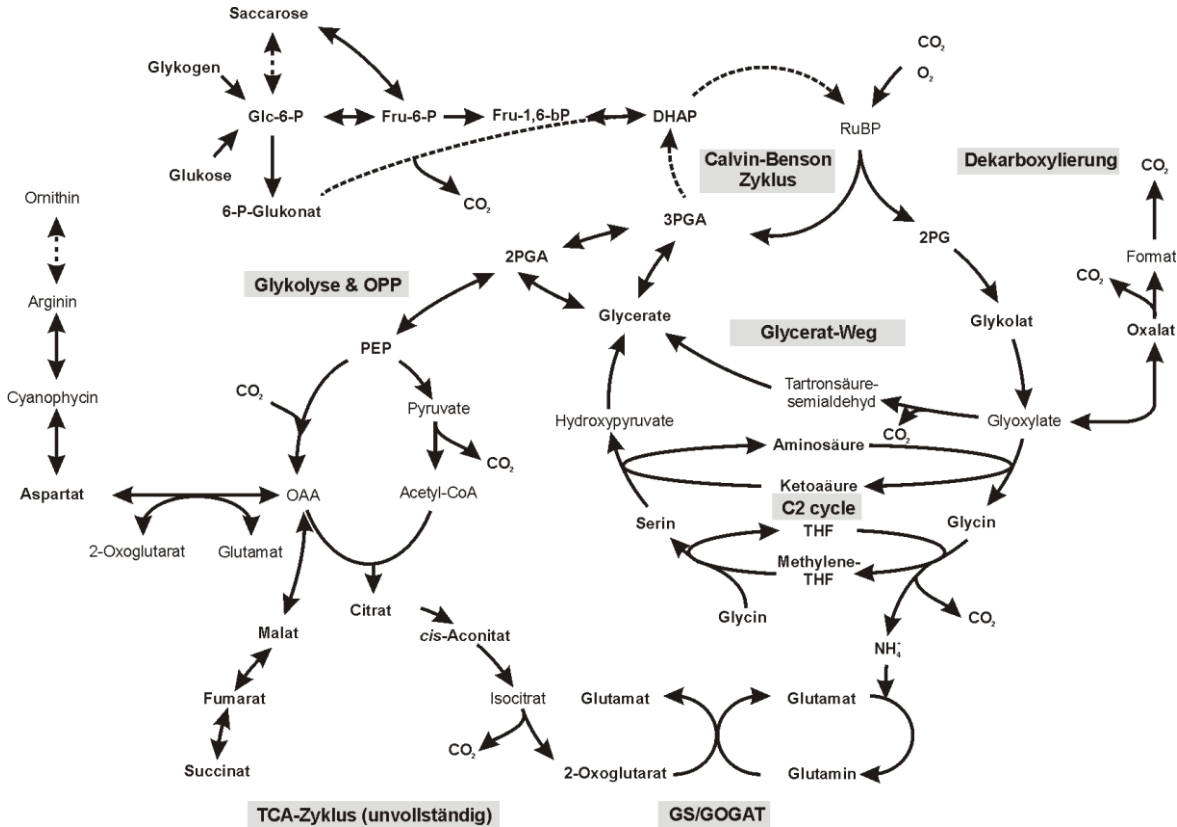


Abbildung 7. Zentraler Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus. Photorespiratorischer 2PG-Metabolismus, Glykolyse, OPP und offener TCA-Zyklus sowie der GS/GOGAT-Weg in *Synechocystis* nach EISENHUT *et al.* (2008, modifiziert).

1.4 Anpassungsmechanismen an C_i-Mangelbedingungen

Der CCM sowie der photorespiratorische 2PG-Metabolismus bilden die Grundlage, die es den Cyanobakterien ermöglicht besser mit dem niedrigen CO₂/O₂-Verhältnis in der Atmosphäre und der Oxygenase-Aktivität der RubisCO umgehen zu können. Daneben sind Cyanobakterien auch kurzfristigen Verschiebungen im C_i-Angebot ausgesetzt. Um auf die Fluktuationen in der C_i-Verfügbarkeit entsprechend schnell und angemessen reagieren zu können, haben sich in Cyanobakterien im Laufe der Evolution Mechanismen zur Anpassung an variable C_i-Bedingungen entwickelt. Neben morphologischen Veränderungen spiegelt sich die Adaptation an C_i-Mangel unter anderem auf Transkriptom- und Metabolom-Ebene wieder.

1.4.1 Modifikationen in der Morphologie

Die Carboxysomen stellen eine der zwei Säulen dar, auf deren Grundlage sich der cyanobakterielle CCM aufbaut. EISENHUT *et al.* (2007) konnten 24 h nach dem Transfer von unter 5 % [v/v] CO₂ (HC) kultivierten *Synechocystis*-Zellen auf 0,038 % CO₂ (LC) eine signifikant erhöhte Anzahl von Carboxysomen beobachten. Beruhend auf elektronmikroskopischen Untersuchungen zeigte *Synechocystis* unter HC im Durchschnitt jeweils ein Carboxysom pro Zelle, während sich unter LC die Anzahl der Carboxysomen pro Zelle auf zwei bis drei erhöhte. Ferner deuten die Betrachtungen von EISENHUT *et al.* (2007) auf eine starke Veränderung im intrazellulären Glykogen-Gehalt hin. Unter HC kultivierte Zellen wiesen sich im elektronenmikroskopischen Bild durch die vermehrte Einlagerung von Glykogen-Granula in dem Zwischenraum der Thylakoide aus, die bei Umstellung auf LC nicht mehr sichtbar waren. Nach dem Eintreten einer limitierten C_i-Verfügbarkeit wird das Glykogen vermutlich während der ersten Adaptationsphase abgebaut.

1.4.2 Modifikationen auf Transkriptom-Ebene

Eingehende Untersuchungen zur Aufklärung der Anpassung an C_i-Mangel auf Transkriptom-Ebene in *Synechocystis* und *Synechococcus* liegen bereits vor (EISENHUT *et al.*, 2008; SCHWARZ *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2004; WOODGER *et al.*, 2003).

Transkriptionelle Veränderungen bei Verschiebung der C_i-Verfügbarkeit von hoch auf niedrig betreffen vorrangig CCM-assoziierte Gene, die Komponenten der CO₂/HCO₃⁻

Aufnahmesysteme kodieren. Gut definierte, unter C_i -Mangel induzierbare Genombereiche stellen die als Cluster organisierten Gene zur Expression der membranständigen Transportsysteme NDH-1₃ (*ndhF3/ndhD3/cupA*-Operon; *sll1732 – sll1736*), BCT1 (*cmp*-Operon; *slr0040– slr0040*) und SbtA (*sbtA/sbtB*-Operon; *slr1512–slr1513*) dar.

1.4.3 Modifikationen auf Metabolom-Ebene

Die verstärkte Bildung von 2PG unter C_i -Mangelbedingungen und deren Auswirkungen auf den Metabolitstatus des zentralen Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus lassen sich über eingehende Metabolom-Analysen nachvollziehen (SCHWARZ *et al.*, 2013). Entsprechende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe liegen bereits für die Cyanobakterien *Synechocystis* und *Synechococcus* vor (EISENHUT *et al.*, 2008; HACKENBERG *et al.*, 2012; SCHWARZ *et al.*, 2011). Bereits 1983 stellten MARCUS *et al.* unter C_i -Mangel die Akkumulation von 2PG fest und beschrieben in diesem Zusammenhang 2PG als möglichen LC-Sensor.

1.5 Mechanismen zur Wahrnehmung der CO₂-Verfügbarkeit

Die limitierte Verfügbarkeit von C_i führt zu einer Verschiebung des intrazellulären Stoffflusses und der transkriptionellen Aktivität vieler Gene. Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, wie der Signaltransduktionsweg in Cyanobakterien und somit die kurzzeitige Adaptation an eine C_i -Mangelbedingung verläuft. Die direkte Messung bzw. Bestimmung der in der unmittelbaren extrazellulären Umgebung befindlichen C_i -Menge wurde als Mechanismus zur CO₂-Wahrnehmung von vielen Autoren als unwahrscheinlich angenommen (MCGINN *et al.*, 2003; MCGINN *et al.*, 2004; WOODGER *et al.*, 2003).

Aufgrund der eingeschränkten Aufnahme von CO₂ und HCO₃⁻ sinkt unter C_i -Limitierung nicht nur der extrazelluläre sondern auch der intrazelluläre C_i -Pool. Dessen Abfall wird von einer australischen Gruppe als eine Möglichkeit zur Feststellung des Vorliegens von Niedrig-CO₂-Bedingungen für cyanobakterielle Zellen diskutiert. WOODGER *et al.* (2003) betrachteten die Auswirkungen von Ethoxyzolid – einem Inhibitor für die Aufnahme von C_i – und Glycolaldehyd – einem Inhibitor für die CO₂-Fixierung – auf die Induktion C_i -abhängiger Gene wie *cmpA* und *sbtA* in *Synechococcus*. Die Behandlung mit Ethoxyzolid, die zur Reduktion des intrazellulären C_i -Pool führte, ging mit einer verstärkten Transkription der CCM-assoziierten Genen einher. Die durch den Einsatz von Glycolaldehyd hervorgerufene

Akkumulation von intrazellulärem C_i dagegen spiegelte sich in einer verminderten Transkription der CCM-assoziierten Gene wider. Dennoch scheint die Wahrnehmung einer C_i -Mangelbedingung nicht nur von dem in der Zelle vorliegenden C_i -Verhältnissen abhängig zu sein (WOODGER *et al.*, 2005).

Die Begünstigung der Oxygenase-Aktivität der Rubisco unter Niedrig- CO_2 spiegelt sich in einer vermehrten Bildung von 2PG wieder, welches zum Schutz des Gesamtmetabolismus verstärkt abgebaut werden muss. Damit würden die Intermediate des 2PG-Metabolismus einen idealen Indikator für das Vorliegen eines C_i -Mangels abgeben (MARCUS *et al.*, 1982). Erste Indizien sprechen dafür, dass die Akkumulation von photorespiratorischen Intermediaten wie Glykolat, 2PG oder Serin tatsächlich in die Signaltransduktion involviert sein könnten. NISHIMURA *et al.* (2008) untersuchten in *Synechococcus* den Effekt einer steigenden Konzentration von 2PG auf die Funktion des Transkriptionsfaktors CmpR, welcher bereits als positiver Regulator für die unter C_i -Mangel induzierte Transkription des *cmp*-Operons bekannt ist (OMATA *et al.*, 2001). *In vitro* Analysen zeigten bei steigender Konzentration an 2PG ($> 10 \mu M$) dessen Wirkung als Coaktivator. 2PG führte zu einer verstärkten Bindung von CmpR an die in die Aktivierung des *cmp*-Operons involvierten *cis*-Elemente der DNA. Dagegen hatte die Zugabe von Glykolat bis zu $100 \mu M$ die Funktion von CmpR nicht beeinflusst. Ferner beschrieben NISHIMURA *et al.* ebenso einen positiven Effekt von RuBP auf die Bindung von CmpR an den Promotor des *cmp*-Operons.

NdhR (CcmR) stellt einen weiteren cyanobakteriellen Transkriptionsfaktor dar, der als Repressor auf viele C_i -regulierte Gene wirkt (Figge *et al.*, 2001). In der *ndhR*-Mutante von *Synechocystis* werden viele bei C_i -Mangel induzierte Gene bereits unter HC verstärkt expremiert, was zur Definition eines NdhR-Regulons führte (Wang *et al.*, 2004). Kürzlich konnte auch für NdhR gezeigt werden, dass die Bindung dieses Repressors an die Promotoren durch metabolische Signale bzw. Corepressoren, hier 2OG und NADPH beeinflusst wird. Ein aus diesen Ergebnissen entwickeltes Modell zeigt, wie eine C_i -induzierte Beeinflussung des Metaboloms auf das Transkriptom wirken könnte (DALEY *et al.*, 2012). Darüber hinaus wiesen TIMM *et al.* (2013) einen regulatorischen Effekt für Serin auf die Expression von Genen für photorespiratorische Enzyme in *Arabidopsis thaliana* nach.

2 ZIELSTELLUNG

Für die oxygene Photosynthese, wie sie Cyanobakterien und Pflanzen betreiben, stellt anorganischer Kohlenstoff (C_i) ein essentielles Ausgangssubstrat dar. Kurzfristigen Schwankungen im C_i -Angebot begegnen Cyanobakterien mit Verschiebungen im Transkriptom- und Metabolom-Muster. Auf Basis dieses Ausgangswissens wurden in der hier vorliegenden Arbeit folgende Schwerpunkt bearbeitet :

- I. Eine vergleichende Metabolom-Analyse an den zwei cyanobakteriellen Modellstämmen *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Synechococcus elongatus* PCC 7942 soll als Fundament für die Definition einer Metabolom-Signatur für Cyanobakterien unter limitierter C_i -Verfügbarkeit dienen. Die Identifizierung von sicheren Kandidaten unter den Intermediaten des zentralen Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus soll ferner dazu herangezogen werden, durch C_i -Mangel induzierte Umstellungen im Grundstoffwechsel aufzuklären.
- II. Die Gegenüberstellung von C_i -abhängigen Veränderungen im Metabolom und Transkriptom in *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Synechococcus elongatus* PCC 7942 soll Rückschlüsse auf Adaptationsmechanismen ermöglichen, die beide Ebenen mit einschließen.
- III. Die Untersuchung der Mutante $\Delta ndhR$ aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 soll weitere Erkenntnisse zur Funktion des Transkriptionsregulons NdhR erbringen. Die Analyse metabolischer Veränderungen in $\Delta ndhR$ unter limitierten C_i -Bedingungen im Vergleich zum WT soll das Modell der C_i -abhängigen Funktion von NdhR ergänzen.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Organismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit folgenden Cyanobakterien-Stämme gearbeitet: 1. *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (Wildtyp) vom Institute Pasteur, Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (im Weiteren bezeichnet als *Synechococcus*) und 2. *Synechocystis* sp. PCC 6803 (japanischer Wildtyp) von N. Murata, National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan (im Weiteren als *Synechocystis* bezeichnet). Die in die Untersuchung mit einbezogene Mutante von *Synechocystis* 6803 (erhalten von T. Ogawa, Nagoya Biocenter, Japan) mit der Bezeichnung $\Delta ndhR$ weist durch die Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette (Km^R) in den kodierenden Bereich einen Defekt im Gen *slr1594* für den CO₂-Regulator NdhR auf. Eine eingehende Charakterisierung der Mutante liegt durch WANG *et al.* (2004) vor.

3.1.2 Oligonucleotid-Primer

Oligonucleotid-Primer wurden zur Verifizierung des Genotyps der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhR$ mittels PCR (\rightarrow 3.3.2) sowie zur Überprüfung der RNA-Isolate auf DNA-Kontaminationen (\rightarrow 3.5.3) eingesetzt. Die verwendeten Oligonucleotid-Primer wurden von der Firma EUROFINS MWGOPERON (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die Primersequenzen der Oligonucleotid-Primer sind in Tabelle 1 zusammenfassend aufgeführt.

Tabelle 1.Oligonucleotid-Primer

Primer	Sequenz (5'→3')	T _m [*] [°C]	PCR-Programm ^{**}
<i>ndhR_fw</i>	CCC ATC TAA ATC ACC ATC T	54	1
<i>ndhR_rev</i>	TGG CCC TAG CGA GTT TAT TG	58	
<i>rnpB_5'</i>	GAGTTGCGGATTCCTGTCAC	62	2
<i>rnpB_3'</i>	GTTCTGTTCCAGGATGCGAG	62	

* theoretische Schmelztemperatur (T_m) näherungsweise $T_m = 4 \times \text{Anzahl G/C} + 2 \times \text{Anzahl A/T}$

** PCR-Programm in Tabelle 3

3.1.3 Nährmedium

Die Anzucht und Kultivierung von *Synechocystis* und *Synechococcus* erfolgte in dem durch RIPPKA *et al.* (1979) beschriebenen Nährmedium mit der Bezeichnung BG11. Die Zusammensetzung der Stammlösungen für die Herstellung vom BG11-Medium sowie die Endkonzentration der Einzelkomponenten sind in Tabelle 2 aufgeführt. Ein Volumen von 1 Liter BG11-Medium enthält 2 ml Stammlösung 1, 50 ml Stammlösung 2, 2 ml Stammlösung 3 sowie 1 ml A6 Spurenelemente und 20 ml TES-Puffer. Die Zugabe des TES-Puffers bestimmt den pH-Wert des BG11-Mediums. Für die Kultivierung unter 5 % [v/v] CO₂ (Hoch-CO₂, *High-CO₂*, HC) wurde BG11 pH 8.0, für die Kultivierung unter 0,038 % CO₂ (ambient, Niedrig-CO₂, *Low-CO₂*, LC) wurde BG11 pH 7.0 verwendet. Der pH-Wert-Effekt auf die Löslichkeit von CO₂ ist in Abbildung 4. Löslichkeit von CO₂ in Abhängigkeit vom pH-Wert

Abbildung 5. Einstellung der optischen Dichte bei 750 nm (OD₇₅₀).Abbildung 4 aufgezeigt.

Für die Kultivierung auf Festmedium wurde zweifach konzentriertes BG11-Medium verwendet, welches neben den bereits aufgeführten Komponenten zusätzlich Natriumthiosulfat (Na₂S₂O₃ × 5 H₂O) in einer Endkonzentration von 24 mM aufwies. Das Festmedium für die Platten bestand zu gleichen Teilen aus 2-fach konzentriertem BG11 und dem Geliermittel Kobe (Roth, Karlsruhe Deutschland). Die Nährmedien wurden vor ihrer Verwendung durch autoklavieren sterilisiert.

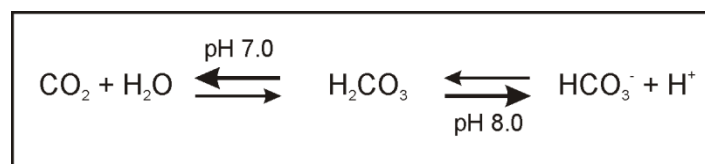


Abbildung 10. Löslichkeit von CO₂ in Abhängigkeit vom pH-Wert

Tabelle 2. Zusammensetzung des BG11-Mediums

Chemikalien	Formel	Molekulargewicht [g/mol]	Endkonzentration [mM]
Stammlösung 1			
Citronensäure Monohydrat	$C_6H_8O_7 \times H_2O$	210,1	0,029
Ammoniumeisencitrat	Fe-NH ₄ -citrat	–	0,03
EDTA Dinatriumsalz	$C_{10}H_{14}O_8N_2Na_2 \times H_2O$	372,2	0,003
Stammlösung 2			
Natriumnitrat	NaNO ₃	84,99	17,65
Natriumdihydrogenphosphat	K ₂ HPO ₄	174,1	0,22
Magnesiumsulfat	$MgSO_4 \times 7 H_2O$	246,5	0,3
Stammlösung 3			
Caliumchlorid	$CaCl_2 \times H_2O$	147,0	0,26
A6 Spurenelemente			
Borsäure	H ₃ BO ₃	61,83	46 µM
Mangan(II)-chlorid	$MnCl_2 \times 4 H_2O$	197,9	9,4 µM
Zinksulfat	$ZnSO_4 \times 7 H_2O$	287,5	0,77 µM
Natriummolybdat	$Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$	241,9	0,086 µM
Cobalt(II)-nitrat	$Co(NO_3)_2 \times H_2O$	291,0	0,17 µM
1 M TES-Puffer pH 7.0/8.0 (KOH)	$C_6H_{15}NO_8S$	229,2	20

3.1.4 Mediumzusätze

Die Zugabe des Antibiotikums Kanamycin (Km) erfolgte entsprechend der inserierten Km^R spezifisch bei Kultivierung der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhR$. Die Km-Stammlösung wies eine Konzentration von 50 mg/ml (in H₂O) auf und wurde zum Erreichen der Arbeitskonzentration von 50 µl/ml in einem Verhältnis von 1:1000 eingesetzt. Die Stammlösung wurde vor ihrer Verwendung sterilfiltriert. Die Lagerung der Stammlösung erfolgte langfristig bei -20 °C und bei ständiger Verwendung bei 4 °C. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte stets nach dem Autoklavieren der Medien.

3.2 Kultivierung

3.2.1 Axenitätstest

Zur Kontrolle des axenischen Charakters einer Kultur wurden 20 µl Kulturflüssigkeit auf eine Agarplatte mit LB (Luria Bertani)-Medium (Roth; Karlsruhe, Deutschland) getropft. Nach Eintrocknen des Kulturtropfens wurde die Platte für 72 h bei 30 °C inkubiert. Ausbleibendes Wachstum heterotropher Bakterien wurde als Indikator für die Axenität der betrachteten Kultur angesehen. Die Notwendigkeit für die Überprüfung der Axenität ergibt sich im Zusammenhang mit Metabolom-Analysen aus dem Umstand, dass alle in der Probe enthaltenen Metabolite extrahiert werden und in die Betrachtung miteinfließen. Die Anwesenheit von Fremdorganismen führt zu Verschiebungen und Überlagerungen der tatsächlichen Metabolit-Gehalte, die auf die untersuchten Cyanobakterien-Kulturen zurückgehen. Sichere Aussagen über Metabolom-Veränderungen in den Cyanobakterien sind somit nicht möglich. Daher kommt dem Axenitätstest in diesem Fall eine besondere Gewichtung zu.

3.2.2 Flüssigkultur

Die Kultivierung von *Synechocystis* und *Synechococcus* erfolgte in 300 mM Erlenmeyerkolben in 100 mM BG11 pH 8.0 unter ambienten Bedingungen bei 30 °C und einer Lichtintensität von 20-40 µmol Photonen s⁻¹ m⁻² sowie 120 rpm. Zum Wechsel des Mediums wurden die Kulturen zunächst für 2 min bei 5.300 U/min und RT zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet in frischen BG11 durch gründliches Mischen suspendiert.

3.2.3 Batchkultur

Für die Durchführung der HC/LC-Shift-Experimente wurden die Cyanobakterien-Kulturen in Batchgefäßen kultiviert. Die Begasung erfolgte über Glasröhrchen. Um Kontaminationen der *Synechocystis*-Kulturen zu vermeiden wurde das Gasmisch zunächst vor Einleiten in die Batchkultur über zwei vorgeschaltete Filter geleitet. Die Batchgefäße befanden sich für die Zeitdauer der Kultivierung in einem temperierten Wasserbad mit 29 °C. Die Lichtintensität betrug 100 µmol Photonen s⁻¹ m⁻². Für die Begasung mit 5 % [v/v] CO₂ wurde Raumluft mit CO₂ angereichert. Für die Kultivierung unter 0,038 % CO₂ erfolgte die Begasung mit Raumluft. Die Einstellung der Begasungsintensität erfolgte manuell. Dabei wurde versucht die Frequenz

der Belüftung innerhalb eines Experimentes unter den mitgeführten Kulturen möglichst gleichmäßig zu halten.

3.2.4 Kultivierung auf Festmedium

Die Kultivierung auf BG11-Kobe-Platten erfolgte zum Zwecke der kurzzeitigen Erhaltung der Cyanobakterien. Die Kultivierung erfolgte unter ambienten Bedingungen bei 30 °C und einer Lichtintensität von 20-40 $\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

3.2.5 Umgang mit Cryo-Erhaltungen

Das Anlegen von Cryo-Erhaltungen diente der langfristigen Einlagerung von cyanobakteriellen Kulturen. Als Ausgangsmaterial wurde 2 ml einer axenischen Flüssig- oder Batchkultur, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befand und im Vorfeld keinem Extremstress ausgesetzt war, verwendet und in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 5.000 rpm und RT wurde das Zellpellet in 200 μl frischem BG11 pH 8.0 suspendiert. Nach der Zugabe von 25 μl DMSO und Mischen wurde der Ansatz dunkel gehalten und anschließend bei -80 °C eingefroren. Zur Reaktivierung von Cryo-Erhaltungen wurden diese auf BG11-Kobe-Platten pH 8.0 ausgestrichen und unter Abdeckung mit Pergamentpapier bis zum Anwachsen im HC-Schrank bei 5 % [v/v] CO₂ kultiviert.

3.2.6 Bestimmung und Einstellung der optischen Dichte

Zur Bestimmung der optischen Dichte (OD_{750}) wurde eine Einmalküvette mit einem Fassungsvermögen von 1 ml (Schichtdicke: 1 cm) mit einer Verdünnung der zu vermessenden Cyanobakterien-Kultur befüllt und anschließend die Extinktion am UV-sensitiven Spektrophotometer (Genesys™ 10S-VIS; Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) bei 750 nm bestimmt (Blindwert: H₂O). Die Wahl der eingesetzten Verdünnung unterlag dem Kriterium, das um Messungenauigkeiten zu vermeiden die Messwerte im Wertebereich von 0.1 bis 1.0 liegen sollten. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (VF) wurde das Kulturvolumen berechnet, das zum Erreichen der gewünschten optischen Dichte benötigt wird (→ Abbildung 5. Einstellung der optischen Dichte bei 750 nm (OD_{750})).

Abbildung 6. Berechnungsgrundlage zur Bestimmung der Wachstumsrate μ einer Kultur. (Abbildung 5).

$$V_K = \frac{OD_{750} \times V_E}{\mu_{750}} \times VF$$

V_K – benötigtes Volumen der Ausgangskultur in ml
 V_E – Endvolumen der Kultur in ml
 OD_{750} – optische Dichte bei 750 nm (Soll-Wert)
 μ_{750} – Extinktion bei 750 nm (Messwert, Istwert)
 VF – Verdünnungsfaktor

Abbildung 13. Einstellung der optischen Dichte bei 750 nm (OD_{750}).

Abbildung 14. Berechnungsgrundlage zur Bestimmung der Wachstumsrate μ einer Kultur. **Abbildung 15.** Einstellung der optischen Dichte bei 750 nm (OD_{750}).

3.2.7 Bestimmung der Wachstumsrate

Zur Ermittlung der Wachstumsrate einer Kultur wurde diese zunächst auf eine $OD_{750} \approx 0.8 - 1.0$ eingestellt. Anschließend wurde die Kultur für 24 h unter den gewünschten Wachstumsbedingungen kultiviert. Nach Ablauf einer 24-stündigen Wachstumsphase die optische Dichte bestimmt. Die Formel zur Berechnung der Wachstumsrate μ ist in Abbildung 6. Berechnungsgrundlage zur Bestimmung der Wachstumsrate μ einer Kultur.

Abbildung 7. Relative Veränderungen in den Poolgrößen von Intermediaten der

$$\mu = \frac{\ln(x_E) - \ln(x_0)}{(t_E - t_0)}$$

μ – Wachstumsrate in h^{-1}
 $\ln(x_0)$ – natürlicher Logarithmus der Extinktion bei 750 nm und $t=0$
 $\ln(x_E)$ – natürlicher Logarithmus der Extinktion bei 750 nm und $t=E$
 t_0 – Zeitpunkt $t=0$
 t_E – Zeitpunkt $t=E$

Photorespiration in *Synechocystis* und *Synechococcus*. Die Darstellung zeigt Werte für die relativen Metabolitgehalte 24 h nach der Umstellung von 5 % [v/v] CO_2 (HC, BG11 pH 8.0) auf 0,038 % [v/v] CO_2 (24 h LC, BG11 pH 7,0) für *Synechocystis* (EISENHUT *et al.*, 2008) und

Synechococcus (SCHWARZ *et al.*, 2011). Der Wert für HC ist auf 1,0 gesetzt. 2PG, deren Anstieg in der Poolgröße unter LC reproduzierbar in mehreren gegenübergestellten, unabhängigen Metabolom-Analysen beobachtet wurde (→ Anhang, Tabelle 18), ist fett gedruckt hervorgehoben. n.d.: nicht detektiert. Abbildung 6 dargestellt. Die Bestimmung der Wachstumsrate eines cyanobakteriellen Stammes zu definierten Wachstumsbedingungen erfolgte unter Einbeziehen mehrerer biologisch unabhängiger Kulturen auf deren Grundlage Mittelwert und Standardabweichung berechnet wurden.

Abbildung 16. Berechnungsgrundlage zur Bestimmung der Wachstumsrate μ einer Kultur.

3.2.8 Bestimmung der Pigmentverhältnisse

Zur Ermittlung der Pigmentierung einer Kultur wurde der Umstand genutzt, dass die cyanobakteriellen Pigmente unterschiedliche Extinktionsmaxima aufweisen: Chlorophyll a (Chla) bei 680 nm, Phycocyanin (PC) bei 625 nm und Carotinoide (Car) bei 490 nm. Unter Berücksichtigung der optischen Dichte bei 750 nm bildet die Methode nach SIGALAT/DEKOUCHKOWSKI (1975) die Berechnungsgrundlage zur Bestimmung der Pigmentkonzentrationen und daraus ableitend zur Bestimmung der Pigmentverhältnisse PC/Chla und Car/Chla.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolation chromosomaler DNA

Die Isolation chromosomaler DNA erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion. Zu diesem Zweck wurden 200 µl Kultur 200 µl Tris-gepuffertes Phenol pH 7,5 (Roth; Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt und für 10 min bei 65 °C inkubiert und alle 2-3 min gemischt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur (RT) wurde dem Ansatz 200 µl Chloroform zugegeben, das Eppendorfgefäß zur guten Durchmischung geschwenkt und anschließend für 4 min bei 13.000 U/min und RT zentrifugiert. Der obere, wässrige, die chromosomale DNA enthaltende Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt, für einen zweiten Waschschriff wurde 200 µl Chloroform hinzugefügt und erneut für 4 min bei 13.000 U/min und RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde erneut in ein frisches Eppendorfgefäß gegeben und konnte anschließend als Isolate der chromosomalen DNA direkt als Template für Polymerase-Kettenreaktionen (→ 3.3.2) eingesetzt werden.

3.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Verifizierung der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhR$ (→ 3.1) wurde im Anschluss an eine erfolgreiche Extraktion chromosomaler DNA (→ 3.3.1) unter Verwendung der genspezifischen Primer (→ 3.1.2) die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt und die PCR-Produkte über eine Agarosegelelektrophorese (→ 3.3.3) größenspezifisch aufgetrennt. Ein 10 µl-PCR-Ansatz enthielt standardmäßig: 1 µl Template, 1 µl Primer forward, 1 µl Primer reverse, 5 µl *Taq* PCR Master Mix Kit sowie 2 µl H₂O. Das *Taq* PCR Master Mix Kit wurde von der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland) bezogen und beinhaltet zur Amplifikation von DNA die thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* mit der

5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität sowie der 5'-3'-Exonucleaseaktivität, den 2 x QIAGEN PCR Puffer, 3 mM MgCl₂ und je 400 µM der Desoxynucleotidtriphosphate (dNTP) der organischen Basen Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) und Cytosin (C). Die PCR-Fragment vom Wild-Typ und der Mutante unterscheiden sich durch die im Zuge der Generierung der Mutante erfolgte Deletion kodierender Genbereiche sowie durch die Insertion von spezifischen Antibiotika-Resistenzkassetten zur Selektion in ihrer Größe. Das Ausbleiben eines Wild-Typ-Fragments im Agarosegelbild (→ 3.3.3) im PCR-Ansatz, der die chromosomale DNA einer Mutante enthielt, galt als Bestätigung für das Vorliegen einer vollständig segregierten Kultur, d.h. die gewünschte Mutation in einem Gen erstreckte sich über das gesamte Genom und schließt somit alle vorhandenen Plasmide mit ein. Das WT-Allel ist in diesem Fall in der untersuchten Mutante nicht mehr enthalten. Um Kontaminationen des verwendeten Wasser in der PCR auszuschließen und Fehldeutungen vorzubeugen wurde als Kontrolle ein Ansatz ohne Template mitgeführt. In diesem Fall sollte kein PCR-Produkt im Gelbild erscheinen, d.h. Kontaminationen mit unerwünschter Fremd-DNA liegen nicht vor.

