



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Untersuchung der Dehydrogenierung von NADH/ NADPH in isolierten und gereinigten Membranen

von

drei verschiedenen Cyanobakterienspezies,

die in zwei verschiedenen Bedingungen gezüchtet wurden

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin:

Samira Sari

Studienrichtung /Studienzweig:

A441-Genetik/ Gen und Biotechnologie

Betreuer:

UNIV.- PROF. DR. G. A. PESCHEK

Wien, im Juli 2010

Institut für Physikalische Chemie
Fakultät für Chemie
Universität Wien, Österreich



دل کرده در این مهیا شد
یک موزن زست و لرمی خفت
لز رد حز خلخور شدیا
آخن بیکار فرمه رکنیت

Ich habe viele Wissenschaften studiert doch am Ende wusste ich über dieses Universum nur soviel wie in einem Haar steckt.

AVICENNA , Persischer Arzt, Physiker, Philosoph, Jurist, Mathematiker, Astronom und Alchemist.

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Günter Peschek der mich während dieser Arbeit als wissenschaftlicher Leiter, besonders durch seine väterliche Fürsorge zur Seite stand und für meine Anliegen immer ein offenes Ohr gehabt hat.

Meinen akademischen Titel und vieles mehr verdanke ich meinen liebevollen Eltern die mich immer gefordert haben und für mich da gewesen sind, wenn ich sie gebraucht habe.

Mein weiterer Dank gilt an alle Freunde, die mich Unterstützt haben besonders an Frau DDr. Marion Engel, weil ohne ihre Hilfe dieser Arbeit fast unmöglich gewesen wäre, sowie Nicole Madlener und Xenia Martonova wegen ihre Mitarbeit, meine liebe kleine Schwerster Sara Sari, dass ein Stück Erinnerung aus der Heimat für diese Arbeit zugeschickt hat und sich liebevoll um die künstlerische Schrift gekümmert hat, dem Kollegen Josef Ruppert wegen seine wertvolle Hilfe, Ideen und Hinweise und Paul Friedl wegen seiner Geduld, Beharrlichkeit und moralischen Unterstützung.

Kurzfassung

Die notwendige Vorbedingung für die Experimente, sind die möglich photoautotrophe Aufzücht der drei Cyanobakterienspezien *Synechocystis* PCC6803, *Synechococcus* PCC 6301 („*Anacystis nidulans*“) und *Anabaena variabilis* (*Anabaena* PCC7120), sowohl deren Züchtung in zwei Bedingungen (in normale- und Stressbedingungen 0,5mM Satzmedium) als auch deren sorgfältige Ernte und Aufarbeitung gemäß einem komplizierten Protokoll (In 1989 wurde es ausgearbeitet, publiziert und verfeinert und mit dessen Hilfe weltweit gelungen wurde die beiden in Cyanobakterien vorkommenden, bioenergetisch relevanten Membrantypen Plasma- oder Zellmembran (CM) und intracytoplasmatische oder Thylakoidmembran (ICM), bei vollem Erhalt ihrer biochemischen Funktionen quasi „nekrochemisch“ zu isolieren und sorgfältig getrennt voneinander, rein darzustellen). Wunderlicher Weise haben die meisten etablierten Forscher, auf diesem Gebiet bewiesen, dass nicht nur die (auch photosynthetisch aktive) ICM sondern auch die CM eine mitochondrienanalog Atmungskette enthält.

Nach der nekrochemische Isolierung von ICM und CM aus zwei einzelligen und einem filamentösen Cyanobakterium, dass enorm hohes Maß an Fingerspitzengefühl und fachliche Erfahrungen benötigt, sollte in CM und ICM genaueren Biochemie des nach wie vor unzureichend verstandenen NAD(P)H-Dehydrogenase-Segments der Atmungskette untersucht werden, sowohl in normalen gezüchteten Bedingungen als auch unter Stress Bedingungen (0,5mM Satzmedium). Unter ausführlicher Zuhilfenahme einschlägiger, insbesondere aus der Mitochondrienforschung her, genauestens bekannten Inhibitoren (Antimycin A/Komplex III, Rotenon/Komplex I, und natürlich auch KCN/Komplex IV) sowie gestützt auf die in meiner Arbeit erhärtete Tatsache, dass die Komplex-I-analog NADH-Dehydrogenase (NADH-1) in oxyphototrophen Organismen sowohl NADH als auch NADPH dehydrogeniert, während die typisch „bakterielle“ NADH-2 streng spezifisch für NADH ist, konnte ein sehr interessantes und konsistentes Bild der cyanobakteriellen Pyridinnucleotid-Dehydrogenasen erhalten werden, das sich als wegweisend für künftige Forschungen auf diesem Gebiet erweisen wird.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Die Cyanobakterien und ihre Rolle bei der Entstehung vom Sauerstoff.....	1
1.2	Kapitelüberblick.....	2
1.3	Abkürzungen.....	3

2. Cyanobakterien

2.1	Allgemeines.....	5
2.1.1	Endosymbiontentheorie.....	5
2.1.2	Neue Theorie	6
2.2	Die Morphologie.....	6
2.2.1	Merkmale.....	7
2.2.2	Glycokalyx.....	7
2.2.3	Peptidoglukan Schicht.....	7
2.2.4	Cytoplasmamembran und Thylakoidmembran.....	7
2.2.5	Phycobilisomen	8
2.2.6	Einschlüsse.....	8
2.2.7	Carboxysomen.....	9
2.2.8	DNA in Cyanobakterien	9
2.2.9	Luftvakuolen.....	9
2.2.10	Heterozysten.....	12
2.2.11	Baeozyten.....	13
2.2.12	Akineten.....	13
2.2.13	Hormogonien.....	13
2.3	Fortbewegung.....	14
2.4	Lebensraum.....	14
2.5	Schutzfunktion.....	14
2.6	Hypothese.....	15
2.7	Bedeutung.....	16
2.8	Systematik.....	16
2.8.1	Taxonomiesche Einleitung nach NCBI.....	17
2.8.1.1	Ordnung Chroococcales.....	17
2.8.1.2	Ordnung Gloeobacterales	17
2.8.1.3	Ordnung Nostocales.....	17
2.8.1.4	Ordnung Oscillatoriaceae.....	17
2.8.1.5	Ordnung Pleurocapsales.....	18
2.8.1.6	Ordnung Prochlorales (prochlorophytes).....	18
2.8.1.7	Ordnung Stigonematales	18
2.8.2	Taxonomiesche Einleitung nach Castenholz und Waterbury.....	19
2.9	Stoffwechselwege und Metabolismus.....	21
2.9.1	Fermentation.....	21
2.9.2	Photosynthese.....	22
2.9.2.1	Primärreaktion oder Licht abhängige Reaktion.....	23
2.9.2.2	Sekundärreaktion oder Dunkelreaktion.....	24
2.9.3	Respiration.....	24
2.9.4	Kohlenstoffmetabolismus.....	25

2.9.5	Stickstoffmetabolismus.....	26
2.9.6	Lipidmetabolismus.....	27
2.10	Ökologie.....	27
3. Cyanobakterielle Elektronentransport		
3.1	Photosynthetischer Elektronentransport.....	28
3.2	Respiratorische Elektronentransport-Kette.....	29
3.3	Reduxpotential.....	30
3.4	Komponente der Atmungskette.....	31
3.4.1	NAD(P)H-Dehydrogenase; Komplex I.....	32
3.4.1.1	FMN; Flavinmononucleotid und FAD; Flavinadenidinucleotid...	33
3.4.1.2	NDH 1.....	33
3.4.1.3	NADH II.....	34
3.4.1.4	Eisen-Schwefel-Proteine.....	34
3.4.2	Succinatdehydrogenase ; Komplex II.....	34
3.4.3	Cytochrom <i>bc</i> -Komplex ; Komplex III.....	35
3.4.3.1	Q-Zyklus.....	36
3.4.4	Cytochrom c-Oxidase; Komplex IV.....	36
3.4.5	H ⁺ -transporting two-sector ATPase; ATP-Synthase.....	37
3.4.5.1	Aufbau von F _I	38
3.4.5.2	Aufbau von F ₀	38
4. Bioenergetik		
4.1	Enzymkinetik.....	39
4.1.1	Linearisierungsverfahren.....	40
4.1.1.1	Lineweaver-Burk-Diagramm (doppelt-reziproke Auftragung).....	40
4.1.1.2	Eadie -Hofstee-Diagramm.....	41
4.1.1.3	Hanes-Diagramm.....	41
4.2	Spektralphotometrie.....	42
4.2.1	Die elektromagnetischer Strahlungen.....	42
4.2.2	Absorption und Konzentration.....	43
4.2.3	Hinweise bei der Messung.....	44
5. Material und Methoden		
5.1	Organismen.....	45
5.1.1	Synechocystis (Cyanophyceae; Chroococcales; Chroococcaceae).....	45
5.1.2	Anacystis nidulans (Cyanobacteria; Chroococcales; Synochococcus).....	45
5.1.3	Anabeana (Cyanobacteria; Nostocales; Nostocaceae).....	46
5.2	Laborvoraussetzungen.....	46
5.2.1	Geräte und Laborutensilien.....	46
5.2.2	Material.....	47
5.2.2.1	Herstellung Waschpuffer.....	47
5.2.2.2	Herstellung Phosphatpuffer.....	47
5.2.2.3	Herstellung Bradford- Lösung.....	47
5.2.2.4	Herstellung BSA(Eichlösung).....	47
5.3	Kultivierung und Zucht.....	47
5.3.1	Zuchtmedien.....	47
5.3.1.1	Kratz und Myers Medium.....	48
5.3.1.2	BG-11 Medium.....	48
5.3.1.3	BG-11 Shaker Medium.....	48
5.3.2	Kulturen.....	49
5.3.2.1	Langzeitkulturen.....	49

5.3.2.2	Tiefkühlkulturen.....	49
5.3.2.3	Vorkulturen.....	49
5.3.2.4	Zuchtkulturen.....	49
5.4	Zellpräparation.....	49
5.4.1	Zelldichte.....	49
5.4.2	Zellernte und Waschprozess.....	50
5.4.3	Bestimmung der Zelldichte (Phykokritbestimmung).....	50
5.4.3.1	Einstellung der Hämatokritwert.....	50
5.4.3.2	Beseitigung der Zellbarriere.....	50
5.4.4	French-Press.....	51
5.4.5	Membran Präparation(CM und ICM Trennung).....	51
5.4.6	Abnahme von Membranen.....	51
5.5	Messung.....	52
5.5.1	Proteinbestimmung.....	52
5.5.2	Spektralphotometrische Prinzipien.....	53
5.5.3	Protein Aktivitätsbestimmung.....	54
5.5.3.1	Zusammenfassung.....	54
5.5.3.2	Beispiel zur Berechnung der spezifischen Aktivität.....	54
5.5.3.3	Reagentien und Hemmstoffen.....	56
5.5.3.3.1	Cytochrom c	56
5.5.3.3.2	Nukleotide NAD(P)H	56
5.5.3.3.3	KCN	57
5.5.3.3.4	Hemmstoffe Rotenon.....	57
5.5.3.3.5	Hemmstoffe Antimycin A.....	58
5.6	Durchführung der Messungen.....	58
5.6.1	Ermittlung der Blindwerte.....	59

6. Die Ergebnisse

6.1	Die Untersuchungsbedingungen	60
6.2	Die Untersuchte Membranaktivität der Spezies.....	61
6.3	Synechocystis PCC 6803.....	62
6.3.1	Die Ergebnisse zu den im Salzmedium gezüchtete <i>Synechocystis</i> PCC 6803.	62
6.3.1.1	Die Spezifische Aktivität der ICM in Anwesenheit der NADH und NADPH.....	63
6.3.1.1.1	Wirkung des Rotenon auf die Aktivität der ICM.....	64
6.3.1.1.2	Wirkung des Antimycin auf die Aktivität der ICM ..	65
6.3.1.2	Die Spezifische Aktivität der CM in Anwesenheit der NADH und NADPH.....	66
6.3.1.2.1	Wirkung des Rotenon auf die Aktivität der CM.....	67
6.3.1.2.2	Wirkung des Antimycin auf die Aktivität der CM...	68
6.3.2	Die Ergebnisse zu den im normalem Medium gezüchtete <i>Synechocystis</i> PCC 6803.....	69
6.3.2.1	Die Spezifische Aktivität der ICM in Anwesenheit der NADH und NADPH	69
6.3.2.1.1	Wirkung des Rotenon auf die Aktivität der ICM.....	70
6.3.2.1.2	Wirkung des Antimycin auf die Aktivität der ICM...	71
6.3.2.2	Die Spezifische Aktivität der CM in Anwesenheit der NADH und NADPH	72
6.3.2.2.1	Wirkung des Rotenon auf die Aktivität der CM.....	73
6.3.2.2.2	Wirkung des Antimycin auf die Aktivität der CM...	74
6.4	<i>Anacystis nidulans</i> PCC 6301.....	75

6.4.1	Die Ergebnisse zu den im Salzmedium gezüchtete <i>Anacystis</i> PCC 6301...	75
6.4.1.1	Die Spezifische Aktivität der ICM in Anwesenheit der NADH und NADPH.....	75
6.4.1.1.1	Wirkung des Rotenon auf die Aktivität der ICM.....	76
6.4.1.1.2	Wirkung des Antimycin auf die Aktivität der ICM.....	77
6.4.1.2	Die Spezifische Aktivität der CM in Anwesenheit der NADH und NADPH.....	78
6.4.1.2.1	Wirkung des Rotenon auf die Aktivität der CM.....	79
6.4.1.2.2	Wirkung des Antimycin auf die Aktivität der CM.....	80
6.4.2	Die Ergebnisse zu den im normalem Medium gezüchtete <i>Anacystis</i> <i>nidulans</i> PCC 6301	82
6.4.2.1	Die Spezifische Aktivität der ICM in Anwesenheit der NADH und NADPH	82
6.4.2.1.1	Wirkung des Rotenon auf die Aktivität der ICM.....	83
6.4.2.1.2	Wirkung des Antimycin auf die Aktivität der ICM..	84
6.4.2.2	Die Spezifische Aktivität der CM in Anwesenheit der NADH und NADPH	85
6.4.2.2.1	Wirkung des Rotenon auf die Aktivität der CM.....	86
6.4.2.2.2	Wirkung des Antimycin auf die Aktivität der CM....	87
6.5	<i>Anabeana</i> PCC 7120.....	89
6.5.1	Die Ergebnisse zu den im Salzmedium gezüchtete <i>Anabeana</i> PCC 7120...	89
6.5.1.1	Die Spezifische Aktivität der ICM in Anwesenheit der NADH und NADPH.....	90
6.5.1.1.1	Wirkung des Rotenon auf die Aktivität der ICM.....	91
6.5.1.1.2	Wirkung des Antimycin auf die Aktivität der ICM ..	92
6.5.2	Die Ergebnisse zu den im normalem Medium gezüchtete <i>Anabeana</i> PCC 7120.....	93
6.5.2.1	Die Spezifische Aktivität der ICM in Anwesenheit der NADH und NADPH	93
6.5.2.1.1	Wirkung des Rotenon auf die Aktivität der ICM.....	94
6.5.2.1.2	Wirkung des Antimycin auf die Aktivität der ICM...	95

7. Interpretationen der Kurven und die Ergebnisse

7.1	Allgemein.....	97
7.2	<i>Anacystis</i> <i>nidulans</i> PCC 6301.....	98
7.2.1	Interpretation der ICM-Kurven unter normalen Bedingungen.....	98
7.2.2	Interpretation der CM-Kurven unter normalen Bedingungen	99
7.2.3	Interpretation der ICM-Kurven unter Stress Bedingungen.....	100
7.2.4	Interpretation der CM-Kurven unter Stress Bedingungen.....	101
7.3	<i>Anabeana</i> PCC 7120.....	102
7.3.1	Interpretation der ICM-Kurven unter normalen Bedingungen.....	102
7.3.3	Interpretation der ICM-Kurven unter Stress Bedingungen.....	103
7.4	<i>Synechocystis</i> PCC 6803.....	104
7.4.1	Interpretation der ICM-Kurven unter normalen Bedingungen.....	104
7.4.2	Interpretation der CM-Kurven unter normalen Bedingungen	105
7.4.3	Interpretation der ICM-Kurven unter Stress Bedingungen.....	106
7.4.4	Interpretation der CM-Kurven unter Stress Bedingungen.....	107
	Literaturverzeichnis.....	109
	Curriculum vitae.....	114

Kapitel I

Einleitung

I.I Die Cyanobakterien und ihre Rolle bei der Entstehung vom Sauerstoff

In heutigen terrestrischen Bedingungen besteht die Luft zu rund 78% aus Stickstoff und zu 21% aus Sauerstoff. Sauerstoff ist verantwortlich für Alterung und chemische Angriffe auf organischen Substanzen von Lebewesen und doch ist sie auch stets eine lebenspendende Atmosphäre, ohne die gegenwärtig kein Leben möglich wäre.

Wenn wir in der Erdgeschichte zurückblicken, stellen wir fest, dass sich der chemische Aufbau der Atmosphäre wesentlich vom heutigen unterscheidet. Erst vor gut 350 Millionen Jahren, in der erdgeschichtlichen *Epoche des Perm*, war ein chemisches Gleichgewicht erreicht, das bis heute recht stabil geblieben ist.

- Vor **4,6 Milliarden Jahren** entsteht die Erde durch die Zusammenballung kosmischer Materie. Die Oberflächentemperatur der Erde musste weit über 1000 Grad Celsius betragen.
- Vor etwa **4,2 Milliarden Jahren** hatte sich die Erde langsam abgekühlt und so konnte sich Wasser ohne zu verdampfen auf ihr halten. Die Weltmeere und die Atmosphäre bildeten sich gleichzeitig aus. **Erste Atmosphäre**: Nach den neuesten Erkenntnissen ist anzunehmen, dass die erste Atmosphäre nicht, wie zunächst angenommen, aus *Methan* und *Ammoniak*, sondern im wesentlichen aus 80% Wasser und Stickstoff, 10% Kohlendioxid, 7 % Schwefelwasserstoff, 0,5% Kohlenmonoxid, 0,5% Wasserstoff, Spuren an Methan und Ammoniak.
- Vor etwa **3,4 Milliarden Jahren** hatte sich die sog. **zweite Atmosphäre** ausgebildet. Das Kohlendioxid löste sich im Meer und es verursachte eine Verringerung des Treibhauseffekts. So konnte sich die noch immer warme Erdatmosphäre weiter abkühlen.
- Vor etwa **3,5 Milliarden Jahren**, konnte das Leben sich auf der Erde etablieren weil langsam das Kohlendioxid bis auf einen kleinen Rest sich beseitigt hat. Und so wandelte sich die Atmosphäre schließlich ein drittes Mal. Mit Hilfe den ersten primitiven Autotrophen Organismen wie Cyanobakterien „*Stromatolithen*“ bzw. blaugrüne Algen reicherte sich Sauerstoff zunächst im Meerwasser an.

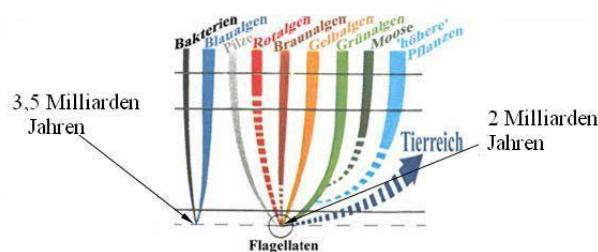


Abb.1.1 Entwicklung der Lebewesen [1]

- Vor etwa **2,5 Milliarden Jahren** pasiert riesige Eisenoxidablagerungen auf dem Meeresboden.
- Vor etwa **2 Milliarden Jahren** wurde fast das gesamte Eisen im Meer als Oxid ausgelöst und abgelagert und so ist der Sauerstoff in die Atmosphäre übergegangen. Im Laufe der Evolution haben sich dann die Lebewesen langsam mehr und mehr an die Atmosphäre (welches jetzt das "Stoffwechselgift" **Sauerstoff** enthielt) angepasst, sogar die aeroben Einzeller benutzten Sauerstoff zur Nahrungsveratmung und nach einiger Zeit entstanden die ersten eukaryotischen Einzeller (Planktonalgen) [2].

I.2 Kapitelüberblick

Kapitel 2 erklärt allgemeines Hintergrundwissen über Cyanobakterien wie Endosymbiontentheorie, Morphologie, Merkmale, Systematik, Ökologie und die wichtige Stoffwechselwege. Stoffwechselwege und Metabolismus zeigen eine genaue Erklärung von verschiedenen Möglichkeiten, die Cyanobakterien nützen um Energie zu gewinnen und am leben zu bleiben. Darum werden auch kurz ganz wichtige bioenergetische Aspekte wie Photosynthese und Atmung geschildert, den Cyanobakterien eine wichtige Position als Modelorganismus bei der Photosynthese-Forschung ergaben.

Kapitel 3 bietet eine allgemeine Erklärung zu Elektronentransport bei Cyanobakterien. Bei der Beschreibung „Die Komponente der Atmungskette“ schließt eine genaue Durchleuchtung über Zusammensetzung und Zusammenarbeit der einzelnen Komponenten in der Atmungskette ein. Wobei die besondere Aufmerksamkeit auf Cytochrom *bc*-Komplex(Komplex III) und NAD(P)H-Dehydrogenase(Komplex I) und ihre Art Elektronen zu transportieren liegt.

Kapitel 4 enthält die Beschreibung der Bioenergetische Gesetze, von Enzymkinetik und Michaelis-Menten Gleichung und Linearisierungsverfahren bis zur Erläuterung von Spektralphotometrische Methoden. Also ist praktisch das Hauptziel dieses Kapitels das theoretische Hintergrundwissen zur Erklärung und Bestimmung der Enzymaktivität und Katalytische Effizienz, welche in der biophysikalischen Chemie bei den enzymkatalysierten Reaktionen eine große Rolle spielt.

Kapitel 5 befasst sich mit dem Material und Methoden. Verschiedene Methoden, wie die Isolierung von Membranen, Bestimmung von Proteinkonzentrationen und Photometrische Messungen. Dazu die detaillierte Beschreibung der verwendeten Spezies, unter anderem die perfekten Kulturbedingungen, sowie die Herstellung von verschiedenen Chemikalien, Zuchtmedien, durchführung von Zell- und Membranpräparation, Beschreibung von Reagenzien und Hemmstoffen und auch Berechnung der spezifischen Aktivität von isolierten Membranvesikeln.

Kapitel 6 erfasst die drei besten Ergebnisse aus jeder untersuchten Cyanobakterienspezies PCC6803/ PCC6301/PCC7120 in dieser Arbeit als übersichtliche im Vergleich stehenden grafischen Darstellungen, von den Messergebnissen in zwei unterschiedlich gezüchteten Bebinigungen.

Kapitel 7 erfasst alle standartisierten Ergebnisse dieser Arbeit als übersichtliche grafische Darstellungen, sowohl die positiven als auch negativen Ergebnissen bei der Aktivierung oder Hemmung, sowie die Interpretationen und Diskussionen.

Appendix Literatur- und Websiteverzeichnis

I.3 Abkürzungen

- A Formel (A = E.c.d) der Absorption.
- ATP Adenosin-5-Triphosphat
- BSA Rinder- Serum-Albumin (bovine serum albumin)
- C Konzentration
- CA Carboanhydrase
- Ca Carboxisom
- CG Cyanophycingranulum
- CM Cytoplasmatische Membran
- Cmp Cytoplasmatisches Membrane Protein
- C_{ox} Konzentration oxiedierter Stufe
- C_{red} Konzentration reduzierter Stufe
- Cyt oxidase Cytochrom Oxidase
- Cyt c Cytochrom $c553$
- Cyt Cytochrom
- Cyt $b6/f$ Cytochrom $b6/f$ -Komplex
- d Dichte
- DGDG Digalactosyldiacylglycerid
- DMSO Dimethylsulfoxid
- DMSO Der Transmitter, Dimethylsulfoxid
- E Extinktionskoeffizient
- EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
- EMK Electromotive Force (Die elektromotorische Kraft)
- Et-OH Ethanol
- Fd Ferredoxin
- FeS Eisen-Schwefel-Protein
- FMN, FAD Flavinnukleotiden (Flavinmononukleotid und Flavinadenindinukleotid)
- FNR Ferredoxin- NADP-Oxidoreduktase
- GG Glykogengranulum
- GV Gasvesikel
- HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
- HGT Horizontaler Gentransfer
- I_{ab} Absorbiertes Licht
- ICM Intracytoplasmatische Membran
- IM Interacytoplasmatische Membranen (Hier ist Thylakoide gemeint).
- IR-Strahlung Infrarotstrahlung
- Ire Reflektiertes Licht
- Itr Transmittiertes Licht
- KCN Kaliumcyanid
- KD Kilo-Dalton ein Masseeinheit für die Größe eines Proteins
- K&M Kratz und Myers Medium
- Km Michaeliskonstante
- MGDG Monogalactosyldiacylglycerid
- MP Mikroplasmodesmen
- NAD Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
- NADP Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

• NCBI	US-amerikanischen National Center for Biotechnology Information
• NDH-1A	NADH-Dehydrogenase Typ A
• NDH-1B	NADH-Dehydrogenase TypB
• NDH	NADH-Dehydrogenase
• N-Seite	Matrix-Seite
• OPPP	Oxidative Pentosephosphatweg
• ox.	Oxidiert
• PB	Phycobilisomen
• PBS	Phycobilisomen
• PC	Plastocyanin
• PG	Phosphatidylglycerid
• PMSF	Phenylmethansulfonyfluorid
• PMK	Die protonenmotorische Kraft
• PQ	Plastochinon
• PS II	Photosystem II
• PP	Polyphosphate
• ppm	Parts per million (Teile von einer Million)
• PS I	Photosystem I
• P-Seite	Intermembranseite
• Psi	Pound-force per square inch. Die Maßeinheit für den Druck.
• PS I	Photosystem I
• PS II	Photosystem II
• Q	Coenzym Ubichinon
• QH ₂	Ubichinol
• red.	Reduziert
• Rieske	FeS-Protein
• rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
• rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
• RT	Raumtemperatur
• RuBisCo	Ribulose Bisphosphat Carboxylase
• S	Substrat
• SA	Die spezifische Aktivität
• SbtA	Natrium-Bicarbonat-Transporter , Sodium-bicarbonat transport
• SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycerid
• T	Zeit
• TCC	Tricarbonsäure-Zyklus
• TM	Thylakoidmembran
• UVB-Licht	Liegt in Wellenlängenbereich von 280 bis 315 Nanometern
• V_{max}	Maximalgeschwindigkeit
• 70S-R	70S-Ribosomen
• Δ Cyt.c	Veränderte Konzentration an Cytochrom c
• [S]	Substrats-Konzentration
• ϵ	Extinktionskoeffizient
• λ	Wellenlänge
• $\Delta\Psi$	Elektrisches Membranpotenzial
• ΔPH	PH-Differenz zwischen Außen und Innenseite

Kapitel 2

Cyanobakterien

2.I Allgemeines

Cyanobakterien sind eine Gruppe von Bakterien, die die Fähigkeit zur oxygenen Photosynthese besitzen. Das heißt die organischen Stoffen werden synthetisiert, unter Verwendung von Lichtenergie.

Früher wurden Cyanobakterien zu den *Phycophyta* (Algen) und zwar als Klasse *Cyanophyceae* (Blualgen) gerechnet.

Die Cyanobakterien werden aber zur den Prokaryoten gezählt und nicht als „Algen“ bezeichnet, weil ihnen die für die Eukaryoten typischen Zellbestandteile fehlen, wie echter Zellkern, Mitochondrien, Chloroplasten, Golgi-Apparat, endoplasmatisches Reticulum und Vakuolen.

Die Mikro-Fossilien von Bakterien, die möglicherweise zur Photosynthese fähig waren und ein Alter von 3,5 – 4 Milliarden Jahre nachweisen, beweisen, dass die Cyanobakterien Vorläufer, vermutlich bereits seit mehr als 3,5 Mrd. Jahre die Erde besiedeln und zählen damit zu den ältesten Lebensformen überhaupt. Durch oxygenen Photosynthese betreibende Cyanobakterien wurde der Gesamte in der Erdatmosphäre vorkommende Sauerstoff gebildet. Obwohl sie selbst aerob sind, haben sie maßgeblich dazu beigetragen, dass die Erde heute von höheren aeroben Lebensformen bewohnbar ist. Denn sie sind es, die vor mindestens 2,7 Milliarden Jahren begannen, durch die Photosynthese Sauerstoff freizusetzen. Man kennt inzwischen bis zu 2000 Arten von Cyanobakterien, die die Wissenschaftler in 5 bis 7 Ordnungen unterteilen [3].

2.I.I Endosymbiontentheorie

Große Prokaryoten verschlangen kleinere Prokaryoten ohne sie zu verdauen, diese entwickelten sich dann zu Zellorganellen (Mitochondrien, Chloroplasten).

Beweise:

Mitochondrien und Chloroplasten sind genauso klein wie Prokaryoten und besitzen ähnliche Enzyme wie Prokaryoten und sie teilen sich binär, und haben ringförmige DNA und auf molekularer Ebene sind sie ähnlich wie die Prokaryoten (z.B.: 16S rRNA) [4]. Siehe Abb. 2.1

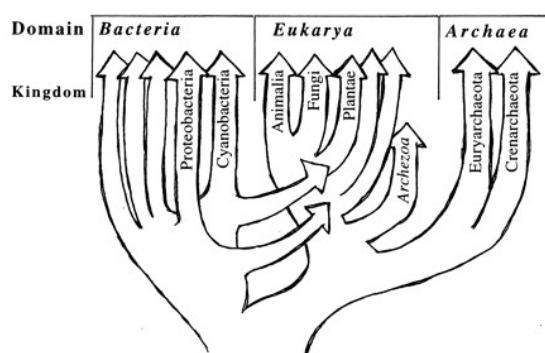


Abb. 2.1 Endosymbiontentheorie [4].

2.1.2 Neue Theorie

Es gab keine Urzelle, oder einen gemeinsamen Vorfahren für alle Lebewesen, sondern eine Vielfalt von ursprünglichen Zellen. Einige konnten sich durchsetzen und wurden zu Vorfahren von Bakterien, Archaeen und Eukaryoten. Dabei spielte auch der Horizontale Gentransfer (HGT) eine große Rolle in der Evolution. Die „Darwinsche Schwelle“ sagte aus, dass horizontaler Gentransfer zur Zeit der Zellsysteme sehr offen gewesen sei, so war HGT mehr häufiger, aber ab dem Zeitpunkt der Etablierung der Zellbestandteile wurde HGT viel seltener [4].

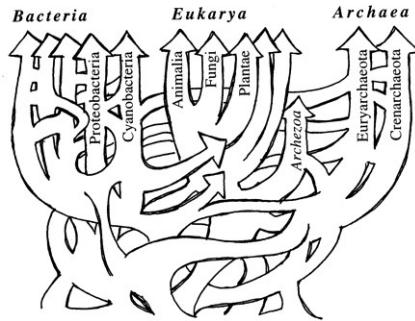


Abb. 2.1 Die neuen Theorien über HGT und Vielfalt von Urzellen [4].

2.2 Die Morphologie

Die Cyanobakterien variieren von der Größe her zwischen 0,5 µm-1 µm im Durchmesser bis 60 µm, wie z.B. bei der *Oscillatoria*. Die Erscheinung ist vielfältig, von Einzelligen, über fädigen Formen, bis hin zu Koloniebildenden. Bei mehrzelligen Cyanobakterien erscheint die Anordnung der Zellen meistens in 3 Formen, hintereinander in langen **Fäden** (zum Beispiel *Anabaena* und *Oscillatoria*), **flächig** (zum Beispiel *Merismopedia*) oder **räumlich** (zum Beispiel *Pleurocapsa* und *Microcystis*)[3]. Die Cyanobakterien bewegen sich nicht gezielt weil sie keine Geißel besitzen aber einige planktische Arten können mit Hilfe von Gasvakuolen, ihre Schwimmhöhe zum optimalen Bereich und den optimalen Lichtverhältnisse im Wasser regulieren um besser die Photosynthese zu vollziehen. Die grafischen Darstellungen wichtiger morphologischer Vielfalt der Cyanobakterien sind in Abb. 2.3 zu sehen.

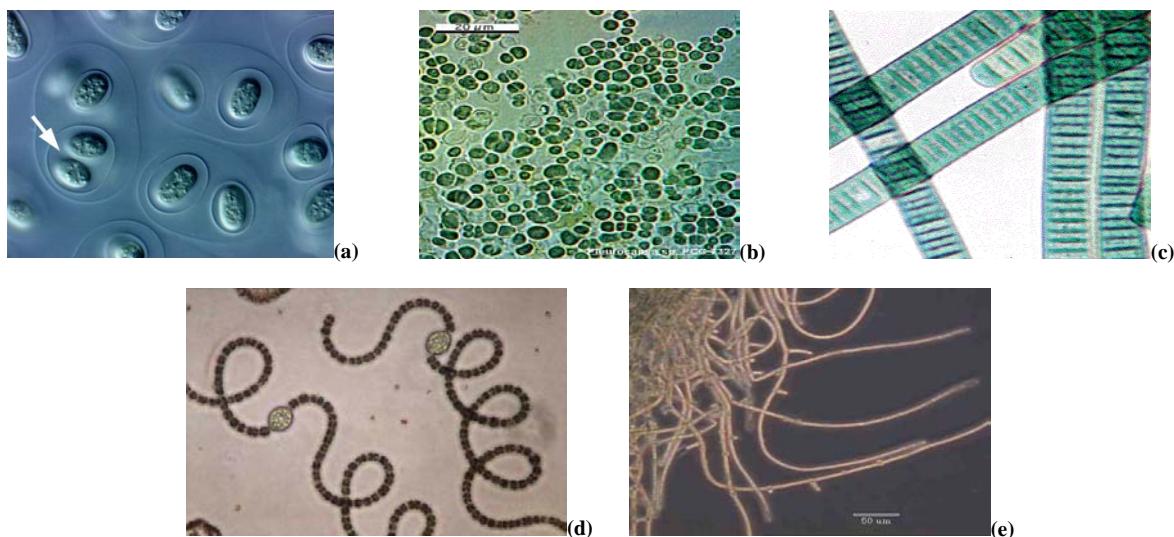


Abb.2.3: Die fünf wichtigen morphologischen Arten der Cyanobakterien.

- a) *Gloeocapsa*, einzellig, die Zelle sind etwa 4-6 µm groß [5].
- b) *Pleurocapsa pcc7327*, Koloniale Zellen sind fähig zur Stickstoff-Fixierung [6].
- c) *Oscillatoria*, filamentös, eine Einzelle ist etwa 15 µm breit und kann mehr als 40 µm lang sein [7].
- d) **Anabaena spiroides**, filamentös, heterozystisch, *mit einem Durchmesser von 7-15 µm* [8].
- e) *Fischerella*, filamentös, verzweigt [9].

2.2.1 Merkmale

Die Cyanobakterien besitzen die typische, prokaryotische Zellorganisation und das bedeutet, dass Cytoplasma nicht Kompartimentiert ist, aber trotzdem werden sie in zwei Regionen, zentrale „Nucleoplasma“ und periphere Regionen „Chromatoplasma“ geteilt.

Die ringförmigen Chromosomen befinden sich in Nucleoplasma und es erscheint durch die Anwesenheit von Ribosomen leicht granuliert zu sein. Im Chromatoplasma befindet sich das photosynthetische Membransystem, die durch Invagination der Plasmamembranen ausgebildet sind. Die Cyanobakterien können sich sehr unterschiedlich Reproduzieren. Dieser Prozess ist stark abhängig von Umweltbedingungen. Diese Reproduktion erfolgt in ein, zwei oder in drei Ebenen. Zum Beispiel teilen sich die *Chroococcidiopsis*-Arten in extrem trockenen Umständen wie z.B. in Wüsten wahrscheinlich nur alle zehntausend Jahre (Nienow and Friedmann, 1993). Die schnellste Teilungsrate liegt zwischen 1 und 2 Stunden z.B. Süßwasser-Cyanobakterium *Anacystis nidulans* in texanischen Seen (Kratz and Myers, 1955)[10].

2.2.2 Glycokalyx

Die Zelle ist nach außen von der so genannten Glycokalyx oder Schleimhülle (aus Kohlenhydraten bestehenden faserigen Schicht) umgeben. Diese Schicht ist sowohl bei eukaryotischen Zellen als auch bei prokaryotischen Zellen zusehen. Sie schützt die Zelle vor Austrocknung, bzw. vor Nährstoffverlust und besonders bei planktischen Arten spielt eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von gelösten Substanzen, Bakterielle DNA lagert sich nach der Innenseite der äußeren Membranen der Glycocalyx ein. Der periplasmatische Raum wird durch eine Peptidoglykan Schicht in einen äußeren und einen inneren Bereich unterteilt. Siehe **Abb. 2.7**

2.2.3 Peptidoglykan Schicht

Die Peptidoglykan Schicht ist für die Zelle eine feste und Form gebende Zellwand. Bei Cyanobakterien ist sie dicker als in Gram-negativen, nicht-photosynthetischen Bakterien. Siehe **Abb. 2.5 und 2.7**

2.2.4 Cytoplasmamembran und Thylakoidmembran

Der Aufbau einer Cytoplasmamembran ist in einzelligen Cyanobakterien und filamentöse Formen unterschiedlich so, dass die Cytoplasmamembran in einzelligen Formen, aus ein Paar konzentrischen Membranenschichten zu der zentralen Region bestehen im Gegenteil sind sie in den filamentösen Formen komplizierter aufgebaut und werden als Thylakoid bezeichnet. Die Cytoplasmamembran trägt die Komponenten der Respiration und die Thylakoidmembran trägt die Bestandteile für Respiration aber auch für Photosynthese. Bei Cyanobakterien findet die Photosynthese in deren Thylakoidmembranen statt (ähnlich wie in den Thylakoiden der Chloroplasten der eukaryotischen Algen). Siehe **Abb. 2.5**. [17].

Am *low potential end* der Atmungskette von Cyanobakterien funktionieren bei der aeroben Respiration die Hydrogenasen, Chinon Oxidoreduktasen und NAD(P)H-Dehydrogenasen [30,

31, 32]. Bis jetzt sind zwei Typen von cyanobakteriellen Hydrogenasen bekannt [33]. respiratorische Hydrogenase liegt in CM [34] und die andere photosynthetische Hydrogenase befindet sich in ICM [35].

2.2.5 Phycobilisomen

Auf den Thylakoidmembranen sind die *Phycobilisomen* aufgelagert. In *Phycobilisomen* kommen die wasserlöslichen akzessorischen Pigmentproteine der Photosynthese vor, den blauen Biliproteinen *c-Phycocyanin* (blau), *c-Allophycocyanin*, und den roten *Phycoerythrin*, und in einigen Fällen *Phycoerythrocyanin*. Siehe Abb. 2.6 (VAN DEN HOEK *et al.* 1993). Bei Cyanobakterien können die Verhältnisse der einzelnen Pigmente variieren und aus diesem Grund erscheinen sie je nachdem welches Pigment mehr vorhanden ist, mehr rötlicher oder bläulicher. Die Name Cyanobakterien „Blualgen“ ist auch durch Dominanz Phycocyanin geprägt. Die *Phycobiline* ermöglichen die Nutzung eines größeren Bereichs des Lichtspektrums, so dass die Cyanobakterien auf diese Weise ausgesprochene Schwachlichtbereiche erfolgreich besiedeln können, wie z. B. die Unterseite von Flussgeröll oder tiefe Schichten in Seen. In Abb. 2.4; a sind die grafische Darstellung des Absorptionsspektrums von akzessorischen Pigmenten zu sehen [11].

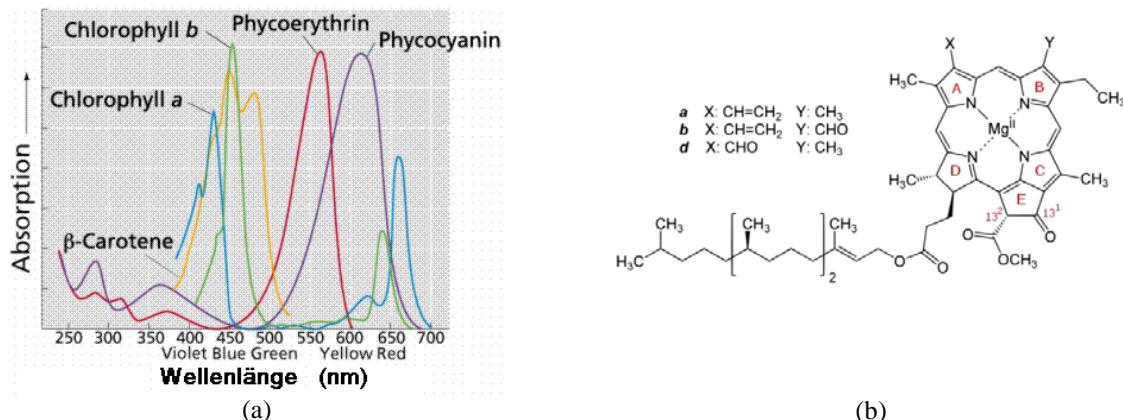


Abb. 2.4 (a) Absorptionsspektrum von akzessorischen Pigmenten (b) Grundstruktur für die Chlorophylle a [11][3][29].

Bei den *Phycobilisomen* handelt es sich um die primären Lichtsammelkomplexe in Cyanobakterien, die Lichtenergie absorbieren und auf das *Chlorophyll a* übertragen. (Siehe Abb. 2.4; b) Die *Prochlorophyta* sind eine Gruppe von Cyanobakterien, die keine *Phycobilisomen* haben. *Chlorophyll a* liegt bei Cyanobakterien im Reaktionszentrum der Photosysteme. *Chlorophyll a* ist das einzige Chlorophyll, das Cyanobakterien produzieren können. *Chlorophyll a* besitzt drei verschiedenen Unterformen, deren Absorptionsmaxima unterschiedlich sind. P-Carotin ist in allen Cyanobakterienarten zu finden, aber verschiedene Xanthophyllen wie Zeaxanthin, Oscillaxanthin oder Myoxanthophyll kommen von Art zu Art unterschiedlich vor.

2.2.6 Einschlüsse

Im Cytoplasma von Cyanobakterien sind eine Reihe verschiedener Einschlüsse zu sehen. Diese Einschlüsse dienen oft als Nährstoffreserve in extremen Umweltbedingungen um zu überleben (Tandeau de Marsac, 1993).

Die Glycogengranula besitzen „Cyanophyceenstärke“ und diese bieten Kohlenstoff und Energiereserve. Diese Cyanophyceenstärke ist ein Glucan ähnlich wie tierisches Glykogen. Lipide werden auch nahe der äußeren Membran gespeichert und zwar in Lipidtröpfchen.

Vermutlich dienen sie für die Membransynthese. In Cyanophycingranula wird besonderes Polypeptid gespeichert. Dieses Polypeptid besteht nur aus zwei Aminosäuren und zwar Arginin und Asparaginsäure, welche ihre Funktion im Stickstoff-Umsatz erfüllen.

In Polyphosphatkörper oder Volutinkörper wird Volutin eingelagert und Phosphat kann hervorragend an das Volutin binden. Deswegen sind Volutinkörper ein guter Platz für Phosphatvorräte. Das Volutin scheint irgendwie mit Gärung zutun zu haben. Man nimmt an, dass Volutin das Gärenzym ist oder aber sehr wahrscheinlicher ein Enzym, dass bei Gärung eine wichtige Rolle spielt. In Carboxysomen sind die Enzyme der Photosynthese gespeichert [10,12, 13]. Siehe **Abb. 2.5**.

2.2.7 Carboxysomen

Die konservierte Energie wird den *Carboxysomen* der CO₂-Fixierung zugeführt. In den *Carboxysomen* sind große Mengen an Carboanhydrase und Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) gespeichert. Normalerweise erfolgt die CO₂-Fixierung in oxygenen photosynthetischen Organismen über den reduktiven *Pentosephosphat-Weg* (Calvin-Zyklus). Hierbei wird CO₂ an Ribulose-1,5-Bisphosphat gebunden und anschließend über diverse Zwischenstufen und mehrfachen Umlauf unter Energieverbrauch zur Synthese von Glucose verwendet. Siehe **Abb. 2.5** (TABITA 1994),[13].

2.2.8 DNA in Cyanobakterien

Die DNA in Cyanobakterien ist ringförmig, die zentral im Protoplasten vorliegt. Wie gesagt, die DNA ist nach der Innenseite der äußeren Membran von der Glycocalyx (Schleimhülle) eingelagert. Bei *Synechocystis* PCC 6803 liegt diese DNA in 6 – 8 chromosomalen Kopien vor (WILLIAMS 1988). Cyanobakterien sind gramnegativ und ein- bis vielzellig. Besonders gut wachsen die Cyanobakterien in einem ruhigen Wassersystem, vor allem in Binnenseen und im Brackwasser und ausserdem bei erhöhten Wassertemperaturen (im Sommer), sowie bei hohem Nährstoffgehalt (Stickstoff und Phosphor). Siehe **Abb. 2.5 und 2.7**.

2.2.9 Luftvakuolen

Einige Arten bilden Luftvakuolen, dass eine Auftriebfunktion hat. So kommen alle Zellen an die Wasseroberfläche und bilden dort dichte Beziege oder auch Wasserblüten genannt. Die in der Bibel erwähnte Rotfärbung des Nils kann vermutlich durch *Oscillatoria rubescens* hervorgerufen sein. Durch Bildung der Wasserblüte werden toxische Peptide ausgeschieden und somit wird das Wasser vergiftet was zur Steigerung der Sterberate von Tieren führt. Siehe **Abb. 2.7**.

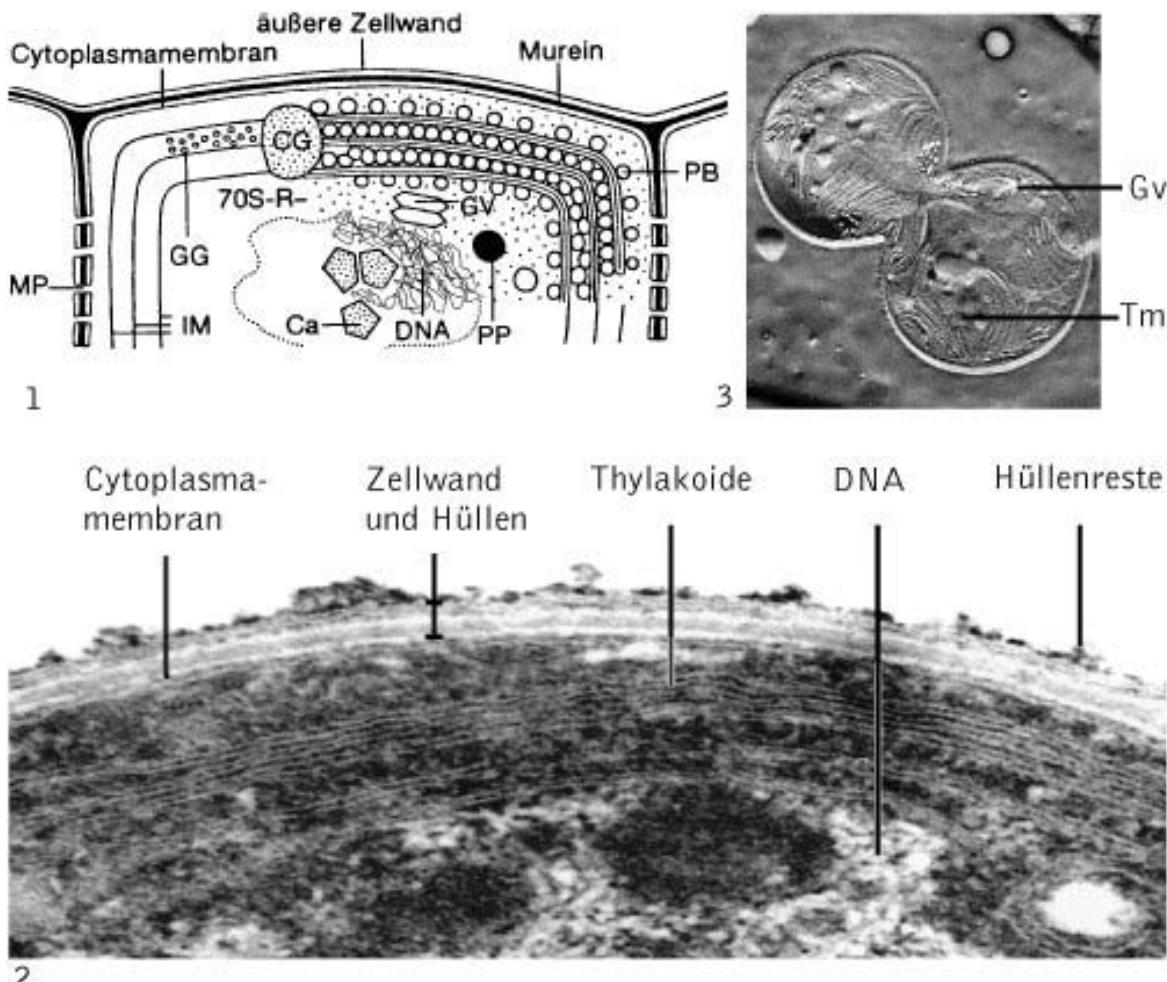


Abb.2.5 schematische Aufbau einer vegetativen Cyanobakterien-Zelle.

Abb.2.5 schematische Aufbau einer vegetativen Cyanobakterien-Zelle.
Ca Carboxisom, **CG** Cyanophycingranulum, **GG** Glykogengranulum, **GV** Gasvesikel, **IM** intercytoplasmatische Membranen (Thylakoide), **MP** Mikroplasmodesmen, **PB** Phycobilisomen, **PP** Polyphosphate, **70S-R** 70S-Ribosomen, **2&3** elektronenmikroskopische Aufnahmen von Cyanobakterien: **2** Ausschnitt eines Dünnschnitts von *Synechocystis*; **3** Aufnahme in Gefrierbruchtechnik (*Microcystis aeruginosa*), **Gv** Gasvesikel, **Tm** Thylakoidmembranen[13].

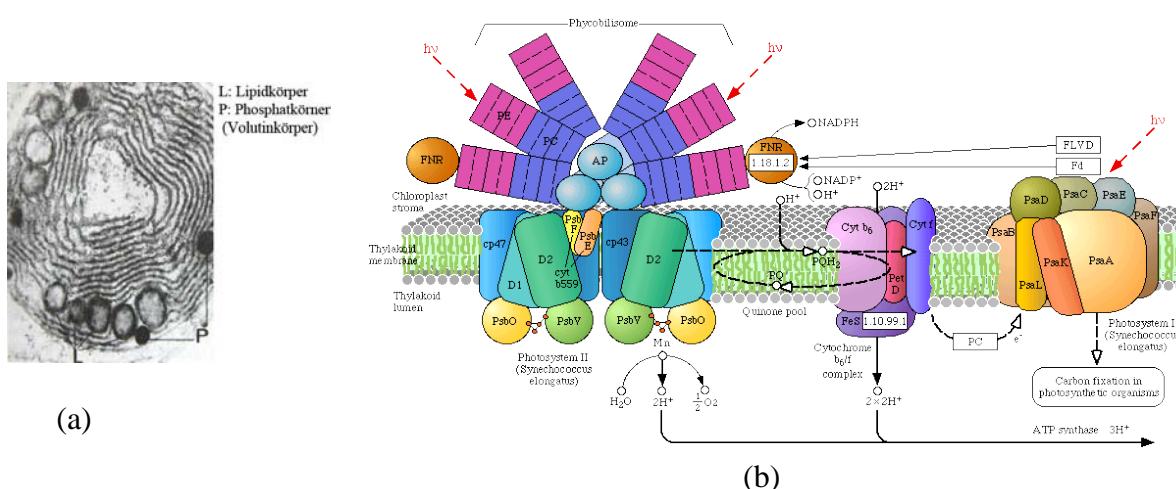


Abb. 2.6 a) Grafische Darstellung vom Lipidkörper und Volutinkörper [14,15]
 b) Aufbau eines Phycobilisoms [12,16].

