

DISSERTATION

Titel der Dissertation

Rekombination im Cyanobakterium

Synechocystis sp. PCC 6803

Verfasserin

Mag. Monika Sachet

angestrebter akademischer Grad

Doktorin der Naturwissenschaften

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A-091 419

Dissertationsgebiet: Chemie

Betreuer: ao. Univ. –Prof .i.R. Dr. Georg Schmetterer

ZUSAMMENFASSUNG

Cyanobakterien (früher Blaualgen) gehören zu den photoautotrophen Eubakterien und sind zur oxygenen Photosynthese befähigt. *Synechocystis* sp. PCC6803 ist ein einzelliges photolithoautotrophes Eubakterium. Es hat einen Durchmesser von 2,3-2,5 µm, keine Gasvakuolen, ist N₂ Fixierung negativ und hat eine Genomgröße von 3,57 Mbp. Eine Manipulation des Cyanobakteriengenoms geschieht entweder durch statistische Mutagenese (mit UV-Bestrahlung oder Chemikalien) oder durch site-specific Mutagenese. Dabei wird entweder rekombinante DNA in die Zellen gebracht und diese manifestiert sich durch autonome Replikation. Oder die DNA integriert durch homologe Rekombination in das Zellgenom, wenn dieses homologe Bereiche aufweist. *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist natürlich transformierbar, d.h. die Zellen sind kompetent für die Aufnahme freier DNA, neben dem Gentransfer mittels Konjugation oder Elektroporation.

Proteine, die in der homologen Rekombination mitwirken, sind in *E.coli* recht gut beschrieben, über die Rekombination in *Synechocystis* ist hingegen sehr wenig bekannt. In *E.coli* gibt es vier unabhängige Wege für homologe Rekombination. Der *recBCD* Weg stellt den dominanten Weg der homologen Rekombination dar. Dieser Proteinkomplex hat mehrere Funktionen, eine Helikaseaktivität, eine ds- und ss-DNA Exonukleaseaktivität und eine ss-DNA Endonukleaseaktivität. Der *recJQ* Weg erzeugt durch die Helikaseaktivität des RecQ und der ss-DNA Exonukleaseaktivität des RecJ Proteins ein geeignetes Substrat für RecA. Die Proteine RecFOR bilden einen funktionell ähnlichen Komplex wie RecBCD. Die genaue Funktion dieser Proteine ist noch nicht geklärt. In Abwesenheit von RecBCD werden RecFOR für die inter- und intramolekulare Rekombination von Plasmiden und bei der postreplikativen Reparatur benötigt. Der *recET* Weg stellt eine Alternative zu den anderen Wegen dar. Eine Sonderstellung nimmt RecA ein. Dieses Protein wird in den drei erst beschriebenen Wegen für die Bildung der Tripelhelix benötigt.

In *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist über Gene der homologen Rekombination wenig bekannt. Die Gesamtsequenz von *Synechocystis* 6803 ist seit 1996 bekannt. In dieser wurden vermutete Rekombinations-Gene anhand von Homologievergleichen identifiziert. Es wurde ein Gen, das gute Homologie zu *E.coli* zeigt und nur eine Kopie im Genom von *Synechocystis* aufweist, für eine genauere Analyse ausgewählt; *recJ* eine ss-DNA Exonuklease. Rec J wurde mit Hilfe homologer Rekombination deletiert und durch eine Resistenz ersetzt. Die homozygote Mutante MSJ1 wurde auf phänotypische Auffälligkeiten, bei der UV-Mutagenese,

Spontanmutagenese und Transformierbarkeit, untersucht. Es zeigte sich, dass MSJ1 eine 100-fach höhere Transformationsrate aufweist als der Wildtyp.

Um ein Artefakt des Phänotyps der MSJ1 Mutante auszuschließen, wurde *recJ* unabhängig mit einem anderen Plasmid bis auf 25 bp des offenen Leserahmens deletiert. Eine 100-fach höhere Transformationsrate der Mutante MSJ2 konnte bestätigt werden.

Es ist in der Mikrobiologie immer kritisch genügend Selektionsmarker für gleichzeitige Mutagenesen in einer Zelle zu haben. Deshalb wurde eine *recJ* negative Mutante erneut mit Hilfe einer SacB Technik hergestellt. Diese homozygote Mutante MSJ3 enthält keine Resistenzkassette im deletierten *recJ* Gen. MSJ3 wurde wieder auf phänotypische Merkmale, in UV-Mutagenese, Spontanmutagenese und Transformierbarkeit, untersucht. Die 100-fach höhere Transformationsrate von MSJ3 bestätigte sich. Es zeigte sich kein Unterschied im Vergleich zum Wildtyp in UV-Mutagenese, Spontanmutagenese und intraspezifischer Konjugation.

Über den Mechanismus wie freie DNA von *Synechocystis* sp. PCC6803 aufgenommen und verarbeitet wird für die homologe Rekombination, ist wenig bekannt. Die MSJ3/*pilA1*-Mutante ist Transformationsnegativ. Es wurde versucht MSJ3/*pilA1*- mit einzelsträngiger DNA zu elektroporieren, um zu sehen ob einzelsträngige DNA, direkt in die Zelle geliefert, homologe Rekombination auslösen kann. Es wurden keine Transformanten erhalten.

ABSTRACT

Cyanobacteria belong to the photoautotroph eubacteria and are able to perform oxygen photosynthesis. *Synechocystis* sp. PCC6803 is a single cell photolithoautotroph eubacterium. It has a diameter of 2,3–2,5 μm , no gas vacuoles, is N_2 fixing negative and its genome has the size of 3,57 Mbp.

Genomic manipulation of a cyanobacterial genome is performed either through statistic mutagenesis (UV-irradiation or chemicals) or site-specific mutagenesis. Therefore recombinant DNA is used for autonomous replication in the cells or homologue DNA for homologue recombination / integration into the genome. *Synechocystis* sp. PCC 6803 is able to take up free DNA besides the gene transport via conjugation or electroporation.

In *E.coli* proteins for homologue recombination are well described but not for *Synechocystis*. Four independent pathways of homologue recombination are described in *E.coli*. The *recBCD* way is the dominant way for homologue recombination. This protein complex has a helicase activity, a ds- and ss-DNA exonuclease activity and ss-DNA endonuclease activity. The *recJQ* way produces with the help of RecQ and the ss-DNA exonuclease activity of RecJ a suitable substrate for RecA. The *recFOR* complex acts similar as RecBCD. The exact function of this complex is not known yet. When RecBCD is not present RecFOR is needed for inter- und intramolecular recombination of plasmids and post replicative repair. The *recET* way is an alternative pathway to the others. A special function has RecA in the first three described pathways; it is needed for building a triple helix.

In *Synechocystis* sp. PCC 6803 not much is known about genes of homologue recombination. The whole genome sequence of *Synechocystis* 6803 is known since 1996. With homology comparison it was possible to find assumed genes for recombination. We have selected *recJ*, a ss-DNA exonuclease, which appears only once in the genome of *Synechocystis* to work with. The Protein was deleted with the help of homologue recombination and replaced with a resistance cassette. The homozygote mutant MSJ1 was screened for a phenotype within UV-mutagenesis, spontaneous mutagenesis and transformability. It was shown that MSJ1 has a 100 fold higher transformability rate than the wildtyp.

To prevent an artefact of the phenotype of MSJ1, the *recJ* open reading frame was independently deleted again with a leftover of 25bp of the open reading frame. The 100 fold higher transformability rate of this mutant MSJ2 was confirmed.

It is crucial in microbiology to have enough selection markers to perform simultaneously mutagenesis in one cell. Therefore the *recJ* mutant was produced again with the SacB technique. This mutant MSJ3 has no resistance cassette within the deleted *recJ* gen. MSJ3 was also screened for a phenotype within UV- mutagenesis, spontaneous mutagenesis and transformability. The 100 fold higher transformability rate in comparison to the wildtyp was confirmed. There was no difference in UV- mutagenesis, spontaneous mutagenesis and intraspecific conjugation.

Not much is known about the mechanism how in *Synechocystis* sp. PCC6803 free DNA is taken up and processed for homologue recombination. Therefore the mutant MSJ3/*pilA1-*, a mutant negative for transformation, was electroporated with ss-DNA, to see, if ss-DNA directly delivered into the cell can lead to homologue recombination. It was not possible to get any transformed cells.

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	9
AUFGABENSTELLUNG	17
HERSTELLUNG EINER <i>recJ</i> (sll1354) NEGATIVEN MUTANTE AUS <i>SYNECHOCYSTITIS SP.</i> PCC 6803	19
UNABHÄNGIGE HERSTELLUNG DER <i>recJ</i> (sll1354) NEGATIVEN MUTANTE VON <i>SYNECHOCYSTITIS SP.</i> PCC 6803 MIT EINEM ANDEREN PLASMID	25
HERSTELLUNG EINER <i>recJ</i> NEGATIVEN MUTANTE AUS <i>SYNECHOCYSTITIS SP.</i> PCC 6803, DIE KEINE RESISTENZKASSATTE IM DELETIERTEN <i>recJ</i> GEN ENTHÄLT	31
VERSUCH EINEN TRANSFORMATIONSNEGATIVEN STAMM + <i>recJ</i> DELETION DURCH ELEKTROPORATION MIT EINZELSTRÄNGIGER DNA ZU TRANSFORMIEREN	43
DISKUSSION	45
MATERIALIEN	49
METHODEN	60
LITERATURVERZEICHNIS	79
INDEX DER ABKÜRZUNGEN	81
LEBENS LAUF	83

EINLEITUNG

ÖKOLOGIE

Cyanobakterien (früher Blaualgen) sind zur oxygenen Photosynthese befähigt, und gehören per definitionem zu den photoautotrophen Eubakterien. Durch die Kombination vieler physiologischer Möglichkeiten (Photoautotrophie, N₂-Fixierung, Meso- und Thermophilie, Salztoleranz, relative Unempfindlichkeit gegenüber UV-Licht und vieles mehr) sind Cyanobakterien ubiquitär vertreten. Sie kommen in Süß- und Salzwasser vor, aber auch in trockenen Habitaten. Sie sind Pioniere bei der Erstbesiedelung von Extremstandorten. Manchmal gelingt dies durch ectosymbiotische oder endosymbiotische Lebensgemeinschaften.

Manche Cyanobakterienstämme bilden starke Exotoxine, die zu schweren Fisch- und Viehvergiftungen führten und auch gelegentlich für Menschen tödlich waren.

SYSTEMATIK

Es gibt nach derzeitiger Einteilung drei große Reiche:

Eukarioten, Archaeobakterien und Eubakterien

Die Cyanobakterien gehören in das Reich der Eubakterien und dort zu der Gruppe der oxygenen photosynthetischen Bakterien. Das heißt sie besitzen Photosystem I und Photosystem II und können daher molekularen Sauerstoff freisetzen. Sie haben Phycobiline als Antennenpigmente und besitzen nur Chlorophyll a mit einer Ausnahme. Sie werden in fünf Sektionen nach Rippka et al [1] eingeteilt.

Die Mitglieder von Sektion I und II sind einzellige Stäbchen und Kokken, wobei viele in losen Zellaggregaten (Coenobien) beieinander sind. Diese Aggregate werden von konzentrischen Layern = Capsulae zusammengehalten.

Sektion I: Chroococcales

einzellige Stäbchen und Kokken, teils in Aggregaten; binäre Zellteilung oder Knospung

Gloeotheca, Gloeocapsa, Synechocystis, Synechococcus, Chamaesiphon,

SektionII: Pleurocapsales

einzellig, neben einfacher binärer Zellteilung auch Teilung in mehreren Teilungsebenen

Pleurocapsa, Dermocarpa, Dermocarpella, Myxosarcina, Chroococciopsis, Xenococcus

Die Mitglieder der Sektionen III, IV und V sind filamentös. Die Filamente oder Trichome sind mit einer Schleimschicht umgeben. Viele Mitglieder sind beweglich.

SektionIII: Oscillatoriales

unverzweigte Filamente, keine Zelldifferenzierung

Oscillatoria, Spirulina, Pseudanabena, Lyngbya, Plectonema, Phormidium

Die Mitglieder der Sektion IV und V zeigen Zelldifferenzierung. Vegetative Zellen können zu Heterocysten (N₂ Fixierung) umgewandelt werden. Manche Stämme können Akineten (Exosporen) oder Hormogonien (mobile Filamente) ausbilden.

SektionIV: Nostocales

Zellteilung in einer Ebene

Nostoc, Anabena, Calothrix, Cylindrospermum, Nodularia, Sytonema

SektionV: Stigonematales

echt verzweigte Filamente, Zellteilung in drei Ebenen

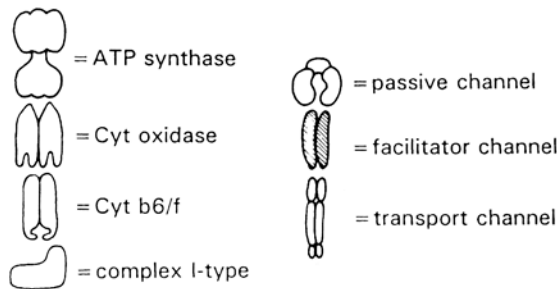
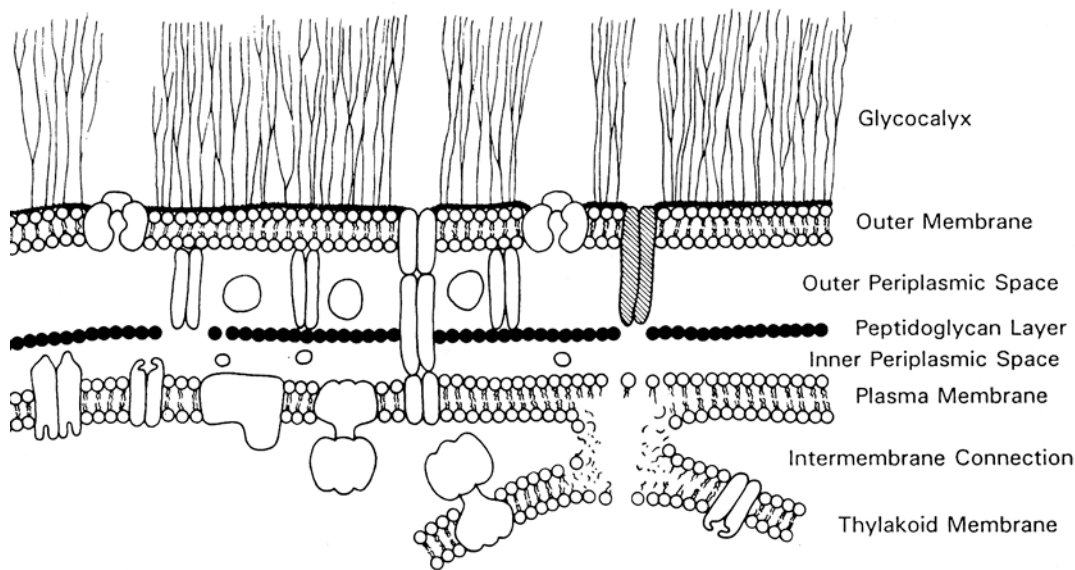
Fischerella, Mastigocladus, Chlorogloeopsis

Prochlorales sind auch oxygene photosynthetische Bakterien, die nicht in dieses Schema passen. Sie besitzen Chlorophyll a und b, haben keine Phycobilisomen und ihre Thylakoide zeigen deutliche Grana. Genetische Studien zeigen aber, dass sie zu den Cyanobakterien gehören.

ZELLSTRUKTUR

Cyanobakterien haben einen für gramnegative Eubakterien typischen Zellwandaufbau.

Dieser sieht von außen nach innen betrachtet wie folgt aus:



Die Glycocalix ist eine Polysaccharidkapsel. Dann folgt die äußere Membran (outer membrane), die ein Lipidbilayer ist. Als äußerer periplasmatischer Raum wird der Platz zwischen äußerer Membran und Peptidoglycan bezeichnet. Die Peptidoglycanschicht ist etwas dicker als üblicherweise beim gramnegativen Typ, der chemische Aufbau entspricht eher dem grampositiven Typ. Der innere periplasmatische Raum wird begrenzt durch das Peptidoglycan und die Cytoplasmamembran, die wieder ein Lipidbilayer ist. Die Thylakoidmembran bildet in Cyanobakterien eine zweite bioenergetisch aktive Membran, mit einem höchstwahrscheinlich abgeschlossenen Intrathylakoidalraum.

GENETIK

Das cyanobakterielle Genom hat eine Größe von 3,5-20 Mbp. Die größten Genome findet man unter den Stämmen die Heterocysten bilden können. Das zirkuläre Chromosom ist in 10-20 Kopien pro Zelle vorhanden. Die chromosomale-DNA ist unterschiedlich stark methyliert, besonders die filamentösen Stämme haben eine extrem starke Methylierung. Bei diesen

Stämmen ist dies nicht nur Schutz der DNA vor dem Schneiden von endogenen Restriktionsenzymen, sondern vermutlich auch eine Regulation der Genexpression.

Oft sind zusätzlich zum Genom noch zirkuläre Plasmide in unterschiedlicher Anzahl (von null bis sechs verschiedene pro Zelle) und Größe (zw. 2 kbp und 1 Mbp) vorhanden. *Synechocystis* sp. PCC 6803 hat zwei kleine (2 und 5 kb) und zwei große (50 und 100 kbp) Plasmide, deren Funktion noch ungeklärt sind. Seit Ende 1996 ist die Gesamtsequenz von *Synechocystis* 6803 bekannt, es sind 3,57 Mbp [2].

Die Manipulation des Cyanobakteriengenom geschieht entweder durch statistische Mutagenese (mit UV-Bestrahlung oder Chemikalien) oder durch site-specific Mutagenese. Dabei wird entweder rekombinante DNA in die Zellen gebracht und diese manifestiert sich durch autonome Replikation. Oder die DNA integriert durch homologe Rekombination ins Chromosom, wenn diese homologe Bereiche zum Genom hat. Aus einfacher Rekombination resultiert die Integration des ganzen Plasmides ins Genom. Bei doppelter Rekombination wird nur jener Teil des Plasmides integrieren, welcher von homologen Sequenzen flankiert ist.

Ein experimenteller Vorteil von *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist, dass dieser Stamm natürlich transformierbar ist, d. h. kompetent für die Aufnahme freier DNA (neben des Gentransfers mittels Konjugation oder Elektroporation) ist.

Bis heute sind ca. 24 natürlich transformierbare Bakterienstämme bekannt, z. B.: *Bacillus subtilis* (grampositives Bakterium) oder *Haemophilus influenzae* (gramnegatives Bakterium).

Unter den natürlich transformierbaren Cyanobakterienstämmen sind bis jetzt nur die einzelligen Stämme *Synechococcus* sp. PCC 7943, PCC 7942, PCC 7002, *Synechocystis* sp. PCC 6808 und PCC 6803 bekannt.

BIOENERGETIK

In der Natur sind viele verschiedene Ernährungstypen möglich:

Energiequelle:	Licht	Photo-
	chem. Energie	Chemo-
Elektronendonator	anorganisch	-litho-
	organisch	-organo-
Kohlenstoffquelle	C ₁ -Körper (CO ₂ , CH ₄ , etc.)	-autotroph
	organische Verb.	-heterotroph

In der Natur sind hauptsächlich fünf Typen verwirklicht:

1. photolithoautotroph (grüne Pflanzen, Algen, Cyanobakterien)
2. photoorganoheterotroph (viele phototrophe Bakterien)
3. chemolithoautotroph (z.B. Schwefelbakterien)
4. chemolithoheterotroph (z.B. Desulfovibrio-Stämme)
5. chemoorganoheterotroph (die meisten Mikroorganismen, Tiere und grüne Pflanzen im Dunklen)

Der Ernährungstyp, den Cyanobakterien bevorzugen, ist Photolithoautotrophie, d.h. Licht wird als Energiequelle, eine anorganische Verbindung (H_2O) als Elektronendonator und CO_2 als Kohlenstoffquelle verwendet.

Manche Cyanobakterien (z.B. *Synechocystis* sp. PCC 6803) können unter geeigneten Bedingungen, (z.B. Glucose im Medium) sowohl heterotrophe als auch autotrophe Stoffwechselwege verwenden. Das heißt, als Energiequelle dient die Photosynthese mit einem anorganischen Elektronendonator und gleichzeitig können organischen Substanzen als Energiequelle verwendet werden. Wobei unter diesen mixotrophen Bedingungen fast nur CO_2 der C-Donor ist. Der Zucker wird aufgenommen, aber fast völlig ins Glykogen eingebaut. Wenn man das Photosystem II mittels DCMU (3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff) hemmt, somit nur mehr zyklische Phosphorylierung (siehe Photosynthese) möglich ist, dann können die Zellen nur mehr in Anwesenheit von organischen Kohlenstoffquellen wachsen. Die Blockierung des Photosystem II verhindert, dass genug Energie für die Nutzung von anorganischen Substanzen da ist.

PHOTOSYNTHESE

Unter Photosynthese versteht man einen Prozess, der es der Zelle erlaubt, mit Licht als einziger Energiequelle zu leben und sich zu vermehren. Mit Hilfe dieser Energie kann aus CO_2 und H_2O Glucose und deren Polymere aufgebaut werden. Die Photosynthese kann in zwei Teilprozesse geteilt werden.

Die Lichtreaktion = photosynthetische Elektronentransportkette erzeugt Energieäquivalente (ATP) und Redoxäquivalente (NADPH).

Die Dunkelreaktion fixiert CO_2 mit Hilfe von ATP und NADPH im Calvin-Zyklus (ist nach seinem Entdecker M. Calvin benannt). Sie ist eine zyklische Folge von Reaktionen, in deren Verlauf CO_2 mit Hilfe von ATP und NADPH in Glucose umgewandelt wird. Diese Reaktionen laufen auch nur bei Licht ab.