Die PCR bildete weiterhin die Grundlage für die Überprüfung der RNA-Extrakte auf das Vorliegen von Verunreinigungen mit DNA (→ 3.5.3). Die entsprechend verwendeten PCR-Programme sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3. PCR-Programme

Schritt	Dauer	Temperatur	Wiederholung
PCR-Programm 1 (6 kb)			
Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	
Denaturierung	20 sec	94 °C	}
Annealing	30 sec	52 °C	
Elongation	4 min	72 °C	
			9 ×
Denaturierung	20 sec	94 °C	}
Annealing	30 sec	52 °C	
Elongation*	4 min	72 °C	
			19 ×
Finale Elongation	7 min	72 °C	
	PAUSE	4 °C	
PCR-Programm 2 (1 kb)			
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C	
Denaturierung	20 sec	95 °C	}
Annealing	30 sec	52 °C	
Elongation**	30 sec	72 °C	
			27 ×
Denaturierung	5 min	72 °C	
	PAUSE	4 °C	

* pro Zyklus Verlängerung um 20 sec

** pro Zyklus Verlängerung um 3 sec

3.3.3 Agarosegelelektrophorese

Zur größenspezifischen Auftrennung der PCR-Produkten (→ 3.3.2) wurden diese elektrophoretisch im Agarosegel voneinander separiert. Dazu wurde Agarose in 1 × TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst, anschließend auf Eis bis ca. 60 °C abgekühlt und mit 0,1 µg ml⁻¹ Ethidiumbromid versetzt. Die Endkonzentration des Agarosegels betrug in Abhängigkeit der Größe des zu analysierenden DNA-Fragmentes 0,8 – 1,0 %. Die Agaroselösung wurde im flüssigen Zustand in eine horizontale Gel-Apparatur gegossen. Nach Aushärtung des Agarosegels wurde dieses in die Elektrophoresekammer überführt. Als Laufmittel wurde 1 × TBE-Puffer verwendet. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 0,2 Volumenteile STOP-Lösung (10 mM Na₂PO₄, pH 7,0, 50 % [v/v] Glycerin, 0,4 % [w/v]

Orange G) versetzt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde der Größenstandard λ DNA *EcoRI/ HindIII* der Firma FERMENTAS (Schwerte, Deutschland) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 30 – 60 min bei einer Spannung von 70 – 120 V. Die Visualisierung und fotografische Dokumentation der separierten DNA-Fragmente erfolgte mittels UV-Transilluminator mit angeschlossenen

3.4 HC/LC-Shift-Experiment

3.4.1 Anzucht

Zur Anzucht der für das Shift-Experiment benötigten Kulturen wurden zunächst Vorkulturen von diesen angesetzt. Dazu wurden möglichst im Vorfeld Cryo-Erhaltungen reaktiviert (→ 3.2.5) um zu gewährleisten, dass die Kulturen frisch und im Vorfeld des Versuches keinem physiologischem Stress ausgesetzt waren. Das notwendige Zellmaterial für die Batchkultur wurde mit einer sterilen Einmalimpföse von der Oberfläche der BG11-Kobe-Platte entnommen, in flüssigem BG11 pH 8.0 (→ 3.1.3) durch vortexen suspendiert und anschließend die so erhaltene Zellkultur in ein Batchgefäß überführt. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte in Anhängigkeit des vorliegenden Selektionsmarkers (→ 3.1.1, 3.1.4). Zur Überprüfung des axenischen Charakters der Kultur wurde ein Steriltest (→ 3.2.1) mitgeführt. Die Kulturen wurden zunächst 2-4 Tage in der Batchbank unter Begasung mit 5 % CO₂ [v/v] bei 29 °C und 100 $\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$ Lichtintensität vorkultiviert. Nach spätestens 3 Tagen wurde das Medium gewechselt (→ 3.2.3) und die Kultur auf OD₇₅₀ \approx 1.0-1.2 verdünnt (→ 3.2.6). Über diese Vorgehensweise wurde versucht bei Durchführung eines HC/LC-Shift-Experiments eine gute Qualität der Ausgangskulturen zu gewährleisten, die keinem Licht- oder Nährstoffstress ausgesetzt waren.

3.4.2 Umstellung auf CO₂-Mangel

Am Vortag des Shift-Experiments wurden die Kulturen nach erfolgtem Mediumwechsel auf OD₇₅₀ \approx 1.0 (→ 3.2.6) eingestellt und erneut für 24 h mit 5 % CO₂ [v/v] begast. Am darauffolgenden Tag wurden die Kulturen zweimal mit BG11 pH 7.0 gewachsen, auf OD₇₅₀ \approx 0.8 – 1.0 (→ 3.2.6) verdünnt und für 1 h Stunde bei 5 % CO₂ [v/v] kultiviert. Anschließend wurden die für den Zeitpunkt HC (0 h LC) notwendigen Proben für die Metabolom- bzw. Transkriptom-Analysen (→ 3.5, 3.6) genommen. Das HC/LC-Shift-Experiment wurde schließlich durch die Umstellung der Begasung von 5 % [v/v] CO₂ auf

0,038% CO₂ (Raumluft) gestartet. Nach 3 h bzw. 24 h wurden erneut entsprechend Proben entnommen (→ 3.5, 3.6). Zu jedem Zeitpunkt der Probennahme wurden die Kulturen hinsichtlich ihrer optischen Dichte vermessen um bei der Metabolom-Analyse (→3.6) eine Normalisierung der Messwerte vornehmen zu können.

3.5 Transkriptom-Analysen

3.5.1 Probennahme

Für die Entnahme einer Probe zur Analyse des Transkriptionsstatus mittels RNA Microarray wurde zunächst im Rahmen eines HC/LC-Shift-Experiments (→ 3.4) zu den Zeitpunkten 0 h, 3 h und 24 h ein Volumen von 5 ml Kultur entnommen und in ein vorgekühltes und in einer mit Eis gefüllten Styroporbox vorliegendem 15 ml-Rotdeckelröhrchen überführt. Die Zellernte erfolgte schnellstmöglich durch Zentrifugation für 10 min bei 4.000 U/min und 4 °C (vorgekühlt). Das Medium wurde angesaugt, Zellpellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur RNA-Extraktion bei -80 °C gelagert.

3.5.2 RNA-Extraktion mittels PGTX-Lösung

Die Methode der RNA-Isolation mittels PGTX beruht auf den Ausführungen in Pinto *et al.* (2009). Die PGTX-Lösung weist für ein Endvolumen von 100 ml folgende Zusammensetzung auf: 54 ml Roti[®]-Aqua-Phenol pH 4.5 – 5 (Roth; Karlsruhe, Deutschland), 6,9 ml Glycerol, 0,1 g 8-Hydroxychinoline, 0,8 g Natriumacetat, 9,5 g Guanidinium-thiocyanate und 4,6 g Guanidiniumhydrochlorid. Eine Einstellung des pH-Wertes ist nicht erforderlich. Zur Extraktion der RNA wurden zu den gefrorenen, auf Eis gelagerten Zellpellets zunächst 500 µl PGTX-Lösung hinzugefügt und durch starkes Mischen suspendiert. Anschließend wurde die PGTX-Zellsuspension in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und im Heizblock für 15 min bei 65 °C unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Probe vorsichtig aber zügig auf Eis gelagert und für 5 min dort belassen. Anschließend wurden der Probe 500 µl Chloroform : Isoamylalkohol (IAA) 1 : 24 (23 Volumeneinheiten (VE) Chloroform zu 1 VE IAA) zugegeben, gemixt und unter gelegentlichem vorsichtigem Schwenken für 10 min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurde die Probe für 10 min bei 6.000 U/min und RT zentrifugiert. Von der oberen wässrigen, die RNA enthaltenden Phase wurden vorsichtig ca. 200 – 300 µl entnommen und in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt. Nach erneuter Zugabe von 500 µl Chloroform : IAA 1 : 24 und anschließender Zentrifugation

wurden 200 – 300 µl der nun erhaltenen oberen wässrigen Phase mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach sorgfältigem Mischen der Probe erfolgte über Nacht die RNA-Fällung bei -20 °C. Zur Gewinnung des RNA-Pellets wurden die Proben nach dem Präzipitationsschritt für 30 min bei 12.000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene RNA-Pellet wurde erst nach Abnahme des Überstandes und durch Lichteinfall als kleines, durchscheinendes Pellet sichtbar. Eine weißliche Verfärbung des Pellets deutet dagegen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin. Das Pellet wurde abschließend durch Zugabe von 100 µl 75 % Ethanol (HPLC-Qualität) gewaschen (nicht suspendieren!) welcher nach Zentrifugation für 5 min bei 12.000 U/min und RT wieder vorsichtig, ohne das Pellet zu beschädigen, entnommen wurde. Um Ethanol-Reste zu entfernen wurde das Pellet abschließend unter der Laminarbox luftgetrocknet. Das RNA-Pellet wurde schließlich in 20-35 µl RNAsae-freiem H₂O (HPLC-Qualität; autoklaviert) suspendiert. Die Lagerung der RNA-Extrakte erfolgte bei -80 °C. Um Kontaminationen der Proben mit RNasen zu unterbinden wurden alle verwendeten Einmalmaterialien wie Pipettenspitzen sowie Eppendorfggefäße zweimalig autoklaviert und auf eine sorgfältige sowie saubere Arbeitsweise geachtet.

3.5.3 Überprüfung der RNA-Extrakte auf Kontaminationen mit DNA

Enthalten die RNA-Proben Reste von DNA so führt dieses bei Durchführung von der Mircoarray-Analyse zu einer Verfälschung und Verschiebung der Aussagen die über den Transkriptionsstatus der Probe gemacht werden kann. Daher hat die Kontrolle der RNA-Extrakte auf das Vorliegen von Kontaminationen mit DNA eine besondere Bedeutung. Zu diesem Zweck wurden die RNA-Proben einer PCR (→ 3.3.2) mit den genspezifischen Primern für *rnpB* (→ 3.1.2) unterzogen. Das Gen *rnpB* kodiert die Untereinheit B der RNase P und unterliegt einer konstitutiven Expression. Als Template wurden jeweils 0,5 µl RNA-Eluat eingesetzt und als Kontrollen PCR-Ansätze mit WT-DNA bzw. H₂O mitgeführt. PCR-Fragmente in den RNA-Isolaten wiesen auf das Vorliegen von DNA-Kontaminationen hin.

3.5.4 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mittels NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop™ 2000; Thermo Fisher Scientific; Schwerte, Deutschland). Nucleinsäuren, DNA und RNA, weisen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm (A_{260}) auf. Das Vorliegen von DNA-Kontaminationen in den RNA-Eluate wurde mittels PCR überprüft (→ 3.5.3). In DNA-freien

RNA-Isolaten kann die RNA-Konzentration somit über die Messung bei A_{260} bestimmt werden. $A_{260} = 1,0$ entspricht dabei $40 \mu\text{g}$ RNA. Für die Messung wurden jeweils $1 \mu\text{l}$ RNA-Eluate eingesetzt. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) gilt als Indikator für die Reinheit der RNA-Eluate. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt, beruhend auf den Absorptionseigenschaften aromatischer Aminosäure-Reste bei 280 nm. (A_{280}). Ein Verhältnis von $A_{260}/A_{280} \approx 2,0$ spricht für eine reine RNA-Isolation ohne Protein- sowie Phenolkontaminationen. Zusätzlich wurde das Verhältnis A_{260}/A_{230} mit in die Beurteilung der Reinheit der RNA-Eluate einbezogen. Werte von $A_{260}/A_{230} = 2,0 - 2,2$ lassen auf eine sehr gute Qualität der RNA-Isolation schießen, während niedrigere Werte darauf hin deuten, dass im RNA-Eluat unerwünschte Fremdstoffe enthalten sind, die ein Absorptionsmaximum bei 230 nm aufweisen, wie z.B. Guanidiniumthiocyanat.

3.5.5 Qualitätskontrolle der RNA-Extrakte mittels Gelelektrophorese

Zur weiteren Überprüfung der RNA-Qualität nach erfolgter Extraktion wurde die RNA in einem denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Herstellung des Agarosegels wurden zunächst $1,3 \text{ g}$ Agarose mit 73 ml RNA-Wasser (HPLC-Wasser, 2fach autoklaviert) und 10 ml $10 \times \text{MOPS}$ ($0,05 \text{ M}$ Natriumacetat, $0,2 \text{ M}$ MOPS, $0,01 \text{ M}$ EDTA, pH 7.0 (NaOH), autoklaviert) aufgekocht und nach Abkühlung auf Handwärme 17 ml Formaldehyd hinzugegeben. Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde $1 \times \text{MOPS}$ verwendet. Zur Aufarbeitung der RNA-Extrakte wurde ein Puffer mit folgenden Bestandteilen zusammenpipettiert (ausreichend für 10 Proben): $25 \mu\text{l}$ $10 \times \text{MOPS}$, $125 \mu\text{l}$ Formamid, $40 \mu\text{l}$ Formaldehyd, $5 \mu\text{l}$ Ethidiumbromid, $15 \mu\text{l}$ STOP-Lösung (\rightarrow 3.3.3). Entsprechend der Bestimmung der RNA-Konzentration (\rightarrow 3.5.4) wurde für jedes RNA-Extrakt das Volumen für $2 \mu\text{g}$ RNA berechnet und mit RNA-Wasser auf ein Endvolumen von $6 \mu\text{l}$ aufgefüllt. Die RNA-Proben wurden mit $21 \mu\text{l}$ Puffer versetzt, für 10 min bei $69 \text{ }^\circ\text{C}$ (Heisblock) aufgekocht und anschließend auf Eis gelagert. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte für $2-4 \text{ h}$ bei 70 V . Die Durchführung der denaturierenden Agarosegelelektrophorese erfolgte aufgrund der hoch toxischen Charaktere von Formaldehyd unter dem Abzug. Zeigten sich im Gelbild die saubere, klar voneinander abgegrenzte Banden für die 23sRNA, 16sRNA und 5sRNA so galt die RNA-Extraktion als erfolgreich, d.h. eine Degeneration der RNA durch RNasen ist auszuschließen. Zusätzlich wurde die Qualität der RNA-Extrakte in der Arbeitsgruppe *Biologie*,

Genetik und experimentelle Bioinformatik unter der Leitung von Dr. Wolfgang R. Hess an der Universität Freiburg mittels Northern-Blot überprüft.

3.5.6 RNA-Microarray

Die auf der DNA-Microarray-Analyse basierende Untersuchung des Transkriptoms erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe *Biologie, Genetik und experimentelle Bioinformatik* unter der Leitung von Dr. Wolfgang R. Hess an der Universität Freiburg. Die entsprechenden Analysen wurden von Dr. Stephan Klähn durchgeführt. Bei Vorliegen von DNA-Kontaminationen in den RNA-Extrakten wurde in Freiburg vor den Microarray-Analysen eine DNase-Behandlung durchgeführt. Die Hybridisierung der Microarrays erfolgte in Anlehnung an GEORG *et al.* (2009). Ausführungen zur Transcriptom-Analyse finden sich im Methodenteil von SCHWARZ *et al.* (2013).

3.6 Metabolom-Analysen

3.6.1 Probennahme

Die Vorgehensweise und Durchführung der Metabolom-Analysen von der Probennahme bis zur gaschromatografisch-massenspektrometrischen (GC-MS) Messung ist angelehnt an das in EISENHUT *et al.* (2008) beschriebene Protokoll. Zur Untersuchung des Metaboloms wurden der Flüssigkultur 7-10 ml entnommen und anschließend die cyanobakteriellen Zellen durch Filtration unter Verwendung eines Nitrocellulose-Filters der Porengröße 0.45 µm (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; www.sigmaaldrich.com) vom Medium separiert. Die Probennahme erfolgte unter Lichteinfluss und ohne anschließende Waschung. Die auf ihrer Oberfläche die Cyanobakterien-Zellen enthaltenden Nitrocellulose-Filter wurden in gefaltetem Zustand in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Proben bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -80 °C.

3.6.2 Extraktion

Die zur Freisetzung und Gewinnung der Metabolite erfolgte Extraktion der Proben wurde durch den Kooperationspartner, der Arbeitsgruppe *Applied Metabolome Analysis* unter der Leitung von Dr. Joachim Kopka am Max-Planck-Institut Golm durchgeführt. Im Vorfeld wurden die Proben sorgfältig verpackt und auf Trockeneis nach Golm versandt um eine Qualitätsminderung durch auftauen zu verhindern. Zum Zwecke der Extraktion wurden die das Zellmaterial enthaltenden Filter im gefrorenen Zustand zunächst in eine Lösung bestehend

aus 630 µl Methanol, 60 µl Nonadeconoic Acid Methylester (2 mg ml⁻¹ Chloroform), 30 µl 13C-Sorbitol (0.2 mg ml⁻¹ in Methanol) und D₄-2,3,3,3-Alanin (1 mg ml⁻¹ in H₂O). Jede Probe wurde sorgfältig für mindestens 1 min gemixt. Zur Gewährleistung einer vollständigen Suspension wurden die Proben im Anschluss für 5 min in einem Ultraschallbad inkubiert, 15 min bei 70 °C gekocht und nach Abkühlung auf Raumtemperatur mit 400 µl Chloroform versetzt und erneut für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die sich anschließende Phasenauftrennung wurde durch Zugabe von 800 µl H₂O induziert. Durch Zentrifugation der Proben in einer Eppendorf 5417 Mikrozentrifuge für 5 min bei 14.000 rpm erfolgte die Trennung von polarer und unpolarer Phase. Das so erhaltende Extrakte mit einem Volumen von 600 µl wurden abschließend in 1,5 ml Mikrotubes für 12 bis 18 h in einer Vakuumzentrifuge aufkonzentriert und getrocknet.

3.6.3 Messung mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Die Vermessung der Proben, durchgeführt von dem Kooperationspartner, der Arbeitsgruppe *Applied Metabolome Analysis* unter der Leitung von Dr. Joachim Kopka am Max-Planck-Institut Golm, erfolgte über ein bereits in WAGNER *et al.* (2003) und ERBAN *et al.* (2007) detailliert beschriebenes gekoppeltes System bestehend aus einem Gaschromatographen (engl. *gas chromatograph*; GC) vom Typ Agilent 6890N24 (Agilent Technologies, Böbling, Deutschland; www.agilent.com) mit einem Split/Splitlos-Injektor und der Kapillarsäule FactorFour VF-5ms (Säulenlänge: 30 m; Säulendurchmesser (innen): 0.25 mm; inner diameter, Schichtdicke: 0.25 µm; Varian-Agilent Technologies) sowie einem nachgeschalteten Elektronenstoßionisator (engl. *electron impact*; EI) und einem Flugzeit-Massenspektrometer (engl. *time-of-flight mass spectrometer*; TOF-MS) vom Typ Pegasus III (LECO Instrumente GmbH, Mönchengladbach, Germany; <http://www.leco.de>). Dazu wurden die Metabolite in den Proben manuell vor Durchlauf der GC-EI/TOF-MS Analyse einer Methoxyaminierung sowie Trimethylsilylierung unterzogen (ERBAN *et al.*; 2007). Zur Kalibrierung der Retentionsindizes wurden jeder Probe eine Mischung aus C₁₀, C₁₂, C₁₅, C₁₈, C₁₉, C₂₂, C₂₈, C₃₂, und C₃₆ n-Alkanen hinzugefügt (STREHMEL *et al.*, 2008). Zur Daten-Evaluierung wurden zunächst die GC-EI/TOF-MS-Chromatogramme erhoben, visuell auf ihre Qualität hin beurteilt und anschließend einer Hintergrund-Korrektur unterzogen. Nach Umwandlung der Chromatogramme in das NetCDF Daten Format unter Verwendung der Software ChromaTOF (Version 4.22; LECO, St. Joseph, USA) wurden die GC-MS Daten standartmäßig in eine

Zahlenmatrix übersetzt. Die Identifizierung der Analyte erfolgte unter Einsatz der TagFinder Software (LUEDEMANN *et al.*, 2008; ALLWOOD *et al.*, 2009). Die Bestimmung der Analyte beruhte auf den Abgleich von den Massenspektren und der Retentionszeit mit den Angaben in der Metabolom-Datenbank aus Golm (Golm metabolome database, GMD; <http://gmd.mpimpgolm.mpg.de/>; KOPKA *et al.*, 2005; SCHAUER *et al.*, 2005; HUMMEL *et al.*, 2010). Leitlinien zur manuellen Identifizierung von Metaboliten beinhalteten das Auftreten von mindestens drei spezifischen Massenfragmenten im Chromatogramm eines Analyten sowie die Übereinstimmung in der Retentionszeit mit einer Abweichung von < 1.0 % (STREHMEL *et al.*, 2008). Die Messwerte wurden bezogen auf das Probenvolumen, die optische Dichte bei 70 nm (OD_{750 nm}) sowie den internen Standard normalisiert. Die Berücksichtigung von Labor- sowie Chemikalien-bedingten Kontaminationen in den Proben erfolgte durch Mitführen von Kontrollproben, die keine Cyanobakterien enthielten. Die Metabolitwerte für die Analyse der Anpassung an CO₂-Mangel wurden routinemäßig als relative Veränderungen bzw. relative Verhältnisse bezogen auf die Metabolitwerte unter 5 % CO₂ angegeben.

3.6.4 Metabolom-Datensätze

Für die Definition einer cyanobakteriellen Metabolom-Signatur unter LC wurden mehrere sowohl bereits publizierte als auch unveröffentlichte Metabolom-Datensätze von *Synechocystis* und *Synechococcus* herangezogen. Die Durchführung der HC/LC-Shift-Experimente wurde von verschiedenen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe vorgenommen. Die Extraktion der Proben sowie die GC-MS und die Datenevaluierung erfolgte stets wie unter → 3.6.2 und → 3.6.3 beschrieben. Die Tabelle 4 enthält eine Auflistung der entsprechenden Datensätze. Im Anhang befindet sich desweiteren eine tabellarische Gegenüberstellung der relativen Gehalte der relevanten Metabolite des zentralen C- und N-Stoffwechsels (→ Tabelle 18).

Tabelle 4. Metabolom-Datensätze

Datensatz	Replikate t*/b**	Status
<i>Synechocystis</i>		
7144	2/2	EISENHUT <i>et al.</i> (2008)
6089	2/2	EISENHUT <i>et al.</i> (2008)
10075	0/4	HACKENBERG <i>et al.</i> (2012)
8001	0/3	unveröffentlicht
13122	3/2	unveröffentlicht
<i>Synechococcus</i>		
8001	0/4	SCHWARZ <i>et al.</i> (2011)
9223	0/4	unveröffentlicht

* technische Replikate

** biologische Replikate

3.7 Glykogenbestimmung

3.7.1 Probennahme

Zur Bestimmung des intrazellulären Gehalts an Glykogen unter variierenden C_i -Bedingungen wurde *Synechocystis* zunächst einem HC/LC-Shift unterzogen (→ 3.4). Zu den Zeitpunkten 0h, 1,5h, 3h, 6h und 24h wurden jeweils 3 ml der Kultur entnommen (auf Eis) und anschließend für 10 min bei 4.000 U/min und 4 °C (vorgekühlt) zentrifugiert. Das Medium wurde angesaugt, das Zellpellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Glykogenbestimmung bei -80 °C gelagert. Für die spätere Berechnung der Glykogenkonzentration in $\mu\text{g ml}^{-1} \text{OD}_{750}^{-1}$ (→ 3.7.2) wurden zum Zeitpunkt der Probennahme die OD_{750} der Kulturen bestimmt.

3.7.2 Glykogenbestimmung mittels Anthron

Zur Bestimmung des intrazellulären Gehaltes an Glykogen, wurde das bei -80 °C aufbewahrte Zellpellet zunächst über Nacht in 1 ml 80 % Ethanol eluiert. Im Anschluss wurde das Eluat zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 1 ml 30 % KOH wurde die Probe für 1 h bei 100 °C im Wasserbad inkubiert und auf Eis runtergekühlt. Nach Zugabe von 1,25 ml 95 % Ethanol wurde die Probe erneut bei 100 °C im Wasserbad aufgeköcht und für 15 min inkubiert. Die Probe wurde für 10 min bei 5000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abermals verworfen. Nach Suspension der Probe von 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$. Bei 100 °C

im Wasserbad für 15 min, wurden dem Ansatz vorsichtig und schrittweise 2 ml Anthronreagenz (200 mg Anthron auf 100 ml 95 % H₂SO₄) zugefügt. Anschließend wurde die Probe für 15 min bei 100 °C inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt stellt sich die Verfärbung der Probe ein. Nach dem abkühlen des Ansatzes auf Eis, konnte die Extinktion der Probe am Photometer bestimmt um auf der Basis einer Glykogen-Eichgerade die Konzentration an Glykogen in µg ml⁻¹ OD₇₅₀⁻¹ berechnet werden.

3.8 *In silico*-Analyse

Die Identifizierung von putativen Genen im Genom von *Synechococcus*, die Enzyme des photorespiratorischen 2PG-Metabolismus kodieren, erfolgte basierend auf den in *Synechocystis* in EISENHUT *et al.* (2006) annotierten Genen über BLAST-Analysen. Die Aminosäuresequenzen der Genprodukte sowie die Suche nach putativen Genen erfolgte über die Datenbank Cyanobase (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/>). Im Anhang befindet sich in Form von Tabelle 16 eine Aufstellung der BLAST-Ergebnisse.

4 ERGEBNISSE

4.1 Vergleichende Metabolom- und Transkriptom-Analysen an *Synechocystis* und *Synechococcus*

Die Gegenüberstellung von metabolischen und transkriptionellen Veränderungen unter limitierter C_i -Verfügbarkeit in den beiden sich in Morphologie und Physiologie unterscheidenden cyanobakteriellen Stämmen *Synechocystis* und *Synechococcus* ermöglichte es, einen Einblick in Stamm-unspezifische LC-Anpassungsmechanismen zu erlangen. Nach der Kultivierung unter 0,038 % CO_2 für einen Zeitraum von 24 h ist das Erreichen eines *steady-state*-Zustands anzunehmen, d.h. die Adaptation an den CO_2 -Mangel ist als weitgehend abgeschlossen zu betrachten. Vor diesem Hintergrund wurden für die vergleichende Studie der beiden Cyanobakterien-Stämme hier ausschließlich die auf der Probennahme zum 24 h-Zeitpunkt beruhenden Metabolom- und Transkriptom-Daten in die Betrachtung einbezogen.

4.1.1 Modulationen im Metabolom unter CO_2 -Mangel

In beiden Cyanobakterien-Stämmen spiegelt sich ein erhöhtes Angebot an CO_2 in einer gesteigerten Wachstumsrate wider (\rightarrow Tabelle 5). Zur Untersuchung von Stamm-übergreifenden CO_2 -abhängigen Veränderungen auf Metabolom-Ebene, die die Grundlage für die spätere Definition einer Metabolom-Signatur für die cyanobakterielle LC-Antwort darstellen, wurden zwei bereits publizierte, unabhängige Datensätze gegenübergestellt:

- (1) EISENHUT *et al.* (2008) unterzogen *Synechocystis* einem HC/LC-Shift-Experiment und stellten im Anschluss basierend auf GC-MS-Messungen eingehende Untersuchungen zu Modifikationen im metabolischen Phänotyp dar.
- (2) SCHWARZ *et al.* (2011) beinhaltet eine analoge Studie zur LC-Anpassung von *Synechococcus* auf Metabolom-Ebene.

Wie bereits im Methodenteil beschrieben, handelt es sich bei den im Folgenden dargestellten Werten um relative Metabolitgehalte. Veränderungen in den Poolgrößen der einzelnen Metabolite nach 24 h Kultivierung unter 0,038 % CO_2 wurden in Relation zum Metabolitgehalt zum Zeitpunkt vor der Umstellung auf CO_2 -Mangel – d.h. unter 5 % [v/v] CO_2 – gesetzt. Der Wert für HC wurde dabei auf 1.0 festgelegt. Für eine umfangreiche Betrachtung des zentralen Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus wurden Intermediate des Calvin-Benson-Bassham Zyklus, des photorespirischen 2PG-Metabolismus sowie an

grenzender Stoffwechselwege wie OPP-Weg, Glykolyse, TCA-Zyklus und GS/GOGAT-Weg betrachtet.

Für die Identifizierung von metabolischen Veränderungen, die als statistisch abgesicherten zu betrachten sind, wurden in die vergleichende Metabolom-Analyse neben den beiden bereits erwähnten und veröffentlichten Metabolom-Studien an *Synechocystis* und *Synechococcus* weitere vorliegende Metabolom-Datensätze herangezogen (→3.6.4). Gründe für die Wahl dieser Vorgehensweise werden im Anschluss diskutiert.

Tabelle 5. Wachstumsraten von *Synechocystis* und *Synechococcus*

Stamm	μ [h ⁻¹]	
	HC	24 h LC
<i>Synechocystis</i>	0,05 ± 0,01	0,01 ± 0,003
<i>Synechococcus</i>	0,060 ± 0,001	0,01 ± 0,001

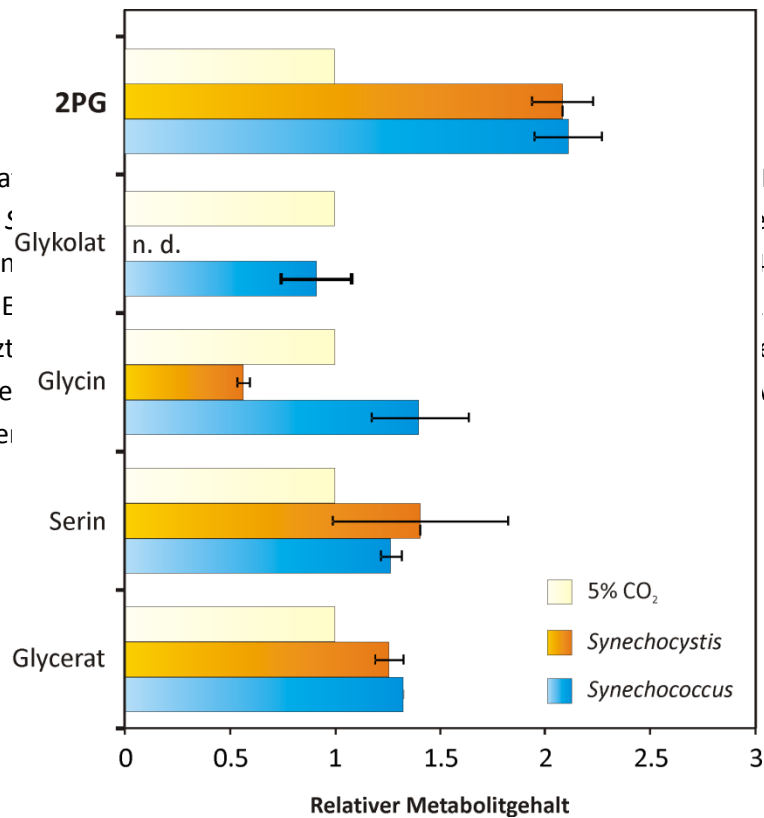
4.1.1.1 Intermediate des photorespiratorischen 2PG-Metabolismus

Unter LC-Bedingungen katalysiert Rubisco neben der CO₂-Fixierung verstärkt die Oxygenase-Reaktion. 2PG akkumuliert gleichermaßen in *Synechocystis* und *Synechococcus* unter LC-Bedingungen (Abbildung 7. Relative Veränderungen in den Poolgrößen von Intermediaten der Photorespiration in *Synechocystis* und *Synechococcus*. Die Darstellung zeigt Werte für die relativen Metabolitgehalte 24 h nach der Umstellung von 5 % [v/v] CO₂ (HC, BG11 pH 8,0) auf 0,038 % [v/v] CO₂ (24 h LC, BG11 pH 7,0) für *Synechocystis* (EISENHUT *et al.*, 2008) und *Synechococcus* (SCHWARZ *et al.*, 2011). Der Wert für HC ist auf 1,0 gesetzt. 2PG, deren Anstieg in der Poolgröße unter LC reproduzierbar in mehreren gegenübergestellten, unabhängigen Metabolom-Analysen beobachtet wurde (→ Anhang, Tabelle 18), ist fett gedruckt hervorgehoben. n.d.: nicht detektiert.

Abbildung 8. Relative Veränderungen in den Poolgrößen von Intermediaten des Calvin-Benson-Bassham Zyklus, des OPP-Weges sowie der Glykolyse in *Synechocystis* und *Synechococcus*. Dargestellt sind Werte für die relativen Metabolitgehalte 24 h nach der Umstellung von 5 % [v/v] CO₂ (HC, BG11 pH 8,0) auf 0,038 % [v/v] CO₂ (24 h LC, BG11 pH 7,0) für *Synechocystis* (EISENHUT *et al.*, 2008) und *Synechococcus* (SCHWARZ *et al.*, 2011). Der Wert für HC ist auf 1,0 gesetzt. Metabolite, deren Verschiebungen in der Poolgröße unter LC reproduzierbar in mehreren gegenübergestellten, unabhängigen Metabolom-Analysen

beobachtete wurden (→ Anhang, Tabelle 18), sind fett gedruckt hervorgehoben. (Abbildung 7). Überdies ist ein schwacher Anstieg in den Gehalten der Intermediate Serin und Glycerat zu verzeichnen. Die GC-MS-basierte Erfassung von Glykolat ist problematisch. Der Glykolat-Peak liegt nahe dem Lösungsmittelpeak, was die Erhebung von aussagekräftigen Daten erschwert. Für *Synechococcus* war die Ermittlung eines relativen Gehalts an Glykolat indessen möglich, wies jedoch keine Abweichung vom Wert der Kultivierung unter HC auf. Eine Diskrepanz im Metabolom zwischen *Synechocystis* und *Synechococcus* ist für den Glycin-Level zu vermerken. Während relativ zum Wert unter HC der Glycin-Gehalt in LC-kultivierten Zellen von *Synechocystis* um rund 50 % abfällt, weist die Metabolom-Analyse in *Synechococcus* auf einen Anstieg im Glycin-Pool hin. Im Kern deuten die Metabolom-Daten von *Synechocystis* und *Synechococcus* erwartungsgemäß auf eine verstärkte Oxygenase-Aktivität der Rubisco sowie auf eine verstärkte Aktivität 2PG-abbauender photorespiratorische Stoffwechselwege hin. Für die Erstellung einer Metabolom-Signatur unter CO₂-Mangelbedingungen ist vorrangig die in beiden untersuchten Stämmen beobachtete und reproduzierbare Akkumulation von 2PG hervorzuheben.

Abbildung 19. Relativer Metabolitgehalte von *Synechocystis* und *Synechococcus* 24 h nach der Umstellung von 5% [v/v] CO₂ auf 0,038% [v/v] CO₂ für *Synechocystis* (EISENHUT *et al.*, 2008) und *Synechococcus* (SCHWARZ *et al.*, 2011). Der Wert für HC ist auf 1,0 gesetzt. Metabolite, deren Verschiebungen in der Poolgröße unter LC reproduzierbar in mehreren gegenübergestellten, unabhängigen Metabolom-Analysen beobachtet wurden (→ Anhang, Tabelle 18), sind fett gedruckt hervorgehoben.



