
Das Methylo- des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp.
PCC 6803: Modell für die funktionelle Charakterisierung
von DNA-Methylierung in Cyanobakterien

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) der Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock



vorgelegt von M. Sc. Katrin Gärtner

1. Gutachter: Prof. Martin Hagemann; Institut für Biowissenschaften der Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Wolfgang R. Hess; Fakultät der Biologie der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg

Jahr der Einreichung: 2019

Jahr der Verteidigung: 2020

„Erst zweifeln, dann untersuchen, dann entdecken!“

Henry Thomas Buckle

Veröffentlichungen und Fachbeiträge

Scholz, Ingeborg; Lott, Steffen C.; Behler, Juliane; **Gärtner, Katrin**; Hagemann, Martin; Hess, Wolfgang R. (2019): Divergent methylation of CRISPR repeats and cas genes in a subtype I-D CRISPR-Cas-system. In: *BMC microbiology* 19 (1), S. 147. DOI: 10.1186/s12866-019-1526-3.

Gärtner, Katrin; Klahn, Stephan; Watanabe, Satoru; Mikkat, Stefan; Scholz, Ingeborg; Hess, Wolfgang R.; Hagemann, Martin (2019): Cytosine N4-Methylation via M.Ssp6803II Is Involved in the Regulation of Transcription, Fine-Tuning of DNA Replication and DNA Repair in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. In: *Frontiers in microbiology* 10, S. 1233. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01233.

Hagemann, Martin; **Gärtner, Katrin**; Scharnagl, Matthias; Bolay, Paul; Lott, Steffen C.; Fuss, Janina et al. (2018): Identification of the DNA methyltransferases establishing the methylome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. In: *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*. DOI: 10.1093/dnares/dsy006.

Gärtner Katrin, Klähn Stephan, Kopf M., Hess Wolfgang R., Hagemann Martin (2016): Occurrence and function of DNA methylation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. In: 12th Workshop on Cyanobacteria in Arizona (USA)

Best Poster Award in Molecular Physiology

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 DNA-Methylierung	1
1.2 Modulation des eukaryotischen Epigenoms durch DNA-Methyltransferasen	3
1.3 DNA-Methylierung und Methyltransferasen in Prokaryoten.....	5
1.3.1 Restriktions-Modifikations-Systeme (RM-Systeme).....	6
1.3.2 <i>Orphan</i> Methyltransferasen	8
1.4 Cyanobakterien	12
1.5 Modellorganismus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	14
2 ZENTRALE FRAGESTELLUNG	15
3 MATERIAL UND METHODEN	16
3.1 Material	16
3.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Enzyme und Kits.....	16
3.1.2 Apparaturen und Geräte.....	16
3.1.3 Vektorsysteme.....	17
3.1.4 Verwendete Organismen.....	19
3.2 Methoden	20
3.2.1 Kultivierung von Mikroorganismen	20
3.2.2 Physiologische Untersuchungen.....	21
3.2.3 Molekularbiologische Methoden	24
3.2.4 Bioinformatik	38
3.2.5 Zusätzliche Methoden durchgeführt in anderen Arbeitsgruppen.....	38
4 ERGEBNISSE	39
4.1 Analyse des Methyloms von <i>Synechocystis</i> 6803	39
4.2 Identifikation von DNA-Methyltransferasen in <i>Synechocystis</i> 6803 Mutation von putativen DNA-Methyltransferasegenen	41
4.3 Spezifität von DNA-Methyltransferasen in <i>Synechocystis</i> 6803.....	46
4.4 Physiologische Profile der Mutanten Δ <i>slr8009</i> , Δ <i>slr0214</i> und Δ <i>slr6095</i>	48
Physiologische Untersuchungen Δ <i>slr8009</i>	48
UV-Versuch Δ <i>slr0214</i> Mutante	50
Physiologische Untersuchungen Δ <i>slr6095</i>	51

Morphologische Untersuchungen Δ <i>slr6095</i>	52
UV-Versuch Δ <i>slr6095</i>	53
4.5 Proteomdaten der Δ <i>slr6095</i> Mutante	54
4.6 Physiologische Untersuchungen der Δ <i>sll0729</i> Mutante.....	56
4.7 Transkriptomanalysen	57
4.8 Isolation und Charakterisierung von Suppressormutanten	60
4.9 Physiologische Untersuchungen der Suppressormutanten.....	64
4.10 Einfluss von M.Ssp6803II auf DNA-Reparaturmechanismen in <i>Synechocystis</i> 6803.....	68
4.11 Einfluss von M.Ssp6803II auf die Genexpression in <i>Synechocystis</i> 6803	70
5 DISKUSSION.....	78
6 ZUSAMMENFASSUNG	93
7 SUMMARY.....	95
8 LITERATURVERZEICHNIS.....	97
9 ANHANG.....	104
9.1 Veränderte Transkriptabundanz von <i>sll0470</i> und <i>sll1526</i>	104
9.2 Karten verwendeter Expressionsplasmide	104
9.3 <i>In silico</i> Analysen von Slr6050.....	105
9.4 Rekombinante Expression von Slr6095 und Sll8009.....	106
Protein Expression von Slr6095.....	106
Protein Expression von Sll8009	106
9.5 Northern Blot Analysen von <i>sll0470</i> und <i>sll1526</i> aus Δ <i>sll0729</i>	108
9.6 Transkriptomdaten der Δ <i>sll0729::supp_1</i> und Δ <i>sll0729::supp_15</i> Mutanten	109
9.7 <i>In silico</i> Analysen von Sll0470 und Sll1526	112
9.8 <i>In silico</i> Analysen von <i>sll8009</i> und der intergenetischen Region von <i>ssl8010</i> und <i>sll8009</i>	113
9.9 Eidesstattliche Erklärung	115

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
AB	Antibiotikum
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementary DNA; komplementäre DNA
cm	Zentimeter
Cm	Chloramphenicol
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	Dinukleotid aus den Nucleobasen Cytosin und Guanin
CTAB	Ceteryltrimethylammoniumbromid-Lösung
d	Tag
d.h.	das heißt
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DNMT1,3a/b/L	DNA-Methyltransferasen (eukaryotisch)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid; Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et. al.</i>	<i>et. alia</i> ; und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FC	fold change; quantitative Veränderung
g	Gravitationskonstante
gDNA	genomische DNA
Gm	Gentamycin
h	Stunde(n)
HRP	horseradish peroxidase; Meerrettich-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
log	Logarithmus
m	Milli (10 ⁻³)
M	Molar
mA	Milliamper
mb	Megabase
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA; Boten-RNA

MW	molecular weight; molekulare Masse
ncRNA	non-coding RNA; nicht-kodierende RNA
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame; offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAR	photosynthetisch aktive Photonen-Flux-Dichte
PCC	Pasteur Culture Collection
PCR	polymerase chain reaction; Polymerasekettenreaktion
pH	potentia Hydrogenii
R	Resistenz
RNA	ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute; Umdrehung pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sm	Spectinomycin
SMRT	<i>single molecule real time</i>
snRNA	small nucleolar RNA
SOC	Super Optimal Broth
sp.	species; Spezies
sRNA	small non-coding RNA; kleine nicht-regulatorische RNA
Strep	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS-T	Tris-buffered saline Puffer mit Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
term.	terminal
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TES	Tris-(hydroxymethyl)-methylaminoethansulfonsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurant
U	unit; Einheit
u.a.	unter anderem
UTR	untranslated region; nicht-translatierter Bereich
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil pro Gesamtvolumen
w/v	Massenanteil pro Gesamtvolumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranoside
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 DNA-Methylierung.....	2
Abbildung 2 <i>De novo</i> Methylierung und Erhaltungsmethylierung durch die Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3a/b	4
Abbildung 3 Konkurrenz zwischen Dam und SeqA um die Bindung von GATC.....	10
Abbildung 4 Verknüpfung der DNA-Methylierung und dem ON- OFF-Status des <i>pap</i> -Operons aus <i>E.coli</i>	11
Abbildung 5 <i>Synechocystis</i> 6803	12
Abbildung 6 Kartierung des vollständig sequenzierten Chromosoms von <i>Synechocystis</i> 6803	14
Abbildung 7 Schematische Darstellung der erzeugten Expressionskonstrukte.	33
Abbildung 8 Schematische Darstellung der erzeugten Expressionskonstrukte.	34
Abbildung 9 Methylom von <i>Synechocystis</i> 6803.	40
Abbildung 10 Methylierung des ^{m5} CGATCG Motivs.....	41
Abbildung 11 Klonierungsschema und Genotypisierung erzeugter Mutanten in putativen DNA-Methyltransferasegenen.	44
Abbildung 12 Klonierungsschema und Genotypisierung erzeugter Mutanten in putativen DNA-Methyltransferasegenen.	45
Abbildung 13 Profil der phänotypischen Untersuchungen von Δ <i>sll8009</i>	49
Abbildung 14 Untersuchung der UV-Toleranz von Δ <i>slr0214</i>	50
Abbildung 15 Profil der phänotypischen Untersuchungen von Δ <i>slr6095</i>	52
Abbildung 16 Mikroskopische Untersuchung der Zellgröße von Δ <i>slr6095</i> und WT.	53
Abbildung 17 Untersuchung der UV-Toleranz von WT und Δ <i>slr6095</i>	54
Abbildung 18 Phänotypisch Charakterisierung der Mutanten Δ <i>sll0729</i> , Δ <i>sll0729::sll0729</i> , Δ <i>sll0729::ssl1378</i> und des WT.	57
Abbildung 19 Graphische Darstellung der Microarray Analysen,	59
Abbildung 20 Phänotypen unabhängiger WT und Δ <i>sll0729</i> Kulturen.	60
Abbildung 21 Unterschiedliche Kolonietypen WT und Δ <i>sll0729</i>	61
Abbildung 22 Genetische Loci und Genotypisierung des WT im Vergleich zu den isolierten Mutanten Δ <i>sll0729_1</i> und Δ <i>sll0729_15</i>	62
Abbildung 23 Abbildung Funktionelle Untersuchung der Methyltransferase M.Ssp6803II ,63	
Abbildung 24 Phänotyp der Flüssigkulturen	64
Abbildung 25 Gesamtes zelluläres Absorptionsspektrum.....	64
Abbildung 26 Wachstumsverhalten von WT und Δ <i>sll0729::supp_1</i>	65
Abbildung 27 Zellgrößen-Profil von WT und Δ <i>sll0729::supp_1</i>	66
Abbildung 28 FACS Analysen zur Bestimmung des DNA-Gehalts	67
Abbildung 29 Untersuchung der UV-Toleranz	69
Abbildung 30 Genomplot der Microarray Untersuchungen von Δ <i>sll0729::supp_1</i> und Δ <i>sll0729::supp_15</i>	71
Abbildung 31 Promotorsequenzen von <i>sll0470</i> und <i>sll1526</i>	71
Abbildung 32 Ergebnisse Promotorgen Assays unter Standardbedingungen.....	73

Abbildung 33 Ergebnisse Promotorgenassay nach Inkubation bei 15 °C.....	73
Abbildung 34 Western-Blot Analyse von Sll1941	76
Abbildung 35 Genomplot der Microarray Untersuchungen von Δ sll0729::supp_1 und Δ sll0729::supp_15	76
Abbildung 36 Modifikation der DNA im Motiv GGCC.....	79
Abbildung 37 HIP1 Sequenz	81
Abbildung 38 Wirkmechanismen der Topoisomerasen II	88
Abbildung 39 Expressionsplasmide pet28a und pASK-IBA43plus.....	104
Abbildung 40 Eco57I RM-Methyltransferase Domäne in Slr6050	105
Abbildung 41 N ₆ -Methyltransferase Domäne aus Eco57I in Slr6050	105
Abbildung 42 Rekombinante Expression von Slr6095 in E. coli.	106
Abbildung 43 Rekombinante Expression von Sll8009 in E. coli.....	107
Abbildung 44 Northern Blot Analysen	108
Abbildung 45 BlastP Analysen und Pfam Datenbank-Abgleich von Sll0470.....	112
Abbildung 46 BlastP Analysen und Pfam Datenbank-Abgleich von Sll1526.....	112
Abbildung 47 BlastX Analysen von <i>ssl8010-ssl8009</i>	113
Abbildung 48 Alignment von <i>Ssl8010-Sll8009</i>	114

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht RM-Systeme.....	8
Tabelle 2 Auflistung der verwendeten Geräte und deren Hersteller	16
Tabelle 3 Übersicht verwendeter Vektoren	17
Tabelle 4 In dieser Arbeit erzeugte rekombinante Plasmide	18
Tabelle 5 Verwendete Mikroorganismen.....	19
Tabelle 6 In dieser Arbeit erzeugte <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 Deletions- und Insertionsmutanten	19
Tabelle 7 In dieser Arbeit hergestellte rekombinante <i>E. coli</i> Stämme	19
Tabelle 8 Verwendete PCR-Programme zur Amplifikation verschiedener Gene	26
Tabelle 9 Übersicht der Methyltransferasen, ihrer Methylierungsmotive, kodierender Gene und erzeugter Mutanten aus <i>Synechocystis</i> 6803.....	47
Tabelle 10 Wachstumsrate und Verdopplungszeit der $\Delta sll8009$ Mutante im Vergleich zum WT.	48
Tabelle 11 Wachstumsraten und Verdopplungszeit $\Delta slr6095$ und WT unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.	51
Tabelle 12 Proteomanalyse von $\Delta slr6095$	55
Tabelle 13 Varianz deregulierter Gene mit signifikanten Änderungen in der Transkriptabundanz der $\Delta sll0729$ Mutante im Vergleich zum WT.....	58
Tabelle 14 Wachstumsraten und Verdopplungszeit des WT und der $\Delta sll0729::supp_1$ Suppressormutante.....	65
Tabelle 15 Proteomanalysen der Suppressormutanten.....	74
Tabelle 16 Änderungen in der Transkriptabundanz von <i>sll0470</i> und <i>sll1526</i> aus vier unabhängigen Microarray Analysen der $\Delta sll0729$ Mutante.	104
Tabelle 17 Transkriptomanalyse der Suppressormutanten $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$	109

1 Einleitung

1.1 DNA-Methylierung

Die genetische Information aller Lebewesen ist in der Desoxyribonukleinsäure (DNA deoxyribonucleic acid) kodiert. Der Schweizer Biochemiker Johann Friedrich Miescher entdeckte die DNA 1869 bei der Herstellung von Rohextrakten aus weißen Blutkörperchen. Erst 82 Jahre später beschrieben James Watson und Francis Crick in einer wissenschaftlichen Abhandlung, dass die DNA in lebenden Zellen zu einer Doppelhelix gewunden ist. Die DNA-Doppelhelix ist aus Polynukleotiden zusammengesetzt. Dabei besteht ein Nukleotid aus einer Base, einer Desoxyribose und einem Phosphatrest. Die Basen sind über Wasserstoffbrückenbindungen mit einander verbunden. Aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften geht Thymin eine Bindung mit Adenin ein und Guanin bindet Cytosin. Die Erbinformation der DNA ist in Genen kodiert. Ihre Gesamtheit wird als Genom bezeichnet (Brown, 2007). Obwohl die biologischen Informationen im Genom gespeichert sind, ermöglicht erst eine koordinierte Aktivität von Proteinen z.B. Enzymen, die Nutzung dieser Informationen. Die Abfolge von biochemischen Prozessen wird als Genexpression bezeichnet, die sich in Transkription und Translation unterteilt. Bei der Transkription wird die DNA einzelner Gene in RNA transkribiert. Die in der Zelle vorliegende RNA aller transkribierter Gene zu einem Zeitpunkt t wird als Transkriptom bezeichnet. Die RNA kann zu Proteinen translatiert werden und bildet in ihrer Gesamtheit das Proteom (Brown, 2007). Die Genexpression kann durch verschiedene chemische, sterische oder topologische Veränderungen der DNA modifiziert werden. Eine bedeutende Modifikation ist die DNA-Methylierung (Jeltsch, 2002). Die Methylierung der DNA findet in prokaryotischen und eukaryotischen Lebewesen statt (Jones *et. al.*, 2001; Blow *et. al.*, 2016). Es handelt sich um einen Prozess, bei dem die DNA chemisch modifiziert jedoch die Basensequenz der DNA nicht verändert wird. Die kovalente Anheftung einer Methylgruppe vom Donor-Molekül S-Adenosyl-L-Methionin an eine Base, innerhalb eines Methylierungsmotivs, wird durch DNA-Methyltransferasen katalysiert. S-Adenosyl-L-Methionin wird nach der Reaktion zu S-Adenosinhomocystein umgesetzt (Jeltsch, 2008). Die DNA-Methylierung liegt in der Regel symmetrisch innerhalb spezifischer Methylierungsmotive in der DNA vor. Nach der Replikation der DNA ist nur der Matrizenstrang methyliert. Dieser hemimethylierte Zustand

wird durch die Aktivität spezieller DNA-Methyltransferasen nach der Methylierung des neusynthetisierten Stranges aufgehoben. Diese DNA-Methylierung wird auch als Erhaltungsmethylierung bezeichnet (Lu *et. al.*, 2013). Bei der *de-novo* Methylierung werden hingegen, durch das Einführen von Methylgruppen an neue Positionen, neue Methylnuster erzeugt. Von besonderer Bedeutung in Eukaryoten ist die Modifikation von Cytosin zu 5-Methylcytosin. Schematisch ist die DNA-Methylierung von Cytosin zu 5-Methylcytosin in Abbildung 1 dargestellt (Lu *et. al.*, 2013). Innerhalb der DNA-Doppelhelix sind die zu methylierenden Basen in der großen Furche lokalisiert. Durch die Methylierung kommt es zur Konformationsänderung der methylierten Base. Dadurch wird die Bindung von DNA-bindenden Proteine durch sterische Effekte beeinflusst (Jeltsch, 2008). In Eukaryoten liegt häufig in Promotorregionen und in CpG-reichen Sequenzen 5-Methylcytosin vor. N6-Methyladenin wurde vorrangig in einzelligen Eukaryoten identifiziert. Zu ihnen gehören *Chlamydomonas reinhardtii* und *Tetrahymena pyriformis* (Hattman *et. al.*, 1978). In Prokaryoten wurde zusätzlich zu N6-Methyladenin und C5-Methylcytosin die Bildung von N4-Methylcytosin beschrieben (Blow *et. al.*, 2016). Moderne Verfahren, die genomweite Untersuchungen der DNA-Methylierung ermöglichen, verschaffen der Wissenschaft aktuell ein erweitertes Verständnis über das genomweite Vorliegen methylierter Basen (Methylom) in verschiedensten Organismen (Blow *et al.*, 2016).

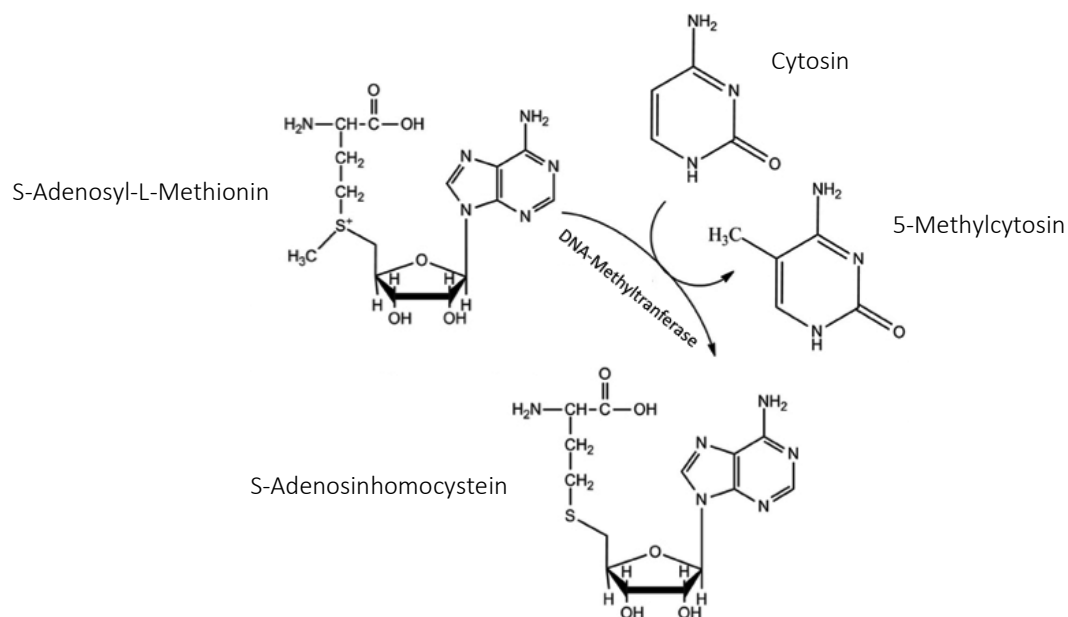


Abbildung 1 DNA-Methylierung

Aus Cytosin wird durch die DNA-Methylierung 5-Methylcytosin. Dabei dient S-Adenosyl-L-Methionin als Methylgruppen-Donor und wird nach der Reaktion zu S-Adenosinohomocystein. Katalysiert wird die Reaktion durch spezifische DNA-Methyltransferasen. Modifiziert nach Lu *et. al.*, 2013.

1.2 Modulation des eukaryotischen Epigenoms durch DNA-Methyltransferasen

Die DNA-Methylierung ist ein Schlüsselmechanismus bei der Ausbildung des eukaryotischen Epigenoms und zählt zu den wichtigsten Mechanismen in der eukaryotischen Genregulation (Jeltsch, 2002). Das Epigenom umfasst die Gesamtheit aller proteinkodierender Gene welche beispielsweise durch DNA-Methylierung modifiziert wurden. Diese Modifikation können vererbt werden und verändern die Funktion der Gene, ohne ihre Struktur zu verändern (Jeltsch *et. al.*, 2016). Hauptsächlich wird die DNA-Methylierung durch drei DNA-Methyltransferasen katalysiert: DNMT1, DNMT3a und DNMT3b (Brown *et. al.*, 2007). In Abbildung 2 sind die Funktionsweisen der eukaryotischen DNA-Methyltransferasen schematisch dargestellt. DNMT1 erkennt hemimethylierte CpG Inseln und ist für die Erhaltungsmethylierung nach der DNA-Replikation verantwortlich (Chen *et. al.*, 2003). Eine Aktivität des Enzyms als *de-novo* Methyltransferase konnte auch nachgewiesen werden (Jeltsch, 2006). Der N-Terminus von DNMT1 beinhaltet regulatorische Domänen, die mit verschiedenen Proteinen interagieren. Zu diesen Proteinen gehören die Methyl-CpG-bindende Proteine (MeCPs), deren stabile Bindung zur Inaktivierung von Genen führt (Jeltsch, 2006). Durch diesen Mechanismus ist die DNA-Methylierung in humanen Zellen an der genomischen Prägung (*Imprinting*) und der X-Chromosom-Inaktivierung beteiligt (Brown *et. al.*, 2007; Csankovszki *et. al.*, 2001; Kaneda *et. al.*, 2004). DNMT3a und DNMT3b werden den *de-novo* Methyltransferasen zu geordnet. In ihrer Funktion fügen sie neue Methylierungen in spezifische Regionen der DNA ein. Zusätzlich wirken DNMT3a und DNMT3b auch als Erhaltungsmethyltransferasen, da sie fehlerhafte DNA-Methylierungen erkennen und diese korrigieren (Chen *et. al.*, 2003). *Knock out* Versuche im Mausmodell haben gezeigt, dass der Verlust von DNMT3a zum Tod der Tiere wenige Wochen nach der Geburt führt. Während der Stammzellentwicklung ist das Enzym für die genomische Prägung (Kaneda *et. al.*, 2004) und die Methylierung von *single copy* Genen (Jeltsch, 2006) verantwortlich. Auch DNMT3b ist essentiell für die Vitalität von Mäusen. In einem *knock out* Experiment starben die Tiere kurz nach der Geburt. Im Menschen führt der Verlust von DNMT3b zum autosomal rezessiv vererbten ICF Syndrom (Immunschwäche der Zentromerregion von Chromosomen und fazialen Anomalien) (Ehrlich *et. al.*, 2006). Zusätzlich wurde DNMT3L als Stimulator für die katalytische Funktion von DNMT3a und

DNMT3b identifiziert. Das Protein DNMT3L besitzt keine katalytische Funktion (Brown *et. al.*, 2007; Jeltsch *et. al.*, 2016).

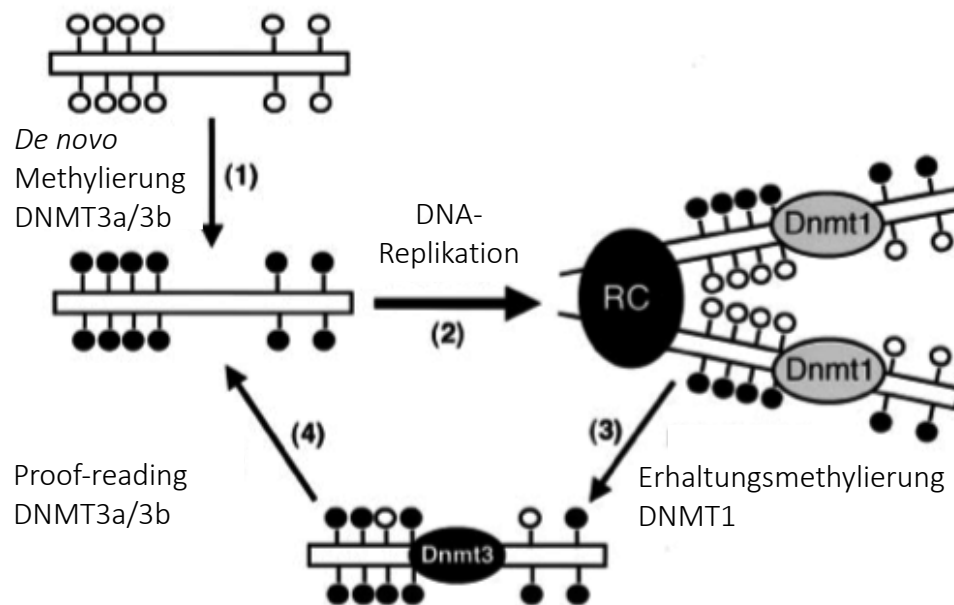


Abbildung 2 *De novo* Methylierung und Erhaltungsmethylierung durch die Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3a/b
Die Darstellung zeigt schematisch das durch DNMT3a/3b neue Methylierungsmuster in die DNA eingefügt werden (1). Nach der DNA-Replikation (2) liegt die DNA hemimethyliert vor. Durch die Methyltransferase DNMT1 wird die hemimethylierte DNA mit einer hohen Effektivität vollständig methyliert (3). Diese Methylierung ist jedoch nicht fehlerfrei. DNMT3a/3b wirken daher zusätzlich als proof-reading Methyltransferasen und ersetzen spezifisch fehlende Methylierung (4).

(weiße Kreise – unmethylierte DNA, schwarze Kreise – methylierte DNA, RC – Replikationskomplex)

Abbildung modifiziert nach Chen *et. al.*, 2003.

Der Wissenschaftler Conrad Waddington prägte im Jahr 1956 erstmals den Begriff der epigenetischen Landschaft. Er formulierte zwei Zusammenhänge:

1. Im Embryonalstadium eukaryotischer Organismen beeinflussen Umwelteinflüsse den späteren adulten Phänotyp.
2. Durch Umwelteinflüsse erworbene Eigenschaften werden innerhalb einer Population über wenige Generationen vererbt (Waddington, 1956).

Aktuell wird Epigenetik beschrieben als vererbare Veränderung in der Genexpression ohne Veränderung oder Verlust innerhalb der DNA-Sequenz (Jeltsch *et. al.*, 2016). Diese Definition basiert auf Untersuchungen von Genexpressionsänderungen während der Zelldifferenzierung sowie die Analysen von Genexpressionsmustern und ihrer Vererbbarkeit

auf nachfolgende Generationen (Waddington, 1956). Auch der Einfluss von Umweltfaktoren auf die Genexpression wird berücksichtigt. Die Ausprägung eines Phänotyps ist somit ein dynamischer Prozess, der durch das Zusammenspiel des Genoms und des Epigenoms beeinflusst wird. Die Modulation des eukaryotischen Epigenoms kann auf verschiedenen Ebenen stattfinden (Jones *et. al.*, 2001; Kouzarides, 2007). Zu den wichtigsten Prozessen, die mit epigenetischer Genregulation in Eukaryoten in Verbindung gebracht werden, gehören die Struktur und Modifikation von Chromatin vor allem durch Histonmodifikation (Kouzarides, 2007), sowie die Methylierung der DNA (Jones *et. al.*, 2001). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Störungen der epigenetischen Genregulation im Menschen zu Erkrankungen, wie Krebs führen kann (Jones und Laird, 1999; Jones und Baylin, 2002). Diese Beispiele heben die Bedeutung der Modulation des Epigenoms durch spezifische DNA-Methyltransferasen in eukaryotischen Lebewesen hervor.

1.3 DNA-Methylierung und Methyltransferasen in Prokaryoten

Vielseitige regulatorische Funktionen der DNA-Methylierung sind für Eukaryoten bereits identifiziert und beschrieben worden. Die Identifikation prokaryotischer DNA-Methylierungsmuster und die Charakterisierung der prokaryotischen DNA-Methyltransferasen steht jedoch erst am Anfang. Dank neuester *omics* Verfahren, wie Bisulfit-Sequenzierung und SMRT-Sequenzierung, konnten genomweite DNA-Methylierungsstudien durchgeführt werden (Blow *et. al.*, 2016). Dabei wurden in prokaryotischen Genomen drei DNA-Modifikationen identifiziert: C5-Methylcytosin, N6-Methyladenin und N4-Methylcytosin. Blow *et. al.* zeigten 2016, dass DNA-Methylierung in über 200 untersuchten Prokaryoten vorkommt und sich hinsichtlich der biologischen Funktion und Sequenzspezifität stark voneinander unterscheidet. Die identifizierten Methyltransferasen sind häufig Teil eines Restriktions-Modifikations-Systems (RM-System). RM-Systeme spielen eine zentrale Rolle in prokaryotischen Abwehrsystemen (Bertani und Weigle, 1953). Zusätzlich wurden auch DNA-Methyltransferasen detektiert, die offensichtlich nicht Teil von RM-Systemen sind (Blow *et al.*, 2016). Diese Enzyme werden als *orphane* DNA-Methyltransferasen bezeichnet, da es für sie keine korrespondierende Restriktionendonuklease gibt. Daher wurde angenommen, dass speziell diese Methyltransferasen Einfluss auf die Genetik der Bakterien haben könnten. In

Alphaproteobakterien und *Gammaproteobakterien* hat die DNA-Methylierung durch *orphane* N6-Methyltransferasen (Dam) beispielsweise Einfluss auf bakterielle Virulenz, Kontrolle der Chromosomen Regulationen und Segregation, Zellzyklusorganisation und postreplikativen *mismatch-repair* (Casadesus, 2016).

1.3.1 Restriktions-Modifikations-Systeme (RM-Systeme)

Bakterielle DNA-Methyltransferasen wirken häufig in einem System mit Restriktionsenzymen, um die Integrität des Genoms zu schützen (Blow *et. al.*, 2016). In der Pionierarbeit von Bertani und Weigle wurde in den 1950er Jahren erstmals ein biologisches Verfahren zur Untersuchung von RM-Systemen vorgestellt. Der Bakteriophage λ wurde mit einem *E. coli* C inkubiert. Mit dem Zell-Lysat wurde anschließend *E. coli* K12 infiziert. Der Phage vermehrte sich im *E. coli* K12 schlecht, da die Phagen DNA nicht für *E. coli* K12 spezifisch modifiziert war und die Nuklease *EcoK* die Fremd-DNA sequenzspezifisch zerschnitt. Durch schnelle Methylierung einiger DNA-Moleküle konnten wenige Phagen den zellulären Schutzmechanismus überwinden und nach erneuter Infektion sich effizient in *E. coli* K12 vermehren. Der Bakteriophage wurde durch neu erworbene, sequenzspezifische Methylierung vor zelleigenen Nukleasen geschützt. So wurde gezeigt, dass *E. coli* Stämme jeweils ein anderes RM-System, mit spezifischen Methylierungsmotiven, aufweisen, das bei der Abwehr von Bakteriophagen eine Rolle spielt (Bertani und Weigle, 1953). Nach Millionen Jahren der Koevolution von Bakterien und Bakteriophagen entstand eine hohe Diversität der RM-Systeme, die ubiquitär im Reich der Prokaryoten vorkommen. Aktuell sind über 2000 RM-Systeme mit verschiedenen Methylierungsmotiven bekannt (Jeltsch, 2002). Durch die Fähigkeit der Mikroorganismen Fremd-DNA von Eigen-DNA zu unterscheiden, werden RM-Systeme auch als Abwehrmechanismus oder als primitives bakterielles Immunsystem beschrieben (Vasu and Nagaraja, 2013). Der Erfolg dieser Systeme liegt in der modularen enzymatischen Zusammensetzung begründet. RM-Systeme bestehen aus Restriktionsendonukleasen (REase) und Methyltransferasen (MTase). Unmethylierte Fremd-DNA wird anhand spezifischer Methylierungsmotive durch die REase erfasst und geschnitten. Durch Spaltung der Phosphodiesterbindungen können 5'-Überhänge, 3'-Überhänge oder glatte Enden entstehen (Roberts, 2003). Die MTase methyliert Eigen-DNA innerhalb spezifischer Methylierungsmotive, so dass Fremd- und Eigen-DNA unterscheidbar werden. RM-Systeme werden in vier Hauptgruppen unterteilt (Tabelle 1;

Roberts, 2003). Dabei werden Methylierungsmotive, Schnittstellen, Ko-Faktoren, Substratspezifität und die Zusammensetzung der Untereinheiten (UE) betrachtet (Wilson und Murray, 1991). Typ I RM-Systeme sind Proteinkomplexe bestehend aus einer separaten REase, MTase und einer UE spezifisch für das DNA Methylierungsmotiv (S). Das System erkennt asymmetrische Methylierungsmotive (z.B. CAGNNNNNTCA) und arbeitet, in Abhängigkeit von der Zielsequenz, als Methyltransferase oder Endonuklease (Roberts, 2016). Für die endonukleolytische Aktivität des Typ I RM-Systems, besteht der Multienzymkomplex zusätzlich aus zwei REasen. Für die Restriktion der DNA wird ATP hydrolysiert. Als Ko-Faktor dient Mg^{2+} und als Methylgruppen-Donor dient S-adenosyl-L-Methionin. Die Schnittstelle der Typ I RM-System variiert und kann bis zu 1000 bp vom Methylierungsmotiv entfernt lokalisiert sein (Murray 2000). Typ II ist eine strukturell und funktional heterogene Gruppe von RM-Systemen und unterscheidet sich grundlegend vom RM-System Typ I. Es besteht aus zwei separaten Enzymen (REase und MTase), die das gleiche DNA-Sequenzmotiv innerhalb der DNA erkennen. Dabei binden die Homodimere 4-8 Nukleotid lange Motive, wie beispielsweise GGCC und trennen sehr nah oder innerhalb dieses Methylierungsmotivs die Phosphodiesterbindungen der DNA. Als Ko-Faktor dient Mg^{2+} (Pingoud, Jeltsch 2001). In den 1990er und 2000er wurden weitere Enzyme dieser Gruppe identifiziert. Da sich einige Enzyme von den klassischen Typ II Charakteristika unterscheiden, werden sie anhand von spezifischen *features* in Typ II Subklassen unterteilt. Zu ihnen gehören Typ II B, E, F, G, M, S und T (Pingoud, Jeltsch 2001). Kennzeichnend für das Typ III RM-System ist, dass nur die MTase eine DNA-Bindedomäne besitzt. Die MTase erzeugt postreplikativ hemimethylierte DNA. Für die Restriktion bindet eine REase an die MTase und bildet so einen aktiven Komplex. Der heterooligomere Komplex bindet nicht palindromische Sequenzen, wie CGAAT und schneidet die DNA außerhalb des Methylierungsmotivs. Als Ko-Faktoren der Methylierung und der Restriktion dienen S-adenosyl-L-Methionin, Mg^{2+} und GTP (Roberts, 2016). DNA-Methylierung schützt die DNA vor der Restriktion durch die drei beschriebenen RM-Systeme. Typ IV RM-Systeme ist hingegen spezifisch für die Restriktion methylierter DNA und besitzt keine MTase UE (Wilson und Murray, 1991).

Tabelle 1 Übersicht RM-Systeme

RM-System Typ	Zusammensetzung	Ko-Faktoren	Restriktionsmuster	Restriktionsenzym (Beispiel)
I	heterologer Proteinkomplex	Mg ²⁺ AdoMet ATP	Restriktion außerhalb des asymmetrische Methylierungsmotivs	<i>Cgl56828IP</i>
II	seperate MTase und REase	Mg ²⁺	Restriktion innerhalb oder nah am symmetrischen Methylierungsmotiv	<i>AatI</i>
II's	seperate MTase und REase	Mg ²⁺	Restriktion außerhalb des symmetrischen Methylierungsmotivs	<i>NaeI</i>
III	seperate MTase und REase	Mg ²⁺ AdoMet ATP	Restriktion außerhalb des symmetrischen Methylierungsmotivs	<i>EcoP15</i>
IV	Heterooligomer	Mg ²⁺ GTP	Schneiden modifizierte DNA	<i>McrBC</i>

1.3.2 Orphane Methyltransferasen

Zusätzlich zu den RM-Systemen, kommen DNA-Methyltransferasen auch unabhängig von Restriktionsendonukleasen in Bakterien vor. Diese alleinständigen DNA-Methyltransferasen, werden als solitäre oder *orphane* DNA-Methyltransferasen bezeichnet (Casadesus, 2016). Im Folgenden wird der Begriff *orphane* DNA-Methyltransferasen als Terminus für diese besonderen DNA-Methyltransferasen verwendet. *Orphane* DNA-Methyltransferasen sind weit verbreitet und erzeugen motivspezifische Methylierungsmuster innerhalb der DNA-Sequenz (Blow *et. al.*, 2016). Ihre Entstehung ist noch nicht vollständig geklärt. Aktuell gibt es zwei unterschiedliche Theorien über die Herkunft dieser Enzyme. Fox *et. al.*, zeigten 2007, dass *Haemophilus influenza* ein Typ III RM-System besitzt, das eine funktionsfähige DNA-Methyltransferase beinhaltet, bei dem die Restriktionsendonuklease jedoch inaktiv ist. Es wurde postuliert, dass die *orphanen* DNA-Methyltransferasen aus funktionsfähigen RM-Systemen stammen (Fox *et. al.*, 2007). In einer Studie von 2016 konnte jedoch gezeigt werden, dass 57 % der untersuchten Organismen konservierte *orphane* DNA-Methyltransferasen aufweisen. Im Vergleich dazu waren es bei den RM-Methyltransferasen nur 9 % (Blow *et. al.*, 2016). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass der Einfluss *orphaner* DNA-Methyltransferasen über die zellulären Abwehrmechanismen hinaus geht. Zusätzliche Funktionen sind unter anderem die Kontrolle der chromosomen Replikation, Beteiligung an DNA *mismatch repair* oder der Regulation der Genexpression (Casadesus, 2016). Der Einfluss der *orphanen* DNA-Methyltransferasen auf die bakterielle Physiologie wurde intensiv für die

Die Dam Methyltransferase aus *Gammaproteobakterien* und die CcrM Methyltransferase aus *Alphaproteobakterien* erforscht (Casadesus und Low, 2006). Die Enzyme katalysieren den Transfer eines Methylrestes von S-Adenosyl-L-Methionin an die N6-Position eines Adenins. Die Dam Methyltransferase methyliert Adenin, innerhalb des Methylierungsmotivs G^{m6}ATC. Dam besitzt zwei Adomet-Bindestellen, eine katalytische Untereinheit (UE) und eine UE für die spezifische Erkennung der DNA. Sowohl hemimethylierte, als auch nicht methylierte DNA wird durch Dam erkannt und methyliert (Marinus und Lobner-Olesen, 2014). Arbeiten an der Dam Methyltransferase haben gezeigt, dass es zwei Arten der Genexpressionsregulation gibt. Zum einen dient der Methylierungsstatus als Indikator für die Zellentwicklung und der damit verbundenen spezifischen Genexpression. Zum anderen führt das Methylierungsmuster zum An- und Ausschalten bestimmter Gene (Low und Casadesus 2008, Casadesus und Low 2013). Ein Beispiel für die Genexpressionskontrolle in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus findet sich in der Expression des *dnaA* Gens in *E.coli*. DnaA initiiert die Replikation, durch die Bindung an *origin of chromosome replication (oriC)*. Drei Promotoren regulieren DnaA (Marinus, 1996). Der Promotor *dnaA2* beinhaltet drei GATC Methylierungsmotive, die den Promotor nur bei vollständiger Methylierung aktivieren. Die Dam Methyltransferase folgt während der Replikation der Replikationsgabel. Dadurch wird der Tochterstrang direkt nach der Synthese methyliert (Marinus, 1996). Die Dam Methyltransferase steht in Konkurrenz mit SeqA, da SeqA spezifisch hemimethylierte GATC Methylierungsmotive bindet (Abbildung 3). SeqA ist unter anderem für die Herstellung der Chromosomenstruktur nach der Replikation verantwortlich und folgt ebenso der Replikationsgabel. Die Bindung von SeqA an die DNA verhindert die DNA-Methylierung durch Dam und inaktiviert in *E. coli* die Expression von *dnaA* (Aloui *et. al.*, 2012; Casadesus, 2016).

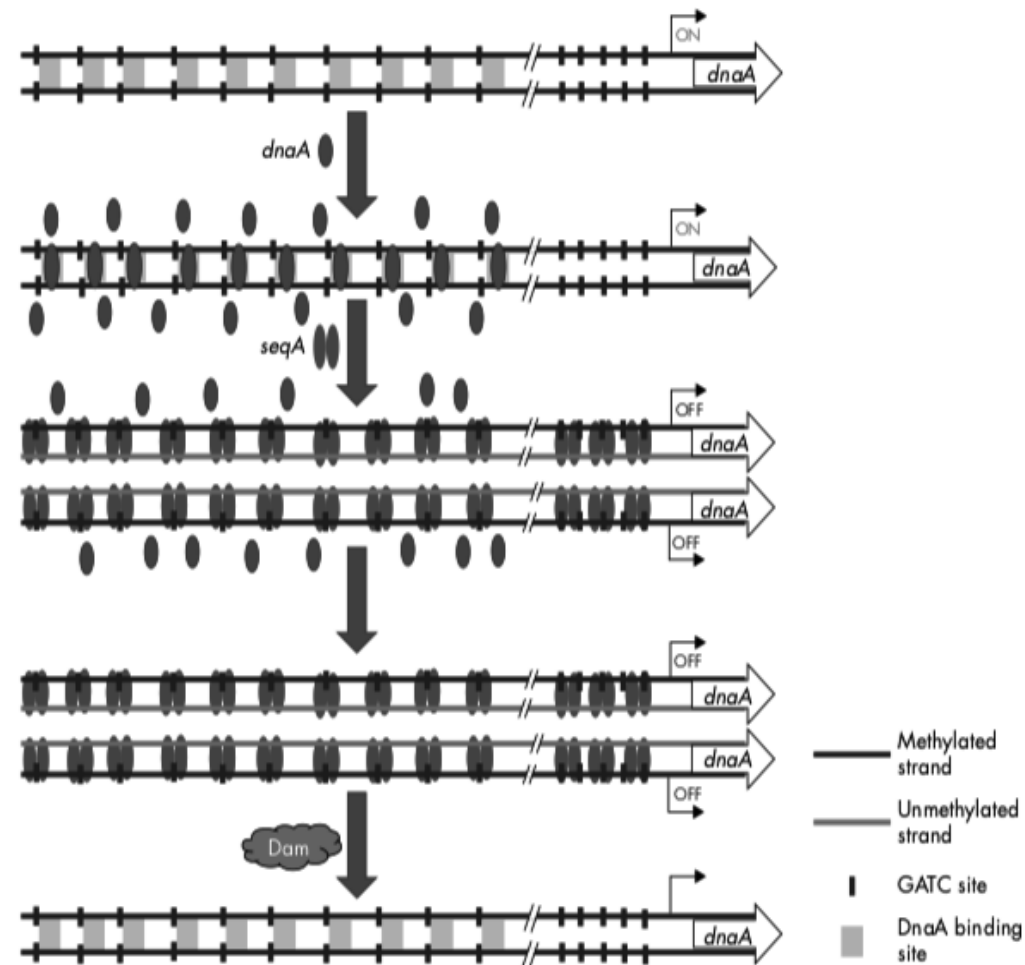


Abbildung 3 Konkurrenz zwischen Dam und SeqA um die Bindung von GATC.

