

Diplomarbeit

vorgelegt zur Erlangung des Grades eines Diplom-Biologen
an der Fakultät für Biologie und Biotechnologie der Ruhr-Universität Bochum



Biochemische Charakterisierung von putativen Phycocerythrin-Lyasen aus dem Cyanobakterium *Prochlorococcus marinus* SS120 und dem Cyanophagen Syn9

von

Christian Scholte

angefertigt in der AG Physiologie der Mikroorganismen
am Lehrstuhl Biologie der Mikroorganismen

Bochum, im Februar 2008

Referentin: Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel

Korreferent: Prof. Dr. Matthias Rögner

Ich danke Frau Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel für die Überlassung dieses interessanten Themas für meine Diplomarbeit sowie für ihre engagierte Betreuung.

Bei Herrn Prof. Dr. Matthias Rögner bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. Ansgar Pötsch danke ich vielmals für die Durchführung der massenspektrometrischen Messungen.

Ich danke Frau Dr. Claudia Steglich für die freundlicherweise zur Verfügung gestellte chromosomale DNA aus *P. marinus* SS120 und Herrn Dr. Matthew Sullivan für das zur Verfügung gestellte Phagenlysat von Syn9.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Thorben Dammeyer, der mit seinen Ratschlägen sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit, die fröhliche Atmosphäre im Labor und oftmals gute Ratschläge bedanken, namentlich Dr. Jessica Wiethaus, Dr. Ronja Tasler, Sonja Brandt, Björn Gisk, Katalin Barkovits, Carlos Lorenzo, Michael Entian, Tülay Basoengen und Britta Schubert.

Nicht zuletzt danke ich meinen Freunden und meiner Familie für schöne Stunden außerhalb der Uni und für ihre moralische Unterstützung in einer schwierigen Phase. Insbesondere meiner Mutter danke ich für alles, was sie für mich getan hat.

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
AS	Aminosäure
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxosulfat
APC	Allophycocyanin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BV	Biliverdin IX α
Chl	Chlorophyll
Cpc	cyanobakterielles Phycocyanin
Cpe	cyanobakterielles Phycerythrin
Cys	Cystein
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest	destilliert
DH-BV	15,16-Dihydrobiliverdin
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
DV-Chl	Divinyl-Chlorophyll
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
HABA	4-Hydroxyazobenzon-2-carboxysäure
His	Histidin
HL	Starklicht-angepasst (<i>high light adapted</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IAA	Iodacetamid
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LL	Schwachlicht-angepasst (<i>low light adapted</i>)
λ	Wellenlänge
M	molar (mol/l)
MCS	multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)

Abkürzungsverzeichnis

MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
kbp	Kilobasenpaare
Mr	relative molekulare Masse
OD	optische Dichte
PC	Phycocyanin
PCB	Phycocyanobilin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PEB	Phycoerythrobilin
PEC	Phycoerythrocyanin
PUB	Phycourobilin
psi	<i>pounds per square inch</i> (1 psi \approx 6894,76 Pascal)
PVB	Phycoviolobilin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV	Säulenvolumen
TAE	Tris-Acetat/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volt
Vis	sichtbar (<i>visible</i>)
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Masse pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Phycobiliproteine – Hauptbestandteile der Phycobilisomen.....	1
1.1.1	Funktion und Aufbau der Phycobilisomen.....	1
1.1.2	Aufbau der Phycobiliproteine.....	3
1.2	Biosynthese der Phycobiline	6
1.3	Assemblierung der Phycobiline an die Apoproteine.....	7
1.3.1	Spontane versus autokatalytische Bindung	7
1.3.2	Enzym-vermittelte Bindung: Phycobiliprotein-Lyasen.....	8
1.4	Das Cyanobakterium Prochlorococcus	12
1.5	Putative PE-Lyasen aus <i>P. marinus</i> SS120	16
1.6	Cyanophagen.....	16
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Geräte	19
2.2	Chemikalien, Enzyme, Antikörper und Kits	19
2.3	Bakterienstämme	20
2.4	Plasmide	21
2.5	Medien und Medienzusätze.....	22
2.5.1	Medien.....	22
2.5.2	Medienzusätze	23
2.6	Mikrobiologische Methoden	23
2.6.1	Sterilisation.....	23
2.6.2	Kultivierung von <i>E.-coli</i> -Zellen	23
2.6.3	Lagerung von Bakterienstämmen.....	24
2.6.4	Herstellung chemisch kompetenter <i>E.-coli</i> -Zellen	24
2.6.5	Transformation chemisch kompetenter <i>E.-coli</i> -Zellen.....	24
2.7	Molekularbiologische Methoden.....	25
2.7.1	MINI-Präparation von Plasmid-DNA	25
2.7.2	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen	25
2.7.3	Agarosegelelektrophorese	26
2.7.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.7.5	Reinigung von DNA-Fragmenten	28
2.7.6	Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen	29
2.7.7	Dephosphorylierung von restringierter Plasmid-DNA.....	29
2.7.8	Ligation von DNA.....	29
2.7.9	Ortsgerichtete Mutagenese	29
2.7.10	Sequenzierung	30
2.8	Proteinbiochemische Methoden	30
2.8.1	Rekombinante Produktion der Apoproteine CpeA und CpeB.....	30
2.8.2	Rekombinante Produktion der putativen Lyasen.....	32
2.8.3	Zellaufschluss	32
2.8.4	Affinitätschromatographie.....	33
2.8.5	Reinigung von unlöslichem His ₆ -CpeA bzw. His ₆ -CpeB aus <i>inclusion bodies</i>	34
2.8.6	Dialyse.....	35
2.8.7	Gelfiltration	35
2.8.8	Proteinkonzentrierung	35
2.8.9	Bestimmung der Proteinkonzentration	35
2.8.10	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	36

2.8.11	Western Blot.....	37
2.8.12	Untersuchung der Interaktion von Chromophor und Protein.....	38
2.8.13	Untersuchung von Lyase-Aktivität der Proteine CpeS und Syn9CpeT.....	40
2.8.14	Chemische Modifikation von Proteinen.....	40
2.9	Biophysikalische Methoden.....	41
2.9.1	Massenspektrometrie.....	41
2.10	Bioinformatische Methoden.....	42
2.11	Gewinnung der Chromophore PEB und PCB.....	42
2.11.1	Extraktion von PEB aus der Rotalge <i>Porphyridium cruentum</i>	42
2.11.2	Extraktion von PCB aus dem Cyanobakterium <i>Spirulina platensis</i>	43
3	Ergebnisse.....	45
3.1	Rekombinante Produktion und Reinigung der Apoproteine CpeA und CpeB aus <i>P. marinus</i> SS120.....	45
3.1.1	pETDuet-1.....	45
3.1.2	pET-43a.....	47
3.1.3	pCold TF.....	48
3.2	Biochemische Charakterisierung der Apoproteine.....	52
3.2.1	Untersuchung kovalenter Bindung von PEB an die Apoproteine.....	52
3.2.2	Spektroskopische Untersuchung der Interaktion von TF-CpeA bzw. TF-CpeB mit PEB.....	53
3.2.3	Untersuchung der Chromophor-Spezifität der Apoproteine.....	56
3.2.4	Untersuchung putativer Chromophor-Bindestellen in TF-CpeA und TF-CpeB.....	56
3.3	Biochemische Charakterisierung der putativen PE-Lyase CpeS aus <i>P. marinus</i> SS120.....	59
3.3.1	Rekombinante Produktion und Reinigung von CpeS.....	60
3.3.2	Interaktion von CpeS mit PEB, BV und PCB.....	60
3.3.3	Untersuchung der Fluoreszenz des CpeS-PEB-Addukts.....	62
3.3.4	Untersuchung kovalenter Bindung von PEB an CpeS.....	63
3.3.5	Putative PEB-Bindestelle in CpeS.....	63
3.3.6	Untersuchung einer Übertragung des PEB von CpeS auf die Apoproteine.....	64
3.4	Rekombinante Produktion der putativen Lyasen CpeT, CpeY, MpeX und CpeZ aus <i>P. marinus</i> SS120.....	67
3.4.1	pASK-IBA45plus.....	67
3.4.2	pCold TF.....	67
3.5	Biochemische Charakterisierung von TF-CpeT.....	68
3.6	Biochemische Charakterisierung der putativen PE-Lyase Pro1634 aus <i>P. marinus</i> SS120.....	69
3.6.1	Rekombinante Produktion und Reinigung von Pro1634.....	70
3.6.2	Interaktion von Pro1634 mit PEB, BV und PCB.....	70
3.6.3	Untersuchung der Fluoreszenz des Pro1634-PEB-Addukts.....	72
3.6.4	Untersuchung kovalenter Bindung von PEB, BV und PCB an Pro1634.....	73
3.6.5	Ermittlung putativer PEB- bzw. PCB-Bindestellen in Pro1634.....	74
3.7	Biochemische Charakterisierung der putativen PE-Lyase Syn9CpeT.....	76
3.7.1	Rekombinante Produktion und Reinigung von Syn9CpeT.....	76
3.7.2	Interaktion von Syn9CpeT mit PEB, BV und PCB.....	77
3.7.3	Untersuchung der Fluoreszenz des Syn9CpeT-PEB-Addukts.....	79
3.7.4	Untersuchung kovalenter Bindung von PEB, BV und PCB an Syn9CpeT.....	79
3.7.5	Untersuchung der PEB-Bindestelle in Syn9CpeT.....	81
3.7.6	Untersuchung einer Übertragung des PEB von Syn9CpeT auf die Apoproteine.....	82

4	Diskussion.....	84
4.1	Das Expressionsplasmid pCold TF ist gut geeignet für die rekombinante Produktion von löslichem CpeA und CpeB.....	84
4.2	CpeA und CpeB binden PEB spontan.....	85
4.3	Die putative cyanobakterielle PE-Lyase CpeS.....	87
4.3.1	CpeS bindet PEB mit hoher Affinität und schwach kovalent.....	87
4.3.2	Ist CpeS eine PE-Lyase?.....	88
4.4	Die putative cyanobakterielle PE-Lyase Pro1634 bindet PEB und PCB kovalent...	90
4.5	Weitere putative cyanobakterielle PE-Lyasen.....	93
4.6	Die putative Cyanophagen-PE-Lyase Syn9CpeT.....	94
4.6.1	Syn9CpeT bindet PEB mit hoher Affinität und schwach kovalent.....	94
4.6.2	Ist Syn9CpeT eine PE-Lyase?.....	96
5	Zusammenfassung.....	98
	Literaturverzeichnis.....	99
	Anhang.....	108

1 Einleitung

1.1 Phycobiliproteine – Hauptbestandteile der Phycobilisomen

1.1.1 Funktion und Aufbau der Phycobilisomen

Phycobilisomen, erstmals beschrieben von Gantt und Conti (1965; 1966; 1969), stellen in Cyanobakterien, Rotalgen und Cryptophyceen die primären Lichtsammelkomplexe des photosynthetischen Apparats dar. Der Thylakoidmembran außen aufliegend absorbieren sie Licht im Wellenlängenbereich von 450–665 nm und leiten die Energie effektiv an die photosynthetischen Reaktionszentren weiter (Searle *et al.*, 1978; Porter *et al.*, 1978). Die Phycobilisomen erlauben diesen Organismen somit die Nutzung von Licht zwischen den roten und blauen Absorptionsbanden der Chlorophylle *a* und *b* („Grünlücke“) und tragen beträchtlich zur globalen Photosynthese bei (MacColl und Guard-Friar, 1987; Sidler, 1994).

Phycobilisomen können bis zu 30% des gesamten Zellproteins ausmachen (Tandeau de Marsac und Houmard, 1993; Grossman *et al.*, 1995), wobei die sogenannten Phycobiliproteine mit ca. 80% den Hauptbestandteil der Phycobilisomenproteine darstellen (Tandeau de Marsac und Cohen-Bazire, 1977). Diese weisen eine starke Färbung auf, welche sich auf die kovalente Bindung von bestimmten Chromophoren, den Phycobilinen, zurückführen lässt (vgl. Abschnitt 1.1.2). Auf der Grundlage der Absorptionseigenschaften im sichtbaren Bereich werden die Phycobiliproteine in vier Gruppen eingeteilt (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Phycobiliprotein-Gruppen.