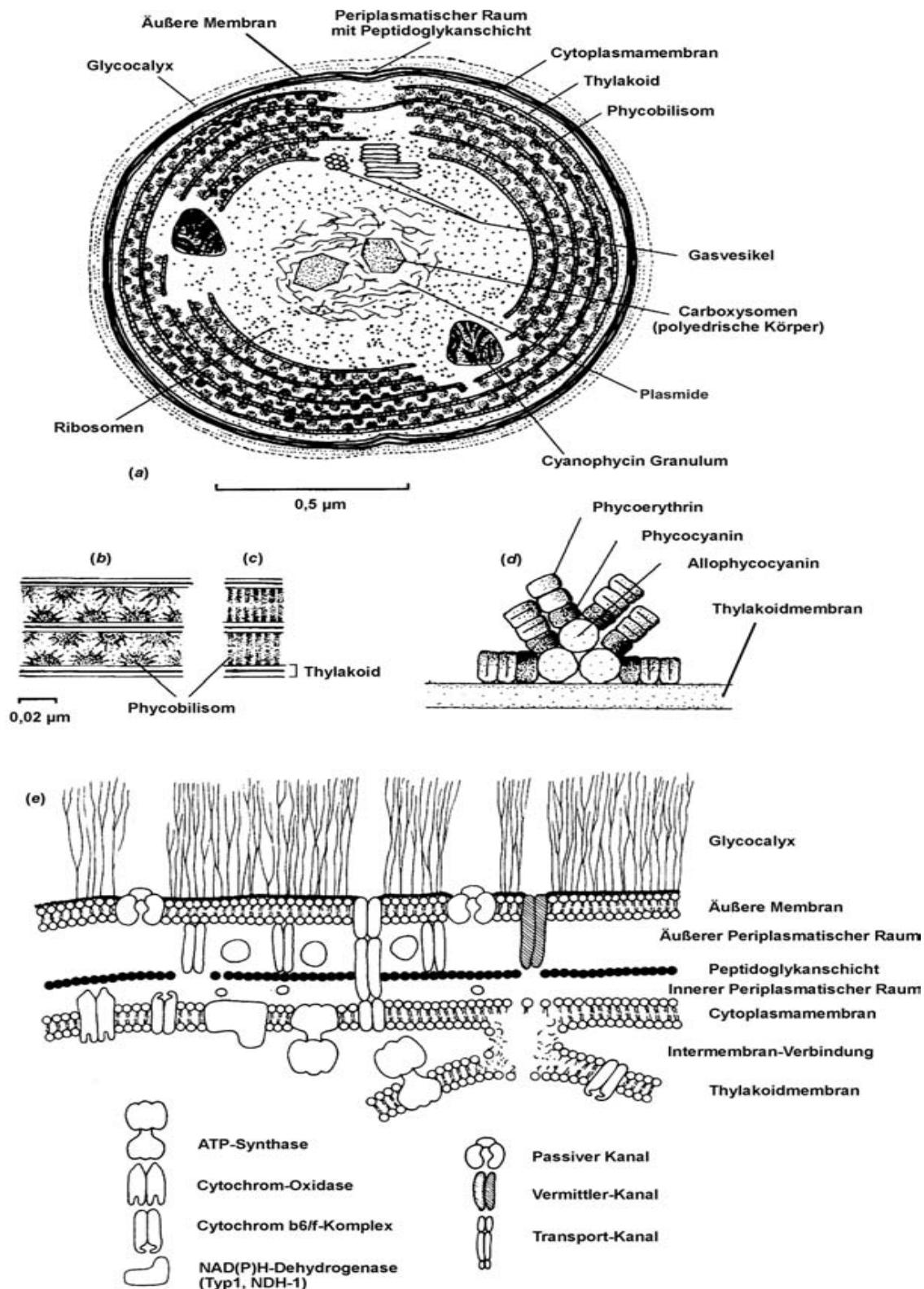


Abb. 2.7 Schematische Darstellung einer *Synechocystis*-Zelle, im Querschnitt [46].

(a) die TM. mit Reihen von Phycobilisomen im Quer- (b) und Längsschnitt

(c), Seitenansicht von Phycobilisomen

(d) und der Membranaufbau einer Cyanobakterienzelle

(e). (a)-(d) verändert nach VAN DEN HOEK *et al.* 1993,

(e) verändert nach GANTT 1994

2.2.10 Heterozysten

Die Cyanobakterien fixieren Stickstoff aus der Luft in Form von Nitrat, Nitrit, Ammonium, Aminosäuren, Harnstoff, Hydroxylamin, Kasein, und als elementaren Stickstoff.

Von Art zu Art werden unterschiedliche Stickstoffquellen verwendet aber alle Cyanobakterienarten können Nitrat als Stickstoffquelle verwenden. (Holm-Hansen, 1968).

In manchen filamentösen Cyanobakterien, finden wir spezialisierte Zellen, in denen mit Hilfe des Nitrogenase Enzyms, die enzymatische Fixierung des Luftstickstoffs stattfindet (biologische Stickstofffixierung). Wenn gebundener Stickstoff (Nitrat, Ammonium) in der Umgebung fehlt, werden die Heterozysten gebildet. Jede zehnte vegetative Zelle differenziert sich irreversibel zu Heterozysten. Unter dem Mikroskop werden sie dann sichtbar größer und haben eine dicke Zellwand, die hellgrün bis fast gelblich aufscheint. Das Nitrogenase Enzym ist äußerst sauerstoffempfindlich und wenn es mit Sauerstoff zu direktem Kontakt kommt, inaktiviert das Enzymkomplex und es werden sogar begleitende Proteine zerstört (Fay, 1983). Deswegen ist der Sauerstoff entwickelnde Teil der Photosynthese (Photosystem II) in Heterozysten nicht aktiv. Dagegen ist sehr wohl das Photosystem I neben der Atmung aktiv, und trägt dazu bei den sehr hohen Energiebedarf (ATP) der Nitrogenase zu gewährleisten. Das Nitrogenase Enzym wird auch von außen eindringendem Sauerstoff geschützt und zwar mit Hilfe der dicken und aufgelagerten Zellwände, die aus Glycolipid- und Polysaccharidschichten bestehen. Der Sauerstoffgehalt der Umgebung ist notwendig bei der Synthese dieser Glycolipid- und Polysaccharidschicht und die Schichtdicke passt sich zum Sauerstoffgehalt aus der Umgebung an. Die vegetativen Zellen benutzen die Photosynthese um Zucker zu erzeugen (wahrscheinlich vor allem Saccharose). Der Zucker wird in die Heterocysten transportiert und dort oxidiert. Der oxidierte Zucker liefert genügend Elektronen zur Reduktion des Luftstickstoffs zu Ammonium und als Endprodukt bildet sich Glutamin.

Das heißt, dass Luftstickstoff im Glutamin gebunden wird, was dann von Heterozysten in die benachbarten Zellen transportiert wird und versorgt so den gesamten Zellfaden mit gebundenem Stickstoff. Also in Heterocysten wird aus den Grundstoffen wie H_2O , CO_2 und N_2 und unter maximaler Ausnutzung von Lichtenergie, Biomasse erzeugt. Siehe Abb. 2.8

Manche Cyanobakterien besitzen Strategien um Stickstoff auch ohne Heterocysten zu fixieren, aber über Art und Weise wie sie den Nitrogenase-Komplex vor Sauerstoff schützen, ist wenig bekannt (Tandeau de Marsac, 1994) [10,18].

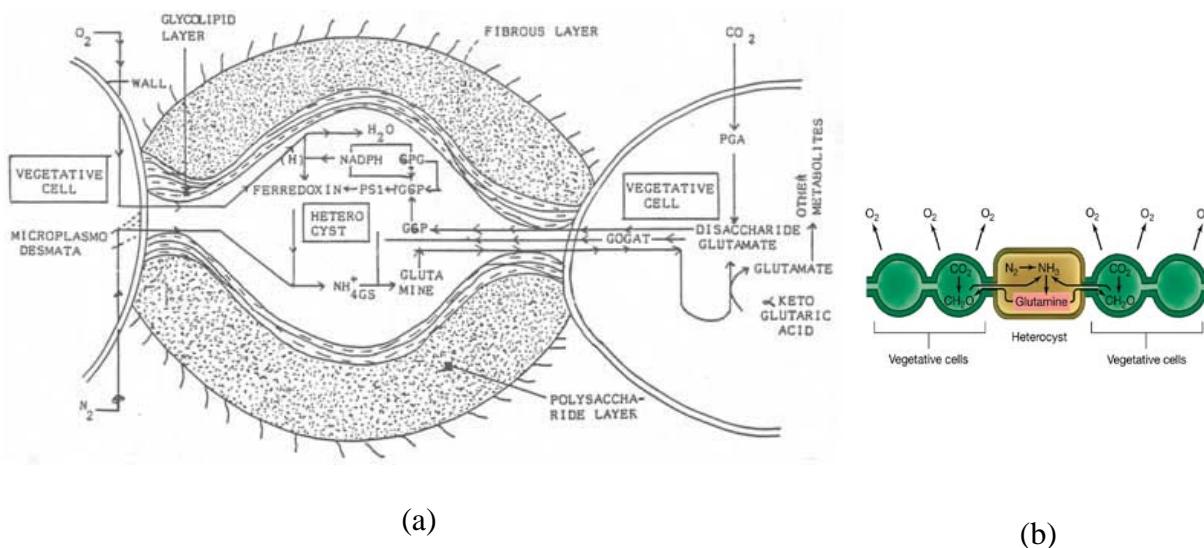


Abb. 2.8 (a),(b) Schematische Darstellung von Heterozysten und Metabolismus und Struktur [18].

2.2.II Baeozyten

Das sind die Reproduktionszellen, die sich durch multiple Teilungen vermehren, was nur bei der zweiten Taxonomischen Gruppe der Cyanobakterien sog. *Pleurocapsales* stattfindet. (= Nanocyten, = "Endosporen"). Pro Mutterzelle sind 4 bis 1000 Baeozyten zusehen. In einigen Gattungen ist auch zusätzlich binäre Teilung möglich.

2.2.I2 Akineten

In ruhenden Dauerstadien und ungünstigen Umweltbedingungen bilden einige Arten von Cyanobakterien die Überdauerungszellen, insbesondere Cyanobakterien wie *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *fischerella* und *Nostoc*. Diese Zellen sind von Art zu Art unterschiedlich und im Vergleich zu anderen vegetativen Zellen größer, robuster, dickwandiger und reservestoffreicher und sie entstehen aus einer vegetativen Zelle. Diese Zellen sollen vor Austrocknung, niedrigen Temperaturen, oder Nährstoffmangelphasen schützen um später wieder vegetative Formen bilden zu können. Siehe Abb. 2.9



Abb. 2.9 In diese Aufnahme (Hellfeld) ist für Pithophora typische Bildung von so genannten Akineten zusehen. Eine stark verdickte Zellwand dient als Schützefunktion vor Austrocknung und ungünstigen Umweltbedingungen. In Akineten werden Reservestoffe gespeichert [19].

2.2.I3 Hormogonien

Die fädige, kleine, bewegliche Filamente die von einigen Cyanobakterien-Arten wie z.B *Nostoc*, *Oscillatoriales* gebildet werden sorgen für vegetativen Vermehrung. Diese wandern ab, setzen sich irgendwo fest und wachsen zu neuen "Mutterfilamenten" heran. Siehe Abb. 2.10 Also, die Cyanobakterien, die echte Verzweigungen haben, bilden auch Hormogonien.

Desikachary bezeichnet diese Strukturen als „kurze, bewegliche Ketten gleichgeformter Einzelzellen“ (Desikachary, 1959). Aber nicht alle Hormogenen lassen sich in diesem Schema definieren. Die sind viel mehr, und zwar modifizierte Filamente, die als Reproduktion und Verbreitung dienen. Die Hormogonien sind an vielen physiologischen Prozessen beteiligt (Tandeau de Marsac, 1994). In Formen, die Heterocysten besitzen, sind diese Hormogonien ganz einfach aufgebaut und sie besitzen große Vorräte an Stickstoff, Phosphor und anderen Nährstoffen (Rippka, 1979) [20].



Abb. 2.10 *Stichosiphon sansibaricus* Aquarium, Epiphytische Art (Dr. R. Wagner Februar 2008)[20].

2.3 Fortbewegung

Viele fädige Cyanobakterien können sich fortbewegen durch Kontakt mit den Substraten, auf dem sie sich bewegen. So suchen die Organismen Zonen optimaler Bestrahlungsstärke in ihrer Umgebung auf. Es ist noch nicht klar wie diese Fortbewegung zu Stande kommt aber die Wissenschaftler diskutieren zurzeit zwei Hypothesen:

Es wird angenommen, dass die Cyanobakterien durch den Ausstoß von Exopolysacchariden aus bestimmten Poren gewisse Scherkräfte bewirken (Bold and Wynne, 1985), und die zweite Hypothese besagt, dass Cyanobakterien sich durch Kontraktion bestimmter Filamente bewegen können (Halfen and Castenholz, 1971).

2.4 Lebensraum

Lebensraum der Cyanobakterien sind bevorzugt das Süßwasser und feuchte Böden, ansonsten auch Meeresswasser, oder Stellen die stark alkalischen pH-Werte haben, Baumrinden, Gesteinsoberflächen, heiße und kalte Wüsten, wo sie sich Krusten auf der Oberfläche bilden, wo sie jedoch nur in der feuchten Jahreszeit wachsen. Manche können sogar in heißen Quellen über 70°C überleben. Die Cyanobakterien können hohe Temperaturen, hohe UV-Strahlen und freie Sulfide tolerieren. Aufgrund ihrer Dominanz in heißen und kalten Wüsten und ihrer hoch entwickelten Schutzmechanismen, das ein Maß für die Unverwüstlichkeit und die Anpassungsfähigkeit der Cyanobakterien ist, können die Cyanobakterien sich überall auf dem Planeten der Erde verbreiten. Die Cyanobakterien besiedeln alle belichteten Ökosysteme wo sie auch nur geringste Lichtintensität ausnützen können. Ausschliesslich bei sehr saueren pH-Werten, wurden bis jetzt noch keine Arten entdeckt (Flaibani et al., 1989). Einige Cyanobakterien leben in Symbiose mit Lebermoosen und Farnen, z.B. das Stickstoff fixierende Cyanobakterium *Anabaena azollae* als Endophyt in dem Algenfarn *Azolla* [10].

2.5 Schutzfunktion

Durch Akkumulation tolerieren die Cyanobakterien in Wüstenlebensräumen Austrocknung und durch manche Substanzen neutralisieren sie osmotischen Stress, der oft durch hohe Salzkonzentration in solchen Lebensräumen verursacht wird. Eine dieser Substanzen ist Trehalose (ein Disaccharid), dass Cyanobakterien zur Regulation ihrer Turgor verwenden um ihrer Membran während einer Austrocknungsphase zu schützen. Die Trehalose und weitere Polyhydroxy-Substanzen können sich wie eine Hydrathülle um die Proteine legen und diese unter extremem Wasserdefizit vor der Denaturierung bewahren. Solche Funktionen werden auch als „Wasser-Ersatz-Mechanismus“ bezeichnet (Potts, 1994).

Weitere Schutzfunktionen bilden Exopolysaccharide in Cyanobakterien. Sie können die Zellen stabilisieren in dem sie sich an die letzten Wasservorräte binden und verhindern damit, dass diese in der Zellmembran binden (Hill, 1997) und innerhalb einiger Minuten rehydrieren die Membranen (Helm, 2000). Oder sie hemmen den Schaden, der durch oxidativen Stress

vorkommt (Barbosa and Alterthum, 1992). Die Exopolysaccharide leisten nicht nur eine Hilfe für Cyanobakterien während Austrocknungsphasen, sondern sie verhindern auch virale oder bakterielle Angriffe (Tease and Walker, 1987), in dem sie an Schwermetalle binden und Antibiotika produzieren. Sie bilden einen Art Barriere gegen toxische Substanzen, die von Bakterien oder Viren produziert worden sind. (Costerton, 1987). Die Cyanobakterien können auch Nähr- und Mineralstoffe akkumulieren und können so diese ungünstigen Umweltbedingungen überleben. Durch Synthese von „Sonnenschutz-Chemikalien“ schützen sie sich vor exzessiver Sonneneinstrahlung bzw. können sie sich auch auf Schattensituationen einstellen. Sie adaptieren sich ausgesprochen gut für die Besiedelung von verschiedenen extremen Bedingungen mit starken Sonneneinstrahlungen durch Bildung intensiverer Pigmente, besonders gut kommen Carotinoiden in Frage (Potts, 1987; Friedmann 1971). Durch Bildung spezieller UV-absorbierender Pigmente wie das Scytonemin und Mycosporin ähnliche Aminosäuren, die sich wiederum in der Exopolysaccharidschicht akkumulieren, bekämpfen Cyanobakterien besonders aggressives UVB-Licht. Diese Strahlung greift sowohl das Photosynthese-System, als auch essentielle Makromoleküle wie die DNA (Garcia-Pichel and Castenholz, 1991; Ehling-Schultz, 1997; Scherer, 1988) an. Die Cyanobakterien zeigen auf Grund ihrer langen evolutionären Geschichte eine hohe Toleranz gegenüber sauerstoffarmen Bedingungen und manche kommen sogar mit höherer Sulphid-Konzentrationen zurecht und da verwenden sie an statt Wasser, H₂S als Wasserstoffdonator zur Photosynthese(Cohen et al., 1975). Extreme Temperaturen (kalte oder heiße Temperaturen), werden auch durch Cyanobakterien toleriert. Heiße Temperaturen bis zu 73°C werden besonders durch *Synechococcus*-Art, die in thermalen Quellen im westlichen Nord-Amerika lebt toleriert (Castenholz 1978). Kalten Temperaturen werden auch in polaren Lebensräumen wie Eisschollen, Gletschern oder eisbedeckten Seen durch Cyanobakterien toleriert, wobei hier, in den Tundren oder in Polarregionen, die Kohlen- und Stickstoffhaushalte des Bodens eine große Rolle spielt und wichtig ist zur Adaption. (Vincent, 2000)[10].

2.6 Hypothese

Die Hypothese der **Panspermie** sagt aus, dass durch einen Meteoriten die Vorfahren der Cyanobakterien auf unsere Mutter Erde gelangt sind, welches durch neueste Studien heute nachweisbar ist. Es wurde auch bewiesen, dass Mikroorganismen in einem Meteoriten überleben können, d.h. Bakterien, die auf den Mond gelandet sind, sind wieder nach der Rückkehr auf der Erde lebensfähig. (amerikanischen Mondmission Surveyor 3). Durch das Biopan-Experiment wurde gezeigt, dass Mikroorganismen im Weltall überleben können. (deutschen Luft- und Raumfahrtzentrums). Weiters beweist die NASA durch einen Marsorbiter, dass der Mars vor 4000 Millionen Jahren eine Umweltbedingungen wie kohlendioxidreiche Atmosphäre und Wasser in Form von Seen und Flüssen gehabt hat, eine Grundvoraussetzung in der das Leben in Form von Cyanobakterien entstanden sein konnte. Aufgrund aller dieser Forschungsergebnisse und basierend auf der hohen Anpassungsfähigkeit und extremen Robustheit der Cyanobakterien, konnte man annehmen, dass erste Cyanobakterien eventuell ihren Ursprung auf dem Mars oder einem anderen Planeten hatten (Vincent, 2000). insbesondere Chroococcidiopsis-Arten sind für diese Untersuchungen gut geeignet. (Friemann and Ocampo-Friedmann, 1994). Die antarktischen Wüsten auf der Erde, zeigen ähnliche Bedingungen wie auf dem Mars, welche durch Cyanobakterien ganz leicht toleriert werden. (Vincent, 2000). Siehe Abb. 2.11 [10].

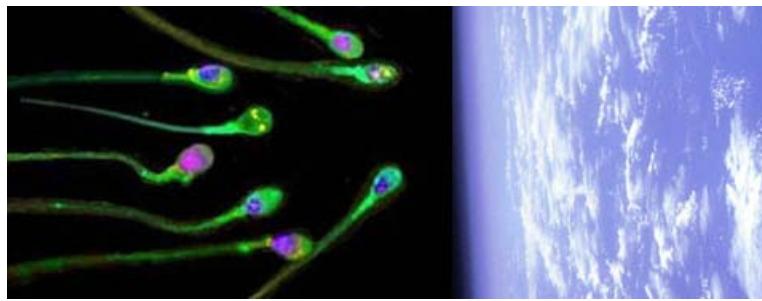


Abb. 2.11 Panspermie; Einfache Lebensformen haben sich über große Distanzen durch das Universum bewegt und so die Anfänge des Lebens auf die Erde gebracht [22].

2.7 Bedeutung

Die Wasserblüte, besonders diejenige, die durch *Spirulina* verursacht sind, gelten in Nordafrika als sehr wichtiger Eiweißlieferant für Menschen. Toxische Cyanobakterielle Wasserblüten kommen auch in Seen, Flüsse und Küstengewässer vor, welche durch Produktion von Toxinen eine schlechte Wasserqualität verursachen und ein überdüngtes stickstoffreiches Gewässer andeuten [10, 23]. Einige Cyanobakterien produzieren antivirale und antibakterielle Substanzen, somit besitzen sie in der Biotechnologie eine wichtige Rolle [24]. Vertreter der Gattungen *Nostoc* und *Anabaena*, die in asiatischen Reisfeldern vorkommen können den Luftstickstoff binden und so eine zusätzlich Düngung ersparen. Man verwendet Cyanobakterien in vielen wissenschaftlichen Forschungen z.B. bei der Untersuchung pflanzlicher Chloroplasten (homolog zu Cyanobakterien Chloroplasten) und besonders bei der Aufklärung der Struktur der Thylakoide in der Molekularbiologie. In der Photosynthese-Forschung werden oft *Anacystis nidulans* oder *Synechocystis* verwendet. Die Cyanobakterien sind Algen-Gruppen, mit dem größten Potential für die Pharmazie, besonders in der Verwendung als Allheilmittel. Die Afa Alge (Cyanobakterium Klamath) ist wirksam gegen Depressionen und ist reich an essentiellen Fettsäuren. Dr. Christian Drapeau (ein ausgebildeter Neurophysiologe) konnte nachweisen, dass die Algen abgesehen von Produktion der essentiellen Aminosäuren, noch eine neuroaktive Aminosäure wie PEA "Molekül der Freude" oder Phenylethylamin produzieren. Im Körper wird aus Phenylalanin, Tyrosin und Eiweiß, der PEA hergestellt, wenn die Algen als Nahrung aufgenommen werden. PEA wirkt als stimmungsaufhellende Aminosäure, dass in keinem anderen Lebensmittel zu finden ist. Viele Cyanobakterien wie *Microcystis* können zu Fisch- und Viehvergiftungen führen, weil sie hochwirksame Neurotoxine und Lebertoxine produzieren. Im Zuge der Untersuchungen dieser Toxine wurde eine Reihe von chemischen und biologischen Eigenschaften der Sekundärmetaboliten herausgefunden, mit deren Hilfe neue pharmazeutische Wirkstoffe wie Herbizide und Pestizide entwickelt wurden. (Shin, 1996). Somit sind die Cyanobakterien wichtige Quelle für die Produktion von immunmodulatorischen und antibakteriellen Stoffen, antiviralen, fungiziden, algiziden, zytotoxischen (Behrens, 1992) [10].

2.8 Systematik

Bis heute wurden 7500 Arten von Cyanobakterien beschrieben, aber tatsächlich sind nur 200 echte frei lebende, nicht symbiotische Arten bekannt. Die erste Einteilung der Cyanobakterien hat im Jahre 1753 stattgefunden. Aufgrund der Fähigkeit Sauerstoff zu produzieren und Photosynthese zu betreiben sind die Cyanobakterien zuerst zu den Algen gerechnet worden. Dabei müssen die Cyanobakterien aufgrund ihrer Zellorganisation zu den prokaryontischen Lebensformen zugeteilt werden. Die Cyanobakterien sind nach der neuen Systematik einer

der großen Äste der Bakterien. Hier existieren mehrere Systeme. In Taxonomie von Cyanobakterien nach NCBI (US-amerikanischen National Center for Biotechnology Information) wird nur zwei von insgesamt 7 *Ordnungen* in *Familien* eingeteilt. In der Taxonomie von Cyanobakterien nach *Cavalier-Smith* wird in 6 Ordnungen aufgeteilt: die *Gloeobacterales* wird dann (mit der einzigen Gattung *Gloeobacter*) in eine eigene Unterabteilung *Gloeobacteria* gestellt und die *Phycobacteria*, in die Klassen *Chroobacteria* aufgeteilt. Die klassische Taxonomie der Cyanobakterien richtet sich nach morphologischen Gesichtspunkten und wird in 2000 verschiedenen Arten und 150 Gattungen (Geitler, 1932) aufgeteilt. Hier wird die Einteilung häufig aufgrund kleiner Unterschiede vorgenommen, wie leichte Unterschiede in Zellgröße und Form oder An- und Abwesenheit einer Schleimhülle [3].

Hier sehen wir zwei wichtige taxonomische Einteilungen:

- a) Taxonomische Einleitung nach NCBI
- b) Taxonomische Einleitung nach Castenholz und Waterbury

2.8.I Taxonomische Einleitung nach NCBI

2.8.1.1 Ordnung Chroococcales

27 Gattungen, z. B. *Chroococcus* und *Gloeocapsa*

Die besitzen wenige morphologische Merkmale und sind einzellige Kokken und Stäbchen. Mann kann im Wasser zum Teil die Bildung von Zellaggregaten in verschiedene Größen sehen. Die Zellen werden durch Schleim zusammen gehalten. Sie besitzen in verschiedenen Ebenen symmetrische oder asymmetrische Querteilungen oder sie vermehren sich durch Sprossung.

2.8.1.2 Ordnung Gloeobacterales

Klasse *Gloeobacteria*: 1 Gattung, *Gloeobacter*

Die sind einzellige Formen, die sich durch binäre Teilung vermehren.

2.8.1.3 Ordnung Nostocales

Familie Microchaetaceae: 6 Gattungen

Familie Nostocaceae: 13 Gattungen, z. B. *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nostoc*

Familie Rivulariaceae: 3 Gattungen

Familie Scytonemataceae: 3 Gattungen

Ca. 50 Arten sind bekannt. Diese filamentöse Cyanobakterien reproduzieren sich in einer einzigen Ebene durch binäre Teilung. Die Zellen können sich bei Abwesenheit von gebundenem Stickstoff zu Heterozysten differenzieren, die dann wiederum Stickstoff aus der Luft fixieren können. Akineten Bildung ist bei dieser Ordnung auch möglich. Die können sich durch gebrochene Trichome, oder Keimung der Akineten oder aber durch Bildung von Hormogonien vermehren. Vor allem leben sie im Süßwasser und feuchter Erde. Teilweise leben sie symbiotisch z.B. in Cycas-Wurzel oder Pilzen.

2.8.1.4 Ordnung Oscillatoriaceae

27 Gattungen, z. B. *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Spirulina*

Diese sind Filamentös und die Zellen sind scheibenförmig. Ihre Trichome teilen sich binär und zwar in einer einzigen Ebene oder sie vermehren sich durch Hormigonien, besitzen keine Heterozysten, Akineten, oder Gallertscheide. Die Fortbewegung erfolgt durch pendelartigen Schwingbewegungen oder durch gleiten. Die Verzweigungen sind unecht.

2.8.1.5 Ordnung Pleurocapsales

7 Gattungen, z. B. *Chroococcidiopsis*

Sie besitzen multiple Zellteilung (multiple Spaltung), die kleine Tochterzelle sog. Baeocyten genannt werden. Je nachdem welche Wachstumsbedingungen herrschen, können diese Gruppe von Cyanobakterien bis zu mehrere hundert Baeocyten bei jeder Zellteilung produzieren. Die Pleurocapsales kommen als Aggregat oder als einzeln vor.

2.8.1.6 Ordnung Prochlorales (prochlorophytes)

Familie Prochloraceae: 1 Gattung, *Prochloron*

Familie Prochlorococcaceae: 1 Gattung, *Prochlorococcus*

Familie Prochlorotrichaceae: 1 Gattung, *Prochlorothrix*

2.8.1.7 Ordnung Stigonematales

12 Gattungen, z. B. *Stigonema*

Die Gattung *Acaryochloris* wird vom NCBI in keine Ordnung eingereiht. Heterocysten, Akineten als auch Hormogonien besitzen eine komplexe Morphologie. Die Teilung ist multiseriell und man sieht hier echte Verzweigungen [3].

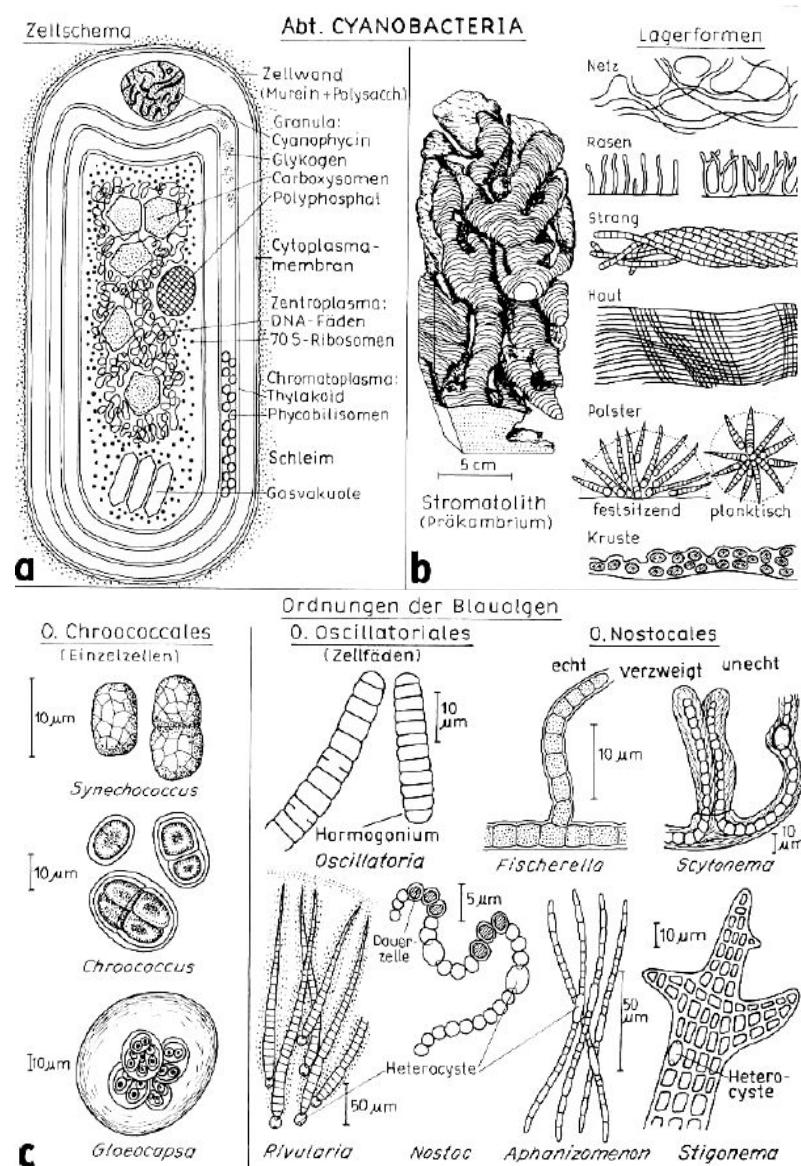


Abb.2.10 Cyanobakterielle Zellschema bei der unterschiedliche Ordnungen [25].

2.8.2 Taxonomiesche Einleitung nach Castenholz und Waterbury.

Die Cyanobakterien gliedert sich in zwei Unterklassen mit sechs Ordnungen (Strassburger, 2002: Schematische Darstellung **Abb. 2.11**). Sie werden hier in die einzelligen Coccoidalen Formen und die filamentösen Formen eingeteilt. Coccoidale Formen sind, oval, kugelig, zylindrische einfachen Einzelzellen, die entweder als freie Zellen oder als Zellaggregate „Kolonien“ vorkommen. Die Zellaggregate kommen definiert z.B. plattenförmig oder kubisch aber auch undefiniert vor. Coccoidale Zellen weisen einen Durchmesser von 0,4 μm bis über 40 μm auf. Auf diesem Grund sind Cyanobakterien in Bezuglich ihren Größe nicht Vergleichbar mit anderen Prokaryoten, weil bei anderen Prokaryoten ein Durchmesser von 0,4 μm schon enorm groß ist. Die Wissenschaften bezeichnen die Cyanobakterien mit einem Durchmesser von 0,4 μm als Picocyanobakterien.

Filamentösen Zellen weisen einen Durchmesser bis zu 100 μm . Die sind kleine Scheiben, die sich zu einem langen Faden hinter einander einreihen. Das Volumen der einzelnen Zelle ist aber trotz des großen Durchmessers in einer Ebene kleiner als das der einzelligen Arten (Demoulin and Janssen, 1981). Filamente verzweigen sich entweder echt oder unecht. Unechte Verzweigungen passiert, wenn ein Filament mit einer Schleimhülle, sich teilt und das neue Filamentstück, unabhängig vom Alten wächst. Echte Verzweigungen kommen zu Stande, wenn ein Filament sich in mehr als einer Ebene teilt, dabei besteht immer einen direkter Kontakt zu dem Ausgangsfilament [10, 26].



Abb. 2.11 Schematische Darstellung Systematische Einteilung der Cyanobakterien nach Strassburger 2002 [10]. [Kathrin Venzke, 2005].

2.9 Stoffwechselwege und Metabolismus

2.9.1 Fermentation

Wenn Sauerstoff und die Elektronenakzeptoren der anaeroben Atmung (Nitrat, Sulfat), fehlen, können erstaunlicher Weise die Cyanobakterien auch aus organischen Substanzen durch Gärung Energie gewinnen. Siehe **Table 2.12**

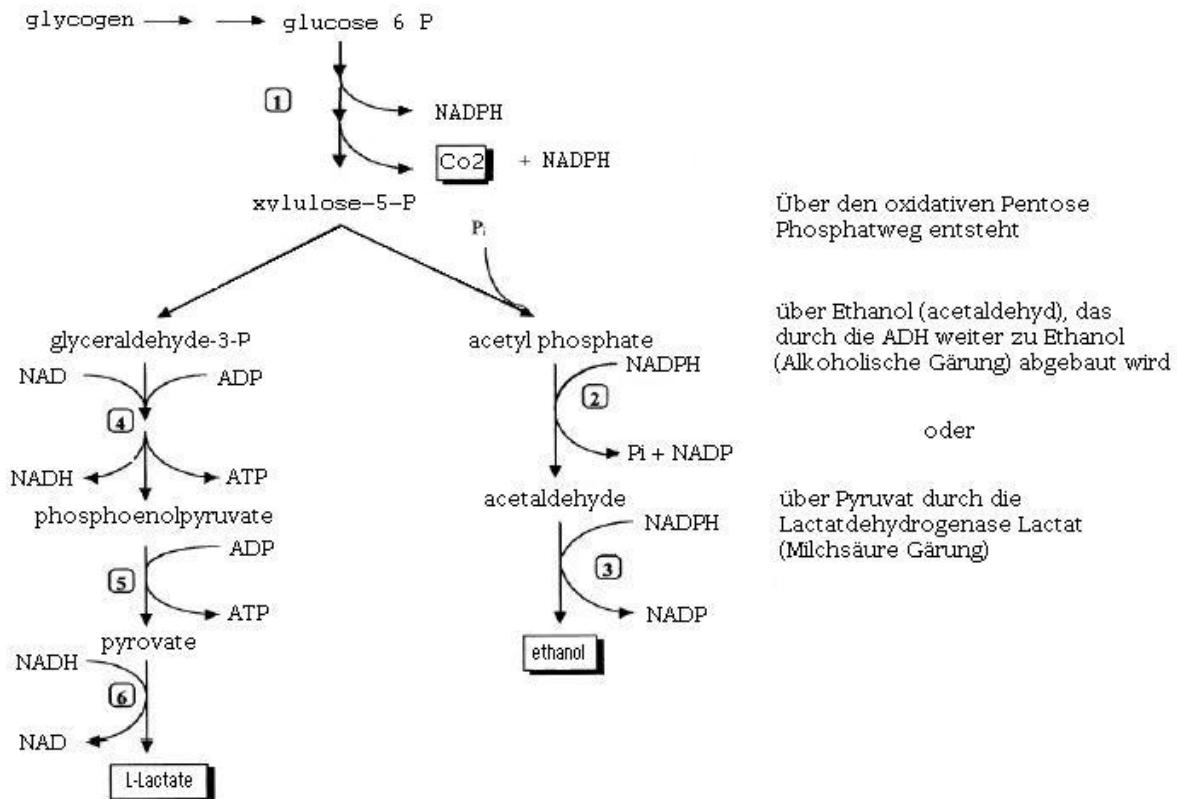
Organism	Strain, origin	Fermentation pathway	Products
Anabaena azollae AaL, AaN, AaS,	Symbiont from Azolla caroliniana	homoacetate	acetate (lactate, CO_2 , H_2)
Anabaena siamensis As1	Paddy field	homoacetate	acetate (CO_2 , H_2)
Cyanothece	PCC 7822(Inst. Pasteur)	Mixed acid	H_2 , ethanol, lactate, formate, acetate
Microcoleus aeruginosa	PCC 7806(Inst. Pasteur)	Mixed acid	H_2 , ethanol, lactate, formate, acetate
Microcoleus chthonoplastes	Microbial mat	Mixed acid	H_2 , ethanol, lactate, formate, acetate
Nostoc sp. Cc	Symbiont from Cycas circinalis	homoacetate	acetate (lactate, CO_2 , H_2)
Nostoc sp. A12	Symbiont from Anthoceros laevis	homoacetate	acetate (lactate, CO_2 , H_2)
Nostoc sp. Ef1	Symbiont from Encephalartos ferox	homoacetate	acetate (lactate, CO_2 , H_2)
Nostoc sp. MAC	Symbiont from Macrozamia lucida	homoacetate	acetate (lactate, CO_2 , H_2)
Nostoc sp. Mm1	Symbiont from Macrozamia moorei	homoacetate	acetate (lactate, CO_2 , H_2)
Nostoc sp. M1	Symbiont from Macrozamia sp.	homoacetate	acetate (lactate, CO_2 , H_2)
Nostoc sp. Gm	Symbiont from Gunnera manicata	homoacetate	acetate (lactate)
Nostoc sp. T1	Paddy field	homoacetate	acetate (lactate, CO_2 , H_2)
Oscillatoria limnetica	Hypolimnion Solar Lake	homoacetate	lactate
Oscillatoria limosa	Microbial mat	Heterolactate homoacetate	lactate, ethanol, acetate
Oscillatoria sp.	Microbial mat	Not known	lactate, ethanol, acetate, formate
Oscillatoria terebriformis	Hot spring microbial mat	Homoacetate?	?
Spirulina platensis	Not known	Mixed acid	H_2 , ethanol, acetate, formate, lactate
Spirulina minosa	Not known	Not known	lactate, acetate

Table 2.12 Cyanobakterien capable of fermentation [27, 28, 29], Stal&Moezelaar 1997, FEMS Microbiology Reviews

Als Beispiel sehen wir hier den Fermentationsablauf der hererolactic säure in *Oscillatoria limosa*. Hier wird L-lactate und Ethanol produziert [27, 28, 29]. Die wichtigsten Enzyme, die sich hier beteiligen, sind:

- 1- Die Enzyme die bei der oxidativen Pentose Phosphatweg immer vorhanden sind.
- 2- Acetaldehyde dehydrogenase
- 3- Alkohol dehydrogenase
- 4- Die Enzyme des Emben-Meyerhoffweges
- 5- Pyruvate kinase
- 6- L-lactate dehydrogenase

Abbau von Glycogen durch Gärung



[27, 28, 29].

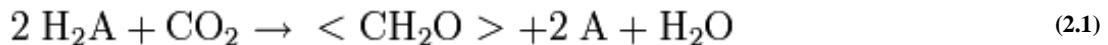
2.9.2 Photosynthese

Die Photosynthese ist der bedeutendste und älteste biogeochimischer Prozess der Erde. Primär wird Lichtenergie zu chemischer Energie umgesetzt und zwar durch einen reduktiven Prozess, mit Hilfe der Farbstoffe, die Licht absorbieren, um Wasser zu spalten und die Elektronen zu gewinnen um sie dann auf NADP^+ zu übertragen. Reduzierte NADPH wird von den Zellen als Energielieferant für verschiedene Biosynthesewege verwendet. In der Cyanobakteriellen Atmungskette werden am häufigsten NADH/NADPH Moleküle dem Wasserstoff liefern wobei bei Säuger-Mitochondrien spielt nur Pyridinnukleotid NADH eine Rolle [36].

Durch Wasserspaltung und Elektronenfluss zwischen den Redoxkomplexen kommt es andererseits zur Produktion eines H^+ - Gradienten, der die ATP- Synthese antreibt. ATP Molekülen können sowohl durch linearen Elektronentransport als auch über den zyklischen Elektronentransport generiert werden (darüber können sie in Kapitel 3 mehr lesen). Lichtenergie wird zur Synthese organischer Verbindungen von der sehr energiearmen anorganischen Kohlenstoff-Verbindung (CO_2) verwendet („Dunkelreaktion“). Ausgangsstoffe (CO_2) müssen zuerst reduziert werden. Gute Reduktionsmittel (Reduktans) sind Wasser (H_2O), Wasserstoff (H_2), Schwefelwasserstoff (H_2S), organische Stoffe wie Säuren und Alkohole, z. B. Acetat bzw. Ethanol. Cyanobakterien verwenden Wasser (H_2O) als Reduktans und dabei wird O_2 freigesetzt (oxygene Photosynthese) unter bestimmten Bedingungen verwenden aber einige Cyanobakterien auch H_2S als Reduktans, je nachdem welche Enzyme ein Organismus zur Verfügung hat. Diese Form der Photosynthese wird als oxygene Photosynthese bezeichnet weil Sauerstoff dabei produziert wird. Durch Photosynthese werden Elektronen oxidiert. Die Elektronen werden dann, durch die Farbstoffe absorbierte

Lichtenergie, auf hohem Energieniveau (niedrigem Redoxpotential) angeregt. So wird aus CO_2 oder aus einfachen organischen Verbindungen wie Acetat, energiereiche Verbindungen wie ATP und NADPH synthetisiert.

Die Gesamtreaktion der Photosynthese ist dann diese vereinfachte Reaktion, die durch Licht in Gang gesetzt wird:



Die Photosynthese besteht aus zwei Reaktionen:

- 1) Lichtabhängige CO_2 -Fixierung (Primärreaktion) gekoppelt mit der Entwicklung von Sauerstoff.
- 2) Lichtunabhängigen Reaktion (Sekundä- oder Dunkelreaktion).

2.9.2.1 Primärreaktion oder Lichtabhängige Reaktion

Hier wird Lichtenergie in chemische Energie (ATP) umgewandelt, dabei wird ein Reduktionsmittel (NADPH) gebildet, durch Kohlenstoffdioxid und Coenzym NADP^+ mit zwei Elektronen und einem Wasserstoff-Ion (Proton / H^+).

Lichtsammelkomplexe absorbieren auf der Biomembran das Licht und so werden Elektronen in den Farbstoffen in einen energiereichen („angeregten“) Zustand versetzt, das heißt: nach Aufnahme von Lichtenergie durch Pigmente kommt es zu einen angeregten Zustand, in der die Elektronen leichter und schneller (während Pikosekunden) auf dem benachbarten Protein Pigmente bis zu „spezial pair“ übertragen werden können. In diesen Proteinpigmenten werden die fehlenden Elektronen durch Spaltung von den zwei Wassermolekülen in 2 Elektronen, 4 Protonen und eine O_2 (Photolyse) ersetzt. Die Lichtsammelkomplexe (Antennen) sind in Cyanobakterien aus speziellen Partikeln aufgebaut, den sog. Phycobilisomen (äußere Antennenkomplexe), die für die Bereitstellung von Lichtenergie verantwortlich sind und Phycobilinproteine, wie offenketige Tetrapyrrol-Farbstoffe, wie die Phycoerythrine (rot) und Phycocyanine (blaugrün). Diese absorbieren insbesondere grünes Licht. Das Cyanobakterienwachstum ist abhängig von einer geringen Eisenkonzentration in ihren natürlichen Lebensräumen. Wenn Eisenmangel herrscht in ihrem Lebensraum werden Phycobilisome und normale Antennenproteine abgebaut [37].

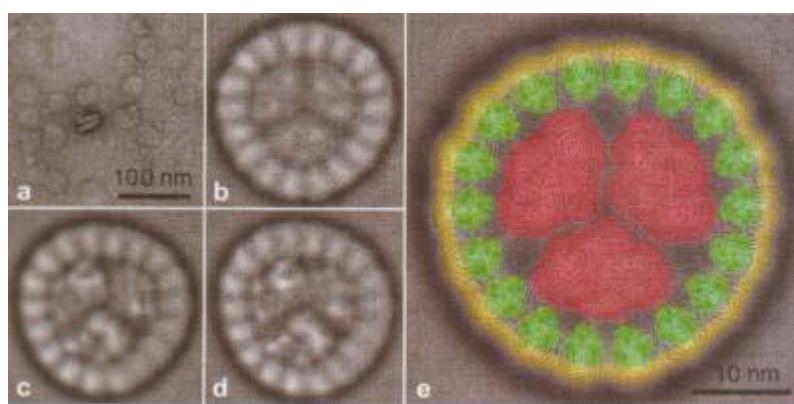
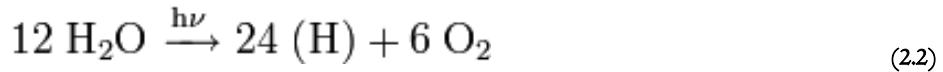


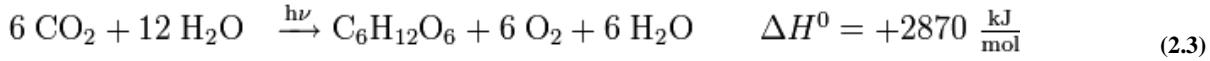
Abb.2.13. Elektronenmikroskopische Analyse des neu entdeckten Komplexes:
Das Bild (a) zeigt nach 52.000-facher Vergrößerung die Ansicht von einzelnen Proteinkomplexen. (b-d) zeigen nach digitaler Bildauswertung die Verschiedenen Ansichten des PSI-IsiA-Komplexes. Im Bild (e) wird PSI-IsiA-Komplexe interpretiert so dass, ein Ring von Seifenmolekülen (äußerer Ring; gelb), einen Ring aus IsiA-Proteinen (Innerer Ring und grün) umgibt. Der IsiA-Ring sammelt Lichtenergie und leitet sie zum einen trimeren Photosystem I (Drei zentral gelegene Ringe; rot) Molekül, dass in der Mitte dieses zellulären Kraftwerkes liegt [37].

Die wichtige Chromophore sind Chlorophyll *a*, Carotinoide und Xanthophylle. Die genannten Farbstoffe sind auf der Thylakoidmembran an Chromoproteine gebunden. Damit lichtabhängige Reaktionen exakt ablaufen (einerseits Wasser oxidieren und andererseits NADP⁺ reduzieren), werden hier zwei *Photosysteme* hintereinander benötigt. Photosystem II stellt ein starkes Oxidationsmittel zur Oxidation von Wasser zur Verfügung und Photosystem I stellt ein starkes Reduktionsmittel zur Reduktion von NADP⁺ zur Verfügung. Diese beider Reaktionen werden gemeinsam als "Lichtreaktion" bezeichnet, da dieser Teil der Photosynthese direkt von Licht abhängig ist.

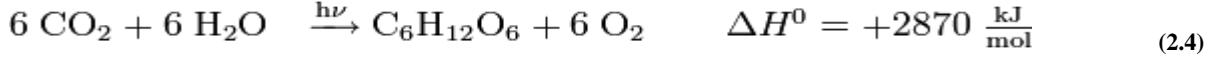


2.9.2.2 Sekundärreaktion oder Dunkelreaktion

Die Reaktion, durch welche CO₂ in organische Bindung umgewandelt wird und in Kohlenhydrat eingebaut wird nennt man Dunkelreaktion (CO₂-Gehalt der Luft beträgt ca. 0,037% (370 ppm). Hier werden die gewonnenen NADPH- Moleküle für Aufbau von Kohlenhydraten benötigt. Dunkelreaktion oder reduktiver Pentosephosphat-Zyklus wurden von Melvin Calvin und seinen Mitarbeitern entdeckt und deshalb wird auch diese Reaktionsfolge als Calvin-Zyklus genannt. Als Akzeptor für CO₂ fungiert Ribulose-1,5-bisphosphat, das aus Ribulose-5-phosphat und ATP durch eine Kinase gebildet wird (Peter Karlson). CO₂ und ATP dienen als Energiequelle und NADPH als Reduktionsmittel und die werden umgewandelt zu Glucose und Wasser. NADPH gibt Wasserstoff und zwei Elektronen ab und wird dabei selbst zum NADP⁺ oxidiert.



Brutto-Reaktionsgleichung für die oxygene Photosynthese



Netto-Reaktionsgleichung für die oxygene Photosynthese [3].

2.9.3 Respiration

Obwohl die Cyanobakterien keine Chloroplasten oder Mitochondrien besitzen, treiben sie trotzdem oxygene Photosynthese und Respiration, deswegen benötigen sie eine komplexe Koordination der verschiedenen Stoffwechselvorgänge und gewisse Aufgabenteilungen innerhalb von einigen Zellen z.B. Heterocysten Aufbau in *Anabaena*. Der photosynthetische Elektronentransport läuft in den meisten Cyanobakterien (Ausnahme von *Gloeobacter violaceus* PCC 7421) in der Thylakoidmembran und die Respiration läuft an der Thylakoidmembran und an der Cytoplasmamembran. Das heißt an der Thylakoidmembran findet sowohl die photosynthetische Elektronentransport-Kette als auch die respiratorische Elektronentransport-Kette statt. Die Voraussetzung für die ATP-Bildung bei der Photosynthese ist die Ansammlung von Protonen in das Lumen der Thylakoidmembran, die durch Photolyse des Wassers zur Entstehung kommen. In der Atmungskette funktionieren viele Elektronendonoren (reduzierte Substanzen) wie Wasserstoff, H₂, NAD(P)H und Succinat, die durch Enzyme wie Hydrogenasen, NAD(P)H-Dehydrogenasen und Succinat-Dehydrogenasen oxidiert werden. NAD(P)H-Dehydrogenasen transportiert bei diesem Prozess zwei Protonen, die durch die Membran, in das Lumen der Thylakoidmembran landen, die Elektronen dagegen wandern über Elektronencarrier Plastochinon weiter bis zu Cytochrom *b6/c*-Komplex und durch weiteren Elektronenfluss kommt es zu Translokation weiterer Protonen. Am Ende werden die Elektronen in der Cytochron *c* Oxidase an Sauerstoff übertragen und wiederum dabei wiederum kommt es zu einer Translokation von weiteren Protonen.

So wird durch den horizontalen Elektronentransport, der Protonengradient in Lumen aufgebaut, welches eine Voraussetzung für ATP- Synthese ist. Die ATP- Synthase - Komplexe sind in die Thylakoidmembran eingebettet und bilden einen Kanal, durch den Protonen entlang eines Gradienten zurück ins Stroma des Chloroplasten fließen können und dadurch wird ATP synthetisiert. (darüber können sie in Kapitel 3 mehr lesen).

2.9.4 Kohlenstoffmetabolismus

In Cyanobakterien gibt es zwei Pentosephosphat-Wege und zwar den reduktiven und den oxidativen Weg. Für den **reduktiven** Pentosephosphat-Weg, ist die Dunkelreaktion der Photosynthese sehr wichtig. CO_2 wird in Calvinzyklus durch Oxidation von NADPH zu CH_2O reduziert. In der Cytoplasmamembran von Cyanobakterien befinden sich die Schlüsselenzyme wie Ribulose Bisphosphat Carboxylase (RuBisCo) und noch weitere Komponenten des Calvinzyklus [38]. Das Rubisco, das wasserlöslich ist, ist sozusagen verantwortlich für die Kohlendioxidaufnahme aber auch katalysiert es den Einbau von Sauerstoff. Das Enzym besteht aus 8 großen und 8 kleinen Untereinheiten. Während der Katalyse geht das Rubisco von einer geöffneten Molekül-Struktur zu einer geschlossenen Form über. Wenn Rubisco sich wieder öffnet, befreit es die Reaktionsprodukte [45].

Die Cyanobakterien reagieren sehr empfindlich auf UV-B-Strahlung. Bei einer 30 minütigen Exposition von UV-B reduzieren sich spürbar die RuBISCO-Aktivität, die Aufnahme von Carbonat, und die Absorption von Phycocyanin [12].

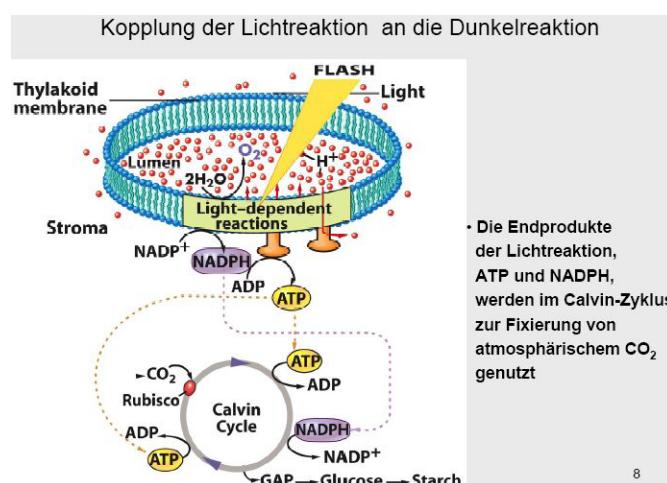
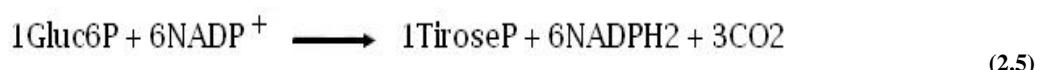


Abb.2 14. Cell and Molecular Biology, 5/e 2008 John Wiley & Sons [39].

Der Glukoseabbau läuft in Cyanobakterien über den **oxidative** Pentosephosphatweg (OPPP), der drei wichtige Funktionen hat.

1. Er stellt die Redox-Äquivalente (NADPH und H^+) für Fettsäuren, Aminosäuren Biosynthese oder für den respiratorischen Elektroenentransport bereit oder es wird damit Nitrit zu Ammonium reduziert.



2. Hexosen werden in Pentosen (Ribose 5-Phosphat) umgewandelt, welche für Nukleinsäuren Biosynthese wichtig sind.
3. Er liefert wichtige Substanzen wie Erythrose 4-phosphat für shikimat-Weg. (Biosynthese aromatischen Aminosäure und etc.)

Hier werden organische Verbindungen wie Zucker vollständig zu CO₂ oxidiert. Bei Cyanobakterien wird die Oxidative Pentosephosphatzzyklus im Dunkeln betrieben und ist geeignet für alle Bakterien die autotroph sind. Bei Cyanobakterien ist ganz charakteristisch, dass hier einen unterbrochenen Zyklus statt findet, weil das Enzym α -Ketoglutarat-Dehydrogenase fehlt. Man spricht von Split Zitratzyklus. Wie man auf der Abbildung 2.15 sieht bei dem OPPP-Weg wird kein ATP produziert [39].