Nach der DNA Replikation liegt das GATC Motiv hemimethyliert vor. Dam und SeqA konkurrieren um die Bindung des hemimethylierten Tochterstranges. Die Bindung von SeqA verhindert die Methylierung des GATC Motivs. Erst durch das Ablösen von SeqA kann Dam die DNA vollständig methylieren.

Abbildung von Adhikari und Curtis, 2016.

Als klassisches Beispiel für Methylierungsabhängige *phase variation* gilt das *pap*-Operon in *E.coli*. Das *pap*-Operon kodiert für die Pili Proteine an der Zelloberfläche. An dem An- und Ausschalten (ON und OFF) des Operons sind drei Proteine und zwei Methylierungsmotive (GATC) beteiligt (Sanchez-Romero *et. al.*, 2015). Im regulatorischen Bereich des *pap*-Operons befinden sich zwei GATC Methylierungsmotive die durch Dam methyliert werden (Marinus und Lobner-Olesen, 2014). Deren Methylierungsstatus ist für die Aktivität des Operons verantwortlich (Abbildung 4; Casadesus und Low, 2006; 2015; Casadesus, 2016)

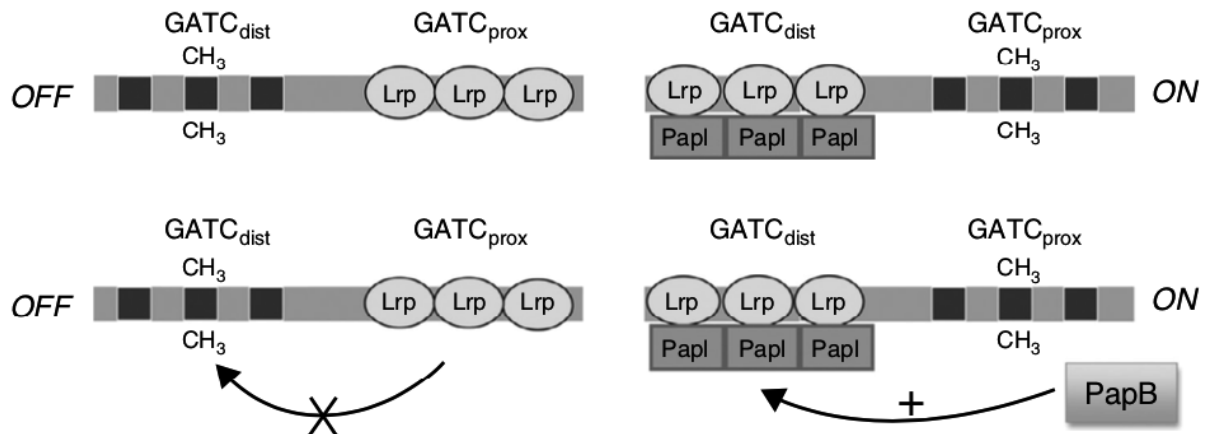


Abbildung 4 Verknüpfung der DNA-Methylierung und dem ON- OFF-Status des *pap*-Operons aus *E. coli*.

Das *pap*-Operon enthält die Proteine LRP, PapI und PapB. Ein globaler Regulator ist dabei LRP, PapI wird als *switching factor* bezeichnet und PapB wird im *pap*-Operon kodiert und aktiviert die Transkription des *papI* Gens. Weiterhin sind die zwei GATC Methylierungsmotive am Wechsel des On- und Off -Status des Operons beteiligt. Das Protein LRP kann innerhalb der *upstream regulatory region* (UAS) des *pap*-Operons an sechs Stellen die DNA binden. Zwei dieser Bindestellen beinhalten das Methylierungsmotiv GATC. Im OFF-Status (das Operon wird nicht exprimiert) bindet LRP drei downstream Bereiche. Dies führt dazu, dass GATC_{prox} nicht methyliert und GATC_{dist} methyliert vorliegt. Die Expression des *pap*-Operons wird inhibiert. Die Expression des *papI* Gens führt zum Anstieg der PapI Konzentration in der Zelle. PapI löst die Translokation von LRP vom *downstream* Bereich, an den *upstream* Bereich der UAS aus. Dies ermöglicht der Dam Methyltransferase die Methylierung von GATC_{prox} und verhindert die Methylierung von GATC_{dist}. Dieser Wechsel aktiviert die Expression der Gene des *pap*-Operons. Zusätzlich aktiviert papB in einem positiven *feedback loop* die Transkription des *papI* Gens und erhält somit den ON-Status des *pap*-Operons. Durch den Abfall der PapI Konzentration durch proteolytische Abbauprozesse, kann der ON-Status wieder zum OFF-Status wechseln. Abbildung: Sanchez-Romero *et. al.*, 2015.

Neben *orphanen* Adenin-Methyltransferasen wurden auch *orphane* Cytosin-Methyltransferasen beschrieben (Marinus und Lobner-Olesen, 2014). Die Methylierung des Cytosins bildet einen *hot spot* für spontane Mutationen. Es konnte gezeigt werden, dass methyliertes Cytosin $5,8 \times 10^{-13}$ pro Sekunde zu Thymin konvertiert wird (Shen *et. al.*, 1994). Trotz dieser bemerkenswerten Erhöhung der Mutationsrate, führt die Deletion von Dcm in *E. coli* zu keiner Änderung im Wachstumsverhalten unter Laborbedingungen (Kahramanoglou *et. al.*, 2012). In *E. coli* Mutanten zeigten DNA-Microarray Analysen eine erhöhte Expression von RpoS, ein Sigmafaktor der an Mechanismen der Stressantwort beteiligt ist. Der Regulationsmechanismus über den Dcm die Genexpression in *E. coli* beeinflusst ist noch nicht charakterisiert worden. Weiterhin konnte auch ein Einfluss auf die Struktur des Genoms durch Dcm nachgewiesen werden (Kahramanoglou *et. al.*, 2012). Die biologischen Funktionen der DNA-Methyltransferasen sind sehr vielfältig. Der Verlust der Methyltransferase HpyAVIBM aus *Helicobacter pylori* führt zur Veränderung der Genexpression. Diese umfassen Gene die an der Motilität, Virulenz und Adhäsion beteiligt

sind (Kumar *et. al.*, 2012). *Vibrio cholera* nutzt Dcm Methylierung um die genotypische Diversität während der stationären Wachstumsphase zu erhöhen (Banerjee und Chowdhury, 2006). Die genomweiten Untersuchungen, erweitern das Wissen und Verständnis über *orphan* Methyltransferasen zunehmend. Trotz weitreichender Studien von Blow *et. al.*, im Jahr 2016, wurden viele Mikroorganismen noch nicht oder nur unzureichend untersucht. Zu diesen noch unzureichend untersuchten Bakterien gehören Cyanobakterien einschließlich des Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Blow *et. al.*, 2016).

1.4 Cyanobakterien

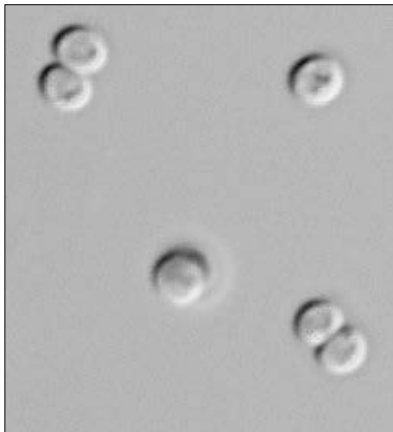


Abbildung 5 *Synechocystis* 6803
Synechocystis 6803 Zellen, Aufnahmen
 mittels 100x Öl-Immersionsobjektiv,
 Olympus UC-30 Kamera und der Software
 CellSens Entry Olympus.

Die Entwicklungsgeschichte der Cyanobakterien lässt sich auf über 3,5 Milliarden Jahre zurückdatieren (Schopf, 1993). Im Laufe der Evolution war es den Cyanobakterien möglich, durch ihren vielseitigen Metabolismus verschiedene Ökosysteme zu erschließen. Zu diesen gehören beispielsweise Süß- und Meerwasserbiotope, terrestrische Habitate wie Wüsten oder Gletscher, ebenso wie Thermalquellen oder Salzseen (Van den Hoek *et. al.*, 1993; Whitton und Potts 2000). Die morphologischen und physiologischen Anpassungen der Cyanobakterien führten zur Ausbildung einer hohen Biodiversität. Das morphologische Spektrum umfasst Einzeller, stäbchen- und kokkenförmige Bakterien, sowie filamentbildende Vertreter (Abbildung 5, Rippka *et. al.*, 1979, Whitton und Potts 2000). Cyanobakterien besitzen die Fähigkeit zur oxygenen Photosynthese. Dabei wird Lichtenergie genutzt, um NADPH und ATP zu generieren. Diese Produkte werden anschließend im Calvin-Benson-Bassham Zyklus zur Umsetzung von anorganischen Kohlenstoffdioxid in organische Verbindungen verwendet. Weiterhin führt die Hydrolyse von Wasser zur Freisetzung von molekularem Sauerstoff (Stryer, 2013). Die Bildung von Sauerstoff als Abfallprodukt der oxygenen Photosynthese führte zur Sauerstoffanreicherung in der damals reduzierten Erdatmosphäre (Van den Hoek *et. al.*, 1993; Holland *et. al.*, 2006). Neben dem Sauerstoffzyklus sind Cyanobakterien essentiell für die globalen Kohlenstoff- und

Stickstoffzyklen (Stryer, 2013). Darüber hinaus nehmen Cyanobakterien eine Schlüsselposition in der Endosymbiontentheorie ein. Sie gelten als Vorläufer aller heute existierender photosynthetisch aktiver Eukaryoten, Algen und Pflanzen (Mereschkowsky, 1905; Van den Hoek *et. al.*, 1993; Dismukes *et. al.*, 2001).

Neben der globalen Bedeutung der Cyanobakterien wurde die Rolle der DNA-Methylierung oder der *orphanen* DNA-Methyltransferasen in diesen *keystone* Organismen nur wenig untersucht. Endonukleasen, als Teil der RM-Systeme wurden hingegen in vielen einzelligen und filamentösen Cyanobakterien identifiziert. In *Anabaena* sp. PCC 7120 wurden vier Typ II Methyltransferasen identifiziert, die mit Restriktionsendonukleasen (*AvaI-IV*) assoziiert sind. Die RM-Systeme schützen den Organismus vor Fremd-DNA. Um *Anabaena* sp. PCC 7120 trotz aktiver RM-Systeme molekularbiologisch zu modifizieren wird über Konjugation der Vektor, gemeinsam mit einem „Helfer“-Plasmid in *E.coli* transformiert. Das „Helfer“-Plasmid kodiert für Enzyme, welche die *AvaI*- und *AvaII*-Schnittstellen methylieren und somit den Vektor später vor dem Restriktionsabbau in *Anabaena* sp. PCC 7120 schützen (Metveyev *et. al.*, 2001).

Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist dagegen virtuell frei von Restriktionsendonukleasen und somit natürlich kompetent (Scharnagl *et. al.*, 1998). Darüber hinaus verfügt dieser Stamm über die Möglichkeit der homologen Rekombination, die es gestattet Fremd-DNA in die eigene chromosomale oder Plasmid-DNA einzufügen (Scharnagl *et. al.*, 1998, Barten und Lill, 1995). Scharnagl *et. al.* (1998) zeigte, dass *Synechocystis* sp. PCC 6803 zwei *orphane* DNA-Methyltransferasen besitzt (M.Ssp6803I und M.Ssp6803III). In *Anabaena* sp. PCC 7120 wurden vier *orphane* DNA-Methyltransferasen (DmtA, DmtB, DmtC und DmtD) nachgewiesen, die die Motive GATC, GGCC, CGATCG und rCCGGy erkennen (Metveyev *et. al.*, 2001). Metveyev *et. al.* (2001) konnte zeigen, dass es innerhalb der Cyanobakterien zahlreiche zu diesen Methyltransferasen homologe Proteine gibt, die vermutlich auch diese Motive erkennen können. Inwieweit es weitere funktionelle *orphane* DNA-Methyltransferasen in dem Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht erforscht.

1.5 Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803

In dieser Arbeit wurde mit dem Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (folgend als *Synechocystis* 6803 bezeichnet) gearbeitet (Abbildung 5). Isoliert wurde das photosynthetisch aktive Bakterium 1968 aus einem Frischwassersee. 1996 wurde durch Kaneko *et. al.*, das gesamte Genom vollständig sequenziert und putative proteinkodierende Gene wurden definierten Regionen zugeordnet (Kaneko *et. al.*, 1996). Das Genom umfasst

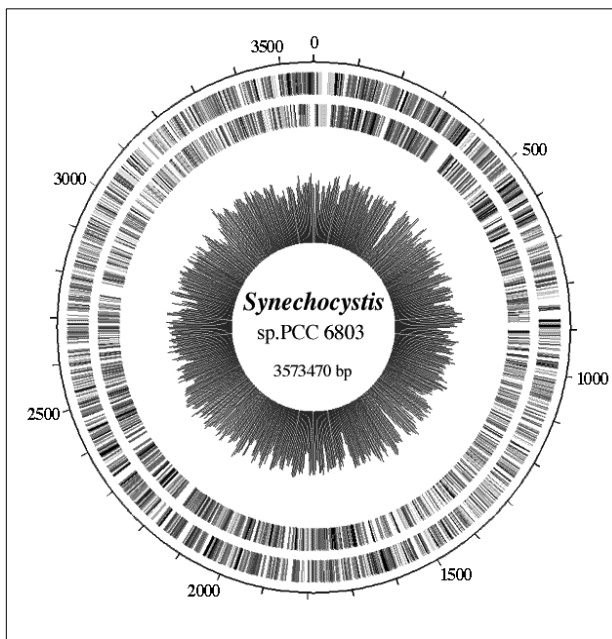


Abbildung 6 Kartierung des vollständig sequenzierten Chromosoms von *Synechocystis* 6803 (Kaneko *et. al.*, 1996).

3,9 Mbp und enthält 3.725 *open reading frames* (ORF). *Synechocystis* 6803 besitzt 7 Plasmide und ein Chromosom (CyanoBase, Juli 2019). In dem *multi-copy* Genom von *Synechocystis* 6803 kommen mehrere Kopien des Chromosoms und der Plasmide vor (Labarre *et. al.*, 1989). Die Sequenzierung des gesamten cyanobakteriellen Genoms ermöglichte die Kartierung der einzelnen Gene und somit eine gezielte genetische

Manipulation des Bakteriums (Abbildung 6).

Für diese Arbeit war besonders interessant, dass *Synechocystis* 6803 virtuell frei von Restriktionsendonukleasen ist und auch *in vitro* keine Hinweise auf Restriktionsendonuklease-Aktivität gefunden wurde (Scharnagl *et. al.*, 1998). Trotzdem konnte die Modifikation der DNA durch DNA-Methylierung im Motiv CGATCG nachgewiesen werden (Scharnagl *et. al.*, 1998). Durch die technische Limitierung, war es lange Zeit nicht möglich, weitere Untersuchungen des cyanobakteriellen Methyloms durchzuführen. Neue „omics“ Techniken wie SMRT- und Bisulfit-Sequenzierung erlauben es, im Rahmen dieser Arbeit, erstmals die Frage nach der Charakterisierung des Methyloms von *Synechocystis* 6803 zu stellen. Die Identifikation der korrespondierenden DNA-Methyltransferasen ermöglichen es Rückschlüsse auf physiologische Einflüsse zu ziehen. Weiterhin ist noch völlig unklar, ob die DNA-Methylierung die Genexpression in *Synechocystis* 6803 beeinflusst.

2 Zentrale Fragestellung

- A. Wie sieht das Methylom von *Synechocystis* 6803 aus?
 - a. Wie viele Methylierungsmotive gibt es?
 - b. Welche Basen werden innerhalb dieser Motive spezifisch methyliert?

- B. Welche Methyltransferasen katalysieren die DNA-Methylierung in *Synechocystis* 6803?

- C. Führt die Deletion putativer Methyltransferasegene zu phänotypischen Veränderungen in den Mutanten?

- D. Hat die DNA-Methylierung einen Einfluss auf die Genexpression in *Synechocystis* 6803?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Enzyme und Kits

Durch die Milli-Q Anlage Evoqua der Firma MediSer24 wurde das ausschließlich für Puffer und Lösungen verwendete Wasser gereinigt. Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden kommerziell von den Firmen QIAGEN (Hilden, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma Aldrich - Merck (Darmstadt, Deutschland), Invitrogen (Leck, Niederlande) bezogen. Die allgemeinen Verbrauchsmaterialien wurden von den folgenden Firmen bezogen: BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Heraeus (Osterode, Deutschland), MWG Biotech (München, Deutschland), Schott Glaswerke (Mainz, Deutschland), Sorvall (Bad Homburg, Deutschland) und GE Healthcare. Die verwendeten Enzyme und Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen NewEnglandBiolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) und ThermoFisherScientific (Schwerte, Deutschland) erworben. Die genutzten Kits NucleoSpin® Plasmid und PCR clean-up Gel extraction stammten von der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland).

3.1.2 Apparaturen und Geräte

Tabelle 2 Auflistung der verwendeten Geräte und deren Hersteller

Gerät	Hersteller
Clean Bench	
Safe HS12	Heraeus
Gaswechsel/Mischgerät	
Gas mixing system GMS 150	Photon Systems Instruments
Gefrier-, Kühl- und Wärmeschränke	
-86 °C freezer quick reference	Thermo Scientific
-20 °C BD-203GAA	Haier
4 °C profi line Kühlschrank	Liebherr
30° C, 37 °C, 65 °C Schrank Function line	Heraeus
Gelelektrophorese-Apparaturen	
Agarosegel-Apparaturen	BioRAD
Polyacrylamidgel-Apparaturen	
Formaldehydgel-Apparaturen	BioRAD
Lampen	
Osram Leuchtstofflampen L36W/76 Natura	OSRAM
Lampen Q-Panel	Q-Lab
Multikultivator	

Multi-Cultivator MC 1000	Photon Systems Instruments
NanoDrop	
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
pH-Meter	
pH211 Microprocessor pH Meter	Hanna Instrument
Photometer	
Cary 50 UV-Visible Spektrophotometer	Varian
Genesys 105 UV-Vis	Thermo Scientific
Präzisionswaagen	
Feinwaage ABT 120 5 DM	Kern
Präzisionswaage 572	Kern
Semi-dry Elektrobplotter	PeqLab
Thermoblöcke und Schüttelplatten	
1,5 ml und 2 ml Thermoblock Tmix	Jena Analytik
Accu Block Digital Dry Bath	Labnet International
Schüttelplatte IKA-Vibrax-VXR	Sigma Aldrich
Thermocycler	
Personal Thermocycler Combi	Biometra
T100 Thermocycler	BioRad
Ultraschall-Homogenisatoren	
Sonotrode UW 70	Bandelin Electronics
Ultraschall-Wandler HD 70	Bandelin Electronics
Visuelle Dokumentation	
Transilluminator UVP inc	Analytic Jena
GeliX20 Imager	Intas science imaging
Power Shot SX 210 Is	Canon
Wasserbad	
Grant JB series	Biopharma
Zentrifugen	
3K30 Laborzentrifuge	Sigma
RC 6 Plus Sorvall	Thermo Electron Cooperation
Tischzentrifuge Micro Star 17	VWR

3.1.3 Vektorsysteme

Die in dieser Arbeit verwendeten und kommerziell erworbenen Vektoren sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die in dieser Arbeit erzeugten Plasmide sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 3 Übersicht verwendeter Vektoren

Name	Beschreibung/relevanter Genotyp	Referenz
pGEMT®	blunt-Klonierungsvektoren, PT7, lacZ start codon, lac operon, AmpR, linearisiert über EcoRV, 3'-term. T-Überhang	PROMEGA
pVZ322	Klonierungsvektor, Km ^R , Gent ^R , IncQ, Mob ⁺	Universität Freiburg, AG Hess
pASK-IBA43+	Expressionsvektor, PtetA, ATG, OmpA-Signal-Sequenz, C-term. Strep-Tag II, N-term. 6xHis-Tag, AmpR	IBA (Göttingen)
pET-28a	Expressionsvektoren, PT7, ATG, C-term. und N-term. 6xHis-Tag, Km ^R	NOVAGEN (Nottingham)
pILA	Km ^R	Universität Freiburg, AG Hess
pUC4K	Klonierungsvektoren, Km ^R	Laborsammlung

Tabelle 4 In dieser Arbeit erzeugte rekombinante Plasmide

Plasmid	Insert (ORF-Name)	Größe des Inserts	Restriktions-schnittstellen	Inserierte AB-Kassette	Restriktions-schnittstellen für die Insertion (fw/rev)	Größe des Konstruktes
pGEMT®- <i>sll8009</i>	<i>sll8009</i>	2874 bp	Clal	Km ^R	/	1359 bp
pGEMT®- <i>slr6095</i>	<i>slr6095</i>	1446 bp	BspEI	Km ^R	/	2550 bp
pet28a- <i>sll8009</i>	<i>sll8009</i>	1512 bp	/	/	EcoRI/XhoI	1512 bp
pASK-IBA43 ⁺ - <i>sll8009</i>	<i>sll8009</i>	1512 bp	/	/	EcoRI/XhoI	1512 bp
pet28a- <i>slr6095</i>	<i>slr6095</i>	1446 bp	/	/	EcoRI/XhoI	1446 bp
pASK-IBA43 ⁺ - <i>slr6095</i>	<i>slr6095</i>	1446 bp	/	/	EcoRI/XhoI	1446 bp
pet28a- <i>slr6050</i>	<i>slr6050</i> C-Terminus	1754 bp	/	/	EcoRI/XhoI	1754 bp
pASK-IBA43 ⁺ - <i>slr6050</i>	<i>slr6050</i> C-Terminus	1754 bp	/	/	EcoRI/XhoI	1754 bp
pILA- <i>sll1526_WT</i>	150 bp upstream <i>sll1526</i>	150 bp	/	Sm ^R	PstI/SacI	150 bp
pILA- <i>sll1526_Mut</i>	150 bp upstream <i>sll1526</i> mutiertes Motiv GCGC	150 bp	/	Sm ^R	PstI/SacI	150 bp
pILA- <i>sll0470_WT</i>	150 bp upstream <i>sll0470</i>	150 bp	/	Sm ^R	PstI/SacI	150 bp
pILA- <i>sll0470_Mut</i>	150 bp upstream <i>sll0470</i> mutiertes Motiv GCGC	150 bp	/	Sm ^R	PstI/SacI	150 bp

3.1.4 Verwendete Organismen

Zu Beginn der Arbeit vorliegende *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Escherichia coli* Stämme sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die in dieser Arbeit erzeugten *Synechocystis* sp. PCC 6803 Deletions- und Insertionskonstrukte und rekombinante *E. coli* Stämme sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 5 Verwendete Mikroorganismen

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803		
WT _{Russisch}	Natürlich kompetenter Wildtyp Stamm.	Isolat aus dem Lehrstuhl für Genetik der staatlichen Universität Moskau, Prof. S. V. Shestakov
WT _{Japanisch}	Natürlich kompetenter Wildtyp Stamm.	Isolat von N. Murata, National Institute of Basic Biology, Okazaki, Japan
Δ sll0729	Deletionsmutante, sll0729, Km ^R , WT _{Russisch}	Scharnagl <i>et. al.</i> , 1998
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F ⁻ , endA1, glnV44, thi-1, relA1, gyrA96, deo ^R , nupG, Δ lacZM15, hsdR17	Invitrogen
XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]	Invitrogen
BL21-Gold (DE3)	F ⁻ , ompT, hsdS (r _B ⁻ m _B ⁻), dcm ⁺ , Tet ^R , gal, λ (DE3), endA, hte	Invitrogen

Tabelle 6 In dieser Arbeit erzeugte *Synechocystis* sp. PCC 6803 Deletions- und Insertionsmutanten

Deletions- und Insertionskonstrukte	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
Δ sll8009	WT _J , Km ^R , Deletionsmutante
Δ slr6095	WT _J , Km ^R , Insertionsmutante
Δ slr6095-6096	WT _J , Km ^R , Deletionsmutante
Δ slr6050	WT _J , Km ^R , Deletionsmutante

Tabelle 7 In dieser Arbeit hergestellte rekombinante *E. coli* Stämme

Rekombinante Plasmide	<i>E. coli</i> Stämme
pet28a-sll8009	BL21-Gold (DE3)
pASK-IBA43 ⁺ -sll8009	BL21-Gold (DE3)
pet28a-slr6095	BL21-Gold (DE)
pet28a-slr6095	BL21-Gold (DE) Hsp10/60
pASK-IBA43 ⁺ -slr6095	BL21-Gold (DE)
pASK-IBA43 ⁺ -slr6095	BL21-Gold (DE) Hsp10/60
pet28a-slr6050	BL21-Gold (DE)
pet28a-slr6050	BL21-Gold (DE) Hsp10/60
pASK-IBA43 ⁺ -slr6050	BL21-Gold (DE)
pASK-IBA43 ⁺ -slr6050	BL21-Gold (DE) Hsp10/60

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung von Mikroorganismen

Kultivierung von *Synechocystis* sp. PCC 6803

Die Kultivierung von *Synechocystis* sp. PCC 6803 erfolgte photoautotroph in 100 ml Erlenmeyerkolben unter konstanter Beleuchtung (photosynthetisch aktive Photonen-Flux-Dichte (PAR) $40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und ständigem Schütteln (140 rpm) bei 30 °C in 1xBG11 Nährmedium. Dieses wurde durch Rippka *et. al.*, (1979) beschrieben. Der pH-Wert des Mediums wurde durch den Zusatz von TES (N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure) auf pH 8,0 reguliert. Für verschiedene Analysen, fand die Kultivierung von *Synechocystis* 6803 mit CO₂ angereicherter Luft (5 % [v/v] CO₂) in Batchkulturgefäßen statt. Spezifische Antibiotika wurden dem 1x BG11 Medium zur stabilen Kultivierung von *Synechocystis* Mutanten zugesetzt. Die Einstellung der Begasungsintensität erfolgte automatisch, durch das Gasmischgerät GMS 150 von Photon Systems Instruments. Zur Vermeidung von Kontaminationen, wurde die mit CO₂ angereicherte Raumluft durch zwei vorgeschaltete Filter über ein Glasröhrchen in die Batchkultur geleitet. Die Kultivierung fand im Wasserbad bei konstanten 29 °C statt und die Lichtintensität betrug PAR $120 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Das 2x BG11 fand Anwendung in der Herstellung von Koble-Agar-Platten, zur Kultivierung von *Synechocystis* 6803 auf Festmedium. Zur Herstellung von zweifach konzentriertem BG11 wurde dem Medium zusätzlich 6 g Natriumthiosulfat zugesetzt. Die Kultivierung fand bei 30 °C unter konstanter Beleuchtung PAR $40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ statt. Zur Selektion und zur stabilen Kultivierung von *Synechocystis* Mutanten wurden den Medien spezifische Antibiotika zugesetzt.

Alle neu generierten Stämme sind der Stammsammlung der Pflanzenphysiologie der Universität Rostock hinzugefügt worden. Dazu wurde 20 ml Kultur bei 4000 rpm, für 5 min zentrifugiert und in 2 ml BG11 resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 250 µl DMSO versetzt und bei -80 °C gelagert.

Kontaminationen der *Synechocystis*-Kulturen mit heterotrophen Bakterien wurde mittels Axenitätstests überprüft. Unter der Clean Bench wurden 5 µl der zu untersuchenden Kultur auf eine LB-Agarplatte getropft. Nachdem der Kulturtropfen angetrocknet war, wurde die Platte für 48 h bei 37 °C inkubiert. Das Wachstum heterotropher Bakterien wies auf

Kontamination der Testkultur hin, wohingegen ausbleibendes Wachstum als Indikator für axenische *Synechocystis*-Kulturen angesehen wurde.

Stammlösung 1 (sterilfiltriert)		Stammlösung 2		Stammlösung 3	
Fe-NH ₄ -citrat	0,03 mM	NaNO ₃	17,65 mM	CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,26 mM
add dest.H ₂ O	100 ml	K ₂ HPO ₄	0,22 mM	add dest.H ₂ O	100 ml
		MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,30 mM		
		add dest.H ₂ O	1000 ml		
Stammlösung 4		Spurenelemente-Mix (sterilfiltriert)		1x BG11-Kulturmedium (autoklaviert)	
TES-KOH (pH 8,0)	1 M	H ₃ BO ₃	46,00 µM	Stammlösung 1	1 ml l ⁻¹
C ₆ H ₈ O ₇ × H ₂ O	0,029 mM	MnCl ₂ × 4 H ₂ O	9,400 µM	Stammlösung 2	50 ml l ⁻¹
C ₁₀ H ₁₄ O ₈ N ₂ Na × H ₂ O	0,003 mM	ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,770 µM	Stammlösung 3	2 ml l ⁻¹
add dest.H ₂ O	500 ml	Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,086 µM	Stammlösung 4	20 ml l ⁻¹
		Co(NO ₃) ₂ × 6 H ₂ O	0,170 µM	Spurenelemente-Mix	1 ml l ⁻¹
Kobe (autoklaviert)		Kobe-Agar		Weitere Zusätze für 2x BG11	
Kobe	4,5 g	Kobe	50 ml	Na ₂ S ₂ O ₃	6 g
add dest.H ₂ O	250 ml	2x BG11	50 ml		
Mediumzusätze					
Kanamycin (Km)	50 µg/ml ⁻¹				
Gentamycin (Gm)	10 µg/ml ⁻¹				

Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) erfolgte bei 37 °C in Luria broth (LB) Medium auf LB-Agarplatten, oder als LB-Flüssigkultur unter kontinuierlichem Schütteln bei 170 rpm. Zur Selektion wurden Antibiotika entsprechend der Plasmid-kodierten Resistenzen dem Medium beigesetzt.

LB-Flüssigmedium (autoklaviert)		Mediumzusätze	
lysogeny broth Medium (Lennox)	6,25 g	Kanamycin (Km)	50 µg/ml ⁻¹
add dest.H ₂ O	250 ml	Spectinomycin (Sm)	50 µg/ml ⁻¹
		Ampicillin (Amp)	40 µg/ml ⁻¹
LB-Agarplatten (autoklaviert)			
lysogeny broth Agar (Lennox)	8,7 g		
add dest.H ₂ O	250 ml		

3.2.2 Physiologische Untersuchungen

Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD) der *Synechocystis*- und der *E. coli*-Kulturen wurde mittels UV-sensitiven Spektrophotometer gemessener Extinktion bei einer Wellenlänge von 750 nm

oder 600 nm bestimmt. Das Fassungsvermögen der verwendeten Einmalküvetten betrug 1 ml mit einer Schichtdicke von 1 cm. Als Blindwert wurde 1x BG11 oder LB Medium verwendet. Die Spezifikation des Spektrophotometers besagt, dass genaue Messwerte im Wertebereich von 0,1 – 1,0 erhalten werden. Um Messungenauigkeiten zu vermeiden, wurden die Kulturen bei Bedarf in 1x BG11 oder LB Medium verdünnt. Der Verdünnungsfaktor wurde bei der Berechnung des Kulturvolumens zur Erreichung der gewünschten OD_{750nm} oder OD_{600nm} einbezogen.

Zelluläres Absorptionsspektrum

Die Aufnahme des gesamten Zellspektrums wurde durchgeführt, um Veränderungen im Chlorophyll-Gehalt von Wildtyp-Kultur (WT) und Mutanten zu untersuchen. Dazu wurden die *Synechocystis*-Kulturen auf OD_{750nm} 1 eingestellt. In einer 1 ml Einmalküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm wurde 1 ml Kultur gegeben und am Cary 50 UV-Visible Spektrophotometer vermessen. Als Blindwert wurde 1 ml 1x BG11 Medium verwendet. Das Spektrum wurde mit einer Wellenlänge von 400 nm bis 800 nm aufgenommen.

Wachstumsversuch und Bestimmung der Wachstumsraten

Zur physiologischen Untersuchung von *Synechocystis*-Kulturen und zur Bestimmung der Wachstumsraten, wurden Wachstumsversuche durchgeführt. Diese fanden unter verschiedenen Bedingungen im Multikultivator oder als Kolbenkultur statt. Bei jedem Versuchsansatz, wurden mindestens zwei technische Replikate kultiviert. Insgesamt wurden die Wachstumsversuche mindestens dreimal wiederholt, um eine statistische Auswertung biologisch unabhängiger Kulturen zu ermöglichen. Auf deren Grundlage wurden Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Die Berechnung der Wachstumsrate erfolgte unter Anwendung der Formel:

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

Dabei beschreibt μ die Wachstumsrate in h^{-1} , $\ln(x_0)$ den natürlichen Logarithmus der Extinktion bei 750 nm und $t = 0$, $\ln(x_E)$ den natürlichen Logarithmus der Extinktion bei 750 nm und $t = E$, t_0 zeigt den Zeitpunkt Null an und t_E den Zeitpunkt E.

Tropftest Analysen

Um biologische Veränderung der Kulturen in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen zu untersuchen wurden Tropftests durchgeführt. Dazu wurden von den Kulturen Verdünnungsreihen (unverdünnt bis 1:10000) angelegt. Je 2 – 5 μl Kultur wurden auf Koble-Platten getropft und anschließend für 5 d bei PAR 40 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ kultiviert. Die Tropftestplatten wurden mit Canon Power Shot SX210 IS fotodokumentiert.

UV-Stress Analysen

Die Vorkulturen wurden in 50 ml Erlenmeyerkolben über 5 d, bei 30 °C und PAR 40 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen abzentrifugiert, in frischem 1x BG11 resuspendiert und auf $\text{OD}_{750\text{nm}}$ 0,1 eingestellt. In dreigeteilte Petrischalen wurden je 7 ml der drei technischen Replikate einer Kultur gegeben. Die Kontrollkulturen wurden anschließend mit Parafilm verschlossen, mit einer 400 nm UVA und UVB *cut off*-Folie (Folex PR, Folex, Dreieich, Deutschland) bedeckt und bei 23 °C, PAR 60 oder 75 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ für 1-3 d kultiviert. Während der kontinuierlichen Bestrahlung mit PAR 75 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ wurden die Testkulturen zusätzlich UVA (8 oder 9,5 $\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$) und UVB (0,4 oder 0,6 $\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$) Strahlung ausgesetzt. Nach der Bestrahlungszeit (12h, 24 h, 36 h, oder 50 h) wurden die Petrischalen geöffnet und die Kulturen gründlich resuspendiert. Anschließend wurden Tropftests durchgeführt. Die Platten der Tropftests wurden bei 30 °C und PAR 40 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ für 6 d kultiviert.

Bestimmung der Zellgröße von *Synechocystis* 6803

Um die Zellgrößen der *Synechocystis*-Kulturen $\Delta\text{sl}10729_1$, $\Delta\text{sl}10729_15$ und des russischen Wildtyps zu bestimmen, wurde aus den Wachstumversuchen je eine 1 ml Probe entnommen. Aus diesen wurden Verdünnungsreihen bis zu einer Verdünnung von 1:10000 hergestellt. Unter Verwendung des Lichtmikroskops Olympus BX-51 wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden unter Anwendung eines 100x Öl-Immersionsobjektiv mit der Olympus UC-30 Kamera und der Software CellSens Entry von Olympus aufgenommen.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

Isolation chromosomaler DNA

Die Phenol-Chloroform-Methode wurde verwendet, um DNA aus *Synechocystis*-Kulturen zu isolieren, welche Anwendung in Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) fand. Für *single molecule real-time sequencing* (SMRT) und auch für die Untersuchung von Methyltransferase Methylierungsmotiven mittels Restriktionsverdau, wurde intakte hochmolekulare DNA genutzt. Um hochmolekulare DNA aus *Synechocystis*-Kulturen und *E. coli* zu isolieren und irreversible Bindung der DNA an Phenol-Reste zu vermeiden, wurde die CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)-Methode verwendet. Diese Methode ermöglicht hohe Konzentrationen nicht intakter DNA zu erhalten, ohne Enzyme mit aufzureinigen.

Für die Isolation mittels Phenol-Chloroform-Methode wurden 200 µl Bakterienkultur mit 200 µl TRIS gepufferten Phenol versetzt und bei 65 °C für 10 min erhitzt. Dieser Suspension wurden 200 µl Chloroform zugesetzt und gemixt. Anschließend wurden die Proben bei 13.000 rpm für 5 min zentrifugiert, wodurch eine Phasentrennung erfolgte. Die wässrige Phase wurde abgenommen und erneut mit Chloroform versetzt und zentrifugiert. Die obere Phase wurde erneut abgenommen und 1 µl zur PCR verwendet.

Zur Isolation hochmolekularer DNA aus *Synechocystis* 6803, wurde die CTAB-Methode verwendet. Dazu wurden die Kulturen unter 5 % [v/v] CO₂ kultiviert, regelmäßig abzentrifugiert und mit frischen BG11 auf OD_{750nm} 1 eingestellt. Zur Probennahme wurden 40 ml der Kulturen auf OD_{750nm} 1 eingestellt und nach 4 h Wachstum verwendet. Um hochmolekulare DNA aus *E. coli*-Kulturen zu isolieren, wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C und 370 rpm kultiviert. Im Anschluss wurden die Kulturen für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Zellaufschluss der *E. coli*- und der *Synechocystis*-Zellen erfolgte bei 60 °C für 30 min in Lysis-Puffer (TrisHCl 50 mM, pH 8). Die Lösung wurde mit 8 mg/ml Lysozym versetzt und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Unter vorsichtigem Mischen wurden 5 M NaCl, 0,5 M EDTA und 1 %-ige SDS-Lösung zur Suspension gegeben und bei 37 °C für 10 min inkubiert. Zur Entfernung der Proteine wurden 20 mg/ml Proteinase K hinzugegeben und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wurden 400 µl 2 %-ige Cetyltrimethylammoniumbromid -Lösung (CTAB-Lösung) dem Gemisch zugesetzt und für 20 min bei 65 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis, wurde ein Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei

4 °C und 13.000 rpm für 30 min. Die obere Phase wurde weiterverwendet und mit einem halben Volumen Chloroform behandelt und wiederholt zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase mit 80 %-igen Ethanol bei -20 °C für 60 min gefällt. Des Weiteren wurden die Proben mit 80 %-igen Ethanol gewaschen. Die isolierte DNA wurde mit 50 µg RNase für 15 min bei 37 °C inkubiert, mit einem Volumenanteil Phenol/Chloroform versetzt und anschließend mit einem Volumenanteil Chloroform aufgereinigt. Die obere Phase wurde mit zwei Volumenanteilen 80 %-igen Ethanol unter Zugabe von 40 µl 3 M Na-Acetat (pH 6) für 60 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach Fällung der genomischen DNA wurde sie bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert und in 500 µl 1x TE-Puffer aufgenommen. Bei schlechter Löslichkeit der Pellets wurde die Chloroform Behandlung wiederholt.

2 %-ige CTAB-Lösung

CTAB	10 g
CTAB in 15 ml dest.H₂O bei 65 °C lösen	
NaCl	1,4 M
Tris HCl (pH 8,0)	100 mM
EDTA	20 mM

10x TE-Puffer

EDTA 0,5 M; pH 8	20 ml
Tris 1 M; pH 7,5	100 ml
add dest.H ₂ O	1000 ml

1x TE-Puffer

10x TE-Puffer	100 ml
add dest.H ₂ O	900 ml

Polymerasekettenreaktion

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde unter Verwendung genspezifischer Primer DNA-Fragmente amplifiziert. Der Standard PCR Ansatz zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde, wie folgt zusammengesetzt: Zu 5 µl 1x Taq Master Mix der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland). Durch die Verlängerung der Elongationszeit produziert die Taq-Polymerase überhängende Adenin-Reste. Diese macht man sich bei der Ligation zu Nutze. Zur Behebung der natürlichen Fehlerrate der Taq-Polymerase wurden dem Standard PCR-Ansatz 0,1 µl Elongase[®]-Enzym-Mix der Firma Invitrogen (Schwerte, Deutschland) zugesetzt. Je Primer wurden 5 pmol µl⁻¹ eingesetzt, sowie 1 µg Template-DNA. Das Gesamtvolumen der PCR-Ansätze betrug 10 µl. Die Phusion[™]-Polymerase der Firma NewEnglandBiolabs (Frankfurt am Main, Deutschland), wurde zur Amplifikation von DNA Fragmenten ab einer Größe von 2 kb verwendet. Der PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl setzte sich wie folgt zusammen: 5x Phusion[™] Puffer, 100 µM je dNTP, 0,5 µM je Primer, 3 % DMSO, 0,002 U/µl Phusion[™]-Polymerase, 1 µg Template-DNA. Bei Abweichungen vom beschriebenen Vorgehen ist dies ausdrücklich in der Arbeit erwähnt. Die verwendeten PCR-Programme sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8 Verwendete PCR-Programme zur Amplifikation verschiedener Gene

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklus
Amplifizierung von <i>slI1526</i>, <i>slI0470</i>, Δ<i>slI8009</i>			
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C	
Denaturierung	10 sec	95 °C	
Annealing	30 sec	56 °C	27 x + 3 sec
Elongation	30 sec	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	
Amplifizierung von <i>slI8009</i>, <i>aphII</i>			
Initiale Denaturierung	2 min	95 °C	
Denaturierung	15 sec	95 °C	
Annealing	30 sec	52 °C	9 x
Elongation	2 min	72 °C	
Denaturierung	15 sec	95 °C	
Annealing	30 sec	52 °C	19 x + 20 sec
Elongation	2 min	72 °C	
Finale Elongation	7 min	72 °C	
Amplifizierung von <i>slr6095</i>, Δ<i>slr6095</i>, <i>slr6050</i>, Δ<i>slI0729</i>, Δ<i>slI0729::slI0729</i>, Δ<i>slI0729::ssl1378</i>			
Initiale Denaturierung	2 min	95 °C	
Denaturierung	15 sec	95 °C	
Annealing	30 sec	52 °C	9 x
Elongation	4 min	72 °C	
Denaturierung	15 sec	95 °C	
Annealing	30 sec	52 °C	19 x + 20 sec
Elongation	4 min	72 °C	
Finale Elongation	7 min	72 °C	

Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe fand mittels Agarosegelelektrophorese statt. Die angelegte Stromstärke wurde in Abhängigkeit von Gelgröße, Agarkonzentration und Fragmentgröße gewählt und betrug zwischen 55 V – 110 V. Um die DNA-Fragmente visuell sichtbar zu machen, wurde dem in 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) erhitzt und anschließend auf ca. 60 °C abgekühlten 0,8 %-igen Agarosegel 0,005 % [v/v] Ethidiumbromid zugesetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und kann unter UV-Licht visualisiert werden, da Ethidiumbromid bei 254-366 nm angeregt wird und bei 590 nm emittiert. Die DNA-Proben wurden mit 5 % [v/v] Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen gegeben. Mit Hilfe der mitgeführten Marker der Firma Fermentas (Lambda DNA EcoRI + HindIII Marker, 1 kb Ladder) konnten DNA-Fragmente nach ihrer Größe bestimmt werden.

