

Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin

Dissertation

**Molekulare Funktionsanalyse von  
Microcystin in *Microcystis aeruginosa*  
PCC 7806**

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) im Fach Biologie

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I

Yvonne Zilliges, geb. Claußner

Dekan: Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. Elke Dittmann  
2. Prof. Dr. Martin Hagemann  
3. PD Dr. Hans von Döhren

eingereicht: 25. Juli 2007

Datum der Promotion: 17. Oktober 2007

## Abstract

Microcystins are the most common cyanobacterial toxins found in freshwater lakes and reservoirs throughout the world. They are frequently produced by the unicellular, colonial cyanobacterium *Microcystis*; however, the role of the peptide for the producing organism is poorly understood. In this study we describe the first global approach to investigate this topic on a molecular level. Proteomic studies with *M. aeruginosa* PCC 7806 wild-type and several microcystin-deficient mutants indicated a physiological function for microcystin. Microcystin was shown to influence the abundance of several proteins which have an intra- or extracellular function. A prominent candidate is RubisCO, the key enzyme of the Calvin cycle. RubisCO and other proteins, initially selected by 2D analysis, are putative cellular binding partners of microcystin. A potential interaction mechanism is the covalent binding of microcystin to cysteine residues of the protein. Moreover, several knockouts of microcystin biosynthesis genes result in an overexpression of a putative morpho-type specific factor, named MrpC. This protein possibly mediates cell-cell interactions in *Microcystis*.

Keywords:                    Microcystin  
                                  *Microcystis* PCC 7806  
                                  Proteomic analysis  
                                  Calvin Cycle  
                                  Microcystin binding proteins  
                                  Cell-cell interactions

## Abstract

Microcystine sind die wohl bekanntesten cyanobakteriellen Toxine. Sie werden im Wesentlichen durch die im Süßwasser weltweit verbreitete, koloniebildende Gattung *Microcystis* synthetisiert. Die biologische Funktion dieser Peptide ist jedoch ungeklärt. In dieser Studie wurde die Fragestellung erstmals über einen globalen Ansatz auf molekularer Ebene analysiert. Die proteomischen Analysen zwischen *M. aeruginosa* PCC 7806/ Wildtyp und einigen Microcystin-freien Mutanten deuten auf eine physiologische Rolle der Microcystine. Microcystine beeinflussen die Abundanz zahlreicher Proteine. Prominentester Vertreter ist RubisCO – Schlüsselenzym des Calvin Zyklus. RubisCO und andere im 2D selektierte Proteine konnten außerdem als mögliche zelluläre Bindepartner des Microcystins identifiziert werden. Möglicherweise bindet MC an bestimmte Cysteinreste dieser Proteine. Mit dem Knockout der *mcy*-Gene geht außerdem eine Überexpression eines Morphotyp-spezifischen Proteins einher, das MrpC genannt wurde. Dieses Protein vermittelt möglicherweise Zell-Zell-Interaktionen in *Microcystis*.

Schlagwörter:

