



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Einfluss CO₂-permeabler Aquaporine auf die Fotosynthese in *Synechococcus sp. PCC7002*

vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

Dissertation

Von Franziska Maria Joseph

Erstgutachter: Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff
Zweitgutachter: Prof. Dr. Andreas Jürgens

Darmstadt 2024



Joseph, Franziska Maria:

Einfluss CO₂-permeabler Aquaporine auf die Fotosynthese in *Synechococcus sp.* PCC7002

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2024

Tag der mündlichen Prüfung: 15.03.2024

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International <https://creativecommons.org/licenses/>

Ehrenwörtliche Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht. Die eingereichte elektronische Version stimmt mit der schriftlichen Version überein.

Darmstadt, den

Unterschrift:

Danksagung

Mein aller herzlichster Dank gilt vor allem Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff, der mir nicht nur während der Promotion, sondern auch schon seit der Bachelor-Thesis die Möglichkeit gegeben hat in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten. Danke, für die Idee zum Thema meiner Arbeit, die vielen Gespräche, Anregungen, Kommentare, Hilfestellungen und Diskussionen, auch wenn sie mit mir manchmal viele Nerven gekostet haben mögen.

Als nächstes möchte ich mich auch bei meinem Zweitgutachter Herrn Prof. Dr. Andreas Jürgens herzlich bedanken, dass er sich die Zeit und Muße genommen hat meine Arbeit mit zu betreuen und zu bewerten.

Mein Dank gilt auch Beate Otto, die immer eine passende Antwort und ein offenes Ohr für Fragen und Probleme hatte. Ohne ihr fachliches Wissen, die erheiternden Gespräche und den Austausch über kulinarische Köstlichkeiten während den „Kaffee“-Pausen, wäre der Laboralltag nur halb so schön gewesen.

Außerdem möchte ich mich auch besonders bei Frau Prof. Dr. Claudia Büchel und Dr. Nicolas Herrmann von der Goethe-Universität Frankfurt am Main für die Möglichkeit zur Nutzung des Spektrofluorometers und die Unterstützung bei der Aufnahme der 77 K Fluoreszenzspektren bedanken. Dr. Sotirios Fragkostefanakis und Leonard Fresenborg danke ich für die Vermittlung hierbei.

Ich möchte an dieser Stelle auch Dr. Nam Trung Tran für die aufschlussreichen Diskussionen, die angenehmen, gemeinsamen Stunden im Büro und die Versorgung mit „Bánh cốm“ aus dem Heimaturlaub meinen Dank aussprechen.

Des Weiteren danke ich auch Isabell Pappert für ihre Freundschaft, die Unterstützung im Labor, die angenehme Fahrgemeinschaft und die Unterhaltung beim Mittagessen gemeinsam mit Luca Jokic.

Den beiden ehemaligen Mitarbeitern Dr. Norbert Uehlein-Rössner und Dr. Paul Elsholz danke ich für die vielen tiefgehenden, fachlichen Erklärungen und Gespräche im Laufe meines Studiums und die Unterstützung darüber hinaus, sowie die lustigen Autofahrten und leckeren Mittagspausen mit Würstchen, Rippchen, Schweinebauch und Eis.

Auch bei Simon Greulich und Kim Wolf und der gesamten restlichen Arbeitsgruppe inkl. Studenten möchte ich mich an dieser Stelle für das angenehme Arbeitsklima, die



unkomplizierte Zusammenarbeit und die schönen Stunden im Sozialraum bedanken. Ein herzliches Dankeschön geht auch an unsere Sekretärin Frau Jacob für die ganze Hilfe im Bürokratie-Dschungel.

Zum Schluss möchte ich mich für die moralische Unterstützung noch bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken.

Zusammenfassung

Einige der als passive Wassertransporter entdeckten Aquaporine sind auch CO₂-durchlässig. Überexprimiert in Pflanzen führten diese bereits zu einer besseren Verteilung von CO₂ im Zellgewebe und einer damit verbundenen, verbesserten Fotosyntheseleistung.

In fotosynthetisch aktiven, einzelligen Cyanobakterien wird anorganischer Kohlenstoff hingegen bereits in Form von Bicarbonat (HCO₃⁻) in der Zelle aufkonzentriert. Dadurch wird auch bei schlechter CO₂-Verfügbarkeit eine hohe Fotosyntheserate sichergestellt. Ob der Einbau CO₂-durchlässiger Aquaporine auch hier Auswirkungen hat, sollte im Zuge dieser Arbeit geklärt werden. Hierfür wurde ein putativ CO₂ und H₂O durchlässiges menschliches Aquaporin (hAQP1), sowie ein CO₂-durchlässiges Aquaporin aus der Tabakpflanze *Nicotiana tabacum* (NtAQP1) in das Cyanobakterium *Synechococcus sp.* PCC7002 eingebaut. Zum Vergleich wurde der unveränderte Stamm (Kontrolle) und eine Transformante mitgeführt, in die ein ausschließlich wasserdurchlässiges Aquaporin aus Tabak (NtPIP2;1) eingebaut wurde.

Die heterologe Produktion der Aquaporine hAQP1 und NtAQP1 führte in den Cyanobakterien zu einer um mindestens 15-20 % erhöhten Brutto-Fotosynthese- bzw. O₂-Produktionsrate, wie Messungen mit einer O₂-Optode zeigten. Gleichzeitig änderte sich die maximale O₂-Produktionsrate nach Einbau des ausschließlich wasserdurchlässigen Aquaporins NtPIP2;1 nicht. Im lichtlimitierten Bereich der Fotosynthese, war aber teilweise eine Abnahme der O₂-Produktion zu beobachten. So wird der Lichtkompensationspunkt erst bei einer höheren Beleuchtungsstärke erreicht.

Als Grund für die erhöhten O₂-Produktionsraten wurde im lichtlimitierten Bereich der Fotosynthese eine erhöhte Effizienz des PSII angenommen, an dem O₂ entsteht. Die erhöhte Effizienz wurde, wie Messungen der 77 K Fluoreszenzspektren nach Anregung der Phycobilisome (PBS) bestätigten, durch „state transitions“ ausgelöst. In +hAQP1 und +NtAQP1 wird dadurch mehr der von den PBS eingefangenen Lichtenergie ans PSII weitergeleitet, in +NtPIP2;1 weniger. Auslöser für die „state transitions“ ist der Redoxstatus des Plastochinolpools. Dieser ist abhängig von der Nutzung der durch die Elektronentransportkette weitergeleiteten Elektronen. Ausgehend vom CO₂-Fluss in die Zelle

wird mehr oder weniger CO_2 zu HCO_3^- umgewandelt. Dadurch ändern sich die Nutzungsverhältnisse und der Redoxstatus des Plastochinolpools. Die heterologe Produktion CO_2 -durchlässiger Aquaporine in Cyanobakterien wirkt sich dabei positiv auf die Nutzung der gewonnenen Elektronen aus und führt dadurch zu einer erhöhten PSII-Effizienz. Weniger Elektronen müssen hier über zyklischen Elektronentransport (CET) recycelt werden.

Dass Zellen von +hAQP1 und +NtAQP1 beide erhöhte O_2 -Produktionsraten und eine erhöhte PSII-Effizienz aufzeigen, weist darauf hin, dass durch beide Aquaporine die CO_2 -Verfügbarkeit in der Zelle verbessert wird.

Durch die verbesserte CO_2 -Verfügbarkeit könnte es auch zu erhöhten CO_2 -Fixierungsraten kommen. Auswirkungen auf den Phänotyp bzw. das Wachstum oder die Biomasseakkumulation konnten allerdings nicht beobachtet werden.

Im lichtgesättigten Bereich der Fotosynthese haben die erhöhten maximalen O_2 -Produktionsraten bei +hAQP1 und +NtAQP1 wahrscheinlich einen anderen Grund. Hier können alle Fotosysteme ausreichend mit Lichtenergie versorgt und die gleiche maximale PSII-Effizienz erreicht werden. In +hAQP1 und +NtAQP1 muss aber weniger überschüssige, reduzierende Kraft recycelt werden.

Neben CET kann dieses Recyclen auch über alternative, teilweise O_2 -verbrauchende Elektronenflusswege (AEF) geschehen. In der Kontrolle und +NtPIP2;1 wird mehr O_2 durch AEF reduziert, da hier mehr reduzierende Kraft recycelt werden muss.

Abstract

Some aquaporins originally discovered as passive water transporters are also CO₂-conductive. When overexpressed in plants, they have led to a better distribution of CO₂ in the cell tissue resulting in improved photosynthetic performance.

In photosynthetically active, unicellular cyanobacteria, on the other hand, inorganic carbon is already concentrated in the cell in the form of bicarbonate (HCO₃⁻). Thereby ensuring a high rate of photosynthesis even when CO₂ availability is poor. Whether the integration of CO₂-permeable aquaporins also has an effect on these cells should be investigated in this work. For this purpose, a putative CO₂ and H₂O permeable human aquaporin (hAQP1) and a CO₂ permeable aquaporin from the tobacco plant *Nicotiana tabacum* (NtAQP1) were produced in the cyanobacterium *Synechococcus sp.* PCC7002. For comparison, the unmodified strain (control) and a transformant producing an exclusively water-permeable aquaporin from tobacco (NtPIP2;1) were included.

The heterologous production of hAQP1 and NtAQP1 led to an increased gross photosynthesis and O₂ production rate in the cyanobacteria by at least 15-20 %. This could be shown by measurements with an O₂ optode. At the same time, the maximum O₂ production rate did not change after integration of the water-permeable aquaporin NtPIP2;1. In the light-limited state of photosynthesis, however, a partial decrease in O₂ production was observed. The light compensation point is achieved at a higher light intensity.

The reason for the increased O₂ production rates was assumed to be an increased PSII-efficiency in the light-limited region of photosynthesis. At the PSII O₂ evolves during photosynthesis. As confirmed by measurements of 77 K fluorescence spectra after excitation of the phycobilisomes (PBS), the increased efficiency was triggered by "state transitions". In +hAQP1 and +NtAQP1 more of the light energy captured by the PBS is transferred to PSII, in +NtPIP2;1 less. The state transitions are triggered by the redox status of the plastoquinone pool. This is dependent on the utilization of the electrons transferred through the electron transport chain. Based on the CO₂ flow into the cell, more or less CO₂ is converted to HCO₃⁻ in the cyanobacteria. This changes the utilization ratios and the redox status of the

plastoquinone pool. The heterologous production of CO₂-conductive aquaporins has a positive effect on the utilization of the electrons obtained and leads to increased PSII efficiency. Fewer electrons have to be recycled via cyclic electron transport (CET).

The fact that cells of +hAQP1 and +NtAQP1 both show increased O₂ production rates and increased PSII efficiency indicates that both aquaporins improve CO₂ availability in the cell.

The improved CO₂ availability could also lead to increased CO₂ fixation rates. However, no effects on the phenotype, growth or biomass accumulation were observed.

In the light-saturated range of photosynthesis, the increased maximum O₂ production rates in +hAQP1 and +NtAQP1 probably have a different reason. Here, all photosystems can be supplied with sufficient amounts of light energy and the same maximum PSII efficiency can be achieved. In +hAQP1 and +NtAQP1, however, less excess reducing power needs to be recycled. In addition to CET, recycling can also occur via alternative electron flow pathways (AEF) that partially consume O₂. In the control and +NtPIP2;1, more O₂ is reduced by AEF, as more reducing power has to be recycled here.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	10
2	Material und Methoden	21
2.1	Verfahren mit Nukleinsäuren	21
2.1.1	Restriktion	21
2.1.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (Kolonie-PCR)	21
2.1.3	In-Fusion® HD cloning.....	23
2.1.4	Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	25
2.1.5	Elektrophoretische Auftrennung von RNA.....	27
2.1.6	Elution von DNA aus Agarosegelen	28
2.1.7	cDNA-Synthese	29
2.1.8	quantitative “Real-time”-Polymerasekettenreaktion	30
2.1.9	Sequenzierung	32
2.1.10	verwendete Plasmide	32
2.1.11	verwendete Primer.....	38
2.2	verwendete Organismen	41
2.3	Verfahren mit Proteinen.....	41
2.3.1	Nickel-Affinitätschromatographie.....	41
2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	43
2.3.3	Coomassie Blau Färbung	46
2.3.4	Western blot.....	47
2.3.5	Kolloidale Silberfärbung	48
2.3.6	Nachweis von Proteinen durch Antikörper	49
2.4	Verfahren mit <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	51
2.4.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	51
2.4.2	Kryokonservierung von <i>E.coli</i>	51

2.4.3	Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i>	51
2.4.4	Transformation von <i>E.coli</i>	53
2.4.5	Proteinextraktion aus <i>E.coli</i>	54
2.5	Verfahren mit <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002.....	54
2.5.1	Kultivierung von <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002.....	54
2.5.2	Kryokonservierung von <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002.....	57
2.5.3	Transformation von <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002.....	57
2.5.4	Genomische DNA-Extraktion aus <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002.....	58
2.5.5	RNA-Extraktion aus <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002.....	60
2.5.6	(Membran-)Proteinextraktion aus <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002.....	61
2.5.7	Aufnahme von Wachstumskurven für <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002.....	64
2.5.8	Phycobiliproteinextraktion aus <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002.....	66
2.5.9	Chlorophyll a Extraktion aus <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002.....	66
2.5.10	Aufnahme von Netto-O ₂ -Produktionsraten mit <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002 ...	67
2.5.11	77 K Fluoreszenzmessungen mit <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002.....	68
2.6	Verfahren mit <i>Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae)</i>	69
2.6.1	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	69
2.6.2	Proteinextraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	70
2.7	Statistik.....	70
3	Ergebnisse.....	71
3.1	Erzeugung und Überprüfung der Cyanobakterientransformationsvektoren.....	71
3.2	Nachweis der erfolgreichen Transformation in <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002.....	74
3.3	Einfluss der veränderten CO ₂ -Diffusion über die Membran auf den CCM.....	80
3.4	Unverändertes Wachstum in den Aquaporintransformanten.....	81
3.5	Auswirkungen der heterologen Aquaporinproduktion auf die Fotosynthese.....	84
4	Diskussion.....	89
4.1	Erzeugung der cyanobakteriellen Aquaporintransformanten.....	89

4.2	Auswirkungen der heterologen Aquaporinproduktion auf das Wachstum von <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002.....	92
4.3	Unveränderte Regulation des CCMs in den Aquaporintransformanten.....	93
4.4	CO ₂ -Durchlässigkeit des endogenen Aquaporins und Effekte der heterologen Aquaporinexpression auf dieses.....	94
4.5	Effekte der heterologen Aquaporinproduktion auf die Fotosyntheseleistung von <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002 im lichtlimitierten Bereich.....	95
4.6	Hypothese zu den erhöhten O ₂ -Produktionsraten im lichtgesättigten Bereich der Fotosynthese.....	100
4.7	Mögliche Auswirkung der erhöhten O ₂ -Produktionsraten auf die CO ₂ -Fixierungsrate	103
4.8	Einfluss der Aquaporinlokalisierung auf die O ₂ -Produktionsrate	105
5	Ausblick.....	108
6	Literaturverzeichnis	110
7	Anhang.....	121
7.1	Abbildungsverzeichnis	121
7.2	Tabellenverzeichnis	123
7.3	Abkürzungsverzeichnis	126

1 Einleitung

Die Entdeckung, dass die Diffusion von Wasser über menschliche Zellmembranen auch über die Diffusion erleichternde Proteinporen, sogenannte Aquaporine erfolgt, brachte Peter Agre 2003 den Nobelpreis in Chemie [1]. Diese Membranproteine sind, wie schnell festgestellt wurde, in nahezu jedem Organismus zu finden. Sie setzen sich zu Tetrameren zusammen, wobei jedes Monomer für sich eine eigene wasserdurchlässige Pore aufweist [2-4]. Die Termini des Monomers zeigen jeweils ins Cytosol und das Protein durchquert mit sechs Alpha-Helices die Membran, wodurch es zu zwei cytosolischen und drei extrazellulären Schleifen kommt [3, 5]. Die Monomerpore erhält durch das sogenannte NPA-Motiv (Asparagin-Prolin-Alanin-Seitenkette) der in die Pore ragenden Schleifen 2 (cytosolisch) und 5 (extrazellulär) und der ar/R-Region (aromatisches Arginin) auf Schleife 5 ihre spezifische Selektivität für H₂O über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Größenausschluss [4, 6]. In der Mitte des Tetramers entsteht eine fünfte „zentrale“ Pore, deren Funktion noch nicht abschließend geklärt ist [7]. In einigen Studien konnte aber bereits festgestellt werden, dass manche zur Klasse der Aquaporine gehörende Proteinporen nicht nur die H₂O Diffusion über die Zellmembran erleichtern, sondern auch die Diffusionsbarriere für andere kleine Moleküle wie Glycerin und CO₂ senken [8], [9], [10]. Ob diese durch die Zentrale und/oder Monomere Pore in die Zelle gelangen bleibt aber offen [7]. CO₂ sollte z.B. aufgrund seiner Größe, linearen Struktur und quadrupolen Eigenschaft durch beide Poren in die Zelle gelangen können [11].

Die Relevanz eines proteinvermittelten CO₂-Transports in die Zelle wurde lange Zeit stark diskutiert und die Existenz CO₂-durchlässiger Aquaporine deshalb abgestritten (vgl. [12]). Denn die Doppellipidschichten, aus denen die Zellmembranen bestehen, sollten eigentlich ausreichend durchlässig für CO₂ sein (vergleiche Abbildung 1A, [13], [14]).

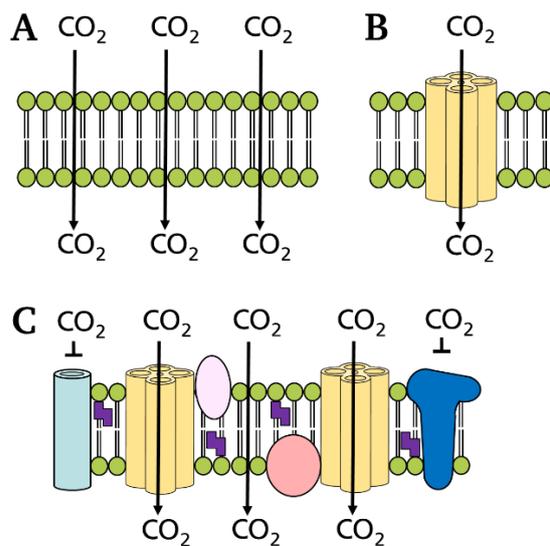


Abbildung 1: CO₂-Diffusion durch unbesetzte Doppellipidschichten (Zellmembranen) (A), über Aquaporine in der Zellmembran (B) und in proteinbesetzten Biomembranen (C) (Adaptiert nach [15])

Etliche Studien aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff konnten aber eindeutig belegen, dass spezielle Aquaporine in Pflanzen und auch Kunstmembranen, CO₂ Diffusion vermitteln (siehe z.B. [8, 14, 16-19]). Dies liegt vor allem auch daran, dass Zellmembranen meist mit vielen Membranproteinen besetzt sind, welche die CO₂ Diffusion über die Doppellipidschicht behindern (Abbildung 1C, [15]). Der Einbau CO₂ Durchlässiger Aquaporine, verhindert dass an dieser Stelle andere CO₂ undurchlässige Proteine in die Membran eingebaut werden und ermöglicht weiterhin die CO₂-Diffusion in die Zelle oder kann diese sogar verbessern. Denn auch die Einlagerung von z.B. Sterolen in die Membran macht diese CO₂ dicht [20], wie besonders Kai und Kaldenhoff (2014) beweisen konnten, die unterschiedliche Mengen an Sterol in eine Lipidschicht bzw. Kunstmembran einbauten [14]. Dabei zeigte sich auch, dass durch den Einbau des Aquaporins NtAQP1 aus *Nicotiana tabacum* in die Membran, die CO₂-Durchlässigkeit wieder erhöht werden konnte, während ein anderes Aquaporin aus der Tabakpflanze, NtPIP2;1, z.B. keinen Effekt auf die CO₂-Durchlässigkeit der Membran hatte. Eine verbesserte CO₂-Durchlässigkeit konnte inzwischen auch durch den Einbau des menschlichen Aquaporins hAQP1 in eine CO₂-dichte Kunstmembranen beobachtet werden [17].

Überexprimiert in Tabakpflanzen konnte ebenfalls sowohl für NtAQP1 aus der Tabakpflanze selbst [8], als auch für hAQP1 aus dem Menschen [17] eine verbesserte CO₂ Diffusion und

damit einhergehend eine erhöhte Fotosyntheserate festgestellt werden. Die Pflanzen zeigten in beiden Fällen eine insgesamt erhöhte CO_2 -Aufnahmerate und besseres Wachstum. Es wurde angenommen, dass gerade in höheren bzw. komplexeren Organismen wie Pflanzen, die erleichterte passive CO_2 -Diffusion die Verteilung von CO_2 im gesamten Gewebe verbessert ([18], [21], siehe Abbildung 2). Eine optimale laterale CO_2 -Diffusion auch in die innersten, Fotosynthese betreibenden Zellen des Blattgewebes ist wichtig, vor allem da CO_2 z.B. hauptsächlich über Stomatazellen in die Pflanzenblätter gelangt.

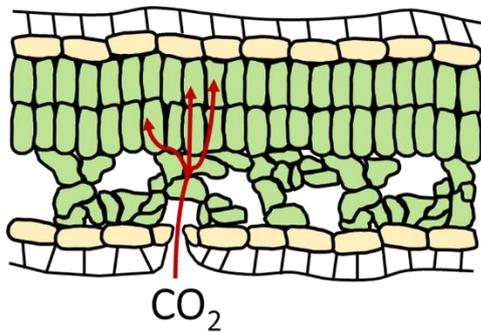


Abbildung 2: Verteilung von CO_2 im Gewebe eines Pflanzenblatts (Querschnitt)

Auch für C_4 -Pflanzen konnte die Relevanz CO_2 -durchlässiger Aquaporine bereits nachgewiesen werden [21]. Die CO_2 -Fixierung findet hier zwar hauptsächlich in den CO_2 -dichten Bündelscheidenzellen statt und das CO_2 wird dazu in den Mesophyllzellen in Form von Malat vorfixiert, eine optimale CO_2 -Diffusion durch das Gewebe verbessert aber die Vorfixierung in den Mesophyllzellen und damit schlussendlich auch die CO_2 -Fixierung der Pflanze.

Ob Aquaporine jedoch auch in einzelligen, fotosynthetisch aktiven Organismen relevante Effekte haben ist die Frage. Hier besteht nicht die Notwendigkeit CO_2 von einer zur nächstgelegenen Zelle bzw. in einem Gewebe zu verteilen, da unizelluläre Organismen immer direkten Kontakt zur Umwelt haben (siehe Abbildung 3).

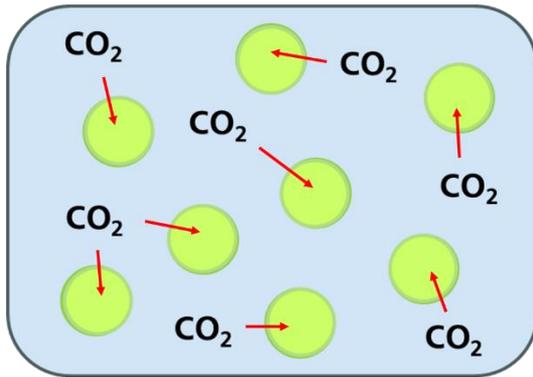


Abbildung 3: CO₂-Aufnahme bei einzelligen, fotosynthetisch aktiven Organismen

Die einfache passive Diffusion von CO₂ über freie Stellen in den Membranen könnte ausreichend hoch sein, um die eine Zelle mit der notwendigen CO₂ Konzentration zu versorgen.

Zu solchen, oxygene Fotosynthese betreibenden, einzelligen Organismen zählen zum Beispiel auch die Cyanobakterien. Es wird ferner sogar angenommen, dass sich die Chloroplasten der Pflanzen und eukaryotischen Mikroalgen erst aus einer Endosymbiose mit verschiedenen Cyanobakterien entwickelt haben [22]. Damit trugen und tragen Sie maßgeblich zur Entstehung und Aufrechterhaltung aeroben Lebens auf der Erde bei. Sie können neben CO₂ auch z.B. Bicarbonat (HCO₃⁻) als Quelle für die anorganische Kohlenstofffixierung (durch Umwandlung in CO₂) nutzen [23, 24]. Sie sind also nicht ausschließlich auf die Verfügbarkeit von CO₂ in der Umgebung als anorganische Kohlenstoffquelle (C_i) angewiesen. Wenn CO₂ vermittelnde Aquaporine hier ebenfalls Einfluss auf die CO₂-Verfügbarkeit bzw. die Fotosynthese der Zelle haben, würde das die Relevanz von CO₂ vermittelnden Aquaporinen nochmals stark verdeutlichen.

Einige Cyanobakterienstämme haben sich im Laufe der Zeit z.B. grade für die Erforschung der Fotosynthese als Modellorganismen herauskristallisiert [25]. Zu diesen gehört auch das einzellige, kokkoide Bakterium *Synechococcus sp.* PCC7002. Im Vergleich zu anderen Mikroalgen hat es eine sehr kurze Generationszeit. Włodarczyk et al. (2020) erreichten z.B. eine minimale Verdopplungszeit von ca. 2,27 h bei 38°C, Begasung mit 1% CO₂ und 500 μmol/m²*s (siehe [25] „Supplementary information“). Aufgrund seiner natürlichen Kompetenz ist es außerdem leicht genetisch modifizierbar [26] und bietet damit zusätzlich eine gute Plattform für die heterologe Proteinproduktion. Es sind einige „neutrale“ Stellen im

Genom bekannt, in die neue DNA-Sequenzen ohne gravierende Schäden für die Zelle z.B. über homologe Rekombination eingebaut werden können [27]. Weiterhin wurde das Genom dieses Stamms bereits vollständig sequenziert (NCBI Gen Datenbank: CP000951.1).

C. van Baalen isolierte den Stamm erstmals 1961 als *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 aus dem Meer vor der Küste von Puerto Rico [28]. Um sich an die fluktuierenden Umweltbedingungen des karibischen Meers anpassen zu können, besitzt *Synechococcus sp.* PCC7002 eine hohe Salz-, Temperatur und Lichttoleranz [29-31]. Nach Nomura et al. (2006) hat zum Beispiel selbst eine hohe Beleuchtungsstärke von 4500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ zumindest in den ersten 40 min keinen negativen Effekt auf die O_2 -Produktion und damit die Brutto-Fotosyntheserate von *Synechococcus sp.* PCC7002. Neben Salzgehalt, Temperatur und Lichtstärke unterliegt auch die Verfügbarkeit von anorganischem Kohlenstoff (C_i) in Form von CO_2 und Bicarbonat (sowie CO_3^{2-}) in marinen Systemen starken Schwankungen [32], z.B. da sich die Löslichkeit von CO_2 in Wasser temperatur- und pH-Wert-bedingt ändert. Im Zuge der Fotosynthese wird dieser anorganische Kohlenstoff (C_i) aber zur Produktion energiereicher organischer Moleküle (Zucker) benötigt. Hierzu wird C_i im Calvin-Benson-Bassham-Zyklus (CBBC) fixiert. Das benötigte C_i nimmt die Zelle dabei aktiv über die in den Zellmembranen sitzenden Bicarbonat-Transporter oder passiv durch CO_2 -Einstrom aus der Umgebung auf [33]. Um Schwankungen in der C_i -Konzentration der Umgebung entgegenzuwirken, haben Cyanobakterien ein regulierbares System zur Aufkonzentrierung von C_i entwickelt – den CO_2 -Konzentrierungsmechanismus (CCM). Bei CO_2 Konzentrationen $>0,1\%$ im Medium [34], sorgen konstitutiv aktive Bicarbonat-Transporter, sowie ein CO_2 -„Uptake“-Komplex (Ndh1-MS') - mit jeweils geringer Affinität für das entsprechende Substrat - für eine stetige Aufnahme von C_i in die Zelle [35-37]. Sinkt die CO_2 -Konzentration in der Umgebung, wird die Produktion weiterer Bicarbonat-Transporter und eines CO_2 -„Uptake“-Komplexes (Ndh1-MS) induziert, die eine hohe Affinität für Bicarbonat (HCO_3^-) bzw. CO_2 aufweisen [35-37]. Dadurch kann auch bei niedrigen C_i -Umgebungskonzentrationen die interne C_i -Konzentration hochgehalten werden, um effektiv CO_2 im CBB-Zyklus fixieren zu können.

Die erwähnten Bicarbonat-Transporter und CO_2 -„Uptake“-Komplexe sitzen dabei wie auch z.B. Ionenkanäle und Aquaporine in den Doppellipidschichten der verschiedenen Zellmembranen [38-40]. *Synechococcus sp.* PCC7002 weist sowohl eine äußere, als auch eine zweite, innere Plasmamembran auf, die den kompletten Zellarraum umschließen. Im

Periplasma zwischen diesen beiden Membranen kommt es zu einer Ansammlung von Peptidoglykan und Cellulose, welche die Zellwand der gramnegativen Cyanobakterien bilden [41]. Durch eine teilweise mit der inneren Plasmamembran verbundene Thylakoidmembran [39], in der hauptsächlich respirative und fotosynthesebezogene Proteinkomplexe sitzen [42], wird das innere der Zelle (Cytoplasma/Cytosol) von einem weiteren Zellarraum, dem Lumen, abgegrenzt.

Um über die äußere und innere Plasmamembran transportiertes bzw. einströmendes C_i besser in der Zelle zu halten, wird es im Cytosol als HCO_3^- aufkonzentriert. Denn für geladene, größere Moleküle wie HCO_3^- stellen die Doppellipid-Membranen eine größere Diffusionsbarriere dar, als für unpolare kleine Moleküle wie CO_2 [43]. Passiv über die Membranen einströmendes CO_2 wird hierfür aktiv von den bereits erwähnten CO_2 -„Uptake“-Komplexen in HCO_3^- umgewandelt [40, 44-46]. Im Cytosol gibt es zudem keine Carboanhydrasen, die die Rückumwandlung von $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ katalysieren bzw. beschleunigen und bei einem cytosolischen pH-Wert von pH 7.8-8.2 liegt das chemische Gleichgewicht dieser Reaktion eher auf Seiten von HCO_3^- [47]. Durch die Bicarbonat-Transporter wird zusätzlich stetig HCO_3^- in die Zelle gepumpt. Das chemische Gleichgewicht zwischen CO_2 und HCO_3^- wird im Cytosol folglich aktiv in Richtung HCO_3^- verschoben [47]. Dadurch kann in der Zelle eine 100-1000-fach höhere HCO_3^- -Konzentration als in der Umgebung erreicht werden [24, 48].

Durch passiven Einstrom aus dem Cytosol bzw. Lumen ist auch der Bicarbonatgehalt in den Carboxysomen – icosahedralen Mikrokompartimenten der Cyanobakterien – hoch, in denen sich das für den CBB-Zyklus wichtige Enzym Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/-oxygenase (RuBisCO) befindet [43]. Dieses katalysiert im Ersten Schritt des CBB-Zyklus z.B. die Addition von CO_2 an den C5-Körper Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP). Dabei entsteht ein instabiler C6-Körper, der in zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat (3-PGA) zerfällt. Aus den Carboxysomen ausgetretenes 3-PGA [49] wird dann im Cytosol unter Verbrauch von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) und Nutzung des Reduktionsäquivalents Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) weiter zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) reduziert. Der Großteil des gebildeten GAP wird zur Regenerierung von RuBP genutzt. Da durch die Fixierung von CO_2 allerdings zusätzliche Kohlenstoffatome zur Bildung von durchschnittlich mehr GAP gewonnen werden, kann ein Teil des GAPs auch zur weiteren

Zuckersynthese z.B. zur Speicherung von Energie abgeführt werden. Da RuBisCO als Substrat neben des regenerierten RuBPs aber nur CO₂ (oder O₂) akzeptiert, wird das von der Zelle im Cytosol aktiv Richtung HCO₃⁻ verschobene chemische Gleichgewicht zwischen HCO₃⁻ und CO₂ in den Carboxysomen wieder in Richtung CO₂ zurückverschoben. Dafür befinden sich in den Carboxysomen Carboanhydrasen, welche die Gleichgewichtsreaktion katalysieren [50].

Abhängig von der Art der Carboanhydrase und RuBisCO lassen sich die Carboxysomen der Cyanobakterien dabei in α- und β-Carboxysomen einteilen [51]. *Synechococcus sp.* PCC7002 zählt zu den β-Cyanobakterien und enthält RuBisCO des Typs 1B, sowie eine carboxysomale β-Carboanhydrase (CcaA bzw. IcfA) [50-52]. Beide binden an das carboxysomale „scaffold“ Protein CcmM, das die beiden Enzyme dann über ein weiteres Protein (CcmN) mit der inneren Carboxysomenschale verankert [52, 53]. CcaA weist hierfür eine große Affinität für CcmM auf und CcmM besitzt zusätzlich eine C-Terminale Domäne mit mehreren, zur kleinen Untereinheit von RuBisCO 1B homologen Sequenzen [54]. Es wird angenommen, dass CcmM darüber an die großen Untereinheiten von RuBisCO binden kann [47, 54]. An das so gebildete Procarboxysom aus RuBisCO, Carboanhydrase, CcmM und CcmN lagern sich dann die beiden Hüllproteine CcmK und CcmL an [55]. Dabei entstehen platte CcmK Hexamere, die je nach Isoform der CcmK-Proteine verschieden geformte, zentrale, geladene Poren bilden [49] und über CcmL mit weiteren CcmK Hexameren zu einem Icosahedron verknüpft werden. Über diese Poren ist der Ein- und Austritt von HCO₃⁻, regeneriertem RuBP und 3-PGA, sowie 2-PG in und aus dem Carboxysom möglich [56]. Durch die sehr dicht gepackte Proteinhülle der Carboxysomen und aufgrund der Ladung der Pore sind die Carboxysomen aber weitestgehend dicht für unpolare Moleküle wie CO₂ und O₂ [57]. Der Sauerstoffgehalt ist durch nicht vorhandenen, aktiven O₂-Transport in die Carboxysomen folglich gering, der CO₂-Gehalt aufgrund der carboxysomalen Carboanhydrase hingegen hoch. In unmittelbarer Nähe der RuBisCO entsteht dadurch ein günstiges Partialdruckverhältnis von CO₂ zu O₂ [43]. Dies ist von Vorteil, da bei der Fixierung von O₂ durch RuBisCO neben dem von der Zelle nutzbaren Produkt 3-PGA das toxische Nebenprodukt 2-Phosphoglycerat (2-PG) entsteht, welches von der Zelle unter Freisetzung von CO₂ wieder abgebaut werden muss (Fotorespiration). Der Anteil an Fotorespiration bzw. Oxygenasereaktionen liegt laut Simulationen von Qian et al (2017) für *Synechococcus sp.* PCC7002 nur bei ca. 2% der Carboxylasereaktionen [58]. Die

Fotorespirationsrate ist damit ähnlich niedrig wie die von C4 Pflanzen [59]. In der C3-Pflanze Weizen liegt die Fotorespirationsrate im Vergleich dazu z.B. bei ca. 27 % [59].

Der geringe Anteil an CO₂, welcher trotz der genannten Eigenschaften der Hülle aus den Carboxysomen ausströmt, wird durch CO₂-„Uptake“-Komplexe in der Thylakoidmembran abgefangen und so der Verlust aus der Zelle minimiert [46]. Diese CO₂-„Uptake“-Komplexe sorgen gleichzeitig auch dafür, dass passiv in die Zelle einströmendes CO₂ durch die Umwandlung zu HCO₃⁻ in der Zelle gehalten wird. Die CO₂-Konzentration im Cytosol wird mit Hilfe der CO₂-„Uptake“-Komplexe folglich aktiv geringgehalten [60]. Aufgrund des entstehenden CO₂-Partialdruckgefälles zwischen Umgebung und Zellinnerem kommt es zu einem stetigen CO₂-Einstrom in die Zelle bzw. ins Cytosol.

Die CO₂-„Uptake“-Komplexe gehören zur Klasse der NAD(P)H-Dehydrogenase ähnlichen Komplexe (Ndh1) [61]. Auch in der Atmungskette und dem zyklischen Elektronentransport spielen diese Ndh1-Komplexe eine wichtige Rolle [61]. Obwohl die Komplexe Ähnlichkeiten zu NAD(P)H-Dehydrogenasen aufweisen, konnte die Funktion als solche in Cyanobakterien für fotosynthetisch genutzte Ndh1-Komplexe bis heute nicht nachgewiesen werden [56]. Hier stellt sehr wahrscheinlich eher reduziertes Ferredoxin den Elektronendonator für die katalysierten Prozesse dar [62, 63]. Die Funktion der einzelnen Ndh1-Komplexe unterscheidet sich dabei stark abhängig von der eingebauten Isoform einzelner, weniger Untereinheiten, vor allem NdhD und NdhF [61, 64]. Gemein ist allen hier erwähnten Ndh1-Komplexen, dass sie (hauptsächlich) in der Thylakoidmembran der Cyanobakterien lokalisiert sind [40, 44].

Zwei Ndh1 Komplexe Ndh1-MS (Ndh1-3) bzw. Ndh1-MS' (Ndh1-4) werden speziell mit der aktiven CO₂-Umwandlung in HCO₃⁻ assoziiert [65]. Das wichtigste Unterscheidungsmerkmal zu anderen Ndh1-Komplexen ist hierbei vor allem die Anlagerung von sogenannten CO₂-„Uptake“-Proteinen (CupA/B bzw. ChpY/X) und die Isoformen NdhD3 und F3 für Ndh1-MS sowie NdhD4 und F4 für Ndh1-MS' [35]. Die erwähnten CO₂-„Uptake“-Proteine binden in beiden Fällen an die NdhF Isoformen des Ndh1-Komplexes.

Die Isoformen der NdhD, NdhF und Cup-Untereinheiten von Ndh1-MS und Ndh1-MS' weisen insgesamt sehr ähnliche Funktionen auf. Mehrere Studien konnten aber zeigen, dass die Produktion der D3, F3 und CupA Isoform hauptsächlich unter CO₂-Limitierenden Bedingungen induziert wird und der Ndh1-MS Komplex gleichzeitig eine sehr hohe Affinität für CO₂ aufweist [35-37, 66]. Die Gensequenzen für die Isoformen D4, F4 und CupB des Ndh1-MS'-Komplexes

werden hingegen konstitutiv, also auch bei hohen externen CO₂-Konzentrationen exprimiert. Der Komplex besitzt allerdings eine geringere Affinität für CO₂ als Ndh1-MS [35-37, 66]. Die Umwandlung von CO₂ zu Bicarbonat ähnelt dabei der von Carboanhydrasen [46] (vgl. auch 4.5).

Die Aufnahme von CO₂ in die Zelle erfolgt im Gegensatz zur aktiven Umwandlung in HCO₃⁻ passiv. Es ist kein aktiver CO₂-Transporter in cyanobakteriellen Zellen bekannt [56]. CO₂ strömt aufgrund des Partialdruckgradienten zwischen Umgebung und Zellinnerem in die Zelle ein oder aus dieser heraus. Da Doppellipidmembranen für das kleine, unpolare Molekül CO₂ eine niedrige Diffusionsbarriere besitzen [13, 14], wird angenommen, dass CO₂ in Cyanobakterien über Membrandiffusion in die Zelle gelangt.

Zumindest in *Synechococcus sp.* PCC7942 gibt es aber Hinweise darauf, dass das endogene Aquaporin AQP Z zur CO₂-Diffusion über die Zellmembran beitragen könnte [67, 68]. Auch von anderen Quellen wird angeführt, dass ein passiver, proteinvermittelter CO₂-Transport, z.B. über Aquaporine in den Cyanobakterien denkbar wäre [56, 60]. *Synechococcus sp.* PCC7002 besitzt ebenfalls ein endogenes Aquaporin (SsAQP Z, NCBI Gen Datenbank: ACB00406.1). Ob dieses die CO₂-Diffusion ermöglicht bzw. erleichtert wurde aber noch nicht untersucht.