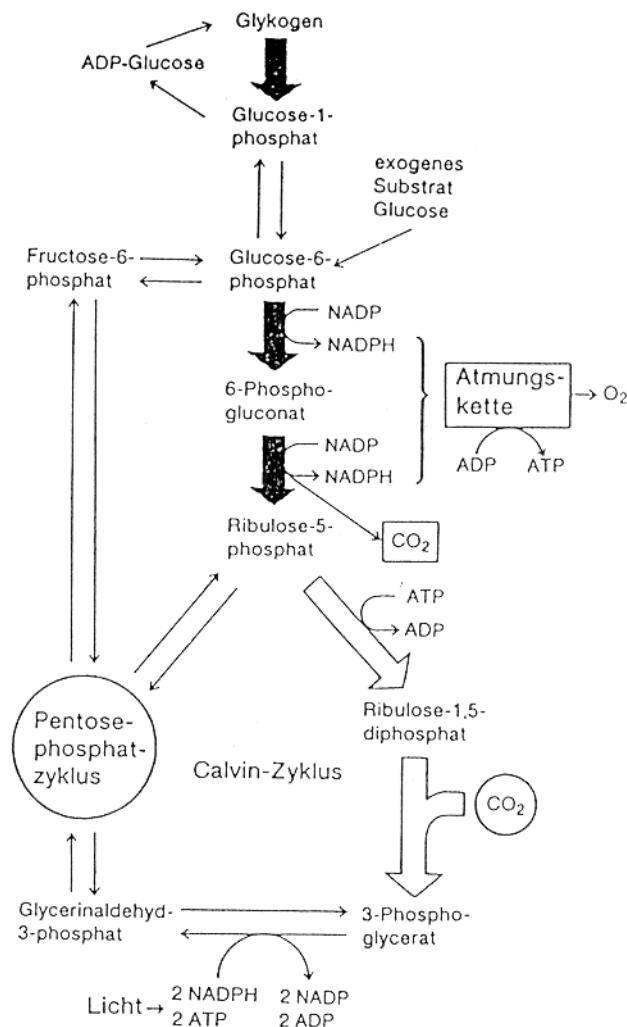


Abb.: Schema des Calvin-Zyklus bis zum Glykogenaufbau

Die photosynthetische Elektronentransportkette befindet sich bei den Cyanobakterien in der Thylakoidmembran = ICM(intracytoplasmatische Membran). Die Elektronentransportkette besteht aus drei großen, transmembranen Proteinkomplexen (Photosystem I (PS I), Photosystem II (PS II) und dem Cytochrom b₆f Komplex) und einigen kleineren, teilweise in der Membran beweglichen Komponenten (z.B. Plastochinon) und dem terminalen Akzeptor NADP⁺.

Nach Sandmann werden die Cyanobakterien nach dem Vorhandensein von zwei bis jetzt bekannten löslichen Elektronencarriern Plastocyanin und Cytochrom c₅₅₃ in drei Gruppen geteilt [3].

1. nur Cytochrom c₅₅₃: kein Gen für Plastocyanin vorhanden (z.B. *Synechococcus* sp. PCC 7002)

2. Cytochrom c_{553} konstitutiv und Plastocyanin nur in Anwesenheit von Kupfer vorhanden (z.B. *Pseudanabena* sp.)
3. Cytochrom c_{553} oder Plastocyanin, je nach Anwesenheit von Kupfer im Medium, bei 30nM Kupfergehalt im Medium ist kein Plastocyanin nachzuweisen (z.B. *Synechocystis* sp. PCC 6803)

Da *Synechocystis* sp. PCC 6803 in die dritte Sandmanngruppe gehört, kann man durch Variation des Kupfergehaltes im Medium entweder die Expression von Plastocyanin ($> 1\mu\text{M}$ Kupfer) oder die Expression von Cytochrom c_{553} ($< 0,1\mu\text{M}$ Kupfer) induzieren. Bei 20-30nM Kupfergehalt im Medium ist nach Zhang et. al.[4] keine Plastocyanin-mRNA im Northern Blot mehr nachzuweisen.

ATMUNG

Die Atmung ist definiert als eine Sequenz von Redoxreaktionen (= respiratorische Elektronentransportkette) mit NAD(P)H oder anderen reduzierten Molekülen als Elektronendonator und verschiedenen Elektronenakzeptoren (meist O_2) unter Bildung eines pH-Gradienten und weiters von ATP (nach Mitchell-Hypothese).

Die Atmung ist bei allen Eukaryoten in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und bei den aeroben Bakterien in der Cytoplasmamembran. Bei den photosynthetischen Bakterien mit Thylakoiden (Cyanobakterien) treten zwei getrennte und wahrscheinlich unterschiedliche Atmungsketten auf, eine in der Cytoplasmamembran und eine in der Thylakoidmembran.

Die Atmungskette in der Cytoplasmamembran der Cyanobakterien sieht ungefähr folgendermaßen aus. Die Elektronentransportkette in der Cytoplasmamembran geht von NAD(P)H über den Chinolpool zum Cytochrom b_6f -Komplex und weiter auf die Endoxidasen (z.B. Cytochrom c oxidase).

In der Thylakoidmembran ist die Elektronentransportkette komplizierter, da sich die Atmung und die Photosynthese verschiedene Komponenten teilen. Wie diese zwei Ketten in einer einzigen Membran reguliert werden, ist noch gänzlich unbekannt. Bekannt ist nur, dass im Licht keine vollständige Atmung stattfindet = Lichtinhibierung der Atmung.

AUFGABENSTELLUNG

Cyanobakterien (früher Blaualgen) gehören zu den photoautotrophen Eubakterien und sind zur oxygenen Photosynthese befähigt. *Synechocystis* sp. PCC6803 ist ein einzelliges photolithoautotrophes Eubakterium, das von R. Kunisawa als *Aphanocapsa* N-1 im Frischwasser in Californien, U.S.A. 1968 isoliert wurde und ist identisch mit dem Isolat *Synechocystis* sp. ATCC 27184 von R. Y. Stanier. Es hat einen Durchmesser von 2,3-2,5 µm, keine Gasvakuolen, ist N₂ Fixierung negativ und hat eine Genomgröße von 3,57 Mbp.

Eine Manipulation des Cyanobakteriengenoms geschieht entweder durch statistische Mutagenese (mit UV-Bestrahlung oder Chemikalien) oder durch site-specific Mutagenese. Dabei wird entweder rekombinante DNA in die Zellen gebracht und diese manifestiert sich durch autonome Replikation. Oder die DNA integriert durch homologe Rekombination in das Zellgenom, wenn dieses homologe Bereiche aufweist. *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist natürlich transformierbar, d. h. die Zellen sind kompetent für die Aufnahme freier DNA, neben dem Gentransfer mittels Konjugation oder Elektroporation.

Proteine, die in der homologen Rekombination mitwirken, sind in *E.coli* recht gut beschrieben [3], über die Rekombination in *Synechocystis* ist hingegen sehr wenig bekannt. In *E.coli* gibt es vier unabhängige Wege für homologe Rekombination. Der *recBCD* Weg stellt den dominanten Weg der homologen Rekombination dar. Dieser Proteinkomplex hat mehrere Funktionen, eine Helikaseaktivität, eine ds- und ss-DNA Exonukleaseaktivität und eine ss-DNA Endonukleaseaktivität. Der *recJQ* Weg erzeugt durch die Helikaseaktivität des RecQ und der ss-DNA Exonukleaseaktivität des RecJ Proteins ein geeignetes Substrat für RecA. Die Proteine RecFOR bilden einen funktionell ähnlichen Komplex wie RecBCD. Die genaue Funktion dieser Proteine ist noch nicht geklärt. In Abwesenheit von RecBCD werden RecFOR für die inter- und intramolekulare Rekombination von Plasmiden und bei der postreplikativen Reparatur benötigt. Der *recET* Weg stellt eine Alternative zu den anderen Wegen dar. Bei den Rekombinationsereignissen dieser beiden Proteine wird im Gegensatz zu den anderen Wegen kein *recA* Genprodukt benötigt. Eine Sonderstellung nimmt RecA ein. Dieses Protein wird in den drei ersten Wegen für die Bildung der Tripelhelix benötigt.

In *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist über Gene, die bei der homologen Rekombination beteiligt sind, nichts bekannt. Nur im Cyanobakterium *Synechococcus* gibt es Untersuchungen über *recA*. Die Versuche von Murphy et al. [5] eine *recA*⁻ Mutante in *Synechococcus* sp. PCC

7002 zu generieren, zeigten dass *recA* für *Synechococcus* essentiell ist. Die Gesamtsequenz von *Synechocystis* 6803 ist seit 1996 bekannt [2]. In dieser wurden vermutete Rekombinations-Gene anhand von Homologievergleichen identifiziert. Den *recBCD*- und den *recET*- Weg dürfte es in *Synechocystis* nicht geben, da keinerlei Homologie zu den *E.coli* Genen gefunden wurde. Gute Homologie zu einem *E.coli* Gene weist eine Sequenz auf. Es entspricht der *recJ* Sequenz von *E.coli*.

Das RecJ Protein von *E.coli* ist schon frühzeitig entdeckt und untersucht worden. RecJ hat die Funktion einer 5'-3' Exonuklease von ss-DNA [6]. Die einfache *recJ* Mutation in *E.coli* hat keine Auswirkung auf die Rekombination. Aber in einem *recBCD*⁻ Stamm hat die zusätzliche *recJ* Mutation starke Auswirkung auf die konjugale Rekombination und die UV-Sensitivität. Im Wildtyp wird *recJ* für den *recFOR* und den *recET* Rekombinationsweg gebraucht. Diese Möglichkeiten (*recFOR* und *recET*) der Rekombination sind unabhängig vom *recBCD* Weg. Der *recBCD* Weg ist in den Wildtypzellen der dominante Weg um zu rekombinieren. Mutationen von *recJ* in Stämmen die *recBCD*⁻ waren haben gezeigt, daß *recJ* für die alternativen Rekombinationswege *recFOR* und *recET* benötigt wird [6].

Ein BLAST der *recJ* Proteinsequenz aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 mit anderen Organismen ergab eine sehr hohe Homologie mit *E.coli* und *Haemophilus influenzae*. Doch ist das *Synechocystis*-Protein um ca. 180 Aminosäuren länger als das *E.coli*- und das *Haemophilus*-Protein. Was das zu bedeuten hat ist noch unklar.

Rec J soll mit Hilfe homologer Rekombination deletiert und mit einer Kanamycinresistenz ersetzt werden. Anschließend soll untersucht werden, ob die homozygote Mutante einen Phänotyp besitzt.

HERSTELLUNG EINER *recJ* (sll1354) NEGATIVEN MUTANTE AUS *SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803*

Die chromosomale DNA von *Synechocystis sp. PCC 6803* wurde isoliert (siehe Materialteil). Mit Hilfe der Primer *recJ*-3' und *recJ*-5' (die genauen Stellen in der DNA-Sequenz sind im Materialteil/Gene ersichtlich) wurde die *recJ* Sequenz amplifiziert und in den Vektor pUC 19 kloniert. Dieses Plasmid wurde in der Stammsammlung unter pMSUV 5 abgelegt. Mit dem Restriktionsenzym *NcoI* wurde ein Großteil des *recJ*-Gens entfernt und stattdessen die Kanamycinkassette aus pRL 446 hineinkloniert. Die genaue Beschreibung des Vektors pMSUV 11 findet sich im Materialteil/Plasmide. Mit Hilfe einer Restriktionsanalyse wurde die richtige Länge und die Orientierung der Km-Kassette festgestellt (dies wurde im Zuge der Diplomarbeit gemacht).

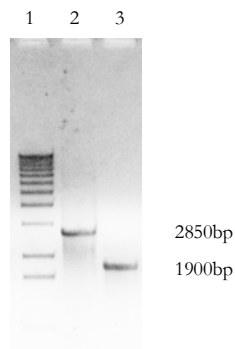
Es wurde eine Plasmidpräp. für die Transformation von *Synechocystis sp. PCC 6803* verwendet. Kurz eine logarithmisch wachsende *Synechocystis sp.* Kultur wurde mit ca. 8 µg Plasmid DNA gemischt und 24 Stunden unter Licht inkubiert. Dann wurden die Cyanobakterien auf einen Membranfilter auf nichtselektiven Medium unter Licht 48 Stunden kultiviert. Danach wurde der Filter auf selektives Medium transferiert. Genaue Ausführung siehe Methodenteil/Transformation von *Synechocystis*.

Nach ca. einer Woche waren hunderte Einzelkolonien, Transformanten, zu sehen. Einzelne Kolonien wurden gepickt und jede auf einer BG 11-TS Agarplatte + Km für Einzelkolonien ausgestrichen.

Nach eineinhalb Wochen waren die Kolonien groß genug um damit eine 50ml Flüssigkultur BG 11-TS + Km anzupfen. Eineinhalb Wochen später wurde ein Aliquot der Kultur in ein frisches Medium überimpft. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt.

Nachdem auch diese Kultur dicht angewachsen war, wurde eine Small-DNA-Präp. (siehe Methodenteil) von der Mutante gemacht. Mit dieser DNA wurde mit den Primern *recJ*-3' und *recJ*-5' PCR gemacht und die Produkte auf einen 1w/v% Agarosegel aufgetrennt. Die Wildtypbande des *recJ*-Gens soll 2855 bp lang sein und die Bandenlänge des mutierten Genoms 1900 bp.

Abb.: PCR des Wildtyps und der *recJ*-Mutante nach zweimaliger sukzessiver Zucht

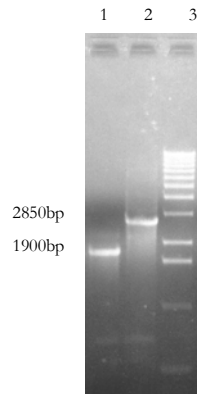


lane 1: X-Marker
lane 2: Wildtyp, erwartete Bande 2855 bp
lane 3: MSJ1, erwartete Bande 1900 bp

Da in der Lane mit der MSJ1 Mutante keine wt-Bande mehr zu sehen ist, kann angenommen werden, daß der *recJ*-Locus homozygot mutiert ist.

Um etwaige wt-Allele, die mit der PCR nicht entdeckt wurden, zu sehen, wurde die Kultur zweimal hintereinander in nichtselektivem BG 11-TS-Medium bis zur stationären Wachstumsphase gezüchtet. Es wäre zu erwarten, dass unter nichtselektivem Wachstum jegliches verbliebene wt-Allel wieder angereichert würde, und so nach erneuter DNA-Präp. mit der PCR wieder nachgewiesen werden könnte (siehe Methodenteil/Transformation von *Synechocystis*).

Abb.: PCR des Wildtyps und der *recJ*-Mutante nach zweimaliger nicht selektiver sukzessiver Zucht



lane 1: MSJ1, erwartete Bande 1900bp
lane 2: Wildtyp, erwartete Bande 2855bp
lane 3: X-Marker

Es war kein wt-Allel bei der Überprüfung zu sehen, so wurde die MSJ1 Mutante als homozygot mutiert im *recJ*-Lokus aufbewahrt.

ÜBERPRÜFUNG DER MSJ1 MUTANTE AUF PHÄNOTYPISCHE MERKMALE

Spontanmutagenese

Für eine Spontanmutationsrate wurde das Model der Fruktoseresistenz gewählt. Fruktose wirkt für *Synechocystis sp.* PCC 6803 wie ein Antibiotikum. Fruktose wird mit dem gleichen Transportprotein wie Glukose aufgenommen. Ist dieses in seiner Funktion gestört, kann keine Glukose bzw. Fruktose aufgenommen werden. Durch spontane Mutation im Glukose /Fruktose Transporter [7,8] kann allerdings schnell eine Resistenz entstehen.

Es wurden exponentiell wachsende Kulturen vom Wildtyp und von MSJ1 (OD= 0,5) auf BG 11-TS Agarplatten + Fruktose (15mM) ausgestrichen und 2 Wochen in der Klimakammer unter Licht kultiviert. Die resistenten Kolonien wurden ausgezählt. Mit Hilfe des viable count = lebende Zelle pro ml, wurde die Spontanmutationsrate berechnet.

Spontanmutationsrate

	Viable Count $\times 10^6$	Transformanten	Transformations- Rate $\times 10^{-6}$		Viable Count $\times 10^6$	Transformanten	Transformations- Rate $\times 10^{-6}$
Wildtyp1	1,95	17	8,78	MSJ1-1	9,05	16	1,76
Wildtyp2	1,95	2	1,02	MSJ1-2	9,05	196	21,65
Wildtyp3	1,95	11	5,64	MSJ1-3	9,05	18	1,98
Wildtyp4	1,95	63	32,3	MSJ1-4	9,05	4	0,44
Wildtyp5	1,95	22	11,28	MSJ1-5	9,05	307	33,92

Die Spontanmutationsrate wurde fünf Mal unabhängig angesetzt und ausgewertet. Es wurde kein Unterschied in der Transformationsrate zwischen dem Wildtyp und der MSJ1 Mutante gefunden.

UV- Mutagenese

Für eine UV-Mutationsrate wurde wieder das Model der Fruktoseresistenz gewählt. Fruktose wirkt für *Synechocystis sp.* PCC 6803 wie ein Antibiotikum. Für die Mutagenese wurde diesmal UV –Licht verwendet.

Es wurden exponentiell wachsende Kulturen vom Wildtyp und von MSJ1 (OD= 0,5) unterschiedlich lange mit UV –Licht (254nm) bestrahlt. Dazu wurden 5 ml dieser Kulturen auf einem Nitrozellulosefilter auf BG 11-TS Agarplatten ausgestrichen. Nachdem die Zellen auf dem Agar angetrocknet waren, wurden die geöffneten Platten in einer dunklen Kammer verschieden lange mit UV –Licht bestrahlt. Die Zellen wurden zwei Tage auf nicht selektiven BG 11-TS Agarplatten in der Klimakammer unter Licht kultiviert. Danach wurde den die Platten mit BG 11-TS Weichagar + Fruktose (15mM) überschichtet. Alle unterschiedlich lang UV bestrahlten Kulturen wurden 2 Wochen in der Klimakammer unter Licht kultiviert. Die resistenten Kolonien wurden ausgezählt. Mit Hilfe des viable count = lebende Zelle pro ml, wurde die Spontanmutationsrate berechnet.

UV-Mutationsrate

Wildtyp				MSJ1			
UV Belichtungszeit	Viable Count $\times 10^6$	Transformanten	Transformations-Rate $\times 10^{-6}$	UV Belichtungszeit	Viable Count $\times 10^6$	Transformanten	Transformations-Rate $\times 10^{-6}$
0 sec.	6,7	1266	186,72	0 sec.	6,1	2125	344,018
30 sec.	6,7	1604	239,17	30 sec.	6,1	1311	212,238
60 sec.	6,7	866	129,09	60 sec.	6,1	1639	265,339
120 sec.	6,7	62	9,24	120 sec.	6,1	238	38,53

Die UV-Mutationsrate wurde zwei Mal unabhängig angesetzt und ausgewertet. Es konnte kein auffälliger Unterschied in der Transformationsrate zwischen dem Wildtyp und der MSJ1 Mutante gefunden.

Natürliche Transformation

Für die Überprüfung der natürlichen Transformierbarkeit von *Synechocystis sp.* PCC 6803 wurden zwei verschiedene Plasmidtypen verwendet. Einmal das replikative Plasmid pKT210 und das integrative Plasmid pJM8. pKT210 beinhaltet ein Replikon mit einem *oriT* für die unabhängige Replikation in *Synechocystis sp.* und Gene für die eigene Mobilisierbarkeit *mob*-Gene. pJM8 besteht aus einem pUC 18 Vektor mit einem großen chromosomalen DNA-Fragment aus *Synechocystis sp.* PCC 6803. Das Insert enthält das *psbA1*-Gen, von welchem ca. 60% aus der Mitte herausgeschnitten sind und durch eine Cm-Kassette (aus Tn9) ersetzt wurde. Die Homologie des Inserts zum *psbA1*-Gen in *Synechocystis sp.* ermöglicht die Integration der Resistenzkassette in das Cyanobakteriengenom durch homologe Rekombination.

Für die Überprüfung der Transformierbarkeit des Wildtyps und MSJ1 wurden je 100µl einer exponentiell wachsenden Kultur mit 0,2µg pJM8 Plasmid DNA oder mit 2µg pKT210 Plasmid DNA gemischt. Diese Zell DNA Suspension wurde über Nacht in der Klimakammer unter Licht kultiviert. Danach wurden die Zellen zwei Tage auf nicht selektiv en BG 11-TS Agarplatten in der Klimakammer unter Licht weiter inkubiert. Für die weitere selektive Kultivierung wurden die Platten mit Weichagar mit Selektivmedium überschichtet. Nach 2

Wochen in der Klimakammer unter Licht wurden die resistenten Kolonien ausgezählt. Mit Hilfe des viable count = lebende Zelle pro ml, wurde die Transformationsrate berechnet.

Transformationsraten

	Viable Count $\times 10^6$	pJM8 (0,2 μ g DNA)		pKT210 (2 μ g DNA)	
		Transformanten	Transformations- Rate $\times 10^{-6}$	Transformanten	Transformations- Rate $\times 10^{-6}$
Wildtyp	10,2	410+/-280	40,19	0	0
MSJ1	15,6	55916+/-24877	3570,66	10+/-9	0,67

Die Transformationsrate wurde vier Mal unabhängig angesetzt und ausgewertet. Es wurde jedesmal ein Unterschied in der Transformationsrate um einen Faktor 100 zwischen dem Wildtyp und der MSJ1 Mutante beim integrativen Plasmid pJM8 gefunden. Die MSJ1 Mutante ist also 100-mal besser transformierbar mit homologer DNA als der Wildtyp.

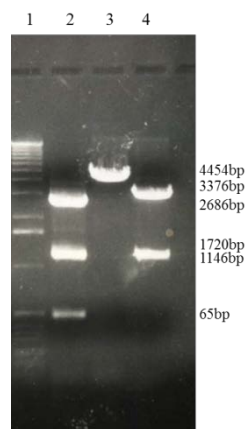
Beim replikativen Plasmid pKT210 zeigte sich auch eine höhere Transformierbarkeit der MSJ1 Mutante gegenüber dem Wildtyp, aber nur um ca. einen Faktor 10.

Letztendlich zeigte die *recJ* negative Mutante ein phänotypischen Merkmal: eine gesteigerte Transformierbarkeit auf natürlichem Weg.