Microcystin

*Microcystis* PCC 7806

Proteomische Analysen

Calvin-Zyklus

Microcystin-bindende Proteine

Zell-Zell-Interaktionen

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>4</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>8</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
1.1 TOXISCHE CYANOBAKTERIEN UND ALGENBLÜTEN .....	10
1.2 <i>MICROCYSTIS</i> SPP. ....	11
1.2.1 <i>Morphologie und Diversität</i> .....	11
1.2.2 <i>Ökologie</i> .....	12
1.2.2.1 Habitat.....	12
1.2.2.2 Ökostrategie – Koloniebildung und vertikale Migration .....	12
1.2.2.3 Microcystis im Jahresverlauf.....	14
1.3 MICROCYSTIN.....	14
1.3.1 <i>Struktur und Eigenschaften</i> .....	14
1.3.1.1 Strukturaufklärung.....	14
1.3.1.2 MC-Varianten und ihre Produzenten .....	15
1.3.1.3 Chemische Eigenschaften der MC.....	15
1.3.2 <i>Biosynthese und Regulation</i> .....	16
1.3.2.1 Durchschnittliche Netto-Produktion.....	16
1.3.2.2 Biosynthese von MC.....	16
1.3.2.2.1 Nicht-ribosomale Peptidsynthese.....	16
1.3.2.2.2 Genetische Basis der MC-Produktion und Biosynthese .....	17
1.3.2.3 Regulation.....	19
1.3.2.3.1 Regulationsebenen.....	19
1.3.2.3.2 Detektion auf Peptidebene.....	19
1.3.2.3.3 Detektion auf Transkriptebene.....	20
1.3.2.3.4 Detektion auf Proteinebene .....	21
1.3.3 <i>Abbau von MC im Ökosystem</i> .....	21
1.3.4 <i>Toxikologie</i> .....	21
1.3.4.1 Mechanismus .....	21
1.3.4.2 Einfluss von MC auf aquatische Lebewesen.....	22
1.3.4.3 Einfluss von MC auf nicht-aquatische Tiere.....	23
1.3.5 <i>Funktionshypothesen</i> .....	24
1.3.5.1 Vorbetrachtungen.....	24
1.3.5.1.1 Evolution der <i>mcy</i> -Gene .....	24
1.3.5.1.2 Funktion anderer bakterieller, nicht-ribosomaler Peptide .....	25
1.3.5.2 Interspezifische Funktionshypothesen .....	26
1.3.5.3 Intraspezifische Funktionshypothesen .....	26
1.3.5.4 Intrazelluläre Funktionshypothesen .....	27

1.4	ZIELSTELLUNG.....	28
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>30</b>
2.1	KULTIVIERUNG VON <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> PCC 7806.....	30
2.2	KULTIVIERUNG VON <i>E. COLI</i> .....	30
2.3	NUKLEINSÄUREN.....	30
2.3.1	<i>Präparation von Nukleinsäuren</i> .....	30
2.3.1.1	Präparation genomischer DNA aus <i>Microcystis</i> spp.....	30
2.3.1.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	30
2.3.1.3	Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	31
2.3.1.4	Präparation von Gesamt-RNA aus <i>Microcystis</i> spp.....	31
2.3.2	<i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i> .....	31
2.3.3	<i>Aufkonzentrieren und Reinigen von Nukleinsäuren</i> .....	31
2.3.4	<i>Analyse von Nukleinsäuren</i> .....	31
2.3.4.1	Horizontale Agarosegelelektrophorese und Färbung von Nukleinsäuren.....	31
2.3.4.2	Sequenzierung von Nukleinsäuren.....	32
2.3.4.3	Sequenzanalyse.....	32
2.3.4.4	PCR.....	32
2.3.4.5	Nachweis spezifischer Nukleinsäuren.....	33
2.3.4.5.1	Herstellung von Sonden.....	33
2.3.4.5.2	Northern Blot.....	33
2.3.4.5.3	Hybridisierung.....	34
2.3.5	<i>Klonierung</i> .....	34
2.3.5.1	Modifizierung von PCR-Fragmenten.....	34
2.3.5.2	Einbau von PCR-Fragmenten in Vektoren.....	34
2.3.5.3	Transformation von <i>E.coli</i> .....	35
2.3.5.4	Selektion und Konstruktanalyse.....	35
2.4	PROTEINANALYSE.....	35
2.4.1	<i>Extraktion von Proteinen aus Microcystis spp.</i> .....	35
2.4.2	<i>Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen</i> .....	36
2.4.3	<i>Reinigen und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen</i> .....	36
2.4.4	<i>Analyse von Proteinextrakten</i> .....	36
2.4.4.1	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen.....	36
2.4.4.1.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
2.4.4.1.2	Isoelektrische Fokussierung und 2-Dimensionale Elektrophorese (2D).....	37
2.4.4.1.3	Blue Native-PAGE (BN-PAGE).....	37
2.4.4.1.4	Färbung, Fixierung von Proteingelen.....	38
2.4.4.1.5	Auswertung von 2D-Gelen.....	38
2.4.4.2	Identifizierung von Proteinspots bzw. -banden.....	38
2.4.4.3	Nachweis spezifischer Proteine.....	39
2.4.4.3.1	Herstellung von Antikörpern (AK).....	39
2.4.4.3.2	Western Blot Analyse und Ponceaufärbung.....	39