Im Gegensatz zum CO₂-Transport in die Zelle ist der HCO₃⁻-Transport bereits gut erforscht. In *Synechococcus sp.* PCC7002 wurden bisher 3 verschiedene Bicarbonat-Transporter entdeckt: Der „bicarbonate uptake transporter“ BicA, der „sodium dependent bicarbonate transporter“ SbtA und ein putatives Porin für Bicarbonat porB [37, 69]. Wie z.B. aus Studien von Price et al. (2004) hervorging, hat SbtA dabei eine höhere Affinität für HCO₃⁻ als BicA. Dafür ist die Flussrate bei BicA höher als bei SbtA [70]. Die Experimente mit Deletions-Transformanten zeigten auch, dass beide Bicarbonat-Transporter unter C_i-Limitierung an der Aufnahme von Bicarbonat beteiligt sind, HCO₃⁻-Transport über SbtA allerdings den größeren Anteil ausmacht [37]. Weiterhin wird vermutet, dass es sich bei BicA im Gegensatz zu SbtA um einen konstitutiv aktiven Bicarbonat-Transporter handelt. Das Expressionslevel von BicA variiert allerdings trotzdem abhängig von der C_i-Konzentration der Umgebung. Unter C_i-limitierenden Bedingungen konnte in der gleichen Studie sowohl für BicA, SbtA und porB zunächst eine kurzzeitige, induzierte Steigerung des Transkriptniveaus beobachtet werden, die aber bei BicA nach wenigen Stunden wieder auf das Grundniveau und bei SbtA und porB zwar auf ein

niedrigeres, aber weiterhin erhöhtes Level abfiel. Auch Shibata et al. (2002), die SbtA in *Synechocystis sp.* 6803 erstmals als $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Symporter identifizierten, stellten fest, dass SbtA unter CO_2 -Limitierten Bedingungen stark induziert wird [69]. SbtA ist in *Synechocystis sp.* PCC6803 hauptsächlich in der inneren Plasmamembran [40], laut Pisareva et al. (2011) aber auch in der Thylakoidmembran der Zelle zu finden [39]. Laut Shelden et al. (2010) weist BicA (wie auch SbtA laut [71]) Strukturen auf, die ins Periplasma oder Cytosol zeigen, was eine Lokalisation in der inneren Plasmamembran ebenfalls sehr wahrscheinlich macht [38]. Über den Bicarbonat-Transport von porB ist hingegen fast nichts bekannt, wahrscheinlich handelt es sich hier um eine Pore, die hauptsächlich in der äußeren Plasmamembran zu finden ist [72, 73].

Zur Fixierung des durch Bicarbonat-Transport oder die Umwandlung von CO_2 in der Zelle aufkonzentrierten Bicarbonats bzw. C_3 im Calvin-Zyklus benötigt die Zelle zusätzlich noch Energie in Form von ATP und das Reduktionsequivalent NADPH. Beides wird der Zelle z.B. durch die lichtgetriebene Reaktion der Fotosynthese bereitgestellt.

Die Cyanobakterien besitzen hierfür zum „Auffangen“ des auf die Zelle treffenden Lichts ähnlich wie Pflanzen Lichtsammelkomplexe - die Phycobilisome - welche die Anregungsenergie des Lichts an die beiden Fotosysteme (PSI und PSII) weiterleiten können. Diese bestehen hauptsächlich aus Phycobiliproteinen, welche sich Antennenförmig um einen Kernkomplex anlagern [74]. In *Synechococcus sp.* PCC7002 kommen drei verschiedene Phycobiliproteine vor: Phycocyanin (Antenne), Phycoerythrin (Antenne) und Allophycocyanin (Kernkomplex)[74]. Teilweise sind auch „orange carotinoid“ bindende Proteine (OCPs) mit den Antennen der Phycobilisome verknüpft [75]. Das Absorptionsmaxima der Phycobilisome liegt hierbei im gelb-grünen Bereich des Lichtspektrums (ca. 500-570 nm) [76]. Zusammen mit den Chlorophyllmolekülen, die Licht im roten und blauen Wellenlängenbereich absorbieren, kann so ein größerer Teil des Lichtspektrums für die Fotosynthese (z.B. auch unter niedriger oder monochromatischer Lichtbedingung) ausgenutzt werden [76]. Die Phycobilisome sitzen auf der Thylakoidmembran, in der sich die fotosynthetischen Komplexe befinden [77].

Am PSII wird durch die (Phycobilisom-)Anregung Wasser gespalten, um Elektronen für den linearen Elektronentransport (LET) zu gewinnen. Dabei entsteht O_2 . Die übertragenen Elektronen werden schließlich zur Bildung des Reduktionsequivalents NADPH genutzt,

welches im Calvin-Zyklus zur CO₂-Fixierung benötigt wird. Gleichzeitig werden im Zuge des LETs Protonen über die Membran transloziert, welche zur Produktion von ATP durch die ATP-Synthase genutzt werden können. Durch LET wird der Zelle somit reduzierende Kraft und „proton motive force“ zur Verfügung gestellt. Wenn der Bedarf der Zelle an NADPH bzw. reduzierender Kraft geringer als ihre Produktion ist, akkumuliert sich NADPH in der Zelle. Dann können weitere transportierte Elektronen zum Schutz vor der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) z.B. durch zyklischen Elektronentransport über PSI (CET) recycelt werden [75]. Das Elektron des Co-Substrats der NADPH-Reduktase (FNR) - reduziertes Ferredoxin - wird dazu über Ndh I-ähnliche Komplexe und Plastochinon zurück auf den Cytb₆f Komplex übertragen [56]. Die Ansammlung von NADPH wird dadurch verhindert, während weiterhin Protonen zur Bildung des als Energielieferant benötigten ATPs über die Membran transloziert werden [75].

Der lichtgetriebene Elektronentransport läuft im Vergleich zur CO₂-Fixierung (ca. 100 s) sehr schnell ab (wenige Sekunden) und ist nur bei niedrigen Lichtbedingungen limitierend für die Fotosynthese. Geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist ansonsten die CO₂-Fixierung. [78]

Durch die aktive C_i-Aufkonzentrierung wird in den einzelligen Cyanobakterien aber bereits eine hohe CO₂-Fixierungs- bzw. Fotosyntheserate erreicht [47]. Ob eine darüber hinaus verbesserte CO₂-Verfügbarkeit durch den Einbau CO₂-durchlässiger Aquaporine in die Zellmembran der Cyanobakterien überhaupt einen Einfluss auf z.B. die Fotosyntheserate hat, sollte im Zuge dieser Arbeit untersucht werden. Dafür wurden die bereits erwähnten (putativen) CO₂-Diffusion vermittelnden Aquaporine NtAQP1 [8] und hAQP1 [9] heterolog in dem Cyanobakterium *Synechococcus sp.* PCC7002 produziert und die Effekte einer möglicherweise verbesserten CO₂-Diffusion über die Zellmembran auf die Zelle und vor allem ihre Fotosyntheseleistung untersucht. Neben dem unveränderten Cyanobakterium wurden als Kontrolle zusätzlich Zellen mitgeführt, welche das Aquaporin NtPIP2;1 produzieren. Dieses ist ausschließlich wasserdurchlässig [14, 17].

2 Material und Methoden

2.1 Verfahren mit Nukleinsäuren

2.1.1 Restriktion

Bereits vorhandene Plasmide, von denen z.B. DNA-Fragmente zum Klonieren kopiert werden sollten, wurden nach der Plasmidisolierung durch Restriktion oder Polymerase-Ketten-Reaktionen auf ihre Richtigkeit überprüft.

Zum Schneiden von DNA-Strängen an bestimmten DNA-Sequenzen wurde je 1 µg der DNA mit 1 U des Restriktionsenzym (mit der entsprechenden Sequenzerkennungsdomäne) in 1x Reaktionspuffer (Enzymspezifisch) vermischt (siehe Tabelle 1). Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte für 1 h bei der enzymspezifischen optimalen Temperatur. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne DNA, so wie ein Ansatz ohne Enzym mitgeführt. Die erfolgreiche Restriktion wurde durch elektrophoretische Auftrennung der DNA in einem 0,8% Agarosegel (mit EtBr) überprüft.

Tabelle 1: Rezeptur des Restriktionsansatzes

	Einzusetzen:
10x enzymspezifischer Reaktionspuffer	1,5 µl
DNA-Template	1 µg
Restriktionsenzym (1 U/µl)	1 µl
Autoklaviertes, deionisiertes H ₂ O	Ad 15 µl

2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (Kolonie-PCR)

Zur Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Sequenz oder zum Nachweis dieser aus einem DNA-Gemisch, wurde eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durchgeführt. Die dafür verwendete, hitzebeständige Taq DNA-Polymerase stammte von Biozym (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) und die PCR wurde deshalb nach dem zugehörigen Hersteller-Protokoll durchgeführt. Als DNA-Vorlage („Template“) diente hierfür entweder

genomische DNA, Plasmid-DNA, cDNA oder ein Extrakt aus aufgebrochenen Zellen. Für letzteres (Kolonie-PCR) wurde Zellmaterial mit einer Pipettenspitze von einem Nährboden abgenommen und in 10 µl H₂O gelöst. In einem Wasserbad erfolgte dann der Aufbruch der Zellen durch Aufkochen bei 95 °C für 10 min und anschließendem Einfrieren bei -80°C. Je 1 µl des Zellaufbruchs wurde nach Auftauen bei 37°C als DNA-„Template“ in der PCR eingesetzt. Für mehrere Ansätze wurde zunächst immer ein „Mastermix“ mit allen in Tabelle 2 angegebenen Komponenten, außer den DNA-„Templates“, hergestellt und auf Eis gekühlt.

Tabelle 2: Rezeptur zur Erstellung eines PCR-Ansatzes

	Einzusetzen:
10x Reaktionspuffer (mit MgCl ₂)	1,5 µl
dNTPs (10 mM, je 2,5 mM)	1,5 µl
„forward Primer“ (10 µM)	0,6 µl
„reverse Primer“ (10 µM)	0,6 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,075 µl
DNA-„Template“	≤ 10 ng Plasmid- & c-DNA, ≤ 500 ng genom. DNA
DMSO (99,5 %, bei Kolonie-PCR)	0,316 µl
Autoklaviertes, deionisiertes H ₂ O	Ad 15 µl

Die Überprüfung der eingesetzten Komponenten auf Verunreinigungen z.B. mit Fremd-DNA erfolgte durch Mitführen eines Ansatzes ohne DNA-„Template“. Außerdem wurde zusätzlich ein DNA-„Template“, welches keine zu den Primern homologen Gensequenzen aufweist (Spezifitäts-Kontrolle), sowie, wenn möglich, ein DNA-„Template“ mit dem bereits erfolgreich eine PCR durchgeführt wurde (Funktions-Kontrolle) als Kontrollen für die PCR eingesetzt. Die eigentliche PCR-Reaktion fand während der Inkubation der Ansätze in einem „Thermocycler“ (T Gradient von Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) nach dem in Tabelle 3 angegebenen Programm statt.

Tabelle 3: PCR-Zyklus-Programm

*abhängig von der optimalen Anlagerungstemperatur der verwendeten Primer

Schritt	Temperatur	Zeit	Wdh. ab	Wdh.
1	95 °C	1 min		
2	95 °C	15 sec		
3	55-65°C *	15 sec		
4	72 °C	15 sec/1000 bp	Schritt 2	25x-40x

Primer für die PCR wurden so designt, dass sie eine Schmelztemperatur zwischen 55-65 °C aufweisen und der Temperaturunterschied zwischen zwei zusammengehörenden Primern nicht mehr als 2 °C beträgt. Der GC-Gehalt lag für alle Primer ungefähr bei 50 %. Die erfolgreiche Amplifizierung des PCR-Produkts wurde durch elektrophoretische Auftrennung der Probe auf einem 0,8 % Agarosegel (+EtBr) überprüft (siehe 2.1.4)

2.1.3 In-Fusion® HD cloning

Um die cDNA-Sequenz der Aquaporingene (Zielsequenz) über homologe Rekombination in das Genom von *Synechococcus sp.* PCC7002 einbauen zu können, wird ein Plasmid benötigt, welches zum Organismus homologe, die Zielsequenz flankierende Sequenzbereiche aufweist. Der Vektor pBK47 weist solche für einen im Genom als „neutral site 2“ [27] markierten Bereich auf. Er enthält aber als Zielsequenz bereits die DNA für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP), welches deshalb gegen die cDNA der Aquaporingene ausgetauscht werden muss. Das In Fusion® HD cloning von Takara Bio Inc. (Kusatsu, Präfektur Shiga, Japan) ist eine einfache Methode, um ein DNA-Fragment (Insert) an einer beliebigen Stelle in einen Vektor einzufügen. Hierfür werden sowohl das DNA-Fragment, wie auch der Vektor (ohne *gfp*) mittels PCR vervielfältigt. Die Primer wurden mit Hilfe des „Primer-Design-Tools“ von Takarabio designt. Neben der zum kopierenden Fragment homologen Anfangs- oder Endsequenz besteht der Primer für die „Insert“-Fragmente noch aus einer ca. 15 bp langen Sequenz, die zum Anfang bzw. Ende des kopierten Vektor-Fragments homolog ist. Dadurch werden bei der „Insert“-PCR

zum Vektor passende Überhänge generiert. Mit Hilfe des In-Fusion Enzyms werden diese Überhänge passend zusammengefügt und das neue Plasmid generiert (siehe Abbildung 4).

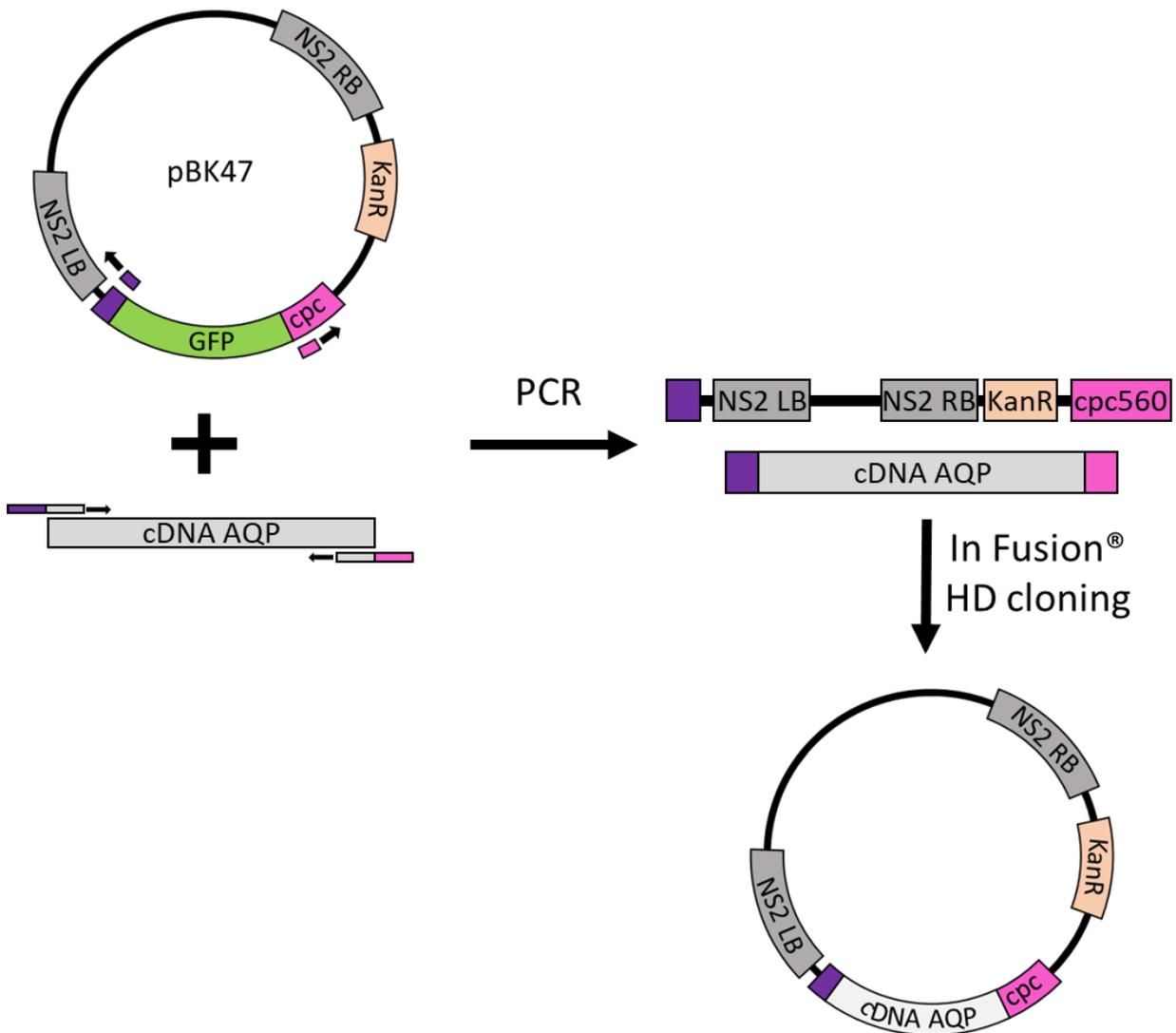


Abbildung 4: Ablauf der Aquaporin-Plasmid-Klonierung mit dem In-Fusion® HD cloning Kit (NS2="neutral site 2", RB/LB="right/left border", KanR=Kanamycinresistenzgen, GFP=grün fluoreszierendes Protein, cpc560="super strong" Cyanobakterien-promotor, AQP=Aquaporin, PCR=Polymerase-Ketten-Reaktion; □→ = Primer)

Der vom Hersteller empfohlene PCR-Ansatz wurde im Volumen verkleinert (siehe Tabelle 4) und anschließend die PCR nach dem im Herstellerprotokoll angegebenen PCR-Zyklus-Programm durchgeführt (siehe Tabelle 5).

Tabelle 4: PCR-Ansatz für das In-Fusion® HD cloning

	Einzusetzen:
Primer „forward“ (2,5 µM)	1 µl

Primer „reverse“ (2,5 µM)	1 µl
DNA-„Template“ (Insert/Vektor)	1 µl (ca. 500 pg)
2x Prime Star Max Premix	6,25 µl
Autoklaviertes, deionisiertes H ₂ O	3,25 µl

Tabelle 5: PCR-Zyklen-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit in sec	Wdh. ab	Wdh.
1	98 °C	10 sec		
2	55 °C	5 sec		
3	72 °C	5 sec (Insert) bzw. 30 sec (Vektor)	Schritt 1	30-35 x

Die vervielfältigten DNA-Fragmente wurden dann auf einem Agarosegel aufgetrennt und aus diesem eluiert, um die eingesetzte „Template“-Plasmid-DNA aus dem PCR-Ansatz zu entfernen (siehe 2.1.6.) Die eluierten DNA-Fragmente (Vektor und Insert) wurden im molaren Verhältnis 1:2 mit dem In-Fusion Enzym (siehe Tabelle 6) für 15 min bei 50 °C inkubiert und bis zur Transformation in kompetente StellarTM-Zellen (siehe 2.4.4) auf Eis gelagert.

Tabelle 6: In-Fusion® HD cloning Ansatz

	Einzusetzen:
5x In-Fusion HD Enzyme Premix	2 µl
Linearisierter Vektor	100 ng in x µl
Amplifiziertes Insert-Fragment	x µl (molares Verhältnis Vektor zu Insert 1:2)
Autoklaviertes, deionisiertes H ₂ O	Ad 10 µl

2.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Agarosegele zur Auftrennung von DNA wurden hergestellt, indem 1,6 g (0,8%) bzw. 2,4 g (1,2 %) Agarose eingewogen und mit 200 ml 1x TAE-Puffer (Tabelle 7) aufgefüllt wurde. Das Gemisch wurde in einem offenen Gefäß in der Mikrowelle so lange aufgeköcht, bis sich die Agarose aufgelöst hatte. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 55 °C und Zugabe von 10 µl einer

1%-igen Ethidiumbromid-Lösung (EtBr) konnte das Agarosegel bei 55 °C im Wärmeschrank gelagert werden. Zum Gießen eines Agarosegels wurde ein Gelschlitten in einen Gießstand gespannt und die Gelkämme in den Gelschlitten eingesetzt. Das flüssige Agarosegel wurde nun in den Gelschlitten gegossen, sodass der Boden vollkommen bedeckt war und nach ca. 20 min im Gelschlitten in eine Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer überführt (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Rezeptur zur Herstellung von 50x TAE-Puffer

	Endkonzentration
Tris/HCl pH 8,3	2 M
EDTA	0,05 M
Essigsäure	0,057 %

Die Proben wurden mit 1/4 Volumen 5x „orange Loading Dye (LD)“ (siehe Tabelle 8) oder 6x „purple Loading Dye (LD)“ (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika) versetzt und in jede Gelkammer nach entfernen des Gelkamms je 5-10 µl der Probe aufgetragen.

Tabelle 8: Rezept zur Herstellung von 5x „Orange Loading Dye“

	Endkonzentration
Orange G	2,2 mM
Ficoll	7,5 %

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte bei ca. 90-100 V bis die orange Lauffront aus dem Gel ausgetreten war. Zur Größenbestimmung wurden als DNA-Marker zusätzlich 2 µl Hyperladder 1 kb von Bioline (Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, Ohio, Vereinigte Staaten von Amerika) aufgetragen. Das EtBr im Agarosegel interkaliert mit der DNA und ermöglicht eine Fluoreszenzfärbung der DNA nach Anregung mit UV-Licht. Dafür wurde ein Gel-Dokumentationsgerät verwendet (TCP-26.M von LTF Labortechnik GmbH & Co.KG, Wasserburg, Germany).

2.1.5 Elektrophoretische Auftrennung von RNA

Zur Auftrennung von RNA in Agarosegelen wurde 1 g Agarose abgewogen und in 42,5 ml autoklaviertem, deionisiertem H₂O aufgeköcht bis sich die Agarose gelöst hat. Nach Abkühlen des Agarosegels auf 60 °C - unter kontinuierlichem Rühren mit Hilfe eines Magnetrührgeräts - wurden unter einem Abzug 5 ml 10x MEN-Puffer (siehe Tabelle 9) und 2,7 ml 37 % Formamid dazugegeben.

Tabelle 9: Zusammensetzung des 10x MEN-Puffers

	Endkonzentration
MOPS	0,2 M
EDTA	0,01 M
NaAc	0,05 M

Der Gelschlitten wurde in einen Gießstand eingespannt und ein Gelkamm in den Gelschlitten eingesetzt. Dann konnte das Agarosegel in den Gelschlitten gegossen werden, bis der Boden bedeckt war. Ca. 500 ng RNA wurde vor dem Auftragen mit dem gleichen Volumen 2x RNA-Ladepuffer (mit EtBr) versetzt (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Zusammensetzung des 2x RNA-Ladepuffers

	Endkonzentration
Formamid	48 %
10x MEN	1,06x
Formaldehyd (37%)	6,4 %
Glycerin (86 %)	5,33 %
Bromphenolblau (2%)	0,106 %
EtBr-Lösung (1 %)	0,002 %

Das Auftragevolumen sollte mindestens 10 µl betragen. Die Proben wurden für 10 min bei 65 °C denaturiert und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt bevor sie auf das Gel

aufgetragen wurden. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte dann in 1x MEN als Laufpuffer bei 60-70 V für 30-45 min unter dem Abzug. Mit Hilfe eines Geldokumentationsgeräts (TCP-26.M von LTF Labortechnik GmbH & Co.KG, Wasserburg, Germany) konnte die RNA im Agarosegel aufgrund der Interkalation mit EtBr unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

2.1.6 Elution von DNA aus Agarosegelen

Um die im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wieder aus dem Gel zu eluieren (z.B. im Zuge des In-Fusion[®] HD clonings) wurde das „Nucleospin[™] Gel and PCR clean-up Kit“ (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Proben fand hierfür in einem 0,8 % Agarosegel mit EtBr bei 60 V für ca. 1 ½ h statt. Die Bande, welche das zu eluierende DNA-Fragment darstellt, wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel rausgeschnitten. Um die DNA vor Schäden durch UV-Licht zu schützen sollte die UV-Exposition beim Schneiden auf ein Minimum begrenzt werden. Das ausgeschnittene Agarosegel-Stück wurde gewogen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Anleitung des Kits erfolgte anschließend die Zugabe von 200 µl Puffer NTI pro 100 mg Agarosegel. Durch 10-minütige Inkubation bei 50 °C wurde die Agarose aufgeschmolzen. Eine „Nucleospin[™] Gel and PCR Clean-up“ Säule wurde in ein Auffanggefäß gesteckt und mit 700 µl der Probenflüssigkeit beladen. Nach einer Zentrifugation bei 11000 g für 30 sec konnte der Durchfluss im Auffanggefäß verworfen werden. Mit eventuell verbliebenem Probenmaterial wurde erneut so verfahren. Zum Waschen wurde die Säule mit 700 µl NT3 Puffer befüllt und erneut für 30 sec bei 11000 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses konnte der Waschschrift wiederholt werden. Die Silica-Membran der Säule, an welche die DNA gebunden ist, wurde anschließend durch Zentrifugation bei 11000 g für 1 min getrocknet. Um den im Puffer vorhandenen Ethanol restlos zu entfernen erfolgte eine 3-minütige Inkubation der Säule bei 70 °C. Zum Eluieren der DNA wurde die Säule dann in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 20 µl Puffer NE bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der 1-minütigen Inkubation erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 11000 g für 1 min. Die eluierte DNA befand sich nun im 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß und wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.1.7 cDNA-Synthese

Zum Nachweis, dass ein bestimmtes Gen (z.B. für ein Aquaporin) in einem Organismus in RNA transkribiert wird, kann eine PCR auch mit RNA statt DNA durchgeführt werden. Durch eine quantitative "Real-time" PCR (qPCR) kann dabei auch analysiert werden, in welcher Menge das bestimmte Gen abgelesen wurde. Vor der Nutzung als PCR-„Template“ musste die isolierte RNA (siehe 2.5.5) aber wieder in DNA umgeschrieben werden. Die Synthese der cDNA erfolgte entweder direkt in der qPCR im Zuge einer Reversen Transkriptase qPCR (RT-qPCR, siehe 2.1.8) oder nach dem Standardprotokoll des Herstellers, von dem die dabei verwendete RNA abhängige DNA-Polymerase stammte (M-MuLV Reverse Transkriptase, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika). Für Letzteres wurden je Reaktionsansatz (siehe Tabelle 11) ca. 1 µg isolierte Gesamt RNA eingesetzt. Um zu verhindern, dass die RNA während der Inkubation durch RNasen abgebaut wird, wurde dem Reaktionsansatz zusätzlich RNase Inhibitor zugefügt.

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

	Einzusetzen:
Gesamt-RNA	Ca. 1 µg
Random hexamer Primer (60 µM)	2 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
10x MuLV Reaktionspuffer	2 µl
MuLV RT (200 U/µl)	1 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl
Autoklaviertes, deionisiertes H ₂ O	Ad 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 5 min bei 25 °C und anschließend für 1 h bei 42 °C inkubiert, bevor die Reverse Transkriptase für 20 min bei 65 °C inaktiviert wurde. Die Lagerung der cDNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

2.1.8 quantitative „Real-time“-Polymerasekettenreaktion

Eine quantitative Analyse des Transkriptniveaus gezielter Gene ist mittels der quantitativen „Real-time“ Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) möglich. Hierfür wird die Signalstärke eines bei der PCR zugegebenen fluoreszierenden Farbstoffs (SYBR-Green), welcher in doppelsträngige DNA interkaliert, nach der Elongationsphase jedes PCR-Zyklus gemessen. Da Primer, Polymerase und Farbstoff während der Reaktion im Überschuss vorhanden sind, steigt die Fluoreszenz proportional zum exponentiellen Anstieg des Amplifikats. Über die zusätzliche Amplifikation eines endogenen Markers - einem Gen, dessen Expression nicht durch die Expression anderer Gene beeinflusst wird und somit immer gleich bleibt - können verschiedene Proben normalisiert und miteinander verglichen werden. Dieser Vergleich erfolgt bei der $\Delta\Delta C_T$ -Methode über den C_T -Wert. Der C_T -Wert gibt die Zyklenzahl der PCR an, ab der das gemessene Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz übertrifft.

Für die qPCR musste zunächst für jedes verwendete Primerpaar ein Mastermix ohne „Template“ angesetzt werden. Da zwei verschiedene Reaktionsmische verwendet wurden, wurde entweder cDNA (siehe 2.1.7) oder isolierte Gesamt-RNA (siehe 2.5.5) als „Template“ eingesetzt. Dafür war die Verwendung von 2 unterschiedlichen qPCR-Reaktionsmischen notwendig, die beide von PCR Biosystems Ltd (London, Vereinigtes Königreich) stammten. Für cDNA wurde der 2x qPCRBio SyGreen Mix Hi-ROX nach Angaben des Herstellers verwendet (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: qPCR Ansatz mit cDNA als „Template“

	Einzusetzen:
2x qPCRBio SyGreen Mix Hi-Rox	10 μ l
Primer forward (10 μ M)	0,8 μ l
Primer reverse (10 μ M)	0,8 μ l
cDNA „Template“	10 ng
Autoklaviertes, deionisiertes H ₂ O	Ad 20 μ l

Ansonsten wurde der 2x qPCRBIO SyGreen 1-Step Detect Hi-ROX Mix eingesetzt (siehe Tabelle 13), mit dem die RNA direkt in der qPCR in cDNA umgeschrieben wird.

Tabelle 13: qPCR Ansatz mit RNA als „Template“

	Einzusetzen:
2x qPCRBIO SyGreen 1-Step Mix	10 µl
Primer forward (10 µM)	0,8 µl
Primer reverse (10 µM)	0,8 µl
20x RTase Go	1 µl
RNA-„Template“	10 ng (Gesamt-RNA)
Autoklaviertes, deionisiertes H ₂ O	Ad 20 µl

Der angesetzte Mastermix wurde anschließend mit dem „Template“ in einer MicroAmp Fast 96-Well Reaktionsplatte (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika) vermischt und die Reaktionsgefäße mit einer optisch klaren Klebefolie (qPCR-Folie, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) verschlossen. Die Polymerasekettenreaktion fand während der Inkubation nach dem vom Hersteller des qPCR-Reaktionsmixes angegebenen Protokoll (siehe Tabelle 14) im Thermo-Cycler (Stepone Plus RT-PCR System, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika) statt. Wenn RNA als „Template“ eingesetzt wurde folgte zu Beginn noch eine Inkubation für 10 min bei 50 °C.

Tabelle 14: qPCR Zyklusprogramm

Bei RNA als „Template“ wurde vor dem 1. Schritt noch eine 10-minütige Inkubation bei 50°C durchgeführt.

Schritte	Temperatur in °C	Zeit in sec	Wdh. ab Schritt	Wdh.
1 Initiale Denaturierung	95 °C	120 sec		
2 Denaturierung	95 °C	5 sec		
3 Annealing & Elongation	60 °C	30 sec	2	40x
4 Denaturierung	95 °C	15 sec		
5 Schmelzkurve	60 °C	60 sec		

6 Schmelzkurve	→ 95 °C (0,3 °C Schritte)	halten für 15 sec		
----------------	---------------------------	----------------------	--	--

Die Aufzeichnung des Fluoreszenzsignals während der qPCR erfolgte in Echtzeit nach jedem Elongationsschritt. Die dadurch erhaltenen C_T -Werte der Zielgene wurden dann auf die C_T -Werte für den endogenen Marker mit der gleichen Probe normalisiert ($\Delta C_{T \text{ Probe}} = C_{T \text{ Zielgen}} - C_{T \text{ Marker}}$). Als endogene Marker wurden hier nach Szekeres et al. (2014) *secA* und *ppC* ausgewählt [79]. Das Transkriptniveau (RQ) der neu eingebrachten Aquaporingene wurde direkt anhand der ΔC_T -Werte berechnet und miteinander verglichen. Für alle anderen Proben wurden die normalisierten Werte aus den Aquaporintransformanten auf das Transkriptniveau des Ursprungsstamms (Referenz) relativiert ($\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Probe}} - \Delta C_{T \text{ Referenz}}$). Für $\Delta C_{T \text{ Referenz}}$ wurde zuvor jeweils der Mittelwert aller auf gleiche Weise erhaltenen $\Delta C_{T \text{ Referenz}}$ -Werte berechnet (z.B. alle C_T -Werte bei der die RNA-Extraktion nach [80] (siehe 2.5.5) und die qPCR mit cDNA als „Template“ durchgeführt wurde). Der relative Quotient (RQ) wurde anschließend aus den ΔC_T - bzw. $\Delta \Delta C_T$ -Werten über die Formel $RQ = 2^{-(\Delta) \Delta C_T}$ berechnet.

2.1.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte durch die Firma Microsynth SeqLab GmbH (Göttingen, Deutschland). Hierfür wurden 12 μl Plasmid-DNA (Endkonzentration 40-100 ng/ μl in 15 μl) mit 3 μl eines Primers (20 μM) in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß vermischt und eingeschickt. Der verwendete Primer wurde so designt, dass er ca. 18 bp lang war, eine Schmelztemperatur von ca. 48 °C aufwies und min. 50 bp vor der Sequenz von Interesse an die DNA bindet.

2.1.10 verwendete Plasmide

Die DNA-Sequenzen (ohne eventuelle Introns) der drei verschiedenen Aquaporine hAQP1, NtAQP1 und NtPIP2;1 wurden mit Hilfe des In Fusion® HD clonings in den Cyanobakterien-

Transformations-Vektor pBK47 (siehe Abbildung 5) eingefügt. Dieser wurde freundlicherweise von Kachel & Mack (2020) zur Verfügung gestellt [81].

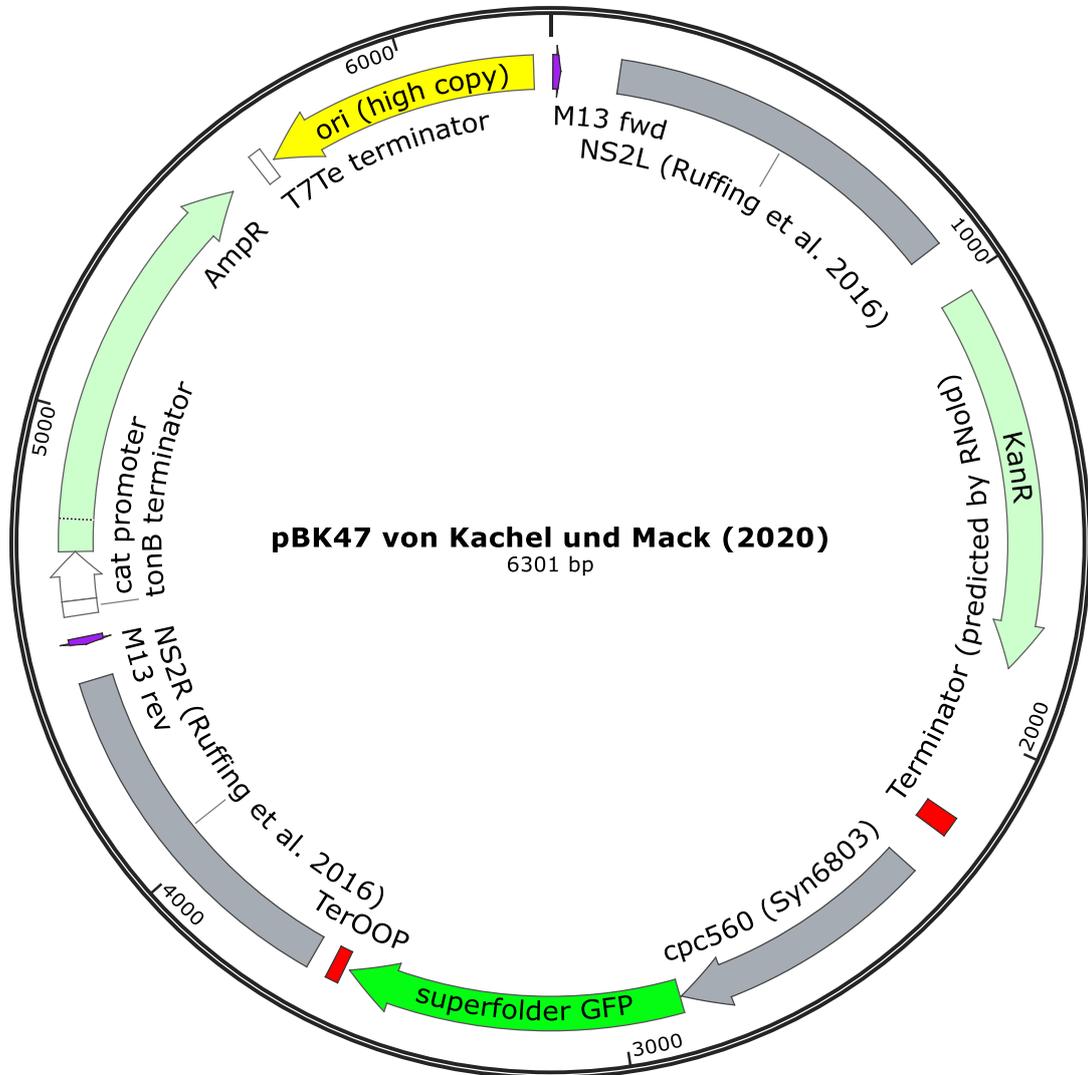


Abbildung 5: Vektorkarte von pBK47 (Zur Verfügung gestellt von Kachel & Mack, 2020)

Hierfür wurde die cDNA-Sequenz für hAQP1 über eine PCR von dem Plasmid pMDC32_AtPIP1;2-Promotorbereich_hsAQP1 (erzeugt von Marlies Heckwolf, 2008) amplifiziert.

Die Gensequenzen für NtAQP1 und NtPIP2;1 stammten von den beiden Plasmiden pET21a+_NtAQP1 (siehe Abbildung 6) und pET21a+_NtPIP2;1 (siehe Abbildung 7).