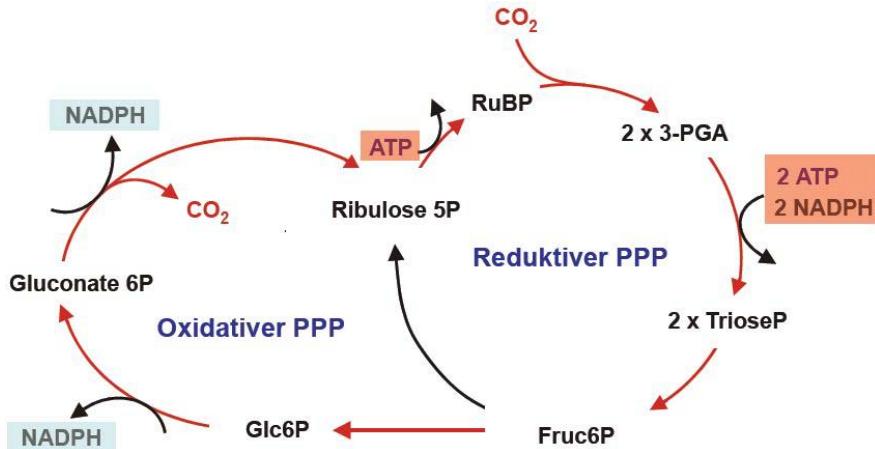


Abb.2.15 Der gleichzeitige Ablauf des reduktiven und des oxidativen Pentosephosphat Weges. Beide Wege müssen aber getrennt reguliert werden [39].

2.9.5 Stickstoffmetabolismus

Die Stickstofffixierung bei Cyanobakterien, gibt ihnen die Möglichkeit im Licht zu wachsen und CO₂ und N₂ als einzige Kohlenstoff-, und Stickstoffquelle zu verwenden, aber es steht ihnen auch anorganische Stickstoffquellen und viele weitere Möglichkeiten wie Ammoniak, Nitrat, Nitrit und Harnstoff zur Verfügung. Manche Spezies können zusätzlich auch Arginin und Glutamin assimilieren [41]. Wie gesagt können einige wenige Bakterien, darunter die Cyanobakterien, über nif-Gene und den Enzymkomplex Nitrogenase, den molekularen Stickstoff aus der Luft fixieren und die Energie dafür wird von der Photosynthese geliefert. Das Enzymkomplex Nitrogenase reduziert den umgewandelten Stickstoff zu seiner biologisch Form (Stickstofffixierung) und setzt sich in Wahrheit aus Dinitrogenase und Dinitrogenase Reduktase zusammen oder anderes ausgedrückt: besteht aus einem Eisen-Schwefel-Protein und Molybdän-Eisen-Schwefel-Protein. In den tropischen Reisfeldern schätzt man, dass Cyanobakterien allein etwa 100 Millionen Tonnen Stickstoff pro Jahr fixieren (Kumar u. Kumar 1988). [42] Die Summengleichung der durch Nitrogenase katalysierten Reaktion lautet:



Dieses Enzym ist extrem Sauerstoffempfindlich und das aktive Zentrum, der aus Eisen-Schwefel-Cluster mit Molybdänatomen besteht, wird leicht durch Sauerstoff inaktiviert, darum wurde es aus dem Prozess oxygener Photosynthese zeitlich und sogar räumlich getrennt und läuft hinter einer dicken Zellwand ab, die in manche filamentösen Cyanobakterien spezifisch die Heterozysten aus vegetativen Zellen ausdifferenziert [40].

2.9.6 Lipidmetabolismus

Von Singer und Nicolson wurde in Jahre 1972 zum ersten Mal Fluidmosaik-Modelle zu den Biomembranen formuliert. Unsere heutige Vorstellung von den cyanobakterielle Membranen basiert auf Ähnlichkeiten der Lipidzusammensetzung von Chloroplastenmembran bei Eukaryoten.

Die Biomembran besteht aus Membranproteine, die lateral frei beweglich sind und eine Lipid-Doppelschicht oder sog. flüssig-kristallin bilden. Die polaren Membranlipide, mit einer hydrophilen Kopfgruppe und einem lipophilen Schwanz, sind verantwortlich für Grundeigenschaften von Biomembranen wie Stabilität, Flexibilität, Fluidität und Semipermeabilität. Fluidität kommt zustande durch hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren. Sowohl eukaryotischen als auch prokaryotischen Thylakoidmembranen bestehen aus unverzweigten Fettsäuren mit 14, 16 oder 18 Kohlenstoffatomen und Glykolipiden wie ungeladenen Galactolipiden Monogalactosyldiacylglycerid (MGDG) und Digalactosyldiacylglycerid (DGDG) und negativ geladene Lipide Sulfoquinovosyldiacylglycerid (SQDG) und Phosphatidylglycerid (PG) [40;44].

2.10 Ökologie

Die Cyanobakterien sind heutzutage oft in den Schlagzeilen, weil sie hochpotente Gifte (Cyanotoxine) produzieren können und aquatische Lebensräume von Menschen verändern und so das Menschenleben gefährden. Das Gefahrenpotenzial ist dort am Größten, wo es wenig Möglichkeiten zur Wasserversorgung gibt und nur Oberflächenwasser als Trinkwasser dient und so können die Menschen mit Cyanotoxinen leichter in Berührung zu kommen und die erste Symptome sind dann: Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen gerötete Augen, und Fieber. Die Cyanobakterien stehen am Anfang der Nahrungskette und kommen in allen Lebensräumen vor (sowohl im Salz- als auch im Süßwasser), aber die meisten Arten leben jedoch im Süßwasser. Das Wachstum und die Verbreitung von Cyanobakterien wird direkt von den Nährstoffverhältnissen in den Gewässern beeinflusst, vor allem in den Sommermonaten vermehren sie sich stark weil viele exogene Faktoren, wie Phosphat- und/oder Nitrat-Einleitungen aus privaten Haushalten, Industrie und Landwirtschaft, in die Gewässer abgeleitet werden. Deswegen wird seit den siebziger Jahren, die Zahl der Cyanobakterien gering gehalten, in dem die Gewässer rein gehalten werden. Und tatsächlich funktioniert es und aufgrund solcher Maßnahmen sind diese Bakterien aus vielen Seen verschwunden [24]. Die Cyanobakterien kommen immer ubiquitär vor und vermehren sich vegetativ. *Thermosynechococcus elongatus* und weitere Aquatische Spezies leben unter extremen Bedingungen wie in heißen Quellen mit optimalen Wachstumstemperaturen: 45 - 70°C oder Spezies wie *Prochlorococcus marinus*, die in Tiefen unterhalb von 150m im Meeresswasser leben, aber das ist nicht alles: die Cyanobakterien können sich fast zu allen Bedingungen adaptieren z.B. sowohl im Brackwasser mit Salzgehalt $\leq 1\%$ als auch in unseren heimischen Seen (Süßwasser, Salzgehalt $\leq 0,1\%$.) Beispiel dafür sind *Microcystis aeruginosa* oder *Anabaena spp.* Viele Spezies können sogar den Boden bevölkern oder haften an Felsen. Stromatolithen sind Fossile Formen, die cyanobakterielle Kalkablagerungen im westen Australiens zeigen. Cyanobakterien können auf festen Oberflächen gleiten und sind mobil obwohl sie keine Geißeln besitzen [43].

Kapitel 3

Cyanobakterielle Elektronentransport

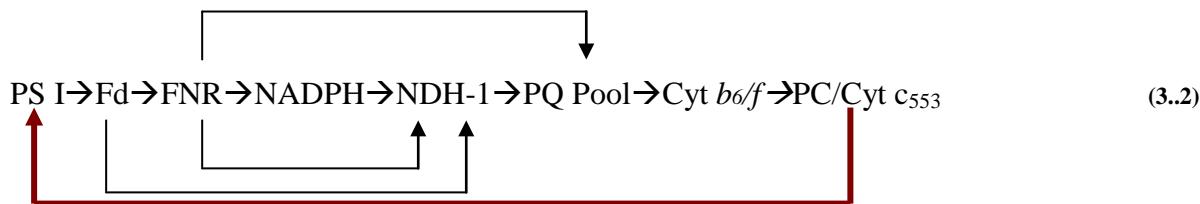
3.I Photosynthetischer Elektronentransport

Cyanobakterien sind die einzigen Organismen, die die oxygenen Photosynthese und die aeroben Respiration in einer einzigen Zelle treiben können, deswegen sind diese beiden Systeme stark miteinander gekoppelt und ein Elektronenaustausch ist zwischen den beiden Systemen möglich [17, 45]. Wie in Kapitel 2 erwähnt wurde, läuft der photosynthetische Elektronentransport in den meisten Cyanobakterien in der Thylakoidmembran. Der respiratorische Elektronentransport läuft sowohl an der Thylakoidmembran, als auch an der Cytoplasmamembran. Das heisst an der Thylakoidmembran läuft die photosynthetische und auch die respiratorische Elektronentransport-Kette. In der Photosynthese Reaktion wird aus der Lichtenergie, der Wasser oxidation und dem Elektronentransport, die Reduktionsäquivalente ($\text{NADPH} + \text{H}^+$) sowie Energieäquivalente (ATP) gebildet. Hier gibt es zwei Arten des Elektronentransportes: der **lineare**, und der **zyklische** Elektronentransport. In dem linearen photosynthetischen Elektronentransport, werden in das Photosystem II die Elektronen durch Lichtenergie aus der Wasserspaltung gebildet und auf Plastochinon (PQ) zu den Cytochrom *b6/f*-Komplex (Cyt *b6/f*) und zu weitere Carrier-Moleküle transportiert. Danach nimmt das oxidierte Reaktionszentrum von Photosystem I (PS I) die Elektronen auf und dort wiederum werden die Elektronen erneut mittels Licht angeregt und weiter an das Akzeptor-Chlorophyll A0 abgegeben. Und weiterhin werden die Elektronen über A1, Fe-S-Zentren und Ferredoxin (Fd) auf die Ferredoxin- NADP⁺-Oxidoreduktase (FNR) übertragen und im letzten Schritt wird NADP⁺ durch FNR reduziert zu NADPH. Die Gesamtenergie, die hier resultiert wird beträgt 6 ATP und 6 NADPH aber für die Kohlenstoff-Fixierungsreaktionen wird jedoch mehr ATP als NADPH benötigt. Deshalb ist die Zyklische Photophosphorylierung auch notwendig, um den Energiebedarf des Calvinzyklus zu decken. Die Komponenten der photosynthetischen Elektronentransport-Kette sind Photosystem II(PS II), Plastochinon, Cytochrom *b6/f*-Komplex, kupferhaltige Protein Plastocyanin oder Cytochrom *c553* (Es wird eines dieser beiden löslichen luminalen Elektronen-Carrier genutzt je nach Verfügbarkeit von Kupfer, wobei im Vergleich zu Cytochrom *c553*, übernimmt Plastocyanin die wichtigere Funktion.) aber beide sind in reduziertes Form bewegliche Elektronenüberträger, Photosystem I (PS I), Ferredoxin und Ferredoxin-NADP⁺⁺-Oxidoreduktase (Scherer 1990; VERMAAS 2001; Schmetterer 1994). In PS II und PS I erfolgt die photochemische Ladungstrennung [46].



Bei Zyklischer photosynthetischer Elektronentransport wird kein Wasser gespalten, kein O₂ freigesetzt und kein NADPH gebildet. Das einzige Produkt ist ATP. Wenn die CO₂-Fixierung nicht in ausreichendem Maße stattfindet und somit zu wenig NADP⁺ zur Verfügung steht, können die Elektronen von Photosystem I auf den Cytochrom *b6/f*-Komplex zurück übertragen werden und auf einem niedrigeren Energieniveau wieder auf Photosystem I zurückfließen. Hier arbeiten die Photosystem I unabhängig von Photosystem II. Hier spielt der NADH-Dehydrogenase-komplex in Thylakoidmembranen möglicherweise eine große Rolle. Die Elektronen verbleiben bei einem Akzeptor der Elektronentransportkette zwischen Photosystem I und II und die werden nicht bergab auf NADP⁺ weitergeleitet.

Das heißt dieser Kreisprozess schließt die Funktion eines Q-Zyklus ein und wirkt als Protonenpumpe, so dass auch ohne Netto-NADP⁺-Reduktion Lichtenergie direkt in chemische Energie in Form von ATP umgewandelt werden kann [46].



Zur Photolyse des Wassers werden 4 Photonen für 1 O_2 benötigt. Die Reduktion von 2 $NADP^+$ im Photosystem I benötigt nochmals 4 Photonen. Daraus ergibt sich ein Quantenbedarf von 8 Photonen.

Die Abschätzung von 8 Quanten ist ein Minimalwert; der wahre Wert wird immer höher ausfallen. Nimmt man einen Quantenbedarf von 8, zur Bildung von 2 NADPH($2 \times 220\text{ kJ/mol}$) und 3 ATP($3 \times 50\text{ kJ/mol}$) pro O_2 an, so wird von der eingestrahlten Energie($8 \times 175\text{ kJ/mol}$) etwa 40% in Form von chemischer Energie gespeichert (Peter Karlson).

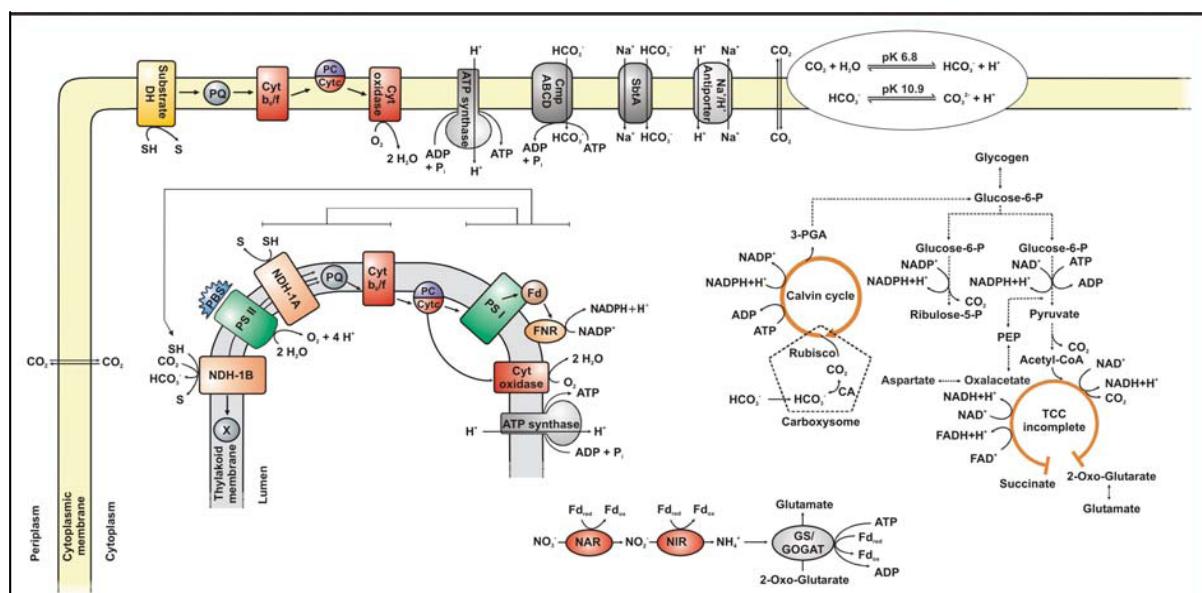


Abb. 3.1 Haupt-Stoffwechselwege der C- und N-Assimilation in Cyanobakterien sowie des C Katabolismus. Abkürzungen, (PQ) Plastochinon, (Cyt *b6/f*) Cytochrom *b6/f*-Komplex, (Cyt_c) Cytochrom *c553*, (PC) Plastocyanin, (Cyt oxidase) Cytochrom Oxidase, (Cmp) „Cytoplasmic membrane protein“, (SbtA) Sodium-bicarbonat transport: SbtA Natrium-Bicarbonat-Transporter, (TCC) Tricarbonsäure-Zyklus, (CA) Carboanhydrase, (NDH-1A) NADH-Dehydrogenase Typ A, (NDH-1B) NADH-Dehydrogenase TypB, (PBS) Phycobilisomen, (S) Substrat, (PS II) Photosystem II, (PS I) Photosystem I, (Fd) Ferredoxin, (FNR) Ferredoxin- NADP-Oxidoreduktase, (Michel) [46].

3.2 Respiratorische Elektronentransport-Kette

Wie bereits erwähnt, hier werden die Elektronen von NADH über die Elektronentransportkette von einem Enzym zum nächsten übertragen und über einen terminalen Elektronenakzeptor, oft Sauerstoff der zu Wasser reduziert wird, übertragen. Dabei wird die Energie, beziehungsweise freie Enthalpie der exergonischen Oxidation von NADH, durch Sauerstoff schrittweise freigesetzt, der wiederum für den endergonischen Transfer von Protonen zur Herstellung von Protonengradient verwendet wird. Der Protonengradienten dient zum Antrieb der endergonischen ATP-Synthetase.

Die Begriffe Zellatmung oder Atmungskette wird verwendet, weil in der oxidative Phosphorylierung zwischen membrangebundenem Elektronentransport und ATP-Synthese und Sauerstoffaufnahme eine Beziehung besteht.

Für den membrangebundenen Elektronentransport sind mehrere oligomere Enzymkomplexe und weitere Komponenten notwendig, die alle in der Biomembran eingebettet sind. Die Komponenten der photosynthetischen Elektronentransportkette haben Ähnlichkeit mit denen die an der Atmungskette beteiligt sind. Deswegen, für die an der Thylakoidmembran ablaufende respiratorische Elektronentransport-Kette, werden zum Teil dieselben redoxaktiven Komponenten genutzt, nämlich Plastochinon, das sowohl in der Photosynthese, als auch in der Atmungskette von Cyanobakterien das bewegliche Chinon darstellt, Cytochrom *b6/f*-Komplex, sowie Plastocyanin (Kupferhaltiges Protein) oder Cytochrom *c553* (SCHERER 1990; VERMAAS 2001). Der Respiration NDH-1 und verschiedene weitere alternative Substrat-Dehydrogenasen stehen außerdem zur Verfügung. Der NDH-1 Komplex aus Cyanobakterien weist große Ähnlichkeit zum Komplex I *E. coli* und zu Mitochondrien auf (FRIEDRICH & SCHEIDE 2000). Komplex II wirkt als Dehydrogenase und ist die einzige Komponente, die nicht am Protonentransport an der Membran beteiligt ist. Cyanobakterien besitzen kein Cytochrom *bc*, deswegen spielt das Cytochrom *bf* in der Atmungskette, als Komplex III, eine wichtige Rolle. Am Ende der Atmungskette findet am Komplex IV, die Rückreaktion statt und der Sauerstoff wird zu Wasser reduziert.

Ein respiratorischer Elektronentransport läuft ebenfalls an der Cytoplasmamembran ab, unter Beteiligung von Substrat-Dehydrogenasen, Plastochinon, Cytochrom *b6/f*-Komplex, sowie Plastocyanin bzw. Cytochrom *c553* (KRAUSHAAR *et al.* 1990;).

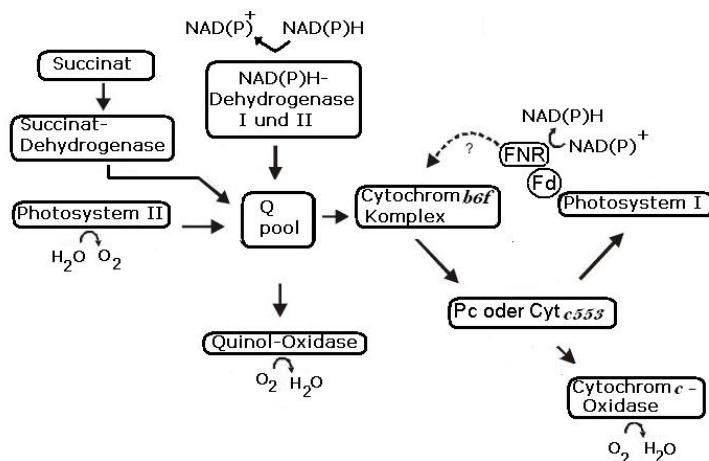


Abb. 3.2 Schematischer Darstellung der Cyanobakteriellen Elektronentransportketten. Dieses Bild zeigt in Cyanobakterien die Vernetzungen von Photosynthetischen und respiratorischen Elektronentransportwege. Elektronen können aus dem Plastochinon Pool in verschiedene Transportwege fließen und es ist abhängig von Kapazität und die Verfügbarkeit verschiedener Elektronenakzeptoren bzw. -donatoren. Wie hier sichtbar ist, werden die Elektronen in allen drei, wegen durch selben Komponenten wie Plastochinonpool, dem *b6f*-Komplex oder den Elektronencarriern Plastocyanin oder Cytochrom *c553* transportiert [47].

3.3 Redoxpotential

Das Redoxpotential ist ein Maß für Verbindungen oder Elementen, die die Tendenz haben Elektronen abzugeben. Diese Werte sind quantitative Werte. Der Fluss der Elektronen läuft in einem Redoxsystem von einem mit negativem zu einem mit positivem Potential und die Komponenten der Atmungskette verhalten sich hier wie Redoxkatalysatoren und pendeln zwischen ihrer reduzierten und oxidierten Form. Als vergleich für die Tendenz zur Elektronenabgabe wird molekularer Wasserstoff benutzt. Wasserstoffelektrode zeigt unter Standardbedingungen (Gleichgewicht zwischen Konzentration oxidiert und reduziert

Stufe, in PH-Wert 7,0) ein Potential E° von -0,42 Volt (Wasserstoffhalbelement). Dabei ist das wirkliche Potential eines Redoxsystems abhängig von Konzentration oxidierter Stufe und Konzentration reduzierter Stufe. Das ist veranschaulich aus der **Nernst-Gleichung** [48].

$$E = E^\circ + (RT/nF) \cdot \ln (C_{\text{ox}}/C_{\text{red}}) \quad (3.9)$$

entspricht in Biologische Bedingungen

$$E' = E^\circ + (0,06/n) \cdot \lg (C_{\text{ox}}/C_{\text{red}}) \quad (3.10)$$

„n“ ist die Anzahl der übertragenen Elektronen (in mol), „T“ ist Temperatur (in K), „F“ ist die Faraday-Konzentration (96,5 kJ/V), C_{ox} ist die Konzentration oxidierter Stufe, und C_{red} ist die Konzentration reduzierter Stufe. Das Redoxpotenzial ist auch ein Maß für die maximale Nutzbarkeit oder für die freie Energie ΔG° einer Reaktion. Die Standard -EMK (ΔE° ; in Volt) eines Redoxsystems, hat auch direkt mit der Gibbs'schen freien Reaktionsenthalpie (in kJ mol⁻¹) zutun.

$$\Delta G^\circ = -nF \Delta E^\circ = -n96,5 \Delta E^\circ \text{ (kJ/mol)} \quad (3.11)$$

$$\Delta G^\circ = -n\varphi \Delta E^\circ \quad (3.12)$$

Während des Elektronentransportprozesses wird eine Menge Energie freigesetzt. Ein großer Teil dieser Energie wird für die protonenmotorischen Kraft (PMK) verwendet. Die PMK erzeugt parallel Protonengradienten, die schließlich die ATP-Synthese antreibt. Dieser Eigenschaft, dass in der bakteriellen Plasmamembran, der Elektronentransport mit dem Aufbau einer Protonenmotorischen Kraft gekoppelt ist, unterscheidet die Elektronentransportkette von anderen Elektronentransportprozessen. Hier in **Tabelle 3.6** sehen wir die Normalpotential E° der Atmungskette-Komponenten.

Substrat oder Komplex	E° (V)	Substrat oder Komplex	E° (V)
$2H^+/H_2$	-0,42	Komplex III	
$NAD(P)^+/NAD(P)H$	-0,32	Cytochrom b_L	-0,01
Komplex I		Cytochrom b_H	+0,03
FMN	-0,30	Fe-S-Cluster	+0,28
Fe-S-Cluster	-0,25 bis -0,05	Cytochrom c_1	+0,22
Succinat	+0,03	Cytochrom c	+0,23
Komplex II		Komplex IV	
FAD	0,0	Cytochrom a	+0,21
Fe-S-Cluster	-0,26 bis 0,00	Cu_A	+0,24
QH_2/Q	+0,04	Cytochrom a_3	+0,39
$\cdot Q^\Theta/Q$	-0,16	Cu_β	+0,34
$QH_2/\cdot Q^\Theta$	+0,28	O_2	+0,82

Abb.3.8 Standardreduktionspotenziale den Redoxkomponente [3].

3.4 Komponente der Atmungskette

Es gibt hier 4 integrale Membranproteinkomplexe, die alle für diese Energieumwandlung wichtig sind. Die Elektronentransportkomplexe, die als Oxidoreduktasen wirken, können unabhängig von einander in der Plasmamembran diffundieren, aber sie neigen zu einer schwachen Wechselwirkung miteinander, was ihre Strukturen in der Membran stabilisiert.

Die Enzymkomplexe enthalten eine Vielfalt von Redoxzentren, wie z.B. Flavinnukleotiden (FMN, FAD), oder bewegliche Coenzym Ubichinol (Q) oder aber andere Zentren wie Eisen-Schwefeln-Cluster, Protein-Coenzyme wie hämhaltigen Cytochrome und kupferhaltige Proteine. Noch dazu kommen zwei kleinere Komponenten: das Coenzym Ubichinon und Cytochrom c. Diese dienen als Redoxbrücken zwischen den Komplexen. Ubichinon überträgt die Elektronen von Komplex I oder II auf Komplex III, während Cytochrom c die Elektronen von Komplex III zum Komplex IV weiterleiten, wo Sauerstoff zu Wasser reduziert wird. Der Elektronenfluss erfolgt durch die Reduktion und Oxidation dieser Redoxzentren. Die Elektronen werden immer von einem Reduktionsmittel auf ein Oxidationsmittel übertragen. Je größer die Reduktionskraft eines Reduktionsmittels, desto kleiner oder negativer ist sein Reduktionspotenzial. Innerhalb Komplex I, II, III, IV findet der Elektronentransport über eine sehr hohe Redoxpotentialdifferenz statt. Die dabei frei werdende Energie, wird für Protonentransport und Aufbau eines Protonengradienten an der Membran verwendet. Siehe Abb.3.3

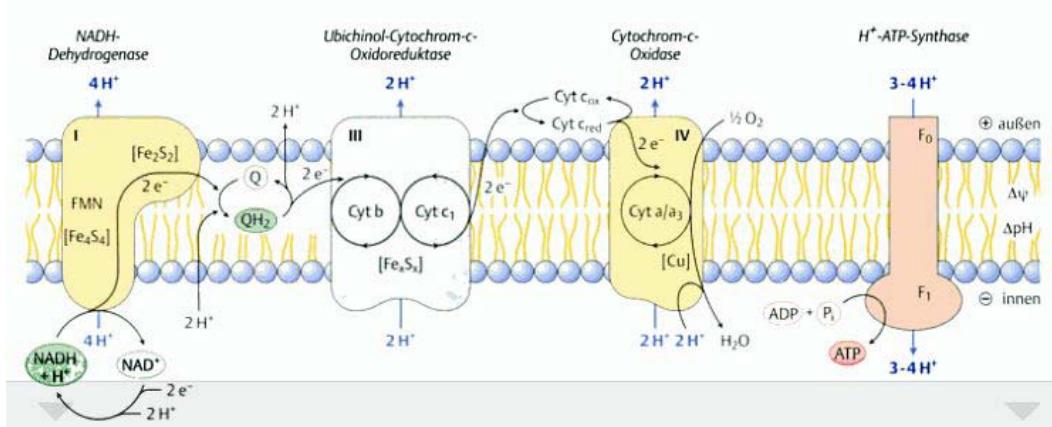
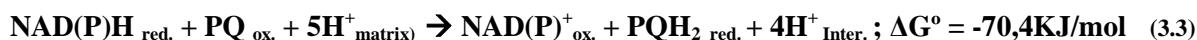


Abb. 3.3 Das Redoxsystem der Atmungskette und der Transport von Elektronen von NADH zu Sauerstoff. Dieser Prozess ist mit Protonengradient gekoppelt, welcher ein Protonenpotenzial erzeugt und ATP Synthese durch ATP-Synthase Enzym antreibt. Wenn Zwei Elektronen durch die Komponenten der Transportkette transportiert wird, werden $10H^+$ nach außen geschleust. Cyt, Cytochrom; Cu, Kupfer, FAD, Flavinadenindinukleotid; FMN, Flavinmononukleotid; FeS, Eisen-Schwefel-Protein; NADH, Nicotinamidadenindinukleotid; Q, Ubichinon; QH₂, Ubichinol; $\Delta\Psi$, elektrisches Membranpotenzial; ΔpH , PH-Differenz zwischen Außen und Innenseite [49].

3.4.I NAD(P)H-Dehydrogenase; Komplex I

Komplex I, der sich auch Coenzym Q Oxidoreduktase Enzym nennt, ist fähig in Cyanobakterien NADH und die $F_{420}H_2$ bzw. NADPH zu oxiedieren und Coenzym Q dabei zu reduzieren. Durch Untersuchungen in Cyanobakterien wurde bewiesen, dass zwei unterschiedliche Dehydrogenase Enzyme in CM und ICM existieren, NAD(P)H-Dehydrogenase I und II.

Katalytische Reaktion von NDH's:



Komplex I kann bis zu ca. 46 Untereinheiten eingeteilt werden. Bei Bakterien können minimal 14 Untereinheiten existieren, die auch als „Kern-Untereinheiten“ bezeichnet werden. Von diesen 14 „Kern-Untereinheiten“, sind 7 peripheren Untereinheiten, die sowohl Substratbindungsstelle für NADH, als auch die prothetischen Gruppen Flavinmononucleotid (FMN) und Eisen-Schwefel-Cluster (Fe-S-Cluster) beinhalten und weitere 7 Untereinheiten, die hydrophob sind und im Inneren der Membran lokalisiert sind. Komplex I besteht je nach dem Organismus aus unterschiedlicher Masse von 500 bis 1000 KD.

Enzymkomplex I kann Funktionell in vier Hauptbereiche gegliedert werden. Die Substratbindungsstelle für NADH befindet sich in der Spitze der peripheren Untereinheiten. NADH wird hier oxidiert und Elektronen werden auf die NADH-Q-Oxidoreduktase weiter übertragen. Der weitere Abschnitt des peripheren Molekülteils (sog. prosthetischen Gruppen) übernehmen den Elektronentransport zum Ubichinon und manchmal katalysieren sie in der Atmungskette die Reaktionen. Die Untereinheiten, die im inneren der Membran liegen, beinhalten sowohl ein Q Hydrogenase Modul (jene Modul in der, die Elektronen auf Ubichinon transferiert werden.) als auch ein Transporter Modul (jene Modul, in der die NADH-Q-Oxidoreduktase Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum geschleust werden). [50, 51, 52]. Siehe Abb. 3.4

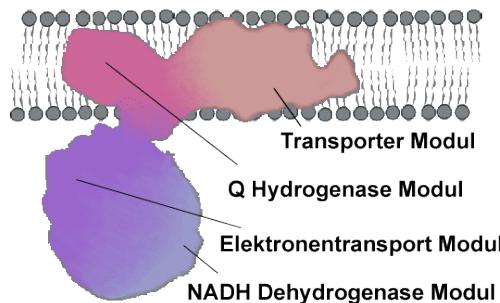


Abb. 3.4 stellt einen theoretischen Überblick endgültige Struktur dar und somit die Lokalisation der funktionellen Gruppen von Komplex I [53].

3.4.I.1 FMN; Flavinmononucleotid und FAD; Flavinadenidinucleotid

FMN ist ein Bestandteil vom Komplex I der Atmungskette (Prosthetische Gruppe von NDH) und FAD ist ein Cofaktor von Flavoproteinen (Prosthetische Gruppe von NDH II), die in vielen Reaktionen beteiligt sind wie z.B.

- Oxidative Deaminierung
- Cholesterin-Biosynthese.
- Katalyse Acyl-CoA-Dehydrogenase
- Purin-Abbau.
- Dehydrogenase-Komplexe [54].

3.4.I.2 NDH I

Die NAD(P)H-Dehydrogenase I hat hohe Homologie zu NADH-Dehydrogenase Mitochondrialen Säugetiere [55, 56, 57]. Eine NAD(P)H-Dehydrogenase I Molekül braucht minimal 14 Untereinheiten [58], von denen in Cyanobakterien 3 davon fehlen, welches für Dehydrogenase Funktion überraschenderweise wesentlich sind. Die NAD(P)H-Dehydrogenase I oxidiert Deamino-NADH und NADPH, welches wie später gezeigt, durch **Rotenon** inhibiert wird [59, 60]. Rotenon (Pflanzengift) wird aus der Wurzel von Barbasco (*Deguelia utilis*) oder der Tubawurzel (*Derris elliptica*), einem in Borneo heimischen Schmetterlingsblütler, gewonnen. Die Wirkung dieser Pflanzen ist seit 17. Jahrhundert bekannt [61]. Zwei Elektronen können von NAD(P)H auf FMN transportiert werden und dieses reduzieren zu FMNH_2 . Genau dasselbe kann bei FADH_2 aus der Citratzyklus passieren [95].

3.4.1.3 NADH II

Die NAD(P)H-Dehydrogenase II kann in Cyanobakterien nur NADH oxidieren und besitzt nur eine Untereinheit mit Prosthetischen Gruppen von Fe-S und FAD. NAD(P)H-Dehydrogenase II transloziert keine Protonen durch die Membran [62].

3.4.1.4 Eisen-Schwefel-Proteine

Eisen-Schwefel-Proteine, besitzen Eisen-Schwefel-Zentrum als prosthetische Gruppe. Diese Proteine spielen bei Redoxreaktionen und bei der Elektronenübertragung eine wichtige Rolle. Das Fe^{2+} oder Fe^{3+} ist am anorganischen Schwefel und an Cys-Gruppen im Protein gebunden. In weiterem Elektronentransport im Komplex I, werden die zwei Elektronen von FMNH_2 auf eine Reihe nicht-Häm-Eisenproteine, Fe-S-Cluster transportiert und am Ende werden diese Elektronen aus Komplex I auf Ubichinon übertragen [53].

3.4.2 Succinatdehydrogenase ; Komplex II

Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase, Komplex II ist ein peripheres Protein (mit einer Masse von 140 kD) und es überträgt zwei Elektronen von dem oxidierten Succinat und gleichzeitig überträgt es zwei Protonen vom Cytoplasma auf Ubichinon und Ubichinon wiederum wird zu QH_2 reduziert. Ubichinon ist der zweite bewegliche Elektronentransporter in der Atmungskette wie Cytochrom c. Cytochrom c überträgt wie eine Brücke die Elektronen vom Komplex III auf Komplex IV, während Ubichinon (Q) diese von den Dehydrogenase-Komplexen I und II auf Komplex III leitet [63]. Über den Komplex II werden die Elektronen des FADH_2 eingeschleust, welche aus dem Citratzyklus stammen [53]. Hier entsteht eine geringere Menge ATP im Vergleich zu Reduktionsmittel NAD^+ , weil erstens hier keine Protonen nach außen gepumpt werden und zweitens die Elektronen durch den Komplex II auf einem niedrigeren Energieniveau in der Atmungskette gebracht werden. Als Folge entstehen pro FADH_2 nur 1,5 ATP [53]. Reduziertes Ubichinon kann wiederum später oxidiert werden, in dem die 2H^+ nach außen frei gesetzt werden und die Elektronen an das oxidierte Enzym Cytochrom $b6_f$ -Komplex weitergibt. Der Komplex II besteht aus vier Untereinheiten, 3 kleinen hydrophoben Untereinheiten und einem dimeren Enzym Succinat-Dehydrogenase, mit einer Masse von 97 kD. Die Succinat-Dehydrogenase besteht aus 4 weiteren Bereichen.

- eine Flavoproteinbereich
- Eisen-Schwefel-Clusterbereich
- eine Cytochrom-b560-Bereich
- und einen Ankerproteinbereich

Prosthetischen Gruppen von Komplex II bestehen aus 3 Arten:

- Eisen-Schwefel-Cluster (2 Fe-2S; 3 Fe-4S; 4 Fe-4S).
- FAD = Flavinadenindinucleotid (kovalent gebunden).
- eine Haem-Gruppe (Cytochrom b560).

Die Succinat-Dehydrogenase katalysiert die Reaktion von Succinat zu Fumarat. Diese Reaktion ist eine Redoxreaktion und dadurch werden zwei Protonen und Elektronen frei. Die Elektronen werden auf FAD übertragen und somit wird das FAD zu FADH_2 reduziert. Diese Reaktion läuft im Isoalloxazinring des FAD, einem Derivat des Vitamins Riboflavin. FAD ist mit Hilfe einer Histidinkette an die Succinat-Dehydrogenase gebunden.

Die Elektronen werden als einzeln von FADH_2 auf Ubichinon, auf die drei Eisen-Schwefel

Cluster übertragen und dadurch wird Fe^{2+} , Gruppe zu Fe^{3+} oxidiert und anschließend werden die Elektronen auf die Haem-Gruppe übertragen und Ubichinon wird zu Ubichinol reduziert, aber es entsteht nicht sofort Ubichinol, sondern als Zwischenprodukt Semichinon weil über dem Eisen-Schwefel-Cluster nicht gleichzeitig zwei Elektronen übertragen werden können.

Malonat ist für diese Reaktion Kompetitiver Inhibitor. Hier spielen auch noch weitere Enzyme für den Elektronentransport von FADH_2 auf Ubichinon in die Atmungskette, eine Rolle. Beispiele hierfür sind Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase und Acyl-CoA-Dehydrogenase [64, 65, 66, 67].

3.4.3 Cytochrom *bc*-Komplex ; Komplex III

Im Jahr 1995-1998 wurde die Struktur dieses Komplexes mit Hilfe Röntgenkristallographie beschrieben. Ubichinon-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase, Komplex III ist ein Dimer aus zwei gleichen Monomeren mit der Molmasse von 248 KD und 11 Untereinheiten. Jedes Monomer besteht aus einem Cytochrom *b* mit zwei Häm-Gruppen (b_H und b_L), einem Cytochrom *c*₁ und einem FeS-Zentrum, dass sich Rieske-FeS-Zentrum nennt. Die prosthetischen Gruppen, die oft an Proteinen gebunden sind, sind keine Protein-Komponenten. Als Aufgabe nehmen diese die Elektronen auf bzw. geben sie ab und werden dabei reduziert bzw. oxidiert. Ubichinon-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase ist mit geringen Unterschieden auch auf den Cytochrome *b6f*-Komplex übertragbar. Mit Hilfe von Komplex III werden die Elektronen von Komplex II auf Cytochrom *c* (kleine peripheres Membranprotein, auf der außenseite der Membran) übertragen. Dabei werden zwei Protonen nach außen abgegeben und zwei Elektronen zu weiteren Komponenten transportiert. Hier ist die entscheidende Reaktion eine Verzweigung vom Elektronenfluss während der Oxidation von Plastoquinol, das heißt ein Elektron läuft über einen „high potential“ Weg (Mit Redoxpotential +300mV) und zwar über Rieske FeS-Protein zu Cytochrom *f* und das andere Elektron zum „low potential“ Weg über Hämgruppen des Cytochroms *b6* (mit Redoxpotential von ca. -150 bzw. -50 mV). Dieser Kreisprozess nennt sich Q-Zyklus. Hier sind die zwei getrennten Bindungsstellen für die Oxidation bzw. Reduktion des Chinol(n)s eine wichtige Voraussetzung für Mechanismus dieses Kreisprozesses [49]. Es ist wichtig zu erwähnen, dass es mehrere Inhibitoren der Atmungskette gibt, die alle eine fungizide und insektizide Wirkung besitzen und die spezifisch für die Hemmung bestimmter Komplexe verwendet werden. Hier gibt es mehrere Inhibitoren, die für die Hemmung vom Enzymkomplexes III verantwortlich sind. Einer der wichtigsten Inhibitoren, die bei meiner Arbeit auch untersucht wurde, ist **Antimycin A**, der spezifischer Inhibitor des Cytochroms *b*. Der Antimycin A verhindert den Transport der Elektronen auf das Cytochrom *c* in dem, dass es sich an UQ_N in der Nähe des Häm b_H auf der Matrix-Seite bindet [68, 69]. Das Cytochrom *b* wird zwar reduziert und kann Elektronen aufnehmen, aber es kann nicht oxidiert werden und die Elektronen an Cytochrom *c* weiter geben [70]. Auf diese Weise wird die ATP-Synthese an der ATPase gehemmt [71].

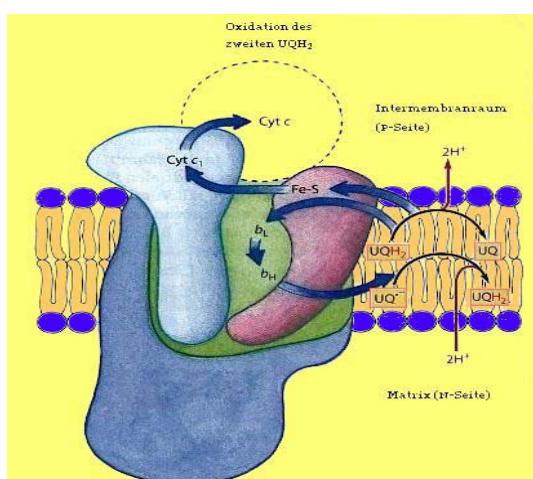


Abb.3.5 Auf der Intermembranseite (P-Seite) werden zwei Moleküle UQH_2 zu UQ oxidiert und dabei 4 H^+ in die P-Seite übertragen. Das Rieske-Fe-S-Zentrum nimmt eine Elektronen pro UQH_2 auf und transportiert es zu Cytochrome *c*₁ weiter. Über Cytochrom *b* wird ein Elektron an UQ abgegeben und es wandelt sich zu UQH_2 um und dabei wird 2 H^+ vom Matrix (N-Seite) auf genommen und verbraucht [53].

3.4.3.I Q-Zyklus

Q-Zyklus wurde erstmals durch Peter Dennis Mitchell (ein britischer Chemiker) beschrieben. Er bekam 1978 den Nobelpreis für Chemie, für seine Forschungen zur Energieumwandlung in Zellen. Der Q-Zyklus (engl. Quinone) ist verknüpft mit Elektronentransfer vom QH_2 auf Cytochrom c und Protonentransport und besteht aus einer Reihe von Redoxreaktionen, in denen Ubichinon (Q) bzw. Ubihydrochinon (QH_2) und Cytochrom c am Komplex III der Atmungskette beteiligt sind. In Cyanobakterien übernimmt die Plastochinon die Rolle von Ubichinon, aber ansonst läuft dieser Zyklus in Cyanobakterien analog zu Mitochondriale Q-Zyklus. Ubichinon ist ein beweglicher Elektronenüberträger zwischen Komplex I bzw. Komplex II und Komplex III welches durch die Aufnahme von zwei Protonen und zwei Elektronen vom Komplex I/II zu Ubihydrochinon (QH_2) reduziert wird. Das reduzierte Ubihydrochinon (QH_2) diffundiert sich zu Komplex III und bindet sich dort an Qo-Bindungsstelle. Jetzt können seine beiden aufgenommenen Elektronen an Cytochrom c und an weiteres Ubichinon, dass in oxidierte Form an Qi-Bindungsstelle an Komplex III bindet, weiter gegeben werden. Hierbei kann Cytochrom c nur ein Elektron aufnehmen und legt es danach als reduzierte Cytochrom vor. Das zweite Elektron fließt über B_1 und B_H auf oxidiertes Ubichinon und zwar in der Qi-Tasche. Das Ubihydrochinon (QH_2) gibt auch seine Protonen an den Intermembranraum ab. Jetzt kann Ubichinon wiederum zum **Ubichinonpool** zurück diffundieren. In zweiter Phase dieses Zykluses bindet sich weiteres Ubihydrochinon an Qo-Stelle und alles wiederholt sich wiederum, aber was wichtig ist, ist dass das Ubisemichinon unter Bindung zweier Protonen aus der Matrix zu Hydrochinon reduziert wird und wenn es durch oxidiertes Chinon ersetzt wird, kann es nun selbst an die Qo-Stelle binden. Insgesamt werden hier zwei Elektronen zwischen Ubihydrochinon und Cytochrom c transportiert und dabei zwei Protonen aus der Matrix entnommen und vier Protonen in den Intermembranraum abgegeben.



4 Protonen von Matrix nach Intermembranraum, 2 Protonen von Matrix an Komplex III [53, 72, 73].

3.4.4 Cytochrom c-Oxidase; Komplex IV

In Komplex IV findet der letzte Schritt der Elektronentransportkette statt. Hier werden reduzierte Cytochrom c oxidiert und die Elektronen von der Membranaußenseite auf O_2 auf die Membraninnenseite übertragen und Sauerstoff wird dann zu Wasser reduziert. Dabei werden mit Hilfe der frei gesetzten Energie, 4 Protonen vom Matrix im den Intermembranraum verbracht, um den Protonengradient aufzubauen. Cytochromoxidase enthält Cytochrom a , a_3 und 3x Cu-Atome und pro Sauerstoffatom werden dann zwei Protonen nach außen abgegeben. Der katalytische Kreislauf beginnt, wenn Komplex IV vollständig oxidiert vorliegt. Jetzt kommt ein reduziertes Cytochrom c und überträgt ein Elektron auf Cu_A -Zentrum (Es gibt hier zwei Kupfer-Zentren und zwar Cu_A und Cu_B). Das Elektron wird dann vom Zentrum auf das Häm a und weiter über Häm a_3 auf das Cu_B -Zentrum (prosthetische Gruppen) übertragen. Das Cu_B -Zentrum liegt nun in der reduzierten Form vor. Im nächsten Schritt wird das zweite Elektron über ein zweites reduziertes Cytochrom c auf Komplex IV übertragen und bewegt sich weiter bis zum Häm a_3 , aber diesmal bleibt es in diesem Zustand und Häm a_3 bleibt in seiner reduzierten Fe^{2+} -Form. Jetzt ist die Cytochrom c Oxidase in der Lage Sauerstoff an reduziertes Häm a_3 zu binden. Sauerstoff wird weiter reduziert zu Peroxid weil das Cu_B -Zentrum ganz nahe am Häm a_3 -Sauerstoff-Komplex liegt und so Sauerstoff als eine Brücke zwischen die Fe^{3+} des Häms und dem Cu_B^{2+} vorliegt.

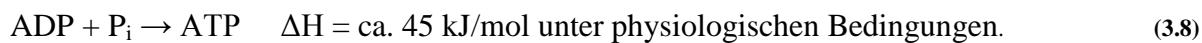
Als nächsten Schritt bringt einerseits die dritte reduzierte Cytochrom c ein weiteres Elektron und andererseits kommt ein weiters Proton aus der Matrix zu der Reaktion-Zentrum und so spaltet sich dann die O-O-Bindung zu einer Ferrylgruppe ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) und eine $\text{Cu}_\text{B}^{2+}\text{-OH}$ Bindung. Als letzter Schritt werden das vierte Elektron und ein zweiter Proton aufgenommen. Als Folge kommt es zur Abspaltung von zwei Wassermolekülen und $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ Reduktion und das Enzym nimmt wieder seine ursprüngliche, vollständig oxidierte Form an.

Die Cytochrom c Oxidase wird durch eine Reihe von sauerstoff-ähnlichen Molekülen wie Cyanide, Azide und Kohlenmonoxid gehemmt oder sie können ebenfalls an Fe^{2+} binden und die O_2 -Bindungsstelle blockieren. Als Folge werden im System keine ATP synthetisiert, weil ein Elektronenstau zu Stande kommt und alle Komponenten der Atmungskette vollständig im reduzierten Zustand vorliegen und so der Protonengradient auch betroffen wird und nicht aufrecht erhalten werden kann.



3.4.5 H^+ -transporting two-sector ATPase; ATP-Synthase

Der ATP-Synthase Enzymkomplex übernimmt zwei wichtige Funktionen: erstens die Protonenpumpe, um den elektrochemischen Gradient an der Membran zu nutzen und zweitens die ATPase Funktion um ATP „eine energiereiche Verbindung“ oder besser gesagt, „der universelle Energieüberträger“ zu regenerieren. ATP- Bildung bedarf der Zufuhr von Energie.



Aus diesem Grund ist dieser Prozess gekoppelt, mit dem energetisch begünstigen Transport von Protonen. So wird eine Form von Energie auf eine andere Form umgewandelt und ohne Ausnahme wird diese immer als Energieüberträger benötigt. ATP-Synthase Enzymkomplex ist ein Bestandteil der Biomembran von Cyanobakterien, Mitochondrien und Chloroplasten und gehört zu der Proteinfamilie der Hydrolasen mit der Masse von 350 KD und einem Durchmesser von 8,5 nm. Wenn die Protonen durch die ATP-Synthase in das Zellinnere zurück fließen, treibt dies dieses Enzym an und so werden die ATP-Moleküle aus ADP und P_i synthetisiert. ATP-Synthase besteht aus 8 bis 20 verschiedene Untereinheiten. Die Anzahl von Untereinheiten kann in unterschiedlichen Organismen variieren. Aber jede ATP-Synthase kann man generell in zwei komplexen Anteilen unterteilen [74, 75, 76]: Die wasserlösliche Komplexe, (F_1) sind diejenige, die ATP katalysieren und der wasserunlösliche Komplex, (F_0) transportiert Protonen und ist eingebaut im Membran. Siehe Abb.3.4. Bei der Zellatmung werden ca. 90 % des gesamten ATP durch oxidative Phosphorylierung hergestellt. Ein Mensch verbraucht z.B. pro Tag etwa 50 bis 80 kg ATP, der für verschiedene biochemische Reaktionen Notwendig ist z.B. für aktiven Ionentransport an Membranen [53].

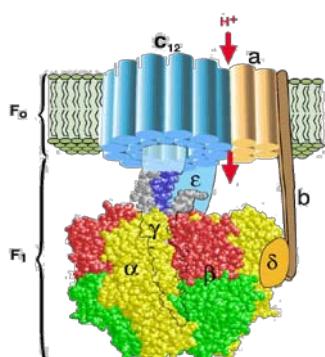


Abb. 3.6 Schematische Darstellung von ATPsynthase Enzym. Die Funktion von ATP-Synthase entspricht im Grunde genommen bei allen Organismen dem gleichen Prinzip [53].

3.4.5.1 Aufbau von F_1

Das katalytische Zentrum liegt in der Untereinheit F_1 . Der Kopfteil liegt auf der Matrixseite, wo die Protonen Konzentrationen am niedrigsten ist und besteht aus fünf verschiedenen Polypeptidketten, die als $F_1\alpha$ 3, $F_1\beta$ 3, $F_1\gamma$, $F_1\delta$ und $F_1\epsilon$ bezeichnet werden.

- $F_1\beta$ -Peptidketten: drei $F_1\beta$ -Untereinheit, die die katalytischen Zentren bilden.
- $F_1\alpha$ -Peptidkette: die $F_1\beta$ -Peptidketten zusammen halten.
- $F_1\gamma$ -Peptidkette: bewegliche $F_1\gamma$ -Untereinheiten verbindet die F_1 - und F_0 - miteinander.
- $F_1\epsilon$ -Peptidkette: Am F_0 -Ende der $F_1\gamma$ -Polypeptidkette befindet sich und verbindet die F_1 -Untereinheit und die F_0b -Peptidkette miteinander [53, 68, 77, 78].

3.4.5.2 Aufbau von F_0

Diese Untereinheit befindet sich zum größten Teil in der Membran und die wiederum besteht aus verschiedenen Subunits F_0a , F_0b und F_0c .

- F_0a : Überträgt die Kraft auf F_0b und setzt Protonenbewegung in eine Drehbewegung um.
- F_0b : Es verbindet die Membran und die F_1 Komponente und überträgt dabei die Kraft. F_0b -Untereinheit besteht aus zwei Polypeptidketten.
- F_0c : Es besteht aus 10 bis 12 Untereinheiten, die sich alle zu einer ringförmigen Struktur verbilden. Dieser Ring ist auf der Innenseite mit Phospholipiden ausgefüllt, damit an dieser Stelle keine Protonenflüsse stattfinden. F_0c -Peptidkette ändert jedes Mal seine Konformation, wenn Protonen sich binden oder lösen und so kommt es zu einer Drehbewegung [53, 68, 77].

Kapitel 4

Bioenergetik

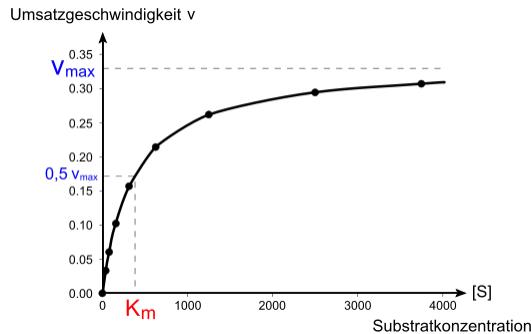
4.I Enzymkinetik

Die Enzymkinetik beschreibt die Geschwindigkeit der enzymkatalysierten, chemischen Reaktionen in der biophysikalischen Chemie. Das Hauptziel ist hier die Beschreibung und Bestimmung der Enzymaktivität und der katalytischen Effizienz. Die Enzyme sind Proteine, die die Rate einer chemischen Reaktion beschleunigen, ohne im Prozess verbraucht zu werden und dienen dazu, die Reaktionen zu lenken. Sie erreichen ihre Wirkung, indem sie sich provisorisch zum Substrat binden und die Aktivierungsenergie senken. So können die Enzyme das Substrat zu einem Produkt umwandeln. Die Rate, an der ein Enzym arbeitet, steht unter Einfluss mehrerer Faktoren wie z.B. **die Konzentration von Substrat-Molekülen** (je mehr von ihnen verfügbar sind, desto schneller können sich die Enzym-Moleküle kollidieren und an das Substrat binden). Die Konzentration des Substrats wird als $[S]$ bezeichnet und in der Einheit Molarität angegeben. **Die Temperatur** ist der nächste Wirkungsfaktor. Wenn die Temperatur ansteigt, beschleunigt dies die molekulare Bewegung und so kommt es zum besseren Kontakten zwischen Enzym und Substrat, aber hier gibt es eine Temperaturgrenze, weil Enzyme (Proteine) in höherer Temperatur denaturieren und unwirksam werden können. Der **pH-Wert** spielt hier ebenfalls eine große Rolle. Die Angleichung eines Proteins steht unter Einfluss des pH und weil die Enzym-Tätigkeit von dieser Angleichung entscheidend abhängig ist, wird seine Tätigkeit dadurch betroffen. Der französische Physikochemiker Victor Henri hat im Jahr 1902 zum ersten Mal den Zusammenhang zwischen Substratkonzentration $[S]$ und Umsatzgeschwindigkeit eines Enzyms v beschrieben. Später wurde in 1909 der pH-Wert definiert und der Deutsche Leonor Michaelis konnte mit seiner kanadischen Post-Doktorandin Maud Menten, 1913 die Ergebnisse von Henri untersuchen und sie bestätigen. Daraus wurde dann die sog. Michaelis-Menten-Theorie ausgearbeitet. Diese Theorie zeigt einen Zusammenhang zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit v und der Enzym- sowie Substratkonzentration $[E_0]$ und $[S]$. Man nimmt hier an, dass ein Enzym- und Substratmolekül sich zu einem Enzym-Substrat-Komplex vereinen und dieser wird dann später entweder in Enzym und Produkt oder in seine Ausgangsbestandteile zurück zerfallen. Ob diese Reaktion schnell oder langsam passiert hängt von den jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten k ab.