Photorespiration in *Synechocystis* und *Synechococcus* 24 h nach der Umstellung von 5% [v/v] CO₂ auf 0,038% [v/v] CO₂ (24 h LC, BG11 pH 7,0) für *Synechocystis* (EISENHUT *et al.*, 2008) und *Synechococcus* (SCHWARZ *et al.*, 2011). Der Wert für HC ist auf 1,0 gesetzt. Metabolite, deren Verschiebungen in der Poolgröße unter LC reproduzierbar in mehreren gegenübergestellten, unabhängigen Metabolom-Analysen beobachtet wurden (→ Anhang, Tabelle 18), sind fett gedruckt hervorgehoben.

4.1.1.2 Intermediate des Calvin-Benson-Bassham Zyklus, des OPP-Weges und der Glykolyse

Primär erfolgt die CO₂-Fixierung in *Synechocystis* und *Synechococcus* über die Carboxylase-Aktivität der Rubisco. Die an *Synechocystis* und *Synechococcus* durchgeführten Metabolom-Analysen enthalten Daten für den relativen Metabolitgehalt an 3PGA, Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), einem Zwischenprodukt aus dem Calvin-Benson-Bassham Zyklus (→ Abbildung 8. Relative Veränderungen in den Poolgrößen von Intermediaten des Calvin-Benson-Bassham Zyklus, des OPP-Weges sowie der Glykolyse in *Synechocystis* und *Synechococcus*. Dargestellt sind Werte für die relativen Metabolitgehalte 24 h nach der Umstellung von 5% [v/v] CO₂ (HC, BG11 pH 8,0) auf 0,038% [v/v] CO₂ (24 h LC, BG11 pH 7,0) für *Synechocystis* (EISENHUT *et al.*, 2008) und *Synechococcus* (SCHWARZ *et al.*, 2011). Der Wert für HC ist auf 1,0 gesetzt. Metabolite, deren Verschiebungen in der Poolgröße unter LC reproduzierbar in mehreren gegenübergestellten, unabhängigen Metabolom-Analysen beobachtet wurden (→ Anhang, Tabelle 18), sind fett gedruckt hervorgehoben.

Abbildung 9. Relative Veränderungen in den Poolgrößen von Intermediaten des TCA-Zyklus sowie des GS/GOGAT-Weges in *Synechocystis* und *Synechococcus*. Dargestellt sind Werte für die relativen Metabolitgehalte 24 h nach der Umstellung von 5% [v/v] CO₂ (HC, BG11 pH 8,0) auf 0,038 % [v/v] CO₂ (24 h LC, BG11 pH 7,0) für *Synechocystis* (EISENHUT *et al.*, 2008) und *Synechococcus* (SCHWARZ *et al.*, 2011). Der Wert für HC ist auf 1,0 gesetzt. (Abbildung 8). Während der 3PGA-Gehalt in *Synechococcus* unter LC-Bedingungen um das Zweifache erhöht ist, zeigt sich keine Veränderung in *Synechocystis*. Bei Betrachtung des DHAP-Levels ist ein spiegelbildliches Verhalten zu beobachten. Der DHAP-Gehalt steigt in *Synechocystis* um mehr als das Doppelte an, während er sich in *Synechococcus* halbiert. Ferner steigt unter LC-Bedingungen der Gehalt an 2PGA in *Synechocystis* und *Synechococcus* um das Vier- bis Acht-fache an. Gleichermaßen ist eine Anreicherung von PEP – ein Intermediat der Glykolyse, der über das Enzym Phosphoglycerat-Hydratase aus 2PGA gebildet wird – zu beobachten. Folglich lassen die GC-MS-Messungen darauf schließen, dass unter CO₂-Mangel sowohl in *Synechocystis* als auch *Synechococcus* das aus der CO₂-Fixierung stammende 3PGA vermehrt in die Glykolyse eingeschleust wird, während der in seiner Aktivität gehemmte Calvin-Benson-Bassham Zyklus es nur unzureichend zu RuBP umbaut. Der Calvin-Benson-Bassham Zyklus besitzt darüber hinaus über das Intermediat DHAP eine Verbindungstelle zum OPP-Weg. Die Metabolom-Analysen an *Synechocystis* und *Synechococcus* lassen zunächst keinen direkten Einfluss einer verminderten CO₂-Verfügbarkeit auf den Gehalt der Intermediate Glukose (Glc), Glykose-6-Phosphat (Glc-6-P) und Fruktose-6-Phosphat (Fru-6-P) erkennen. Hingegen zeigt sich in beiden Cyanobakterien-Stämmen eine Akkumulation von 6-Phosphoglukonat (6-P-Glykonat), welches über die beiden Enzyme Glc-6-P-Dehydrogenase und Phosphoglukonat-Dehydratase aus Glc-6-P generiert wird. Der Gehalt von Saccharose verhielt sich in *Synechocystis* und *Synechococcus* unterschiedlich. Während in *Synechococcus* der Saccharose-Gehalt unter LC leicht steigt, zeichnet sich für *Synechocystis* ein drastischer Abfall im Saccharose-Gehalt ab. Übereinstimmend verhalten sich im Metabolom von *Synechocystis* und *Synechococcus* die Intermediate 2PGA und PEP, die als mögliche Kandidaten für die Herleitung einer Metabolom-Signatur für die Anpassung von Cyanobakterien an CO₂-Limitierung dienen könnten. Die Veränderungen im Gehalt von 6-P-Glykonat sind zu diskutieren.

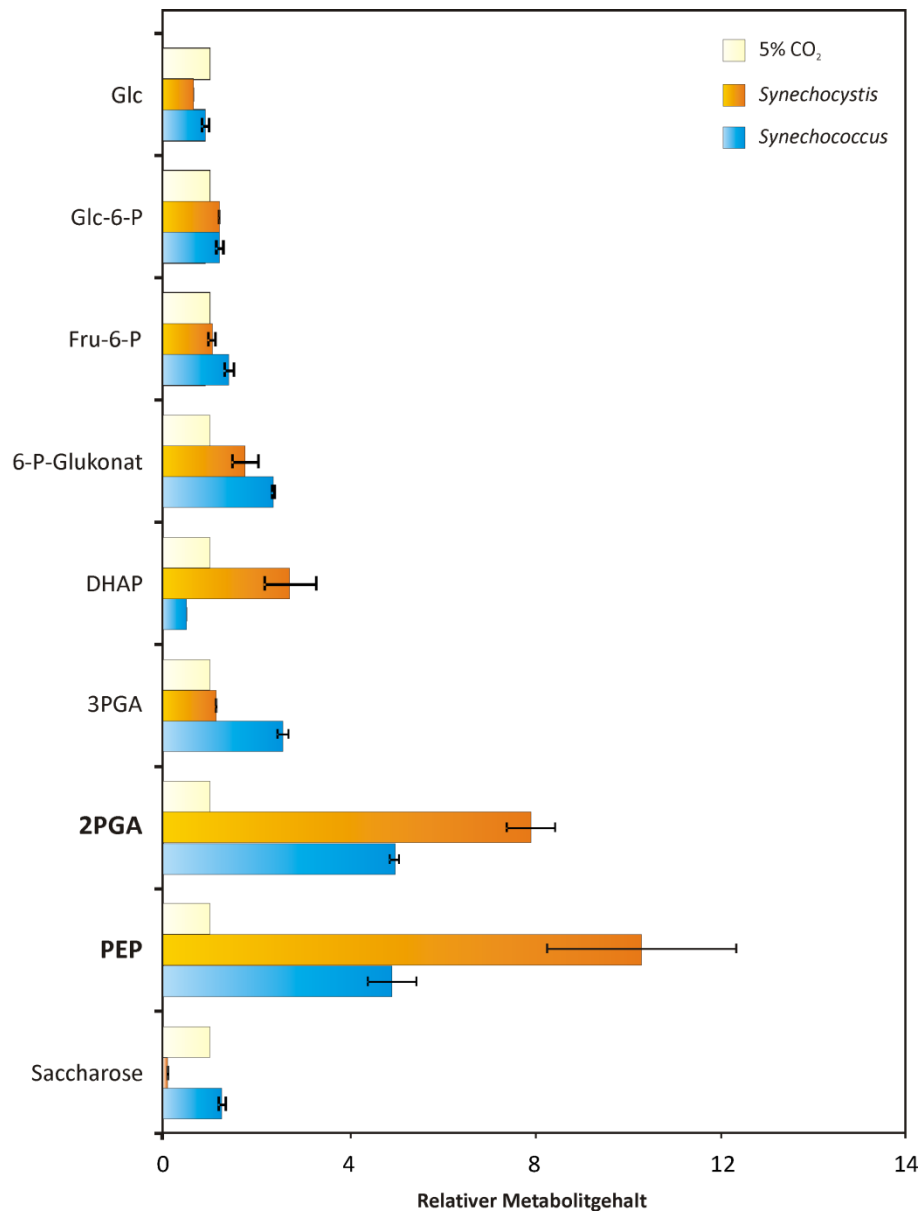


Abbildung 22. Relative Veränderungen in den Poolgrößen von Intermediaten des Calvin-Benson-Bassham Zyklus, des OPP-Weges sowie der Glykolyse in *Synechocystis* und *Synechococcus*. Dargestellt sind Werte für die relativen Metabolitgehalte 24 h nach der Umstellung von 5 % [v/v] CO₂ (HC, BG11 pH 8,0) auf 0,038 % [v/v] CO₂ (24 h LC, BG11 pH 7,0) für *Synechocystis* (EISENHUT *et al.*, 2008) und *Synechococcus* (SCHWARZ *et al.*, 2011). Der Wert für HC ist auf 1,0 gesetzt. Metabolite, deren Verschiebungen in der Poolgröße unter LC reproduzierbar in mehreren gegenübergestellten, unabhängigen Metabolom-Analysen beobachtet wurden (→ Anhang, Tabelle 18), sind fett gedruckt hervorgehoben.

4.1.1.3 Intermediate des TCA-Zyklus und des GS/GOGAT-Weges

Der relative Gehalt an Citrat fällt in *Synechocystis* 24 h nach Umstellung auf LC um 50 %, in *Synechococcus* steigt Citrat dagegen leicht an (→ Abbildung 9. Relative Veränderungen in den Poolgrößen von Intermediaten des TCA-Zyklus sowie des

GS/GOGAT-Weges in *Synechocystis* und *Synechococcus*. Dargestellt sind Werte für die relativen Metabolitgehalte 24 h nach der Umstellung von 5% [v/v] CO₂ (HC, BG11 pH 8,0) auf 0,038 % [v/v] CO₂ (24 h LC, BG11 pH 7,0) für *Synechocystis* (EISENHUT *et al.*, 2008) und *Synechococcus* (SCHWARZ *et al.*, 2011). Der Wert für HC ist auf 1,0 gesetzt.

Abbildung 10. Änderungen im Glykogengehalt in *Synechocystis* nach Transfer von HC zu LC. (Abbildung 9). Eine Erhöhung des Gehalts an *cis*-Aconitat – ein Intermediat des TCA Zyklus und ein Vorläufer der Generierung von 2OG – findet sich in beiden Cyanobakterien-Stämmen. Die Metabolite Succinat, Malat und Fumarat zeigen beim Vergleich von *Synechocystis* und *Synechococcus* kein einheitliches Verhalten. In *Synechocystis* fällt der Gehalt an Succinat während Fumarat und Malat auf das Zweifache akkumulieren. In *Synechococcus* sind dagegen die Metabolit-Veränderungen entgegen gerichtet, d.h. der Succinat-Level erhöht sich auf das Dreifache während Malat sowie Fumarat um 50 % abnehmen.

Der Metabolit 2OG ist gleichfalls über den GS/GOGAT-Weg in die Stickstoff-Assimilation eingebunden. Der Gehalt an Glutamin sinkt in *Synechocystis* und *Synechococcus* unter LC um das Zwei- bis Dreifache. In beiden cyanobakteriellen Stämmen bleibt der Glutamat-Level 24 h nach dem Umsetzen auf LC unverändert. Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die starke Akkumulation von 2OG in *Synechocystis* und *Synechococcus* um das 10- bzw. 20-fache. Ableitend von den oben beschriebenen Veränderungen im Metabolitgehalt von Intermediaten des TCA Zyklus und des GS/GOGAT-Weges scheint in den beiden Cyanobakterien *Synechocystis* und *Synechococcus* als Reaktion auf das Eintreten einer limitierten C_i-Verfügbarkeit ein Anstieg im 2OG-Level sowie eine Reduzierung im Glutamin-Pool bezeichnend zu sein. Diese Beobachtungen sind bei Einbeziehen von weiteren Metabolom-Datensätzen als nicht stabil einzuordnen (→ Anhang, Tabelle 18) und werden im Anschluss diskutiert.

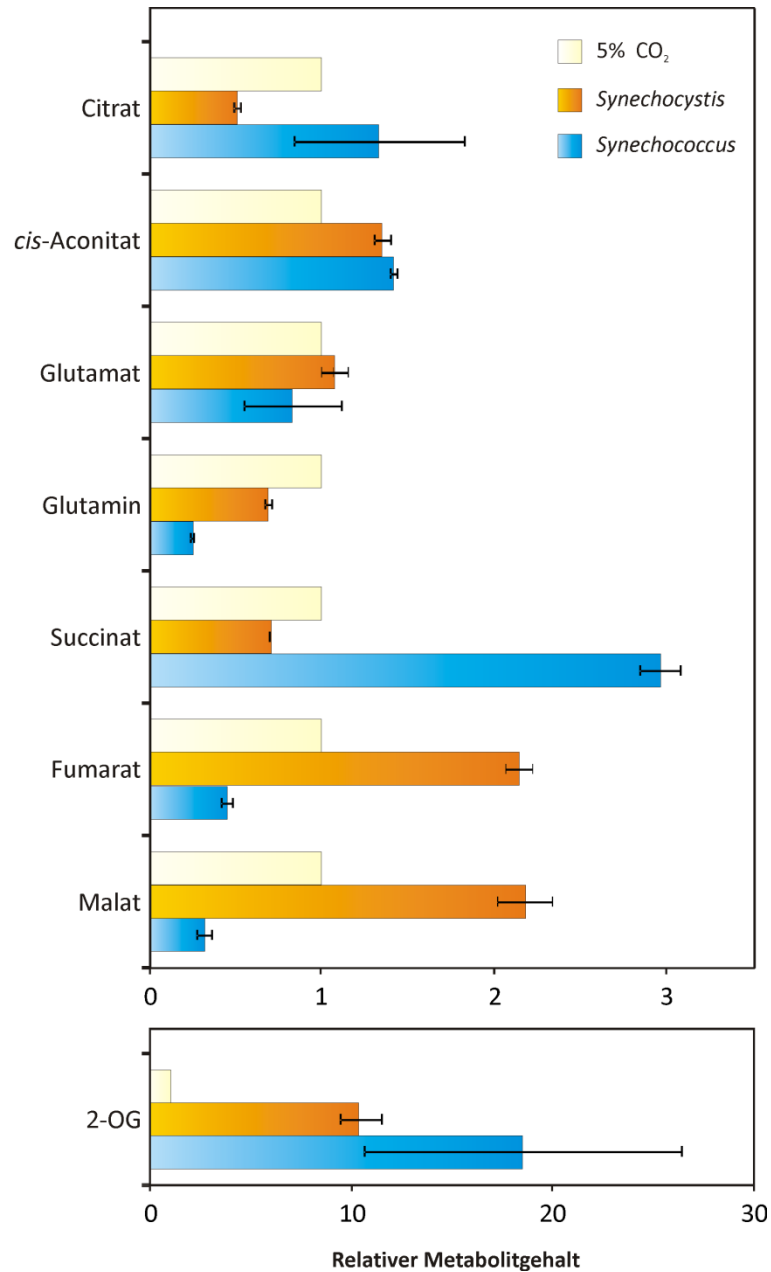


Abbildung 25. Relative Veränderungen in den Poolgrößen von Intermediaten des TCA-Zyklus sowie des GS/GOGAT-Weges in *Synechocystis* und *Synechococcus*. Dargestellt sind Werte für die relativen Metabolitgehalte 24 h nach der Umstellung von 5% [v/v] CO₂ (HC, BG11 pH 8,0) auf 0,038 % [v/v] CO₂ (24 h LC, BG11 pH 7,0) für *Synechocystis* (EISENHUT *et al.*, 2008) und *Synechococcus* (SCHWARZ *et al.*, 2011). Der Wert für HC ist auf 1,0 gesetzt.

4.1.1.4 Glykogenbestimmung

Zur Bestimmung des Glykogengehaltes von *Synechocystis*-Zellen, die einem C_i-Mangel ausgesetzt sind, wurden WT-Kulturen einem HC/LC-Shifts (→ 3.4) unterzogen und die Glykogenbestimmung mittels Anthron (→ 3.7) genommen. Der Gehalt an Glykogen während der ersten 6 h nach Umstellung auf LC noch konstant (→ Abbildung 10). Änderungen im Glykogengehalt in *Synechocystis* nach Transfer von HC zu LC.

Abbildung 11. Verifizierung des Genotyps der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhR$ mittels PCR. (Abbildung 10). Erst im Anschluss findet verstärkt der Abbau von Glykogen statt. Nach 24 h LC unterliegt der Glykogen-Gehalt einer eindeutig signifikanten Verminderung um 99 %.

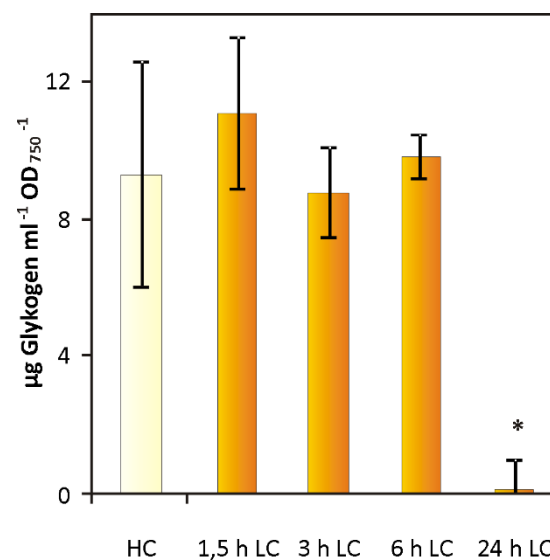


Abbildung 28. Änderungen im Glykogengehalt in *Synechocystis* nach Transfer von HC zu LC.

4.1.2 Modulation im Transkriptom unter CO₂-Mangel

Für die vergleichende Untersuchung an *Synechocystis* und *Synechococcus* zur Identifizierung möglicher Parallelen in LC-induzierten Veränderungen im Transkriptom, wurden zwei unabhängige Datensätze herangezogen:

- (1) EISENHUT *et al.* (2007) enthält die Daten der Transkriptom-Analyse an *Synechocystis*.
- (2) Aus SCHWARZ *et al.* (2011) wurden die Vergleichswerte für *Synechococcus* entnommen.

4.1.2.1 CO₂-Konzentrierungsmechanismus

Die Beobachtung der Transkription der C_i-Transportergene für BCT1, SbtA und NDH-1₃ bietet die einfachste Möglichkeit, eine eindeutige Aussage über das Vorliegen einer CO₂-Mangelbedingung treffen zu können und stellt folglich ein zuverlässiges Kontrollsystem dar. Die Analyse des Transkriptoms in *Synechocystis* und *Synechococcus* unter LC-Bedingungen legt – in Übereinstimmung mit der Literatur – Stamm-übergreifend gesteigerte Transkriptionsraten für die Gene von BCT1, SbtA und NDH-1₃ offen (→ Tabelle 10). In *Synechococcus* fallen die relativen Transkriptmengen der Gene allerdings nach 24 h unter LC bereits wieder auf das Ausgangsniveau zurück, wohingegen in *Synechocystis* der relativer Transkriptgehalt auch nach 24 h noch erhöht bleibt.

Die Transkription von Genen, die carboxysomale Hüllproteine kodieren, ist dagegen übereinstimmend in beiden Cyanobakterien-Stämmen zum Zeitpunkt 24 h LC reduziert. Als Carboxysomen-assoziierte Enzyme gehen Rubisco und die CA in die Analyse der Gene des CCMs mit ein. Die Transkription der Gene für die kleine und große Untereinheit der Rubisco (*rbcL* und *rbcS*) sowie die Gene *rbcX* und *rbcR* zeigen in *Synechocystis* und *Synechococcus* keine Veränderung auf. Das Gen für die CA (1447) zeichnet sich dagegen in *Synechococcus* durch eine um das Zweifache gesteigerte Transkription nach 6 h LC aus. Nach 24 h ist der Transkriptgehalt an 1447 und dem homologen Gen in *Synechocystis* im Vergleich zum Wert unter HC unverändert.

Tabelle 6. Reaktive Veränderungen im Transkriptgehalt CCM-assoziiierter Gene in *Synechocystis* und *Synechococcus*. *Fold change*-Werte für die Transkription der Gene nach 6 h bzw. 24 h Kultivierung unter CO₂-Limitierung relativ zur Transkription bei Wachstum unter 5 % CO₂ in *Synechocystis* (EISENHUT *et al.*, 2007) und in *Synechococcus* (SCHWARZ *et al.*, 2011). Erhöhte Transkriptmengen (*fold change*-Werte $\geq 1,87$) sind in orange, reduzierte (*fold change*-Werte $\leq 0,53$) in blau hervorgehoben.

Funktion	Genname	<i>Synechocystis</i>		<i>Synechococcus</i>		
		ORF	24h	ORF	6h	24h
CO₂/HCO₃⁻-Transportsysteme						
BCT1	<i>cmpA</i>	<i>slr0040</i>	212,31	1488	24,69	0,86
	<i>cmpB</i>	<i>slr0041</i>	100,43	1489	21,44	0,79
	<i>porB</i>	<i>slr0042</i>	83,87			
	<i>cmpC</i>	<i>slr0043</i>	38,59	1490	13,36	0,49
	<i>cmpD</i>	<i>slr0044</i>	35,75	1491	17,83	0,88
	<i>cmpR</i>	<i>sll0030</i>	3,78	1310	2,47	1,11
SbtA	<i>sbtA</i>	<i>slr1512</i>	28,44	1475	15,45	0,57
	<i>sbtB</i>	<i>slr1513</i>	19,97	1476	3,85	0,20
NDH-1₃	<i>ndhF3</i>	<i>sll1732</i>	34,54	2091	1,27	1,39
	<i>ndhD3</i>	<i>sll1733</i>	25,99	2092	9,87	0,47
	<i>cupA, chpY</i>	<i>sll1734</i>	23,43	2093	8,66	0,72
		<i>sll1735</i>	10,93	2094	10,88	1,06
	<i>ndhR</i>	<i>sll1736</i>	2,50			
NDH-1₄	<i>ndhF4</i>	<i>sll0026</i>	0,85	0309	1,09	0,10
	<i>ndhD4</i>	<i>sll0027</i>	0,81	0609	0,88	1,00
	<i>cupB, chpX</i>	<i>slr1302</i>	0,49	0308	1,50	1,01
BicA	<i>bicA</i>	<i>sll0834</i>	0,43	–	–	–
Carboxysomale Hüllproteine						
	<i>ccmK2</i>	<i>sll1028</i>	0,41	–	–	–
	<i>ccmK1</i>	<i>sll1029</i>	0,68	1421	1,72	0,03
	<i>ccmL</i>	<i>sll1030</i>	0,44	1422	1,70	0,16
	<i>ccmM</i>	<i>sll1031</i>	0,31	1423	1,07	0,19
	<i>ccmN</i>	<i>sll1032</i>	0,26	1424	1,07	1,13
		<i>sll1033</i>	0,49	–	–	–
	<i>ccmK3</i>	<i>slr1838</i>	0,49	0284	0,71	0,24
	<i>ccmK4</i>	<i>slr1839</i>	0,29	0285	0,84	0,47
		<i>slr1840</i>	0,41	–	–	–
	<i>ccmO</i>	<i>slr0436</i>	1,13	1425	1,43	0,56
Enzyme						
RubisCO	<i>rbcL</i>	<i>slr0009</i>	0,77	1426	1,64	0,17
	<i>rbcX</i>	<i>slr0011</i>	0,77	1535	0,68	1,55
	<i>rbcS</i>	<i>slr0012</i>	0,81	1427	1,69	0,06
	<i>rbcR, ycf30</i>	<i>sll0998</i>	1,54	–	–	–
Carbonatanhydrase	<i>ccaA</i>	<i>slr1347</i>	0,57	1447	2,37	1,44

4.1.2.2 Photorespiratorischer 2PG-Metabolismus

Die Gene für photorespiratorische Enzyme in *Synechococcus* wurden, beruhend auf Aminosäure-Sequenzvergleichen mit den bereits aus *Synechocystis* von Eisenhut *et al.* (2008) annotierten Genen bestimmt. Eine Auflistung sowie eine Gegenüberstellung mit dem zugehörigen E-value-Werten der homologen Gene aus *Synechocystis* und *Synechococcus* befindet sich in Form von Tabelle 16 im Anhang. In Abweichung zu *Synechocystis*, dessen Genom zwei Gene (*sll0404* und *slr0806*) für eine Glykolat-Dehydrogenase-Untereinheit GlcD enthält, weist das Genom von *Synechococcus* mit *0276* nur ein putatives Gen für GlcD auf. Bezüglich kodierender Gene für die Phosphoglykolat-Phosphatase (PGPase) existieren in Analogie zu den *Synechocystis*-Genen *sll1349* und *slr1762* in *Synechococcus* die homologen Gene *2613* und *0693*. Zusätzlich weist *Synechocystis* mit *slr0458* ein weiteres putatives, PGPase-kodierendes Gen auf, zu dem kein homologes in *Synechococcus* zu finden ist. Überdies bietet die Datenbank kegg (www.genome.jp/kegg) einen Anhaltspunkt für die Anwesenheit einer dritten putativen PGPase in *Synechococcus* in Gestalt von *0217*. Hervorzuheben ist die Abwesenheit einer der Glycerat-2-Kinase aus *Synechocystis* ähnlichen Glycerat-Kinase in *Synechococcus*. BLAST-Analysen auf der Basis der Aminosäuresequenz der Glycerat-Kinase aus *Arabidopsis thaliana* (*At1g80380*; BOLDT *et al.*, 2005) weisen jedoch in *Synechococcus* das Gen *0996* als putative Glycerat-3-Kinase aus.

Ausgehend von den *in silico* identifizierten Genen für die Synthese von 2PG-abbauenden Enzymen, wurde anschließend die Transkription derselben unter LC betrachtet (→ Tabelle 7). Eine deutliche Induktion von Genen des in Pflanzen vertretenden C2-Zyklus bleibt in *Synechocystis* 24 h nach Umstellung auf LC aus. Die Gene für die Glykolat-Dehydrogenase, den Glycin-Dekarboxylase-Komplex sowie für die Glycerat-Kinase zeigen sogar eine Herabsetzung der Transkriptmenge unter LC. Eine Ausnahme bildet mit einer verdreifachten Transkriptmenge das Gen *slr1556*, das vermutlich eine Hydroxypyruvat Reduktase kodiert. In *Synechococcus* zeigt sich nach 6-stündiger LC-Kultivierung ein ähnliches Bild. Die Gene für den pflanzlichen 2PG-Abbauweg zeigen mit einer Ausnahme keine verstärkte Transkription. Das für eine putative PGPase-kodierende Gen *0217* weist einen 6-fachen Anstieg im Transkriptgehalt auf. Im Gegensatz zu *Synechocystis* zeigt sich in *Synechococcus* 24 h nach LC eine erhöhte Transkriptmenge des PGPase-kodierenden Genes *2613* sowie der beiden Gene *2046* und *2308*, die Komponenten des Glycin-Dekarboxylase-Komplexes darstellen.

In *Synechocystis* zeichnet sich für das Gen *sll1981* der Glyoxylat-Carboligase – ein Element des in Bakterien vertretenen Glycerat-Weges – eine unter LC gesteigerte Transkriptmenge ab, während in *Synechococcus* das homologe Gen *0139* einen um 50 % verminderten relativen Transkriptgehalt erkennen lässt. Die beiden in *Synechocystis* und *Synechococcus* vorkommenden, homologen Gene *sll1358* und *2388*, die eine putative Oxalat-Dekarboxylase kodieren, sind jeweils durch eine Verdopplung der Transkriptmenge 24 h nach dem HC/LC-Shift gekennzeichnet. Dementsprechend weisen die Transkriptom-Analysen darauf hin, dass in *Synechocystis* und *Synechococcus* unter LC der Abbau von 2PG verstärkt über den Glycerat-Weg sowie über die Dekarboxylierung vermittelt wird.

Tabelle 7. Relative Veränderungen im Transkriptgehalt photorespiratorischer Enzyme in *Synechocystis* und *Synechococcus*. *Fold change*-Werte für die Transkription der Gene nach 6 h bzw. 24 h Kultivierung unter LC relativ zur Transkription bei Wachstum unter HC. Die Werte für *Synechocystis* wurden EISENHUT *et al.* (2007) entnommen. Die *Synechococcus*-Werte sind Gegenstand der Publikation SCHWARZ *et al.* (2011). Erhöhte Transkriptmengen (*fold change*-Werte $\geq 1,87$) sind in orange, reduzierte (*fold change*-Werte $\leq 0,53$) in blau hervorgehoben.

Enzym	Genname	<i>Synechocystis</i>		<i>Synechococcus</i>			
		ORF	24 h	ORF	6 h	24 h	
C2-Zyklus							
2-Phosphoglykolat-Phosphatase (PGP)	<i>cbbZp</i>	<i>sll1349</i>	0,72	2613	1,04	2,00	
		<i>slr1762</i>	0,70	0693	0,69	0,51	
		<i>slr0458</i>	0,91				
Glykolat-Dehydrogenase (GlcD)	<i>glcD, glcD1</i>	<i>sll0404</i>	1,60	0217	6,22	0,19	
		<i>sll0806</i>	0,44	0276	1,10	0,54	
		<i>glcE</i>	<i>sll1189</i>	0,83	1718	0,63	0,59
		<i>glcF</i>	<i>sll1831</i>	0,80	1717	0,80	1,03
Serin/Glyoxylat-Aminotransferase Glycin-Dekarboxylase-Komplex (GDC)	<i>gcvP</i>	<i>sll1559</i>	0,38	0191	0,41	0,42	
		<i>slr0293</i>	1,14	2047	1,26	0,41	
		<i>gcvH</i>	<i>slr0879</i>	0,49	2046	1,01	2,15
		<i>gcvT</i>	<i>sll0171</i>	1,07	2308	1,05	3,29
Serin-Hydroxymethyl-Transferase (SHMT)	<i>shm, glyA</i>	<i>slr1096</i>	0,37	1198	1,52	0,97	
		<i>slr1931</i>	0,60	0282	0,22	0,87	
Hydroxypyruvat-Reduktase (HPR)	<i>serA</i>	<i>sll1908</i>	0,36	1501	0,60	0,40	
		<i>ddh</i>	<i>slr1556</i>	2,94	1347	0,79	0,16
Glycerat-Kinase (GK bzw. GLYK)	<i>6803GK</i>	<i>slr1840</i>	0,41				
		<i>7942GLYK</i>		0996	1,24	1,69	
Glycerat-Weg							
Glyoxylat-Carboligase (GCL)	<i>gcl, ilvB</i>	<i>sll1981</i>	2,29	0139	0,74	0,53	
		<i>gcl, ilvG</i>	<i>slr2088</i>	1,03			
Tartronsäuresemialdehyd-Reduktase (TSR)	<i>tsr, mmsB</i>	<i>slr0229</i>	1,11	1857	0,84	0,82	
Dekarboxylierung							
Hydroxyacid-Dehydrogenase	<i>citH, ldh</i>	<i>sll0891</i>	1,27				
Oxalat-Dekarboxylase	<i>mncA</i>	<i>sll1358</i>	2,50	2388	0,95	2,24	
Format-Dehydrogenase	<i>fdh</i>	<i>sll1359</i>	1,79	2387	1,0	1,37	

4.1.2.3 Calvin-Benson-Bassham Zyklus, OPP-Weg und Glykolyse

Der Calvin-Benson-Bassham Zyklus ist unmittelbar vom Eintreten einer CO₂-Mangelbedingung betroffen. Die vorliegenden Transkriptom-Analysen weisen nach 24 h LC für *Synechocystis* und *Synechococcus* gleichermaßen eine Invarianz oder Reduktion in der Expression von mit dem Calvin-Benson-Bassham Zyklus assoziierten Genen auf (→ Tabelle 8). Eine Ausnahme stellt in *Synechococcus* die Dreifache Zunahme der mRNA des Gens 1939 dar, welches eine Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodiert.

Die Transkription von Genen der Glykolyse sowie des OPP-Weges scheinen 24 h nach LC in *Synechocystis* nicht beeinflusst zu sein oder zeichnen sich wie die Gene *slr1124* und *slr1945* für die Phosphoglyceromutase durch eine verminderte Transkriptmenge aus. Ebenso sinkt der Transkriptgehalt von *sll1721* und *slr1934*. Vergleichsweise verhält sich beim Blick auf die relativen Werte zum Zeitpunkt 6 h das Transkriptom in *Synechococcus*. Nach 24-stündiger Kultivierung von *Synechococcus* unter LC zeigen sich allerdings eindeutige Anzeichen für eine gesteigerte Transkription einzelner Gene des OPP-Weges sowie der Glykolyse. Der Transkriptgehalt vom Gen 0592 für eine 6-Phosphofruktokinase steigt um fast das Dreifache an, ebenso ist der Gehalt der mRNA von dem eine Pyruvat-Kinase kodierenden Gen 0098 um das Vierfache erhöht. Gene der Phosphoglyceromutase 0485 und 2078 zeigen einen LC-abhängigen Anstieg der mRNA. Die Transkriptom-Daten von *Synechococcus* sprechen demnach für eine durch CO₂-Mangel vermittelte Aktivierung von neben dem Calvin-Benson-Bassham Zyklus alternativen C-assimilierenden Stoffwechselwegen wie dem OPP-Weg und der Glykolyse. Unterschiede zum Transkriptom-Muster in *Synechocystis* sind nachfolgend zu diskutieren.