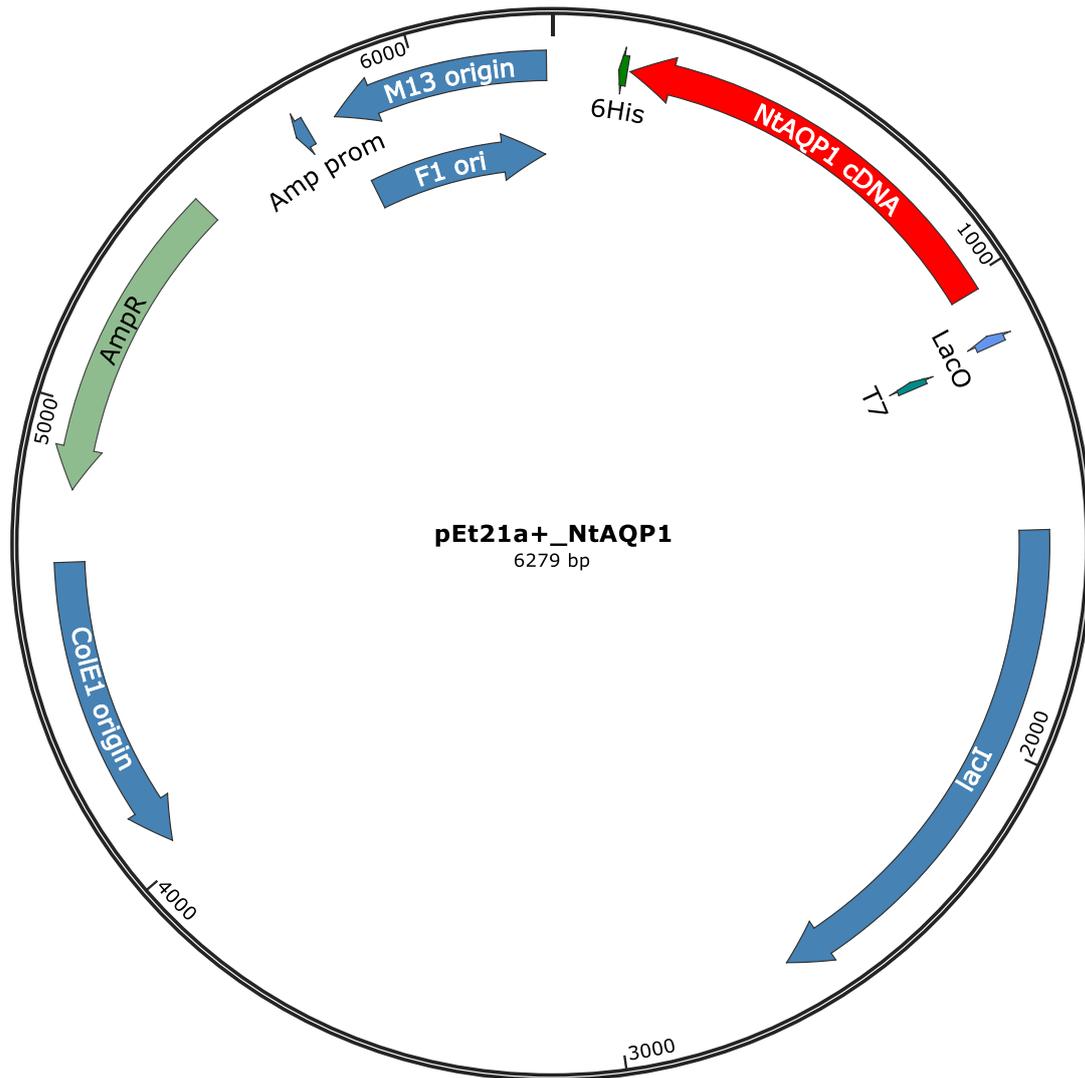


Abbildung 6: Vektorkarte von pEt21a+_NtAQP1 (erzeugt von Patrick Bienert, 2012)

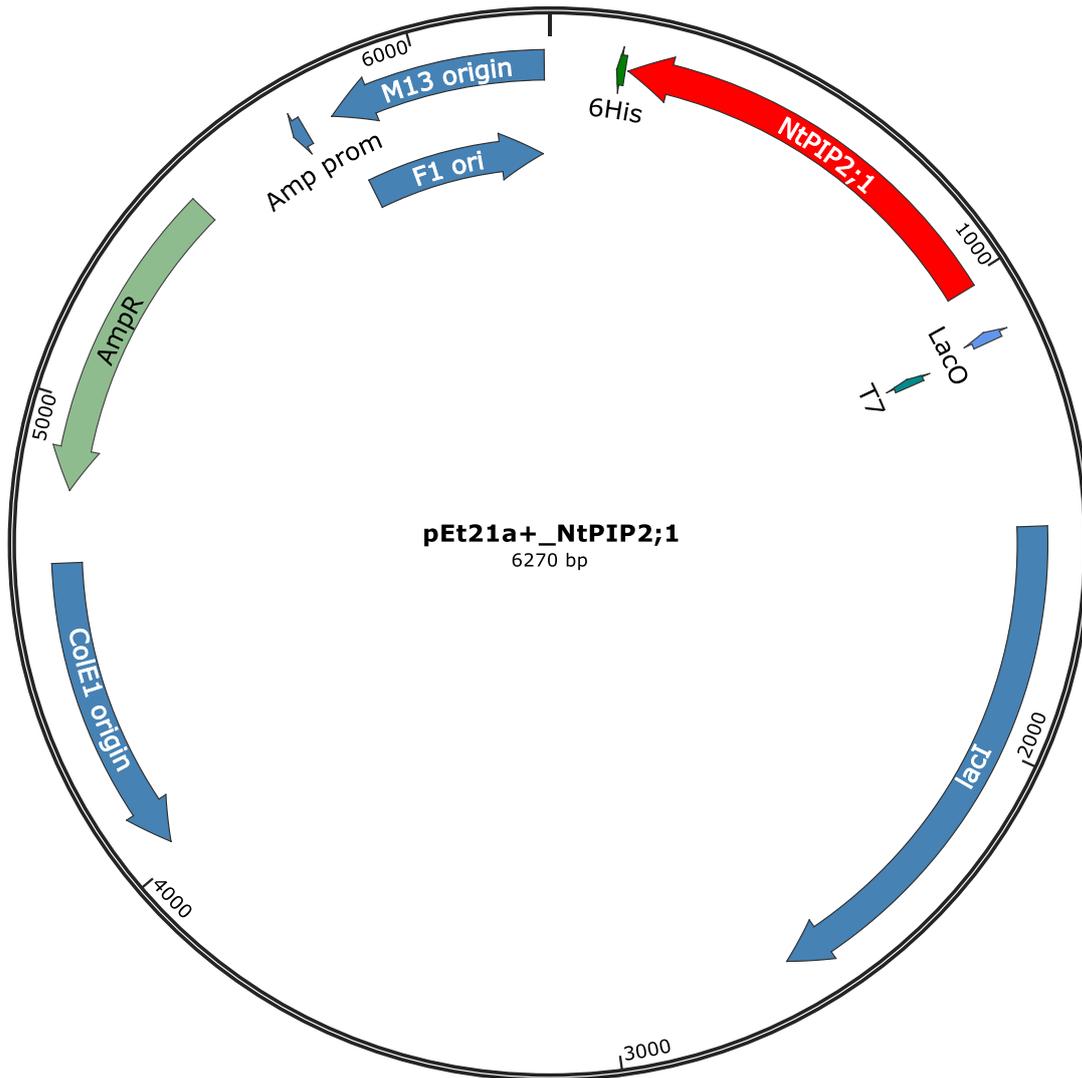


Abbildung 7: Vektorkarte von pEt21a+_NtPIP2;1 (erzeugt von Patrick Bienert, 2012)

Die Vektorkarten der neu hergestellten Plasmide pBK47_hAQP1, pBK47_NtAQP1, pBK47_NtPIP2;1 mit und ohne His-Tag, sowie pBK47_GFP_6xHIS sind in Abbildung 8 und Abbildung 9 dargestellt.

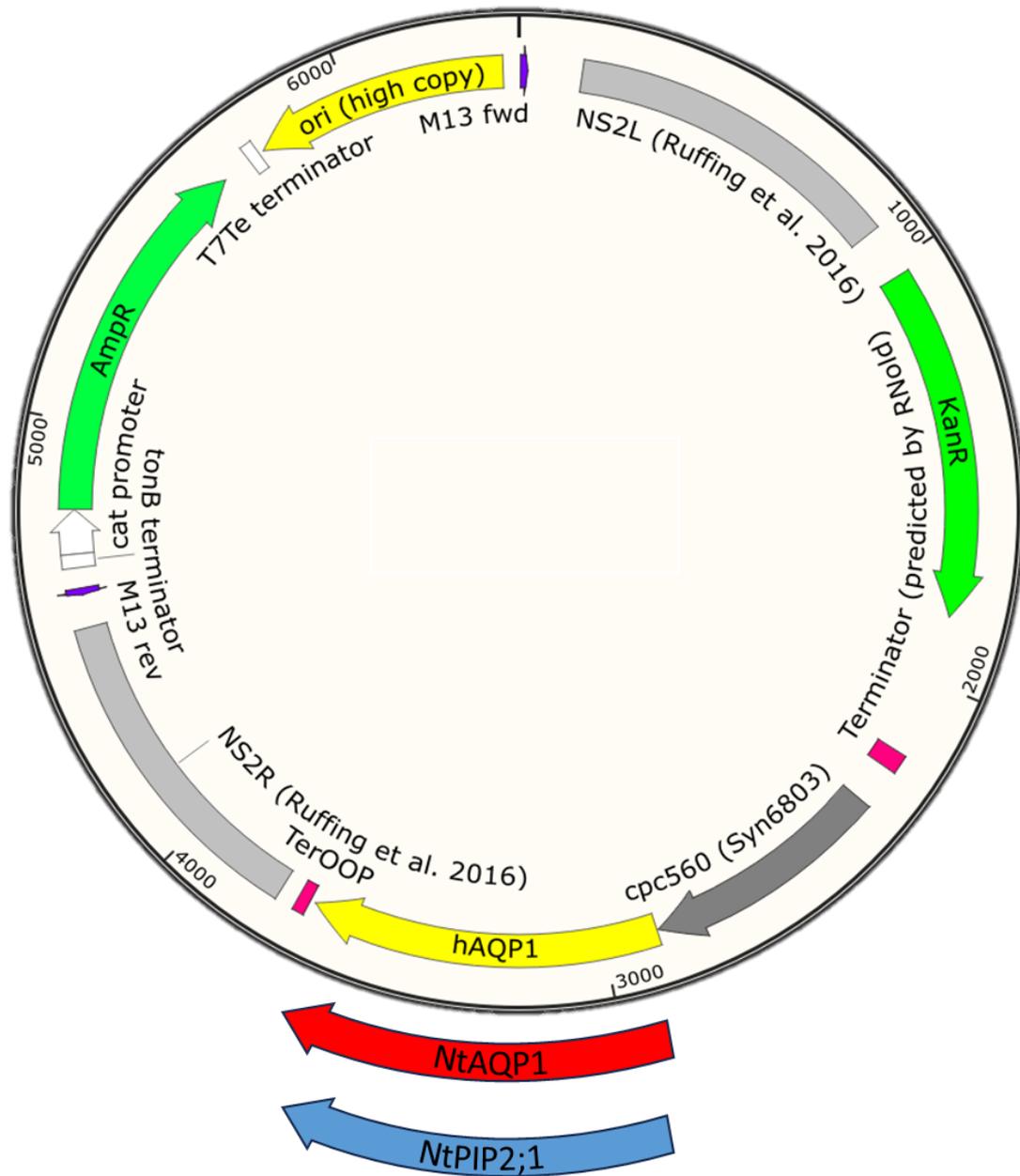


Abbildung 8: Vektorkarten von pBK47_hAQP1, _NtAQP1 und _NtPIP2;1
 Größe der Plasmide: pBK47_hAQP1=6394 bp, pBK47_NtAQP1=6448 bp und pBK47_NtPIP2;1=6439 bp

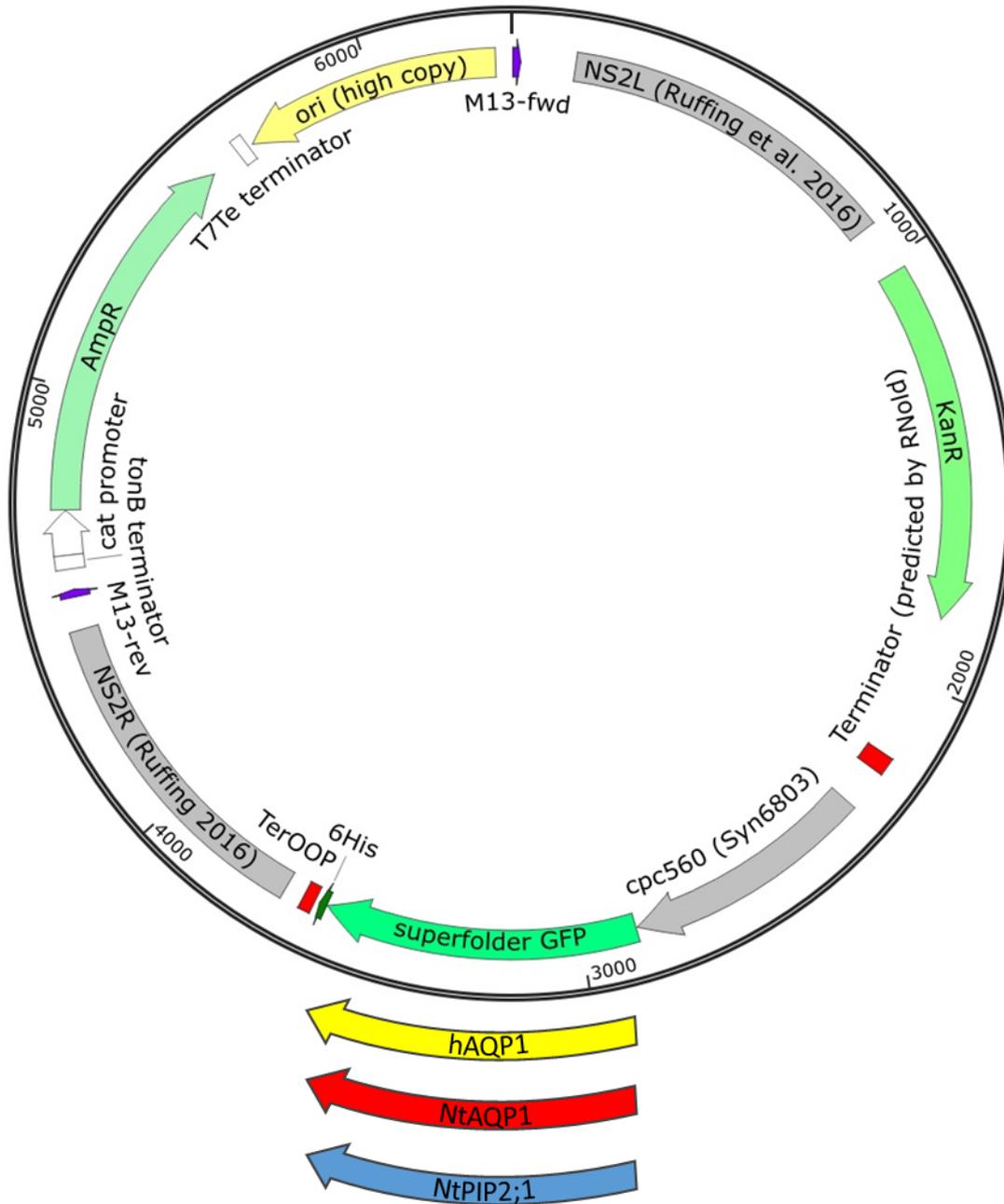


Abbildung 9: Vektorkarten von pBK47_sfGFP_6xHIS, _hAQP1_6xHIS, _NtAQP1_6xHIS und _NtPIP2;1_6xHIS
 (Größe der Plasmide: pBK47_sfGFP_6xHIS = 6319 bp, _hAQP1_6xHIS = 6412 bp, _NtAQP1_6xHIS = 6466 bp und _NtPIP2;1_6xHIS = 6457 bp)

2.1.11 verwendete Primer

In-Fusion-cloning Primer:	Sequenz
hAQP1His_InFus_fwd	TCAAGTAGGAGATTAATCATATGGCCAGCGAGTTCAAGAAG
hAQP1His_InFus_rev	CGAGCGTTGGATCTAGATTATTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGGGCTTC ATCTCCACCCTG
NtAQP1_His_fwd	TCAAGTAGGAGATTAATCATATGGCAGAAAACAAAGAAGAAGATG
NtAQP1_His_rev	CGAGCGTTGGATCTAGATTATTGTTGTTGTTGTTGTTGAGACGACTTG TGGAAATGGAATGG
NtPIP2.1His_IF_fwd	TCAAGTAGGAGATTAATCATATGTCAAAGGACGTGATTGAAGAAG
NtPIP2.1His_IF_rev	CGAGCGTTGGATCTAGATTATTGTTGTTGTTGTTGTTGGTTGGTTGGG TTACTGCGGAAAG
pBK47_Backbone_fwd	TAATCTAGATCCAACGCTCGG
pBK47_Backbone_rev	ATGATTAATCTCCTACTTGACTTT
pBK47_NtAQP1_Takara_fwd	TAGGAGATTAATCATATGGCAGAAAACAAAGAAGAAGATG
pBK47_NtAQP1_Takara_rev	GTTGGATCTAGATTAAGACGACTTGTGGAATGGAATGG
pBK47_NtPIP2;1_Takara_fwd	TAGGAGATTAATCATATGTCAAAGGACGTGATTGAAGAAG
pBK47_NPIP2;1_Takara_rev	GTTGGATCTAGATTAGTTGGTTGGGTTACTGCGGAAAG
pBK47_hAQP1_Takara_fwd	TAGGAGATTAATCATATGGCCAGCGAGTTCAAGAAG

pBK47_hAQP1_Takara _rev	GTTGGATCTAGATTATTTGGGCTTCATCTCCACCCTG
pBK47_GFP_Taka_fwd	TCAAGTAGGAGATTAATCATATGAGCAAAGGAGAAGAACTTTTC
pBK47+70_6xHIS_rev	CGAGCGTTGGATCTAGATTAGTGATGGTGTGTTTGTAGAGCTCATC CATGCC

Nachweisprimer:	Sequenz
Insertnachweis_hAQP1_fwd	AGATCAGCATCTTCCGTGCC
Insertnachweis_NtAQP1_fwd	TCTCAGGAGGACACATCAAC
Insertnachweis_NtPIP2;1_fwd	GGACACATTAACCCAGCAG
pBK47_und_pBK70_Insertnachweis_rev	GATGTATGCTCTTCTGCTCC
NtAQP1_neu_fwd	ATTACAAAGAACCACCACCAG
NtAQP1_neu_rev	AACAACATTAGCACCACCAC
NtPIP2;1_fwd	TATCTCGAGATGTCAAAGGACGTGATTGAAG
NtPIP2;1_rev	TAATCTAGATTAGTTGGTTGGGTTACTGCG
hAQP1_fwd	GCTCTTCTGGAGGGCAGTGGTGGC
hAQP1_rev	GGGCTACAGAGAGGCCGATGGCA
CYA740-fwd (16S rRNA)	GGCYRWAWCTGACACTSAGGGA
CYA1494-r (16S rRNA)	TACGGCTACCTTGTTACGAC

qPCR-Primer:	Sequenz
qPCR_NdhF3_fwd	CCTGGGTGCTGATTAAGTTG
qPCR_NdhF3_rev	GCACTGACGGAATAGGACAA
qPCR_BicA_fwd	CTACCACTGAAAAACGCTGG

qPCR_BicA_rev	CACCGATATCAAAGACGAGG
qPCR_NtAQP1_fwd	ACTGATGCTAAGAGAAATGCC
qPCR_NtAQP1_rev	ATGATCGCAGCTCCAAGAC
qPCR_NtPIP2;1_fwd	CCAGCAGTGACATTTGGG
qPCR_NtPIP2;1_rev	GCACCACCACCTAATGTGT
qPCR_hAQP1_fwd	ATCGAGATCATCGGGACC
qPCR_hAQP1_rev	TAATCCCACAGCCAGTGTAG
qPCR_Rbcl_fwd	CCTTCCGCAAGGTTTTCTC
qPCR_Rbcl_rev	GCAGCTTAGTGAAACCAATCC
qPCR_SbtA_fwd	TAGCCGACTTACAATCCCC
qPCR_SbtA_rev	TCAGAATGCCCATGAGCAC
qPCR_porB_fwd	AATGCTTGCCTCAATGCC
qPCR_porB_rev	GCTTCGAGATCATCAACCC

Sequenzierprimer	Sequenz
Seq_pBK47_fwd	TACTTTGGACTCCCTCAG
Seq_pBK47_und_pBK70_rev	CCTTCCAGATGTATGCTC
pET21a+_Seq_fwd	AACTCAGCTTCCTTTCGG
NtAQP1_Seq_rev	TGTCTGTTTGAGCAGCTG
NtPIP2;1_Seq_fwd	TCTGGGTTGGACCATTG
hAQP1_Seq_rev	ACCGATGCTGATGAAGAC
M13-Primer	Von Microsynth Sec-lab

2.2 verwendete Organismen

Die verwendeten Plasmide zur Amplifikation der Aquaporingene befanden sich alle in *E. coli* DH5 α Zellen (Genotyp: +recA1, +endA1 und +lacZ Δ M15). Die neu klonierten Plasmide wurden dann in kompetente StellarTM-Zellen (*E. coli* HST08 mit Genotyp: -mrr, -hsdRMS, -mcrBC & -mcrA) transformiert, die von Takara Bio Inc. (Kusatsu, Präfektur Shiga, Japan) bezogen wurden. Das Cyanobakterium *Synechococcus sp.* PCC7002 stammte von Kachel & Mack (2020). Für Proteinextrakte aus Hefe wurde der Hefestamm SY1 (MATa, ura3-52, leu2-3, 112, his4-619, sec6-4, GAL) genutzt (siehe [82]). Das aufgereinigte NtAQP1-6xHIS stammt aus transgenen *Pichia pastoris* X-33 Hefezellen, die von Beate Otto zur Verfügung gestellt wurden.

2.3 Verfahren mit Proteinen

2.3.1 Nickel-Affinitätschromatographie

Mit einem His-Tag versehene Proteine können über eine Nickel-Affinitätschromatographie aus einem Proteingemisch isoliert werden. Hierfür wurden zunächst 500 μ l Sepharose (Chelating Sepharose Fast Flow beads, GE Healthcare, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten von Amerika) mit 1 ml deionisiertem, autoklaviertem H₂O durch invertieren vermischt und anschließend für 10 sec bei 14800 rpm zentrifugiert. Nach entfernen des Überstands konnte die Säule mit zweiwertigen Nickelionen beladen werden, indem 1 ml 0,2 M NiCl₂ mit der Sepharose durch invertieren gemischt wurde. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand wieder entfernt und die Säule mit 2,5 ml H₂O gewaschen. Abschließend erfolgte noch ein Waschschrift mit 2,5 ml Ladepuffer (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Zusammensetzung des Ladepuffers

Der pH-Wert des Ladepuffers wurde mit HCl auf pH 4 eingestellt.

	Endkonzentration
NaOAc	20 mM
NaCl	150 mM

Das Säulenmaterial wurde anschließend in 1 ml des Puffers aufgenommen, in dem die zu isolierenden Proteine gelöst waren. Nachdem der Überstand der Solubilisierung bzw. ein Proteinextrakt zu dem Säulenmaterial gegeben worden war, erfolgte eine Schüttel-Inkubation für 1 h bei 4 °C. Anschließend wurde der Ansatz auf eine Tropfsäule gegeben und der Verschluss der Säule geöffnet, sodass der Überstand abfließen konnte. Das abgesetzte Säulenmaterial wurde anschließend 3-mal mit 1350 µl Waschpuffer (siehe Tabelle 16) gewaschen und der Durchfluss jeweils in einem geeigneten Gefäß aufgefangen und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 16: Zusammensetzung des Waschpuffers

DDM wurde nur bei der Isolation von Membranproteinen zugegeben.

	Endkonzentration:
Imidazol pH 7,5	50 mM
NaCl	500 mM
Glycerin	10 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	2 mM
DDM	0,05 %
Deionisiertes autoklaviertes H ₂ O	

Nach dem Waschen erfolgte die Elution der an die Säule gebundenen Proteine durch Erhöhung der Imidazol- und NaCl-Konzentration. Hierfür wurden 3-mal je 600 µl Elutionspuffer mit aufsteigenden NaCl-Konzentrationen (siehe Tabelle 17) auf die Säule gegeben und jeweils für 10 min inkubiert. Anschließend konnten die Durchflussfraktionen wieder in einem geeigneten Gefäß aufgefangen werden. Der Erfolg der Affinitätschromatographie wurde auf einem Polyacrylamidgel überprüft.

Tabelle 17: Zusammensetzung des Elutionspuffers

DDM wurde nur bei der Isolation von Membranproteinen zugegeben.

	Endkonzentration:
Imidazol	200 mM
Glycerin	5 %
β-Mercaptoethanol	1 mM
DDM	0,025 %
NaCl	50 mM / 100 mM /200 mM
EDTA	12 mM
Deionisiertes, autoklaviertes H ₂ O	

Das Säulenmaterial kann regeneriert werden, indem die Säule erst mit 0,5 Säulenvolumen 2 M NaCl, dann mit 1 M NaOH und zum Schluss mit 70 % EtOH gewaschen wird.

2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden in einem Sodiumdodecylsulfat(SDS)-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gelmatrix entsteht dabei durch Auspolymerisieren des verwendeten Polyacrylamids. Das Gel selbst besteht aus zwei Teilen, einem Sammelgel und einem Trenngel. Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Gele (Porengröße, pH-Wert) kann das eingesetzte Proteingemisch im Sammelgel zunächst konzentriert werden, bevor es im Trenngel nach Größe des jeweiligen Proteins aufgetrennt wird. Das SDS sorgt dabei dafür, die Eigenladung der Proteine zu demaskieren, sodass beim Anlegen einer elektrischen Spannung die Proteine nur anhand ihrer Größe und nicht ihrer spezifischen Eigenladung aufgetrennt werden. Zur Herstellung der Polyacrylamidgele wurden zunächst die Abstandshalter (Spacer) und Glasplatten nach Angaben des Herstellers zusammengebaut und die entstandene Gelküvette in einer Gelgießapparatur eingespannt. Danach erfolgte die Herstellung des Trenngels (siehe Tabelle 18). Alle Komponenten bis auf Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) wurden dafür in einem 50 ml Falcon vermischt. Direkt nach der Zugabe des Radikalstarters APS und des Polymerisierungskatalysators TEMED wurde das Trenngel gut durchmischt und in die vorbereiteten Gelkammern gegossen. Hierbei sollte

nach oben hin noch ausreichend Platz für das Sammelgel inklusive Kamm gelassen werden. Während dem Auspolymerisieren wurde das Gel mit H₂O überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Trenngels

	Einzusetzen (4 Gele)
30 % Acrylamid (AA)/Bisacrylamid (BAA) (37,5:1)	13 ml
4x Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl pH 8,8)	7,5 ml
10 % SDS	0,3 ml
Deionisiertes H ₂ O	9 ml
TEMED	10 µl
40 % APS	38 µl

Nach dem vollständigen Auspolymerisieren des Trenngels konnte das Sammelgel gegossen werden. Auch für das Sammelgel wurden zuerst alle Komponenten bis auf APS und TEMED gut miteinander vermischt (siehe Tabelle 19). Nach Entfernen der Wasserschicht auf dem Trenngel erfolgte die Zugabe von TEMED, sowie APS zur benötigten Menge des Sammelgels. Nach erneutem durchmischen des Gels wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm zur Bildung von Beladungstaschen in das noch flüssige Sammelgel eingesteckt. Der restliche Ansatz für das Sammelgel kann ohne Zugabe von TEMED und APS bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert werden. Vollständig auspolymerisiert wurden die fertigen Polyacrylamidgele in feuchten Tüchern eingewickelt bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

Tabelle 19: Zusammensetzung des Sammelgels

	Für 40 ml Sammelgel
30 % AA/BAA (37,5:1)	5,3 ml
4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl pH 6,6)	10 ml
10 % SDS	0,4 ml
Deionisiertes H ₂ O	24 ml

1 % Bromphenolblau	10 µl
TEMED	4 µl pro 5 ml Sammelgel
APS	6,5 µl pro 5 ml Sammelgel

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in dem gegossenen SDS-Polyacrylamidgel wurde zunächst die untere Elektrodenkammer der Elektrophoreseapparatur ca. 1cm hoch mit 1x Lämmli-puffer befüllt (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Rezept zur Herstellung von 10x Lämmli-puffer

	Endkonzentration
Tris/HCl pH 8,3	250 mM
SDS	1 % (w/v)
Glycin	1,92 M

Anschließend wurde das Gel (mit Glasplatten und Spacer) mit Klammern an der Apparatur befestigt und die dabei entstehende obere Kammer ebenfalls mit Lämmli-puffer befüllt. Nach Entfernen des Kammes konnten die Taschen mit Puffer gespült werden. Anschließend wurden je Geltasche ca. 10 µl der Proben, welche zuvor mit SDS-Ladepuffer vermischt wurden (siehe Tabelle 21), aufgetragen. Vor dem Auftragen erfolgte eine 30-minütige Denaturierung der Proben bei Raumtemperatur. Bei Gesamtproteinextraktionen aus *E. coli*, Hefe und *Synechococcus sp.* PCC7002 befand sich der Proteinextrakt bereits in 1x SDS-Ladepuffer und wurde vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel ca. 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut und inkubiert.

Tabelle 21: Rezeptur zur Herstellung eines 4x SDS-Ladepuffers

	Endkonzentration:
Tris/HCl pH 6,8	250 mM
SDS	8 % (w/v)
Glycerin	40 % (v/v)
DTT	200 mM

Bromphenolblau	0,01 % (v/v)
----------------	--------------

Ein Größenvergleich war durch Auftragen von „Blue Prestained Protein Standard, Broad Range“ (11-190 kDa) (international NEB P7706) oder „BlueStar Prestained Protein Marker“ (Nippon Genetics Europe) als Proteinmarker möglich. Die Proteine wurden anschließend so lange bei 30 mA pro Gel elektrophoretisch aufgetrennt bis die Bromphenolblaufront aus dem Gel austrat.

2.3.3 Coomassie Blau Färbung

Wenn die in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine nicht zum späteren Nachweis mit Antikörpern weiter auf eine PVDF-Membran übertragen werden sollten, wurden die Proteine im Gel mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie-Blau angefärbt, welcher sich an basische Seitenketten der Proteine anlagert. Dafür wurde das Gel nach der Elektrophorese vorsichtig von den Glasplatten befreit und in eine Schale mit Coomassie-Blau-Lösung gegeben (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Zusammensetzung der Coomassie-Blau Färbelösung

	Endkonzentration:
Coomassie-Blau R250	13 % (v/v)
Methanol	4,5 % (v/v)
Essigsäure	1 % (v/v)

Nach 30-minütiger Inkubation wurde das Gel mehrmals und solange in Entfärbelösung (siehe Tabelle 23) gewaschen, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

Tabelle 23: Zusammensetzung Entfärbelösung

	Endkonzentration:
Methanol	30 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

2.3.4 Western blot

Zur Detektion von bestimmten Proteinen mit Hilfe von Antikörpern müssen die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine zunächst auf eine PVDF-Membran übertragen werden, da die Gelmatrix in der die Proteine eingeschlossen sind die Bindung der Antikörper an die Proteine stören würde. Dafür musste die PVDF-Membran zunächst aktiviert werden. Die Membran wurde dafür 15 Sekunden in 100 % Methanol inkubiert und anschließend 2 Minuten mit ddH₂O gewaschen. Danach wurde die Membran für 5 Minuten in 4 °C gekühltem Transferpuffer (siehe Tabelle 24) equilibriert.

Tabelle 24: Zusammensetzung des Transferpuffers

	Endkonzentration:
CAPS/NaOH pH 11	10 mM
Methanol	10 % (v/v)

Das Polyacrylamidgel konnte nun vorsichtig von den Glasplatten und Spacern der Gelkuvette befreit werden. Die PVDF-Membran wurde in Transferpuffer vorsichtig auf dem Polyacrylamidgel positioniert und beide zwischen mehrere Stücke Chromatographiepapier (190 g/m², A. Hartenstein GmbH), sowie zwei Stücke eines Schwammtuchs gelegt. Sowohl das Chromatographiepapier, als auch die Schwammtücher wurden zuvor in Transferpuffer eingeweicht. Nach dem Einklemmen des Aufbaus in eine Kassette konnte diese in eine mit Transferpuffer gefüllte Elektroblokt-Kammer eingesetzt werden. Das Polyacrylamidgel war hierbei der Kathode (-) und die PVDF-Membran der Anode (+) zugewandt. Während dem Transfer wurde der Transferpuffer mit Hilfe eines Magnetstabs konstant durchmischt und die Blokt-Kammer von außen mit Eis gekühlt. Hierfür wurde Sie in einer mit Eis gefüllten Styroporbox auf einen Magnetrührer gestellt. Der Transfer erfolgte für 2 h bei einer angelegten Spannung von 40 V. Wurden die Proteine über Nacht transferiert, wurde eine Spannung von 20 V angelegt und die Box mit einem Deckel verschlossen.

2.3.5 Kolloidale Silberfärbung

Um den Erfolg des Proteintransfers auf die PVDF-Membran zu überprüfen und die Gesamtproteinmengen zu quantifizieren, können die Proteine auf der PVDF-Membran mit Hilfe einer Silberlösung angefärbt werden. Hierfür wurde zunächst die Färbelösung hergestellt (siehe Tabelle 25). Natriumcitrat und Eisensulfat wurden mit deionisiertem Wasser in einem Becherglas vermischt und unter kontinuierlichem Rühren tropfenweise Silbernitrat zugegeben. Die Lösung sollte immer frisch angesetzt werden.

Tabelle 25: Rezept zur Herstellung der Silbernitrat-Färbelösung

	Einzusetzen:
Natrium-Citrat	1g
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,4 g
AgNO ₃	0,1 g
Deionisiertes H ₂ O	45 ml

Anschließend wurde die PVDF-Membran aus der Blot-Kammer entnommen. Mit der dem Polyacrylamidgel zugewandten Seite nach oben wurde sie in deionisiertem Wasser gewaschen und für wenige Minuten in der Silberlösung geschwenkt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Nach 3-maligem Waschen der Membran in deionisiertem Wasser konnte die Färbung der Proteinbanden dokumentiert werden. Zur anschließenden Entfärbung wurde die PVDF-Membran 2-mal für 5 Minuten in Entfärbelösung (siehe Tabelle 26) geschwenkt und anschließend 3-mal für 5 Minuten in deionisiertem Wasser gewaschen. Danach konnte die Membran für den Antikörpernachweis vorbereitet werden.

Tabelle 26: Rezept zur Herstellung von Silbernitrat-Entfärbelösung

	Einzusetzen:
K ₃ Fe(CN) ₆	0,49 g
Na ₂ S ₂ O ₃	1,24 g
Deionisiertes H ₂ O	100 ml

2.3.6 Nachweis von Proteinen durch Antikörper

Um bestimmte Proteine in einem Proteingemisch nachzuweisen, können Antikörper eingesetzt werden. Der primäre Antikörper bindet dabei spezifisch an den Antigenteil des nachzuweisenden Proteins. Ein zweiter (sekundärer) Antikörper, der an ein Enzym (z.B. alkalische Phosphatase) gekoppelt ist, bindet dann zielgerichtet an den primären Antikörper. Nach Zugabe eines passenden Substrats (CDP-Star) wird dieses durch das Enzym umgesetzt, was z.B. zu einer photometrisch nachweisbaren Chemi-Fluoreszenz des Substrats führt. Um die Membran mit den Proteinen für den Antikörpernachweis vorzubereiten wurde die PVDF-Membran zunächst kurz in Waschlösung (=PBST, siehe Tabelle 27) gewaschen.

Tabelle 27: Zusammensetzung der Waschlösung

	Endkonzentration:
Na ₂ HPO ₄	0,83 % (w/v)
NaH ₂ PO ₄	0,23 % (w/v)
NaCl	0,4 % (w/v)
Tween20	0,5 % (w/v)

Anschließend fand die Blockierung freier Bindestellen auf der PVDF-Membran durch Inkubation in Blocklösung (5% (w/v) Magermilch in PBST) für ca. 1 h oder über Nacht bei 4 °C statt. Die PVDF-Membran wurde aus der Blocklösung in einen kleinen Plastikbeutel gelegt und 1 ml des primären Antikörpers in entsprechender Verdünnung dazugegeben (siehe Tabelle 28).

Tabelle 28: Liste verwendeter Antikörper

Die sekundären Antikörper (AK) stammten alle von Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika) und sind an eine alkalische Phosphatase gekoppelt

Primärer AK (Herkunft, Verdünnung)	Sekundärer AK (Art, Verdünnung)
Aqp 1 (B-11) (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000)	Anti-Maus-Antikörper (IgG) (1:30000)

Anti NtAQP1 (2001) (Davids Biotechnologie GmbH, 1:500)	Anti-Huhn-Antikörper (IgY) (1:50000)
Anti PIP2 (1:500)	Anti-Kanin-Antikörper (IgG) (1:30000)
Anti Histidin (1:6000)	Anti-Mausantikörper (IgG) (1:30000)

Nach Verschweißen des Beutels erfolgte die Inkubation der Membran für 1 h mit den Antikörpern. Dann wurde die Membran 3-mal für 10 Minuten mit der Waschlösung gewaschen um restliche ungebundene Antikörper zu entfernen und anschließend für 1h mit 1 ml des sekundären Antikörpers (verdünnt in 2,5 % (w/v) Magermilchlösung mit PBST) inkubiert (siehe Tabelle 28). Es folgten erneute Waschschrte (2x 10 min) in PBST und danach 2-mal für 5 Minuten in Assay B Lösung (siehe Tabelle 29).

Tabelle 29: Zusammensetzung der Assay B Lösung

	Endkonzentration:
Tris/HCl pH 9,8	200 mM
MgCl ₂	10 mM

Die gewaschene Membran wurde dann für 5 Minuten mit 1 ml Tropix Nitro Block II Lösung (1:20 verdünnt mit Assay B Lösung, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika) inkubiert und anschließend ein letztes Mal mit Assay B Lösung für 2 Mal 5 Minuten gewaschen. Zum Schluss wurde 1 ml einer 1:50 Verdünnung des Substrats CDP-Star (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika) in Assay B Lösung auf die Membran getropft und für 5 Minuten inkubiert. Die Überschüssige Flüssigkeit wurde vorsichtig ablaufen gelassen und die Membran in Frischhaltefolie gewickelt. Die Chemilumineszenz konnte ohne Filter bei weit geöffneter Blende (Iris) mit Hilfe einer Chemidoc XRS (BioRad, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika) detektiert werden.

2.4 Verfahren mit *Escherichia coli* (*E. coli*)

2.4.1 Kultivierung von *E. coli*

Zellen von *E. coli* wurden kultiviert, indem Sie in LB-Medium (siehe Tabelle 30) bei 37 °C und 120 rpm auf einem Schüttelinkubator (Laboshake RO 500 von Gerhardt) inkubiert wurden. Aus einer Glycerinkultur entnommenes Zellmaterial wurde hierzu mit einem Zahnstocher in einen Shikane-Kolben mit LB-Medium überführt. Zur Herstellung von LB-Nährböden musste dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % Agar Agar zugegeben werden. Das noch warme LB-Agar Gemisch wurde dann in eine Petrischale gegossen. Nach dem vollständigen Abkühlen konnten die Zellen auf dem Nährboden mit Hilfe einer Impföse ausgestrichen werden, bevor Sie in einem Wärmeschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert wurden.

Tabelle 30: Rezeptur zur Herstellung von LB-Medium

Vor dem Autoklavieren wurde das Medium auf einen pH-Wert von pH 7,5 eingestellt.

	Einzusetzen:
Hefeextrakt	5 g
Trypton	10 g
NaCl	5 g
Deionisiertes H ₂ O	Ad 1 L

2.4.2 Kryokonservierung von *E.coli*

Zur Konservierung von *E. coli* wurden 300 µl 80% Glycerol in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 600 µl Zellsuspension vermischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

2.4.3 Plasmidisolation aus *E.coli*

Zur Isolation eines Plasmids aus *E. coli* wurden Zellen mit einem Zahnstocher aus einer Glycerinkultur von *Escherichia coli* entnommen und in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin

über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag konnten die Zellen durch Zentrifugation von 3 ml der Kultur bei 14000 rpm für 30 sec sedimentiert werden. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellen in 300 µl Resuspensionspuffer (P1) resuspendiert (siehe Tabelle 31).

Tabelle 31: Zusammensetzung des Resuspensionspuffers (P1)

RNase A wurde erst nach dem Autoklavieren, direkt vor der Verwendung frisch dazugegeben.

	Endkonzentration:
Tris/HCl pH 8	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg/ml

Die Lyse der Zellen erfolgte nach Zugabe von 300 µl Lysepuffer (P2) (siehe Tabelle 32).

Tabelle 32: Zusammensetzung des Lysepuffers (P2)

Vor der Benutzung wurde der Lysepuffer autoklaviert

	Endkonzentration:
NaOH	200 mM
SDS	1 %

Nach vorsichtigem Invertieren wurden die Zellen bei Raumtemperatur für ca. 5 min aufgeschlossen. Die Zugabe von 300 µl Neutralisationspuffer (P3, 3 M Kaliumacetat, pH 5,5) und eine 10-minütige Inkubation auf Eis verhinderten die vollständige Zellyse. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 14000 rpm wurde der Überstand vorsichtig in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe des 0,7x Volumens Isopropanol folgte eine erneute Zentrifugation bei 14000 rpm für 20 min. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat in 200 µl autoklaviertem, deionisiertem H₂O gelöst. Anschließend wurde 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 5,2), sowie das 2,5-fache Volumen 100 % Ethanol (eiskalt) zugegeben und die Plasmid-DNA über Nacht bei -20 °C gefällt. Am nächsten Tag wurde die DNA durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 30 min präzipitiert und der Überstand sorgfältig entfernt. Die Plasmid-DNA konnte dann in 30 µl H₂O aufgenommen und bei 4 °C aufbewahrt werden. Die erfolgreiche Plasmid-Isolation wurde auf einem Agarosegel überprüft.