Phycobiliprotein-Gruppe	$\lambda(A_{\max})$ [nm]
Phycoerythrine (PE)	565–575
Phycoerythrocyanine (PEC)	575
Phycocyanine (PC)	615–640
Allophycocyanine (APC)	650–655

Ein Phycobilisom setzt sich aus einer Kernstruktur und peripheren Stäbchen-artigen Strukturen zusammen (siehe Abb. 1). Von den genannten Phycobiliprotein-Gruppen findet sich im Kern stets nur Allophycocyanin (APC), während die Pigmentzusammensetzung der Stäbchen variieren kann. So ist in den Phycobilisomen aller natürlich vorkommenden Cyanobakterien zwar stets Phycocyanin (PC) vorhanden, das weiter distal liegende Phycoerythrin (PE) kann

aber fehlen bzw. durch Phycoerythrocyanin (PEC) ersetzt sein (Bryant, 1982). Des Weiteren unterliegt die Pigmentzusammensetzung der Phycobilisomen Veränderungen als Antwort auf Lichtintensität und -qualität sowie Nährstoffangebot (Grossman *et al.*, 1993).

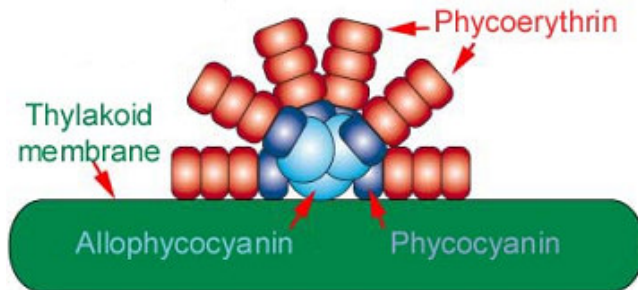


Abb. 1: Aufbau eines Phycobilisoms (Quelle: http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/library/webb/BOT311/Cyanobacteria/phycobilisome_small.jpg).

Die beschriebene Anordnung der Phycobiliproteine in den Phycobilisomen ermöglicht einen optimalen Energiefluss absorbierter Lichtenergie durch strahlungsfreien Exzitonentransfer zu den Reaktionszentren in der Thylakoidmembran (siehe Abb. 2).

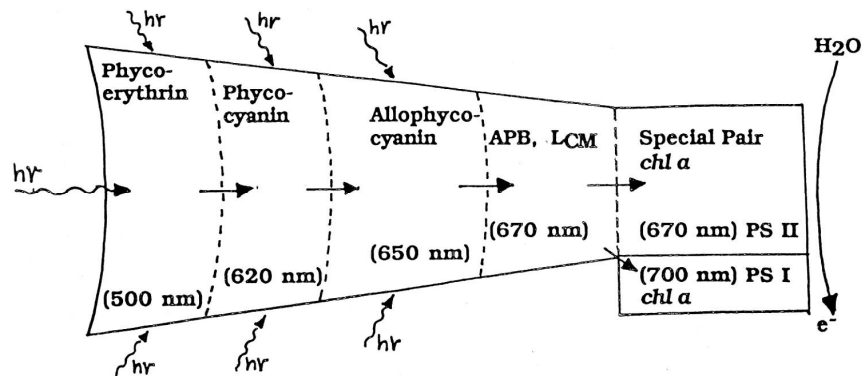


Abb. 2: Energiefluss in Phycobilisomen von Cyanobakterien und Rotalgen. Absorbierte Lichtenergie wird durch strahlungsfreien Exzitonentransfer von Pigmenten, die bei kürzerer Wellenlänge absorbieren, auf Pigmente übertragen, die bei längerer Wellenlänge absorbieren. Schließlich wird die Energie zwischen Photosystem I (PS I) und Photosystem II (PS II) aufgeteilt (aus Zhao *et al.*, 1992).

Ein weiterer Bestandteil eines Phycobilisoms sind Linkerproteine, die am Aufbau und der Stabilisierung des Multiproteinkomplexes beteiligt sind (Glazer *et al.*, 1982; 1985). Sie sind in der Regel farblos, mit Ausnahme des Kern-Membran-Linkerproteins LCM (ApcE) (vgl. Abb. 2) und der γ -Untereinheiten einiger Phycoerythrine, die ebenfalls chromophoryliert sind und zusätzlich der Energieübertragung dienen (Koller und Wehrmeyer, 1977; Glazer und Hixson, 1977; Lundell *et al.*, 1981; Wilbanks und Glazer, 1993).

1.1.2 Aufbau der Phycobiliproteine

Phycobiliproteine von Cyanobakterien und Rotalgen stellen eine Gruppe stark gefärbter und wasserlöslicher Proteine dar, die untereinander deutliche Homologie sowohl in der Aminosäuresequenz (Apt *et al.*, 1995; MacColl, 1998) als auch in der dreidimensionalen Struktur zeigen (Schirmer *et al.*, 1985; 1987; Düring *et al.*, 1990; 1991; Ficner *et al.*, 1992; Brejc *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1999; Stec *et al.*, 1999; Padyana *et al.*, 2001). Es handelt sich in der Regel um heterodimere Proteine, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit, die untereinander ebenfalls homolog sind, in äquimolarer Stöchiometrie auftreten und molekulare Massen von je 15–20 kDa besitzen. Beide Untereinheiten weisen einen globulären C-Terminus, der die Chromophore trägt, und eine N-terminale Verlängerung, die zwei α -Helices umfasst und hauptsächlich die Oligomerisierung vermittelt, auf (siehe Abb. 3 A, B). Drei der $\alpha\beta$ -Dimere lagern sich wiederum zu einem stabilen ringförmigen $(\alpha\beta)_3$ -Trimer zusammen, welches die grundlegende Struktureinheit des Phycobilisoms darstellt (Schirmer *et al.*, 1985; 1987; Düring *et al.*, 1990; 1991; Ficner *et al.*, 1992) (siehe Abb. 3 C). In PE aus Rotalgen und einigen Cyanobakterien findet sich zudem eine γ -Untereinheit.

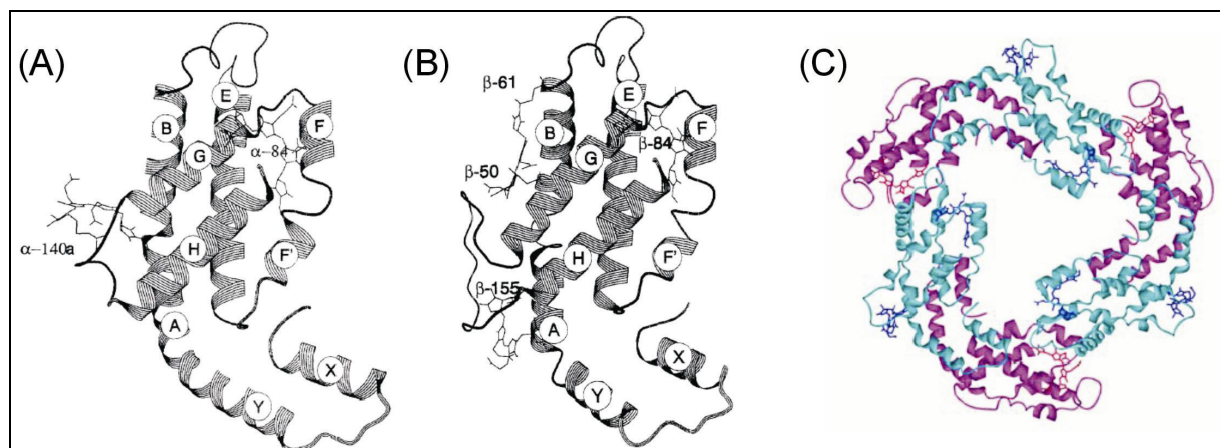


Abb. 3: Bändermodell der (A) α -Untereinheit und (B) β -Untereinheit des R-Phycoerythrins aus der Rotalge *Porphyridium sordidum* (aus Ficner *et al.*, 1992). (C) Bändermodell des Phycocyanin-Trimers aus *Mastigocladus laminosus*. Dieses besitzt einen Durchmesser von 11 nm und eine Dicke von 3 nm, das zentrale Loch hat einen Durchmesser von 3 nm. Die α -Untereinheiten sind violett, die β -Untereinheiten hellblau, PVB rot und PCB blau dargestellt (aus Düring *et al.*, 1990).

Die Färbung der Phycobiliproteine beruht auf der kovalenten Bindung sogenannter Phycobiline, bei denen es sich um Chromophore aus der Gruppe der linearen Tetrapyrrole handelt. Die kovalente Bindung erfolgt an konservierte Cysteinreste im Apoprotein durch Ausbildung von Thioether-Bindungen. Während man in der α -Untereinheit meist nur ein bis zwei Phycobiline findet, kann die β -Untereinheit bis zu vier Phycobiline tragen (Rüdiger, 1994), wobei

die Anzahl der Chromophor-Bindestellen von APC über PC und PEC nach PE zunimmt (Sidler, 1994). Man findet in Cyanobakterien und Rotalgen vier Typen von Phycobilinen (siehe Tab. 2 und Abb. 4), die sich in der Anzahl konjugierter Doppelbindungen und somit in ihren Absorptionseigenschaften unterscheiden. Die Absorptionseigenschaften der Phycobiline werden zudem stark durch die Interaktion mit der Proteinumgebung beeinflusst (Scheer und Kufer, 1977; Zickendraht-Wendelstadt *et al.*, 1980; Scheer, 1981). So nehmen freie Phycobiline eine recht flexible zyklische oder helikale Struktur ein (Falk, 1989), während Protein-gebundene Phycobiline in einer festen und gestreckten Konformation vorliegen, was zudem meist mit einer Drehung aus der Ebene einhergeht. Aufgrund dieser starren Anordnung in den Phycobiliproteinen sind die Phycobiline hochfluoreszent, da ein strahlungsfreier Rückgang des angeregten Zustands in den Grundzustand unterbunden wird. Diese Eigenschaft macht man sich in vielen biotechnologischen und biomedizinischen Anwendungen oder in der Untersuchung des marinen Phytoplanktons zunutze (Kronick und Grossman, 1983; Peck *et al.*, 1989; Frankel *et al.*, 1989; Glazer, 1994; Downes und Hall, 1998; Cavender-Bares *et al.*, 1998; Beutler *et al.*, 2002).

Tab. 2: Natürlich vorkommende Phycobiline in den Phycobilisomen aus Cyanobakterien und Rotalgen.

Phycobilin	Anzahl konjugierter Doppelbindungen	λ (A_{\max}) [nm]	Farbe
Phycocyanobilin (PCB)	8	ca. 640	blau
Phycoviolobilin (PVB)	7	ca. 575	violett
Phycoerythrobilin (PEB)	6	ca. 550	rot
Phycourobilin (PUB)	5	ca. 500	gelb

Wie Abb. 4 zu entnehmen ist, können Phycoerythrobilin (PEB) und Phycourobilin (PUB) über eine oder zwei Thioether-Bindungen kovalent mit dem Apoprotein verknüpft sein, da beide Chromophore sowohl am A- als auch am D-Ring eine Vinyl-Gruppe besitzen, über die die Bindung an einen Cysteinrest vermittelt wird (Nagy *et al.*, 1985; Glazer, 1985; Ficner *et al.*, 1992).