Tabelle 8. Relative Veränderungen im Transkriptgehalt von Enzymen des Calvin-Benson-Bassham Zyklus, des OPP-Weges und der Glykolyse in *Synechocystis* und *Synechococcus*. *Fold change*-Werte für die Transkription der Gene nach 6 h bzw. 24 h LC relativ zur Transkription bei Wachstum unter HC. Die Werte für *Synechocystis* wurden EISENHUT *et al.* (2007) entnommen. Die *Synechococcus*-Werte sind Gegenstand der Publikation SCHWARZ *et al.* (2011). Erhöhte Transkriptmengen (*fold change*-Werte $\geq 1,87$) sind in orange, reduzierte (*fold change*-Werte $\leq 0,53$) in blau hervorgehoben.

Enzym	Genname	<i>Synechocystis</i>		<i>Synechococcus</i>		
		ORF	24 h	ORF	6 h	24 h
Calvin-Benson-Bassham Zyklus						
Phosphoglycerat-Kinase	<i>pgk</i>	<i>slr0394</i>	0,61	1116	0,45	0,35
Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	<i>gap1</i>	<i>slr0884</i>	0,86	0245	0,75	0,94
				1939	1,11	3,05
		<i>gap2</i>	0,50	1742	0,30	0,07
Triosephosphat-Isomerase	<i>tpiA</i>	<i>slr0783</i>	0,70	1261	1,14	0,13
Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase	<i>cbbA</i>	<i>sll0018</i>	0,99	1443	1,77	0,10
		<i>fda</i>	<i>slr0943</i>	1,15		
Fruktose-1,6-Bisphosphatase	<i>fbpII, fbp</i>	<i>slr0952</i>	0,87	2335	1,11	1,67
		<i>fbpI, glpX</i>	<i>slr2094</i>	0,78	0505	0,30
Transketolase		<i>sll1070</i>	0,59	0538	0,44	0,33
Ribose-5-Phosphat-Isomerase	<i>tktA</i>	<i>slr0194</i>	0,34	0584	0,60	1,07
		<i>rpiA</i>	<i>ssl2153</i>	1,39		
Ribulose-5-Phosphate-Kinase	<i>rpiB</i>	<i>sll1525</i>	0,43	0977	1,04	0,33
Ribulose-Phosphat-3-Epimerase	<i>prk</i>	<i>sll0807</i>	1,16	0604	0,42	0,14
			<i>rpe, cfxE</i>			
Glykolyse und OPP-Zyklus						
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	<i>zwf</i>	<i>slr1843</i>	1,49	2334	1,26	0,32
Glukose-6-Phosphat-Isomerase		<i>slr1349</i>	0,58	2029	1,0	0,66
6-Phosphofruktokinase	<i>pfkA</i>	<i>sll0745</i>	1,41	0592	0,81	2,71
		<i>sll1196</i>	1,26			
Phosphoglyceromutase	<i>gpmB</i>	<i>sll0395</i>	0,90	0469	0,96	0,71
		<i>slr1124</i>	0,29	0485	0,46	2,74
		<i>yibO</i>	0,51	2078	0,58	15,42
Phosphoglycerat-Hydratase	<i>eno</i>	<i>slr0752</i>	0,52	0639	0,43	0,43
Pyruvat-Kinase	<i>pykF</i>	<i>sll0587</i>	1,21	0098	0,86	3,82
		<i>sll1275</i>	0,73			
Pyruvat-Dehydrogenase	<i>pdhB</i>	<i>sll1721</i>	0,43	0143	0,82	0,61
		<i>slr1934</i>	0,52	1944	0,82	0,54
Acetyl-CoA Enzym	<i>odhB</i>	<i>sll1841</i>	0,40	1068	0,94	0,14

4.1.2.4 TCA-Zyklus und GS/GOGAT-Weg

In *Synechocystis* sind keine Veränderungen in der Transkription TCA-assoziiierter Gene unter LC-Bedingungen zu beobachten (→ Tabelle 9). In gleicher Weise ist die Transkription der homologen Gene aus *Synechococcus* nach 6-stündigem CO₂-Mangel invariant, zeichnet sich aber nach 24 h LC durch eine gesteigerte Synthese der mRNA vom Gen *0641* aus, das für eine Succinat-Dehydrogenase kodiert, die die Umsetzung von Fumarat in Succinat katalysiert.

Das über den TCA generierte 2OG kann über den GS/GOGAT-Weg in die N-Assimilation eingehen. Die Transkriptmengen der Gene *slr0288* und *slr1756* für die Glutamin-Synthetase (GS) aus *Synechocystis* sowie die Transkriptmengen für die homologen Gene *0169* und *2156* aus *Synechococcus* sind um die Hälfte reduziert. Lediglich das Gen *0890* für die Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase aus *Synechococcus* wies nach 24 h LC-Kultivierung eine leicht verstärkte Expression auf.

Tabelle 9. Relative Veränderungen im Transkriptgehalt von Enzymen des TCA-Zyklus und des GS/GOGAT-Weges in *Synechocystis* und *Synechococcus*. *Fold change*-Werte für die Transkription der Gene nach 6 h bzw. 24 h LC relativ zur Transkription bei Wachstum unter HC. Die Werte für *Synechocystis* wurden EISENHUT *et al.* (2007) entnommen. Die *Synechococcus*-Werte sind Gegenstand der Publikation SCHWARZ *et al.* (2011). Erhöhte Transkriptmengen (*fold change*-Werte $\geq 1,87$) sind in orange, reduzierte (*fold change*-Werte $\leq 0,53$) in blau hervorgehoben.

Enzym	Genname	<i>Synechocystis</i>		<i>Synechococcus</i>		
		ORF	24h	ORF	6h	24h
TCA Zyklus						
Citrat-Synthase	<i>gltA</i>	<i>sll0401</i>	1,69	<i>0612</i>	0,73	1,72
Aconitat-Hydratase		<i>slr0665</i>	0,85	<i>0903</i>	0,69	1,44
Isocitrat-Dehydrogenase	<i>icd</i>	<i>slr1289</i>	0,23	<i>1719</i>	0,65	0,72
Fumarat-Hydratase		<i>slr0018</i>	0,75	<i>1007</i>	0,44	0,97
Succinat-Dehydrogenase	<i>sdhB</i>	<i>sll0823</i>	0,89	<i>1533</i>	0,39	1,11
	<i>sdhB</i>	<i>sll1625</i>	1,47	<i>0314</i>	0,96	0,83
	<i>sdhA</i>	<i>slr1233</i>	1,61	<i>0641</i>	1,24	4,45
GS/GOGAT						
Glutamin-Synthetase	<i>glnN</i>	<i>slr0288</i>	0,22	<i>0169</i>	0,53	0,73
	<i>glnA</i>	<i>slr1756</i>	0,17	<i>2156</i>	0,33	0,28
			1,00	<i>2296</i>	0,91	0,21
Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase	<i>gltF</i>	<i>sll1499</i>	0,67	<i>0890</i>	1,15	1,90
	<i>gltB</i>	<i>sll1502</i>	1,73			

4.2 Untersuchungen zu Transkriptom- und Metabolom-Veränderungen in der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhR$

Der Transkriptionsregulator NdhR ist als Repressor für LC-induzierte Gene wie dem *ndhF3/ndhD3/cupA*-Operon und dem *sbtA/sbtB*-Operon bekannt. Nachfolgend werden eingehende Untersuchungen der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhR$ auf physiologischer, sowie auf transkriptioneller und metabolischer Ebene unter HC- und LC-Kultivierung vorgestellt.

4.2.1 Verifizierung des Genotyps der Mutante $\Delta ndhR$

Zur Überprüfung des Genotypes der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhR$ wurde unter Verwendung genspezifischer Oligonucleotid-Primer (\rightarrow 3.1.2) das Genfragment amplifiziert (\rightarrow 3.3.2) und elektrophoretisch aufgetrennt (\rightarrow 3.3.3). Durch die Insertion der Km^R -Kassette in den kodierenden Bereich des Genes *ndhR* (*sll1594*) vergrößert sich das zu erwartende PCR-Fragment im Vergleich zum WT-Fragment (1,1 kbp) um 1,2 kbp. Die Abwesenheit eines WT-Fragments in der Mutante weist auf deren segregierten Charakter hin. Die Abbildung 11. Verifizierung des Genotyps der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhR$ mittels PCR.

Abbildung 12. Physiologische Charakterisierung der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhR$ bei Kultivierung unter HC (5 % CO_2) und LC (0,038 % CO_2). A Wachstumsrate μ in [h^{-1}]. B Pigmentverhältnisse von Phycocyanin (PC) und Carotinoide (Car) relativ zum Chlorophyll *a* (Chla)-Gehalt. Statistische Signifikanzbestimmung mittels t-Test bei $p \leq 0,05$ (*). Abbildung 11 bestätigt den Genotyp und somit die Identität der Mutante $\Delta ndhR$. Die im Folgenden beschriebenen Beobachtungen bei der Untersuchung der Mutante stehen direkt in Verbindung mit der Abwesenheit des Transkriptionsregulators NdhR.

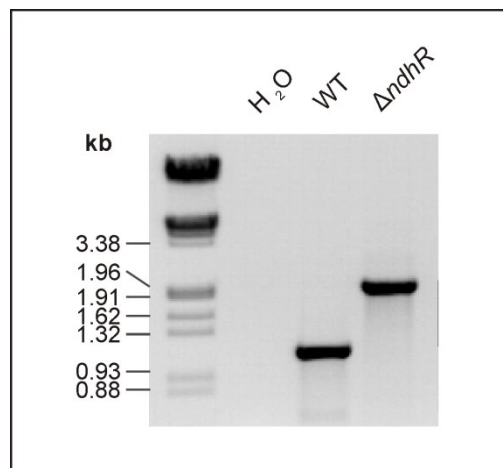


Abbildung 31. Verifizierung des Genotyps der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhR$ mittels PCR.

4.2.2 Physiologische Charakterisierung

Zunächst wurden im Anschluss an die Verifizierung des Phänotyps der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhR$ das Wachstum sowie die Pigmentverhältnisse unter HC und LC untersucht. Unter HC zeigt die Mutante das gleiche Wachstumsverhalten wie der WT. Beim Transfer von HC auf LC dagegen, ist das Wachstum von $\Delta ndhR$ im Vergleich zum WT signifikant vermindert. Bezüglich der Pigmentkonzentrationen von PC und Car ist zwischen der Mutante und dem WT kein deutlicher Unterschied zu erkennen.

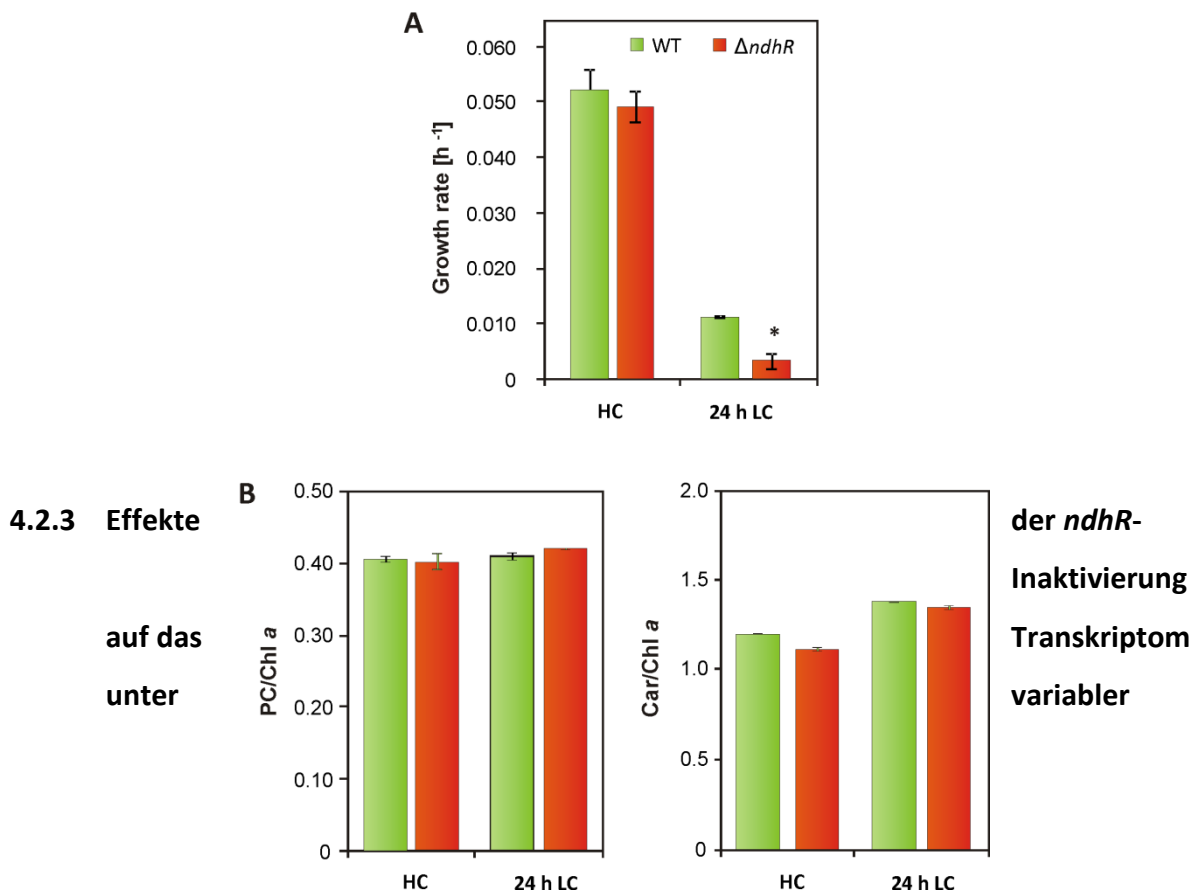


Abbildung 34. Physiologische Charakterisierung der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhR$ bei Kultivierung unter HC (5 % CO₂) und LC (0,038 % CO₂). **A** Wachstumsrate μ in [h⁻¹]. **B** Pigmentverhältnisse von Phycocyanin (PC) und Carotinoide (Car) relativ zum Chlorophyll *a* (Chl*a*)-Gehalt. Statistische Signifikanzbestimmung mittels t-Test bei $p \leq 0,05$ (*).

C_i-Verfügbarkeit

Zur Untersuchung welche Auswirkungen die Abwesenheit des Transkriptionsregulators NdhR auf das Transkriptionsmuster unter HC und LC hat, wurden Kulturen von *Synechocystis* (WT) und der Mutante $\Delta ndhR$ einem HC/LC-Shift (\rightarrow 3.4) unterzogen und zu den Zeitpunkten 0 h,

3 h und 24 h Proben für die sich anschließende Analyse mittels Microarray-Analyse genommen (→ 3.5). WANG *et al.* (2004) postulierten bereits basierend auf Real-Time-quantitative-PCR (RT-PCR) und DNA-Microarray-Analysen die Existenz eines CCM-assoziierten Regulons für den Transkriptionsregulator NdhR. Unter Betrachtung des Modells der Funktion und Rolle von NdhR sind Verschiebungen im Transkriptom der Mutante $\Delta ndhR$ unter HC-Bedingungen von besonderem Interesse (WANG *et al.*, 2004; DALEY *et al.*, 2012).

4.2.3.1 CO₂-Konzentrierungsmechanismus

Ob die Inaktivierung von *ndhR* zu einer Veränderung im Transkriptionsmuster unter HC führt, lässt sich anhand der Untersuchung bereits als NdhR-reguliert identifizierter Gene für LC-induzierbare CO₂/HCO₃⁻-Aufnahmesysteme des CCM abschätzen. Das *sbtA*-Gen (*slr1512*) sowie das *downstream*-gelegene *sbtB*-Gen (*slr1513*) zeigen in der $\Delta ndhR$ -Mutante bereits unter HC einen gesteigerten mRNA-Gehalt (→ Tabelle 10). Im WT steigt die relative Transkriptmenge von *sbtA/sbtB* erst nach 3 h bzw. 24 h LC stark an. Unter LC-Bedingungen ist für Transkriptmenge vom *sbtA/sbtB*-Operon in $\Delta ndhR$ weitere Anstieg zu beobachten.

In gleicher Weise verändert sich die Transkription des *ndhF3/ndhD3/cupA*-Operons, das die Gene *sll1732* bis *sll1736* umfasst. In Übereinstimmung zu *sbtA/sbtB* zeichnet sich die Mutante $\Delta ndhR$ durch eine Erhöhung der relativen Transkriptmenge der entsprechenden *ndhF3/ndhD3/cupA*-Gene bereits unter HC-Bedingungen aus. Im WT dagegen ist die Transkription vom *ndhF3/ndhD3/cupA*-Operon LC-reguliert und nimmt erst im Zuge der Umstellung auf LC zu. In der Mutante steigt die mRNA-Menge von *ndhF3/ndhD3/cupA* wie bei *sbtA/sbtB* unter LC weiter an.

Für das *ndhF4/ndhD4/cupB*-Operon (*sll0026*, *sll0027* sowie *slr1302*) wurde eine konstitutive Expression unabhängig der C_i-Verfügbarkeit sowohl im WT als auch in der Mutante gefunden, d.h. eine Veränderung in der Transkriptionsstärke der betreffenden Gene ist unter HC und LC nicht zu verzeichnen.

Im WT sowie in der Mutante $\Delta ndhR$ zeigt sich gleichermaßen keine LC-induzierte Transkription des BicA-kodierenden Gen (*sll0834*). Hingegen ist die Transkriptmenge von *bicA* in der Mutante im Vergleich zum WT generell und unabhängig von der CO₂-Verfügbarkeit um das Zwei- bis Siebenfache erhöht.

Ferner zeigt der Transkriptom-Vergleich von *Synechocystis* (WT) und $\Delta ndhR$ keine Unterschiede bei der Transkription der Gene des CO₂-abhängigen *cmp*-Operons. Allerdings ist

im WT die relative Transkriptmenge für das *cmpA*-Gen (*slr0040*) bereits nach 3 h Kultivierung unter LC um das 40-fach erhöht, während in der Mutante der *cmpA*-Transkriptlevel nur um das Vierfach ansteigt. Allerdings scheint die *cmpA*-Induktion in der Mutante nur zeitlich verzögert zu sein, da sowohl im WT als auch in $\Delta ndhR$ nach 24 h LC-Bedingungen eine relativ gleich starke Induktion für *cmpA* von 26- bzw. 30-fach relativ zum HC-Wert gemessen wurde. Die die carboxysomalen Hüllproteine kodierenden Gene des *ccm*-Operons sind ebenso wie die Gene für die in den Carboxysomen lokalisierten Enzyme Rubisco (*slr0009* - *slr0012*, *slr0998*) und CA (*slr1347*) im WT und in der Mutante nicht CO₂-reguliert. Die zugehörigen Werte der Gene tendieren unter HC und LC für den WT und $\Delta ndhR$ um den Wert 1.

Tabelle 10. Relative transkriptionelle Veränderungen CCM-assoziiierter Gene in der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhR$. Relative RNA-Mengen (*fold changes*) unter 3 h und 24 h LC (0,038 % CO₂) im Vergleich zur Transkription unter HC (5 % CO₂) und dem WT. Erhöhte Transkriptmengen (*fold change-Werte* $\geq 1,87$) sind in orange, reduzierte (*fold change-Werte* $\leq 0,53$) in blau hervorgehoben. Übereinstimmungen mit WANG *et al.* (2004) sind mit ^w gekennzeichnet.

Funktion	Genname	ORF	WT-LC/ WT-HC		$\Delta ndhR$ -HC/ WT-HC	$\Delta ndhR$ -LC/ $\Delta ndhR$ -HC	
			3 h	24 h		3 h	24 h
CO₂/HCO₃⁻-Transportsysteme							
BCT1	<i>cmpA</i>	<i>slr0040</i>	38,76	26,60	1,00	3,87	29,80
	<i>cmpB</i>	<i>slr0041</i>	35,17	25,25	0,98	4,00	26,99
	<i>porB</i>	<i>slr0042</i>	23,23	18,48	0,98	3,46	20,22
	<i>cmpC</i>	<i>slr0043</i>	18,85	12,48	0,99	3,15	13,80
	<i>cmpD</i>	<i>slr0044</i>	15,86	13,50	0,99	2,86	13,21
	<i>cmpR</i>	<i>sll0030</i>	1,85	1,26	0,99	1,34	1,37
SbtA	<i>sbtA</i>	<i>slr1512</i>	23,89	13,49	3,38 ^w	3,66	11,71
	<i>sbtB</i>	<i>slr1513</i>	12,14	6,40	2,21 ^w	3,22	8,47
NDH-1₃	<i>ndhF3</i>	<i>sll1732</i>	29,01	21,53	6,86 ^w	2,23	5,88
	<i>ndhD3</i>	<i>sll1733</i>	21,40	17,85	6,20 ^w	1,90	5,51
	<i>cupA, chpY</i>	<i>sll1734</i>	12,57	11,54	4,87 ^w	1,41	4,46
		<i>sll1735</i>	8,04	5,45	3,41 ^w	1,41	3,22
	<i>ndhR</i>	<i>sll1736</i>	3,40	1,96	1,76	1,38	2,06
		<i>sll1594</i>	2,39	2,15	0,71	1,03	0,99
NDH-1₄	<i>ndhF4</i>	<i>sll0026</i>	0,86	0,83	1,00	0,94	0,76
	<i>ndhD4</i>	<i>sll0027</i>	1,78	0,87	0,82	1,87	1,73
	<i>cupB, chpX</i>	<i>slr1302</i>	0,47	0,48	1,05	0,86	1,00
BicA	<i>bicA</i>	<i>sll0834</i>	0,95	0,71	07,23 ^w	0,77	0,20
Carboxysomale Hüllproteine							
	<i>ccmK2</i>	<i>sll1028</i>	1,08	1,19	1,01	1,14	1,12
	<i>ccmK1</i>	<i>sll1029</i>	0,99	1,20	1,04	1,05	1,05
	<i>ccmL</i>	<i>sll1030</i>	1,30	1,00	0,97	0,99	0,94
	<i>ccmM</i>	<i>sll1031</i>	0,70	0,92	1,00	0,79	0,68
	<i>ccmN</i>	<i>sll1032</i>	0,70	0,77	1,04	0,68	0,55
		<i>sll1033</i>	0,91	0,92	1,05	0,85	0,78
	<i>ccmK3</i>	<i>slr1838</i>	0,65	0,59	0,99	0,83	0,60
	<i>ccmK4</i>	<i>slr1839</i>	0,69	0,44	1,05	0,87	0,38
		<i>slr1840</i>	0,49	0,35	1,02	0,66	0,29
	<i>ccmO</i>	<i>slr0436</i>	0,83	1,11	0,99	0,87	1,11
Enzyme							
RubisCO	<i>rbcL</i>	<i>slr0009</i>	1,52	1,10	1,10	1,18	1,10
	<i>rbcX</i>	<i>slr0011</i>	1,74	1,34	1,08	1,25	1,31
	<i>rbcS</i>	<i>slr0012</i>	1,94	1,52	1,08	1,45	1,57
	<i>rbcR, ycf30</i>	<i>sll0998</i>	1,26	1,27	1,01	1,20	1,31
Carbonat-anhydrase	<i>ccaA</i>	<i>slr1347</i>	0,66	0,70	1,05	0,73	0,72

4.2.3.2 Photorespiratorischer 2PG-Metabolismus

Die Gegenüberstellung der Transkriptom-Analyse an *Synechocystis* (WT) und $\Delta ndhR$ zeigt summa summarum keine Unterschiede oder Verschiebungen im Transkriptionsmuster sowohl unter HC als auch unter LC Bedingungen (\rightarrow Tabelle 11). Die relativen Transkriptmengen der in die Photorespiration involvierten Gene schwanken in der Mutante unter HC um den Wert 1,0 und lassen somit keine Änderungen erkennen.

Des Weiteren spiegeln die Daten das bereits aus den Ausführungen unter Abschnitt 4.1.1.1 bekannte Verhaltensmuster von Genen für photorespiratorische Enzyme wider. Das *glcD2*-Gen (*slr0806*) sowie das die Serin/Glyoxylat-Aminotransferase kodierende Gen *sll1559* und die Gene *gcvH* (*slr0879*) und *gcvL* (*slr1096*), als Bestandteile des Glycin-Dekarboxylase-Komplexes, zeichnen sich hinsichtlich ihrer Transkription 24 h nach Umstellung auf LC im WT und der Mutante durch eine Verminderung der mRNA-Menge aus. Gleichermäßen sinkt die Transkriptmenge des Gens *sll1908* für die Hydroxypyruvat-Reduktase sowie des Glycerat-Kinase kodierenden Gens *slr18040* unter den Schwellenwert von 0,53 und unterliegt somit einer CO₂-Mangel-bedingten Reduktion der Transkriptionsrate. Eine Ausnahme stellt das Gen *slr1556* – ein Gen für eine weitere Hydroxypyruvat Reduktase – dar, welches mit einem Wert von 1,20 nach 24 h LC von *Synechocystis* tendenziell verstärkt transkribiert wird. Ebenfalls zeichnet sich das Gen *sll1981*, das die Glyoxylat-Carboligase kodiert, durch eine leicht erhöhte Transkriptmenge aus. Ferner weisen die Gene *sll1358* und *sll1359* für die Oxalat-Dekarboxylase sowie Format-Dekarboxylase eine verstärkte Transkription unter CO₂-Mangel auf.

Demzufolge weist die Transkriptom-Analyse darauf hin, dass NdhR an der Regulation der Transkription von Genen, die photorespiratorische Enzyme kodieren, nicht beteiligt ist. Zudem unterstützen die hier vorliegenden Daten, die Hypothese, dass der 2PG-Abbau unter LC unter Beteiligung aller drei Wege des photorespiratorischen 2PG-Metabolismus stattfindet, vermutlich mit einer stärkeren Beteiligung des Glycerat-Weges sowie der Dekarboxylierung von Glyoxylat.

Tabelle 11. Relative transkriptionelle Veränderungen von Genen des photorespiratorischen 2PG-Metabolismus in der Mutante $\Delta ndhR$ unter 3 h und 24 h LC im Vergleich zur Transkription unter HC und dem WT. Erhöhte Transkriptmengen (*fold change-Werte* $\geq 1,87$) sind in orange, reduzierte (*fold change-Werte* $\leq 0,53$) in blau hervorgehoben.

Enzym	Genname	ORF	WT-LC/ WT-HC		$\Delta ndhR$ -HC/ WT-HC		$\Delta ndhR$ -LC/ $\Delta ndhR$ -HC	
			3 h	24 h	3 h	24 h	3 h	24 h
C2-Zyklus								
Phosphoglykolate- Phosphatase	<i>cbbZp</i>	<i>sll1349</i>	0,87	0,85	1,00	0,97	0,92	
		<i>slr1762</i>	0,88	0,86	1,03	0,90	0,81	
		<i>slr0458</i>	0,87	0,86	1,00	0,93	0,85	
Glykolate- Dehydrogenase	<i>glcD</i> ,	<i>sll0404</i>	1,37	1,37	1,02	1,17	1,54	
		<i>glcD1</i>	0,59	0,61	0,96	0,67	0,56	
		<i>glcD2</i>	0,81	0,92	0,97	0,85	0,87	
		<i>glcE</i>	1,05	0,84	1,00	1,08	0,82	
		<i>glcF</i>						
Serin/Glyoxylat- Aminotransferase		<i>sll1559</i>	0,41	0,40	1,02	0,63	0,40	
		<i>slr0293</i>	1,18	0,98	0,91	1,19	1,28	
Glycin-Dekarboxylase- Komplex	<i>gcvP</i>	<i>slr0879</i>	0,91	0,51	0,99	0,91	0,55	
		<i>gcvH</i>	1,13	1,05	0,97	1,11	1,19	
		<i>gcvT</i>	0,67	0,57	1,08	0,73	0,50	
		<i>gcvL,phdD</i>						
Serin-Hydroxymethyl- Transferase	<i>shm, glyA</i>	<i>sll1931</i>	0,65	0,72	1,07	0,74	0,71	
Hydroxypyruvat- Reduktase	<i>serA</i>	<i>sll1908</i>	0,61	0,45	1,08	0,71	0,38	
		<i>slr1556</i>	1,06	1,20	0,96	0,99	1,32	
Glycerat-Kinase	<i>6803GK</i> <i>7942GLYK</i>	<i>slr1840</i>	0,49	0,35				
					1,02	0,66	0,29	
Glycerat-Weg								
Glyoxylat-Carboligase	<i>gcl,ilvB</i> <i>gcl, ilvG</i>	<i>sll1981</i>	1,07	1,63	0,92	0,93	1,80	
		<i>slr2088</i>	0,73	1,23	0,94	0,86	1,27	
Tartronsäuresemi- aldehyd-Reduktase	<i>tsr, mmsB</i>	<i>slr0229</i>	0,93	0,99	1,01	0,96	1,12	
Decarboxylierung								
Hydroxyacid- Dehydrogenase	<i>citH, ldh</i>	<i>sll0891</i>	1,16	1,15	0,97	1,02	1,15	
		<i>mncA</i>	1,71	1,77	1,06	1,54	1,29	
		<i>fdh</i>	1,27	1,44	1,04	1,24	1,20	

4.2.3.3 Calvin-Benson-Bassham Zyklus, OPP-Weg und Glykolyse

Im Weiteren werden die Transkriptionsmuster von Genen für den cyanobakteriellen Primärstoffwechsel vom WT und der Mutante gegenübergestellt (→ Tabelle 12). Die *fold change*-Werte der Gene, die die Enzyme für den Calvin-Benson-Bassham Zyklus, die Glykolyse sowie den OPP-Weg kodieren, zeigen in $\Delta ndhR$ im Vergleich zum WT unter HC keine Veränderungen auf. Die relativen Transkriptwerte $\Delta ndhR\text{-HC}/\text{WT-HC}$ tendieren um 1,0.

Ferner weisen vor allem die Gene des Calvin-Benson-Bassham Zyklus im WT und der Mutante unter LC eher eine Reduktion der Transkriptmengen auf. Ebenso scheinen die mit der Glykolyse und dem OPP-Weg assoziierten Gene in *Synechocystis* ebenfalls nicht generell LC-reguliert zu sein. Eine Ausnahme stellt das Gen *slr1843* (*zwf*) dar, das die Basis für die Synthese der Glc-6-Dehydrogenase darstellt. Beide Kulturen zeigen nach 3 h LC tendenziell eine Erhöhung der Transkriptmengen, was auf einen aktivierten OPP-Weg hindeutet.

Dementsprechend ist eine NdhR-abhängige Regulation der Gene des Primärstoffwechsels unter LC auszuschließen. Weiterhin untermauert die Transkriptom-Analyse die unter Abschnitt 4.1.2.3 für *Synechocystis* dargestellten Beobachtungen.

Tabelle 12. Relative transkriptionelle Veränderungen von Genen des Calvin-Benson-Bassham Zyklus, dem OPP-Zyklus und der Glykolyse in der Mutante $\Delta ndhR$ unter 3 h und 24 h LC im Vergleich zur Transkription unter HC und dem WT. Erhöhte Transkriptmengen (**fold change-Werte $\geq 1,87$**) sind in orange, reduzierte (**fold change-Werte $\leq 0,53$**) in blau hervorgehoben.