2.4.4 Transformation von *E.coli*

Die im Zuge des In Fusion® HD clonings hergestellten Plasmide wurden in chemisch kompetente *E. coli Stellar™* Zellen (Takara Bio Euorpe SAS, St. Germain en Laye, Frankreich) transformiert. Hierfür wurden die Zellen nach Protokoll des Herstellers zuerst auf Eis aufgetaut, bevor je 50 µl pro Transformationsansatz in einen 15 ml Falcon überführt wurden. Nach Zugabe von je 2,5 µl des In-Fusion HD cloning Reaktionsmixes, erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Die Zellen wurden dann für 45 sec bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. Zur Regeneration und Ausbildung der Antibiotikaresistenz folgte eine 1-stündige Inkubation der Zellen in 450 µl vorgewärmtem SOC-Medium (siehe Tabelle 33) bei 37 °C und 120 rpm auf dem Schüttelinkubator (Laboshake RO 500 von Gerhardt). Anschließend wurden verschiedene Mengen der Zellen (20, 100, 200 µl und der Rest) auf Nährböden mit den entsprechenden Selektionsantibiotika (100 µg/ml Ampicillin und Kanamycin) und zusätzlich (100 µl) auch auf Nährboden ohne Antibiotika (Überlebenskontrolle) ausgestrichen. Nach einer Inkubation der Zellen über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank konnte die erfolgreiche Transformation durch eine Kolonie-PCR überprüft werden. Als Kontrolle wurde immer ein Transformationsansatz ohne Plasmid-DNA mitgeführt.

Tabelle 33: Rezeptur zur Herstellung von SOC-Medium.

Der pH-Wert des Mediums wurde vor dem autoklavieren auf pH 7,0 eingestellt. Die Glucose wurde sterilfiltriert und erst nach dem abkühlen zum Medium dazugegeben.

	Einzusetzen:
Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
MgCl ₂ (2 M)	5 ml
KCl (250 mM)	10 ml
Glucose (1 M)	20 ml
Deionisiertes H ₂ O	Ad 1 L

2.4.5 Proteinextraktion aus *E.coli*

Zellkulturen von *Escherichia Coli* wurden zur Proteinextraktion bei 4000 rpm für ca. 1 Minute sedimentiert. Die Resuspension der Zellen erfolgte dann in 750 µl 1x PBS (siehe Tabelle 34).

Tabelle 34: Rezeptur zur Herstellung von 10x PBS

	Einzusetzen
NaCl	40 g
Na ₂ PO ₄	82,3 g
NaH ₂ PO ₄	23,5 g
Deionisiertes, autoklaviertes H ₂ O	Ad 1L

Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen, indem sie mit einer Ultraschallsonde 3x für 30 sec (50 % Amplitude und „Duty cycle“ von 50) aufgebrochen wurden. Zwischen den einzelnen Aufbruchzyklen erfolgte ein Kühlschritt für ca. 30 sec auf Eis. Nach Zugabe von 250 µl 4x SDS-Ladepuffer (siehe Tabelle 21) wurde das Proteingemisch nochmal für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem Auftragen der Proteine auf das Polyacrylamidgel wurden die Zelltrümmer noch durch kurzes Zentrifugieren sedimentiert.

2.5 Verfahren mit *Synechococcus sp. PCC7002*

2.5.1 Kultivierung von *Synechococcus sp. PCC7002*

Die Kultivierung von *Synechococcus sp. PCC7002* erfolgte in 400 ml Blasensäulen-Reaktoren. Diese befanden sich in einem Wasserbad, welches auf 30 °C erwärmt wurde. Die Anzucht der Zellen erfolgte standardmäßig durch Begasung mit einem Luftgemisch mit 1% CO₂ in A⁺-Medium ([83], siehe Tabelle 35 und Tabelle 36) bei 250 µmol/m²*s Weißlicht. Für die Wachstumsversuche wurde unter anderem das Anzuchtmedium, die Temperatur, die Lichtbedingung und der CO₂-Gehalt des Luftgemischs variiert. Die Zellen wurden dafür in A⁺- (mit 10 mM Urea oder NH₄Cl), AA⁺- (siehe Tabelle 37 und Tabelle 39) oder ATTC-Medium

(ATCC Medium 957, American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, Vereinigte Staaten von America, siehe Tabelle 38 und Tabelle 39) kultiviert.

Zur Herstellung von Nährböden wurde dem Medium vor dem Autoklavieren noch 1,5 % Agar Agar zugegeben. Nachdem das Agar-Nährmedium in Petrischalen gegossen und abgekühlt war, wurden die Zellen mit einer Impföse auf dem Nährboden ausplattiert und bei 37 °C oder Raumtemperatur und ca. 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ Weißlicht inkubiert.

Tabelle 35: Rezeptur zur Herstellung von A⁺-Medium

FeCl₃ wurde erst nach dem autoklavieren und zusätzlich Vitamin B12 (4 $\mu\text{g}/\text{L}$) direkt vor der Benutzung des Mediums zugegeben.

	Einzusetzen:
NaCl	18 g
KCl	0,6 g
NaNO ₃	1 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	5 g
KH ₂ PO ₄ (50 g/L)	1 ml
CaCl ₂ (37 g/L)	7,2 ml
NaEDTA (3 g/L)	10 ml
FeCl ₃ *6H ₂ O (3,89 g in 1 L 0,1 N HCl)	1 ml
Tris pH 8,2 (100 g/L)	10 ml
1000x P1 Metal Mix	1 ml
dH ₂ O	Add 1 L

Tabelle 36: Rezeptur zur Herstellung von 1000x P1 Metal Mix

	Einzusetzen:
H ₃ BO ₃	34,26 g
MnCl ₂ *4H ₂ O	4,32 g
ZnCl	0,315 g
MoO ₃	0,03 g
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,003 g

CoCl ₂ *6H ₂ O	0,01215 g
dH ₂ O	Ad 1 L

Tabelle 37: Rezeptur zur Herstellung von AA+ Medium

Das FeCl₃, sowie Vitamin B12 (4 µg/L) wurden erst nach dem Autoklavieren zum Medium dazugegeben.

	Einzusetzen:
NaCl	18 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	5 g
Glycerol	1,1 ml
Tris/HCl (825 mM, pH 8,2)	10 ml
FeCl ₃ *6H ₂ O (15 mM)	1 ml
Trace Metals A-5	1 ml
KH ₂ PO ₄	0,025 g
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	0,03 g
KCl	0,6 g
NaNO ₃	1 g
CaCl ₂	0,133 g
dH ₂ O	Add 1 L

Tabelle 38: Rezeptur zur Herstellung von ATTC-Medium

Vor dem Autoklavieren wurde der pH-Wert auf pH 8,5 eingestellt. Vitamin B12 (20 µg/L) wurde immer erst nach dem Autoklavieren frisch zum Medium hinzugegeben.

	Einzusetzen:
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,04 g
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,02 g
NaNO ₃	0,75 g
K ₂ HPO ₄ * 3 H ₂ O	0,02 g
Zitronensäure	0,003 g
Ammonium-Eisen-Zitrat	0,003 g
EDTA	0,0005 g
Na ₂ CO ₃	0,02 g

Spurenelemente A-5	1 ml
Aquariumsalz	30 g
Deionisiertes H ₂ O	Ad 1 L

Tabelle 39: Rezeptur zur Herstellung von A-5 Spurenelementen

	Einzusetzen:
H ₃ BO ₃	2,86 g
MnCl ₂ *4H ₂ O	1,81 g
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,222 g
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,039 g
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,079 g
Co(NO ₃) ₂ *6H ₂ O	0,0494 g
Deionisiertes H ₂ O	Ad 1 L

2.5.2 Kryokonservierung von *Synechococcus sp.* PCC7002

Zur Aufbewahrung von *Synechococcus sp.* PCC7002 über einen längeren Zeitraum wurden 950 µl einer Zellsuspension mit 50 µl DMSO vermischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren (vgl. [81]). Anschließend wurden die Zellen bei -80°C aufbewahrt. Sollten die Zellen erneut kultiviert werden, wurden sie bei 37 °C aufgetaut und dann wie in 2.5.1 beschrieben in A+ Medium angezogen.

2.5.3 Transformation von *Synechococcus sp.* PCC7002

Da *Synechococcus sp.* PCC7002 natürlich kompetent ist, sind keine speziellen Techniken, wie z.B. Elektroporation oder Hitzeschock zur Transformation notwendig. Die Zellen müssen lediglich mit der transgenen DNA inkubiert werden. Je 400 µl Zellen aus der exponentieller Wachstumsphase (ca. OD_{730nm}=1) wurden dafür bei 2500 rpm für 10 min abzentrifugiert und auf OD_{730nm}=2,5 aufkonzentriert. Die Zellen wurden dann mit 200 ng Plasmid-DNA vermischt und im Dunkeln für 5 h bei 38 °C inkubiert. Anschließend konnten die Zellen auf 25 ml A⁺-Agar (1,5% Agar-Agar) ohne Antibiotikum ausplattiert und bei 30 °C für 40 h und ca. 150 µmol/m²*s

inkubiert werden. Nach 40 h wurde je 1 ml einer Kanamycin-Lösung in A⁺-Medium (2,5 mg/ml) über die Agarplatten geträufelt und antrocknen gelassen. Die Selektion der Zellen erfolgte für 10 Tage bei Raumtemperatur und 150 µmol/m²*s. Zur Kontrolle wurden immer Zellen ohne Antibiotikaselektion sowie mit H₂O statt Plasmid-DNA transformierte Zellen mitgeführt. Einzelkolonien der erfolgreich transformierten Zellen wurden mehrmals mit steigenden Konzentrationen Antibiotikum (bis 800 µg/ml Kanamycin) in A⁺-Medium angezogen, um nach Transformanden mit einer möglichst hohen Anzahl der neu eingebrachten DNA-Sequenzen in den Genomkopien zu selektieren.

2.5.4 Genomische DNA-Extraktion aus *Synechococcus sp.* PCC7002

Zur Extraktion genomischer DNA aus *Synechococcus sp.* PCC7002 wurde das Protokoll von Kasajima et al. (2004) leicht adaptiert [84]. Je 500 µl einer Zellkultur mit einer OD_{730nm}=1 wurden bei 10.000 rpm für 5 min zentrifugiert und die sedimentierten Zellen anschließend mit H₂O gewaschen. Nach Entfernen des Überstands erfolgte die Zugabe von 200 µl Extraktionspuffer (siehe Tabelle 40) und eine Spatelspitze „glass beads“ (Ø 0,25-0,5 mm). Nach dem mechanischen Aufbruch im BeatBlaster 24 (Benchmark Scientific, Syreville, New Jersey, Vereinigte Staaten) bei 4000 m/s konnten die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 10.000 rpm für 5 min sedimentiert werden. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die DNA-Lösung bei 4 °C aufbewahrt. Für einen 20 µl PCR-Ansatz wurde je 1 µl der DNA-Lösung eingesetzt. Um die notwendige Zeitdauer für den Aufschluss der Zellen zu ermitteln, wurden Zellen für unterschiedliche Zeitintervalle im BeatBlaster24 mechanisch aufgebrochen und die erfolgreiche Extraktion genomischer DNA durch die Amplifikation des 16s rRNA-Gens untersucht (siehe Abbildung 10).

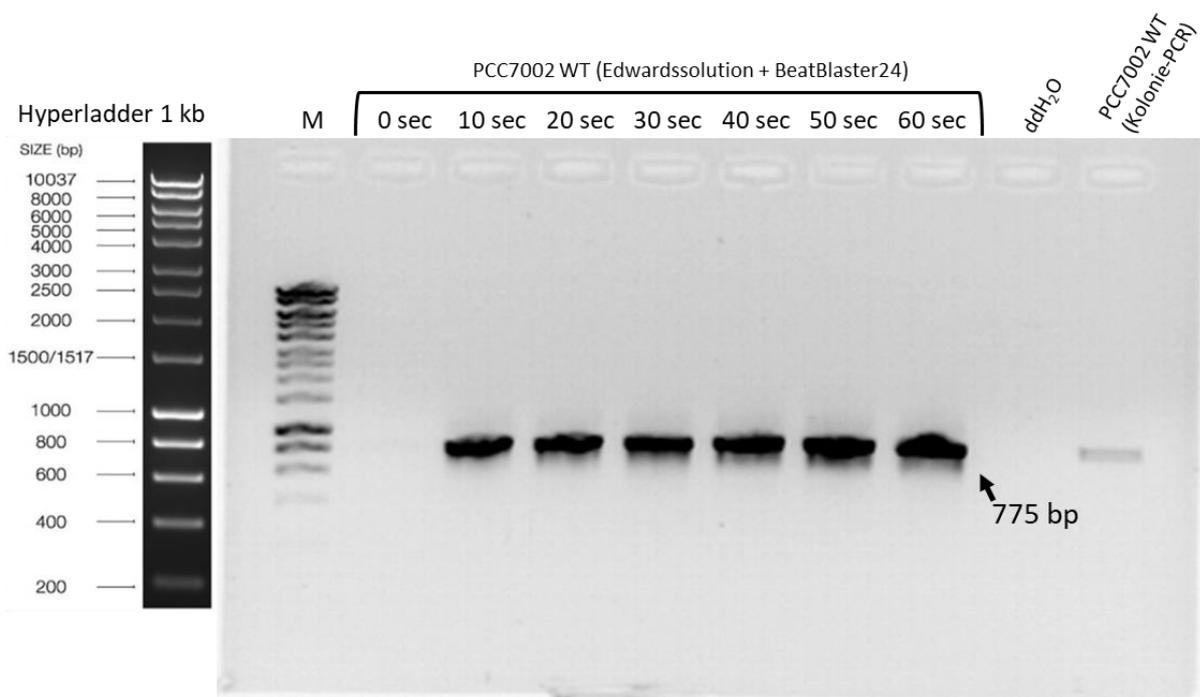


Abbildung 10: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis genomischer DNA nach Aufbruch der Zellen für verschiedene Zeitintervalle

Die PCR wurde mit Primern für das 16S rRNA-Gen durchgeführt, wobei als „Template“ jeweils ein Zellextrakt aus *Synechococcus sp.* PCC7002 eingesetzt wurde. Hierfür wurden die Zellen in verschiedenen langen Zeitintervallen mechanisch mit „glass beads“ aufgebrochen. Die Elektrophoretische Auftrennung von je 7,5 µl des PCR-Ansatzes in 1x orange DNA-Ladepuffer erfolgte bei 90 V für ca. 25 min. Als Marker (M) wurden 2 µl Hyperladder 1 kb von Bioline aufgetragen. Zum Vergleich wurde auch eine Kolonie-PCR (siehe 2.1.2) mit den gleichen Primern durchgeführt.

Da der Aufbruch für 10s bereits zu einem im Agarosegel deutlich sichtbaren Amplifikat führte, erfolgte das Aufbrechen der Zellen nachfolgend immer für 10s im BeatBlaster24 bei 4000 m/s. Zum Nachweis erfolgreich isolierter genomischer DNA aus den Aquaporintransformanten und dem Ursprungstamm wurde eine Amplifikation des 16S rRNA-Gens durchgeführt (siehe 2.1.11).

Tabelle 40: Extraktionspuffer zur Aufnahme genomischer DNA

Zunächst wurde eine Edwards-Lösung nach Angaben der Tabelle hergestellt. Zur Herstellung des Extraktionspuffers wurde die Edwards-Lösung 1:10 mit TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8) gemischt.

Tris/HCl (pH 7,5)	200 mM
EDTA	25 mM
SDS	0,5 %

NaCl	250 mM
------	--------

2.5.5 RNA-Extraktion aus *Synechococcus sp.* PCC7002

RNA wurde auf zwei verschiedenen Wegen aus dem Cyanobakterium *Synechococcus sp.* PCC7002 extrahiert. In beiden Fällen wurden 50 ml einer Zellkultur, welche sich in der exponentiellen Wachstumsphase (ca. $OD_{730\text{ nm}} = 1$) befand, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt, bevor Sie in einem Kryo-Lyophilisator für 24 h gefriergetrocknet wurden. Der Aufbruch von ca. 100 mg der gefriergetrockneten Zellen erfolgte anschließend durch Zerreiben in einem Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff. Das Pulver wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und dann mit 1 ml Lysepuffer entweder aus dem Spectrum™ Plant total RNA-Kit oder nach Sokolovsky et al (1990) versetzt (siehe Tabelle 41, [80]).

Tabelle 41: Lysepuffer zur Extraktion von RNA nach Sokolovsky et al. (1990)

	Endkonzentration:
NaCl	600 mM
Tris/HCl pH 8	100 mM
EDTA	10 mM
SDS	4 %

Das weitere Vorgehen erfolgte im ersten Fall nach Anleitung des Kits. Zusätzlich wurden wie im Protokoll vorgeschlagen DNA-Verunreinigungen mit Hilfe des On-column DNase I Digest Sets von Sigma Aldrich durchgeführt. Im zweiten Fall wurde die RNA nach einem leicht modifizierten Protokoll von Sokolovsky et al (1990) isoliert [80]. Die in Lysepuffer resuspendierten Zellen wurden dafür statt mit gesättigtem Phenol mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt und 30 min bei Raumtemperatur auf einer Rüttelplatte geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension bei 13.000 rpm für 15 min zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu sedimentieren. Der Überstand wurde tröpfchenweise mit

dem 0,75-fachen Volumen 8 M LiCl zur Fällung der RNA versetzt. Nach Inkubation bei 4 °C für 1h, erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 min bei 4°C, um das RNA-Präzipitat von den flüssigen Bestandteilen zu trennen. Der Überstand wurde entfernt und die RNA in 70% eiskaltem EtOH gewaschen. Anschließend konnte die isolierte RNA in 17,5 µl autoklaviertem MiliQ-Wasser aufgenommen werden. Nach Zugabe von 2 µl 10x DNase-Reaktionspuffer (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika) und 0,5 µl DNase (2 U/µl, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika) wurden DNA-Verunreinigungen durch 30-minütige Inkubation bei 38 °C entfernt. Die Inaktivierung der DNase erfolgte durch Zugabe von 2,5 µl 25 mM EDTA und Inkubation bei 75 °C für 10 min. Zu der RNA-Lösung wurden weitere 277,5 µl autoklaviertes MiliQ-Wasser gegeben und die RNA durch Zugabe von 30 µl 3M Kaliumacetat (pH 5) und 750 µl eiskaltem 100% EtOH über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Tag wurde die RNA durch Zentrifugation bei 4°C und 13.000 rpm für 15 min sedimentiert und mit eiskaltem 70% EtOH gewaschen. Nach einer kurzen Trocknungsphase in einem geöffneten Gefäß auf Eis konnte die RNA abschließend in 50 µl autoklaviertem MiliQ-Wasser aufgenommen werden. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Überprüfung der erfolgreichen Isolation fand photometrisch anhand der Absorptionsverhältnisse $A_{260/280\text{nm}}$ und $A_{260/230\text{nm}}$, sowie durch elektrophoretische Auftrennung in einem 1 % MEN-Agarosegel statt (siehe 2.1.5).

2.5.6 (Membran-)Proteinextraktion aus *Synechococcus sp.* PCC7002

Die in die Zellen eingebrachten Aquaporine weisen eine starke Hydrophobizität auf und sind sehr lipophil. Deshalb sind sie hauptsächlich in den Doppellipidmembranen der Zelle zu finden. Die Isolation von Membranproteinen (z.B. zum Nachweis dieser in einem Organismus) ist etwas aufwendiger als die Extraktion von wasserlöslichen Proteinen (z.B. Phycobiliproteinen), da diese zuvor noch aus der Membran herausgelöst werden müssen. Dafür wird ein Solubilisierungspuffer benötigt, der eine ausreichende Menge an Detergenzien zum Lösen und Aufnehmen der Proteine in der wässrigen Lösung enthält. Zur Extraktion der Membranproteine aus *Synechococcus sp.* PCC7002 mussten die Zellen zunächst aufgeschlossen werden. Um eine geeignete Methode hierfür zu finden, erfolgte zunächst ein

Vergleich verschiedener Aufschlussmethoden. Dafür wurden je ca. 20 ml einer Zellkultur ($OD_{730nm} = 0,5$) bei 3000 rpm für 10 min zentrifugiert und mit autoklaviertem H_2O gewaschen. Nach entfernen des Überstands wurden die Zellen in 1 ml 1x SDS-Ladepuffer (siehe Tabelle 21) aufgenommen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte zum einen durch Ultraschallbehandlung für 1, 2, 3 oder 4x 30 sec (bei 50 % Amplitude und einem „Duty cycle“ von 50) oder 1 bzw. 3-maligem Einfrieren und Auftauen („Freeze & Thaw“ bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ & $37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Zusätzlich wurden die Zellen auch durch Zugabe einer Spatelspitze „glass beads“ ($\varnothing 0,5\text{ mm}$) und vortexen für 10, 15 oder 20 x 30 sec oder im BeatBlaster24 (Benchmark Scientific, Syreville, New Jersey, Vereinigte Staaten) für 5x 1 min bei 7000 m/s aufgeschlossen. Zwischen den einzelnen Aufbruch-Schritten erfolgte eine 1-minütige Inkubation der Zellen auf Eis. Das Ergebnis der Aufschlüsse wurde dann anhand der Gesamtproteinkonzentration auf einem Polyacrylamidgel überprüft (siehe Abbildung 11).

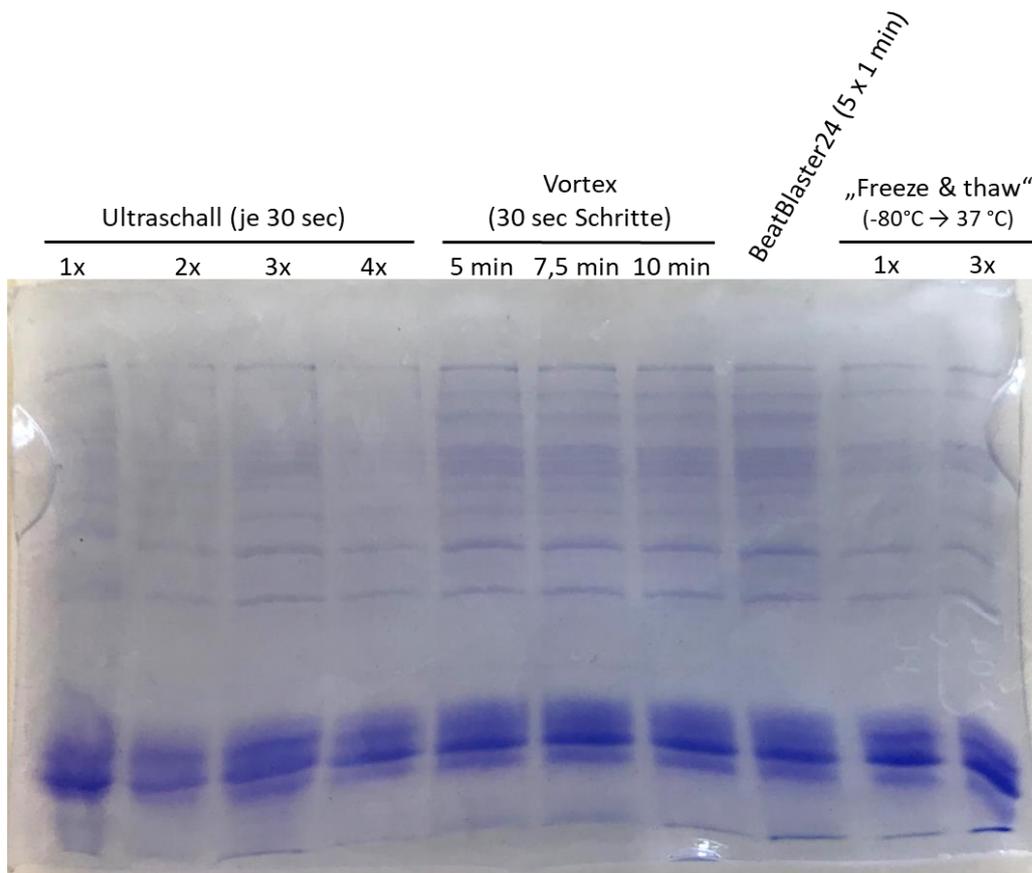


Abbildung 11: Elektrophoretische Auftrennung der mit verschiedenen Aufschlussmethoden isolierten Proteine aus *Synechococcus* sp. PCC7002 auf einem Polyacrylamidgel

Die Proteine wurden nach der ca. 30-minütigen Auftrennung bei 30 mA mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt. Je Spur wurden ca. 10 µl des Proteinaufschlusses in 1x SDS-Ladepuffer aufgetragen.

Da die Proteinisolationen mit „glass beads“ die intensivsten Bandenmuster im Polyacrylamidgel aufzeigten, fand der Aufschluss der Zellen im Folgenden damit statt. Die Menge der eingesetzten Zellen wurde erhöht, um eine größere Proteinausbeute zu erzielen. Die Zellen aus 50 ml einer Zellkultur ($OD_{730nm}=1$) wurden dafür in ca. 10 ml Lysepuffer (siehe Tabelle 42) aufgenommen.

Tabelle 42: Zusammensetzung des Lysepuffers

Leupeptin und Pepstatin A wurden immer erst kurz vor der Benutzung zum Lysepuffer dazugegeben.

	Endkonzentration:
Na ₃ PO ₄ pH 7,5	50 mM
Glycerin	5 %
EDTA	1 mM
Leupeptin	10 µg/ml
Pepstatin A	1,4 µg/ml

Vor dem mechanischen Aufschluss der Zellen für 4 mal 2 min im „Bead-Beater“ (Model 1107900, Biospec Products, Inc., Bartlesville, Oklahoma, Vereinigte Staaten von Amerika) unter Kühlung mit Eis und jeweils 2 min Pause dazwischen wurden ca. 10 ml „glass beads“ (Ø 0,1 mm) zu der Zellsuspension gegeben. Nach Überführen des Zellextrakt (ohne „glass beads“!) in ein Zentrifugenröhrchen, konnten die „glass beads“ mit 40 ml Lysepuffer gewaschen werden, bevor auch dieser Überstand ins Zentrifugenröhrchen gegeben wurde. Es folgte eine kurze Zentrifugation bei 30000 rpm und 4 °C für 5 min in einer Ultrazentrifuge, um die Zelltrümmer vom Proteingemisch im Überstand zu trennen. Eine erneute Zentrifugation des Überstands für 2 h führte zur Sedimentation der Membranen. Diese wurden anschließend mit Hilfe eines Homogenisators (nach Potter-Elyehjem) in 4 ml 20 mM Tris/HCl pH 7,5 und 100 mM NaCl resuspendiert. Über die photometrische Vermessung der OD bei 280 nm konnte die ungefähre Proteinkonzentration bestimmt werden. Zu ca. 65 mg isolierter Membranproteine in 3 ml Flüssigkeit kamen anschließend 3 ml eines Solubilisierungspuffers (siehe Tabelle 43)

hinzu. Das Gemisch wurden dann für 2 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert, um die Proteine aus den Membranen zu lösen. Es folgte eine letzte Zentrifugation für 15 min bei 50000 rpm und 4 °C in einer Ultrazentrifuge zur Sedimentation der Membranreste, bevor die Membranproteine bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren wurden.

Tabelle 43: Rezeptur zur Herstellung des Solubilisierungspuffers

	Einzusetzen:
Glycerin	690 µl
1,4 M β-Mercaptoethanol	8,4 µl
5 mM DDM	600 µl
20 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl	1701,6 µl

2.5.7 Aufnahme von Wachstumskurven für *Synechococcus sp.* PCC7002

Um geeignete Wachstumsbedingungen zur Kultivierung von *Synechococcus sp.* PCC7002 zu ermitteln wurden verschiedene Medien, Temperaturen und Lichtbedingungen ausgetestet. Dafür wurden Zellen einer kryokonservierten Zellkultur bei 37°C aufgetaut und in entsprechendem Medium in einem 400 ml Blasensäulen Bioreaktor bei 30°C, 250 µmol/m²*s und Begasung mit einem Luftgemisch mit 1% CO₂ begast. Am nächsten Tag wurden Zellen aus dieser Vorkultur in frischem Medium auf eine OD_{730nm}=0,1 verdünnt und zur Messung bei der jeweils getesteten Temperatur, Lichtintensität und Begasung im Blasensäulenreaktor kultiviert. Mit 12 h Zeitverzögerung wurde eine zweite Zellkultur gleichermaßen angesetzt, um zeitliche Lücken bei der Aufnahme der Wachstumskurven zu schließen. Über einen Zeitraum von mindestens 24 h wurden immer wieder einige Milliliter Zellen aus dem Reaktionsgefäß entnommen und damit die Optische Dichte bei 730 nm, die Zellzahl/ml, das Trockengewicht und der Chlorophyll a Gehalt (siehe 2.5.9) bestimmt. Zur Verringerung des technischen Fehlers erfolgte dabei jede Messung drei Mal (n=1). Die Optische Dichte wurde mit dem FoodALYT Photometer Extra (OMNILAB-Laborzentrum, Bremen, Germany) bestimmt und die Zellzahl mit der Neubauer Zellzählkammer ausgezählt. Um die Ergebnisse der

Wachstumsversuche zur optimalen Kultivierung zusammenzufassen: Mit zunehmender Beleuchtungsstärke sank die Verdopplungszeit. Zwischen 250 und 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ konnte aber nur noch eine geringe Verbesserung beobachtet werden. Bei Temperaturen über 30°C bis 38 °C wuchsen die Cyanobakterien vergleichbar schnell. In AA⁺- und ATCC-Medium wiesen die Zellen in mehreren Versuchen eine hellere Farbe auf, wuchsen nicht oder verklumpten. Die Zugabe von Urea oder NH₄Cl zum A⁺-Medium konnte die Verdopplungszeit nicht verbessern. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde beschlossen die Zellen standardmäßig bei 30°C und 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ Beleuchtung in A⁺-Medium bei Begasung mit einem Luftgemisch mit 1% CO₂ zu kultivieren. Die minimale erreichte Verdopplungszeit bei 36 °C betrug ca. $5,68 \pm 0,41$ h (n=6). Für die vergleichenden Wachstumsversuche mit Aquaporintransformanten und dem Ursprungsstamm bei Begasung mit Luft, wurde die Zellzahl mit der "Cell counter" Funktion des BZ-X810 Mikroskops (Keyence Corporation, Osaka, Japan) automatisiert ausgezählt, dafür wurde mit Hilfe des Z-Stacking Moduls ein Bild über mehrere Ebenen der Neubauer Zellzählkammer aufgenommen. Deshalb können die Zellzahlen nicht direkt mit denen aus den anderen Wachstumsversuchen verglichen werden, in denen die Zellen nur auf einer Ebene im Durchlichtmikroskop ausgezählt wurden. Zur Bestimmung des Trockengewichts wurden die Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße mit bekanntem Gewicht überführt und durch Zentrifugation bei 10.000 rpm für 2 min sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die Zellen wurden dann in einem Kryolyophilisator für 24 h gefriergetrocknet und die Gewichtszunahme im 1,5 ml Reaktionsgefäß ermittelt. Zur grafischen Darstellung der Wachstumskurven wurde die optische Dichte bei 730nm gegen die Zeit aufgetragen. Mit Hilfe des "solver" "add ins" von Excel wurde eine Kurvenanpassung nach der Methode der kleinsten Quadrate (χ^2) vorgenommen ($R^2 \geq 0,86$ für Begasung mit Luft und $R^2 \geq 0,94$ für Begasung mit 1% CO₂). Zur Beschreibung der Wachstumskurve wurde die Gompertz-Funktion herangezogen ($y(t) = a * e^{-b * e^{-c * t}}$). Die Parameter der Funktion wurden zur Angleichung der Kurve an die gemessenen Daten angepasst, um χ^2 zu minimieren. Die Berechnung der Verdopplungszeit (G in Tagen) erfolgte im exponentiell ansteigenden Bereich der Wachstumskurven nach [85] mit Hilfe der Formeln

$$K' = \frac{\ln\left(\frac{\text{Biomasse}_{t2}}{\text{Biomasse}_{t1}}\right)}{(t2-t1)} \text{ für die spezifische Wachstumsrate (K')} \text{ und } G = \frac{\ln(2)}{K'}$$

2.5.8 Phycobiliproteinextraktion aus *Synechococcus sp.* PCC7002

Die Extraktion der Phycobiliproteine erfolgte nach Gupta et al. (2020)[70]. Hierfür wurden die Zellen aus 1 ml einer Zellkultur mit bekannter OD_{730nm} durch Zentrifugation bei 3500 rpm für 15 min sedimentiert und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend auf Eis wieder aufgetaut. Nach Zugabe von je 1 ml 10 mM PBS (pH 7,2, eiskalt), sowie einer Spatelspitze „glass beads“ (\varnothing 0,25-0,5 mm) erfolgte der mechanische Aufbruch der Zellen im BeatBlaster24 (Benchmark Scientific, Syreville, New Jersey, Vereinigte Staaten) bei 7000 m/s für 2 Zyklen a 30 Sekunden mit 30-sekündiger Pause auf Eis. Zum Entfernen der Zelltrümmer wurde die Suspension erneut zentrifugiert, bevor der Überstand im FoodALYT Photometer Extra (OMNILAB-Laborzentrum, Bremen, Germany) bei 562, 615 und 652 nm vermessen wurde. Mit Hilfe der Formeln von Bennett and Bogorad (1973)[86] konnte aus den OD-Werten dann der Phycobiliproteingehalt kalkuliert werden:

$$c(\text{Phycocyanin, PC, mg/ml}) = \frac{OD_{615nm} - 0,474 * OD_{652nm}}{5,34}$$

$$c(\text{Allophycocyanin, APC, mg/ml}) = \frac{OD_{652nm} - 0,208 * OD_{615nm}}{5,09}$$

$$c(\text{Phycoerythrin, PE, mg/ml}) = \frac{OD_{562nm} - 2,41 * c(\text{PC}) - 0,849 * c(\text{APC})}{9,62}$$

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte auf die OD_{730nm} der Zellkultur vor der Phycobiliproteinisolierung normiert.

2.5.9 Chlorophyll a Extraktion aus *Synechococcus sp.* PCC7002

Synechococcus sp. PCC7002 besitzt, wie die meisten Cyanobakterien, ausschließlich Chlorophyll a. Zur Extraktion der Chlorophyll a Moleküle aus den Zellen wurde das Protokoll von Palmqvist und Sundberg (2002) leicht modifiziert [87]. Je 1 ml Zellkultur mit bekannter OD_{730nm} wurde in Lösungsmitteltauglichen 1,5 ml Reaktionsgefäßen (mit Schraubdeckeln und Dichtungsring) bei 7.500 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit ddH₂O gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Methanol und einer Spatelspitze MgCO₃, sowie „glassbeads“ (\varnothing 0,5 mm) erfolgte der Aufbruch der Zellen im BeatBlaster24 (Benchmark Scientific, Syreville, New Jersey, Vereinigte Staaten) bei 7000 m/s für 2 Zyklen a 30 Sekunden mit 10 sec Pause dazwischen. Der Ansatz wurde für 10 min bei 60 °C inkubiert

und die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 10 min bei 7.500 rpm sedimentiert. Die Vermessung des Überstand im FoodALYT Photometer Extra (OMNILAB-Laborzentrum, Bremen, Germany) erfolgte bei Wellenlängen von 665 und 730 nm. Jede Extraktion wurde drei Mal durchgeführt, um den technischen Fehler zu minimieren (n=1). Der Chlorophyll a Gehalt wurde mit Hilfe der Formel $\text{Chl a } [\mu\text{g/ml}] = 12.9447 * (A_{665\text{nm}} - A_{730\text{nm}})$ berechnet [88] und auf die $\text{OD}_{730\text{nm}}$ vor dem Aufbrechen der Zellen normiert.

2.5.10 Aufnahme von Netto-O₂-Produktionsraten mit *Synechococcus sp.* PCC7002

Für die Messung der O₂-Netto-Produktionsrate wurde eine O₂-Sensorfolie (SF-RPSu4, PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Germany) verwendet, deren Fluoreszenz abhängig von der O₂-Konzentration der Umgebung ausgelöscht wird. Durch das Licht der zugehörigen Detektoreinheit (DU01) wird die Fluoreszenz der Folie angeregt und die Fluoreszenzintensität kann anschließend von der Einheit detektiert werden. Mit Hilfe der Zeit-Messungs Funktion der zugehörigen VisiSens™ AnalytiCal 1 Software (PreSens Precision Sensing GmbH) konnte die Fluoreszenzabnahme dabei nach Anschalten einer Beleuchtungsquelle in regelmäßigen Zeitabständen (3 min) gemessen werden. Da die externe Beleuchtungsquelle die Fluoreszenzdetektion stört, musste die Beleuchtung 20 sec vor jeder Aufnahme ausgeschaltet werden. Für jede Messung wurden zunächst 3,8 ml einer am Tag zuvor angeimpften Zellkultur von *Synechococcus sp.* PCC7002 ($\text{OD}_{730\text{nm}}=2$) für 40 min bei 30 °C dunkelinkubiert. Dann wurde das Licht (Kaltweiß) für 9-12 min mit unterschiedlichen Beleuchtungsstärken (0, 100, 190, 290, 510, 715, 840, 1140, 1300 oder 1480 $\mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$) eingeschaltet. Die Ermittlung der Beleuchtungsstärke erfolgte mit einem Luxometer (US-SQS/L Sensor der Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland) in A⁺-Medium. Während der Fluoreszenz-Messung befanden sich die Zellen in einer 4 ml Quarzküvette, in die mindestens einen Tag zuvor mit Alleskleber ein Stück der O₂-Sensorfolie geklebt wurde. Die Küvette wurde durch Silikonfett mit einem Deckel verschlossen.

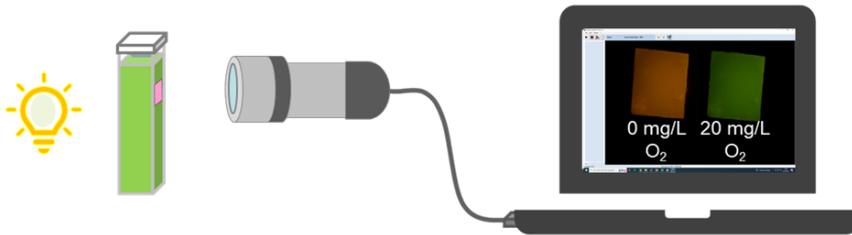


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Wenn die Zellen mit unterschiedlichen O₂ Konz. oder N₂ begast wurden, fand die Dunkelinkubation der Zellen in einem mit Alufolie umwickelten 50 ml Falcon statt. Darin fand auch die Begasung der Zellkultur mit dem gewünschten Luftgemisch für die letzten 10 min der Dunkelinkubation statt. Nach überführen der Zellen in die Küvette wurden die Zellen nochmals für 1 min begast und ein Deckel auf die an den oberen Rändern bereits mit Silikonfett eingeschmierte Küvette gelegt. Diese wurde nochmals von außen mit Silikonfett abgedichtet. Anschließend erfolgte die Messung bei Beleuchtung. Die Kalibrierung des Sensors erfolgte durch Befüllen der Küvette mit Luft (100 % O₂-Sättigung), einem Gasgemisch mit 40 % O₂ (198? % O₂-Sättigung) oder einer Na₂SO₃-Lösung (10 g/L, 0 % O₂-Sättigung). Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten konnten mit Hilfe der VisiSens™ AnalytiCal 1 software von Presens Precision Sensing GmbH ausgewertet werden. Nach Umwandlung der O₂-Konzentrationen von % in mg/L wurde aus der Zu- oder Abnahme der O₂-Konzentration über den gemessenen Zeitraum die Steigung berechnet, welche noch auf die gemessene OD_{730nm} der Zellkultur und den Chlorophyll a Gehalt normiert wurde. Aus den Steigungen bzw. O₂-Netto-Produktionsraten bei verschiedenen Beleuchtungsstärken konnten dann Licht-Dosis-Antwortkurven erstellt werden.