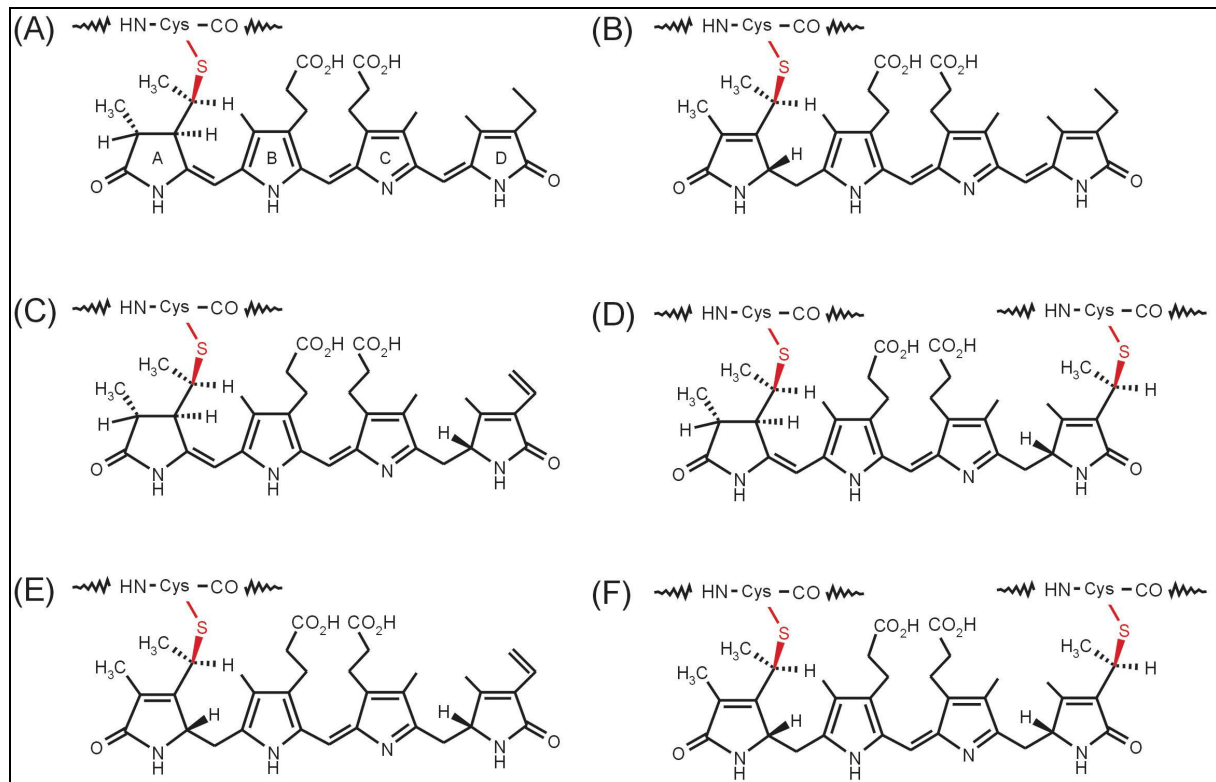


Abb. 4: Struktur Protein-gebundener Phycobiline. (A) 3¹-Cys-PCB, (B) 3¹-Cys-PVB, (C) 3¹-Cys-PEB, (D) 3^{1,18}-Di-Cys-PEB, (E) 3¹-Cys-PUB, (F) 3^{1,18}-Di-Cys-PUB. Die Thioether-Bindungen zwischen Phycobilin und Cysteinrest des Apoproteins sind jeweils rot hervorgehoben.

APC enthält stets nur einen Phycocyanobilin(PCB)-Chromophor pro Untereinheit an den konservierten Positionen α -Cys82 und β -Cys82. PC besitzt drei Chromophor-Bindestellen an den konservierten Positionen α -Cys84, β -Cys84 und β -Cys155, an denen PCB der typische Chromophor ist. An den Positionen α -Cys84 und β -Cys155, welche im PC-Trimer in der Peripherie des Lichtsammelkomplexes lokalisiert sind, können zur besseren Nutzung von Licht im blauen und grünen Wellenlängenbereich allerdings einer oder beide PCB-Chromophore durch Phycoviolobilin (PVB), PEB oder PUB ersetzt sein. In PC von Rotalgen findet man an β -Cys155 daher stets PEB. Die Expression des lediglich in Cyanobakterien vorkommenden PEC wird unter Schwachlicht-Bedingungen stark induziert. PEC weist eine sehr ähnliche Chromophor-Zusammensetzung wie PC auf. Es bindet an den Positionen β -Cys84 und β -Cys155 je einen PCB-Chromophor, während α -Cys84 stets den photoaktiven Chromophor PVB trägt. PEC wird in Rotalgen nicht gefunden. In PE finden sich entweder nur PEB- oder zusätzlich PUB-Chromophore. Typ-I-PE (PE-I) trägt an den konservierten Positionen α -Cys84, α -Cys143, β -Cys50/61 (doppelte Bindung), β -Cys84 und β -Cys155 insgesamt fünf Chromophore, während Typ-II-PE (PE-II) eine weitere Chromophor-Bindestelle für PEB oder PUB an α -Cys75 besitzt. Zudem weist PE-II für gewöhnlich ein

höheres PUB:PEB-Verhältnis als PE-I auf (für detaillierte Informationen und Referenzen siehe Sidler, 1994) (siehe Tab. 3). Mittlerweile ist ein dritter PE-Typ (PE-III) bekannt (siehe Unterkapitel 1.4).

Tab. 3: Chromophor-Bindestellen und Phycobilin-Gehalt der Phycobiliproteine.

Protein	Chromophor-Bindestelle					
	α -Cys75	α -Cys82 ¹ ,84 ²	α -Cys143	β -Cys50/61	β -Cys82 ¹ ,84 ²	β -Cys155
APC		PCB			PCB	
PC		PCB/PEB (PCV/PUB)			PCB	PCB/PEB (PVB/PUB)
PEC		PCV			PCB	PCB
PE-I		PEB/PUB	PEB/PUB	PEB/PUB	PEB	PEB
PE-II	PEB/PUB	PEB/PUB	PEB/PUB	PEB/PUB	PEB	PEB

¹ APC; ² PC, PEC, PE-I, PE-II

1.2 Biosynthese der Phycobiline

Das Vorgängermolekül aller Phycobiline ist das zyklische Tetrapyrrol Häm, welches zunächst durch eine Ferredoxin-abhängige Hämoxygenase zu Biliverdin IX α (BV) gespalten wird (Cornejo *et al.*, 1998). Daraufhin wird BV durch Ferredoxin-abhängige Bilinreduktasen an je zwei von drei möglichen Stellen reduziert, was zur Bildung der Chromophore PCB und PEB führt. PCB entsteht in einer von PCB:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PcyA) katalysierten Reaktion, die zwei aufeinanderfolgende Zwei-Elektronen-Reduktionen mit 18¹,18²-Dihydrobiliverdin als Zwischenprodukt umfasst (Frankenberg und Lagarias, 2003). PEB wird hingegen durch die aufeinanderfolgende Aktivität der beiden Enzyme 15,16-Dihydrobiliverdin:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PebA) und PEB:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PebB) in jeweils Zwei-Elektronen-Reduktionen mit 15,16-Dihydrobiliverdin (DH-BV) als Zwischenprodukt gebildet (Frankenberg *et al.*, 2001; Dammeyer und Frankenberg-Dinkel, 2006). Kürzlich wurde das Enzym PEB-Synthase (PebS) des Cyanophagen P-SSM2 identifiziert, welches beide Reduktionsschritte von BV zu PEB katalysiert, ebenfalls mit DH-BV als Zwischenprodukt (Dammeyer *et al.*, 2008) (siehe Abb. 5).

Die Phycobiline PVB und PUB wurden in der Natur noch nie in freier Form gefunden, auch sind keine Biosynthesegene für diese Chromophore bekannt (vgl. Abschnitt 1.3.2).

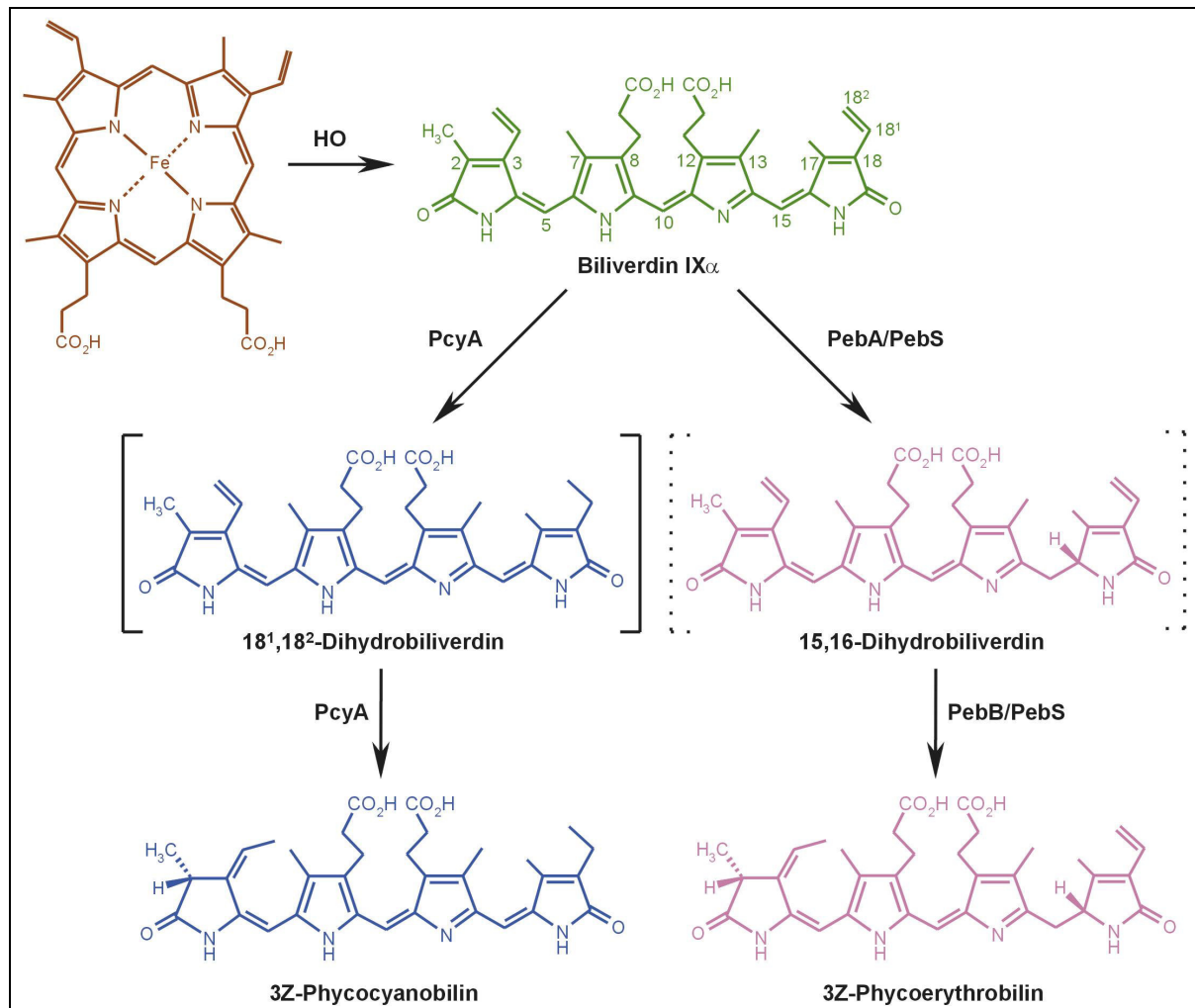


Abb. 5: Biosynthese der Phycobiline PCB und PEB ausgehend von Häm. HO: Hämoxygenase; PcyA: Phycocyanobilin:Ferredoxin-Oxidoreduktase; PebA: 15,16-Dihydrobiliverdin:Ferredoxin-Oxidoreduktase; PebB: Phycoerythrobilin:Ferredoxin-Oxidoreduktase; PebS: Phycoerythrobilin-Synthase. Die durchgezogene Klammer kennzeichnet ein PcyA-gebundenes Zwischenprodukt, die gepunktete Klammer ein freies bzw. PebS-gebundenes Zwischenprodukt.