50x TAE

Tris	242 g
reine Essigsäure	57 ml
EDTA, 5 M, pH 8,0	100 ml
add _{dest.} H ₂ O	1000 ml

1x TAE

50x TAE	20 ml
add _{dest.} H ₂ O	980 ml

DNA Elution aus Agarosegelen

Das Kit PCR clean-up Gel extraction der Firma Marchery und Nagl wurde verwendet um DNA aus 0,8 %-igen oder 1 %-igen Agarosegelen zu eluieren. Die Gelelution erfolgte nach Herstellerangaben und die eluierte DNA wurde entweder direkt für PCR oder Ligation eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

Klenow-Fragment

Nach der Restriktion entstandene DNA-Fragmente mit 5'-Überhang wurden, mittels Klenow-Fragment aufgefüllt, um das erzeugte Fragment über blunt end Ligation in den Zielvektor zu klonieren. Das Herstellerprotokoll wurde (Thermo Fisher Scientific) verwendet und die Reaktion wurde durch Inkubation bei 75 °C für 10 min abgestoppt. Die erhaltenen DNA-Fragmente fanden direkte Anwendung in der Ligation, oder wurde bei -20 °C gelagert.

Ligation

Die Klonierung der mittels Standard-PCR amplifizierten PCR-Fragmente mit Adenin-Überhang in das pGEM®T-Vektorsystem (Promega) erfolgte nach Herstellerangaben. Das genutzte Vektorsystem lag linearisiert mit Thymin-Überhang vor. So konnten die mit Taq-Polymerase amplifizierten PCR-Fragmente direkt in den Vektor ligiert werden. Die Ligation von verifizierten Genen in Expressionsvektoren, erfolgte in einem 25 µl Ansatz mit 5 Units T4-DNA-Ligase und 10x Ligase Puffer. Das Verhältnis der eingesetzten Insert- zu Vektor-DNA lag bei 1:1 oder 2:1. Zur Klonierung der Promotoren (von *sll0470* und *sll1526*) für den Promotorgen Assay wurden die mutierten und natürlichen Promotoren *upstream* der *luxAB* Gene im *pilA* Vektorsystem (Kunert *et al.*, 2000) kloniert. Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend in *E. coli* transformiert.

Herstellung genetisch modifizierter Cyanobakterien

Genetisch modifizierte Cyanobakterien, wurden mittels Transformation und Konjugation erzeugt. Die natürliche Kompetenz von *Synechocystis* ermöglicht eine direkte Transformation der Zellen mit Fremd-DNA, ohne vorheriger Behandlung der Zellen. Für die Transformation wurde der japanische und der russische Wildtyp verwendet. Die 40 ml Kulturen wurden unter 5 % [v/v] CO₂ und bei 120 µmol Photonen · m⁻² · s⁻¹ kultiviert. Die

OD_{750nm} wurde auf 1 eingestellt und die Kulturen für weitere 4 h bei den angegebenen Bedingungen kultiviert. Im Anschluss wurden zu 500 µl Wildtyp-Kultur mit 1 µl, 3 µl oder 5 µl Plasmid-DNA zugegeben und bei Dunkelheit für 4 h bei 30 °C und 370 rpm inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde auf 40 ml Kobe-Platten ohne Zugabe von Antibiotika (AB) ausplattiert. Die Platten wurden bei 30 °C und PAR 40 µmol Photonen · m⁻² · s⁻¹ für 4 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit entsprechenden AB unterschichtet. Die erste AB-Behandlung wurde mit 50 % der Endkonzentration durchgeführt. Alle weiteren AB-Behandlungen wurden mit der Endkonzentration des entsprechenden ABs durchgeführt, bis die Zellen vollständig lysiert waren. Nach weiteren 4 bis 6 Tagen Inkubationszeit wurden einzelne Kolonien selektiert, kultiviert und hinsichtlich der eingebrachten Mutation via PCR und Restriktion untersucht. Die Mutante $\Delta sll0729$ wurde mit den Genen *sll0729* oder *ss1378* komplementiert. Dazu wurden die Gene in das Plasmid pVZ322 kloniert und über Konjugation in die Mutante $\Delta sll0729$ eingeführt. Die angewandte Klonierungsstrategie wurde in Hagemann *et. al.*, 2018 beschrieben.

Herstellung genetisch modifizierter *Escherichia coli*-Kulturen

Die Transformation von *E. coli* mit Plasmid DNA wurde auf Eis durchgeführt. Zu den kompetenten *E. coli* Zellen wurden vorsichtig und ohne mischen der gesamte Ligationsansatz gegeben. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 42 °C für 90 s einem Hitzeschock unterzogen. Im Anschluss wurden die Zellen für 7 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 700 µl SOC-Medium wurde der Transformationsansatz für 1 h kontinuierlich bei 37 °C und 370 rpm geschüttelt. Auf AXI-Platten wurden je 200 µl und 600 µl Transformationsansatz ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur Identifikation von Bakterien mit erfolgreich transformierten rekombinanten Vektorkonstrukten, wurde die Blau-Weiß-Selektion/ α -Komplementation verwendet. Das pGEM[®]T-Vektorsystem (Promega) enthält neben der Ampicillin Resistenzkassette, an der Multi Cloning Site (MCS) das Gen für β -Galactosidase (*lacZ*). Zur Induktion des *lac*-Promotors wurde den AXI-Platten Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) zugesetzt. Durch erfolgreiche Insertion des zu analysierenden DNA-Fragments kommt es zu einem frame shift im β -Galactosidase Gen. Der C-Terminus des α -Donor wurde somit inaktiv. Auch der verwendete bakterielle Wirt enthielt kein funktionsfähiges Gen für β -Galactosidase. Da so

die enzymatisch aktive Homotetramerform der β -Galactosidase nicht gebildet wurde, konnte die zugesetzte Galactosidase (X-Gal) nicht geschnitten werden. Daher wurden weiße Kolonien selektiert, die das rekombinante Vektorkonstrukt enthielten. Diese wurden anschließend auf frische AXI-Masterplatten vereinzelt. Angelegte flüssig Übernachten Kulturen wurden für die Präparation von Plasmid DNA verwendet.

AXI-Platten		SOC-Medium	
IPTG	50 mg/ml	20 %-ige Glukose	2 ml
X-Gal	40 μ g/ml	LB-Flüssigmedium	50 ml
Amp	100 μ g/ml		
LB-Agarplatten			

Plasmid-Minipräparation

Zur Isolation von Plasmid DNA wurde das NucleoSpin® Plasmid Kit von Macherey und Nagel verwendet. Die Isolation wurde entsprechend der Herstelleranweisung durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde entweder direkt für die Restriktion und SMRT-Sequenzierung verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Restriktionsverdau von DNA

Zur Überprüfung der transformierten DNA und der DNA-Methylierung verschiedener Mutanten, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Die Enzyme wurden entsprechend der Klonierungsstrategie oder der zu untersuchenden Methylierungsmotive gewählt. Bei der Restriktion von Plasmid DNA wurde der Ansatz 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe eines Stopp-Mix beendet. Genomische DNA wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Unter Verwendung der Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente aufgetrennt und hinsichtlich ihrer Größe untersucht.

Restriktionsansatz		Stopp-Mix	
10x Puffer	2,5 μ l	Tris-HCl pH 7,5	10 mM
Enzym	0,5 μ l	EDTA	1 mM
DNA	1,0 μ g	Glycerin	30,0 %
add _{dest.} H ₂ O	20 μ l	Bromphenolblau	0,2 %

Sequenzierung

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurden sie mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Die erstellten pGEM[®]T-Konstrukte wurden von der Firma Microsynth AG (Balgach, Schweiz), sequenziert und mittels BioEdit unter Zuhilfenahme des Sequence Alignment Explorers untersucht.

RNA- Isolation

Für die Isolation von RNA wurden 80 ml einer Kultur von *Synechocystis* auf 5 % [v/v] CO₂, bei 120 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 28 °C kultiviert und auf OD_{750nm} 1 eingestellt. Die Probennahme (drei technische Replikate mit je 20 ml Kultur) erfolgte auf Eis. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Den Zellpellets wurden 500 μl PGTX-Lösung (modifiziert nach Pino *et. al.*, 2009) zugesetzt und unter ständigen Schütteln gelöst. Bei 65 °C wurden die Proben für 15 min erhitzt und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 μl Chloroform wurden die Proben für 10 min bei RT und 6000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, erneut mit 500 μl Chloroform versetzt und zentrifugiert. Die in ein neues Eppendorfgefäß überführte obere Phase wurde mit 500 μl 4 °C kaltem Isopropanol bei -20 °C über Nacht gefällt. Die erhaltenen Proben wurden für 30 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 4 °C kaltem 75 %-igen Ethanol gewaschen. Das Ethanol wurde vorsichtig abgenommen und die Proben wurden unter der Clean Bench getrocknet. Die RNA wurde in 30 μl RNase freiem Wasser aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Die Intaktheit der RNA wurde mittels Formaldehydgelelektrophorese überprüft und für Microarray Analysen verwendet (Durchführung an der Universität Freiburg durch Dr. Stephan Klähn und Victoria Reimann).

PGTX-Lösung

8-Hydroxyquinoline	0,10 g
EDTA	0,58 g
Natriumacetat	0,80 g
Guanidinthiocyanat	9,50 g
Guanidinhydrochlorid	4,60 g
Aqua-Phenol	54,0 ml
Glycerol	6,9 ml
add _{dest.} H ₂ O	100 ml

Formaldehydgelelektrophorese

Die Auftrennung der RNA erfolgte im Formaldehyd-Gel. Zur Herstellung des Formaldehyd-Gels wurden 1,3 g Agarose mit 10 ml 10x MOPS und 73 ml _{dest.}H₂O vermischt und erhitzt. Nach dem aufkochen wurden 17 ml Formaldehyd dazugegeben und das Gel wurde zügig gegossen. Zur Aufbereitung der RNA Proben wurden 2 µg RNA mit 21 µl Denaturierungslösung versetzt und für 10 min bei 68 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben für 5 min auf Eis inkubiert und auf das Formaldehyd-Gel aufgetragen. Die Proben wurden über 4 h im Formaldehyd-Gel bei 80 V in 1x MOPS-Laufpuffer (1:10, 10x MOPS in _{dest.}H₂O) aufgetrennt. Intakte RNA wurde für Microarray Analysen verwendet. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

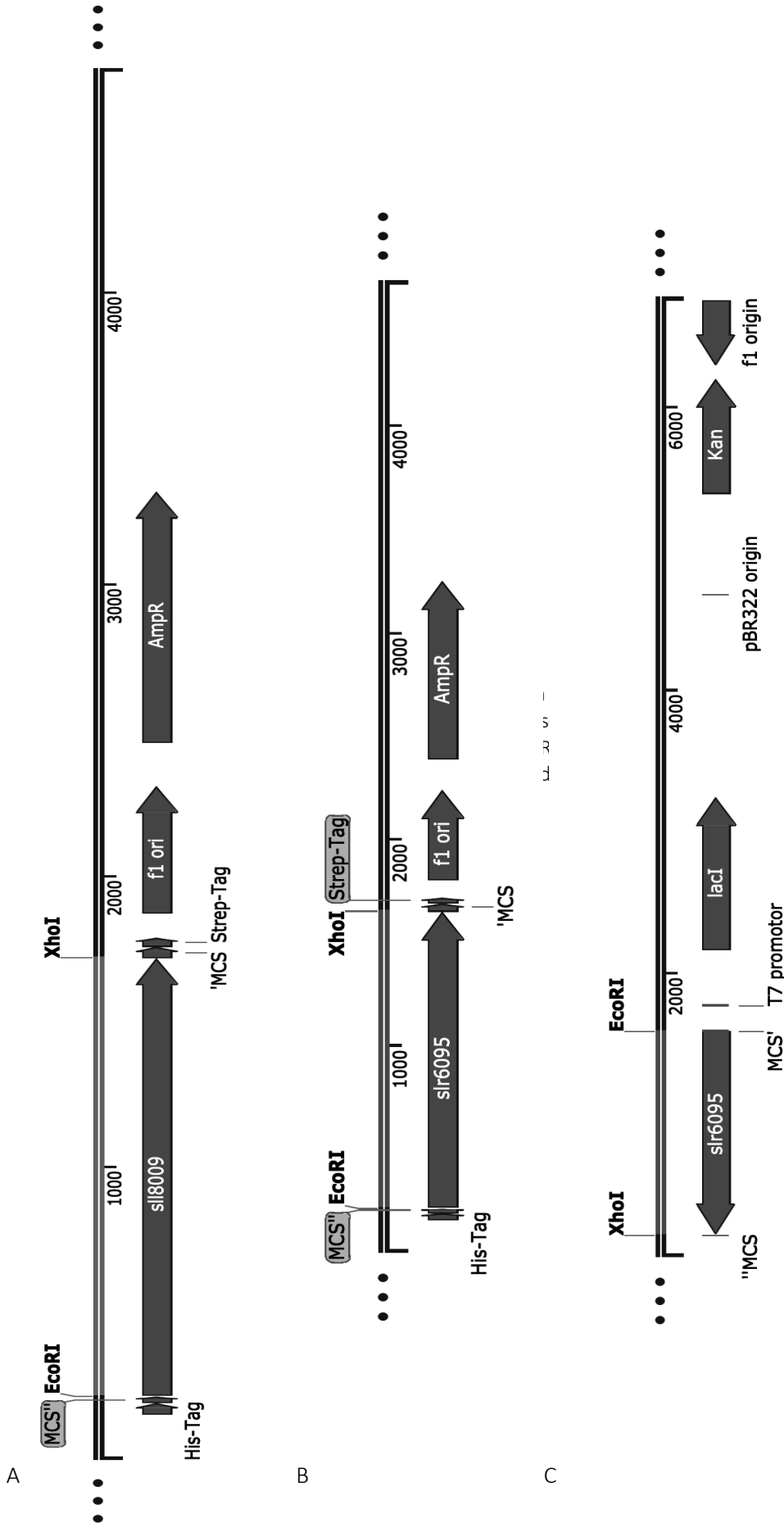
10x MOPS Puffer		Denaturierungslösung	
Na-Acetat	50 mM	10xMOPS	2,5 µl
MOPS	200 mM	Formamid	12,5 µl
EDTA	10 mM	Formaldehyd	4,0 µl
add _{dest.} H ₂ O	1000 ml	Ethidiumbromid	0,5 µl
pH 7,0		6x Ladepuffer	1,5 µl

Expression rekombinanter Proteine

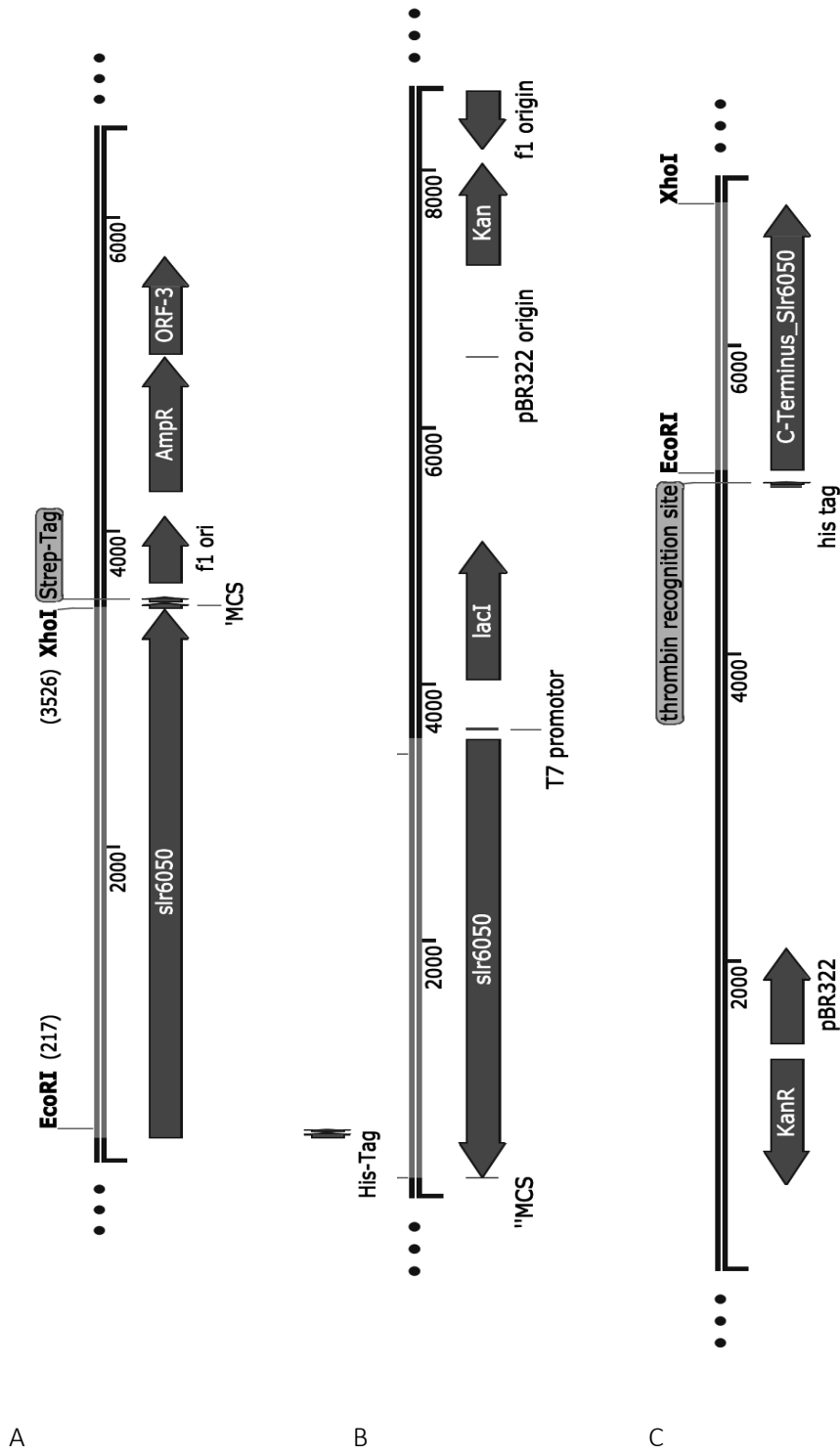
Die Expression von *Synechocystis* Protein erfolgte in *E. coli*. Dazu wurden spezifische Primer der putativen Methyltransferase Gene abgeleitet und mittels PCR amplifiziert. Die Gensequenz wurde in pGEMT über eingebrachte Restriktionsschnittstellen kloniert und in *E. coli* transformiert. Über Sanger-Sequenzierung wurden die Konstrukte sequenziert und kontrolliert. Anschließend wurden die Konstrukte in einen Expressionsvektor (pET-28a, pASK-IBA43plus) kloniert und in BL21-Gold (DE3) transformiert. Durch die Zugabe von IPTG oder Anhydrotetracyclin Hydrochlorid (AHT) wurde die Expression angeregt. Die Bildung eines His-Tag-Fusionsprotein, ermöglichte die Aufreinigung der Proteine über Affinitätschromatographie.

Zur heterologen Expression wurde eine 5 ml *E. coli* Übernachtskultur, aus positiv selektierten Klonen angelegt und bei 37 °C und 370 rpm mit spezifischem Antibiotikum kultiviert. In einem 500 ml Schikanekolben wurden 200 ml LB-Medium und 1 ml der *E. coli* Übernachtskultur gefüllt und bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,8 bei 37 °C und 370 rpm kultiviert. Als nicht induzierte Probe wurde 1 ml dieser Kultur nach dem Erreichen der

OD_{600nm} 0,8 entnommen, bei 13.000 rpm zentrifugiert, mit 100 µl Homogenisationspuffer versetzt und bei 4 °C gelagert. Die Kultur wurde unter Verwendung von 1 mM IPTG (pET-28a) oder 200 µg l⁻¹ AHT (pASK-IBA43+) induziert und für weitere 4 h inkubiert. Die Probennahme der induzierten Probe erfolgte wie für die nicht induzierte Proben beschrieben. Nach der Probennahme wurde die gesamte Bakterienkultur in Zentrifugenbecher überführt und für 15 min, bei 4 °C und 9.000 rpm abzentrifugiert (Sorval-Zentrifuge, SLA-3000 Rotor). Alle nun folgenden Arbeitsschritte fanden auf Eis statt. Der Kulturüberstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml Homogenisationspuffer gelöst. Die Bakterien wurden durch Ultraschallbehandlung (4x 30 sec) lysiert und erneut für 15 min, bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert, um die löslichen Proteine von sedimentierenden Zelltrümmern zu separieren. Das Lysat mit einem Volumen von 100 µl wurde abgenommen und bei 4 °C gelagert. Das Pellet wurde in 100 µl Homogenisationspuffer resuspendiert und bei 4 °C gelagert. Die Proben wurden für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet oder für spätere Verwendung bei -20 °C gelagert.



verwendeten forward Primer wurde die Sequenz von slr6095 in pIB43plus kloniert. Zur Expression von Slr6095



ndeten *forward* Primer wurde die Sequenz für die
 estriktionsschnittstellen in pASK-IBA43plus (A) und

Affinitätschromatografie

Als chromatografisches Trennverfahren zur Aufreinigung von Proteinen wurde die Affinitätschromatografie verwendet. Durch die Klonierung des codierenden Bereichs einer putativen Methyltransferase in einen Expressionsvektor (pET-28a, pASK-IBA43+), wurde ein Fusionsprotein mit His-Tag erzeugt. Die Aufreinigung des Fusionsproteins fand mittels Affinitätschromatografie unter Verwendung einer Nickel-NTA-Matrix statt. Die verwendeten Säulen PDmidi Trap G-25 der Firma GE Health wurden wie folgt vorbereitet: 2 ml Säulenmatrix wurden in eine leere Säule gegeben. Nachdem der in der Matrix enthaltene Ethanol durch die offene Säule abgelaufen war, konnte sich die Matrix absetzen. Diese wurden anschließend drei Mal mit 5 ml Homogenisierungspuffer equilibriert. Das Lysat wurde aufgetragen und mit Waschpuffer drei Mal gewaschen. Die Proteine wurden unter Verwendung von Elutionspuffer eluiert und anschließend im SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese hinsichtlich der Reinheit überprüft. Die Eluate wurden mit 20 % Glycerol versetzt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Homogenisierungspuffer		Waschpuffer		Elutionspuffer	
Phosphatpuffer	20 mM	Phosphatpuffer	20 mM	Phosphatpuffer	20 mM
NaCl	500mM	NaCl	500 mM	NaCl	500 mM
	pH 7,8	Imidazol	75 mM	Imidazol	300 mM
			pH 7,8		pH 7,8

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe, erfolgte über die diskontinuierliche denaturierende SDS-Page (Laemmli 1970). Die Proteinproben und der verwendete Proteinmarker (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas), wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit 3x Laemmli-Lösung versetzt und bei $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder direkt auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Rezeptur für zwei SDS-Gele ist nachfolgend zusammengefasst. Die Konzentrierung der Proteine erfolgte für 30 min, bei 70 V im Sammelgel. Die Auftrennung erfolgte für 1,5 h bei 130 V. Verwendet wurde ein 10x Laufpuffer welcher in einem Liter $\text{dest. H}_2\text{O}$ 15 g Tris, 72 g Glycin und 10 g SDS enthält.

SDS-Polyacrylamidgel			3x Laemmli-Lösung	
Detergenz	Trenngel	Sammelgel		
Acrylamid/ BIS (37,5/1)	4,00 ml	0,975 ml	Tris HCl 0,5 mM (pH6,8)	18,0 ml
dest.H ₂ O	3,35 ml	2,725 ml	Glycerol (68 %)	14,4 ml
1,5 M TrisHCL (pH 8,8)	2,50 ml	-	2-β-Mercaptoethanol	7,2 ml
0,5 M TrisHCL (pH6,8)	-	1,250 ml	Bromphenolblau 1 %	7,2 ml
10 % SDS	100 µl	50 µl	SDS	2,88 g
10 % Ammoniumpersulfat	70 µl	30 µl	add dest.H ₂ O	1,2 ml
TEMED	5 µl	5 µl		

Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung der SDS-Polyacrylamid-Gele, erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld. Dazu wurden die Gele aus den Glaträgern herausgelöst und mit Coomassie-Brillant Blau R-250-Farblösung für 1 h gefärbt. Mittels Entfärberlösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure) wurde überschüssiges Coomassie gelöst und die Proteinbanden wurden deutlich erkennbar. Im Anschluss wurde das Gel mit dest.H₂O gespült, in eine Folie eingeschweißt und zur weiteren Auswertung eingescannt.

Coomassie-Brillant Blau R-250-Farblösung	
Coomassie-Brillant Blau R-250	0,5 g
Methanol	250 ml
Essigsäure (100 %)	50 ml
add dest.H ₂ O	200 ml

Western-Blot

Zur spezifischen Detektion von Proteinen, nach deren Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel, wurden Western-Blot Untersuchungen durchgeführt. Zwei mit Semi-Dry Puffer durchnässte Schichten Whatman Papier, wurden auf den Blotter gelegt. Darauf folgte eine angefeuchtete Nitrozellulosemembran (Protran Premium 0,45 Nitrozellulose, Satorius), das Gel und zwei weitere mit Semi-Dry Puffer benetzte Schichten Whatman Papier. Nach der Entfernung von Luftbläschen erfolgte der Blot für 70 min bei 1 mA pro cm² Gel. Im Anschluss wurde die Membran kurz in _{dest.}H₂O gewaschen und die Übertragung der Proteine auf die Membran mittels Ponceau-S Färbung überprüft. Die Membran wurde durch waschen in 1x TBS entfärbt. Für den immunologischen Nachweis wurde die Membran für 30 min in 5 %-iger Magermilch geblockt und anschließend mit dem Anti-His-HRP Antikörper (1:10000), der Firma Miltenyi Biotec GmbH, oder dem Topoisomerase Antikörper der Firma BaseClear über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal mit 1x TBS für je 10 min gewaschen. Die Nachweisreaktion fand unter Verwendung der ECL-Reagenzien statt. In einem Verhältnis von 1:1 wurden die Lösungen 1 und 2 gemischt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde in eine Klarsichtfolie überführt, eingeschweißt und in eine Entwicklungskassette gelegt. In der Dunkelkammer fand bei Raumtemperatur und Rotlicht die Entwicklung auf einen Röntgenfilm statt. Dazu wurde ein Film für 5 min auf die Membran gelegt. Der Film wurde für 30 sec in die Entwicklungslösung überführt, mit Wasser gewaschen und anschließend in die Fixierlösung überführt und wiederholt in Wasser gewaschen. Die Membran wurde mit _{dest.}H₂O gewaschen, mit 1x TBS gespült und bei 4 °C im gelagert.

ECL-Lösung 1

Luminol	2,5 mM
p-Coumaric Acid	400 µM
Tris-HCL (pH 8,5)	100 mM

ECL-Lösung 2

H ₂ O ₂	5,4 mM
Tris-HCL (pH 8,5)	100 mM

1x TBS

Tris	24,3 g
NaCl	80,0 g
add _{dest.} H ₂ O	1000 ml

Semi-Dry Puffer

Tris	58,0 g
Glycin	29,0 g
SDS	3,7 g
add _{dest.} H ₂ O	1000 ml

Ponceau-S Färbung

Ponceau S	0,06 g
Essigsäure (5 %)	3 ml
add _{dest.} H ₂ O	60 ml

3.2.4 Bioinformatik

Unter Verwendung von Rebase wurden annotierte putative Methyltransferasen identifiziert. Alle Mutationskonstrukte wurden mit der Software Clone Manager Suite 7 und Artemis erstellt. Die verwendeten DNA und Proteinsequenzen wurden im Zeitraum 2015-2018 der Homepage <http://genome.microbedb.jp/cyanobase/> entnommen (http://genome.microbedb.jp/cyanobase/GCA_001318385.1). Weitere Analysen (BlastP), wurden mittels NCBI GenBank Datenbank durchgeführt. Die Sanger-Sequenzierungen wurden mit der Software BioEdit, unter Zuhilfenahme des Sequence Alignment Explorers analysiert und ausgewertet.

3.2.5 Zusätzliche Methoden durchgeführt in anderen Arbeitsgruppen

Zur Untersuchung der Methylierungsmotive von *Synechocystis* 6803 und den Mutanten $\Delta sll0729$, $\Delta slr6095$, $\Delta sll8009$ wurden SMRT- und Bisulfit-Sequenzierung am Max-Planck Genomzentrum, Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtung von PhD Janina Fuss und Dr. Bruno Heuttel durchgeführt. Die bioinformatische Analyse der Bisulfit-Sequenzierung fand zusätzlich an der Universität Freiburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang R. Hess statt. Die Kultivierung, die Probennahme und die Isolation hochmolekularer DNA wurde durch mich durchgeführt. Alle Transkriptomanalysen erfolgten mittels Microarray Analysen an der Universität Freiburg, durch die Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang R. Hess. Die bioinformatischen Analysen, sowie die DNase-Behandlungen der RNA wurden von Dr. Stephan Klähn und Victoria Reimann durchgeführt. Die Kultivierung, die Probennahme und die Isolation der RNA wurde von mir realisiert. Der DNA-Gehalt der *Synechocystis*-Kulturen (WT und $\Delta sll0729::supp_1$) wurden in Japan an der Universität für Agrarwissenschaften durch Dr. Satoru Watanabe mittels FACS Analysen analysiert. Das Proteom der WT, $\Delta sll0729::supp_1$, $\Delta sll0729::supp_15$ Kulturen wurde von Dr. Stephan Mikkat an der Universitätsmedizin Rostock, Proteomzentrum untersucht. Die Kultivierung und die Probennahme fand durch mich im Labor der Universität Rostock statt. Zur Untersuchung der Promotoraktivität von *sll0470* und *sll1526* wurden an der Universität Freiburg in der Arbeitsgruppe um Prof. Hess von Ingeborg Scholz Promotorgen Assays durchgeführt. Die Klonierungsstrategie und die Klonierung aller Promotorkonstrukte, wurde von mir durchgeführt.

4 Ergebnisse

Die Methylierung der DNA wird durch DNA-Methyltransferasen katalysiert. Neueste „omics“ Techniken, wie *single molecule real time sequencing* (SMRT-Sequenzierung) und Bisulfit-Sequenzierung ermöglichen es, vollständige Methylome, d.h. die Gesamtheit aller DNA-Metylierungen eines Organismus, zu charakterisieren. Trotz dieser technischen Möglichkeiten ist aktuell die biologische Funktion der DNA-Methylierung in Prokaryoten nur wenig erforscht. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst das Methylom des Modellstammes *Synechocystis* sp. PCC 6803 (wird im Folgenden als *Synechocystis* 6803 bezeichnet) charakterisiert und danach die Methyltransferasen identifiziert, sowie die Funktion der DNA-Methylierung untersucht.

4.1 Analyse des Methyloms von *Synechocystis* 6803

Über Bisulfit-Sequenzierung und SMRT-Sequenzierung konnten das vollständige Methylom von *Synechocystis* 6803 identifiziert werden. Es beinhaltet fünf spezifische Methylierungsmotive von DNA-Methyltransferasen, die mit unterschiedlicher Häufigkeit im Genom vertreten sind. Abbildung 9 zeigt die Verteilung der fünf Methylierungsmotive im gesamten Chromosom von *Synechocystis* 6803. Zwei Methylierungsmotive ($G^{m6}ATC$, $m^5CGATCG$) wurden bereits zuvor beschrieben und ihre korrespondierenden DNA-Methyltransferasen wurden identifiziert (Scharnagl *et. al.*, 1998). In der Arbeit von Scharnagl *et. al.* wurde angenommen, dass das erste Cytosin im Motiv $m^5CGATCG$, durch eine C^5 -Methylierung modifiziert wird, da Sequenzvergleiche ähnliche DNA-spezifische Methyltransferasen mit dieser Methylierung identifiziert wurden. Mittels Bisulfit-Sequenzierung konnte im Rahmen dieser Arbeit nun experimentell belegt werden, dass tatsächlich das erste Cytosin im Methylierungsmotiv C^5 -methyliert ist. Es konnte gezeigt werden, dass das Motiv zu 80 % - 100 % im Genom von *Synechocystis* 6803 methyliert vorliegt (Abbildung 10). Insgesamt wurde das Motiv $m^5CGATCG$ 10236 Mal im gesamten Genom nachgewiesen.

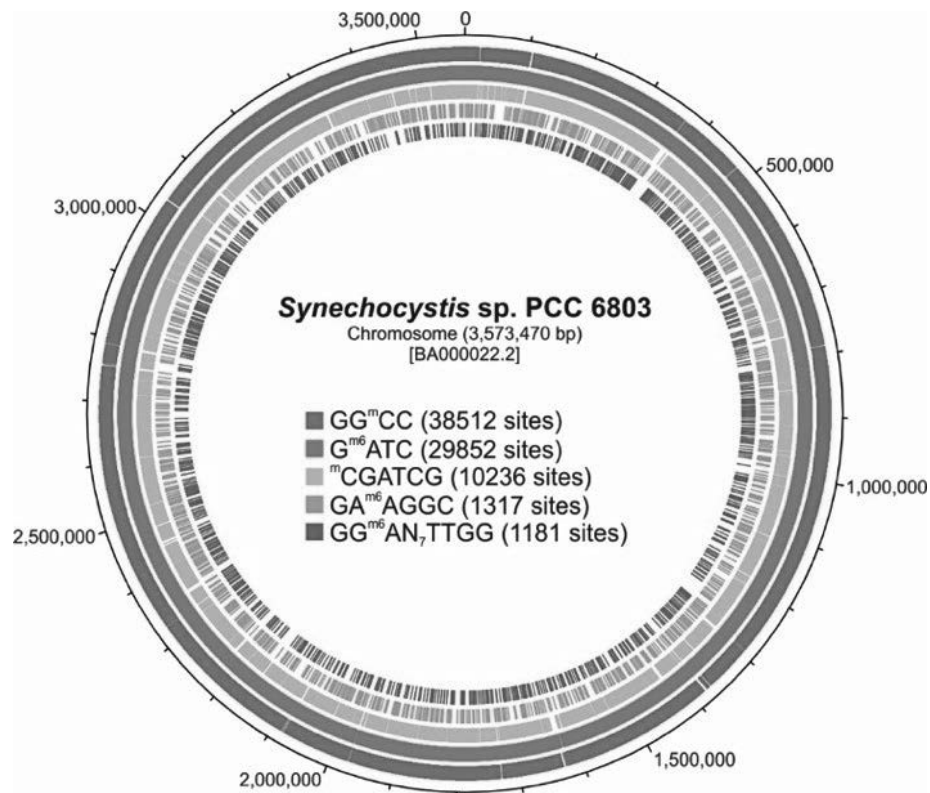


Abbildung 9 Methylom von *Synechocystis* 6803.

Mittels SMRT-Sequenzierung wurden fünf Methylierungsmotive identifiziert. Diese kommen in unterschiedlicher Frequenz auf beiden Strängen des Chromosoms vor. Die Sequenzanalyse fand im Max Planck Institute für Pflanzenzüchtungsforschung (Köln) statt. Die graphische Darstellung wurde durch Dr. Stephan Klähn (Universität-Freiburg) realisiert.

Als drittes Motiv konnte das Palindrom GGCC identifiziert werden. Das Motiv GG^{m⁴}CC kommt mit 38512 Methylierungsmotiven am häufigsten im Genom bzw. Methylom von *Synechocystis* 6803 vor. Durch eine N⁴-Cytosin-Methylierung wird das erste Cytosin innerhalb des Motivs modifiziert.

Weiterhin wurde das Motiv GAAGGC als Ziel von Methylierungsaktivität im Genom von *Synechocystis* 6803 nachgewiesen. Innerhalb des Methylierungsmotivs GA^{m⁶}AGGC wird das zweite Adenin durch eine putative N⁶-Adenin Methyltransferase methyliert.

Als fünftes Motiv wurde GG^{m⁶}AN₇TTGG gefunden, das im Gegensatz zu den anderen Methylierungsmotiven nicht als Palindrom im Genom von *Synechocystis* 6803 vorkommt. Eine Sequenz mit sieben variablen Basen folgt nach dem modifizierten N⁶-Methyladenin an Position drei innerhalb des Methylierungsmotivs. Mit 1181 Methylierungsmotiven kommt dieses Methylierungsmotiv mit der geringsten Häufigkeit im Genom von *Synechocystis* 6803 vor.

Die Charakterisierung des Methyloms mittels SMRT-Sequenzierung von *Synechocystis* 6803 zeigt, dass es mindestens fünf Methylierungsmotive gibt, die sowohl N⁶-Adenin-Methylierung als auch C⁵-Methylierung und N⁴-Cytosin-Methylierung beinhalten können.

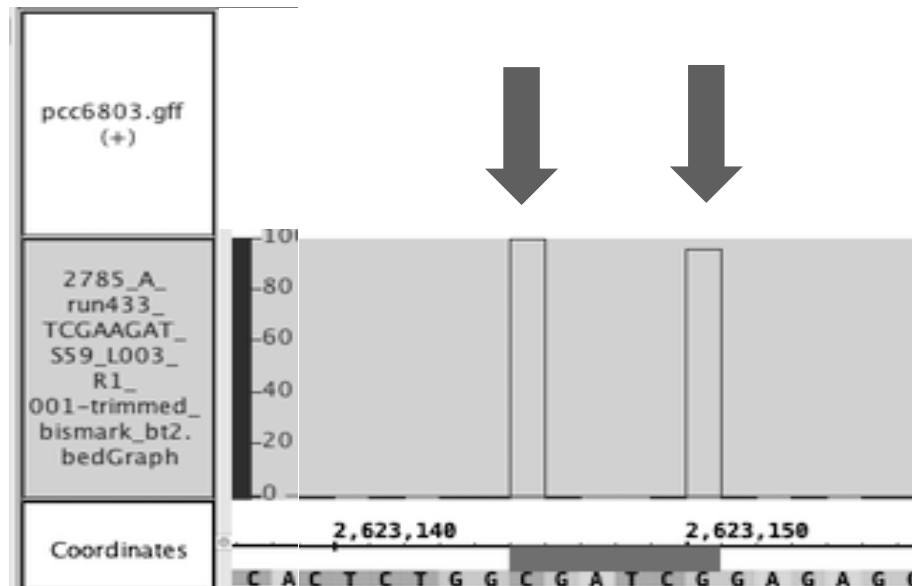


Abbildung 10 Methylierung des ^{m5}CGATCG Motivs.

Das Motiv ^{m5}CGATCG wird in *Synechocystis* 6803 bis zu 100 % methyliert. Die roten Pfeile zeigen die methylierten Positionen beider DNA-Stränge (Cytosin).

4.2 Identifikation von DNA-Methyltransferasen in *Synechocystis* 6803 Mutation von putativen DNA-Methyltransferasegenen

Die identifizierten Methylierungsmotive wurden *in silico* durch REBASE (*The Restriction Enzyme Database*) untersucht. REBASE ist eine Datenbank, die Informationen über Restriktionsenzyme und DNA-Methyltransferasen zur Verfügung stellt. In dieser Arbeit wurden durch REBASE Informationen über Methylierungsmotive und Methylierungsspezifität von DNA-Methyltransferasen und Restriktionsschnittstellen gewonnen. Vier annotierte Methyltransferasen konnten so als Kandidaten für die detektierten Methylierungsmotiven aus *Synechocystis* 6803 identifiziert werden. Anschließend konnte unter Verwendung des BlastP Algorithmus in den Datenbanken UniProt und Cyanobase Gene ermittelt werden, die für putative DNA-Methyltransferasen kodieren. Neben den bereits nachgewiesenen DNA-Methyltransferasen M.Ssp6803I und M.Ssp6803III (Scharnagl *et. al.*, 1998) gehören dazu die Gene *sll0729* (annotiert als

modification methylase), *sll8009* (annotiert als *type I restriction-modification system*), *slr6050* (Slr6050 Protein) und *slr6095* (annotiert als *type I restriction-modification system*), die aufgrund ihrer Annotierung als Kandidaten für putative DNA-Methyltransferasen in Frage kommen. Um deren Spezifität zu verifizieren und den Einfluss eines Defektes der putativen DNA-Methyltransferasen zu untersuchen, wurden Mutationen im *open reading frame* (ORF) dieser Gene eingeführt. In Abbildung 11 und Abbildung 12 sind die Klonierungsschemata und die Genotypisierungen der erzeugten Mutanten dargestellt.

Zunächst wurden unter Verwendung Gen-spezifischer Primer, die Kandidaten-Gene aus der *Synechocystis* WT DNA amplifiziert und in das pGEMT Vektor-System kloniert. Wie in Abbildung 11 oder Abbildung 12 dargestellt, fand die Insertion einer Kanamycin Resistenzkassette (*aphII* Gen, dunkel lila Pfeil km^R) über spezifische Restriktionsschnittstellen statt. Plasmid-DNA dieser Konstrukte wurde aus *E. coli* isoliert und in *Synechocystis* 6803 transformiert. Kanamycin-resistente Kolonien wurden auf Festmedium selektiert und kultiviert. Der Genotyp vollständig segregierter Mutanten wurde mittels PCR und Agarosegelelektrophorese nachgewiesen. Die Mutante $\Delta sll0729$ stand zu Beginn dieser Arbeit bereits zur Verfügung. Zur Vollständigkeit ist das Klonierungsschema in Abbildung 11 A dargestellt. Bei der Genotypisierung (verwendete Primer *sll0729* fw/rev) wurde für die Mutante $\Delta sll0729$ ein Fragment bei ca. 3 kb nachgewiesen (Abbildung 11 B), wogegen das WT-Fragment mit einer Größe von ca. 2 kb in der Mutante nicht nachgewiesen werden konnte. Daher wurde davon ausgegangen, dass diese Mutante keine Kopien des WT Chromosoms enthält und somit vollständig segregiert vorlag.