UNABHÄNGIGE HERSTELLUNG DER *recJ* (sll1354) NEGATIVEN MUTANTE VON *SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803* MIT EINEM ANDEREN PLASMID

Von einer Plasmid DNA Präparation pMSUV 11 wurde (siehe Materialteil) mit Hilfe der Primer *recJ*-BglII-1 und *recJ*-BglII-2 (die genauen Stellen in der DNA-Sequenz sind im Materialteil/Gene und Primer ersichtlich) wurde die Plasmid Sequenz amplifiziert. Die Primer waren so ausgewählt, dass vom offenen Leserahmen des *RecJ* Proteins nur mehr 25 bp übrig bleiben. Durch eine reverse PCR des Plasmides pMSUV 11 mit den Primern *recJ*-BglII-1 und *recJ*-BglII-2 (Methoden/ Primer), bleibt die homologe Umgebungssequenz von *recJ* noch vorhanden. Aus dem Plasmid pRL446 wurde die Km Resistenzkassette mit *Bam*HI ausgeschnitten, mit Hilfe eines 1% Agarosegels vom Rest des Vektors getrennt, ausgeschnitten aus dem Gel und aufgereinigt für eine Ligation. Das PCR Produkt wurde ebenfalls über ein Agarosegel von PCR Bruchstücken getrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt für die Ligation. Ein Teil des Ligationsansatzes (Methoden/ Ligationen) wurde in *E.coli.* transformiert (Methoden/ Transformation von *E.coli.*) und diese auf selektiven Agarplatten + Km kultiviert. Aus resistenten Kolonien wurden die Plasmide eluiert (Methoden/ Koch-Quick-Präp.) und einer Restriktionsanalyse unterzogen. Mit Hilfe dieser Restriktionsanalyse wurden die richtige Länge der Ligation und die Orientierung der Km-Kassette festgestellt. Die genaue Beschreibung des Vektors pMSUV25A findet sich im Materialteil/ Plasmide.

Abb.: Restriktionsanalyse des pMSUV 25A Plasmides



lane 1: X-Marker

lane 2: pMSUV25A *Hind*II verdaut, erwartete Bande 2686bp, 1720bp und 65bp

lane 3: pMSUV25A *Eco*RI verdaut, erwartete Bande 4454bp

lane 4: pMSUV25A *Hind*III verdaut, erwartete Bande 3376bp und 1146bp

Der Vektors pMSUV25A wurde mit *EcoRI*, *HindII* und *HindIII* verdaut. *EcoRI* schneidet nur 1x im Vektor was eine Bande mit 4454bp Länge ergibt. *HindIII* schneidet 2x und ergibt mit der Orientierung der Km-Kassette paralell zum *recJ* Gen Banden von der Länge 3376 bp und 1146 bp. *HindII* schneidet 3x und ergibt mit der Orientierung der Km-Kassette paralell zum *recJ* Gen Banden von der Länge 2686 bp, 1720 bp und 65 bp.

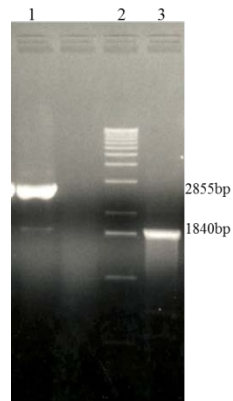
Es wurde eine Plasmidpräp. Von pMSUV25A für die Transformation von *Synechocystis sp.* PCC 6803 verwendet. Kurz eine logarithmisch wachsende *Synechocystis sp.* Kultur wurde mit ca. 8µg Plasmid DNA gemischt und 24 Stunden unter Licht inkubiert. Dann wurden die Cyanobakterien auf einen Membranfilter auf nicht selektivem Medium unter Licht 48 Stunden kultiviert. Danach wurde der Filter auf selektives Medium transferiert. Genaue Ausführung siehe Methodenteil/Transformation von *Synechocystis*.

Nach ca. einer Woche waren Einzelkolonien, Transformanten, zu sehen. Einzelne Kolonien wurden gepickt und jede auf einer BG 11-TS Agarplatte + Km für Einzelkolonien ausgestrichen.

Nach eineinhalb Wochen waren die Kolonien groß genug um damit eine 50ml Flüssigkultur BG 11-TS + Km anzupfen. Eineinhalb Wochen später wurde ein Aliquot der Kultur in einen frisches Medium + Km überimpft. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt.

Nachdem auch diese Kultur dicht angewachsen war, wurde eine Small-DNA-Präp. (siehe Methodenteil) von der Mutante und dem Wildtyp gemacht. Mit dieser DNA wurde mit den Primern *recJ*-3' und *recJ*-5' PCR gemacht und die Produkte auf einen 1w/v% Agarosegel aufgetrennt. Die Wildtypbande des *recJ*-Gens soll 2855 bp lang sein und die Bandenlänge des mutierten Genoms 1840 bp.

Abb.: PCR des Wildtyps und der *recJ-2* Mutante nach zweimaliger selektiver Zucht



lane 1: Wildtyp, erwartete Bande 2855 bp
lane 2: X-Marker
lane 3: MSJ2, erwartete Bande 1840 bp

Da in der Lane mit der *recJ-2* Mutante keine wt-Bande mehr zu sehen ist, kann angenommen werden, dass der *recJ*-Locus homozygot mutiert ist. Dieser *recJ::Km* Mutante wurde als MSJ2 aufbewahrt.

Um etwaige wt-Allele, die mit der PCR nicht entdeckt wurden, zu sehen, wurde die Kultur zweimal hintereinander in nichtselektivem BG 11-TS-Medium bis zur stationären Wachstumsphase gezüchtet. Es wäre zu erwarten, dass unter nichtselektivem Wachstum jegliches verbliebene wt-Allel wieder angereichert würde, und so nach erneuter DNA-Präp. mit der PCR wieder nachgewiesen werden könnte (siehe Methodenteil/Transformation von *Synechocystis*).

Es konnte kein wt-Allel bei der Überprüfung gefunden werden und so wurde die MSJ2 Mutante als homozygot mutiert im *recJ*-Lokus eingefroren.

ÜBERPRÜFUNG DER MSJ2 MUTANTE AUF ÄNDERUNG DER TRANSFORMATIONSRATE

Natürliche Transformation

Für die Überprüfung der natürlichen Transformierbarkeit von *Synechocystis sp.* PCC 6803 wurden wieder zwei verschiedene Plasmidtypen verwendet. Einmal das replikative Plasmid pKT210 und das integrative Plasmid pJM8. pKT210 beinhaltet ein Replikon mit einem *oriT* für die unabhängige Replikation in *Synechocystis sp.* und Gene für die eigene Mobilisierbarkeit

mob-Gene. pJM8 besteht aus einem pUC 18 Vektor mit einem großen chromosomalen DNA-Fragment aus *Synechocystis sp.* PCC 6803. Das Insert enthält das *psbAI*-Gen, von welchem ca. 60% aus der Mitte herausgeschnitten sind und durch eine Cm-Kassette (aus Tn9) ersetzt wurde. Die Homologie des Inserts zum *psbAI*-Gen in *Synechocystis sp.* ermöglicht die Integration der Resistenzkassette in das Cyanobakteriengenom durch homologe Rekombination.

Für die Überprüfung der Transformierbarkeit des Wildtyps und MSJ2 wurden je 100µl einer exponentiell wachsenden Kultur mit 0,2µg pJM8 Plasmid DNA oder mit 2µg pKT210 Plasmid DNA gemischt. Diese Suspension wurde über Nacht in der Klimakammer unter Licht kultiviert. Danach wurden die Zellen zwei Tage auf nicht selektiv en BG 11-TS Agarplatten in der Klimakammer unter Licht weiter inkubiert. Für die weitere selektive Kultivierung wurden die Platten mit Weichagar mit Selektivmedium überschichtet. Nach 2 Wochen in der Klimakammer unter Licht wurden die resistenten Kolonien ausgezählt. Mit Hilfe des viable count = lebende Zelle pro ml, wurde die Transformationsrate berechnet.

Transformationsraten

		pJM8 (0,2µg DNA)		pKT210 (2µg DNA)	
	Viable Count $\times 10^{-6}$	Transformanten	Transformations- Rate $\times 10^{-6}$	Transformanten	Transformations- Rate $\times 10^{-6}$
Wildtyp	8,7	80+/-28	9,19	5+/-1	0,51
MSJ2	9,8	2530+/-594	256,85	107+/-48	10,93

Die Transformationsrate wurde drei Mal unabhängig angesetzt und ausgewertet. Es wurde jedes Mal wieder ein Unterschied in der Transformationsrate um einen Faktor 100 zwischen dem Wildtyp und der MSJ2 Mutante beim integrativen Plasmid pJM8 gefunden. Beim replikativen Plasmid pKT210 zeigte sich auch eine höhere Transformierbarkeit der MSJ2 Mutante gegenüber dem Wildtyp, aber nur um ca. einen Faktor 10.

Der Phänotyp der gesteigerten Transformierbarkeit der *recJ* negativen Mutante konnte auch in der unabhängig hergestellten MSJ2 Mutante gezeigt werden.

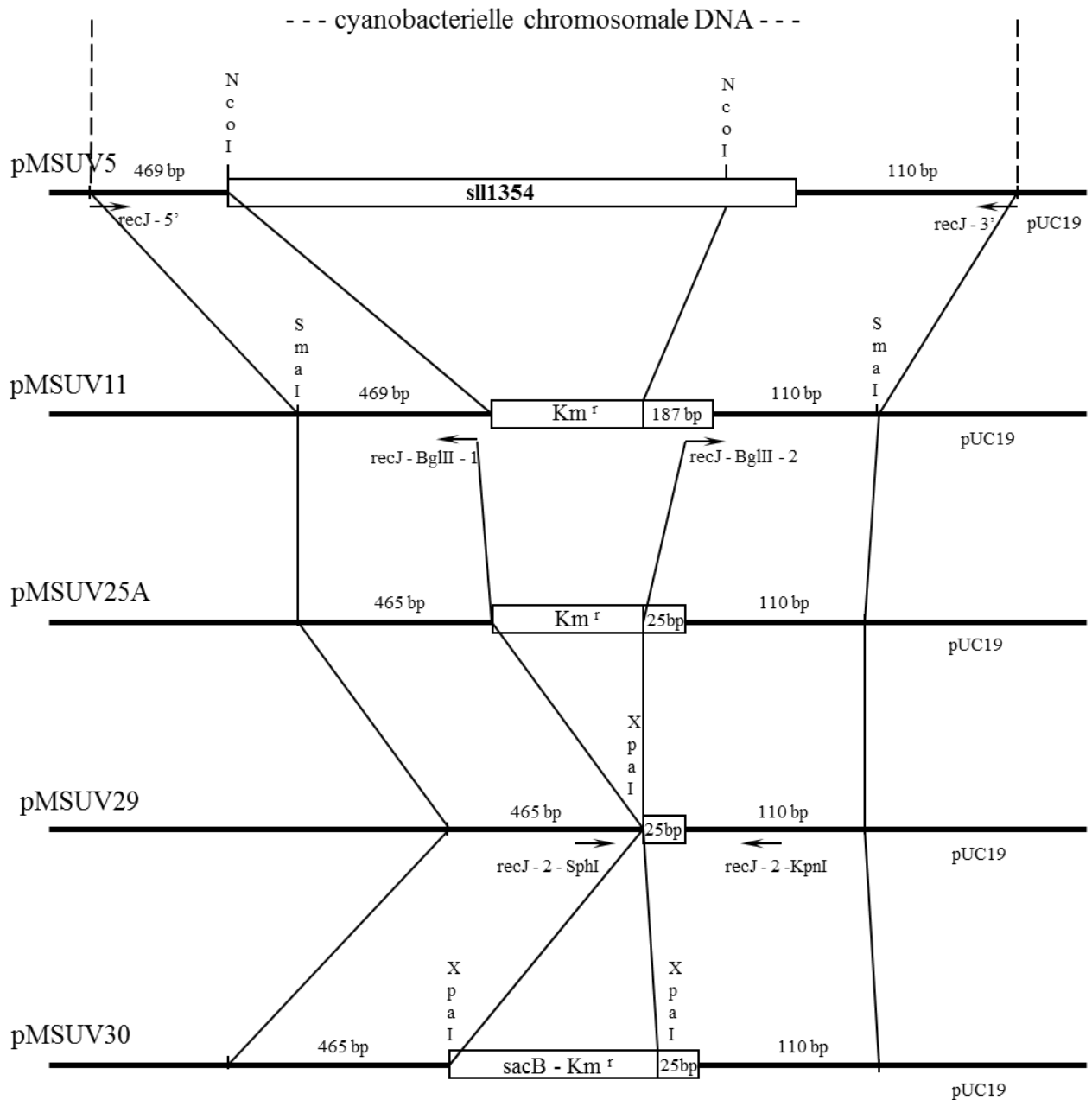
HERSTELLUNG EINER *recJ* NEGATIVEN MUTANTE AUS *SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803*, DIE KEINE RESISTENZKASSATTE IM DELETIERTEN *recJ* GEN ENTHÄLT

Da es in der Mikrobiologie immer kritisch ist genügend Selektionsmarker für gleichzeitige Mutagenesen in einer Zelle zu haben, wurde die *recJ* negative Mutante erneut mit Hilfe einer *SacB* Technik [9,10] hergestellt. Das *sacB* Gen codiert für eine Levansucrase von *B.subtilis*. Die Produktion von Levansucrase wird durch die Anwesenheit von Sucrose/ Rohrzucker induziert. Die Expression des *sacB* Proteins ist für gram-neg. Bakterien und Cyanobakterien, welche auch einen gram-neg. Zellwandaufbau haben, letal [11,12].

Dadurch kann mit Sucrose im Medium auf den Verlust der *sacB*/ Km Kasette selektiert werden. *SacB* und die Km Kasette können gemeinsam durch einen Verdau mit *XbaI* aus pRL250 ausgeschnitten werden und ergeben eine Fragmentlänge von ca. 3800 bp.

Um die Entstehungsgeschichte der bis jetzt verwendeten Plasmide und der noch zu bauenden Plasmide übersichtlicher zu machen, ist ein Stammbaum der Plasmide zusammengestellt worden. Darin sind wichtige Restriktionsschnittstellen eingezeichnet und die Primer Bindungsstellen, welche zur Mutanten Überprüfung verwendet wurden.

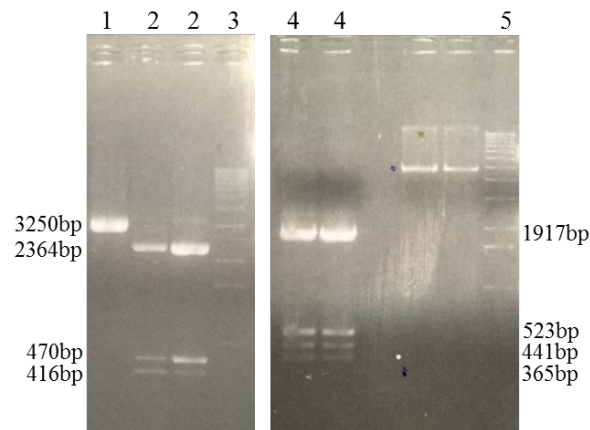
Stammbaum der Plasmide:



Für die Herstellung der *recJ* neg. + Resistenz neg. Mutante wurde das Plasmid pMSUV 25A mit *XbaI* verdaut um die *Km*-Kassette herauszuschneiden. Die entstandenen DNA Stücke des Verdaues wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und das 3250 bp lange Fragment, der Vektor ohne *Km*-Kassette, ausgeschnitten. Dieses Fragment wurde aus dem Gel eluiert und religiert. Das legierte Plasmid wurde in DH5 α (*E.coli.*) transfiziert und selektiv mit der verbliebenen Resistenz des Vektors (Ampicillin) vermehrt. Nach einer Aufreinigung

(Methodenteil/ Koch-Quick) aus *E.coli.* wurde das Plasmid einer Restriktionsanalyse unterzogen. Die genaue Beschreibung des Vektors pMSUV29 findet sich im Materialteil/ Plasmide.

Abb.: Rerstriktionsanalyse des pMSUV 29 Plasmides

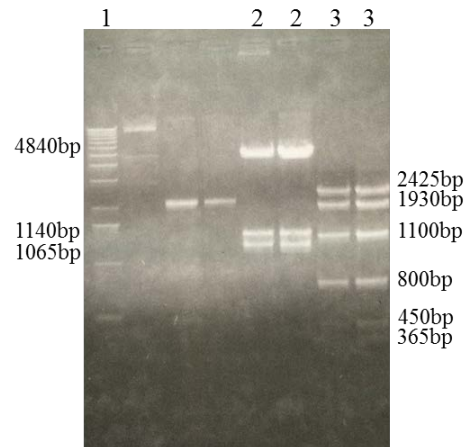


- lane 1: pMSUV29 *HpaI* verdaut, erwartete Bande 3250 bp
- lane 2: pMSUV29 *PvuII* verdaut, erwartete Bande 2364 bp, 470 bp und 416 bp
- lane 3 und 4: X-Marker
- lane 4: pMSUV29 *NspI* verdaut, erwartete Bande 1917 bp, 523 bp, 441 bp und 365 bp

Der Vektors pMSUV29 wurde mit *HpaI*, *NspI* und *PvuII* verdaut. *HpaI* schneidet nur 1x im Vektor was eine Bande mit 3250bp Länge ergibt. *PvuII* schneidet 3x und ergibt Längen von 2364 bp, 470bp und 416 bp. *NspI* schneidet 4x und ergibt Längen von 1917 bp, 523 bp, 441bp und 365 bp.

Paralell dazu wurde die *SacB/ Km* Kasette durch einen Verdau mit *XbaI* des Plasmides pRL250 (Beschreibung siehe Material/ Plasmide) ausgeschnitten. Die Plasmid Fragmente wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und das Fragment mit 3800 bp Länge aus dem Gel eluiert. Die *SacB/ Km* Kasette und das 3250 bp lange Fragment des pMSUV 25A wurden legiert. Die Ligation wurde in DH5 α (*E.coli.*) transfiziert und selektiv mit der Km Resistenz des Vektors vermehrt. Nach einer Aufreinigung (Methodenteil/ Koch-Quick) aus *E.coli.* wurde das Plasmid einer Restriktionsanalyse unterzogen. Die genaue Beschreibung des Vektors pMSUV30 findet sich im Materialteil/ Plasmide.

Abb.: Rerstriktionsanalyse des pMSUV 30 Plasmides



lane 1: X-Marker

lane 2: pMSUV30 *Hind*III verdaut, erwartete Bande 4840 bp, 1140 bp und 1065 bp

lane 3: pMSUV30 *Nsp*I verdaut, erwartete Bande 2425 bp, 1930 bp, 1100 bp, 800 bp, 450 bp und 365bp

Der Vektors pMSUV30 wurde mit *Nsp*I und *Hind*III verdaut. *Hind*III schneidet nur 3x im Vektor und ergibt Banden mit 4840 bp, 1140 bp und 1065 bp Länge. *Nsp*I schneidet 6x und ergibt Längen von 2425 bp, 1930bp, 1100 bp, 800bp, 450 bp und 365 bp.

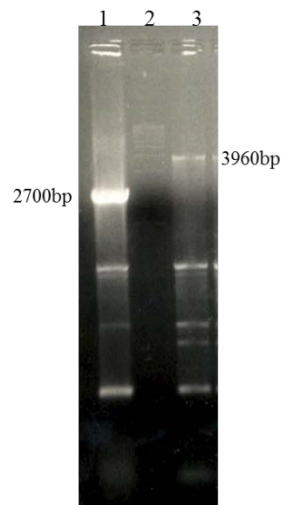
Es wurden Plasmid Präparationen von beiden Plasmiden für die Transformation von *Synechocystis sp.* PCC 6803 verwendet. Als erstes wurde *Synechocystis sp.* mit pMSUV30 transformiert. Kurz eine logarithmisch wachsende *Synechocystis sp.* Kultur wurde mit ca. 8µg Plasmid DNA gemischt und 24 Stunden unter Licht inkubiert. Dann wurden die Cyanobakterien auf einen Membranfilter auf nicht selektivem Medium unter Licht 48 Stunden kultiviert. Danach wurde der Filter auf selektives Medium transferiert. Genaue Ausführung siehe Methodenteil/Transformation von *Synechocystis*.

Nach ca. einer Woche waren Einzelkolonien, Transformanten, zu sehen. Einzelne Kolonien wurden gepickt und jede auf einer BG 11-TS Agarplatte + Km für Einzelkolonien ausgestrichen.

Nach eineinhalb Wochen waren die Kolonien groß genug um damit eine 50ml Flüssigkultur BG 11-TS + Km anzuimpfen. Eineinhalb Wochen später wurde ein Aliquot der Kultur in einen frisches Medium + Km überimpft. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt.

Nachdem auch diese Kultur dicht angewachsen war, wurde eine Small-DNA-Präp. (siehe Methodenteil) von der Mutante und dem Wildtyp gemacht. Mit dieser DNA wurde mit den Primern *recJ2-Kpn*I und *recJ2-Sph*I PCR gemacht und die Produkte auf einen 1w/v% Agarosegel aufgetrennt. Die Wildtypbande des *recJ*-Gens soll 2700 bp lang sein und die Bandenlänge der veränderten *recJ::sacB::Km* Gensequenz 3960 bp.

Abb.: PCR des Wildtyps und der *recJ::sacB::Km* Mutante nach zweimaliger selektiver Zucht



lane 1: Wildtyp, erwartete Bande 2700 bp
lane 2: X-Marker
lane 3: *recJ::sacB* Mutante, erwartete Bande 3960 bp

Die *recJ::sacB::Km* 6803 Mutante ist nach dem Bandenmuster homozygot im *recJ* Lokus mutiert. Die gewünschte *recJ::sacB::Km* Bande von 3960 bp ist zu sehen und keine wt Band von *recJ*. Es wurde beschlossen mit dieser *recJ::sacB::Km* Mutante weiter zu arbeiten ohne einer zweimaligen nicht selektiver Zucht, da das *sacB::Km* Fragment nur für die Selektion verwendet wird und aus dem Genom wieder entfernt wird.