2.4.4.3.3	Immunpräzipitation.....	40
2.4.4.3.4	AK-gekoppelte Bindungsanalyse.....	41
2.4.4.3.5	Nachweis von glycosylierten Proteinen .....	41
2.4.5	<i>Rekombinante Proteinexpression in E.coli</i> .....	41
2.4.6	<i>MC-Bindungsassays</i> .....	42
2.4.7	<i>In situ-Funktionsanalyse von MrpC</i> .....	42
2.5	MC-QUANTIFIZIERUNG MITTELS HPLC .....	43
2.6	MATERIAL.....	44
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>45</b>
3.1	DIE FUNKTIONSANALYSE VON MICROCYSTIN IN <i>M. AERUGINOSA</i> PCC 7806 .....	45
3.2	PROTEOMISCHE EXPRESSIONSANALYSE VON PCC 7806/ WT UND $\Delta$ MCYB-MUTANTE .....	47
3.2.1	<i>Experimenteller Ansatz und Durchführung</i> .....	47
3.2.2	<i>Selektion von MC-abhängigen Proteinen</i> .....	48
3.3	DER EINFLUSS VON MC AUF DIE EXPRESSION INTRAZELLULÄRER PROTEINE: MC – PROTEINE DER PHOTOSYNTHE .....	56
3.3.1	<i>Verifizierung der MC-abhängigen Expression von ATP-Synthase, FBP, (GAPDH) und CP12-Polypeptid</i> .....	56
3.3.2	<i>Einfluß von MC auf die Expression von RubisCO</i> .....	58
3.4	DER EINFLUSS VON MC AUF DIE EXPRESSION EXTRAZELLULÄRER PROTEINE: MC – MRPC.....	61
3.4.1	<i>Identifizierung, Namensgebung und Besonderheiten von MrpC</i> .....	61
3.4.2	<i>Verbreitung des mrpC-Gens innerhalb der Microcystis-Spezies</i> .....	66
3.4.3	<i>Prozessierung und Differentielle Expression von MrpC in PCC 7806/ Wt und <math>\Delta</math>mcyB-Mutante</i> .....	67
3.4.3.1	Transkription von mrpC.....	67
3.4.3.2	Herstellung eines Antikörpers gegen MrpC .....	68
3.4.3.3	Expression von MrpC in zellulären und extrazellulären Extrakten.....	68
3.4.3.4	Glycosylierung von MrpC .....	71
3.4.4	<i>In situ-Analyse von MrpC</i> .....	72
3.5	MC-BINDUNGSANALYSEN .....	74
3.5.1	<i>Bindungsfähigkeit der MC an zelluläre Proteine</i> .....	74
3.5.2	<i>Selektion und Identifizierung der potentiellen MC-Bindepartner</i> .....	76
3.5.3	<i>Verifizierung der Bindungspartner in vitro – MC-Bindungsassays</i> .....	78
3.5.3.1	Vorbetrachtungen/ Vorversuche zum Mechanismus der möglichen MC-Protein-Interaktion.....	78
3.5.3.2	In vitro-Bindungsassays von MC an RubisCO .....	80
3.5.3.3	In vivo-Bindungsassays von MC an RubisCO.....	81
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>84</b>
4.1	GRUNDELEMENTE DER MOLEKULAREN MC-FUNKTIONSANALYSE IN <i>MICROCYSTIS</i> PCC 7806.....	84
4.1.1	<i>Knockout-Mutanten</i> .....	84
4.1.2	<i>Determination der Variablen</i> .....	85