1.3 Assemblierung der Phycobiline an die Apoproteine

1.3.1 Spontane versus autokatalytische Bindung

Die Apoprotein-Untereinheiten der meisten Phycobiliproteine zeigen eine spontane Bindung von Phycobilinen, die allerdings in Holo-Phycobiliproteinen resultiert, die sich in ihren spektroskopischen Eigenschaften von den nativen Proteinen unterscheiden. Arciero *et al.* (1988a; 1988b) zeigten zuerst, dass eine spontane Bindung von PCB an α -Cys84 und β -Cys82 der Apo-PC-Untereinheiten aus *Synechococcus* sp. PCC7002 erfolgt. Dabei entsteht allerdings durch unphysiologische Oxidation eine neue Doppelbindung zwischen C2 und C3 des A-Rings, was in der Bildung von Peptid-gebundenem 18¹,18²-Dihydrobiliverdin (Mesobiliverdin) resultiert. Dieses ist das Vorläufermolekül von PCB in dessen Biosynthese (vgl.

Abb. 5). Auch PEB kann spontan von α -Cys84 und β -Cys82 der Apo-PC-Untereinheiten gebunden werden, wobei jeweils eine entsprechende Oxidation an C2 und C3 unter Bildung von Peptid-gebundenem DH-BV erfolgt (Arciero *et al.*, 1988c), dem direkten Vorläufermolekül von PEB in dessen Biosynthese. Die Inkubation der α -Apountereinheit von PE aus *Calothrix* sp. PCC7601 mit PEB führt hingegen zu einem Produktgemisch, welches neben einem Cys82-DH-BV- und einem Cys139-PUB-Addukt nur geringe Mengen des jeweils natürlichen PEB-Addukts enthält (Fairchild und Glazer, 1994a). Zudem entsteht auch eine kleine Menge an Cys59 gebundenes PEB, obwohl dieser Cysteinrest *in vivo* keine Chromophor-Bindestelle darstellt. Spontane Bindung von PCB an Cys84 sowohl der α - als auch der β -Untereinheiten von PC und PEC resultiert in gebundenem Chromophor mit nicht nativer Konfiguration (Zhao *et al.*, 2004).

Spontane Bindungen dieser Art müssen daher von echter autokatalytischer Bindung unterschieden werden, bei welcher Chromoproteine entstehen, die sich weder spektroskopisch noch biochemisch oder funktionell von den nativen Proteinen unterscheiden lassen. Die autokatalytische Bindung von linearen Tetrapyrrolen an Cysteinreste ist sehr gut in Phytochromen untersucht (Wu und Lagarias, 2000), einer mit den Phycobiliproteinen funktionell und phylogenetisch nur entfernt verwandten Klasse von Biliproteinen (Lamparter, 2004). Ein weiteres Beispiel für autokatalytische Bindung ist die Bindung von PCB an das Kernmembran-Linkerprotein ApcE der Phycobilisomen (Zhao *et al.*, 2005a). In Phycobiliproteinen stellt autokatalytische Bindung allerdings (wenn überhaupt) die Ausnahme dar. Beschrieben wurde sie z.B. für ApcA (α -Untereinheit von APC) aus *Anabaena* sp. PCC7120 und *Synechocystis* sp. PCC6803 (Hu *et al.*, 2006), wobei dies allerdings zumindest im Falle des Proteins aus *Anabaena* sp. PCC7120 aufgrund neuer Ergebnisse strittig ist (Zhao *et al.*, 2007). Auch für CpeB aus *P. marinus* MED4 wurde eine autokatalytische Bindung postuliert, ein eindeutiger Nachweis eines nativ gebundenen Chromophors wurde allerdings nicht erbracht (Steglich *et al.*, 2005).

1.3.2 Enzym-vermittelte Bindung: Phycobiliprotein-Lyasen

Aus der spontanen Bindung lässt sich ersehen, dass viele, wenn nicht alle, Apophycobiliproteine geeignete Chromophore binden können, wobei die Bindung hauptsächlich an solche Cysteinreste erfolgt, die auch in den nativen Proteinen chromophoryliert vorliegen. Dies lässt vermuten, dass die korrekte Bindung der Phycobiline Enzyme benötigt, die eine Chaperonartige Funktion besitzen und dadurch ungewünschte Nebenreaktionen bei Ausbildung der

Chromophor-Bindung an das Apoprotein verhindern. Zu diesen zählen sowohl die unphysiologische Oxidation des Chromophors als auch die Ausbildung einer falschen Stereochemie am asymmetrischen C-Atom, das bei der Bindung entsteht.

Die Bedeutung konformativer Kontrolle des Chromophors wurde von Zhao *et al.* (2004) hervorgehoben. Zum einen wurde gezeigt, dass in Anwesenheit des Detergens Triton X-100, welches die Konformation des Chromophors (und in geringerem Maße die des Proteins) verändert, PCB bevorzugt zu Cys155 anstatt zu Cys84 der β -Untereinheit von PC dirigiert wird und dass dabei der korrekt gebundene Chromophor entsteht. Zudem verhindert Triton X-100 die Oxidation von PCB zu Mesobiliverdin während der Bindung an Cys84 der α -Untereinheit. Die Ergebnisse sprechen demnach dafür, dass durch die konformative Kontrolle des Chromophors sowohl die Spezifität der Bindestelle festgelegt wird als auch unphysiologische Nebenreaktionen wie die Oxidation des Chromophors unterbunden werden.

Bislang wurden drei Typen von Enzymen beschrieben, welche die korrekte Bindung der Chromophore an die Apoproteine katalysieren und die allgemein als Phycobiliprotein-Lyasen bezeichnet werden: die E/F-Typ-Lyasen, die S(/U)-Typ-Lyasen und die T-Typ-Lyasen.

E/F-Typ-Lyasen

Ein erster Hinweis auf eine Phycobiliprotein-Lyase wurde im Jahr 1992 erbracht, als gezeigt wurde, dass durch separate oder gemeinsame Inaktivierung der Gene *cpcE* und *cpcF* aus *Synechococcus* sp. PCC7002 eine fehlerhafte Bindung von PCB an Cys84 der α -Untereinheit von PC (CpcA) unter Bildung eines Mesobiliverdin-Addukts hervorgerufen wird. Die Bindung von PCB an die β -Untereinheit (Cys82 und Cys155) wird hingegen nicht beeinflusst (Zhou *et al.*, 1992; Swanson *et al.*, 1992). Schon bald darauf gelang der eindeutige Nachweis, dass CpcE und CpcF eine heterodimere PC-Lyase bilden, welche PCB reversibel und spezifisch an α -Cys84 bindet (Fairchild *et al.*, 1992). Auch PEB kann von dieser Lyase verwendet werden, allerdings mit geringerer Effektivität (Fairchild und Glazer, 1994b). CpcE und CpcF sind zueinander homolog und besitzen jeweils die COG1413(*HEAT repeat*)-Domäne.

Bei Untersuchung der Gene *pecE* und *pecF* aus *Mastigocladus laminosus* wurde eine neue Aktivität einer Phycobiliprotein-Lyase entdeckt. Die von diesen Genen codierten Proteine sind stark homolog zu CpcE bzw. CpcF und bilden eine heterodimere PEC-Lyase, die PCB an Cys84 der α -Untereinheit von PEC bindet und zusätzlich zu PVB isomerisiert (Zhao *et al.*, 2000; 2002). Durch Koexpression von *pecA* (codiert für die α -Apountereinheit), *pecE* und *pecF* aus *Anabaena* sp. PCC7120 mit PCB-Biosynthesegenen in einem heterologen System

wurde wiederum natives Holo- α -PEC erhalten (Tooley *et al.*, 2002). Ein erster Hinweis auf eine solche Isomerase-Aktivität wurde bereits im Jahr 1995 erbracht, indem gezeigt wurde, dass in einer *pecEF*-Deletionsmutante von *Anabaena* sp. PCC7120 die α -Untereinheit von PEC an Cys84 mit PCB anstatt mit dem natürlich gefundenen Chromophor PVB chromophoryliert wird (Jung *et al.*, 1995).

Die PecE-Untereinheit erfüllt vermutlich eine Chaperon-artige Funktion durch Interaktion mit der α -Untereinheit (Böhm *et al.*, 2007). In der PecF-Untereinheit wurde zudem ein in CpcF nicht vorkommendes Motiv identifiziert, welches für die Isomerase-Aktivität essenziell ist (Zhao *et al.*, 2005b).

Die Isomerase-Aktivität der heterodimeren PEC-Lyase liefert eine Erklärung dafür, weshalb PVB in der Natur noch nie in freier Form gefunden wurde. Entsprechendes wird für den Chromophor PUB vermutet, der aus PEB in einer der Isomerisierung von PCB zu PVB entsprechenden Reaktion hervorgehen könnte (vgl. Abb. 4). Bisher wurde ein Nachweis einer solchen Aktivität einer Phycobiliprotein-Lyase allerdings nicht erbracht. Einen starken Hinweis liefert jedoch das Vorkommen eines fusionierten *cpcEF*-Gens aus *Synechococcus* sp. WH8102 (Six *et al.*, 2005). Obwohl dieser Organismus kein PEC produziert, enthält die F-Sequenz das für die Isomerisierung charakteristische Motiv der PecF-Untereinheit.

In PE-, APC- und auch einigen PC-Genclustern werden keine Gene gefunden, die für CpcE- und CpcF-Homologe codieren. Verschiedene Cyanobakterien weisen hier jedoch Gene auf, die für Proteine mit entfernter Ähnlichkeit zu CpcE und CpcF codieren (Kahn *et al.*, 1997; De Lormier *et al.*, 1993). Zu diesen zählen z.B. *cpeY* und *cpeZ*, wobei gezeigt wurde, dass die Proteine CpeY und CpeZ aus *Fremyella diplosiphon* (*F. diplosiphon*) für die PE-Synthese benötigt werden und somit putative PE-Lyasen darstellen (Kahn *et al.*, 1997). Eine genauere biochemische Charakterisierung dieser Proteine steht allerdings noch aus.

S(U)-Typ-Lyasen

Im Jahr 2004 wurde in *Synechococcus* sp. PCC7002 eine neue Gruppe von Proteinen (CpcS, CpcT, CpcU, CpcV) identifiziert, welche die Bindung von PCB an die β -Untereinheit von PC katalysieren, allerdings nur sehr fern mit den E/F-Typ-Lyasen verwandt sind (Shen *et al.*, 2004). Später konnte gezeigt werden, dass ein CpcS-ähnliches Protein (CpeS1) aus *Anabaena* sp. PCC7120 PCB spezifisch an β -Cys84 von PC und PEC bindet (Zhao *et al.*, 2006; 2007a). In weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass CpeS1 eine beinahe universale Lyase für Cys84-Bindestellen in cyanobakteriellen Phycobiliproteinen darstellt (Zhao *et al.*, 2007b). So

bindet es PCB nicht nur an Cys84 der β -Untereinheiten von PC und PEC, sondern auch an die entsprechenden Cysteinreste aller fünf APC-Untereinheiten (ApcA1, ApcA2, ApcB, ApcD, ApcF). Darüber hinaus katalysiert CpeS1 sogar die Bindung von PEB an die entsprechenden Bindestellen beider PE-Untereinheiten aus *F. diplosiphon*, obwohl *Anabaena* sp. PCC7120 selbst kein PE produziert. Ausnahmen dieser Universalität stellt Cys84 der α -Untereinheiten von PC und PEC dar, die wahrscheinlich von E/F-Typ-Lyasen chromophoryliert werden.

Im Gegensatz zu CpeS1 aus *Anabaena* sp. PCC7120 ist CpcS-I aus *Synechococcus* sp. PCC7002 allein völlig inaktiv. Gemeinsam mit dem homologen Protein CpcU, das wie die S-Typ-Lyasen die sogenannte CpeS-Domäne besitzt, bildet es allerdings eine heterodimere Phycobiliprotein-Lyase, welche die Bindung von PCB an β -Cys82 von PC sowie α -Cys81 und β -Cys82 von APC katalysiert (Shen *et al.*, 2008; Saunée *et al.*, 2008).