Wenn die Substratkonzentration steigt, steigt auch die Reaktionsgeschwindigkeit, was Anfangs linear geschieht, aber später während die Substratkonzentration steigt, bleibt die Reaktionsgeschwindigkeit konstant und die Kurve flacht sich ab, das heißt dass eine weitere Steigerung der Substratkonzentration keinen Einfluss mehr auf die Geschwindigkeit des Enzyms haben kann. Jetzt kann man die Maximalgeschwindigkeit V_{max} rechnen. Wobei K_m die Michaeliskonstante ist. K_m ist sehr niedrig, das heißt, dass das Enzym schon bei niedriger Substratkonzentration eine Maximalgeschwindigkeit erreicht, mit anderen Worten, das Enzym arbeitet sehr effizient. Enzyme, die durch einen zufälligen Kontakt mit dem Substrat, besser gesagt durch eine Diffusion, zu einer Reaktion kommen, nennt man „katalytisch“

perfekt“, weil sie große Effizienz besitzen. Diese erreichen Werte für die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_m von mehr als 10^8 bis $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die Michaelis-Menten-Konstante variiert sich je nach Enzym und Substrat zwischen 10^{-3} - 10^{-6} mol/l . Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird nur bei sehr hohen Substratkonzentrationen erreicht, denn dann sind alle Enzyme aktiv, d.h. sie liegen als Enzym-Substrat-Komplex vor [78,79, 80].



$$v = \frac{k_{cat}[E_0][S_0]}{K_m + [S_0]} \quad (4.2)$$

$$v = k_{cat}[E]_t \frac{[S]}{K_m + [S]} = V_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (4.3)$$

$$V_{max} = k_{cat} \times [E]_t \quad (4.4)$$

Abb. 4.1 K_m ist die Michaeliskonstante und besteht aus der Substrat-Konzentration, die V_i erzeugt, welches die Hälfte von V_{max} ist. Die gesamte Enzymkonzentration und Substratkonzentration bezeichnet man mit E_0 und S_0 . An niedrigen Werten von $[S]$ erhebt sich die anfängliche Geschwindigkeit, V_i , fast geradlinig mit der Erhöhung $[S]$ aber wenn $[S]$ zunimmt, pendeln sich die Zunahme von V_i (das Formen einer rechteckigen Hyperbel). Deswegen variiert auch die V_{max} , die maximale Geschwindigkeit der Reaktion [81].

4.1.1 Linearisierungsverfahren

Dieses Verfahren wird sehr oft für eine schnelle grafische Darstellung von K_m und V_{max} verwendet. Ein Nachteil dabei ist, ist dass ein nicht-lineares Diagramm, durch Linearisierungsverfahren weitgehend ausgeschaltet werden kann. Es gibt dabei für Umformungen der Michaelis-Menten-Gleichung drei einfache Linearisierungen: das Lineweaver-Burk-Diagramm, Hanes-Diagramm und das Eadie-Hofstee-Diagramm.

4.1.1.1 Lineweaver-Burk-Diagramm (doppelt-reziproke Auftragung)

Der lineweaver-Burk-Diagramm besteht aus einer doppelt-reziproken Umkehrung der Michaelis-Menten-Gleichung. Der $1/v$ wird hier als Funktion von $1/[S]$ aufgetragen.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}[S]} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]} \quad (4.5)$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (4.6)$$

Hier werden die beiden Variablen v und $[S]$ getrennt voneinander aufgetragen, was einen großen Vorteil gegenüber anderen Linearisierungsverfahren darstellt. Besonders bei Hemm- und Mehrsubstrat-Mechanismen wird die Interpretation leichter. Der wesentlichste Nachteil ist, dass es leider oft zu erheblichen Verfälschungen der Ergebnisse kommt. Die Daten sind hier durch eine reziproke Darstellung ungleich verteilt. Daher ist diese Methode zur Auswertung unverlässlich weil man von einer Seite (in Richtung des Achsenkreuzes) eine Stauchung der Daten und von der anderen Seite (in die entgegengesetzte Richtung) eine Spreizung der Daten sieht. Das heißt hier eine Ungleichverteilung zustande kommt, was sich auf die abhängige Variable v und auf deren Fehlergrenzen auswirkt. Deswegen verwendet man die Michaelis-Menten-Parameter ohne lineare Regression, die zu deutlich genaueren Ergebnissen führt [82,83].

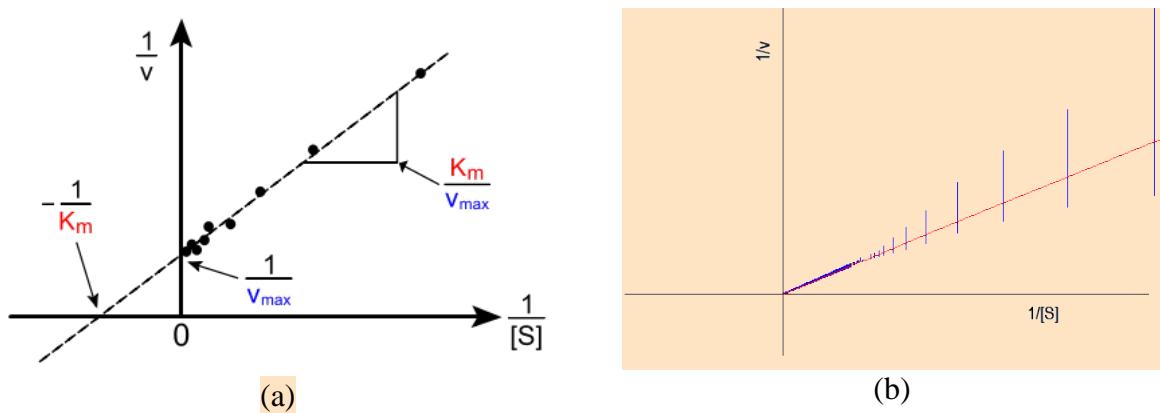


Abb. 4.2. (a) In der grafischen Darstellung des Lineweaver-Burk-Diagramms wird der reziproke Umsatzgeschwindigkeit $1/v$ gegen die reziproke Substratkonzentration $1/[S]$ aufgetragen und dabei entsteht eine Gerade mit der Steigung K_M/v_{\max} , die die Abszisse bei $1/K_M$ schneidet; (b) Fehlergrenzen bei der Lineweaver-Burk-Darstellung [78,82, 83].

4.1.1.2 Eadie -Hofstee-Diagramm

Das ist eine graphische Auftragung und Linearisierung der Michaelis-Menten-Gleichung. Dabei schneidet die Gerade bei der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit die Ordinate. Die Steigung ist die negative Michaelis-Menten-Konstante. Es wird V gegen $V/[S]$ aufgetragen und so enthält man V_{\max} und $-K_M$ aus dem Ordinatenschnittpunkt und aus der Steigung der Geraden. Eine der größten Nachteile dieser Linearisierung, liegen in der fehlenden Variablentrennung und einer Verzerrung der Fehlergrenzen, die sich von der Mitte des Diagramms zu hohen und niederen Substratkonzentrationen ausweiten [82].

$$v = v_{\max} - k_M \frac{v}{[S]} \quad \begin{aligned} k_M &= \text{Michaelis-Menten-Konstante} \\ v_{\max} &= \text{maximale Reaktionsgeschwindigkeit} \end{aligned} \quad (4.7)$$

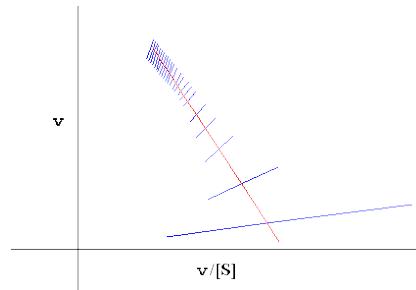


Abb. 4.3. Fehlergrenzen des Eadie-Hofstee-Diagramms [83].

4.1.1.3 Hanes-Diagramm

Multipliziert man die reziproke Michaelis-Menten-Gleichung mit der Substratkonzentration $[S]$, ergibt sich das Hanes-Diagramm und so wird $[S]/v$ gegen $[S]$ aufgetragen. Die Steigung der Gerade ist $1/v_{\max}$ und die kreuzt die Abszisse und die Ordinate in der Reihenfolge bei $1/K_M$ und bei K_M/v_{\max} . Hier findet geringere Fehlerverzerrung statt, aber weil die Substratkonzentration in beide Achsen (X und Y-Achsen) mitwirkt, erfolgt keine Trennung der Variablen.

$$\frac{[S]}{v} = \frac{[S]}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \quad (4.8)$$

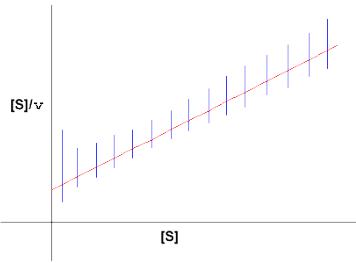


Abb. 4.4 Fehlergrenzen des Hanes-Diagramm [83].

4.2 Spektralphotometrie

Auch Kolorimetrie oder Absorptionsphotometrie genannt. Durch diese Methode kann man die Konzentration eines gelösten lichtabsorbierenden Substrates in einer Lösung messen und zwar durch eine Vergleichsmessung einer bekannten Konzentration (Probe). Diese Methode basiert auf einen Lichtstrahl mit bestimmter Wellenlänge und Intensität, der durch eine Glasküvette mit bestimmter Dicke und gefüllt mit Proben, geleitet wird. Bestimmte Wellenlängen des Lichtes wird je nach Art des Substrats unterschiedlich absorbiert, wobei die Konzentration des Stoffes, die Stärke der Absorption bestimmt, welches durch Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet werden kann [78].

4.2.1 Die elektromagnetischen Strahlungen

Die elektromagnetischen Strahlungen bestehen aus sichtbarem Licht (welches wir mit dem Auge direkt wahrnehmen) und aus für uns unsichtbarem Licht wie UV- bzw. IR-Strahlung. Wobei das sichtbare Licht, wenn es zerlegt wird, selbst aus einem farbigen Spektrum besteht. Das Spektrum beginnt mit violetter Farbe in 380-450 nm; blau 450-500 nm; grün 500-570 nm; gelb 570-590 nm; orange 590-620 nm; rot 620-780 nm. Die kurze Wellenlängen sind UV-Strahlung bei <380 nm. und Lange Wellenlänge sind IR-Strahlung bei >780 nm.

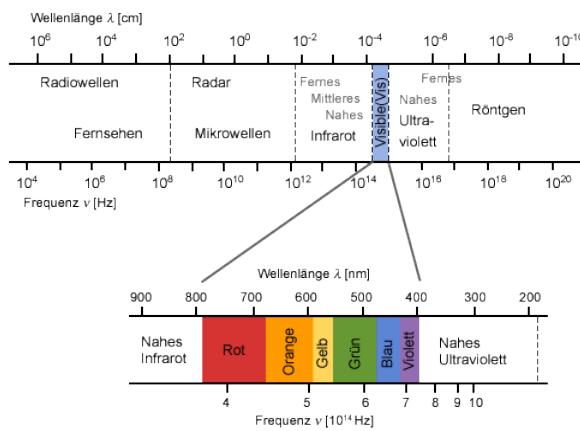


Abb.4.5 Schematische Darstellung der elektromagnetischen Strahlungen.[79]

Als nächstes, was in dieser Methode wichtig ist, ist die Lichtintensität, die nicht eindeutig definierbar ist. Wenn Licht (I_0) auf ein klares, nicht trübes Medium fällt, wird ein Teil davon reflektiert (I_{re}), ein Teil davon transmittiert (I_{tr}) und der andere Teil wird absorbiert (I_{ab}). In der Absorptionsphotometrie bemüht man sich, in einem Medium, dieses absorbierte Licht zu bestimmen.

$$I_o = I_{re} + I_{ab} + I_{tr} \quad (4.9)$$

Man misst die bestimmten Wellenlängenbereiche, wo das Licht absorbiert oder reflektiert wurde, um Substanzen zu charakterisieren. Jede Substanz absorbiert oder reflektiert aufgrund ihrer Struktur, das Licht in einer ganz charakteristischen Art und Weise. Das Licht regt die Atome bzw. Moleküle an. Diese angeregte Energie wird in Form von Wärme und sichtbarer Strahlung (Fluoreszenz) wieder abgegeben [84].

4.2.2 Absorption und Konzentration

In einer Lösung, in der eine Substanz mit verschiedener Konzentration gelöst ist, hängt die Absorption und damit auch die Extinktionskonstante von Lösungen, von der Konzentration c , des gelösten Stoffes ab. Das gilt sogar für die Lösungen, die sehr stark verdünnt sind.

Beersche Gesetz: Bei vielen Lösungen ist die Extinktionskonstante K , bei geringen Konzentrationen ($c < 10^{-2} \text{ mol/l}$), proportional zu der Konzentration des gelösten Stoffes. Dieses Gesetz gibt als analytische Methode eine Grundlage für die moderne Fotometrie und ist für monochromatische Strahlung (Licht) geeignet d.h. man kann die Konzentration der gelösten Substanzen in einer verdünnten Lösung fotometrisch messen.

$$K = k \cdot c \quad (4.10)$$

k = Proportionalitätskonstante

Damit wird Gleichung (4.9) zu:

$$I_a = I_e \cdot e^{-k \cdot c \cdot x} \quad (4.11)$$

Wenn man diese Gleichung vereinfacht und den Begriff Extinktion E zuführt, dann erhält man folgende vereinfachte Formel:

$$E = -\log \left(\frac{I_a}{I_e} \right) \quad (4.12)$$

Setzt man Gleichung (4.11) in Gleichung (4.12) ein, so ergibt sich dann:

$$E = -\log e^{-k \cdot c \cdot x} = k \cdot c \cdot x \cdot \log e = \epsilon \cdot c \cdot x \quad (4.13)$$

$k \cdot \log e$ wurde durch ϵ ersetzt, so lautet dann das **Bouguer-Lambert-Beersche** Gesetz oder Lambert-Beersche-Gesetz:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot x \quad (4.14)$$

Die Extinktion E (mit der Einheit eins) einer monochromatischen Strahlung, ist dem Produkt aus der Konzentration c (mit der Einheit mol/l oder mol/liter) und der Schichtdicke x (mit der Einheit m oder cm) einer Lösung, proportional. Die Konstante ϵ (mit der Einheit m²/mol oder cm²/μmol) heißt Extinktionskoeffizient, welche wellenlängenabhängig ist und für jede Stoffart eine spezifische Größe hat $\epsilon = \epsilon(\lambda)$ [84].

4.2.3 Hinweise bei der Messung

Bevor mit dem Ablesen begonnen wird, sollte die Abdeckhaube des Photometers geschlossen sein. Die Sonneneinstrahlung direkt auf dem Gerät, kann sogar bei geschlossenem Deckel, die Messwerte beeinträchtigen. Die Optik des Photometers, die Filter und die Küvetten sollten sauber sein (Kleenex fusselfrei benutzen) und auch frei von Fingerabdrücken auf den Küvetten. Die Küvetten werden zuerst mit Alkohol und dann mit dest. Wasser gewaschen. Vor den Messungen sollte nicht vergessen werden, die Wellenlänge einzustellen und die bestimmten Skalenwertes auszuwählen. Die Messwerte und eventuell die Grafiken können mittels Spezialdrucker ausgedruckt werden. Vor den Messungen müssen alle Substanzen ganz schnell miteinander gemischt werden, weil die Reaktionen bereits zum Zeitpunkt wo die Substanzen in die Lösung pipetiert werden, bereits abzulaufen beginnt. Genauso schnell sollte mit der Messung angefangen werden. Das Programm wird automatisch alle drei Sekunden ein Mal messen und endet automatisch nach 99 Messungen. Wenn weitere Messungen benötigt werden, sollte man ganz schnell handeln und wiederum auf Start drücken, sonst sehen wir auf den Kurven eine Zeitlücke, wo das Programm keine Werte gemessen hat. Eine saubere Meßküvette sollte immer bis etwa 3/4 voll sein, so dass der ganze Meßparallellichtstrahl durch die Flüssigkeit hindurch treten kann. Man sollte beim Umgang mit der Kristallküvette ganz vorsichtig sein [84].

Kapitel 5

Material und Methoden

5.I Organismen

5.I.I *Synechocystis* (Cyanophyceae; Chroococcales; Chroococcaceae)

Im Jahr 1968 wurde das einzellige, im Süßwasser vorkommende Cyanobakterium isoliert und wurde als *Synechocystis PCC 6803* bezeichnet. Das erste Cyanobakterium, dessen Genom im Jahr 1996, vollständig sequenziert wurde. Das Genom ist zirkular und umfasst 3.573.470 Basenpaare. Durch die leichte Handhabung und sehr schnelles Adaptationvermögen, war *Synechocystis PCC 6803* in unserer Arbeit das beliebteste Untersuchungsobjekt. *Synechocystis* ist einer der am meisten studierten Cyanobakterien, weil es sowohl autotroph als auch heterotroph überleben kann. *Synechocystis* kann zwar auch in wenig Licht bis zur völligen Dunkelheit wachsen, aber dann verlangen sie, aus unbekannten Gründen, ein Minimum von 5 bis 15 Minuten (blaues) Licht pro Tag [Bild 3, 85].

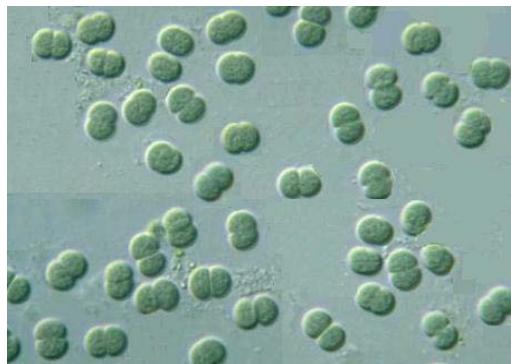


Abb.5.1 *Synechocystis*

5.I.2 *Anacystis nidulans* (Cyanobacteria; Chroococcales; Synochococcus)

Die einzelligen Cyanobakterien, der Gruppe *Synechococcus* besetzen einen wichtigen Platz am Anfang der marinen Nahrungskette. Sie kommen sehr zahlreich vor und haben die Fähigkeit Hauptnährstoffe zu aufzunehmen und Metalle von submikromolarer Konzentration im Ozean aufzuspüren. Die zylinderformige, frei schwimmenden Zellen kommen einzeln oder als Klumpen (2-4 Zellen, die sich nicht nach der Teilung völlig geteilt haben) vor und sie leben unter anderem im Süßwasser und sind Photoautotroph. Sie sind 1µm breit und können drei Mal so lang sein. Ihre Zellwand ist einem Gramm negativer Typ ähnlich. Der Zellinhalt ist größtenteils gleichmäßig verteilt, aber sie haben manchmal sichtbare Granulen. Sie kommen mit unterschiedlichen Farben vor, wie blass blau-grüne Farbe oder olivgrün bis gelb und rot [86,87]. *Anacystis nidulans PCC 6301* ist ein Modellorganismus für photosynthetische Studien, für Kohlenhydrat- und Stickstoff-Assimilationen und besonders für Untersuchungen von Stresssituationen [3, 86, 88 Bild].

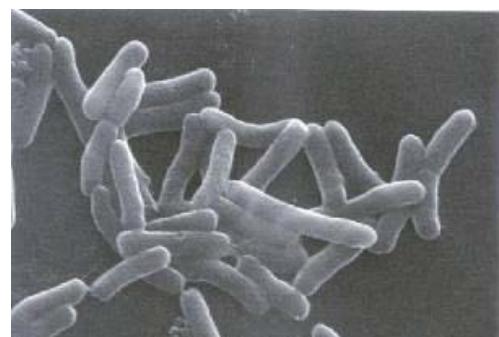


Abb.5.2 *Anacystis nidulans*

5.1.3 *Anabeana* (Cyanobacteria; Nostocales; Nostocaceae)

Anabeana PCC 7120 ist ein gramnegatives, aerobes, freibewegliches, fadenförmiges Cyanobakterium, welches Stickstoff und CO₂ durch Anwendung der Photosynthese bindet. Sie sind unverzweigte, einzellreihige Fäden, die in blaugrüner, graugrüner bis gelbgrüner Farbe erscheinen und besitzen gerade oder spirale Trichome, ohne Scheide. Die Heterocysten, die häufig farblose und dickwandig bzw. etwas größere Zellen in den Fäden sind, sind interkalar oder terminal liegend. Diese Heterocysten sind in der Lage Luftstickstoff zu fixieren und zu Ammonium zu reduzieren. Die einzelnen Zellen sind kugelförmig bis zylindrisch. Das Wachstum erfolgt durch Zellteilung innerhalb des Fadens. Die Vermehrung erfolgt ungeschlechtlich durch Fragmentation der Fäden. Ungünstige Perioden werden als Dauerstadien überdauert, als länglich ovale Akineten. *Anabeana* ist von erheblicher globaler Bedeutung, da es einen wichtigen Beitrag zur CO₂-Sequestrierung leistet (Fixierung des CO₂, somit gelangt es nicht in die Atmosphäre). Es kommt nicht direkt im Meerwasser vor, sondern eher in Süßwasser bzw. salzwasserhaltigen Seen und es ist selten symbiotisch (z.B. bei trop. Wasserfarn Azolla in Blatthöhlen). Manche Arten können Nervengifte bilden: Anatoxin, das Viehsterben auslösen kann. Einige Arten werden auf Reisfeldern eingesetzt als effektiver natürlicher Dünger. Das Genom besteht aus 7,2 Millionen Basenpaare und die Genomsequenzierung und die komplette Genom-Kartierung wurde im Jahre 1999 durchgeführt [89, Bild].



Abb. 5.3 *Anabeana*

5.2 Laborvoraussetzungen

5.2.I Geräte und Laborutensilien

- Autoklaven Getinge GE 666 EC-1
- Trockner
- PH-Meter
- Analysewaagen, und Präzisionswaagen
- Inokulations-Box, Flaschen
- Erlenmeyerkolben; Mess-Pipetten, Kolben, Zylinder; Der Pipettierball; Bechergläser; Pasteurpipette
- Hämatokritröhren
- JA-10, SW-28, TI-60-Zentrifugenbecher(500ml)
- French-Press American Instrument Company USA
- Zentrifuge zur Zellernte; Beckmann J2-21 M Induction Drive Centrifuge, JA-10 Rotor
- Zentrifuge zur Hämatokritwert Bestimmung; Beckmann J21-B
- Ultrazentrifuge zur Auftrennung der Membranen; Beckmann XL-90, Beckmann SW 28 Ausschwingrotor; Beckmann Ti-60 Rotor
- Schuttler NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO: INC: ;G24 ENVIRONMENTAL INCUBATOR SHAKER
- CO₂ und Luft Pumpe
- Aquarium und Warmwasser / Zirkulator bewegt das warme Wasser ständig im Kreislauf.
- Spektralphotometer Shimadzu UV-VIS_NIR Scanning Spectrophotometer.
- Plastik- und Kristallküvetten.

5.2.2 Material

- Waschpuffer
- Phosphatpuffer
- isotonem Medium(20% w/w Saccharose)
- Lysozym, Sigma
- Desoxyribonuklease I, Sigma
- Proteaseinhibitior 100 mM Phenylmethansulfonylfluoride PMSF in Methanol
- Saccharose-Lösungen werden in Phosphatpuffer hergestellt. (35%, 30%, 10% (w/w))
- Bradford-Lösung und BSA(bovine serum albumin)

5.2.2.1 Herstellung Waschpuffer

- Waschpuffer: 10mM Hepes/NaOH mit pH 7,4. Der pH-Wert wird mit 10mM NaOH eingestellt.
 - 10mM HEPES
 - 10mM Na₂EDTA
 - 10mM NaCl

5.2.2.2 Herstellung Phosphatpuffer

- Phosphatpuffer: 10mM und besteht aus
 - 5mM K₂PO₄.3H₂O
 - 5mM KH₂PO₄

5.2.2.3 Herstellung Bradford- Lösung

0,01% Coomassie Brilliant Blue, 4,7% Ethanol, 8,5 % H₃PO₄, 100mg Coomassie Brilliant Blue gelöst in 50ml 95 %igem Ethanol, 100ml 85%ige Ortho-Phosphorsäure zugesetzt und auf 1 Liter mit destilliertes Wasser aufgefüllt.

5.2.2.4 Herstellung BSA(Eichlösung)

Die Konzentrationen von BSA-Lösungen, die verwendet werden, sind unterschiedlich. Deswegen werden diese Lösungen in zwei Konzentrationen hergestellt.

- 0,1 mg BSA in 1ml H₂O
- 1,0 mg BSA in 1ml H₂O

5.3 Kultivierung und Zucht

5.3.1 Zuchtmédien

Die Kulturmedien und weitere Laborutensilien werden sterilisiert. Um das Ausfällen der Salze in den Kulturmedien zu vermeiden, müssen wir diese immer vor dem autoklavieren in die Hauptbestandteile trennen, um sie dann getrennt zu autoklavieren. Danach wenn beide Teile abgekühlt sind, werden sie wieder zusammen gemischt. Die Ernten und Inokulieren werden in der Inokulationsbox vollzogen. Alle Zuchtmédien besitzen eine pH-Wert von 7,4; dieser wird eingestellt mit Konzentration H₂SO₄.

5.3.I.1 Kratz und Myers Medium

Die Zusammensetzung dieses Medium sehen sie in diesen zwei Tabellen.

Hauptbestandteile	g/l	mM
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	1,31	5,74
NaHCO ₃	0,84	10
NaCO ₃	0,106	1
NaNO ₃	1,5	17,7
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,15	0,610
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,01	0,042
NaEDTA	0,064	0,204
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,0042	0,016

Tabelle 5.1

Spuren	g/l	mM
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,82	30,7
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57	6,28
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,44	7,28
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,4	1,68
Na ₂ MoO ⁴ .H ₂ O	1,01	4,17

Tabelle 5.2

5.3.I.2 BG-II Medium

Die Zusammensetzung dieses Mediums sehen sie in diesen zwei Tabellen:

Hauptbestandteile	g/l	mM
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	43,89	1,919
NaHCO ₃	840	10
NaCO ₃	106	1
NaNO ₃	1500	17,7
MgSO ₄ .7H ₂ O	150	0,610
CaCl ₂ .2H ₂ O	36	0,25
Citronensäure	6	0,031
Eisenammoniumcitrat	6	0,023
Na ₂ EDTA	1	0,003

Tabelle 5.3

Spuren	g/l	mM
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222	0,77
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079	0,32
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81	9,15
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0494	0,21
H ₃ BO ₃	2,86	46
Na ₂ MoO ⁴ .H ₂ O	0,39	1,6

Tabelle 5.4

5.3.I.3 BG-II Shaker Medium

Die Zusammensetzung dieses Mediums sehen sie in diesen zwei Tabellen:

Hauptbestandteile	g/l	mM
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	43,2	0,19
Na ₂ CO ₃	20	0,19
NaNO ₃	1500	17,6
MgSO ₄ .7H ₂ O	75	0,3
CaCl ₂ .2H ₂ O	36	0,24
Citronensäure.H ₂ O	6	0,029
Eisenammoniumcitrat	6	0,023
Na ₂ EDTA	1	0,003

Tabelle 5.6

Spuren	g/l	mM
Co(NO ₃) ₂ .6 H ₂ O	0,0494	0,21
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81	9,15
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0494	0,21
H ₃ BO ₃	2,86	46,3
Na ₂ MoO ⁴ .2H ₂ O	0,39	1,6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222	0,77
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079	0,32

Tabelle 5.7

5.3.2 Kulturen

5.3.2.1 Langzeitkulturen

Die Reservekulturen auf Agarplatten garantieren eine Sicherung, für den Fall wenn die anderen Kulturen nicht aktiv wachsen sollten. Bei den Langzeitkulturen ist das Wachstum der Zellen extrem eingeschränkt, somit werden die Zellen über längere Zeit konserviert erhalten. Das Nährmedium(BG-11 oder K&M, je nachdem welche Spezies darauf wachsen soll) wird mit 1,5% Agar gemischt und in Petrischalen gegossen. Je nach Medium werden dann unterschiedliche Spezies auf den Agarplatten eingesetzt. Die Zellen werden unter sterilen Bedingungen, mit ausreichendem Licht, bei 32 Grad Celsius und bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80%, im Brutschrank inkubiert. [95]

5.3.2.2 Tiefkühlkulturen

Die Tiefkühlkulturen kann man über mehrere Jahre aufbewahren. Die Zellen werden mit 0,5 ml DMSO gemischt, durch flüssigen Stickstoff (so wird die Bildung von Eiskristallen vermieden) sofort eingefroren und bei -70 Grad Celsius gelagert.

5.3.2.3 Vorkulturen

Die gewachsene Zellen auf der Agarplatten, werden unter sterilen Bedingungen, in 100ml vom geeigneten Medium von Shaker (BG 11-, K&M-Shaker), im Erlenmeyerkolben, inkuliert und wiederum bei gleicher Bedingungen wie bei Langzeitkulturen, aber mit 30 °C, deponiert. Die Öffnung des Erlenmeyerkolbens wird mit Watte verschlossen und in Schuttler kultiviert.

5.3.2.4 Zuchtkulturen

Die Zuchtfaschen werden bis zur Hälfte mit geeignetem Nährmedium für die Zellkulturen eingefüllt. Anschließend kommt ein Teil der Vorkulturen hinein, und zwar soviel bis eine entsprechende Zelldichte erreicht wird. Die Zuchtfaschen werden im Aquarium mit geeignetem Licht und entsprechender Temperatur deponiert. Hier fordern die unterschiedlichen Spezies die geeignete Lichtintensität, Nährmedium und Temperatur. Die Belüftung erfolgt mit 1,5 %ige (v/v)CO₂.

5.4 Zellpräparation

Um die Aktivität von Enzymen der Atmungskette, auf der Cyanobakterielle Membranen erfolgreich zu messen, benötigt man die isolierte Membran und zwar die cytoplasmatischen und intracytoplasmatischen Membranen, denn nur diese Beiden besitzen die Proteinkomplexe der Atmungskette. Die äußeren Membranen sind enzymatisch inaktiv. Isolierung von ICM und CM erfolgt durch eine ausgezeichnete Methode, und zwar die sog. **Saccharose-Dichteradianten-Zentrifugation** [90, 91]. Die Auf trennung von ICM und CM erfolgt durch diese Methode aufgrund unterschiedlicher Dichte, ISOPYKNISCH. Zur Isolierung sollten zuerst die gezüchteten Zellen aufgeschlossen werden.

5.4.1 Zelldichte

Wenn die gezüchteten Zellen in den Zuchtfaschen, eine bestimmte Dichte mit einem

Hämatokritwert von 6-10 μ g/ml erreicht haben, dann erfolgt die Zellernte. Das Erreichen dieser Hämatokritwerte ist wichtig weil bei einem zu niedrigen Wert keine Atmungsaktivität festgestellt wird. Der Grund für geringere Werte könnte ausreichendes Licht sein, denn dann verzichten die Zelle ihre Atmungsaktivität zu betreiben, deswegen produzieren sie dann auch weniger Proteinkomponenten der Atmungskette.

5.4.2 Zellernte und Waschprozess

Aus den Zuchtflaschen werden die Zellsuspensionen entnommen und transferiert (unter sterilen Bedingungen), in JA-10 500ml Zentrifugenbecher. Die Zentrifugation dauert 10 min. bei RT und bei 8000rpm. Danach wird der leicht bräunliche Überstand abgegossen und die dabei entstandenen grünen Pellets wiederum, werden in Waschpuffer (pH 7,4) aufgenommen und gelöst und der ganze Prozess erfolgt wieder von vorne solange bis der Überstand klar wird. Hier ist die Bildung von den Pellets, zwischen den verschiedenen Spezies, unterschiedlich. Während die *Anabeana PCC 7120* und *Anacystis nidulans PCC 6301* dichte, hellgrüne Pellets bilden, bildet *Synechocystis PCC 6803* lockere, dunkelgrüne Pellets, dass sich beim Waschen sehr leicht auflöst und es besteht die Gefahr, dass es beim Abgießen vom Überstand weggewaschen wird.

5.4.3 Bestimmung der Zelldichte (Phykokritbestimmung)

Diese wird durch Bestimmung des Hämatokritwerts ermittelt. Das ist die Zelldichte in μ l eingesetzter Suspension pro ml. Um die Dichte von Zellen zu bestimmen, werden sie in Hämatokritröhren ca. 10 min. in RT bei 7000rpm, mittels Ausschwingrotors JA20 10 in Backmann J21 B Zentrifuge, zentrifugiert. Danach wird die Zellsuspension auf einen Hämatokritwert von 80-100 μ l /ml eingestellt, damit man bei der French-Press eine hohe Aufschlußrate bekommen kann.

5.4.3.1 Einstellung der Hämatokritwert

Die Suspension wird 8 Min. bei 8000rpm und RT zentrifugiert und dann in isotonem Medium (20% w/w Saccharose) aufgenommen, so dass die gewünschte Dichte zustande kommt.

5.4.3.2 Beseitigung der Zellbarriere

In der Suspension kommt dann 0,2% Lysozym hinzu und wird inkubiert in Schüttler für 90 min., bei einer Temperatur von 39°C. Das mit EDTA erhaltene Medium (Chelatbildner mit zweiwertigen Kationen), destabilisiert die äußeren Membranen, weil die anionische Lipopolysaccharidschicht ihren Halt verliert. Außerdem verdaut das Lysozym die Peptidoglykanschicht und damit kann die Zelle besser und leichter aufgeschlossen werden. Nachdem die Inkubationszeit vorbei ist, wird die Zellsuspension 9 min., bei 9000rpm, in RT zentrifugiert und am Ende wird der lila färbigen Überstand (kommt vom austreten des Phykokyanins in der Lösung) abgegossen und die Pellets werden in hypotonem Medium (Waschpuffer) aufgelöst. Dieses Medium bewirkt einen osmotischen Schock auf die Zelle, damit werden die Späroplasten aufgequellt und mit dem Aufplatzen der Zelle erfolgt ein austreten der Proteasen in der Lösung. Aus diesem Grund ist hier nicht mehr weitere Arbeit in der RT erforderlich, sondern eine geeignete Temperatur von 4 °C. Um die Aktivität der Proteasen zu hemmen, wird eine sog. Proteaseinhibitior; 10 mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluoride in Methanol) in die Lösung zu gegeben. Die DNA liegt somit frei in der Lösung und bewirkt eine Viskosität, die durch eine spatel spitze Desoxyribonuklease I, Sigma verhindert wird.

5.4.4 French-Press

Die Zellsuspension, die oft zwischen 100 bis 200ml (*kontinuierlichen Betrieb* oder *Volumina* variiert, wird unter großem Druck durch ein enges Ventil gepresst. (Manton-Gaulin-Homogenisator). French-Press arbeitet mit dem gleichen Prinzip wie der Manton-Gaulin Homogenisator. Hier bewirken die Kavitationskräfte, den Aufschluss [3]. Die Behandlung der versch. Spezies verläuft unterschiedlich, weil die *Synechocystis PCC 6803* Spezies aufgrund der vorhandenen Schleimhülle ein vorpressen bei niedrigerem Druck benötigen. Diese Vorbehandlung bei 280 psi, lockert durch Scherkräfte die Schleimhülle von *Synechocystis PCC* auf und bei anschliessender Behandlung mit 680 psi, werden die Zelle in French-Press leichter durch die Öse ($\varnothing 1\mu\text{m}$) gequetscht und aufgebrochen. Bei den anderen Spezies ist eine solche Vorbehandlung nicht notwendig. Die somit zertrümmerte Lösung wird weiter 8 Min. bei 9000 rpm, in Temperatur von 4 °C, zentrifugiert. Das Pellet wird diesmal verworfen, weil es aus gebrochenen Zellwänden und Überresten der Zellstrukturen besteht. Der Überstand, der aus Rohmembrane, Membran-Proteinen, so wie Atmungskomponenten, Pigmenten und Zellsäften besteht, wird aufbewahrt.

5.4.5 Membran Präparation (CM und ICM Trennung)

Der Überstand ist eine Membranvesikelsuspension, welche auf eine 42%ige w/w Saccharoselösung gebracht wird. Diese Suspension dient dann als erste, unterste Fraktion im Dichtegradienten. Achtung: Die Saccharose sollte in der Rohmembran vollständig gelöst werden. Die Rohmembran bleibt die ganze Zeit, während die Saccharose aufgelöst wird, in einem eiskalten Wasserbad, weil die Temperatur auf 4 °C konstant erhalten werden muss. Während des Auflösens der Saccharose, sollte man übermäßige Schaumbildung vermeiden. Schaumbildung ist ein Zeichen der denaturierenden Proteine. Nach der Reihe pipetieren wir die Dichtegradienten-Fraktionen in den kaltgestellten SW-28 Zentrifugenbechern. 18ml **42%**iger Rohmembran; 6ml **35%**ige Zucker-Lösung; 8ml **30%**ige Zucker-Lösung; und am Ende die 3ml **10%**ige Zucker-Lösung. Dieser Vorgang passiert in kalten Bedingungen und mit viel Ruhe und Geduld, um ein vermischen der Schichten zu vermeiden. Das Gewicht eines jeden einzelnen SW-28 Zentrifugenbechers, wird noch mal überprüft, um sie eventuell zu tariieren. Dieser Vorgang sollte ganz schnell geschehen, um eine Temperaturänderung zu vermeiden. Am Ende werden sie mindestens 18 Stunden bei 4 °C und 27,000 rpm, im Ausschwingrotor SW-28, in vor gekühlter Ultrazentrifuge, zentrifugiert.

5.4.6 Abnahme von Membranen und Waschprozesse

Man erwartet sich durch diese isopyknische Ultrazentrifugation, dass bei den 10%igen Zuckerschichten sich die Karotinoid-Pigmente ansammeln, bei den 30% und 35%igen Zuckerschichten die CM und bei den 42%igen Zuckerschichten ICM (über dem Pellet) ansammelt. Das heißt, dass nach der Zentrifugation, sich die einzelnen Protein Vesikeln je nach ihrer Dichte aufteilen. Wobei diese Aufteilung, je nach Spezies unterschiedlich sein kann, z.B. bei Aufteilung CM und ICM bei *Synechocystis PCC 6803* ist aufgefallen, dass die Bildung einer CM Schicht stärker erkennbar ist, als bei *Anacystis nidulans PCC 6301* und *Anabeana PCC 7120*. Bei *Anabeana PCC 7120* ist die Bildung von Karotinoid-Bande sehr auffällig und gibt von wenig bis keine CM zu erkennen. Dafür hat *Anacystis nidulans PCC 6301* fast immer eine ganz unauffällige Übergangsschicht gebildet. Die CM und ICM werden nach der Reihe vorsichtig mit Pasteurpipetten entnommen. Das Pellet wurde außerdem in wenig 10mM Phosphatpuffer aufgenommen.

5.5 Messung

Die Membranen sind jetzt getrennt und werden für die Messung vorbereitet in dem der Zucker wiederum weggewaschen wird. Dafür werden die aufgeteilte Membranen (ICM und CM) in 3-4 fachen Volumen, 10mM Phosphatpuffer aufgenommen, langsam durchmischt und in vorher kalt gestellte TI-60 Zentrifugenbecher überführt, eventuell tariert und gute weitere 50min. bei 50000rpm und in 4 °C im TI-60 Rotor in Ultrazentrifuge geschleudert. Das Pellet (ICM ist grün und CM dunkelorange) wird in wenig 10mM Phosphatpuffer aufgenommen. Es muss noch angemerkt werden, dass während der Aufnahme von CM mit den Pasteurpipetten es oft zur Vermischung dieser beiden Schichten kommt. Sie zeigen beide die gleiche Farbe, ausserdem liegen die CM und die Karotinoidschichten sehr nahe bei einander, somit werden unvermeidlich Karotinoide aufgenommen. Aber dieses Problem löst sich von selbst, weil hier in dieser Phase, CM ein Pellet ausbildet, was Karotinoid-Pigmente nicht können und damit verbleiben diese in der Lösung. Das heisst, in dieser Phase werden diese beiden Substanzen vollständig getrennt. Die Aktivität von CM und ICM kann 2-3 Tage gemessen werden, sie bisher in 4°C aufbewahrt wurden, und durch mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren. Obwohl dies nicht bei vielen Spezies besonders erfolgreich ist, ist es bei **Synechocystis PCC 6803** recht gut anwendbar. Gerade durch diese leichte Handhabung hat sich diese Spezies bei unserer Forschungsarbeit ganz beliebt gemacht.

5.5.1 Proteinbestimmung

Bevor man die Aktivität von Membrane messen kann, sollte der Proteinengehalt quantitativ berechnet werden. Die Protein Konzentrationen kann man nach **Bradford** (eine spektralphotometrischer Test) bestimmen. Diese Methode basiert nach der Bindung des Coomassie Brilliant Blue an basische Aminosäuren. Währenddessen verändert die Coomassie sein Absorptionsmaximum und verändert und verschiebt sich hin zur Wellenlänge 595 nm. Diese Absorptionsänderung wird in dieser Methode gemessen und die Konzentration des unbekannten Proteins wird damit mitberechnet. Hier wird Rinder- Serum-Albumin für die Eichung verwendet. Als Voraussetzung sollte das unbekannte Protein einen annähernd gleichen Gehalt an basischen Aminosäuren wie die Eichungen zeigen. Für die Herstellung von Bradford- Lösung oder Eichlösungen siehe 5.2.2.3 und - 4 [92].

	Nr.	µl BSA/Probe	µl H ₂ O	µl Bradfordlsg.	Endkonz./µg/ml
Standard	1	0	50	950	Leerwert
	2	20(100µg/ml)	30	950	2
	3	50(100µg/ml)	0	950	5
	4	10 (10mg/ml)	40	950	10
	5	15(10mg/ml)	35	950	15
	6	20(10mg/ml)	30	950	20
	7	25(10mg/ml)	25	950	25
Proben	8	Roh 50 (Pur)	-	950	? Gemessen
	9	Roh 50(1:10)	-	950	? Gemessen
	10	Roh 50(1:100)	-	950	? Gemessen
	11	ICM 50 (pur)	-	950	? Gemessen
	12	ICM 50(1:10)	-	950	? Gemessen
	13	ICM 50(1:100)	-	950	? Gemessen
	14	CM 50 (Pur)	-	950	? Gemessen
	15	CM 40 (Pur)	10	950	? Gemessen
	16	CM 30 (pur)	20	950	? Gemessen

Tabb.5.8 Standard- und Probenmengen bei Proteinbestimmung nach Bradford

Nach dieser Tabelle werden die Proben und BSA- Standard Proteine mit Bradford- Lösung gut gemischt und bei RT etwa zwischen 15 bis 30 Min. in der Dunkelkammer inkubiert (das Licht kann die Wirkung von Coomassie ändern oder vermindern, deswegen bleibt die Lösung während der Inkubationszeit in der Dunkelheit) Nach 30 Min. werden die Lösungen nach der Reihe d.h. zuerst Standard Lösungen und dann Proben in 595 nm gemessen. Durch die Messung der Standard- Lösungen wird eine Eichgrade erstellt. Die Eichgerade wird benutzt, um unbekannte Proteinkonzentrationen in unsere Proben zu berechnen. Bei Verdünnung von unbekannten Proteinlösungen (Proben) muss man darauf achten, dass später die Messwerte von den Proben immer im linearen Teil der Eichgrade liegen. Das heißt die Software berechnet die Konzentration der Proteine in den Proben mit Hilfe der Eichgrade und wenn die Verdünnung im linearen Bereich liegt, kann man später die tatsächliche Konzentration auch anhand der eingesetzten Mengen und Verdünnungen berechnen. Die Küvetten sollen während der Messung immer sauber sein, damit zu keiner Verfälschung der Ergebnisse kommt.

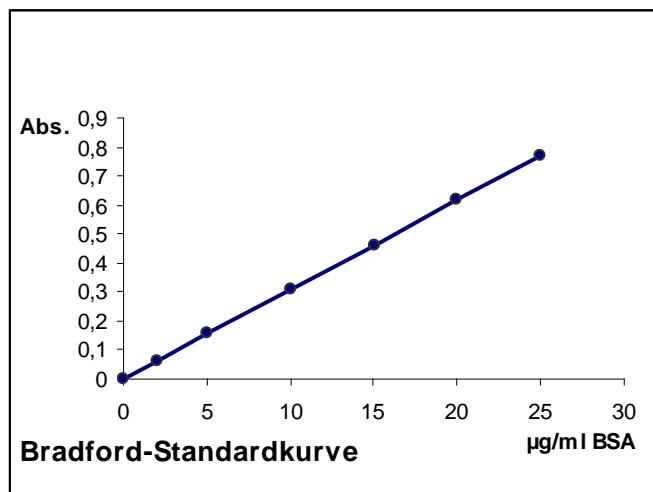


Abb.5.4 Hier ist eine Typische Eichkurve zusehen.

5.5.2 Spektralphotometrische Prinzipien

Die Methode (Spektralphotometrie) wird oft für Charakterisierung von Proteinen oder Proteinkreuzungen verwendet. Für allgemeine Informationen und bestimmte Hinweise siehe Kapitel 4 Teil 4.2.

Mit Hilfe dieser Methode kann man auch die Proteine der Atmungskette untersuchen wie *Cytochrom C oxidase* und *NADH-Dehydrogenase*. Die Aktivität der Cytochrom c Oxidase wird über ein zeitliches Verfahren berechnet, und zwar so, dass man die Konzentration an reduziertem Cytochrom c durch zwei Wellenlängenphotometrie misst. Also die Absorption wird zuerst bei 550 nm gemessen bei dieser Wellenlänge zeigt die reduzierte Cytochrom c einen a-Peak, welche der oxidierten Form fehlt. Als nächste wird die Absorption bei 540 nm gemessen. Hier ist der isosbestischer Punkt das heißt der Extinktionskoeffizient läuft unabhängig von Reduxstatus. Jetzt wird die Differenz von den beiden Werten, der als Funktion der Zeit angenommen wird, berechnet. Wobei hier die Störfaktoren der beiden Messungen sich im gleichen Maße zeigen und einfach durch abziehen der Werte ausgeglichen werden. Das ist eine der größten Vorteile bei diesem Verfahren. Der bei uns verwendeter Photometer misst nicht nach dem Gesetz der 2-Wellenlänge-Photometrie, sondern es ist eine alternierende Messung bei 550 nm und 540 nm, wo die Messdaten alle 3 Sek. diskontinuierlich als Liste gemessen und gezeigt werden. Dieser zeitliche Abstand ist abhängig vom Abstand der beiden Wellenlängen und wird durch das Gerät als eine Zeitkurve

erstellt. Hierbei handelt es sich entweder um eine Abnahme oder Zunahme, der Konzentration an reduziertem *Cytochrom c*, je nach Vorzeichen der Steigung. Cytochrom c, dass reduziert ist, besitzt einen Extinktionskoeffizient von $29.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die Differenz des Extinktionskoeffizienten zwischen dem reduzierten und oxidierten Cytochrom c liegt bei 550 nm.

$$E_{\text{red}} - E_{\text{ox}} = 19,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Nach Lambert-Beer'schen Gesetz

$$A = E \cdot c \cdot d \quad (5.1)$$

A = Absorption

E = Extinktionskoeffizient

c = Konzentration

d = 1cm

$$\Delta C[\mu\text{M}] = (\Delta A_{(550-540)}/19,5) * 1000 = \Delta A * 51,28 \quad (5.2)$$

Mit Hilfe von ΔC anhand des Volumens der Küvette kann man den Umsatz an Konzentration Cytochrom c berechnen. Besonders die spezifische Aktivität wird als Umsatz an Cytochrom c pro Minute pro Menge an Protein im Ansatz berechnet.

Die spezifische Aktivität = S.A.

veränderte Konzentration an Cytochrom c = $\Delta \text{Cyt.c}$ und Einheit ist (nmol)

Zeit = T und Einheit ist (min.)

Proteinmenge = PM und die Einheit ist (mg)

$$S.A. = \Delta \text{Cyt.c} / T * PM \quad (5.3)$$

5.5.3 Protein Aktivitätsbestimmung

5.5.3.1 Zusammenfassung

Der Reaktionsansatz der Oxidation von Cytochrom c läuft in der thermostatisierten Messpuffer (Phosphatpuffer) vermischt mit Membranvesikel und reduziertem Pferdeherz-Cytochrom c (ermittelt spezifische Aktivitäten) und mindestens $33\mu\text{M}$ KCN(Kaliumcyanid unterbindet eine Rückoxidation des reduzierten Cytochrom c). Nach der Pipettierung in die Küvette wird der ganze Inhalt gut durchmischt und der Photometer gestartet (leer Lauf). Nach etwa 20 bis 30 Messungen, wo fast keine Aktivität zu festzustellen ist, wird NADH bzw. NADPH dazu pipettiert und ab diesen Zeitpunkt findet die Rückreaktion von Cytochrom c statt. Dabei wird die Reduktion von externem Cytochrom c in Abhängigkeit der zugeführten NADH bzw. NADPH-Konzentration gemessen. NADH bzw. NADPH liefern Elektronen (Elektronendonator bzw. Sauerstoff als Elektronenakzeptor). Die Auswertung und Berechnung die Steigung ($\Delta A/\text{min}$) wird an Hand der ausgedruckten Kurven berechnet. Die X-Achsenwerte (Sequenz Nr.) sollte durch 3 dividiert werden damit es auf Sek. Berechnet wird werden. Hier wurde auch die Hemmstoffe (Rotenon und Antimycin A) verwendet um zu untersuchen wie sie die Aktivitäten beeinträchtigen.

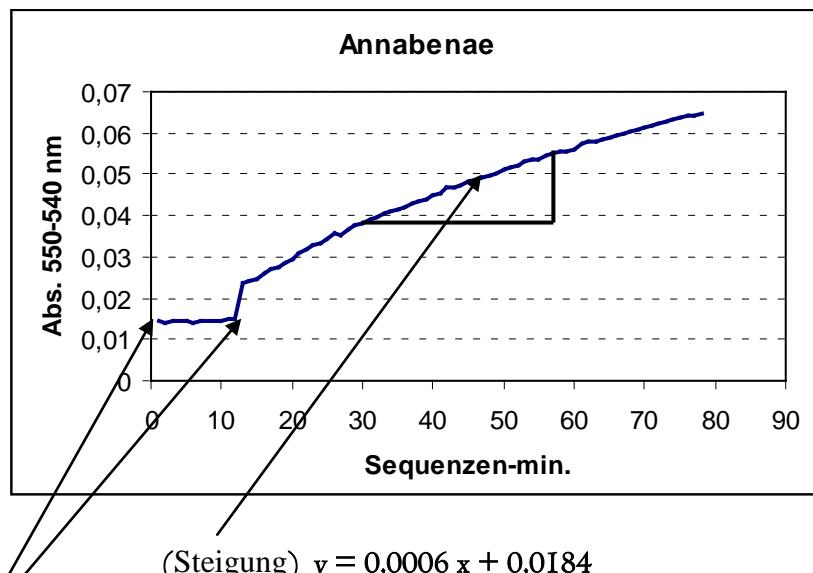
5.5.3.2 Beispiel zur Berechnung der spezifischen Aktivität

Hier wird keine Enzymanreicherung vorgenommen. Deswegen wird bei der Berechnung der spezifischen Aktivität, nur die gesamten Proteine der Membranvesikel berechnet und nicht die Aktivität des reinen Proteinkomplexes. Aus diesem Grund verwendet man statt der Menge des Enzymkomplexes, welches für die Reaktion verantwortlich ist, nur die Menge an Substrat.

Diese Formel stellt dann ein Maß für die Geschwindigkeit einer enzymatisch katalysierten Reaktion dar.

Der Ansatz besteht aus $8\mu\text{M}$ Ferricytochrom, $150\mu\text{M}$ NADH, $30\mu\text{M}$ KCN, $636\mu\text{l}$ Phosphatpuffer(auf $700\mu\text{l}$) und $20\mu\text{g}$ Annabena-Membranvesikel.

Seq. Nr.	ΔA
1	0,0309
2	0,0318
3	0,0327
4	0,0331
5	0,0343
6	0,0356
7	0,0353
8	0,0368
9	0,0376
10	0,0382
11	0,0392
12	0,0394
13	0,0405
14	0,0410
15	0,0415
16	0,0421
17	0,0428
18	0,0436
19	0,0440
20	0,0450
21	0,0456
22	0,0466
23	0,0470
24	0,0475
25	0,0482
26	0,0489
27	0,0491
28	0,0498
29	0,0504
30	0,0511
----	----



leer Lauf = hier wurde noch keine NADH oder NADPH in die Lösung pipettiert und KCN hemmt die Rückreaktion von Cytochrom c.