Also wurde die *recJ::sacB::Km* 6803 Mutante mit pMSUV29, dem *recJ* neg. und Resistenz neg Vektor transformiert. Wiederum eine logarithmisch wachsende *recJ::sacB::Km* 6803 Mutanten Kultur wurde mit ca. 8 µg Plasmid DNA gemischt und 24 Stunden unter Licht inkubiert. Dann wurden die Cyanobakterien auf nicht selektivem Medium unter Licht 48 Stunden kultiviert. Danach wurde mit selektivem Medium mit Sucrose (5%) –Weichagar überschichtet. Genaue Ausführung siehe Methodenteil/Transformation von *Synechocystis*.

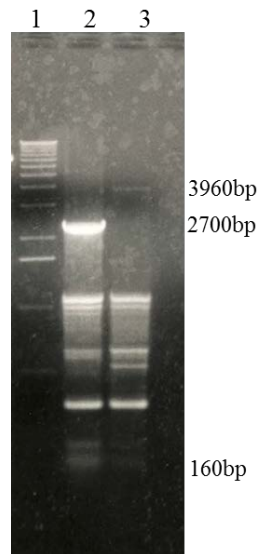
Nach ca. eineinhalb Wochen waren Einzelkolonien, Transformanten, zu sehen. Einzelne Kolonien wurden gepickt und jede auf einer BG 11-TS Agarplatte + Suc. für Einzelkolonien ausgestrichen.

Nach zwei Wochen waren einzelne Kolonien groß genug um damit eine 50ml Flüssigkultur BG 11-TS + Suc. anzuimpfen. Eineinhalb Wochen später wurde ein Aliquot der Kultur in frisches Medium + Suc. überimpft. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt.

Nachdem auch diese Kultur dicht angewachsen war, wurde eine Small-DNA-Präp. (siehe Methodenteil) von der Mutante und dem Wildtyp gemacht. Mit dieser DNA wurde mit den

Primern *recJ2*-KpnI und *recJ2*-SphI eine PCR durchgeführt und die Produkte auf einem 1w/v% Agarosegel aufgetrennt. Die Wildtypbande des *recJ*-Gens soll 2700 bp lang sein und die Bandenlänge der veränderten *recJ ex sacB::Km* Gensequenz 160 bp.

Abb.: PCR des Wildtyps und der *recJ ex sacB::Km* Mutante nach zweimaliger selektiver Zucht

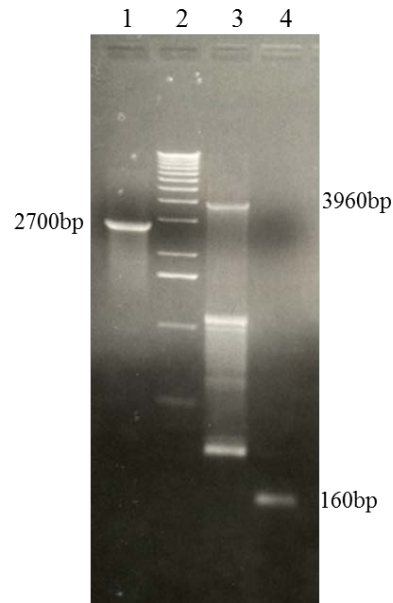


lane 1: X-Marker
lane 2: Wildtyp, erwartete Bande 2700 bp
lane 3: *recJ ex sacB::Km* Mutante, erwartete Bande 160 bp

Bei der *recJ ex sacB::Km* Mutante ist noch die Bande + *sacB* 3960 bp zu sehen. Diese Mutante wurde daraufhin noch zwei Mal selektiv weiter gezüchtet. Bei neuerlicher PCR Überprüfung war die *recJ::sacB::Km* Bande nicht mehr zu sehen. Da keine *recJ::sacB::Km* Bande mehr zu sehen war, kann angenommen werden, dass der *recJ*-Locus homozygot mutiert ist. Dieser *recJ ex sacB::Km* Mutante wurde als MSJ3 aufbewahrt.

Um etwaige *recJ::sacB::Km* Allele, die mit der PCR nicht entdeckt wurden, zu sehen, wurde die Kultur zweimal hintereinander in nicht selektivem BG 11-TS-Medium bis zur stationären Wachstumsphase gezüchtet. Es wäre zu erwarten, dass unter nicht selektivem Wachstum jegliches verbliebene *recJ::sacB::Km* Allel wieder angereichert würde, und so nach erneuter DNA-Präp. mit der PCR wieder nachgewiesen werden könnte (siehe Methodenteil/Transformation von *Synechocystis*). Die PCR wurde mit den Primern *recJ2*-KpnI und *recJ2*-SphI PCR durchgeführt und die Produkte auf einen 1w/v% Agarosegel aufgetrennt. Die Wildtypbande des *recJ*-Gens soll 2700 bp lang sein und die Bandenlänge der veränderten *recJ ex sacB::Km* Gensequenz 160 bp.

Abb.: PCR des Wildtyps und der *recJ ex sacB::Km* Mutante nach zweimaliger nicht selektiver Zucht



lane 1: Wildtyp, erwartete Bande 2700 bp
lane 2: X-Marker
lane 3: *recJ::sacB::Km* Mutante, erwartete Bande 3960 bp
lane 4: *recJ ex sacB::Km* Mutante, erwartete Bande 160 bp

Es war kein *recJ::sacB::Km* Allel bei der Überprüfung zu sehen, so wurde die MSJ3 Mutante als homozygot mutiert im *recJ*-Lokus aufbewahrt.

ÜBERPRÜFUNG DER MSJ3 MUTANTE AUF PHÄNOTYPISCHE MERKMALE

Spontanmutagenese

Für eine Spontanmutationsrate wurde wieder das Model der Fruktoseresistenz gewählt. Fruktose wirkt für *Synechocystis sp.* PCC 6803 wie ein Antibiotikum. Fruktose wird mit dem gleichen Transportprotein wie Glukose aufgenommen. Ist dieses in seiner Funktion gestört, kann keine Glukose bzw. Fruktose aufgenommen werden. Durch spontane Mutation im Glukose /Fruktose Transporter [7,8] kann allerdings schnell eine Resistenz entstehen.

Es wurden exponentiell wachsende Kulturen vom Wildtyp und von MSJ3 (OD= 0,5) auf BG 11-TS Agarplatten + Fruktose (15mM) ausgestrichen und 2 Wochen in der Klimakammer

unter Licht kultiviert. Die resistenten Kolonien wurden ausgezählt. Mit Hilfe des viable count = lebende Zelle pro ml, wurde die Spontanmutationsrate berechnet.

Spontanmutationsrate

	Viable Count $\times 10^6$	Transformanten	Transformations- Rate $\times 10^{-6}$		Viable Count $\times 10^6$	Transformanten	Transformations- Rate $\times 10^{-6}$
Wildtyp1	12,06	111	9,203	MSJ3-1	9,07	33	3,638
Wildtyp2	12,06	43	3,565	MSJ3-2	9,07	103	11,35
Wildtyp3	12,06	18	1,492	MSJ3-3	9,07	25	2,756
Wildtyp4	12,06	33	2,736	MSJ3-4	9,07	26	2,866

Die Spontanmutationsrate wurde vier Mal unabhängig angesetzt und ausgewertet. Es wurde kein Unterschied in der Transformationsrate zwischen dem Wildtyp und der MSJ3 Mutante gefunden.

UV- Mutagenese

Für eine UV-Mutationsrate wurde wieder das Model der Fruktoseresistenz gewählt. Fruktose wirkt für *Synechocystis sp.* PCC 6803 wie ein Antibiotikum. Für die Mutagenese wurde diesmal UV –Licht verwendet.

Es wurden exponentiell wachsende Kulturen vom Wildtyp und von MSJ3 (OD= 0,5) unterschiedlich lange mit UV –Licht (254nm) bestrahlt. Dazu wurden 5 ml dieser Kulturen auf einem Nitrozellulosefilter auf BG 11-TS Agarplatten ausgestrichen. Nachdem die Zellen auf dem Agar angetrocknet waren, wurden die geöffneten Platten in einer dunklen Kammer verschieden lange mit UV –Licht bestrahlt. Die Zellen wurden zwei Tage auf nicht selektiven BG 11-TS Agarplatten in der Klimakammer unter Licht kultiviert. Danach wurde den die Platten mit BG 11-TS Weichagar + Fruktose (15mM) überschichtet. Alle unterschiedlich lang UV bestrahlten Kulturen wurden 2 Wochen in der Klimakammer unter Licht kultiviert. Die resistenten Kolonien wurden ausgezählt. Mit Hilfe des viable count = lebende Zelle pro ml, wurde die Spontanmutationsrate berechnet.

UV-Mutationsrate

Wildtyp				MSJ3			
UV Belichtungszeit	Viable Count $\times 10^6$	Transformanten	Transformations-Rate $\times 10^{-6}$	UV Belichtungszeit	Viable Count $\times 10^6$	Transformanten	Transformations-Rate $\times 10^{-6}$
0 sec.	3,36	806	239,38	0 sec.	2,14	1171	372,92
15 sec.	3,36	439	130,38	15 sec.	2,14	962	449,53
30 sec.	3,36	550	163,35	30 sec.	2,14	900	286,62
60 sec.	3,36	465	138,1	60 sec.	2,14	943	440,65

Die UV-Mutationsrate wurde zwei Mal unabhängig angesetzt und ausgewertet. Es konnte kein auffälliger Unterschied in der Transformationsrate zwischen dem Wildtyp und der MSJ3 Mutante gefunden.

Natürliche Transformation

Für die Überprüfung der natürlichen Transformierbarkeit von *Synechocystis sp.* PCC 6803 wurden wieder die zwei verschiedene Plasmidtypen verwendet. Einmal das replikative Plasmid pKT210 und das integrative Plasmid pJM8. pKT210 beinhaltet ein Replikon mit einem *oriT* für die unabhängige Replikation in *Synechocystis sp.* und Gene für die eigene Mobilisierbarkeit *mob*-Gene. pJM8 besteht aus einem pUC 18 Vektor mit einem großen chromosomalen DNA-Fragment aus *Synechocystis sp.* PCC 6803. Das Insert enthält das *psbA1*-Gen, von welchem ca. 60% aus der Mitte herausgeschnitten sind und durch eine Cm-Kassette (aus Tn9) ersetzt wurde. Die Homologie des Inserts zum *psbA1*-Gen in *Synechocystis sp.* ermöglicht die Integration der Resistenzkassette in das Cyanobakteriengenom durch homologe Rekombination.

Für die Überprüfung der Transformierbarkeit des Wildtyps und MSJ3 wurden je 100µl einer exponentiell wachsenden Kultur mit 0,2µg pJM8 Plasmid DNA oder mit 2µg pKT210 Plasmid DNA gemischt. Diese Zell DNA Suspension wurde über Nacht in der Klimakammer unter Licht kultiviert. Danach wurden die Zellen zwei Tage auf nicht selektiven BG 11-TS Agarplatten in der Klimakammer unter Licht weiter inkubiert. Für die weitere selektive Kultivierung wurden die Platten mit Weichagar mit Selektivmedium überschichtet. Nach 2

Wochen in der Klimakammer unter Licht wurden die resistenten Kolonien ausgezählt. Mit Hilfe des viable count = lebende Zelle pro ml, wurde die Transformationsrate berechnet.

Transformationsraten

	Viable Count $\times 10^6$	pJM8 (0,2 μ g DNA)		pKT210 (2 μ g DNA)	
		Transformanten	Transformations- Rate $\times 10^{-6}$	Transformanten	Transformations- Rate $\times 10^{-6}$
Wildtyp	21,5	1366+/-1179	63,53	36+/-32	1,69
MSJ3	31,7	43350+/-38862	1367,5	1740+/-1060	54,88

Die Transformationsrate wurde drei Mal unabhängig angesetzt und ausgewertet. Es wurde jedesmal ein Unterschied in der Transformationsrate um einen Faktor 100 zwischen dem Wildtyp und der MSJ3 Mutante beim integrativen Plasmid pJM8 gefunden. Die MSJ3 Mutante ist also 100-mal besser transformierbar mit homologer DNA als der Wildtyp.

Beim replikativen Plasmid pKT210 zeigte sich auch eine höhere Transformierbarkeit der MSJ3 Mutante gegenüber dem Wildtyp, aber nur um ca. einen Faktor 10.

Letztendlich zeigte auch diese *recJ* neg. Resistenz neg. Mutante ein phänotypischen Merkmal: eine gesteigerte Transformierbarkeit auf natürlichem Weg.

Intraspezifische Konjugation

1994 wies Muro-Pastor et al. [13] den konjugativen Gentransfer zwischen zwei Cyanobakterien nach. Ein Megaplasmid wurde von einem Anabena-Stamm auf einen anderen übertragen. Dieser Vorgang war DNase resistent, die DNA muss sich in einem geschützten Kompartiment befunden haben, was auf Konjugation hinwies.

Um zu untersuchen, ob die *recJ* Deletion auf die intraspezifische Konjugation Einfluss hat, wurden der Wildtyp und die MSJ3 Mutante parallel untersucht. Dazu wurden beide Stämme mit den Plasmiden pALUV5, besitzt eine Chloramphenicolresistenzkassette, oder pALUV6, besitzt eine Steptomycinresistenzkassette, transformiert (siehe Material/ Plasmide) und unter selektiven Bedingungen weiter gezüchtet.

Es wurden exponentiell wachsende Kulturen vom Wildtyp und von MSJ3 (OD= 0,5) mit BG 11-TS Medium gewaschen und anschließend nach folgendem Schema gemischt unter Zugabe

von DNase (10µg/µl). Die DNase Zugabe soll die natürliche Transformierbarkeit- Aufnahme von freier DNA von *Synechocystis sp.* unterbinden.

Mischungsschema:

Wildtyp/ pALUV5 und Wildtyp/ pALUV6

MSJ3/ pALUV5 und MSJ3/ pALUV6

Wildtyp/ pALUV5 und pALUV6- DNA

Wildtyp/ pALUV6 und pALUV5- DNA

MSJ3/ pALUV5 und pALUV6- DNA

MSJ3/ pALUV6 und pALUV5- DNA

Diese Mischungen blieben ÜN in der Klimakammer unter Lichteinstrahlung. Am nächsten Tag wurden dieser Kulturen auf einem Nitrozellulosefilter auf BG 11-TS Agarplatten nicht selektiv ausgestrichen. Nach zwei Tagen auf nicht selektiven BG 11-TS Agarplatten wurden die Filter auf selektives Medium transferiert und 2 Wochen in der Klimakammer unter Licht kultiviert. Die resistenten Kolonien wurden ausgezählt. Dieser Versuch wurde dreimal unabhängig angesetzt.

gemischte Stämme/ DNA	Cm und Sm resistente Kolonien
Wildtyp/ pALUV5 und Wildtyp/ pALUV6	50+/-4
MSJ3/ pALUV5 und MSJ3/ pALUV6	52+/-8
Wildtyp/ pALUV5 und pALUV6- DNA	0
Wildtyp/ pALUV6 und pALUV5- DNA	0
MSJ3/ pALUV5 und pALUV6- DNA	0
MSJ3/ pALUV6 und pALUV5- DNA	0

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass die natürliche Transformation erfolgreich unterbunden wurde. Alle Kulturen mit nur einem Stamm und beigefügter DNA konnten auf dem selektivem Medium Cm+ und Km+ nicht wachsen. Die Kulturen mit den zwei unterschiedlichen Stämmen hatten beide Resistenzen erworben und konnten Kolonien bilden. Die Transformationshäufigkeit unterscheidet sich aber nicht zwischen Wildtyp und MSJ3.

Daraus wurde geschlossen, dass die Deletion des *recJ* Genes nicht die intraspezifische Konjugation in *Synechocystis* sp. PCC6803 beeinflusst.

VERSUCH EINEN TRANSFORMATIONSNEGATIVEN STAMM + *recJ* DELETION DURCH ELEKTROPORATION MIT EINZELSTRÄNGIGER DNA ZU TRANSFORMIEREN

Über den Mechanismus wie freie DNA von *Synechocystis* sp. PCC6803 aufgenommen und verarbeitet wird für eine homologe Rekombination, ist wenig bekannt. *Synechocystis* dürfte DNA als single- stranded DNA aufnehmen, ähnlich wie es auch in anderen Bakterien beschrieben ist [14]. Wahrscheinlich wird die DNA nicht fragmentiert bei der Aufnahme in die Zelle, wie es bei gram- positiven Bakterien beschrieben ist [15]. Es ist auch beschrieben, dass eine Ca-abhängige Nuclease, vorhanden in oder auf der Zytoplasma Membran von *Synechocystis*, die DNA während der Aufnahme in die Zelle zu single- stranded DNA abbaut. Denn eine Stunde nach kokultivierung mit ds- DNA, ist diese DNA single- stranded in *Synechocystis* nachzuweisen [16].

Die MSJ3/*pilA1*- Mutante ist Transformationsnegativ durch eine Deletion im *pilA1* Lokus. Dieses Gen gehört zu den Typ IV Pili [17,18], welche für die natürliche Aufnahme von DNA wichtig sind. Es wurde versucht MSJ3/*pilA1*- mit einzelsträngiger DNA zu elektroporieren, um zu sehen ob einzelsträngige DNA, direkt in die Zelle geliefert, homologe Rekombination auslösen kann.

Dafür wurde mit Hilfe eines Lamda Phagen M13KO7 eine Superinfektion eines *E.coli* Stammes, der das Plasmid pJM8 enthielt, durchgeführt. Kurz, eine log. wachsende *E.coli* Kultur wurde mit diesem Phagen infiziert. Die infizierte Kultur wurde zwei Stunden mit 200 U/min bei 37°C geschüttelt. Dann wurde Kanamycin in einer Konzentration von 70µg/ml zugesetzt und weitere 16 Stunden kultiviert. Danach wurde die Kultur bei 8000 rpm abzentrifugiert und der Überstand weiterverwendet. Die DNA wurde zwei Mal mit einer 2,5 M NaCl/ 20%Peg Lösung zwei Stunden auf 4°C gefällt und in TE wieder gelöst. Die einzelsträngige DNA wurde Phenol/ Chloroform extrahiert (siehe Methodenteil). Die DNA wurde auf einem 1% Agarose Gel auf Reinheit untersucht und die DNA Konzentration photometrisch bestimmt.

Diese DNA wurde anschließend in *Synechocystis* sp. PCC6803 elektroporiert (siehe Methoden/ Elektroporation von *Synechocystis* sp. PCC 6803). Falls diese DNA in der Zelle für homologe Rekombination verwendbar ist, sollte das ca. 3000 bp große chromosomale DNA Fragment aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, enthalten in pJM8, in das Genom inserieren können. Dieses Insert enthält das *psbA1*-Gen, von welchem ca. 60% aus der Mitte

herausgeschnitten sind und durch eine Cm-Kassette (aus Tn9) ersetzt wurden. Dadurch können anschließend die Cyanobakterien mit Cm auf Transformanten selektiert werden.

Dafür wurden 500µl einer exponentiell wachsenden MSJ3/pilA1 Kultur mit 2µg bez. 10µg ss-pJM8 DNA gemischt und elektroporiert. Diese Suspension wurde über Nacht in der Klimakammer unter Licht kultiviert. Danach wurden die Zellen zwei Tage auf nicht selektiven BG 11-TS Agarplatten in der Klimakammer unter Licht weiter inkubiert. Für die weitere selektive Kultivierung wurden die Platten mit Weichagar mit Selektivmedium überschichtet. Nach 2 Wochen in der Klimakammer unter Licht wurden die resistenten Kolonien ausgezählt. Folgendes Schema zeigt die verschiedenen Versuchsansätze und die Ergebnisse. Die Versuchsreihe wurde zwei Mal unabhängig durchgeführt.

MSJ3/pilA1- : +/-DNA, +/-Elektroporation	Cm resistente Kolonien
MSJ3/pilA1- : 0 µg DNA, - Elektroporation	0
MSJ3/pilA1- : 2 µg DNA, - Elektroporation	0
MSJ3/pilA1- : 2 µg DNA, + Elektroporation	0
MSJ3/pilA1- : 2 µg DNA, + Elektroporation	0
MSJ3/pilA1- : 10 µg DNA, + Elektroporation	0
MSJ3/pilA1- : 10 µg DNA, + Elektroporation	0

Es wurden in keiner Gruppe Transformanten erhalten. Die Kontrolle für die Spontanmutation (MSJ3/pilA1- : 0 µg DNA, - Elektroporation) und die Kontrolle ob MSJ3/pilA1- (MSJ3/pilA1- : 2 µg DNA, - Elektroporation) wirklich nicht nat. transformierbar ist, zeigten keine Ausreißer. Somit kann man hypothetisieren, ss- DNA durch Elektroporation direkt in die Zelle gebracht, kann nicht in das cyanobakterielle Genom integrieren.

DISKUSSION

Die Herstellung einer homozygoten *recJ* negativen Mutante war problemlos. *RecJ* wurde aus dem Genom von *Synechocystis sp.* PCC 6803 deletiert und mit einer Resistenzkassette ersetzt. Die Funktion des RecJ- Proteins wird in *E.coli* als 5'-3' Exonuklease von ss-DNA beschrieben [6]. In *E.coli* hat die einfache *recJ* Mutation keinen Phänotyp da die verschiedenen Rekombinationswege redundant sind. Es gibt also andere Proteine, die das Fehlen von RecJ kompensieren können.

Die Untersuchung von MSJ1 auf einen Phänotyp zeigte bei der Überprüfung der natürlichen Transformierbarkeit mit zwei verschiedene Plasmidtypen einen auffallenden Unterschied in der Transformationsrate um einen Faktor 100 zwischen dem Wildtyp und der MSJ1 Mutante beim integrativen Plasmid pJM8. Die MSJ1 Mutante ist also 100-mal besser transformierbar mit homologer DNA als der Wildtyp. Beim replikativem Plasmid pKT210 zeigte sich auch eine höhere Transformierbarkeit von MSJ1 gegenüber dem Wildtyp, aber nur um ca. einen Faktor 10.