Enzym	Genname	ORF	WT-LC/ WT-HC		$\Delta ndhR$ -HC/ WT-HC	$\Delta ndhR$ -LC/ $\Delta ndhR$ -HC	
			3 h	24 h		3 h	24 h
Calvin-Benson-Bassham Zyklus							
Phosphoglycera- Kinase	<i>pgk</i>	<i>slr0394</i>	0,70	0,74	1,01	0,83	0,61
Glyceraldehyd-3-P- Dehydrogenase	<i>gap1</i>	<i>slr0884</i>	1,05	0,86	0,86	1,21	0,93
	<i>gap2</i>	<i>sll1342</i>	0,63	0,65	1,02	0,99	0,59
Triosephosphat- Isomerase	<i>tpiA</i>	<i>slr0783</i>	0,47	0,35	1,02	0,61	0,32
Fruktose-1,6-Bisphosphat	<i>cbbA</i>	<i>sll0018</i>	1,06	0,94	1,07	0,91	0,95
Aldolase	<i>fda</i>	<i>slr0943</i>	0,81	0,85	1,02	0,88	0,86
Fruktose-1,6- Bisphosphatase	<i>fbplI, fbp</i>	<i>slr0952</i>	1,03	1,04	1,03	0,93	1,00
	<i>fbpl, glpX</i>	<i>slr2094</i>	0,93	0,84	1,03	1,14	0,67
Transketolase	<i>tktA</i>	<i>sll1070</i>	0,36	0,43	0,97	0,60	0,32
Ribose-5-Phosphat- Isomerase	<i>rpiA</i>	<i>slr0194</i>	0,34	0,30	1,07	0,49	0,27
	<i>rpiB</i>	<i>ssl2153</i>	1,06	1,03	1,00	0,95	1,01
Ribulose-5-Phosphate- Kinase	<i>prk</i>	<i>sll1525</i>	0,81	0,58	1,02	0,95	0,57
Ribulose-Phosphat-3- Epimerase	<i>rpe, cfxE</i>	<i>sll0807</i>	1,03	1,16	1,10	1,02	0,77
Glykolyse und OPP							
Glykose-6-Phosphate-1- Dehydrogenase	<i>zwf</i>	<i>slr1843</i>	2,32	1,81	1,00	1,84	1,79
Glykose-6-Phosphat- Isomerase		<i>slr1349</i>	1,00	0,77	1,01	0,99	0,70
6-Phosphofruktokinase	<i>pfkA</i>	<i>sll0745</i>	1,08	1,14	1,06	1,01	1,09
	<i>pfkA</i>	<i>sll1196</i>	1,19	1,11	0,99	1,19	0,98
Phosphoglyceromutase		<i>sll0395</i>	1,06	1,16	1,05	1,08	1,14
	<i>gpmB</i>	<i>slr1124</i>	0,94	1,05	0,98	0,99	1,07
	<i>yibO</i>	<i>slr1945</i>	1,10	0,93	1,01	1,06	0,73
Phosphoglycerat- Hydratase	<i>eno</i>	<i>slr0752</i>	1,19	0,67	0,92	1,19	0,70
Pyruvat-Kinase	<i>pykF</i>	<i>sll0587</i>	1,42	1,14	1,02	1,15	1,10
	<i>pykF</i>	<i>sll1275</i>	0,60	0,65	1,02	0,74	0,64
Pyruvat-Dehydrogenase	<i>pdhB</i>	<i>sll1721</i>	0,65	0,56	0,99	0,78	0,54
		<i>slr1934</i>	0,83	0,56	1,05	0,91	0,59
Acetyl-CoA Enzym	<i>odhB</i>	<i>sll1841</i>	0,83	0,73	1,05	0,86	0,70

4.2.3.4 TCA-Zyklus und GS/GOGAT-Weg

Bei Betrachtung der Transkription von Genen für Enzyme des TCA-Zyklus sowie des GS/GOGAT-Weges ergaben sich ebenfalls keine Änderungen in $\Delta ndhR$ sowohl unter HC als auch LC (\rightarrow Tabelle 13). Die relativen Transkriptmengen von $\Delta ndhR$ unter HC liegen um den Wert 1,0. Die Transkription von Genen des TCA-Zyklus zeigen keine eindeutigen Veränderungen auf. Eine Ausnahme stellt das Gen *slr1289 (icd)*, kodierend für die Isocitrat Dehydrogenase dar, das nach 24 h LC in WT und $\Delta ndhR$ reduzierte Transkriptmengen aufwies. Die Gene *slr0288 (glnN)* und *slr1756 (glnA)*, die Untereinheiten der Glutamin Synthetase kodieren, sind unter LC im WT und der Mutante gleichermaßen in ihrer Transkription verringert.

Die Ergebnisse der durchgeführten Transkriptom-Untersuchung legen offen, das NdhR keinen Einfluß auf die Transkription von Genen des TCA-Zyklus sowie des GS/GOGAT-Weges hat. Zudem unterliegen Gene des N-Stoffwechsels unter LC einer verminderten Transkriptionsrate.

Tabelle 13. Relative transkriptionelle Veränderungen von Genen des TCA-Zyklus und des GS/GOGAT-Weges in der Mutante $\Delta ndhR$ unter 3 h und 24 h LC (0,038 % CO₂) im Vergleich zur Transkription unter HC (5 % CO₂) und dem WT. Erhöhte Transkriptmengen (*fold change-Werte* $\geq 1,87$) sind in orange, reduzierte (*fold change-Werte* $\leq 0,53$) in blau hervorgehoben.

Enzym	Genname	ORF	WT-LC/ WT-HC		$\Delta ndhR$ -HC/ WT-HC		$\Delta ndhR$ -LC/ $\Delta ndhR$ -HC	
			3 h	24 h			3 h	24 h
TCA Zyklus								
Citrat-Synthase	<i>gltA</i>	<i>slI0401</i>	1,04	1,39	1,05	0,95	1,49	
Aconitat-Hydratase		<i>slr0665</i>	0,89	0,82	1,04	0,87	0,85	
Isocitrat- Dehydrogenase	<i>icd</i>	<i>slr1289</i>	0,82	0,54	1,07	0,93	0,45	
		<i>slr0018</i>	1,61	1,06	1,16	1,17	1,12	
Fumarat-Hydratase	<i>sdhB</i>	<i>slI0823</i>	0,76	0,69	1,03	0,88	0,70	
Succinat- Dehydrogenase	<i>sdhB</i>	<i>slI1625</i>	1,24	1,16	1,01	1,12	1,07	
	<i>sdhA</i>	<i>slr1233</i>	1,49	1,41	0,98	1,07	1,34	
GS/GOGAT								
Glutamin- Synthetase	<i>glnN</i>	<i>slr0288</i>	0,45	0,49	0,87	0,82	0,46	
	<i>glnA</i>	<i>slr1756</i>	0,22	0,22	0,97	0,48	0,13	
	<i>gltF</i>	<i>slI1499</i>	0,69	0,71	1,04	0,64	0,75	
Glutamat-Synthase	<i>gltB</i>	<i>slI1502</i>	1,14	1,34	0,94	1,10	1,46	

4.2.3.5 Beeinflussung der Transkription von weiteren Genen in der Mutante $\Delta ndhR$

4.2.3.5.1 Zunahme der Transkriptmenge

Von besonderem Interesse war die Identifizierung von weiteren Unterschieden im Transkriptom der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhR$ im Vergleich zum WT, die nicht bereits aus WANG *et al.* (2004) bekannt sind. Ihre Identifizierung würde eine Erweiterung des bereits bekannten Modells der Funktion des Regulons NdhR gestatten.

Die miteinander in einem Cluster organisierten Gene *slr2006* bis *slr2013* sowie *ssr3409* und *ssr3410* zeichnen sich durch eine verstärkte Transkription in $\Delta ndhR$ unter HC aus (→ Tabelle 14). Diese Gene sind in der Literatur auch als *ndhD5/ndhD6*-Operon bekannt und kodieren NDH-Untereinheiten (DALEY *et al.*, 2012). Weiterhin ist zu erkennen, dass im WT unter LC die Transkription vom *ndhD5/ndhD6*-Operon verstärkt stattfindet. Jedoch sind die Transkriptmengen in der Mutante $\Delta ndhR$ auch unter 24 h LC im Vergleich zum WT stark erhöht.

Ebenso verhält es sich mit dem relativen Transkriptgehalt der Gene *slr1592* und *sll0529*. Das Gen *slr1592* ist als putative Pseudouridin Synthase annotiert. Bei *sll0529* handelt es sich um ein hypothetisches Protein unbekannter Funktion. In diesem Fall ist für $\Delta ndhR$ ebenfalls eine erhöhte Transkription der entsprechenden Gene unter HC und LC zu verzeichnen. Eine LC-induzierte Transkriptionssteigerung im WT ist jedoch nicht zu beobachten.

Das aus den Genen *slr1259* bis *slr1262* bestehende Operon wird im WT unter limitierter CO₂-Verfügbarkeit in seiner Transkription unterdrückt, d.h. die Transkriptmenge sinkt unter den Schwellenwert von 0,53. Dagegen ist für die Mutante nach 24 h LC für die Gene des Operons keine deutliche Reduktion zu verzeichnen. Ihre relative Expression bleibt gleich. Das führt dazu, dass in 24 h LC kultivierten Zellen der relative mRNA-Gehalt dieses Operons in der Mutante im Vergleich zum WT erhöht ist. Unter HC entspricht die Transkriptmenge in $\Delta ndhR$ der im WT. Dementsprechend führt im WT die Anwesenheit von NdhR unter LC zur Repression des Genclusters *slr1259* bis *slr1262*. In der Mutante bleibt die Transkription dagegen unverändert. Gleichermäßen verhält sich die Transkription der Gene *ssl3769* und *slr1535*. Die Genprodukte von *slr1259* bis *slr1262* sowie *ssl3769* und *slr1535* sind als hypothetische Proteine annotiert, deren Funktion unbekannt ist.

Dementsprechend sind für die Mutante $\Delta ndhR$ folgende Veränderungen im Transkriptionsmuster weiterer Gen hervorzuheben: 1. Die Erhöhung der Transkriptmenge des

Genclusters *slr2006-slr2013/ssr3409/ssr3410* sowie der Gene *slr1592* und *slr1259* unter HC und 2. Das Ausbleiben der LC-induzierten Abnahme der Transkriptmengen des Genclusters *slr1259-slr1262* sowie die Gene *ssl3769* und *slr1535*

Tabelle 14. Relativ erhöhte Transkriptmengen weiterer Gene in der Mutante $\Delta ndhR$ im Vergleich zum WT unter HC und 24 h LC. Erhöhte Transkriptmengen (**fold change-Werte $\geq 1,87$**) sind in orange, reduzierte (**fold change-Werte $\leq 0,53$**) in blau hervorgehoben. Übereinstimmungen mit WANG *et al.* (2004) sind mit ^w gekennzeichnet.

Gen	Annotation	WT-LC/ WT-HC		$\Delta ndhR$ - HC/ WT-HC	$\Delta ndhR$ - LC/ WT-LC	$\Delta ndhR$ -LC/ $\Delta ndhR$ -HC	
		3 h	24 h			3 h	24 h
<i>slr2006</i>	hypothetisches Protein	2,02	1,75	19,72^w	10,01	0,93	0,89
<i>slr2007</i>	NADH Dehydrogenase Untereinheit 4	1,61	1,49	9,77^w	5,97	0,83	0,91
<i>slr2008</i>	hypothetisches Protein	1,51	0,68	6,55^w	3,40	0,68	0,79
<i>slr2009</i>	NADH Dehydrogenase Untereinheit 4	1,35	1,38	4,63^w	2,50	0,68	0,74
<i>slr2010</i>	hypothetisches Protein	1,45	1,42	5,06^w	2,57	0,69	0,72
<i>slr2011</i>	hypothetisches Protein	1,46	1,37	4,63^w	2,44	0,68	0,72
<i>slr2012</i>	hypothetisches Protein	1,48	1,43	4,66^w	2,60	0,69	0,80
<i>slr2013</i>	hypothetisches Protein	1,35	1,04	3,34^w	1,81	1,04	0,65
<i>ssr3409</i>	hypothetisches Protein	1,66	1,48	5,32^w	2,88	0,77	0,80
<i>ssr3410</i>	hypothetisches Protein	1,55	1,52	5,66^w	3,01	1,52	0,76
<i>slr1592</i>	Pseudouridine Synthase	1,00	1,03	3,95^w	2,35	0,78	0,61
<i>slr1259</i>	hypothetisches Protein	0,89	0,76	2,02^w	1,48	0,85	0,56
<i>slr1260</i>	hypothetisches Protein	0,31	0,24	0,87	3,65	0,95	1,02
<i>slr1261</i>	hypothetisches Protein	0,47	0,39	0,91	2,33	0,92	1,00
<i>slr1262</i>	hypothetisches Protein	0,41	0,37	0,88	2,45	0,89	1,04
<i>slr1262</i>	hypothetisches Protein	0,57	0,54	0,89	1,66	0,90	1,01
<i>ssl3769</i>	hypothetisches Protein	0,72	0,62	0,99	2,87	0,97	1,80
<i>slr1535</i>	hypothetisches Protein	0,31	0,35	1,11	1,98	0,78	0,63

4.2.3.5.2 Abnahme der Transkriptmenge

Mit in die Transkriptom-Analyse von $\Delta ndhR$ sollen Gene eingehen, die unter HC bzw. LC eine Verminderung der Transkriptmenge aufweisen. Hervorzuheben ist die reduzierte Transkriptmenge des aus den Genen *sll0680* - *sll0684* bestehenden Operons (\rightarrow Tabelle 15). Die entsprechenden Gene, die Untereinheiten eines Phosphat-Transporters kodieren, weisen in der Mutante unter HC niedrigere relative Transkriptmengen auf. Im WT unterliegt das Operon einer LC-abhängigen verstärkten Transkription, die auch in $\Delta ndhR$ deutlich zu erkennen ist. Die Transkriptgehalte der Gene *sll0680* - *sll0684* sind in WT und $\Delta ndhR$ nach 24 h LC ähnlich.

Weitere Gene, die in $\Delta ndhR$ sowohl unter HC als auch LC durch eine Verminderung der relativen Transkriptmengen charakterisiert sind, sind *sll1862/sll1863*, *slr0907*, *sll0108* und *ssr3570*. Die Genprodukte sind als hypothetische Proteine annotiert, deren Funktion ungeklärt ist.

Tabelle 15. Verminderte Transkriptmengen weiterer Gene in der Mutante $\Delta ndhR$ im Vergleich zum WT unter HC (5 % CO₂) und 24 h LC (0,038 % CO₂). Erhöhte Transkriptmengen (**fold change-Werte $\geq 1,87$**) sind in orange, reduzierte (**fold change-Werte $\leq 0,53$**) in blau hervorgehoben.

Gen	Annotation	WT-LC/ WT-HC		$\Delta ndhR$ - HC/ WT-HC	$\Delta ndhR$ - LC/ WT-LC	$\Delta ndhR$ -LC/ $\Delta ndhR$ -HC	
		3 h	24 h			3 h	24 h
<i>sll0680</i>	Phosphat-bindendes Protein (PBP)	2,55	1,03	0,33	1,03	8,56	3,18
<i>sll0681</i>	Phosphat-Transporter Untereinheit PstC	2,10	0,97	0,37	0,82	5,70	2,13
<i>sll0682</i>	Phosphat-Transporter Untereinheit PstA	1,42	0,92	0,41	0,92	4,00	2,04
<i>sll0683</i>	Phosphat-Transporter Untereinheit PstB	1,28	0,93	0,45	0,91	3,41	1,89
<i>sll0684</i>	Phosphat-Transporter Untereinheit PstB	1,26	0,90	0,47	0,96	3,05	1,84
<i>sll1862</i>	hypothetisches Protein	0,36	0,97	0,54	0,49	0,39	0,89
<i>sll1863</i>	hypothetisches Protein	0,15	0,37	0,57	0,51	0,23	0,33
<i>slr0907</i>	hypothetisches Protein	1,37	0,84	0,42	0,49	0,97	0,96
<i>sll0108</i>	Ammonium/Methylammonium-Permease	0,18	0,22	0,90	0,49	0,55	0,12
<i>ssr3570</i>	hypothetisches Protein	0,87	1,52	0,92	0,53	0,93	0,89

4.2.3.6 Beeinflussung der Transkription von Genen für nicht-kodierende RNAs

Von besonderem Interesse im Zuge von Transkriptom-Analysen ist der Nachweis sich verändernder Transkriptmengen von nicht-proteinkodierenden, kleinen RNA's. Zu den kleinen RNA's, die zumeist eine regulatorische Funktionen erfüllen, zählen auch die antisense-RNA's. Die Microarray-Analyse ermöglichte die Identifizierung einer antisense-RNA für das Gen *sll1730*, dessen Transkriptrate in $\Delta ndhR$ unter HC um das Dreifache erhöht ist. Das Genprodukt ist in der Datenbank Cyanobase als unbekanntes Protein angegeben. Im WT weist die antisense-RNA von *sll1730* nach 3 h bzw. 24 h LC *fold change*-Werte von 1,44 und 1,53 auf und unterliegt somit keiner eindeutigen LC-Induktion.

4.2.4 Effekte der *ndhR*-Inaktivierung auf das Metabolom unter variabler C_i -Verfügbarkeit

Die Analyse möglicher Veränderungen auf Transkriptom-Ebene in $\Delta ndhR$ unter HC und LC im Vergleich zum WT wies vorrangig auf eine Beteiligung von NdhR an der Regulation CCM-assoziierter Gene hin (\rightarrow 4.2.3.1). Parallel wurde das Metabolom untersucht, um zu analysieren, inwieweit die Induktion LC-spezifischer Gene unter HC auch das Metabolom in der Mutante $\Delta ndhR$ in Richtung einer LC-Signatur unter HC verschiebt.

4.2.4.1 Intermediate des photorespiratorischer 2PG-Metabolismus

Unter HC-Bedingungen zeigt die Metabolom-Analyse an $\Delta ndhR$ keinen signifikanten Unterschied zum WT bei Betrachtung der relativen Metabolitgehalte der photorespiratorischen Intermediate 2PG, Glykolat, Glycin und Serin (\rightarrow Abbildung 13. Relativer Metabolitgehalt der Intermediate des photorespiratorischen 2PG-Metabolismus in *Synechocystis* (WT) und in der Mutante $\Delta ndhR$ unter HC und LC. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$).

Abbildung 14. Relative Metabolitgehalte von Ribulose-5-P, einem Intermediat des Calvin-Bensson-Bassham Zyklus. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test (* $p < 0,001$; ** $p < 0,01$). Abbildung 13). Nach dem Transfer von HC zu LC nimmt der Gehalt an 2PG im WT bereits nach 3 h um das Fünffache bezogen auf das Ausgangsniveau unter HC zu und fällt nach 24 h auf das Dreifache zurück. Im Vergleich zum WT weist die Mutante $\Delta ndhR$ nach 3 h LC-Kultivierung mit einer Verdopplung im 2PG-Gehalt dagegen eine deutlich schwächer ausgeprägte LC-Antwort auf. Nach 24 h CO_2 -Mangel gleichen sich allerdings die 2PG-Gehalte im WT und in der Mutante an. Analog verhält sich der Gehalt an Glykolat, d.h. die im WT beobachtete Zunahme im Glykolat-Pool nach 3 h LC bleibt in der Mutante nahezu aus. Nach 24 h LC sinkt der Gehalt an Glykolat im WT wieder auf den HC-Level ab. Nach 24 h LC lässt sich damit kein Unterschied zwischen WT und der Mutante $\Delta ndhR$ in der Glykolatmenge erkennen. Im Vergleich zum WT bleibt in der Mutante der Glykolat-Level unabhängig vom C_i -Angebot konstant.

Die photorespiratorischen Intermediate Glycin und Serin steigen im WT nach 3 h LC an. Nach 24 h LC erreicht der Glycin-Gehalt im WT wieder das Ausgangsniveau, während sich der Serin-

Pool fast verdreifacht. Dagegen unterliegen in $\Delta ndhR$ die Poolgrößen von Serin und Glycin – wie bereits bei Glykolat beobachtet – keinen LC-induzierten Veränderungen und unterscheiden sich somit signifikant zu ihrem Verhalten im WT.

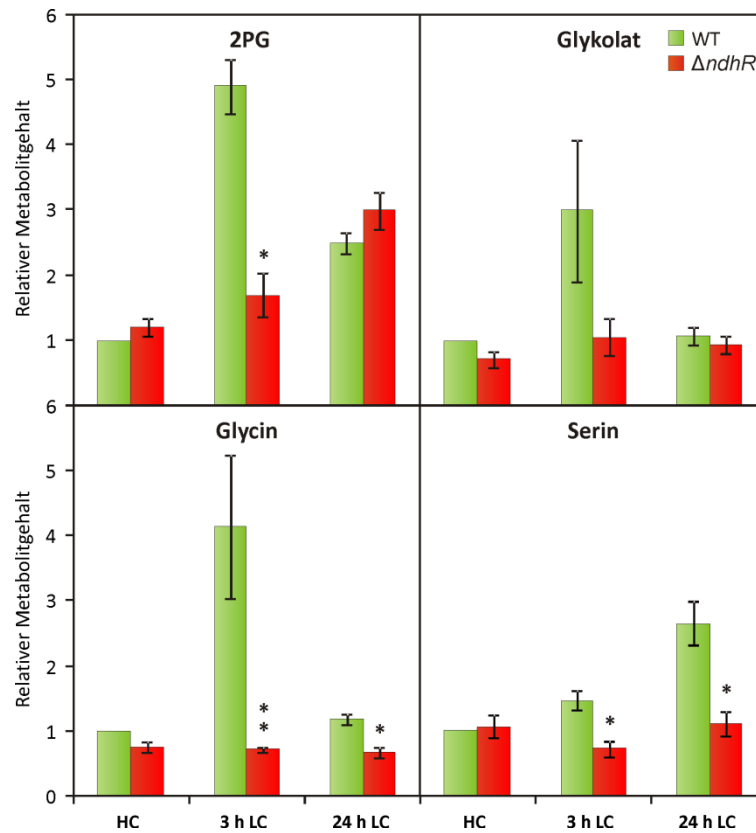


Abbildung 37. Relativer Metabolitgehalt der Intermediate des photorespiratorischen 2PG-Metabolismus in *Synechocystis* (WT) und in der Mutante $\Delta ndhR$ unter HC und LC. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$).

4.2.4.2 Intermediate des Calvin-Benson-Bassham Zyklus, des OPP-Weges und der Glykolyse

4.2.4.2.1 Ribulose-5-P, die Vorstufe von RuBP, liegt in HC-kultivierten Zellen des WT und der unter dem Detektionsminimum (→ Abbildung 14. Relative Metabolitgehalte von Ribulose-5-P, einem Intermediat des Calvin-Bensson-Bassham Zyklus. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test (* $p < 0,001$; ** $p < 0,01$).

Abbildung 15. Relative Metabolitgehalte von Intermediaten der Glykolyse und des OPP-Weges in *Synechocystis* (WT) und in der Mutante $\Delta ndhR$ unter HC und LC. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test (* $p < 0,001$; ** $p < 0,01$). n.d.: nicht detektiert. **Abbildung 14).** Nach 3 h LC steigt der Pool an Ribulose 5-P im WT sowie in $\Delta ndhR$ an, wobei die Zunahme in der Mutante signifikant schwächer ausfällt als im WT. Zum Zeitpunkt 24 h LC bleibt in WT und Mutante der Gehalt an Ribulose-5-P gegenüber HC erhöht. Ein signifikanter Unterschied ist zwischen Mutante und WT jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht zu verzeichnen.

Hinsichtlich der Gehalte an 2PGA und PEP zeigt der WT eine Verdopplung der Poolgrößen (→ Abbildung 15. Relative Metabolitgehalte von Intermediaten der Glykolyse und des OPP-Weges in *Synechocystis* (WT) und in der Mutante $\Delta ndhR$ unter HC und LC. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test (* $p < 0,001$; ** $p < 0,01$). n.d.: nicht detektiert.

Abbildung 16. Relative Metabolitgehalte von Intermediaten des TCA-Zyklus und des GS/GOGAT-Weges in *Synechocystis* WT und in der Mutante $\Delta ndhR$ unter HC (5 % CO₂) und LC (0,038 % CO₂). Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test (* $p < 0,001$; ** $p < 0,01$). **Abbildung 15),** während 3PGA dagegen unter LC auf dem Ausgangsniveau verbleibt. Bezüglich der Poolgrößen von 3PGA und 2PGA verhalten sich WT und Mutante unter HC und LC vergleichbar. Eine Ausnahme stellt in $\Delta ndhR$ der unter HC bereits signifikant erhöhte Gehalt an PEP dar. Unter LC ist zwischen WT und Mutante kein Unterschied im PEP-Level zu erkennen.

Die Poolgrößen von Glc-6-P und noch deutlicher die von 6-P-Gluconat und Saccharose sind in HC-kultivierten Zellen der Mutante $\Delta ndhR$ im Vergleich zum WT signifikant vermindert. Nach dem HC/LC-Transfer sinkt der Gehalt an Glc-6-P und 6-P-Gluconat in WT und $\Delta ndhR$ gleichermaßen ab. Dagegen ist der Abfall im Saccharose-Pool in der Mutante nach 24 h LC signifikant stärker ausgeprägt als im WT.

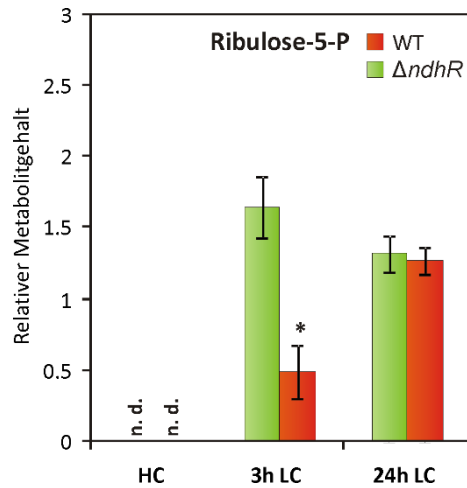


Abbildung 40. Relative Metabolitgehalte von Ribulose-5-P, einem Intermediat des Calvin-Bensson-Bassham Zyklus. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test (* $p < 0,001$; ** $p < 0,01$).

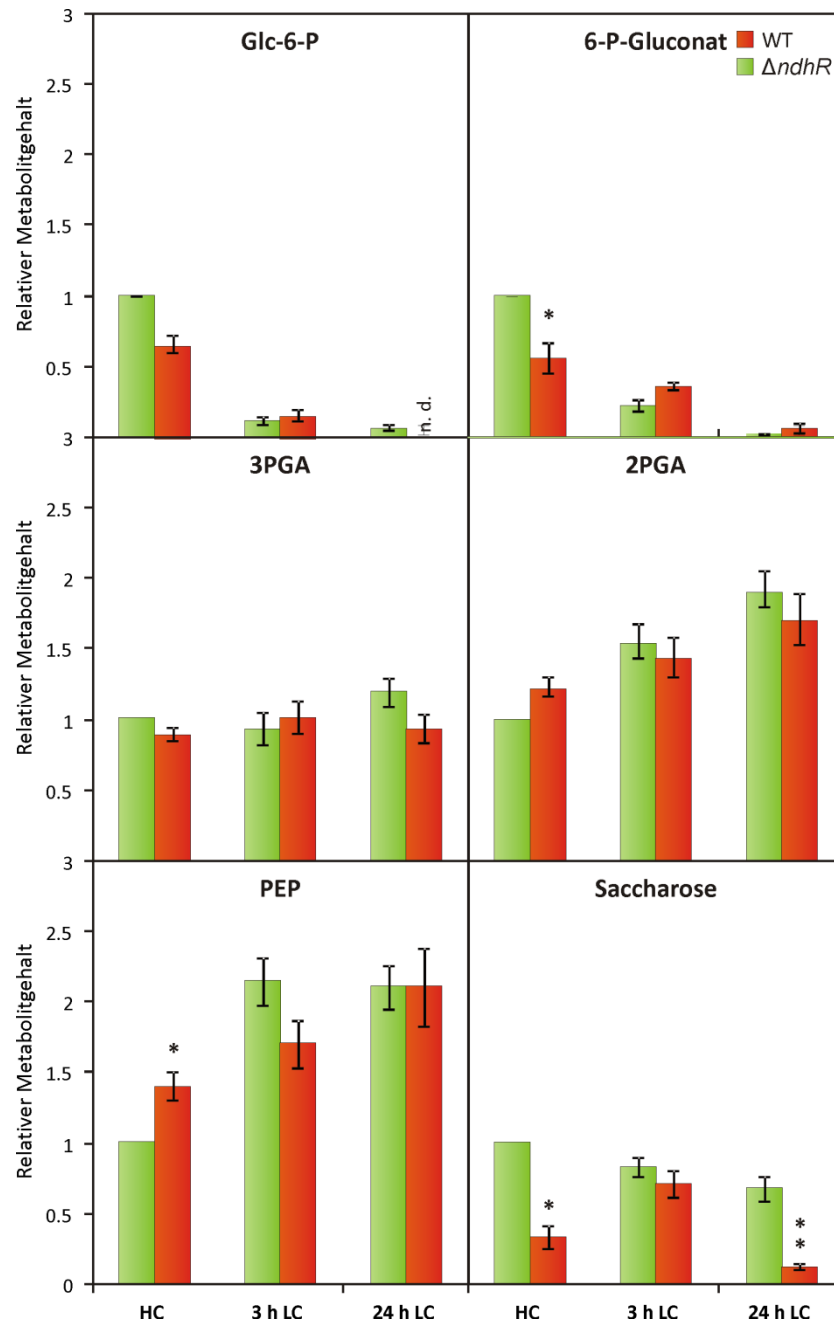


Abbildung 43. Relative Metabolitgehalte von Intermediaten der Glykolyse und des OPP-Weges in *Synechocystis* (WT) und in der Mutante $\Delta ndhR$ unter HC und LC. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test (* $p < 0,001$; ** $p < 0,01$). n.d.: nicht detektiert.

4.2.4.3 Intermediate des TCA-Zyklus und des GS/GOGAT-Weges

Bei Betrachtung der Metabolitgehalte von Intermediaten des TCA-Zyklus sind zunächst in WT und $\Delta ndhR$ unter HC für Citrat und Malat keine Unterschiede festzustellen (→ Abbildung 16. Relative Metabolitgehalte von Intermediaten des TCA-Zyklus und des GS/GOGAT-Weges in *Synechocystis* WT und in der Mutante $\Delta ndhR$ unter HC

(5 % CO₂) und LC (0,038 % CO₂). Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test (* p < 0,001; ** p < 0,01).

Abbildung 17. Modell zur Verdeutlichung der LC-Anwort in Cyanobakterien. In blau hinterlegte Stoffwechselwege sind als Reaktion auf LC in ihrer Aktivität vermindert, hellorange hinterlegte Bereiche signalisieren gesteigerte Aktivität. Metabolite mit einem deutlichen Anstieg bzw. Abfall in der Poolgröße sind in orange bzw. blau hervorgehoben. (Abbildung 16). Die LC-induzierte Abnahme des Citrat-Pools fällt in $\Delta ndhR$ 3 h nach LC-Transfer signifikant stärker aus als im WT. Der relative Gehalt an Malat zeigt im WT unter LC keine Veränderung, während in $\Delta ndhR$ der Malat-Level unter LC signifikant reduziert ist.

Die beiden Intermediate Glutamat und 2OG sind hinsichtlich ihrer Poolgröße unter HC in $\Delta ndhR$ nicht verändert. Der Glutamat-Level sinkt unter Einfluss von LC im WT und der Mutante. Nach 24 h LC ist der Abfall im Glutamat-Pool in der Mutante signifikant stärker ausgeprägt als im WT. Der Gehalt an 2OG sinkt sowohl im WT als auch in der Mutante $\Delta ndhR$ 24 h nach dem Shift auf LC um 70 % ab. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den unter Abschnitt 4.1.1.3 beschriebenen Metabolom-Analysen und Bedarf im Zuge der Definition einer Metabolom-Signatur einer Auseinandersetzung (→ 5.1).

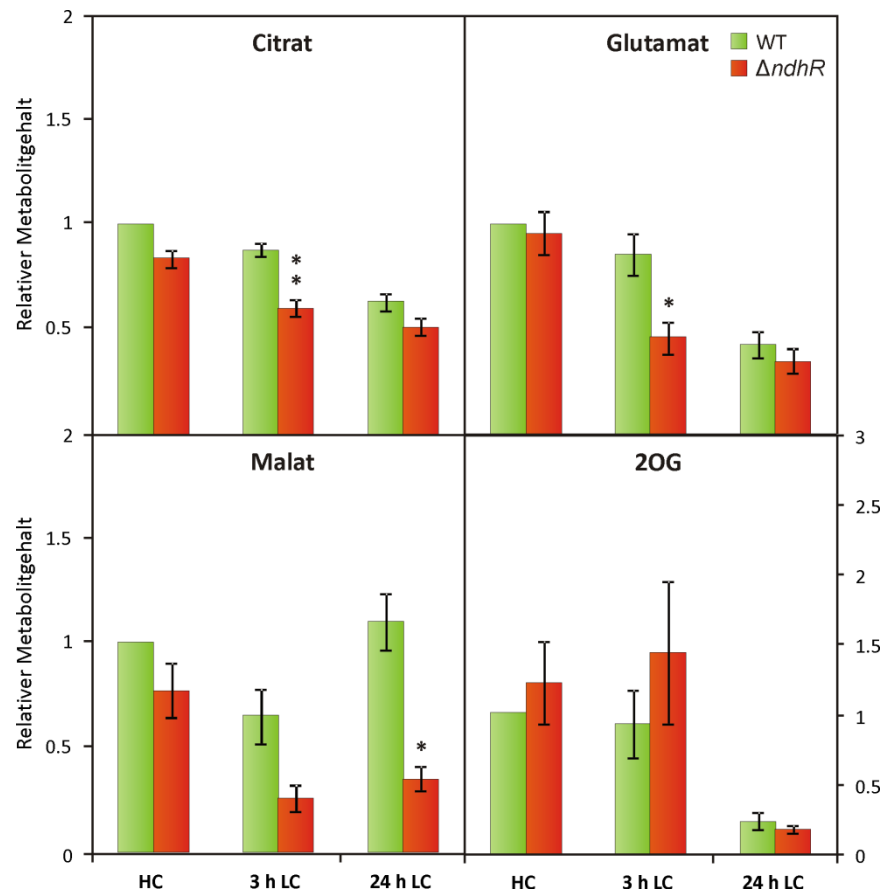


Abbildung 46. Relative Metabolitgehalte von Intermediaten des TCA-Zyklus und des GS/GOGAT-Weges in *Synechocystis* WT und in der Mutante $\Delta ndhR$ unter HC (5 % CO₂) und LC (0,038 % CO₂). Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test (* p < 0,001; ** p < 0,01).