4.1.3	<i>Globale molekulare Analysen: Proteomik versus Microarray</i> .....	86
4.2	SELEKTION DER MC-ABHÄNGIGEN STOFFWECHSELWEGE.....	87
4.2.1	<i>Evaluation der aktuellen 2D-Studie</i> .....	87
4.2.1.1	Zusammenfassung der 2D-Analysen und Wertung der Ergebnisse.....	87
4.2.1.2	Validierung der identifizierten Spots im Vergleich mit anderen proteomischen Studien zu Cyanobakterien.....	89
4.2.2	<i>Kandidatenselektion: Differentielle Kandidaten versus Bindepartner</i> .....	91
4.2.3	<i>Mögliche Interaktionsmechanismen zur Regulation der Abundanz von Proteinen</i> .....	95
4.3	DER EINFLUSS VON MC IN LICHTABHÄNGIGE BZW. ASSOZIIERTE PROZESSE.....	96
4.3.1	<i>Einordnung der Kandidaten</i> .....	96
4.3.2	<i>Die licht- und redoxregulierte Transkription</i> .....	97
4.3.3	<i>Bedeutung und Regulation der an der Lichtreaktion beteiligten sowie assoziierten, MC-abhängigen Proteine</i> .....	98
4.3.4	<i>Dunkelreaktion/ Calvin-Benson-Bassham-Zyklus oder Reduktiver Pentose-Phosphat-Zyklus</i> 106	
4.3.4.1	Bedeutung, Ablauf und Einordnung der Kandidaten.....	106
4.3.4.2	CO <sub>2</sub> -Fixierung: Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/ Oxygenase (RubisCO).....	107
4.3.4.3	GAPDH-CP12-PRK und FBP/SBP.....	113
4.4	IMPLIKATIONEN VON MC IN ZELL-ZELL-INTERAKTIONEN.....	119
4.4.1	<i>MrpA – ein durch Mediumfaktoren reguliertes, hypothetisches Protein in Microcystis</i> .....	119
4.4.2	<i>MrpC – ein Zell-Zell-Kontakte vermittelndes, glycosyliertes Protein in toxischen Microcystis-Stämmen</i> .....	120
4.4.3	<i>Andere in ihrer Abundanz durch MC beeinflusste Oberflächenproteine</i> .....	127
	Lytisches Enzym.....	127
4.5	IMPLIKATIONEN VON MC IN ANDEREN STOFFWECHSELPROZESSEN.....	127
4.6	HYPOTHESE ZUR FUNKTION DES MC.....	128
4.6.1	<i>Die MC-Funktion innerhalb der Gattung Microcystis</i> .....	128
4.6.2	<i>Toxische versus nicht-toxische Genotypen</i> .....	131
4.6.3	<i>Projektion der Funktionshypothese auf andere MC-Produzenten</i> .....	133
	<b>REFERENZEN</b> .....	<b>135</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>176</b>
	<b>ANHANG</b> .....	<b>183</b>
	<b>CURRICULUM VITAE</b> .....	<b>194</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>198</b>
	<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b> .....	<b>199</b>

## Zusammenfassung

Cyanobakterien - auch als Blaualgen bezeichnet - sind phototrophe Eubakterien, die phylogenetisch sehr alt sind. In Seen aller Breitengrade, aber auch im marinen Bereich kommt es in den Sommermonaten immer wieder zu Massenentwicklungen von Cyanobakterien. Im Süßwasser dominieren dabei einige wenige Gattungen, unter ihnen *Microcystis*, *Planktothrix* und *Anabaena*. Viele Vertreter dieser so genannten „blütenbildenden“ Arten können das wohl am weitesten verbreitete cyanobakterielle Toxin, das Microcystin (MC) produzieren. Dabei handelt es sich um ein zyklisches Heptapeptid, für das nahezu 100 Strukturvarianten beschrieben worden sind. MC hemmen eukaryotische Proteinphosphatasen des Typs 1 und 2A und werden mit vielen Vergiftungserscheinungen bei Tieren und auch Menschen in Verbindung gebracht. Die WHO hat MC auf die Liste der für Menschen gefährlichen Stoffe gesetzt.