Über Gene, die bei der homologen Rekombination beteiligt sind ist in *Synechocystis sp.* PCC 6803 nicht viel bekannt. Die Gesamtsequenz von *Synechocystis sp.* PCC 6803 ist seit 1996 bekannt [2] und über Homologievergleiche wurden vermutete Rekombinations-Gene identifiziert. Den *recBCD*- und den *recET*- Weg dürfte es in *Synechocystis* nicht geben, da keinerlei Homologie zu den *E.coli* Genen gefunden wurde. Für *recA*, *recJ*, *recR*, *recG* und *xerC* gibt es gute Homologien. Es gibt im Cyanobakterium *Synechococcus* Untersuchungen zu *recA*. Die Versuche von Murphy et al. [19] eine *recA* neg. Mutante in *Synechococcus sp.* PCC 7002 zu generieren, zeigten, dass *recA* für *Synechococcus* essentiell ist. Dieses Protein wird in drei Rekombinationswegen für die Bildung der Tripelhelix benötigt. In meiner Diplomarbeit wurde versucht das *recA* Gen in *Synechocystis sp.* PCC 6803 zu deletieren. Auch hier wurde keine homozygote Mutante MSA erhalten nach mehrmaliger selektiver Zucht. So dürfte das RecA Protein auch in *Synechocystis* essentiell sein. Die Deletion von *recJ* in MSJ1 konnte hingegen recht einfach homozygot deletiert werden.

Um sicher zu sein, dass die verbliebenen 187bp des *recJ* in der MSJ1 Mutante nicht ausreichen für eine Restfunktion des Proteins, wurde erneut eine *recJ* Mutante, MSJ2; mit einer kompletten Deletion des Genes hergestellt. Auch diese MSJ2 Mutante wurde leicht homozygot. Der Unterschied in der Transformationsrate um einen Faktor 100 zwischen dem Wildtyp und der MSJ2 Mutante beim integrativen Plasmid pJM8 und ein Faktor 10 beim

replikativem Plasmid pKT210 wurden wieder gefunden. Die homozygoten Mutanten MSJ1 und MSJ2 wurden auf andere phänotypische Auffälligkeiten untersucht, wie UV-Mutagenese und Spontanmutagenese. Es wurde kein Unterschied zum Wildtyp gefunden.

Um genügend Selektionsmarker für gleichzeitige Mutagenesen in einer Zelle zu haben, für weitere Untersuchungen des Phänotypes, wurde die *recJ* negative Mutante erneut mit Hilfe einer *SacB* Technik [9,10] hergestellt. Die MSJ3 Mutante konnte auch als homozygot mutiert im *recJ*-Lokus hergestellt werden, aber der Aufwand diese homozygot zu bekommen, war aufwendiger als bei MSJ1 und MSJ2. Die Untersuchung von MSJ3 auf einen Phänotyp zeigte bei der Überprüfung der natürlichen Transformierbarkeit mit den zwei verschiedenen Plasmidtypen wieder den Unterschied in der Transformationsrate um einen Faktor 100 zwischen dem Wildtyp und der MSJ3 Mutante beim integrativen Plasmid pJM8. Beim replikativem Plasmid pKT210 zeigte sich auch eine höhere Transformierbarkeit von MSJ3 gegenüber dem Wildtyp, aber nur um ca. einen Faktor 10. Auffälligkeiten bei der UV-Mutagenese und Spontanmutagenese von MSJ3 konnten nicht gefunden werden.

Um zu untersuchen, ob die *recJ* Deletion auf die intraspezifische Konjugation Einfluss hat, wurden der Wildtyp und die MSJ3 Mutante parallel untersucht. Da Muro-Pastor et al. [13] den konjugativen Gentransfer zwischen zwei Cyanobakterien nachgewiesen haben, indem sie die Übertragung eines Megaplasmid von einem *Anabena*- Stamm auf einen anderen zeigten, wurden zwei Plasmide mit unterschiedlichen Resistenzen verwendet für diese Überprüfung. Da die natürliche Transformation von *Synechocystis sp.* PCC 6803 durch DNase Behandlung unterbunden war und keine Kolonien mit beiden Resistenzen gefunden wurden bei den Kontrollen, kann behauptet werden: aller Gentransfer der stattgefunden hat ist über Konjugation geschehen. Die Kulturen mit den zwei unterschiedlichen Stämmen hatten beide Resistenzen erworben und konnten Kolonien bilden. Die Transformationshäufigkeit unterscheidet sich aber nicht zwischen Wildtyp und MSJ3. Daraus wurde geschlossen, dass die Deletion des *recJ* Genes nicht die intraspezifische Konjugation in *Synechocystis sp.* PCC 6803 beeinflusst.

Über den Mechanismus wie freie DNA von *Synechocystis sp.* PCC 6803 aufgenommen und verarbeitet wird für homologe Rekombination, ist wenig bekannt. *Synechocystis* dürfte DNA als single- stranded DNA aufnehmen [14] und die DNA wird nicht fragmentiert bei der Aufnahme in die Zelle [15]. Es ist auch beschrieben, dass eine Ca-abhängige Nuklease, vorhanden in oder auf der Zytoplasma Membran von *Synechocystis*, die DNA während der Aufnahme in die Zelle zu single- stranded DNA abbaut [16]. Die MSJ3/pilA1- Mutante ist

Transformationsnegativ durch eine Deletion im *pilA1* Locus. Dieses Gen gehört zu den Typ IV Pili [17,18]. Es wurde versucht MSJ3/*pilA1*- mit einzelsträngiger DNA, produziert aus dem Plasmid pJM8, zu elektroporieren. Mehrmalige Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen von DNA brachten keine resistenten Transformanten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Deletion des *recJ* Genes in *Synechocystis sp.* PCC 6803 leicht homozygot erhalten werden kann. Dies ist in dieser Arbeit drei Mal unabhängig und mit unterschiedlichen Plasmid Konstruktionen gezeigt worden. Der Phänotyp, eine erhöhte Transformierbarkeit durch natürliche Transformation, konnte bei jeder der drei Mutanten bestätigt werden. Alle anderen untersuchten Phänotyp Möglichkeiten, Spontanmutationsrate, UV- Mutagenese und intraspezifische Konjugation, zeigten keinen Unterschied zwischen Wildtyp und der *recJ* Deletionsmutante. Da über den Mechanismus wie freie DNA von *Synechocystis sp.* PCC 6803 aufgenommen und verarbeitet wird für homologe Rekombination, wenig bekannt ist, wurde versucht eine Transformations negative, *recJ* deletierte MSJ3/*pilA1*- Mutante mit einzelsträngiger DNA durch Elektroporation zu transformieren. Hierbei wurden keine Transformanten erhalten. Es liegt die Annahme nahe, dass die ss- DNA, die bei der Konjugation und der nat. Transformation in die Zelle gelangt, durch irgendwelche Mechanismen/ Proteine vor dem Abbau geschützt wird. Die Deletion einer einzelnen ss- Exonuklease, nämlich *recJ*, scheint nicht ausreichend zu sein um den Abbau zu verhindern.

Trotz allem wurde in dieser Arbeit eine Mutante MSJ3 mit einem Phänotyp, der erhöhten Transformationsrate, gefunden. Dieser Phänotyp und die natürliche Transformierbarkeit von *Synechocystis sp.* PCC 6803 könnten eine gute Hilfe beim **genetic mapping** von Photosynthese Proteinen, Proteinen der Atmungskette in Cyanobakterien und bei der N₂ Fixierung oder Zystenbildung in anderen Stämmen nützlich sein. Da man bei Komplementationsversuchen immer nur geringe Mengen an DNA zur Verfügung hat, ist die erhöhte Transformierbarkeit von MSJ3, was impliziert, dass geringere Mengen an DNA zu Transformanten führen, von großem Vorteil.

MATERIALIEN

STÄMME

CYANOBAKTERIELLE STÄMME

Synechocystis sp. PCC6803

von R. Kunisawa als *Aphanocapsa* N-1 im Frischwasser in Californien, U.S.A. 1968 isoliert; identisch mit dem Isolat *Synechocystis* sp. ATCC 27184 von R. Y. Stanier; Eigenschaften: Durchmesser 2,3-2,5 μm , keine Gasvakuolen, photoheterotroph, N_2 Fixierung negativ, euryhalin, G+C 47,5 mol%, Genomgröße : 3,57 Mbp

E.COLI-STÄMME

a) DH5 α (Nal^r)

Genotyp: F⁻/endA1 hsdR17 (r_k^- m_r^+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 $\Delta(\text{lacIZYA-agrF})$ U169 deoR ($\Phi 80\text{dlac}\Delta(\text{lacZ})\text{M15}$) λ^- ; α -Komplementation möglich

b) DH1

Genotyp: supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1;

c) JM109

Genotyp: (McrA⁻) recA1 endA1 hsdR17 gyrA96(Nal^r) supE44 thi-1 $\Delta(\text{lac-proAB})$ lacI^q;

d) HB101 (Sm^r)

Genotyp: F⁻ ara-14 leuB6 $\Delta(\text{gpt-proA})$ 62 lacY1 glnV44(AS) galK2 LAM- recA13 rpsL20(Sm^r) xylA5 mtl-1 thi-1 hsdS20; hat eine hohe Transformationseffizienz, gut für große Plasmidpräparationen geeignet

PLASMIDE

1) pUC 19 (2686bp, Ampicillin^r) [2]

pUC 19 ist ein kleines *E. coli* Plasmid mit hoher copy-number. Es besitzt eine Ampicillinresistenzkassette und einen Replikationsursprung der Inkompatibilitätsgruppe ColE1. Außerdem befindet sich auf diesem Plasmid ein lacZ-Gen, welches in der Promotorregion einen Polylinker hat. Es ist α -Komplementation ermöglicht.

2) pABL 109 (ca. 6,4 kbp, Ampicillin^r, Kanamycin^r) [3]

Das Ursprungsplasmid pUC 118 enthält ein ca. 3,2 kbp langes chromosomales DNA-Fragment aus *Synechocystis sp.* PCC 6803, welches das *petJ*-Gen enthält. Dieses Fragment wurde in die *Hind*III Schnittstelle des pUC 118 kloniert. Anstelle des ORF des *petJ*-Gens wurde die Km-Kassette (aus pUC 4K) kloniert.

3) pRL 446 (Ampicillin^r, Kanamycin^r) [unveröffentlicht; C.P. Wolk, East Lansing, MI]

Das Plasmid setzt sich zusammen aus pUC, L.EHE1, C.K2 (Nomenklatur siehe [4]). Es enthält die Km-Kassette aus dem Transposon Tn903, welche man mit *Bam*HI ausschneiden kann.

4) pJM8 (ca. 5850 bp, Chloramphenicol^r) [unveröffentlicht; B. Diner, Wilmington, DE]

Es besteht aus einem pUC 18 Vektor mit einem ca. 3000 bp großen chromosomalen DNA-Fragment aus *Synechocystis sp.* PCC 6803. Das Insert enthält das *psbA1*-Gen, von welchem ca. 60% aus der Mitte herausgeschnitten sind und durch eine Cm-Kassette (aus Tn9) ersetzt wurde. Die Cm-Kassette kann mit *Bam*HI ausgeschnitten werden.

5) pRL 463 (ca. 4,73 kbp, Ampicillin^r, Streptomycin/Spektinomycin^r) [unveröffentlicht; C.P. Wolk, East Lansing, MI]

pRL 463 ist ein Derivat von pRL 183 (dieses ist ein pUC 118 mit einem L.HEH1-Polylinker [20]). Es enthält in der *Eco*RI Schnittstelle des L.HEH1-Polylinkers eine ca. 2 kbp große Streptomycin/Spektinomycinresistenzkassette vom Plasmid pHP 45 Ω [5]

6) pRL 250 (ca. 14,3 kbp, Chloramphenicol^r, Kanamycin^r, Sucrose^s) [20,9]

Das Plasmid setzt sich zusammen aus pDU1, L.EHE2 und C.K5. Außerdem enthält es das *sacB* Gen (codiert für eine Levansucrase von *B.subtilis*). *SacB* und die Km Kasette können gemeinsam durch einen Verdau mit *XbaI* ausgeschnitten werden und ergeben eine Fragmentlänge von ca. 3800 bp.

7) pKT210 (ca. 16,1 kbp, Chloramphenicol^r, /Spektinomycin^r)

pKT210 beinhaltet ein Replikon mit einem *oriT* für die selbstständige Replikation in *E.coli* und in *Synechocystis sp.* und Gene für die eigene Mobilisierbarkeit *mob*-Gene neben den zwei Resistenzen, Chloramphenicol und Streptomycin.

8) pALUV5 (Chloramphenicol^r)

Aus dem Plasmid pKT210 wurde mit *NruI* die Spektinomycinresistenzkasette ausgeschnitten und der Vektor relegiert. Dieser Vektor beinhaltet ein Replikon mit einem *oriT* für die selbstständige Replikation in *E.coli* und in *Synechocystis sp* und Gene für die eigene Mobilisierbarkeit *mob*-Gene neben nur mehr einer Resistenz, Chloramphenicol.

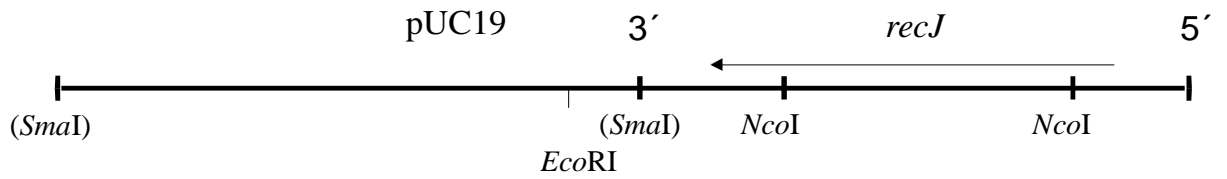
9) pALUV6 (Spektinomycin^r)

Aus dem Plasmid pKT210 wurde mit *PstI* die Chloramphenicolresistenzkasette ausgeschnitten und der Vektor relegiert. Dieser Vektor beinhaltet ein Replikon mit einem *oriT* für die selbstständige Replikation in *E.coli* und in *Synechocystis sp* und Gene für die eigene Mobilisierbarkeit *mob*-Gene neben nur mehr einer Resistenz, Streptomycin.

WÄHREND DIESER ARBEIT HERGESTELLTEN PLASMIDE:

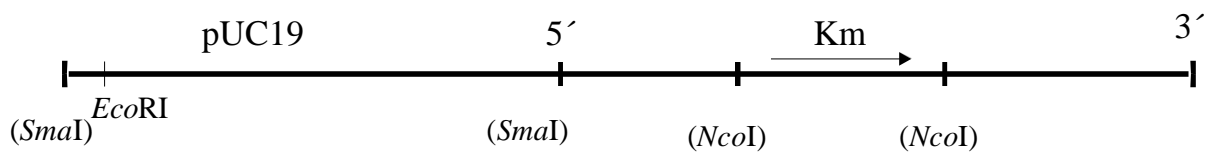
10) pMSUV 5 (5541 bp, Ampicillin^r);

pUC 19 wurde mit *SmaI* aufgeschnitten und das PCR-Produkt der Primer *recJ-5'* und *recJ-3'* (2855 bp) aus *Synechocystis sp.* PCC 6803 (siehe Materialteil/Gensequenzen) hineinkloniert. Die 3'-Seite des *recJ*-PCR Produkts liegt im Vektor bei der *EcoRI* Stelle.



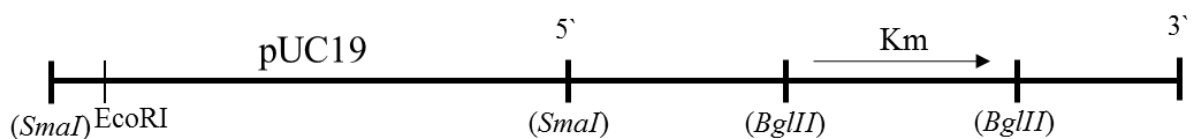
11) pMSUV 11 (4692 bp, Ampicillin^r, Kanamycin^r);

Das Ausgangsplasmid war pMSUV 5. Aus dem ORF des *recJ*-Gens wurde mit *NcoI* ein 2122 bp langes Stück herausgeschnitten. Nach dem Abverdauen der überstehenden Einzelstränge mit Mungbean Nuklease wurde in diese Stelle die Km-Kassette aus pRL 446 (mit *BamHI* ausgeschnitten und Mungbean Nuklease behandelt) kloniert. Der Leserahmen der Km-Kassette ist parallel zum Leserahmen des *recJ*-Gens. 465 bp und 287 bp sind die verbleibenden chromosomalen DNA Fragmente von *Synechocystis* sp. PCC 6803 für die homologe Rekombination.



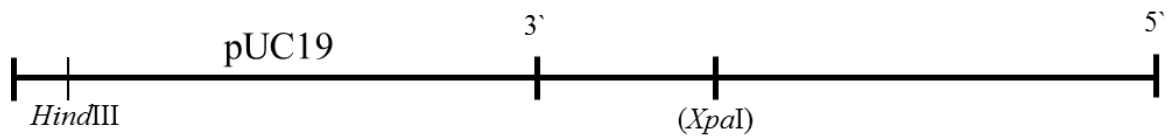
12) pMSUV 25A (4454 bp, Ampicillin^r, Kanamycin^r);

Das Ausgangsplasmid war pMSUV 11. Durch eine reverse PCR des Plasmides pMSUV11 mit den Primern *recJ*-*BglII*-1 und *recJ*-*BglII*-2 bleiben vom offenen Leserahmen des *RecJ* Proteins nur mehr 25 bp übrig. Nach der DNA Aufreinigung wurden die Km-Kassette aus pRL 446 (mit *BamHI* ausgeschnitten) und das PCR Produkt ligiert und in *E.coli* kloniert. Der Leserahmen der Km-Kassette ist parallel zum Leserahmen des *recJ*-Gens. 465 bp und 129 bp sind die verbleibenden chromosomalen DNA Fragmente von *Synechocystis* sp. PCC 6803 für die homologe Rekombination.



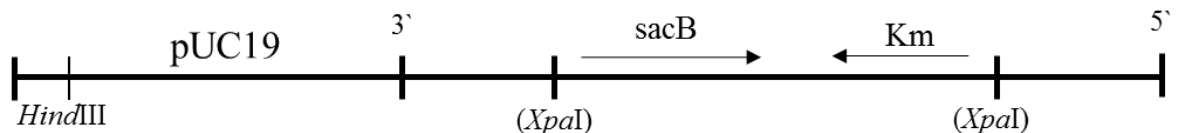
13) pMSUV 29 (3250 bp, Ampicillin^r);

Das Ausgangsplasmid pMSUV 25A wurde mit *Xba*I verdaut um die Km-Kassette herauszuschneiden. Das aufgereinigte 3250 bp lange Fragment, der Vektor ohne Km-Kassette, wurde religiert. Vom *recJ*-Gen sind die verbleibenden chromosomalen DNA Fragmente von *Synechocystis* sp. PCC 6803 für die homologe Rekombination 465 bp und 110 bp lang.



14) pMSUV 30 (7061 bp, Ampicillin^r, Kanamycin^r, Sucrose^s)

Das Ausgangsplasmid pMSUV 25A wurde mit *Xba*I verdaut um die Km-Kassette herauszuschneiden. Das aufgereinigte 3250 bp lange Fragment, des Vektor ohne Km-Kassette, wurde mit der *SacB*/ Km Kassette (ca. 3800 bp) aus pRL250 ligiert. Vom *recJ*-Gen sind die verbleibenden chromosomalen DNA Fragmente von *Synechocystis* sp. PCC 6803 für die homologe Rekombination 465 bp und 110 bp lang.