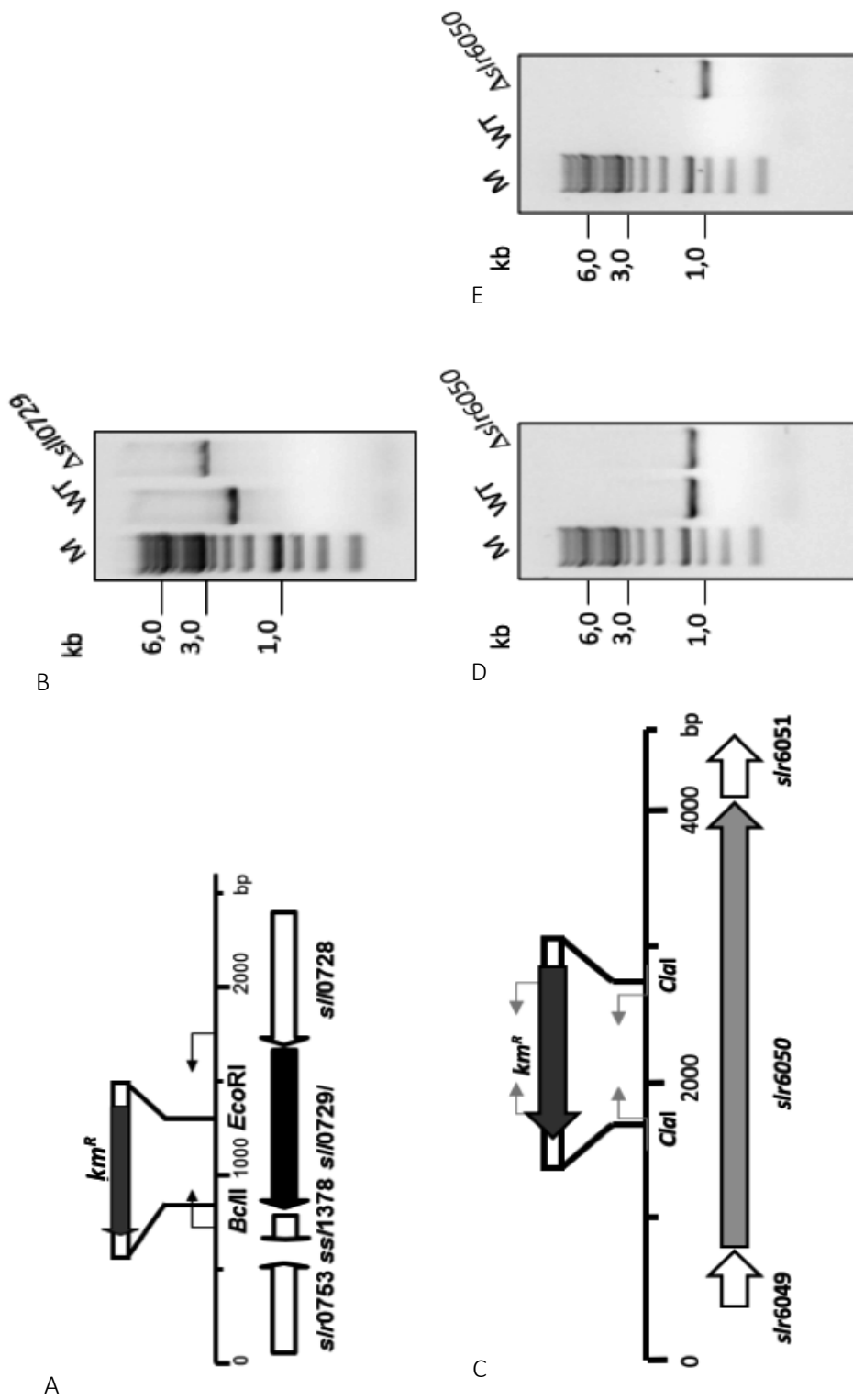
Das Klonierungsschema in Abbildung 11 C zeigt, dass die Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette mit einer Deletion von *slr6050* über die Restriktionsschnittstelle *Clal* verbunden war. Da das deletierte Fragment aus *slr6050* (ca. 930 bp) und die inserierte Kanamycin-Resistenzkassette (ca. 950 bp) eine ähnliche Größe besitzen, konnten unter Verwendung der genflankierenden Primer (Primer *slr6050* fw/rev) keine Rückschlüsse über die Segregation der Mutante gezogen werden. Es wurden Primer synthetisiert, die innerhalb des in der Mutante deletierten Bereiches von *slr6050* binden (*slr6050* fw_i/rev_i). Wie in Abbildung 11 D zu erkennen ist, konnte unter Verwendung dieser Primer ein ca. 910 bp großes Fragment für WT und $\Delta slr6050$ amplifiziert werden. Zusätzlich konnte unter Verwendung spezifischer Primer für das *aphII* Gen ein 950 bp großes Amplifikat für die $\Delta slr6050$ Mutante nachgewiesen werden (Abbildung 11 E). Trotz der Kultivierung der

$\Delta slr6050$ Mutante über mehrere Generationen mit zunehmender Antibiotikakonzentration, konnte keine vollständig segregierte Mutante erzeugt werden. Dieser Befund weist daraufhin, dass *slr6050* essentiell für die Vitalität von *Synechocystis* 6803 ist. Auch konnte trotz vielseitiger Klonierungs- und Expressionsstrategien das *codon* optimierte *slr6050* Gen nicht in *E. coli* exprimiert werden.

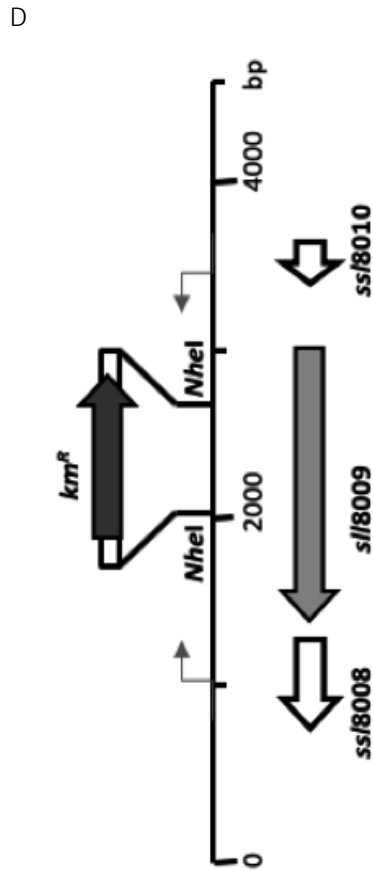
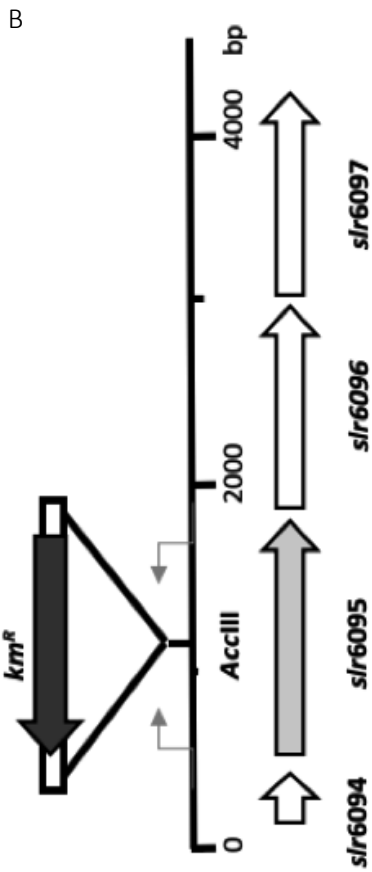
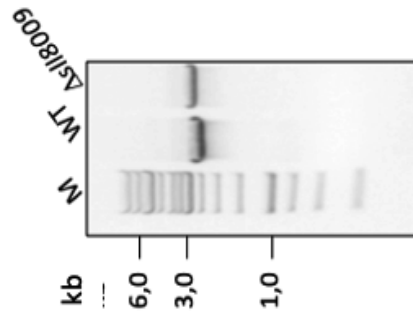
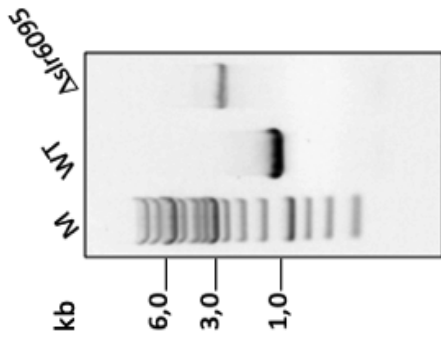
Über die Restriktionsschnittstelle *AccIII* wurde *slr6095* durch Insertion des *aphII* Gens inaktiviert (siehe Abbildung 12 A). Wie in Abbildung 12 B zu erkennen ist, konnte für die Mutante ein um das inserierte *aphII* Gen vergrößertes PCR Fragment (ca. 2,4 kb) amplifiziert werden, während das WT-Gen nicht auftrat. Die Mutante $\Delta slr6095$ lag somit vollständig segregiert vor.

Wie in Abbildung 12 C schematisch dargestellt, wurde das Gen *sll8009* über *NheI* deletiert. Die amplifizierten PCR-Fragmente der $\Delta sll8009$ Mutante (ca. 3 kb) und des WT (ca. 2,6 kb) wurden mittels Agarosegelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Das nachgewiesene Fragment der $\Delta sll8009$ Mutante ist im Vergleich zum WT um die inserierte Kanamycin-Resistenzkassette vergrößert (siehe Abbildung 12 D). Da auch in dieser Mutante kein WT spezifisches Fragment detektiert werden konnte, wurde davon ausgegangen, dass $\Delta sll8009$ vollständig segregiert vorlag.

Zusammenfassend konnten drei vollständig segregierte Mutanten in Genen für DNA-Methyltransferasen erzeugt werden, die im Folgenden mittels SMRT-Sequenzierung untersucht wurden. Die $\Delta slr6050$ Mutante wurde in den nachfolgenden Analysen nicht weiter betrachtet, da keine vollständig segregierte Mutante erzeugt werden konnte.



erzeugter Mutanten in putativen DNA-Methyltra...
 : Antibiotika Resistenzkassette (*aphII* Gen, als...
 ung der amplifizierten Fragmente aus WT und...
 g von Δ *sir6050*. Deletion innerhalb des ORF's...
 /types der Δ *sir6050* Mutante, sind mit blauen Pfei...
 roßes Fragment aus WT und Δ *sir6050* DNA. D...
 e (*aphII* Gen) unter Verwendung der Primer ap...
 n der Mutante Nachgewiesen werden.



typisierung erzeugter Mutanten in putativen DNA-Methyltr...
 e. Insertion von km^R (dunkel lila Pfeil), über die Restriktions...
 (blaue Pfeile).
 95 Mutante. Mittels PCR wurde DNA des WT und der...
 /r6095 amplifiziert und durch Agarosegelelektrophorese...
 ante $\Delta slr8009$. Übersicht des genetischen Locus von $slr8009$...
 sowie der inserierten Kanamycin-Resistenzkassete (km^R , lil...
 ?) entsprechend ihrer Größe im Agarosegel. Nachweis d...

4.3 Spezifität von DNA-Methyltransferasen in *Synechocystis* 6803

Das Methyloem der Mutanten $\Delta sll0729$, $\Delta slr6095$ und $\Delta sll8009$ wurden im Folgenden untersucht. Es wurde erwartet, dass die Deletion der putativen DNA-Methyltransferasegene zur Aufhebung der spezifischen Methylierung in den Methylierungsmotiven führt. Aus allen Mutanten wurde mittels CTAB Methode hochmolekulare genomische DNA isoliert. Die isolierte gDNA wurde für SMRT-Sequenzierung verwendet. Die Tabelle 9 fasst die identifizierten Methyltransferasen und ihre Methylierungsmotive zusammen.

Die $\Delta sll0729$ Mutante zeigte in den SMRT-Sequenzierdaten keine Methylierung im Methylierungsmotiv GG^{m4}CC. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei Sll0729 um eine N⁴-Cytosin-Methyltransferase handelt, die die *core* Sequenz von GG^{m4}CC methyliert. Entsprechend der Nomenklatur wurde das Enzym M.Ssp6803II benannt. Als unabhängiger Nachweis über die Aktivität von M.Ssp6803II wurde die klassische Restriktionsanalyse durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym die DNA vor dem Abbau durch Restriktionsenzyme (*HaeIII*, *EaeI*, *ApaI*), die spezifisch für das Motiv GGCC sind, schützt (Abbildung 23).

Die Methylierung des Motivs GG^{m6}AN₇TTGG konnte in der Mutante $\Delta slr6095$ nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei Slr6095 um eine N⁶-Adenin-Methyltransferase handelt, die das Motiv GG^{m6}AN₇TTGG/CCA^{m6}AN₇TCC methyliert. Entsprechend der Nomenklatur wurde das Enzym M.Ssp6803V benannt. Der klassische Restriktionsansatz, zur Untersuchung der Methyltransferase Aktivität von Slr6095 konnte nicht durchgeführt werden, da es keine spezifischen Restriktionsenzyme für das Motiv GG^{m6}AN₇TTGG/CCA^{m6}AN₇TCC gibt. Daher sollte ein Methyltransferase Assay durchgeführt werden. Dieses Assay nutzt die Abhängigkeit der aufgereinigten Methyltransferase von S-Adenosyl Methionin für die Methylierungsreaktion. So wird der Co-Faktor während der DNA-Methylierung zu S-Adenosinhomocystein und durch eine Reaktionskaskade zu einem Intermediat, dass mit dem Reagenz OxiRed reagiert. Das Reaktionsprodukt führt zu einer starken Absorption, die bei 570 nm gemessen werden kann. Daher wurde das 53,54 kDa große Protein Slr6095 rekombinant in *E. coli* exprimiert. Trotz verschiedener Klonierungs- und Expressionsstrategien konnte das Protein ausschließlich im Zellpellet nachgewiesen werden (siehe Anhang, Abbildung 42). Die Aktivität der putativen Methyltransferase konnte daher nicht analysiert werden.

Die SMRT-Sequenzierung zeigte keinen Unterschied im Methylierungsprofil zwischen WT DNA und Δ *sll8009* DNA. Es wurde geschlussfolgert, dass Sll8009 nicht an der Methylierung der DNA von *Synechocystis* 6803 beteiligt ist. Mittels Methyltransferase Assay sollte zusätzlich experimentell überprüft werden, ob Sll8009 inaktiv ist. Dazu wurde das 56,39 kDa große Protein rekombinant in *E. coli* exprimiert und mittels SDS-Gelelektrophorese entsprechend der Größe aufgetrennt. Trotz verschiedener Klonierungs- und Expressionsstrategien, konnte jedoch kein lösliches Protein exprimiert werden (siehe Anhang, Abbildung 43).

Die Ergebnisse der SMRT-Sequenzierung sind in der NCBI Datenbank (BioProject ID: PRJNA430784, BioSample: SAMN08378604, and SRA: SRS2844079) hinterlegt.

Tabelle 9 Übersicht der Methyltransferasen, ihrer Methylierungsmotive, kodierender Gene und erzeugter Mutanten aus *Synechocystis* 6803.

Gen	Mutante	Methylierungsmotiv	Methyltransferase	Funktion
<i>slr0214</i> [°]	Δ <i>slr0214</i> [°]	m ⁵ CGATCG	M.Ssp6803I [°]	DNA-Reparaturmechanismen
<i>sll0729</i>	Δ <i>sll0729</i>	GG ^{m4} CC	M.Ssp6803II	Regulation einzelner Gene, Chromosomenstabilität, DNA-Reparaturmechanismen, DNA-Replikation und Organisation
<i>slr1803</i> [°]	Δ <i>slr1803</i> ^{°*}	G ^{m6} ATC [°]	M.Ssp6803III [°]	-
<i>slr6050</i>	Δ <i>slr6050</i> ^{*+}	GA ^{m6} AGGC [*]	M.Ssp6803IV	-
<i>slr6095</i>	Δ <i>slr6095</i>	GG ^{m6} AN7TTGG	M.Ssp6803V	Verarbeitung genetischer Informationen
<i>sll8009</i>	Δ <i>sll8009</i>	-	Potentielle Methyltransferase	Nicht an detektierter DNA- Methylierung beteiligt

[°] beschrieben von Scharnagl *et. al.*, 1998; * nicht vollständig segregierte Mutante; + Methylierungs-Spezifität aus Sequenzähnlichkeit geschlussfolgert und nicht experimentell belegt

4.4 Physiologische Profile der Mutanten $\Delta sll8009$, $\Delta slr0214$ und $\Delta slr6095$

Um die physiologische Funktion der DNA-Methylierung durch M.Ssp6803II, M.Ssp6803V und eventuell durch Sll8009 von *Synechocystis* 6803 zu untersuchen, wurde die Mutanten physiologisch charakterisiert.

Physiologische Untersuchungen $\Delta sll8009$

Wachstumsversuche in flüssigem oder auf Festmedium zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten der Mutanten $\Delta sll8009$ und des Wildtyps (WT) (Abbildung 13 A). Die Aufnahme des gesamten zellulären Absorptionsspektrums von $\Delta sll8009$ zeigte eine Erhöhung des Chlorophyll/Phycocyanin-Gehalts im Vergleich zum WT (Abbildung 13 B). Zur Berechnung der Wachstumsraten sowie Verdopplungszeit der $\Delta sll8009$ Mutante, wurden Kulturen unter 5 % CO₂-Begasung, bei PAR 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ oder PAR 150 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Multikultivator für 7 d oder 8 d gemeinsam mit dem WT kultiviert. Wie in Abbildung 13 dargestellt, konnte trotz erhöhtem Chlorophyll/Phycocyaningehaltes in der Mutante kein signifikanter Unterschied im Wachstumsverhalten festgestellt werden. Tabelle 10 zeigt die berechneten Wachstumsraten, sowie die Verdopplungszeiten der untersuchten Kulturen. Da die Untersuchung des Methylierungsprofils von $\Delta sll8009$ darauf hinwies, dass Sll8009 nicht an der Methylierung der DNA beteiligt ist, wurden keine weiteren physiologischen Untersuchungen durchgeführt.

Tabelle 10 Wachstumsrate und Verdopplungszeit der $\Delta sll8009$ Mutante im Vergleich zum WT.

	Wachstumsrate $\mu[\text{d}^{-1}]$	Verdopplungszeit pro d
Wachstumsbedingungen PAR 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 5 % CO₂-Begasung		
WT	0,31 \pm 0,11	2,23 \pm 1,86
$\Delta sll8009$	0,30 \pm 0,07	2,31 \pm 1,1
Wachstumsbedingungen PAR 150 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 5 % CO₂-Begasung		
WT	0,40 \pm 0,27	1,73 \pm 4,3
$\Delta sll8009$	0,42 \pm 0,10	1,65 \pm 0,84

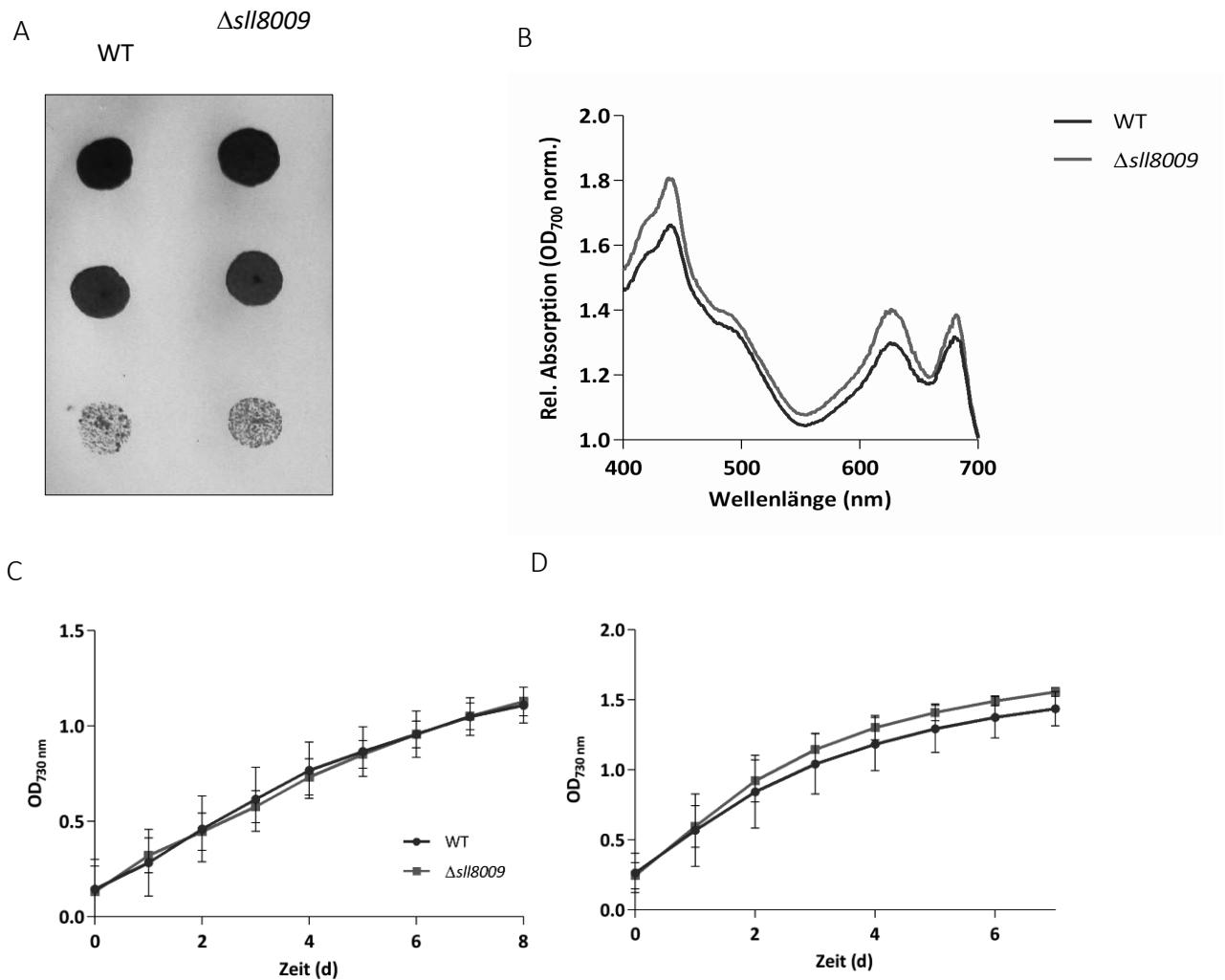


Abbildung 13 Profil der phänotypischen Untersuchungen von $\Delta sll8009$.

A Fotodokumentation eines Tropftests (Verdünnung 1:10, 1:100, 1:1000). Es wurden 5 μ l Zellsuspension auf BG11 Agar-Platten getropft und ohne Zusatz von Antibiotikum für 5 d unter Standardbedingungen inkubiert. **B** Aufnahme des gesamten Zellspektrums von $\Delta sll8009$ und WT. **C** Wachstumsversuch von $\Delta sll8009$ und WT. Die Kultivierung fand über 8 d, 5 % CO_2 -Begasung, bei PAR 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ statt. **D** Wachstumsversuch von $\Delta sll8009$ und WT. Im Multicultivator wurden die Kulturen über 7 d, 5 % CO_2 -Begasung, bei PAR 150 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kultiviert. Alle Wachstumsversuche fanden in BG11, bei 29 °C im Multicultivator 2 statt. (n = 3)

UV-Versuch $\Delta slr0214$ Mutante

Die Mutante $\Delta slr0214$ wurde bereits von Scharnagl *et. al.* (1998) charakterisiert. Es konnten damals eine signifikante Verringerung im Wachstumsverhalten der Mutante im Vergleich zum WT festgestellt werden. Auf Kobe-Agarplatten zeigte sich hier kein phänotypischer Unterschied zwischen den Kulturen. Hinsichtlich ihrer UV-Toleranz wurde die Mutante $\Delta slr0214$ in dieser Arbeit erstmals untersucht. Die Kontrollplatte zeigt, dass sich die Kulturen der Mutante und des WT unter Standardbedingungen gleich verhalten (Abbildung 14 A). Die *cut-off* Folie schützt die Kulturen vor der UV-Strahlung. Die Kulturen des WT und der Mutante sind nach einer Inkubationszeit von 60 h bei PAR $75 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Photonen vital (Abbildung 14 B). Nach einer Inkubationszeit in Gegenwart von UV-A $9,5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, UV-B $0,6 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, PAR $75 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Photonen, über einen Zeitraum von 60 h zeigte die Mutante einen letalen Phänotyp. Der WT zeigte bei gleicher UV-Behandlung ein verringertes Wachstum (Abbildung 14 C). Da die Mutante $\Delta slr0214$ im japanischen WT Hintergrund erzeugt wurde, wurde in diesem Experiment der japanische WT verwendet.

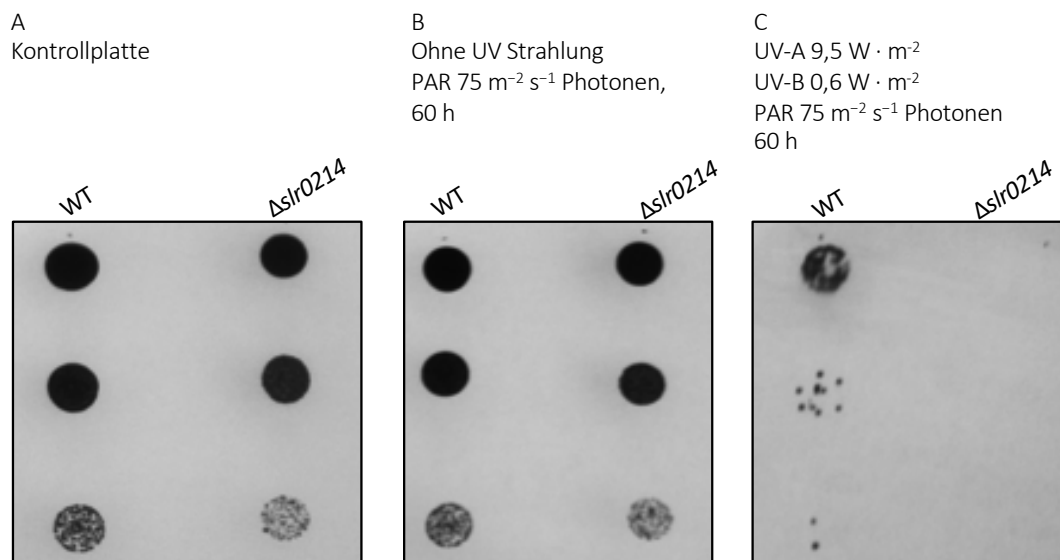


Abbildung 14 Untersuchung der UV-Toleranz von $\Delta slr0214$.

Bilder der angelegten Tropftests aus den untersuchten Flüssigkulturen von $\Delta slr0214$ und WT. **A** Kontrollplatte, ohne UV-Behandlung. **B** Kontrollplatte, Tropftest nach 60 h Inkubation der Zellen unter einer 400 nm UV cut-off Folie (Folex PR, Folex, Dreieich, Deutschland) und PAR $75 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Photonen. **C** Tropftest nach UV-Bestrahlung UV-A $9,5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, UV-B $0,6 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, PAR $75 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Photonen, über eine Dauer von 60 h. Nachdem die Flüssigkulturen mit oder ohne UV-Bestrahlung behandelt wurden, wurde eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1000) angelegt und $5 \mu\text{l}$ Suspension wurden für den Tropftest auf Kobe-BG11 Platten ohne Antibiotikazusatz getropft. Anschließend fand eine Inkubation über 5 d unter Standardbedingungen statt.

Physiologische Untersuchungen $\Delta slr6095$

Die Kultivierung des WT und der $\Delta slr6095$ Mutante unter Raumluft und PAR 40 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, zeigten im Tropftest ein ähnliches Wachstumsverhalten (Abbildung 15 A). Die Untersuchungen des gesamten zellulären Absorptionsspektrums (Abbildung 15 B) zeigte eine leichte Erhöhung im Chlorophyll/Phycocyanin-Gehalt in der $\Delta slr6095$ Mutante im Vergleich zum WT. Für die Berechnung der Wachstumsraten und der Verdopplungszeit der $\Delta slr6095$ Mutante und des WT wurden die Kulturen unter 5 %iger CO_2 -Begasung, bei PAR 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ oder PAR 150 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Multikultivator für 7 d oder 8 d kultiviert. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Wachstumsverhalten festgestellt werden (Abbildung 15 C, D). Die berechneten Wachstumsraten, sowie die Verdopplungszeiten der untersuchten Kulturen (WT und $\Delta slr6095$) sind in Tabelle 11 dokumentiert.

Tabelle 11 Wachstumsraten und Verdopplungszeit $\Delta slr6095$ und WT unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.

	Wachstumsrate $\mu[\text{d}^{-1}]$	Verdopplungszeit pro d
Wachstumsbedingungen PAR 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 5 % CO_2-Begasung		
WT	$0,31 \pm 0,11$	$2,24 \pm 1,82$
$\Delta slr6095$	$0,30 \pm 0,10$	$2,31 \pm 1,73$
Wachstumsbedingungen PAR 150 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 5 % CO_2-Begasung		
WT	$0,40 \pm 0,27$	$1,73 \pm 4,3$
$\Delta slr6095$	$0,42 \pm 0,14$	$1,65 \pm 1,23$

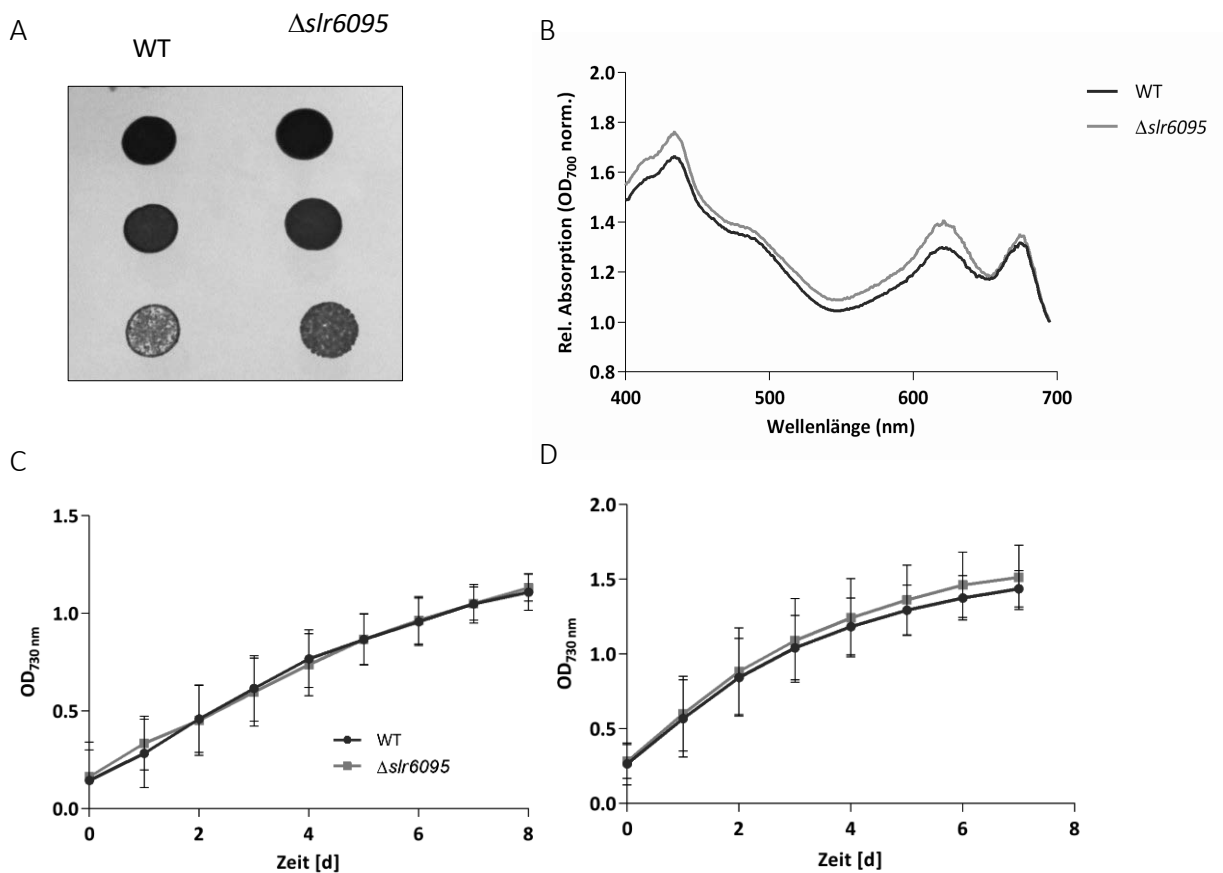


Abbildung 15 Profil der phänotypischen Untersuchungen von $\Delta slr6095$.

A Fotodokumentation eines Tropftests (Verdünnung 1:10, 1:100, 1:1000). Die Kulturen wurden bei PAR $40\ \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ unter Raumluft im Kolben kultiviert. Es wurden $5\ \mu\text{l}$ Zellsuspension (WT und $\Delta slr6095$) auf BG11 Agar-Platten getropft und ohne Zusatz von Antibiotikum für 5 d unter Standardbedingungen inkubiert. **B** Aufnahme des gesamten zellulären Absorptionsspektrums von $\Delta slr6095$ und WT. **C** Wachstumsversuch von $\Delta slr6095$ und WT. Die Kultivierung fand über 8 d, 5% CO_2 -Begasung, bei PAR $50\ \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ statt. **D** Wachstumsversuch von $\Delta slr6095$ und WT. Im Multikultivator wurden die Kulturen über 7 d, 5% CO_2 -Begasung, bei PAR $150\ \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ kultiviert. Alle Wachstumsversuche fanden in BG11, bei $29\ ^\circ\text{C}$ im Multikultivator 2 statt. ($n = 3$)

Morphologische Untersuchungen $\Delta slr6095$

Die Zellen der $\Delta slr6095$ Mutante und des WT wurden weiterhin mikroskopisch untersucht. Dazu wurden die Kulturen unter Raumluft bei Standardbedingungen kultiviert. Die Probennahme der Kulturen (WT und $\Delta slr6095$) fand in der lag-Phase statt. Jeweils 100 Zellen wurden betrachtet und vermessen. Die Zellen der Mutante waren oft etwas kleiner, insgesamt konnte jedoch keine signifikanten Änderungen in der Zellgröße von $\Delta slr6095$ im Vergleich zum WT festgestellt werden (Abbildung 16).

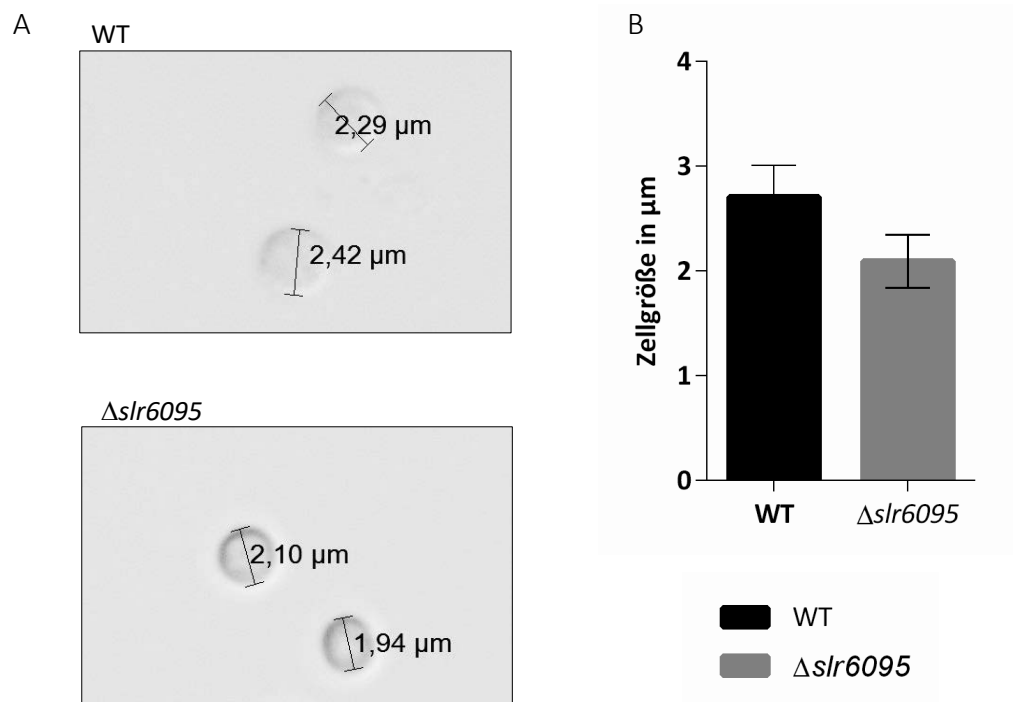


Abbildung 16 Mikroskopische Untersuchung der Zellgröße von $\Delta\text{slr6095}$ und WT.

A Fotodokumentation vermessener Zellen. **B** Mittelwerte aus hundert vermessenen $\Delta\text{slr6095}$ und WT Zellen. p-Wert 0,4 Die Kulturen wurden bei Raumluft unter Standardbedingungen kultiviert. Die Probennahme erfolgte in der lag-Phase. Untersuchung mittels 100x Öl-Immersionsobjektiv, Olympus UC-30 Kamera und der Software CellSens Entry Olympus.

UV-Versuch $\Delta\text{slr6095}$

Da Elhai (2015) DNA-Methylierung mit DNA-Reparaturmechanismen in Verbindung brachte, sollte untersucht werden, ob die Mutante $\Delta\text{slr6095}$ eine Änderung in der UV-Toleranz im Vergleich zum WT aufweist. Mittels Tropftest Analysen wurde die Vitalität der Kulturen (WT und $\Delta\text{slr6095}$) vor Beginn des Experiments (Abbildung 17 A Kontrollplatte) und nach dem Experiment untersucht. Eine Bestrahlung von UV-A $9,5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, UV-B $0,6 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ und PAR $75 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Photonen für 12 h hatte keinen Einfluss auf die Vitalität der Kulturen. Die UV-Bestrahlung über 60 h wirkte letal auf alle Kulturen (Daten nicht gezeigt). Während des Versuches, wurden die Flüssigkulturen mit UV-A $9,5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, UV-B $0,6 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ und PAR $75 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Photonen für nur 48 h bestrahlt (Abbildung 17 C UV-Bestrahlung) oder durch einen UV-Licht *cut-off* Folie vor der UV-Strahlung geschützt (Abbildung 17 B Ohne UV-Bestrahlung). Anschließend wurden die Flüssigkulturen vorsichtig resuspendiert und auf

BG11-Agarplatten (ohne Zusatz von Kanamycin) in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 getropft. Die Tropftest-Platten wurden unter Standardbedingungen für 5 d inkubiert. Die Kultivierung der Mutante $\Delta slr6095$ und des WT bei UV-A $9,5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, UV-B $0,6 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ und PAR $75 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Photonen für 48 h erzeugte im Tropftest keinen phänotypischen Unterschied zwischen den beiden Kulturen. Die putative Methyltransferase Slr6095 scheint keinen Einfluss auf die Stressantwort oder DNA-Reparaturmechanismen in *Synechocystis* 6803 zu haben.

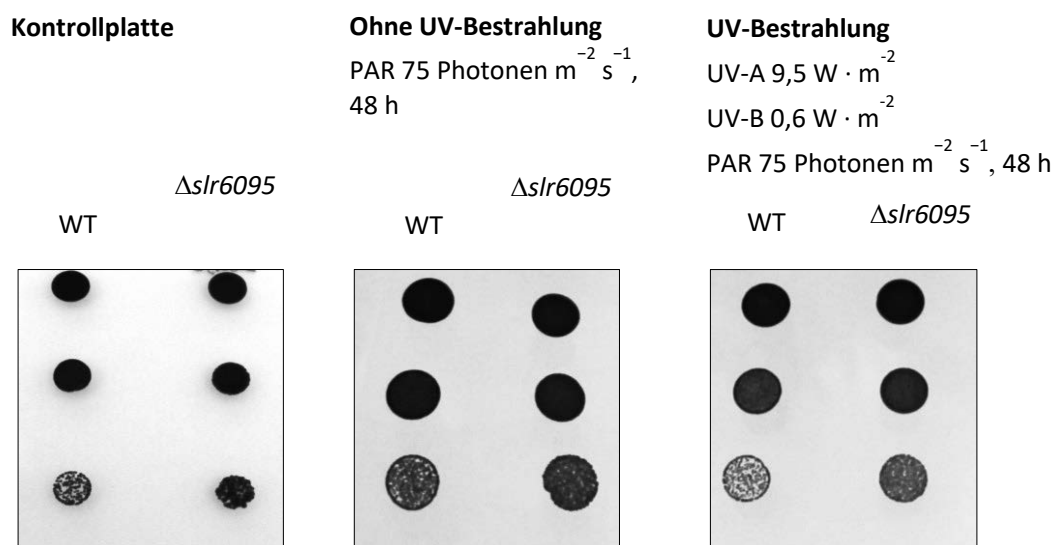


Abbildung 17 Untersuchung der UV-Toleranz von WT und $\Delta slr6095$.

A Kontrollplatte, ohne UV-Behandlung. **B** Kontrollplatte, Inkubation der Zellen unter einer 400 nm UV *cut-off* Folie (Folex PR, Folex, Dreieich, Deutschland). Tropftest nach 48 h Bestrahlung UV-A $9,5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, UV-B $0,6 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, PAR 75 Photonen $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. **C** Tropftest nach UV-Bestrahlung UV-A $9,5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, UV-B $0,6 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, PAR 75 Photonen $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, über eine Dauer von 48 h.

Fotodokumentation der angelegten Tropftest-Platten. Es wurden Verdünnungsreihen (1:10, 1:100, 1:1000) der Kulturen angelegt und $5 \mu\text{l}$ der Zellsuspension wurde auf Kobe-BG11 Platten ohne Antibiotikumzusatz getropft. Anschließend wurden die BG11-Platten unter Standardbedingungen für 5 d inkubiert.

4.5 Proteomdaten der $\Delta slr6095$ Mutante

Das Proteom der vollständig segregierten Mutante $\Delta slr6095$ wurde im Vergleich zum WT analysiert, um den Einfluss von M.Ssp6803V auf die Genexpression zu untersuchen. Es wurde das totale Proteomextrakt und die Membranfraktion analysiert. Es konnten nur geringe Änderungen im Proteom von $\Delta slr6095$ im Vergleich zum WT detektiert werden (Tabelle 12). Insgesamt wurde ein Protein mit erhöhter und sechs Proteine mit verringerter Abundanz gemessen. Im totalen Proteomextrakt konnte eine erhöhte Proteinabundanz für

die Ribonukleotid-Diphosphat Reduktase UE Alpha (*slr1164*) nachgewiesen werden ((\log_2) FC 1,11). Das Protein katalysiert die Synthese von Desoxyribunkleotiden. Somit ist das Protein auch an der DNA-Replikation beteiligt. In der Sequenz von *slr1164* konnte kein spezifisches Methylierungsmotiv (GG^{m6}AN7TTGG) identifiziert werden. Zu den Proteinen mit verringerter Abundanz zählt der Transkriptions-Repressor NrdR (Membranfraktion, (\log_2) FC -1,19). NrdR reprimiert die Transkription durch Bindung von NrdR-Boxen. Die Daten lassen erkennen, dass die Insertionsmutation von Δ *slr6095* wie zu erwarten zur Verringerung von M.Ssp6803V führt. Weiterhin wurde eine verringerte Abundanz für drei Proteine mit unbekannter Funktion (SII0470, SII0471, Slr6096) detektiert. Die beiden Gene *sII0470* und *sII0471* liegen in einem Operon. Slr6097 ist als Type I spezifische Deoxyribonuklease annotiert und zeigt eine verringerte Proteinabundanz von -4,52 in der Membranfraktion. Die proteinkodierenden Gene *slr6096* und *slr6097* sind *down stream* von *slr6095* auf dem Plasmid pSYSX lokalisiert und werden in einer Transkriptionsunit exprimiert.

Tabelle 12 Proteomanalyse von Δ *slr6095*

Die Tabelle zeigt signifikant veränderter Proteine der Δ *slr6095* Mutante im Vergleich zum WT. Die Kulturen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und das totale Proteomextrakt, sowie die Membranfraktion wurden untersucht. Dabei wurde der Mittelwert aus zwei biologischen Replikaten als (\log_2) FC angegeben. (\log_2) FC >1 oder <-1; P-Wert < 0.01. Die Aufarbeitung der Proben und die Proteomanalysen wurden durch Dr. Stefan Mikkat am Proteomzentrum der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt.