5 DISKUSSION

5.1 Definition einer Metabolom-Signatur für die Anpassung von Cyanobakterien an C_i-Mangel

In Pflanzen, Algen und Cyanobakterien wird die Photosynthese-Rate primär durch die Verfügbarkeit von C_i bestimmt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine vergleichende Betrachtung der Cyanobakterien-Stämme *Synechocystis* und *Synechococcus* hinsichtlich ihrer LC-induzierten Veränderungen im Metabolom sowie Transkriptom durchgeführt. Für die Definition einer cyanobakteriellen Metabolom-Signatur LC-adaptierter Zellen muß sichergestellt sein, dass die Umstellung des Metaboloms an LC-Bedingungen stabil ist. Für den Shift der Cyanobakterien von HC auf LC zeigten bereits vorangegangene Untersuchungen, dass zwischen kurzfristigen, transienten und langfristigen Verschiebungen im Gehalt einzelner Metabolite unterschieden werden muss (EISENHUT *et al.*, 2008; SCHWARZ *et al.*, 2011; HACKENBERG *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2004). WANG *et al.* (2004) beschrieben mit Hilfe einer Wachstumsanalyse für *Synechocystis* eine zweiphasige Adaptation an C_i-Mangel. Nach einem Transfer von HC auf LC verändert sich das Wachstum zunächst nicht. Erst nach 3 h LC-Kultivierung verzeichneten WANG *et al.* einen starken Wachstumseinbruch, der im Anschluss zu einer Verminderung der Wachstumsrate führt. Nach 24 h LC wurde ein ‚steady state‘-Zustand erreicht, d.h. die Anpassung an eine C_i-Mangelbedingung war abgeschlossen. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein neues stabiles Wachstum erreicht und es kam zu keinen weiteren metabolischen als auch transkriptionellen Veränderungen (WANG *et al.*, 2004; EISENHUT *et al.*, 2007; SCHWARZ *et al.*, 2011). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die zelluläre Anpassung an Veränderungen im C_i-Angebot ebenfalls stufenweise verläuft. Darüber hinaus handelt es sich bei *Synechocystis* und *Synechococcus* um zwei sich morphologisch und physiologisch unterscheidenden Cyanobakterien-Stämme mit unterschiedlichen Wachstumsraten, *Synechococcus* wächst dabei unter Standardbedingungen deutlich schneller als *Synechocystis*. Eine Gegenüberstellung von Metabolom-Analysen ist nur sinnvoll und aussagekräftig, wenn davon ausgegangen werden kann, dass die Kulturen zum Zeitpunkt der Datenerhebung den gleichen Anpassungsstatus erreicht haben. Kurze Zeiträume unter LC-Kultivierung sind somit ungeeignet. Für den Stamm-

übergreifenden Vergleich zur Definition einer Metabolom-Signatur wurde daher der 24 h-LC-Zeitpunkt gewählt.

Die Verrechnung unabhängiger Datensätzen von biologischen Objekten, die unterschiedlichen Ursprungs sind, gestaltet sich oft schwierig, da das metabolische System sehr sensibel auf äußere Faktoren wie Licht und Temperatur wie auch auf den Zustand der Zellen reagiert, der je nach Vorkultur variieren kann. Daneben ist die Probennahme für die Metabolom-Analyse eine kritische Größe, die einen entscheidenden Einfluss auf die Metabolit-Gehalte und somit auf die Datenlage haben kann. Die hier gewählte Methode einer schnellen Probennahme im Licht und das zügige Schockgefrieren der Proben in flüssigem Stickstoff sollte garantieren, dass das Metabolom der Probe den tatsächlichen Zustand zum gewünschten Zeitpunkt widerspiegelt. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass bereits geringste Verzögerungen sowie äußere Faktoren zu einer Verschiebung und Verfälschung des Metaboloms führen können. Neben dem CO₂-Gehalt der zugeführten Luft üben viele weitere Faktoren einen deutlichen Einfluss auf die C_i-Versorgung von Cyanobakterien aus. So ist neben der Temperatur und der Salinität insbesondere der pH-Wert ein entscheidender Parameter. Der pH-Wert beeinflusst direkt die Löslichkeit von CO₂. Unter alkalischen Bedingungen steigt die Löslichkeit von CO₂ und somit der Anteil von HCO₃⁻, während ein eher neutraler bis leicht saurer pH-Wert die Aufnahme von CO₂ in Lösung verhindert bzw. das Gleichgewicht in Richtung CO₂ verschiebt. SUMMERFIELD und SHERMAN (2008) untersuchten die pH-Wert-abhängige Transkription von Genen in *Synechocystis*. Bereits 2 h nach Umstellung des pH-Wertes von pH 10 auf pH 7.5 unter LC Bedingungen verzeichneten SUMMERFIELD und SHERMANN (2008) eine um das drei- bis vierfache angestiegene Transkriptmenge der CCM-Gene des *cmp*-Operons (*slr0040* – *slr0044*) sowie des *sbtA/sbtB*-Operons (*slr1512/slr1513*). Der Wechsel des pH-Wertes führt dementsprechend auch ohne direkte Umstellung des C_i-Angebotes im umgebenden Medium zur Induktion einer C_i-Mangelbedingung und folglich zur Erhöhung der Transkription LC-induzierter Gene.

Für den HC/LC-Shift wurde daher zusätzlich zur Verminderung der CO₂-Menge in der zugeführten Luft auf 0,038 % CO₂ ein Wechsel im pH-Wert des BG11-Mediums durchgeführt. HC-Kulturen wurden mit BG11 pH 8.0 angezogen und vor dem HC/LC-Shift auf BG11 pH 7.0 umgesetzt. Die Umstellung des pH-Wertes erfolgte an dem Tag an dem auch der HC/LC-Shift durchgeführt wurde. Für die Durchführung eines HC/LC-Shift-Experimentes ist folglich

ebenfalls entscheidend, zu welchem Zeitpunkt im Vorfeld die Umstellung des pH-Wertes von pH 8.0 auf pH 7.0 erfolgt. Das HC/LC-Shift-Experiment wurde standardmäßig konstant 1 h nach dem pH-Shift gestartet.

Weiterhin unterscheiden sich in den zur Verfügung stehenden Datensätzen häufig die Anzahl der detektierten und identifizierten Metabolite. Erschwerend kommt hinzu, dass die Bestimmung der Metabolit-Gehalte auf Messwerten von unterschiedlichen Fragmenten des jeweiligen Analyten beruht, deren Fragmentanzahl und -art sich in den Datensätzen unterscheidet. Summa summarum wären bei einer direkten Verrechnung der Metabolitmesswerte aus den verschiedenen Datensätzen hohe Standardabweichungen und Unsicherheiten in der statistischen Auswertung die Folge gewesen, die die real vorliegenden qualitativen Veränderungen im Metabolom überdecken würden. Dementsprechend wurde ein anderer Weg der vergleichenden Analyse gewählt. Alle vorhandenen Datensätze wurden zunächst separat betrachtet und nach signifikanten Veränderungen untersucht. Solche Veränderungen von Einzelmetaboliten in einzelnen Datensätzen wurden dann mit allen verfügbaren Datensätzen abgeglichen und es wurden nur die Metabolite ausgewählt, die eine signifikante Zu- oder Abnahme zeigten. Die Höhe der *fold change*-Werte ist bei dieser Betrachtungsweise nicht ausschlaggebend. Entscheidend ist eine sich reproduzierbar abzeichnende Tendenz in der Veränderung des Metabolit-Gehaltes. Diese Vorgehensweise führt dazu, dass als weiteres Kriterium die Metabolite der definierenden LC-induzierten Metabolom-Signatur immer wiederkehrend und reproduzierbar detektierbar sein mussten. In die anschließende Betrachtung wurden ausschließlich Metabolite einbezogen, die stets auch in Datensätzen mit geringem Umfang bezüglich der annotierbaren Analyte in der Datenevaluierung eingegangen sind. Metabolite wie z. B. Glykolat, DHAP, *cis*-Aconitat sowie Ribulose-5-P lagen in der Nähe des Detektionsminimums. Die Messbarkeit dieser Metabolite ist somit von der Menge an Zellmaterial sowie Extraktionseffizienz in besonderem Maße abhängig. Metabolite nahe der Nachweisgrenze sind für aussagekräftige Rückschlüsse auf Veränderungen im Metabolom unter LC daher eher ungeeignet.

Um über vergleichende Metabolom-Analysen Rückschlüsse auf die LC-induzierte Metabolom-Signatur in Cyanobakterien ziehen zu können, wurde zunächst von zwei bereits publizierten Datensätzen für *Synechocystis* und *Synechococcus* ausgegangen (EISENHUT *et al.*, 2008; SCHWARZ *et al.*, 2011). Zur Identifizierung von sicheren Kandidaten für die Metabolom-

Signatur, die sich durch ein beständig gleiches oder ähnliches Verhalten unter LC auszeichnen, wurden zunächst Übereinstimmungen zwischen *Synechocystis* und *Synechococcus* untersucht. Im Anschluss wurde das Verhalten der entsprechend favorisierten Metabolite in weiteren Datensätzen betrachtet (→ 3.6.4). Auf dieser Grundlage wurde entschieden, ob es sich bei den betrachteten Metaboliten um sichere Kandidaten handelt oder ob der Metabolit für die Definition einer Metabolom-Signatur als ungeeignet anzusehen ist. Die dick gedruckt hervorgehobenen Metabolite in den Abbildungen des Abschnitts 4.1 wurden folglich nicht auf der Grundlage einer statistisch basierten Berechnung als Kandidaten für die Metabolom-Signatur ausgewählt, sondern stellen das Ergebnis von Vergleichen verschiedener Datensätze zur Metabolom-Analyse dar.

Bezüglich des photorespiratorischen 2PG-Metabolismus wurden die Intermediate 2PG, Serin und Glycerat als mögliche Kandidaten in Erwägung gezogen. Der 2PG-Gehalt steigt in beiden Cyanobakterien-Stämmen unter LC um das Zweifache an. Dieses Verhalten von 2PG spiegelt sich auch in allen weiteren unveröffentlichten Datensätzen wieder und kann somit als stabil angesehen werden. Bereits 1983 berichteten MARCUS *et al.* (1987) für *Anabaena variabilis* einen Anstieg im 2PG-Gehalt unter LC. Das O_2/CO_2 – Verhältnis steigt unter diesen Bedingungen an. Die vermehrte Verwendung von O_2 als Substrat für die RubisCO führt zur verstärkten Bildung von 2PG. Ein erhöhter intrazellulärer Anteil an 2PG unter LC ist folglich auf die gesteigerte Oxygenase-Aktivität der RubisCO zurückzuführen. Der 2PG-Anstieg in LC-behandelten Cyanobakterien zeigt außerdem, dass der CCM nicht, wie angenommen effektiv genug ist, Sauerstoff aus den Carboxysomen fernzuhalten und damit die Oxygenasereaktion zu vermeiden. Somit kommt dem Abbau des 2PG über den photorespiratorischen 2PG-Metabolismus eine essentielle Bedeutung zu. Der Gehalt an den photorespiratorischen Intermediaten Serin und Glycerat stieg tendenziell – aber schwach – an. Dennoch weist der Vergleich zu unveröffentlichten Datensätzen sowie zu HACKENBERG *et al.* (2012) darauf hin, dass die Veränderungen im Metabolit-Gehalt von Serin und Glycerat nicht stabil und ausreichend reproduzierbar sind. Serin und Glycerat zeigen in einigen Fällen reduzierte bzw. unveränderte Gehalte und wurden demzufolge von der Metabolom-Signatur ausgeschlossen. Bei Betrachtung der Intermediate des Calvin-Benson-Bassham Zyklus sowie des OPP und der Glykolyse dominierten die Anstiege in den Metabolit-Gehalten von 2PGA und PEP. Ein Anstieg im 3PGA-Level um das Zwei- bis Dreifach war nur in *Synechococcus* zu beobachten.

Weiterführende Untersuchungen in HACKENBERG *et al.* (2012) sowie die Betrachtung unveröffentlichter Datensätzen bestätigen den Anstieg im Level von 2PGA und PEP, während das Auftreten einer 3PGA-Akkumulation zumindest für *Synechocystis* nicht reproduziert werden kann. EISENHUT *et al.* (2008) beschrieben für *Synechocystis* eine transiente Erhöhung des 3PGA-Pools nach 3 h LC um das Sechsfache. Gleichzeitig ist 2PG ebenfalls bereits nach 3 h LC erhöht. Dieser transiente Anstieg von 3PGA könnte somit direkt mit der durch die Anwesenheit von 2PG verminderten Aktivität des Calvin-Benson-Bassham Zyklus in Verbindung stehen. Im weiteren Verlauf der Anpassung an C_i -Mangel könnte der Umsatz von 3PGA über andere Stoffwechselwege verstärkt ablaufen, so dass sich der 3PGA-Level wieder dem Ausgangswert unter HC angleicht. Basierend auf diesen Beobachtungen kann von einer verstärkten Umsetzung von 3PGA über 2PGA zu PEP in LC-Zellen ausgegangen werden. Flux-Analysen unter Verwendung von $NaH^{13}CO_3$ bestätigten das Einschleusen von 3PGA in den OPP-Weg und deren Umsetzung zu PEP (HUEGE *et al.*, 2011; Young *et al.*, 2011).

Weitere Intermediate des Calvin-Benson-Bassham Zyklus wie DHAP und Ribulose-5-P sind mit der hier verwendeten GC-MS-Technik schwer detektierbar und somit Metabolite die nur in wenigen Datensätzen auftauchen. Übereinstimmungen zwischen *Synechocystis* und *Synechococcus* lassen sich beim Vergleich mehrerer Datensätze nicht eindeutig definieren. EISENHUT *et al.* (2008) deuteten jedoch einen transienten LC-induzierten Anstieg im Level von DHAP unter 3 h LC als Indikation für die Herabsetzung der Aktivität des Calvin-Benson-Bassham Zyklus an. Ebenso zeigten HACKENBERG *et al.* (2012) für *Synechocystis* nach 24 h LC-Shift einen Anstieg im Gehalt von Ribulose-5-P. Diese Beobachtung wird durch die im Zuge dieser Arbeit erfolgten Metabolom-Analyse an der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhR$ gestützt (\rightarrow 4.2.4.2). Im WT liegt der Level von Ribulose-5-P bei HC unter dem Detektionsminimum, während 3 h bzw. 24 h nach dem HC/LC-Shift dieser Metabolit detektierbar ist. Demzufolge steigt der Gehalt an Ribulose-5-P. Vor dem Hintergrund der bekannten inhibitorischen Wirkung von 2PG auf die Aktivase der RubisCO sowie auf die Enzyme Phosphofruktokinase und Triosephosphat-Isomerase (KELLY und LATZKO, 1977), die in den Calvin-Benson-Bassham Zyklus involviert sind, ist unter steigendem 2PG-Gehalt von einer Hemmung dieses Stoffwechselweges auszugehen. Demzufolge wird das aus dem Abbau von 2PG hervorgehende 3PGA unter LC nicht vorrangig über den Calvin-Benson-Bassham Zyklus zu RuBP regeneriert. Dieser Umstand könnte auch die vermehrte Umsetzung von 3PGA zu 2PGA

erklären. Der C-Metabolismus verläuft unter LC somit verstärkt über den OPP-Weg. Eine verstärkte Nutzung des OPP-Weges war in *Synechocystis* zuvor bereits für den Abbau externer Glukose sowie für den Glykogenabbau im Dunkeln beschrieben worden (TAKAHASHI *et al.*, 2008; NARAINSAMY *et al.*, 2013). Obwohl die beobachteten Veränderungen in den Poolgrößen von DHAP und Ribulose-5-P diese Theorie unterstützen, gehen diese Metabolite nicht in die zu definierende Metabolom-Signatur ein, da sie nicht reproduzierbar in den Metabolom-Analysen auftauchen. Zudem scheinen die Veränderungen im Gehalt von DHAP und Ribulose-5-P eher transientser Natur zu sein (EISENHUT *et al.*, 2008). Für die Aufstellung einer Metabolom-Signatur sind folglich neben der 2PG-Akkumulation, ein Anstieg in den Gehalten von 2PGA und PEP von Bedeutung.

Bei Betrachtung von Metaboliten des TCA-Zyklus sowie des GS/GOGAT-Weges wurde ein Abfall im Glutamin-Pool sowie ein Anstieg im 2OG-Level als mögliche Komponenten für eine LC-Metabolom-Signatur in Erwägung gezogen. Allerdings zeigt ein Vergleich mit weiteren Datensätzen, dass diese Veränderungen im Metabolom nicht als stabil einzuschätzen sind. Entgegen des stark ausgeprägten Anstiegs im 2OG-Pool in EISENHUT *et al.* (2008) und SCHWARZ *et al.* (2011), ist in der Metabolom-Analyse von HACKENBERG *et al.* (2012) keine Veränderung im 2OG-Level zu verzeichnen. Wie im Datensatz zur Untersuchung der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhR$, der Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit und unter Abschnitt 4.2.4 einzusehen ist, fällt der 2OG-Gehalt nach 24 h LC um mehr als 50 % ab. Das Verhalten von 2OG unter LC scheint somit neben der Abhängigkeit vom C_i -Angebot von weiteren Faktoren beeinflusst zu sein. Der Metabolit 2OG stellt eine Schnittstelle zwischen dem TCA Zyklus und dem GS/GOGAT-Weg und folglich zwischen dem C-Metabolismus und dem N-Metabolismus dar. In der Literatur wird 2OG als interner Indikator für die Wahrnehmung des intrazellulären N-Status in Cyanobakterien beschrieben (MURO-PASTOR *et al.*, 2005). Ein hoher 2OG-Level signalisiert der Zelle das Vorliegen eines hohen C/N-Verhältnisses und veranlasst die verstärkte Transkription von Genen des N-Stoffwechsels (MURO-PASTOR *et al.*, 2005). Diese Reaktion ist unseren HC Bedingungen ähnlich. Der Gehalt an 2OG unterliegt somit der Regulation des C- und des N-Metabolismus. Zudem wurde zunächst davon ausgegangen, dass Cyanobakterien aufgrund der Abwesenheit eines 2OG-Dehydrogenase-Komplexes, der die Umsetzung von 2OG zu Succinat katalysiert, über einen unvollständigen TCA-Zyklus verfügen (SMITH *et al.*, 1967; PEARCE *et al.*, 1967; PEARCE *et al.*,

1969). Dementsprechend wäre 2OG ein Endprodukt des TCA-Zyklus, der allein über den GS/GOGAT-Weg weiterverstoffwechselt werden könnte. Neuste Untersuchungen lassen jedoch darauf schließen, dass ein Ringschluss durch alternative Enzyme, die 2OG als Substrat verwenden, möglich wäre (COOLEY *et al.*, 2000; ZANG und BRYANT, 2011). Ein Modell zur Metabolom-Struktur in *Synechocystis* durch KNOOP *et al.* (2010) bestätigt diese Annahme zusätzlich. STEINHAUSER *et al.* (2011) postuliert des Weiteren, dass in Abhängigkeit von den vorherrschenden Wachstumsbedingungen ein Wechsel zwischen offenem und geschlossenem TCA-Zyklus in Cyanobakterien Teil entsprechender Anpassungsmechanismen darstellen könnte. Da der TCA-Zyklus auch in den hier vorgestellten Experimenten zwischen offenem und geschlossenem Zustand variiert, kann nicht zweifelsfrei festgestellt werden. Allerdings kam es zu Fluktuationen der Gehalte an Succinat, Malat und Fumarat auf der anderen Seite des „offenen“ TCA-Zyklus. In *Synechocystis* steigt der Gehalt an Malat und Fumarat nach 24 h LC während der Succinat-Pool abfällt. In *Synechococcus* dagegen fällt der Gehalt an Succinat und der Level an Malat und Fumarat steigt. Inwieweit diese Variationen auf einen Fluss über Malat aus einer C-Fixierung mittels PEP-Carboxylase hindeuten oder von einem (zeitweise) geschlossenen Zyklus stammen, ist derzeit nicht zu entscheiden. In ¹³C-Flussmessungen (Huege *et al.*, 2011) wurden in photorespiratorischen Mutanten von *Synechocystis* klare Hinweise gefunden, dass unter LC-Bedingungen eine verstärkte C-Fixierung durch die PEP-Carboxylase stattfindet. Folglich besteht die Möglichkeit, dass der 2OG-Level in unseren Experimenten von weiteren Faktoren beeinflusst wird. Die signifikante Akkumulation von 2OG unter LC um das 10- bis 20-fache in EISENHUT *et al.* (2008) und SCHWARZ *et al.* (2011) liess sich jedoch – wie bereits erwähnt – nicht immer reproduzieren. Die Erhöhung des 2OG-Levels lässt sich somit nicht generell als Folge der C_i-Mangelanpassung betrachten und geht nicht in die aufzustellende Metabolom-Signatur ein.

In ähnlicher Weise verhält es sich mit dem Metaboliten Glutamin. Ein Abfall im Glutamin-Pool ist bei Begutachtung weiterer unveröffentlicher Datensätze kein sicherer Indikator für LC-induzierte Metabolom-Veränderungen. Zusätzlich stellt Glutamin hinsichtlich seiner Annotierung während der GC-MS-Analyse einen eher unsicheren Kandidaten dar, der bei der Datenevaluierung häufig fehlt. Somit ist Glutamin aus der Metabolom-Signatur auszuschließen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass für die Erstellung einer unter LC-Bedingungen induzierten Metabolom-Signatur ausschließlich die Metabolite 2PG, PEP in Frage kommen (Abbildung 17. Modell zur Verdeutlichung der LC-Anwort in Cyanobakterien. In blau hinterlegte Stoffwechselwege sind als Reaktion auf LC in ihrer Aktivität vermindert, hellorange hinterlegte Bereiche signalisieren gesteigerte Aktivität. Metabolite mit einem deutlichen Anstieg bzw. Abfall in der Poolgröße sind in orange bzw. blau hervorgehoben.

Abbildung 18. Relative Metabolitgehalte der Aminosäuren Ornithin und Aspartatin *Synechocystis* (WT) und in der Mutante $\Delta ndhR$ unter HC (5 % CO₂) und LC (0,035 % CO₂). Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test (* p < 0,01; ** p < 0,001). (Abbildung 17). Diese Metabolite zeigen in allen Metabolom-Analysen in *Synechocystis* und *Synechococcus* eine reproduzierbare Akkumulation nach 24 h LC. Die Akkumulation von 2PG spiegelt die verstärkte Oxygenase-Aktivität der RubisCO wider. Die gesteigerten Metabolit-Gehalte an 2PGA und PEP weisen auf die erhöhte Aktivität des OPP und die Inhibierung des Calvin-Benson-Bassham Zyklus hin. Ferner bestätigten Glykogen-Bestimmung an *Synechocystis* die Annahme eines LC-induzierten Abbaus dieses cyanobakteriellen Kohlenstoff-Speichers. EISENHUT *et al.* (2007) beschrieben auf Grundlage von elektronenmikroskopischen Untersuchungen die Abnahme der intrazellulären Glykogen-Granula. Die Bestimmung des Gehaltes an Glykogen nach Durchführung eines HC/LC-Shift bestätigte diese Beobachtung. Allerdings setzt der Glykogenabbau erst recht spät ein. Nach 6 h LC war der Glykogenpool nahezu unverändert. Erst nach 24 h LC war Glykogen fast vollständig abgebaut. Vermutlich werden in der frühen Phase der LC-Anpassung zunächst die Pools leichter verfügbarer Metabolite genutzt. Erst eine langfristige C-Verknappung greift den Glykogenpool an. Alternativ kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Glykogenabbau unverändert verläuft, jedoch nach 6 h LC die Umstellung der C-Assimilation zu einer stark verminderten Glykogensynthese führt, da viel fixierter Kohlenstoff aus dem Calvin-Benson-Bassham Zyklus in Richtung OPP und Glykolyse abgezweigt wird.

5.2 Korrelationen im Transkriptom und Metabolom unter CO₂-Mangel

In Ergänzung zu den Metabolom-Analysen an *Synechocystis* und *Synechococcus* unter C_i-Limitierung wurden Veränderungen auf Transkriptionsebene mit in die Betrachtung einbezogen. Der Grundgedanke der kombinierten Analyse von metabolischen und transkriptionellen Veränderungen in Reaktion auf eine veränderte C_i-Verfügbarkeit besteht darin, dass die isolierte Betrachtung der Akkumulation bzw. Abnahme von Metaboliten keine eindeutige Aussage darüber zulässt, inwieweit eine verstärkte bzw. verminderte Bildung oder ein verringerter bzw. erhöhter Abbau für diese Änderungen verantwortlich ist. Die Regulation der Enzymaktivität findet in Bakterien häufig auf transkriptioneller Ebene statt. Somit könnten Veränderungen im Transkriptionsmuster von *Synechocystis* und *Synechococcus* unter CO₂-Mangel in Genen, die Enzyme des zentralen C- und N-Metabolismus kodieren, zur Aufdeckung von gesteigerten oder verminderten Enzymaktivitäten herangezogen werden. Dabei muss aber beachtet werden, dass eine verstärkte Transkription eines Gen nicht unweigerlich in einer verstärkten Synthese des zugehörigen Proteins münden muss. Posttranskriptionelle Regulationsmechanismen sind in Bakterien ebenfalls von Bedeutung (VÖLKER und HECKER, 2005). Die Gene für die carboxysomalen Hüllproteine, die im *ccm*-Operon lokalisiert sind sowie die Gene für die in den Carboxysomen vorliegenden Enzymen, die RubisCO (*rbc*-Operon, *slr0009* – *slr0012*) sowie die Carbonatanhydrase (*ccaA*, *slr1347*), zeigen eine Reduktion der Transkriptionsrate. EISENHUT *et al.* (2007) zeigten jedoch mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen, dass die Anzahl der Carboxysomen pro Zelle unter LC-Bedingungen steigt. Folglich beruht dieser sich morphologisch äußernde Adaptationsmechanismus eher nicht auf einer transkriptionellen Regulation und ist ein gutes Beispiel dafür, dass posttranskriptionelle Regulationen bei der LC-Anpassung von Cyanobakterien stattfinden. Zudem ist theoretisch für die Aktivierung eines Stoffwechselweges nicht die Hochregulation der Transkription aller in den Prozess eingebundenen Enzyme von Bedeutung. Meist reicht die vermehrte Expression oder die gesteigerte Aktivität von sogenannten Schlüsselenzymen eines Stoffwechselweges, die zumeist ratenlimitierende Reaktionen – sogenannte „*bottleneck*“-Reaktionen – katalysieren, aus.

Besonderes Interesse kommt bei der kombinierten Analyse von Transkriptom und Metabolom der Fragestellung zu, inwiefern sich veränderte Metabolitgehalte durch Variationen im

Transkriptom widerspiegeln und erklären lassen. Die Interpretation gestaltet sich bei der praktischen Umsetzung allerdings schwierig.

Die Gegenüberstellung der Transkriptom-Analysen aus EISENHUT *et al.* (2008) sowie SCHWARZ *et al.* (2011) und somit der Vergleich von *Synechocystis* und *Synechococcus* sollte einen Einblick in Stamm-unspezifische Anpassungsstrategien auf Transkriptom-Ebene ermöglichen. Als β -Cyanobakterien verfügen beide Cyanobakterien-Stämme über ein CCM bestehend aus Transportsystemen für die Aufnahme von CO_2 sowie HCO_3^- und Carboxysomen. Im Gegensatz zu *Synechocystis* fehlt *Synechococcus* allerdings der konstitutiv exprimierte BicA-Transporter. Hinsichtlich der LC-induzierten Transkription von BCT1, NDH-1₃ und SbtA verhalten sich *Synechocystis* und *Synechococcus* ähnlich. Die Transkriptmengen der zugehörigen Gene steigen unter LC stark an. Bezeichnend für *Synechococcus* ist allerdings, dass im Gegensatz zu *Synechocystis* die Transkriptionsrate nach 6 h LC ihr Maximum erreicht hat und nach 24 h LC wieder zu dem unter HC vorliegenden Ausgangsniveau zurückkehrt. Dieser Unterschied kann auf Stamm-spezifische Unterschiede in der Wachstumsrate zurückgeführt werden, die sich auch in einem variablen zeitlichen Ablauf der LC-Anpassung widerspiegeln. WANG *et al.* (2004) haben das Wachstumsverhalten von *Synechocystis* nach einem Shift von HC auf LC untersucht. Nach ihren Befunden führt die Umstellung auf LC bei einer OD_{750} von 0,95 nach etwa 3 h zu einem abrupten Wachstumseinschnitt und im Folgenden zu einer Reduktion der Wachstumsrate. Zu Beginn der LC-Anpassung, d.h. in den ersten 3 h, scheint das Wachstum dagegen nicht beeinträchtigt zu sein. Weiterhin führen WANG *et al.* (2004) auf, dass das Eintreten der Wachstumsreduktion von der zum Zeitpunkt des HC/LC-Shifts vorliegenden Zelldichte der Kultur beeinflusst wird. In Kulturen mit einer geringen Zelldichte verschiebt sich der Einschnitt in der Wachstumskurve zeitlich nach hinten. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass eine Zellzahl-abhängige LC-Einstellung existiert. Beispielsweise könnte im LC-Medium zunächst noch mehr C_i vorhanden sein, wenn die Zelldichte niedrig ist. Bei hoher Zelldichte stellt sich dagegen die C_i -Mangelbedingung schneller ein und führt somit rascher zu einer zellulären C_i -Anpassung. Zudem hat die Zellzahl pro ml, die Zellform sowie die Zellgröße aufgrund gegenseitiger Beschattung der Zellen direkten Einfluss auf die Lichtverhältnisse in der Kultur (McGINN *et al.*, 2003). Um diese Aspekte näher zu beleuchten, wäre eine vergleichende Wachstumsuntersuchung von *Synechocystis* und *Synechococcus* erforderlich auf deren Grundlage der optimale Zeitpunkt für

die vergleichende Transkriptom-Analyse bestimmt werden könnte. Rückblickend zeigen dennoch sowohl *Synechocystis* als auch *Synechococcus* die LC-induzierten Verschiebungen des Transkriptoms. Somit kann davon ausgegangen werden, dass beide Stämme unter unseren Versuchsbedingungen bereits stabil auf das Vorliegen einer C_i-Mangelbedingung reagiert haben.

Bei der Betrachtung der Expression von Genen für Enzyme des zentralen C- und N-Metabolismus zeigen sich in *Synechococcus* deutlich mehr LC-induzierte Unterschiede als in *Synechocystis*.

Wie verhalten sich *Synechocystis* und *Synechococcus* bei Betrachtung der Transkription von Genen, die Enzyme des photorespiratorischen 2PG-Metabolismus kodieren? Zunächst wurden putative 2PG-abbauende Enzyme im Genom von *Synechococcus* durch *in silico*-Analysen identifiziert. Mit einer Ausnahme existieren in *Synechococcus* Homologe zu den bereits in *Synechocystis* annotierten Genen nach EISENHUT *et al.* (2006). Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Ausführungen in KERN *et al.* (2011). Eine Ausnahme stellt die Glycerat-Kinase dar. *Synechococcus* besitzt im Vergleich zu *Synechocystis* eine Glycerat-3-Kinase, die der der höheren Pflanzen ähnlich ist (Boldt *et al.*, 2005).

Bezüglich der Gene für Enzyme des C₂-Zyklus finden sich in *Synechocystis* unveränderte oder reduzierte Transkriptmengen, während die Gene *sll1981* für die Glyoxylat-Carboligase und *sll1358* für die Oxalat-Dekarboxylase, die in die alternativen 2PG-abbauenden Prozesse involviert sind, einen um das Zweifache erhöhten Transkriptlevel aufweisen. EISENHUT *et al.* (2008) deuteten diese Beobachtung als Anzeichen dafür, dass zwar die drei möglichen 2PG-Abbauwege für die Detoxifikation von Bedeutung sind und kooperativ miteinander agieren, es jedoch unter LC-Bedingungen zu einem vermehrten Fluss über den Glycerat-Weg bzw. in Richtung der vollständiger Dekarboxylierung von Glyoxylat kommt. In *Synechococcus* zeigt 6 h nach LC-Shift nur das Gen *0217* für eine putative 2PG-Phosphatase eine um das Sechsfache erhöhte Transkriptmenge, während nach 24 h LC Gene für den Glycin Dekarboxylase Komplex (*2046, 2308*) und das die Oxalat-Dekarboxylase kodierende Gen *2388* gesteigerte Transkriptionsraten aufweisen. Direkte genspezifische Übereinstimmungen zwischen *Synechocystis* und *Synechococcus* lassen sich – mit einer Ausnahme – anhand der Transkriptom-Analysen nicht erkennen. Diese Beobachtung weist auf eher Stamm-spezifische Regulationsmechanismen hin und könnte zudem das Resultat geringer Abweichungen in der

Durchführung der HC/LC-Shift-Experiment sein, die bezüglich der Wahl des Zeitpunkts der Beprobung sowie der Zelldichte das Ergebnis der Transkriptom-Analyse in *Synechocystis* und *Synechococcus* auf unterschiedliche Weise beeinflussten. Jedoch zeichnen sich beide cyanobakteriellen Stämme unter LC in unterschiedlichem Maße durch eine Stimulation des 2PG-Metabolismus aus. In *Synechococcus* dient die verstärkte Transkription einer 2PG-Phosphatase als Indikator, dass es sich bei der Dephosphorylierung von 2PG eventuell um einen ratenlimitierenden Schritt im Zuge der 2PG-Detoxifikation handeln könnte. In *Synechocystis* könnte dieser Umstand durch das Vorliegen von drei putativen Genen kompensiert werden, die eine 2PG-Phosphatase kodieren und konstitutiv transkribiert werden. Zudem enthält das Genom vermutlich noch ein weiteres 2PG-dephosphorylierendes Enzym in Form von *slr0586*, während in *Synechococcus* insgesamt nur drei putative PGPase-Gene existierten.