GENSEQUENZEN

recJ (sll1354) und Umgebung

```

                recJ-5' Primer →
CGATCGCCTAGGGTCCGATGTCCTTATCTTCCGCCAATACAACGGAAAACTTTTGCCAC
800 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCTAGCGGATCCCAGCTACAGAAGTAGAAGCGGTTATGTTGCCTTTTGGAAAAACGGGTG

```

recJ-PCR-Produkt = 2855bp

TAGGGTTGGGAATATGGCCCCTGACAACAACCTCCTTAGGCAACCACAACGGGCTAGCCA
860 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 919
ATCCCAACCCCTTATACCGGGGACTGTTGTTGAGGAATCCGTTGGTGTGCCCCGGATCGGT

AGGCTTCCTTAGGGCAGTCCCCCTCATTGACCAAGCCCAACGACAACAATTGATTTCTCT
920 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 979
TCCGAAGGGGATCCCGTCAGGGGGAGTAACTGGTTCGGGTTGCTGTTGTTAACTAAAGAGA

GCTGGAACAGGAAGAACTAATGTTTGAATAAATTACGCCATACCCTCATTTCCTCCGGCA
980 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1039
CGACCTTGTCTTCTTTGATTACAAACCTTATTTAATGCGGTATGGGAGTAAAGGGCCGT

AATAAGAACTTTGGCGATCGCCTTTCAAGTTGGGGGAACGAATATGGCTGGGAAGATTT
1040 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1099
TTATTCTTTGAAACCGCTAGCGGAAAGTTCAACCCCTTGCTTATACCGACCCTTCTAAA

ACACACCTATGGTCAGAGCATTATCAAGGCTTTGGAAAATTTTGATAGCCGTCGATTGGA
1100 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1159
TGTGTGGATACCACTCTCGTAATAGTTCGAAACCTTTTAAAATATCGGCAGCTAACCT

GCAACTTATGGGTCAATTTCCCAATATAGAGCTAGTCTGACGGAAGTTTCTGCCGGAGT
1160 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1219
CGTTGAATACCCAGTTAAAGGGGTTATATCTCGATCAGACTGCCTTCAAAGACGGCCCTCA

Stop-s111353
GGATGGTAAGCATGCTTCCGAGTAGGCAAAAAGTTAGTATGGAATCCCTTTCAATTCTC
1220 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1279
CCTACCATTCTGACGAAGGCTCATCCGTTTTTTCAATCATACTTAGGGAAAGTTAAGAG

NcoI
TA**CCCATGGC**CCAATTTTCGTTGGCAGTTAATTTCCCCTGTTACTCCCCGGCTATTTTTG
1280 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1339
ATTGGTACCGGGTTAAAGCAACCGTCAATTAAGGGGGACAATGAGGGGGCCGATAAAAAC

a M A Q F R W Q L I P P V T P P A I F V -

TCGAACAGGTGCGTCGCCATTTGTGGCCAATCCAGCGGTCAATTTGCCGCCCAATTACTGT
1340 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1399
AGCTTGTCCACGCAGCGGTAACACCGGTTAGGTCGCCAGTTAAACGGCGGGTTAATGACA

a E Q V R R H C G Q S S G Q F A A Q L L W -

GGCAAAGGGCATTTCAGTCAGCGGATCAGTTGGGTGGGTTTCTTTCCCGGATTGTTATA
1400 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1459
CCGTTTCCCGTAAGTCAGTCGCCTAGTCAACCCACCCAAAGAAAGGGGCTAACAAATAT

a Q R G I Q S A D Q L G G F L S P D C Y T -

CTCCCACAGCCCTTGGGAATTTGGCCAGGAAATGAAATGGGCTGTACAAAGGTTGGGCC
1460 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1519
GAGGGTGGTCCGGAACCCCTTAAACCGGTCCTTTACTTTACCCGACATGTTTCCAACCCGG

a P T S P W E F G Q E M K W A V Q R L G Q -

NcoI
AG**GCCATGGC**CCAGAAGGAAAAAGTCAACATTTGGGGGGATTTTCGATGCCGACGGCATT
1520 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1579
TCCGGTACCGGGTCTTCTTTTTTTCAGTGGTAAACCCCTTAAAGCTACGGCTGCCGTAAT

a A M A Q K E K V T I W G D F D A D G I T -

```

CTTCCACTGCAGTGTATGGAAGGATTGGGGCAATTTTTTCCCAGGATAGCCAGTTGA
1580 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1639
GAAGGTGACGTCACAATACCCCTTCCTAACCCCGTTAAAAAAGGGTCTATCGGTCAACT
a      S T A V L W E G L G Q F F P Q D S Q L T -
CCTACACCATCCCTAACCGTTTACGGGAGTCCCACGGCCTCAACCGACCGGGACTAGAAC
1640 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1699
GGATGTGGTAGGGATTGGCAAATGCCCTCAGGGTGCCGGAGTTGGCTGGCCCTGATCTTG
a      Y T I P N R L R E S H G L N R P G L E R -
GCTTAGCAACCCAGGGTACAAAGTTAATTGTACCTGCGACACTGGCAGTACAAATTTGG
1700 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1759
CGAATCGTTGGGTCCCATGTTTCAATTAACAGTGGACGCTGTGACCGTCATGTTTAAACC
a      L A T Q G T K L I V T C D T G S T N L D -
ACGAAATGTCTATGCCCAGCAGTTGGGCATGGATGTAATTGTCACCGACCACCATACGT
1760 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1819
TGCTTTAACAGATACGGTTCGTCAACCCGTACCTACATTAACAGTGGCTGGTGGTATGCA
a      E I V Y A Q Q L G M D V I V T D H H T L -
TGCCAGACGATCGCCCGAGGTGGTGGCCATTATTAACCCCGTTACTTTGCCGATGGCC
1820 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1879
ACGGTCTGCTAGCGGGCTCCACCACCGTAATAATGGGGGCAATGAAACGGCTACCGG
a      P D D R P E V V A I I N P R Y F A D G H -
ATCCCTGTTTAACTTTCGGAGTAGCAGTGGCTTTTAAAGTTGGTGGAAAGCTCTCTACA
1880 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1939
TAGGGGACAAATTGGAAAGGCCTCATCGTCACCGAAAATTCAACCACCTTCGAGAGATGT
a      P L F N L S G V A V A F K L V E A L Y N -
ACCAATATCCCACAGTGCCCAACAACCCTTGGAGGATTTACTAGATTTAGTGGCGATCG
1940 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1999
TGTTTATAGGGTGTACGGGGTTGTTGGGAACCTCCTAAATGATCTAAATCACCGTAGC
a      Q Y P T V P Q Q P L E D L L D L V A I G -
GTCTAATTCGGATTTGGTTACCCTGCAAGGTGATTGTCGTTACCTAGCCCAACGGGGCA
2000 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 2059
CAGATTAACGGCTAAACCAATGGGACGTTCCACTAACAGCAATGGATCGGGTTGCCCCGT
a      L I A D L V T L Q G D C R Y L A Q R G I -
TTGCCAACTCCGTACCCAAAAGATCCAGCCACTGCCACCCGCCCTGGCATCCATGCC
2060 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 2119
AACGGTTGAGGCATGGGTTTTTCTAGGTGCGGTGACGGTGGGCGGACCGTAGGTACGGG
a      A Q L R T Q K D P A T A T R P G I H A L -
TACTTAACTTTGCAATCGCAACGGCGATCGGCCACAGACATTGGTTTTGGTATTGGCC
2120 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 2179
ATGAATTGAAAACGTTAGCGTTGCCGCTAGCCGGGTGTCTGTAACAAAACCATAACCGG
a      L N L C N R N G D R P T D I G F G I G P -
CCCGCATCAACGCCATCAGTCGCATTAAGGGGATGCTAGCTTTGGAGTAGAACTACTCA
2180 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 2239
GGGCGTAGTTGCGGTAGTCAGCGTAATTTCCCTACGATCGAAACCTCATCTTGATGAGT
a      R I N A I S R I K G D A S F G V E L L T -

```



```

CCAGTCGGGACACAAAAGTTTGTAAACCAATTGGCGGCCGAAGCGGAAACCCTCAACAGTA
2240 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 2299
GGTCAGCCCTGTGTTTTCAAACATTGGTTAACCGCCGGCTTCGCCTTTGGGAGTTGTCAT

a      S R D T K V C N Q L A A E A E T L N S R -

GACGCAAGGGATTACAGAAATCTGTCAATTATCGAAATTGACCAACGACTCCAAAACATTG
2300 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 2359
CTGCGTTCCCTAATGTCTTTAGACAGTAATAGCTTTAACTGGTTGCTGAGGTTTTGTAAC

a      R K G L Q K S V I I E I D Q R L Q N I D -

ACCTATCCACCACCGGGTAGTAGTACTACCGATCCCAGTGGCCTACAGGGTTTTTGG
2360 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 2419
TGGATAGGTGGTGGCCCCATCATCATGAGTGGCTAGGGTCCACCGGATGTCCCCAAAACC

a      L S T T G V V V L T D P Q W P T G V L G -

GCCTAGCCGCCAGTCATGTAGCCCAAACCTGTGGCCGTCGGGCCATTTTGTCTAACACCC
2420 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 2479
CGGATCGCGGTCCAGTACATCGGGTTTGACACCGGCAGGCCGGTAAAACGAGTTGTGGG

a      L A A S H V A Q T C G R P A I L L N T Q -
AAGATGGGAAAATTGCCAAAGGATCAGCCCGTTCTGTGGCCAACATTGACCTTTATGCC
2480 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 2539
TTCTACCCTTTTAAACGGTTTCCTAGTCGGGCAAGACACCGGTTGTAAGTGGAAATACGGG

a      D G K I A K G S A R S V A N I D L Y A L -

TACTGCACAGTCAACGACATTTAATGCTGGGCTTTGGAGGCCATCCCTTTGCCGCCGGTT
2540 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 2599
ATGACGTGTGCTGCTGTAAATTACGACCCGAAACCTCCGGTAGGGAAACGGCGGCCAA

a      L H S Q R H L M L G F G G H P F A A G L -

TGAGCTTGCCTTTGGATAAAATTGCCGTTGTTACGGAAGCGGTCAATCAACAGTTTTGGC
2600 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 2659
ACTCGAACGGAAACCTATTTAACGGCAACAAGTGCCCTCGCCAGTTAGTTGTCAAACCG

a      S L P L D K L P L F T E A V N Q Q F W Q -

AAAGCTACGGAGCCCAGATCAGCTTGGATCCGATTCTGGCAGTGGATCTCCAAGTGAAGG
2660 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 2719
TTTCGATGCCTCGGGTCTAGTCGAACCTAGGCTAAGACCGTCACCTAGAGGTTCACTCC

a      S Y G A Q I S L D P I L A V D L Q V K V -

TGGCAGATTTAGGACAGGACCTCTTTCGGGAATTTAATTTGCTTGAACCTATGGCATGG
2720 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 2779
ACCGTCTAAATCCTGTCTGAGAGAAAGCCCTTAAATTTAAACGAACTTGGGATACCGTACC

a      A D L G Q D L F R E F N L L E P Y G M G -

GTAACCCCGCACCCAACTACTACTGAAAATGTGCAAGTCGGGAGGCCAGCTTTTCGCA
2780 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 2839
CATTTGGGGCGTGGGTTTGTGATGATGACCTTTTACACGTTTCAGCCCTCCGGGTCGAAAGCGT

a      N P A P K L L L E N V Q V G R P S F R N -

ATATCAAAGACCGCACTGGTAATAAAGTGTCTACCTAAAAACCAGCTTTTCGGGTAACGG
2840 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 2899
TATAGTTTCTGGCGTGACCATTATTTACAGGATGGATTTTGGTTCGAAAGCCATTGCC

a      I K D R T G N K V S Y L K T S F R V T D -

```

ACTATCCGCCTAAAACCGATGACGATGGCCAAGTTGTTCAATGCCCTGGGGTTTGGTGGG
 2900 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 2959
 TGATAGGCGGATTTTGGCTACTGCTACCGGTTCAACAAGTTACGGGACCCCAAACCACCC
 a Y P P K T D D D G Q V V Q C P G V W W G -
 GCCACCATCCCGATGAACTGCCCAAAATGAACCGTTGGATCTGGTGGTGAATTAGACT
 2960 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 3019
 CGGTGGTAGGGCTACTTGACGGGGTTTTACTTGGCAACCTAGACCACCACCTTAATCTGA
 a H H P D E L P Q N E P L D L V V E L D F -
 TCAACACCTACGACCGGCAGTATGAAGTGCGCCTGATCGATTTCCGCTTACATCAACCCC
 3020 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 3079
 AGTTGTGGATGCTGGCCGTCATACTTCACGCGGACTAGCTAAAGGCGAATGTAGTTGGGG
 a N T Y D R Q Y E V R L I D F R L H Q P Q -
 AAGGAATGCCCTAGTCAAACCTAGTACCAATTTAATTGACCGCCGTTCCCCCATGCC
 3080 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 3139
 TTCCTTAACGGGGATCAGTTTGATCATGGTTAAATTAAGTGGCGGCAAGGGGGGTACGGG
 a G I A P S Q T S T N L I D R R S P H A P -
 CAGACCAGGATCTTTCTCCCAAGGTCATGTCTCCGCACCTGTCCCAGCAGTTGGTCAG
 3140 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 3199
 GTCTGGTCTAGAAAGAGGGGTTCCAGTACAGGAGGCGTGGACAGGGTCGTCAACCAGTC
 a D Q D L S P Q G H V L R T C P S S W S E -
 AATTGCGCCGGGCCTACCAACAGGCGATCGCCGCCAGCAACCCCTAGTGTGGATTATC
 3200 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 3259
 TTAACGCGGCCCGGATGGTTGTCCGCTAGCGCGGGTCGTTGGGGATCAACCTAATAG
 a L R R A Y Q Q A I A A Q Q P L V L D Y H -
 ATTTCTTACCCCAATGCCCTAGTAGCTTAGTGGCCGAACTAGAAGCCCAATGGCATGGGC
 3260 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 3319
 TAAAGAATGGGGTTACGGGATCATCGAATCACCGGCTTGATCTTCGGGTACCGTACCCG
 a F L P Q C P S S L V A E L E A Q W H G R -
NcoI
 GGGAAACGGCCCAACTTTCTCCCCTCAGCTTGCAAAAACAATGGGATTTTAGCCATGGCT
 3320 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 3379
 CCCTTTGCCGGGTTGAAAGAGGGGAGTCAACGTTTTTTGTTACCCATAAATCGGTACCGA
 a E T A Q L S P L S L Q K Q W D F S H G L -
 TAGCAAGTCAAATTCTGGTCCTAATCCAAGAGTACGGCCAGCGTTAAACTCAGGCAGTG
 3380 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 3439
 ATCGTTCAGTTTAAGACCAGGATTAGGTTCTCATGCCGGTTCGCAATTTGAGTCCGTAC
 a A S Q I L V L I Q E Y G P A L N S G S A -
 CTTGGCCGAAAGCTTTGGTCCGCAAAATGAAACTTTAATTGCAGAAGAACAATTCCAAA
 3440 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 3499
 GAACCGGCTTTGAAACAGGCGGTTAACTTTGAAATTAACGTCTTCTTGTTAAGGTTT
 a W P K A L V R Q I E T L I A E E Q F Q K -
 AGCAATATTTAGCCAGGTGTCCCTAACCCCGAGCTTTTGGCCACCGTACCCGACAAGC
 3500 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 3559
 TCGTTATAAAGTCGGTCCACAGGGATTGGGGCTCGAAAACCGGTGGCATGGGCTGTTCG
 a Q Y F S Q V S L T P E L L A T V P D K P -
Ende s111354
 CATGAAAATTTTTGCGATGCTGGGAATTTAGTGTATCATTGTAACTGTCCGTTGGAG
 3560 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 3619
 GTACTTTTAATAAACGCTACGACCCTTAAATCACATAGTAACAATGACAGGCAACCTC

a *

```

← recJ-3`Primer
AAACAGACAAGGCTTGGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCAGGGGACTCATAAGCCCAAGGTCTG
3620 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 3679
TTTGTCTGTTCCGAACCATCGAGTCAACCAATCTCGTCCCCTGAGTATTCGGGTTCCAGC

```

PCR PRIMER

- 1) für die Entfernung des *recJ*-Gens (Cyanobase: *sll1354*)

5': recJ-5' 5'-GAT GTC TTC ATC TTC CGC CAA TAC-3'

3': recJ-3' 5'-CCA AGC CTT GTC TGT TTC TTC AAC-3'

- 2) für die reverse PCR des *recJ*-Gens aus pMSUV11

recJ-BglIII-1 5'-GAA GAT CTT CAA AGG GAT TCC ATA CTA AC -3'

recJ-BglIII-2 5'-GAA GAT CTT CCC CAC CCT ACC CCA CAA GCC-3'

- 3) für die Überprüfung der Deletion des *recJ*-Gens

recJ2-KpnI 5'-GGG GTA CCA CTA AAT TCC CAG CAT CGC-3'

recJ2-SphI 5'-CCA TAT AGA GCT AGT CTG ACG GAA G-3'

LÄNGENSTANDARDS FÜR AGAROSEGELE

a) *Lambda*-DNA (λ) Hind III verdaut; 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 1 μl pro Ansatz verwendet, ca. 10 min. bei 37°C vor Zugabe der Stoplösung inkubiert
23130bp, 9410bp, 6557bp, 4361bp, 2322bp, 2027bp, 564bp, 125bp

b) pBR322-DNA Msp I verdaut; 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 1 μl pro Ansatz verwendet
622bp, 527bp, 404bp, 307bp, 242bp*, 238bp*, 217bp, 201bp*, 190bp*, 180bp*,
160bp*, 147bp*, 123bp*, 110bp*, 90bp*, 76bp*, 67bp*, 34bp*, 26bp*, 15bp*,
9bp*

*... diese DNA-Fragmente sind auf 1m/v% Agarosegelen nicht mehr unterscheidbar

c) DNA-Längenstandards X; 0,25µg µl⁻¹, 2µl pro Ansatz verwendet, ca. 10 min. auf 37°C vor dem Zugeben der Stopplösung
12216bp, 11198bp, 10180bp, 9162bp, 8144bp, 7126bp, 6108bp, 5090bp, 4072bp, 3054bp, 2036bp, 1636bp, 1018bp, 517/506bp, 396bp, 344bp, 298bp, 220/201bp, 154/134bp, 75bp

ANTIBIOTIKUMRESISTENZKASSETTEN

a) Kanamycinresistenzkassette

(Km^r: ntp-Genprodukt = Neomycinphosphotransferase)

Die Kassette ist mit BamHI aus pRL 446 auszuschneiden. Sie ist 1273bp lang. Die ursprüngliche Resistenzkassette stammt aus dem Tn903.

Konzentrationen von Kanamycin für

E.coli 50µg ml⁻¹

Synechocystis sp. PCC 6803 50µg ml⁻¹

b) Chloramphenicolresistenzkassette

(Cm^r: CAT-Genprodukt = Chloramphenicolacetyltransferase)

Diese Kassette wird mit BamHI aus pJM 8 ausgeschnitten. Sie ist 1385bp lang. Die ursprüngliche Resistenzkassette stammt aus dem Tn9.

Konzentrationen von Chloramphenicol für

E.coli 20µg ml⁻¹

Synechocystis sp. PCC 6803 10µg ml⁻¹

c) Streptomycin/Spektinomycinresistenzkassette

(Sm/Sp^r: aadA-Genprodukt)

Das BamHI -Fragment aus pRL 463 ist ungefähr 2000bp lang. Die ursprüngliche Resistenzkassette stammt aus dem Plasmid pHP 45Ω [5].

Konzentrationen von Streptomycin für

E.coli 50µg ml⁻¹

Synechocystis sp. PCC 6803 10µg ml⁻¹

Alle Antibiotika werde mittels Sterilfilter (Minisart N, 200nm) sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

METHODEN

ZUCHT VON ESCHERICHIA COLI (*E.coli*)

E.coli werden in LB-Medium (Medium nach Luria & Bertani oder L-Broth) gezüchtet.

LB:	Trypton	10 g l ⁻¹
	Hefeextrakt	5 g l ⁻¹
	NaCl	10 g l ⁻¹

sterilisiert durch Autoklavieren (20 min; 1 bar), Lagerung bei RT

Plattenkulturen

30 ml LB-Medium mit 1,5w/v% Bakto-Agar (vorher autoklaviert) in eine Petrischale geben. Antibiotika werden direkt dem LA (= LB mit 1,5w/v% Bakto-Agar) zugesetzt. Von IPTG (Isopropylthiogalactosid)(20 mg ml⁻¹) und Xgal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid) (2 w/v% in DMF (Dimethylformamid)) werden jeweils 40µl auf den festen Agar aufgetragen. Die Zucht erfolgt im Brutschrank bei 37°C üN. Im Kühlschrank sind die Platten mehrere Wochen lagerfähig.

Minikulturen für die Stammhaltung, Koch-Qick-Präparationen und als Vorkultur

Maxikulturen

3-6 ml LB-Medium + Antibiotika werden in eine sterile Glaseprouvette mit Metallkappe in einem Schüttler bei 210 rpm und 37°C üN inkubiert.

Maxikulturen für die IH-Maxi-Präparation

1 l LB-Medium wird in einem 2 l-Fernbachkolben autoklaviert. Nach Abkühlen werden die entsprechenden Antibiotika und die 5 ml Vorkultur zugesetzt und bei 210 rpm und 37°C üN im Schüttler inkubiert.

ZUCHT VON SYNECHOCYSTIS SP. PCC6803 UND DEREN MUTANTEN

Die Zucht von *Synechocystis sp.* PCC 6803 erfolgt im Zuchtmedium BG11-TS. Die Herstellung dieses Mediums erfolgt durch Mischen der vier Stammlösungen (I, II, III, IV), von TES² und der Zugabe von Na-Thiosulfat nach untenstehendem Schema und anschließendem Autoklavieren (120°C, 1 bar).

Bei der Zucht ohne zugesetztem Kupfer (Kupfermangel) wurde kein Na-Thiosulfat zugegeben und zur Herstellung der Stammlösungen teilweise suprapure Chemikalien (um die Menge an Kupfer durch Verunreinigung der Chemikalien selbst zu minimieren) verwendet = BG11-Cu⁻.

BG11 TS:	Stammlsg. I	0,1		v/v% ¹
	Stammlsg. II	1 v/v%	(BG11 Cu ⁻ : ohne	CuSO ₄)
	Stammlsg. III	0,1		v/v%
	Stammlsg. IV	0,1 v/v%		
	TES ²	1 v/v%	(nicht bei	BG11 Cu ⁻)
	Na-Thiosulfat (s ³)	0,3 w/v%	(nicht bei	BG11 Cu ⁻)
Stammlsg. I (10 ³)	K ₂ HPO ₄ ·3 H ₂ O [#]		40	g l ⁻¹
Stammlsg. II (10 ²)	MgSO ₄ ·7 H ₂ O		3,7	g l ⁻¹
	CaCl ₂ ·4 H ₂ O [#]	4,75		g l ⁻¹
	NaNO ₃ [#]		150	g l ⁻¹
	A ₅ -Spuren (10 ¹)		100	ml l ⁻¹
	├─ MoO ₃	230		mg l ⁻¹
	├─ H ₃ BO ₄	2,86		g l ⁻¹
	├─ MnCl ₂ ·4 H ₂ O	1,81		g l ⁻¹
	├─ ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	220		mg l ⁻¹
	├─ CuSO ₄ ·5 H ₂ O	80 mg l ⁻¹	(nicht bei	BG11
Cu ⁻)	└─ Co(NO ₃) ₂ ·6 H ₂ O	50		mg l ⁻¹
Stammlsg. III (10 ³)	Na ₂ MgEDTA ⁴		1	g l ⁻¹
	Fe(NH ₄)-Citrat		6	g l ⁻¹
	Zitronensäure	6		g l ⁻¹
Stammlsg. IV (10 ³)	Na ₂ CO ₃ [#]		20	g l ⁻¹
TES-HCl (10 ²)		1	M	(pH 8,0)

Die Stammlösungen und das TES werden nach Autoklavierung bei 4 °C gelagert

[#] ... bei Zucht ohne zugesetztem Kupfer suprapure Chemikalien (Merck)

¹v/v% ... Volums-Volumsprozent

²TES ... 2-([2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]amino)ethansulfonsäure (trivial: N-tris-hydroxymethyl-2-aminoethansulfonsäure; ein 'Good Buffer')

³s ... solidus (fest)

⁴EDTA ... Ethylendiaminetetraacetic acid; ein Chelator für zweiwertige Ionen

verwendet um die Menge an Kupfer durch Verunreinigungen der Chemikalien zu minimieren.