Eine auffällige Eigenschaft der S/(U)-Typ-Lyasen ist somit eine hohe Spezifität für die Chromophor-Bindestelle, während die Proteinspezifität relativ gering ist.

T-Typ-Lyasen

Im Jahr 2000 wurde gezeigt, dass eine *cpeT*-Transposonmutante von *F. diplosiphon* kein nachweisbares PE produziert (Cobley *et al.*, 2000). Zudem ergab eine genaue Charakterisierung des zu CpeT homologen Proteins CpcT aus *Synechococcus* sp. PCC7002, welches von Shen *et al.* als neue Phycobiliprotein-Lyase identifiziert wurde (s. o.), dass es sich um eine PC-Lyase handelt, die PCB spezifisch an Cys153 der β -Untereinheit bindet (Shen *et al.*, 2006). Später wurde mit CpcT aus *Anabaena* sp. PCC7120 eine zweite T-Typ-Lyase identifiziert, welche die Bindung von PCB an β -Cys155 nicht nur von PC, sondern auch von PEC katalysiert (Zhao *et al.*, 2007a). Dies spricht für eine hohe Spezifität für die Chromophor-Bindestelle bei allerdings geringer Proteinspezifität. Die gemeinsame Domäne der T-Typ-Lyasen ist die DUF1001-Domäne.

Eine phylogenetische Untersuchung von CpcT/CpeT-Homologen (Shen *et al.*, 2006) sowie der Befund, dass eine *cpeT*-Transposonmutante von *F. diplosiphon* kein nachweisbares PE produziert (s. o.), lassen vermuten, dass T-Typ-Lyasen in PE-produzierenden Cyanobakterien in entsprechender Weise auch die Bindung von PEB an PE katalysieren. Ein experimenteller Beweis wurde allerdings bisher nicht erbracht. Interessanterweise finden sich T-Typ-Lyasen in allen Cyanobakterien bis auf den ausschließlich PE-produzierenden Organismus

P. marinus MED4. Da dessen PE die konservierte Bindestelle β -Cys159 nicht besitzt, wird eine spezifische Lyase für diese Position entsprechend nicht benötigt.

In Tab. 4 sind die drei Phycobiliprotein-Lyase-Typen zusammengefasst.

Tab. 4: Phycobiliprotein-Lyase-Typen.

Typ	Beispiele	Aktivität	Protein-spezifität	Bindestellen-spezifität
E/F-Typ	CpcE/CpcF (<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002)	PCB: α -Cys84-PC-Lyase	hoch	hoch
	PecE/PecF (<i>Mastigocladus laminosus</i>)	PCB: α -Cys84-PEC-Lyase/ Isomerase		
S(U)-Typ	CpeS1 (<i>Anabaena</i> sp. PCC7120)	PCB: β -Cys84-PC-Lyase PCB: β -Cys84-PEC-Lyase PCB:ApcA1-/A2-/B-/D-/F- Lyase PEB: α -Cys84-PE-Lyase PEB: β -Cys84-PE-Lyase	gering	hoch
	CpcS-I/CpcU (<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002)	PCB: β -Cys82-PC-Lyase PCB: α -Cys81-PEC-Lyase PCB: β -Cys82-PEC-Lyase		
T-Typ	CpcT (<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002)	PCB: β -Cys153-PC-Lyase	gering	hoch
	CpcT (<i>Anabaena</i> sp. PCC7120)	PCB: β -Cys155-PC-Lyase PCB: β -Cys155-PEC-Lyase		

1.4 Das Cyanobakterium *Prochlorococcus*

Die Gattung *Prochlorococcus*, die zur Abstammungslinie der Cyanobakterien zählt (Palenik und Haselkorn, 1992; Urbach *et al.*, 1992), wurde erst vor etwa 20 Jahren unter Verwendung von sensitiver Durchflusszytometrie entdeckt (Chisholm *et al.*, 1988). Einen ersten publizierten Hinweis gab es allerdings bereits 1979 durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von „type II“-Zellen aus Wasserproben des Nordatlantischen Ozeans (Johnson und Sieburth, 1979) (siehe Abb. 6).

Mit einem Durchmesser von nur 0,5–0,7 μm ist *Prochlorococcus* der kleinste bekannte phototrophe Organismus und befindet sich damit zugleich an der Grenze der kleinsten vorher-sagbaren Größe eines oxygen phototrophen Organismus (Morel *et al.*, 1993; Raven, 1994). Die geringe Größe sowie die schwache Fluoreszenz erklären, weshalb *Prochlorococcus* lange Zeit unentdeckt blieb, obwohl sich schon bald herausstellte, dass diese Gattung mit einer Zelldichte von typischerweise 10^4 – 10^5 Zellen/ml der zahlreichste phototrophe Organismus in

den Ozeanen und vermutlich auf dem Planeten ist und gemeinsam mit *Synechococcus* zu bis zu 80% der Primärproduktion in den oligotrophen Ozeanen beiträgt (Goericke und Welschmeyer, 1993; Li, 1995; Vendhuis *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997; 1998; Partensky *et al.*, 1999).

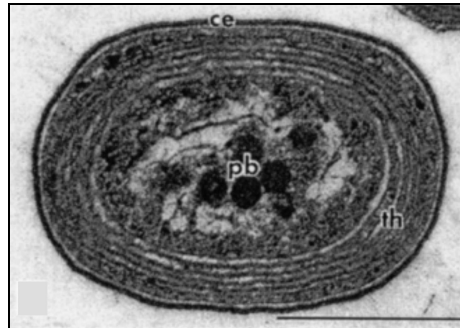


Abb. 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer *Prochlorococcus*-Zelle aus einer Wasserprobe des Nordatlantischen Ozeans (aus Johnson und Sieburth, 1979). ce: Zellhülle; th: Thylakoidmembran; pb: polyedrische Körper. Maßstab: 0,5 µm.

Prochlorococcus ist ubiquitär zwischen den beiden 40. Breitengraden nördlich und südlich des Äquators verbreitet und wird sowohl in Oberflächennähe als auch in 100–200 m tiefen Wasserschichten gefunden, die weniger als 1% des Sonnenlichts erreicht (Partensky *et al.*, 1999). Da kein *Prochlorococcus*-Stamm gefunden wurde, der Photosynthese über mehr als 2,5 Größenordnungen der Lichtintensität betreiben kann (Moore *et al.*, 1995), erfordert diese enorme vertikale Verteilung, dass verschiedene *Prochlorococcus*-Stämme bei signifikant unterschiedlichen Lichtbedingungen ihr Photosyntheseoptimum besitzen. Man unterteilt sie daher in an Starklicht angepasste „high light“ (HL)- und an Schwachlicht angepasste „low light“ (LL)-Stämme. HL-Stämme werden vornehmlich in Oberflächennähe gefunden und haben ihr Photosyntheseoptimum bei einer Lichtintensität von $200 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die in tieferen Wasserschichten gefundenen LL-Stämme haben ihr Photosyntheseoptimum hingegen bei $30\text{--}50 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Moore *et al.*, 1995; 1998; Moore und Chisholm, 1999).

Ein Beispiel für einen LL-Stamm ist *P. marinus* SS120, ein Beispiel für einen HL-Stamm *P. marinus* MED4. Die Genome beider Organismen sowie zehn weiterer *Prochlorococcus*-Stämme sind bereits vollständig sequenziert (Kettler *et al.*, 2007). Die Genomgrößen der *Prochlorococcus*-Stämme sind die kleinsten bekannten unter den oxygen phototrophen Organismen. Während das Genom des LL-Stamms SS120 1774 kbp umfasst und für ca. 1900 Gene codiert, ist das Genom des HL-Stamms MED4 mit 1658 kbp und ca. 1700 Genen noch stärker reduziert. *Prochlorococcus* dient daher als Modellorganismus für die Untersuchung des minimalen Bedarfs an Genen für allgemeine Photosyntheseprozesse. Des Weiteren erlau-

ben die Unterschiede in den Genomen von HL- und LL-Stämmen Einblicke in die genetischen Grundlagen der Anpassung an bestimmte ökologische Nischen.

Prochlorococcus weist verglichen mit anderen Cyanobakterien wie z.B. seinem nächsten Verwandten *Synechococcus* eine ungewöhnliche Chromophor- und Pigment-Zusammensetzung auf. Die wohl auffälligste Eigenschaft ist das Fehlen der für Cyanobakterien charakteristischen Phycobilisomen (vgl. Unterabschnitt 1.1). Stattdessen besitzt *Prochlorococcus* intrinsische Membranantennen, die als Pcb (*prochlorophyte Chl b-binding protein*) bezeichnet werden und die eng mit CP43 verwandt sind, einem konstitutiv exprimierten Chl-*a*-Bindprotein von Photosystem II (LaRoche *et al.*, 1996; Bibby *et al.*, 2003). Eine weitere Besonderheit ist das Auftreten der ungewöhnlichen Chromophore Divinyl-Chlorophyll *a* und *b* (DV-Chl *a* und *b*), mit einer Rotverschiebung des Soret-Maximums um 8–10 nm (Goericke und Repeta, 1992; Morel *et al.*, 1993).

Abb. 7 stellt schematisch den typischen Aufbau des photosynthetischen Apparats von Cyanobakterien und Rotalgen dem von *Prochlorococcus* gegenüber.

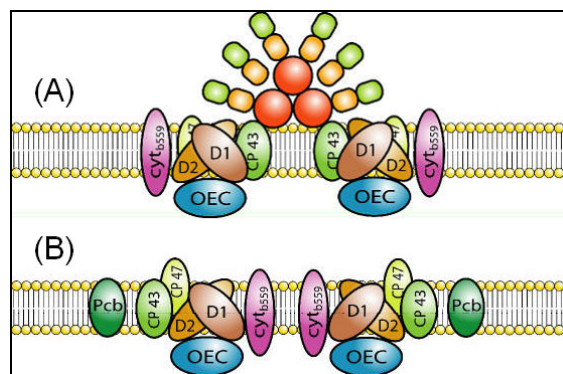


Abb. 7: (A) Aufbau des photosynthetischen Apparats von Rotalgen sowie der meisten Cyanobakterien mit einem der Thylakoidmembran aufliegenden Phycobilisom. In der Membran finden sich die photosynthetischen Reaktionszentren. (B) In *Prochlorococcus* fehlen Phycobilisomen, stattdessen werden von den Reaktionszentren Pcb-Proteine rekrutiert, die intrinsische Membranantennen darstellen.

Obwohl man in *Prochlorococcus* keine Phycobilisomen findet, wurde für *P. marinus* SS120 überraschenderweise das Vorkommen von PE beschrieben (Hess *et al.*, 1996). Für dieses wurde ein PUB:PEB-Verhältnis von 3:1 postuliert (Steglich *et al.*, 2003). Wegen der ungewöhnlichen Sequenz der α - und der β -Untereinheit sowie dem Vorhandensein nur einer Chromophor-Bindestelle in der α -Untereinheit wurde es als dritter PE-Typ (PE-III, vgl. Abschnitt 1.1.2) eingeordnet. Die beiden als CpeA und CpeB bezeichneten α - und β -Untereinheiten mit den konservierten Cysteinresten sind schematisch in Abb. 8 dargestellt.

oder Stickstoff-Mangel beobachtet (Steglich *et al.*, 2001). Somit ist eine Rolle von PE auch in der chromatischen Adaptation, d.h. in der Veränderung der Pigment-Zusammensetzung als Reaktion auf externe Stimuli, als unwahrscheinlich anzusehen. Die Funktion von PE in HL- und/oder LL-Stämmen von *Prochlorococcus* wird heute eher in der Lichtrezeption als in der Lichtsammlung vermutet (Steglich *et al.*, 2005).

Noch rätselhafter ist das Vorkommen des PCB-Biosynthesegens *pcyA* in allen sequenzierten *Prochlorococcus*-Stämmen (vgl. Abb. 9), da in diesen bislang keine PCB-bindenden Proteine beschrieben wurden. So fehlen diesen Organismen neben den PCB-bindenden Phycobiliproteinen auch die ebenfalls PCB-bindenden Phytochrome. Dies sind Lichtrezeptoren, die in anderen Cyanobakterien weit verbreitet sind (Montgomery und Lagarias, 2002).