Sowohl in *Synechocystis* als auch *Synechococcus* ist unter LC die Transkriptmenge des Gens für eine putative Oxalat-Dekarboxylase erhöht. Diese Übereinstimmung deutet auf eine besondere Bedeutung der vollständigen Dekarboxylierung als 2PG-abbauenden Prozess unter LC hin. Dementsprechend lassen die Transkriptom-Analysen die Vermutung zu, dass es sich bei diesem Zweig des 2PG-Metabolismus um einen optionalen Weg handelt, der unter LC-Bedingungen die Detoxifikation von 2PG ferner vermittelt. Zudem führt die vollständige Dekarboxylierung von Glyoxylat zur Freisetzung von CO₂, welches intrazellulär zur Reassimilation herangezogen werden könnte. Da Cyanobakterien als Vertreter der Prokaryoten nicht über eine Kompartimentierung verfügen, laufen alle metabolischen Prozesse wie die CO₂-Fixierung sowie die Photorespiration parallel und ohne Trennung durch Membranen als Barriere an der Thylakoidmembran sowie im Cytoplasma ab. Lediglich die RubisCO sowie die CA sind bei β -Cyanobakterien zum größten Teile in den Carboxysomen lokalisiert. Dennoch enthält auch das Cytoplasma in weitaus geringeren Mengen diese Enzyme. Kürzlich wurde gezeigt, dass beim Zusammenbau der Carboxysomen zunächst ein Core von RubisCO-Ansammlungen entsteht, bevor sich die Proteinhülle organisiert (CAMERON *et al.*, 2013). Diese freien Mengen an RubisCO könnten die Entsehung von 2PG auch unter HC-Bedingungen erklären. Dementsprechend bestünde aber auch die Möglichkeit, dass freies RubisCO zur Refixierung von CO₂ aus Stoffwechselwegen wie der Dekarboxylierung von Glyoxylat in der Lage ist. Allerdings wird angenommen, dass dieses CO₂ vor allem an

spezialisierten NDH-Komplexen wieder in das wenig permeable Bicarbonat umgewandelt wird. Entsprechende Flux-Analysen unter Einsatz von Substraten, die mittels stabiler ^{13}C -Isotope markiert sind, könnten Aufschluss über diese zusätzliche CO_2 -Quelle unter LC-Bedingungen geben (HUEGE *et al.*, 2011; SCHWARZ *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2011).

Gene für Enzyme des Calvin-Benson-Bassham Zyklus sind sowohl in *Synechocystis* als auch in *Synechococcus* in ihrer Transkription nicht durch die Umstellung auf LC beeinflusst – eine Ausnahme bildet in *Synechococcus* allein das Gen *1939*, das für eine Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase kodiert. Im Gegenzug dazu deutet die Transkriptom-Analyse an *Synechococcus* zumindest auf erhöhte Transkriptmengen der Gene *0592*, *0458*, *2078* und *0098* hin, die in Assoziation mit der Glykolyse und des OPP-Weges stehen. Somit zeigen sowohl die Metabolom- als auch Transkriptom-Daten eine Aktivierung dieser Wege des zentralen C-Metabolismus unter LC an. Die Metabolom-Analysen in *Synechococcus* und *Synechocystis* wies in Form der Akkumulation von 3PGA, 2PGA sowie PEP und der Abnahme der Glykogen-Menge klar darauf hin, dass LC-Bedingungen zu einer Inhibierung des Calvin-Benson-Bassham Zyklus, zum verstärkten Abbau des Speicherstoffes Glykogen sowie zur erhöhten Umsetzung von 3PGA über den OPP führen.

Die Transkription von Genen des TCA-Zyklus sowie des GS/GOGAT-Weges zeigen in *Synechocystis* und *Synechococcus* eher die Tendenz zur Reduktion mit Ausnahme einer deutlich gesteigerten Transkriptmenge vom Gen *0641*, das in *Synechococcus* eine Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase kodiert.

Basierend auf der kombinierten und vergleichenden Metabolom- und Transkriptom-Analyse der Cyanobakterien-Stämme *Synechocystis* und *Synechococcus* in Reaktion auf einen des C_i -Angebotes von HC zu LC lassen sich folgende, fundamentale Anpassungsstrategien definieren (Abbildung 17. Modell zur Verdeutlichung der LC-Anwort in Cyanobakterien. In blau hinterlegte Stoffwechselwege sind als Reaktion auf LC in ihrer Aktivität vermindert, hellorange hinterlegte Bereiche signalisieren gesteigerte Aktivität. Metabolite mit einem deutlichen Anstieg bzw. Abfall in der Poolgröße sind in orange bzw. blau hervorgehoben.

Abbildung 18. Relative Metabolitgehalte der Aminosäuren Ornithin und Aspartatin *Synechocystis* (WT) und in der Mutante $\Delta ndhR$ unter HC (5 % CO_2) und LC (0,035 % CO_2).

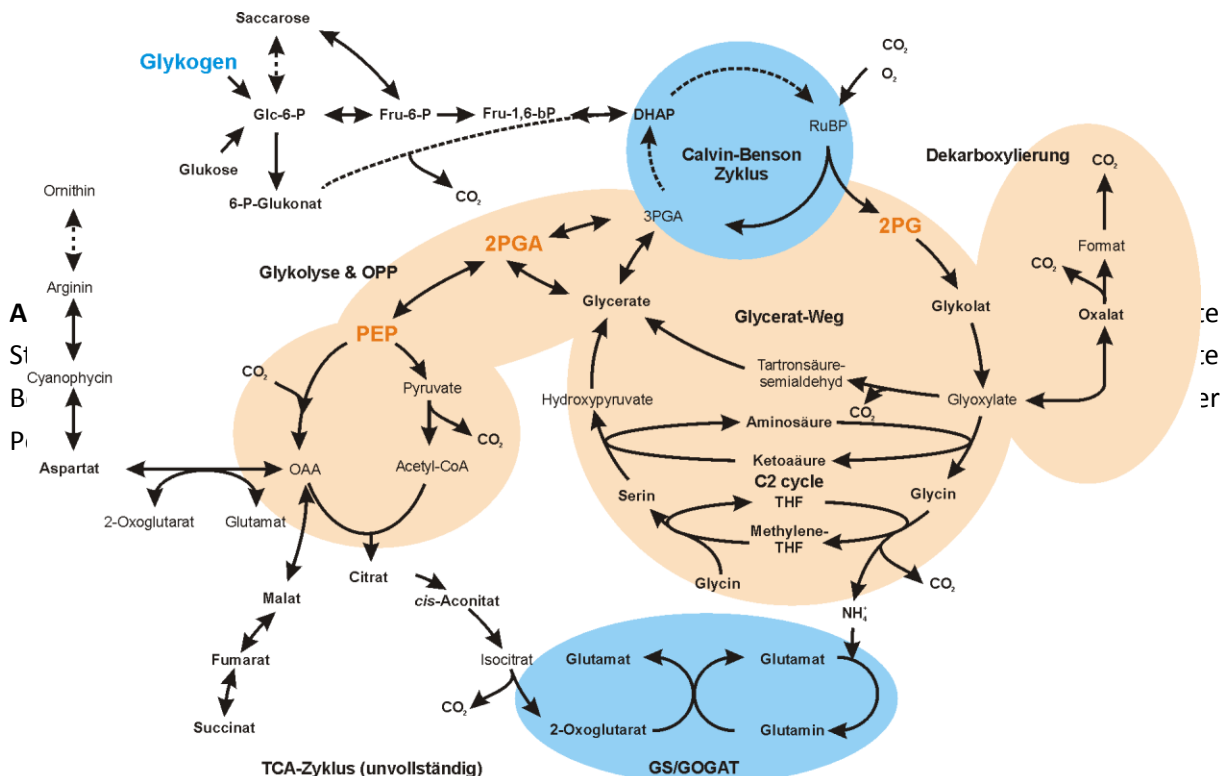
Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$).Abbildung 17):

- (1) Zur Verbesserung der Effizienz des CCM werden in Form von BCT1 und NDH-1₃ zusätzliche CO₂/HCO₃⁻-Aufnahmesysteme über eine gesteigerte Transkription aktiviert. Gleichzeitig wird die Anzahl der Carboxysomen pro Zelle erhöht.
- (2) Zur Kompensierung eines auftretenden Mangels an C_i wird der Kohlenstoff-Speicherstoff Glykogen abgebaut.
- (3) Das durch gesteigerte Oxygenase-Aktivität der RubisCO gebildete 2PG wird über die drei Wege des photorespiratorischen 2PG-Metabolismus verstoffwechselt.
- (4) Die CO₂-Fixierung über den Calvin-Benson-Bassham Zyklus wird aufgrund des negativen Effektes von 2PG und deren ansteigendem Metabolit-Gehalt inhibiert.
- (5) Der Kohlenstoff-Metabolismus verläuft vermehrt über die Glykolyse sowie den OPP-Weg ab.
- (6) Die Aktivität des N-Metabolismus über den GS/GOGAT-Weg wird im Zuge der LC-Anpassung herabgesetzt, um einen Ausgleich im intrazellulären C/N-Haushalt zu gewährleisten.

Bei den hier untersuchten Cyanobakterien-Stämmen *Synechocystis* und *Synechococcus* handelt es sich um nicht-diazotrophe Mikroorganismen, die nicht zur Fixierung von molekularem Stickstoff (N₂) befähigt sind. Für weiterführende Betrachtungen der C_i-Anpassung wäre das Einbeziehen von N₂-fixierenden Cyanobakterien wie *Anabaena* und *Nostoc* interessant.

5.3 Auswirkungen der *ndhR*-Inaktivierung auf die Anpassung an CO₂-Mangel

Der Transkriptionsregulator NdhR wurde in der Literatur als Repressor für LC-induzierte Gene wie das *ndhF3/ndhD3/cupA*-Operon, das *ndhD5/ndhD6*-Operon sowie das *sbtA/sbtB*-Operon beschrieben (WANG *et al.*, 2004). FIGGE *et al.* (2001) identifizierten als Konsensussequenz für die NdhR-Bindung an die DNA eine TCAATG-(N₁₀)-ATCAAT Sequenz. Diese auch als T(N₁₁)A-Motiv bezeichnete DNA-Region ist *upstream* von der Promotor-Region NdhR-regulierter Gene lokalisiert (CARMEL *et al.*, 2013; FIGGE *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2004). Die Bindung von NdhR an die Konsensus-Sequenz unterbindet die Expression der entsprechend „*downstream*“ gelegenen Gene. Gleichzeitig reguliert NdhR die Expression seines eigenen



Genes *ndhR* (*sll1594*). DALEY *et al.* (2012) untersuchten, inwieweit ein Metabolit die Bindung von NdhR an den Promotor beeinflusst und damit als potentieller metabolischer Sensor für die Wahrnehmung einer C_i-Mangelbedingung verantwortlich ist. Nach diesen Befunden

fungieren 2OG und NADP⁺ als Co-Repressoren und vermitteln die NdhR-Bindung sowie deren Aufrechterhaltung an das T(N₁₁)A-Motiv.

Physiologische Untersuchungen der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhR$ zeigten im Vergleich zum WT unter HC keinen Unterschied in der Wachstumsrate. Unter LC-Bedingungen dagegen zeichnet sich $\Delta ndhR$ durch ein um etwa 70 % reduziertes Wachstum aus. Ein ähnliches Wachstumsverhalten wurde bereits von WANG *et al.* (2004) beschrieben.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Transkriptom-Analyse der NdhR-Mutante zeichnete sich bei Betrachtung CCM-assoziiierter Gene durch eine gute Reproduzierbarkeit der bereits in WANG *et al.* (2004) postulierten transkriptionellen Verschiebungen im Vergleich zum WT aus. Die Mutante $\Delta ndhR$ zeigte bereits unter HC erhöhte Transkriptmengen der Operongene *ndhD3/ndhF3/cupA*, *sbtA/sbtB* sowie *ndhD5/ndhD6*, während das durch CmpR regulierte *cmp*-Operon (NISHIMURA *et al.*, 2008) unbeeinflusst blieb. Diese Studienübergreifenden Übereinstimmungen bestätigen die Funktion von NdhR als Repressor der Expression der LC-induzierten CO₂/HCO₃⁻-Transportsysteme. Darüber hinaus finden sich in der Mutante $\Delta ndhR$ in Anlehnung an WANG *et al.* (2004) ebenfalls die verstärkte Transkription der Gene *ssr3409*, *ssr3010* sowie *slr1592* und *sll0529* unter HC wieder. Für *slr2006* beschrieben WANG *et al.* (2004) die Anwesenheit eines „upstream“ T(N₁₁)A-Motives. Somit entsprechen die hier beobachteten Modifikationen des Transkriptoms der $\Delta ndhR$ -Mutante den in WANG *et al.* (2004) beschriebenen.

Darüber hinaus zeigten WANG *et al.* (2004) induzierte Veränderungen in der Transkription der Gene *slr0829*, *slr1099*, *sll1605*, *sll0622*, *slr0787* sowie *sll0916*, die durch die *ndhR*-Inaktivierung verursacht wurden. Diese Gene zeigten in der hier durchgeführten Untersuchung unter HC und LC in der $\Delta ndhR$ -Mutante keine Verschiebungen im Transkriptionsmuster. Die als Operon organisierten Gene *slr1259 – slr1262* sowie *ssl3769* und *slr1535* zeichneten sich im WT durch verminderte Transkriptmengen unter LC um rund 50 % aus, während in der Mutante diese Reduktion ausbleibt. Ein Blick in die Datenbank Cyanobase, zeigt das die hier angesprochenen Genprodukte als hypothetische Proteine annotiert sind. Das ist ein erster Hinweis darauf, dass NdhR für diese Gene unter LC als Repressor oder unter HC als Aktivator wirken könnte. Um zu klären inwieweit diese Effekte durch direkte NdhR-Bindung im Promotorbereich dieser Gene hervorgerufen wurden oder eher indirekter Art sind, bedarf es weiterer Untersuchungen. Ferner war die Identifizierung von Genen möglich, die in Abwesenheit von NdhR unter HC und

LC in ihrer Transkription gehemmt sind. Die Gene *slr0907*, *sll1862/sll1863* sowie *slr0907* kodieren für hypothetische Proteine. Die Transkriptmengen dieser Gene sind in der Mutante im Vergleich zum WT sowohl unter HC als auch LC vermindert. Im WT unterliegen diese Gene keiner eindeutig zu identifizierenden LC-Regulation. Das Gencluster *sll0680-sll0684* weist in der Mutante $\Delta ndhR$ unter HC eine um 60 - 70 % reduzierte Transkriptmenge auf. Sowohl im WT als auch in der Mutante steigt der Level des Operons nach 3 h LC zunächst an und nähert sich nach 24 h wieder dem Ausgangsniveau unter HC an. Das entsprechende Operon kodiert für einen Phosphattransporter vom ABC-Typ (SCANLAN *et al.*, 1993; PITT *et al.*, 2010). Phosphat stellt einen essentiellen Baustein der Nukleinsäuren und vieler anderer Zellbestandteile dar. *Synechocystis* ist zur intrazellulären Akkumulation von anorganischem Phosphat (P_i) in Form von Polyphosphaten (polyP) befähigt (LAWRENCE *et al.*, 1998). Unter Stressbedingungen wie P_i -Mangel, Stickstoffmangel, Salzstress sowie oxidativer Stress wurde in der Literatur eine gesteigerte Transkript- bzw. Proteinmenge für *sll0680* beschrieben (FUSZARD *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2006; KOBAYASHI *et al.*, 2004; PITT *et al.*, 2010). Für die Kultivierung von *Synechocystis* in Dunkelheit wiesen BURUT-ARCHANAI *et al.* (2011) dagegen eine verminderte Aktivität der Aufnahme von P_i nach. Ohne Licht kann die Bereitstellung von ATP und NADPH, die aus der Lichtreaktion der Photosynthese stammen, für die CO_2 -Fixierung über den Calvin-Benson-Bassham Zyklus nicht mehr gewährleistet werden. Beide Kultivierungsbedingungen, Dunkelheit und die Reduktion der C_i -Verfügbarkeit im Außenmedium, bedingen in *Synechocystis* somit einen Mangel an C_i und setzen die CO_2 -Fixierung sowie die Photosyntheserate herab. Dementsprechend vermindert sich die Wachstumsrate der Kultur. Weiterhin verfügen LC-adaptierte *Synechocystis*-Zellen aufgrund des C_i - Mangels sowie des eingeschränkten Wachstums langfristig gesehen vermutlich eher über einen Überschuss an intrazellulärem P_i . Einen transienten Anstieg für *sll0680* beschrieben PITT *et al.* (2010) auch für die Kultivierung unter Starklicht, einer Bedingung die zu einem relativen C_i -Mangel aufgrund des gesteigerten Wachstums führt. Weiterhin schrieben SUZUKI *et al.* (2003) die Regulation der P_i -Mangelantwort in *Synechocystis* dem Zweikomponentensystem SphS und SphR zu. Die verminderte Transkriptmenge an *sll0680* in $\Delta ndhR$ unter HC kann somit vermutlich nicht direkt der *ndhR*-Inaktivierung zugeschrieben werden. Eine NdhR-Bindungsstelle im Promotorbereich von *sll0680-sll0684* vom T(N₁₁)A-Typ ist ebenso nicht eindeutig identifizierbar. Dementsprechend ist zu vermuten, dass die

reduzierte Transkriptmenge von *sll0680* unter HC eine indirekte Folge der Abwesenheit von NdhR ist und mit dem zum Teil bereits unter HC vorliegenden LC-Status zusammenhängen könnte.

Bei Betrachtung von Genen, die Enzyme des zentralen C- und N-Metabolismus kodieren, sind keine Unterschiede zwischen WT und Mutante zu erkennen. Folglich ist die Transkription dieser Gene NdhR-unabhängig.

Weiterhin zeigte sich eine gesteigerte Transkriptmenge in der antisense RNA (asRNA) des Genes *sll1730*. Das Genprodukt ist in der Datenbank Cyanobase als Protein unbekannter Funktion annotiert. *In silico*-Blast-Analysen lassen erkennen, dass Sll1730 mit der Domäne DUF3540 einen konservierten Bereich aufweist. Diese Domäne wurde auch in ähnlichen Proteinen anderer Bakterien gefunden, Hinweise auf deren Funktion liegen zurzeit jedoch nicht vor. Der asRNA kommt als nichtprotein-kodierende, kleine RNA in Bakterien vermutlich bei posttranskriptionellen Regulationsmechanismen eine Rolle zu. Die Bindung einer asRNA an die komplementäre mRNA unterbindet die Translation und somit die Proteinsynthese. Im WT unterliegt die asRNA von *sll1730* keiner LC-abhängigen Transkription. Die gesteigerte Transkriptmenge der asRNA könnte somit darauf hindeuten, dass NdhR indirekt auch eine Rolle bei der posttranslationalen Regulation spielen könnte.

Die Metabolom-Analysen an $\Delta ndhR$ weisen darauf hin, dass in der Mutante die LC-Anwort schwächer oder verspätet im Vergleich zum WT ausgeprägt ist. Der Anstieg im 2PG-Gehalt ist in der Mutante nach 3 h LC signifikant geringer als im WT, nähert sich aber nach 24 h LC mit einer Verdreifachung dem WT-Wert an. In Kombination mit der in der Transkriptom-Analyse bereits unter HC verstärkten Transkription der Gene für die $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Aufnahmesysteme SbtA und NDH-1₃, scheint der Mangel an C_i in den Zellen der Mutante geringer auszufallen. 2PG wird als möglicher metabolischer Signalgeber für die Wahrnehmung einer LC-Bedingung diskutiert. Für den Transkriptionsregulator CmpR, der die LC-abhängige Transkription vom *cmp*-Operon vermittelt, wiesen NISHIMURA *et al.* (2008) nach, dass die Bindung an die DNA durch 2PG begünstigt wird. DALEY *et al.* (2012) zeigten dagegen für den Regulator NdhR eine von 2OG abhängige Bindung an die DNA. Ein Anstieg im 2OG-Level ist allerdings wie bereits im Vorfeld gezeigt, keine stabile Komponente der LC-Anpassung und wird vermutlich durch weitere Faktoren beeinflusst. Die Metabolom-Analyse im Zuge der Charakterisierung der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhR$ wies auf einen Abfall im 2OG-Level hin. Im Vergleich zum WT

von *Synechocystis* zeigt sich in der Mutante bereits unter HC ein signifikant erhöhter Gehalt an PEP. Dementsprechend scheint der C-Metabolismus in $\Delta ndhR$ bereits unter HC in Richtung OPP-Weg verschoben zu sein. Diese Beobachtung könnte als Erklärung dafür angesehen werden, dass die LC-Anwort in der Mutante schwächer ausfällt als im WT.

Das Modell des NdhR-Regulons und die Repressorwirkung von NdhR auf LC-induzierte Gene wie sie bereits in der Literatur beschrieben worden ist (WANG *et al.*, 2004; DALEY *et al.*, 2012), kann entsprechend um weitere metabolische Merkmale ergänzt werden. Ein deutlicher Anstieg im 2PG-Pool bleibt in der Mutante unter HC aus. Dementsprechend hat die Transkription der NdhR-regulierten Gene keinen direkten Einfluss auf das Metabolom. Dennoch ist $\Delta ndhR$ durch eine schwächer ausgeprägte LC-Antwort auf Metabolom-Ebene gekennzeichnet. Diese Beobachtung ist mit dem in der Mutante bereits unter HC erreichten LC-Status in Verbindung zu bringen. Er führt dazu, dass die Mutante bereits zum Teil, z. B. durch die verstärkte Transkription von CO_2/HCO^- -Aufnahmesystemen, auf das Eintreten einer LC-Bedingung vorbereitet ist.

6 AUSBLICK

Die in dieser Arbeit vorgenommene Definition einer stabilen Metabolom-Signatur für die Anpassung von Cyanobakterien an C_i -Mangelbedingungen stellt eine Basis für die Feststellung des C_i -Status cyanobakterieller Zellen dar. Die Interaktion des Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus scheint neben dem C_i -Angebot durch weitere Faktoren und Regulationsmechanismen beeinflusst zu sein, wie Variationen im Verhalten der Metabolite Glutamat, Glutamin und 2OG zeigen.

Die Untersuchung von Stickstoff-fixierenden Cyanobakterien wie *Nostoc* und *Anabaena* könnte die Ausweitung der Metabolom-Signatur auch auf diese Organismengruppe ermöglichen. Zudem stellt sich die Frage, inwiefern die C_i -Verfügbarkeit Einfluss auf den in der Literatur beschriebenen offenen oder geschlossenen TCA Zyklus haben könnte (STEINHAUSER *et al.*, 2012). Die Untersuchung von *Synechocystis*-Mutanten, die Gendefekte in den putativ für den Ringschluss notwendigen Enzymen 2OG Dekarboxylase und Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase aufweisen, könnte zur Klärung beitragen.

Die Untersuchungen zum Transkriptionregulator NdhR bestätigen das bereits bekannte Modell des NdhR-Regulons. Des Weiteren gibt es erste Hinweise darauf, dass NdhR auch Einfluss auf die Transkription von nichtprotein-kodierender RNA wie asRNA hat. Das System dieser Regulationsmechanismen ist nicht hinreichend aufgeklärt und vor allem hinsichtlich der RNAs, die bei der Anpassung an C_i -Mangel involviert sein könnten, noch nicht charakterisiert. Dementsprechend stellen die hier erzielten Ergebnisse einen Ansatzpunkt für die über das Metabolom und Transkriptom hinausgehende Definition der C_i -Anpassung dar.

Der Metabolit 2OG ist zum einen bei der Regulation des Stickstoffmetabolismus unter N-Mangel (FORCHHAMMER *et al.*, 1994; 2008) beteiligt und zum anderen wird 2OG als Co-Activator für NdhR beschrieben (DALEY *et al.*, 2012). In Kombination mit den widersprüchlichen Veränderungen im 2OG-Gehalt in *Synechocystis* und *Synechococcus* unter LC scheint dieser Metabolite eine Schlüsselrolle bei unterschiedlichen Regulationsmechanismen zu spielen. Fütterungsexperimente mit 2OG könnten zur Aufklärung der Funktion von 2OG im Rahmen der C_i -Anpassung beitragen. Neben der $\Delta ndhR$ -Mutante sollte zudem die *Synechocystis*-Mutante $\Delta glnB$, die einen Defekt im PII-Protein aufweist, hinzugezogen werden. HC/LC-Shift-Experimente mit $\Delta glnB$ wurden im Rahmen dieser Arbeit

bereits durchgeführt. Des Weiteren wurde die *Synechocystis*-Mutante $\Delta abrB$ in die Transkriptom und Metabolom-Analysen mit eingeschlossen. AbrB ist in Anlehnung an NdhR bereits ebenfalls als Repressor der C_i -Anpassung bekannt (ISHII und HIHARA, 2008; LIEMAN-HURWITZ *et al.*, 2008; DUTHEIL *et al.*, 2012). Eine Darstellung dieser zusätzlichen Datensätze war aufgrund festgelegter Grenzwerte bezüglich der Umfänglichkeit dieser Arbeit hier nicht möglich. Die Auswertung der entsprechenden Experimente wird in naher Zukunft in Originalpublikationen erfolgen.

Im Zusammenhang mit der C_i -Anpassung scheint neben 2OG auch 2PG eine Rolle bei der Regulation zu spielen. HACKENBERG *et al.* (2012) zeigten bereits, dass in der Carboxysomen-Mutante $\Delta ccmM$ der Gehalt an 2PG unter HC signifikant erhöht ist. Die Bindung des Transkriptionsregulators CmpR, der das *cmp*-Operon unter LC reguliert, wird durch erhöhte Mengen an 2PG verstärkt (NISHIMURA *et al.*, 2008). Dennoch wies das Transkriptom von $\Delta ccmM$ keinen erhöhten Transkriptlevel im *cmp*-Operon auf. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass 2PG das einzige Signal für LC ist und weitere Faktoren, wie z. B. der intrazelluläre Gehalt an HCO_3^- an der LC-Wahrnehmung beteiligt sein könnten. In Zukunft könnte die Einbeziehung einer Mutante im C_i -Transport, z.B. der *Synechocystis*-Mutante $\Delta ndhD3/\Delta ndhD4/\Delta sbtA/\Delta cmpA$ (Xu *et al.*, 2011), die nur noch über den konstitutiv exprimierten Transporter BicA verfügt, von Interesse sein. In dieser Mutante sollte der interne C_i -Pool sehr gering sein, so dass RubisCO in einer LC-Umgebung unter HC-Bedingungen arbeiten muss. Vergleichende Analysen hinsichtlich des Transkriptoms und Metaboloms unter HC und LC könnten zur Klärung der Bedeutung metabolischer Signale beitragen.

7 LITERATUR

- ABED RM, Dobretsov S, Sudesh K (2009)** Applications of cyanobacteria in biotechnology. *J Appl Microbiol*, 106, 1-12.A
- ALLWOOD JW, Erban A, de Koning S, Dunn WB, Luedemann A, Lommen A, Kay L, Löscher R, Kopka J, Goodacre R (2009)** Inter-laboratory reproducibility of fast gas chromatography–electron impact–time of flight mass spectrometry (GC–EI–TOF/MS) based plant metabolomics. *Metabolomics* 5(4): 479–496 (doi: 10.1007/s11306-009-0169-z)
- ANDERSON SL, McINTOSH L (1991)** Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: a blue-light-requiring process. *J Bacteriol*, 173, 2761-2767.
- ANEMAET IG, Bekker M, Hellingwerf KJ (2010)** Algal photosynthesis as the primary driver for a sustainable development in energy, feed, and food production. *Mar Biotechnol (NY)*, 12, 619-629.
- ATSUMI S, Higashide W, Liao JC (2009)** Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nat Biotechnol*, 27, 1177-1180.
- BADGER MR and PRICE GD (2003)** CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: Molecular components, their diversity and evolution. *J Exp Botany*, 54, 609-622.
- BADGER MR, Kaplan A, Berry JA (1980)** Internal inorganic carbon pool of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 66, 407-413.
- BADGER MR, Price GD, Long BM, Woodger FJ (2006)** The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *J Exp Botany*, 57, 249-265.
- BOLDT R, Edner C, Kolukisaoglu U, Hagemann M, Weckwerth W, Wienkoop S, Morgenthal K, Bauwe H (2005)** D-GLYCERATE 3-KINASE, the last unknown enzyme in the photorespiratory cycle in *Arabidopsis*, belongs to a novel kinase family. *Plant Cell*, 17, 2413-2420.
- BURUT-ARCHANAI S, Eaton-Rye JJ, Incharoensakdi A (2011)** Na⁺-stimulated phosphate uptake system in *Synechocystis* sp. PCC 6803 with Pst1 as a main transporter. *BMC Microbiol*, 11, 25, doi: 10.1186/1471-2180-11-225.
- CAMERON JC, Wilson SC, Bernstein SL, Kerfeld CA (2013)** Biogenesis of a bacterial organelle: The carboxysome assembly pathway. *Cell*, 155, 1131-1140.
- CANNON GC, Bradburne CE, Aldrich HC, Baker SH, Heinhorst S, Shively JM (2001)** Microcompartments in prokaryotes: carboxysomes and related polyhedra. *Appl Environ Microbiol*, 67, 5351-5361.
- CAPONE DG, Zehr JP, Paerl HW, Bergman B, Carpenter EJ (1997)** *Trichodesmium*, a globally significant marine cyanobacterium. *Science*, 276, 1221-1229.
- CARMEL D, Dahlström KM, Holmström M, Allahverdiyeva Y, Battchikova N, Aro EM, Salminen TA, Mulo P (2013)** Structural model, physiology and regulation of Slr0006 in *Synechocystis* PCC 6803. *Arch Microbiol*, 195, 727-736.

- COLMAN B** (1989) Photosynthetic carbon assimilation and the suppression of photorespiration in the cyanobacteria. *Aquatic Botany*, 34, 211-231.
- COOLEY JW**, Howitt CA, Vermaas WF (2000) Succinate : quinol oxidoreductases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Presence and function in metabolism and electron transport. *J Bacteriol*, 182, 714–722.
- COT SS**, So AK, Espie GS (2008) A multiprotein bicarbonate dehydration complex essential to carboxysome function in cyanobacteria. *J Bacteriol*, 190, 936-945.
- DALEY SM**, Kappell AD, Carrick MJ, Burnap RL (2012) Regulation of the cyanobacterial CO₂-concentrating mechanism involves internal sensing of NADP⁺ and α -ketogutarate levels by transcription factor CcmR. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0041286.
- DEUSCH O**, Landan G, Roettger M, Gruenheit N, Kowallik KV, Allen JF, Martin W, Dagan T (2008) Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor. *Mol Biol Evol*, 25, 748-761.
- DISMUKES GC**, Carrieri D, Bennette N, Ananyev GM, Posewitz MC (2008) Aquatic phototrophs: Efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr Opin Biotechnol*, 19, 235-240.
- DISMUKES GC**, Klimov VV, Baranov SV, Kozlov YN, DasGupta J, Tyryshkin A (2001) The origin of atmospheric oxygen on earth: The innovation of oxygenic photosynthesis. *PNAS*, 98, 2170-2175.
- DOUGLAS SE** (1994) Chloroplast origins and evolution. In *The Molecular biology of cyanobacteria*, Hrsg. Bryant DA, Kluwer Academic Publishers, Amsterdam.
- DUTHEIL J**, Saenkham P, Sakr S, Leplat C, Ortega-Ramos M, Bottin H, Cournac L, Cassier-Chauvat C, Chauvat F (2012) The AbrB2 autorepressor, expressed from an atypical promoter, represses the hydrogenase operon to regulate hydrogen production in *Synechocystis* strain PCC6803. *J Bacteriol*, 194, 5423-5433.
- EISENHUT M**, Aquirre von Wobeser E, Jonas L, Schubert H, Ibelings BW, Bauwe H, Matthijs HC, Hagemann M (2007) Long-term response toward inorganic carbon limitation in wild type and glycolate turnover mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol*, 144, 1946-1959.
- EISENHUT M**, Huege J, Schwarz D, Bauwe H, Kopka J, Hagemann M (2008) Metabolome phenotyping of inorganic carbon limitation in cells of wild type and photorespiratory mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol*, 148, 2109-2120.
- EISENHUT M**, Kahlon S, Hasse D, Ewald R, Lieman-Hurwitz J, Ogawa T, Ruth W, Bauwe H, Kaplan A, Hagemann M (2006) The plant-like C₂ glycolate cycle and the bacterial-like glycerate pathway cooperate in phosphoglycolate metabolism in cyanobacteria. *Plant Physiol*, 142, 333-342.
- ERBAN A**, Schauer N, Fernie AR, Kopka J (2007) Non-supervised construction and application of mass spectral and retention time index libraries from time-of-flight GC-MS metabolite profiles. *Methods in Molecular Biology* 358: 19-38 In: Weckwerth W (ed) *Metabolomics: methods and protocols*. Humana Press (ISBN: 978-1-58829-561-3), Totowa (doi: 10.1007/978-1-59745-244-1_2)

- FIELD** CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P (1998) Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281, 237-240.
- FIGGE** RM, Cassier-Chauvat C, Chauvat F, Cerff R (2001) Characterization and analysis of an NAD(P)H dehydrogenase transcriptional regulator critical for the survival of cyanobacteria facing inorganic carbon starvation and osmotic stress. *Mol Microbiol*, 39, 455-468.
- FLORES** E, **HERRERO** A (2005) Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Biochem Soc Trans*, 33, 164-167.
- FORCHHAMMER** K 820089 P(II) signal transducers: novel functional and structural insights. *Trends Microbiol*, 16, 65-72.
- FUZARD** MA, Ow SY, Gan CS, Noirel J, Ternan NG, McMullan G, Biggs CA, Reardon KF, Wright PC (2013) The quantitative proteomic response of *Synechocystis* sp. PCC6803 to phosphate acclimation. *Aquat Biosyst*, 9, doi: 10.1186/2046-9063-9-5.
- GEORG** J, Voss B, Scholz I, Mitschke J, Wilde A, Hess WR (2009) Evidence for a major role of antisense RNAs in cyanobacterial gene regulation. *Mol Syst Biol*, 5, 305.
- GHIRARDI** ML, Dubini A, Yu J, Maness PC (2009) Photobiological hydrogen-production systems. *Chem Soc Rev*, 38, 52-61.
- GRIFFIN** KL, **SEEMAN** JR (1996) Plants, CO₂ and photosynthesis in the 21st century. *Chem Biol*, 3, 245-254.
- GUBERNATOR** B, Bartoszewski R, Kroliczewski J, Wildner G, Szczepaniak A (2008) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. *Photosynth Res*, 95, 101-109.
- GUPTA** RS, **MATHEWS** DW (2010) Signature proteins for the major clades of Cyanobacteria. *BMC Evol Biol*, 25, 10-24.
- HACKENBERG** C, Huege J, Engelhardt A, Wittink F, Laue M, Matthijs HC, Kopka J, Bauwe H, Hagemann M (2012) Low-carbon acclimation in carboxysome-less and photorespiratory mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Microbiology*, 158, 398-413.
- HAIMOVICH-DAYAN** M, Kahlon S, Hihara Y, Hagemann M, Ogawa T, Ohad I (2011) Cross-talk between photomixotrophic growth and CO₂-concentrating mechanism in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Environ Microbiol*, 13, 1767-1777.
- HIHARA** Y, Kamei A, Kanehisa M, Kaplan A, Ikeuchi M (2001) DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. *Plant Cell*, 13, 793-806.
- HOLLAND** HD (2006) The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361, 903-915.
- HUANG** F, Fulda S, Hagemann M, Norling B (2006) Proteomic screening of salt-stress-induced changes in plasma membranes of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Proteomics*, 5, 910-920.
- HUEGE** J, Goetze J, Schwarz D, Bauwe H, Hagemann M, Kopka J (2011) Modulation of the major paths of carbon in photorespiratory mutants of *Synechocystis*. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0016278.