Accession-nr. ^A	Zugangs-nr. ^B	Beschreibung	Δ <i>slr6095</i> /WT	
			Membran-fraktion	Total-extrakt
P74240	Slr1164	Ribonukleotid-Diphosphat Reduktase UE Alpha	-	1,11
Q55622	Slr0780	Repressor NrdR	-1,19	-
Q6YRQ9	Slr6095	M.Ssp6803V	-1,37	-2,92
Q6YRQ8	Slr6096	Unbekanntes Protein	-1,40	-
Q55847	SII0470	Unbekanntes Protein	-	-1,54
Q55846	SII0471	Unbekanntes Protein	-1,57	-2,27
Q6YRQ7	Slr6097	Type I spezifische Deoxyribonuklease	-4,52	-

A: Uniprot Zugangsnummer

B: CyanoBase Zugangsnummer

4.6 Physiologische Untersuchungen der $\Delta sll0729$ Mutante

Erste Analysen der $\Delta sll0729$ Mutante zeigten, dass die Inaktivierung der Methyltransferase M.Ssp6803II einen starken physiologischen Effekt zur Folge hat. Im Vergleich zum WT zeigt die Mutante $\Delta sll0729$ ein verringertes Wachstum (Abbildung 18 A) und eine Verringerung im Chlorophyll/Phycocyanin-Gehalt (Abbildung 18 B). Dies führte zu einem bläulichen Erscheinungsbild im Vergleich zum WT (Abbildung 18 C). Um zu überprüfen, ob dieser Effekt durch die Inaktivierung der Methyltransferase hervorgerufen wird, wurden Mutanten generiert, die ektopisch auf dem Plasmid pVZ322 die Gene *sll0729* oder *ssl1378* exprimieren. Im Genom von *Synechocystis* 6803 ist das Gen *ssl1378* *downstream* von *sll0729* lokalisiert. Um polare Effekte, durch Beschädigung des Gens während der Deletion von *sll0729* auszuschließen, wurde die Mutante $\Delta sll0729::ssl1378$ generiert. Die Komplementation von *ssl1378* führte nicht zur Aufhebung des $\Delta sll0729$ Phänotyps (Abbildung 18 C). Die Beschädigung des Gens *ssl1378* hat hier somit keinen entscheidenden Einfluss auf den beobachteten Phänotyp in der Mutante $\Delta sll0729$. Die Komplementation der $\Delta sll0729$ Mutante mit *sll0729* führte hingegen zur vollständigen Wiederherstellung des WT-Phänotyps (Abbildung 18 C). So konnte experimentell gezeigt werden, dass das verringerte Wachstumsverhalten und die Verringerung des Chlorophyll/Phycocyanin-Gehalts in der $\Delta sll0729$ Mutante durch die fehlende GG^{m4}CC Methylierung hervorgerufen wird.

Zusammenfassend zeigten die physiologischen Untersuchungen der $\Delta sll0729$ Mutante, dass sie als Einzige unter den analysierten Methyltransferasen einen ausgeprägten Phänotyp im Vergleich zum WT aufwies. Dieser Effekt ist unabhängig vom *downstream* lokalisierten Gen *ssl1378* und konnte durch die Komplementation mit *sll0729* aufgehoben werden. Daher wurde in weiteren Experimenten die Mutante $\Delta sll0729$ intensiver untersucht.

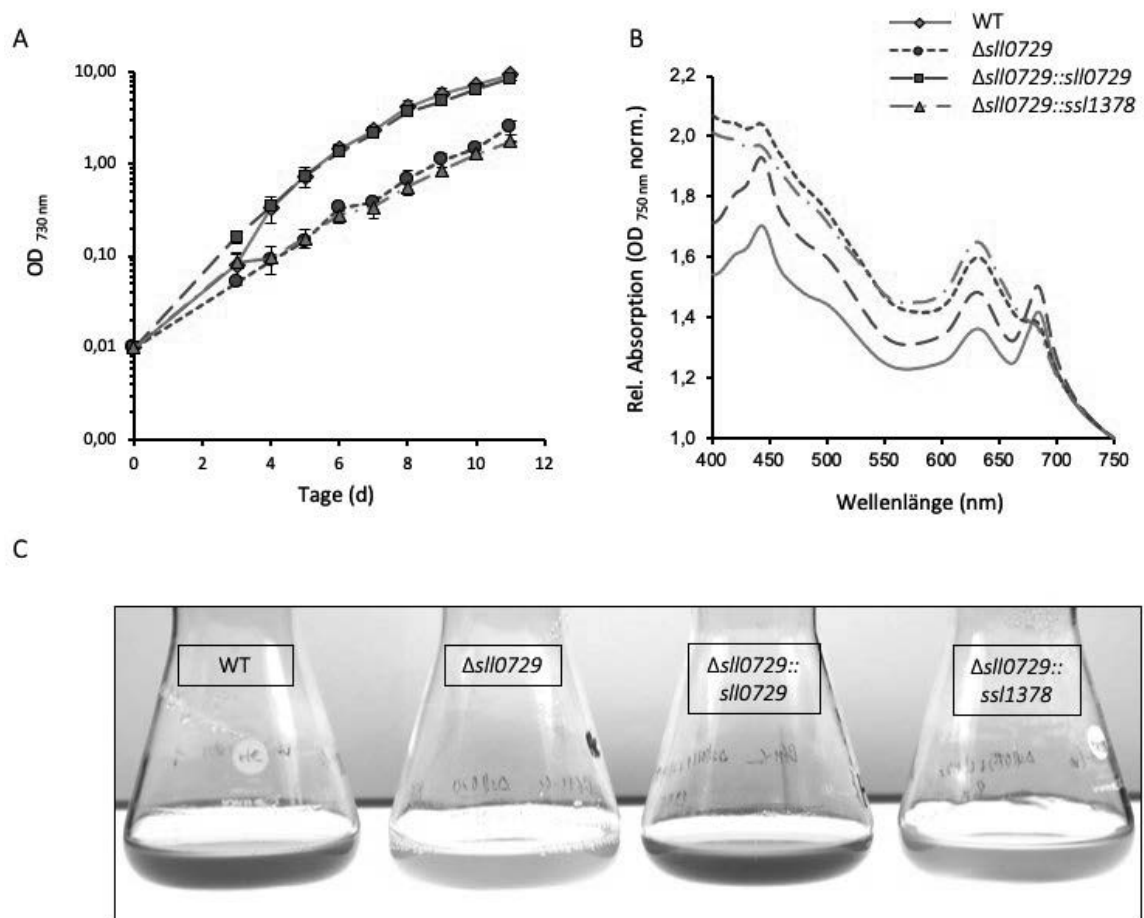


Abbildung 18 Phänotypisch Charakterisierung der Mutanten $\Delta ssl0729$, $\Delta ssl0729::ssl0729$, $\Delta ssl0729::ssl1378$ und des WT. **A** Wachstumsversuch unter Standardbedingungen über 12 Tage. (n=3) **B** Absorptionsspektren von Zellen der Mutanten und des WT. **C** Erscheinungsbild der Mutanten und des WT in Flüssigkulturen.

4.7 Transkriptomanalysen

Mit 38.512 Methylierungsmotiven kommt das Motiv GG^{m4}CC im Genom von *Synechocystis* 6803 am häufigsten vor. Da die Überrepräsentation von Methylierungsmotiven unter Umständen einen Einfluss auf die Genexpression hat, konnte 2002 in einer genomweiten Studie von Oshima *et. al.*, für den Modellorganismus *E. coli* gezeigt werden. Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der phänotypischen Veränderung, der fehlenden DNA-Methylierung und der Genexpression existiert, wurden Microarray Analysen der Mutante $\Delta ssl0729$ durchgeführt. Entgegen erster Annahmen wurden im Transkriptom der $\Delta ssl0729$ Mutante nur wenige und vor allem widersprüchliche Änderungen in der Transkriptabundanz proteinkodierender Gene erfasst. Es konnte auch kein Zusammenhang zwischen der Lokalisation der Methylierungsmotive im Bereich putativer Promotorelemente

und Veränderungen in der Transkriptabundanz proteinkodierender Gene erkannt werden. Die Schwankungen im Transkriptom erlaubten auch keine Identifizierung von Genen, die für die beobachteten starken phänotypischen Änderungen der $\Delta sll0729$ Mutante verantwortlich sein könnten. Daher wurden dafür eher pleiotrope Effekte als spezifische Transkriptänderungen angenommen. Insgesamt wurde das Transkriptom von $\Delta sll0729$ mit Hilfe von vier unabhängigen Microarray Analysen untersucht, um die Konsistenz der Daten zu validieren. Dazu wurden auch die $\Delta sll0729::ssl1378$ und $\Delta sll0729::sll0729$ Mutanten in die Untersuchungen einbezogen. Das experimentelle Setup unterschied sich hinsichtlich der Kultivierungsdauer und der Lichtintensität zwischen den einzelnen Versuchen. Die Ergebnisse der Transkriptomuntersuchungen von $\Delta sll0729$ zeigten in jedem Experiment andere in der Transkriptabundanz signifikant veränderte Gene (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13 Varianz deregulierter Gene mit signifikanten Änderungen in der Transkriptabundanz der $\Delta sll0729$ Mutante im Vergleich zum WT.

Daten aus vier unabhängigen Microarray Analysen.

DNA-Microarray	Gesamtanzahl deregulierter proteinkodierender Gene	
	positiver FC $\Delta sll0729$ vs. WT	negativer FC $\Delta sll0729$ vs. WT
1	18	41
2	225	224
3	59	40
4	110	7

Die komplementierte Mutante $\Delta sll0729::sll0729$ zeigte ein WT-ähnliches Transkriptomprofil, wohingegen das Transkriptom von $\Delta sll0729::ssl1378$ dem der $\Delta sll0729$ Mutante in dem entsprechenden Experiment gleichkam. Innerhalb aller Experimente zeigten nur zwei Gene, die für hypothetische Proteine kodieren (*sll0470*, *sll1526*) in allen Microarray Analysen der $\Delta sll0729$ Mutante eine reproduzierbare Änderung in der Transkriptabundanz im Vergleich zum WT. Das Gen *sll0470* wird in $\Delta sll0729$ stärker als im WT exprimiert, wohingegen *sll1526* eine Verringerung der Transkriptmenge in der Mutante aufweist (siehe Abbildung 19 A und B). Die Mutante $\Delta sll0729::sll0729$ zeigt eine WT spezifische Expression dieser Gene. Vergleichbar mit der $\Delta sll0729$ Mutante ist die Änderung in der Transkriptabundanz der Gene im Transkriptom des Stammes $\Delta sll0729::ssl1378$. *In silico* Analysen der genetischen Loki ergaben, dass die Gene *sll0470* und *sll1526* ein GGCC

Motiv innerhalb des -35 Elements, *upstream* der transkriptionellen Startsequenz (TSS) aufweisen.

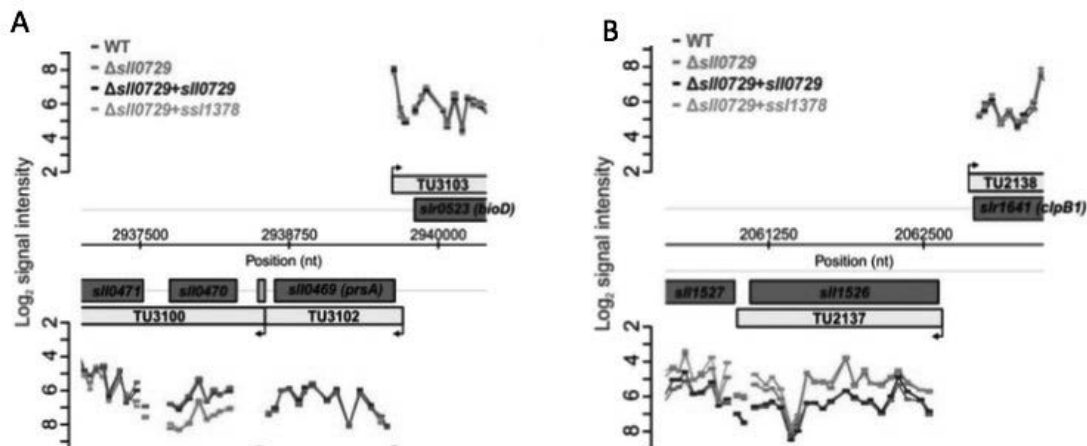


Abbildung 19 Graphische Darstellung der Microarray Analysen, mittels Signalintensität spezifischer genetischer Loci. **A** Erhöhte Transkriptabundanz von *sll0470* in $\Delta sll0729$ im Vergleich zum WT. **B** Die Transkriptabundanz von *sll1526* ist in der Mutante $\Delta sll0729$ im Vergleich zum WT verringert. Die Komplementation der Mutante $\Delta sll0729$, mit *sll0729* kann diese Veränderungen in beiden Genen revertieren. Die Mutante $\Delta sll0729::ssl1378$ zeigt die gleichen Änderungen in der Transkriptabundanz beider Gene, wie die $\Delta sll0729$ Mutante.

Mittels Northern Blot Analysen konnten die veränderten Transkriptmengen der Gene *sll1526* und *sll0470* in der $\Delta sll0729$ Mutante bestätigt werden (siehe Anhang 9.5). Durch die von Scharnagl *et al.* (1998) beschriebenen phänotypischen Veränderungen der Mutante $\Delta sllr0214$, wurde $\Delta sllr0214$ als weiterer interessanter Kandidat in die Transkriptomuntersuchungen einbezogen. Die Microarray Analysen ergaben ausschließlich für das Gen *sll0382* eine signifikante Änderung in der Transkriptabundanz (FC $\log_2 1$; p-Wert 0,05) von $\Delta sllr0214$ im Vergleich zum WT. *In silico* Untersuchungen zeigten das *sll0382* im Bereich des putativen Promotorelements kein spezifisches Methylierungsmotiv für CGATCG enthält. Die Daten weisen darauf hin, dass die phänotypischen Veränderungen in der Mutante $\Delta sllr0214$ nicht mit der fehlenden DNA-Methylierung korrelieren.

4.8 Isolation und Charakterisierung von Suppressormutanten

Während der Kultivierung der $\Delta sll0729$ Mutante über mehrere Generationen wurde unter Standardbedingungen eine Aufhebung des charakteristischen bläulichen Phänotyps beobachtet. Wie in Abbildung 20 gezeigt, wies die $\Delta sll0729$ Kultur zunehmend eine dem WT ähnliche Pigmentierung auf und auch die Wachstumsraten glichen sich an.

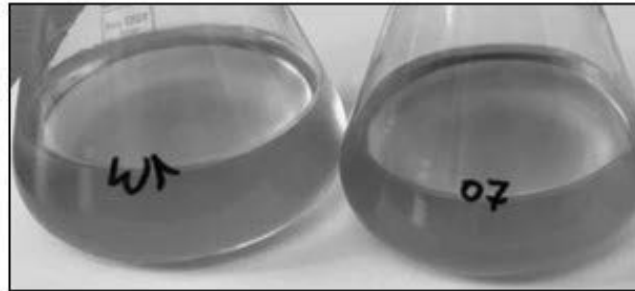


Abbildung 20 Phänotypen unabhängiger WT und $\Delta sll0729$ Kulturen. Kultivierung der Flüssigkulturen bei Raumluft unter Standardbedingungen, über mehrere Generationen hinweg.

Wie in Abbildung 21 zu erkennen, konnte im Verdünnungsausstrich (Verdünnung 1:10000), einer WT ähnlichen $\Delta sll0729$ Kultur zwei unterschiedliche Kolonietypen in Gegenwart von Kanamycin isoliert werden. Die für die ursprüngliche Mutante $\Delta sll0729$ charakteristischen, kleinen bläulichen Kolonien unterschieden sich deutlich von den großen WT ähnlichen grünen Kolonien (Vergleich Abbildung 21 A und B). Zwei WT-ähnliche Kolonien (im Folgenden benannt als $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$) wurden für weitere Untersuchungen isoliert und kultiviert. *Synechocystis* 6803 besitzt eine natürliche Kompetenz und ein *multi-copy* Genom. Es ist daher möglich, dass die Mutante $\Delta sll0729$ das wildtypische Gen *sll0729* wieder in das Chromosomen integriert hat oder nicht durchgehend vollständig segregiert war. Auch die Möglichkeit einer Suppressormutation, die die Auswirkung der Deletion von *sll0729* im Genom von *Synechocystis* 6803 ausgleicht, könnte für diese Aufhebung des Phänotyps verantwortlich sein.

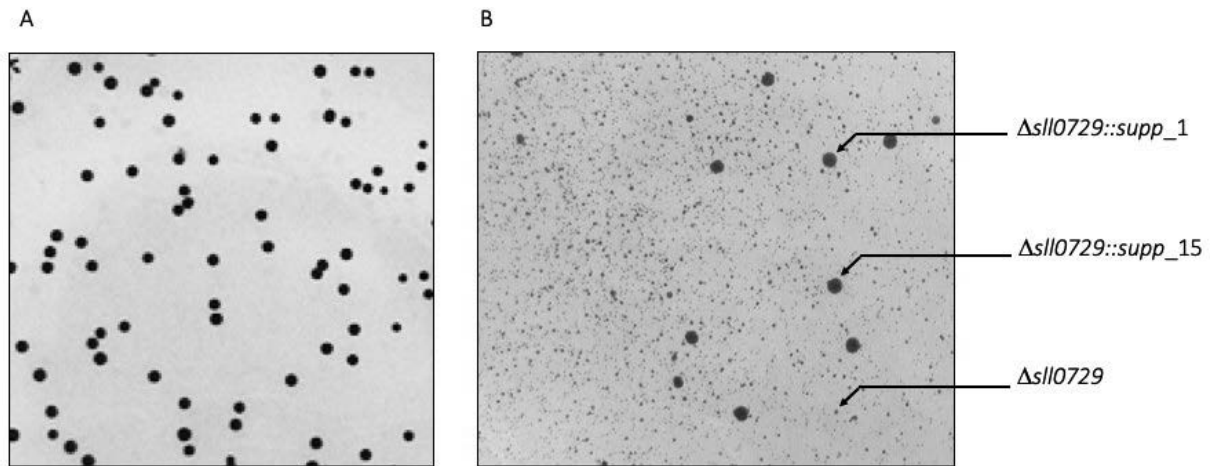


Abbildung 21 Unterschiedliche Kolonietypen WT und $\Delta sll0729$

A WT Kolonien.

B Neben kleinen bläulichen Kolonien, traten WT ähnliche Kolonietypen in einer $\Delta sll0729$ Kultur auf (gekennzeichnet durch schwarze Pfeile). Zwei unabhängige WT ähnliche Kolonien wurden isoliert und kultiviert

Kultiviert wurden 1/1000 verdünnte Suspensionen auf BG11 Kobe-Platten unter Standardbedingungen.

Unter Verwendung genspezifischer Primer wurde mittels PCR untersucht, ob das Gen *sll0729* in den Isolaten $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$ weiterhin mutiert ist (Abbildung 22 B, in schwarz Primer 1 und 2). In der $\Delta sll0729$ Mutante ist das Gen *sll0729* durch Deletion eines 490 bp großen Fragments inaktiviert worden (Abbildung 11). Um zu untersuchen, ob dieses Gen in den Isolaten weiterhin vollständig deletiert ist, wurden zusätzlich für diesen Bereich spezifische Primer synthetisiert (Abbildung 22 A, in lila Primer 3 und 4). Wie in Abbildung 22 A zu erkennen ist, konnte unter Verwendung der Primer 1 und 2 ein 2 kb großes Fragment aus WT DNA amplifiziert werden. Dies entspricht dem erwarteten Amplifikat für das intakte Gen *sll0729*. Unter Verwendung der Primer 3 und 4 wurde aus WT DNA ein 0,49 kb Fragment detektiert, welches innerhalb der kodierenden Sequenz des *sll0729* Gens liegt. Aus der DNA der Isolate $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$ konnte unter Verwendung der Primer 1 und 2 je ein 2,5 kb großes Fragment detektiert werden. Dieses entspricht dem mutierten *sll0729* Gen mit inserierter Antibiotikum-Resistenz-Kassette. Bei Verwendung der Primerkombination 3 und 4 konnte kein Amplifikat mit Mutanten-DNA als *template* detektiert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Mutanten $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$ immer noch das mutierte $\Delta sll0729$ Konstrukt enthalten und vollständig segregiert sind. Nachfolgend wurde untersucht, ob das Methylierungsmotive GGCC in den Mutanten methyliert oder unmethyliert vorliegt.

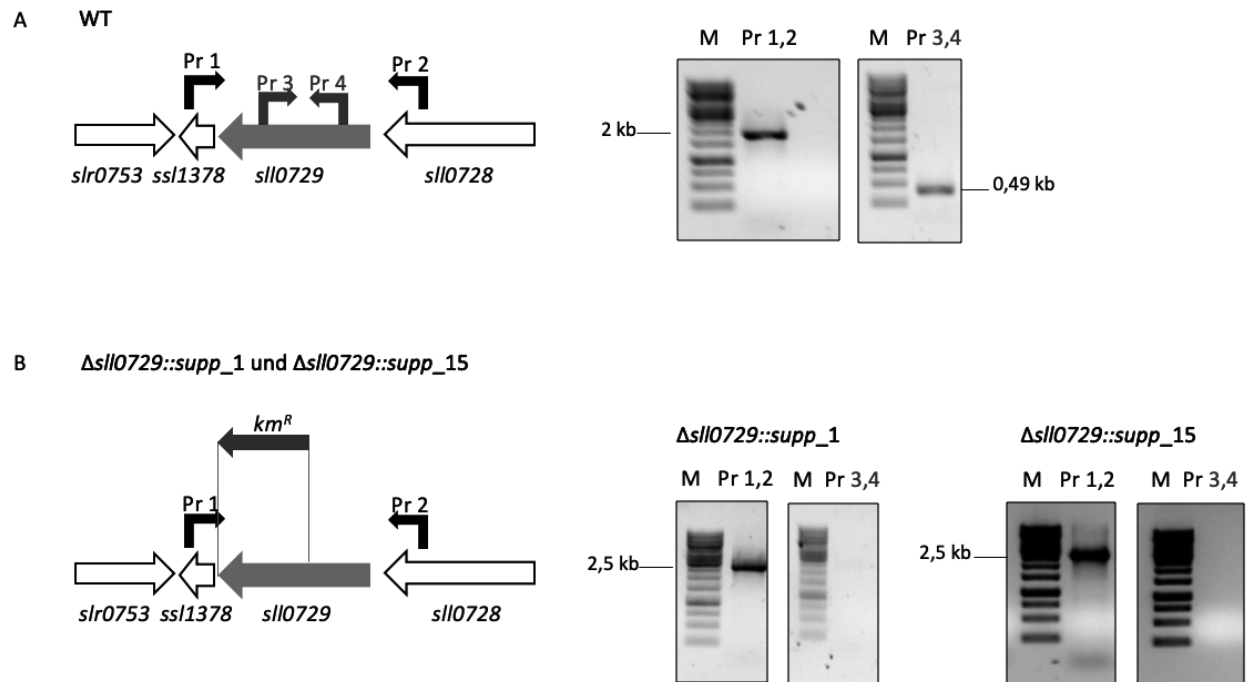


Abbildung 22 Genetische Loci und Genotypisierung des WT im Vergleich zu den isolierten Mutanten $\Delta sll0729_1$ und $\Delta sll0729_15$.

A Genetischer Locus um *sll0729* im WT, mit Bindestellen der verwendeten Primer. PCR chromosomaler DNA aus *Synechocystis* 6803. Primer 1 und 2 (schwarz) zum Nachweis des *sll0729* Gens. Die Primer 3 und 4 amplifizieren ein 490 bp großes Fragment innerhalb der kodierenden Sequenz von *sll0729*. **B** Genetischer Locus um *sll0729* mit inserierter Kanamycin Resistenzkassette in den Mutanten $\Delta sll0729_1$ und $\Delta sll0729_15$. PCR chromosomaler DNA der Isolate $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$, unter Verwendung der Primer 1 und 2. Das Gen *sll0729* wird durch diese Primer amplifiziert. Das Amplifikat erzeugt in der Mutante ein um die Kanamycin Resistenzkassette vergrößert Fragment. Aufgrund der Deletion des Gens *sll0729* in den Mutanten können die Primer 3 und 4 nicht binden und erzeugen somit in der PCR kein Fragment. Die Auftrennung der DNA-Fragmente fand mittels Agarosegelelektrophorese statt.

Zur Untersuchung des Methylierungsprofils der Mutanten $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$ wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Dazu wurde hochmolekulare chromosomale DNA der Mutanten mittels CTAB Methode isoliert und mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen (*HaeIII*, *EaeI*, *ApaI*), die spezifisch für das Erkennungsmotiv GGCC sind, inkubiert. Ist die Methyltransferase M.Ssp6803II aktiv, so schützt die Methylierung des GGCC-Motivs vor dem Abbau der DNA durch die Endonuklease-Aktivität des Enzyms. Die Abbildung 23 zeigt, dass die chromosomale DNA des WT, $\Delta sll0729$ und $\Delta sll0729::sll0729$ in Abwesenheit von Restriktasen (ungeschnitten - un), hochmolekular vorlag. Wie erwartet führte die Inkubation der hochmolekularen DNA aus WT und $\Delta sll0729::sll0729$ mit den Restriktionsenzymen *HaeIII*, *EaeI*, *ApaI* nicht zum Abbau der DNA. Die DNA von WT und $\Delta sll0729::sll0729$ wird durch die Methylierung des GG^{m4}CC Motivs durch die intakte Methyltransferase M.Ssp6803II vor dem Abbau geschützt. Die DNA der Mutanten $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$ wurde durch die

Restriktionsenzyme *HaeIII*, *EaeI*, *ApaI* geschnitten. Das Motiv GGCC liegt innerhalb der chromosomalen DNA der $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$ Kulturen daher unmethyliert vor. Die Deletion von *sll0729* inaktiviert auch in den Mutanten $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$ die Methyltransferase M.Ssp6803II.

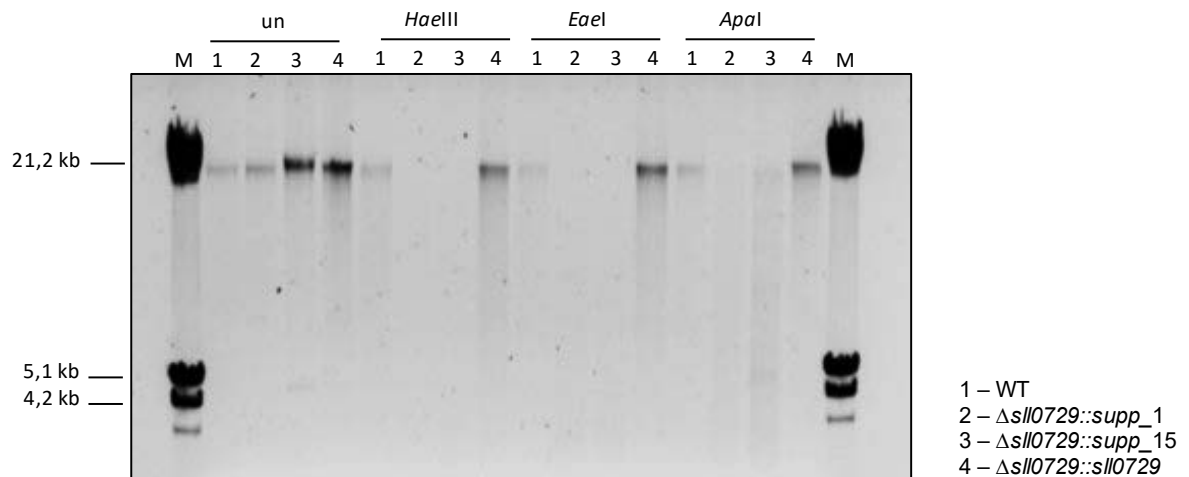


Abbildung 23 Funktionelle Untersuchung der Methyltransferase M.Ssp6803II, mittels klassischem Restriktionsverdau chromosomaler DNA von WT (1), $\Delta sll0729::supp_1$ (2), $\Delta sll0729::supp_15$ (3) und $\Delta sll0729::sll0729$ (4) Proben. Ungeschnittene (un) hochmolekulare DNA wurde als Positivkontrolle verwendet. Mit den methylierungssensitiven Restriktionsenzymen *HaeIII*, *EaeI*, *ApaI*, spezifisch für das Methylierungsmotiv GGCC inkubierte DNA zeigte für den WT und der $\Delta sll0729::sll0729$ Mutante keine Degradation der chromosomalen DNA. Die chromosomale DNA der Mutanten $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$ wurde hingegen vollständig degradiert. Die DNA Fragmente wurden über Agarosegelelektrophorese analysiert.

Durch die Mutation des Gens *sll0729* ist die Methyltransferase M.Ssp6803II in beiden Mutanten inaktiv und das Motiv GGCC liegt in der chromosomalen DNA unmethyliert vor. Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei den Isolaten um Suppressormutanten handelt, bei denen eine oder mehrere Mutationen im Genom zur Aufhebung des ursprünglich beschriebenen $\Delta sll0729$ Phänotyps führten. Die phänotypischen Veränderungen in den Suppressormutanten blieben über mehrere Generationen erhalten. Dies ermöglichte die physiologische Charakterisierung stabiler Mutanten mit fehlender GGCC Methylierung.

4.9 Physiologische Untersuchungen der Suppressormutanten

Zur physiologischen Untersuchung der Suppressormutanten $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_{15}$ wurden die Kolbenkulturen betrachtet und das zelluläre Absorptionsspektrum aufgenommen. In Abbildung 24 ist der Phänotyp der Suppressormutanten $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_{15}$, im Vergleich zum WT und zur originalen $\Delta sll0729$ Mutante dargestellt.

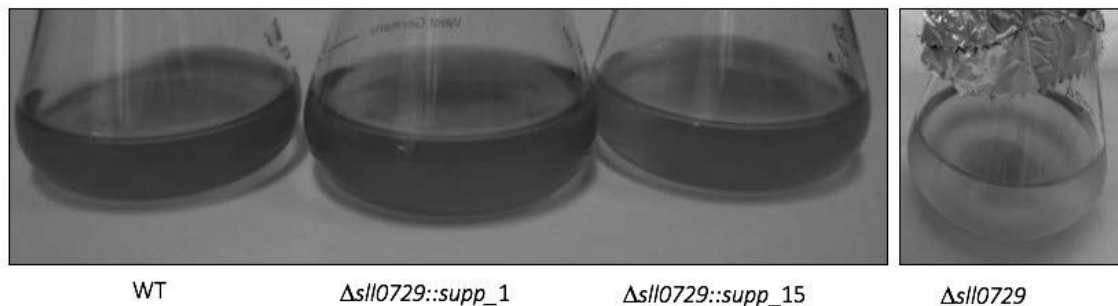


Abbildung 24 Phänotyp der Flüssigkulturen

WT, $\Delta sll0729::supp_1$, $\Delta sll0729::supp_{15}$ und $\Delta sll0729$. Kultivierung in 1xBG11 bei Raumluft und unter Standardbedingungen.

Die Pigmentierung der $\Delta sll0729$ Mutante war im Vergleich zum WT wie bereits zuvor erwähnt verändert. In dieser Mutante gab es eine Verringerung des Chlorophyll/Phycocyanin-Gehalts im Vergleich zum WT (siehe Abbildung 18). Aufnahmen des zellulären Absorptionsspektrums der $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_{15}$ Mutanten zeigten keine Veränderung im Chlorophyll/Phycocyanin-Gehalt im Vergleich zum WT (Abbildung 25).

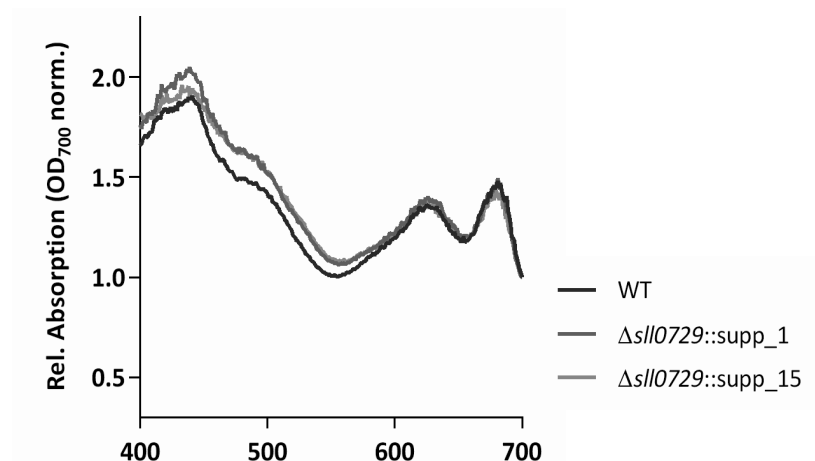


Abbildung 25 Gesamtes zelluläres Absorptionsspektrum

Kulturen WT, $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_{15}$. Kultivierung bei Raumluft unter Standardbedingungen.

Da sich die Suppressormutanten sehr ähnlich verhielten, wurde im Folgenden mit der Mutante $\Delta sll0729::supp_1$ weitergearbeitet. Zur Erhebung der Wachstumsraten (Änderung der optischen Dichte in Abhängigkeit von der Zeit) und der Verdopplungszeit (Verdopplung der Zellzahl in Abhängigkeit von der Zeit) der Kulturen wurden Wachstumsversuche durchgeführt. Die Kulturen wurden unter 5 % CO₂-Begasung, bei PAR 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ oder PAR 150 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Multikultivator für 7 d kultiviert. Wie in Tabelle 14 und Abbildung 26 dargestellt, konnten keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zwischen WT und $\Delta sll0729::supp_1$ detektiert werden. Weiterhin wurden Wachstumsversuche bei anderen Kulturbedingungen wie unter Raumluft, bei PAR 40 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in 50 ml Kolbenkultur und unter 5 % CO₂-Begasung, bei PAR 75 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ oder PAR 200 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durchgeführt. Auch diese Untersuchungen zeigten keine Änderung im Wachstumsverhalten der $\Delta sll0729::supp_1$ Mutante im Vergleich zum WT. Das Verhalten der Suppressormutanten zeigt somit, dass der ursprüngliche Pigmentierungs- und Wachstumsphänotyp nicht direkt durch die fehlende GGCC Methylierung verursacht wurde.

Tabelle 14 Wachstumsraten und Verdopplungszeit des WT und der $\Delta sll0729::supp_1$ Suppressormutante.

	Wachstumsrate $\mu[\text{d}^{-1}]$	Verdopplungszeit pro Tag
Wachstumsbedingungen PAR 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 5 % CO₂-Begasung		
WT	$0,37 \pm 0,01$	$1,87 \pm 0,03$
$\Delta sll0729::supp_1$	$0,31 \pm 0,03$	$2,21 \pm 0,18$
Wachstumsbedingungen PAR 150 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 5 % CO₂-Begasung		
WT	$0,45 \pm 0,16$	$1,54 \pm 1,25$
$\Delta sll0729::supp_1$	$0,36 \pm 0,11$	$1,93 \pm 1,3$

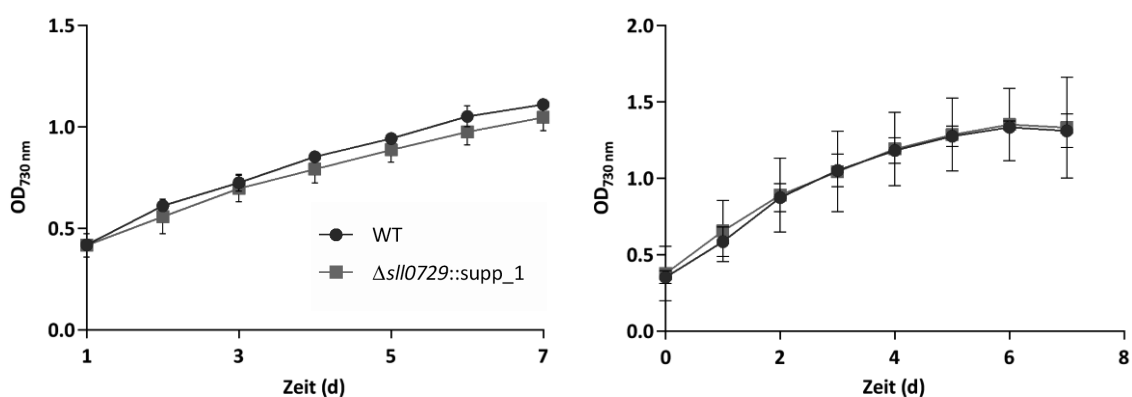


Abbildung 26 Wachstumsverhalten von WT und $\Delta sll0729::supp_1$

Wachstumsversuch WT und $\Delta sll0729::supp_1$ Suppressormutante. Zunahme der OD_{730nm} über Zeit (7 d). Kultivierung in 1xBG11, unter CO₂ Begasung (5 %). **A** Lichtintensität PAR 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Kultivierung im Multikultivator.

B Lichtintensität PAR 150 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Kultivierung im Multikultivator 1. (n = 3)

Da sich das Wachstum und das Absorptionsspektrum der Suppressormutante nicht vom WT unterschied, wurde davon ausgegangen, dass auch die Zellgröße der beiden Kulturen ähnlich sei. Um diese Vermutung zu belegen, wurden die Zellen mikroskopisch untersucht. Die Kulturen des WT und $\Delta slI0729::supp_1$ wurden dafür unter normaler Raumluft und 5 % CO₂ kultiviert. Aus hundert vermessenen Zellen der WT Kultur und der Suppressormutantenkultur wurde der Mittelwert gebildet und graphisch in Abbildung 27 A dargestellt. Entgegen erster Annahmen konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung der Suppressormutante unter Normalluft zu einer Verringerung der Zellgröße um ca. 50 % im Vergleich zum WT führte. Auch unter 5 % CO₂ Begasung wiesen die Zellen der Suppressormutante eine signifikant verringerte Zellgröße im Vergleich zum WT auf. Diese Arbeit zeigt, dass die GGCC-Methylierung einen Einfluss auf die Zellgröße hat.

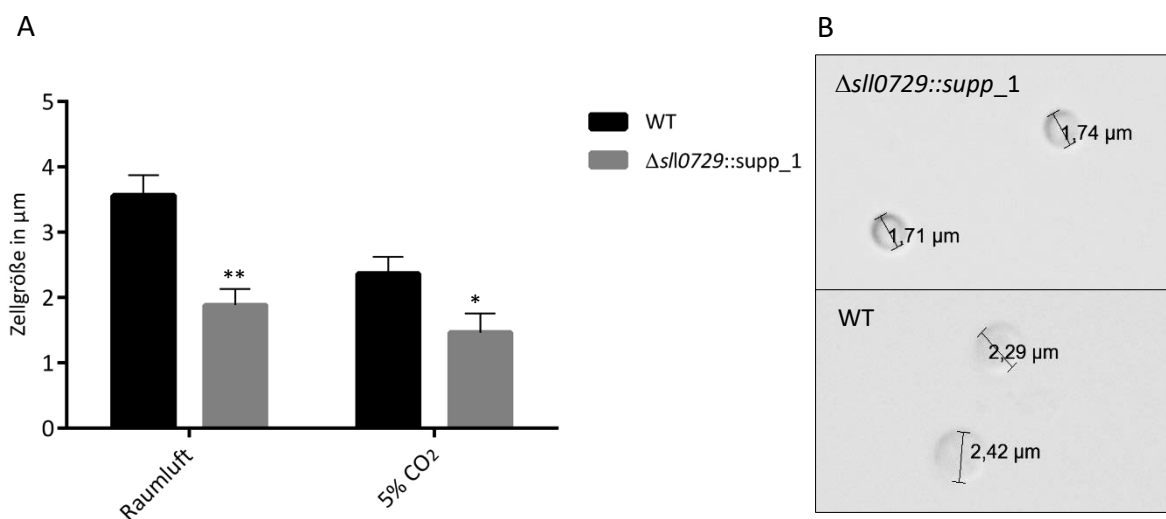


Abbildung 27 Zellgrößen-Profil von WT und $\Delta slI0729::supp_1$

A Graphische Darstellung des Zellgrößen-Profiles von WT und $\Delta slI0729::supp_1$. Mittelwert aus hundert mikroskopisch vermessenen Zellen, aus homogenen WT oder $\Delta slI0729::supp_1$ Kulturen. Kultivierung unter 5 % CO₂ Begasung oder Raumluft. p-Wert < 0,05 **B** Mikroskopische Untersuchungen, des Zellgrößen-Profiles von WT und $\Delta slI0729::supp_1$. Kultivierung unter Raumluft. Probennahme lag-Phase. Aufnahmen mittels 100x Öl-Immersionobjektiv, Olympus UC-30 Kamera und der Software CellSens Entry Olympus.

In *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (Zheng und O'Shea, 2017) wurde beschrieben, dass die Zellgröße mit dem DNA-Gehalt korreliert. Dass es eine Korrelation zwischen Chromosomen-Anzahl und Wachstumsbedingungen gibt, zeigte 2016 die Arbeitsgruppe um Zerulla *et. al.* Da die Suppressormutanten eine signifikant verringerte Zellgröße im Vergleich zum WT aufweisen, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch der DNA-Gehalt mittels FACS-Analysen untersucht. Die untersuchten Kulturen wurden unter ständigem Schütteln bei normaler Raumluft oder 2 % CO₂-Begasung kultiviert. Die Ergebnisse veranschaulichen, dass die Anzahl der Chromosomen in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen variabel ist. Die Kultivierung von *Synechocystis* 6803 unter 2 % CO₂ Begasung führt zu einer dreimal höheren Chromosomenanzahl in Zellen des WT im Vergleich zu Zellen nach Anzucht unter Raumluft. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass der DNA-Gehalt in der Suppressormutante $\Delta sl10729::supp_1$ im Vergleich zum WT verringert ist. Diese Verringerung in der Chromosomenanzahl konnte für die Suppressormutante unter beiden Kultivierungsbedingungen nachgewiesen werden (Abbildung 28).

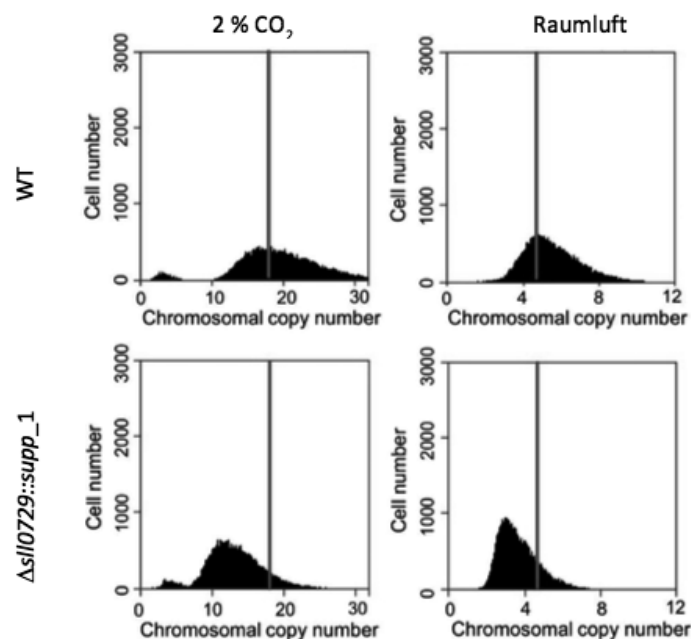


Abbildung 28 FACS Analysen zur Bestimmung des DNA-Gehalts

Verringerter DNA-Gehalt der Suppressormutante im Vergleich zum WT. Mittels FACS Analysen wurde die Chromosomenanzahl von WT und $\Delta sl10729::supp_1$ Zellen unter Raumluft und 2 % CO₂ gemessen. 30.000 Zellen wurden untersucht. Die FACS Daten wurden im Rahmen des Projektes freundlich von Dr. Satoru Watanabe (Tokyo, University of Agriculture) zur Verfügung gestellt.