Über die Funktion der MC gibt es zahlreiche Hypothesen. Es wird sowohl eine Rolle bei der Abwehr von Fressfeinden diskutiert als auch eine allelopathische Wirkung auf Dinoflagellaten. Dem gegenüber steht das Alter der Gene für die MC-Biosynthese. Diese Gene sind schon früh evolviert, d.h. schon lange vor der Existenz von „eukaryotischer Konkurrenz“. Ziel war es daher, die Ursprungsfunktion der energetisch sehr aufwändig zu synthetisierenden Microcystine herauszufinden.

Durch den proteomischen Vergleich von Wildtyp (Wt) und MC-freier Mutante konnten mehrere Gene selektiert werden, die potentielle Interaktionspartner des MC bzw. dessen direkte und indirekte Zielgene sind. Eine Verifizierung dieser Kandidaten wurde bereits in dieser Arbeit begonnen. So beeinflusst MC die Abundanz vieler Enzyme des Calvin-Zyklus wie Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/ Oxygenase (RubisCO), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Fructose-1,6-bisphosphatase/ Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (FBP/ SBP). Ebenso könnte die differentielle Expression alternativer CP12-Polypeptide hierbei eine Rolle spielen. Sequenzanalysen, die im Rahmen des Genomprojektes möglich waren, zeigten, dass die genannten Proteine in der Regel über ein zusätzliches Cystein verfügen. Wir postulieren, dass analog zu den Vorgängen bei der Inhibition von eukaryotischen Proteinphosphatasen (toxischer Effekt) MC über Cysteine an seine Zielproteine bindet und deren sterische Konformation, Aktivität bzw. Degradation beeinflusst. Untersuchungen zu dieser möglichen Bindung wurden ebenfalls in dieser Arbeit

begonnen. *In vitro* und *in vivo* konnte dabei die Bindung von MC an RubisCO über eine Immunoblotanalyse nachgewiesen werden.

Neben diesen putativen, intrazellulären Funktionen agiert MC außerhalb der Zelle und hat Einfluss auf die Abundanz und/ oder Oligomerisierung einiger Proteine der Zelloberfläche. Zu diesen zählen, neben dem bereits publizierten Microvirin (MVN), das in dieser Studie untersuchte MrpC. MrpC, ein sezerniertes und glycosyliertes Protein, vermittelt möglicherweise Zell-Zell-Kontakte in fast ausschließlich toxischen *Microcystis*-Stämmen. Mit dem Knockout der *mcy*-Gene geht eine Überexpression dieses Proteins einher und führt in MC-freien Mutanten zu einer stärkeren Aggregation der Zellen. Möglicherweise ist MrpC von entscheidender Bedeutung für die multizelluläre Verhaltensweise von *Microcystis*. Über die Beeinflussung der Abundanz, Oligomerisierung oder Modifizierung solcher Morphotyp-spezifischen Faktoren könnte die mögliche Rolle von MC in der Koloniebildung begründet sein.

Zusammenfassend kann für MC eine dualistische Funktionsweise - innerhalb der Spezies betrachtend - postuliert werden. Zum einen erfüllt MC eine Funktion in lichtabhängigen Prozessen und zum anderen bei Zell-Zell-Interaktionen. Beide Prozesse verändern sich während der vertikalen Migration, einem der Charakteristika von *Microcystis*-Kolonien. Möglicherweise wird so die temporale Nischenbildung zwischen toxischen und nicht-toxischen Morpho- bzw. Genotypen in einem Ökosystem ermöglicht.