Die Steigung dieser Kurve beträgt $0,0006$ pro Sequenz. Eine Sequenz entspricht 3 sek. und ΔA sollte in Min. gerechnet werden, deswegen wird Min. dividiert durch 3.

$$\Delta A = 0,0006 * 20 = \underline{0,012}$$

Auf der anderen Seite kann man die Konzentration von Ferricytochrom berechnen.

$$\Delta c = 0,012 * 1000 / 19,5 = 0,615 \text{ nM}/(\text{min.ml}) = \underline{0,431 \text{ nM}/(\text{min. in } 700\mu\text{l})}$$

$$\text{Spez. Aktivität} = 0,431 / 0,02 = \underline{21,55 \text{ nmol}/(\text{min.mg})}$$

5.5.3.3 Reagentien und Hemmstoffen

5.5.3.3.I Cytochrom c

Cytochrom c aus Pferdeherz besteht aus einem Molekulargewicht von 12384 Dalton und wird als Ferri- Ferrocyanocytocrom in gemischter Form geliefert, wobei die Ferri-Form annähernd bei 100% liegt. Als Kontrolle: wenn in 10 μ M Cytochrom c, direkt ein Korn von K₃[Fe₃(CN)₆] zugegeben wird, wird in der Küvette keine Absorptionsänderung bei 550-540nm gemessen [92, 93].

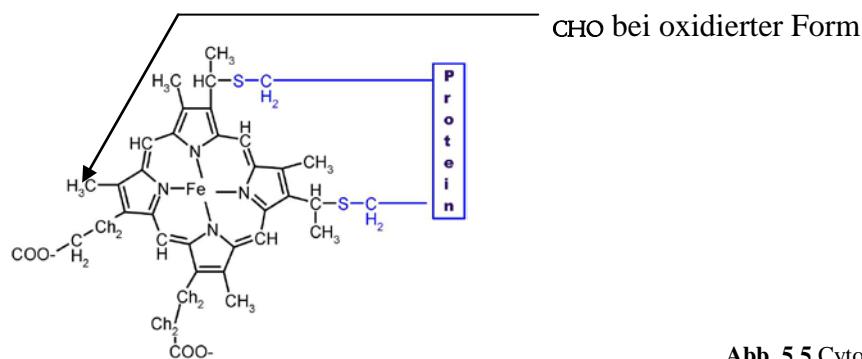


Abb. 5.5 Cytochrom c

5.5.3.3.2 Nukleotide NAD(P)H

NAD ist ein Coenzym und im Jahr 1904 von Sir Arthur Harden und Young entdeckt. Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, richtig gesagt Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) ist ein Hydridionen übertragendes Koenzym. Diese Hydridionen bestehen aus Zwei-Elektronen/Ein-Proton. Deswegen kann sich dieses Molekül an zahlreichen Redoxreaktionen beteiligen. NAD⁺ stellt die oxidierte Form dar, mit der Molaren Masse 663,43 g·mol⁻¹ und NADH die reduzierte Form mit der Molaren Masse 665,45 g·mol⁻¹. Es gibt auch noch ähnliche Coenzyme oder besser gesagt ein Derivat des NADH, das sog. Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP⁺) mit der Molaren Masse 744,41 g·mol⁻¹ und Summenformel C₂₁H₂₉N₇O₁₇P₃. Diese NADP- Molekül besitzt am 2'C-Atom der Ribose einen weiteren Phosphatrest und hat damit einen Phosphat-Rest am Adenosin weniger, als NAD-Molekül. NADP⁺ ist die oxidierte Form und NADPH ist dann die reduzierte Form. In den meisten biochemischen Reaktionen werden die NADH und NADPH unterschiedlich benutzt. Während NADH aus Glykolyse und Citratzyklus durch Katabolismus gewonnen wird und weiter in der Atmungskette oxidiert, um nötige ATP für wichtige Reaktionen im Lebewesen zu synthetisieren, fungiert NADPH aber als Reduktionsmittel im Anabolismus, um Elektronen und Protonen in der reduzierenden Biosynthese bereit zu stellen [3].

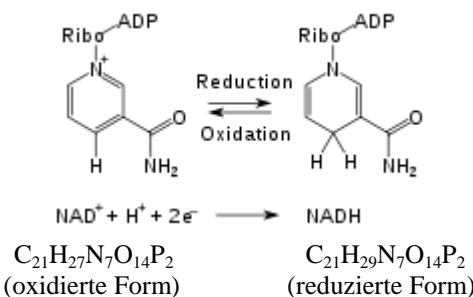


Abb.5.6 Reduxreaktion und Summenformel des NAD[3]

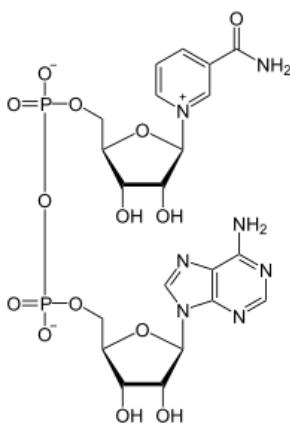


Abb.5.7 NAD⁺ oxidierte Form[3]

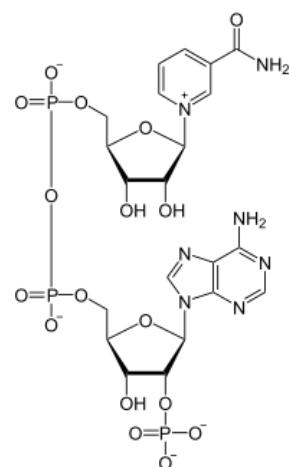
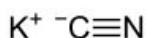


Abb. 5.8 NADP⁺ oxidierte Form[3]

5.5.3.3.3 KCN

Die bittermandelartig riechende Kaliumcyanid mit Molare Masse $65,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ besitzt farblose Kristalle, die sich gut in Wasser lösen und eine sehr giftige Chemikalie ist sowie in kleinen Mengen tödlich. Dies wäre auch über Hautresorption möglich. Die Wirkung von KCN auf Cytochrom-c-Oxidase ist in unserer Arbeit wesentlich, weil das Cyanid-Ion sich an Komplex IV der Atmungskette bindet und zwar an der Stelle, wo sich normalerweise die Sauerstoff-Moleküle (an der Cytochrom-c-Oxidase) bindet, und diese blockiert die Bindung von Sauerstoff und das führt zur inneren Erstickung. Diesen Vorgang verwenden wir bei der Aktivität Messungen [3].



Strukturformel

5.5.3.3.4 Hemmstoffe Rotenon

Rotenon mit Molare Masse $394,42 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und Summenformel $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_6$ ist der bekannteste Vertreter der Rotenoide. Es ist die giftigste Chemikalie und wird aus der Barbasco-Wurzel oder Tubawurzel gewonnen. Es wirkt auf Komplex I inhibiert NDH I, verhindert die Elektronenübertragung und damit erliegt der Stoffwechsel. Dabei kann die Zelle kein ATP mehr herstellen und verhungert. Rotenon ist in Wasser unlöslich, aber es lässt sich in Ethanol, Benzol, Aseton, oder Chloroform lösen [3].

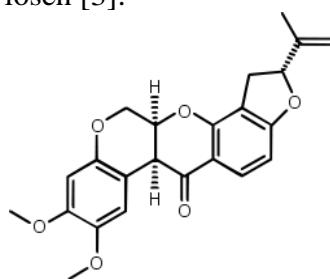


Abb.5.9 Strukturformel von Rotenon

5.5.3.3.5 Hemmstoffe Antimycin A

Antimycin A, oder besser gesagt Antimycin A₁, besteht aus Streptomyceten Antibiotikum und Hemmstoff der Atmungskette. Dieser Hemmstoff kann sich an den Komplex III binden und zwar an die Q_i-Stelle im Cytochrom bc₁ Komplex. Alle Komponenten der Atmungskette (im Komplex III), die vorne liegen, bleiben reduziert und diejenige die dahinter liegen, bleiben oxidiert. So blockiert Antimycin A₁ die Übertragung von Elektronen vom Coenzym Q auf Cytochrom c (also von Häm b_H zum Ubichinon). Das hat zwei weitere Auswirkungen: zuerst wird der Verbrauch von Sauerstoff im Komplex IV verhindert und zweitens wird die Synthese von ATP im Komplex V gehemmt. Antimycin A₁ mit Summenformel C₂₈H₄₀N₂O₉ und die Molare Masse 548,625 g·mol⁻¹ ist in Wasser unlöslich und lässt sich aber in Aceton oder Ethanol lösen [3].

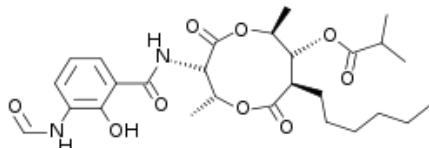


Abb 5.10 Antimycin A Strukturformel

5.6 Durchführung der Messungen

Die Messküvette wird vor der Messung und auch zwischen jeder neuen Messung mit Aceton oder 70% Et-OH gereinigt und zum Schluss mit Phosphatpuffer wieder nachgespült. Dadurch werden die Rückstände der vorigen Messungen entfernt. Wenn Rückstände der Membranvesikel immer noch in der Küvette vorhanden sind, kommt es zur Reduktion von Cytochrom c durch NAD(P)H, obwohl keine Membransuspension in die Küvette pipettiert wurde. Deswegen ist es hilfreich, wenn vor der Messung, einen Blindwert gemessen wird. Wir haben dies als Leerlauf bezeichnet. Bevor die Probe in die Küvette rein pipettiert wird, wird eine Messung über 10-20 Sequenzen durchgeführt, wobei die Kurve, die in optimalen Bedingungen liegt, eine Steigung zeigen sollte, dass gleich oder annähernd Null ist. Diese Steigung wird dann nur bei den Proben, die geringe Aktivität zeigen berücksichtigt und wird von der gemessenen Membranaktivität subtrahiert (nähere Information siehe 5.6.1 Ermittlung der Blindwerte). Alle Komponenten werden in 10µM Phosphatpuffer mit pH-Wert von 7,4 gelöst und die Messungen werden in RT vollzogen. Während der Messung sollte die Konzentration der verwendeten Substanzen immer konstant bleiben, denn nur so können relevante Werte (Reproduzierbarkeit) gegeben werden. Die Konzentrationen für die Substanzen sind hier aufgelistet.

KCN	30	µM
Nukleotide	150	µM
Ferricytochrom c	10	µM
Hemmstoffe	20-150	µM
Membranen	80-100	µM je nach der Konzentration
Phosphatpuffer	10	µM bis zu 700µl

Wie gesagt, die geeignete Konzentration von Membranen-Suspension sollte mit Hilfe von Bradford bestimmt werden. Wenn bei der Messung die Menge an Membranen zu wenig ist, kommt es zur unspezifischen Reduktion von Cytochrom c und dadurch zu Überlagerung der Reaktionen und wenn die Menge zu viel ist, behindern die Membranvesikel sich gegenseitig. Auf jeden Fall sollte diese Menge zwischen 10-50µg Protein/ Ansatz sein.

5.6.I Ermittlung der Blindwerte

Um zu kontrollieren und zu beweisen, dass es sich bei den Reaktionen tatsächlich um die enzymatisch katalysierte Reaktionen handeln, ermitteln wir für alle Komponenten ohne Probe, eine Blindwert.

Der Ansatz besteht aus $10\mu\text{M}$ Ferricytochrom, $150\mu\text{M}$ NADH, $30\mu\text{M}$ KCN und Phosphatpuffer mit pH Wert von 7,4 auf $700\mu\text{l}$.

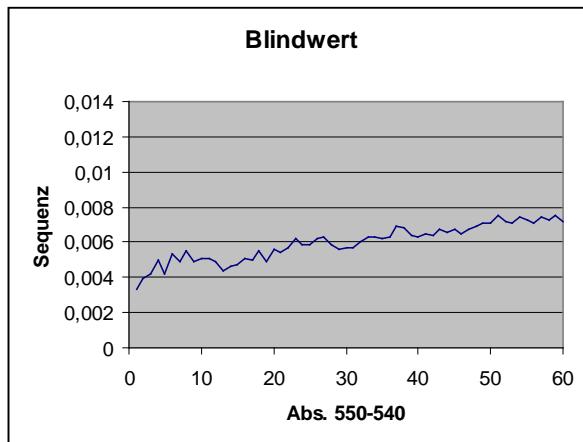


Abb.5.11 Leerlauf bei Reduktion von Cytochrom c $0,026 \text{ nM} / \text{min}^*$ Ansatz in 60 Sequenzen zeigt eine Änderung von 4 Werten in 3. Komastelle d.h. Nahe zu Null und wie man sieht nach einiger Zeit flacht sich die Kurve ab. D.h. vor der Zugabe von Membranenvesikel ist es immer besser eine Leer Messung laufen zu lassen (ohne Membran)

Kapitel 6

Die Ergebnisse

6.1 Die Untersuchungsbedingungen

Die Spezies werden unter zwei verschiedene Bedingungen untersucht. Einmal unter normalen Bedingungen und als zweite Versuchsreihe einmal unter Stress.

Obwohl alle Zellen immer eine gewisse Salzmenge enthalten und das Leben als erstes im Meer entstanden ist, ist eine zu hohe Salzkonzentration für die meisten Lebewesen, ein bedrohlicher Zustand für ihr Wachstum. Die Cyanobakterien, besonders *Synechocystis* Sp. PCC 6803, dienen als einfacher bakterieller Modellorganismus zur molekularen Untersuchung der zellulären Salzanpassung. Das *Synechocystis* Sp. PCC 6803 und weitere Cyanobakterien leben im Süßwasser, aber auch in Seewasserhabitaten (terrestrischen Lebensbedingungen) und aufgrund vielfältiger Anpassungsstrategien, zeigen diese gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen große Toleranz. Trotzdem zeigt eine Erhöhung des Salzgehaltes (hyperosmotische Bedingungen) immer eine osmotische Stressreaktion (d.h. Wassermangel) und einen Ionenstress (d.h. zu hohe Salzkonzentration im Cytoplasma). Sobald ein Übermaß an Salzionen in die Zelle einströmt und die Bakterien zelluläres Wasser verlieren, werden in der Zelle die meisten Lebensprozesse gehemmt. Erstaunlicherweise kann sich *Synechocystis* in weniger als einer Stunde an die Stresssituation anpassen. In weniger als einer Stunde werden die toxischen Natriumionen gegen weniger toxische Kaliumionen ausgetauscht und innerhalb weiterer Stunden werden diese Ionen verwendet um selbst hergestellte organischen Schutzsubstanzen, hier Glucosylglycerol (GG) und Saccharose, zu produzieren und um damit die herkömmliche Kaliumionen zu ersetzen. Diese Salzanpassung läuft nur im Licht erfolgreich ab. Alle diese Umstände (GG- Synthese und Ionenpumpen) erhöht den Energiebedarf der Zellen, deswegen wird die Photosynthese optimiert. Darunter versteht man verschiedene Wege, die die Zellen auskönnen müssen, um ihren Energiebedarf zu erhöhen wie z.B. die Produktion von Cytochrom M anstatt Cytochrom C oder die Vermehrung von ATP-Produktion durch zyklischen Elektronentransport. Man kann mit Hilfe der verschiedenen genetischen Techniken, alle diese umfangreichen Veränderungen charakterisieren. (DNA- Microarray oder Immunoblotting). Dadurch kann man beweisen, dass schon 30 Minuten nach dem Salzschock in der Zelle bereits mehr als 200 Gene eingeschaltet werden, die hochreguliert arbeiten und zwischen spezifischer und genereller Stressantwort unterscheiden können. Wenn die Zelle dem Salzstress länger ausgesetzt wird, dann sind nur noch 39 Gene aktiv, die alle Proteine codieren die für die Salzanpassung notwendig sind. Dank der Funktion dieser Gene, können die Cyanobakterien eine Salzkonzentration bis zu 0,7 M NaCl tolerieren und die Cyanobakterien die speziell Glucosylglycerol synthetisieren können, können in bis zu 1,8 M NaCl Konzentration überleben und diejenige die sogar fähig sind Glycin- oder Glutamatbetain zu produzieren (halotolerantesten Cyanobakterienstämme), tolerieren sogar eine Salzkonzentration mit 2,7 M NaCl in der Umgebung (Stamm *Synechococcus* Sp. PCC 7942).

Als Schwerpunkt des zweiten Teiles dieser Arbeit wird auf der Membran des Cyanobakteriums, die eventuelle, spezifische Aktivitätsänderung in der Elektronentransportkette untersucht. Es muss zuerst eindeutig geklärt werden, ob generell berechnete, spezifische Membranaktivitäten zu sehen sind und ob hier eine lineare Abhängigkeit von externen Salzkonzentrationen und interne Funktionen von

Proteinkomplexe in Anwesenheit der NADH bzw. NADPH, feststellbar sind. Anschließend, aus rein persönlichem Interesse, wäre zu überprüfen, ob unter diesen Bedingungen Cytochrom m (mittels Immunoblotting) anstatt Cytochrom c codiert wird. Doch leider Gottes ist dieser Wunsch, wegen beschränkter Zeit und Möglichkeiten und einer zu geringen Protein Konzentration in der isolierten Membran (ICM und CM) nicht zu erfüllen [94].

6.2 Die untersuchte Membranaktivität der Spezies

Hier wird das Verhalten von Membranen (ICM, CM) dreier verschiedener Spezies untersucht. Einmal in Anwesenheit von NADH, und weiters in Anwesenheit von NADPH zu vergleichen. Dabei wird ihre spezifische Aktivität berechnet. Danach werden jedem Ansatz (ICM oder CM in Anwesenheit von NADH bzw. NADPH) zusätzlich noch mit Hemmstoffe wie Rotenon bzw. Antimycin A behandelt und parallel zu einander zueinander verglichen. Die Spezies werden ausserdem unter zwei verschiedenen externen Bedingungen, entweder in 0,5 Molarem salzhaltigem Nährmedium oder normalem Nährmedium, gezüchtet. Diese Untersuchungen werden jedes Mal an isolierten Membranen (**Stamm** genannt) durchgeführt. Das heißt ein Stamm entspricht hier die gewonnenen Membranenvesikeln (ICM und CM) von einer Spezies, nach einer Isolierung. Die Substrate werden zuerst durch Ermittlung von Blindwerten festgestellt.

Der Versuchansatz besteht somit aus dem Standard-Ansatz, der immer konstant bleibt und die zu berechnende Membranvesikelsuspension. Dies wird mittels Bradford- Methode (je nach der Konzentration von Proteinen) berechnet.

Der Standard-Ansatz besteht aus 5-10 μ M Ferricytochrom (oxidierte Cytochrom c) und 150-200 μ M NADH bzw. NADPH und 10-30 μ M KCN und auf 700 μ l mit Phosphatpuffer (PH 7,4) aufgefüllt. Die Konzentration von Membranvesikel (ICM, CM) in einer Küvette soll zwischen 10-50 μ g liegen. Die Konzentration von Hemmstoffen (Antimycin A und Rotenon), sollte zwischen 50 μ M bis 150 μ M sein.

Für die Berechnung der spezifischen Aktivität, wie in Kapitel 5 erwähnt wurde, ist die Berechnung von ΔA notwendig. Eine Sequenz entspricht 3 Sekunden und ΔA sollte in Minuten gerechnet werden.

$$\Delta A = \text{Steigung} * (60\text{min}/3) \quad (6.1)$$

$$\Delta c [\mu\text{M}] = (\Delta A / 19,5) * 1000 \text{ (oder } 700\mu\text{l Volumen der Küvette)} \quad (6.2)$$

$$\text{Spez. Aktivität} = \Delta c / \text{Protein Konzentration} \quad (6.3)$$

Hier werden die Ergebnisse in drei verschiedene Bereiche aufgeteilt und der genaue Vorgang wird in drei Tabellen dargestellt:

Tabelle 1: Ergebnisse zu Spezies *Synechocystis PCC 6803*

Im Salzmedium gezüchtete <i>Synechocystis PCC 6803</i>			Im normalem Medium gezüchtete <i>Synechocystis PCC 6803</i>		
ICM-CM	NADH	Antimycin Rotenon	ICM-CM	NADH	Antimycin Rotenon
	NADPH	Antimycin Rotenon		NADPH	Antimycin Rotenon

Tabelle 2: Ergebnisse zu Spezies *Anacystis nidulans* PCC 630I

Im Salzmedium gezüchtete <i>Anacystis nidulans</i> PCC 630I			Im normalem Medium gezüchtete <i>Anacystis nidulans</i> PCC 630I		
ICM-CM	NADH	Antimycin Rotenon	ICM-CM	NADH	Antimycin Rotenon
	NADPH	Antimycin Rotenon		NADPH	Antimycin Rotenon

Tabelle 3: Ergebnisse zu Spezies *Anabeana* PCC 7120

Im Salzmedium gezüchtete <i>Anabeana</i> PCC 7120			Im normalem Medium gezüchtete <i>Anabeana</i> PCC 7120		
ICM-CM	NADH	Antimycin Rotenon	ICM-CM	NADH	Antimycin Rotenon
	NADPH	Antimycin Rotenon		NADPH	Antimycin Rotenon

6.3 *Synechocystis* PCC 6803

Hier sind die Aktivitäts-Kurven aus den verschiedenen Isolierungen zu sehen. Jede geerntete Kultur wird als ein Stamm bezeichnet.

Standardansatz für alle Stämme:

7 µM Ferricytochrom (oxidierte Cytochrom c)

150-200 µM NADH bzw. NADPH

20 µM KCN

100 µM Hemmstoffe (Antimycin A und Rotenon)

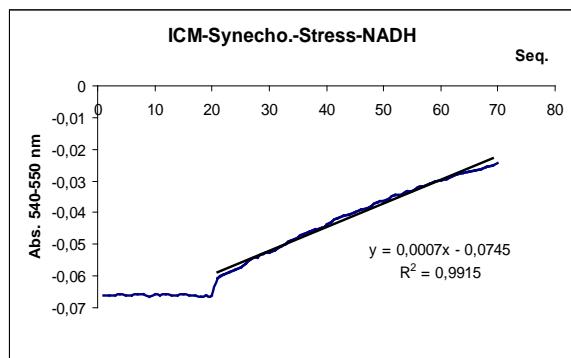
Auf 700µl mit Phosphatpuffer (PH 7,4) aufgefüllt

Salzkonzentration bei den in Salzmedium gezüchteten Stämmen beträgt 0,5 mM.

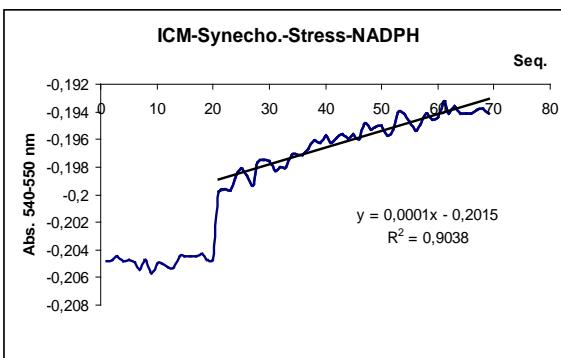
6.3.I Die Ergebnisse zu den im Salzmedium gezüchtete *Synechocystis* PCC 6803

Im Salzmedium gezüchtete <i>Synechocystis</i> PCC 6803			Im normalem Medium gezüchtete <i>Synechocystis</i> PCC 6803		
ICM-CM	NADH	Antimycin Rotenon	ICM-CM	NADH	Antimycin Rotenon
	NADPH	Antimycin Rotenon		NADPH	Antimycin Rotenon

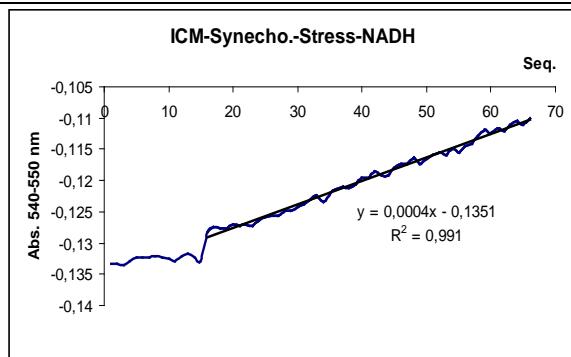
6.3.I.I Die Spezifische Aktivität der ICM in Anwesenheit der NADH und NADPH



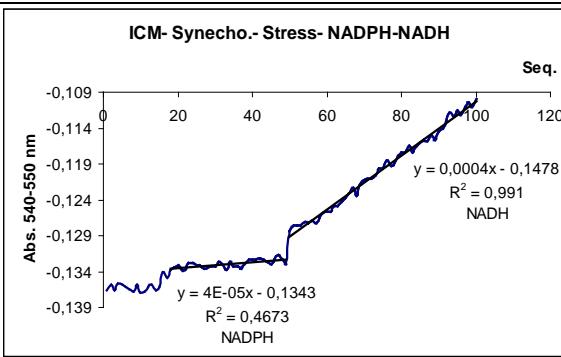
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 9,77 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 74.63 μ g



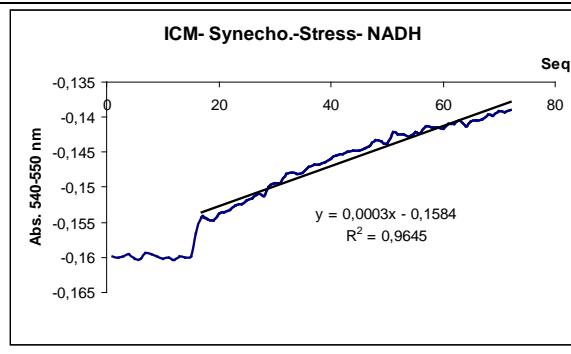
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADPH
Spez. Aktivität = 1,4 nmol/(min.* mg)mm
Protein Konz. : 74.63 μ g



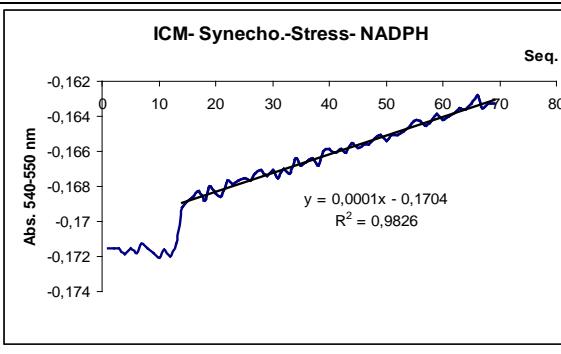
Stamm 2: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 7,6 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 55 μ g



Stamm 2: Aktivität in Anwesenheit der NADH bzw.
in NADPH inaktiv



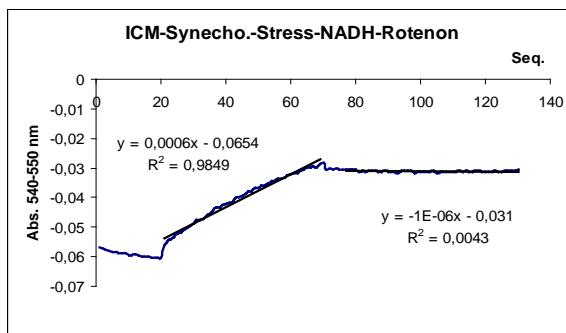
Stamm 3: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 4,53 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 69 μ g



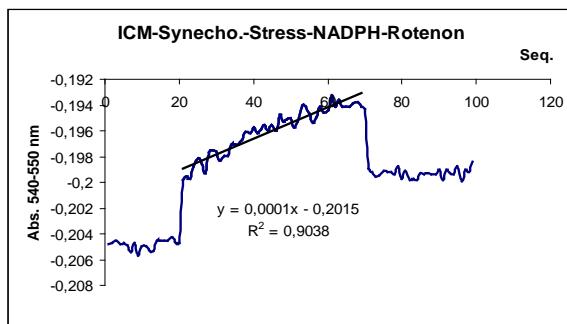
Stamm 3: Aktivität in Anwesenheit der NADPH
Spez. Aktivität = 1,51 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 69 μ g

6.3.I.I.I

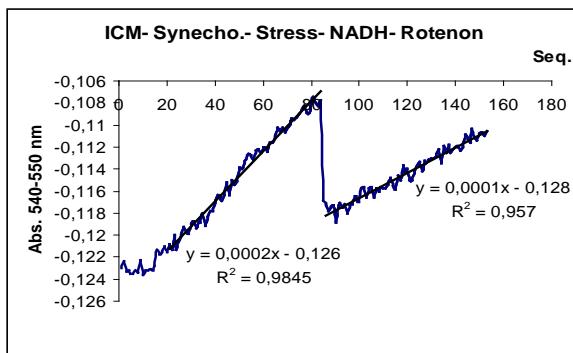
Wirkung des Rotenon auf die Aktivität der ICM



Stamm 1: NADH-Rotenon mit 100%iger Hemmung

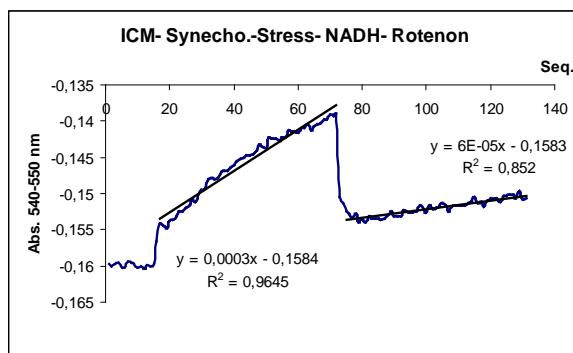


Stamm 1: NADPH-Rotenon mit 100%iger Hemmung

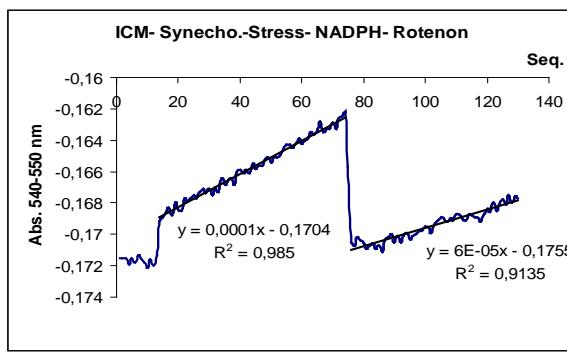


Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 3,8 nmol/(min.* mg) auf 1,9 nmol/(min.* mg) reduziert. Das heißt 1,9 nmol/(min.* mg) weniger.

NADPH
ist nicht aktiv
deswegen wird
keine
Hemmung
berechnet



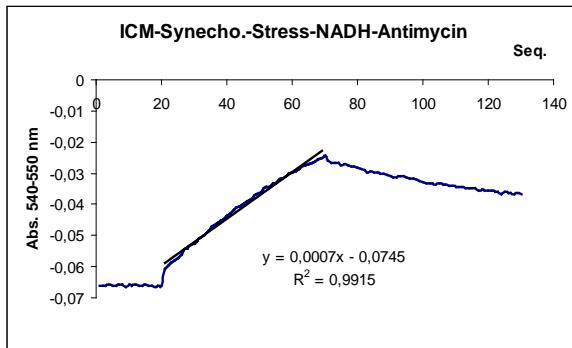
Stamm 3 : NADH-Rotenon mit 100%iger Hemmung



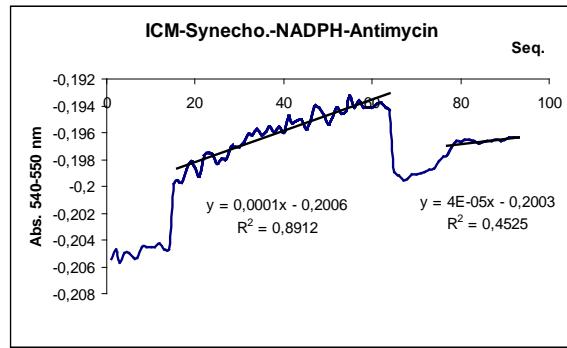
Stamm 3 : NADH-Rotenon mit 100%iger Hemmung

6.3.I.I.2

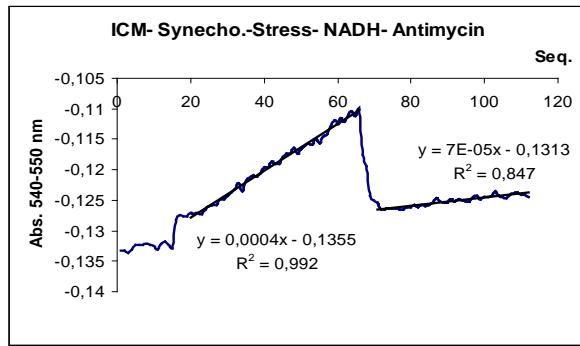
Wirkung des Antimycin auf die Aktivität der ICM



Stamm 1: NADH-Antimycin A mit 100%iger Hemmung

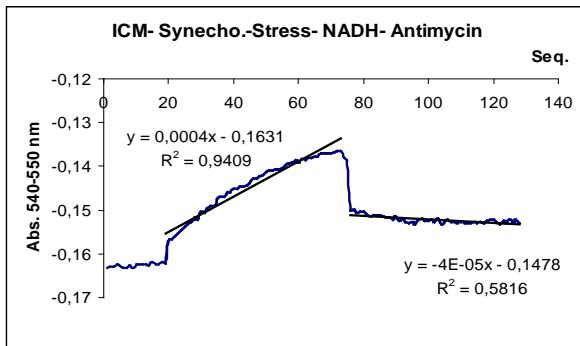


Stamm 1: NADPH-Antimycin A mit 100%iger Hemmung

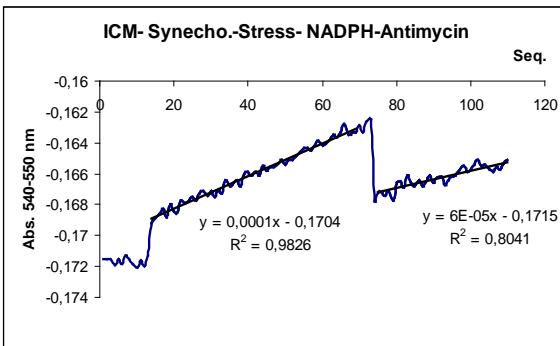


Stamm 2 : NADH-Antimycin A mit 100%iger Hemmung

NADPH
ist nicht aktiv
deswegen wird
keine
Hemmung
berechnet

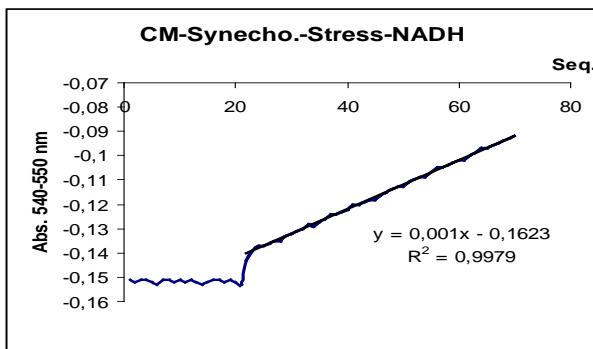


Stamm 3 : NADH-Antimycin A mit 100%iger Hemmung

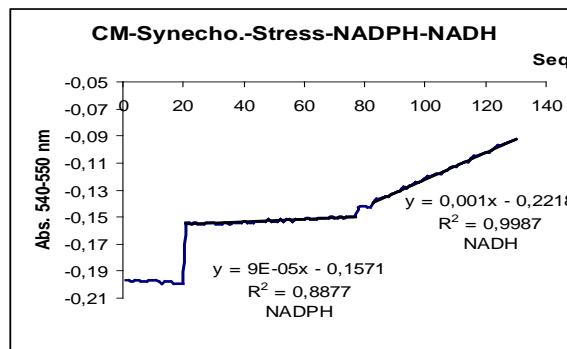


Stamm 3 : NADH-Antimycin A mit 100%iger Hemmung

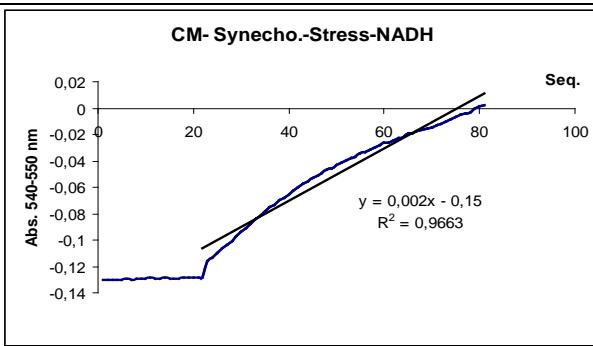
6.3.I.2 Die Spezifische Aktivität der CM in Anwesenheit der NADH und NADPH



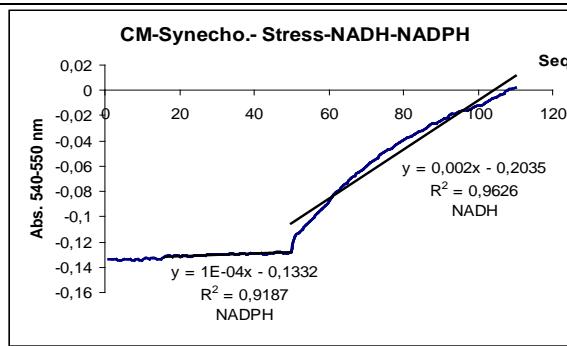
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 7,3 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 142,8 µg



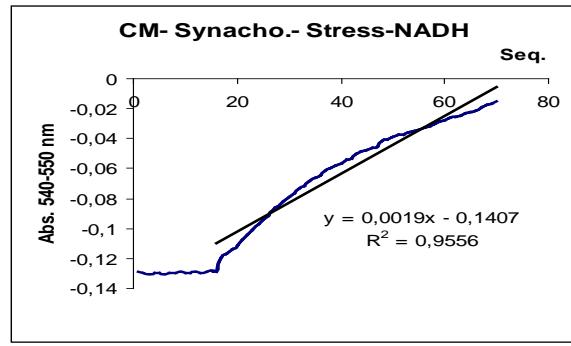
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADH bzw. in NADPH inaktiv
Protein Konz. : 142,8 µg



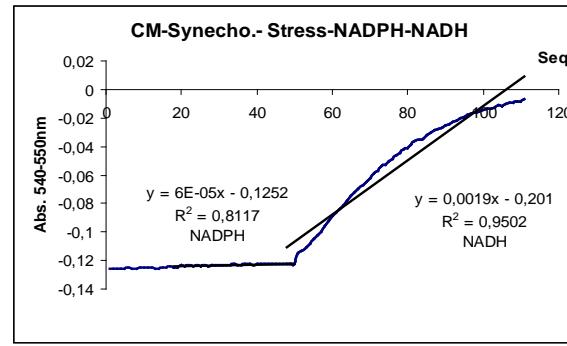
Stamm 2: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 13,62 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 153 µg



Stamm 2: Aktivität in Anwesenheit der NADH bzw. in NADPH inaktiv
Protein Konz. : 153 µg



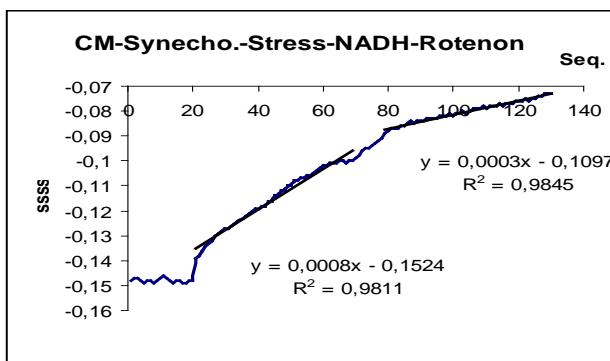
Stamm 3: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 9,85 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 201 µg



Stamm 3: Aktivität in Anwesenheit der NADH bzw. in NADPH inaktiv
Protein Konz. : 201 µg

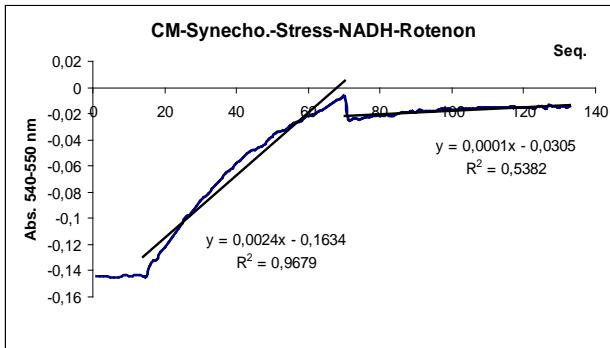
6.3.1.2.I

Wirkung des Rotenon auf der Aktivität der CM



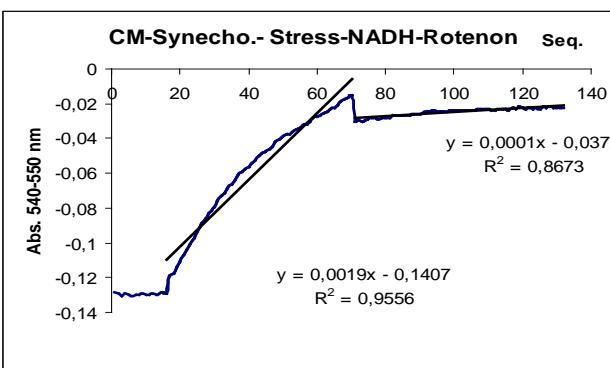
NADPH
 ist nicht aktiv
 deswegen wird
 keine
 Hemmung
 berechnet

Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 5,84 nmol/(min.* mg) auf 2,2 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 3,65 nmol/(min.* mg) weniger.



NADPH
 ist nicht aktiv
 deswegen wird
 keine
 Hemmung
 berechnet

Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 16,34 nmol/(min.* mg) auf 0,7 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 15,7 nmol/(min.* mg) weniger.

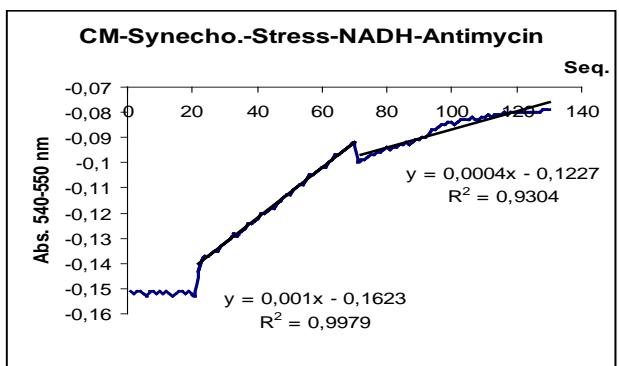


NADPH
 ist nicht aktiv
 deswegen wird
 keine
 Hemmung
 berechnet

Stamm 3: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 9,85 nmol/(min.* mg) auf 0,52 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 9,33 nmol/(min.* mg) weniger.

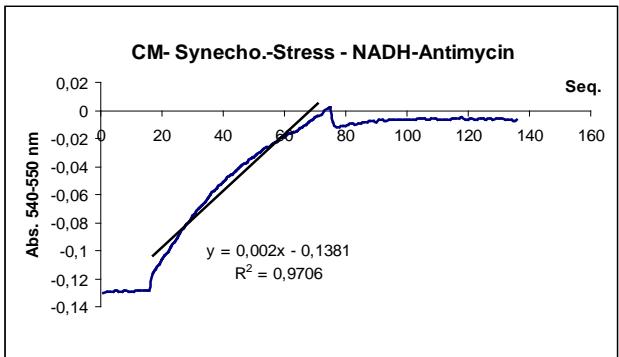
6.3.1.2.2

Wirkung des Antimycin auf die Aktivität der CM



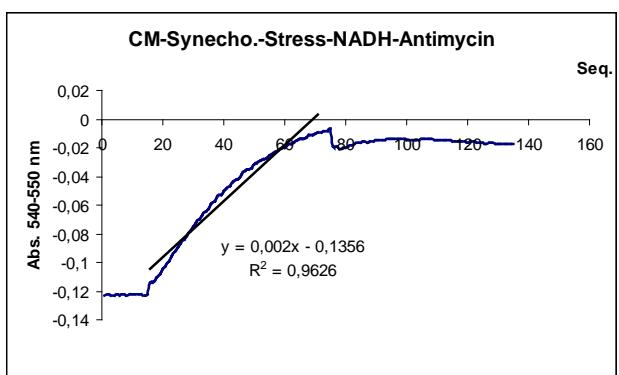
NADPH
ist nicht aktiv
deswegen wird
keine
Hemmung
berechnet

Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 7,3 nmol/(min.* mg) auf 3 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 4,4 nmol/(min.* mg) weniger.



NADPH
ist nicht aktiv
deswegen wird
keine
Hemmung
berechnet

Stamm 2: NADH-Antimycin A mit 100%iger Hemmung.



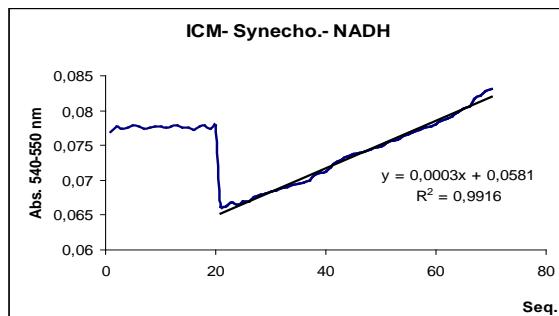
NADPH
ist nicht aktiv
deswegen wird
keine
Hemmung
berechnet

Stamm 3: NADH-Antimycin A mit 100%iger Hemmung.

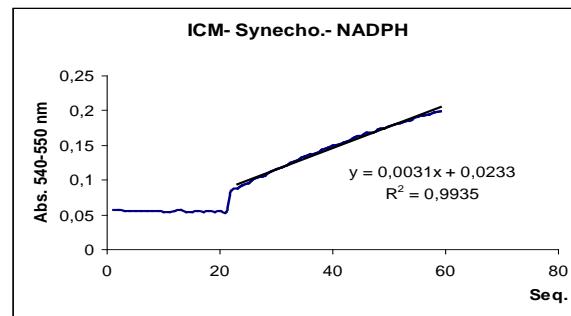
6.3.2 Die Ergebnisse zu den im normalem Medium gezüchteten *Synechocystis* PCC 6803

Im Salzmedium gezüchtete <i>Synechocystis</i> PCC 6803			Im normalem Medium gezüchtete <i>Synechocystis</i> PCC 6803		
ICM-CM	NADH	Antimycin Rotenon	ICM-CM	NADH	Antimycin Rotenon
	NADPH	Antimycin Rotenon		NADPH	Antimycin Rotenon

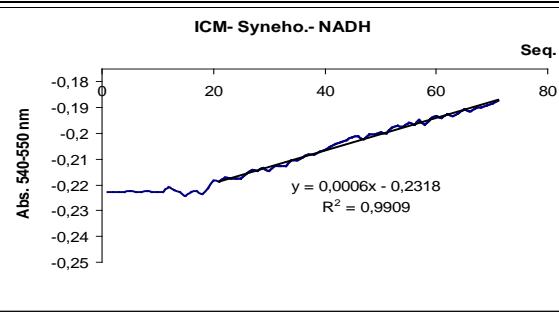
6.3.2.I Die Spezifische Aktivität der ICM in Anwesenheit der NADH und NADPH



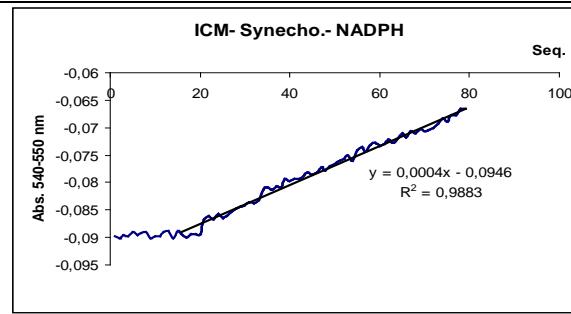
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 6,01 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 52 µg



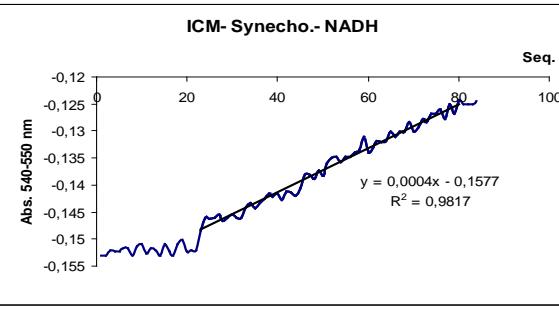
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADPH
Spez. Aktivität = 62,1 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 52 µg



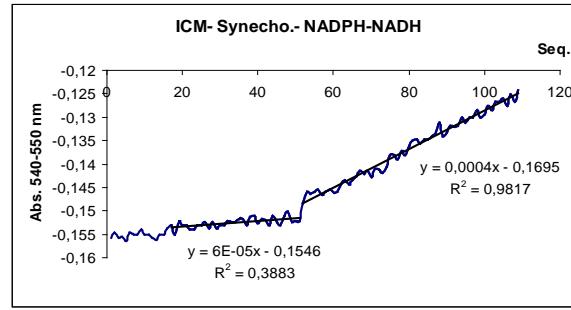
Stamm 2: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 8,6 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 73 µg



Stamm 2: Aktivität in Anwesenheit der NADPH
Spez. Aktivität = 5,7 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 73 µg



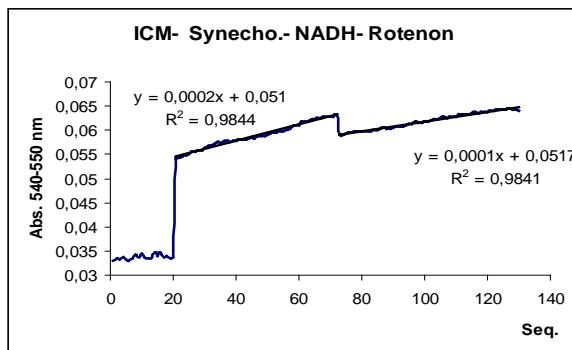
Stamm 3: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 5,86 nmol/(min.* mg), Pro.kon: 71µg



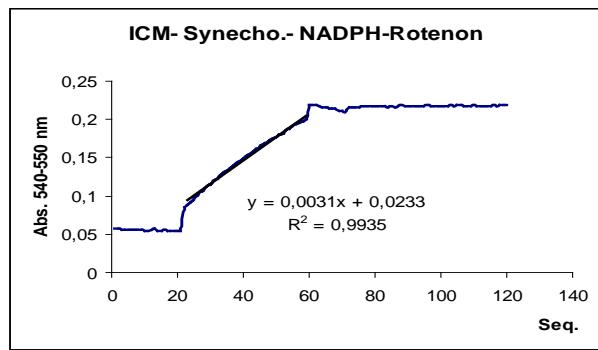
Stamm 3: Aktivität in Anwesenheit der NADH bzw. in NADPH inaktiv, Protein Konz. : 71µg 69

6.3.2.I.I

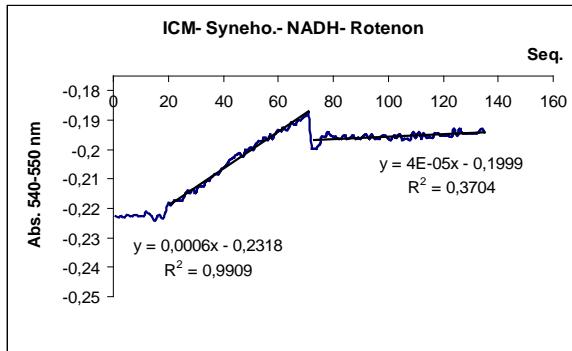
Wirkung des Rotenon auf die Aktivität der ICM



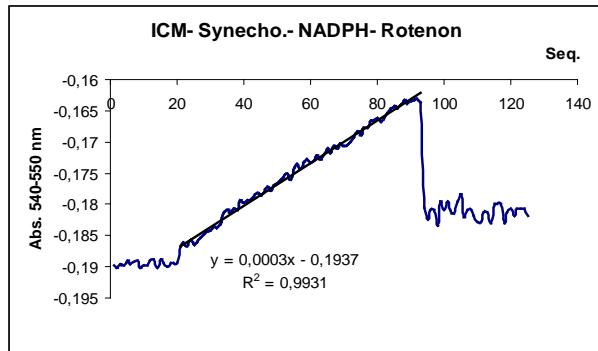
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 4 nmol/(min.* mg) auf 2 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 2 nmol/(min.* mg) weniger.



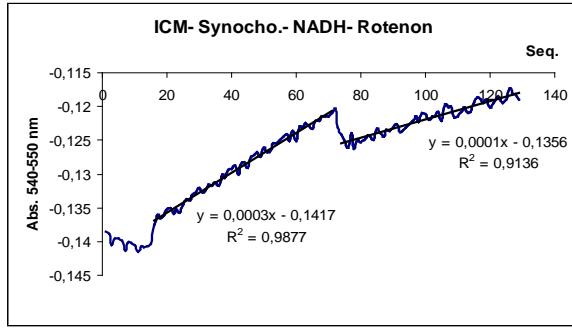
Stamm 1: NADPH-Rotenon mit 100%iger Hemmung



Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.



Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.

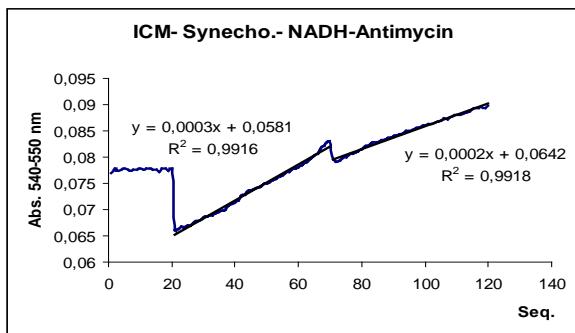


Stamm 3: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 4,4 nmol/(min.* mg) auf 1,47 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 2,93 nmol/(min.* mg) weniger.