4.10 Einfluss von M.Ssp6803II auf DNA-Reparaturmechanismen in *Synechocystis* 6803

In verschiedenen Bakterien wurden bereits DNA-Reparaturmechanismen mit DNA-Methylierung in Verbindung gebracht (Elhai, 2015). UV-Strahlung führt häufig zu negativen Effekten in biologischen Systemen. Primäre Angriffspunkte sind dabei Makromoleküle wie DNA, in der Thymine miteinander verschmelzen und durch Excisionsreparatur entfernt werden müssen. Um derartige DNA-Reparaturmechanismen in *Synechocystis* 6803 zu aktivieren, wurden die Kulturen des WT, der Suppressormutanten und $\Delta sll0729::sll0729$ definierter UV-Strahlung ausgesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde so der Einfluss von M.Ssp6803II auf die Vitalität der Kulturen und einem möglichen Einfluss auf DNA-Reparaturmechanismen nach der Exposition von UV-Strahlung untersucht.

Mittels Tropftest wurde die Lebensfähigkeit der Kulturen vor dem Beginn des Experimentes, ohne UV-Bestrahlung und nach UV-Bestrahlung überprüft.

In Vorversuchen wurde die optimale Expositionszeit ermittelt. Nach 12 h UV-Bestrahlung (UV-A $9,5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, UV-B $0,6 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) wurde kein Unterschied in der UV-Toleranz zwischen WT und den Suppressormutanten nachgewiesen, alle Zellen blieben vital. Eine UV-Belastung von über 50 h (UV-A $9,5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, UV-B $0,6 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) wirkte letal auf den WT und die Suppressormutanten.

Durch eine UV-Strahlung von 36 h konnte jedoch ein klarer phänotypischer Unterschied in der UV-Toleranz zwischen WT und den Suppressormutanten detektiert werden. In Abbildung 29 ist gezeigt, dass auf der Kontrollplatte alle Kulturen gleich anwachsen. Nach 36 h Kultivierung unter einer UV-Licht *cut-off* Folie und PAR 75 Photonen $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zeigten die Suppressormutanten ein leicht verringertes Wachstum im Vergleich zum WT und $\Delta sll0729::sll0729$. (siehe Abbildung 29 B) Die Exposition der Flüssigkulturen bei einer UV-Bestrahlung von UV-A $9,5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, UV-B $0,6 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, PAR 75 Photonen $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, über die Dauer von 36 h führte im Tropftest zu vitalen Kolonien des WT (Abbildung 29 C). Die komplementierte Mutante $\Delta sll0729::sll0729$ konnte nach der UV-Bestrahlung den WT-Phänotyp nicht vollständig wiederherstellen, blieb jedoch weitgehend vital. Die Suppressormutanten zeigten dagegen eine starke Sensitivität gegenüber der UV-Strahlung, da keine Zellen nach UV-Exposition mehr lebensfähig waren. Es wird vermutet, dass die

fehlende Methylierung des GGCC Motivs in $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$ einen negativen Einfluss auf DNA-Reparaturmechanismen hat.

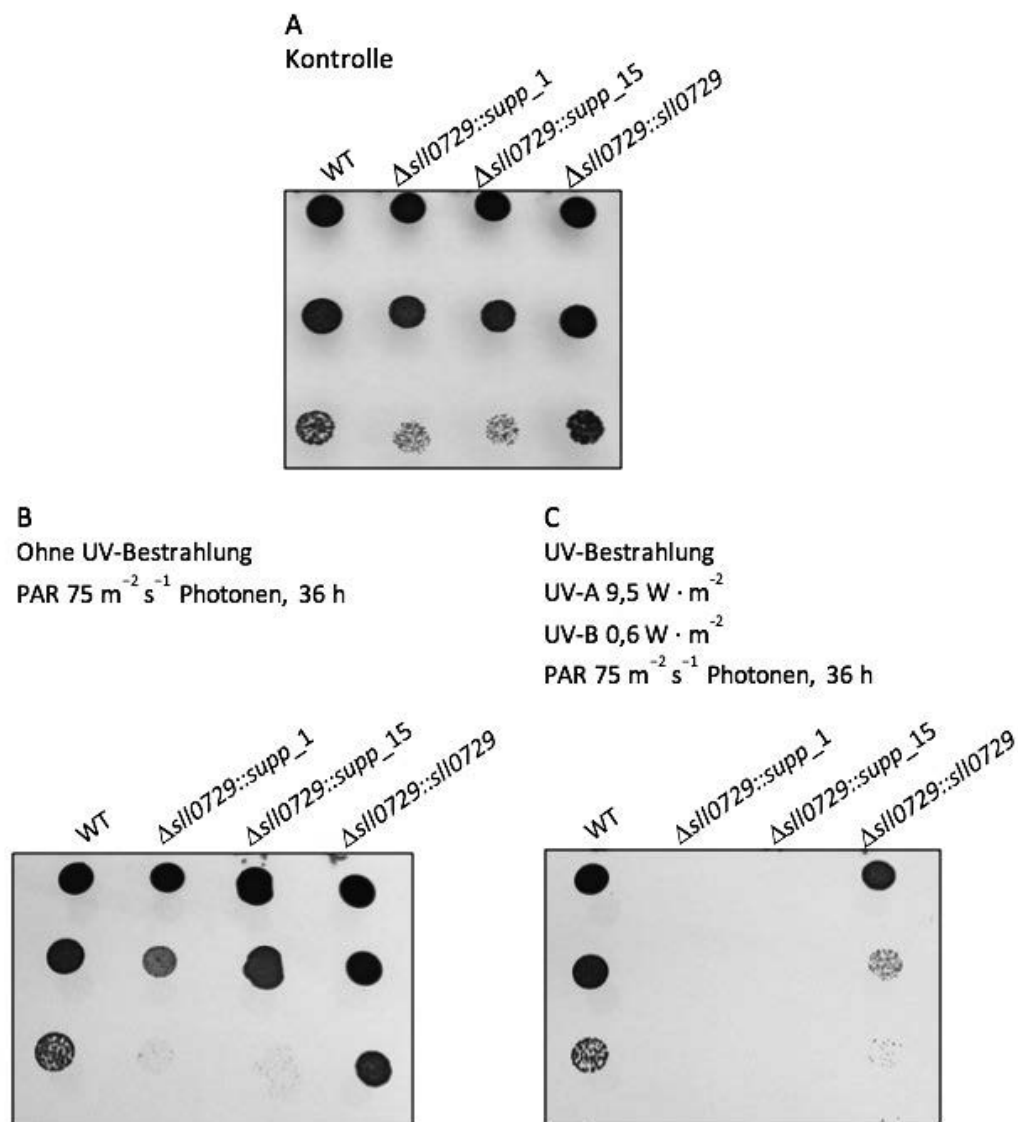


Abbildung 29 Untersuchung der UV-Toleranz

WT, Suppressormutanten und $\Delta sll0729::sll0729$. Bilder der angelegten Tropftests aus den behandelten Flüssigkulturen. **A** Kontrollplatte, ohne UV-Behandlung. **B** Kontrollplatte, Tropftest nach 36 h Inkubation der Zellen unter einer 400 nm UV cut-off Folie (Folex PR, Folex, Dreieich, Deutschland) und $75 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Photonen. **C** Tropftest nach UV-Bestrahlung UV-A $9,5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, UV-B $0,6 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, PAR $75 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Photonen, über eine Dauer von 36 h. Nach der Inkubation der Flüssigkulturen mit oder ohne UV-Bestrahlung wurden eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1000) angelegt und 5 μl wurden für den Tropftest auf Kobe-BG11 Platten ohne Antibiotikumzusatz getropft. Anschließend fand eine Inkubation über 5 d unter Standardbedingungen statt.

4.11 Einfluss von M.Ssp6803II auf die Genexpression in *Synechocystis* 6803

Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit lautet: Hat die DNA-Methylierung einen Einfluss auf die Genexpression in *Synechocystis* 6803? Um diese Frage zu beantworten wurde zu Beginn der Untersuchungen das Methylom von *Synechocystis* 6803 charakterisiert, vier Methyltransferasen und ihre kodierenden Gene identifiziert und entsprechende Deletionsmutanten generiert. Die ursprünglich erzeugte Mutante $\Delta sll0729$ zeigte phänotypische Unterschiede im Vergleich zum WT. Das häufige Vorkommen des GGCC Motivs (38.000 mal) im *Synechocystis* 6803 Genom ließ vermuten, dass es einen globalen MSp6803II-abhängigen Transkriptionsregulationsmechanismus geben könnte, da statistisch gesehen viele dieser Motive in Promotorbereichen liegen könnten. Daher wurde das Transkriptom der $\Delta sll0729$ Mutante untersucht, die jedoch zu keinen eindeutigen Ergebnissen führten (siehe Kapitel 4.7). Nur die zwei Gene *sll0470* und *sll1526* wiesen in allen Transkriptomuntersuchungen eine Veränderung in der Transkriptabundanz auf. Interessanterweise führte die Langzeitkultivierung der $\Delta sll0729$ Mutante zur Aufhebung des Phänotyps, vermutlich durch Suppressormutation(en). Stabile Suppressormutanten, die keine GGCC Methylierung aufwiesen, wurden zur erneuten Untersuchung des Transkriptoms herangezogen. Insgesamt wurden mittels Microarray Analysen 78 chromosomale Gene mit einer veränderte Transkriptabundanz in beiden Suppressormutanten im Vergleich zum WT detektiert (Tabelle 17). Ein besonderer Fokus lag auf den Genen *sll0470* und *sll1526*, die in allen Transkriptomuntersuchungen der originalen $\Delta sll0729$ Mutante eine signifikante Änderung in der Transkriptabundanz aufwiesen (Tabelle 16). Die Analysen zeigten für *sll0470* ebenfalls eine erhöhte Transkriptabundanz von bis zu 1,11 \log_2 FC in $\Delta sll0729::supp_15$ im Vergleich zum WT. In $\Delta sll0729::supp_1$ lag die Änderung der Transkriptabundanz für *sll0470* bei 0,61 \log_2 FC und fiel damit unter den gesetzten Grenzwert. Für *sll1526* konnte auf RNA-Ebene eine Reduktion der Transkripte, um -0,65 \log_2 FC ($\Delta sll0729::supp_1$) und um -0,6 \log_2 FC ($\Delta sll0729::supp_15$) detektiert werden. Diese Werte lagen unterhalb des gesetzten Grenzwertes von 1,00 \log_2 FC, zeigen aber wie in der ursprünglichen Mutante eine Tendenz zur verringerten Transkriptmenge (Abbildung 30). Diese Ergebnisse unterstreichen die Annahme, dass zumindest die Expression dieser zwei Gene direkt von der GGCC Methylierung beeinflusst wird.

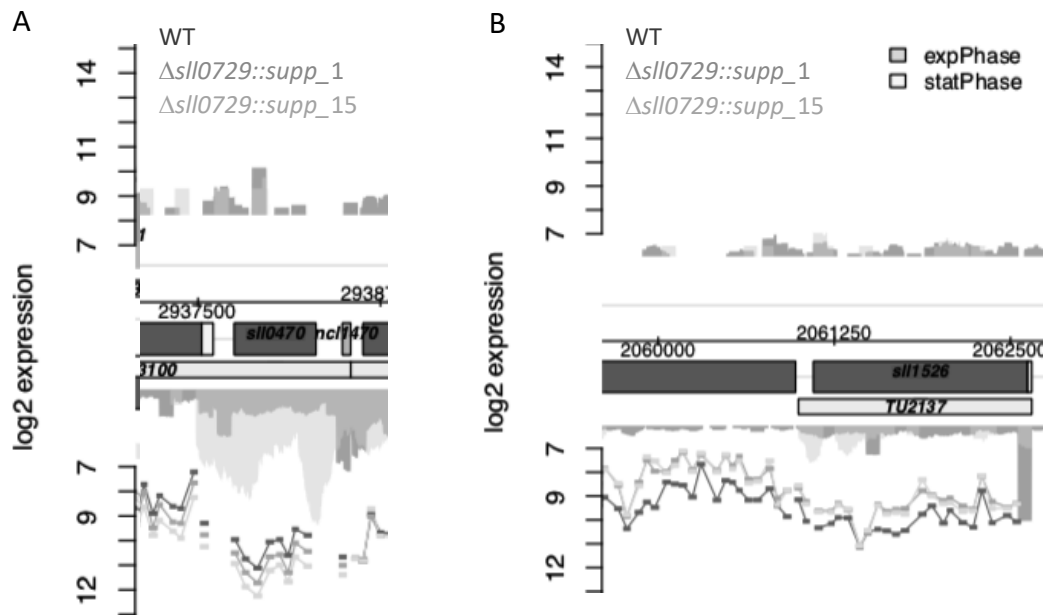


Abbildung 30 Genomplot der Microarray Untersuchungen von $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$. Veränderte Signalintensität spezifischer genetischer Gen-Loki in den Suppressormutanten im Vergleich zum WT. **A** Erhöhte Transkriptabundanz von *sll0470*. **B** Die Transkriptabundanz von *sll1526* ist leicht verringert.

Interessanterweise zeigten *in silico* Analysen der genetischen Loci, dass die Gene *sll0470* und *sll1526* ein GGCC Motiv innerhalb des -35 Elements, *upstream* der transkriptionellen Startsequenz (TSS) enthalten. Es wurden spezifisch Promotorsequenzen synthetisiert, die eine Punktmutation (GCGC) im GGCC Motiv aufwiesen. Natürliche Promotorelemente wurden aus *Synechocystis* 6803 amplifiziert (Abbildung 31).

	GGCC motif	-10 element	+1 (TSS)	fused to <i>luxAB</i>
<i>sll0470</i>	GGCT GGCC AAAGCTGGGACGGGGTGATAGTCTTGGTTAA.....CDS			
<i>sll0470m</i>	GGCT GCGC AAAGCTGGGACGGGGTGATAGTCTTGGTTAA.....CDS			
<i>sll1526</i>	ACTAG GGCC CCAAAGCCCCTTTCTTGTAAGCTAAGGGCTA.....CDS			
<i>sll1526m</i>	ACTAG GCGC CCAAAGCCCCTTTCTTGTAAGCTAAGGGCTA.....CDS			

Abbildung 31 Promotorsequenzen von *sll0470* und *sll1526*. Mutation (rot) im GGCC-Motiv (grün) zu GCGC, innerhalb des -35 Elements sind mit kleinem m am Genamen markiert. -10 Element und +1 transkriptionale Startstellen sind mit rot markiert. Die putativen Promotorelemente der vier Konstrukte wurden an *luxAB* fusioniert (markiert in grau).

Die mutierten und natürlichen Promotorelemente wurden *upstream* der *luxAB* Gene im pILA Vektorsystem (Kunert *et. al.*, 2000) kloniert und in einen neutralen genomischen Locus innerhalb des WT Chromosoms bzw. $\Delta sll0729::supp_15$ Chromosoms transformiert.

Anschließend fanden mit den erzeugten Stämmen Promotoraktivitätsbestimmungen (Baumgartner *et. al.*, 2016) statt. Dies ermöglichte die Betrachtung der Aktivität der Promotoren in Abhängigkeit von der GGCC Methylierung (Abbildung 32). Als Kontrolle wurde die Lumineszenz von Zellen des WT und der Suppressormutante ohne *luxAB* Gene gemessen, die zuvor mit und ohne Zusatz von Decanal inkubiert wurden. Für das Promotorelement *sll0470* mit natürlichem GGCC Motiv (*Psll0470*) wurde in den WT Zellen eine geringe Promotoraktivität gemessen. Diese unterschied sich kaum von den Hintergrundaktivitäten der Kontrollmessung. Im Suppressormutantenhintergrund von $\Delta sll0729::supp_15$ wurde für *Psll0470* eine Aktivierung des Promotorelements gemessen (374 a.u.). Die Mutation des Promotorelements von *sll0470* (*Psll0470M*) führte in $\Delta sll0729::supp_15$ zu einer Reduktion der Promotoraktivität um 75 % (102 a.u.). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass das GGCC Motiv *upstream* von *sll0470* einen Einfluss auf die Stärke des Promotors und somit auf die Genexpression von *sll0470* hat. Für *Psll1526* und *Psll1526M* lagen die Messungen sowohl in den WT Zellen, als auch in den Zellen der Suppressormutante unterhalb des Detektionslimits und unterschieden sich nicht von den Kontrollen. In der Arbeit von Kopf *et. al.*, 2014 konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von *sll1526* bei verschiedenen Umweltbedingungen wie z.B. Kältestress induziert wird. Daher wurden Zellen des WT *Synechocystis* 6803 und der Mutante $\Delta sll0729::supp_15$ Reporterkultur vor der Messung der Promotoraktivität bei 15 °C für 30 min inkubiert. Für *Psll1526* und *Psll1526M* lagen die gemessenen Daten wiederum unterhalb des Detektionslimits. Interessanterweise, zeigen die Daten für *Psll0470* im Reporterstamm $\Delta sll0729::supp_15$ auch bei 15 °C eine erhöhte Promotoraktivität im Vergleich zum WT. Das korreliert mit der gesteigerten Transkriptabundanz dieses Gens in Mutanten mit defekten *sll0729* Gen. Wie bereits unter Standardbedingungen beobachtet, ist die Promotoraktivität im Reporterstamm $\Delta sll0729::supp_15$ mit dem mutierten Promotorelement *Psll0470M* nach Kultivierung bei 15°C um ca. 60 % verringert (siehe Abbildung 23). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass eine globale Regulation der Genexpression durch die Methylierung des GG^{4m}CC Motivs in *Synechocystis* 6803 offensichtlich nicht vorhanden ist. Vielmehr deuten die Ergebnisse auf eine gezielte Regulation einzelner Gene durch DNA-Methylierung hin. So konnte experimentell gezeigt werden, dass die DNA-Methylierung des Methylierungsmotivs GG^{m4}CC eine regulatorische Funktion für die Aktivität des Promotorelements *Psll0470* hat.

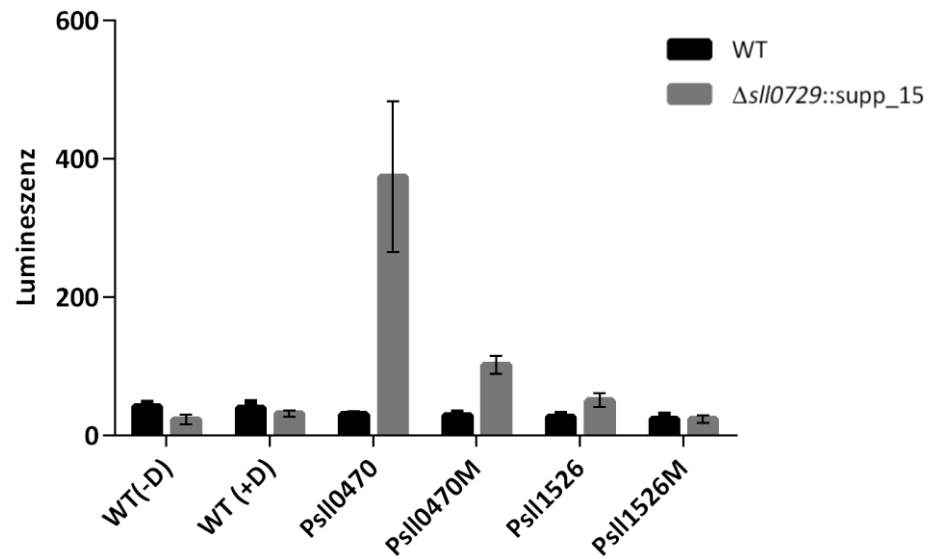


Abbildung 32 Ergebnisse Promotorgen Assays unter Standardbedingungen
 Biolumineszenzmessung, zur Bestimmung der Promotoraktivität von *sll0470* und *sll1526* in WT *Synechocystis* 6803 und $\Delta sll0729::supp_{15}$ *luxAB* Reporterstamm. Präfix P steht für WT-Promotorelement mit dem Motiv GGCC (*Psll0470* und *Psll1526*). Suffix M beschreibt die Punktmutation im Motiv GCGC (*Psll0470M* und *Psll1526M*). Die Messungen wurden an vierfachen biologischen Replikaten durchgeführt.

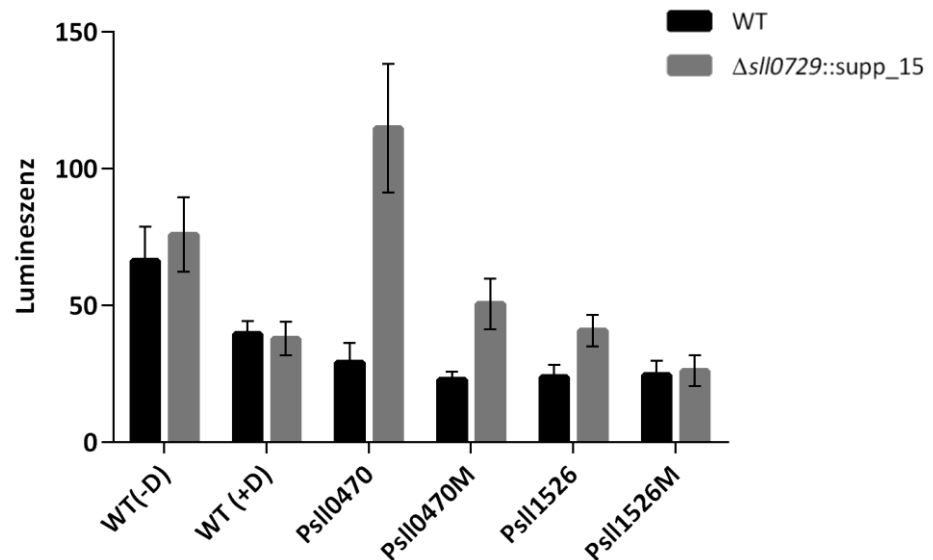


Abbildung 33 Ergebnisse Promotorgenassay nach Inkubation bei 15 °C
 Biolumineszenzmessung, zur Bestimmung der Promotoraktivität von *sll0470* und *sll1526* in WT *Synechocystis* 6803 und $\Delta sll0729::supp_{15}$ *luxAB* Reporterstamm, nach Inkubation der Zellen für 30 min bei 15 °C. Präfix P steht für WT-Promotorelement mit dem Motiv GGCC (*Psll0470* und *Psll1526*). Suffix M beschreibt die Punktmutation im Motiv GCGC (*Psll0470M* und *Psll1526M*). Die Messungen wurden an vierfachen biologischen Replikaten durchgeführt.

Auch das Proteom der stabilen Suppressormutanten $\Delta slI0729::supp_1$ und $\Delta slI0729::supp_15$ wurde analysiert, um den Einfluss von M.Ssp6803II auf die Genexpression zu untersuchen. Zusätzlich zur Untersuchung des totalen Proteomextraktes wurden auch die Membranfraktion analysiert. So konnten 1701 Proteine relativ quantifiziert werden. Im Proteom der Suppressormutanten konnten 13 Proteine mit signifikanter Änderung im Vergleich zum WT nachgewiesen werden (Tabelle 15).

Tabelle 15 Proteomanalysen der Suppressormutanten

Die Tabelle zeigt signifikant veränderter Proteine in den Suppressormutanten $\Delta slI0729::supp_1$ und $\Delta slI0729::supp_15$ im Vergleich zum WT. Die relativen Änderungen in der Proteinabundanz der Suppressormutanten ist im Vergleich zum WT als (\log_2) FC angegeben. Die Kulturen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und das totale Proteomextrakt, sowie die Membranfraktion wurden untersucht. (\log_2) FC >1 oder <-1; P-Wert < 0.01. Die Aufarbeitung der Proben und die Proteomanalysen wurden durch Dr. Stefan Mikkat am Proteomzentrum der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt.

Accession-nr. ^A	Zugangs-nr. ^B	Beschreibung	$\Delta slI0729::supp_1$ /WT		$\Delta slI0729::supp_15$ /WT	
			Membran-fraktion	Total-extrakt	Membran-fraktion	Total-extrakt
P73077	SlI1941	DNA Topoisomerase IV UE A, ParC	-1.84	n.n.	-2.05	n.n.
P73646	SlI1760	Homoserinkinase, ThrB	-1.08	n.n.	-1.19	n.n.
P73655	Slr1844	Tryptophan-tRNA Ligase, TrpS	-1.12	-1.16	-1.05	-1.11
P73956	SlI1414	Protein Thf1, Psb29	-1.09	-1.03	-1.03	-1.19
P74359	SlI1527	Unbekanntes Protein	-1.49	n.n.	-1.26	n.n.
P74360	SlI1526	Hypothetisches Protein	-1.11	-1.65	-0.99	-1.50
Q55612	Slr0776	UDP-3-O-Acylglucosamine N-Acyltransferase, LpxD	-1.45	-1.49	-1.24	-1.30
P74302	Slr0937	Unbekanntes Protein	n.n.	1.07	n.n.	1.41
P74332	Slr0959	Hypothetisches Protein	1.05	n.n.	0.92	n.n.
Q55982	SlI0660	4-Hydroxythreonin-4-Phosphat Dehydrogenase, PdxA	0.99	n.n.	1.01	n.n.
Q6YRQ7	Slr6097	Typ I <i>site-specific</i> Deoxyribonuklease	1.15	n.n.	1.24	n.n.
Q6YRQ8	Slr6096	Typ I RM System, M UE	1.21	1.62	1.59	1.91
Q6YRQ9	Slr6095	Typ I RM System, M UE, M.Ssp6803V	0.99	1.47	1.07	1.57

A: Uniprot Zugangsnummer

B: CyanoBase Zugangsnummer

n.n. nicht nachgewiesen

Insgesamt wurden im Proteom sechs Proteine mit erhöhter Abundanz detektiert. Die Methyltransferase M.Ssp6803V (Slr6095) ist in beiden Suppressormutanten mit einer erhöhten Abundanz im Vergleich zum WT vorhanden. Nachgewiesen wurde das Protein in der Membranfraktion und im Gesamtextrakt. M.Ssp6803V wird durch *slr6095* auf dem Plasmid pSYSX von *Synechocystis* 6803 kodiert (Hagemann *et. al.*, 2018). Die Ergebnisse

physiologischer Untersuchungen, der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten $\Delta slr6095$ Insertionsmutante, sind unter 4.4 nachzulesen.

Weiterhin konnte für Slr6096 und Slr6097 eine relative Erhöhung der Proteinabundanz in den Suppressormutanten im Vergleich zum WT gemessen werden. Annotiert sind die Proteine als Typ I Restriktionsmodifikationssystem (Slr6096) und Typ I spezifische Desoxyribonuklease. Im Gegensatz zu Slr6096, konnte Slr6097 nur in der Membranfraktion nachgewiesen werden. Kodiert werden beide Proteine durch die Gene *slr6096* und *slr6097*. Beide Gene werden in einer Transkriptionseinheit (TU6090) abgelesen. Sie sind neben *slr6095* auf dem Plasmid pSYSX lokalisiert. Sll0660, 4-Hydroxythreonine-4-phosphat Dehydrogenase (PdxA) ist in beiden Suppressorstämmen hochreguliert. Dieses Enzym katalysiert die NAD(P) abhängige Oxidation von 4-(Phosphoxy)-L-Threonin (HTP) zu 2-Amino-3-Oxo-4-(Phosphoxy)Buttersäure. Die Proteine Slr0937 und Slr0959 haben keine bekannte Funktion.

Sieben Proteine wiesen ein verringertes Proteinlevel auf. Dazu gehören die hypothetischen Proteine Sll1526, dessen mRNA reproduzierbar verringert gemessen wurde, und Sll1527. In beiden Suppressormutanten liegt ebenfalls ThrF1 mit einer reduzierten Proteinabundanz vor. LpxD (UDP-3-O-Acylglucosamine N-Acyltransferase), die am Lipopolysaccharid-Metabolismus beteiligt ist, zeigt in $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$ eine reduzierte Proteinabundanz. Die Tryptophan tRNA Ligase katalysiert in *Synechocystis* 6803 die Bindung von Tryptophan an die tRNA. Sowohl in der Membranfraktion, als auch im Gesamtextrakt ist die Proteinabundanz in beiden Suppressormutanten verringert. ThrB zeigt in den Membranfraktionen beider Suppressormutanten eine Verringerung in der Proteinabundanz um -1,08 ($\Delta sll0729::supp_1$) und -1,19 ($\Delta sll0729::supp_15$). Die Homoserinkinase wird durch *sll1760* kodiert und katalysiert die Phosphorylierungsreaktion von L-Homoserin zu L-Homoserinphosphat, unter Verbrauch von ATP. Besonders stark ausgeprägt im Proteom beider Suppressormutanten ist die Reduktion von Sll1941, der Topoisomerase IV UE A. In der Membranfraktion von $\Delta sll0729::supp_15$ ist Sll1941 um das Vierfache reduziert, während es in $\Delta sll0729::supp_1$ dreimal verringert ist. Um diesen Befund zu erhärten, wurde ein Sll1941 spezifischer Antikörper hergestellt (BaseClear), mit dessen Hilfe in Western-Blot Analysen die Reduktion der Topoisomerase IV UE A in $\Delta sll0729::supp_1$ im Vergleich zum WT bestätigt wurde. Von beiden Stämmen wurden 7,5 μ g Proteinextrakt für die Analyse verwendet. Der Sll1941 Antikörper detektierte das Protein in der erwarteten Größe von

101 kDa. Für die Suppressormutante konnte ein schwächeres Signal im Vergleich zum WT nachgewiesen werden (Abbildung 34).

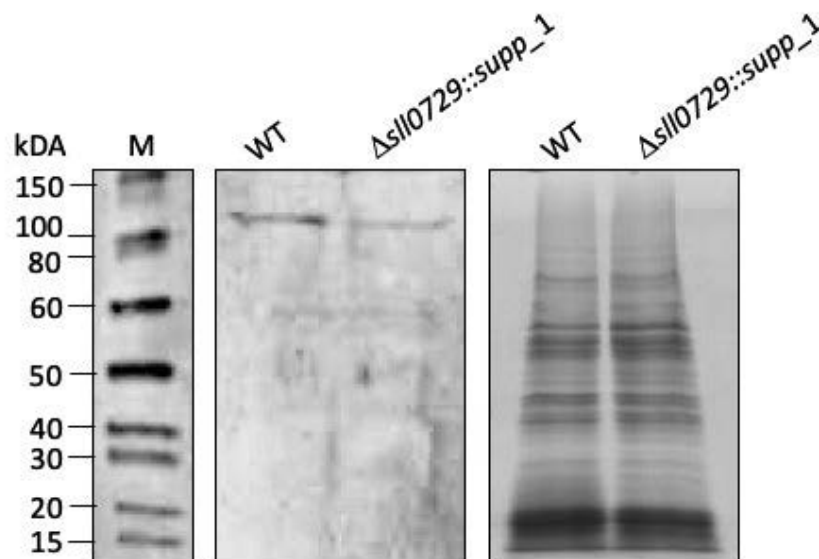


Abbildung 34 Western-Blot Analyse von Sll1941

Verifikation der reduzierten Proteinabundanz von Sll1941 in der Suppressormutante $\Delta sll0729::supp_1$ im Vergleich zum WT. Insgesamt wurden pro Tasche 7,5 μg gesamt Proteinextrakt verwendet. Sll1941 (schwarze Pfeile) wurde unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers detektiert. Das Signal wurde über Chemilumineszenz emittiert und der Röntgenfilm wurde Fotodokumentiert (mittleres Bild). Das Coomassie-Gel wurde mit 7,5 μg Proteinextrakt beladen und nach der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese in Coomassie-Brillant Blau R-250-Farbblösung für 1 h gefärbt. Mittels 40 % Methanol, 10 % Essigsäure wurde überschüssiges Coomassie gelöst und das Gel wurde Fotodokumentiert.

Auch auf mRNA Ebene konnte mittels Microarray Analysen gezeigt werden, dass die Transkriptabundanz von *sll1941* in beiden Suppressormutanten, im Vergleich zum WT verringert ist ($\Delta sll0729::supp_1$, $-0,87 \log_2 \text{FC}$ und $\Delta sll0729::supp_15$, $-1,00 \log_2 \text{FC}$; Abbildung 35).

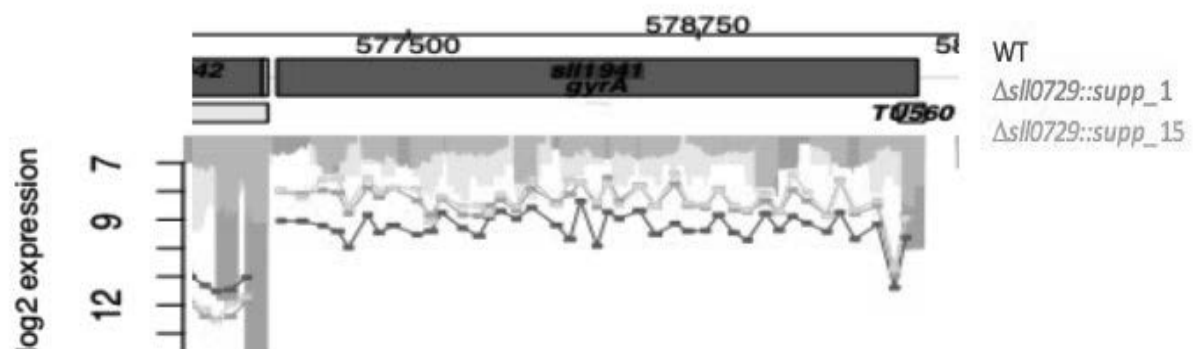


Abbildung 35 Genomplot der Microarray Untersuchungen von $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$

Signalintensität, um den genetischen Locus von *sll1941*. Reduzierte Abundanz der *sll1941* Transkripte in den Suppressormutanten im Vergleich zum WT. Zwei biologische und drei technische Replikate wurden für die Analysen verwendet.

Die Topoisomerase IV ist essentiell für die Chromosomen Segregation von *Synechocystis* 6803. Während der DNA-Replikation ist das Protein für die DNA-Dekatenierung topologisch verbundener Tochter-Chromosomen verantwortlich. Die Daten deuten darauf hin, dass die fehlende GGCC Methylierung evtl. zu Störungen in der DNA Replikation bzw. Chromosomensegregation führt. Die Reduktion der Topoisomerase IV UE A in der Suppressormutante könnte somit dazu beigetragen haben, die ursprünglich beobachteten starken phänotypischen Veränderungen in der originalen $\Delta sll0729$ Mutante auszugleichen. Allerdings konnten sowohl in der codierenden als auch der *upstream* Sequenz von *sll1941* keine Unterschiede in der DNA der Suppressormutanten im Vergleich zum WT gefunden werden.

5 Diskussion

Die Modifikation der DNA durch DNA-Methylierung fügt dem genetischen Code, eine zusätzliche Information bei (Casadesus, 2006). Intensive Forschung an eukaryotischen Zellen offenbarte häufig einen Einfluss, der epigenetischen Modifikation der DNA, auf die Genexpression sowie genomische Prägung (*Imprinting*), der X-Inaktivierung, Alterungsprozesse, Krebszellentwicklung und viele weitere Mechanismen (Brown *et. al.*, 2007; Csankovszki *et. al.*, 2001; Kaneda *et. al.*, 2004). Die Bedeutung der DNA-Methylierung in Prokaryoten ist weniger gut untersucht. Klassisch werden DNA-Methyltransferasen mit RM-Systemen in Verbindung gebracht und in diesem Zusammenhang funktional dem zellulären Abwehrsystem zugeschrieben (Blow *et. al.*, 2016). Aktuell werden jedoch immer häufiger *orphane* DNA-Methyltransferasen identifiziert, die keine korrespondierende Restriktionsendonukleasen besitzen (Casadesus, 2016). Die biologische Funktion der *orphanen* DNA-Methyltransferasen ist meist noch unklar. Aktuelle Forschungsergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass DNA-Methyltransferasen auch in Prokaryoten regulatorische Funktionen besitzen können. So wurde beispielsweise der Einfluss der Dam aus *E. coli* auf die Zellentwicklung, der DNA Replikation oder der Regulation der Genexpression beschrieben (Low und Casadesus 2008, Casadesus und Low 2013).

Innerhalb des ökologisch wichtigen Phylum Cyanobakterien sind bisher nur wenige Untersuchungen zur DNA-Methylierung vorgenommen worden. SMRT-Sequenzierung und Bisulfit-Sequenzierung ermöglichten die globale Untersuchung des Methyloms von *Synechocystis* 6803. Mittels Bisulfit-Sequenzierung kann C5-Methylcytosin zu 100 % detektiert werden, wohingegen SMRT-Sequenzierung C5-Methylcytosin nicht oder nur eingeschränkt detektiert. Da N4-Methylcytosin teilweise resistent gegenüber der Bisulfit-Behandlung ist, wird diese Methylierung nur zu 50 % detektiert (Vilkaitis und Klimasauskas, 1999) (siehe Abbildung 36). SMRT-Sequenzierung kann N6-Methyladenin und Cytosinmethylierungen im Genom detektieren (Flusberg *et. al.*, 2010). C5-Methylcytosin konnte in unseren Analysen nicht bestimmt werden. Daher ermöglicht die Kombination der beiden Methoden eine zuverlässige Unterscheidung von C5-Methylcytosin und N4-Methylcytosin, sowie die Detektion von N6-Methyladenin und sollte somit einen vollständigen Überblick über das *Synechocystis* 6803 Methylom erlauben.

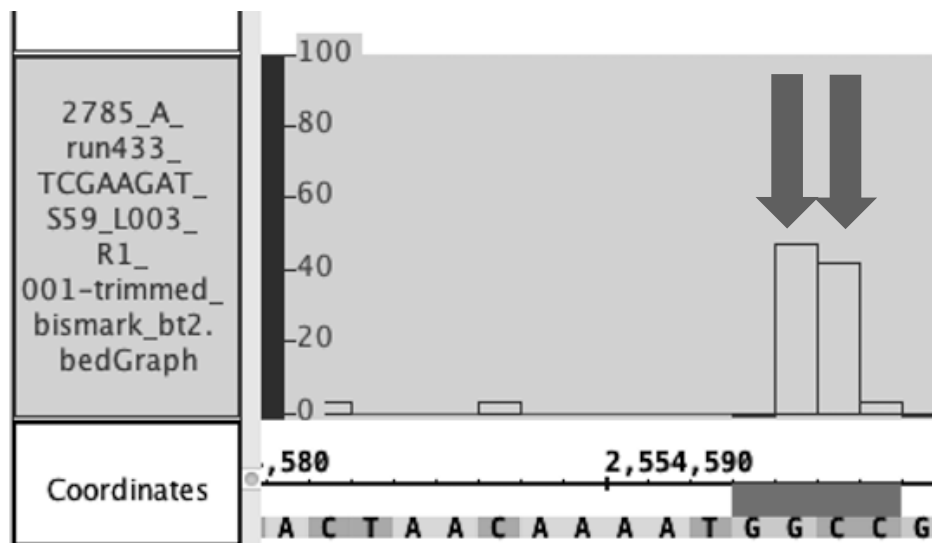


Abbildung 36 Modifikation der DNA im Motiv GGCC

Das Motiv GG^{m4}CC wird in *Synechocystis* 6803 in Bisulfitanalysen als bis zu 50 % methyliert angegeben. Die Modifikation der DNA findet auf beiden Strängen parallel statt. Die roten Pfeile zeigen die methylierten Positionen beider DNA-Stränge (Cytosin).

In einer umfassenden Studie wurden 2018 230 Prokaryoten, darunter zwei Cyanobakterien hinsichtlich ihrer DNA-Modifikation analysiert. In 93 % der Organismen wurde eine spezifische Methylierung der DNA detektiert und fast 48 % der untersuchten Organismen besaßen aktive Typ II Methyltransferasen (Blow *et. al.*, 2018). Der Modellorganismus *Synechocystis* 6803 eignete sich besonders zur Untersuchung von *orphanen* DNA-Methyltransferasen, da I) das Genom vollständig sequenziert vorliegt (Kaneko, 1996), II) das Transkriptom identifiziert wurde (Kopf *et. al.*, 2014), III) *in vitro* die Abwesenheit von Restriktionsendonukleasen überprüft wurde (Scharnagl *et. al.*, 1989), IV) die Modifikation der DNA durch DNA-Methylierung im Motiv CGATCG nachgewiesen wurde (Scharnagl *et. al.*, 1989).

In dieser Arbeit wurde erstmals das vollständige Methylom von *Synechocystis* 6803 charakterisiert. Das Methylom umfasst fünf spezifische Methylierungsmotive: ^{m5}CGATCG, G^{m6}ATC, GG^{m4}CC, GG^{m6}AN7TTGG/CCA^{m6}AN7TCC und GA^{m6}AGGC. Mit unterschiedlicher Häufigkeit sind diese im Genom von *Synechocystis* 6803 verteilt (siehe 4.1). Allen Methylierungsmotiven konnten spezifische Methyltransferasen zugeordnet werden. Zwei Motive (^{m5}CGATCG, G^{m6}ATC) und ihre korrespondierenden Methyltransferasen (M.Ssp6803I

und M.Ssp6803III) wurden bereits zuvor beschrieben und unabhängig in dieser Arbeit bestätigt (Scharnagl *et. al.*, 1998).

M.Ssp6803I – DNA-Methyltransferase methyliert das Motiv ^{m5}CGATCG und beeinflusst DNA-Reparaturmechanismen und die Stabilität der Chromosomen

Im Chromosom von *Synechocystis* 6803 wird die Methyltransferase M.Ssp6803I durch *slr0214* kodiert und methyliert spezifisch das Motiv ^mCGATCG (Scharnagl *et. al.*, 1998). Das im Motiv ^{m5}CGATCG das erste C⁵ methyliert vorliegt, konnte in dieser Arbeit mittels Bisulfit-Sequenzierung direkt belegt werden. Die Sequenz ist Teil des oktamerischen Palindroms GCGATCGC, welches als *highly iterated palindrome* (HIP1) bezeichnet wird. Allgemein kommen solche, sich in der Basenabfolge wiederholende palindrome Sequenzen in fast allen Prokaryoten vor. Sie sind hinsichtlich ihrer Länge, Häufigkeit und Organisation sehr divers. Eine Besonderheit des HIP1 Motivs ist die phylogenetische Verteilung innerhalb der Cyanobakterien (Robinson *et. al.*, 1995). Erstmals wurde HIP1 in *Synechococcus* PCC 6301 beschrieben. In diesem Cyanobakterium kommt das Motiv durchschnittlich alle 320 Nukleotide vor und ist vorwiegend in proteinkodierenden Regionen lokalisiert (Robinson *et. al.*, 1995). Im Chromosom von *Synechocystis* 6803 wurde das HIP1 Motiv alle 1131 Nukleotide nachgewiesen (Robinson *et. al.*, 1995; Kaneko *et. al.*, 1997). Es gibt große Schwankungen hinsichtlich der Verteilung des HIP Motivs innerhalb der DNA-Sequenzen der Plasmide (Kaneko *et al.*, 1997). In Genomen, in denen HIP1 nur wenig oder gar nicht vorkommt, wurden alternative HIP Motive, wie das Chi Motiv beschrieben. Auch neue HIP Motive wie GGCGCC, GCsGC, oder rCCGy sind von *Calothrix* PCC 7103, *Cyanothece* PCC 7122 und *Oscillatoria* PCC 10802 bekannt (Elhai, 2015). Trotz Jahrzehnte langer Forschung ist die Funktion des HIP1 Motivs noch immer ungeklärt. Auffällig ist jedoch die Assoziation des Motivs mit spezifischen DNA-Methyltransferasen, wie M.Ssp6803I oder M.Ssp6803III. Elhai postulierte 2015 die Theorie, M.Ssp6803I sei an Methylierungs-abhängiger *mismatch repair* der DNA beteiligt. Einen Zusammenhang zwischen HIP1 und der Erhaltung der Chromosomenstruktur in Cyanobakterien zeigten Xu *et. al.* (2018) auf. In dieser Arbeit zeigte die Δ *slr0214* Mutante einen UV-sensitiven Phänotyp im Vergleich zum WT. Dies könnte darauf hinweisen, dass M.Ssp6803I tatsächlich eine Funktion bei DNA-

Raparaturmechanismen oder einen Einfluss auf die Chromosomenstabilität übernimmt. Eine darüber hinausgehende Bedeutung von M.Ssp6803I für die Regulation der Genexpression konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Mittels DNA-Microarray Analysen konnte praktisch keine globalen Änderungen im Expressionsverhalten im Vergleich zum WT gefunden werden. Nur ein Gen (*sll0382*), das für ein Protein unbekannter Funktion kodiert, zeigte eine Veränderung in der Transkriptabundanz im Vergleich zum WT. Die Ergebnisse stehen im Kontrast zur Häufigkeit des ^{m5}CGATCG Motivs mit 29852 Erkennungssequenzen im Genom von *Synechocystis* 6803. Doch auch für die HIP1 Sequenz konnte kein direkter Zusammenhang mit globaler Genexpressionsregulationsmechanismen nachgewiesen werden (Xu *et. al.*, 2018).