1.5 Putative PE-Lyasen aus *P. marinus* SS120

Auf dem PE-Gencluster von *P. marinus* SS120 befinden sich neben den Genen *cpeA* und *cpeB*, die für die α - bzw. die β -Apountereinheit codieren, u. a. fünf weitere Gene, die für putative PE-Lyasen codieren (*cpeS*, *cpeT*, *cpeY*, *mpeX* und *cpeZ*) (siehe Abb. 10).

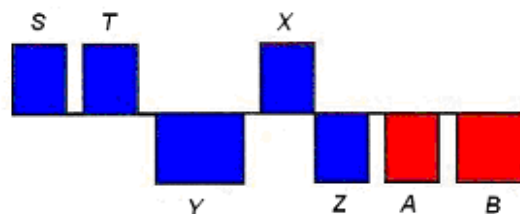


Abb. 10: Ausschnitt des PE-Genclusters aus *P. marinus* SS120. Rot markiert sind die Gene *cpeA* und *cpeB*, die für die α - bzw. die β -Apountereinheit codieren, blau markiert sind die Gene *cpeS*, *cpeT*, *cpeY*, *mpeX* und *cpeZ*, die für putative PE-Lyasen codieren.

CpeS besitzt die CpeS-Domäne der S/(U)-Typ-Lyasen, CpeT die DUF1001-Domäne der T-Typ-Lyasen und CpeY, MpeX und CpeZ die COG1413(*HEAT repeat*)-Domäne der E/F-Typ-Lyasen. CpeY und CpeZ sind jeweils homolog zu den gleichnamigen Proteinen aus *F. diplosiphon* (vgl. Abschnitt 1.3.2). Zusätzlich wurde mittels *NCBI protein blast* ein hypothetisches Protein aus *P. marinus* SS120 gefunden, welches ebenfalls die COG1413-Domäne enthält. Codiert wird es vom Gen *pro1634*, welches weit vom PE-Gencluster entfernt liegt.

1.6 Cyanophagen

Viren stellen in den Ozeanen die zahlenmäßig häufigsten biologischen Einheiten dar und befallen dort alle lebenden Organismen, von den Bakterien bis zu den Säugetieren (Suttle,

2005). Da ein Großteil der globalen Photosynthese von Cyanobakterien, insbesondere von *Prochlorococcus* und *Synechococcus*, geleistet wird (vgl. Unterkapitel 1.4), beeinflussen cyanobakterielle Viren (Cyanophagen) in hohem Maße die marinen Kohlenstoff- und Stickstoffzyklen (Azam, 1998). Darüber hinaus führen sie durch Lyse ihrer autotrophen Wirte zur Freisetzung von gebundenem Kohlenstoff und Stickstoff, was das Leben von heterotrophen Organismen in ansonsten oligotrophen Gewässern ermöglicht (Middleboe *et al.*, 1996). Eine wichtige Rolle spielen Cyanophagen zusätzlich in der Kontrolle der phytoplanktonischen Zellzahl, da ihre Anzahl stets mit der ihrer Wirtszellen korreliert (Fuhrman, 1999; Wommack und Colwell, 2000). Sie leisten auch einen wichtigen Beitrag zur cyanobakteriellen Evolution, weil sie den lateralen Austausch von Genen zwischen verschiedenen Wirtszellen ermöglichen (Lindell *et al.*, 2004; Sullivan *et al.*, 2005; Zeidner *et al.*, 2005; Coleman *et al.*, 2006). Dieser genetische Austausch wird durch die relativ geringe Wirtsspezifität vieler Cyanophagen begünstigt, die sowohl *Prochlorococcus*- als auch *Synechococcus*-Stämme befallen können (Sullivan *et al.*, 2003).

Interessanterweise findet man in den Genomen von Cyanophagen Photosynthesegene cyanobakteriellen Ursprungs (Mann *et al.*, 2003; Millard *et al.*, 2004; Lindell *et al.*, 2004; Sullivan *et al.*, 2005; Weigele *et al.*, 2007). Während der Infektion der Wirtszellen kann so deren photosynthetische Aktivität stabilisiert oder sogar erhöht werden, um eine maximale Cyanophagen-Proliferation zu ermöglichen (Lindell *et al.*, 2004).

Ein Beispiel für einen Cyanophagen ist das T4-ähnliche Virus Syn9 (siehe Abb. 11), welches aus *Synechococcus* sp. WH8109 isoliert wurde, aber auch einige andere *Synechococcus*- sowie *Prochlorococcus*-Stämme (allerdings nicht SS120) infizieren kann (Sullivan *et al.*, 2003; Weigele *et al.*, 2007). Die Sequenzierung des Genoms führte u. a. zur Vorhersage eines Gens, das für ein CpeT-ähnliches Protein mit DUF1001-Domäne codiert. Dieses Protein stellt daher eine putative PE-Lyase dar.

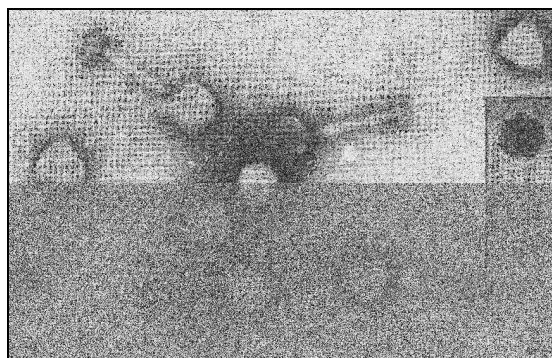


Abb. 11: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Vironen des Cyanophagen Syn9 (aus Weigele *et al.*, 2007). Maßstabsbalken: 50 nm.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die biochemische Charakterisierung der α - und β -PE-Untereinheiten CpeA und CpeB aus *P. marinus* SS120 sowie der putativen PE-Lyasen aus *P. marinus* SS120 und dem Cyanophagen Syn9. Dazu sollten die Proteine in *Escherichia coli* (*E. coli*) rekombinant produziert und mittels *In-vitro*-Studien auf folgende Fragestellungen hin untersucht werden:

- Interagieren die Proteine mit linearen Tetrapyrrolen und, falls ja, besitzen sie Spezifität für einen bestimmten Chromophor?
- Katalysieren die putativen PE-Lyasen tatsächlich die Assemblierung von PEB an die PE-Untereinheiten und gegebenenfalls auch die simultane Isomerisierung zu PUB?

Durch Ergebnisse dieser Arbeit sollten Grundlagen für zukünftige Versuche auf diesem Gebiet geschaffen werden.

2 Material und Methoden

3 Ergebnisse

4 Diskussion

5 Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

- Arciero, D.M., Bryant, D.A., and Glazer, A.N. (1988b) In vitro attachment of bilins to apophycocyanin. I. Specific covalent adduct formation at cysteinyl residues involved in phycocyanobilin binding in C-phycocyanin. *J Biol Chem* **263**: 18343-18349.
- Arciero, D.M., Dallas, J.M., and Glazer, A.N. (1988b) In vitro attachment of bilins to apophycocyanin. II. Determination of the structures of tryptic bilin peptides derived from the phycocyanobilin adduct. *J Biol Chem* **263**: 18350-18357.
- Arciero, D.M., Dallas, J.M., and Glazer, A.N. (1988c) In vitro attachment of bilins to apophycocyanin. III. Properties of the phycoerythrobilin adduct. *J Biol Chem* **263**: 18358-18363.
- Apt, K.E., Collier, J.L., and Grossman, A.R. (1995) Evolution of the phycobiliproteins. *J Mol Biol* **248**: 79-96.
- Azam, F. (1998) Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science* **280**: 694-696.
- Berkelmann, T.R., and Lagarias, J.C. (1986) Visualization of bilin-linked peptides and proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **156**: 194-201.
- Beutler, M., Wiltshire, K.H., Meyer, B., Moldaenke, C., Luring, C., Meyerhofer, M., Hansen, U.P., and Dau, H. (2002) A fluorometric method for the differentiation of algal populations *in vivo* and *in situ*. *Photosynth Res* **72**: 39-53.
- Bibby, T.S., Mary, I., Nield, J., Partensky, F., and Barber, J. (2003) Low-light-adapted *Prochlorococcus* species possess specific antennae for each photosystem. *Nature* **424**: 1051-1054.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Böhm, S., Endres, S., Scheer, H., and Zhao, K.H. (2007) Biliprotein chromophore attachment: chaperone-like function of the PecE subunit of alpha-phycoerythrobilin lyase. *J Biol Chem* **282**: 25357-25366.
- Brejc, K., Ficner, R., Huber, R., and Steinbacher, S. (1995) Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of allophycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina platensis* at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol* **249**: 424-440.
- Bryant, D.A. (1982) Phycoerythrocyanin and phycoerythrin: Properties and occurrence in cyanobacteria. *J Gen Microbiol* **128**: 835-844.
- Cavender-Bares, K.K., Frankel, S.L., and Chisholm, S.W. (1998) A dual sheath flow cytometer for shipboard analyses of phytoplankton communities from the oligotrophic oceans. *Limnol Oceanogr* **43**: 1383-1388.
- Chapman, D.J., Cole, W.J., and Siegelmann, H.W. (1967) The structure of phycoerythrobilin. *J Amer Chem Soc* **89**: 5976-5977.
- Chisholm, S.W., Olson, R.J., Zettler, E. R., Waterbury, J.B., Goericke, R., and Welschmeyer, N. (1988) A novel free-living prochlorophyte occurs at high cell concentrations in the oceanic euphotic zone. *Nature* **334**: 340-343.
- Cobley, J.G., Oda, J.F., Ramos-Boudreau, C., and Sumiyoshi, T. (2000) In *10th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes*. Aug 26-31, pp. 81, Barcelona, Spain.

- Coleman, M.L., Sullivan, M.B., Martiny, A.C., Steglich, C., Barry, K., Delong, E.F., and Chisholm, S.W. (2006) Genomic islands and the ecology and evolution of *Prochlorococcus*. *Science* **311**: 1768-1770.
- Cornejo, J., Willows, R.D., and Beale, S.I. (1998) Phytobilin biosynthesis: Cloning and expression of a gene encoding soluble ferredoxin-dependent heme oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant J* **15**: 99-107.
- Dammeyer, T., and Frankenberg-Dinkel, N. (2006) Insights into phycoerythrobilin biosynthesis point toward metabolic channeling. *J Biol Chem* **281**: 27081-27089.
- Dammeyer, T., Bagby, S.C., Sullivan, M.B., Chisholm, S.W., and Frankenberg-Dinkel, N. (2008) Two activities for the price of one: Efficient phage-mediated pigment biosynthesis in oceanic cyanobacteria. *Manuscript submitted*.
- De Lorimier, R., Wilbanks, S.M., and Glazer, A.N. (1993) Genes of the R-Phycocyanin II locus of marine *Synechococcus* spp. and comparison of protein-chromophore interactions in phycocyanins differing in bilin composition. *Plant Mol Biol* **21**: 225-237.
- Downes, M.T., and Hall, J.A. (1998) A sensitive fluorometric technique for the measurement of phycobilin pigments and its application to the study of marine and freshwater picophytoplankton in oligotrophic environments. *J Appl Phycol* **10**: 357-363.
- Düring, M., Huber, R., Bode, W., Rübeler, R., and Zuber, H. (1990) Refined three-dimensional structure of phycoerythrocyanin from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* at 2.7 Å. *J Mol Biol* **211**: 633-644.
- Düring, M., Schmidt, G.B., and Huber, R. (1991) Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of constitutive C-phycoyanin from the chromatically adapting cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* at 1.66 Å resolution. *J Mol Biol* **217**: 577-592.
- Fairchild, C.D., Zhao, J., Zhou, J., Colson, S.E., Bryant, D.A., and Glazer, A.N. (1992) Phycocyanin α -subunit phycocyanobilin lyase. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7017-7021.
- Fairchild, C.D., and Glazer, A.N. (1994a) Nonenzymatic bilin addition to the α subunit of an apophycocerythrin. *J Biol Chem* **269**: 28988-28996.
- Fairchild, C.D., and Glazer, A.N. (1994b) Oligomeric structure, enzyme kinetics and substrate specificity of the phycocyanin alpha-subunit phycocyanobilin lyase. *J Biol Chem* **269**: 8686-8694.
- Falk, H. (1989) *The chemistry of linear oligopyrroles and bile pigments*. Wien, New York: Springer.
- Ficner, R., Lobeck, K., Schmidt, G.B., and Huber, R. (1992) Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of B-phycoerythrin from the red alga *Porphyridium sordidum* at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol* **228**: 935-950.
- Frankel, D.S., Olson, R.J., Frankel, S.L., and Chisholm, S.W. (1989) Use of a neural net computer system for analysis of flow cytometric data of phytoplankton populations. *Cytometry* **10**: 540-550.
- Frankenberg, N., Mukougawa, K., Kohchi, T., and Lagarias, J.C. (2001) Functional genomic analysis of the HY2 family of ferredoxin-dependent bilin reductases from oxygenic photosynthetic organisms. *Plant Cell* **13**: 965-978.
- Frankenberg, N., and Lagarias, J.C. (2003) Phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase of *Anabaena* sp. PCC 7120. Biochemical and spectroscopic. *J Biol Chem* **278**: 9219-9226.