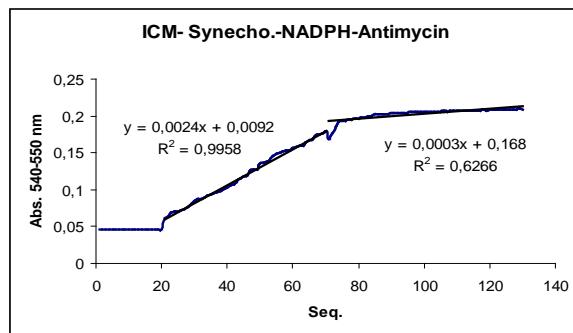
NADPH
ist nicht aktiv
deswegen wird
keine
Hemmung
berechnet

6.3.2.1.2

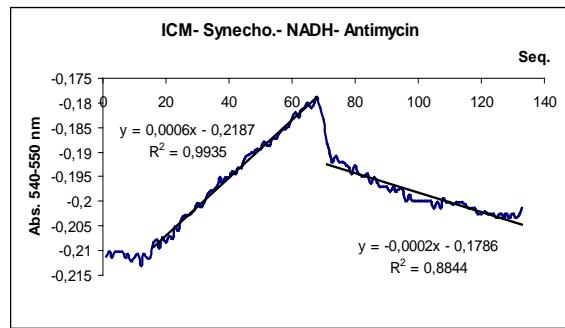
Wirkung des Antimycin auf die Aktivität der ICM



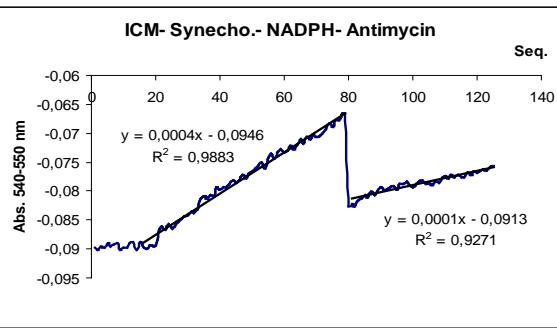
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 6,01 nmol/(min.* mg) auf 4,01 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 2,01 nmol/(min.* mg) weniger.



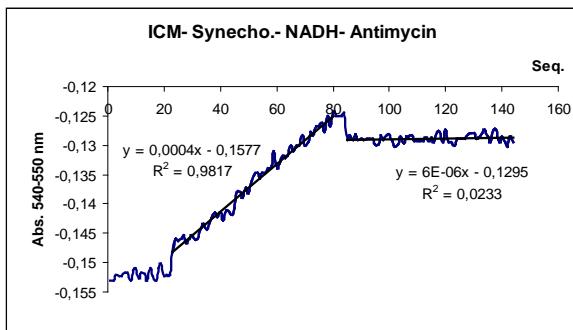
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 48,1 nmol/(min.* mg) auf 6,01 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 42,1 nmol/(min.* mg) weniger.



Stamm 2: 100%iger Hemmung



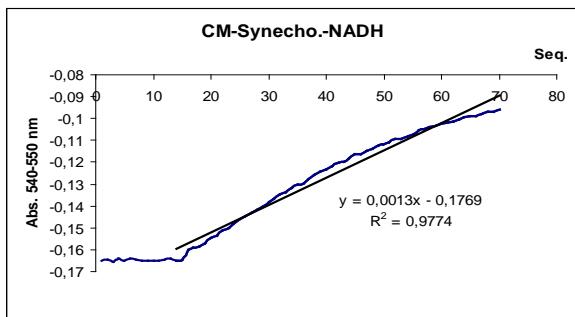
Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 5,71 nmol/(min.* mg) auf 1,43 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 4,3 nmol/(min.* mg) weniger



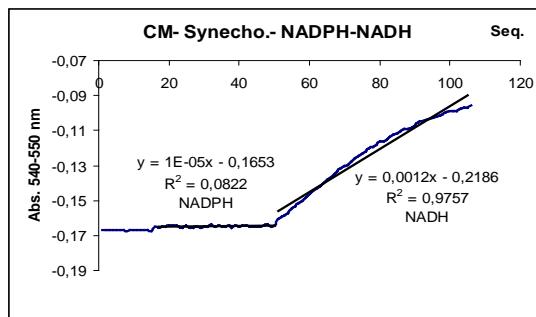
Stamm 3: NADH-Antimycin A mit 100%iger Hemmung.

NADPH
ist nicht aktiv
deswegen wird
keine
Hemmung
berechnet

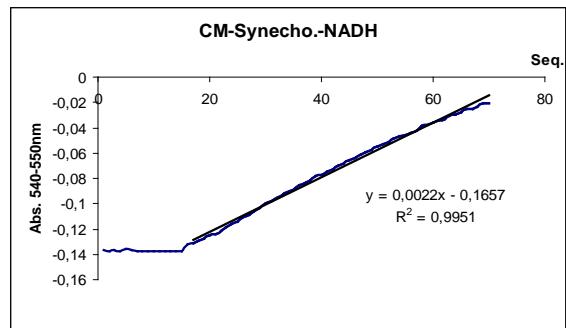
6.3.2.2 Die Spezifische Aktivität der CM in Anwesenheit der NADH und NADPH



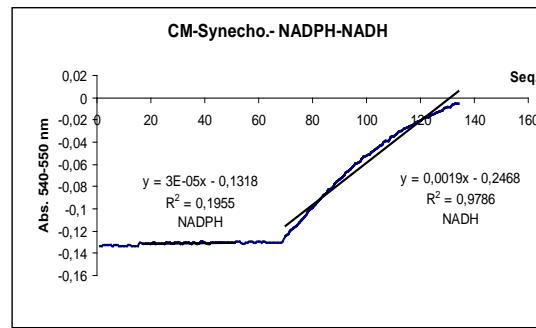
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 4,26 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 318 μ g



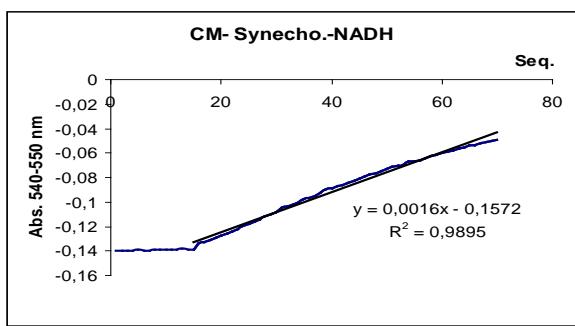
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADH
NADPH ist nicht aktiv
Protein Konz. : 318 μ g



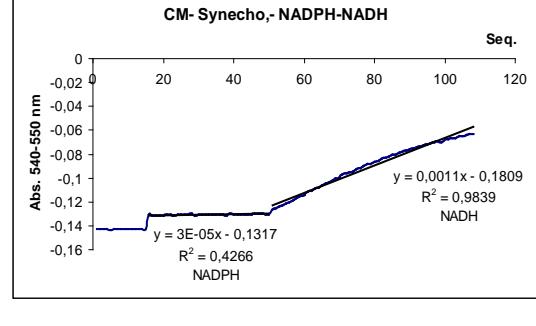
Stamm 2: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 5 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 474 μ g



Stamm 2: Aktivität in Anwesenheit der NADH
bzw. in NADPH inaktiv.
Protein Konz. : 474 μ g



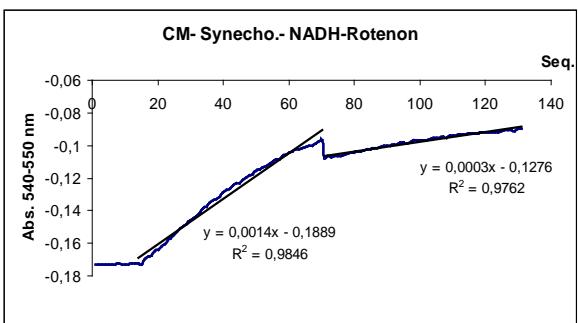
Stamm 3: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 4 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 428 μ g



Stamm 3: Aktivität in Anwesenheit der NADH
bzw. in NADPH inaktiv
Protein Konz. : 428 μ g

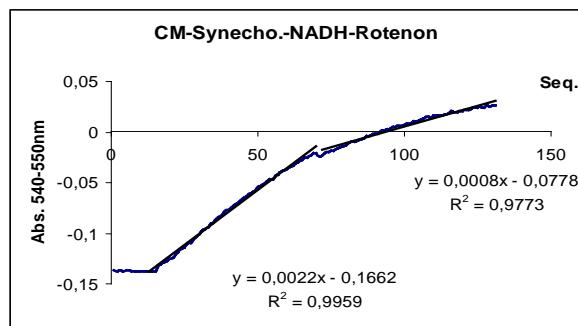
6.3.2.2.I

Wirkung des Rotenon auf der Aktivität der CM



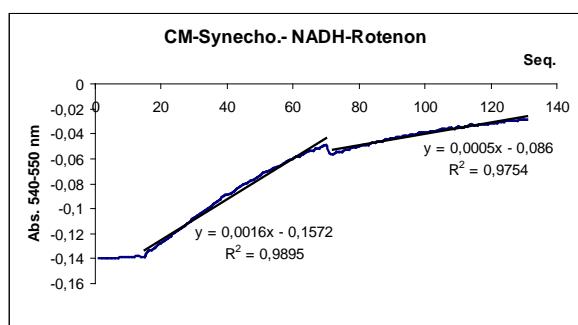
NADPH
ist nicht aktiv
deswegen wird
keine
Hemmung
berechnet

Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 4,6 nmol/(min.* mg) auf 1 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 3,6 nmol/(min.* mg) weniger.



NADPH
ist nicht aktiv
deswegen Wird
keine
Hemmung
berechnet

Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 4,8 nmol/(min.* mg) auf 1,8 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 3,1 nmol/(min.* mg) weniger

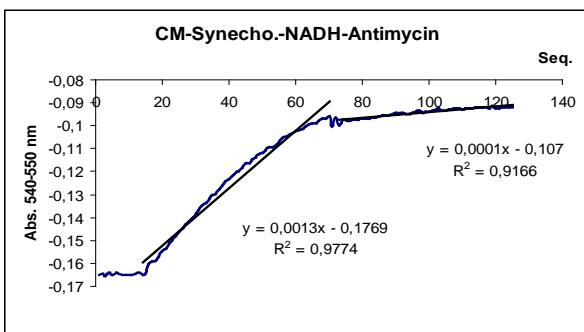


NADPH
ist nicht aktiv
deswegen wird
keine
Hemmung
berechnet

Stamm 3: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 4 nmol/(min.* mg) auf 1,22 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 2,7 nmol/(min.* mg) weniger

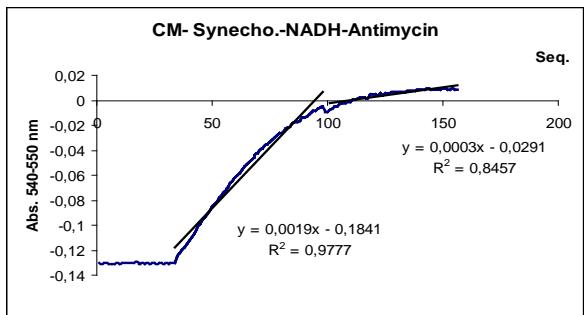
6.3.2.2.2

Wirkung des Antimycin auf die Aktivität der CM



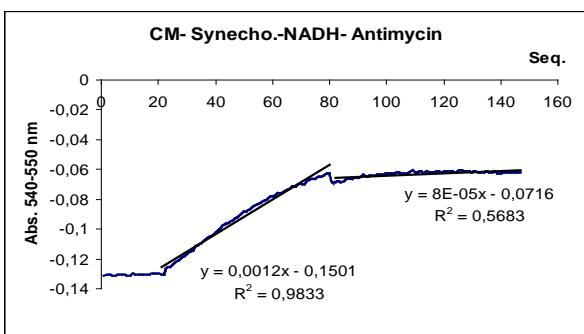
NADPH
ist nicht aktiv
deswegen wird
keine
Hemmung
berechnet

Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 4,3 nmol/(min.* mg) auf 0,33 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 3,93 nmol/(min.* mg) weniger.



NADPH
ist nicht aktiv
deswegen wird
keine
Hemmung
berechnet

Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 4,2 nmol/(min.* mg) auf 0,7 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 3,52 nmol/(min.* mg) weniger.



NADPH
ist nicht aktiv
deswegen wird
keine
Hemmung
berechnet

Stamm 3: 100% tiger Hemmung

6.4 *Anacystis nidulans* PCC 630I

Hier sind die Aktivitäts-Kurven aus den verschiedenen Isolierungen zu sehen. Jede geerntete Kulturen werden als ein Stamm bezeichnet.

Standardansatz für alle Stämme:

7 μ M Ferricytochrom (oxidierte Cytochrom c)

150-200 μ M NADH bzw. NADPH

20 μ M KCN

100 μ M Hemmstoffe (Antimycin A und Rotenon)

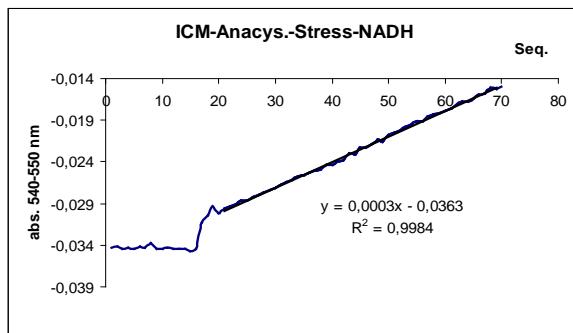
Auf 700 μ l mit Phosphatpuffer (PH 7,4) aufgefüllt

Salzkonzentration, bei dem im Salzmedium gezüchtete Stämme beträgt 0,5 mM.

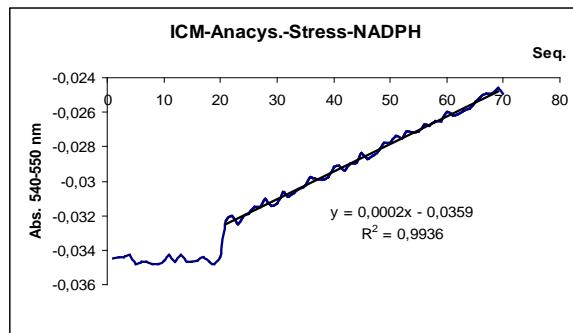
6.4.I Die Ergebnisse zu den im Salzmedium gezüchtete *Anacystis nidulans* PCC 630I

Im Salzmedium gezüchtete <i>Anacystis nidulans</i> PCC 630I			Im normalem Medium gezüchtete <i>Anacystis nidulans</i> PCC 630I		
ICM-CM	NADH	Antimycin Rotenon	ICM-CM	NADH	Antimycin Rotenon
	NADPH	Antimycin Rotenon		NADPH	Antimycin Rotenon

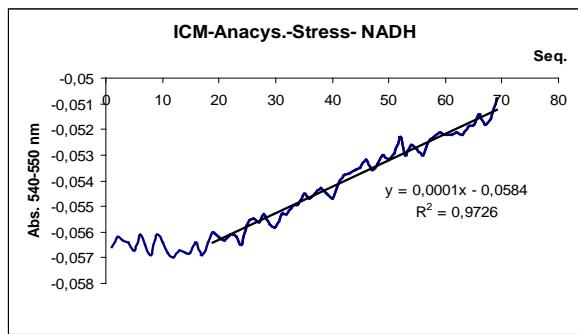
6.4.I.I Die Spezifische Aktivität der ICM in Anwesenheit der NADH und NADPH



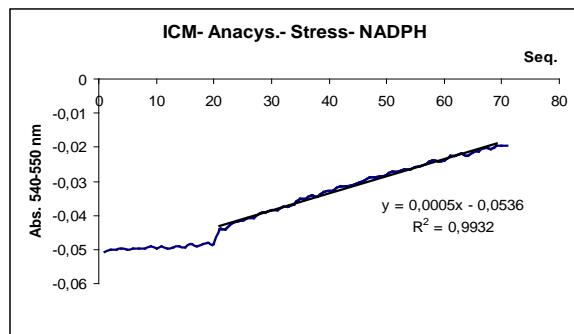
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 3,63 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 86 μ g
Salzmedium: 0,25 mM



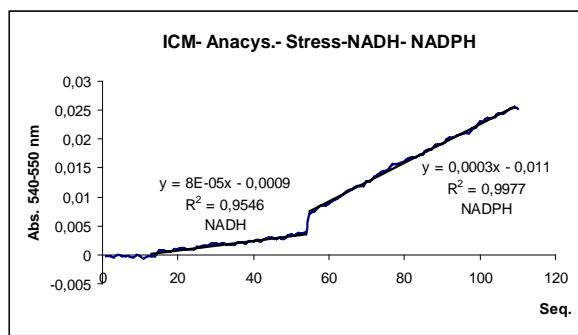
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADPH
Spez. Aktivität = 2,42 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 86 μ g
Salzmedium: 0,25 mM



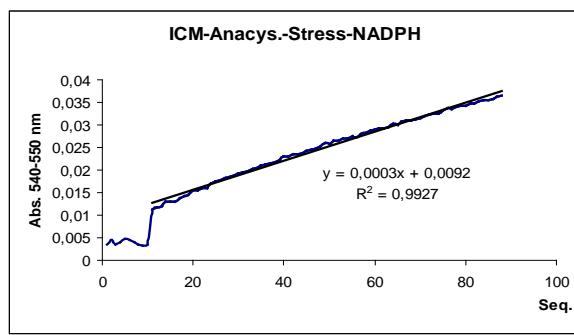
Stamm 2: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 1,66 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 62,7 µg



Stamm 2: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 8,31 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 62,7 µg

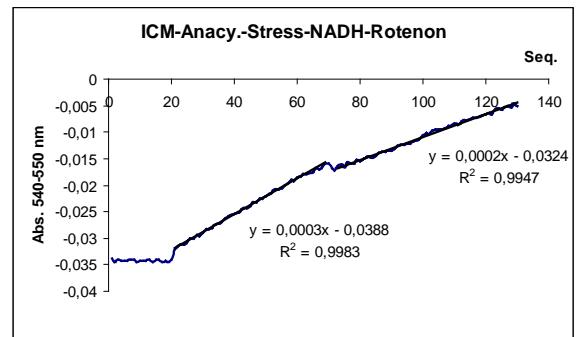


Stamm 3: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 61 µg

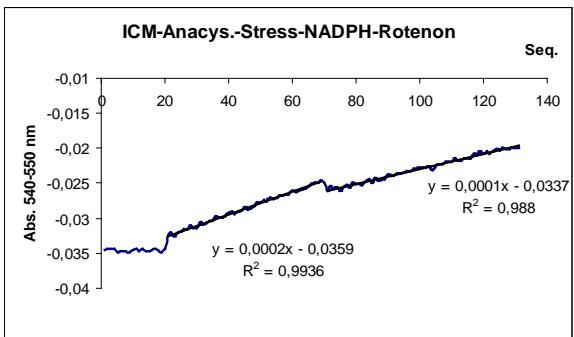


Stamm 3: Aktivität in Anwesenheit der NADPH
Spez. Aktivität = 5,12 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 61 µg

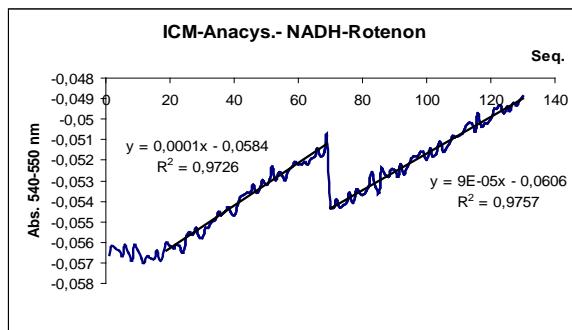
6.4.I.I.I Wirkung des Rotenon auf die Aktivität der ICM



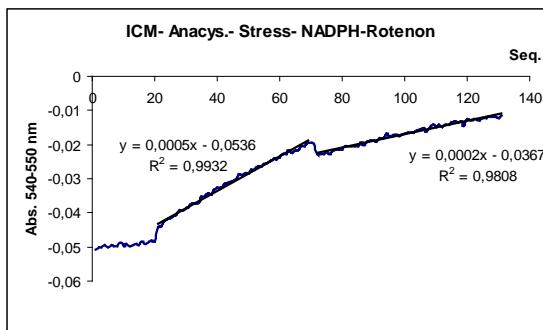
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 3,63 nmol/(min.* mg) auf 2,42 nmol/(min.* mg) reduziert.
Das sind 1,21 nmol/(min.* mg) weniger.



Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 2,42 nmol/(min.* mg) auf 1,21 nmol/(min.* mg) reduziert.
Das sind 1,21 nmol/(min.* mg) weniger.

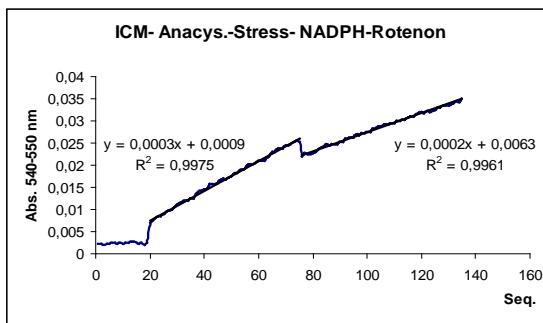


Stamm 2: 100%iger Hemmung



Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 8,31 nmol/(min.* mg) auf 3,32 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 5 nmol/(min.* mg) weniger.

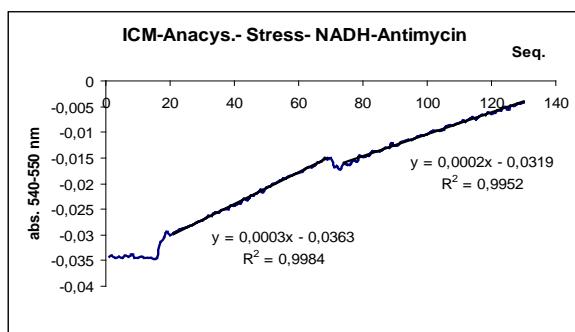
NADH
ist nicht aktiv
deswegen wird
keine
Hemmung
berechnet



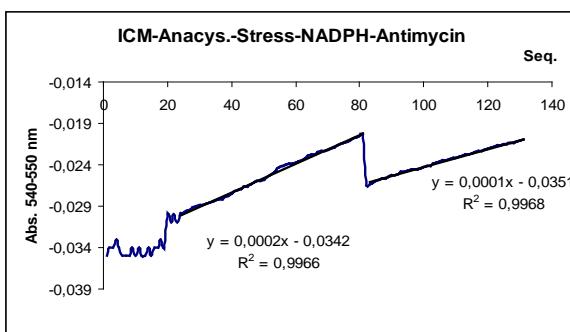
Stamm 3: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 5,12 nmol/(min.* mg) auf 3,42 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 1,71 nmol/(min.* mg) weniger.

6.4.I.I.2

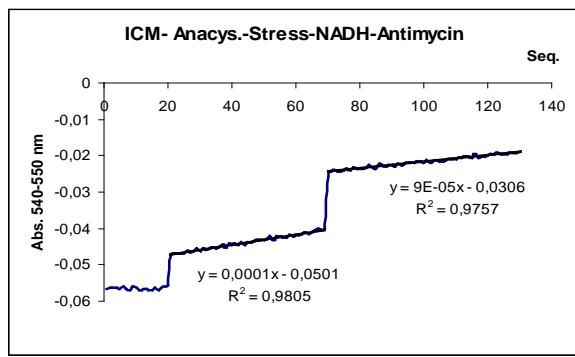
Wirkung des Antimycin auf die Aktivität der ICM



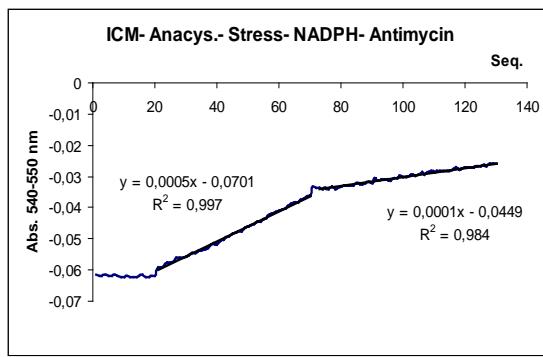
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 3,63 nmol/(min.* mg) auf 2,42 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 1,21 nmol/(min.* mg) weniger



Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 2,42 nmol/(min.* mg) auf 1,21 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 1,21 nmol/(min.* mg) weniger.

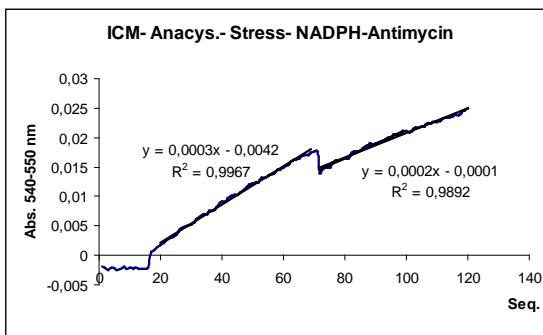


Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.



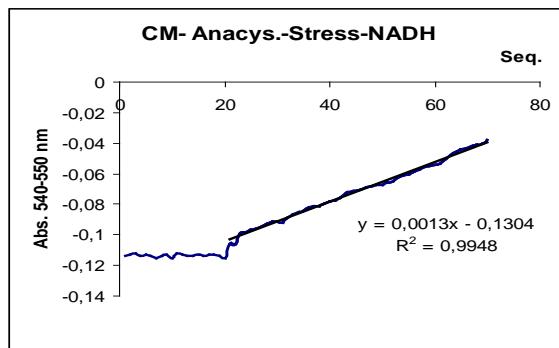
Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 8,31 nmol/(min.* mg) auf 1,66 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 6,65 nmol/(min.* mg) weniger.

NADH
ist nicht aktiv
deswegen wird
keine
Hemmung
berechnet

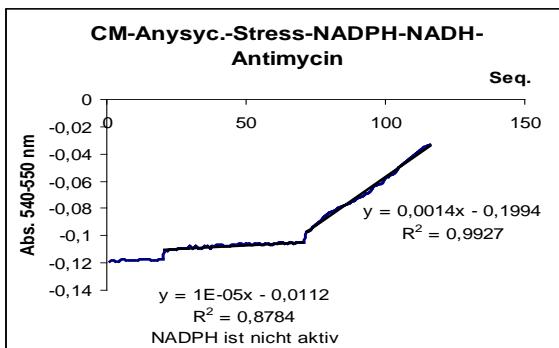


Stamm 3: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 5,12 nmol/(min.* mg) auf 3,42 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 1,71 nmol/(min.* mg) weniger.

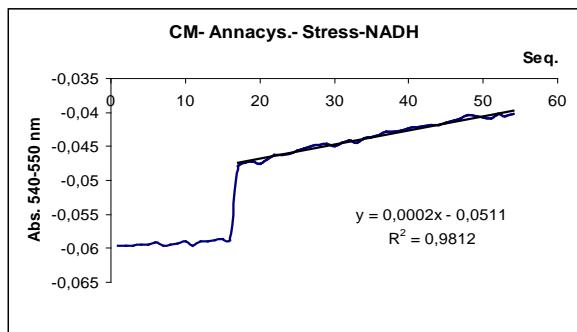
6.4.I.2 Die Spezifische Aktivität der CM in Anwesenheit der NADH und NADPH



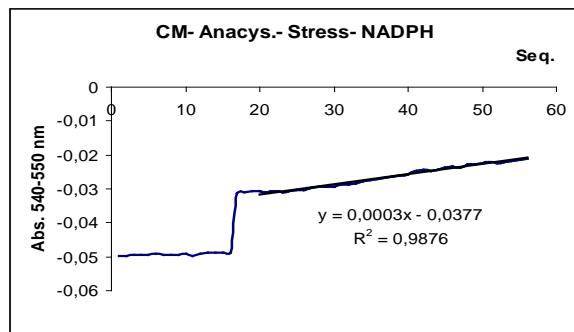
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 10,13 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 144 µg
Salzmedium : 0,25 mM



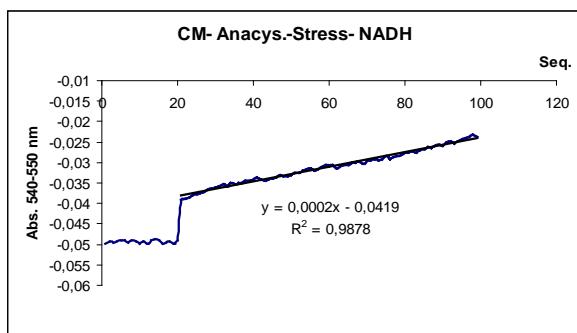
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADH bzw. in NADPH inaktiv
Die Protein Konz.: 144 µg
Salzmedium : 0,25 mM



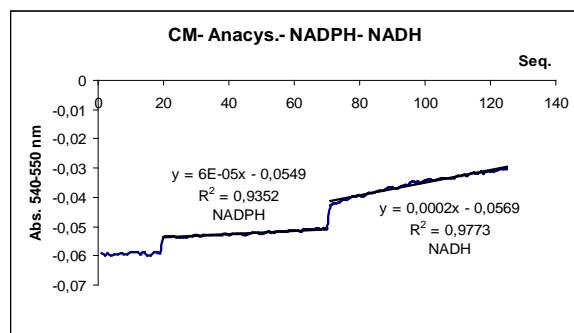
Stamm 2: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 0,43 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 484 μ g



Stamm 2: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 0,65 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 484 μ g

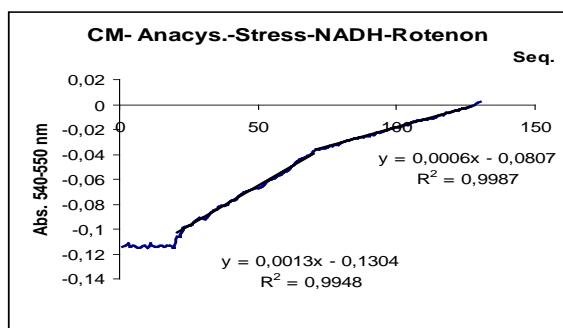


Stamm 3: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 1,51 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 138,4 μ g



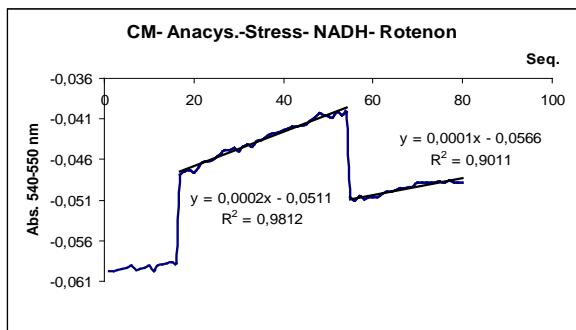
Stamm 3: Aktivität in Anwesenheit der NADH bzw. in NADPH inaktiv
Protein Konz. : 138,4 μ g

6.4.I.2.I Wirkung des Rotenon auf die Aktivität der CM

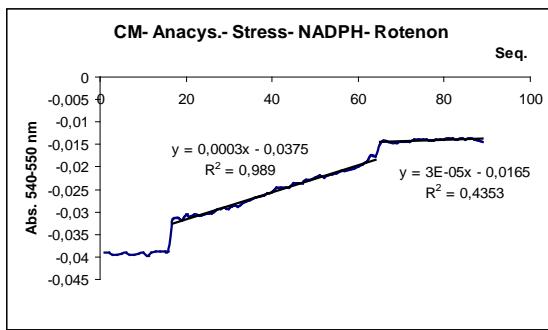


Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 9,4 nmol/(min.* mg) auf 4,34 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 5,1 nmol/(min.* mg) weniger

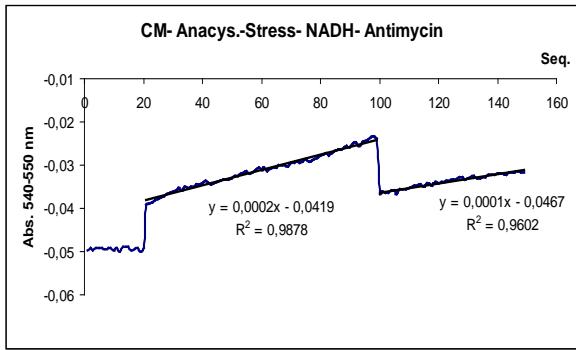
NADPH
ist nicht aktiv
deswegen wird
keine
Hemmung
berechnet



Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 0,43 nmol/(min.* mg) auf 0,22 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 0,22 nmol/(min.* mg) weniger.



Stamm 2: NADPH-Rotenon mit 100%iger Hemmung

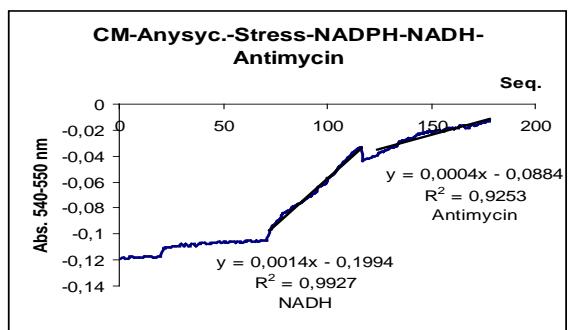


Stamm 3: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 1,51 nmol/(min.* mg) auf 0,75 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 0,753 nmol/(min.* mg) weniger.

NADPH
ist nicht aktiv
deswegen wird
keine
Hemmung
berechnet

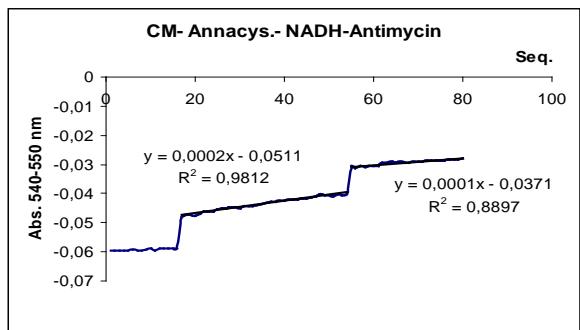
6.4.1.2.2

Wirkung des Antimycin auf die Aktivität der CM

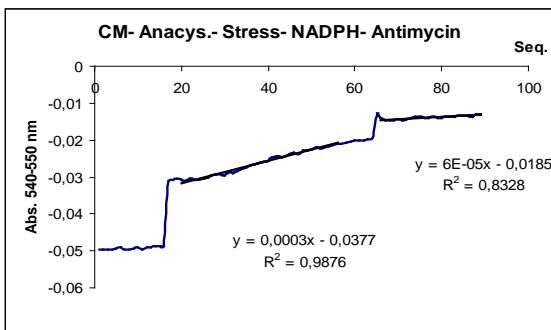


Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 10,13 nmol/(min.* mg) auf 2,9 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 7,23 nmol/(min.* mg) weniger.

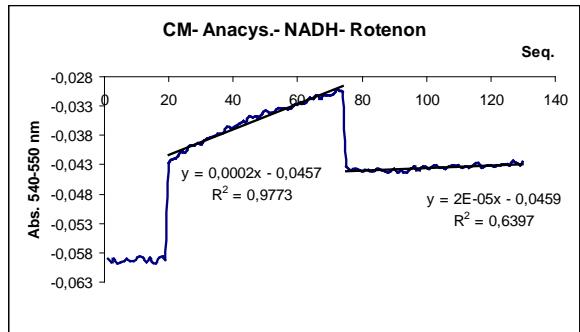
NADPH
ist nicht aktiv
deswegen wird
keine
Hemmung
berechnet



Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 0,43 nmol/(min.* mg) auf 0,22 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 0,22 nmol/(min.* mg) weniger.



Stamm 2: NADPH- Antimycin mit 100%iger Hemmung



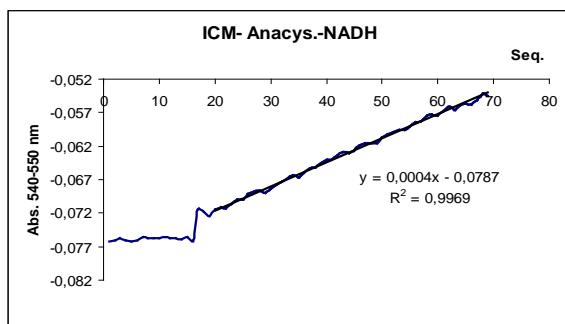
Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.

NADPH
ist nicht aktiv
deswegen wird
keine
Hemmung
berechnet

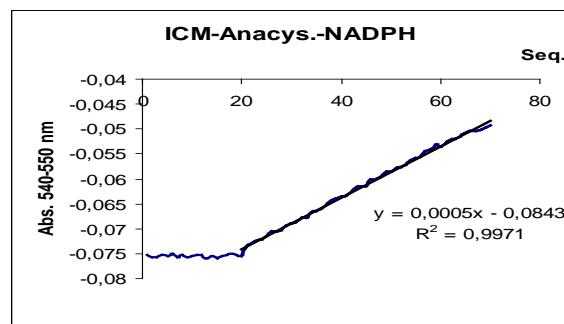
6.4.2 Die Ergebnisse zu den im normalen Medium gezüchteten *Anacystis nidulans* PCC 630I.

Im Salzmedium gezüchtete <i>Anacystis nidulans</i> PCC 630I			Im normalem Medium gezüchtete <i>Anacystis nidulans</i> PCC 630I		
ICM-CM	NADH	Antimycin Rotenon	ICM-CM	NADH	Antimycin Rotenon
	NADPH	Antimycin Rotenon		NADPH	Antimycin Rotenon

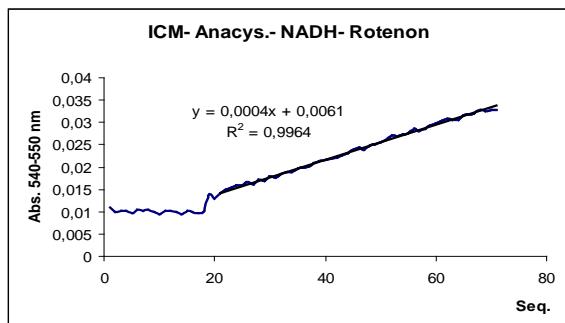
6.4.2.I Die Spezifische Aktivität der ICM in Anwesenheit der NADH und NADPH



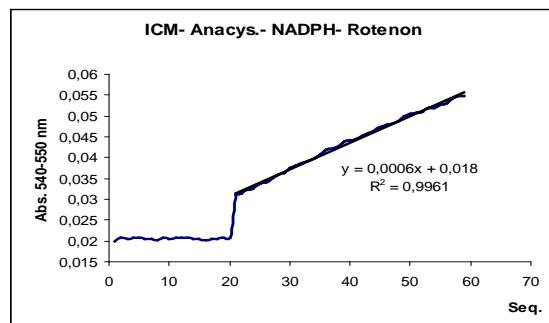
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 5,7 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 73 µg



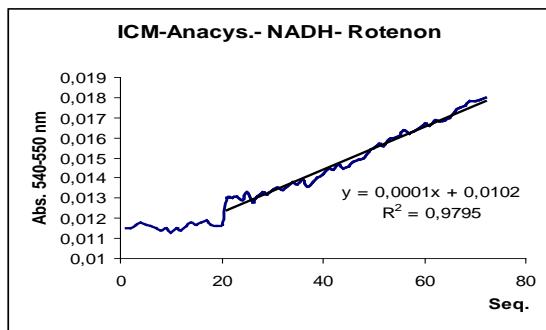
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADPH
Spez. Aktivität = 7,134 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 73 µg



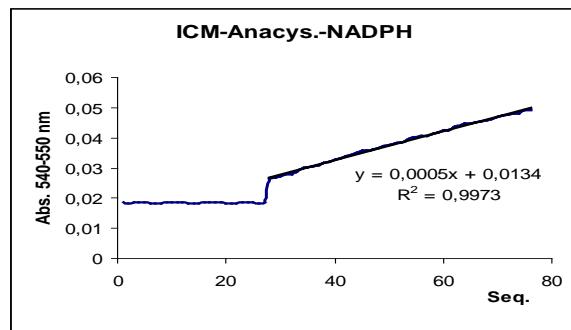
Stamm 2 : Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 10,3 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 40,5 µg



Stamm 2 : Aktivität in Anwesenheit der NADPH
Spez. Aktivität = 15,4 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 40,5 µg



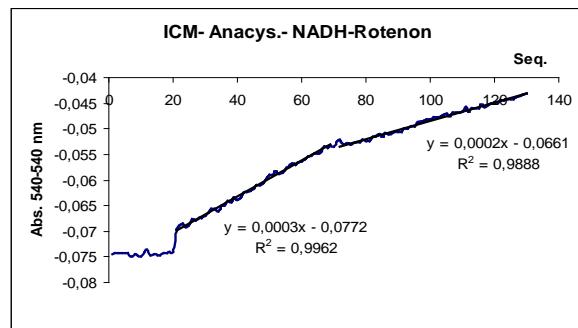
Stamm 3 : Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 2,4 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 43,5 µg



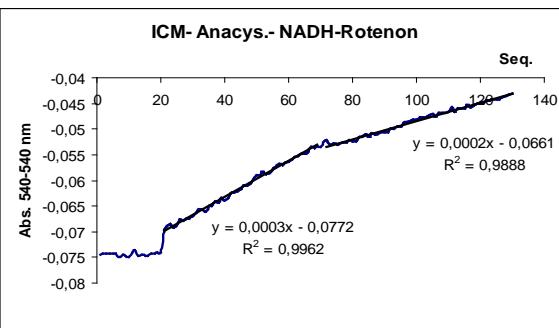
Stamm 3 : Aktivität in Anwesenheit der NADPH
Spez. Aktivität = 11,97 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 43,5 µg

6.4.2.I.I

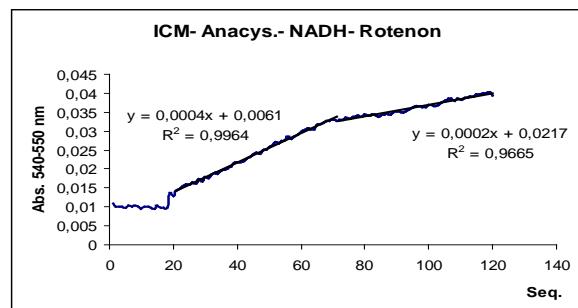
Wirkung des Rotenon auf die Aktivität der ICM



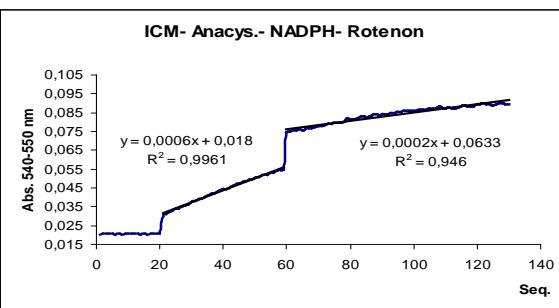
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 4,3 nmol/(min.* mg) auf 2,9 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 1,43 nmol/(min.* mg) weniger.



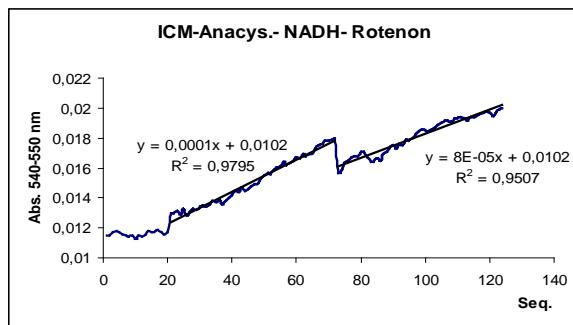
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 4,3 nmol/(min.* mg) auf 2,85 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 1,43 nmol/(min.* mg) weniger.



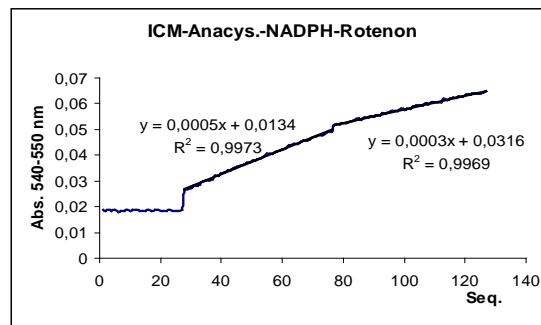
Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 10,3 nmol/(min.* mg) auf 5,14 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 5,14 nmol/(min.* mg) weniger.



Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 15,43 nmol/(min.* mg) auf 5,14 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 10,3 nmol/(min.* mg) weniger



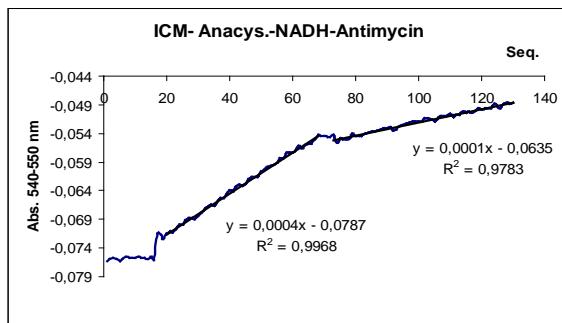
Stamm 3 : Spez. Aktivität ist durch Rotenon von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.



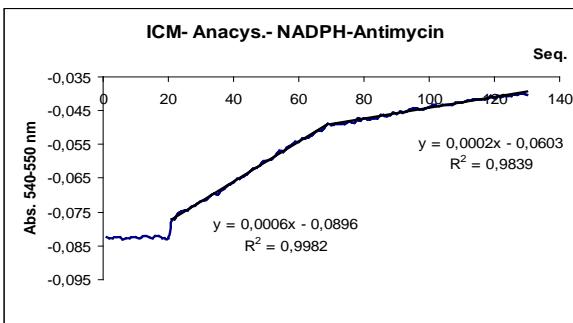
Stamm 3 : Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 11,97 nmol/(min.* mg) auf 7,2 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 4,8 nmol/(min.* mg) weniger.

6.4.2.I.2

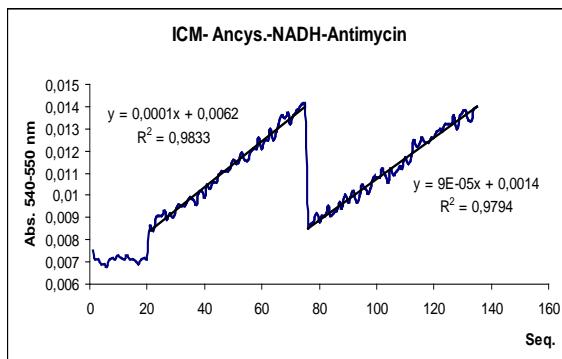
Wirkung des Antimycin auf der Aktivität der ICM



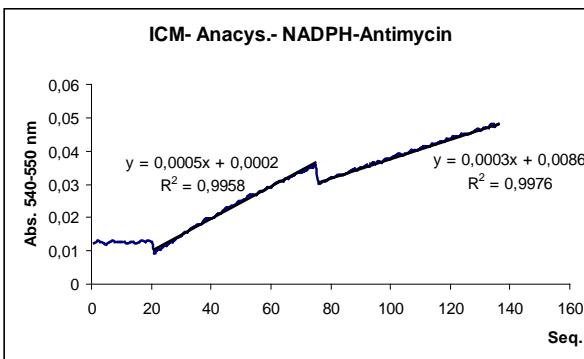
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 5,7 nmol/(min.* mg) auf 1,43 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 4,3 nmol/(min.* mg) weniger.



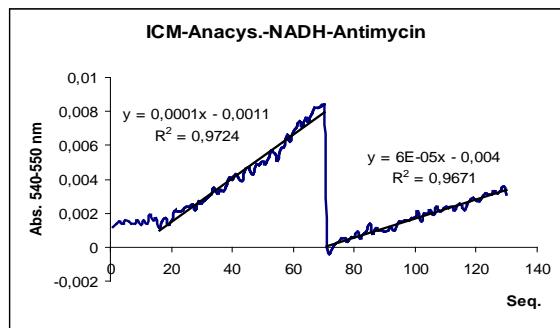
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 8,6 nmol/(min.* mg) auf 2,9 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 5,7 nmol/(min.* mg) weniger.



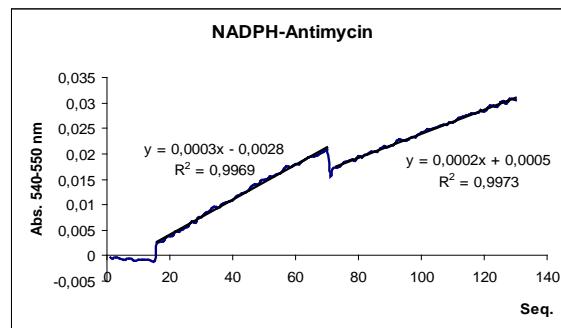
Stamm 2 : Spez. Aktivität ist durch Antimycin von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.



Stamm 2 : Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 12,9 nmol/(min.* mg) auf 7,72 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 5,14 nmol/(min.* mg) weniger.

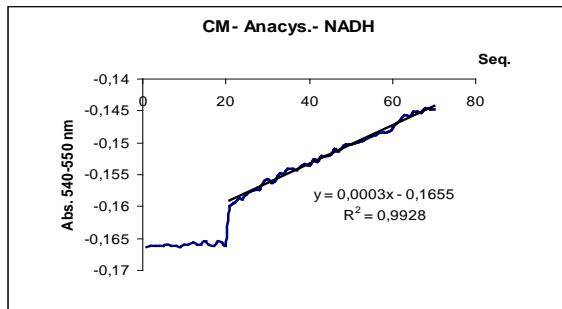


Stamm 3 : Spez. Aktivität ist durch Antimycin von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.

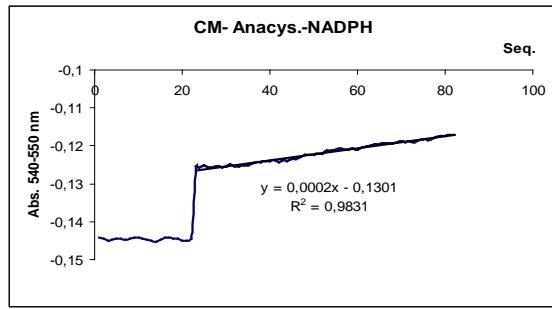


Stamm 3 : Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 7,2 nmol/(min.* mg) auf 4,8 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 2,4 nmol/(min.* mg) weniger.

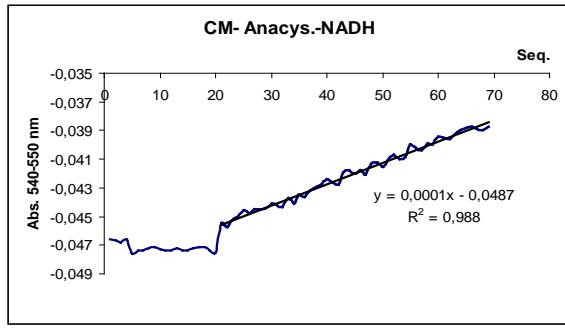
6.4.2.2 Die Spezifische Aktivität der CM in Anwesenheit der NADH und NADPH



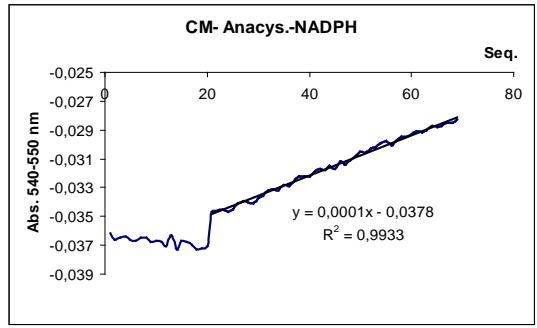
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 1,8 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 176,5 µg



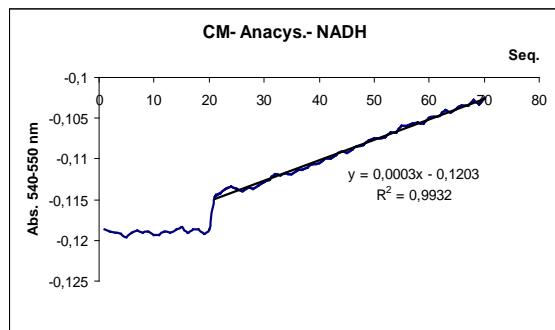
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADPH
Spez. Aktivität = 1,2 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 176,5 µg



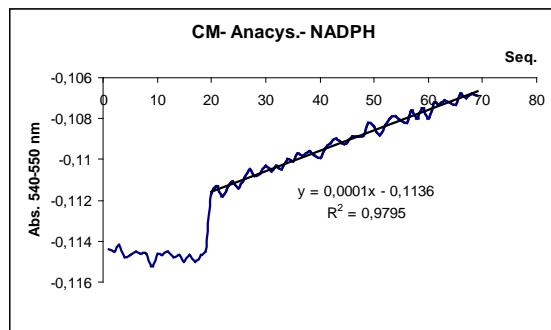
Stamm 2: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 1 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 123,5 µg



Stamm 2: Aktivität in Anwesenheit der NADPH
Spez. Aktivität = 1 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 123,5 µg

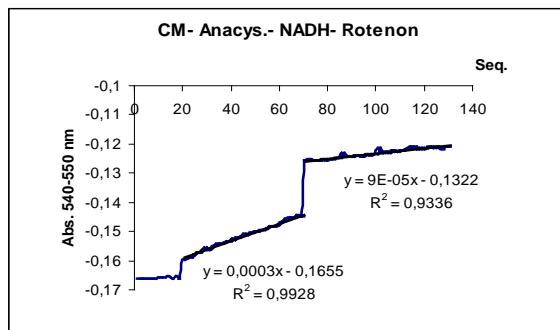


Stamm 3: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 2 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 165,3 µg

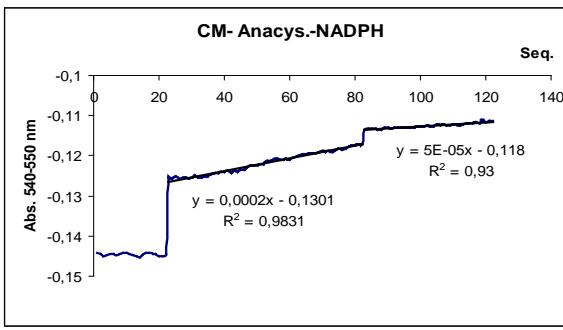


Stamm 3: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 0,6 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 165,3 µg

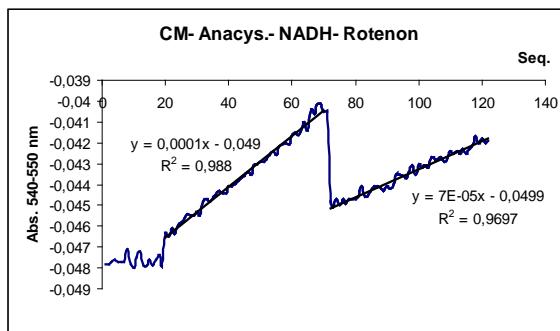
6.4.2.2.I Wirkung des Rotenon auf die Aktivität der CM



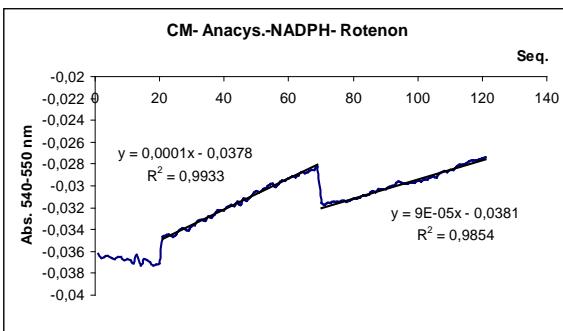
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.