Hierfür wurde eine Kurvenanpassung an die Formel $P_n = \frac{\alpha \cdot I + P_{\max} - \sqrt{(\alpha \cdot I + P_{\max})^2 - 4 \cdot \xi \cdot \alpha \cdot I \cdot P_{\max}}}{2 \cdot \xi}$ von Thornley (1998) vorgenommen ($R^2 \geq 0,91$).

2.5.11 77 K Fluoreszenzmessungen mit *Synechococcus sp.* PCC7002

Die Fluoreszenzspektren bei 77 K wurden mit einem Spektrofluorometer (FP-6500 von JASCO International Co. Ltd. Hachioji, Tokyo, Japan) aufgenommen. In dieses konnte ein Dewargefäß

eingesetzt werden, welches für die Messungen mit flüssigem Stickstoff gefüllt war. In einer 4 ml Plastikküvette wurden vor jeder Messung je 4 ml einer Zellkultur in der exponentiellen Wachstumsphase für 40 min dunkelinkubiert. Nach anschließender 5-minütiger Beleuchtungsphase bei 210 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ (Weißlicht) für 5 min, wurden die Phycobilisome in den Zellen durch Zugabe von 4 ml 0,5 M Kalium-Phosphatpuffer (pH 7,5) (adaptiert nach [89]) und Beleuchtung für weitere 5 min fixiert. Es folgte eine Zentrifugation der Zellen bei 3000 rpm für 5 min. Dann wurden die Zellen in 1,6 ml Phosphatpuffer aufgenommen und mit 2,4 ml 86 % Glycerol gemischt, bevor 2 ml des Ansatzes vorsichtig in einer 2 ml Plastikküvette in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Nur glasklar gefrorene Proben wurden für die Fluoreszenzmessungen weiterverwendet. Die Excitation der Phycobiliproteine und des Chlorophylls fand bei 550 nm bzw. 440 nm statt. Die Fluoreszenzemission im Bereich von 620 bis 800 nm (in 0,5 nm Abständen) wurde pro eingefrorene Probe je 5-mal gemessen und die Werte zum Glätten der Kurve gemittelt (n=1). Vor der Relativierung des Datensatzes auf die Emission bei 640 nm, erfolgte noch eine zusätzliche Glättung durch Berechnung des gleitenden Durchschnitts (je 10 nm). Für jede Zelllinie wurden drei solcher Messungen gemittelt (n=3).

2.6 Verfahren mit *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)

2.6.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Hefezellen des Stamms *SY1* wurden in YPD-Medium (siehe Tabelle 44) bei 30 °C und 120 rpm schüttelnd kultiviert.

Tabelle 44: Zusammensetzung des YPD-Mediums

	Endkonzentration:
Hefeextrakt	1 % (w/v)
Pepton	2 % (w/v)
Glucose	2 % (w/v)

2.6.2 Proteinextraktion aus *S. cerevisiae*

Nach der Kultivierung von *SY1* Zellen wurden 2 ml der Kultur für ca. 30 sec bei 10000 rpm sedimentiert und der Überstand entfernt. Transgene, eingefrorene Hefezellen, die mit einem His-Tag versehene NtAQP1 enthielten, wurden freundlicherweise von Beate Otto zur Verfügung gestellt. Je 250 µl der Hefezellen wurden mit 750 µl Lyse- & Ladepuffer (siehe Tabelle 45) vermengt und 2 Spatelspitzen Glaskügelchen (Ø 0,25 mm) dazugegeben.

Tabelle 45: Zusammensetzung des Lyse- & Ladepuffers

	Endkonzentration:
Tris/HCl pH 6,8	50 mM
SDS	4 % (w/v)
Glycerin	30 % (v/v)
DTT	0,1 M
Bromphenolblau	0,005 % (w/v)

Der mechanische Aufschluss der Zellen erfolgte im BeatBlaster24 (Benchmark Scientific, Syreville, New Jersey, Vereinigte Staaten) bei 7000 m/s für 4 Zyklen a 60 sec und 15 s Pause dazwischen. Der Zellextrakt wurde anschließend für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 10000 g für 10 min konnte der Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert werden. Die Membranproteinisolation erfolgte dann auf gleiche Weise wie für Cyanobakterien (siehe 2.5.6). Im Anschluss wurde eine Nickel-Affinitätschromatographie durchgeführt, um das Aquaporin aus dem Membranproteingemisch zu isolieren (siehe 2.3.1).

2.7 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde die Software Jamovi benutzt. Dabei wurden jeweils zwei Datensätze miteinander verglichen und auf Normalverteilung und Varianzhomogenität getestet. Abhängig von diesen Ergebnissen wurde dann der Zweistichproben-t-, Welchs-, Mann-Whitney-U- oder Kruskal-Wallis-Test zur Signifikanzbestimmung gewählt. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha=0,05$ gewählt. Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

3 Ergebnisse

3.1 Erzeugung und Überprüfung der Cyanobakterientransformationsvektoren

Der für die Versuche ausgewählte Cyanobakterienstamm ist natürlich kompetent. Aus der Umgebung aufgenommene DNA-Fragmenten werden über homologe Rekombination in das Genom von *Synechococcus sp.* PCC7002 eingebaut. Im Zuge dieser Arbeit sollten die Gene für drei verschiedene Aquaporine in das Cyanobakteriengenom integriert werden. Zur Erzeugung von geeigneten Cyanobakterientransformations-vektoren wurde der Vektor pBK47 und Plasmide, mit der cDNA für die Aquaporine hAQP1, NtAQP1 und NtPIP2;1 aus *E.coli* isoliert. Nach erfolgreicher Überprüfung konnten der Vektor (ohne *gfp*) und die cDNA mittels PCR vervielfältigt und die PCR-Produkte aufgereinigt werden. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente in den PCR-Ansätzen vor und nach erfolgter Gelextraktion im Agarosegel ist in Abbildung 13 zu sehen.

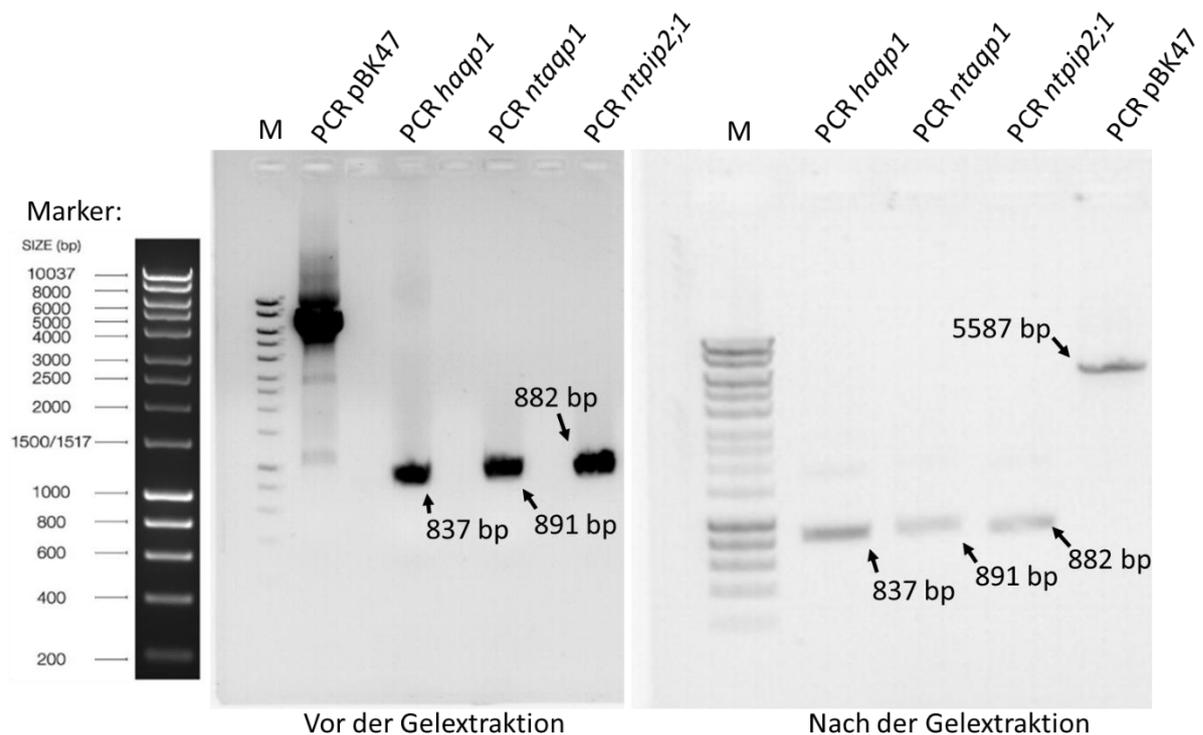


Abbildung 13: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate der cDNA von *haqp1*, *ntaqp1* und *ntpip2;1* und des Vektors pBK47 (ohne dem enthaltenen „gene of interest“ *gfp*) für das In-Fusion® HD cloning vor (links) und nach der Gelextraktion (rechts) (M: DNA-Marker)

Da der komplette PCR-Ansatz aufgetragen wurde, sind im Agarosegel vor der Extraktion nur sehr hoch konzentrierte DNA-Banden für die PCR-Produkte zu sehen. Nach Amplifikation des Vektors ist neben einigen schwächeren Banden eine sehr starke, schwarze Bande zwischen 5000-8000 bp zu erkennen, die wahrscheinlich dem PCR-Produkt mit einer Größe von 5587 bp zuzuordnen ist. Für die drei PCR-Ansätze zur Amplifikation der Aquaporin-cDNA ist jeweils nur eine starke Bande zwischen 800-1000 bp zu erkennen, die der erwarteten Produktgröße (837 bp für *haqp1*, 891 bp für *ntaqp1*, sowie 882 bp für *ntpip2;1*) entspricht. Nach der Aufreinigung sind nur noch DNA-Banden in Höhe der erwarteten Größen zu sehen, hier wurden ca. 60-80 ng DNA (nach Schätzung aus photometrischer Konzentrationsbestimmung) aufgetragen.

Der Extraktionsschritt wurde durchgeführt, um Verunreinigungen z.B. mit dem eingesetzten „Template“ zu minimieren. Eine Kontamination der neu klonierten Plasmide (pBK47 mit Aquaporin-cDNA & KanR) mit pBK47 (GFP & KanR) könnte z.B. bei der Selektion erfolgreich transformierter Zellen zu einer hohen Zahl falsch positiver Transformanten führen.

Nach Zusammenfügen von Vektor und Insert durch das In-Fusion-Enzym, wurden die neuen Plasmide pBK47_hAQP1, pBK47_NtAQP1 und pBK47_NtPIP2;1 zur Vervielfältigung in kompetente Stellarzellen transformiert. Bei der Auswertung der Transformation fiel auf, dass einige Kolonien eine grünlich-gelbe Färbung aufwiesen, während die meisten Kolonien eher weißlich erschienen. Trotz der durchgeführten Gelextraktion zur Entfernung der Verunreinigung mit dem Originalvektor, produzierten ca. 10 % der erhaltenen Transformanten das Reporterprotein GFP, wie Tabelle 46 zu entnehmen ist.

Tabelle 46: Anteil falsch positiver *E.coli* Transformanten nach dem In-Fusion® HD cloning

	Kolonien mit GFP	Kolonien insgesamt	Anteil in %
pBK47_hAQP1	22	243	9
pBK47_NtAQP1	16	143	11
pBK47_NtPIP2;1	35	414	8,5

Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften des in den falsch positiven Zellen gebildeten GFPs war es aber möglich, eine weitere Selektion der transformierten Zellen durchzuführen. Die weiß erscheinenden Kolonien wurden anschließend in einer Kolonie-PCR auf das

Vorhandensein der Aquaporin-cDNA überprüft. Aus den positiv getesteten Klonen wurden Plasmide isoliert und ebenfalls überprüft (siehe Abbildung 14).

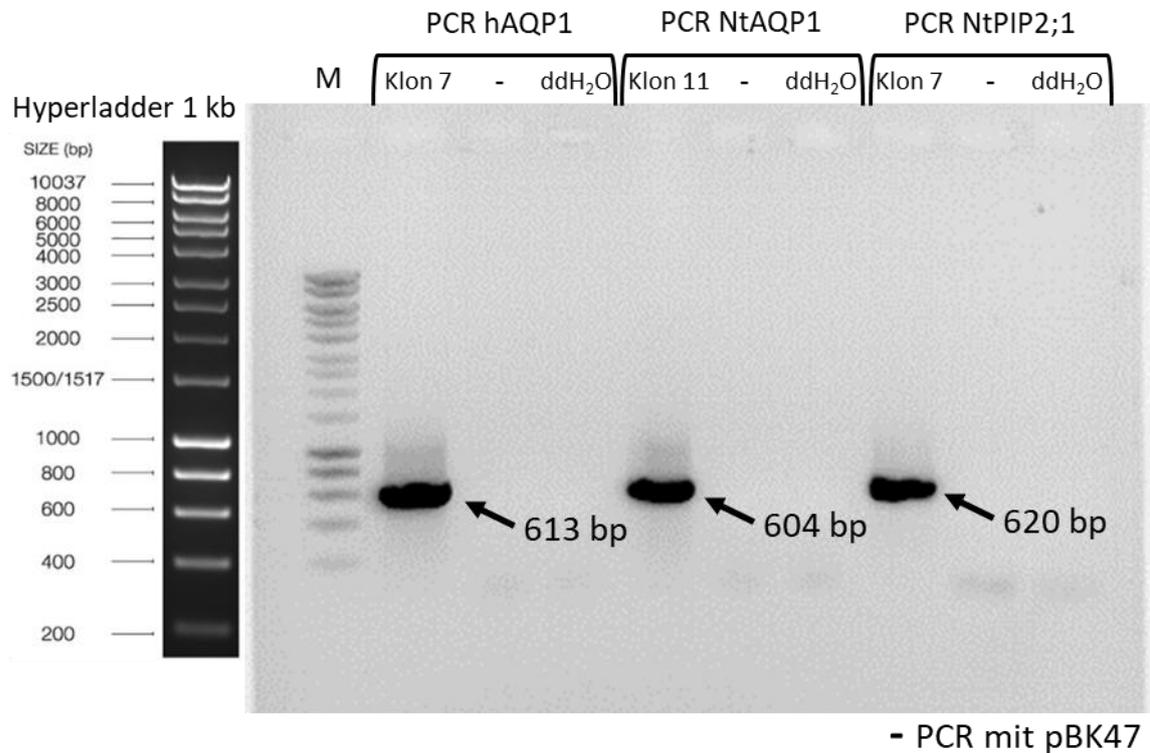


Abbildung 14: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zur Überprüfung der aus *E.coli* isolierten Aquaporintransformationsvektoren (M: DNA-Marker, als Spezifitätskontrolle wurde eine PCR mit dem Originalvektor pBK47 als „Template“ durchgeführt und unter – auf dem Gel aufgetrennt)

Die Primer wurden dabei so gewählt, dass ein Primer auf dem Vektorrückgrad von pBK47 und einer an die jeweilige Aquaporin-cDNA bindet. Die DNA-Banden in Abbildung 14 weisen dabei alle eine Größe von ca. 600 bp auf, was ca. der Größe der erwarteten PCR-Produkte entspricht. Wenn pBK47 oder Wasser zur Kontrolle in der PCR eingesetzt wurden, konnte kein Amplifikat auf dem Agarosegel nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurden die Plasmide im Bereich der neu eingebrachten Aquaporin-cDNA sequenziert, um die Integrität des Konstrukts zu bestätigen (vgl. Abbildung 15).

gewachsene Zellrasen starb ab. Ca. 10 Tage später waren auf den Nährböden jedoch wieder kleine grüne Kolonien zu sehen. Nur bei den mit H₂O transformierten Zellen entstanden keine neuen Kolonien. Zum Nachweis der erfolgten Genomintegration in die Cyanobakterien wurde die Aquaporin-cDNA in der genomischen DNA der Transformanten durch eine PCR amplifiziert (vgl. Abbildung 16).

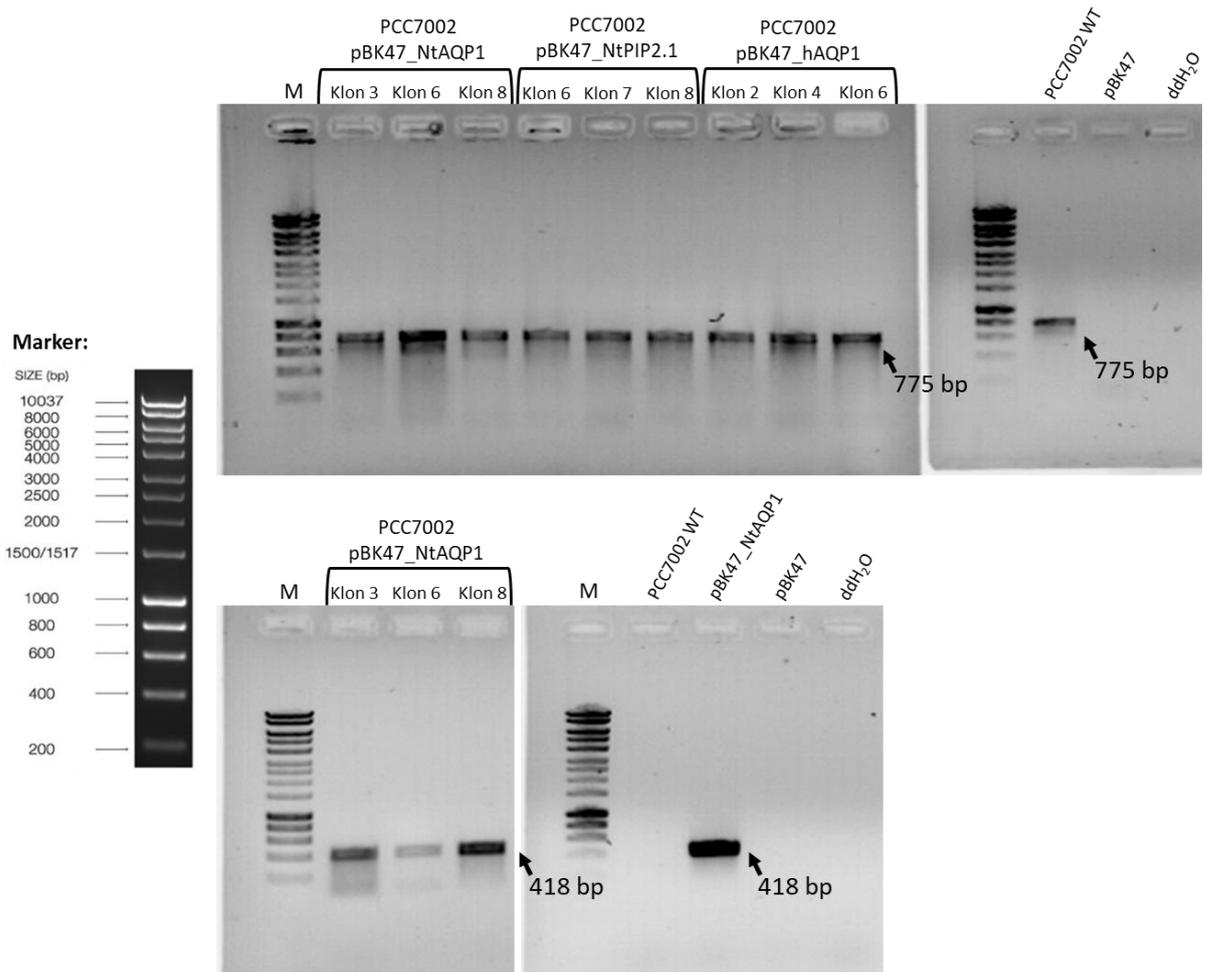


Abbildung 16: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis des 16S rRNA-Gens (oben) und der eingebrachten cDNA für *ntaqp1* (unten) in der aus *Synechococcus sp.* PCC7002 extrahierten genomischen DNA (M: Marker, zur Kontrolle wurde genomische DNA aus dem Ursprungstamm (PCC7002 WT), der Originalvektor pBK47, sowie das in dieser Arbeit erzeugte Plasmid pBK47_NtAQP1 und Wasser in der PCR eingesetzt und auf dem Agarosegel aufgetrennt)

Nach Amplifikation des 16S rRNA-Gens ist im Agarosegel für jede der Proben je eine Bande zwischen 600-800 bp zu erkennen, welche dem erwarteten PCR-Produkt (775 bp) zuzuordnen ist. Dies lässt darauf schließen, dass hier genomische DNA extrahiert wurde. Beispielhaft wird in Abbildung 16 auch die Auftrennung der PCR-Ansätze zum Nachweis von *ntaqp1* im

genomischen DNA-Extrakt gezeigt. Während beim Ursprungstamm (WT) kein Amplifikat nachgewiesen werden kann, ist für die entsprechenden Transformanten von *Synechococcus* sp. PCC7002 bzw. das Transformationsplasmid je eine Bande in Höhe von ca. 400 bp zu sehen, welche der Größe des erwarteten PCR-Produkts entspricht.

Um den Einbau der Aquaporin-cDNA in möglichst viele Genomkopien des Cyanobakteriums zu gewährleisten wurden die Transformanten anschließend mehrmals bei ansteigenden Antibiotikakonzentrationen (bis zu 800 µg/ml) kultiviert.

Dass die eingebrachten Konstrukte im Genom auch abgelesen werden, kann durch Analyse des Transkriptlevels überprüft werden. Hierfür wurde eine qPCR zum Nachweis der Menge an Aquaporintranskript im Vergleich zur Expression eines Referenzgens (SecA) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 zu sehen.

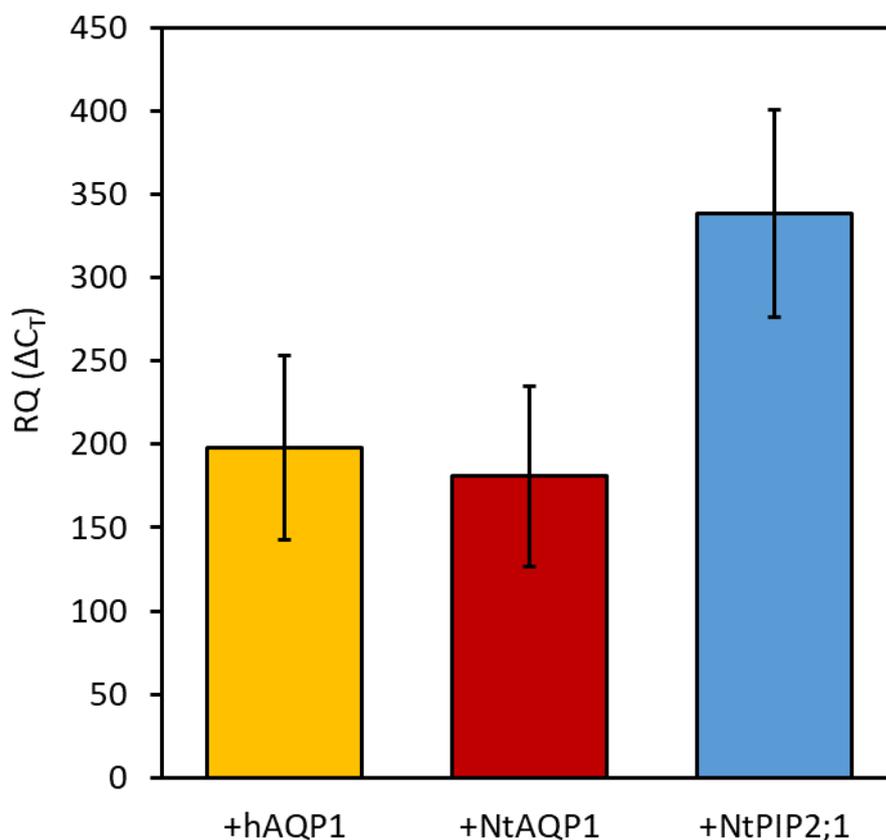


Abbildung 17: Transkriptlevel der in *Synechococcus* sp. PCC7002 eingebrachten Aquaporine
Die C_T-Werte wurden auf das Referenzgen secA normiert und daraus der RQ berechnet. (n=10)

In allen getesteten Aquaporintransformanten konnte die Expression der entsprechenden Aquaporinsequenz nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Referenzgen ist die

Transkriptmenge der eingebrachten Aquaporine ca. 180–338-mal höher. Im Ursprungsstamm konnte keines der Transkripte gefunden werden (C_T -Werte >30).

Zum Nachweis der Proteintranslation sollten Immunoassays durchgeführt werden. Die Detektion von hAQP1 und NtPIP2;1 mit spezifischen Primärantikörpern führte in mehreren Versuchen jedoch zu keinem Ergebnis. Die technische Kontrolle (durch Bindung des primären Antikörpers an die PVDF-Membran) bestätigte aber die korrekte Funktionalität des verwendeten Lumineszenzsystems.

Der Nachweis von NtAQP1 mit spezifischen Primärantikörpern ist in *Abbildung 18* zu sehen. Nach der Silberkolloidalfärbung konnten für alle Proben Proteinbanden im Bereich von 3,5–260 kDa auf der PVDF-Membran angefärbt werden, was für eine erfolgreiche Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran spricht. Nach Durchführung des Immunoassays ist außer für den Proteinextrakt aus unveränderten Hefen bei allen Proben, auch den Kontrollen ohne NtAQP1, eine Bande in Höhe von ca. 30 kDa und für das aus Hefen isolierte NtAQP1-His noch eine weitere Bande bei ca. 60 kDa zu sehen. Das NtAQP1 Monomer besitzt eine Größe von ca. 30 kDa und das Dimer ist ca. 60 kDa groß. Oberhalb von ca. 60 kDa ist in allen Spuren ein leichter Schmier zu erkennen. In den Spuren mit Proteinextrakt aus NtAQP1 produzierenden Hefen und dem aufgereinigten NtAQP1-His zieht sich dieser sogar fast über die gesamte Membran.

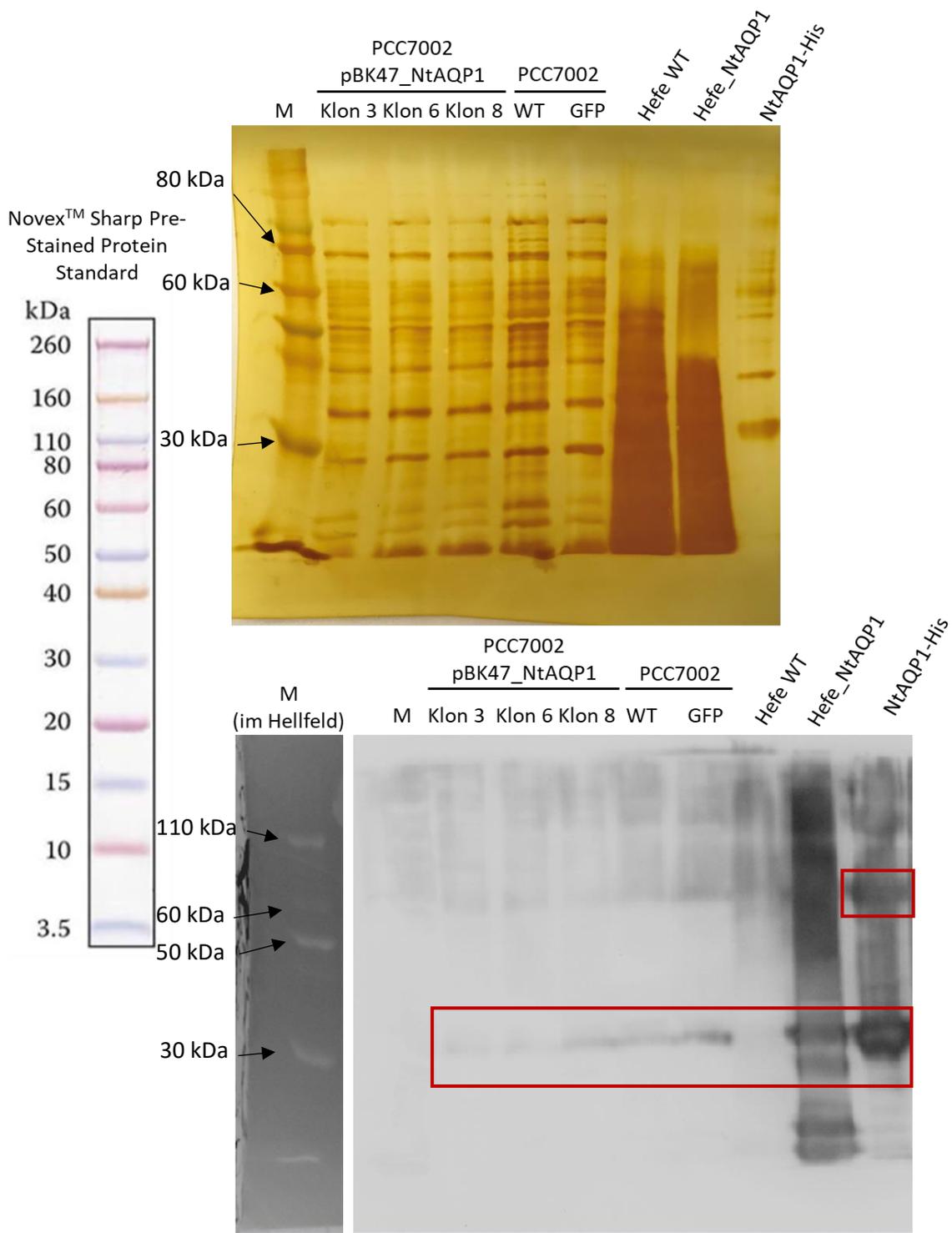


Abbildung 18: Silberkolloidalfärbung einer PVDF-Membran mit Proteinextrakten aus *Synechococcus* sp. PCC7002 und NtAQP1-Transformanten (oben) und Immunoassay der selben Membran zum Nachweis von NtAQP1 mit spezifischen Antikörpern (unten) (M: Protein-Marker, zur Spezifitätskontrolle ist der Proteinextrakt des Ursprungsstamms (PCC7002 WT), einer GFP produzierenden Transformante, des Hefestamms SY1 (Hefe WT), einer NtAQP1 produzierenden Hefe und aus letzter isoliertes NtAQP1-His aufgetragen worden)

Der Nachweis mit proteinspezifischen Antikörpern war nicht erfolgreich. Dies könnte laut der Sequenzierung (vgl. Abbildung 15) an den detektierten Basendeletionen liegen. Der Nachweis der DNA-Fragmente im Genom der Cyanobakterien (vgl. Abbildung 16) und auch des Transkriptlevels (vgl. Abbildung 17) konnte zwar erbracht werden, mit den hierfür verwendeten Methoden lassen sich jedoch einzelne, fehlende Basen im Konstrukt nicht nachweisen. Die durch die Sequenzierung angezeigten Deletionen würden allerdings zu einer Leserasterverschiebung bei den Aminosäurecodons während der Proteintranslation führen. Dadurch könnte es neben einer veränderten Aminosäuresequenz und damit einhergehenden Struktur- und Funktionsverlustes auch zu drastischen Größenunterschieden zwischen dem putativen und tatsächlichen Protein kommen. Deshalb wurden die bereits klonierten Cyanobakterientransformationsvektoren zum erleichterten Nachweis eines Proteins in der richtigen Größe hinter der Aquaporin-cDNA mit einem His-Tag versehen. Hierfür wurde wieder das In-Fusion® HD cloning genutzt. Der Immunoassay zum Nachweis der His-getaggten Proteine fand anschließend mit Proteinextrakten aus überprüften, transformierten *E.coli* Stellar™-Zellen statt (siehe Abbildung 19).

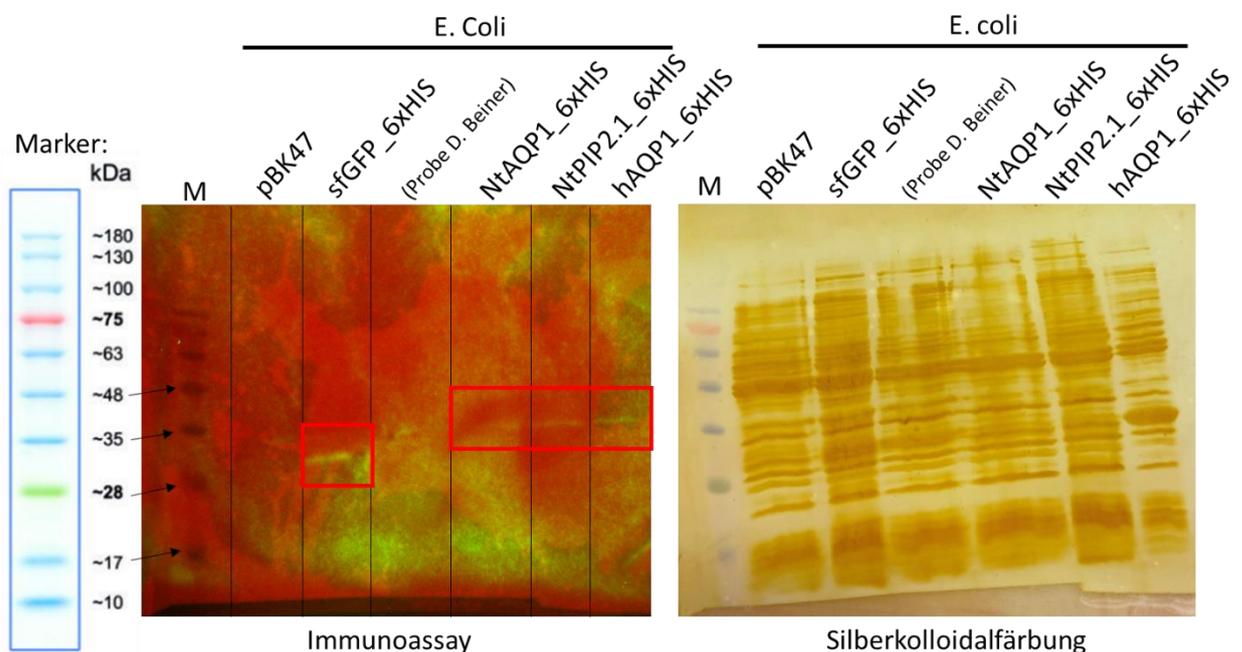


Abbildung 19: Immunoassay zum Nachweis der His-getaggten Proteine im Proteinextrakt von *E. coli* Transformanten mit Anti-His-Antikörpern (links) und Silberkolloidalfärbung der Proteinextrakte auf der PVDF-Membran (rechts)

(M: Protein-Marker, zur Kontrolle wurde der Proteinextrakt von *E.coli* Transformanten aufgetragen, die GFP mit (sfGFP_6xHIS) oder ohne His-Tag (pBK47) produzierten)

Auf der PVDF-Membran ist eine ca. 28 kDa große Bande für den Proteinextrakt aus der GFP-6xHis exprimierenden *E.coli* Transformante zu sehen. Außerdem konnten drei weitere Banden zwischen 28 und 35 kDa in den *E. coli* Proteinextrakten der Aquaporin-6xHis-Tag Transformanten detektiert werden. GFP-6xHis hat eine Größe von ca. 28 kDa, NtAQP1-6xHIS ca. 31 kDa, NtPIP2;1-6xHis ca. 32 kDa und hAQP1-6xHIS ca. 30 kDa.

Nach der Transformation der Konstrukte in die Cyanobakterien blieb ein erneuter Nachweis der Aquaporine mit Anti-His-Antikörpern jedoch wieder erfolglos. Um die Produktion und Funktionsfähigkeit der Aquaporine in den Cyanobakterien dennoch nachzuweisen, wurden die Aquaporintransformanten auf physiologische Unterschiede z.B. im Wachstum oder der Fotosynthese analysiert. Außerdem wurde der Einfluss der, durch den Einbau der Aquaporine in die Membran möglicherweise veränderten, CO₂-Verfügbarkeit in der Zelle auf die Regulation des CCMs untersucht.

3.3 Einfluss der veränderten CO₂-Diffusion über die Membran auf den CCM

Eine Veränderung der intrazellulären CO₂-Verfügbarkeit löst in den Cyanobakterien eine Regulation des CO₂-Konzentrationsmechanismus (CCM) aus. Bei einer starken CO₂-Limitierung wird z.B. die Expression zusätzlicher Bicarbonat-Transporter bzw. CO₂-„Uptake“-Komplexe mit höherer Affinität für das jeweilige Substrat induziert. Da angenommen wird, dass sich durch den Einbau der drei Aquaporine die CO₂-Diffusion über die Membran ändert, sollte untersucht werden, ob dies zu unterschiedlicher Regulation der CCM-Gene in den Aquaporintransformanten führt. Weiterhin wurde auch die Auswirkung der heterologen Aquaporinproduktion auf das Transkriptniveau des endogenen Aquaporins ssAQPZ, sowie die große RuBisCO-Untereinheit analysiert (siehe Abbildung 20). Die Zellen wurden bei Begasung mit einem Luftgemisch mit 1% CO₂ kultiviert.

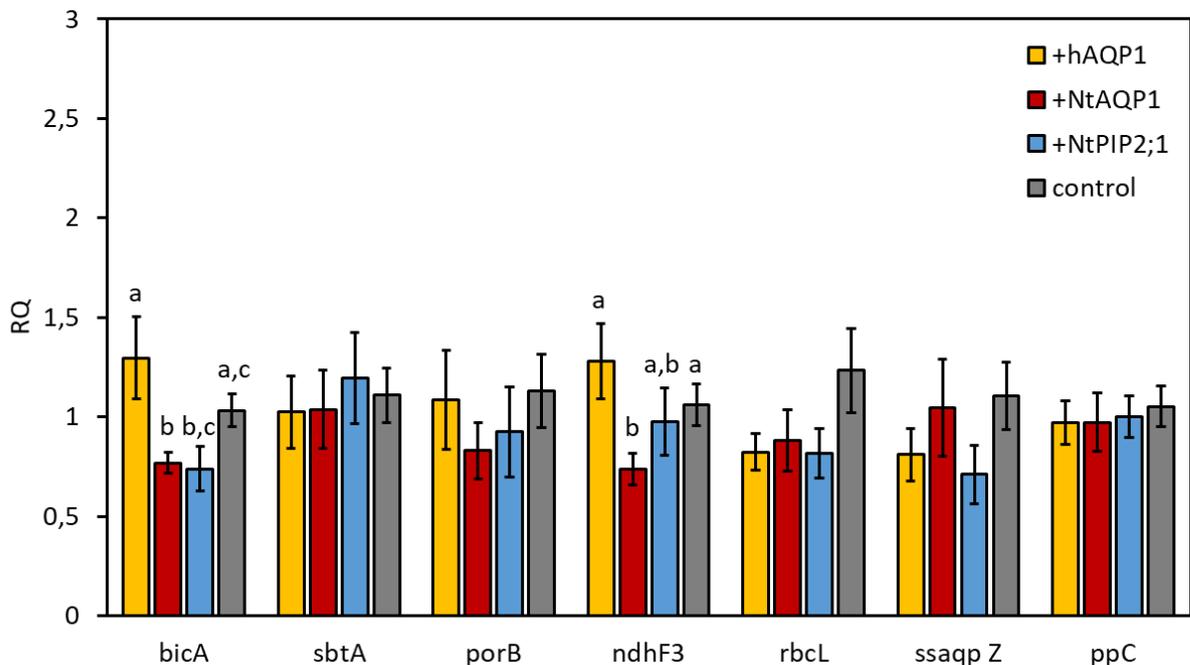


Abbildung 20: Analyse des Transkriptniveaus der Gene für die drei Bicarbonat-Transporter BicA, SbtA und porB, sowie eine Untereinheit des induzierbaren CO₂-„uptake“ Komplexes (NdhF3), der großen RuBisCO-Untereinheit (RbcL), des endogenen Aquaporins (ssaQPZ) und dem zweiten Referenzgen ppC in *Synechococcus sp.* PCC7002 Kontrollzellen und den Aquaporintransformanten (+hAQP1, +NtAQP1 und +NtPIP2;1) (n=10)

Das Transkriptniveau von *bicA* ist in +NtAQP1 geringer als in +hAQP1 ($p=0,041$) und der Kontrolle ($p=0,021$). Gleichzeitig wies die Linie +NtPIP2;1 ein ebenfalls niedrigeres *bicA*-Transkriptniveau auf als +hAQP1 ($p=0,038$). Für *ndhF3* ist das Transkriptniveau in +NtAQP1 ebenfalls niedriger als in der Kontrolle ($p=0,033$) und +hAQP1 ($p=0,009$). Die übrigen Gene zeigten keine veränderten Transkriptlevel.