Plattenkulturen

30 ml von BG11-TS oder BG11-Cu⁻ -Medium mit 1,5w/v% Bakto-Agar (vorher autoklaviert) in Petrischalen geben. Die Antibiotika, Glucose (10mM), Fructose (10mM), DCMU (3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff) (10µM), CuSO₄ (bis 1,3µM) etc. werden direkt in das noch flüssige Medium zugegeben.

Für Transformationen werden zusätzlich sterilisierte Filter (Schleicher & Schuell Protran BA 85, 0,45µm) auf die Platten gelegt. Die Zucht erfolgt in einer Heraphyt-Klimakammer bei 32 °C, 80 % Luftfeuchtigkeit und Dauerlicht (ca. 60µmol m⁻² s⁻¹) ein bis zwei Wochen. Zusätzlich werden die Platten in eine durchsichtige Plastiksachtel mit Deckel gegeben um ein Austrocknen zu vermeiden. Danach können die Platten einige Zeit bei RT gelagert werden.

Flüssigkulturen (50 ml)

In einen 100 ml Erlenmeyerkolben werden 50 ml BG11-TS oder BG11-Cu⁻¹ Medium gegeben, mit Watte und Alufolie verschlossen und autoklaviert. Nach dem Auskühlen werden wahlweise Antibiotika, Glucose etc. Zugegeben und mit einem Aliquot einer Flüssigkultur oder einer Einzelkolonie angeimpft. Gezüchtet wird in einem controlled environment Incubator Shaker bei 32°C, 150 rpm, Dauerlicht (60 µmol m⁻² s⁻¹) und zusätzlich wurde der Inkubatorraum mit CO₂ begast um besseres Wachstum zu erzielen.

STAMMSAMMLUNG

Die verschiedenen *E.coli*- und Cyanobakterien-Stämme werden im -80°C Gefrierschrank eingefroren.

E.coli-Stämme:

1 ml einer üN Kultur wird mit 145µl sterilem 80 v/v% Glycerin vermischt und in einem sterilen Nunc-Röhrchen eingefroren.

Cyanobakterien-Stämme:

Eine dichte 50 ml Kultur wird abzentrifugiert (10 min., 2000 rpm), der Überstand weitgehend entfernt und die Zellen im Rest der Flüssigkeit suspendiert. 1 ml dieser Zellsuspension wird mit 300µl frischem DMSO (Dimethylsulfoxid) vermischt. Die Zellen im Nunc-Röhrchen werden mit flüssigem N₂ schockgefroren und bei -75°C gelagert.

KOCH-QUICK-PRÄPARATION (Small-Scale-Plasmid-Präparation aus *E.coli* nach Holmes und Quigley)

3 ml einer üN-Kultur von *E.coli* werden 1 min. bei 12000 rpm in einem Eppendorfgefäß geerntet und das Pellet in 350µl STET (0,1M NaCl; 10mM Tris-HCl(pH 8,0); 1mM EDTA (Ethylendiaminetetraacetic acid)(pH 8,0) die bis jetzt aufgezählten Ingredienzien autoklaviert verwenden; 5v/v% Triton X-100; 8w/v% Saccharose; Lagerung bei RT) resuspendiert.

Dazu werden 25µl Lysozym (10mg ml⁻¹, frisch zubereitet) zugesetzt und anschließend 40 sec. in Wasserbad gekocht.

Sofort danach 15 min. bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend das flaumige Pellet (enthält Membranen und die dort anhaftende chrom. DNA) mit einem sterilen Zahnstocher entfernt.

Die zurückbleibende Plasmid-DNA wird mit 350µl Isopropanol gefällt und 15 min. bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird abgehoben und das Pellet kurz im Exsikkator getrocknet.

Das trockene Pellet wird in 20-50µl TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA (pH 8,0)) gelöst.

Zur Überprüfung der Ausbeute kann ein Aliquot auf einem Agarose-Minigel überprüft werden.

IH-MAXI-PRÄPARATION (Large-Scale-Plasmid-Präparation aus *E.coli* nach Ish-Horowicz)

1 l einer *E.coli* üN-Kultur wird in 500ml-Zentrifugenbecher 10 min. bei 6000 rpm und RT geerntet. Die Pellets werden in je 10ml IH I-Lösung (50mM Glucose; 25mM Tris-HCl (pH 8,0); 10mMEDTA (pH 8,0); Lagerung bei 4°C) resuspendiert und in einem Becher vereint.

Nun werden 5mg ml⁻¹ festes Lysozym zugegeben und mindestens 5 min. bei RT inkubiert.

Dann werden 40ml IH II-Lösung (10v/v% 2M NaOH; 1w/v% SDS(Sodium dodecylsulfate); Lagerung bei RT) zugegeben und vorsichtig gemischt bis das Pellet sich gelöst hat. Danach 5 min. auf Eis kühlen.

Jetzt werden 30ml IH III-Lösung (3M Kaliumacetat; 11,5v/v% Eisessig; Lagerung bei 4°C) , auf Eis vorgekühlt, zugegeben und geschwenkt bis zur vollständigen Präzipitation. Es wird weitere 5 min. auf Eis inkubiert, dann 20 min. bei 10000 rpm und 4°C abzentrifugiert.

Der Überstand wird mit dem 0,6 fachen Volumen Isopropanol bei RT gefällt, abzentrifugiert, das Pellet zweimal mit 70v/v% Ethanol (-20°C) gewaschen und 10 min. im Exsikkator getrocknet.

Das Pellet wird in 10ml TE gelöst. Die Trennung der chrom. DNA und der Plasmid DNA erfolgt mit Hilfe einer CsCl-Gradientenzentrifugation.

DNA-SPEKTROSKOPIE

Die DNA Konzentrationen von Plasmid- und chromosomalen-Maxi-Präparationen werden photometrisch bei 260nm mit einem Zweistrahlphotometer in Quarzküvetten bestimmt. Die gemessene OD sollte mindestens 0,1 betragen. Die DNA Konzentration in der Küvette (c) ergibt sich aus: $OD_{260} = 0,02 * c (\mu\text{g ml}^{-1})$

Um das Ausmaß der Proteinkontamination abschätzen zu können, misst man zusätzlich die OD bei 280nm. Liegt das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} bei 1.8-2 oder höher, so ist der Proteinanteil gering und obige Berechnung gilt in guter Näherung.

RESTRIKTIONSVERDAU VON PLASMID-DNA

Für ca. 1µg DNA einer Koch-Quick Präp. oder einer CsCl-Präp. werden standardmäßig 2u Restriktionsenzym (eine Unit ist definiert als die Menge Enzym, die vollständig 1µg einer bestimmten Standard-DNA innerhalb von 1 h bei einer spezifischen Temperatur schneidet) eingesetzt. Der Verdau wird in einem Gesamtvolumen von 20µl bis 100µl pro Ansatz bereitet, je nachdem ob man einen Kontrollverdau oder einen präparativen Verdau bereitet.

Der Ansatz enthält weiter 10v/v% eines 10x Puffers (der vom Restriktionsenzym abhängt) und 10v/v% RNase A (2mg ml⁻¹ RNase A; 100mM Natriumacetat (pH 5,2) ;1mM EDTA (pH 8,0); 10 min. kochen = DNase-Inaktivierung; bei -20°C lagern und vor Verwendung 1 :100 verdünnen).

Bei Doppelverdauen mit zwei verschiedenen Enzymen, die nicht im gleichen Puffer schneiden, kann man zuerst mit einem Enzym schneiden. Dann kann man auf den Puffer des zweiten Enzyms einstellen (hinzufügen von Komponenten) und mit dem zweiten Enzym schneiden.

Ist ein Pufferwechsel nicht möglich, so kann man die DNA zwischen den Verdauen nach einmaliger Extraktion mit Chloroform mit 10v/v% 2,5M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5fachen Volumen Ethanol fällen. Danach das Pellet in der gewünschten Menge H₂O aufnehmen.

Der Verdau erfolgt standardmäßig 2 h bei 37°C.

Mit 10v/v% Stop-Lösung (25mM Tris-HCl (pH 8); 50v/v% Glycerin; 0,25m/v% Bromphenolblau; 0,25m/v% Xylencyanol FF; bei 4°C gelagert), die zugleich als Auftragspuffer für das Agarosegel fungiert, wird der Verdau gestoppt.

Bei partiellen Verdauen wird dieser durch Zugabe von Stop-Lösung und gleichzeitiger Inkubation auf Eis abgestoppt.

DNA-AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Mini-Gel (zur qualitativen Kontrolle und Quantifizierung bei Koch-Quick-Präp., IH Small und Maxi-Präp. und Large-scale-Gesamt-DNA-Präp. aus Cyanobakterien)
0,3m/v% - 2m/v% Agarose (jenachdem welche Molekulargewichte man unterscheiden möchte) werden in 50ml 1xTAE (50x TAE: 242g l⁻¹ Tris; 57ml l⁻¹ Eisessig; 50mM EDTA (pH 8); autoklaviert und bei RT gelagert; zur Verwendung 1 : 50 mit Wasser verdünnt) im Mikrowellenherd aufgekocht und dann auf ca. 60°C abgekühlt. Nun werden 5µl Ethidiumbromid-Lösung (10mg ml⁻¹) zugegeben und in den abgedichteten Gelschlitten geleert. Der entsprechende Kamm wird gleich eingesetzt. Nach dem Festwerden der Agarose kann der Kamm entfernt werden und der Schlitten in die Gelwanne, gefüllt mit 1x TAE, gelegt werden. Die Proben und Längenstandards werden aufgetragen und der Lauf bei 70 Volt 2-4 h je nach Auftrennung durchgeführt.

Die Dokumentation der Banden erfolgt mit einem UV-Transilluminator (maximale emittierte Wellenlänge 302nm) einem UV-Filter, einem Kodak 22A Wratten-Filter und einer Polaroid MP4 Kamera auf einem Polaroid Schwarzweiß-Photo (Typ 57).

Maxi-Gel (bei Kontrollverdauen, bei präparativen Verdauen und zur Auftrennung von PCR-Produkten)

0.3-2m/v% Agarose in 300ml 1x TAE im Mikrowellenherd aufkochen lassen, auf ca. 60°C abkühlen lassen mit 30µl Ethidiumbromid-Lösung (10mg ml⁻¹) versetzt und in den abgedichteten Gelschlitten gießen. Den entsprechenden Kamm einsetzen und abkühlen lassen. Gelschlitten in die Apparatur geben und mit 1x TAE füllen. Die Proben werden aufgetragen und der Lauf entweder 4-7 h bei 130 V oder 18 h bei 50 V gemacht.

Die Dokumentation erfolgt wie oben.

DNA-ISOLIERUNG AUS AGAROSEGELEN MITTELS QIAEX II

Gewünschte Bande aus dem Agarosegel über dem UV-Transiluminator (so kurz wie möglich mit UV-Licht bestrahlen, um DNA-Schäden zu vermeiden) ausschneiden und in ein Eppendorfgefäß geben. Nun werden 3x Volumen von Puffer QX1 zu 1x Volumen des Agarosegelstückes gegeben.

Dazu werden 10µl (wenn man < 2µg DNA extrahieren will) QIAEX II-Glasmilch gegeben und kurz gevortext.

Das Gemisch wird für 10 min. auf 50°C gestellt, wobei zwischendurch mehrmals gevortext wird. Durch die Gelbfärbung des Puffers kann man gut erkennen, ob sich das Gelstückchen vollständig gelöst hat. Schlägt die Gelbfärbung des Puffers in orange oder in violett um, so hat sich der pH zu stark geändert. Das kann man durch Zufügen von 10µl Natriumacetat 3M pH 5 wieder beheben.

Dann wird die Probe 30 sec. bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgehoben. Das Pellet wird mit 500µl Puffer QX1 gewaschen, danach 2mal mit je 500µl Puffer PE gewaschen und das Pellet 10-15 min. trocknen gelassen, bis seine Farbe Weiß ist.

Jetzt kann die DNA von der Glasmilch eluiert werden. Dazu pipettiert man die entsprechende Menge TE oder H₂O zur Milch, mischt und lässt es 10 min. bei RT stehen. Danach wird kurz abzentrifugiert und der Überstand, der die DNA enthält, in ein frisches Eppendorfgefäß gegeben. Etwas bessere Ausbeuten kann man erreichen, wenn man nochmals eluiert und die Überstände vereinigt.

PLASMID-KONSTRUKTION (Ligation)

Die Ligation erfolgt in möglichst kleinem Volumen (um 10 μ l) mit zwei bis zehnfachem Überschuß an Insert (um ca. eine fragmentgrößenabhängige Äquimolarität der zu ligierenden DNA-Fragmente zu erreichen) bei 16 °C üN. Der Ansatz enthält 10 v/v% 10xLigasepuffer (660mM Tris-HCl (pH 8,0); 100mM MgCl₂; 10mM EDTA (pH 8,0); 1mM ATP; 100mM DTT (Dithiothreitol); Lagerung bei -20 °C und vor Verwendung auf Eis auftauen lassen (ATP !)), die DNA-Fragmente und 5u (ein unit T4-DNA-Ligase ist jene Enzymaktivität, die bei 37°C in 20 min. 1nMol [³²P] aus Pyrophosphat in Norit-absorbierbare Substanz austauscht) T4-DNA-Ligase (5u μ l⁻¹).

Prinzipiell existieren zwei Möglichkeiten, nämlich 'sticky-end' und 'blunt-end' Ligationen.

Bei 'sticky-end' Ligation (d.h. Ligation zweier Fragmente, die dieselben Einzelstrang Überhänge haben) inkubiert man vor Zugabe des Puffers 5 min bei 45 °C und stellt anschließend gleich auf Eis, um die intramolekularen kohäsiven Enden zu denaturieren.

Wenn das Plasmid, in welches das gewünschte DNA-Fragment ligiert werden soll, nur mit einem Restriktionsenzym, das 'sticky-end' schneidet, geschnitten wurde, kann man vor der Ligation das linearisierte Plasmid durch eine Phosphatasebehandlung an der Religation hindern.

Bei nicht kompatiblen überhängenden Enden kann man entweder durch S1- oder Mung-bean-Nuklease Verdau oder durch Auffüllen der 5'-überhängenden Enden mittels Taq-DNA-Polymerase 'blunt-ends' erzeugen.

Der Nuklease Verdau erfolgt direkt nach dem Restriktionsverdau durch Zugabe von 10 v/v% 10xS1-Puffer (33mM Natriumacetat; 50mM NaCl; 0,03mM ZnSO₄; Lagerung bei RT) und 40u (ein unit S1-Nuklease ist die Enzymaktivität, die in 1 min. bei 37°C 1 μ g dNTPs aus denaturierter DNA freisetzt) S1-Nuklease oder Mung-bean-Nuklease (400u μ l⁻¹; vor Verwendung in S1-Puffer 1 : 10 verdünnen). Das Gesamtvolumen des Ansatzes sollte dabei zusätzlich verfünffacht werden, um den Restriktionsenzym-puffer zu verdünnen.

Der Ansatz für das Auffüllen mittels Taq-DNA-Polymerase enthält die nach dem Restriktionsverdau mit Chloroform extrahierte, gefällte und wiederaufgenommene DNA, 10 v/v% 10xTaq-Puffer (Zusammensetzung s. Kap. PCR), je 0,1mM dNTP und 2,5u Taq-DNA-Polymerase und wird bei 72 °C 15 min. lang inkubiert. Die Isolierung des erwünschten DNA-Fragments erfolgt in allen Fällen über Agarose-Gelelektrophorese und 'Gene-Clean'.

ELEKTROPORATION VON E.COLI

ELEKTROKOMPETENZ

Eine logarithmische 200 ml-Kultur ($OD_{600} \sim 2$) des entsprechenden *E.coli*-Stammes in SOB-Medium ($5g\ l^{-1}$ Hefeextrakt; $20g\ l^{-1}$ Trypton; $0,5g\ l^{-1}$ NaCl; $2,5mM$ KCl; mit NaOH auf pH 7,0 stellen, autoklavieren und vor Verwendung $10\ mM$ $MgCl_2$ (sterilfiltriert) zugeben)

10 min. auf Eis kühlen, dann ernten (5 min bei 5000 rpm und $4\ ^\circ C$) und die Zellen zweimal mit je 100ml eisgekühltem 10v/v% Glycerin (autoklaviert) waschen. Das Pellet dann in wenig Restflüssigkeit resuspendieren und in $60\mu l$ Aliquots aufteilen. Nach Schockfrieren in fl. N_2 werden die Aliquots bei $-75\ ^\circ C$ gelagert.

ELEKTROPORATION

$60\ \mu l$ der elektrokompetenten Zellen auf Eis auftauen lassen, $0,1\mu l$ einer Koch-Quick-Präparation (s. Kap. Koch-Quick-Präp.) oder bis zu $4\mu l$ eines Ligationsansatzes (s. Kap. Ligation) (beide DNA-Lösungen vor Entnahme der Aliquots kurz abzentrifugieren) zugeben, die DNA mindestens 5 min. auf Eis an die Bakterienzellen binden lassen, dann die Zellen in Ethanol gespülte, trockene, eisgekühlte Elektroporationsküvetten geben, außen gut abtrocknen und in den $-20^\circ C$ vorgekühlten und abgetrockneten Küvettenhalter stellen. Den Küvettenhalter in das Gehäuse schieben und durch Drücken der beiden Pulsknöpfe den Kondensator zur Entladung bringen (Einstellungen am Bio-Rad Gene Pulser: $2,5\ kV$; $25\ \mu F$; $200\ \Omega$).

Die Zellen in der Küvette sofort mit 1 ml SOC-Medium ($5g\ l^{-1}$ Hefeextrakt; $20g\ l^{-1}$ Trypton; $10mM$ NaCl; $2,5mM$ KCl; $20mM$ $MgCl_2$; $20mM$ $MgSO_4$; autoklavieren und $20mM$ Glucose zusetzen; Lagerung bei RT) mischen, in eine sterile Epruvette transferieren und dann ca. 1 Stunde bei 250 rpm und $37\ ^\circ C$ zur Expression der Plasmid vermittelten Antibiotikumresistenz schütteln.

Dann die Zellen ernten und in 10 %- und 90 %-Aliquoten auf LA-Platten (mit Antibiotika oder/und IPTG und Xgal) **ausplattieren** (s. Kap. Zucht von *E.coli*). Die Zucht erfolgt üN und sollte besonders bei der Selektion mit Ampicillin nicht verlängert werden, da dann Satellitenkulturen auftreten.

Bei Screening mit dem Farbstoff Xgal läßt sich die Farbentwicklung durch eine mehrstündige Inkubation im Kühlschrank verstärken.

Die Plasmid-DNA der erhaltenen Transformanten wird schließlich nach Anzucht einer Minikultur in selektivem LB-Medium durch Koch-Quick-Präparation isoliert und mittels verschiedener Kontrollverdaue auf ihre Richtigkeit überprüft.

Die *E.coli*-Kultur die das richtige Plasmid enthält wird nochmals üN in selektivem LB-Medium angezüchtet und dann in der Stammhaltung eingefroren (s. Kap. Stammhaltung).

TRANSFORMATION VON *E.COLI* NACH DER CaCl_2 -METHODE

KOMPETENZ

Eine logarithmisch wachsende 100ml-Kultur des entsprechenden *E.coli* -Stammes in LB-Medium ($\text{OD}_{600} \sim 2$) wird bei 4°C und 5000rpm geerntet. Der Überstand wird quantitativ weggeschüttet.

Nun wird das Pellet in 50ml eiskalter CaCl_2 -Lösung (50mM CaCl_2 ; 10mM Tris-HCl pH 8) resuspendiert und 20 min. auf Eis stehen gelassen. Danach wieder abzentrifugieren und das Pellet wird nochmals in 50ml eiskalter CaCl_2 -Lösung gelöst. Danach wie oben abzentrifugieren.

Das Pellet in 6ml eisgekühlter CaCl_2 -Lösung resuspendieren (nicht warm werden lassen) und 900µl 80% Glycerin dazugeben und vortexen.

Dann wird die Suspension in Eppendorf-Gefäßen zu je 200µl aufgeteilt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Lagerung bei -70°C.

TRANSFORMATION

Die kompetenten Zellen werden langsam auf Eis aufgetaut. Zugabe der gewünschten DNA zu den Zellen und 20 min. bei 0°C inkubieren.

Jetzt werden die Zellen 45 sec. bei 42°C inkubiert und danach rasch 2 min. auf Eis inkubieren.

Dann werden 1ml SOC-Medium (siehe Elektroporation) dazugegeben und 1 h bei 37°C geschüttelt.

Nach dem Konzentrieren der Zellen auf 100-200µl werden diese auf selektiven (Antibiotika, X-Gal +IPTG) Agarplatten ausplattiert. Die Platten werden üN bei 37°C inkubiert.

TRANSFORMATION VON SYNECHOCYSTIS SP. PCC6803 UND DEREN MUTANTEN

zur Theorie vgl. Kap. Cyanobakterien-Genetik

NATÜRLICHE TRANSFORMATION von *Synechocystis sp.* PCC 6803

Synechocystis sp. PCC6803 ist natürlich, d.h. von Natur aus, kompetent für die Aufnahme von freier DNA und daher sehr einfach zu transformieren.

Zur Durchführung braucht man eine frische, sich in logarithmischer Wachstumsphase befindliche, Cyanobakterienkultur (OD₇₃₀ zwischen 1 und 3) und gereinigte Plasmid-DNA.

100µl BG11 TS-Medium mit ca. 10⁷ Cyanobakterien (eine OD₇₃₀ von 0,5 entspricht ca. 10⁷ Cyanobakterien pro ml) werden mit 2 bis 15µg (bei integrativen Plasmiden bis zu 15µg; für replizierende Plasmide reichen 2µg DNA) Plasmid-DNA (in möglichst geringer Menge sterilem TE gelöst) gemischt und dann ca. 24 h in einem Eppendorfgefäß im Lichtbrutschrank (32°C, 80% Luftfeuchtigkeit, starkes Dauerlicht) inkubiert.