Allerdings scheint auch hier eine genauere Analyse einzelner Gene wichtig zu sein. Nicht alle CGATCG Sequenzen in *Synechocystis* 6803 scheinen vollständig methyliert zu sein. Auf dem Plasmid pSYSa wurde eine praktisch unmethylierte CGATCG Sequenz gefunden, die sich inmitten von Genen für ein CRISPR_System befinden (Scholz *et. al.*, 2019). Diese starke Hypomethylierung scheint sich auf die Funktion des CRISPR_Systems auszuwirken, denn in der Δ *slr0214* Mutante, wo die ^{m5}CGATCG Methylierung vollständig fehlt, kam es zu einer Verringerung der Konjugationseffizienz um 50 % im Vergleich zum WT. Diese Ergebnisse spiegeln eine noch unbekannt Funktion der DNA-Methylierung in der CRISPR-vermittelten DNA-Transformation und Konjugation wider (Scholz *et. al.*, 2019).

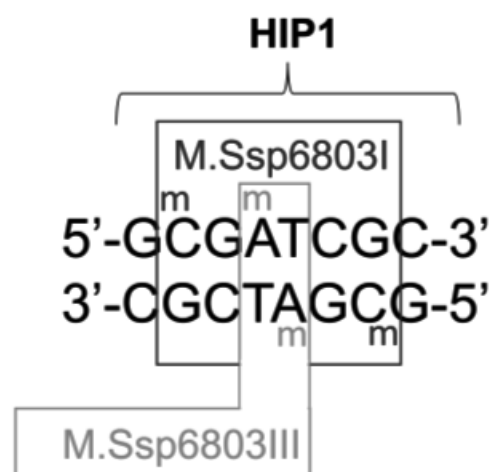


Abbildung 37 HIP1 Sequenz

Die HIP1 Sequenz mit den enthaltenen DNA-Methylierungsmotiven spezifisch für die DNA-Methyltransferasen M-Ssp6803I und M-Ssp6803III aus *Synechocystis* 6803. Modifiziert nach Scholz *et. al.*, 2019.

Das Motiv G^{m6}ATC bildet auch einen Teil der HIP1 Sequenz und kommt, wie m⁵CGATCG, darüber hinaus auch häufig unabhängig im Genom von *Synechocystis* 6803 vor (siehe Abbildung 37) (Elhai, 2015). Das Gen *slr1803* kodiert für die DNA-Methyltransferase M.Ssp6803III, welche G^{m6}ATC methyliert und essentiell für die Viabilität des Organismus ist (Scharnagl *et. al.*, 1998). In *Anabena* PCC 7120 methyliert die DNA-Methyltransferase DmtA das Methylierungsmotiv GATC. DmtA ist ebenso wichtig für das Überleben der Zelle, da keine *knockout* Mutante unter Laborbedingungen erzeugt werden konnte (Matveyev *et. al.*, 2001). Es wird angenommen, dass die DNA-Methyltransferasen, die spezifisch Motive innerhalb der HIP Sequenz methylieren, verschiedene biologische Funktionen übernehmen (Elhai, 2015). Die physiologische Funktion von M.Ssp6803III in *Synechocystis* 6803 ist unbekannt, da das Fehlen einer segregierten Mutante weitergehende Studien sehr einschränkt. Die DNA-Methyltransferase Dam aus *E. coli* ist an verschiedenen Mechanismen, wie der Regulation der Genexpression (1.3.2), der Chromosomen Segregation, oder DNA-Reperaturmechanismen beteiligt (Marinus und Morris 1974; Løbner-Olesen und Skarstad 1988). Dam ist nicht essentiell für die Aufrechterhaltung der Zellviabilität von *E. coli*, ihr Verlust führt im Laborversuch jedoch zur Erhöhung der Mutationsrate. Marinus und Morris schlussfolgerten, dass Dam aus *E. coli* eine Funktion in der DNA-Replikation hat (1.3.2) (Marinus und Morris, 1974). Vermutlich unterscheidet sich der Replikationsmechanismus von *Synechocystis* 6803 von dem in *E.coli*, was auf der einen Seite die essentielle Rolle von Dam (Scharnagl *et. al.*, 1998) sowie auf der anderen Seite die Beteiligung des DnaA Proteins betrifft (Langer *et. al.*, 1996).

M.Ssp6803II – DNA-Methyltransferase mit diversen biologischen Funktionen

Die DNA-Methyltransferase M.Ssp6803II wird im Chromosom von *Synechocystis* 6803 durch *sll0729* kodiert. Sie katalysiert die N4-Methylierung des zentralen Cytosins im Motiv GG^{m4}CC. Mittels SMRT-Sequenzierung konnten 38.512 Methylierungsmotive im Genom von *Synechocystis* 6803 detektiert werden. Die Deletion von *sll0729* führte zunächst zu starken phänotypischen Änderungen in der Mutante. So zeigte die Mutante eine Reduktion im Chlorophyll a Gehalt und wies eine Verringerung im Wachstum im Vergleich zum WT auf. Die hohe Anzahl detektierter GG^{m4}CC Motive im Genom von *Synechocystis* 6803 und der

deutlichen phänotypischen Änderungen der $\Delta sII0729$ Mutante ließen vermuten, dass die Methylierung von GG^{m4}CC einen Einfluss auf die Genexpression hat. Daher wurden DNA-Microarray Analysen durchgeführt. Entgegen erster Annahmen zeigten nur wenige Gene eine signifikante Änderung in der Transkriptabundanz im Vergleich zum WT, darüber hinaus waren diese Änderungen jedoch nicht konstant. Die Wiederholung der DNA-Microarray Analysen zeigten bei jedem Experiment unterschiedliche Gene mit veränderter Transkriptabundanz, nur zwei Gene zeigten reproduzierbare Veränderungen.

Zusätzlich wiesen nur wenige der transkriptionell veränderten Gene ein GG^{m4}CC Motiv im Promotorbereich auf. Der Einfluss der DNA-Methylierung auf die Genexpression wurde auch im *Mycobacterium tuberculosis* untersucht. Dabei zeigte der Stamm L1 keine Änderung in der Genexpression in Abhängigkeit der DNA-Methylierung. Für den Stamm L4 konnten hingegen 8 Gene detektiert werden, die vermutlich durch fehlende DNA-Methylierungen in der *upstream* Region der Gene zur Veränderung der Genexpression führen (Gomez-Gonzalez *et. al.*, 2019). Zehn Gene mit konstant veränderter Genexpression wurden in zwei *Helicobacter pylori* Stämmen beschrieben, wobei in den Einzellexperimenten ebenfalls erheblich höhere Varianzen gefunden wurden (Estibariz *et. al.*, 2019). Sowohl in *Mycobacterium tuberculosis* L4, als auch in *Helicobacter pylori* gab es neben diesen Veränderungen viele weitere Änderungen der Genexpression, die auf indirekte Effekte hinweisen (Gomez-Gonzalez *et. al.*, 2019; Estibariz *et. al.*, 2019). In *Synechocystis* 6803 wurden zwei Gene (*sII0470* und *sII1526*) mit konstanter Änderung in der Transkriptabundanz in allen Microarray Analysen erfasst. Beide Gene enthalten im putativen Promotorbereich das Methylierungsmotiv GG^{m4}CC. Die hier erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die gemessenen Änderungen in der Transkriptabundanz vieler Gene nicht direkt durch die Methylierung von GG^{m4}CC verursacht wurden. Diese Ansicht wird auch dadurch unterstützt, dass in den Suppressormutanten, die keine GGCC-Methylierung aber stabiles Wachstum aufweisen, ebenfalls nur wenige Gene eine Änderung der Genexpression zeigten.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei den Genexpressionsuntersuchungen der ursprünglichen $\Delta sII0729$ Mutante eher um indirekte Änderungen handelt, lieferten phänotypische Untersuchungen. Nach mehreren Generationen wurde eine schrittweise Aufhebung des charakteristischen $\Delta sII0729$ Pigmentierungsphänotyps beobachtet. Aus einer heterogenen $\Delta sII0729$ Kultur wurden spontan auftretende Suppressormutanten isoliert. Bereits 1978 beschrieben Coulondre *et. al.*, dass Cytosinmethylierung ein Hotspot

für Punktmutationen in *E. coli* sei (Coulondre *et. al.*, 1978). Aber auch in *Listerien*, *Campylobacter*, *Salmonella* und anderen Bakterien wurde die DNA-Methylierung mit Hypermutation in Verbindung gebracht (Cherry, 2018). Die isolierten Suppressormutanten waren wie die originale $\Delta sll0729$ Mutante vollständig segregiert und wiesen einen funktionalen Defekt der Methyltransferase M.Ssp6803II auf. Zwei Isolate wurden für weitere Untersuchungen kultiviert ($\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$). Phänotypische Untersuchungen zeigten einen WT ähnlichen Phänotyp der Suppressormutanten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der beobachtete charakteristische Phänotyp der $\Delta sll0729$ Mutante nur indirekt durch die fehlende DNA-Methylierung im GG^{m4}CC Motiv verursacht wurde und dass es durch mögliche Mutationen in den Suppressorstämmen zum Ausgleich dieser sekundären Effekte kam. Die Verwendung heterogener Kulturen zusammengesetzt aus $\Delta sll0729$ Mutante und Suppressormutanten, könnte die Inkonsistenz der durchgeführten DNA-Microarray Analysen erklären.

Die stabilen Suppressormutanten erlaubten nun eine gezielte Untersuchung der Auswirkung fehlender GGCC-Methylierung. Daher wurden erneut DNA-Microarray Analysen der stabilen Suppressormutanten $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$ durchgeführt. Neben einigen anderen Genen konnte tendenziell die Änderung in der Transkriptabundanz für *sll1526* und *sll0470* detektiert werden. Diese Gene zeigten bereits in allen vorherigen DNA-Microarray Analysen eine Veränderung in der Transkriptabundanz. *In silico* Analysen der genetischen Loci zeigten, dass die Gene *sll0470* und *sll1526* ein GGCC Motiv innerhalb des -35 Elements, *upstream* der transkriptionellen Startsequenz (TSS) enthalten. Da in Bakterien die -35 Region entscheidend für die Promotoraktivität ist, waren *sll0470* und *sll1526* interessante Kandidaten, um zu untersuchen, ob die DNA-Methylierung des GG^{m4}CC Motivs einen direkten Einfluss auf die Promotoraktivität dieser Gene hat. *Upstream* der *luxAB* Gene wurden mutierte (GCGC) und natürlichen (GGCC) Promotorelemente im pilA Vektorsystem (Kunert *et. al.*, 2000) kloniert und in einen neutralen genomischen Locus innerhalb des WT Chromosoms bzw. $\Delta sll0729::supp_15$ Chromosoms transformiert. Anschließend fanden mit den erzeugten Klonen Promotorassays (Baumgartner *et. al.*, 2016) statt. Da es nicht möglich war stabile $\Delta sll0729$ Mutante zu kultivieren, wurde die Suppressormutante $\Delta sll0729::supp_15$ für die Experimente verwendet. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die unbekannte(n) Mutation(en) in der Suppressormutante ein

Methylierungs-unabhängiger Einfluss auf die Promotoraktivität ausgeübt wird. Die Ergebnisse zeigten für das Promotorelement Ps//0470, dass die Spezifität des GGCC Motiv und der Methylierungsstatus des Motivs unter Standardbedingungen und bei 15 °C einen Einfluss auf die Stärke des Promotors hat. Der Verlust der Methylierung führt zur verstärkten Expression von *s//0470*, wie es auch in den Genexpressionsuntersuchungen mit Mutanten ohne GGCC-Methylierung festgestellt wurde. Unter Verwendung der gleichen experimentellen Bedingungen lagen die Messungen für die Promotorelemente von *s//1526* in den WT- und den suppressormutanten Zellen unterhalb des Detektionslimits. Kopf *et. al.*, zeigten 2014, dass die Genexpression von *s//1526* unter Kältestress induziert wird. Die Ergebnisse des Promotorassays weisen darauf hin, dass diese Induktion unabhängig vom GGCC Motiv ist. Es konnte kein Einfluss auf die Genexpression von *s//1526* in Abhängigkeit vom Methylierungsmotiv GGCC nachgewiesen werden. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der DNA-Microarray Analysen und der Promotorassays darauf hin, dass eine globale Regulation der Genexpression durch die Methylierung des GG^{4m}CC Motivs offensichtlich in *Synechocystis* 6803 nicht vorhanden ist. Vielmehr scheint eine gezielte Regulation spezifischer Gene, wie *s//0470* statt zu finden. Die Gene *s//0470* und *s//1526* sind aktuell nicht charakterisiert. Der Proteinabgleich mit der Pfam Datenbank und BlastP Analysen zeigten für das 186 AA lange Protein Sll0470 eine DUF2808 Domäne von Position 44 bis 184 (Abbildung 45). Diese Domäne mit unbekannter Funktion wurde bisher ausschließlich in Cyanobakterien detektiert. Das zweite unbekanntes Protein, kodiert durch *s//1526*, kommt hingegen nur in wenigen Cyanobakterien und einigen Proteobakterien vor. Unter Verwendung der Pfam Datenbank zeigte der Proteinabgleich zwei konservierte Domänen. Eine Methyltransferase Domäne (pfam13649) und eine regulatorische Methyltransferase Domäne (pfam10119) (Abbildung 46). Die regulatorische Domäne beeinflusst die Aktivität von Methyltransferasen. BlastP Analysen zeigten weiterhin, dass die pfam13649 Domäne mit SmtA (COG0500) überlappen (Abbildung 46). Die SmtA Superfamilie beinhaltet S-Adenosyl-L-Methionin abhängige Methyltransferasen der Klasse I. Diese Enzyme erkennen unterschiedliche Substrate wie kleine Moleküle, Fette oder DNA und methylieren eine große Anzahl an Atomen, wie Stickstoff, Sauerstoff oder Kohlenstoff. Das Sll1526 die zwei Domänen pfam13649 und pfam10119 enthält, lässt vermuten das es sich bei diesem Protein um eine Methyltransferase handelt, dessen Substratspezifität noch

nicht identifiziert wurde. Die Frage, ob die Proteine Sll1526 und Sll0470 funktional verbunden sind kann noch nicht geklärt werden.

Zur Untersuchung der biologischen Funktion von M.Ssp6803II wurden weiterhin phänotypische Untersuchungen durchgeführt. Mikroskopische Betrachtung der Zellen der Suppressormutanten ergaben eine Veränderung in der Zellgröße. Sowohl Kultivierungsbedingungen unter Raumluft, als auch unter CO₂ Begasung zeigten eine signifikante Verringerung im Zelldurchmesser der Suppressormutanten. Eine Korrelation zwischen der Zellgröße und dem DNA-Gehalt konnte in *Synechococcus elongatus* beobachtet werden (Zheng und O'Shea, 2017). Unsere Untersuchungen der Suppressormutanten zeigten neben der kleineren Zellgröße auch eine Verringerung im DNA-Gehalt. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Chromosomenanzahl in *Synechocystis* 6803 in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen ist. Diese Beobachtung ähnelt den Beobachtungen von Zerulla *et. al.* (2016). In *Prochlorococcus* Stämmen mit kleinen redundanzfreien Genomen (1,66 – 1,74 Mb) führt UV-Strahlung zur Erhöhung der Mutationsrate (Osburne *et. al.*, 2009). Wiederholte UV-Strahlung führt in *E. coli* zu Mutationen verschiedener Gene, die in an der DNA-Replikation und DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind (Alcantara-Diaz *et. al.*, 2004). Osburne *et. al.*, spekulierte das *E. coli* Stämme mit größerem Genom tolerant gegenüber Mutationen durch UV-Strahlung seien (Osburne *et. al.*, 2009). Untersuchungen der Suppressormutanten unter UV-Stress zeigten eine deutliche Verschlechterung der Viabilität der Zellen im Vergleich zum WT, was auf ein vermindertes Vermögen zum Reparieren oder direkt auf die verminderte Chromosomenzahl zurückzuführen sein könnte. Dies könnte auf einen Einfluss von M.Ssp6803II auf die Chromosomenstabilität, DNA-Replikation oder DNA-Reparaturmechanismen hinweisen. Es muss jedoch auch berücksichtigt werden das durch die Verringerung der Zellgröße das Oberflächen-Volumen-Verhältnis in den Suppressormutanten größer wird. Dies erhöht die Angriffsfläche der Suppressormutanten für die UV-Strahlung.

Ein weiterer Hinweis auf die Funktion von M.Ssp6803II lieferten Proteomanalysen der Suppressormutanten. Insgesamt wurden im Proteom der Suppressormutanten sechs Proteine mit erhöhter Abundanz und sieben Proteine mit verringertem Proteinlevel detektiert. Die Topoisomerase IV UE A war in den Suppressorstämmen bis zum Vierfachen im Vergleich zum WT reduziert. Durch Änderungen in der Verknüpfungszahl der DNA-

Stränge, können Topoisomerasen dynamische Veränderungen in der DNA-Topologie ausgleichen. Diese dynamischen Veränderungen finden beispielsweise während und nach der DNA-Replikation statt (Espeli und Mariani, 2004). Durch topologische Veränderungen kann die DNA-Topoisomerase auch die Expression von Genen beeinflussen (Dorman und Dorman, 2016). Topoisomerasen werden entsprechend ihrer Funktion in zwei Familien eingeteilt. Die Typ I Topoisomerasen ermöglichen eine DNA-Strangpassage durch einen Strangbruch. In *E. coli* wurden zwei Typ IA Topoisomerasen beschrieben, die ohne Energiequelle die Spaltungsreaktion der DNA katalysieren. Diese sind die Topoisomerase I und III. Die Typ II Topoisomerasen erzeugen einen vorübergehenden Doppelstrangbruch in der DNA, um die Passage eines DNA-Moleküls zu gewährleisten (Champoux, 2001). Für die Hydrolyse der DNA brauchen diese Typ II Topoisomerasen ATP. Um die Stabilität des Genoms während der Reaktion zu gewährleisten binden die Typ II Topoisomerasen über kovalente Bindung die 5'Enden der DNA Stränge (Deweese *et. al.*, 2009). In *E.coli* werden die Gyrase und die Topoisomerase IV den Typ II Topoisomerasen zugeordnet (Wang *et. al.*, 2008). In Abbildung 14 ist ihr Wirkungsmechanismus dargestellt. Die DNA-Gyrase beseitigt positiv *supercoiled* DNA vor dem Replikationsprozess. Die Hauptfunktion der Topoisomerase IV ist die Trennung der Tochter-Chromsomen nach der DNA-Replikation, relaxieren negativer Superhelices und entknotet DNA (Deibler *et. al.*, 2001).

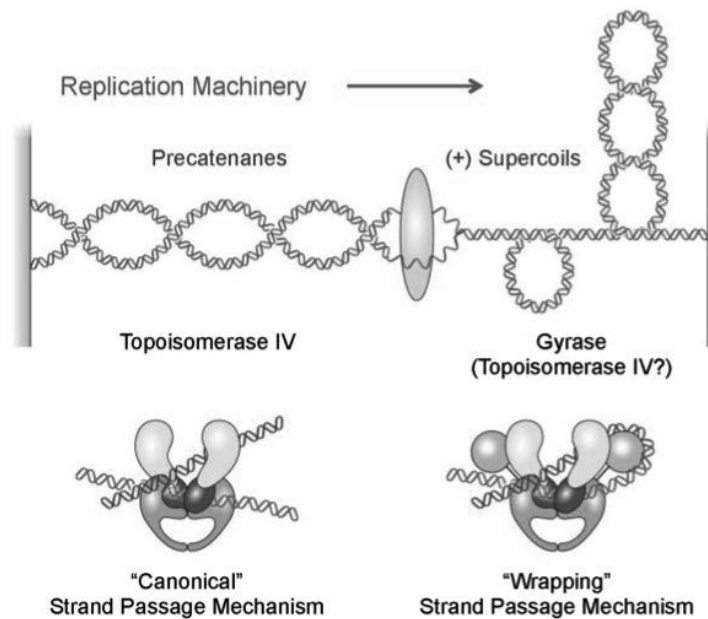


Abbildung 38 Wirkmechanismen der Topoisomerasen II

Die Gyrase entspannt positiv *supercoiled* DNA über *wrapping*. Die Topoisomerase IV trennt nach der Replikation entstandene Tochterstränge (*canonical*). (Ashley et. al., 2017)

Durch die Verringerung der Topoisomerase IV in den Suppressormutanten scheint die gezielte Entknotung der Tochterstränge nach der DNA-Replikation zu fehlen. Dies führt zu Veränderungen in der DNA-Topologie, was zur Veränderung in der Affinität von einigen DNA bindenden Protein führen kann (Dorman und Dorman, 2016). Dies hat Auswirkungen auf die DNA-Replikation in *Synechocystis* 6803 zu haben. Die Störung der DNA-Replikation könnte die Verringerung des DNA-Gehalts in den Suppressormutanten und die Verringerung der Zellgröße im Vergleich zum WT erklären. In anderen Organismen wurde bereits eine Korrelation der Zellgröße mit dem DNA-Gehalt der Zelle beschrieben (Zheng und O'Shea, 2017). Die Methylierung des GGCC Motivs durch M.Ssp6803II scheint keinen direkten Effekt auf die Genexpressionsregulation zu haben. Die Ergebnisse weisen eher darauf hin, dass es einen regulatorischen Effekt der DNA-Replikation über die DNA Organisation gibt. Diese Theorie wird durch die Akkumulation von Slr0937 in den Suppressormutanten bestärkt. Das Protein enthält die Domäne TIGR02168, welche für die DNA-Segregation von Bedeutung ist. *In silico* Analysen haben gezeigt, dass *sll1941* ein GGCC Motiv im Promotorbereich enthält. Das macht *sll1941* zu einem interessanten Kandidaten für weiterführende Promotorassay Analysen.

M.Ssp6803IV – essentielle DNA-Methyltransferase mit unbekannter Funktion methyliert das Motiv GA^{m6}AGGC

Das Motiv GA^{m6}AGGC wurde bisher ausschließlich in *Synechocystis* identifiziert. Das bifunktionale Enzym Eco57I aus *E. coli* erkennt und methyliert das verwandte Motiv CTGA^{m6}AG in Abhängigkeit von S-Adenosyl-L-Methionin. Ein ähnliches Methylierungsenzym wird in *Synechocystis* 6803 durch das Gen *slr6050* auf dem Plasmid pSYSX kodiert. Neben REBASE Daten zeigten *in silico* Analysen das *slr6050* eine ECO57I Domäne besitzt. Gene können über horizontalen Gentransfer von anderen Organismen erworben werden. Diese können deaktiviert werden, wenn die Gene keine Funktion für den Organismus haben oder um den Organismus vor ihrer Funktion zu schützen. Häufig führt der Erwerb neuer Gene jedoch zur Erweiterung des genetischen Pools und zur Anpassung an neue Habitate. Als natürlich kompetenter Organismus kann *Synechocystis* 6803 über homologe Rekombination Fremd-DNA in die eigene chromosomale oder Plasmid-DNA integrieren (Barten und Lill, 1995). Es ist anzunehmen, dass die extern erworbene DNA-Methyltransferase ursprünglich das Motiv CTGA^{m6}AG erkannt und ihre Spezifität entsprechend dem Wirtsorganismus *Synechocystis* 6803 angepasst hat. Das die Sequenzspezifität von Eco57I biotechnologisch verändert werden kann, zeigten Rimseliene *et. al.* (Rimseliene *et. al.*, 2003. Saravanan *et. al.*, 2008). Blastp Analysen zeigten Übereinstimmungen in vier S-Adenosyl-Methionin abhängige Methyltransferase verschiedener Cyanobakterien (*Microcystis aeruginosa*, *Scytonema millei*, *Dolichospermum planctonicum* und *Anabaena sp.* WA101). Daher wurde hier vorläufig geschlussfolgert, dass *slr6050* für M.Ssp6803IV kodiert und vermutlich das Motiv GA^{m6}AGGC methyliert. Alle experimentellen Versuche *slr6050* zu deletieren, resultierten in einer unvollständig segregierten Δ *slr6050* Mutante. Dies weist darauf hin, dass die Funktion von M.Ssp6803IV essentiell für die Viabilität des Organismus ist.

M.Ssp6803V – DNA-Methyltransferase methyliert das Motiv GG^{m6}AN7TTGG/CCA^{m6}AN7TCC und beeinflusst die Verarbeitung genetischer Informationen

Die DNA-Methyltransferase M.Ssp6803V wird durch *slr6095* kodiert und methyliert das Motiv GG^{m6}AN7TTGG/CCA^{m6}AN7TCC. Physiologische Untersuchungen der vollständig segregierten Δ *slr6095* Mutante ergaben keine auffälligen Unterschiede im Wachstumsverhalten, zellulärem Absorptionsspektrum oder der Zellgröße unter Laborbedingungen. Auch unter UV-Strahlung verhielt sich die Mutante WT-ähnlich. Es wird angenommen, dass M.Ssp6803V keinen Einfluss auf DNA-Reparaturmechanismen hat. Untersuchungen des Proteoms zeigten für die Mutante Δ *slr6095* nur geringe Änderungen im Vergleich zum WT. Eine verringerte Proteinabundanz von M.Ssp6803V konnte nachgewiesen werden ((log₂) FC -1,37 Membranfraktion; (log₂) FC -2,92 Totalextrakt). Es ist deutlich, dass die Insertionsmutation keine vollständige Deletion von *slr6095* zu Folge hat oder eine mit WT *Synechosystis* 6803 kontaminierte Δ *slr6095* Kultur untersucht wurde. Der Transkriptions-Repressor NrdR weist in der Δ *slr6095* Mutante eine verringerte Proteinabundanz im Vergleich zum WT auf (Membranfraktion, (log₂) FC -1,19). NrdR reprimiert die Transkription von Ribonukleotid Reduktase Genen, wie *nrdA* durch Bindung an *nrdR*-Boxen. Durch die Verringerung des Proteins könnte der Anstieg in der Proteinabundanz von Ribonukleotid-Diphosphat Reduktase UE Alpha (NrdA) ((log₂) FC 1,11 Totalextrakt) begründet sein. Die Synthese von Desoxyribonukleotiden wird durch NrdA katalysiert, da es die 2'-Hydroxygruppe der Ribonukleotiden reduziert. Somit ist das Protein an der DNA-Replikation beteiligt. In *E. coli* hatte die Deletion von NrdR Genen physiologisch keinen Effekt auf das Wachstumsverhalten. Mittels Transkriptom Analysen wurde die Erhöhung der Ribonukleotid Reduktase in den *E. coli* Mutanten nachgewiesen (Dreux *et. al.*, 2015). Auch in *Pseudomonas aeruginosa* erhöhte sich die Transkriptabundanz der Ribonukleotid Reduktase Gene in NrdR Deletionsmutanten (Crespo *et. al.*, 2015). Die Untersuchung des Proteoms von Δ *slr6095* weist darauf hin das M.Ssp6803V an der Verarbeitung genetischer Informationen beteiligt sein könnte.

Sll8009 hat keinen Einfluss auf die DNA-Methylierung in *Synechocystis* 6803

Das Gen *sll8009* ist in UniProt als Type I RM System Methyltransferase Untereinheit annotiert. Auf dem Plasmid pSYSG kodieren neben *sll8009*, die Gene *sll8006* (Substratspezifische Untereinheit) und *sll8049* (Restriktionendonuklease Untereinheit). Die drei Gene könnten zusammen ein vollständiges RM-System des Typ I bilden. Der N-terminale Bereich der putativen Methyltransferase ist um 156 Aminosäuren verkürzt. Die fehlende Sequenz ist teilweise in *ssl8010* und in der intergenetischen Region zwischen *ssl8010* und *sll8009* lokalisiert. Da sich beide Gene im gleichen *reading frame* befinden scheint eine Punktmutation zur Unterbrechung des Transkripts geführt zu haben. Die Punktmutation von CAA zu TAA führt ein Stopcodon in die Sequenz ein. Dies führt zur Termination der Transkription (Abbildung 47 und Abbildung 48) und könnte zu einer Inaktivierung dieses RM-Systems geführt haben. Die gesamte Region wurde im Rahmen dieser Arbeit resequenziert, um einen Sequenzierfehler in der Datenbank auszuschließen. Die Resequenzierung ergab keine Abweichung zur ursprünglichen Genomsequenz. Die *in silico* Analysen und Sequenzanalysen wiesen darauf hin, dass die beschriebenen Mutationen zur Inaktivierung der putativen Methyltransferase Sll8009 führen. Physiologische Analysen der erzeugten Δ *sll8009* Mutante zeigten im Vergleich zum WT keine signifikanten Änderungen im Wachstumsverhalten, trotz erhöhtem Chlorophyll/Phycocyanin-Gehalt. SMRT-Sequenzierung der Mutante Δ *sll8009* ergaben keine Änderungen im Methylierungsstatus im Vergleich zum WT. Die *in silico* und *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass Sll8009 nicht an der Methylierung der DNA von *Synechocystis* 6803 beteiligt ist. Das Toxin Antitoxin (TA) Systeme häufig mit Abwehrsystemen wie RM-Systemen oder mobilen Elementen clusterartig auftreten zeigte Kopfmann *et. al.* (Kopfmann *et. al.*, 2016). Drei auf pSYSG lokalisierte TA Systeme bilden mit dem Typ I RM System, mit sechs mobilen Elementen und fünf verwandten TA Modulen ein Cluster zur Stabilisierung der Gene. Innerhalb dieses Clusters ist das Typ I RM System genetisch durch die TA Systeme stabilisiert (Kopfmann *et. al.*, 2016). Elhai postulierte 2015 eine enge Verknüpfung von DNA-Methylierungsmotiven und der Funktionsfähigkeit von spezifischen DNA-Methyltransferasen (Elhai, 2015). Mittels SMRT-Sequenzierung wurden fünf Methylierungsmotive detektiert. Fünf spezifischen DNA-Methyltransferasen konnten identifiziert und den Motiven zugeordnet werden (In dieser

Arbeit und Scharnagl *et al.*, 1998). Es wurde kein sechstes Methylierungsmotiv detektiert. Dies könnte darauf hinweisen, dass das Typ I RM System ihren Ursprung in anderen Organismen hat, dass dieses System durch die Punktmutation inaktiviert wurde und es somit in *Synechocystis* 6803 kein spezifisches Methylierungsmotiv gibt. Ohne korrespondierendes Methylierungsmotiv hat die Methyltransferase Sll8009 keine biologische Funktion. Dies könnte zur Inaktivierung des Typ I RM Systems, trotz genetisch stabilisierender TA Systeme, durch die beschriebenen Mutation im putativen Methyltransferasegen *sll8009* geführt haben. Ohne aktive DNA-Methyltransferase im RM-System würde die Restriktionsendonuklease die DNA der Zelle hydrolysieren. Das Gen *sll8049* weist einen *frame shift* auf, der vermutlich die Inaktivierung der Restriktionsendonuklease bewirkt.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle von DNA-Methylierung in *Synechocystis* 6803 charakterisiert werden. Mittels SRMT- und Bisulfit-Sequenzierung wurden fünf Methylierungsmotive detektiert: m^5 CGATCG, G^{m6} ATC, GG^{m4} CC, GA^{m6} AGGC und GG^{m6} AN7TTGG/CCA m^6 AN7TCC. Durch *in silico* Analysen konnte jedem Methylierungsmotiv eine putative DNA-Methyltransferase zugeordnet werden. Die DNA-Methyltransferasen M.Ssp6803I (*slr0214*) und M.Ssp6803III (*slr1803*) methylieren die Motive m^5 CGATCG und G^{m6} ATC (Scharnagl *et. al.*, 1998). Die Bisulfit-Sequenzierung bewies, dass im Motiv m^5 CGATCG das erste C⁵ methyliert vorliegt. Weiterhin konnte eine funktionelle Bedeutung von M.Ssp6803I für DNA-Reparaturmechanismen nachgewiesen werden. Die DNA-Methyltransferase M.Ssp6803II (*sll0729*) methyliert das Motiv GG^{m4} CC. Deren Mutationen führte zu verringertem Wachstum. Allerdings wies die Mutante Δ *sll0729* einen instabilen Phänotyp auf, der anhand der Suppressormutantenklonen Δ *sll0729::supp_1*, sowie Δ *sll0729::supp_15* näher charakterisiert wurde. Mittels Microarray Analysen wurde nur für zwei Gene eine veränderte Transkriptabundanzdetektiert. Das Gen *sll0470* zeigte sowohl in der originalen Δ *sll0729* Mutante als auch in den Suppressorklonen eine erhöhte RNA-Menge. Dieses Gen beinhaltet das Methylierungsmotiv GGCC in der Promotorregion. Die Daten der Microarray Analysen und der Promotoraktivitätsmessungen deuten darauf hin, dass eine Transkriptionsregulation einzelner Gene durch die Aktivität von M.Ssp6803II existiert. Weiterhin zeigten die Suppressorklone eine Verringerung in der Zellgröße, dem DNA-Gehalt und eine verringerte UV-Toleranz im Vergleich zum Wildtyp. Daher wird ein Einfluss von M.Ssp6803II auf die Chromosomenstabilität, DNA-Replikation und DNA-Reparaturmechanismen angenommen. Diese Veränderungen könnten an der registrierten verringerten Transkriptom- und Proteomanalysen Abundanz der Topoisomerase IV Untereinheit A (*sll1941*) in den Suppressorklonen liegen. Die Gene *slr6050* und *slr6095* kodieren für die Methyltransferasen M.Ssp6803IV und M.Ssp6803V. M.Ssp6803IV modifiziert das Motiv GA^{m6} AGGC, wohingegen M.Ssp6803V das Motiv GG^{m6} AN7TTGG/CCA m^6 AN7TCC methyliert. M.Ssp6803IV ist für die Vitalität von *Synechocystis* 6803 essentiell. Proteom Analysen der Δ *slr6095* Mutante ergaben eine veränderte Proteinabundanz von NrdR und NrdA, was auf einen Einfluss von M.Ssp6803V auf die Verarbeitung genetischer Informationen hinweist. Insgesamt konnte erstmals eine

umfassende funktionelle Analyse des Methyloms eines Modellcyanobakteriums erbracht werden.

7 Summary

The dissertation aimed to analyze the role of DNA-methylation in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. With the help of new omics techniques like SMRT-sequencing and bisulfite-sequencing we identified five methylation motifs, namely: m^5 CGATCG, G^{m6} ATC, GG^{m4} CC, GA^{m6} AGGC and GG^{m6} AN7TTGG/ CCA^{m6} AN7TCC. *In silico* analyses identified putative DNA-methyltransferases that are likely responsible for the methylation of these motifs. The DNA-methyltransferases M.Ssp6803I (*slr0214*) and M.Ssp6803III (*slr1803*) methylate the motifs m^5 CGATCG and G^{m6} ATC (Scharnagl *et. al.*, 1998). Bisulfite-sequencing revealed that the first cytosine of the motif m^5 CGATCG became C⁵ methylated. Further analysis showed a functional role of M.Ssp6803I for DNA repair. The DNA-methyltransferase M.Ssp6803II (*sll0729*) methylates the first cytosine of the core sequence GG^{m4} CC. Initial analyses of the Δ *sll0729* mutant showed a growth and pigmentation phenotype. However, these changes in mutant Δ *sll0729* were unstable due to the appearance of suppressor mutants. The suppressor clones Δ *sll0729::supp_1* and Δ *sll0729::supp_15* were isolated and analyzed using microarray analysis. The results showed changed gene expression of only two genes. For example the *sll0470* transcrip, bearing a GGCC methylation motif in the promotor region, was found in higher abundances in the initial mutant Δ *sll0729* as well as in suppressor clones compared to wild type. These analysis reveald that the expression of few selected genes might be regulated via the activity of M.Ssp6803II. Interestingly, the suppressor clones showed decreased cell size, lower DNA content and reduced UV-tolerance compared to wild type. Therefore a role of DNA-methylation via M.Ssp6803II on chromosome stability, DNA-replication and DNA-repair mechanisms is assumed. These changes could be correlated with the function of the topoisomerase IV subunit A (*sll1941*), which was found in lowered abundance in transcriptome and proteome analyses of the suppressor clone. The DNA-methyltransferase M.Ssp6803IV and M.Ssp6803V are modifying the methylation motifs GA^{m6} AGGC and GG^{m6} AN7TTGG/ CCA^{m6} AN7TCC. M.Ssp6803IV is essential for the viability of *Synechocystis* 6803. Proteome analysis of the Δ *slr6095* mutant reveal changes in the abundance of NrdR and NrdA, which indicates a role of M.Ssp6803V in processing genetic information. Here, a first comprehensive functional analysis of DNA methylation among cyanobacteria was performed, which showed that this mechanism fulfills divers roles in the

cyanobacterial cell such as gene expression regulation, DNA-replication and DNA-structure maintenance.

8 Literaturverzeichnis

- Adhikari, Satish; Curtis, Patrick D. (2016): DNA methyltransferases and epigenetic regulation in bacteria. In: *FEMS microbiology reviews* 40 (5), S. 575–591. DOI: 10.1093/femsre/fuw023.
- Alcantara-Diaz, David; Brena-Valle, Matilde; Serment-Guerrero, Jorge (2004): Divergent adaptation of *Escherichia coli* to cyclic ultraviolet light exposures. In: *Mutagenesis* 19 (5), S. 349–354. DOI: 10.1093/mutage/geh039.
- Amine Aloui; Alya El May; Saloua Kouass Sahbani; Ahmed Landoulsi (2013): The Mechanisms of DNA Replication. Roles of Methylation and Sequestration in the Mechanisms of DNA Replication in some Members of the Enterobacteriaceae Family. In: *IntechOpen* (12), S. 315–332.
- Ashley, Rachel E.; Dittmore, Andrew; McPherson, Sylvia A.; Turnbough, Charles L., JR; Neuman, Keir C.; Osheroff, Neil (2017): Activities of gyrase and topoisomerase IV on positively supercoiled DNA. In: *Nucleic acids research* 45 (16), S. 9611–9624. DOI: 10.1093/nar/gkx649.
- Banerjee, Sanjib; Chowdhury, Rukhsana (2006): An orphan DNA (cytosine-5-)-methyltransferase in *Vibrio cholerae*. In: *Microbiology (Reading, England)* 152 (Pt 4), S. 1055–1062. DOI: 10.1099/mic.0.28624-0.
- Barten, Roland; Lill, Holger (1995): DNA-uptake in the naturally competent cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. In: *FEMS Microbiology Letters* 129 (1), S. 83–88. DOI: 10.1016/0378-1097(95)00143-5.
- Baumgartner, Desiree; Kopf, Matthias; Klahn, Stephan; Steglich, Claudia; Hess, Wolfgang R. (2016): Small proteins in cyanobacteria provide a paradigm for the functional analysis of the bacterial micro-proteome. In: *BMC microbiology* 16 (1), S. 285. DOI: 10.1186/s12866-016-0896-z.
- Bertani G.; Weigle J.J. (1953): Host controlled variation in bacterial viruses. In: *Journal of bacteriology* 65 (2), S. 113–121.
- Blow, Matthew J.; Clark, Tyson A.; Daum, Chris G.; Deutschbauer, Adam M.; Fomenkov, Alexey; Fries, Roxanne et al. (2016): The Epigenomic Landscape of Prokaryotes. In: *PLoS genetics* 12 (2), e1005854. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005854.
- Brown, Kevin D.; Robertson, Keith D. (2007): DNMT1 knockout delivers a strong blow to genome stability and cell viability. In: *Nature genetics* 39 (3), S. 289–290. DOI: 10.1038/ng0307-289.
- Brown T.A. (2007): *Genome und Gene, Lehrbuch der molekularen Genetik*. Kapitel 1,2,3 und 8 Auflage 3. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Casadesus, Josep (2016): Bacterial DNA Methylation and Methylomes. In: *Advances in experimental medicine and biology* 945, S. 35–61. DOI: 10.1007/978-3-319-43624-1_3.
- Casadesus, Josep; Low, David (2006): Epigenetic gene regulation in the bacterial world. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 70 (3), S. 830–856. DOI: 10.1128/MMBR.00016-06.

- Casadesús, Josep; Low, David A. (2013): Programmed heterogeneity: epigenetic mechanisms in bacteria. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (20), S. 13929–13935. DOI: 10.1074/jbc.r113.472274.
- Champoux, J. J. (2001): DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. In: *Annual review of biochemistry* 70, S. 369–413. DOI: 10.1146/annurev.biochem.70.1.369.
- Chen, Taiping; Ueda, Yoshihide; Dodge, Jonathan E.; Wang, Zhenjuan; Li, En (2003): Establishment and Maintenance of Genomic Methylation Patterns in Mouse Embryonic Stem Cells by Dnmt3a and Dnmt3b. In: *Molecular and Cellular Biology* 23 (16), S. 5594. DOI: 10.1128/MCB.23.16.5594-5605.2003.
- Cherry, Joshua L. (2018): Methylation-Induced Hypermutation in Natural Populations of Bacteria. In: *Journal of bacteriology* 200 (24). DOI: 10.1128/JB.00371-18.
- Coulondre, C.; Miller, J. H.; Farabaugh, P. J.; Gilbert, W. (1978): Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. In: *Nature* 274 (5673), S. 775–780. DOI: 10.1038/274775a0.
- Crespo, Anna; Pedraz, Lucas; Torrents, Eduard (2015): Function of the *Pseudomonas aeruginosa* NrdR Transcription Factor: Global Transcriptomic Analysis and Its Role on Ribonucleotide Reductase Gene Expression. In: *PloS one* 10 (4), e0123571. DOI: 10.1371/journal.pone.0123571.
- Csankovszki, G.; Nagy, A.; Jaenisch, R. (2001): Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. In: *The Journal of cell biology* 153 (4), S. 773–784. DOI: 10.1083/jcb.153.4.773.
- Deibler, R. W.; Rahmati, S.; Zechiedrich, E. L. (2001): Topoisomerase IV, alone, unknots DNA in *E. coli*. In: *Genes & development* 15 (6), S. 748–761. DOI: 10.1101/gad.872301.
- Deweese, Joseph E.; Osheroff, Neil (2009): The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. In: *Nucleic acids research* 37 (3), S. 738–748. DOI: 10.1093/nar/gkn937.
- Dismukes, G. C.; Klimov, V. V.; Baranov, S. V.; Kozlov, Y. N.; DasGupta, J.; Tyryshkin, A. (2001): The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (5), S. 2170–2175. DOI: 10.1073/pnas.061514798.
- Dorman, Charles J.; Dorman, Matthew J. (2016): DNA supercoiling is a fundamental regulatory principle in the control of bacterial gene expression. In: *Biophysical reviews* 8 (3), S. 209–220. DOI: 10.1007/s12551-016-0205-y.
- Dreux, Nicolas; del Mar Cendra, Maria; Massier, Sebastien; Darfeuille-Michaud, Arlette; Barnich, Nicolas; Torrents, Eduard (2015): Ribonucleotide reductase NrdR as a novel regulator for motility and chemotaxis during adherent-invasive *Escherichia coli* infection. In: *Infection and immunity* 83 (4), S. 1305–1317. DOI: 10.1128/IAI.02772-14.
- Ehrlich, Melanie; Jackson, Kelly; Weemaes, Corry (2006): Immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome (ICF). In: *Orphanet J Rare Dis* 1, S. 2. DOI: 10.1186/1750-1172-1-2.