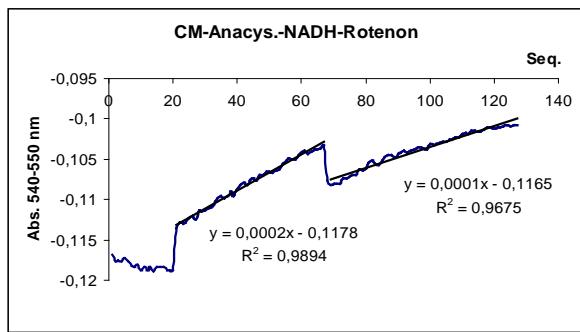
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.



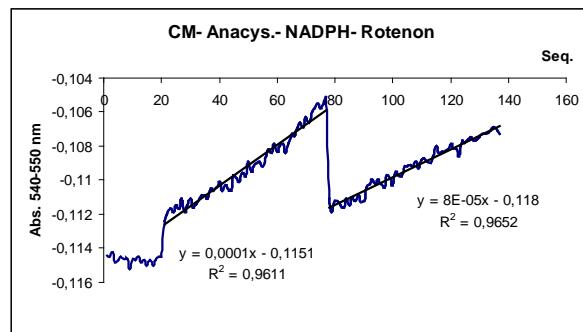
Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.



Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.



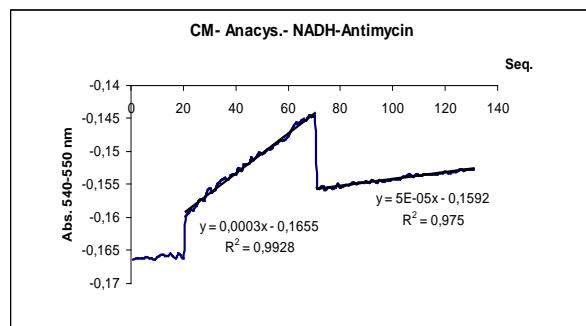
Stamm 3: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 1,3 nmol/(min.* mg) auf 0,63 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 0,63 nmol/(min.* mg) weniger.



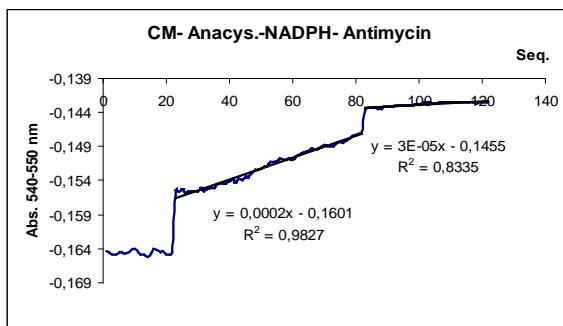
Stamm 3: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.

6.4.2.2.2

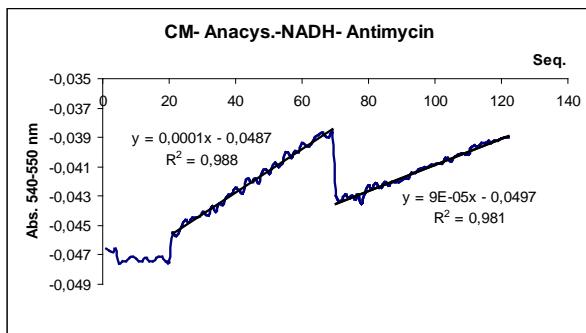
Wirkung des Antimycin auf der Aktivität der CM



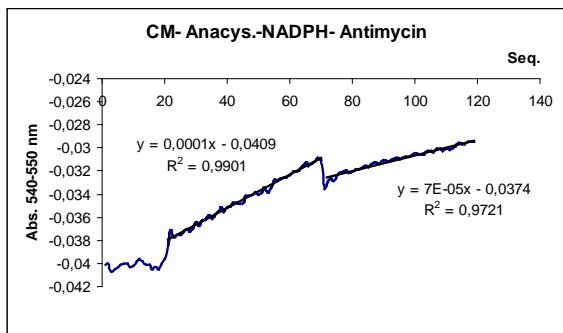
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.



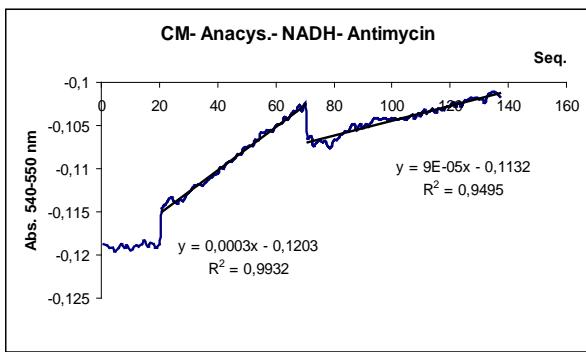
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.



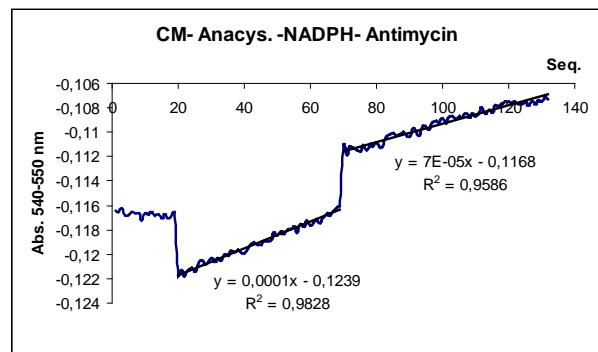
Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.



Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.



Stamm 3: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.



Stamm 3: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.

6.5 *Anabeana PCC 7120*

Hier sind die Aktivitäts-Kurven aus den verschiedenen Isolierungen zu sehen. Jede geerntete Kulturen wird als ein Stamm bezeichnet.

Standardansatz für alle Stämme:

7 μ M Ferricytochrom (oxidierte Cytochrom c)

150-200 μ M NADH bzw. NADPH

20 μ M KCN

100 μ M Hemmstoffe (Antimycin A und Rotenon)

Auf 700 μ l mit Phosphatpuffer (PH 7,4) aufgefüllt

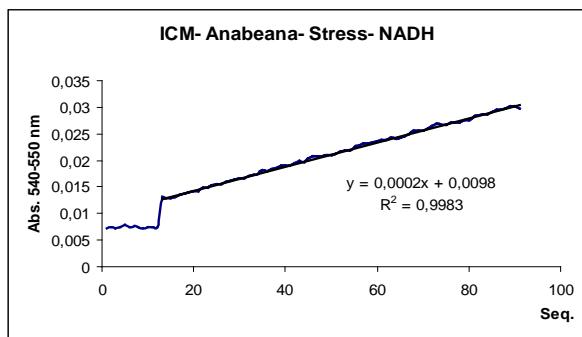
Die Salzkonzentration bei den im Salzmedium gezüchtete Stämme beträgt 0,5 mM.

Schwierigkeiten: Fast bei 88 % aller Stämme, ist eine Isolierung von CM- Membrane nicht möglich. Bei 7 % sind zwar CM- Membrane vorhanden, aber aufgrund von geringer Proteinkonzentrationen sind diese nicht brauchbar. Bei den restlichen 5 % zeigen die CM- Membrane keine Aktivität. Aus diesem Grund konnten wir bei dieser Spezies keine Untersuchungen der CM-Membrane durchführen.

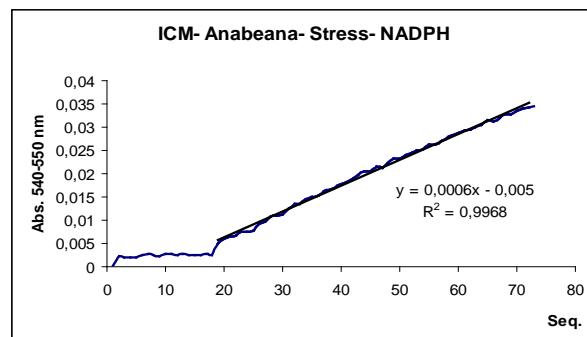
6.5.I Die Ergebnisse zu die im Salzmedium gezüchtete *Anabeana* PCC 7120

Im Salzmedium gezüchtete <i>Anabeana</i> PCC 7120			Im normalem Medium gezüchtete <i>Anabeana</i> PCC 7120		
ICM-CM	NADH	Antimycin Rotenon	ICM-CM	NADH	Antimycin Rotenon
	NADPH	Antimycin Rotenon		NADPH	Antimycin Rotenon

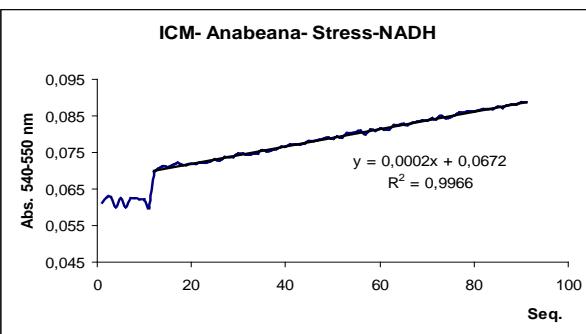
6.5.I.I Die Spezifische Aktivität der ICM in Anwesenheit der NADH und NADPH



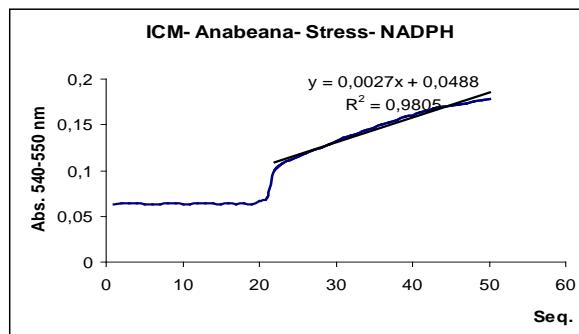
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 2,83 nmol/(min.* mg).
Protein Konz. : 73,6 µg



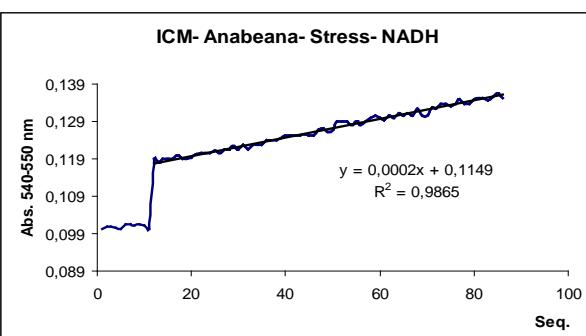
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADPH
Spez. Aktivität = 8,5 nmol/(min.* mg).
Protein Konz. : 73,6 µg



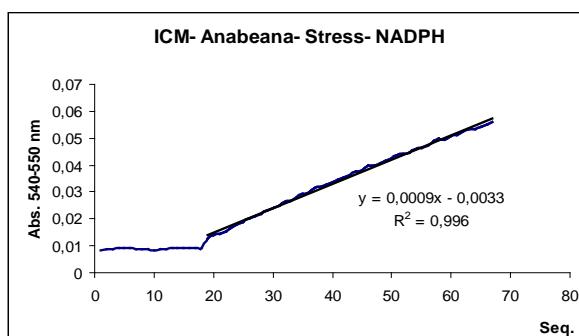
Stamm 2: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 3,255 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 64 µg



Stamm 2: Aktivität in Anwesenheit der NADPH
Spez. Aktivität = 43,95 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 64 µg



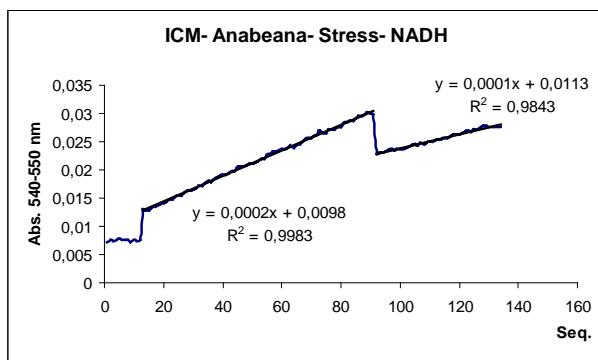
Stamm 3: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 2,125 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 98 µg



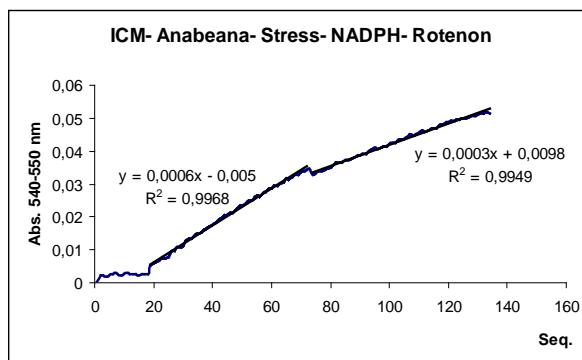
Stamm 3: Aktivität in Anwesenheit der NADPH
Spez. Aktivität = 9,566 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 98 µg

6.5.I.I.I

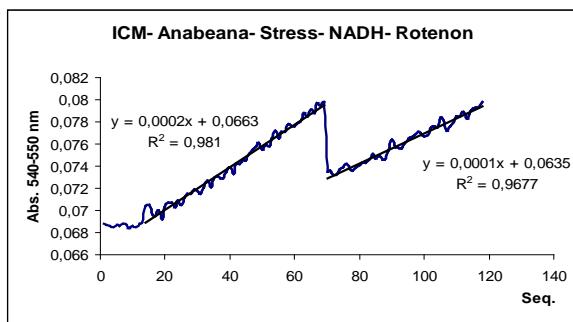
Wirkung des Rotenon auf die Aktivität der ICM



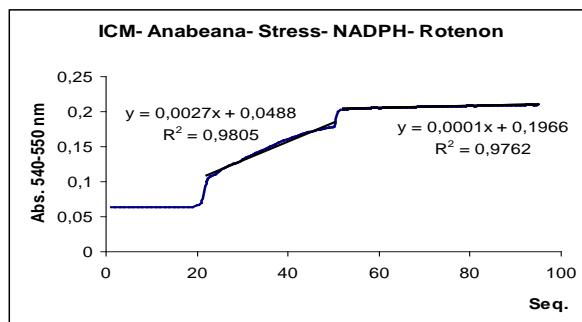
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 2,83 nmol/(min.* mg) auf 1,42 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 1,42 nmol/(min.* mg) weniger.



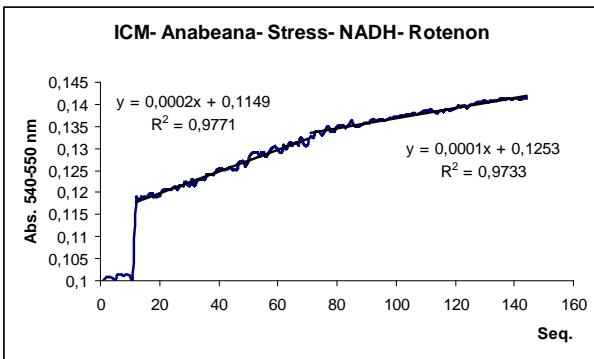
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 8,5 nmol/(min.* mg) auf 4,3 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 4,3 nmol/(min.* mg) weniger.



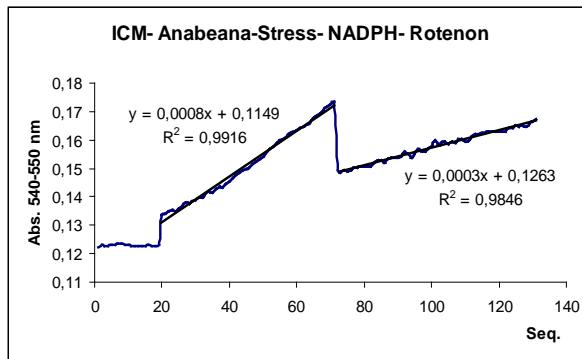
Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 3,3 nmol/(min.* mg) auf 1,63 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 1,63 nmol/(min.* mg) weniger.



Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 43,95 nmol/(min.* mg) auf 1,63 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 42,32 nmol/(min.* mg) weniger.



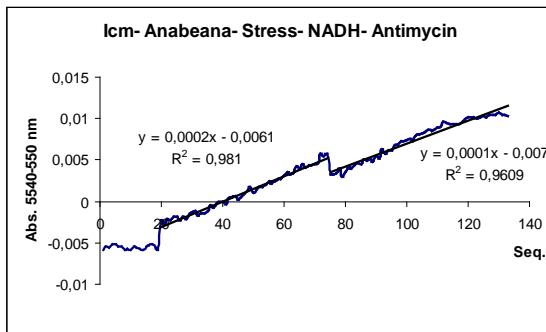
Stamm 3: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 2,13 nmol/(min.* mg) auf 1,1 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 1,1 nmol/(min.* mg) weniger.



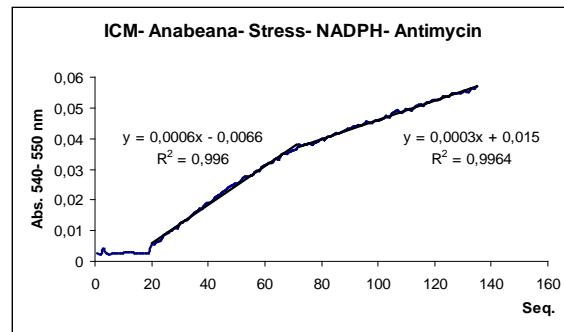
Stamm 3: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 8,5 nmol/(min.* mg) auf 3,2 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 5,32 nmol/(min.* mg) weniger.

6.5.I.1.2

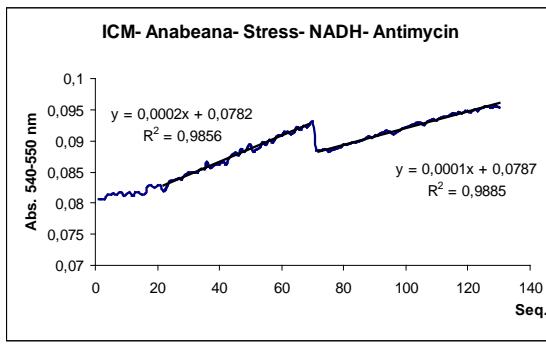
Wirkung des Antimycin auf die Aktivität der ICM



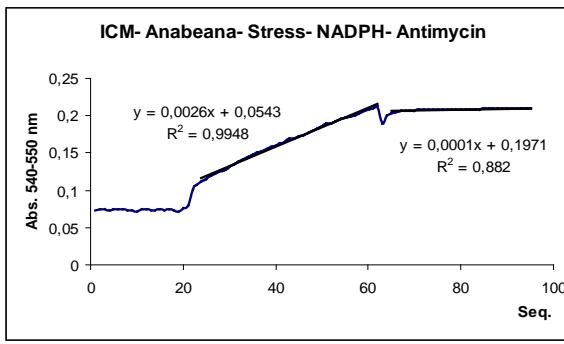
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 2,83 nmol/(min.* mg) auf 1,42 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 1,42 nmol/(min.* mg) weniger.



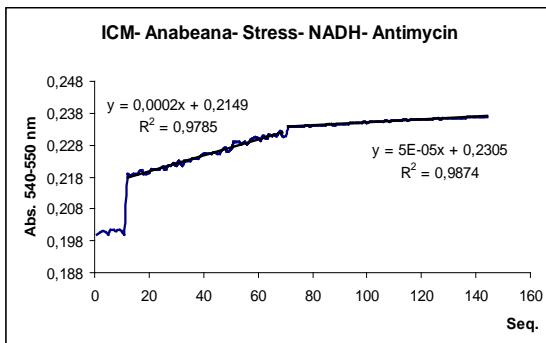
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 8,5 nmol/(min.* mg) auf 4,3 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 4,3 nmol/(min.* mg) weniger.



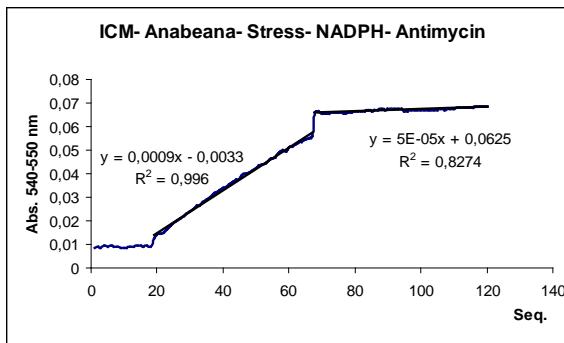
Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 3,3 nmol/(min.* mg) auf 1,63 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 1,63 nmol/(min.* mg) weniger.



Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 42,32 nmol/(min.* mg) auf 1,63 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 40,7 nmol/(min.* mg) weniger.



Stamm 3: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.

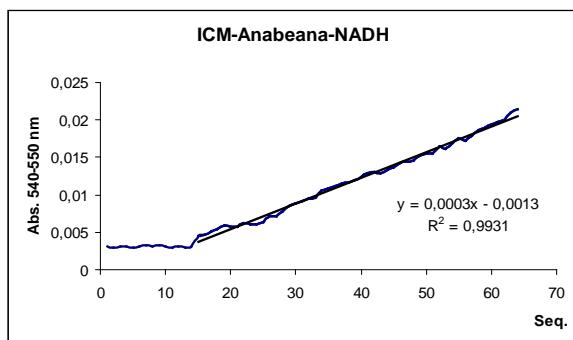


Stamm 3: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von nmol/(min.* mg) auf nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind nmol/(min.* mg) weniger.

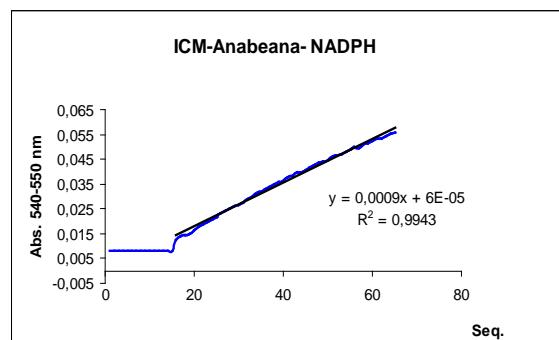
6.5.2 Die Ergebnisse zu dem im normalen Medium gezüchteten *Anabeana* PCC 7120.

Im Salzmedium gezüchtete <i>Anabeana</i> PCC 7120			Im normalem Medium gezüchtete <i>Anabeana</i> PCC 7120		
ICM-CM	NADH	Antimycin Rotenon	ICM-CM	NADH	Antimycin Rotenon
	NADPH	Antimycin Rotenon		NADPH	Antimycin Rotenon

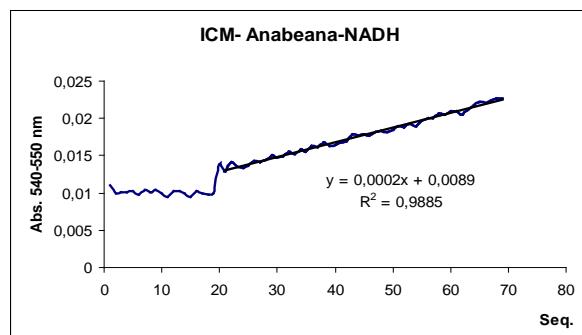
6.5.2.I Die Spezifische Aktivität der ICM in Anwesenheit der NADH und NADPH



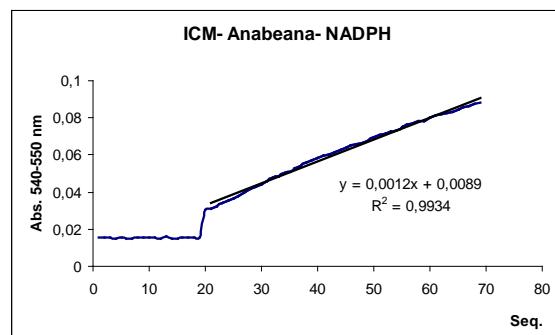
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 5 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 62,5 µg



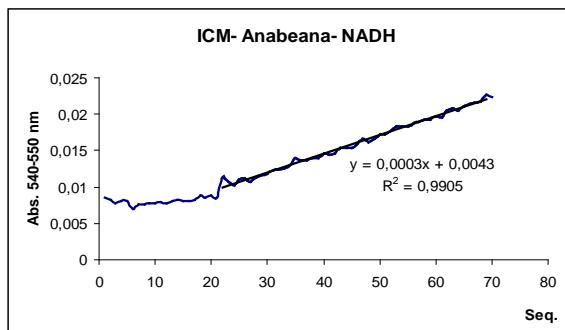
Stamm 1: Aktivität in Anwesenheit der NADPH
Spez. Aktivität = 15 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 62,5 µg



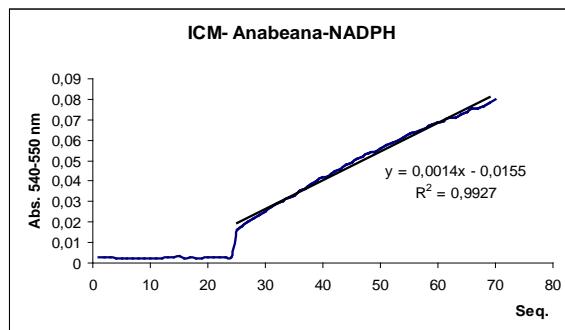
Stamm 2 : Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 4,21 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 49,5 µg



Stamm 2 : Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 25,25 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 49,5 µg

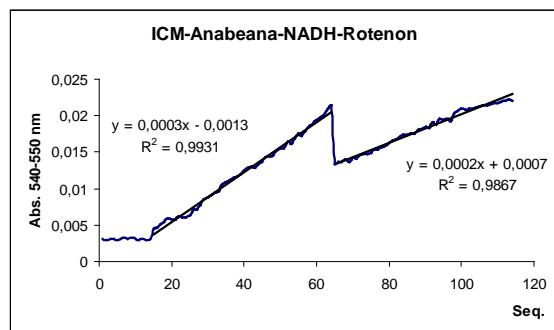


Stamm 3 : Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 6,3 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 49,9 µg

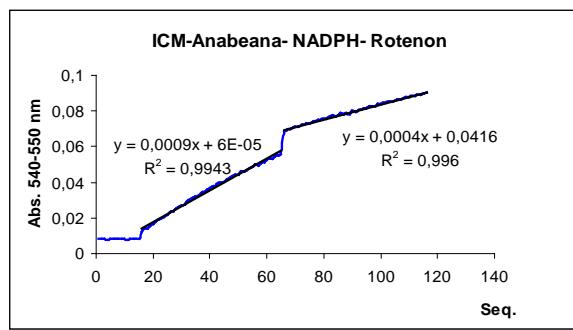


Stamm 3 : Aktivität in Anwesenheit der NADH
Spez. Aktivität = 29,225 nmol/(min.* mg)
Protein Konz. : 49,9 µg

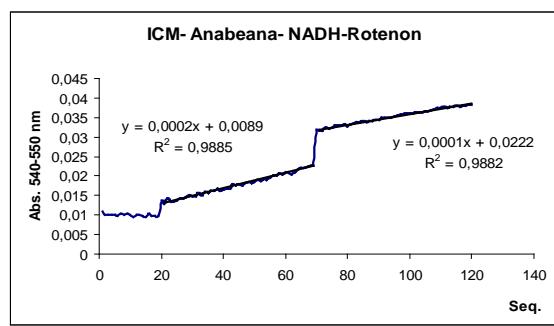
6.5.2.I.I Wirkung des Rotenon auf die Aktivität der ICM



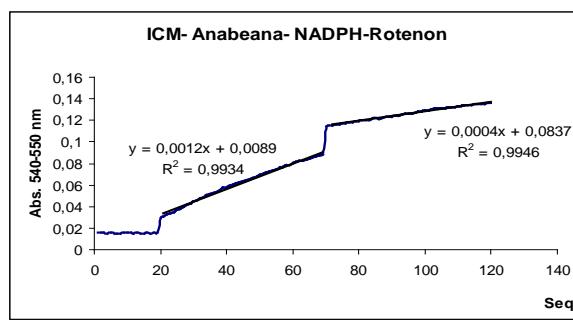
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 5 nmol/(min.* mg) auf 3,33 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 1,7 nmol/(min.* mg) weniger.



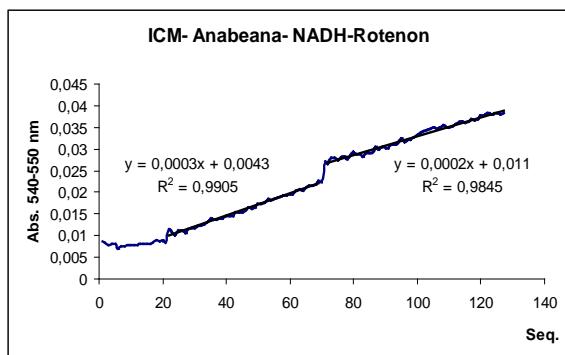
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 15 nmol/(min.* mg) auf 7 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 8,33 nmol/(min.* mg) weniger.



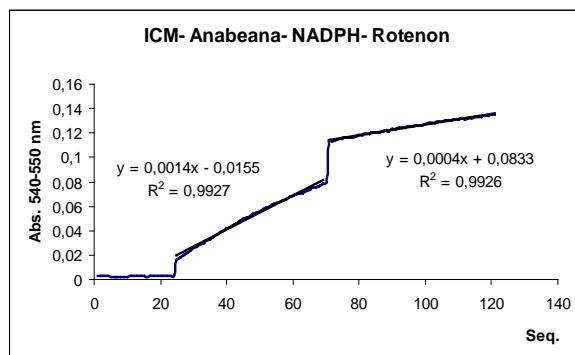
Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 4,21 nmol/(min.* mg) auf 2,11 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 2,11 nmol/(min.* mg) weniger.



Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 25,3 nmol/(min.* mg) auf 8,42 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 16,84 nmol/(min.* mg) weniger.

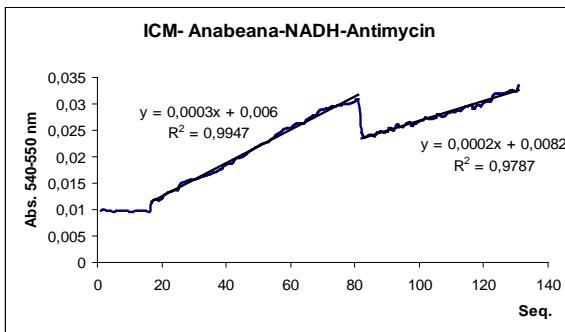


Stamm 3: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 6,3 nmol/(min.* mg) auf 4,2 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 2,1 nmol/(min.* mg) weniger.

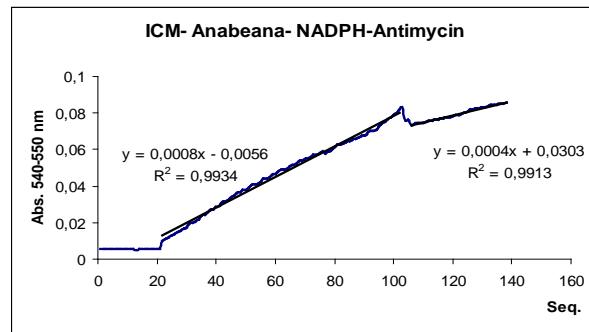


Stamm 3: Spez. Aktivität ist durch Rotenon von 29,13 nmol/(min.* mg) auf 8,35 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 20,9 nmol/(min.* mg) weniger.

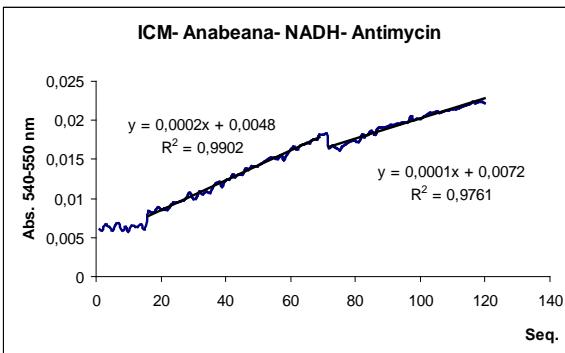
6.5.2.1.2 Wirkung des Antimycin auf die Aktivität der ICM



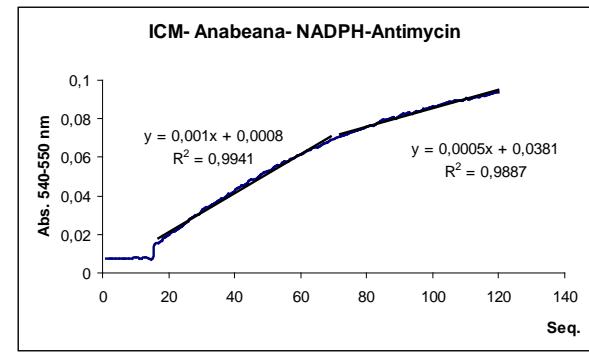
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 5 nmol/(min.* mg) auf 3,33 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 1,7 nmol/(min.* mg) weniger



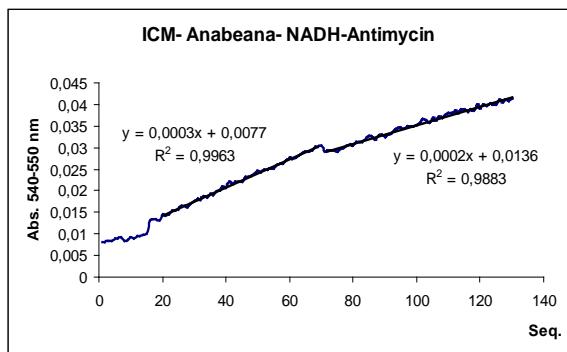
Stamm 1: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 13,3 nmol/(min.* mg) auf 6,7 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 6,7 nmol/(min.* mg) weniger



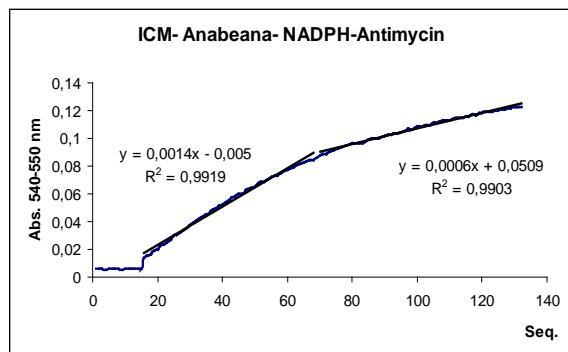
Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 4,21 nmol/(min.* mg) auf 2,11 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 2,11 nmol/(min.* mg) weniger.



Stamm 2: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 21,1 nmol/(min.* mg) auf 10,52 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 10,52 nmol/(min.* mg) weniger.



Stamm 3: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 6,3 nmol/(min.* mg) auf 4,2 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 2,1 nmol/(min.* mg) weniger



Stamm 3: Spez. Aktivität ist durch Antimycin von 29,23 nmol/(min.* mg) auf 12,53 nmol/(min.* mg) reduziert. Das sind 16,7 nmol/(min.* mg) weniger

Kapitel 7

Interpretationen der Kurven und die Ergebnisse

7.I Allgemein

Der Standardansatz bei allen Stämmen besteht aus:

- 5-10 μM Ferricytochrom (oxidiertes Cytochrom c)
- 150-200 μM NADH bzw. NADPH
- 10-30 μM KCN
- auf 700 μl mit Phosphatpuffer (PH 7,4) aufgefüllt.

Die Konzentration von Membranvesikel (ICM, CM) in einer Küvette soll zwischen 10-50 μg liegen und die die Konzentration von den Hemmstoffen (Antimycin A und Rotenon) soll zwischen 50 μM bis 150 μM sein.

Auf Grund der übersichtlichen und vergleichbaren Ergebnisse wurde die Aktivität nach einer konstanten Proteinkonzentration von **0,1 ng** bei allen Stämmen berechnet und dargestellt und zwar mit Hilfe der folgenden Formeln:

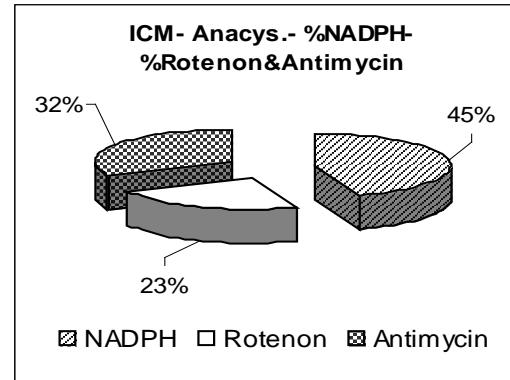
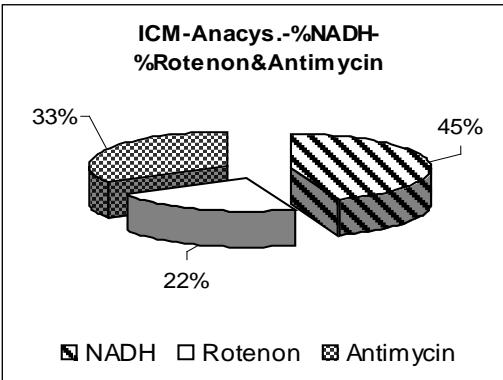
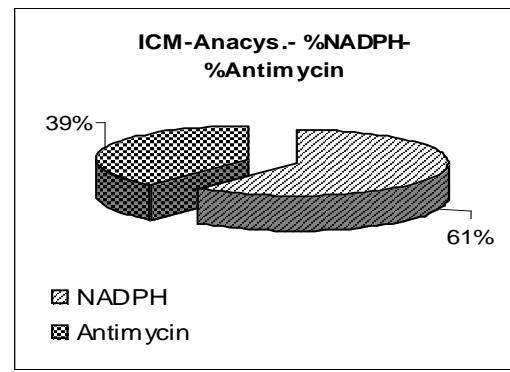
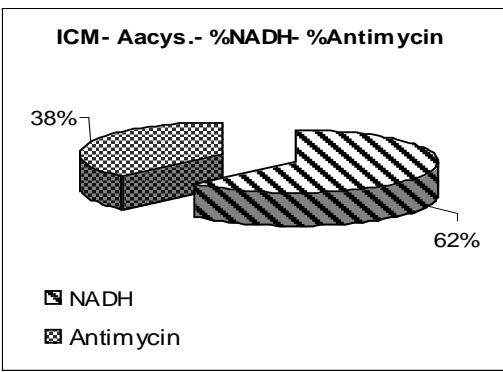
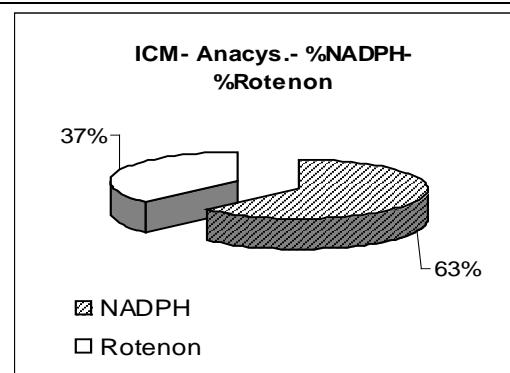
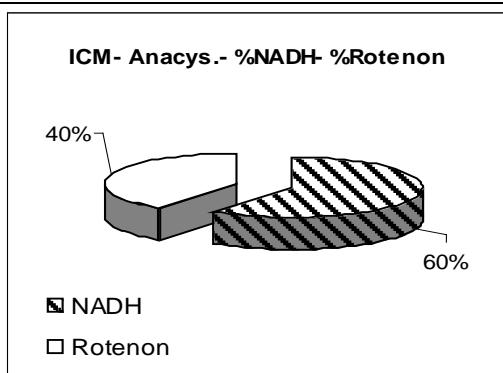
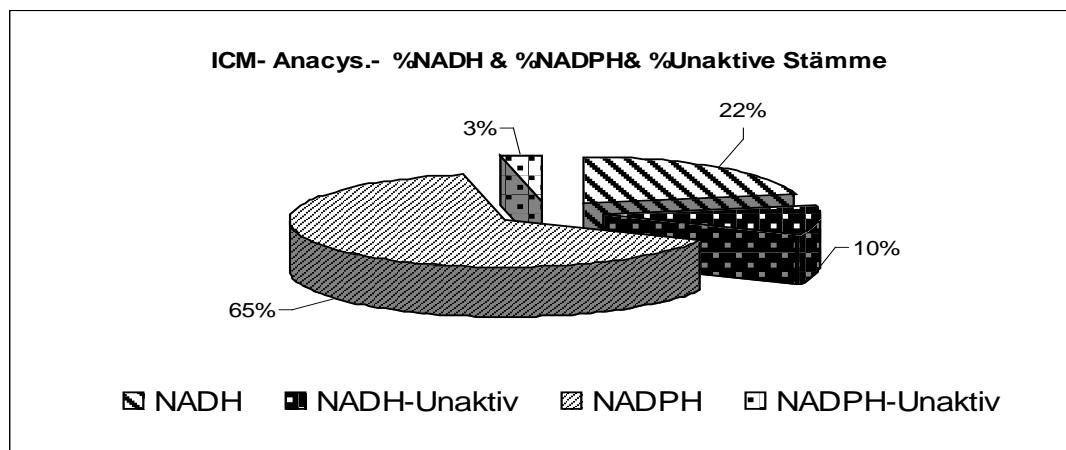
$$\Delta A = \text{Steigung} * (60\text{min}/3) \quad (7.1)$$

$$\Delta c [\mu\text{M}] = (\Delta A / 19,5) * 1000 \text{ (oder } 700\mu\text{l Volumen der Küvette)} \quad (7.2)$$

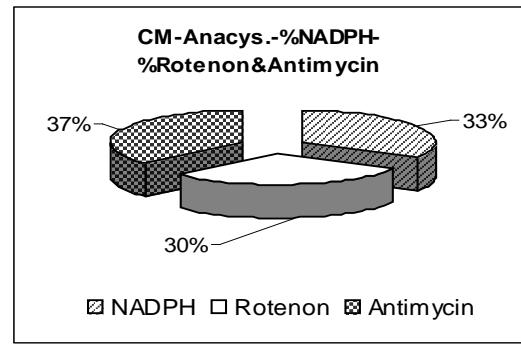
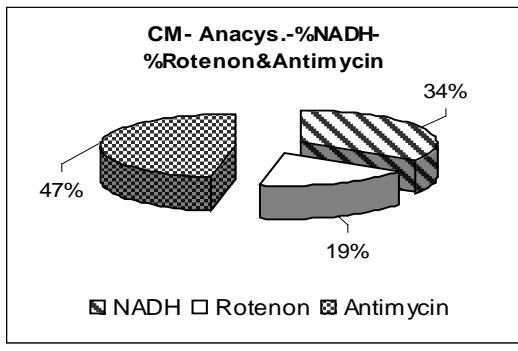
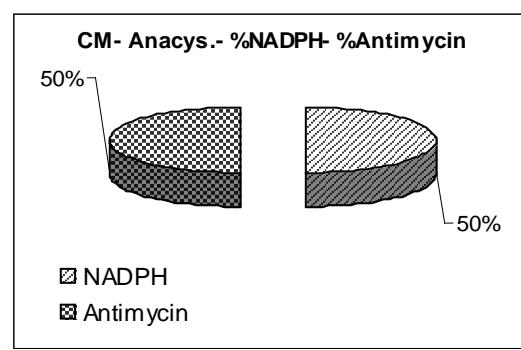
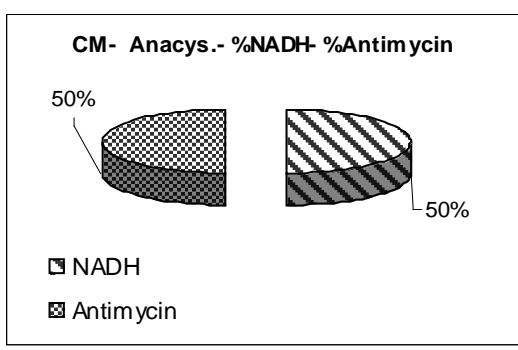
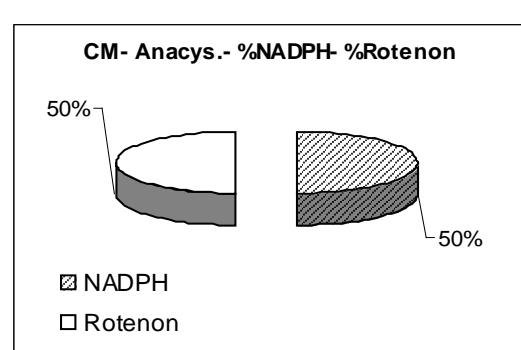
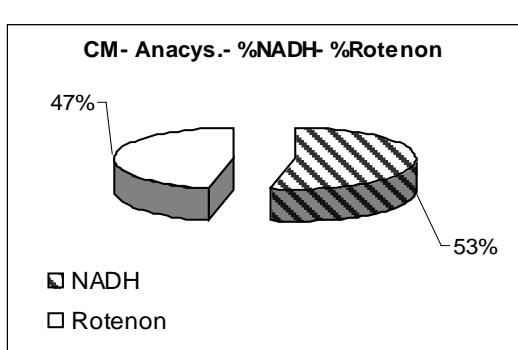
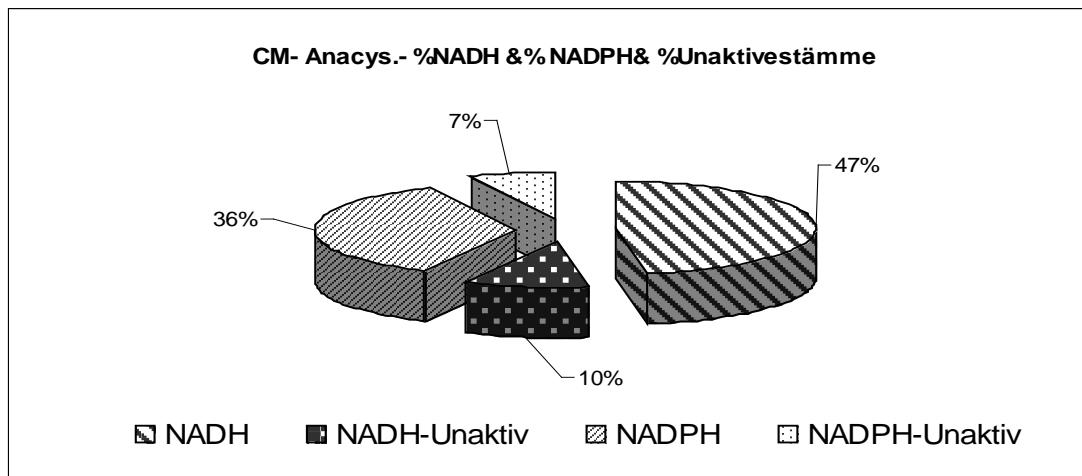
$$\text{Spez. Aktivität} = \Delta c / \text{Protein Konzentration} (= \mathbf{0,1 \text{ ng}}) \quad (7.2)$$

7.2 *Anacystis nidulans* PCC 630I

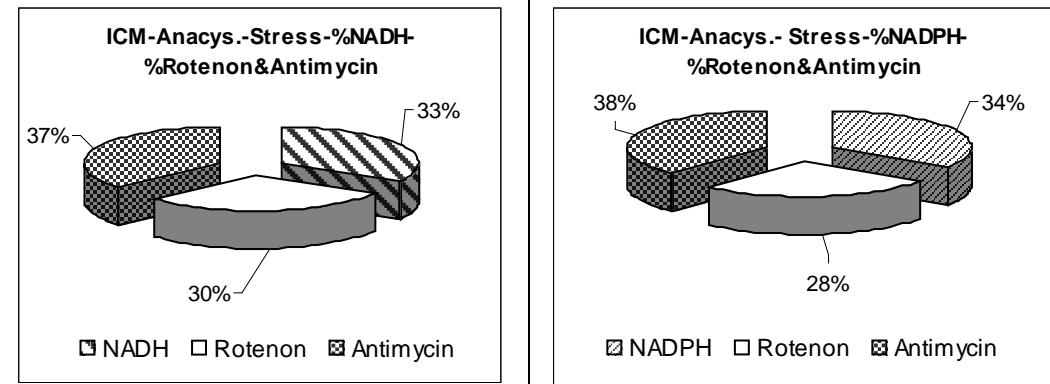
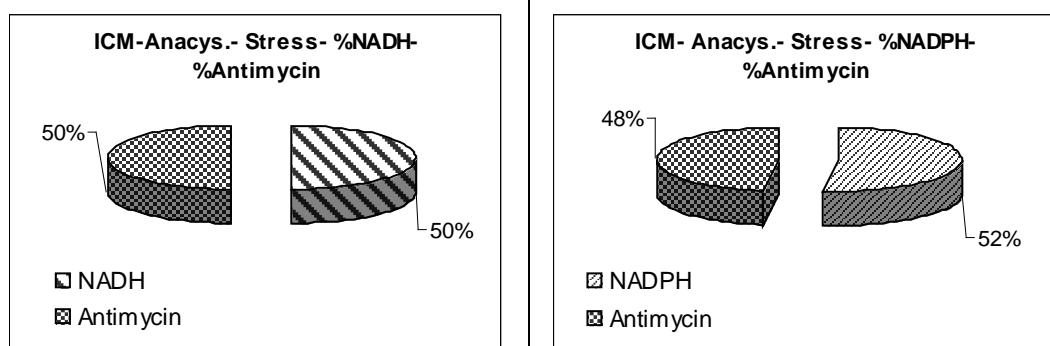
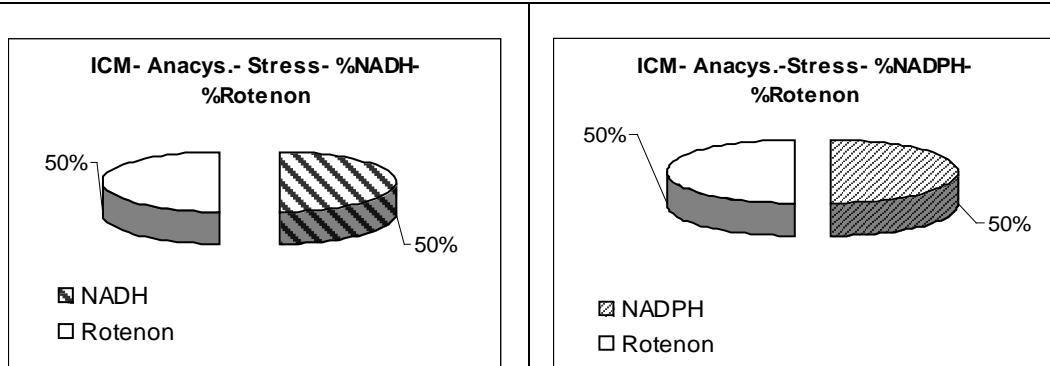
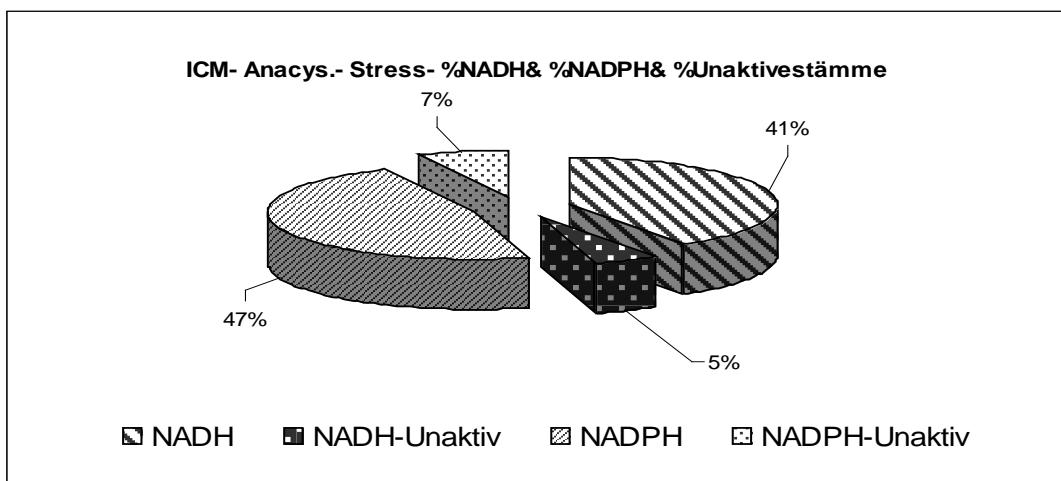
7.2.1 Interpretation der ICM-Kurven unter normalen Bedingungen.