Unabhängig davon, dass der CCM der Cyanobakterien in den transgenen Zelllinien folglich unverändert zu sein scheint, könnte der Einbau der Aquaporine in die Zellmembran trotzdem Auswirkungen auf z.B. das Wachstum oder die Fotosyntheseleistung der Zellen haben. Deshalb wurden z.B. auch Wachstumsversuche durchgeführt.

3.4 Unverändertes Wachstum in den Aquaporintransformanten

Die Wachstumsversuche fanden sowohl bei Begasung mit mit CO₂-angereicherter Luft (1% CO₂) als auch einem natürlichen Luftgemisch mit atmosphärischer CO₂-Konzentration (0,04% CO₂) statt. In Abbildung 21 wurde beispielhaft die gemessene OD_{730nm} über einen Zeitraum

von 10 Tagen aufgetragen und in Tabelle 47 die berechnete Verdopplungszeiten für die in Abbildung 21 gezeigten Kurven angegeben.

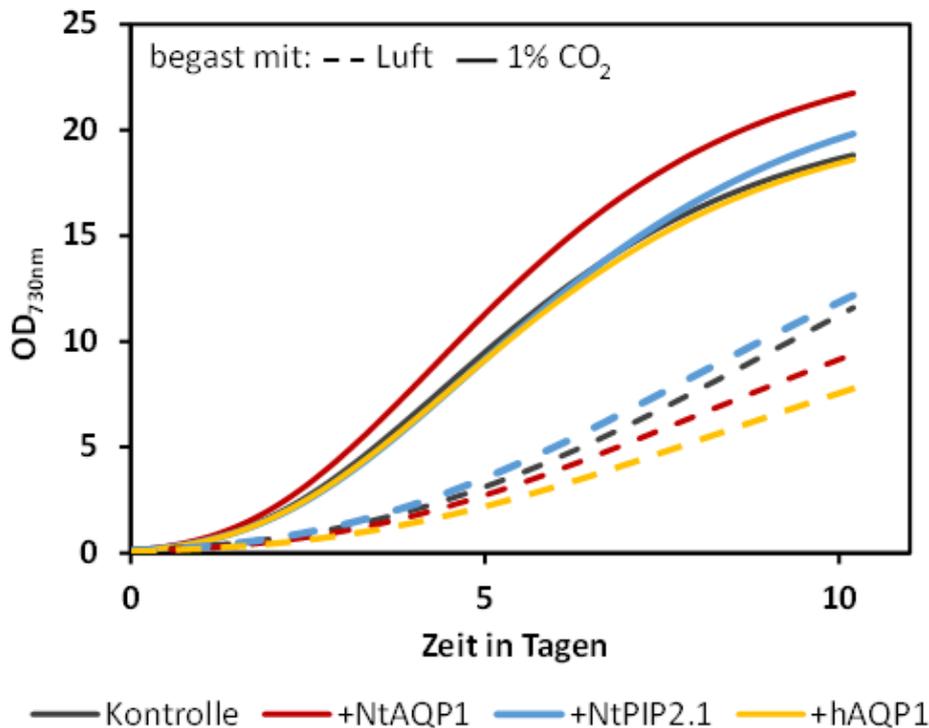


Abbildung 21: Wachstumskurven (OD_{730nm}) der *Synechococcus sp.* PCC7002 Kontrollzellen und den Aquaporintransformanten (+hAQP1, +NtAQP1 und +NtPIP2;1) bei Begasung mit Luft (0,04 % CO_2) und einem Luftgemisch mit 1% CO_2 (Luft: n=2, 1% CO_2 : n=3)

Tabelle 47: Verdopplungszeit der OD_{730nm} von *Synechococcus sp.* PCC7002 Kontrollzellen und den Aquaporintransformanten (+hAQP1, +NtAQP1 und +NtPIP2;1) bei Begasung mit Luft und einem Luftgemisch mit 1% CO_2 ($p \geq 0,047$) Berechnet in der exponentiellen Wachstumsphase: Luft 0-70 h, 1% CO_2 0-26 h

Begasung mit	+hAQP1	+NtAQP1	+NtPIP2;1	Kontrolle
Luft ($p \geq 0,209$)	$16.8 \pm 0.6 \text{ h}^a$	$17.2 \pm 0.1 \text{ h}^a$	$17.0 \pm 0.1 \text{ h}^a$	$15.9 \pm 0.3 \text{ h}^a$
1 % CO_2 ($p \geq 0,047$)	$6.8 \pm 0.4 \text{ h}^{b,c}$	$5.8 \pm 0.2 \text{ h}^{b,c}$	$5.9 \pm 0.04 \text{ h}^c$	$6.4 \pm 0.1 \text{ h}^b$

Bei Begasung mit Luft erreichen die Zellen im Vergleich zur Begasung mit 1% CO_2 im gleichen Zeitraum nur eine geringere OD_{730nm} . Zwischen den Aquaporintransformanten und der Kontrolle konnten allerdings bei gleicher Begasung fast keine Unterschiede festgestellt werden (vgl. Abbildung 21, Tabelle 47). Nur für +NtPIP2;1 war die Verdopplungszeit mit $5,9 \pm 0,04 \text{ h}$ statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle ($6,4 \pm 0,1 \text{ h}$). Da zwischen +NtPIP2;1

und +hAQP1 mit einer höheren Verdopplungszeit ($6,8 \pm 0,4$ h) als die Kontrolle allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied zu finden war, wurden die Messwerte als vergleichbar groß angesehen. Grund für die Signifikanz ist hier wahrscheinlich der sehr geringe Messfehler bei +NtPIP2;1).

Zeitgleich mit der OD_{730nm} wurde auch das Trockengewicht (Biomassezunahme) und die Zellzahl/ml bestimmt (vgl. Tabelle 48).

Tabelle 48: Verdopplungszeit der Biomassezunahme von *Synechococcus sp.* PCC7002 Kontrollzellen und den Aquaporintransformanten (+hAQP1, +NtAQP1 und +NtPIP2;1) bei Begasung mit Luft und einem Luftgemisch mit 1% CO₂

Berechnet in der exponentiellen Phase der Biomassezunahme: Luft 0-292 h, 1% CO₂ 0-54 h

Begasung mit	+hAQP1	+NtAQP1	+NtPIP2;1	Kontrolle
Luft	36.3 ± 3.4 h ^a	51.6 ± 17.7 h ^a	49.3 ± 5.4 h ^a	41.8 ± 14.1 h ^a
1 % CO ₂	18.1 ± 1.6 h ^b	17.2 ± 0.2 h ^b	17.3 ± 1.2 h ^b	16.8 ± 1.5 h ^b

Auch hier waren keine Unterschiede zwischen der Kontrolle und den transgenen Zelllinien erkennbar.

Zusätzlich wurde auch der Chlorophyll a Gehalt während des Wachstums der Zellen gemessen (siehe Tabelle 49).

Tabelle 49: Werte des gemittelten Chlorophyll a Gehalts pro OD_{730nm} in $\mu\text{g/ml}$ während der Wachstumsexperimente mit *Synechococcus sp.* PCC7002 Kontrollzellen und den Aquaporintransformanten (+hAQP1, +NtAQP1 und +NtPIP2;1)

Berechnet in der Phase exponentiellen Anstiegs des Chlorophyll a Gehalts: Luft 0-65 h, 1% CO₂ 0-38 h

Begasung mit	+hAQP1	+NtAQP1	+NtPIP2;1	Kontrolle
Luft ($p \geq 0.018$)	2.7 ± 0.3 $\mu\text{g/ml}$ ^{a,b}	2.9 ± 0.2 $\mu\text{g/ml}$ ^b	2.6 ± 0.3 $\mu\text{g/ml}$ ^{a,b}	2.2 ± 0.2 $\mu\text{g/ml}$ ^a
1% CO ₂	2.9 ± 0.2 $\mu\text{g/ml}$ ^c	2.8 ± 0.2 $\mu\text{g/ml}$ ^c	2.9 ± 0.2 $\mu\text{g/ml}$ ^c	2.4 ± 0.2 $\mu\text{g/ml}$ ^c

Nur für +NtAQP1 war der Chlorophyll a Gehalt nach Begasung mit Luft im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht. Ansonsten blieb der Chlorophyll a Gehalt in den transgenen Linien im Vergleich zur Kontrolle jeweils gleich.

Die heterologe Aquaporinproduktion scheint folglich keinen Effekt auf das direkte Wachstum der Zellen zu haben. Auswirkungen auf die Fotosynthese(rate) durch die heterologe Aquaporinproduktion in den Cyanobakterien wären aber trotzdem denkbar. Dies wurde im Folgenden überprüft.

3.5 Auswirkungen der heterologen Aquaporinproduktion auf die Fotosynthese

Um Rückschlüsse auf die Fotosyntheseleistung in den Cyanobakterien zu erhalten wurde die Netto-O₂-Produktion der Zellen analysiert. Zunächst erfolgten Messungen bei Beleuchtung über ca. 30 min, um die optimale Beleuchtungsdauer zu ermitteln. Ein beispielhafter Kurvenverlauf ist in Abbildung 22 zu sehen.

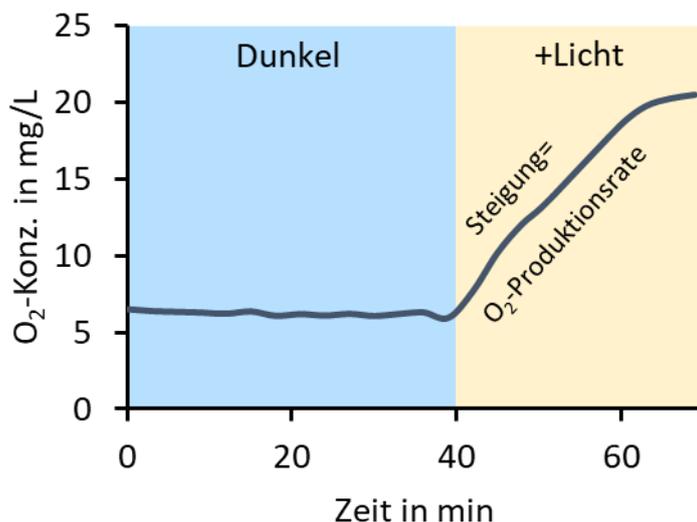


Abbildung 22: Beispielhafter Kurvenverlauf einer O₂-Messung mit *Synechococcus sp.* PCC7002

Die Zellen wurden für ca. 40 min im Dunkeln inkubiert und dann das Licht angeschaltet. Die O₂-Konzentration wurde währenddessen mit einem O₂-Sensor bestimmt.

Hier erfolgte zunächst eine 40-minütige Dunkelinkubation der Zellen. In dieser Zeit sinkt der O₂-Gehalt in der Messküvette aufgrund des O₂-Verbrauchs bei der Zellatmung geringfügig. Nach Einschalten der Beleuchtungsquelle nimmt die O₂-Konzentration in den ersten ca. 20 min stetig zu, bis sie eine Sättigung erreicht. Diese Sättigungsphase ist wahrscheinlich der maximalen Löslichkeit von O₂ im Medium zuzuschreiben. Die anfängliche Steigung während der lichtgetriebenen O₂-Produktion variiert abhängig von der Beleuchtungsstärke und der

CO₂-Verfügbarkeit und stellt die Netto-O₂-Produktionsrate dar. Um den Probendurchsatz zu erhöhen, wurde die O₂-Produktion (Steigung der Kurve) während der Beleuchtung nur noch für ca. 10 min aufgezeichnet.

Die bei verschiedenen Beleuchtungsstärken ermittelten Netto-O₂-Produktionsraten wurde in Abbildung 23 für die drei Transformanten (+hAQP1, +NtAQP1 & +NtPIP2;1) und die Kontrolle (Ursprungstamm) als Licht-Dosis-Antwortkurve aufgetragen.

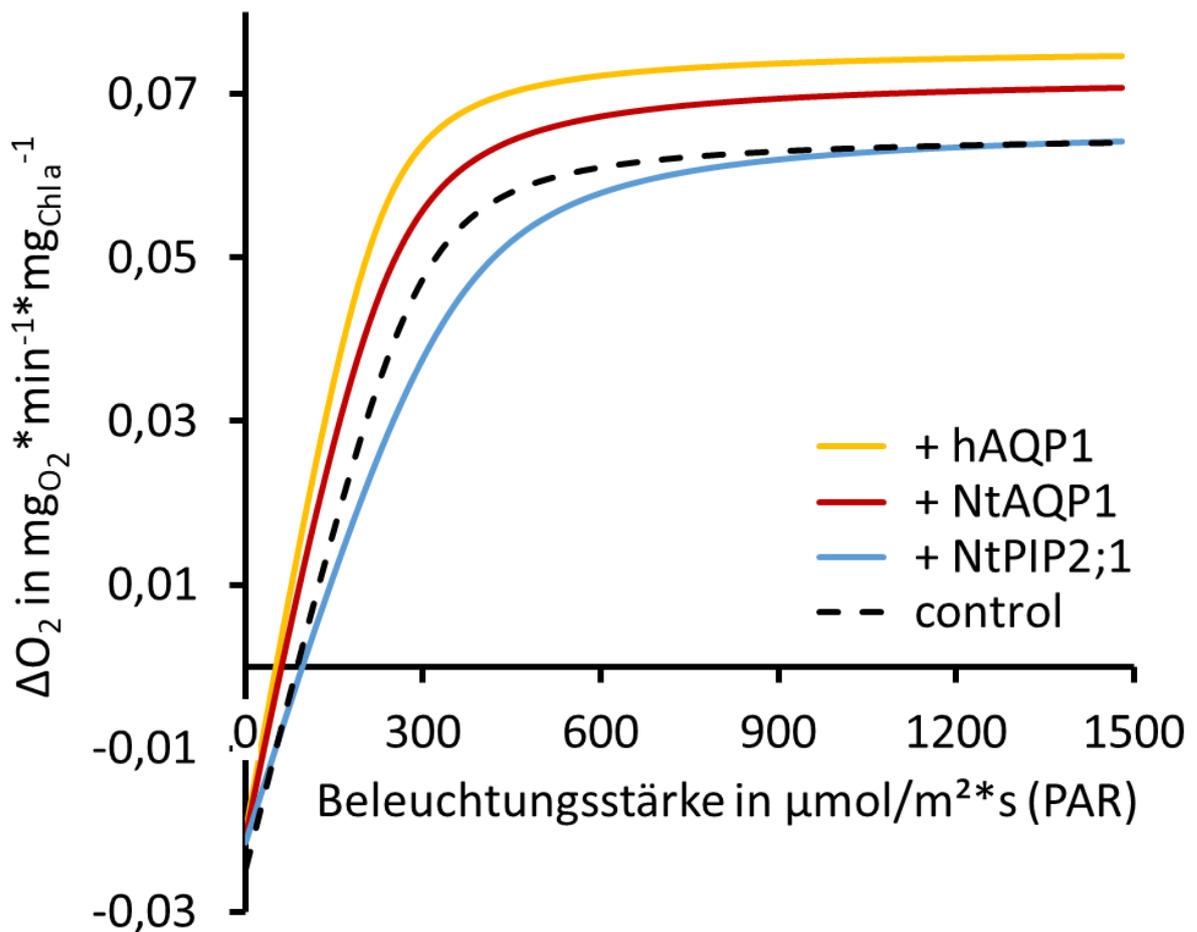


Abbildung 23: Licht-Dosis-Antwortkurve für die Netto-O₂-Produktionsraten von *Synechococcus sp.* PCC7002 Kontrollzellen und den Aquaporintransformanten (+hAQP1, +NtAQP1 und +NtPIP2;1)

Ohne Beleuchtung ist die Netto-O₂-Produktionsrate negativ und für alle Zelllinien vergleichbar ($p \geq 0.167$). Mit zunehmender Beleuchtungsstärke steigen die Netto-O₂-Produktionsraten für

+hAQP1 ($0,0003 \frac{mg_{O_2}}{min * mg_{Chla} * (\mu mol * m^{-2} * s^{-1})}$) und +NtAQP1 ($0,00027 \frac{mg_{O_2}}{min * mg_{Chla} * (\mu mol * m^{-2} * s^{-1})}$) stärker an, als für die Kontrolle ($0,00024 \frac{mg_{O_2}}{min * mg_{Chla} * (\mu mol * m^{-2} * s^{-1})}$) und +NtPIP2;1 ($0,0002$

$\frac{m_{gO_2}}{\min * m_{gChla} * (\mu\text{mol} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1})}$). Ab einem gewissen Punkt, der Beleuchtung mit ca. 510 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 * \text{s}$, geht die Netto- O_2 -Produktionsrate in eine Sättigung über, hier gab es keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den einzelnen Beleuchtungsstufen je Zelllinie. Die ab 510 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 * \text{s}$ gemessenen Netto- O_2 -Produktionsraten wurden deshalb zur Kalkulation der maximalen Netto- O_2 -Produktionsrate gemittelt (siehe Tabelle 50). Für +NtAQP1 wurden ca. 15 % und für +hAQP1 ca. 20 % höhere maximale Netto- O_2 -Produktionsraten erreicht als für die Kontrolle und +NtPIP2;1.

Tabelle 50: ermittelte Netto- O_2 -Produktionsraten bei verschiedenen Beleuchtungsstärken für *Synechococcus sp.* PCC7002 Kontrollzellen und die Aquaporintransformanten (+hAQP1, +NtAQP1 und +NtPIP2;1) im Vergleich zur maximalen Netto- O_2 -Produktionsrate der Kontrolle in %

	0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 * \text{s}$ (n \geq 20, p \geq 0.166)	100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 * \text{s}$ (n \geq 20, p \leq 0.002)	190 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 * \text{s}$ (n \geq 20, p \leq 0.026)	290 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 * \text{s}$ (n \geq 20, p \leq 0.006)	510-1480 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 * \text{s}$ (n \geq 120, p \leq 0.03)
+ hAQP1	-33,3 \pm 0,7 % ^a	23,3 \pm 5,4 % ^{b,d}	78,1 \pm 5,7 % ^e	104,2 \pm 8,0 % ^{h,i,j}	119,7 \pm 4,9 % ^{j,l}
+ NtAQP1	-34,1 \pm 0,7 % ^a	14,6 \pm 3,9 % ^b	57,7 \pm 5,1 % ^f	94,1 \pm 9,4 % ^{e,h,j}	115,1 \pm 3,3 % ^{i,l}
+ NtPIP2;1	-35,4 \pm 1,3 % ^a	-4,4 \pm 2,4 % ^c	35,4 \pm 7,8 % ^{d,g}	56,8 \pm 6,5 % ^{f,k}	102,9 \pm 3,8 % ^h
Kontrolle	-40,8 \pm 5,0 % ^a	13,1 \pm 4,3 % ^b	45,7 \pm 6,1 % ^{f,g}	74,0 \pm 6,1 % ^{e,k}	100,0 \pm 2,8 % ^h

Der Chlorophyll a Gehalt, welcher parallel zu den O_2 -Messungen für die Kontrolle und die Aquaporintransformanten bestimmt wurde, ist in Abbildung 24 aufgetragen.

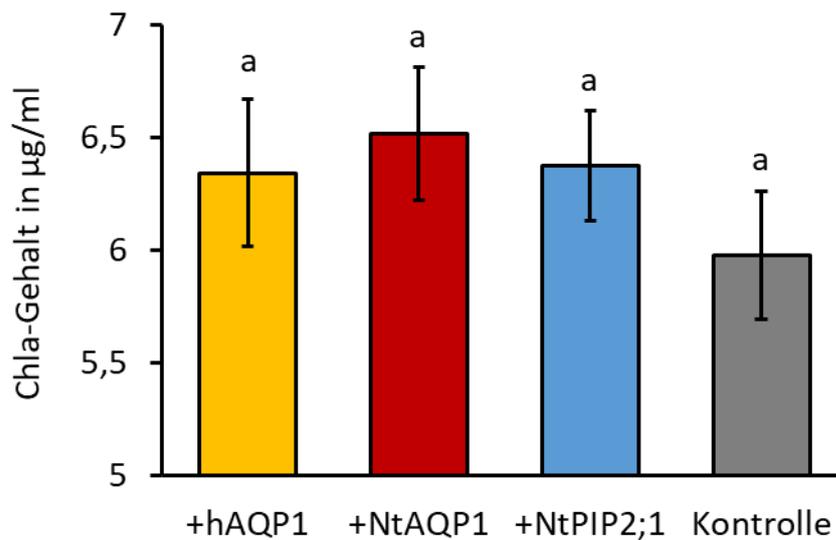


Abbildung 24: Chlorophyll a Gehalt in *Synechococcus sp.* PCC7002 Kontrollzellen und den Aquaporintransformaten (+hAQP1, +NtAQP1 und +NtPIP2;1) zum Zeitpunkt der O₂-Messungen (n≥12)

Da der Chlorophyll a Gehalt in allen Zelllinien gleich war, wurden die Netto-O₂-Produktionsraten in Abbildung 23 auf den Mittleren Chlorophyll a Gehalt normiert.

Als Grund für die hier beobachteten, erhöhten Netto-O₂-Produktionsraten (im lichtlimitierten Bereich) wurde eine erhöhte PSII-Effizienz vermutet. Die Übertragung der Lichtenergie von den Phycobilisomen (Lichtsammelkomplexen) an die beiden Fotosysteme (PS) wurde deshalb mit Hilfe von 77 K Fluoreszenzmessungen untersucht (siehe Abbildung 25). Die Zellen wurden zuvor mit ca. 210 µmol/m²*s Weißlicht beleuchtet.

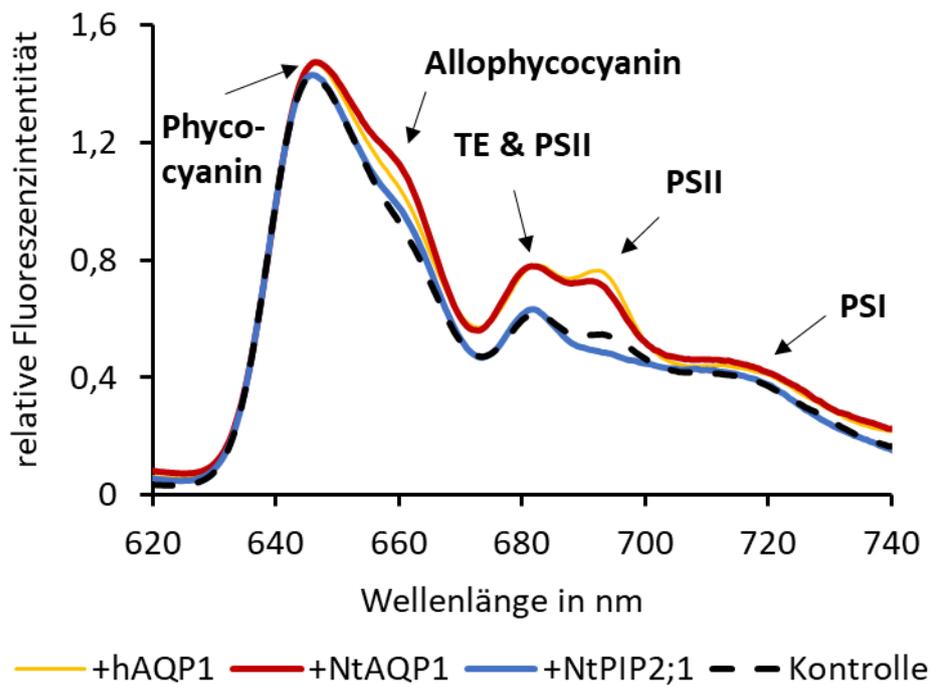


Abbildung 25: 77 K Fluoreszenzmessungen mit *Synechococcus sp.* PCC7002 Kontrollzellen und den Aquaporintransformanten (+hAQP1, +NtAQP1 und +NtPIP2;1) nach Anregung der Phycobilisome bei 550 nm

Die Messungen zeigen, dass nach Anregung der Phycobilisome die Fluoreszenz im Bereich der für PSII charakteristischen Wellenlängenmaxima (685 und 695 nm) bei +hAQP1 und +NtAQP1 tatsächlich erhöht und bei 695 nm für +NtPIP2;1 erniedrigt ist.

4 Diskussion

4.1 Erzeugung der cyanobakteriellen Aquaporintransformanten

Um die heterologe Aquaporinproduktion in den Cyanobakterien zu ermöglichen wurden zunächst geeignete Transformationsvektoren erzeugt. Dabei kam es aber trotz des durchgeführten Gelextraktionsschritts (siehe Abbildung 13) zu einer Verunreinigung der neu klonierten Plasmide mit dem Originalvektor pBK47 (siehe Tabelle 46). Vor der Gelextraktion war im Bereich von 5000-8000 bp nur eine sehr große, starke Bande im Agarosegel zu sehen. Die DNA-Banden des amplifizierten Vektors pBK47 ohne *gfp* (5587 bp) und des eingesetzten Originalplasmids pBK47 (6301 bp) sollten beide in diesem Bereich auf dem Agarosegel zu finden sein. Deshalb ist anzunehmen, dass hier beim Ausschneiden des Agarosegels auch linearisiertes Originalplasmid überführt wurde, das möglicherweise aufgrund der geringeren, aufgetragenen DNA-Menge im Agarosegel nach der Extraktion (insgesamt 60-80 ng nach photometrischer Konzentrationsabschätzung) nicht zu sehen war.

Ungeachtet dessen, konnten jedoch erfolgreich Kolonien identifiziert werden, welche die neuen Plasmide mit Aquaporin-cDNA enthielten (vgl. Abbildung 14). Durch die Wahl der Primer (einer auf dem Vektor, einer auf dem Insert) konnte bestätigt werden, dass die Plasmide aus dem kopierten Vektorrückgrad von pBK47 und der jeweiligen Aquaporin-cDNA bestehen und es sich nicht z.B. um das Originalplasmid handelt, von dem die Aquaporin-cDNA kopiert wurde (z.B. pET21a+_NtAQP1). Die Sequenzierung der neu generierten Plasmide zeigte allerdings für alle drei Konstrukte jeweils eine Basendeletion, die auf den Originalplasmiden nicht zu finden ist (vgl. Abbildung 15). Die in der PCR verwendete Polymerase weist eine äußerst hohe Zuverlässigkeit, Genauigkeit und Spezifität auf ([90]). Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass es in allen drei PCRs zu einer Basendeletion gekommen ist. Eventuell gab es hier Probleme bei der Sequenzierung. Der Bereich in dem die Basendeletion z.B. bei pBK47_NtPIP2;1 auftritt liegt in einer repetitiven Sequenz [AACC(C)AACCAAC] und sowohl für *ntpip2;1*, als auch *ntaqp1* ist die deletierte Base Teil einer kleinen Mononukleotidregion (CCC bzw. AAAA), welche zu Problemen bei der Sequenzierung führen kann. Das Chromatogramm weist allerdings keine Unstimmigkeiten an den entsprechenden Stellen auf. Dagegen spricht auch, dass es bei der Sequenzierung des gleichen DNA-Bereichs auf den Originalplasmiden keine Probleme gab. Es wäre aber z.B.

möglich, dass die Aquaporin-cDNAs mit Teilen des neuen Vektors pBK47 interagieren und dadurch eine für die Sequenzierung störende Sekundärstruktur entsteht. Auffällig ist auch, dass die Deletion bei allen drei Konstrukten immer das vierte Basentriplett nach Anfang oder vor Ende der cDNA betrifft. Bei haqp1 und ntaqp1 würde die Deletion zu einem stark verkürzten (50 bzw. 22 AS statt 269 bzw. 287 AS) und bei ntpip2;1 zu einem um 7 AS längeren Protein (291 statt 284 AS) führen. Dies würde sehr wahrscheinlich zu einem Funktionsverlust des jeweiligen Aquaporins führen. Da aber die Vermutung nahe lag, dass es sich hier nur um Unstimmigkeiten bei der Sequenzierung handelt, wurden die Plasmide trotzdem zur Transformation der Cyanobakterien eingesetzt. Die erfolgreiche Genomintegration konnte durch Amplifikation der Aquaporin-cDNA im genomischen DNA-Extrakt der entsprechenden Transformanten zunächst bestätigt werden (vgl. Abbildung 16). Auch auf RNA-Ebene war der Nachweis erfolgreich (siehe Abbildung 17). Die Analyse des Transkriptniveaus der neu eingebrachten Aquaporin-DNA mittels qPCR zeigt, dass diese auch in RNA umgeschrieben wird. Die hohen Transkriptmengen lassen z.B. aufgrund von möglichen prä- und posttranslationalen Regulationen allerdings nicht direkt auf eine ebenso hohe Proteinproduktion schließen. Mehrere Versuche die (Menge der) gebildeten Aquaporine mit einem Immunoassay auf Protein-Ebene nachzuweisen blieben allerdings erfolglos. Bei Verwendung des Anti-NtAQP1 Antikörpers konnte in den entsprechenden Proteingemischen aus transgenen Cyanobakterien und Hefen (Kontrolle) zwar ein Protein mit einer Größe von ca. 30 kDa (entspricht der Größe des NtAQP1-Monomers) nachgewiesen werden, allerdings war dies auch im Ursprungstamm und der GFP produzierenden Transformante möglich, welche kein NtAQP1 produzieren sollten (vgl. Abbildung 18). Nur in unveränderten Hefezellen konnte kein Protein detektiert werden. *Synechococcus sp.* PCC7002 besitzt bereits ein endogenes Aquaporin (SsAQP Z, NCBI Datenbank: ACB00406.1), welches ca. 26 kDa groß sein sollte. Eventuell erkennt der verwendete Antikörper auch SsAQP Z als Antigen. Der verwendete Primärantikörper ist aber gegen den ins Zytoplasma zeigenden N-Terminus von NtAQP1 gerichtet, welcher sich in der Aminosäure-Sequenzabfolge von SsAQP Z unterscheidet. Vielleicht wurde hier auch insgesamt zu viel Protein auf die Membran aufgetragen, sodass es zu unspezifischen Bindungen des Antikörpers kommt. Dagegen spricht aber, dass im Proteinextrakt aus Hefen ohne NtAQP1, für das nach der Silberfärbung auch eine

hohe Gesamtproteinmenge zu beobachten ist, keine unspezifische Proteindetektion stattfindet.

Für NtPIP2;1 und hAQP1 konnten im Gegensatz dazu durch die verwendeten spezifischen Anti-Aquaporin-Primär-Antikörper überhaupt keine Proteine auf der PVDF-Membran detektiert werden. Dass die direkt auf der PVDF-Membran gebundenen Primärantikörper aber über sekundäre Antikörper bzw. Chemilumineszenz detektiert werden konnten, deutet darauf hin, dass zumindest das Detektionssystem an sich noch funktionsfähig war. Es wäre aber möglich, dass der Primärantikörper aufgrund einer putativ veränderten Proteinstruktur der Aquaporine (vergleiche bei Sequenzierung entdeckte Basendeletionen) nicht mehr spezifisch binden konnte. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit hierfür eher gering, da die Detektion eines nachträglich an die Aquaporine angefügten His-Tags im Proteinextrakt aus Stellarzellen zu Chemilumineszenzbanden in der erwarteten, ungefähren Größe führte (siehe Abbildung 19). Da die cDNA der Aquaporine für die Klonierung der neuen Plasmide von den zuvor klonierten Aquaporintransformationsvektoren kopiert wurde, deutet dies darauf hin, dass die bei der Sequenzierung identifizierten Deletionen eher Sequenzierfehler waren. Ansonsten würde aufgrund der Leserasterverschiebung für NtAQP1 und hAQP1 z.B. nur ein 2-5 kDa großes Proteinfragment entstehen. Zumindest in den Stellarzellen werden aber Aquaporinmonomere in der erwarteten Größe (ca. 30 kDa) gebildet. Nach Integration der Aquaporin-cDNA mit der His-Tag-Sequenz in das Genom von *Synechococcus sp.* PCC7002 blieb der Nachweis der His-getagten Aquaporine trotzdem erfolglos. Eventuell war auch die Membranproteinsolubilisierung der Proben aus *Synechococcus sp.* PCC7002 nicht erfolgreich, sodass sich (auch schon bei der Verwendung aquaporinspezifischer Antikörper) keine oder nur wenige Membranproteine bzw. detektierbare Aquaporine im Proteingemisch befanden.

Der Erfolg der Membranproteinsolubilisierung hätte z.B. durch Immunoassays mit anderen bekannten Membranproteinen weiter überprüft werden können. Stattdessen wurde aber auf Funktions-Ebene untersucht, ob die Produktion der Aquaporine in den Cyanobakterien Auswirkungen auf die Zellphysiologie bzw. vor allem die Fotosyntheseleistung und das Wachstum hat. Diese würden die tatsächliche Produktion der Aquaporine ebenfalls belegen.

4.2 Auswirkungen der heterologen Aquaporinproduktion auf das Wachstum von *Synechococcus sp. PCC7002*

Wie sich ein möglicherweise verbesserter CO₂-Fluss in die Zelle auf das Wachstum auswirkt wurde in Wachstumsversuchen analysiert. Weder für die Verdopplungsrate noch Biomassezunahme, Zellzahl/ml oder den Chlorophyll a Gehalt konnten Unterschiede zwischen den Zelllinien im exponentiellen Wachstumsbereich gefunden werden (vgl. Abbildung 21, Tabelle 47, Tabelle 48 und Tabelle 49). Hierfür wurden die Zellen einmal mit CO₂ reicher und einmal mit Luft mit atmosphärischen CO₂-Konzentrationen (0,04%) begast. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass mögliche Effekte der neu eingebrachten Aquaporine auf das Wachstum nur bei bestimmten externen CO₂-Konzentrationen auftreten. Die Wachstumsversuche wurden bei 250 µmol/m²*s durchgeführt, also bei Beleuchtungsstärken im lichtlimitierten Bereich der Fotosynthese. Hier ist die O₂-Produktionsrate bzw. PSII-Effizienz in +hAQP1 und +NtAQP1 nachweislich erhöht (siehe Abbildung 23 und Abbildung 25) und könnte zu erhöhten CO₂-Fixierungsraten führen. Aus der dadurch erhöhten, gespeicherten Energiemenge könnte auch ein verbessertes Wachstum der Zellen resultieren. Nach Überexpression der Bicarbonat-Transporter war eine erhöhte Biomasseproduktion bereits zu beobachten [70, 91].

Für die Aquaporintransformanten war dies jedoch nicht der Fall. Wenn die CO₂-Fixierungsraten hier tatsächlich erhöht sind, könnte es auch sein, dass die gewonnene Energie statt für das Wachstum in alternative Prozesse z.B. zur vermehrten Aminosäuresynthese gesteckt wird, um die Produktion der zusätzlichen Aquaporine zu ermöglichen.

Die Manipulation oder Deletion von CO₂-„Uptake“-Komplexen führte in mehreren Studien bereits zu einer Beeinträchtigung der Wachstumsrate [45, 92]. Die Zellen benötigten dann zum Wachsen eine hohe CO₂-Konzentration oder wuchsen z.B. nur unter Bedingungen, bei denen HCO₃⁻ der Haupt-C_i-Aufnahmeweg war, ähnlich schnell wie der Ursprungstamm. Durch den Einbau des wasserdurchlässigen Aquaporins NtPIP2;1 in die Cyanobakterien wird der CO₂-Fluss über die Zellmembran beeinträchtigt, was negative Auswirkungen auf die Umsetzungsrate der CO₂-„Uptake“-Komplexe hat. In +NtPIP2;1 konnten aber keine negativen Effekte auf das Wachstum beobachtet werden.

4.3 Unveränderte Regulation des CCMs in den Aquaporintransformanten

Unterschiedliche CO₂-Verfügbarkeit führt in Cyanobakterien, wie bereits erwähnt, auch zu einer Regulation des CCMs. Bereits bei externen CO₂-Konzentrationen \geq ca. 0,04 % CO₂ konnte eine Runterregulierung der induzierbaren CCM-Gene beobachtet werden [34]. Die Zellen wurden für die Versuche aber standardmäßig mit einer noch höheren CO₂-Konzentration (1% CO₂) begast, sodass der CO₂-Einstrom in die Zelle hoch sein sollte.

Die Integration von NtPIP2;1 hat jedoch einen gegenteiligen Einfluss auf den CO₂-abhängigen C_i-Einstrom. Eine insgesamt geringere C_i-Verfügbarkeit in der Zelle wäre denkbar. Diese könnte zur Induktion der induzierbaren hochaffinen CCM-Komplexe führen, die eine effizientere C_i-Aufnahme gewährleisten. Normalerweise geschieht dies vor allem bei niedrigen externen C_i-Konzentrationen <0,04 % CO₂. Die C_i-Konzentration wird dabei hauptsächlich intrazellulär über sekundäre Botenstoffe (z.B. cAMP oder c-di-AMP), die Konzentration von NADP⁺, Produkten des Calvin-Zyklus (3-PG, 2-PG und RuBP) oder des TCA-Zyklus (2-OG) erkannt, die dann Regulatoren der induzierbaren CCM-Komponenten, wie NdhR (CcmR), CmpR, Sbtb oder cyABrB2, hemmen oder aktivieren [73, 93-96]. Die Induktion wird durch die Folgen einer erniedrigten internen CO₂-Verfügbarkeit ausgelöst. Da die Zellen mit 1% CO₂ begast wurden, war für die Kontrolle und die beiden CO₂-durchlässigen Aquaporintransformanten +NtAQP1 und +hAQP1 keine Regulation des CCM zu erwarten, während sie für +NtPIP2.1 aber denkbar wäre. Allerdings konnten hier keine erhöhten Transkriptlevel für +NtPIP2;1 detektiert werden (vgl. Abbildung 20). Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass die schlechtere CO₂-Verfügbarkeit in +NtPIP2;1 zwar z.B. leichte Auswirkungen auf die „Phycobilisome state transition“ hat (siehe Abbildung 25), der Unterschied im Gesamt-C_i-Gehalt zum Ursprungsstamm allerdings nicht so gravierend ist, dass hier insgesamt ein C_i-Mangel von der Zelle detektiert bzw. die CO₂-Fixierungsrate oder das Wachstum (siehe Abbildung 21) beeinträchtigt wird.

Die Expressionsniveaus für bicA und ndhF3 waren in den Zelllinien +hAQP1 und +NtAQP1 hingegen teilweise signifikant unterschiedlich, allerdings wiesen die Zelllinien mit den beiden CO₂-durchlässigen Aquaporinen dabei gegensätzliche Niveaurichtungen auf. In +NtAQP1 nahm das Transkriptniveau für bicA z.B. ab, während es in +hAQP1 anstieg. Da sich die Änderungen des Transkriptlevels im Bereich von ca. 0,7-1,5x befanden und aufgrund der

gegensätzlichen Entwicklungen bei den zwei ähnlichen Zelllinien, wurden die Unterschiede eher als Fluktuationen angesehen.