- Elhai, Jeff (2015): Highly Iterated Palindromic Sequences (HIPs) and Their Relationship to DNA Methyltransferases. In: *Life (Basel, Switzerland)* 5 (1), S. 921–948. DOI: 10.3390/life5010921.
- Espeli, Olivier; Marians, Kenneth J. (2004): Untangling intracellular DNA topology. In: *Molecular microbiology* 52 (4), S. 925–931. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04047.x.
- Estibariz, Iratxe; Overmann, Annemarie; Ailloud, Florent; Krebs, Juliane; Josenhans, Christine; Suerbaum, Sebastian (2019): The core genome m5C methyltransferase JHP1050 (M.Hpy99III) plays an important role in orchestrating gene expression in *Helicobacter pylori*. In: *Nucleic acids research* 47 (5), S. 2336–2348. DOI: 10.1093/nar/gky1307.
- Flusberg, Benjamin A.; Webster, Dale R.; Lee, Jessica H.; Travers, Kevin J.; Olivares, Eric C.; Clark, Tyson A. et al. (2010): Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. In: *Nature methods* 7 (6), S. 461–465. DOI: 10.1038/nmeth.1459.
- Fox, Kate L.; Dowideit, Stefanie J.; Erwin, Alice L.; Srikhanta, Yogitha N.; Smith, Arnold L.; Jennings, Michael P. (2007): Haemophilus influenzae phasevarions have evolved from type III DNA restriction systems into epigenetic regulators of gene expression. In: *Nucleic acids research* 35 (15), S. 5242–5252. DOI: 10.1093/nar/gkm571.
- Gartner, Katrin; Klahn, Stephan; Watanabe, Satoru; Mikkat, Stefan; Scholz, Ingeborg; Hess, Wolfgang R.; Hagemann, Martin (2019): Cytosine N4-Methylation via M.Ssp6803II Is Involved in the Regulation of Transcription, Fine-Tuning of DNA Replication and DNA Repair in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. In: *Frontiers in microbiology* 10, S. 1233. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01233.
- Gomez-Gonzalez, Paula J.; Andreu, Nuria; Phelan, Jody E.; Sessions, Paola Florez de; Glynn, Judith R.; Crampin, Amelia C. et al. (2019): An integrated whole genome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* reveals insights into relationship between its genome, transcriptome and methylome. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 5204. DOI: 10.1038/s41598-019-41692-2.
- Hagemann, Martin; Gärtner, Katrin; Scharnagl, Matthias; Bolay, Paul; Lott, Steffen C.; Fuss, Janina et al. (2018): Identification of the DNA methyltransferases establishing the methylome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. In: *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*. DOI: 10.1093/dnares/dsy006.
- Hattman, S.; Kenny, C.; Berger, L.; Pratt, K. (1978): Comparative study of DNA methylation in three unicellular eucaryotes. In: *Journal of bacteriology* 135 (3), S. 1156–1157. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/99431>.
- Holland, Heinrich D. (2006): The oxygenation of the atmosphere and oceans. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 361 (1470), S. 903–915. DOI: 10.1098/rstb.2006.1838.
- Janulaitis, A.; Vaisvila, R.; Timinskas, A.; Klimasauskas, S.; Butkus, V. (1992): Cloning and sequence analysis of the genes coding for Eco57I type IV restriction-modification enzymes. In: *Nucleic acids research* 20 (22), S. 6051–6056. DOI: 10.1093/nar/20.22.6051.
- Jeltsch, Albert (2002): Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. In: *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 3 (4), S. 274–293.

- Jeltsch, Albert (2006): On the enzymatic properties of Dnmt1: specificity, processivity, mechanism of linear diffusion and allosteric regulation of the enzyme. In: *Epigenetics* 1 (2), S. 63–66. DOI: 10.4161/epi.1.2.2767.
- Jeltsch, Albert (2008): Reading and writing DNA methylation. In: *Nature structural & molecular biology* 15 (10), S. 1003–1004. DOI: 10.1038/nsmb1008-1003.
- Jeltsch, Albert (2013): Oxygen, epigenetic signaling, and the evolution of early life. In: *Trends in biochemical sciences* 38 (4), S. 172–176. DOI: 10.1016/j.tibs.2013.02.001.
- Jeltsch, Albert; Jurkowska, Renata Z. (2014): New concepts in DNA methylation. In: *Trends in biochemical sciences : TIBS ; an official publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 39 (7), S. 310–318.
- Jeltsch, Albert; Jurkowska, Renata Z. (2016): Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases - a new regulatory paradigm. In: *Nucleic acids research* 44 (18), S. 8556–8575. DOI: 10.1093/nar/gkw723.
- Jones, P. A.; Laird, P. W. (1999): Cancer epigenetics comes of age. In: *Nature genetics* 21 (2), S. 163–167. DOI: 10.1038/5947.
- Jones, P. A.; Takai, D. (2001): The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. In: *Science (New York, N.Y.)* 293 (5532), S. 1068–1070. DOI: 10.1126/science.1063852.
- Jones, Peter A.; Baylin, Stephen B. (2002): The fundamental role of epigenetic events in cancer. In: *Nature reviews. Genetics* 3 (6), S. 415–428. DOI: 10.1038/nrg816.
- Kahramanoglou, Christina; Prieto, Ana I.; Khedkar, Supriya; Haase, Bettina; Gupta, Ankur; Benes, Vladimir et al. (2012): Genomics of DNA cytosine methylation in *Escherichia coli* reveals its role in stationary phase transcription. In: *Nature communications* 3, S. 886. DOI: 10.1038/ncomms1878.
- Kaneda, M.; Sado, T.; Hata, K.; Okano, M.; Tsujimoto, N.; Li, E.; Sasaki, H. (2004): Role of de novo DNA methyltransferases in initiation of genomic imprinting and X-chromosome inactivation. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 69, S. 125–129. DOI: 10.1101/sqb.2004.69.125.
- Kaneko, T.; Sato, S.; Kotani, H.; Tanaka, A.; Asamizu, E.; Nakamura, Y. et al. (1996): Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. In: *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 3 (3), S. 109–136. DOI: 10.1093/dnares/3.3.109.
- Kaneko, T.; Tabata, S. (1997): Complete genome structure of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. In: *Plant & cell physiology* 38 (11), S. 1171–1176. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029103.
- Kaneko, Takakazu; Nakamura, Yasukazu; Sasamoto, Shigemi; Watanabe, Akiko; Kohara, Mitsuyo; Matsumoto, Midori et al. (2003): Structural analysis of four large plasmids harboring in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. In: *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 10 (5), S. 221–228. DOI: 10.1093/dnares/10.5.221.
- Kopf, Matthias; Klahn, Stephan; Pade, Nadin; Weingartner, Christian; Hagemann, Martin; Voss, Bjorn; Hess, Wolfgang R. (2014): Comparative genome analysis of the closely related

- Synechocystis strains PCC 6714 and PCC 6803. In: *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 21 (3), S. 255–266. DOI: 10.1093/dnares/dst055.
- Kopf, Matthias; Klahn, Stephan; Scholz, Ingeborg; Matthiessen, Jasper K. F.; Hess, Wolfgang R.; Voss, Bjorn (2014): Comparative analysis of the primary transcriptome of *Synechocystis* sp. PCC 6803. In: *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 21 (5), S. 527–539. DOI: 10.1093/dnares/dsu018.
- Kopfmann, Stefan; Roesch, Stefanie K.; Hess, Wolfgang R. (2016): Type II Toxin-Antitoxin Systems in the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. In: *Toxins* 8 (7). DOI: 10.3390/toxins8070228.
- Kouzarides, Tony (2007): Chromatin modifications and their function. In: *Cell* 128 (4), S. 693–705. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.005.
- Kumar, Ritesh; Mukhopadhyay, Asish K.; Ghosh, Prachetash; Rao, Desirazu N. (2012): Comparative transcriptomics of *H. pylori* strains AM5, SS1 and their hpyAVIBM deletion mutants: possible roles of cytosine methylation. In: *PloS one* 7 (8), e42303. DOI: 10.1371/journal.pone.0042303.
- Kunert, Anja; Hagemann, Martin; Erdmann, Norbert (2000): Construction of promoter probe vectors for *Synechocystis* sp. PCC 6803 using the light-emitting reporter systems Gfp and LuxAB. In: *Journal of microbiological methods* 41 (3), S. 185–194. Online verfügbar unter [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00162-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00162-7).
- Labarre, J.; Chauvat, F.; Thuriaux, P. (1989): Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. In: *Journal of bacteriology* 171 (6), S. 3449–3457. DOI: 10.1128/jb.171.6.3449-3457.1989.
- Langer, U.; Richter, S.; Roth, A.; Weigel, C.; Messer, W. (1996): A comprehensive set of DnaA-box mutations in the replication origin, oriC, of *Escherichia coli*. In: *Molecular microbiology* 21 (2), S. 301–311. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1996.6481362.x.
- Levine, C.; Hiasa, H.; Marians, K. J. (1998): DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. In: *Biochimica et biophysica acta* 1400 (1-3), S. 29–43. DOI: 10.1016/s0167-4781(98)00126-2.
- Lim, Sangyong; Jung, Jong-Hyun; Blanchard, Laurence; Groot, Arjan de (2019): Conservation and diversity of radiation and oxidative stress resistance mechanisms in *Deinococcus* species. In: *FEMS microbiology reviews* 43 (1), S. 19–52. DOI: 10.1093/femsre/fuy037.
- Low, David A.; Casadesus, Josep (2008): Clocks and switches: bacterial gene regulation by DNA adenine methylation. In: *Current opinion in microbiology* 11 (2), S. 106–112. DOI: 10.1016/j.mib.2008.02.012.
- Lu, Haoyang; Liu, Xinzhou; Deng, Yulin; Qing, Hong (2013): DNA methylation, a hand behind neurodegenerative diseases. In: *Frontiers in aging neuroscience* 5, S. 85. DOI: 10.3389/fnagi.2013.00085.
- María A Sánchez-Romero; Ignacio Cota; Josep Casadesús (2015): DNA methylation in bacteria: from the methyl group to the methylome. In: *Current opinion in microbiology* 25, S. 9–16. DOI: 10.1016/j.mib.2015.03.004.

- Marinus, M. G.; Lobner-Olesen, A. (2014): DNA Methylation. In: *EcoSal Plus* 6 (1). DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2013.
- Matveyev, A. V.; Young, K. T.; Meng, A.; Elhai, J. (2001): DNA methyltransferases of the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. In: *Nucleic acids research* 29 (7), S. 1491–1506. DOI: 10.1093/nar/29.7.1491.
- Mereschkowski K.S. (1905): Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. In: *Biol Centralbl* (25), 593-604, 689-691.
- Murray, N. E. (2000): Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 64 (2), S. 412–434. DOI: 10.1128/mubr.64.2.412-434.2000.
- Osburne, Marcia S.; Holmbeck, Brianne M.; Frias-Lopez, Jorge; Steen, Robert; Huang, Katherine; Kelly, Libusha et al. (2010): UV hyper-resistance in *Prochlorococcus* MED4 results from a single base pair deletion just upstream of an operon encoding nudix hydrolase and photolyase. In: *Environ Microbiol* 12 (7), S. 1978–1988. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02203.x.
- Oshima, Taku; Wada, Chieko; Kawagoe, Yuya; Ara, Takeshi; Maeda, Maki; Masuda, Yasushi et al. (2002): Genome-wide analysis of deoxyadenosine methyltransferase-mediated control of gene expression in *Escherichia coli*. In: *Molecular microbiology* 45 (3), S. 673–695. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.03037.x.
- Pingoud, A.; Jeltsch, A. (2001): Structure and function of type II restriction endonucleases. In: *Nucleic acids research* 29 (18), S. 3705–3727. DOI: 10.1093/nar/29.18.3705.
- Potts, M.; Whitton, B. A. (1977): Nitrogen fixation by blue-green algal communities in the intertidal zone of the lagoon of Aldabra Atoll. In: *Oecologia* 27 (4), S. 275–283. DOI: 10.1007/BF00345560.
- Rimseliene, Renata; Maneliene, Zita; Lubys, Arvydas; Janulaitis, Arvydas (2003): Engineering of restriction endonucleases: using methylation activity of the bifunctional endonuclease Eco57I to select the mutant with a novel sequence specificity. In: *Journal of molecular biology* 327 (2), S. 383–391. DOI: 10.1016/s0022-2836(03)00142-6.
- Rippka R; Deruelles J; Waterbury J; Herdman M; Stanier R (1979): Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. In: *J Gen Microbiol* (111), S. 1–61.
- Roberts, Richard J.; Belfort, Marlene; Bestor, Timothy; Bhagwat, Ashok S.; Bickle, Thomas A.; Bitinaite, Jurate et al. (2003): A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. In: *Nucleic acids research* 31 (7), S. 1805–1812. DOI: 10.1093/nar/gkg274.
- Roberts, Richard J.; Vincze, Tamas; Posfai, Janos; Macelis, Dana (2003): REBASE: restriction enzymes and methyltransferases. In: *Nucleic acids research* 31 (1), S. 418–420. DOI: 10.1093/nar/gkg069.
- Robinson, N. J.; Robinson, P. J.; Gupta, A.; Bleasby, A. J.; Whitton, B. A.; Morby, A. P. (1995): Singular over-representation of an octameric palindrome, HIP1, in DNA from many cyanobacteria. In: *Nucleic acids research* 23 (5), S. 729–735. DOI: 10.1093/nar/23.5.729.

- Saravanan, Matheshwaran; Vasu, Kommireddy; Nagaraja, Valakunja (2008): Evolution of sequence specificity in a restriction endonuclease by a point mutation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (30), S. 10344–10347. DOI: 10.1073/pnas.0804974105.
- Scharnagl, M.; Richter, S.; Hagemann, M. (1998): The cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 expresses a DNA methyltransferase specific for the recognition sequence of the restriction endonuclease PvuI. In: *Journal of bacteriology* 180 (16), S. 4116–4122.
- Scholz, Ingeborg; Lott, Steffen C.; Behler, Juliane; Gartner, Katrin; Hagemann, Martin; Hess, Wolfgang R. (2019): Divergent methylation of CRISPR repeats and cas genes in a subtype I-D CRISPR-Cas-system. In: *BMC microbiology* 19 (1), S. 147. DOI: 10.1186/s12866-019-1526-3.
- Schopf, J. W.; Packer, B. M. (1987): Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. In: *Science (New York, N.Y.)* 237, S. 70–73. DOI: 10.1126/science.11539686.
- Stryer Biochemie (Hg.) (2013): Die Lichtreaktionen der Photosynthese. Unter Mitarbeit von Jeremy M., BergJohn L. und TymoczkoLubert Stryer.
- Van den Hoek Christian; Jahns Hans Martin; Mann David G. (Hg.) (1993): Alles über Algen Algen. 3. Aufl.: Georg Thieme Verlag.
- Vasu, Kommireddy; Nagaraja, Valakunja (2013): Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 77 (1), S. 53–72. DOI: 10.1128/MMBR.00044-12.
- Vieira, J.; Messing, J. (1982): The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. In: *Gene* 19 (3), S. 259–268. DOI: 10.1016/0378-1119(82)90015-4.
- Vilkaitis, G.; Klimasauskas, S. (1999): Bisulfite sequencing protocol displays both 5-methylcytosine and N4-methylcytosine. In: *Analytical biochemistry* 271 (1), S. 116–119. DOI: 10.1006/abio.1999.4116.
- Waddington, C. H. (1956): GENETIC ASSIMILATION OF THE BITHORAX PHENOTYPE. In: *Evolution* 10 (1), S. 1–13. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1956.tb02824.x.
- Wang, Xindan; Reyes-Lamothe, Rodrigo; Sherratt, David J. (2008): Modulation of *Escherichia coli* sister chromosome cohesion by topoisomerase IV. In: *Genes & development* 22 (17), S. 2426–2433. DOI: 10.1101/gad.487508.
- Wilson, G. G.; Murray, N. E. (1991): Restriction and modification systems. In: *Annual review of genetics* 25, S. 585–627. DOI: 10.1146/annurev.ge.25.120191.003101.
- Zerulla, Karolin; Ludt, Katharina; Soppa, Jorg (2016): The ploidy level of *Synechocystis* sp. PCC 6803 is highly variable and is influenced by growth phase and by chemical and physical external parameters. In: *Microbiology (Reading, England)* 162 (5), S. 730–739. DOI: 10.1099/mic.0.000264.
- Zheng, Xiao-Yu; O'Shea, Erin K. (2017): Cyanobacteria Maintain Constant Protein Concentration despite Genome Copy-Number Variation. In: *Cell reports* 19 (3), S. 497–504. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.03.067.

9 Anhang

9.1 Veränderte Transkriptabundanz von *sll0470* und *sll1526*

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse von vier unabhängigen Microarray Analysen der $\Delta sll0729$ Mutante für die Gene *sll0470* und *sll1526*. In den vier Untersuchungen war die Transkriptabundanz dieser zwei Gene in der Mutante $\Delta sll0729$ im Vergleich zum WT verändert.

Tabelle 16 Änderungen in der Transkriptabundanz von *sll0470* und *sll1526* aus vier unabhängigen Microarray Analysen der $\Delta sll0729$ Mutante.

DNA-Microarray Untersuchung	<i>sll0470</i>	<i>sll1526</i>
1	1,27	- 0,9
2	1,73	- 0,8
3	1,6	- 1,40
4	1,3	- 1,05

9.2 Karten verwendeter Expressionsplasmide

Die zur Klonierung verwendeten Karten der Expressionsplasmide pet28a und pASK-IBA43plus sind in Abbildung 39 dargestellt.

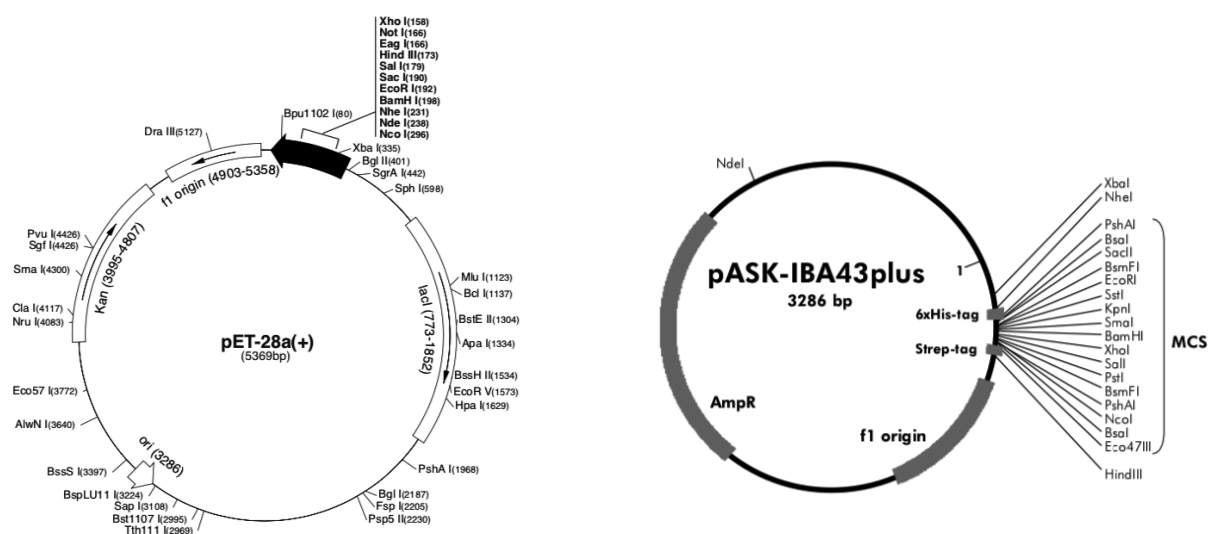


Abbildung 39 Expressionsplasmide pet28a und pASK-IBA43plus

9.4 Rekombinante Expression von Slr6095 und Sll8009

Protein Expression von Slr6095

Die rekombinante Expression von Slr6095 fand in *E. coli* statt. Das 53,54 kDa große Protein Slr6095 konnte nicht löslich exprimiert. Trotz verschiedener Klonierungs- und Expressionsstrategien konnte das Protein ausschließlich im Zellpellet nachgewiesen werden (siehe Abbildung 42).

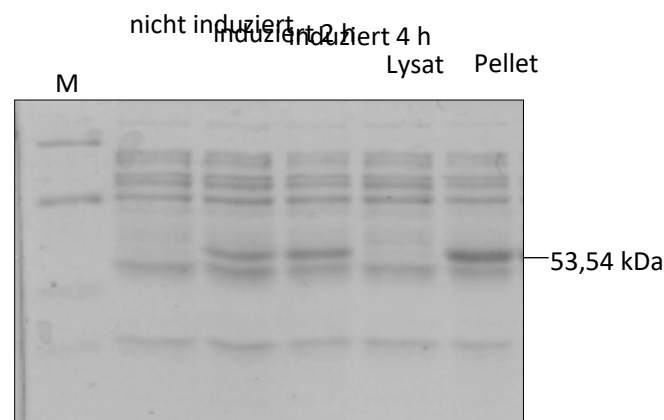


Abbildung 42 Rekombinante Expression von Slr6095 in *E. coli*.

Akkumulation von Slr6095 im Zellpellet. Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde das Polyakrylamid mit Coomassie-Brillant Blau R-250-Farblösung für 12 h gefärbt. Mittels 40% Methanol, 10% Essigsäure wurde überschüssiges Coomassie gelöst und das Gel wurde Fotodokumentiert.

Protein Expression von Sll8009

Das 56,39 kDa große Protein Sll8009 wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert und mittels SDS-Gelelektrophorese entsprechend der Größe aufgetrennt. Trotz verschiedener Klonierungs- und Expressionsstrategien, konnte kein lösliches Protein exprimiert werden. (siehe Abbildung 43)

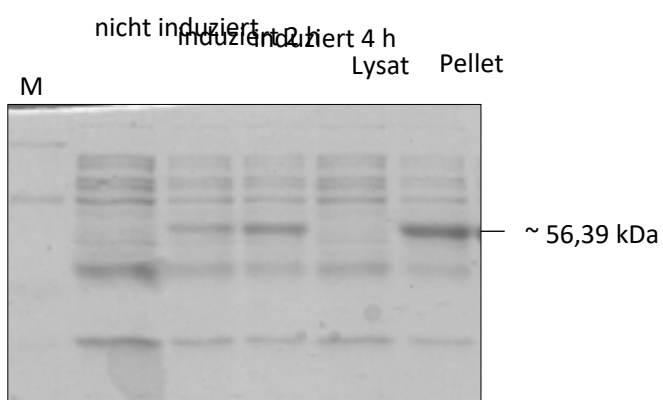


Abbildung 43 Rekombinante Expression von Sll8009 in E. coli.

Akkumulation von Sll8009 im Zellpellet. Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde das Polyakrylamid mit Coomassie-Brillant Blau R-250-Farblösung für 12 h gefärbt. Mittels 40% Methanol, 10% Essigsäure wurde überschüssiges Coomassie gelöst und das Gel wurde Fotodokumentiert.

9.5 Northern Blot Analysen von *sll0470* und *sll1526* aus $\Delta sll0729$

RNA-Proben der $\Delta sll0729$ Mutante und des WT's, die bereits für die erste und dritte Microarray Analyse verwendet wurden, fand weiterhin Anwendung in Northern Blot Analysen. Unabhängig von den Microarray Analysen, konnte die veränderte Transkriptmenge der Gene *sll1526* und *sll0470* in zwei unabhängigen Experimenten mittels Northern Blot Analysen bestätigt werden (siehe Abbildung 44). Die spezifisch für *sll1526* mit ^{32}P markierten Proben, zeigen ein schwaches Signal in der $\Delta sll0729$ Mutante, im Vergleich zum WT. Die spezifisch für *sll0470* mit ^{32}P markierten Proben, zeigen ein stärkeres Signal in der Mutante, als im WT. Die verwendeten Proben stammen aus zwei unabhängigen Experimenten (Abbildung 44 Array 1 und Array 3) mit je zwei biologischen Replikaten (1,2 Abbildung 44).

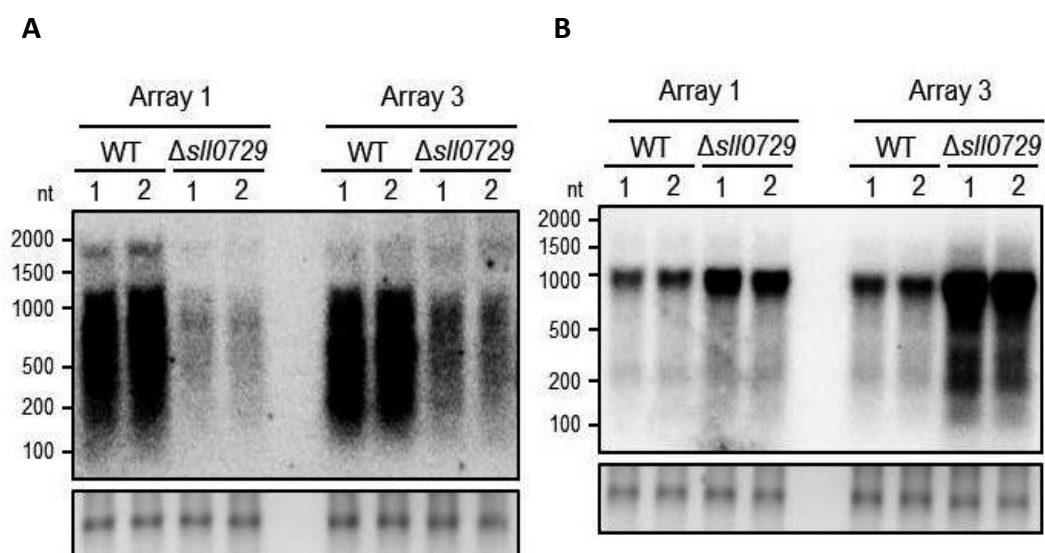


Abbildung 44 Northern Blot Analysen

Die ^{32}P markierter RNA-Proben, spezifisch für *sll1526* (A) und *sll0470* (B). Zwei biologische Replikate der RNA des WT und der $\Delta sll0729$ Mutante wurden mitgeführt (1,2). Die Bezeichnung Array 1 und Array 3 verweist auf die Nutzung der verwendeten RNA-Proben für die Microarray Analysen 1 und 3. Der Northern Blot wurde an der Universität Freiburg durch Dr. Stephan Klähn durchgeführt.

9.6 Transkriptomdaten der $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$ Mutanten

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse der Transkriptomanalysen von $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$ zusammengefasst.

Tabelle 17 Transkriptomanalyse der Suppressormutanten $\Delta sll0729::supp_1$ und $\Delta sll0729::supp_15$.

Die relativen Änderungen in der Transkriptabundanz chromosomaler Gene, ist im Vergleich zum WT als $\log_2 FC > 1$ oder < -1 P-Wert < 0.05 angegeben. Die Kulturen wurden unter Standardbedingungen kultiviert.

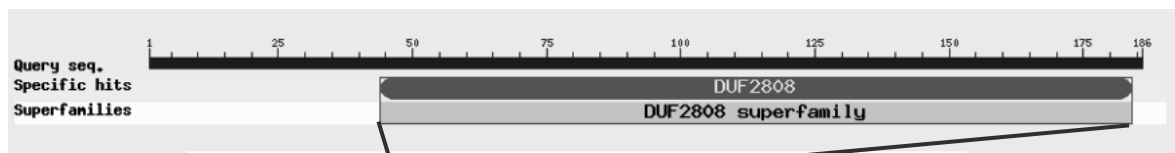
Zugangs- nr. ^A	Beschreibung	$\Delta sll0729::supp_1/WT$	$\Delta sll0729::supp_15/WT$
sll1594	ndhF3 Operon Transkriptionsregulator	-2,00	-1,83
ssl3441	Translationsinitiationsfaktor IF-1	-1,96	-2,23
slr1928	type 4 <i>pilin-like</i> Protein	-1,93	-1,87
slr1291	NAD(P)H-Quinone Oxidoreduktase UE 4	-1,71	-2,25
sll1968	PmgA	-1,69	-1,52
slr0473	Phytochrome 1 Regulator, Zwei-Komponenten Sensor Histidinkinase	-1,67	-1,74
slr1886	rsfS	-1,66	-1,67
slr0301	Phosphoenolpyruvatsynthase	-1,61	-1,54
slr1739	Photosystem II Protein	-1,57	-1,23
ssl2502	unbekanntes Protein	-1,44	-1,39
sll0856	RNA Polymerase Sigma-E Faktor, rpoE	-1,43	-1,40
sll1454	Nitratreduktase, narB	-1,42	-1,62
slr1239	Pyridin Nucleotid Transhydrogenase alpha UE, pntA	-1,42	-1,61
slr0288	Glutamat Ammonium Ligase	-1,38	-1,27
slr1564	RNA Polymerase Sigma Factor, SigF	-1,35	-1,08
ssr2227	Transpoase	-1,34	-1,62
slr2010	Hypothetisches Protein	-1,34	-1,20
sll2008	aktive Protease	-1,32	-1,85
sll0271	Transkriptionsantiterminierungsprotein, NusB	-1,32	-1,51
slr1929	Type 4 <i>pilin-like</i> Protein	-1,31	-1,44
sll1247	Hypothetisches Protein	-1,30	-1,50
slr1608	Glukose Dehydrogenase	-1,28	-1,06
slr0074	ABC Transporter UE	-1,26	-1,20
slr1549	Peptiddeformylase	-1,26	-1,15
slr0075	ABC Transporter UE	-1,25	-1,24
ssl2814	Unbekanntes Protein	-1,25	-1,46
slr0899	Cyanhydratase	-1,25	-1,20
sll0947	Protein A Homolog (Licht reprimiert)	-1,24	-1,39
sll1533	<i>twitching mobility</i> Protein, pilT	-1,22	-1,15
sll1888	Histidinkinase	-1,18	-1,07

ssr3409	Hypothetisches Protein	-1,18	-1,18
slr0076	ABC Transporter UE	-1,16	-1,21
sll0086-as	ABC Transporter UE	-1,15	-1,16
slr1417	Hypothetisches Protein YCF57	-1,15	-1,17
sll0550	Flavoprotein	-1,15	-1,04
slr1240	Unbekanntes Protein	-1,15	-1,25
sll1453	Nitrat Transportprotein, nrtD	-1,13	-1,25
sml0012	Hypothetisches Protein	-1,12	-1,04
slr0077	Cystein Desulfurase, csd	-1,12	-1,22
slr0474	Zwei-Komponenten <i>response regulator</i> CheY, Regulator Phytochrome 1, <i>rcp1</i>	-1,11	-1,02
slr2031	Sigma Faktor SibG, Regulatorprotein <i>RsbU</i>	-1,11	-1,24
sll0807	Ribulose-phosphate 3-epimerase, <i>rpe</i>	-1,10	-1,19
sll0857	Unbekanntes Protein	-1,09	-1,14
ssr3410	Hypothetisches Protein	-1,08	-1,15
sll1452	Nitrat Transport, ATP Bindeprotein , <i>ntrC</i>	-1,08	-1,27
slr0900	Molybdopterin Molybdenumtransferase	-1,05	-1,11
ssl3549	Hypothetisches Protein	-1,04	-1,16
sll0517	RNA Bindeprotein	-1,02	-1,15
sll2009	Protease	-1,02	-1,47
slr0772	Licht unabhängige Protochlorophyllide Reduktase UE, <i>chlB</i>	-1,00	-1,08
sll1941	Topoisomerase 4 UE A	-0,87	-1,00
slr1945	Phosphoglyceromutase	1,00	1,04
sll0656	Extrazelluläre Nuklease	1,02	1,22
sll1835	Periplasmatisches Protein	1,03	1,07
sll1283	Sporulationsprotein, <i>spoIID</i>	1,05	1,27
slr1842	Cysteinsynthase	1,06	1,07
sll1052	Hypothetisches Protein	1,11	1,06
sll0654	Alkalische Phosphatase	1,17	1,06
slr1176	Glukose-1-Phosphat Adenyltransferase, <i>glgC</i>	1,19	1,06
slr0827	Alanin Razemase	1,19	1,04
sll0224	Unbekanntes Protein	1,27	1,00
slr1742	Unbekanntes Protein	1,30	1,09
ssl3177	Hypothetisches Protein	1,31	1,28
sll0680	Phosphatbindeprotein, <i>pstS</i>	1,40	1,44
sll0144	Uridylatkinase, <i>pryH</i>	1,43	1,42
slr0949	<i>high-affinity branched-chain</i> Aminosäuretransport Permease	1,45	1,00
slr1828	Ferredoxin	1,47	1,25
slr1874	D-Alanin Ligase	1,53	1,29
sll1694	Pilin Polypeptid PilA1	1,58	1,50
sll1537	Ähnlich zum MuT Protein	1,60	1,56

ssr1155	Hypothetisches Protein	1,61	1,53
slr0528	UDP-N-Acetylmuramoylalanyl-D-glutamate, 2,6-Diaminopimelat Ligase, <i>murE</i>	1,65	1,57
slr0676	Adenylylsulfatkinase, <i>cysC</i>	1,67	1,26
slr0537	Putative Zuckerkinase	1,77	1,44
slr1249	Phosphattransportsystem Permease, <i>pstA</i>	1,77	1,30
slr1248	Phosphattransportsystem Permease, <i>pstC</i>	1,91	1,52
sll1695	Pilin Polypeptide PilA2	1,95	1,55
slr1247	Phosphatbindeprotein, <i>pstS</i>	2,28	1,71

A: CyanoBase Zugangsnummer

9.7 *In silico* Analysen von SII0470 und SII1526

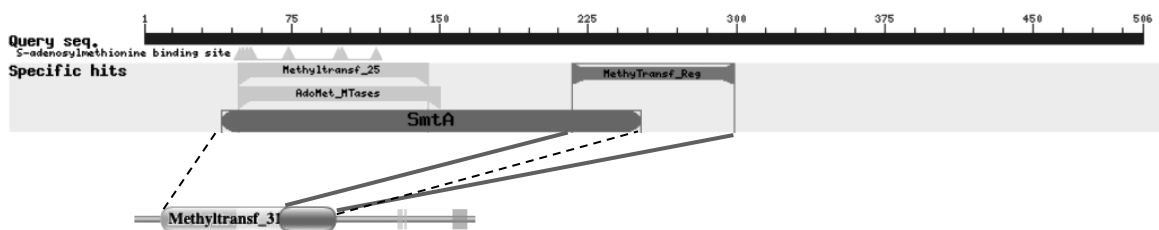


[Download](#) the data used to generate the domain graphic in JSON format.

Source	Domain	Start	End	Gathering threshold (bits)		Score (bits)		E-value	
				Sequence	Domain	Sequence	Domain	Sequence	Domain
sig_p	n/a	1	38	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
low_complexity	n/a	11	24	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Pfam	DUF2808	44	184	23.70	23.70	130.60	130.30	1.1e-34	1.3e-34
disorder	n/a	146	147	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

Abbildung 45 BlastP Analysen und Pfam Datenbank-Abgleich von SII0470

Screenshot des Proteinabgleichs von SII0470 mit der Pfam Datenbank und BlastP Analysen. SII0470 enthält im Bereich von 44-184 eine DUF2808 Domäne unbekannter Funktion.



[Download](#) the data used to generate the domain graphic in JSON format.

Source	Domain	Start	End	Gathering threshold (bits)		Score (bits)		E-value	
				Sequence	Domain	Sequence	Domain	Sequence	Domain
Pfam	Methyltransf_31	40	231	27.00	27.00	54.60	51.60	2.6e-11	2.3e-10
Pfam	MethyTransf_Reg	216	299	25.50	25.50	110.80	109.20	1e-28	3.1e-28
disorder	n/a	394	396	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
disorder	n/a	398	400	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
disorder	n/a	404	405	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
coiled_coil	n/a	475	495	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

Abbildung 46 BlastP Analysen und Pfam Datenbank-Abgleich von SII1526

Screenshot des Proteinabgleichs von SII1526 mit der Pfam Datenbank und BlastP Analysen. Das Protein SII1526 enthält eine Methyltransferase Domäne an Position 40-231 (pfam 13649), die in der SmtA Superfamilie enthalten ist. Eine regulatorische Methyltransferase Domäne befindet sich im Bereich von 216-299.

9.8 *In silico* Analysen von *sll8009* und der intergenetischen Region von *ssl8010* und *sll8009*

In Abbildung 47 ist die genetische Organisation von *sll8009* und *ssl8010* dargestellt. Der orange Markierte Bereich zeigt *ssl8010* und den intergenetischen Bereich zwischen *ssl8010* und *sll8009*, welcher zur BlastX Analyse verwendet wurde. Die blauen Striche markieren den Bereich des Gens *sll8009*, der zur BlastX Analyse verwendet wurde. Abbildung 47 zeigt die konservierte HdsM Superfamilie. Der N-terminale Bereich der putativen Methyltransferase ist um 156 Aminosäuren verkürzt. Die fehlende Sequenz ist teilweise in *ssl8010* und in der intergenetischen Region zwischen *ssl8010* und *sll8009* lokalisiert (Abbildung 47 C).

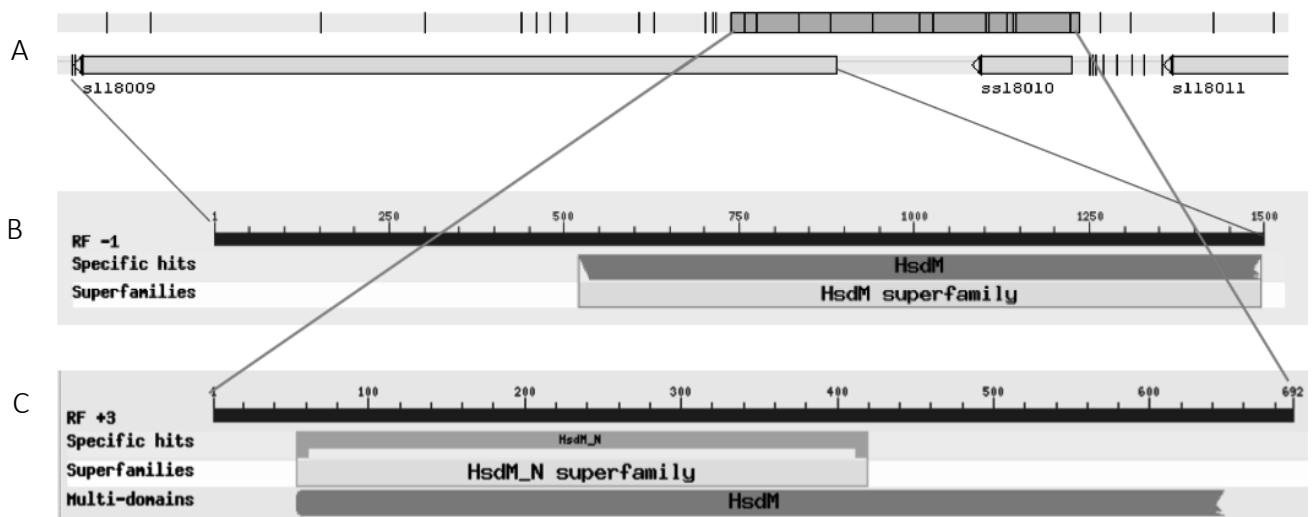


Abbildung 47 BlastX Analysen von *ssl8010-sll8009*

A Genetische Organisation von *ssl8010* bis *sll8009*. Screenshot Artemis Eintrag der pSYSG Genbank. **B** BlastX Analyse von *sll8009*. Konservierte HsdM Domäne und Superfamilie. **C** BlastX Analyse des intergenetischen Bereichs und *ssl8010*. Zeigt HsdM Superfamilie und weiterführende HsdM Domäne.

Die Gene *ssl8010* und *sll8009* befinden sich im gleichen *reading frame*. Eine Punktmutation scheint zur Unterbrechung des Transkripts geführt zu haben. Die Punktmutation von CAA zu TAA führt ein Stopcodon in die Sequenz ein. Die Termination des Transkripts ist in Abbildung 48 durch einen roten Pfeil markiert. Die verwendete Sequenz für das Alignment in Abbildung 48 entspricht der für die BlastX Analysen verwendeten intergenetischen Sequenz von *ssl8010-sll8009* (orange markiert Abbildung 47). Die gesamte Region wurde im Rahmen

dieser Arbeit resequenziert, um einen Fehler auszuschließen. Die Resequenzierung ergab keine Abweichung zur ursprünglichen Genomsequenz.

restriction endonuclease subunit S [Geobacter sp. M18]

Sequence ID: [WP_015721214.1](#) Length: 710 Number of Matches: 1

▶ [See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 1 to 225 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
404 bits(1038)	7e-135	Compositional matrix adjust.	203/225(90%)	211/225(93%)	0/225(0%)	+3
Query 18		MNPVSHNNIVNFIWGIADDVLRDVYVRGKYRDVILPMTVIRRLDAVLEPSKEKVLTMKG*				
Sbjct 1		MN V HN+IVNFIWGIADDVLRDVYVRGKYRDVILPMTVIRRLDA+LEPSKEKVL MK				
Query 198		LDSAAIANQHAALCQASGEAFYNVSPFTLRDLKNAKQQQLKADFETYLDGFSQNVQEIL				377
Sbjct 61		LD A IANQHAALCQA+GEAFYNVSPFTLRDLKNAKQQQLKADFE YLDGFS NVQEIL				120
Query 378		DKFKFRNQIPTLIEADILGHLLKFLDSRVNLSPKPVQDIDGNEVLSALDNHSMGTIFEE				557
Sbjct 121		DKFKFRNQIPTLIEADILGHLEKFLDGRVNLSPKPVQDVGNEILPALDNHSMGTIFEE				180
Query 558		LIRRFNEENNEEAGEHFTPRDVVCLMADLIFLSIGDLIESGTYLV		692		
Sbjct 181		LIRRFNEENN+EAGEHFTPRDVVCLMADLIFL + D IESGTYLV		225		

Abbildung 48 Alignment von Ssl8010-Sll8009

Der rote Pfeil markiert den Stopp im Transkript der HsdM Domäne zwischen Ssl8010 und Sll8009.

9.9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, wurden unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Rostock, 2020

Ort, Datum

Unterschrift