- Fuhrman, J.A. (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* **399**: 541-548.
- Gantt, E., and Conti, S.F. (1965) The ultrastructure of *Porphyridium cruentum*. *J Cell Biol* **26**: 365-381.
- Gantt, E., and Conti, S.F. (1966) Granules associated with the chloroplast lamellae of *Porphyridium cruentum*. *J Cell Biol* **29**: 423-434.
- Gantt, E., and Conti, S.F. (1969) Ultrastructure of blue-green algae. *J Bacteriol* **97**: 1486-1493.
- Gill, S.C., and von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence. *Anal Biochem* **182**: 319-326.
- Glazer, A.N., and Hixson, C.S. (1977) *Porphyridium cruentum* B-phycoerythrin and b-phycoerythrin. *J Biol Chem* **252**: 32-42.
- Glazer, A.N. (1982) Phycobilisomes: structure and dynamics. *Annu Rev Microbiol* **36**: 173-198.
- Glazer, A.N. (1985) Light harvesting by phycobilisomes. *Annu Rev Biophys Chem* **14**, 47-77.
- Glazer, A.N. (1994) Phycobiliproteins – a family of valuable, widely used fluorophores. *J Appl Phycol* **6**: 105-112.
- Goerick, R., and Repeta, D.J. (1992) The pigments of *Prochlorococcus marinus*: the presence of divinyl chlorophyll *a* and *b* in a marine prochlorophyte. *Limnol Oceanogr* **37**: 425-433.
- Goerick, R., and Welschmeyer, N.A. (1993) The marine prochlorophyte *Prochlorococcus* contributes significantly to phytoplankton biomass and primary production in the Sargasso Sea. *Deep Sea Res* **40**: 2283-2294.
- Grossman, A.R., Schaefer, M.R., Chiang, G.G., and Collier, J.L. (1993) The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Rev* **57**: 725-749.
- Grossman, A.R., Bhaya, D., Apt, K.E., and Kehoe, D.M. (1995) Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: diversity, control and evolution. *Annu Rev Genet* **29**: 231-287.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hess, W.R., Partensky, F., Van der Staay, G.W., Garcia-Fernandez, J.M., Börner, T., and Vaultot, D. (1996) Coexistence of phycoerythrin and a chlorophyll *a/b* antenna in a marine prokaryote. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 11126-11130.
- Hess, W.R., Steglich, C., Lichtlé, C., and Partensky, F. (1999) Phycoerythrins of the oxyphotobacterium *Prochlorococcus marinus* are associated to the thylakoid membranes and are encoded by a single large gene cluster. *Plant Mol Biol* **40**: 507-521.
- Hu, I.C., Lee, T.R., Lin, H.F., Chiueh, C.C., and Lyu, P.C. (2006) Biosynthesis of fluorescent allophycocyanin alpha-subunits by autocatalytic bilin attachment. *Biochemistry* **45**: 7092-7099.
- Johnson, P.W., and Sieburth, J.M. (1979) Chroococcoid cyanobacteria in the sea: a ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnol Oceanogr* **24**: 928-935.

- Jung, L.J., Chan, C.F., and Glazer, A.N. (1995) Candidate genes for the phycoerythrocyanin alpha subunit lyase. Biochemical analysis of *pecE* and *pecF* interposon mutants. *J Biol Chem* **270**: 12877-12884.
- Kahn, K., Mazel, D., Houmard, J., Tandeau de Marsac, N., and Schaefer, M.R. (1997) A role for *cpeYZ* in cyanobacterial phycoerythrin biosynthesis. *J Bacteriol* **179**: 998-1006.
- Kettler, G.C., Martiny, A.C., Huang, K., Zucker, J., Coleman, M., Rodrique, S., Chen, F., Lapidus, A., Ferreira, S., Johnson, J., Steglich, C., Church, G., Richardson, P.M., and Chisholm, S.W. (2007) Patterns and implications of gene gain and loss in the evolution of *Prochlorococcus*. *PLoS Genetics* preprint (2007): e231.eor.
- Koller, K.P., and Wehrmeyer, W. (1977) B-Phycoerythrin from *Rhodella violacea*. *Arch Microbiol* **104**: 255-261.
- Kronick, M.N., and Grossman, P.D. (1983) Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates. *Clin Chem* **29**: 1582-1586.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lamparter, T. (2004) Evolution of cyanobacterial and plant phytochromes. *FEBS Lett* **573**: 1-5.
- LaRoche, J., van der Staay, G.W.M., Partensky, F., Ducret, A., Aebersold, R., Li, R., Golden, S.S., Hiller, R.G., Wrench, P.M., Larkum, A.W.D., and Green, B.R. (1996) Independent evolution of the prochlorophyte and green plant chlorophyll *a/b* light-harvesting proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 15244-15248.
- Li, W.K.W. (1995) Composition of ultraphytoplankton in the central North Atlantic. *Mar Ecol Prog Ser* **122**: 1-8.
- Lindell, D., Sullivan, M.B., Johnson, Z.I., Tolonen, A.C., Rohwer, F., and Chisholm, S.W. (2004) Transfer of photosynthesis genes to and from *Prochlorococcus* viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 11013-11018.
- Liu, H., Nolla, H.A., and Campbell, L. (1997) *Prochlorococcus* growth rate and contribution to primary production in the equatorial and subtropical North Pacific Ocean. *Aquat Microb Ecol* **12**: 39-47.
- Liu, H., Campbell, L., Landry, M.R., Nolla, H.A., Brown, S.L., and Constantinou, J. (1998) *Prochlorococcus* and *Synechococcus* growth rates and contributions in the Arabian Sea during the 1995 Southwest and Northeast monsoons. *Deep Sea Res II* **45**: 2327-2352.
- Liu, J.Y., Jiang, T., Zhang, J.P., and Liang, D.C. (1999) Crystal structure of allophycocyanin from red algae *Porphyra yezoensis* at 2.2-Å resolution. *J Biol Chem* **274**: 16945-16952.
- Lokstein, H., Steglich, C., and Hess, W.R. (1999) Light-harvesting antenna function of phycoerythrin in *Prochlorococcus marinus*. *Biochim Biophys Acta* **1410**: 97-98.
- Lundell, D.J., Yamanaka, G., and Glazer, A.N. (1981) A terminal energy acceptor of the phycobilisome: The 75'000-Dalton polypeptide of *Synechococcus* 6031 phycobilisome – A new biliprotein. *J Cell Biol* **91**: 315-319.
- MacColl, R., Guard-Friar, D. (1987) *Phycobiliproteins*. Boca Raton: CRC Press.
- MacColl, R. (1998) Cyanobacterial Phycobilisomes. *J Struct Biol* **124**: 311-334.

- Mann, N.H., Cook, A., Millard, A., Bailey, S., Clokie, M. (2003) Marine ecosystems: Bacterial photosynthesis genes in a virus. *Nature* **424**: 741.
- Middleboe, M., Jorgensen, N., and Kroer, N. (1996) Effects of viruses on nutrients turnover and growth efficiency of non-infected marine bacterioplankton. *Appl Environ Microbiol* **62**: 1991-1997.
- Millard, A., Clokie, M.R., Shub, D.A., and Mann, N.H. (2004) Genetic organization of the *psbAD* region in phages infecting marine *Synechococcus* strains. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 11007-11012.
- Montgomery, B.L., and Lagarias, J.C. (2002) Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci* **7**: 357-366.
- Moore, L.R., Goericke, R., and Chisholm, S.W. (1995) Comparative physiology of *Synechococcus* and *Prochlorococcus*: influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties. *Mar Ecol Prog Ser* **116**: 259-275.
- Moore, L.R., Rocap, G., and Chisholm, S.W. (1998) Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature* **393**: 464-467.
- Moore, L.R., and Chisholm, S.W. (1999) Photophysiology of the marine cyanobacterium *Prochlorococcus*: Ecotypic differences among cultured isolates. *Limnol Oceanogr* **44**: 628-638.
- Morel, A., Ahn, Y.-W., Partensky, F., Vaultot, D., and Claustre, H. (1993) *Prochlorococcus* and *Synechococcus*: a comparative study of their size, pigmentation and related optical properties. *J Mar Res* **51**: 617-649.
- Nagy, J.O., Bishop, J.E., Klotz, A.V., Glazer, A.N., and Rapoport, H. (1985) Bilin attachment sites in the alpha-subunits, beta-subunits and gamma subunits of R-phycoerythrin – Structural studies on singly and doubly linked phycourobilins. *J Biol Chem* **260**: 4864-4868.
- Padyana, A.K., Bhat, V.B., Madyastha, K.M., Rajashankar, K.R., and Ramakumar, S. (2001) Crystal structure of a light-harvesting protein C-phycoerythrin from *Spirulina platensis*. *Biochem Biophys Res Commun* **282**: 893-898.
- Palenik, B., and Haselkorn, R. (1992) Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll b-containing prokaryotes. *Nature* **355**: 265-267.
- Partensky, F., Hess, W.R., and Vaultot, D. (1999) *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 106-127.
- Peck, K., Stryer, L., Glazer, A.N., and Mathies, R.A. (1989) Single-molecule fluorescence detection: autocorrelation criterion and experimental realization with phycoerythrin. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 4087-4091.
- Penno, S., Campbell, L., and Hess, W.R. (2000) Presence of phycoerythrin in two strains of *Prochlorococcus* (Cyanobacteria) isolated from the subtropical North Pacific Ocean. *J Phycol* **36**: 723-729.
- Porter, G., Tredwell, C.J., Searle, G.F.W., and Barber, J. (1978) Picosecond time-resolved energy transfer in *Porphyridium cruentum*. Part I. In the intact alga. *Biochim Biophys Acta* **501**: 232-245.
- Pridmore, R.D. (1987) New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* **56**: 309-312.