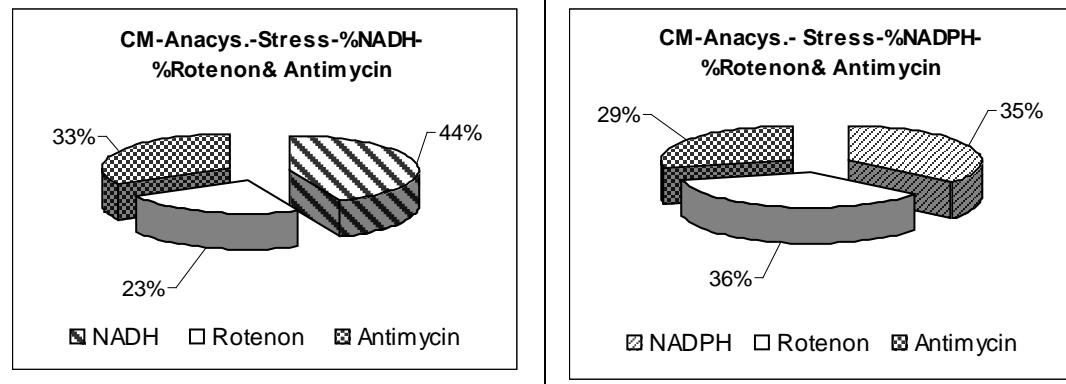
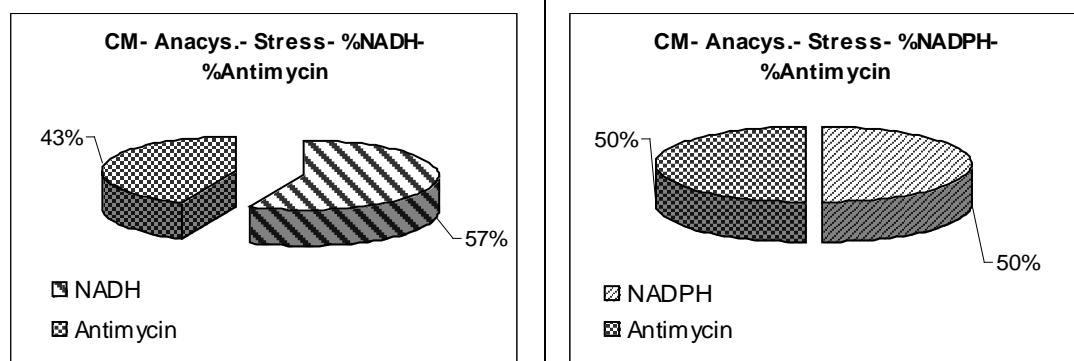
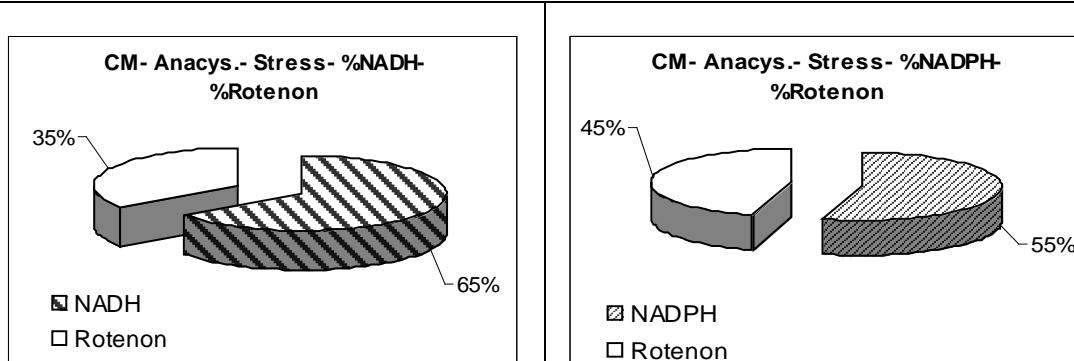
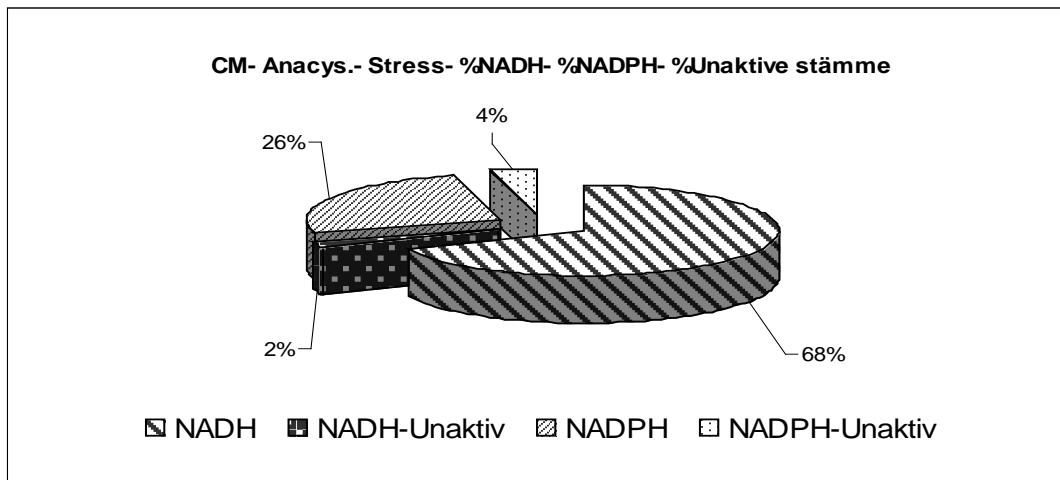
7.2.2 Interpretation der CM-Kurven unter normalen Bedingungen.



7.2.3 Interpretation der ICM-Kurven unter Stressbedingungen.

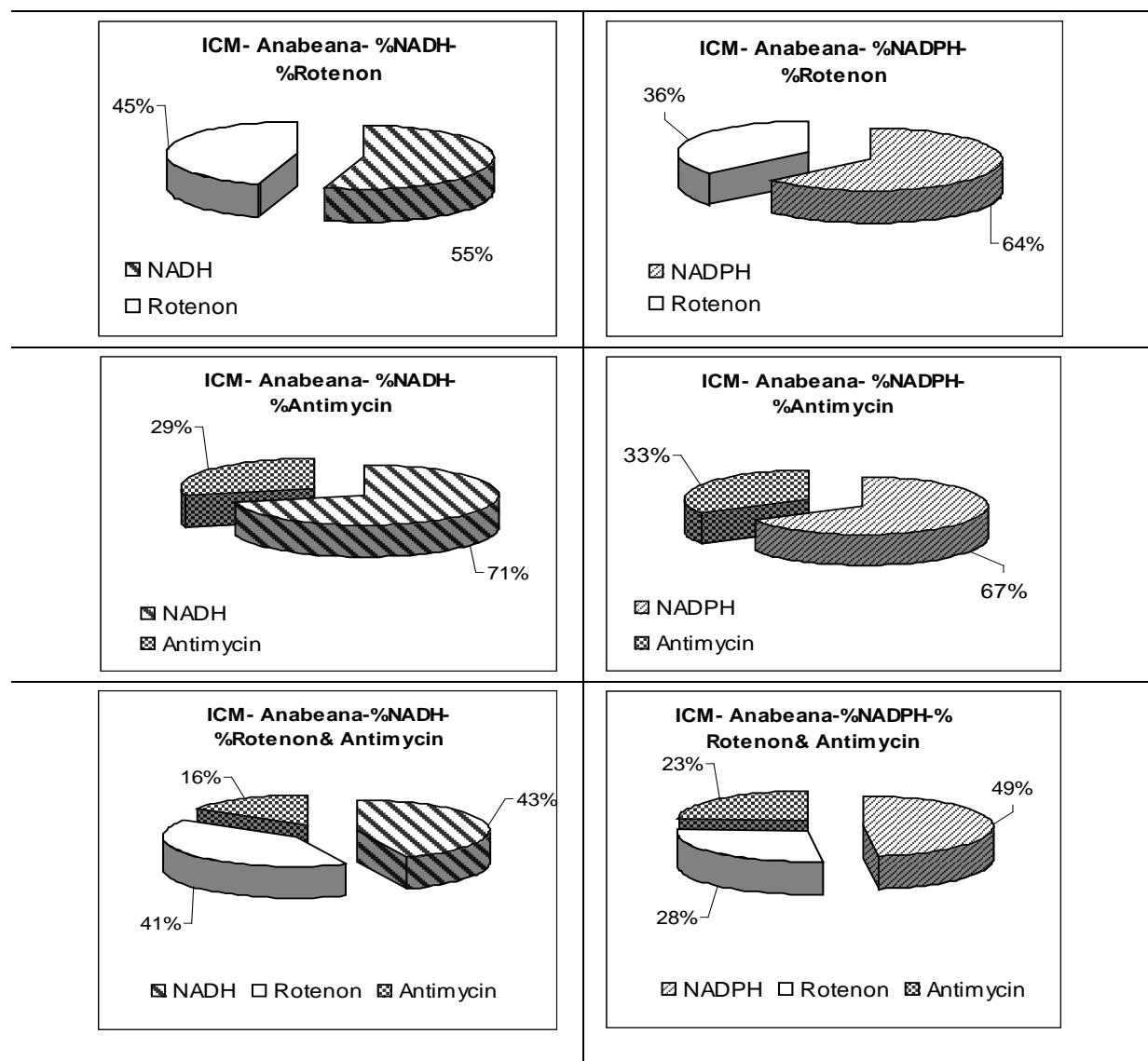
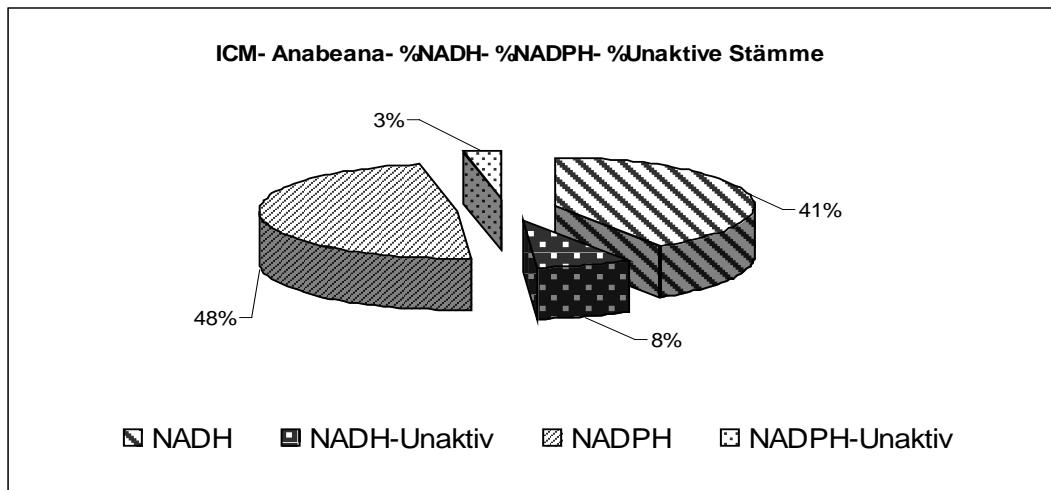


7.2.4 Interpretation der CM-Kurven unter Stressbedingungen.

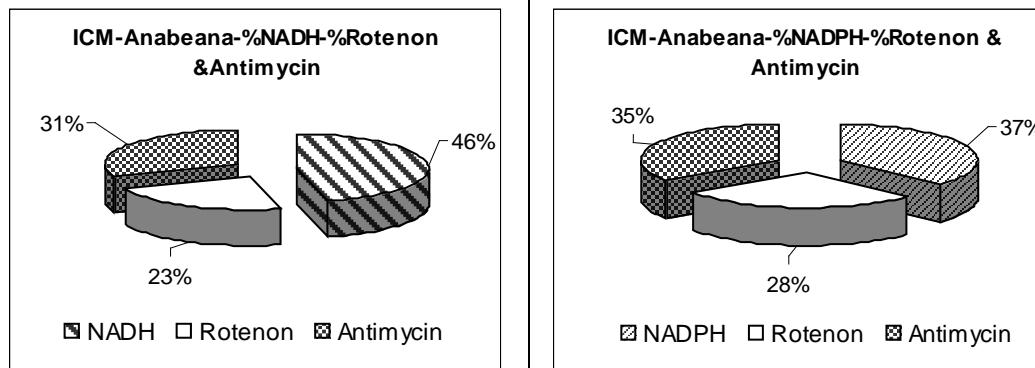
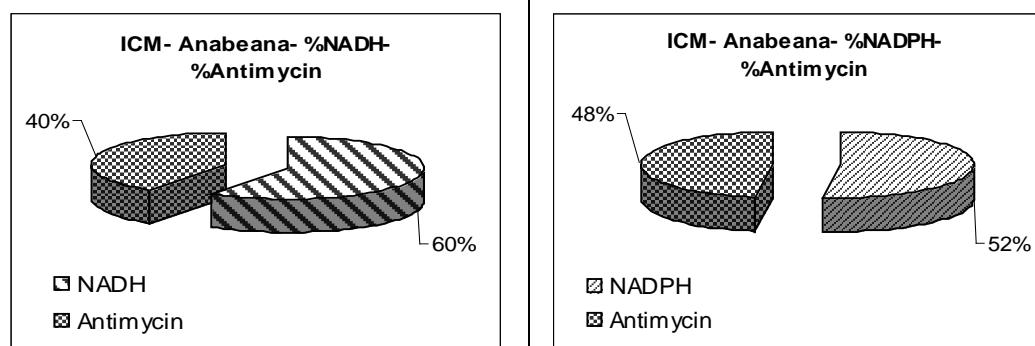
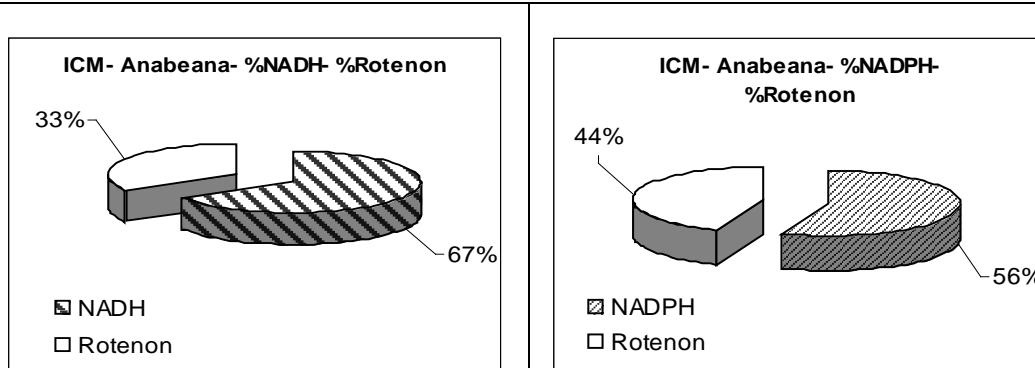
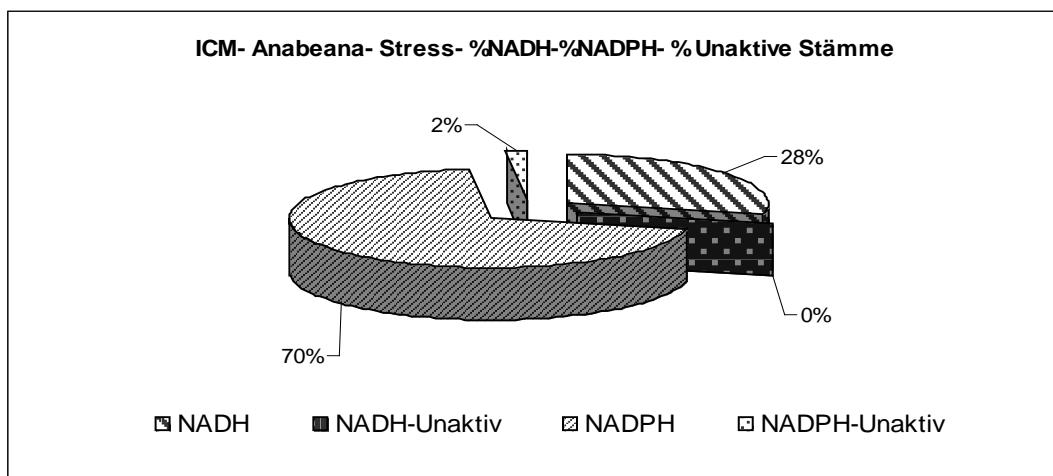


7.3 *Anabeana* PCC 7120

7.3.1 Interpretation der ICM-Kurven unter normalen Bedingungen.

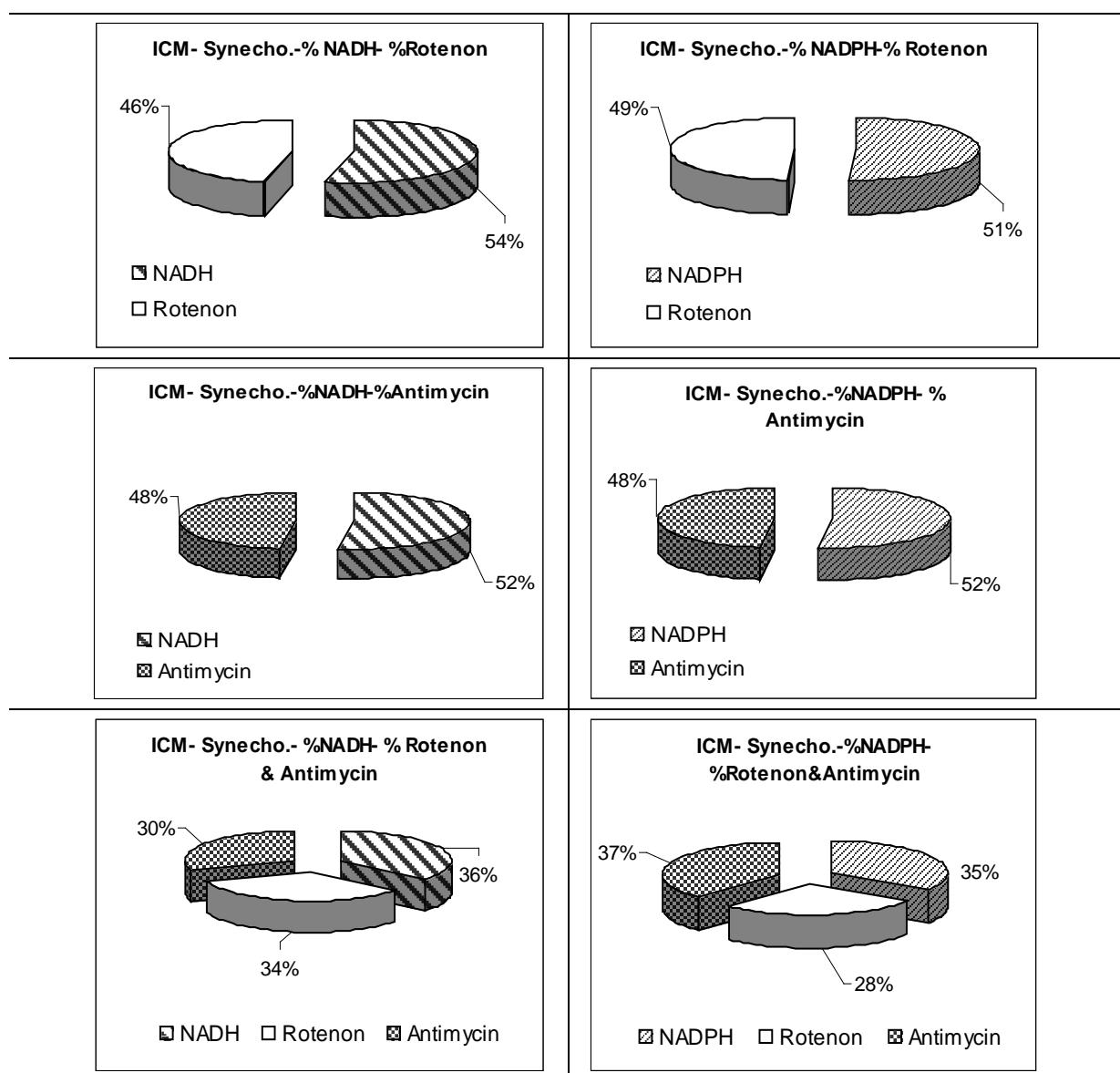
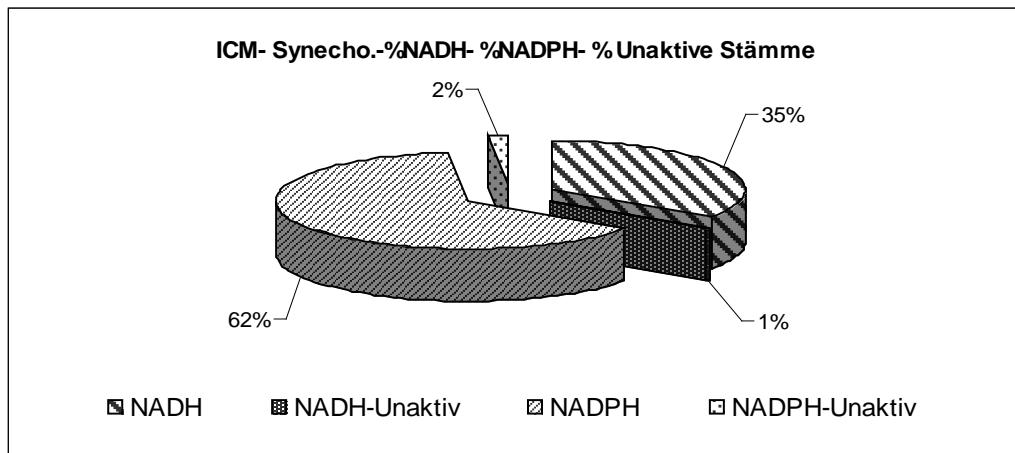


7.3.2 Interpretation der ICM-Kurven unter Stressbedingungen.

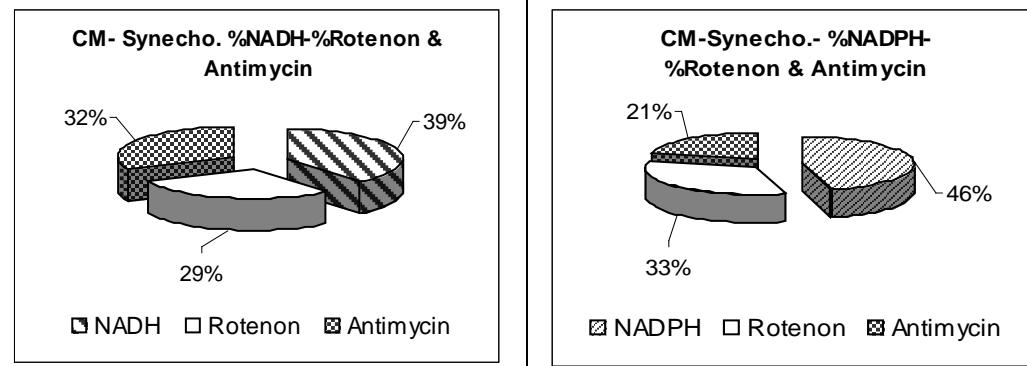
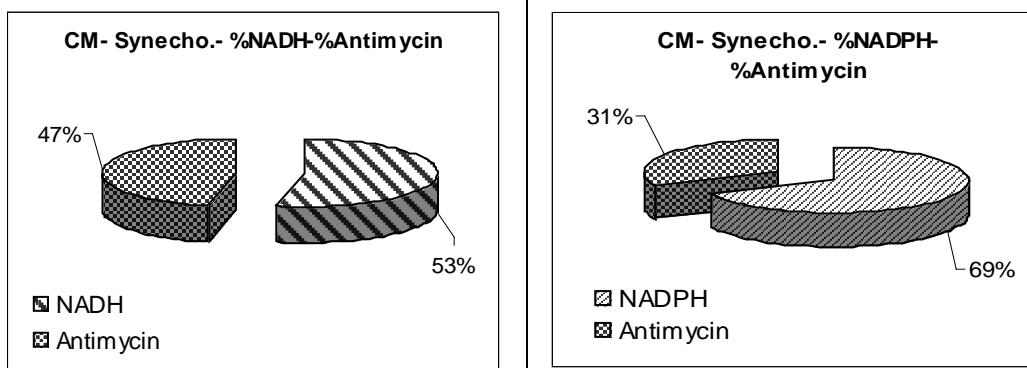
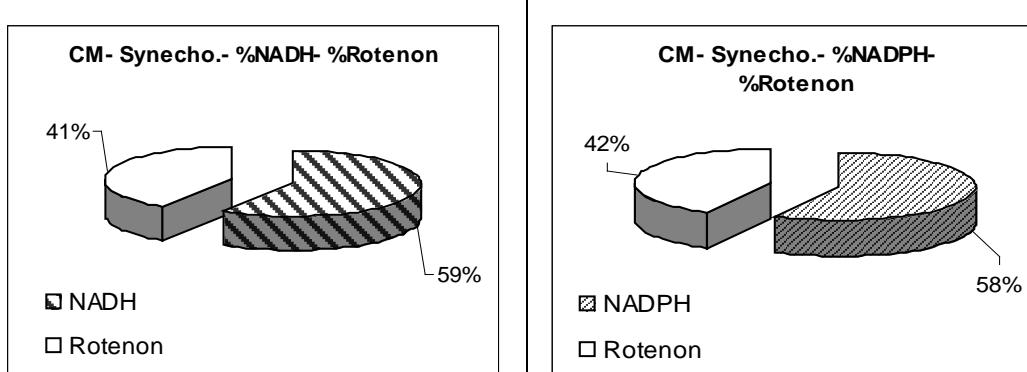
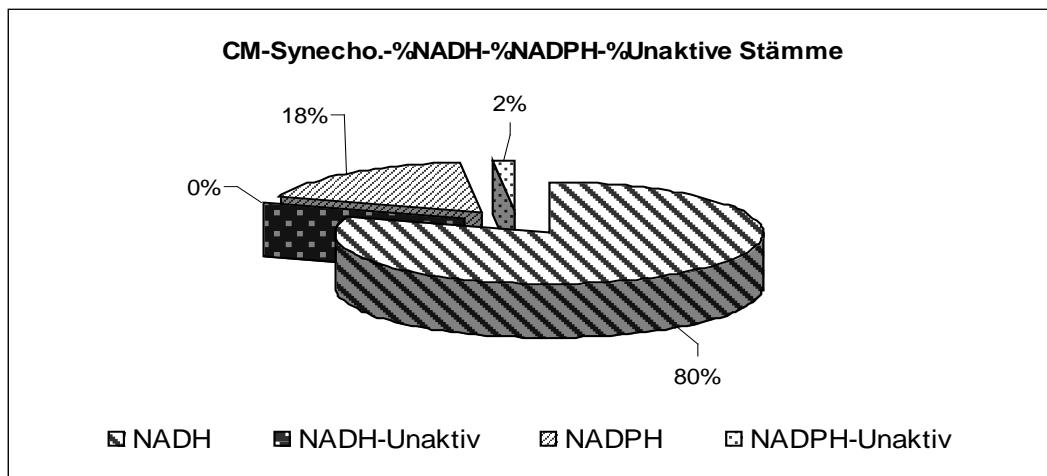


7.4 *Synechocystis PCC 6803*

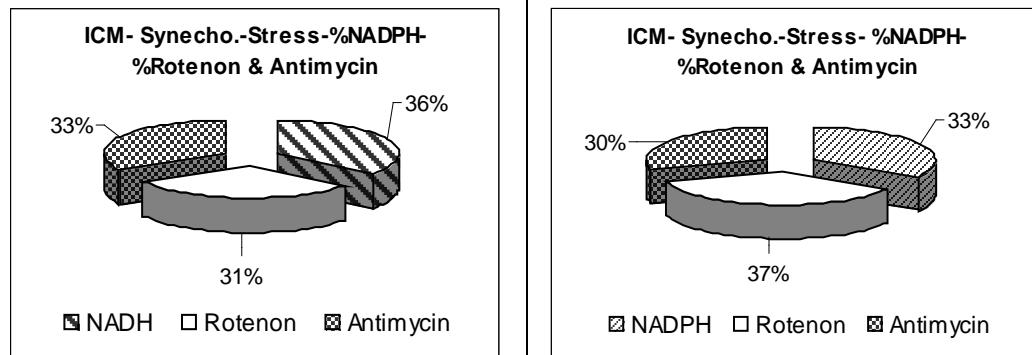
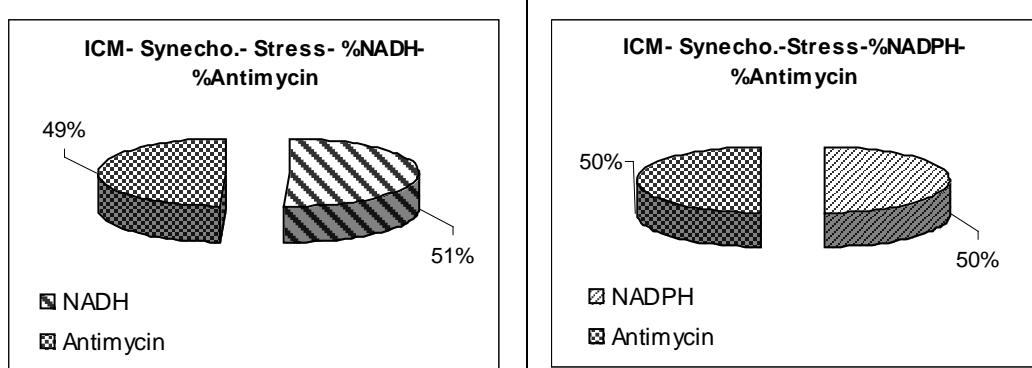
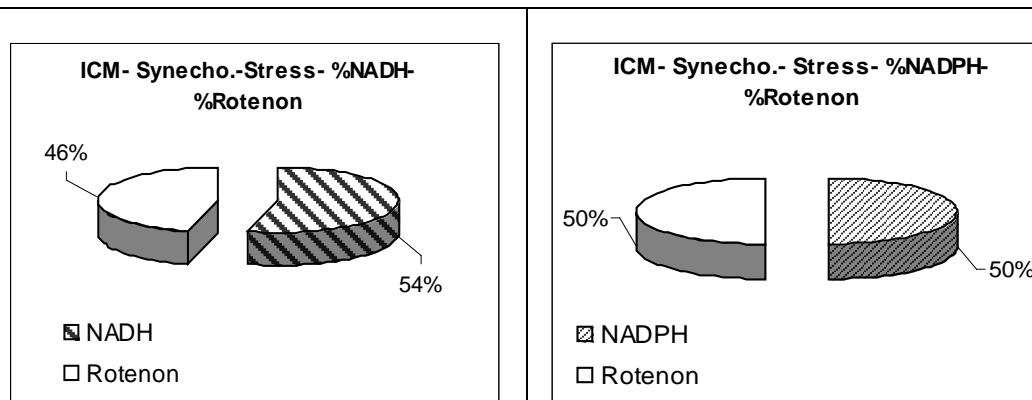
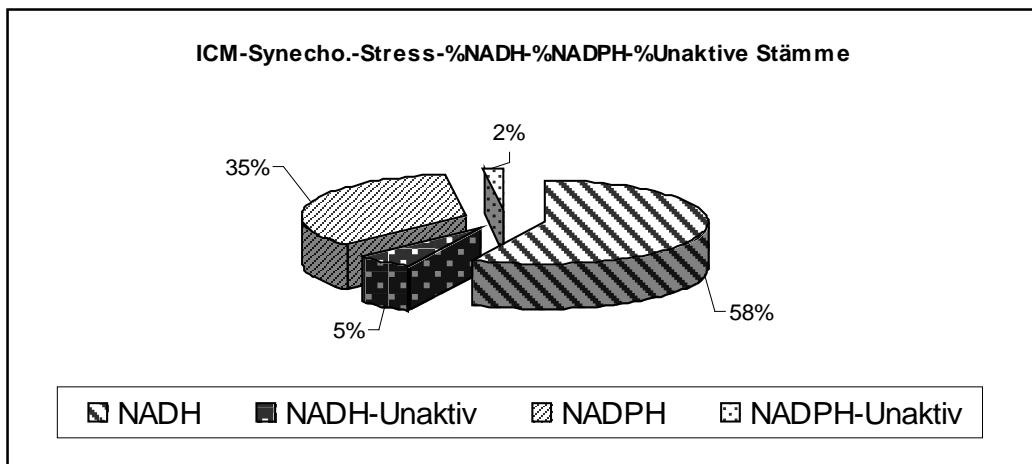
7.4.1 Interpretation der ICM-Kurven unter normalen Bedingungen.



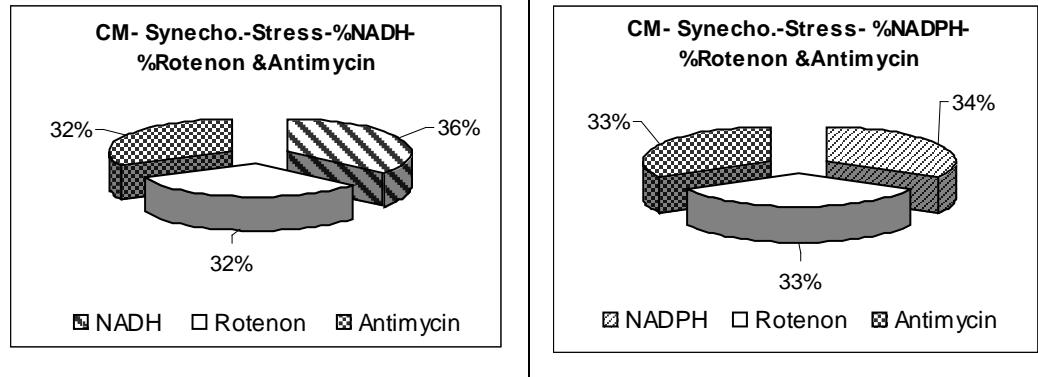
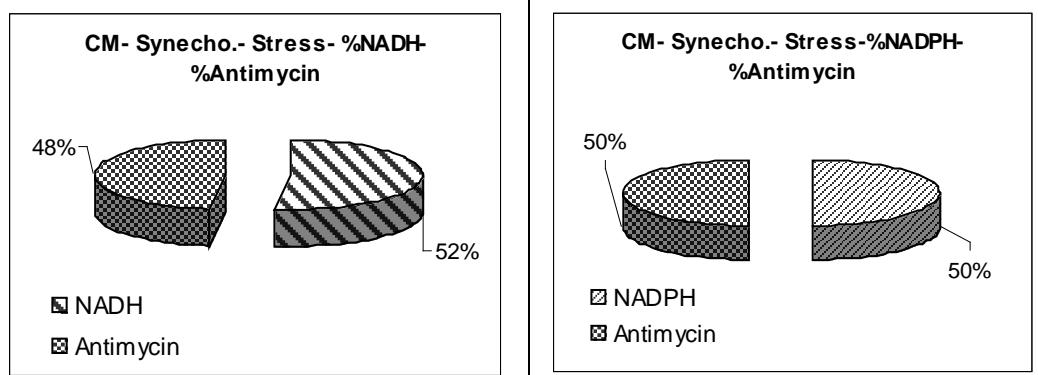
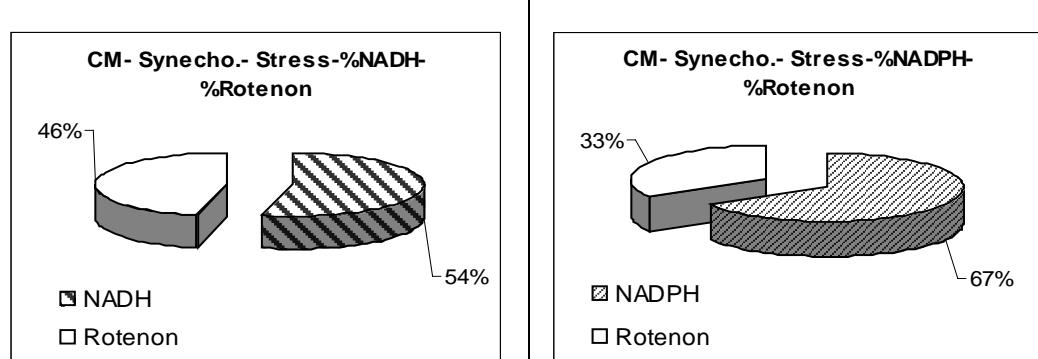
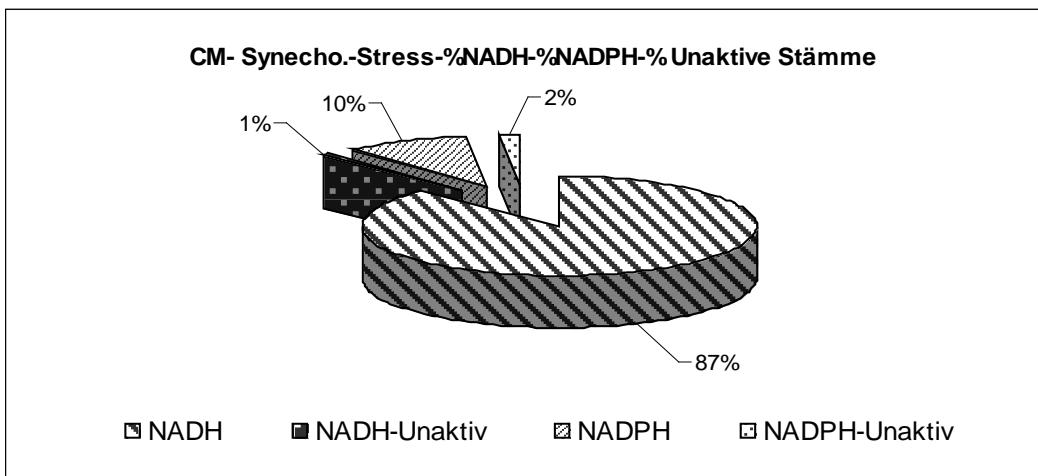
7.4.2 Interpretation der CM-Kurven unter normalen Bedingungen.



7.4.3 Interpretation den ICM-Kurven unter Stressbedingungen.



7.4.4 Interpretation der CM-Kurven unter Stressbedingungen.



Literaturverzeichnis

- [1] Bild→<http://www.hubert-brune.de/erdgeschichte.html>
- [2] <http://www.martin-neukamm.de/leben.html>
- [3] <http://de.wikipedia.org/wiki/Cyanobakterien>
- [4] <http://www.pmbio.icbm.de/vl/allg/phylogen.pdf>
- [5] Bild→http://silicasecchidisk.conncoll.edu/LucidKeys/Carolina_Key/html/Gloeocapsa_Main.html
- [6] Bild→<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pleurocapsa>
- [7] Bild→<http://www.cartage.org.lb/en/themes/Sciences/Zoology/AboutZoology/DiversityLife/DiversityLife.htm>
- [8] Bild→http://www.hib.no/.../anabaena_spiroides.html
- [9] Bild→<http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/images/images.html>
- [10] Dissertation Arbeit (Exopolysaccharide aus Cyanobakterien-Untersuchungen zum strukturellen Aufbau und zur biologischen Aktivität), Kathrin Venzke, Kiel 2005
- [11] Bild→<http://www.biologie-abitur.de/stoff.html> und www.wissenschaft-online.de
- [12] Bornman JF(1989) Target sites of UV-B radiation in Photosynthesis of higher plants. J Photochem Photobiol B: Biol 4: 145-158, J.Matschullat, H.J.Tobischall, H.-J.Voigt (Hrsg.) Geochemie und umwelt.
- [13] Bild→<http://www.wissenschaft-online.de>
- [14] Zyklusvorlesung:Biodiversität u. Systematik der Pflanzen; Teil 1: Niedere Pflanzen; Marcus Koch
- [15] Bild→<http://www.bot.uni-heidelberg.de>
- [16] Bild→www.chm.bris.ac.uk/motm/oec/images/phyco.gifhttp://www.botanik.biologie.uni-muenchen.de(P. Braun / H. Scheer,WS 2008 / 2009) Charakterisierung und ökologische Bedeutung 1 von Cyanobakterien.
- [17] G.A Peschek Structure-function relationships in the dualfunktio photosynthetic.respiratory electron-transport assembly of cyanobacteria (blue-green alge).Biochem Soc Trans, 24:729-733, 1996
- [18] Bild→ <http://www.bionik.tu-berlin.de/institut/s2solar.html>
Bild→www.microbiologyprocedure.com/nitrogen-fixation-free-living-blue-green-algae/images/nitro
- [19] Bild→ <http://www.aquamax.de/Pithophora.htm>
- [20] <http://www.dr-ralf-wagner.de/Blaualgen.html>
- [21] <http://www.sophistica.org>

- [22] Bild → <http://www.esowatch.com/ge/index.php?title=Panspermie>
- [23] Toxische und nicht-toxische Cyanobakterien in Gewässern der Scharmützelseeregion: Ihr Vorkommen in Gewässern unterschiedlicher Trophie und Morphometrie und Steuermechanismen ihrer Dynamik in polymiktischen Flachseen; Dr. Arbeit; vorgelegt von Claudia Wiedner; 1999
- [24] Peptide aus einer Cyanobakterien Wasser blüte (1998) aus dem Wannsee/Berlin: Strukturen und biologische Wirksamkeit; Dissertation ; von Ximena Ocampo Bennett; 2007
- [25] www.uni-ulm.de/IT/Scripte/Prokaryoten_Cyanobakt.pdf (Dr. Gerhard Mehrke)
- [26] Phylogenie und Taxonomie von Cyanobakterien und Flechten vom Prof. Dr. Burkhard Büdel, J.-Prof. Dr. Frank Kauff B. 2007. edition.Cambridge University Press.
- [27] 300599 UE Molekulare Ökologie von Cyanobakterien. Rainer Kurmayer, Austrian Academy of Sciences.
- [28] <http://www.oeaw.ac.at/limno/personnel/Kurmayer>
- [29] <http://www.oeaw.ac.at/limno/files/pdf/uebung08.pdf>
- [30] G.A.Peschek et al. The respiratory chain of blue-green alge (cyanobakteria). *Physiologia Plantarum*, 120:358-369, 2004
- [31] H.Flasch. Spektralphotometrische Untersuchungen über die Komplexe I, II, III des respiratorischen Elektronentransportsystem an getrennten Plasma- und Thylakoidmembranen von Cyanobakterien. Master's thesis, Institut für physikalische Chemie, Universität Wien, august 1997.
- [32] P.K.Udall C.A. Howitt and W.F.J. Vermaas. Type-2 NADH dehydrogenases in the cyanobakterium *Synechocystis sp. Strain PCC 6803* are involved in regulation rather than respiration. *Journal of Bacteriology*, 181(3):3994-4003, Feb. 1999
- [33] G.A.Peschek. Evidence for two funktional distinct hydrogenases in *Anacystis nidulans*. *Arch Microbiol*, 123:81-92, 1979.. *Biochim Biophys Acta*, 548:203-215, 1979.
- [34] G.A.Peschek. Anaerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*. *Biochim Biophys Acta*, 548:203-215, 1979.
- [35] G.A.Peschek. Anaerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*: H₂-dependet photoreduction and related reactions. *Biochim Biophys Acta*, 548:187-202, 1979.
- [36] G.A.Peschek. Electron transport reactions in respiratory particles of hydrogenase induced *Anacystis nidulans*. *Arch Microbiol*, 125:123-131, 1980
- [37] BOEKEMA, E. J., HIFNEY, A., YAKUSHEVSKA, A. E., PIOTROWSKI, M., KEEGSTRA, W., BERRY, S., MICHEL, K.-P, PISTORIUS, EX. & KUIP, J.: A giant chlorophyllprotein complex induced by iron-deficiency in cyanobacteria. *Nature*, Nr.412, S.745-748, 6.08.2001. •
Kontakt: Dr. JOCHEN KUIP, Dr. STEFAN BERRY, Fakultät für Biologie der Ruhr-Universität Bochum, 44780 Bochum.
- [38] Expression rekombinanter pflanzlicher Phosphoenolpyruvat...Kohlenstoffmetabolismus von Thomas Rademacher

- [39] BiochemieProf. Uwe SonnewaldLehrstuhl für Biochemieusonne@biologie.uni-erlangen (Bild).
- [40] G.A. Peschek and R.Zoder. Temperature Stress and Basic Bioenergetic Strategies for Stress.
- [41] E.Flores and A.Herrero. Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobakteria. Biochemical Society Transactions, 33:164-167, 2005.
- [42] Mikrobiologisches Praktikum: Versuche und Theorie von Alexander Steinbüchel, Fred B. Oppermann Sani
- [43] <http://www.geo.de/GEO/natur/oekologie/771.html>; <http://www.bioinf.uni-leipzig.de/Leere/PRAKTIKUM/Protokolle/WS05/1/intro.html>; <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/biotoxine/bakterientoxine.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/biotoxine/cyano.vscml.html>; www.chemgapedia.de/.../cyano.vscml.html
- [44] http://www.diss.fuberlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISSERT_derivate_.....
http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/.../FUDISSERT.../2_kap1.pdf;... [PDF]
- [45] www.ruhr-uni-bochum.de/.../02_3%20Cyanobakterien.html(Cyanobakterien - Ruhr-Universität Bochum)
- [46] Vergleichende Charakterisierung von *Synechocystis* sp. PCC 6803 Wildtyp und einer Histidin-Kinase (Slr1759)-freien Mutante; vorgelegt von Anke Nodop (Bild).
- [47] Molekulargenetische Charakterisierung von Untereinheiten des Cytochrom *b6f*-Komplexes von Cyanobakterien der Gattung *Anabaena*; Der Naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg vorgelegt von Matthias Arnold, Regensburg, 2001
- [48] Biochemie von H. Robert Horton, Laurence A. Moran, K. Gray.,, 2008 - Medical.
- [49] Allgemeine Mikrobiologie von Georg Fuchs, Hans Günther Schlegel (Atmungskette).
- [50] Die modulare Evolution eines Enzymkomplexes, Dr. Dirk Flemming & Prof. Dr. Thorsten Friedrich, Institut für Organische Chemie und Biochemie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
- [51] Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)
 Und die Webseiten:
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>; http://www.life.uiuc.edu/crofts/bioph354/complex_i.html
<http://www.mrc-dunn.cam.ac.uk/research/>; <http://www.scripps.edu/mem/biochem/CI/>
- [52] Biochemie, Jeremy M. Berg, Lubert Stryer, Spektrum-Verlag, 5. Auflage 2003
- [53] <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/MathNat/Biologie/Didaktik/Zellatmung/dateienI/dateien/atmung..html>
- [54] http://de.wikibooks.org/wiki/Biochemie_und_Pathobiochemie:_Ubichinon-Stoffwechsel
- [55] H. Weiss et al. The respiratory-chain NADH dehydrogenase(complex I) of mitochondria. Eur.J.Biochem., 197:563-576, 1991
- [56] T.Yagi. The bacterial energy-transducing NADH-quinone oxidoreductases. Biochem. Biophys. Acta, 1141:1-17, 1993

- [57] T.Friedrichi and H.Weiss. Modular evolution of the respiratory NADH: Ubiquinone oxidoreductase And the origin of its modules. *J. Theor. Biol.*, 187:529-540, 1997.
- [58] T.Friedrichi and B.Böttcher. The gross structure of the respiratory complex I: A Lego System. *Biochim. Biophys. Acta*, 1608:1-9, 2004
- [59] T.Festetics. Kinetische Untersuchungen an NAD(P)H-Dehydrogenasen in Cyanobakterien. Master's thesis, Institut für Physikalische Chemie, Universität Wien, October 2004
- [60] C.Freiler. Charakterization of respiratory chain dehydrogenases in isolated and purified membranes from cyanobacteria. Master's thesis. Institut für Physikalische Chemie, Universität Wien, August 2003.
- [61] <http://de.wikipedia.org/wiki/Rotenon>
- [62] C.Obinger und G.A. Pschek M.Paumann, G.Regelsberger. The bioenergetic role of dioxygen and the terminal oxidase(s) in cyanobacterien. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1707:231-253, 2005
- [63] http://de.wikibooks.org/wiki/Biochemie_und_Pathobiochemie:_Ubichinon-Stoffwechsel
- [64] Biochemie (1992); Voet/ Voet; VCH Verlagsgesellschaft mbH
- [65] Biochemie (5. Auflage); Berg/ Tymoczko/ Stryer; Spektrum Akademischer Verlag
- [66] Strasburger, Lehrbuch der Botanik (35. Auflage); Sitte/ Weiler/ Kadereit/ Bresinsky/ Körner; Spektrum Akademischer Verlag.
- [67] <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map00190.html> und <http://www.wikipedia.org> (Bild Einleitung)
- [68] http://de.wikipedia.org/wiki/Antimycin_A
- [69] Atmungskette (bearbeitet): Campbell, Neil A.: Biologie, 2. korrigierter Nachdruck, Spektrum Akad. Verl. Heidelberg, Berlin, Oxford, 2000; 186-189.
- [70] Elle, Jana Susann: Charakterisierung der Atmungsketten-Enzyme NADH-CoQ-Reduktase und Cytochrom-C-Oxidase in verschiedenen humanen Geweben und Darstellung ihrer Bedeutung bei Defekten, Ludwig-Maximilians-Universität, 2005. <http://www.cup.uni-muenchen.de/ac/kluefers/homepage/L/BAC/1ycc.gif>
- [71] <http://www.answers.com/topic/rieske-fe2s2-svg>
- [72] Inhibition von Komplex III (verändert nach): Michael, Gerhard (Hrsg.): Biochemical Pathways, Spektrum Akad. Verl. Heidelberg, Berlin, 1999; 193-194. <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d19/19d.htm>
- [73] Komplex 3, Struktur, Oxidation von UQH₂ am Komplex 3, Gesamtreaktionsgleichung (bearbeitet): Nelson, David et Cox, Michael: Lehninger Biochemie, 3. Aufl., Springer-Verlag, 2001; 723-724
- [74] H. Wang und G. Oster (1998) *Nature* 396 279-282
- [75] Stryer, Lubert, Biochemie, 5.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH 1991, Berlin
- [76] Campbell, Biologie, 6.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH 2003, Berlin

- [77] Stryer, Lubert, Biochemie, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH 1991, Berlin
- [78] www.genome.jp; www.wikipwdia.de; www.atpase.de
- [79] http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/4/cm/kinetik/einf_kat.vlu/Page/vsc/de/ch/4/cm/kinetik/enzyme2.vscml.html
- [80] www.med4you.at/.../enzyme/lbef_enzyme.htm
- [81] <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/E/EnzymeKinetics.html>
- [82] http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/michaelis_menten_gleichung.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/kinetik/lineweaver_burk.vscml.html
- [83] Bild→<http://www.chemgapedia.de/vsengine/tra/vsc/de/ch/8/bc/tra/biokat-basic.tra/Vlu/vsc/de/...../kinetic/hanes.vscml.html>
- [84] users.physik.tu-muenchen.de/cucke/medprakt/Spektral.PDF
- [85] Bild→protist.i.hosei.ac.jp/.../index.html
- [86] Bild→ <http://www.springerlink.com/content/g56601k6613681j3/>
- [87] silicasecchidisk.conncoll.edu/LucidKeys/Carol...
- [88] Bild→www.cyanogroup.com/id15.html
- [89] Bild→<http://www.micrographia.com/specbiol/bacteri/bacter/bact0200/anabae03.jpg>
- [90] T. Omata N. Murata. Isolation of cyanobacterial plasma Membranes. *Meth Enzymol*, 167:245-251, 1988.
- [91] G.A. Peschek V. Molitor. Respiratory electron Transport in plasma and thylakoid membrane preparations form the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *FEBS Lett*, 195:145-150, 1986
- [92] http://www.biologie.uni-hamburg.de/lehre/mikro/kurs2_netz/bradford.pdf
- [93] <http://www.ddesignmedia.de/.../KIDN3.htm>
- [94] Martin Hagemann, Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock; Erdmann, N., Hagemann, M. (2001): Salt acclimation of algae and cyanobacteria; Berry, S., Esper, B., Karandashova, I., Teuber, M., Elanskaya, I., Rögner, M., Hagemann, M. (2003); Kanesaki, Y., Suzuki, I., Allakhverdiev, S. I., Mikami, K., Murata, N. (2002); Marin, K., Kanesaki, Y., Los, D. A., Murata, N., Suzuki, I., Hagemann, M. (2004); Marin, K., Suzuki, I., Yamaguchi, K., Ribbeck, K., Yamamoto, H., Kanesaki, Y., Hagemann, M., Murata, N. (2003); Shoumskaya, M. A., Paithoonrangsarid, K., Kanesaki, Y., Los, D. A., Zinchenko, V. V., Tanticharoen, M., Suzuki, I., Murata, N. (2005); Gralla, J. D., Vargas, D. R. (2006); Fulda, S., Mikkat, S., Huang, F., Huckauf, J., Marin, K., Norling, B., Hagemann, M. (2006): Proteome analysis of Salt stress response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp.
- [95] Untersuchung cyanobakterieller Succinat: Chinon Oxidoreduktasen; Diplomarbeit; Vorgelegt von Murat Özcelik am September 2005

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.

Curriculum vitae

- **Personliche Daten**

Name: Samira Sari
Geboren: 19 März 1970, Arak
Staatsbürgerschaft: Persien
Lebensmittelpunkt: Wien/Österreich

- **Ausbildung**

Volksschule: In Arak/Persien von 1976 bis 1981
Mittelschule: In Arak/Persien von 1982 bis 1985
Gymnasium: In Mashhad/Persien von 1986 bis 1989
Universität Tehran; Medizin von 1990 bis 1993
Universität Mashhad; Persische Literatur von 1995-1997
Universität Wien; Biologie von 2000- 2006
Universität Wien; Genetik & Mikrobiologie von 2006-2010

- *Sprachen:*

Deutsch, English, Persian