FILTERTECHNIK

Am nächsten Tag werden die Cyanobakterien dann auf einem autoklavierten Membranfilter (Protran BA 85; 0,45µm), welcher sich auf einer nichtselektiven BG11 TS-Agarplatte befindet, ausplattiert und wieder 1 bis 2 Tage im Lichtbrutschrank inkubiert.

Während dieses Zeitraums kann die doppelte homologe Rekombination in eines der 10 - 20 Chromosomenkopien stattfinden und das Antibiotikumresistenzgen exprimiert werden.

Schließlich wird der Membranfilter (mit den Cyanobakterien) auf eine selektive BG11 TS-Agarplatte (mit dem(n) entsprechenden selektiven Antibiotikum(a)) transferiert und bis zum Erscheinen der ersten Einzelkolonien im Lichtbrutschrank inkubiert.

WEICHAGARTECHNIK

Am nächsten Tag werden die Cyanobakterien dann mit 5 ml BG11 TS-Weichagar (ca. 45 °C) gemischt und auf eine BG11 TS-Agarplatte gegossen. Die Platte mit dem ausgehärteten Agar wird anschließend 2 Tage im Lichtbrutschrank inkubiert. Danach wird die Platte mit 5 ml BG11 TS-Weichagar, welcher das Antibiotikum für die Selektion enthält, überschichtet. Bis zum Erscheinen von Einzelkolonien wird die Platte im Lichtbrutschrank inkubiert.

Diese Einzelkolonien (d.h. Transformanten, welche das erwünschte Konstrukt und die Antibiotikumresistenzkassette durch homologe Rekombination an der richtigen Stelle ins Chromosom integriert haben) werden dann wieder auf selektiven BG11 TS-Agarplatten

ausgestrichen. Mit den auf diesen Platten erhaltenen Einzelkolonien können dann Flüssigkulturen mit selektivem BG11 TS oder BG11 Cu⁻-Medium angeimpft werden.

Nach Isolation der Gesamt-DNA dieser Kulturen (s. Kap. Small-Scale-Präp. und Large-Scale-Präp. aus *Synechocystis*) wird zur Überprüfung auf Homozygotie im entsprechendem Locus PCR mit entsprechenden außenliegenden Primern (s. Kap. PCR-Primer und Gensequenzen) durchgeführt.

Außenliegende Primer (im Gegensatz zu innenliegenden Primern) bedeutet in diesem Fall, dass sich die Primerbindungsstellen knapp außerhalb des deletierten DNA-Bereichs befinden und folgende PCR-Produkte bei den drei möglichen Genomsituationen liefern (s. Abb. folgend):

- a) Homozygot wildtyp (Situation im Ausgangsstamm): ein PCR-Produkt mit der Länge des Bereichs zwischen den zwei Primern auf dem Chromosom (Wildtyp-Allel)
- b) Homozygot deletiert (kein intaktes Gen mehr vorhanden): ein PCR-Produkt mit der Länge des Bereichs zwischen den zwei Primern auf dem Chromosom minus Länge des herausgeschnittenen (deletierten) Bereichs plus Länge der Antibiotikumresistenzkassette.
- c) Heterozygot (wildtyp und deletiert) im entsprechenden Gen-Locus (Situation nach doppelter homologer Rekombination aber vor vollständiger Segregation): zwei PCR-Produkte mit den Längen wie unter a) und unter b) beschrieben, annähernd in dem Mengenverhältnis wie diese zwei Allele (wildtyp und deletiert) in der der PCR zugesetzten chromosomalen DNA (und somit in dem Genompool der Kultur) vorkommen (vorausgesetzt, dass die PCR die unterschiedlichen Templates in gleichem Ausmaße vermehrt).

Abb. :

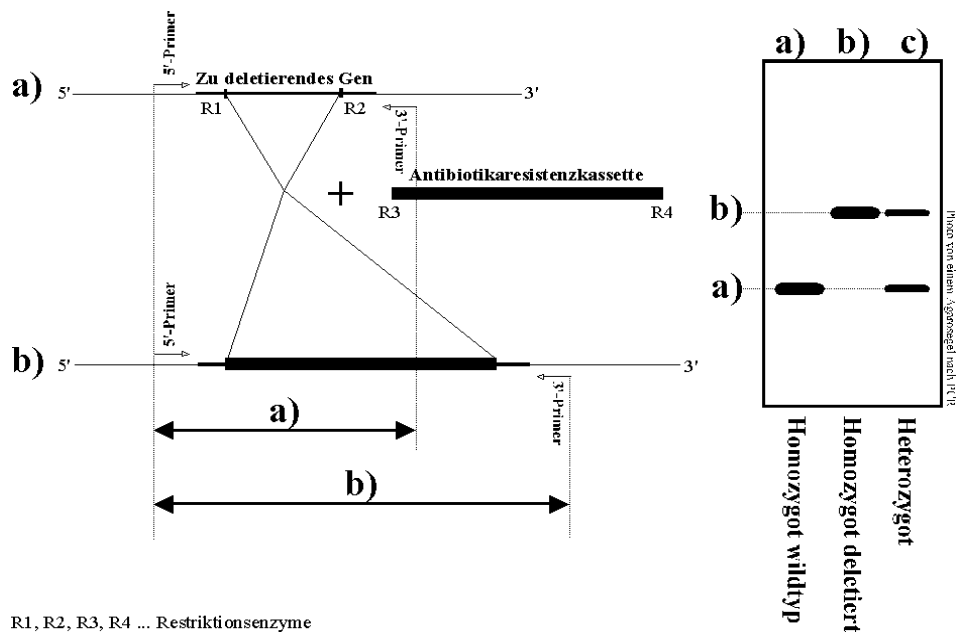


Abb. : PCR Produkte der drei möglichen Genomsituationen (a) homozygot wildtyp, b) homozygot deletiert und c) heterozygot nach Transformation mit einem nichtreplizierenden Plasmid, das einen chromosomalen (und somit homologen) Bereich besitzt, aus dem ein Stück DNA deletiert und durch eine Antibiotikumresistenzkassette ersetzt wurde.

Falls die Kulturen nicht homozygot mutiert im entsprechenden Locus sind (d.h. noch immer eine Bande am Agarosegel sichtbar ist, die der Länge nach dem Wildtyp-Allel entspricht) kann versucht werden, ob durch weitere sukzessive Zucht in selektivem Medium entweder in Flüssigkultur oder über Einzelkoloniausstriche (wahlweise unter verschiedenen Wachstumsbedingungen wie Photoautotrophie, Mixotrophie oder Chemoorganoheterotrophie oder/und mit steigender Antibiotikumkonzentration), die gewünschte homozygote Mutante erhalten wird. Welches nur möglich ist, wenn die gewünschte Homozygotie nicht prinzipiell unmöglich ist.

Ist ein Mutantenstamm homozygot mutiert (d.h. ist am Agarosegel nur mehr das PCR-Produkt zusehen welches dem unterbrochenen Allel entspricht) kann man den Mutantenstamm zur Kontrolle mehrmals hintereinander in nichtselektivem Medium (um die möglicherweise noch vorhanden Wildtyp-Allele wieder zu vermehren) züchten.

Eine weitere PCR zeigt dann ob noch Wildtyp-Allele nachweisbar sind, und falls nicht kann der Mutantenstamm nach einem Einzelkoloniausstrich und einer bis zur stationären Wachstum Phase gezüchteten Flüssigkultur in der Stammhaltung eingefroren werden.

ELEKTROPORATION von *Synechocystis sp.* PCC 6803

Eine logarithmische wachsende Cyanobakterienkultur wird 3-mal mit sterilem Hepes (1mM, pH 7,5) gewaschen. 60 µl der Zellsuspension werden mit der entsprechenden Menge DNA vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wird das DNA-Zellgemisch in eine Elektroporationsküvette gefüllt und mit einem Biorad Elektroporator gepulst. Einstellungen am Gerät: 1cm Küvette – R = 200 Ω, C = 25 µF, U = 2,5kV; 0,1cm Küvette - R = 200 Ω, C = 25 µF, U = 1,8kV Anschließend werden die Zellen in 1 ml BG11 T aufgenommen und Platten transferiert. Danach wird 2 Tage im Lichtbrutschrank inkubiert. Für die spezifische Selektion mit Antibiotikum wird der Filter auf selektives Medium transferiert und bis zum Erscheinen von Einzelkolonien im Lichtbrutschrank inkubiert.

SMALL-SCALE-GESAMT-DNA-PRÄPARATION AUS SYNECHOCYSTIS SP. PCC6803

Um die vielen im Rahmen dieser Arbeit zu überprüfenden Mutantenstämme rasch auf Homozygotie überprüfen zu können, wurde eine neue, sehr rasche Methode entwickelt, um genügend DNA aus *Synechocystis* für einen PCR Versuch zu erhalten.

- 2x1,5 ml einer sehr frischen aber schon dichten 50 ml-Kultur 5 min bei 12000rpm und RT abzentrifugieren und den Überstand auf 500 µl verringern (durch Abheben der überflüssigen Flüssigkeit)
- 100 µl 10w/v% N-Laurylsarcosine zugeben und dabei das Pellet resuspendieren
- ca. 300 mg trockene, hitzesterilisierte glass beads (Sigma: G-9143) (Korngröße 212 - 300 µm; mit halbkonzentrierter HNO₃ waschen; ausgiebig mit H₂O spülen; trocknen bei 100°C; hitzesterilisieren bei 180°C für ca. 2 h) zugeben und 3 min. kräftig vortexen
- 2 min. ins kochende Wasserbad stecken und dann 5 min. bei 14000rpm und 4°C abzentrifugieren

- den Überstand (ca. 400µl) in einem frischen Eppendorfgefäß mit 5µl Glasmilch (QIAEX II, siehe DNA-Isolierung) und 300µl Puffer QX 1 vermischen und 10 min. auf Eis inkubieren, ab und zu vortexen
- 2 min. bei 14000rpm und 4°C abzentrifugieren, den Überstand quantitativ abheben (notfalls nochmals kurz abzentrifugieren) und das Glasmilch-Pellet 2x mit 200µl Puffer PE waschen
- 2 min bei 14000rpm und RT abzentrifugieren und den Überstand wieder quantitativ abheben, das Pellet trocknen lassen bis es weiß ist
- das Pellet in 20µl TE resuspendieren und 10 min. bei RT inkubieren
- 2 min. bei 12000rpm und RT abzentrifugieren und den Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß transferieren
- davon 5µl zum PCR-Ansatz zusetzen (s. Kap. PCR)

LARGE-SCALE-GESAMT-DNA-PRÄPARATION AUS *SYNECHO-CYSTIS SP.* PCC6803

- ernten einer dichten 50 ml-Kultur in JA-20 Röhrchen 10 min. bei 10000rpm und RT
- das Pellet mit wenig TE in ein Eppendorfgefäß transferieren und mit TE auffüllen
- abzentrifugieren (Eppendorfszentrifuge: 10 min., 12000rpm, RT) und in 400µl TE aufnehmen (kräftig vortexen)
- ca. 150µl trockene, hitzesterilisierte glass-beads (s. Kap. Small-DNA-Präp. aus Cyanobakterien), 20µl 10w/v% SDS und 450µl Phenol/Chloroform (1:1) zugeben
- 10 mal hintereinander 1 min. vortexen und 1 min. auf Eis stellen
- 15 min. bei 4°C in der Eppendorfszentrifuge abzentrifugieren und den wässrigen Überstand hintereinander mit je gleichem Volumen an Phenol, Phenol/Chloroform (1:1), Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und schließlich Chloroform extrahieren
- nach abschätzen des Volumens der wässrigen Phase wird die DNA durch Zugabe von 10v/v% 2,5 M NaAcetat (pH 5,2) und 2,5-fachem Volumen an Ethanol p.A. gefällt
- nach 15 min. Zentrifugation bei 4°C in der Eppendorfszentrifuge wird das Pellet mit 70v/v% Ethanol (- 20°C) gewaschen, im Exsikkator getrocknet und in 50µl TE gelöst
- zur Kontrolle wird ein Aliquot (1 µl) auf einem Mini-Gel (0,3m/v%; s. Kap. Gelelektrophorese) überprüft

LARGE-SCALE-GESAMT-DNA-PRÄPARATION AUS *SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803* OHNE PHENOL

- 30ml einer frischen, halbwegs dichten Kultur in einem Falconröhrchen ernten und den Überstand abheben
- ca. je 500µl Zellen in ein Eppendorf geben
- 150µl glass-beads (siehe Small-DNA-Präp. aus Cyanobakterien), 100µl SDSw/v% und 200µl NH₄OH (3M) dazugeben
- 6 mal hintereinander 1 min. vortexen und 1 min. auf Eis stellen
- 4min. in kochendes H₂O-Bad halten
- 15min. bei 4°C und 12000rpm abzentrifugieren und den Überstand in ein neues Eppendorfgefäß geben
- die gleich Menge Isopropanol (~600µl) dazugeben und mischen
- 10min. bei -20°C fällen lassen
- 20min. bei 4°C und 12000rpm zentrifugieren, Überstand abheben und das Pellet trocknen
- das Pellet in 500µl TE lösen und 500µl Isobutanol (TE gesättigt) dazugeben, mischen und 1min. abzentrifugieren
- klare (untere) , farblose Phase in ein neues Eppendorf geben
- die gleiche Menge Isopropanol dazugeben, 10min. bei -20°C fällen und 15min. bei 12000rpm und 4°C abzentrifugieren
- Pellet mit 70% Ethanol waschen und trocknen
- Pellet in 50-100µl TE aufnehmen

PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

PCR-Ansatz:

- DNA

Gesamt-DNA von *Synechocystis* sp. PCC 6803:

5µl einer Small-scale-Gesamt-DNA-Präparation

1µl einer Large-scale-Gesamt-DNA-Präparation

Plasmid-DNA aus *E.coli*:

0,1µl einer Koch-Quick-Präparation oder
IH-Quick-Präparation oder IH-MaxiPräparation

- 10xTaq-Puffer 5µl
(100mM Tris- HCl; 15mM MgCl₂; 500mM KCl; pH 8,3 (20 °C))
- dATP (0,1mM) 5µl (1mM)
(1 : 100 Verdünnung der 100mM Lösungen von Boehringer Mannheim)
- dTTP (0,1mM) 5µl (1mM; wie oben)
- dCTP (0,1mM) 5µl (1mM; wie oben)
- dGTP (0,1mM) 5µl (1mM; wie oben)
- 5'- Primer (1µM) 0,5µl (0,1mM)
- 3'- Primer (1µM) 0,5µl (0,1mM)

- Taq-DNA-Polymerase (2,5u) 0,5µl (5u/µl)
(ein unit Taq-DNA-Polimerase ist definiert als die Menge an Enzym, die
10nmol dNTPs in Dna innerhalb von 30 min. bei 72°C einbauen kann)
- H₂O ad 50µl

PCR-Parameter (GeneAmp PCR System 2400 von Perkin Elmer):

5 min	94°C	
	30 sec	94°C
	30 sec	45°C für <i>petJ</i> -Primer
		50°C für <i>cytM</i> -Primer
		58°C für <i>petE</i> -Primer
		56°C für Cm-Primer
		55°C für Tn -Primer
		55°C für <i>recA, G, J, R</i>
		<i>xerC</i> -Primer
1 - 1,5 min	72 °C	

5 min

72 °C

8

4 °C

20µl des PCR-Ansatzes mit 10v/v% Stopplösung mischen, auf ein großes Agarosegel auftragen und üN bei 30 - 50mA laufen lassen. Am nächsten Tag über einem UV-Transilluminator photographieren (s. Kap. Gelelektrophorese).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., (1989): Molecular cloning - a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- [2] Kaneko T, Sato S., Kotani H., Tanaka A., Asamizu E. (1996): Sequence Analysis of the Genom of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 , Sequence Determination of the Entire Genom and Assignments of Potential Protein-coding Regions, DNA Res. 3: 109-136
- [3] Sandmann R. (1986): Formation of plastocyanin and cytochrom c-553 in different species of blue-green algae, Arch. Microbiol. 145: 76-79
- [4] Zhang L., Pakrasi H. B., Whitmarsh J. (1994): Photoautotrophic Growth of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in the Absence of Cytochrom c-553 and Plastocyanin, J. Biol. Chem. 269: 5036-5042
- [5] Murphy R., Gasparich G., Bryant D., Porter R., (1990): Nucleotid Sequence and Further Charakterisation of the *Synechococcus* sp. Pcc 7002 recA Gen, J of Bact., Feb.: 967-976
- [6] Kowalczykowski S., Dixon D., Eggleston A., Lauder S., Rehrauer W., (1994): Biochemistry of Homologous Recombination in *Escherichia coli*, Microbiol. Reviews, Sept., 401-465
- [7] Zang X., Liu B., Liu S., Arunakumara K., Zhang X.,(2007), Optimum Conditions for Transformation of *Synechocystis* sp. PCC 6803 J of Molbiol., June, 241-245
- [8] Flores E., Schmetterer G., (1986), Interaction of Fructose with the Glucose Permease of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803, J of Bact. May,: 693-696
- [9] Cai Y. and Wolk C., (1990), Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences, *J. Bacteriol.* 1990, 172(6):3138
- [10] Viola S., Rühle T. and Leister D., (2014), A single vector-based strategy for marker-less gene replacement in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Microbial Cell Factories* 2014, 13:4
- [11] Gay P., Le Coq D., Steinmetz M., Berkelman T., and Kado C., (1985) Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria, *J. Bacteriol.*,164:918-921.

- [12] Gay P., Le Coq D., Steinmetz M., Ferrari E., and Hoch J., (1983), Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 153:1424-1431.
- [13] Muro-Pastor, AM., Kuritz, T., Flores, E.,Herrero, A. and Wolf, CP. (1994): Transformation of a genetic marker from a megaplasmid of *Anabens sp.* Strain PCC7120 to a megaplasmid of a different *Anabena* strain. *J. Bacteriol.* 176: 1093-1098
- [14] Dreiseikelmann, B. (1994) Translocation of DNA across bacterial membranes. *Microbiol. Rev.* 58, 293-316.
- [15] Dubnau, D. (1991) Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* 55, 395-424.
- [16] Barten, R. and Lill, H. (1995) DNA-uptake in the naturally competent cyanobacterium, *Synechocystis sp.* PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 129, 83-88.
- [17] Yoshihara S., Geng XX., Okamoto S., Yura K., Murata T., Go M., Ohmori M. and Ikeuchi M. (2001): Mutational analysis of genes involved in pilus structur, mobility and transformation competency in the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Plant Cell Physiol* 42; 63-73
- [18] Bhaya D., Bianco NR., Bryant D. and Grossman A. (2000): Type IV pilus biogenesis and motility in the *Synechocystis sp.* PCC 6803; *Molecular Microbiology* 37; 941-951
- [19] Murphy R., Gasparich G., Bryant D., Porter R., (1990): Nucleotid Sequence and Further Charakterisation of the *Synechococcus sp.* Pcc 7002 *recA* Gen, *J of Bact.*, Feb.: 967-976
- [20] Elhia J., Wolk C. P. (1988): A versatile class of positiv-selection vektors based on the nonviability of palindrom-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers, *Gene* 68: 119-138

Quellenangaben: Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

INDEX DER ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AB	Antibiotikum
ARTO	alternative <u>R</u> espiratorische <u>T</u> erminale <u>O</u> xidase
ATP	<u>A</u> denosin-5'- <u>t</u> riphosphat
Bd.	Band
Bde.	Bände
bp	Basenpaar(e) (engl.: <u>b</u> ase <u>p</u> air(s))
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Chl.	Chlorophyll Oxidoreduktase)
d.h.	dass heist
DNA	<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> uclei <u>c</u> acid (dt.: DNS = <u>D</u> esoxyribo <u>n</u> uclei <u>n</u> säure)
dt.	deutsch
engl.	englisch
etc.	et cetera
fl.	flüssig(em)
Hg.	Herausgeber
hptsl.	hauptsächlich
ICM	<u>I</u> ntracytoplasmatische <u>M</u> embran
IS-Sequenz	<u>I</u> nsertions-Sequenz
Kap.	Kapitel
kbp	Kilobasenpaar (= 10^3 Basenpaare)
kJ	Kilojoul (= 10^3 Joul)
M_r	relative molare Masse (Einheitslos)
Mbp	Megabasenpaar (= 10^6 Basenpaare)
mRNA	<u>m</u> essenger RNA
μ M	Mikromolar (= 10^{-6} Molar)
nm	Nanometer (= 10^{-9} Meter)
Nr.	Nummer
OD _x	Optische Dichte bei x nm
OM	<u>o</u> uter <u>m</u> embrane (dt. äußere Membran)
ORF	<u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame
PCC	<u>P</u> asteur <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
PS I	<u>P</u> hotosystem I
PS II	<u>P</u> hotosystem II
RNA	<u>r</u> ibonuclei <u>c</u> acid (dt.: RNS = <u>R</u> ibonuclei <u>n</u> säure)
RUBISCO	Ribulose-1,5-diphosphat-Carboxylase
rRNA	<u>r</u> ibosomale RNA
s.	siehe
S.	Seite
SDS	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfat (dt.: Natrium Dodecylsulfat)
sog.	sogenannt(e)
sp.	species
syn.	synonym
Tab.	Tabelle
teilw.	teilweise

usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
vs.	versus
v/v%	Volums-Volumsprozent
w/v%	Massen-Volumsprozent (engl. <u>w</u> eight für Masse)
w/w%	Massen-Massenprozent (engl. <u>w</u> eight für Masse)
z.B.	zum Beispiel
zw.	zwischen

LEBENS LAUF

Name: Monika Sachet

Geboren in Wien am: 10. Mai 1964

1970 - 1974 Volksschule Wien Speising

1974 - 1983 AHS - Bundesrealgymnasium Erlgasse Wien 12

1983 Geburt unserer Tochter

1986 Geburt unseres Sohnes

1988 Studium der Mikrobiologie an der Natur- und
Formalwissenschaftlichen Fakultät der Universität Wien

1999 Sponson zur Magistra rer.nat.

Beginn der praktischen Arbeit für die Dissertation am
Institut für Physikalische Chemie der Universität Wien