4.4 CO₂-Durchlässigkeit des endogenen Aquaporins und Effekte der heterologen Aquaporinexpression auf dieses

Eingebaut in künstliche Membranen konnte für hAQP1 und NtAQP1 kein Unterschied im CO₂-Fluss der Proteine festgestellt werden [17]. Hier wurden vergleichbare Mengen von zellfrei exprimierten Aquaporinproteinen in CO₂-dichte künstliche Membranen eingebaut und der CO₂-Fluss durch die Membran mit einer pH-Mikroelektrode gemessen. Homotetramere der beiden Aquaporine scheinen also *in vitro* eine vergleichbare CO₂-Durchlässigkeit aufzuweisen. In den Cyanobakterien war im lichtlimitierten Bereich für +hAQP1 eine deutlich erhöhte O₂-Produktionsrate zu sehen, während für +NtAQP1 nur eine Tendenz festzustellen war. Ob dies an unterschiedlich hohen Aquaporinkonzentrationen in den beiden Zelllinien liegt, kann nicht belegt werden, da die Proteinkonzentration der in *Synechococcus sp.* PCC7002 eingebrachten Aquaporine nicht überprüft werden konnte. Deshalb ist unklar, ob aus den ähnlichen Transkriptmengen eine vergleichbare oder unterschiedliche Menge an Protein entstanden ist. Es ist zudem auch denkbar, dass die CO₂-Permeabilität der Aquaporine anderweitig beeinträchtigt bzw. verändert wird, z.B. durch die Bildung von Heterotetrameren. Otto et al. (2010) wiesen bereits nach, dass mit zunehmender Anzahl des CO₂-durchlässigen Aquaporins NtAQP1 in einem Heterotetramer-Komplex mit dem H₂O-durchlässigen Aquaporin NtPIP2;1 die CO₂-Durchlässigkeit des Tetramers zunimmt [97]. Es ist nicht bekannt, ob das in *Synechococcus sp.* PCC7002 vorhandene endogene Aquaporin SsAQP Z CO₂-durchlässig ist oder nicht. Eine Heterotetramerbildung mit SsAQP Z wäre in den transgenen Cyanobakterien aber denkbar und könnte in jedem Fall zu einer Regulation der CO₂-Durchlässigkeit des Heterotetramers führen. Es wurde bisher auch nicht untersucht, ob andere CO₂-permeable Aquaporine in Kombination mit (nicht) CO₂-permeablen Aquaporinen zu unterschiedlichen CO₂-Permeabilitäten des Heterotetramers führen. So könnte die Heterotetramerbildung von hAQP1 oder NtAQP1 mit SsAQP Z, selbst bei gleicher Anzahl der jeweiligen heterolog produzierten CO₂-permeablen Aquaporine im Tetramer, zu unterschiedlichen CO₂-Permeabilitäten führen. Auch die Tendenz der verschiedenen Aquaporine, sich mit anderen Aquaporinen zu Heterotetrameren zusammenschließen, könnte in natürlichen Systemen

unterschiedlich sein und auch von den Konzentrationsverhältnissen abhängen. All dies könnte dazu führen, dass die CO₂-Durchlässigkeit der Cyanobakterienmembran auch bei gleichen Proteinkonzentrationen von hAQP1 und NtAQP1 in den Zellen insgesamt unterschiedlich ist und vice versa. Im Gegensatz dazu könnte die Heterotetramerbildung des wasserleitenden Aquaporins NtPIP2;1 mit SsAQP Z zu einer Verringerung der CO₂-Durchlässigkeit des Tetramers führen, wenn SsAQP Z CO₂-durchlässig wäre, was ebenfalls zu einer geringeren O₂-Produktionsrate beitragen würde.

Wie genau CO₂ durch ein Aquaporin diffundiert ist nicht bekannt. Die CO₂ Moleküle könnten entweder durch die zentrale Pore diffundieren, die sich durch Zusammenschluss der Aquaporintetramere bildet oder über die jeweilige Monomerpore CO₂-durchlässiger Aquaporine in die Zelle gelangen [7, 11]. In beiden Fällen hätte die Heterotetramerbildung Auswirkungen auf die CO₂-Durchlässigkeit des Komplexes.

Das Transkriptniveau von *ssaqpZ* in den Transformanten war im Vergleich zur Kontrolle unverändert (Abbildung 20). Daher kann zumindest davon ausgegangen werden, dass die unterschiedlichen O₂-Produktionsraten nicht auf eine einfache Manipulation der Menge des endogenen Aquaporins (auf Transkriptionsebene) zurückzuführen sind.

4.5 Effekte der heterologen Aquaporinproduktion auf die Fotosyntheseleistung von *Synechococcus sp. PCC7002* im lichtlimitierten Bereich

Die O₂-Produktion der Zelle gibt Aufschluss über die (Brutto-)Fotosyntheserate. Denn durch die Spaltung von Wasser am PSII zur Gewinnung von Elektronen für die Transportkette entsteht im Zuge der Fotosynthese O₂. Da in gewissem Maße aber stetig O₂ z.B. bei der Zellatmung wieder verbraucht wird, kann hier nur der Netto-O₂-Gewinn gemessen werden. Dieser nimmt, wie auch in Abbildung 23 zu sehen ist, bei steigender Beleuchtungsintensität zunächst zu (lichtlimitierter Bereich) und erreicht dann ab ca. 510 μmol/m²*s eine Sättigung (CO₂-limitierter bzw. lichtgesättigter Bereich).

Ohne Licht und folglich auch unter Ausschluss der Fotosynthese ist die (negative) Netto-O₂-Produktionsrate in allen Zelllinien noch gleich (vgl. Tabelle 50). Das deutet darauf hin, dass der O₂-Verbrauch durch die „normale“ Zellatmung in allen Zelllinien ähnlich ist. Den Lichtkompensationspunkt – an dem die O₂-Produktion durch Fotosynthese den Verbrauch bei der Atmung überwiegt – erreichen die Kontrollzellen und die von +hAQP1 und +NtAQP1 im

Gegensatz zur Transformante mit dem wasserdurchlässigen Aquaporin (+NtPIP2;1) bereits bei einer Beleuchtungsstärke unter $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ Weißlicht. In den beiden Transformanten mit CO_2 -durchlässigen Aquaporinen (+hAQP1 und +NtAQP1) steigt die Netto- O_2 -Produktionsrate dann zwischen $190\text{-}510 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ stärker an als für die Kontrolle bzw. +NtPIP2;1. Wobei sich zwischen +NtAQP1 und der Kontrolle im lichtlimitierten Bereich nur eine Tendenz (12-27 % höhere Raten), aber keine signifikanten Unterschiede zeigen ($p \geq 0,087$). Da in vivo und in vitro bereits gezeigt wurde, dass hAQP1 und NtAQP1 den CO_2 -Transport über Membranen verbessern, NtPIP2;1 allerdings nicht ([19]; [14]; [17]), liegt die Vermutung nahe, dass die erhöhten O_2 -Produktionsraten bzw. Tendenzen das Resultat eines erleichterten CO_2 -Flusses über die Membranen der transgenen Cyanobakterien sind. Generell lassen erhöhte O_2 -Produktionsraten auch auf eine verbesserte PSII-Effizienz und Fotosyntheserate allgemein schließen [98]. Wodurch diese erhöhte PSII-Effizienz zu Stande kommt, könnte folgende Hypothese erklären:

Durch linearen Elektronentransport (LET) über das PSII entsteht reduziertes Ferredoxin (vgl. Abbildung 26). Dieses kann z.B. zur Herstellung des im Calvin-Zyklus benötigten Reduktionsequivalents NADPH genutzt werden. Aber auch für die Umwandlung von CO_2 zu HCO_3^- am CO_2 -„Uptake“-Komplex wird reduziertes Ferredoxin benötigt.

Es wird angenommen, dass dieses als Elektronendonator sein Elektron über ein Fe-S Cluster an Plastochinon überträgt, welches ebenfalls an den CO_2 -„Uptake“-Komplex bindet [99]. Durch das Redoxsignal von Plastochinol wird wahrscheinlich die Protonierungs- und Deprotonierungskaskade verschiedener anderer Untereinheiten, darunter auch NdhD3/4 ausgelöst. Dadurch würde H^+ zur späteren ATP-Gewinnung über die Membran transloziert [46]). Nachdem es schon vielfach vermutet wurde fanden Han et al. (2017) heraus, dass NdhD3 und NdhD4 tatsächlich als Protonenpumpe fungieren [45]. Simulationen und Strukturanalysen von Schuller et al. (2020) mit Ndh1-MS-Komplexen aus *Thermosynechococcus elongatus* lassen vermuten, dass gleichzeitig CO_2 in die CO_2 -Bindetasche des Enzyms eintritt, die aus CupA/B und NdhF gebildet wird. Ähnlich wie bei Carboanhydrasen komplexiert CupA/B ein Zn^{2+} -Ion, über welches auch H_2O in der Reaktionstasche gehalten wird. Dieses Wassermolekül gibt über einen Protonenakzeptor der NdhF-Untereinheit ein Proton ab und das dabei entstehende OH^- -Radikal kann dann über nucleophile Addition das Kohlenstoffdioxidmolekül angreifen. Dabei wird es zu HCO_3^-

hydratisiert. Pro hydriertem CO₂ würden dabei mind. 3 H⁺-Ionen über die Thylakoidmembran gepumpt [46]. Die Untersuchungen mit Hilfe der Kryo-Elektronenmikroskopie zeigten auch, dass die Cup-Untereinheiten der Ndh1-Komplexe ins Cytoplasma ragen. Es ist deshalb anzunehmen, dass die Umwandlung von CO₂ zu Bicarbonat auf Seiten des Cytoplasmas stattfindet. Die dabei freiwerdenden H⁺-Ionen werden dann wahrscheinlich durch die Protonentranslokation der Ndh1-Untereinheiten ins Lumen direkt wieder eingefangen, wodurch die Rückreaktion von HCO₃⁻ zu CO₂ weitestgehend verhindert werden würde.

Weder für den LET noch bei der Umwandlung von CO₂ genutzte und folglich überschüssige Elektronen werden vor allem durch zyklischen Elektronentransport (CET) über PSI recycelt. Durch den Einbau CO₂-durchlässiger Aquaporine in die Zellmembran, wie bei +hAQP1 und +NtAQP1 gelangt CO₂ besser in die Zelle und für die Umwandlung wird folglich mehr reduziertes Ferredoxin benötigt. Die Rate CETs zum Recyclen überschüssiger Elektronen sinkt. Dadurch akkumuliert auch weniger reduziertes Plastochinol am Cyt-b₆f-Komplex (vgl. Abbildung 26). Der Redoxstatus des Plastochinolpools ist nachweislich der Auslöser für sogenannte „Phycobilisome state transitions“ ([100]). Bei einem oxidierten Plastochinolpool, wie es hier der Fall wäre, würde eine „state transition“ der Phycobilisomen zu „state 1“ vom PSI zu PSII ausgelöst. Dadurch wird die von den Phycobilisomen aufgefangene Lichtenergie vermehrt an das PSII weitergeleitet und dessen Effizienz erhöht. Um die aufgestellte Hypothese zu beweisen, wurde die Energieweiterleitung der Phycobilisome an die Fotosysteme mit Hilfe von 77K Fluoreszenzmessungen analysiert (vgl. Abbildung 25). Dadurch konnte tatsächlich bestätigt werden, dass in +hAQP1 und +NtAQP1 nach Anregung der Phycobilisomen mehr Energie an das PSII weitergeleitet wird. Dadurch entsteht mehr O₂ am PSII, was die gemessenen, erhöhten O₂-Produktionsraten im lichtlimitierten Bereich der Fotosynthese bei +hAQP1 und +NtAQP1 erklärt.

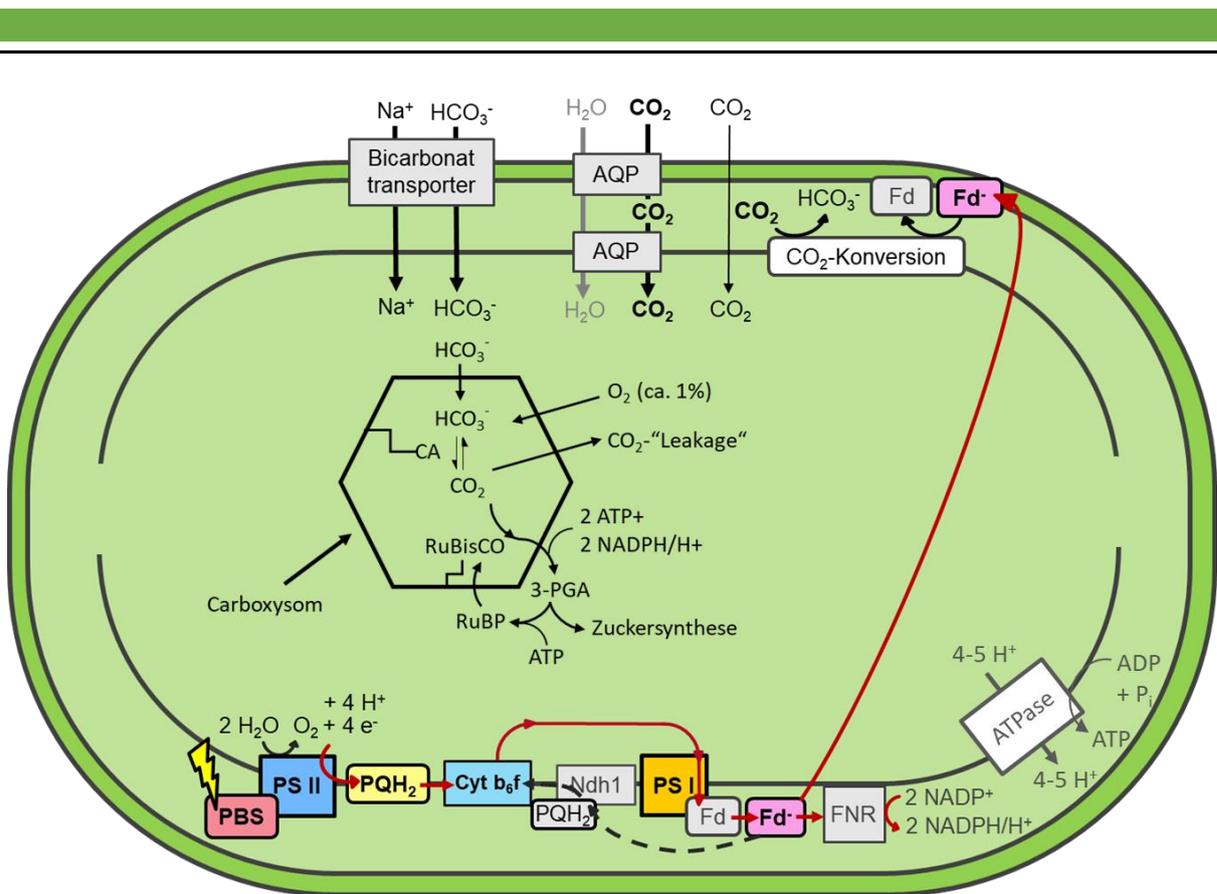


Abbildung 26: Übersicht des Ablaufs der Photosynthese und der C_i -Aufnahme in +hAQP1 und +NtAQP1

Mit roten Pfeilen ist der Weg eines am PSII gewonnenen Elektrons im linearen Elektronentransportweg markiert. Nach Übertragung des Elektrons auf Ferredoxin (Fd-) kann dieses z.B. zur Erzeugung von NADPH für den Calvin-Zyklus und zur Umwandlung von CO_2 zu HCO_3^- genutzt werden oder durch zyklischen Elektronentransport (gestrichelte Pfeile) recycelt werden. Da in +hAQP1 und +NtAQP1 die CO_2 -Diffusion über die Membran durch den Einbau CO_2 -durchlässiger Aquaporine erhöht ist, wird mehr CO_2 umgewandelt. Die rot markierten Wege werden favorisiert und verändern den Redoxzustand des Plastochinolpools (PQH_2 -Menge). Dadurch wird eine „Phycobilisome state transition“ ausgelöst, sodass Lichtenergie von den Phycobilisomen (PBS) hauptsächlich ans PSII und weniger ans PSI abgegeben wird.

Im Gegensatz dazu konnte in +NtPIP2;1 im lichtlimitierten Bereich der Photosynthese eine erniedrigte O_2 -Produktionsrate festgestellt werden. Hier wurde ein nachweislich wasserdurchlässiges Aquaporin in die Zelle eingebracht [14, 17]. Der Lichtkompensationspunkt wurde signifikant später erreicht, als bei den anderen Zelllinien (vgl. Tabelle 50). In *Synechococcus* UTEX625 wird der Lichtkompensationspunkt zwischen 100 und 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ erreicht [91]. In +NtPIP2;1 wird dieser zwischen 100 und 190 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ erreicht und sollte damit immer noch im „normalen“ Bereich für die Photosyntheseleistung liegen, sodass nicht davon ausgegangen werden muss, dass die Zellen in der Photosynthese sehr stark beeinträchtigt sind.

Die Verschiebung des Lichtkompensationspunkts hin zu einer höheren Beleuchtungsstärke lässt sich folgendermaßen erklären: Alle drei Aquaporine werden in die Zellmembran eingebaut. Dadurch werden auch unbesetzte Stellen in der Membran besetzt, über die sonst CO₂ direkt diffundieren könnte. Bei +hAQP1 und +NtAQP1 wurden sie durch CO₂-durchlässige Proteinporen ersetzt. Die passive CO₂-Diffusion bleibt dadurch gleich oder wird sogar verbessert [14, 19]. In +NtPIP2;1 wird durch den Einbau der CO₂-impermeablen Aquaporine die CO₂-Durchlässigkeit der Membran verringert. Weniger CO₂ strömt in die Zelle und muss umgewandelt werden, wodurch der Verbrauch von reduziertem Ferredoxin sinkt. Dieses akkumuliert sich in der Zelle und wird über CET recycelt. Dadurch staut sich aber reduziertes Plastochinol am Cyt-b₆f-Komplex und der Redoxstatus des Plastochinolpools wird reduzierter. Das Redoxsignal löst eine „state transition“ zu „state 2“ vom PSII zum PSI aus, sodass weniger Energie von den Phycobilisomen ans PSII übertragen wird. Deswegen entsteht auch weniger O₂ am PSII und die O₂-Produktionsrate sinkt. Nach Auswertung der 77 K Fluoreszenzmessungen konnte eine Abnahme des für PSII charakteristischen Fluoreszenzmaximums bei 695 nm beobachtet werden, die dafürspricht, dass hier weniger Energie ans PSII weitergeleitet wird und dadurch auch weniger O₂ produziert wird.

Eigentlich würde man ebenfalls eine erhöhte Fluoreszenz bei für das PSI charakteristischen Absorptionsmaxima (ca. 715-740 nm) erwarten. Für *Synechococcus sp.* PCC7002 ist bei beide Zuständen der „state transition“ in verschiedenen Studien aber bereits entweder eine Abnahme, Zunahme oder gleichbleibende PSI Fluoreszenz beobachtet worden [101, 102], [103]. Die Gründe dafür sind nicht klar. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse wurden aber bereits verschiedene Modelle zur Phycobilisomen-Energieübertragung auch für ein und denselben Stamm vorgeschlagen [103]. Zum einen könnten die Phycobilisomen einfach auf der Thylakoidmembran von PSI zu PSII und umgekehrt wandern [75]. Dann wäre aber eine erhöhte PSI-Fluoreszenz für „state 2“ zu erwarten. Gleiches gilt für das Modell, bei dem die Phycobilisomen hauptsächlich mit dem PSII assoziiert sind und die Energieübertragung von den Phycobilisomen an PSI z.B. durch „energy spillover“ vom PSII erfolgt [101, 103]. Bei *Spirulina platensis* gibt es Hinweise darauf, dass die „state transitions“ auch eine Umverteilung bzw. Monomerisierung der Fotosysteme speziell PSI zur Folge haben [104], welche die Wahrscheinlichkeit des „spillovers“ verändern. Andere Studien merken an, dass die Phycobilisomen sich durch das Signal der „state transition“ zum PSI vielleicht einfach vom PSII

entkoppeln [103]. Dadurch würde die PSI charakteristische Fluoreszenz gleichbleiben, während sich die PSII charakteristische Fluoreszenz nach Anregung der Phycobilisome verändert. Warum für den gleichen Organismus unterschiedliche Verhaltensweisen für die PSI-charakteristische Fluoreszenz gemessen werden konnten bleibt unklar. Die erhöhte bzw. erniedrigte Fluoreszenz im für PSII charakteristischen Absorptionsbereich sollte aber auch unabhängig davon einen Beweis für die jeweils vorliegende „state transition“ darstellen und die aufgestellten Hypothesen belegen.

Dadurch, dass der Chlorophyll a Gehalt in den Zelllinien unverändert ist (vgl. Abbildung 24), kann auch ausgeschlossen werden, dass in den Aquaporintransformanten unterschiedliche Gesamtmengen der hauptsächlich daraus bestehenden Fotosysteme vorhanden sind. Denn aus diesen könnten u.a. auch ungleiche Elektronentransport- bzw. Zuckersyntheseraten resultieren.

4.6 Hypothese zu den erhöhten O₂-Produktionsraten im lichtgesättigten Bereich der Fotosynthese

Die „state transitions“ allein erklären jedoch nicht, warum im lichtgesättigten Bereich der Fotosynthese, wenn genügend Photonenenergie zur Anregung aller Fotosysteme und Phycobilisome zur Verfügung steht, die maximalen Netto-O₂-Produktionsraten von +hAQP1 und +NtAQP1 im Vergleich zur Kontrolle und +NtPIP2;1 um ca. 15-20 % erhöht sind.

Wenn alle Fotosysteme ausreichend mit Lichtenergie versorgt werden können, sollte in allen Zelllinien eine vergleichbare maximale Menge O₂ produziert bzw. Elektronen weitergeleitet werden. Dadurch würde auch die maximale Produktionsrate des Reduktionsequivalents NADPH erreicht. Mit einer zeitlichen Dauer von wenigen Sekunden [78] ist dann nicht mehr wie im lichtlimitierten Bereich der Fotosynthese die Gewinnung der Reduktionsequivalente (=Lichtreaktion) der limitierende Schritt der Fotosynthese, sondern der Calvin-Zyklus (CBBC). Dieser benötigt ca. 100 s zur Zuckersynthese [78]. Wenn sich das Reduktionsequivalent NADPH jedoch z.B. dadurch anhäuft, kann es in Kontakt mit O₂ zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kommen [105]. Diese verursachen oxidativen Stress für die Zelle. Um dies zu verhindern, gibt es einige Regulationswege, welche die O₂-Konzentration reduzieren und/oder die Menge ungenutzter Reduktionsequivalente geringhalten: Wie bereits erwähnt, unterdrückt die „state transition“ von PSII zu PSI in der lichtlimitierten Phase der Fotosynthese

durch vermehrten CET die Erzeugung von mehr Reduktionsequivalenten. Auch der CO₂-„uptake“-Komplex kann regulierend wirken. Auch hier wird reduziertes Ferredoxin genutzt und damit das Cosubstrat für die Erzeugung von NADPH verbraucht. Bei +NtAQP1 und +hAQP1 verringert die verbesserte CO₂-Aufnahmerate durch die Umwandlung zu HCO₃⁻ die Menge an ungenutzten Reduktionsequivalenten und kann dadurch bereits die Entstehung von ROS verhindern. Überschüssige Photonenenergie kann außerdem auch direkt von den Phycobilisomen oder Fotosystemen z.B. in Form von Chlorophyll-Fluoreszenz oder nicht-photochemischem Quenching (z.B. über „orange Carotinoid“-Proteine) abgeführt werden. Zusätzlich dazu gibt es aber auch noch mehrere andere, teilweise O₂-abhängige, alternative Elektronenflusswege (AEF). In der Atmungskette übertragen Succinat-Dehydrogenasen (SDH) und Ndh I- und 2A-ähnliche Komplexe Elektronen auf Plastochinon [106]. Diese Elektronen stammen jeweils von Succinat, FNR oder NADPH. Da die Komplexe der Atmungskette und der Fotosysteme beide in der Thylakoidmembran zu finden sind und sich Komplexe wie Cytb6f teilen, kann es bei räumlicher Nähe auch zum „spill over“ der Elektronen von z.B. PSI auf terminale Oxidasen der Atmungskette wie der Cytochrom-c-Oxidase (COX) oder der bd-Chinol-Oxidase (Cyd) und umgekehrt kommen [107]. Dabei werden O₂ und H⁺ verbraucht, um H₂O zu produzieren. Dieser Prozess wurde insbesondere beim Wechsel von Dunkel zu Hochlichtbedingungen beobachtet [108, 109]. Liu et al. (2012) zeigten, dass bei einem eher reduzierten Plastochinolpool die Ndh-1 Komplexe gleichmäßiger in der Membran verteilt vorliegen, wodurch der „spill over“ wahrscheinlicher wird als bei einem oxidierten Plastochinolpool, da sich die an der Atmung beteiligten Komplexe dann eher zu „Clustern“ zusammenlagern [107]. In Dunkelheit (durch die Zellatmung) und bei hohen Lichtintensitäten wird der Plastochinolpool in den Cyanobakterien generell eher reduzierter [110, 111], da sich aufgrund der im Vergleich zur Lichtreaktion langsamer ablaufenden CO₂-Fixierung mehr der beim Elektronentransport bereitgestellten Energie anhäuft.

Bei der Aufnahme der Licht-Dosis-Antwort-Kurven in Abbildung 23 wurden die Zellen vor der Beleuchtung immer dunkel inkubiert und dann das Licht mit einer bestimmten Intensität angeschaltet. Der alternative O₂-abhängige Elektronenflussweg über COX könnte also gerade in der Kontrolle und +NtPIP2;1 dazu geführt haben, dass bei hohen, sättigenden Lichtbedingungen, die Netto-O₂-Produktion verringert wurde. Bei +NtAQP1 und +hAQP1 wäre dies nicht nötig, da hier bereits durch die aufgrund des verbesserten CO₂-Flusses erhöhte

Umwandlung von CO₂ eine Ansammlung der Reduktionsequivalente unterbunden und der Plastochinolpool oxidiert wird.

Neben COX kann auch der Hydrogenasekomplex (HOX) Elektronen von FNR einfangen und zur Produktion von H₂ nutzen [105]. Desweiteren können auch die Flavodiirone 1/3 in einer mehlerähnlichen Reaktion O₂ zu H₂O reduzieren und die Mehler-Reaktion selbst kann am PSI stattfinden [105]. Alle diese Reaktionen könnten ebenfalls zur Verringerung der O₂-Produktion bei den Kontrollzellen und +NtPIP2;1 beigetragen haben.

Im CO₂-limitierten Bereich der Fotosynthese, d.h. unter lichtgesättigten Bedingungen, konnten Shimakava et al. (2016) in *Synechococcus sp.* PCC7002 bereits einen alternativen O₂-abhängigen Elektronenfluss (AEF) nicht nur bei niedrigen, sondern auch bei Konzentrationen von 0,04% CO₂ im Medium beobachten [105]. Und dies sogar unabhängig von der O₂-Konzentration in der Umgebung. Auch Allahverdiyeva et al. (2011) beobachteten, allerdings für *Synechocystis* bereits bei 0,04% CO₂ eine O₂-Reduktion durch AEF um ca. 20% [112]. Bei niedrigeren CO₂-Konzentrationen stieg der Anteil von AEF auf bis zu 60%. In *Synechococcus sp.* PCC7002 waren die maximalen Netto-O₂-Produktionsraten für +hAQP1 und +NtAQP1 15-20% höher als die von +NtPIP2;1 und der Kontrolle. AEF könnte ein Grund dafür sein. Für +hAQP1 und +NtAQP1 werden eventuell keine per se höheren maximalen O₂-Produktionsraten erreicht, sondern nur weniger des gebildeten Sauerstoffs reduziert.

Es gibt aber z.B. auch Hinweise darauf, dass bei einem stark reduzierten Plastochinolpool der CO₂-„Uptake“-Komplex zur Re-oxidation entgegengesetzt seiner normalen Funktion Protonen aus dem Lumen pumpt. Die Rückreaktion von HCO₃⁻ zu CO₂ würde dann allerdings durch die erhöhte H⁺-Konzentration nahe der CO₂-Bindetasche begünstigt [46]. Die cryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen und die Simulation von Schuller et al. (2020) zeigten, dass die Untereinheit NdhF3 des CO₂-„Uptake“-Komplexes eine Art unpolaren Tunnel hin zur Zn²⁺ Bindestelle ausbildet, durch die CO₂ aus dem Lumen zur CO₂-Bindestelle des Ndh1-Komplexes gelangen kann. Aus den Carboxysomen ins Lumen austretendes CO₂ kann darüber zielgerichtet vom CO₂-„uptake“-Komplex eingefangen und schon vor der Diffusion über die Thylakoidmembran am Austreten aus der Zelle gehindert werden. Schuller et al (2020) nehmen aber an, dass dieser Tunnel bei einem stark reduzierten Plastochinolpool z.B. durch Konformationsänderung geschlossen wird, um die vermehrte Rückreaktion von Bicarbonat zu unterbinden [46]. Die Aufkonzentrierung von HCO₃⁻ würde sonst - wie z.B. auch bei

cytosolischen Carboanhydrasen - behindert. Durch die Blockierung wäre aber auch die CO₂-Umwandlung in allen Zelllinien eingeschränkt. Eventuell verhindert dann aber die verbesserte CO₂-Verfügbarkeit in +hAQP1 und +NtAQP1 selbst, durch die Oxidierung des Plastochinolpools die Blockierung der CO₂-„Uptake“ Komplexe. Eine andere Möglichkeit zur Erklärung der trotzdem höheren O₂-Produktionsraten in +hAQP1 und +NtAQP1 wäre, dass hier eventuell nur die Umwandlung von aus dem Lumen entfliehendem CO₂ durch die Blockierung des Tunnels verhindert wird, auf cytosolischer Seite in die Bindetasche eintretendes CO₂ aber z.B. weiterhin in Bicarbonat umgewandelt werden könnte.

4.7 Mögliche Auswirkung der erhöhten O₂-Produktionsraten auf die CO₂-Fixierungsrate

Ob die erhöhte Effektivität der Lichtreaktion auch in einer erhöhten CO₂-Fixierungsrate resultiert kann aus der Messung der Brutto-Fotosyntheseleistung allein nicht geschlossen werden. Eine erhöhte CO₂-Verfügbarkeit durch eine verbesserte CO₂ Diffusion über die Zellmembran könnte in den Aquaporintransformanten +hAQP1 und +NtAQP1 aber zu einer verbesserten RuBisCO:CO₂ Kinetik und damit CO₂-Fixierungsrate führen. Im lichtlimitierten Bereich der Fotosynthese sollten die bereitgestellten Reduktionsequivalente der limitierende Schritt für die CO₂-Fixierung sein. Durch die 77 K Fluoreszenzmessungen konnte bestätigt werden, dass im lichtlimitierten Bereich die PSII-Effizienz in +hAQP1 und +NtAQP1 erhöht war (siehe Abbildung 25). Wenn hier bei gleicher Beleuchtung durch die erhöhte PSII-Effizienz mehr Reduktionsequivalente produziert werden, könnte dies im Vergleich auch zu einer erhöhten CO₂-Fixierungsrate führen. Im lichtgesättigten bzw. CO₂-limitierten Bereich der Fotosynthese wird die CO₂-Fixierungsrate von der CO₂-Konzentration an der RuBisCO limitiert. Da die CO₂-Konzentration in den Carboxysomen auch bei niedrigen externen CO₂-Konzentrationen bereits hoch ist, ist es fraglich, ob eine verbesserte CO₂-Verfügbarkeit, die RuBisCO:CO₂-Kinetik noch weiter erhöhen kann. Dagegen spricht z.B., dass für CO₂-Fixierungsraten von Cyanobakterien bereits ab einer externen CO₂-Konzentration von 10-15 µM eine Sättigung beobachtet werden konnte [47].

Die verbesserte CO₂-Diffusion in die Zelle könnte aber dazu führen, dass die CO₂-Konzentration an RuBisCO-Enzymen, welche noch nicht mit den Hüllproteinen zu Carboxysomen assembliert sind, sich also „frei“ im Cytosol befinden, erhöht wird. Dadurch

könnte die CO₂-Fixierungsrate erhöht und die Fotorespirationsrate noch weiter verringert werden.

Es wäre aber auch möglich, dass in den Zellen ein noch unbekannter Regulationsmechanismus existiert, welcher z.B. bei erhöhter CO₂-Aufnahme den Bicarbonattransport in die Zelle herunterfährt und vice versa, sodass trotzdem vergleichbare Mengen an C_i in die Zelle transportiert werden. In den meisten Studien, die sich mit der Manipulation des C_i-Flusses in Cyanobakterien beschäftigen, wurde nur der Bicarbonattransport manipuliert und dann Bedingungen (z.B. ein stark alkalischer pH-Wert) gewählt, welche den CO₂-Fluss als C_i-Aufnahmeweg weitestgehend ausschließen [37, 70, 91]. Und auch Ding et al. 2013, die als eine der wenigen den CO₂-Fluss über ein putativ CO₂-durchlässiges Aquaporin in Cyanobakterien manipuliert haben, sorgten nur unter aziden Bedingungen für einen niedrigeren CO₂-Fluss in die Zelle [67]. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass unter "neutralen" Bedingungen, wenn beide C_i-Transportwege stattfinden können, der Gesamt-C_i-Fluss in die Zelle reguliert wird.

Weiterhin führt bei gleicher Menge auftreffender Photonen mehr LET in +hAQP1 und +NtAQP1 zwar zu mehr reduziertem Ferredoxin, aber mehr davon wird auch für die Umwandlung von CO₂ in Bicarbonat benötigt. Wenn der verbesserte CO₂-Fluss gleichzeitig auch die Verfügbarkeit von CO₂ in der Nähe der Rubisco verbessert und zu einer erhöhten RuBisCO:CO₂-Kinetik führt, wird zusätzlich auch mehr NADPH für den CBBC benötigt. Die Menge an Reduktionsäquivalenten für die erhöhte CO₂-Fixierung im CBBC steht dabei in direkter Konkurrenz zur Umwandlung des vermehrt in die Zelle einströmenden CO₂s selbst. Infolgedessen könnte die CO₂-Fixierungsrate bei den unterschiedlichen Transformanten und der Kontrolle trotzdem ähnlich hoch sein. Damit wäre auch die Menge an in Form von Zuckern gespeicherter Energie vergleichbar, was bei gleicher Beleuchtung zu einem ähnlichen Wachstum führen könnte, obwohl unterschiedliche Netto-O₂-Mengen produziert werden. Fotosyntheseeffizienz und Wachstum müssen also nicht immer miteinander korrelieren. Im lichtgesättigten Bereich entstammt die erhöhte Netto-O₂-Produktion wahrscheinlich sowieso nicht einer im Vergleich zur Kontrolle erhöhten PSII-Effizienz, sondern rührt daher, dass weniger O₂ über alternative Elektronentransportwege zum Schutz der Zelle verbraucht wird. Im lichtlimitierten Bereich der Fotosynthese gibt es aber folglich Argumente, die für eine erhöhte CO₂-Fixierungsrate sprechen. Auch eine durch die Transformation eventuell erhöhte

RuBisCO-Konzentration könnte z.B. zu einer erhöhten CO₂-Fixierungsrate führen. Ebenso wäre aber auch eine Beeinträchtigung der RuBisCO-Konzentration durch die Transformation möglich und könnte bei einer verbesserten CO₂-Verfügbarkeit, wie in +hAQP1 und +NtAQP1, zu einer mehr oder weniger gleichbleibenden CO₂-Fixierungsrate führen. Bei einer erhöhten Substratkonzentration (wie in +hAQP1 und +NtAQP1) wäre zum Erreichen der gleichen Umsetzungsgeschwindigkeit nach Michaelis-Menten z.B. eine niedrigere Enzymkonzentration ausreichend.

Die RuBisCO-Konzentration wurde in den Aquaporintransformanten allerdings zumindest nicht auf Transkriptionsebene reguliert, da das Expressionsniveau des Gens für die große RuBisCO-Untereinheit hier unverändert war (Abbildung 20). Eine Posttranskriptionelle Regulation wäre allerdings theoretisch möglich und würde zumindest bei einer Verringerung der RuBisCO-Konzentration auf eventuell gleichbleibende CO₂-Fixierungsraten schließen lassen und die möglicherweise dadurch unveränderten Wachstumsraten erklären.

4.8 Einfluss der Aquaporinlokalisierung auf die O₂-Produktionsrate

Im Folgenden wird auf die Auswirkungen einer Aquaporinlokalisierung in den Carboxysomen eingegangen. Hierzu müssen zunächst einige wichtige Punkte zu den Carboxysomen genannt werden: Durch die Verankerung von Carboanhydrase und RUBISCO mit der Carboxysomenschale wird sichergestellt, dass sich die beiden für eine effiziente CO₂-Fixierung wichtigen Enzyme hauptsächlich in den Carboxysomen befinden [50, 113]. Bereits 1989 erkannten Price und Badger, dass der Anteil der beiden Enzyme im Cytosol von der Zelle geringgehalten werden muss, da Carboanhydrasen z.B. durch ihre katalytische Funktion (bei der Gleichgewichtseinstellung) der Aufkonzentrierung von HCO₃⁻ im Cytosol entgegenwirken und dies auch Auswirkungen auf die CO₂-Konzentration in den Carboxysomen hat [114]. Wenn zusätzlich Carboanhydrasen im Cytosol aktiv waren oder die vollständige Carboxysomenbildung verhindert wurde, zeigten die Zellen einen erhöhten Bedarf an externem CO₂ um ähnliche Fotosyntheseraten wie unveränderte Zellen zu erreichen [54, 114, 115]. Unter sehr niedrigen externen CO₂-Konzentrationen wurde teilweise sogar das Wachstum eingestellt. Die Abschirmung der Carboanhydrase und RuBisCOs in den Carboxysomen macht eine C_i-Aufkonzentrierung im Cytosol überhaupt erst möglich und stellt

gleichzeitig eine hohe CO₂-Konzentration in der Nähe der RuBisCO und damit eine hohe CO₂-Fixierungsrate sicher.

Anders als bei Zellmembranen, über die CO₂ sehr leicht diffundieren kann, besteht die Hülle der Carboxysomen wie bereits erwähnt nicht aus einer Doppellipidschicht, sondern setzt sich rein aus Proteinen zusammen. Die proteinöse Carboxysomenhülle sorgt dabei dafür, dass CO₂ in den Carboxysomen gehalten wird und nicht passiv ins Cytosol ausströmt. Der Einbau von CO₂-Diffusion vermittelnden Aquaporinen in die Carboxysomenhülle würde genau dies hingegen ermöglichen und hätte ähnliche Folgen für die RuBisCO:CO₂ Kinetik wie cytosolische Carboanhydrasen. Die hohe cytosolische HCO₃⁻ Konzentration könnte zwar im Gegensatz dazu besser aufrechterhalten werden, da sich keine Carboanhydrasen im Cytosol befinden, allerdings wäre die Aufrechterhaltung des hohen CO₂-Partialdrucks in den Carboxysomen bzw. in der Nähe der Rubisco dadurch nicht mehr möglich und würde die CO₂ Fixierungsrate senken. Da die CO₂ Konzentration im Cytosol durch die CO₂-„Uptake“-Komplexe aktiv geringgehalten wird, würde in den Carboxysomen umgewandeltes CO₂ aufgrund des ins Cytosol gerichteten Partialdruckgradienten vermehrt (wegen der durch die Aquaporine stark erleichterten passiven CO₂ Diffusion) aus dem Carboxysom ins Lumen bzw. Cytosol zurückströmen. Dieses CO₂ müsste dann aufwendig von den CO₂-„Uptake“-Komplexen wieder in HCO₃⁻ umgewandelt bzw. eingefangen werden, bevor es zum CO₂-Ausstrom kommt. Da die CO₂ Konzentration an den CO₂-„Uptake“-Komplexen dadurch ebenfalls erhöht wäre und aufgrund der dadurch erhöhten Umsetzungsgeschwindigkeit mehr reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator benötigt werden würde, könnte auch dies der Grund für die gemessenen erhöhten O₂-Produktionsraten beim Einbau CO₂-vermittelnder Aquaporine in die Zelle sein. Aquaporine sind normalerweise in den Doppellipidschichten (Zellmembranen) der Zelle zu finden. Der Einbau von Aquaporinen in diese ist viel wahrscheinlicher, als in die dicht gepackte und gut strukturierte proteinöse Carboxysomenhülle. Da die Zerstörung von Carboxysomen in den meisten Fällen starke Auswirkungen auf das photoautotrophe Wachstum der Zelle hatte, diese aber beim Einbau der Aquaporine nicht zu sehen waren (siehe Abbildung 21), sollte dies zusätzlich darauf schließen lassen, dass der Einbau der Aquaporine nicht in die Carboxysomenhülle erfolgt. Denn dadurch würde die Funktion der Carboxysomen, als abgegrenzter Reaktionsort mit hoher CO₂-Konzentration für eine effektive RuBisCO:CO₂ Kinetik, ebenfalls zerstört.