- HUMMEL J**, Strehmel N, Selbig J, Walther D, Kopka J (2010) Decision tree supported substructure prediction of metabolites from GC-MS profiles. *Metabolomics* 6: 322-333 (doi: 10.1007/s11306-010-0198-7)
- HUSIC DW**, Husic HD, Tolbert NE (1987) The oxidative photosynthetic carbon cycle or C2 cycle. *CRC Crit Rev Plant Sci*, 5, 45-100.
- ISHII A**, **HIHARA Y**. (2008) An AbrB-Like Transcriptional Regulator, Sll0822, Is Essential for the Activation of Nitrogen-Regulated Genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol*, 148, 660-670.
- JORDAN DB**, **OGREN WL** (1983) Species variation in the specificity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. *Arch Biochem Biophys*, 227, 425-433.
- KANESAKI Y**, Shiwa N, Tajima N, Suzuki M, Watanabe S, Sato N, Ikeuchi M, Yoshikawa (2011) Identification of substrain-specific mutation by massively parallel whole-genome resequencing of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*.
- KAPLAN A**, Hagemann M, Bauwe H, Kahlon S, Ogawa T (2008) Carbon acquisition by cyanobacteria: mechanisms, comparative genomics and evolution. In *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*, Hrsg. Herrero A und Flores H, Norfolk, UK: Caister Academic Press, 305–334.
- KAPLAN A**, **REINHOLD L** (1999) CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50, 539-570.
- KAISING JF** (1993) Earth's early atmosphere. *Science*, 259, 920-926.
- KELLY GJ**, **LATZKO E** (1977) Chloroplast phosphofructokinase: II. Partial purification, kinetic and regulatory properties. *Plant Physiol*, 60, 295-299.
- KERFELD CA**, Sawaya MR, Tanaka S, Nguyen CV, Phillips M, Beeby M, Yeates TO (2005) Protein structures forming the shell of primitive bacterial organelles. *Science*, 309, 936-938.
- KERN R**, Bauwe H, Hagemann M (2011) Evolution of enzymes involved in the photorespiratory 2-phosphoglycolate cycle from cyanobacteria via algae toward plants. *Photosynth Res*, 109, 103-1014.
- KERR RA** (2005) The story of O₂. *Science*, 308, 1730-1732.
- KOBAYASHI M**, Ishizuka T, Katayama M, Kanehisa M, Bhattacharyya-Pakrasi M, Pakrasi HB, Ikeuchi M (2004) Response to oxidative stress involves a novel peroxiredoxin gene in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol*, 45, 290-299.
- KOPKA J**, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmueller E, Doermann P, Weckwerth W, Gibon Y, Stitt M, Willmitzer L, Fernie AR, Steinhauser D (2005) GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics* 21 (8): 1635-1638 (doi: 10.1093/bioinformatics/bti236)
- LARSSON J**, Nylander JA, Bergman B (2011) Genome fluctuations in cyanobacteria reflect evolutionary, developmental and adaptive traits. *BMC Evol Biol*, 11, 187.

- LAWRENCE** BA, Suarez C, DePina A, Click E, Kolodny NH, Allen MM (1998) Two internal pools of soluble polyphosphate in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6308: an in vivo ³¹P NMR spectroscopic study. *Arch Microbiol*, 169, 195-200.
- LIEMAN-HURWITZ** J, Haimovich M, Shalev-Malul G, Ishii A, Hihara Y, Gaathon A, Lebendiker M, Kaplan A (2008) A cyanobacterial AbrB-like protein affects the apparent photosynthetic affinity for CO₂ by modulating low-CO₂-induced gene expression. *Environ Microbiol*, 11, 927-936.
- LIU** X, Sheng J, Curtiss R 3rd (2011) Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria. *PNAS*, 108, 6899-6904.
- LUEDEMAN** A, Strassburg K, Erban A, Kopka J (2008) TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics* 24 (5): 732 -737 (doi: 10.1093/bioinformatics/btn023)
- MARCUS** Y, Zenvirth D, Harel E, Kaplan A (1982) Induction of HCO₃⁻ transporting capability and high photosynthetic affinity to inorganic carbon by low concentration of CO₂ in *Anabaena variabilis*. *Plant Physiol*, 69, 1008-1012.
- McEWEN** JT, Machado IM, Connor MR, Atsumi S (2013) Engineering *Synechococcus elongatus* PCC 7942 for continuous growth under diurnal conditions. *Appl Environ Microbiol*, 79, 1668-1675.
- McGINN** PJ, Price GD, Badger MR (2004) High light enhances the expression of low-CO₂-inducible transcripts involved in the CO₂-concentrating mechanism in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant, Cell and Environment*, 27, 615-626.
- McGINN** PJ, Price GD, Maleszka R, Badger MR (2003) Inorganic carbon limitation and light control the expression of transcripts related to the CO₂-concentrating mechanism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC6803. *Plant Physiol*, 132, 218-229.
- MENDZHUL** MI, Lysenko TG, Shainskaia OA, Busakhina IV (2000) Activity of tricarboxylic acid cycle enzymes in cyanobacteria *Spirulina platensis*. *Mikrobiol Z*, 62, 3-10.
- MERESCHKOWSKI** KS (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol Centralbl*, Bd. 25, 593-604, 689-691.
- MITSCHE** J, Georg J, Scholz I, Sharma CM, Dienst D, Bantscheff J, Voss B, Steglich C, Wilde A, Vogel J, Hess WR (2011) An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *PNAS*, 108, 2124-2129.
- NARINSAMY** K, Cassier-Chauvat C, Junot C, Chauvat F (2013) High performance analysis of the cyanobacterial metabolism via liquid chromatography coupled to a LTQ-Orbitrap mass spectrometer: evidence that glucose reprograms the whole carbon metabolism and triggers oxidative stress. *Metabolomics*, 9, 21-32.
- NISHIMURA** T, Takahashi Y, Yamaguchi O, Suzuki H, Maeda S, Omata T (2008) Mechanism of low CO₂-induced activation of the cmp bicarbonate transporter operon by a LysR family protein in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *Mol Microbiol*, 68, 98-109.

- NODOP A**, Pietsch D, Höcker R, Becker A, Pistorius EK, Forchhammer K, Michel KP (2008) Transcript profiling reveals new insights into the acclimation of the mesophilic fresh-water cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 to iron starvation. *Plant Physiol*, 147, 747-763.
- NORMAN EG**, **COLMAN B** (1991) Purification and characterization of phosphoglycolate phosphatase from the cyanobacterium *Coccochloris peniocyctis*. *Plant Physiol*, 95, 693-698.
- OMATA T**, Gohta S, Takahashi Y, Harano Y, Maeda S (2001) Involvement of a CbbR homolog in low CO₂-induced activation of the bicarbonate transporter operon in cyanobacteria. *J Bacteriol*, 183, 1891-1898.
- PARTENSKY F**, Hess WR, Vaulot D (1999) *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63, 106-127.
- PEARCE J**, **CARR NG** (1967) The metabolism of acetate by the blue-green algae, *Anabaena variabilis* and *Anacystis nidulans*. *J Gen Microbiol*, 49, 301-313.
- PEARCE J**, Leach CK, Carr NG (1969) The incomplete tricarboxylic acid cycle in the blue-green alga *Anabaena variabilis*. *J Gen Microbiol*, 55, 371-378.
- PINTO FL**, Thapper A, Sontheim W, Lindblad P (2009) Analysis of current and alternative phenol based RNA extraction methodologies for cyanobacteria. *BMC Mol Biol*, doi: 10.1186/1471-2199-10-79.
- PITT FD**, Mazard S, Humphreys L, Scanlan DJ (2010) Functional Characterization of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 *pst1* and *pst2* Gene Clusters Reveals a Novel Strategy for Phosphate Uptake in a Freshwater Cyanobacterium. *J Bacteriol*, 192, 3512-3523.
- POLLACK JB** (1991) Kuiper prize lecture: Present and past climates of the terrestrial planets. *ICARUS*, 91, 173-198.
- PRICE GD** (2011) Inorganic carbon transporters of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *Photosynth Res*, 109, 47-57.
- READ BA**, **TABITA FR** (1994) High substrate specificity factor ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase from eukaryotic marine algae and properties of recombinant cyanobacterial RubiSCO containing "algal" residue modifications. *Arch Biochem Biophys*, 312, 210-218.
- RIPPKA R**, Deruelles J, Waterbury J, Herdman M, Stanier R (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol*, 111, 1-61.
- SCANLAN D**, Mann NH, Carr NG (1993) The response of the picoplanktonic marine cyanobacterium *Synechococcus* species WH7803 to phosphate starvation involves a protein homologous to the periplasmic phosphate-binding protein of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 10, 181-191.
- SCHAUER N**, Steinhauser D, Strelkov S, Schomburg D, Allison G, Moritz T, Lundgren K, Roessner-Tunali U, Forbes MG, Willmitzer L, Fernie AR, Kopka J (2005) GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Letters* 579 (6): 1332-1337 (doi: 10.1016/j.febslet.2005.01.029)
- SCHWARZ D**, Nodop A, Hüge J, Purfürst S, Forchhammer K, Michel KP, Bauwe H, Kopka J, Hagemann M (2011) Metabolic and transcriptomic phenotyping of inorganic carbon

acclimation in the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Physiol*, 155, 1640-1655.

SCHWARZ D, Orf I, Kopka J, Hagemann M (2013) Recent Applications of Metabolomics Toward Cyanobacteria. *Metabolites*, 3, 72-100.

SHAW GH (2008) Earth's atmosphere – Hadean to early Proterozoic. *Chemie der Erde - Geochemistry*, 68, 235-264.

SHI T, FALKOWSKI PG (2008) Genome evolution in cyanobacteria: The stable core and the variable shell. *PNAS*, 105, 2510-2515.

SIGALT C, DE KOUCKOWSKI Y (1975) Fractionnement et caractérisation de l'appareil photosynthétique de l'algue bleue unicellulaire *Anacystis nidulans*. I. Obtention de fractions membranaire par 'lyse osmotique' et analyse pigmentaire. *Physiol Veg*, 13, 243-258.

SMITH A.J, London J, Stanier RY (1967) Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green algae and thiobacilli. *J Bacteriol*, 94, 972-983.

SPREITZER RJ, Peddi SR, Satagopan S (2005) Phylogenetic engineering at an interface between large and small subunits imparts land-plant kinetic properties to algal Rubisco. *PNAS*, 102, 17225-17230.

STEINHAUSER D, Fernie AR, Araújo WL (2012) Unusual cyanobacterial TCA cycles: not broken just different. *Trends Plant Sci*, 17, 503-509.

STREHMEL N, Hummel J, Erban A, Strassburg K, Kopka J (2008) Retention index thresholds for compound matching in GC-MS metabolite profiling. *Journal of Chromatography B* 871: 182-190 (doi: 10.1016/j.jchromb.2008.04.042)

SUGITA C, Ogata K, Shikata M, Jikuva H, Takano J, Furumichi M, Kanehisa M, Omata T, Sugiura M, Sugita M (2007) Complete nucleotide sequence of the freshwater unicellular cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 6301 chromosome: gene content and organization. *Photosynth Res*, 93, 55-67.

SUMMERFIELD TC, SHERMAN LA (2008) Global transcriptional response of the alkali-tolerant cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 to a pH 10 environment. *Appl Environ Microbiol*, 74, 5276-5284.

SUZUKI S, Ferjani A, Suzuki I, Murata N (2004) The SphS-SphR two component system is the exclusive sensor for the induction of gene expression in response to phosphate limitation in *Synechocystis*. *J Biol Chem*, 279, 13234-13240.

TAKABE T (1977) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from the blue-green alga, *Anabaena cylindrical*. *Agric Biol Chem*, 41, 2255-2260.

TAKABE T, Nishimura M, Akazawa T (1976) Presence of two subunit types in Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase from blue-green algae. *Biochem Biophys Research Com*, 68, 537-544.

TAKAHASHI H, Uchimiya H, Hihara Y (2008) Difference in the metabolite levels between photoautotrophic and photomixotrophic culture of *Synechocystis* sp. PCC 6803 examined by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *J Exp Bot*, 59, 3009-3018.

-
- TIMM S**, Florian A, Wittmiß M, Jahnke K, Hagemann M, Fernie AR, Bauwe H (2013) Serine acts as a metabolic signal for the transcriptional control of photorespiration-related genes in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 162, 379-389.
- TOLBERT NE** (1997) The C-2 oxidative photosynthetic carbon cycle. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, 1-25.
- VALENTIN K, ZETSCHKE K** (1990) Rubisco genes indicate a close phylogenetic relation between the plastids of Chromophyta and Phodophyta. *Plant Mol Biol*, 15, 575-584.
- WAGNER C**, Sefkow M, Kopka J (2003) Construction and application of a mass spectral and retention time index database generated from plant GC/EI-TOF-MS metabolite profiles. *Phytochemistry* 62(6): 887-900 (doi: 10.1016/S0031-9422(02)00703-3)
- WANG HL**, Postier BL, Burnap RL (2004) Alteration in global patterns of gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to inorganic carbon limitation and the inactivation of *ndhR*, a LysR family regulator. *J Biol Chem*, 279, 5739-5751.
- WILLIAMS PG** (2009) Panning for chemical gold: Marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends Biotechnol*, 27 45-52.
- WOODGER FJ**, Badger MR, Price GD (2003) Inorganic carbon limitation induces transcripts encoding components of the CO₂-concentrating mechanism in *Synechococcus* sp. PCC7942 through a redox-independent pathway. *Plant Physiol*, 133, 2069-2080.
- WOODGER FJ**, Badger MR, Price GD (2005) Sensing of inorganic carbon limitation in *Synechococcus* PCC7942 is correlated with the size of the internal inorganic carbon pool and involves oxygen. *Plant Physiol*, 139, 1959-1969.
- YEATES TO**, Tsai Y, Tanaka S, Sawaya MR, Kerfeld CA (2007) Self-assembly in the carboxysome: a viral capsid-like protein shell in bacterial cells. *Biochem Soc Trans*, 35, 508-511.
- YOUNG JD**, Shastri AA, Stephanopoulos G, Morgan JA (2011) Mapping photoautotrophic metabolism with isotopically nonstationary ¹³C flux analysis. *Metab Eng*, 13, 656–665.
- ZEHR JP**, Waterbury JB, Turner PJ, Montoya JP, Omoregie E, Steward GF, Hansen A, Karl DM (2001) Unicellular cyanobacteria fix N₂ in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature*, 412, 635-638.
- ZHANG S, BRYANT DA** (2011) The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria. *Science*, 334, 1551-1553.

ANHANG

Tabelle 16. Ähnlichkeiten zwischen den Aminosäuresequenzen von den im photorespiratorischen 2PG-Abbau involvierten Proteinen aus *Synechocystis* und *Synechococcus*.

Protein	Genname	ORF in <i>Synechocystis</i>	ORF in <i>Synechococcus</i>	E-value
C2-Zyklus				
Phosphoglykolat-Phosphatase (PGP)	<i>cbbZp</i>	<i>sll1349</i>	2613	3e ⁻⁵⁰
		<i>slr1762</i>	0693	9e ⁻⁴¹
		<i>slr0458</i>	–	–
		–	0217	–
Glykolat-Dehydrogenase (GlcD)	<i>glcD1</i> <i>glcD2</i> <i>glcE</i> <i>glcF</i>	<i>sll0404</i>	0276	0
		<i>slr0806</i>	–	–
		<i>sll1189</i>	1718	4e ⁻⁸⁸
		<i>sll1831</i>	1717	e ⁻¹⁷⁶
Serin/Glyoxylat Aminotransferase		<i>sll1559</i>	0191	0
			2160	e ⁻⁵⁴
Glycin-Dekarboxylase-Komplex (GDC)	<i>gcvP</i> <i>gcvH</i> <i>gcvT</i> <i>gcvL, phdD</i>	<i>slr0293</i>	2047	0
		<i>slr0879</i>	2046	2e ⁻⁴⁴
		<i>sll0171</i>	2308	e ⁻¹⁴⁹
		<i>slr1096</i>	1198	0
Serin-Hydroxymethyl- Transferase (SHMT)	<i>glyA, shm</i>	<i>sll1931</i>	0282	0
Hydroxypyruvat-Reduktase (HPR)	<i>serA</i> <i>ddh</i>	<i>sll1981</i>	1501	0
		<i>slr2088</i>	1347	e ⁻¹³³
Glycerat-Kinase (GLYK)	<i>6803GK</i> <i>7942GLYK</i>	<i>slr1840</i>	–	–
		–	0996	5e ^{-20*}
Glycerat-Weg				
Glyoxylat-Carboligase (GCL)	<i>ilvB, glc</i> <i>ilvG, gcl</i>	<i>sll1981</i>		5e ⁻⁸⁷
		<i>slr2088</i>	0139	0
Tartronsäuresemialdehyd- Reduktase (TSR)	<i>tsr, mmsB</i>	<i>slr0229</i>	1857	2e ⁻¹⁷
Decarboxylierung				
Hydroxyacid-Dehydrogenase	<i>citH, ldh</i>	<i>sll0891</i>	–	–
Oxalat-Dekarboxylase	<i>mncA</i>	<i>sll1358</i>	2388	0
Format-Dehydrogenase	<i>fdh</i>	<i>sll1359</i>	2387	0

* *Blast*-Analyse mit der Aminosäuresequenz für die Glycerat-Kinase aus *Arabidopsis thaliana* (*At1g80380*; BOLDT *et al.*, 2005)

Tabelle 17. Auflistung der Gene des zentralen C- und N-Metabolismus in *Synechocystis* und *Synechococcus* unter Angabe der zugehörigen EC-Nummer entsprechend der Datenbank KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).

Enzym	EC-Nummer	ORF	
		<i>Synechocystis</i>	<i>Synechococcus</i>
Photorespiratorischer 2PG-Metabolismus			
C2 Zyklus			
Phosphoglykolat-Phosphatase	3.1.3.18	<i>sll1349, slr0458, slr1762</i>	2613, 0693
Glykolate-Dehydrogenase	1.1.3.15	<i>sll0404, slr0806, sll1189, sll1831</i>	0276, 1717, 1718
Serin/Glyoxylat-Aminotransferase	–	<i>sll1559</i>	0191
Glycin Dekarboxylase-Komplex	–	<i>slr0293, slr0879, sll0171, slr1096</i>	2047, 2046, 2308, 1198
Serin-Hydroxymethyl-Transferase	2.1.2.1	<i>slr1931</i>	0282
Hydroxypyruvat-Reduktase	1.1.1.81	<i>sll1908, slr1556</i>	1501, 1347
Glycerat-Kinase	2.7.1.31	<i>slr1840</i>	0996
Glycerat-Weg			
Glyoxylat-Carboligase	4.1.1.47	<i>sll1981, slr0288</i>	0139
Tartronsäuresemialdehyd-Reduktase	1.1.1.60	<i>slr0229</i>	1857
Decarboxylierung			
Hydroxyacid-Dehydrogenase	–	<i>sll0891</i>	–
Oxalat-Dekarboxylase	4.1.1.2	<i>sll1358</i>	2388
Format-Dehydrogenase	1.2.1.2	<i>sll1359</i>	2387
Calvin-Benson-Bassham Zyklus			
Rubisco	4.1.1.39	<i>slr0009, slr0011, slr0012, sll0998</i>	1426, 1535, 1427
Phosphoglykolat-Kinase	2.7.2.3	<i>slr0394</i>	1116
Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	1.2.1.12	<i>slr0884</i>	0245, 1939

	1.2.1.59	<i>sll1342</i>	1742
Triosephosphat-Isomerase	5.3.1.1	<i>slr0783</i>	1261
Fruktose-1,6-Bisphosphatase	4.1.2.13	<i>sll0018, slr0943</i>	1443
Transketolase	2.2.1.1	<i>sll1070</i>	0538
Ribose-5-Phosphat-Isomerase	5.3.1.6	<i>slr0914, ssl2153</i>	0584
Ribulose-5-Phosphat-3-Epimerase	2.7.1.19	<i>sll1525</i>	0977
Ribulose-Phosphat-3-Epimerase	5.1.3.1	<i>sll0807</i>	0604

Glykolyse und OPP-Weg

Glycose-6-Posphat-1-Dehydrogenase		<i>slr1843</i>	2334
Glykose-6-Phosphat-Isomerase	5.3.1.9	<i>slr1349</i>	2029
6-Phosphatfruktokinase	2.7.1.11	<i>sll0745, sll1196</i>	0592
Phosphoglyceratmutase	5.4.2.1	<i>sll0395, slr1124, slr1945, slr1748</i>	0469, 0485, 2078
Phosphoglycerat-Hydratase	4.2.1.11	<i>slr0752</i>	0639
Pyruvat-Kinase	2.7.1.40	<i>sll0587, sll1275</i>	0098
Pyruvat-Dehydrogenase	1.2.4.1	<i>sll1721, slr1934</i>	0143, 1944
Acetyl-CoA Enzym	2.3.1.12	<i>sll1841</i>	1068

TCA-Zyklus

Citrat-Synthase	2.3.3.1	<i>sll0401</i>	0612
Aconitat-Hydratase	4.2.1.3	<i>slr0665</i>	0903
Isocitrat-Dehydrogenase	1.1.1.42	<i>slr1289</i>	1719
Fumarat-Hydratase	4.2.1.2	<i>slr0018</i>	1007
Succinat-Dehydrogenase	1.3.99.1	<i>sll0823, sll1625, slr1233</i>	0314, 0641, 1533

GS/GOGAT- Weg

Glutamin-Synthetase	1.4.1.14	<i>slr0288, slr1756</i>	0169, 2156, 2296
Glutamat-Synthase		<i>sll1499, sll1502</i>	0890

Tabelle 18. Gegenüberstellung verschiedener Metabolom-Datensätze von *Synechocystis* und *Synechococcus*. Veränderungen im relativen Gehalt ausgewählter Metabolite nach 24 h LC.

Metabolit	Datensatz						
	7144	6089	<i>Synechocystis</i> 10075	8001	13122	<i>Synechococcus</i> 8001 9223	
Photorespiratorischer 2PG-Metabolismus							
2PG	2,61 ± 2,14	2,08 ± 0,44	7,93 ± 0,83	3,25 ± 0,19	2,50 ± 0,16	2,11 ± 1,59	–
Glykolat	–	–	0,68 ± 0,04	5,08 ± 0,84	1,07 ± 0,13	0,89 ± 0,14	1,48 ± 0,41
Glycin	0,99 ± 0,51	0,53 ± 0,14	0,19 ± 0,04	1,15 ± 0,64	1,17 ± 0,08	1,35 ± 0,18	1,49 ± 0,20
Serin	1,57 ± 0,23	1,41 ± 0,17	0,27 ± 0,05	1,45 ± 0,11	2,64 ± 0,33	1,26 ± 0,09	0,46 ± 0,20
Glycerat	1,94 ± 0,91	1,25 ± 0,26	1,13 ± 0,09	1,03 ± 0,10	–	1,32 ± 0,33	1,44 ± 0,29
Calvin-Benson-Bassham Zyklus, OPP-Weg und Glykolyse							
Glc	0,48 ± 0,2	0,12 ± 0,04	0,20 ± 0,01	–	0,12 ± 0,02	0,80 ± 0,33	1,11 ± 0,28
Glc-6-P	0,73 ± 0,28	1,09 ± 0,36	0,12 ± 0,04	1,75 ± 0,25	0,07 ± 0,02	1,12 ± 0,47	1,87 ± 0,39
Fru-6P	–	0,96 ± 0,19	–	1,26 ± 0,20	0,52 ± 0,10	1,20 ± 0,40	0,53 ± 0,09
6-P-Gluconat	–	1,57 ± 0,96	0,14 ± 0,12	1,51 ± 0,20	0,03 ± 0,01	2,01 ± 0,95	–
DHAP	–	2,40 ± 0,73	–	–	–	9,68 ± 7,01	–
3PGA	4,03 ± 1,39	–	1,16 ± 0,13	1,10 ± 0,20	1,19 ± 0,10	2,61 ± 1,58	1,87 ± 0,39
2PGA	–	7,91 ± 3,76	–	1,39 ± 0,30	1,91 ± 0,13	4,95 ± 2,60	–
PEP	5,88 ± 3,54	10,29 ± 5,38	1,64 ± 0,13	1,40 ± 0,34	2,10 ± 0,15	4,74 ± 3,03	1,43 ± 0,21
Saccharose	0,80 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,95 ± 0,07	0,68 ± 0,09	1,11 ± 0,26	0,51 ± 0,04
TCA Zyklus und GS/GOGAT-Weg							
Citrat	1,08 ± 0,35	0,51 ± 0,06	0,71 ± 0,03	0,68 ± 0,03	0,63 ± 0,04	1,34 ± 0,54	0,69 ± 0,12
<i>cis</i> -Aconitat	0,68 ± 0,12	1,34 ± 0,22	–	0,60 ± 0,08	–	1,40 ± 0,18	–
Glutamat	0,02	1,07 ± 0,06	0,07 ± 0,02	2,28 ± 1,98	0,43 ± 0,06	0,90 ± 0,50	0,22 ± 0,57
Glutamin	–	–	–	0,89 ± 1,26	–	0,24 ± 0,16	–
Succinat	1,47 ± 0,33	0,70 ± 0,11	–	1,01 ± 0,11	–	0,47 ± 0,09	1,66 ± 0,15
Fumarat	1,01 ± 0,22	2,14 ± 0,48	0,80 ± 0,03	1,03 ± 0,08	–	0,37 ± 0,22	0,97 ± 0,41
Malat	1,23 ± 0,48	2,18 ± 0,37	0,81 ± 0,05	1,14 ± 0,06	1,10 ± 0,13	13,01 ± 8,15	0,29 ± 0,04
2OG	–	10,4 ± 3,70	1,06 ± 0,37	0,88 ± 0,43	0,23 ± 0,06	–	1,99 ± 0,20

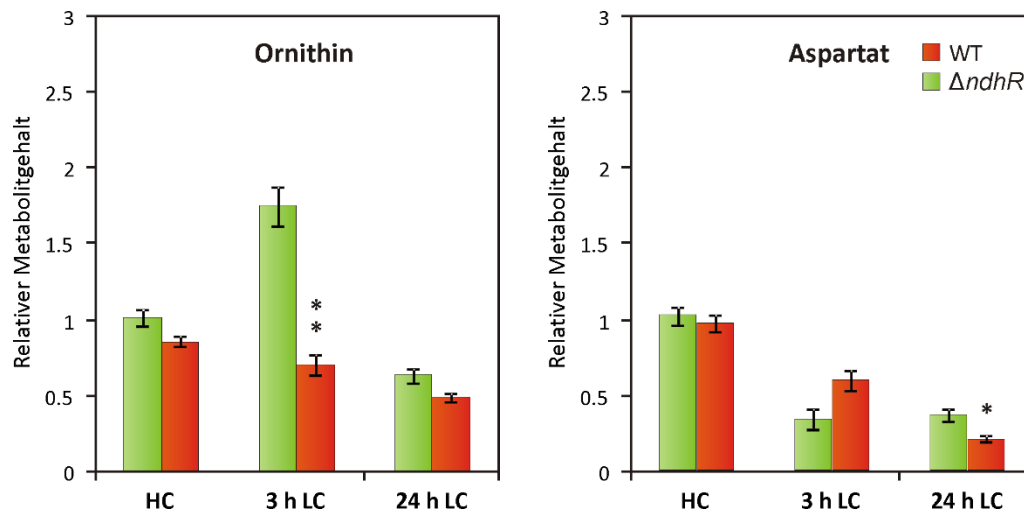


Abbildung 52. Relative Metabolitgehalte der Aminosäuren Ornithin und Aspartatin *Synechocystis* (WT) und in der Mutante $\Delta ndhR$ unter HC (5 % CO₂) und LC (0,035 % CO₂). Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test (* p < 0,01; ** p < 0,001).

Publikationen

Eisenhut M, Huege J, **Schwarz D**, Bauwe H, Kopka J, Hagemann M (2008) Metabolome phenotyping of inorganic carbon limitation in cells of wild type and photorespiratory mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol*, 148, 2109-2120. (doi: 10.1104/pp.108.129403)

Huege J, Goetze J, **Schwarz D**, Bauwe H, Hagemann M, Kopka J (2011) Modulation of the major paths of carbon in photorespiratory mutants of *Synechocystis*. *PLoS One*, e16278, doi: 10.1371/journal.pone.0016278.

Schwarz D, Nodop A, Hüge J, Purfürst S, Forchhammer K, Michel KP, Bauwe H, Kopka J, Hagemann M (2011) Metabolic and transcriptomic phenotyping of inorganic carbon acclimation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Physiol*, 155, 1640-1655.

Jablonsky J, Hagemann M, **Schwarz D**, Wolkenhauer O (2013) Phosphoglycerate mutases function as reverse regulated isoenzymes in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *PLoS One*, e58281, doi: 10.1371/journal.pone.0058281.

Schwarz D, Schubert H, Georg J, Hess WR, Hagemann M (2013) The gene *sml0013* of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 encodes for a novel subunit of the NDH1 complex that is ubiquitous distributed among cyanobacteria. *Plant Physiol*, 163, 1191-1202.

Schwarz D, Orf I, Kopka J, Hagemann M (2013) Recent applications of metabolomics toward cyanobacteria. *Metabolites*, 3, 72-100.

Tagungsbeiträge und Forschungsaufenthalt

PROMICS-Metting 2010 – Warnemünde; Teilnahme

*PROMICS-Metting 2011 – Hannover; Vortrag *Metabolomics with Cyanobacteria – from Steady State Level toward Flux Analyses**

*Kongress 8th European Workshop on Molecular Biology of Cyanobacteria 2011– Naantali, Finland; Poster *Metabolomic and transcriptomic phenotyping of acclimation towards CO₂ limitation of cyanobacteria**

*Forschungsaufenthalt 2011 am MPI Golm, Abteilung Willmitzer, Arbeitsgruppe *Applied Metabolome Analysis* unter der Leitung von Dr. Joachim Kopka, Inhalt: Einführung in die Metabolom-Analyse mittels GC/MS; Dauer: 5 Tage*

*PROMICS-Metting 2012 – Warnemünde; Poster *Metabolome analysis of cyanobacterial carbon acclimation**

*ESF-EMBO Symposium *Molecular Bioenergetics Of Cyanobacteria: Shaping The Environment* 2013 – Pultusk, Polen, Poster *The NDH-associated function of smI0013 in Synechocystis sp. PCC 6803*, Präsentation durch Prof. Dr. Martin Hagemann*

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen, als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den

Doreen Schwarz