- Prouty, W.F., Karnovsky, M.J., and Goldberg, A.L. (1975) Degradation of abnormal proteins in *E. coli*. *J Biol Chem* **250**: 1112-1122.
- Raven, J.A. (1994) Why are there no picoplanktonic O₂ evolvers with volumes less than 10⁻¹⁹ m³? *J Plankton Res* **16**: 565-580.
- Rüdiger, W. (1994) Phycobiliproteins and Phycobilins. In *Progrs phycolog res* **10**: 97-135. Round, F.E., and Chapman, D.J. (ed).
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., and Mullis, K.B. (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sambrook, J., and Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Saunée, N.A., Williams, S.R., Bryant, D.A., and Schluchter, W.M. (2008) Biogenesis of phycobiliproteins. II. CpcS-I and CpcU comprise the heterodimeric bilin lyase that attaches phycocyanobilin to Cys-82 of β -phycocyanin and Cys-81 of allophycocyanin subunits in *Synechococcus* sp. PCC 7002. *J Biol Chem Papers in Press*. Jan 16.
- Scheer, H., and Kufer, W. (1977) Conformational studies on C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Z Naturforsch* **32**: 513-519.
- Scheer, H. (1981) Biliproteine. *Angew Chem* **93**: 230-250.
- Schirmer, T., Huber, R., Sidler, W.A., and Zuber, H. (1985) X-ray crystallographic structure of the light-harvesting biliprotein C-phycocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* and its resemblance to globin structure. *J Mol Biol* **184**: 257-277.
- Schirmer, T., Bode, W., and Huber, R. (1987) Refined three-dimensional structure of two cyanobacterial C-phycocyanins at 2.1 and 2.5 Å resolution. A common principle of phycobilin-protein interaction. *J Mol Biol* **196**: 677-695.
- Searle, G.F.W., Barber, J., Porter, G., and Tredwell, C.J. (1978) Picosecond time-resolved energy transfer in *Porphyridium cruentum*. Part II. In the isolated light-harvesting complex (phycobilisomes). *Biochim Biophys Acta* **501**: 246-256.
- Shen, G., Saunée, N.A., Gallo, E., Begovic, Z., Schluchter, W.M., and Bryant, D.A. (2004) Identification of novel phycobiliprotein lyases in cyanobacteria. In *PS 2004 light-harvesting systems workshop*. Niederman, R.A., Blankenship, R.E., Frank, H., Robert, B., and van Grondelle, R., (eds). Saint Adele, Québec, Canada, pp. 14-15.
- Shen, G., Saunée, N.A., Williams, S.R., Gallo, E., Schluchter, W.M., and Bryant, D.A. (2006) Identification and characterization of a novel class of bilin lyase: the *cpcT* gene encodes a bilin lyase responsible for attachment of phycocyanobilin to Cys-153 on the beta subunit of phycocyanin in *Synechococcus* sp. PCC 7002. *J Biol Chem* **281**: 17768-17778.
- Shen, G., Schluchter, W.M., and Bryant, D.A. (2008) Biogenesis of phycobiliproteins. I. *cpcS-I* and *cpcU* mutants of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 define a heterodimeric phycocyanobilin lyase specific for β -phycocyanin and allophycocyanin subunits. *J Biol Chem Papers in Press*. Jan 16.
- Sidler, W.A. (1994) Phycobilisome and phycobiliprotein structures. In *The molecular biology of cyanobacteria*. Bryant, D.A. (ed). Dordrecht: Kluwer, pp. 139-216.

- Six, C., Thomas, J.C., Thion, L., Lemoine, Y., Zal, F., and Partensky, F. (2005) Characterization of two novel phycoerythrin-associated linker proteins in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH8102. *J Bacteriol* **187**: 1685-1694.
- Stec, B., Troxler, R.F., and Teeter, M.M. (1999) Crystal structure of C-phycoyanin from *Cyanidium caldarium* provides a new perspective on phycobilisome assembly. *Biophys J* **76**: 2912-2921.
- Steglich, C., Behrenfeld, M., Koblizek, M., Claustre, H., Penno, S., Prasil, O., *et al.* (2001) Nitrogen deprivation strongly affects Photosystem II but not phycoerythrin level in the divinyl-chlorophyll *b*-containing cyanobacterium *Prochlorococcus marinus*. *Biochim Biophys Acta* **1503**: 341-349.
- Steglich, C., Mullineaux, C.W., Teuchner, K., Hess, W.R., and Lokstein, H. (2003) Photo-physical properties of *Prochlorococcus marinus* SS120 divinyl chlorophylls and phycoerythrin *in vitro* and *in vivo*. *FEBS Lett* **553**: 79-84.
- Steglich, C., Frankenberg-Dinkel, N., Penno, S., and Hess, W.R. (2005) A green light-absorbing phycoerythrin is present in the high-light-adapted marine cyanobacterium *Prochlorococcus* sp. MED4. *Environ Microbiol* **7**: 1611-1618.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**: 60-89.
- Sullivan, M.B., Waterbury, J.B., and Chisholm, S.W. (2003) Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Nature* **424**: 1047-1051.
- Sullivan, M.B., Coleman, M.L., Weigele, P., Rohwer, F., and Chisholm, S.W. (2005) Three *Prochlorococcus* cyanophage genomes: signature features and ecological interpretations. *PLoS Biol* **3**: e144.
- Suttle, C.A. (2005) Viruses in the sea. *Nature* **437**: 356-361.
- Swanson, R.V., Zhou, J., Leary, J.A., Williams, T., de Lorimier, R., Bryant, D.A., and Glazer, A.N. (1992) Characterization of phycoyanin produced by *cpcE* and *cpcF* mutants and identification of an intergenic suppressor of the defect in bilin attachment. *J Biol Chem* **267**: 16146-16154.
- Tandeau de Marsac, N., and Cohen-Bazire, G. (1977) Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 1635-1639.
- Tandeau de Marsac, N., and Houmard, J. (1993) Phycobilisomes and complementary adaptation in cyanobacteria. *Bull Inst Pasteur* **81**: 201-254.
- Ting, C.S., Rocap, G., King, J., and Chisholm, S.W. (1999) Characterization of phycoerythrin genes in the chlorophyll *a2/b2*-containing prokaryote, *Prochlorococcus* sp. MIT9303. In *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Garab, G. (ed). Dordrecht: Kluwer, pp. 225-228.
- Ting, C.S., Rocap, G., King, J., and Chisholm, S.W. (2001) Phycobiliprotein genes of the marine photosynthetic prokaryote *Prochlorococcus*: Evidence for rapid evolution of genetic heterogeneity. *Microbiology* **147**: 3171-3182.
- Tooley, A.J., and Glazer, A.N. (2002) Biosynthesis of the cyanobacterial light-harvesting polypeptide phycoerythrocyanin holo-alpha subunit in a heterologous host. *J Bacteriol* **184**: 4666-4671.
- Tu, J.M., Kupka, M., Böhm, S., Plöschner, M., Eichacker, L., Zhao, K.H., and Scheer, H. (2008) *Photosynth Res* **95**: 163-168.

- Urbach, E., Robertson, D.L., and Chisholm, S.W. (1992) Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation. *Nature* **355**: 267-270.
- Veldhuis, M.J.W., Kraay, G.W., Van Bleijswijk, J.D.L., and Baars, M.A. (1997) Seasonal and spatial variation in phytoplankton biomass, productivity and growth in the northwestern Indian Ocean: The southwest and northeast monsoon, 1992-1993. *Deep Sea Res* **44**: 425-449.
- Weigele, P.R., Pope, W.H., Pedulla, M.L., Houtz, J.M., Smith, A.L., Conway, J.F., King, J., Hatfull, G.F., Lawrence, J.G., and Hendrix, R.W. (2007) Genomic and structural analysis of Syn9, a cyanophage infecting *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Environ Microbiol* **9**: 1675-1695.
- Weller, J.P., and Gossauer, A. (1980) Synthese und Photoisomerisierung des *racem.* Phytychromobilin-dimethylesters. *Chem Ber* **113**: 1603-1611.
- Wilbanks, S.M., and Glazer, A.N. (1993) Rod-structure of a phycoerythrin II-containing phycobilisome. Complete sequence and bilin attachment site of a phycoerythrin gamma subunit. *J Biol Chem* **268**: 1236-1241.
- Wommack, K.E., and Colwell, R.R. (2000) Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 69-114.
- Wu, S.H., and Lagarias, J.C. (2000) Defining the bilin lyase domain: lessons from the extended phytochrome superfamily. *Biochemistry* **39**: 13487-13495.
- Zeidner, G., Bielawski, J.B., Shmoish, M., Scanlan, D.J., Sabehi, G., and Beja, O. (2005) Potential gene recombination between *Prochlorococcus* and *Synechococcus* via viral intermediates. *Environ Microbiol* **7**: 1505-1513.
- Zickendraht-Wendelstadt, B., Friedrich, J., and Rüdiger, W. (1980) Spectral characterization of monomeric C-phycoerythrin from *Pseudoanabaena* W1173 and its α and β subunits: energy transfer in isolated subunits and C-phycoerythrin. *Photochem Photobiol* **31**: 367-376.
- Zhao, J., Zhou, J., and Bryant, D.A. (1992) Energy transfer processes in phycobilisomes as deduced from analyses of mutants of *Synechococcus* sp PCC 7002. In *Research in Photosynthesis, Vol I*. Murata, N. (ed). Dordrecht: Kluwer, pp. 25-32.
- Zhao, K.H., Deng, M.G., Zheng, M., Zhou, M., Parbel, A., Storf, M., Meyer, M., Strohmann, B., and Scheer, H. (2000) Novel activity of a phycobiliprotein lyase: both the attachment of phycocyanobilin and the isomerization to phycoviolobilin are catalyzed by the proteins PecE and PecF encoded by the phycoerythrocyanin operon. *FEBS Lett* **469**: 9-13.
- Zhao, K.H., Wu, D., Wang, L., Zhou, M., Storf, M., Bubenzer, C., Strohmann, B., and Scheer, H. (2002) Characterization of phycoviolobilin phycoerythrocyanin- α 84-cystein-lyase (isomerizing) from *Mastigocladus laminosus*. *Eur J Biochem* **269**: 4542-4550.
- Zhao, K.H., Zhu, J.P., Song, B., Zhou, M., Storf, M., Böhm, S., Bubenzer, C., and Scheer, H. (2004) Nonenzymatic chromophore attachment in biliproteins: conformational control by the detergent Triton X-100. *Biochim Biophys Acta* **1657**: 131-145.
- Zhao, K.H., Su, P., Böhm, S., Song, B., Zhou, M., Bubenzer, C., and Scheer, H. (2005a) Reconstitution of phycobilisome core-membrane linker, L_{CM}, by autocatalytic chromophore binding to ApcE. *Biochim Biophys Acta* **1706**: 81-87.

- Zhao, K.H., Wu, D., Zhou, M., Zhang, L., Böhm, S., Bubenzer, C., and Scheer, H. (2005b) Amino acid residues associated with enzymatic activity of the isomerizing phycoviolobilin-lyase PecE/F. *Biochemistry* **44**: 8126-8137.
- Zhao, K.H., Su, P., Li, J.A., Tu, J.M., Zhou, M., Bubenzer, C., and Scheer, H. (2006) Chromophore attachment to phycobiliprotein beta-subunits: phycocyanobilin:cysteine- β 84 phycobiliprotein lyase activity of CpeS-like protein from *Anabaena* sp. PCC7120. *J Biol Chem* **281**: 8573-8581.
- Zhao, K.H., Zhang, J., Tu, J.M., Böhm, S., Plöschner, M., Eichacker, L., Bubenzer, C., Scheer, H., Wang, X., and Zhou, M. (2007a) Lyase activities of CpcS- and CpcT-like proteins from *Nostoc* sp. PCC7120 and sequential reconstitution of binding sites of phycoerythrocyanin and phycocyanin beta-subunits. *J Biol Chem* **282**: 34093-34103.
- Zhao, K.H., Su, P., Tu, J.M., Wang, X., Liu, H., Plöschner, M., Eichacker, L., Yang, B., Zhou, M., and Scheer, H. (2007b) Phycobilin:cysteine-84 biliprotein lyase, a near-universal lyase for cysteine-84-binding sites in cyanobacterial phycobiliproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 14300-14305.
- Zhou, J., Gasparich, G.E., Stirewalt, V.L., de Lorimier, R., and Bryant, D.A. (1992) The *cpcE* and *cpcF* genes of *Synechococcus* sp. PCC 7002. Construction and phenotypic characterization of interposon mutants. *J Biol Chem* **267**: 16138-16145.

Anhang

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die heute eingereichte Diplomarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Bei der vorliegenden Diplomarbeit handelt es sich um vier in Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare.

Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.

Betreuerin der Arbeit war: Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel

Als Korreferenten schlage ich vor: Prof. Dr. Matthias Rögner

Bochum, den 15.02.2008

.....

(Unterschrift)