Sowohl der Einbau der Aquaporine in die Carboxysomen als auch eine insgesamt erhöhte CO₂-„Uptake“-Rate als Erklärung für die erhöhten Netto-O₂-Produktionsraten in +hAQP1 und +NtAQP1 setzen aber voraus, dass die jeweiligen Aquaporine in den Cyanobakterien auch funktionsfähig produziert wurden und CO₂-durchlässig sind. Die Argumente sprechen aber insgesamt eher für die bereits nachgewiesenen „Phycobilisome state transitions“ bzw. die Hypothese zur verringerten O₂-Reduktion als Erklärung für die erhöhten Netto-O₂-Produktionsraten.

5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte belegt werden, dass der Einbau CO₂-durchlässiger Aquaporine auch in bereits CO₂-aufkonzentrierenden, einzelligen Cyanobakterien eine physiologische Relevanz hat. Die Brutto-Fotosyntheserate war hier erhöht. Dies lässt darauf schließen, dass die Fotosyntheserate auch in den Bicarbonat-aufkonzentrierenden Cyanobakterien durch die CO₂-Diffusion in die Zelle limitiert werden kann. Außerdem wurde durch die Versuche nochmals bestätigt, dass nicht nur NtAQP1 sondern auch das menschliche Aquaporin hAQP1 beim Einbau die CO₂-Durchlässigkeit einer Membran verbessert. Denn in den transgenen Zelllinien mit hAQP1 konnten ähnliche Effekte auf die Fotosynthese der Cyanobakterien beobachtet werden wie in den transgenen Zelllinien, welche NtAQP1 produzierten. Die dabei aufgrund der erhöhten CO₂-„Uptake“-Rate erhöhten O₂-Produktionsraten geben auch einen Hinweis darauf, dass in den Cyanobakterien nicht nur linearer Elektronentransport, sondern auch die CO₂-Umwandlung gegenüber dem zirkulären Elektronentransportweg favorisiert wird. Zusammenfassend lässt sich außerdem sagen, dass in den Cyanobakterien durch den Einbau CO₂-durchlässiger Aquaporine bei gleichen Kultivierungsbedingungen insgesamt mehr O₂ produziert wird als in unveränderten Zellen. Für die Industrie wären dies vor allem in Verbindung mit erhöhten CO₂-Fixierungsraten eventuell als CO₂-Kompensationsmaßnahme von Interesse. Die transgenen Zelllinien würden sich dann z.B. auch als „noch klimafreundlichere“ Produktionsplattform für z.B. heterolog produzierte Proteine anbieten. Wie sich die verbesserte CO₂-Verfügbarkeit in den Zellen aber auf die CO₂-Fixierungsrate auswirkt konnte noch nicht geklärt werden. Hierfür könnte man z.B. die Akkumulation des Energiespeichers Glykogen in den transgenen Cyanobakterien mit der unveränderter Zellen vergleichen. Gupta et al. (2020) konnten in Bicarbonat-Transporter überexprimierenden Cyanobakterien eine erhöhte Glycogenakkumulation feststellen [70]. Außerdem könnten Experimente mit radioaktiv markierten Kohlenstoff- oder Sauerstoffmolekülen durchgeführt werden (vgl. [11]). Sowohl radioaktiv „markiertes“ Bicarbonat und/oder CO₂ könnten hier der Zelle als C₁-Quelle zur Verfügung gestellt werden und die Menge der damit produzierten Zucker detektiert werden. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob in den transgenen Cyanobakterien mehr CO₂ fixiert wird.

Auch die Messung der CO₂-Aufnahmeraten z.B. mit einer Gaswechselanlage oder einer pH-Mikroelektrode (vgl. [17, 19]) könnten belegen, ob hier z.B. insgesamt erhöhte C_i-Transportraten zu finden sind. Aus den in der Diskussion bereits genannten Gründen kann die C_i-Transportrate in die Zelle allerdings nicht direkt Aufschluss über die CO₂-Fixierungsrate geben.

Außerdem wäre es empfehlenswert die CO₂-Durchlässigkeit des endogenen Aquaporins, z.B. durch Einbau in eine gasdichte Kunstmembran oder Überexpression in den Cyanobakterien, zu überprüfen.

Um abschließend nochmal zu Beweisen, dass ausschließlich die verbesserte CO₂-Diffusion in die Zelle für die erhöhten O₂-Produktionsraten verantwortlich ist, könnte außerdem der CO₂-“Uptake” in den transgenen Cyanobakterien z.B. mit Ethoxzolamid [116] ausgeschaltet werden. Wenn die O₂-Produktionsrate dann in allen Zelllinien wieder vergleichbar ist, belegt dies, dass die Aquaporinintegration der Grund für die erhöhten O₂-Produktionsraten in den transgenen Zellen ist.

6 Literaturverzeichnis

1. Agre, P., *Nobel Lecture. Aquaporin water channels*. Biosci Rep, 2004. **24**(3): p. 127-63.
2. Kruse, E., N. Uehlein, and R. Kaldenhoff, *The aquaporins*. Genome Biology, 2006. **7**(2): p. 206.
3. Jung, J.S., et al., *Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model*. J Biol Chem, 1994. **269**(20): p. 14648-54.
4. Gomes, D., et al., *Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2009. **1788**(6): p. 1213-1228.
5. Siefritz, F., et al., *The tobacco plasma membrane aquaporin NtAQP1*. Journal of Experimental Botany, 2001. **52**(363): p. 1953-1957.
6. de Groot, B.L. and H. Grubmüller, *Water Permeation Across Biological Membranes: Mechanism and Dynamics of Aquaporin-1 and GlpF*. Science, 2001. **294**(5550): p. 2353-2357.
7. Ozu, M., et al., *Aquaporins: More Than Functional Monomers in a Tetrameric Arrangement*. Cells, 2018. **7**(11).
8. Uehlein, N., et al., *The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions*. Nature, 2003. **425**(6959): p. 734-7.
9. Nakhoul, N.L., et al., *Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the CO₂ permeability of Xenopus oocytes*. Am J Physiol, 1998. **274**(2): p. C543-8.
10. Hibuse, T., et al., *Aquaporins and glycerol metabolism*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1758**(8): p. 1004-11.
11. Endeward, V., et al., *Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO₂ transport across the human erythrocyte membrane*. Faseb j, 2006. **20**(12): p. 1974-81.
12. Boron, W.F., et al., *Intrinsic CO₂ permeability of cell membranes and potential biological relevance of CO₂ channels*. Chemphyschem, 2011. **12**(5): p. 1017-9.
13. Missner, A., et al., *Carbon dioxide transport through membranes*. J Biol Chem, 2008. **283**(37): p. 25340-25347.

14. Kai, L. and R. Kaldenhoff, *A refined model of water and CO₂ membrane diffusion: Effects and contribution of sterols and proteins*. Scientific Reports, 2014. **4**(1): p. 6665.
15. Cooper, G.J., R. Occhipinti, and W.F. Boron, *CrossTalk proposal: Physiological CO₂ exchange can depend on membrane channels*. J Physiol, 2015. **593**(23): p. 5025-8.
16. Heckwolf, M., et al., *The Arabidopsis thaliana aquaporin AtPIP1;2 is a physiologically relevant CO₂ transport facilitator*. Plant J, 2011. **67**(5): p. 795-804.
17. Elsholz, P., *Studien zur physiologischen Relevanz der hAQP1 vermittelten CO₂ Membrandiffusion*. 2020, Technische Universität: Darmstadt.
18. Flexas, J., et al., *Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ in vivo*. Plant J, 2006. **48**(3): p. 427-39.
19. Uehlein, N., et al., *Gas-tight triblock-copolymer membranes are converted to CO₂ permeable by insertion of plant aquaporins*. Scientific Reports, 2012. **2**(1): p. 538.
20. Itele, F., et al., *CO₂ permeability of cell membranes is regulated by membrane cholesterol and protein gas channels*. Faseb j, 2012. **26**(12): p. 5182-91.
21. Ermakova, M., et al., *Expression of a CO₂-permeable aquaporin enhances mesophyll conductance in the C(4) species Setaria viridis*. Elife, 2021. **10**.
22. Sato, N., *Are Cyanobacteria an Ancestor of Chloroplasts or Just One of the Gene Donors for Plants and Algae?* Genes (Basel), 2021. **12**(6).
23. Miller, A.G. and B. Colman, *Evidence for HCO₃⁻ Transport by the Blue-Green Alga (Cyanobacterium) Coccochloris penicocystis 1*. Plant Physiology, 1980. **65**(2): p. 397-402.
24. Miller, A.G. and B. Colman, *Active transport and accumulation of bicarbonate by a unicellular cyanobacterium*. J Bacteriol, 1980. **143**(3): p. 1253-9.
25. Włodarczyk, A., et al., *Newly discovered Synechococcus sp. PCC 11901 is a robust cyanobacterial strain for high biomass production*. Communications Biology, 2020. **3**(1): p. 215.
26. Stevens, S.E. and R.D. Porter, *Transformation in Agmenellum quadruplicatum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(10): p. 6052-6.

-
27. Ruffing, A.M., T.J. Jensen, and L.M. Strickland, *Genetic tools for advancement of Synechococcus sp. PCC 7002 as a cyanobacterial chassis*. Microbial Cell Factories, 2016. **15**(1): p. 190.
 28. Van Baalen, C. *Studies on Marine Blue-Green Algae*. 1962.
 29. Nomura, C.T., T. Sakamoto, and D.A. Bryant, *Roles for heme-copper oxidases in extreme high-light and oxidative stress response in the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7002*. Arch Microbiol, 2006. **185**(6): p. 471-9.
 30. Ludwig, M. and D.A. Bryant, *Synechococcus sp. Strain PCC 7002 Transcriptome: Acclimation to Temperature, Salinity, Oxidative Stress, and Mixotrophic Growth Conditions*. Front Microbiol, 2012. **3**: p. 354.
 31. Batterton, J.C. and C. Van Baalen, *Growth responses of blue-green algae to sodium chloride concentration*. Archiv für Mikrobiologie, 1971. **76**(2): p. 151-165.
 32. Badger, M.R., et al., *The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism*. Journal of Experimental Botany, 2005. **57**(2): p. 249-265.
 33. Liu, X., et al., *Current advances in engineering cyanobacteria and their applications for photosynthetic butanol production*. Current Opinion in Biotechnology, 2022. **73**: p. 143-150.
 34. Sültemeyer, D., et al., *Characterisation of carbon dioxide and bicarbonate transport during steady-state photosynthesis in the marine cyanobacterium Synechococcus strain PCC7002*. Planta, 1995. **197**(4): p. 597-607.
 35. Shibata, M., et al., *Distinct constitutive and low-CO₂-induced CO₂ uptake systems in cyanobacteria: genes involved and their phylogenetic relationship with homologous genes in other organisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11789-94.
 36. Ohkawa, H., et al., *Mutation of ndh genes leads to inhibition of CO₂ uptake rather than HCO₃⁻ uptake in Synechocystis sp. strain PCC 6803*. J Bacteriol, 2000. **182**(9): p. 2591-6.
 37. Price, G.D., et al., *Identification of a SulP-type bicarbonate transporter in marine cyanobacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(52): p. 18228-33.

-
38. Sheldon, M.C., S.M. Howitt, and G.D. Price, *Membrane topology of the cyanobacterial bicarbonate transporter, BicA, a member of the SulP (SLC26A) family*. Mol Membr Biol, 2010. **27**(1): p. 12-22.
 39. Pisareva, T., et al., *Model for Membrane Organization and Protein Sorting in the Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 Inferred from Proteomics and Multivariate Sequence Analyses*. Journal of Proteome Research, 2011. **10**(8): p. 3617-3631.
 40. Zhang, P., et al., *Expression and functional roles of the two distinct NDH-1 complexes and the carbon acquisition complex NdhD3/NdhF3/CupA/Sll1735 in Synechocystis sp PCC 6803*. Plant Cell, 2004. **16**(12): p. 3326-40.
 41. Zhao, C., et al., *High-yield production of extracellular type-I cellulose by the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7002*. Cell Discovery, 2015. **1**(1): p. 15004.
 42. Mullineaux, C.W., *Co-existence of photosynthetic and respiratory activities in cyanobacterial thylakoid membranes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2014. **1837**(4): p. 503-511.
 43. Price, G.D., et al., *The functioning of the CO₂ concentrating mechanism in several cyanobacterial strains: a review of general physiological characteristics, genes, proteins, and recent advances*. Canadian Journal of Botany, 1998. **76**(6): p. 973-1002.
 44. Xu, M., et al., *Identification and Localization of the CupB Protein Involved in Constitutive CO₂ Uptake in the Cyanobacterium, Synechocystis sp. Strain PCC 6803*. Plant and Cell Physiology, 2008. **49**(6): p. 994-997.
 45. Han, X., et al., *Co-ordination of NDH and Cup proteins in CO₂ uptake in cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803*. J Exp Bot, 2017. **68**(14): p. 3869-3877.
 46. Schuller, J.M., et al., *Redox-coupled proton pumping drives carbon concentration in the photosynthetic complex I*. Nature Communications, 2020. **11**(1): p. 494.
 47. Price, G.D., et al., *Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants*. Journal of Experimental Botany, 2007. **59**(7): p. 1441-1461.

48. Badger, M.R., M. Bassett, and H.N. Comins, *A Model for HCO₃ Accumulation and Photosynthesis in the Cyanobacterium Synechococcus sp: Theoretical Predictions and Experimental Observations*. Plant Physiol, 1985. **77**(2): p. 465-71.
49. Kerfeld, C.A., et al., *Protein structures forming the shell of primitive bacterial organelles*. Science, 2005. **309**(5736): p. 936-8.
50. Price, G.D., J.R. Coleman, and M.R. Badger, *Association of Carbonic Anhydrase Activity with Carboxysomes Isolated from the Cyanobacterium Synechococcus PCC7942*. Plant Physiol, 1992. **100**(2): p. 784-93.
51. Badger, M.R. and G.D. Price, *CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution*. Journal of Experimental Botany, 2003. **54**(383): p. 609-622.
52. Cot, S.S.-W., A.K.-C. So, and G.S. Espie, *A Multiprotein Bicarbonate Dehydration Complex Essential to Carboxysome Function in Cyanobacteria*. Journal of Bacteriology, 2008. **190**(3): p. 936-945.
53. Long, B.M., et al., *Analysis of carboxysomes from Synechococcus PCC7942 reveals multiple Rubisco complexes with carboxysomal proteins CcmM and CcaA*. J Biol Chem, 2007. **282**(40): p. 29323-35.
54. Ludwig, M., D. Sültemeyer, and G.D. Price, *ISOLATION OF ccmKLMN GENES FROM THE MARINE CYANOBACTERIUM, SYNECHOCOCCUS SP. PCC7002 (CYANOPHYCEAE), AND EVIDENCE THAT CcmM IS ESSENTIAL FOR CARBOXYSOME ASSEMBLY*. Journal of Phycology, 2000. **36**(6): p. 1109-1119.
55. Cameron, Jeffrey C., et al., *Biogenesis of a Bacterial Organelle: The Carboxysome Assembly Pathway*. Cell, 2013. **155**(5): p. 1131-1140.
56. Hagemann, M., S. Song, and B. Eva-Maria, eds. *Inorganic Carbon Assimilation in Cyanobacteria: Mechanisms, Regulation, and Engineering*. 2021. 1-31.
57. Kinney, J.N., S.D. Axen, and C.A. Kerfeld, *Comparative analysis of carboxysome shell proteins*. Photosynthesis Research, 2011. **109**(1): p. 21-32.
58. Qian, X., et al., *Flux balance analysis of photoautotrophic metabolism: Uncovering new biological details of subsystems involved in cyanobacterial photosynthesis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2017. **1858**(4): p. 276-287.

-
59. de Veau, E.J. and J.E. Burris, *Photorespiratory Rates in Wheat and Maize as Determined by 18O-Labeling 1*. *Plant Physiology*, 1989. **90**(2): p. 500-511.
 60. Burnap, R.L., M. Hagemann, and A. Kaplan, *Regulation of CO₂ Concentrating Mechanism in Cyanobacteria*. *Life (Basel)*, 2015. **5**(1): p. 348-71.
 61. Battchikova, N., M. Eisenhut, and E.-M. Aro, *Cyanobacterial NDH-1 complexes: Novel insights and remaining puzzles*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2011. **1807**(8): p. 935-944.
 62. Schuller, J.M., et al., *Structural adaptations of photosynthetic complex I enable ferredoxin-dependent electron transfer*. *Science*, 2019. **363**(6424): p. 257-260.
 63. Yamamoto, H., et al., *An Src Homology 3 Domain-Like Fold Protein Forms a Ferredoxin Binding Site for the Chloroplast NADH Dehydrogenase-Like Complex in Arabidopsis* *The Plant Cell*, 2011. **23**(4): p. 1480-1493.
 64. Battchikova, N. and E.-M. Aro, *Cyanobacterial NDH-1 complexes: multiplicity in function and subunit composition*. *Physiologia Plantarum*, 2007. **131**(1): p. 22-32.
 65. Hualing, M., *Cyanobacterial NDH-1 Complexes*. *Front Microbiol*, 2022. **13**: p. 933160.
 66. Klughammer, B., et al., *The involvement of NAD(P)H dehydrogenase subunits, NdhD3 and NdhF3, in high-affinity CO₂ uptake in Synechococcus sp. PCC7002 gives evidence for multiple NDH-1 complexes with specific roles in cyanobacteria*. *Mol Microbiol*, 1999. **32**(6): p. 1305-15.
 67. Ding, X., et al., *Water and CO₂ permeability of SsAqpZ, the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC7942 aquaporin*. *Biol Cell*, 2013. **105**(3): p. 118-28.
 68. Tchernov, D., et al., *Passive entry of CO₂ and its energy-dependent intracellular conversion to HCO₃⁻ in cyanobacteria are driven by a photosystem I-generated $\Delta\mu_{H^+}$* . *J Biol Chem*, 2001. **276**(26): p. 23450-5.
 69. Shibata, M., et al., *Genes essential to sodium-dependent bicarbonate transport in cyanobacteria: function and phylogenetic analysis*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(21): p. 18658-64.
 70. Gupta, J.K., et al., *Overexpression of bicarbonate transporters in the marine cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7002 increases growth rate and glycogen accumulation*. *Biotechnology for Biofuels*, 2020. **13**(1): p. 17.

71. Price, G.D., M.C. Shelden, and S.M. Howitt, *Membrane topology of the cyanobacterial bicarbonate transporter, SbtA, and identification of potential regulatory loops*. Mol Membr Biol, 2011. **28**(5): p. 265-75.
72. Price, G.D., *Inorganic carbon transporters of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism*. Photosynthesis Research, 2011. **109**(1): p. 47-57.
73. Woodger, F.J., D.A. Bryant, and G.D. Price, *Transcriptional regulation of the CO₂-concentrating mechanism in a euryhaline, coastal marine cyanobacterium, Synechococcus sp. Strain PCC 7002: role of NdhR/CcmR*. J Bacteriol, 2007. **189**(9): p. 3335-47.
74. Bryant, D.A., et al., *Phycobilisomes of the Cyanobacterium Synechococcus SP. PCC 7002: Structure, Function, Assembly, and Expression*, in *Molecular Biology of Membrane-Bound Complexes in Phototrophic Bacteria*, G. Drews and E.A. Dawes, Editors. 1990, Springer US: Boston, MA. p. 129-141.
75. Mullineaux, C.W., *Electron transport and light-harvesting switches in cyanobacteria*. Front Plant Sci, 2014. **5**: p. 7.
76. Gantt, E., *Phycobilisomes*. Annual Review of Plant Physiology, 1981. **32**(1): p. 327-347.
77. Mullineaux, C.W., *The thylakoid membranes of cyanobacteria: structure, dynamics and function*. Functional Plant Biology, 1999. **26**(7): p. 671-677.
78. Ruban, A.V., *Evolution under the sun: optimizing light harvesting in photosynthesis*. J Exp Bot, 2015. **66**(1): p. 7-23.
79. Szekeres, E., et al., *Selection of proper reference genes for the cyanobacterium Synechococcus PCC 7002 using real-time quantitative PCR*. FEMS Microbiol Lett, 2014. **359**(1): p. 102-9.
80. Sokolovsky, V.Y., et al., *Fast and reliable mini-prep RNA extraction from Neurospora crassa*. Fungal Genetics Reports, 1990. **37**: p. 27.
81. Kachel, B. and M. Mack, *Engineering of Synechococcus sp. strain PCC 7002 for the photoautotrophic production of light-sensitive riboflavin (vitamin B₂)*. Metab Eng, 2020. **62**: p. 275-286.
82. Nakamoto, R.K., R. Rao, and C.W. Slayman, *Expression of the yeast plasma membrane [H⁺]ATPase in secretory vesicles. A new strategy for directed mutagenesis*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(12): p. 7940-7949.

-
83. Stevens, S.E., C. Patterson, and J. Myers, *The production of hydrogen peroxide by blue-green algae: A survey*. Journal of Phycology, 1973. **9**: p. 427-430.
84. Kasajima, I., et al., *A protocol for rapid DNA extraction from Arabidopsis thaliana for PCR analysis*. Plant Molecular Biology Reporter, 2004. **22**: p. 49-52.
85. Fogg, G.E. and B. Thake, *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. 1987: University of Wisconsin Press.
86. Bennett, A. and L. Bogorad *COMPLEMENTARY CHROMATIC ADAPTATION IN A FILAMENTOUS BLUE-GREEN ALGA*. Journal of Cell Biology, 1973. **58**(2): p. 419-435.
87. Palmqvist, K. and B. Sundberg, *Characterising Photosynthesis and Respiration in Freshly Isolated or Cultured Lichen Photobionts*, in *Protocols in Lichenology: Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring*, I.C. Kranner, R.P. Beckett, and A.K. Varma, Editors. 2002, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 152-181.
88. Ritchie, R.J., *Consistent Sets of Spectrophotometric Chlorophyll Equations for Acetone, Methanol and Ethanol Solvents*. Photosynthesis Research, 2006. **89**(1): p. 27-41.
89. Joshua, S. and C.W. Mullineaux, *Phycobilisome Diffusion Is Required for Light-State Transitions in Cyanobacteria*. Plant Physiology, 2004. **135**(4): p. 2112-2119.
90. Bio, T.; Available from:
https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/R045A/R045A_e.v1510Da.pdf. Letzter Aufruf: 16.01.2024, 01:14 Uhr
91. Kamennaya, N.A., et al., *Installing extra bicarbonate transporters in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6803 enhances biomass production*. Metabolic Engineering, 2015. **29**: p. 76-85.
92. Ogawa, T., *A gene homologous to the subunit-2 gene of NADH dehydrogenase is essential to inorganic carbon transport of Synechocystis PCC6803*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(10): p. 4275-9.
93. Hagemann, M., S. Song, and E.M. Brouwer, *Inorganic Carbon Assimilation in Cyanobacteria: Mechanisms, Regulation, and Engineering*, in *Cyanobacteria Biotechnology*, S.L. J. Nielsen, G. Stephanopoulos and P. Hudson, Editor. 2021, Wiley-VCH: Weinheim. p. 1-31.

-
94. Daley, S.M., et al., *Regulation of the cyanobacterial CO₂-concentrating mechanism involves internal sensing of NADP⁺ and α -ketogutarate levels by transcription factor CcmR*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41286.
 95. Mantovani, O., et al., *The impact of the cyanobacterial carbon-regulator protein SbtB and of the second messengers cAMP and c-di-AMP on CO₂-dependent gene expression*. New Phytologist, 2022. **234**(5): p. 1801-1816.
 96. Orf, I., et al., *CyAbrB2 Contributes to the Transcriptional Regulation of Low CO₂ Acclimation in Synechocystis sp. PCC 6803*. Plant and Cell Physiology, 2016. **57**(10): p. 2232-2243.
 97. Otto, B., et al., *Aquaporin tetramer composition modifies the function of tobacco aquaporins*. J Biol Chem, 2010. **285**(41): p. 31253-60.
 98. Geel, C., W. Versluis, and J.F.H. Snel, *Estimation of oxygen evolution by marine phytoplankton from measurement of the efficiency of Photosystem II electron flow*. Photosynthesis Research, 1997. **51**(1): p. 61-70.
 99. Saura, P. and V.R.I. Kaila, *Molecular dynamics and structural models of the cyanobacterial NDH-1 complex*. Biochim Biophys Acta Bioenerg, 2019. **1860**(3): p. 201-208.
 100. Mullineaux, C.W. and J.F. Allen, *State 1-State 2 transitions in the cyanobacterium Synechococcus 6301 are controlled by the redox state of electron carriers between Photosystems I and II*. Photosynthesis Research, 1990. **23**(3): p. 297-311.
 101. McConnell, M., et al., *Regulation of the Distribution of Chlorophyll and Phycobilin-Absorbed Excitation Energy in Cyanobacteria. A Structure-Based Model for the Light State Transition*. Plant physiology, 2002. **130**: p. 1201-12.
 102. Zhao, J., G. Shen, and D.A. Bryant, *Photosystem stoichiometry and state transitions in a mutant of the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7002 lacking phycocyanin*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2001. **1505**(2): p. 248-257.
 103. Calzadilla, P.I. and D. Kirilovsky, *Revisiting cyanobacterial state transitions*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2020. **19**(5): p. 585-603.
 104. Li, H., et al., *The state transition mechanism - simply depending on light-on and -off in Spirulina platensis*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1757**(11): p. 1512-9.

105. Shimakawa, G., et al., *Diversity in photosynthetic electron transport under [CO(2)]-limitation: the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7002 and green alga Chlamydomonas reinhardtii drive an O(2)-dependent alternative electron flow and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence during CO(2)-limited photosynthesis*. *Photosynth Res*, 2016. **130**(1-3): p. 293-305.
106. Lea-Smith, D. and G. Hanke, *Electron Transport in Cyanobacteria and Its Potential in Bioproduction*. 2021. p. 33-63.
107. Liu, L., et al., *Control of electron transport routes through redox-regulated redistribution of respiratory complexes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. **109**(28): p. 11431-11436.
108. Lea-Smith, D.J., et al., *Thylakoid terminal oxidases are essential for the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 to survive rapidly changing light intensities*. *Plant Physiol*, 2013. **162**(1): p. 484-95.
109. Ermakova, M., et al., *Distinguishing the Roles of Thylakoid Respiratory Terminal Oxidases in the Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803* *Plant Physiology*, 2016. **171**(2): p. 1307-1319.
110. Mullineaux, C.W. and J.F. Allen, *The state 2 transition in the cyanobacterium Synechococcus 6301 can be driven by respiratory electron flow into the plastoquinone pool*. *FEBS Letters*, 1986. **205**(1): p. 155-160.
111. Sun, N., et al., *A thylakoid-located carbonic anhydrase regulates CO(2) uptake in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803*. *New Phytol*, 2019. **222**(1): p. 206-217.
112. Allahverdiyeva, Y., et al., *Interplay between flavodiiron proteins and photorespiration in Synechocystis sp. PCC 6803*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(27): p. 24007-14.
113. McKay, R.M.L., S.P. Gibbs, and G.S. Espie, *Effect of dissolved inorganic carbon on the expression of carboxysomes, localization of Rubisco and the mode of inorganic carbon transport in cells of the cyanobacterium Synechococcus UTEX 625*. *Archives of Microbiology*, 1993. **159**(1): p. 21-29.
114. Price, G.D. and M.R. Badger, *Expression of Human Carbonic Anhydrase in the Cyanobacterium Synechococcus PCC7942 Creates a High CO(2)-Requiring Phenotype : Evidence for a Central Role for Carboxysomes in the CO(2) Concentrating Mechanism*. *Plant Physiol*, 1989. **91**(2): p. 505-13.

-
115. Price, G., et al., *Random Insertional Mutagenesis Used in the Generation of Mutants of the Marine Cyanobacterium Synechococcus sp. Strain PCC7002 With an Impaired CO₂ Concentrating Mechanism*. Australian journal of plant physiology, 1997. **24**: p. 317-327.
116. Price, G.D. and M.R. Badger, *Ethoxzolamide Inhibition of CO₂ Uptake in the Cyanobacterium Synechococcus PCC7942 without Apparent Inhibition of Internal Carbonic Anhydrase Activity*. Plant Physiol, 1989. **89**(1): p. 37-43.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CO ₂ -Diffusion durch unbesetzte Doppellipidschichten (Zellmembranen) (A), über Aquaporine in der Zellmembran (B) und in proteinbesetzten Biomembranen (C) (Adaptiert nach [15])	11
Abbildung 2: Verteilung von CO ₂ im Gewebe eines Pflanzenblatts (Querschnitt).....	12
Abbildung 3: CO ₂ -Aufnahme bei einzelligen, fotosynthetisch aktiven Organismen.....	13
Abbildung 4: Ablauf der Aquaporin-Plasmid-Klonierung mit dem In Fusion® HD cloning Kit.....	24
Abbildung 5: Vektorkarte von pBK47 (Zur Verfügung gestellt von Kachel & Mack, 2020).....	33
Abbildung 6: Vektorkarte von pEt21a+_NtAQP1 (erzeugt von Patrick Bienert, 2012).....	34
Abbildung 7: Vektorkarte von pEt21a+_NtPIP2;1 (erzeugt von Patrick Bienert, 2012).....	35
Abbildung 8: Vektorkarten von pBK47_hAQP1, _NtAQP1 und _NtPIP2;1.....	36
Abbildung 9: Vektorkarten von pBK47_sfGFP_6xHIS, _hAQP1_6xHIS, _NtAQP1_6xHIS und _NtPIP2;1_6xHIS.....	37
Abbildung 10: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis genomischer DNA nach Aufbruch der Zellen für verschiedene Zeitintervalle.....	59
Abbildung 11: Elektrophoretische Auftrennung der mit verschiedenen Aufschlussmethoden isolierten Proteine aus <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 auf einem Polyacrylamidgel.....	62
Abbildung 12: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.....	68
Abbildung 13: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate der cDNA von <i>haqp1</i> , <i>ntaqp1</i> und <i>ntpip2;1</i> und des Vektors pBK47 (ohne dem enthaltenen „gene of interest“ <i>gfp</i>) für das In-Fusion® HD cloning vor (links) und nach der Gelextraktion (rechts) (M: DNA-Marker)	71
Abbildung 14: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zur Überprüfung der aus <i>E.coli</i> isolierten Aquaporintransformationsvektoren (M: DNA-Marker, als Spezifitätskontrolle wurde eine PCR mit dem Originalvektor pBK47 als „Template“ durchgeführt und unter – auf dem Gel aufgetrennt).....	73
Abbildung 15: Sequenzierungsergebnisse der neu erzeugten Aquaporin-Plasmide (unten) und Originalvektoren (oben) im Vergleich zur cDNA (Mitte) des jeweiligen Aquaporins	74
Abbildung 16: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis des 16S rRNA-Gens (oben) und der eingebrachten cDNA für <i>ntaqp1</i> (unten) in der aus <i>Synechococcus</i> sp.	

PCC7002 extrahierten genomischen DNA (M: Marker, zur Kontrolle wurde genomische DNA aus dem Ursprungstamm (PCC7002 WT), der Originalvektor pBK47, sowie das in dieser Arbeit erzeugte Plasmid pBK47_NtAQP1 und Wasser in der PCR eingesetzt und auf dem Agarosegel aufgetrennt)	75
Abbildung 17: Transkriptlevel der in <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002 eingebrachten Aquaporine Die C_T -Werte wurden auf das Referenzgen <i>secA</i> normiert und daraus der RQ berechnet. (n=10).....	76
Abbildung 18: Silberkolloidalfärbung einer PVDF-Membran mit Proteinextrakten aus <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002 und NtAQP1-Transformanten (oben) und Immunoassay der selben Membran zum Nachweis von NtAQP1 mit spezifischen Antikörpern (unten)	78
Abbildung 19: Immunoassay zum Nachweis der His-getaggten Proteine im Proteinextrakt von <i>E. coli</i> Transformanten mit Anti-His-Antikörpern (links) und Silberkolloidalfärbung der Proteinextrakte auf der PVDF-Membran (rechts)	79
Abbildung 20: Analyse des Transkriptniveaus der Gene für die drei Bicarbonat-Transporter <i>BicA</i>, <i>SbtA</i> und <i>porB</i>, sowie eine Untereinheit des induzierbaren CO_2-„uptake“ Komplexes (<i>NdhF3</i>), der großen RuBisCO-Untereinheit (<i>RbcL</i>), des endogenen Aquaporins (<i>ssAQPZ</i>) und dem zweiten Referenzgen <i>ppC</i> in <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002 Kontrollzellen und den Aquaporintransformanten (+hAQP1, +NtAQP1 und +NtPIP2;1) (n=10)	81
Abbildung 21: Wachstumskurven (OD_{730nm}) der <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002 Kontrollzellen und den Aquaporintransformanten (+hAQP1, +NtAQP1 und +NtPIP2;1) bei Begasung mit Luft (0,04 % CO_2) und einem Luftgemisch mit 1% CO_2 (Luft: n=2, 1% CO_2: n=3)	82
Abbildung 22: Beispielhafter Kurvenverlauf einer O_2-Messung mit <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002	84
Abbildung 23: Licht-Dosis-Antwortkurve für die Netto-O_2-Produktionsraten von <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002 Kontrollzellen und den Aquaporintransformanten (+hAQP1, +NtAQP1 und +NtPIP2;1)	85
Abbildung 24: Chlorophyll a Gehalt in <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002 Kontrollzellen und den Aquaporintransformanten (+hAQP1, +NtAQP1 und +NtPIP2;1) zum Zeitpunkt der O_2-Messungen (n≥12)	87
Abbildung 25: 77 K Fluoreszenzmessungen mit <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002 Kontrollzellen und den Aquaporintransformanten (+hAQP1, +NtAQP1 und +NtPIP2;1) nach Anregung der Phycobilisome bei 550 nm.....	88
Abbildung 26: Übersicht des Ablaufs der Fotosynthese und der C_i-Aufnahme in +hAQP1 und +NtAQP1	98

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Rezeptur des Restriktionsansatzes	21
Tabelle 2: Rezeptur zur Erstellung eines PCR-Ansatzes.....	22
Tabelle 3: PCR-Zyklen-Programm.....	23
Tabelle 4: PCR-Ansatz für das In-Fusion® HD cloning.....	24
Tabelle 5: PCR-Zyklen-Programm.....	25
Tabelle 6: In-Fusion® HD cloning Ansatz.....	25
Tabelle 7: Rezeptur zur Herstellung von 50x TAE-Puffer	26
Tabelle 8: Rezept zur Herstellung von 5x „Orange Loading Dye“	26
Tabelle 9: Zusammensetzung des 10x MEN-Puffers	27
Tabelle 10: Zusammensetzung des 2x RNA-Ladepuffers	27
Tabelle 11: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.....	29
Tabelle 12: qPCR Ansatz mit cDNA als „Template“	30
Tabelle 13: qPCR Ansatz mit RNA als „Template“	31
Tabelle 14: qPCR Zyklenprogramm	31
Tabelle 15: Zusammensetzung des Ladepuffers.....	41
Tabelle 16: Zusammensetzung des Waschpuffers	42
Tabelle 17: Zusammensetzung des Elutionspuffers	43
Tabelle 18: Zusammensetzung des Trenngels	44
Tabelle 19: Zusammensetzung des Sammelgels	44
Tabelle 20: Rezept zur Herstellung von 10x Lämmli-puffer	45
Tabelle 21: Rezeptur zur Herstellung eines 4x SDS-Ladepuffers	45
Tabelle 22:Zusammensetzung der Coomassie-Blau Färbelösung	46
Tabelle 23: Zusammensetzung Entfärbelösung.....	46
Tabelle 24: Zusammensetzung des Transferpuffers.....	47
Tabelle 25: Rezept zur Herstellung der Silbernitrat-Färbelösung.....	48
Tabelle 26: Rezept zur Herstellung von Silbernitrat-Entfärbelösung	48
Tabelle 27: Zusammensetzung der Waschlösung.....	49
Tabelle 28: Liste verwendeter Antikörper	49

Tabelle 29: Zusammensetzung der Assay B Lösung	50
Tabelle 30: Rezeptur zur Herstellung von LB-Medium.....	51
Tabelle 31: Zusammensetzung des Resuspensionspuffers (P1).....	52
Tabelle 32: Zusammensetzung des Lysepuffers (P2).....	52
Tabelle 33: Rezeptur zur Herstellung von SOC-Medium.....	53
Tabelle 34: Rezeptur zur Herstellung von 10x PBS.....	54
Tabelle 35: Rezeptur zur Herstellung von A+ Medium.....	55
Tabelle 36: Rezeptur zur Herstellung von 1000x P1 Metal Mix.....	55
Tabelle 37: Rezeptur zur Herstellung von AA+ Medium.....	56
Tabelle 38: Rezeptur zur Herstellung von ATTC-Medium.....	56
Tabelle 39: Rezeptur zur Herstellung von A-5 Spurenelementen.....	57
Tabelle 40: Extraktionspuffer zur Aufnahme genomischer DNA.....	59
Tabelle 41: Lysepuffer zur Extraktion von RNA nach Sokolovsky et al. (1990).....	60
Tabelle 42: Zusammensetzung des Lysepuffers.....	63
Tabelle 43: Rezeptur zur Herstellung des Solubilisierungspuffers.....	64
Tabelle 44: Zusammensetzung des YPD-Mediums.....	69
Tabelle 45: Zusammensetzung des Lyse- & Ladepuffers.....	70
Tabelle 46: Anteil falsch positiver E.coli Transformanten nach dem In-Fusion® HD cloning.....	72
Tabelle 47: Verdopplungszeit der OD _{730nm} von <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002 Kontrollzellen und den Aquaporintransformanten (+hAQP1, +NtAQP1 und +NtPIP2;1) bei Begasung mit Luft und einem Luftgemisch mit 1% CO ₂ (p≥0,047) Berechnet in der exponentiellen Wachstumsphase: Luft 0-70 h, 1% CO ₂ 0-26 h	82
Tabelle 48: Verdopplungszeit der Biomassezunahme von <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002 Kontrollzellen und den Aquaporintransformanten (+hAQP1, +NtAQP1 und +NtPIP2;1) bei Begasung mit Luft und einem Luftgemisch mit 1% CO ₂	83
Tabelle 49: Werte des gemittelten Chlorophyll a Gehalts pro OD _{730nm} in µg/ml während der Wachstumsexperimente mit <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002 Kontrollzellen und den Aquaporintransformanten (+hAQP1, +NtAQP1 und +NtPIP2;1).....	83
Tabelle 50: ermittelte Netto-O ₂ -Produktionsraten bei verschiedenen Beleuchtungsstärken für <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002 Kontrollzellen und die Aquaporintransformanten (+hAQP1,	

+NtAQP1 und +NtPIP2;1) im Vergleich zur maximalen Netto-O₂-Produktionsrate der Kontrolle in %.....	86
--	-----------

7.3 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
L	Liter
ml	Mililiter
μl	Mikroliter
g	Gramm
mg	Miligramm
μg	Mikrogramm
ng	Nanogramm
w/v	„weight per volume“ = Masse pro Volumen
rpm	„revolutions per minute“ =Umdrehungen pro Minute
min	Minute(n)
sec	Sekunde(n)
h	Stunden
d	Tage
M	Molar
mM	Milimolar
μM	Mikromolar
OD	Optische Dichte
x g	Zentrifugalbeschleunigung
μm	Mikrometer
V	Volt
μmol/(m ² *s)	Photonenstromdichte in Mikromol/(Quadratmeter*Sekunde)
ad	Auffüllen auf
∅	Durchmesser
U	Units
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
bp	Basenpaare
CCM	CO ₂ -Konzentrations-Mechanismus
C _i	anorganische Kohlenstoffquelle
z.B.	zum Beispiel
CBBC	Calvin-Benson-Bassham-Zyklus