# 1 Einleitung

## 1.1 Toxische Cyanobakterien und Algenblüten

Cyanobakterien, früher auch als Blau- oder blaugrüne Algen bezeichnet, erhielten ihren Namen aufgrund ihrer blauen Pigmente und wurden erstmals 1753 von Linné beschrieben [1, 2, 3]. Sie gehören zu den ältesten Lebewesen auf unserer Erde. Erste Arten tauchten schon vor 2,5 bis 3,5 Milliarden Jahren auf [4]. Cyanobakterien repräsentieren heute die größte, diverseste und am weitesten verbreitete Gruppe photosynthetischer Prokaryoten [3]. Innerhalb dieser Gruppe sind sie die einzigen Vertreter, die eine oxygene Photosynthese betreiben. Dies führte zur Entstehung der heutigen Sauerstoffatmosphäre [5]. Es gilt als gesichert, dass Cyanobakterien die Vorläufer pflanzlicher Chloroplasten sind [6, 7]. Cyanobakterien waren somit an grundlegenden evolutiven Prozessen beteiligt, die die Existenz von mehrzelligem Leben auf der Erde ermöglichten [5].

Einige Cyanobakterien produzieren bioaktive Substanzen mit zum Teil toxischer Wirkung. Zu den im Süßwasser verbreiteten toxischen Gattungen gehören *Microcystis* (Abb. 1) aber auch *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Aphanizomenon* und *Cylindrospermopsis*. In Salz- und Brackwasser dominieren *Nodularia*-Arten. Erste wissenschaftliche Berichte aus dem 19. Jahrhundert über akute Vergiftungen bei Fischen, Vögeln, Haus- und Weidetieren stammen aus Dänemark [8], Australien [9] und Westpreußen [10]. Eine Gefahr für den Menschen besteht immer dann, wenn die mit Cyanobakterien kontaminierten Seen als Trinkwasserreservoir genutzt werden. Intoxikationen beruhen in erster Linie auf fehlender oder unsachgemäßer Aufarbeitung [11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18]. In Deutschland liegt das größte Gefahrenpotenzial der Cyanotoxine beim Kontakt in Badegewässern, da hier Massenansammlungen vorwiegend im Spätsommer nach warmen, niederschlagsarmen Schönwetter-perioden auftreten können.

Cyanobakterielle Toxine, und hier insbesondere das Microcystin-LR (MC-LR), werden als potentielle Biowaffe eingestuft. Nach Berechnungen von Reynolds reichen schon 5 µl einer dicht gewachsenen Algenblüte aus, um einen Menschen zu töten [19]. Bei Toxizitätstests an Mäusen liegt die letale Dosis (MC-LR) bei 50 µg/kg KG (i.p.) (<http://www.cyanotoxic.com/analytes.htm>) [20, 21]. Daher hat die WHO einen Grenzwert von 1 µg/L für MC-LR im Trinkwasser festgelegt [22].



**Abb. 1: Algenblüte von *Microcystis* im Grandview Garden Park von Beijing/ China**  
(<http://www.cyanosite.bio.purdue.edu/images/images.html>)

## 1.2 *Microcystis* spp.

### 1.2.1 Morphologie und Diversität

*Microcystis*, im Deutschen auch als Netzblualge bezeichnet, wurde erstmals 1833 von Kützing beschrieben [23]. Diese Gattung gehört zur Ordnung der *Chroococcales* (Familie der *Microcystaceae*) und wird aufgrund ihrer einzelligen, coccoiden Zellform und ihrer binären Teilungsart zur Sektion I der cyanobakteriellen Klassifikation gezählt [24]. In der Natur können sie sehr große Aggregate (Kolonien) bilden. Anhand ihrer Zellgröße ( $\varnothing$  2 bis 7  $\mu\text{m}$ ), der Dicke und Form der sie umgebenden Schleimschicht sowie der Gestalt der Kolonien konnten 32 verschiedene *Microcystis*-Arten (Morphotypen) von Geitler identifiziert werden (Abb. 2) [25, 26, 27]. Mittels Sequenz-vergleichs der 16S *rDNA* und des ITS zwischen 16S und 23S *rDNAs* wurde gezeigt, dass einige Phänotypen zu denselben Genotypen gehören und im Sinne der Phylogenie nur als morphologische Varianten einer Art betrachtet werden sollten [28, 29, 30].

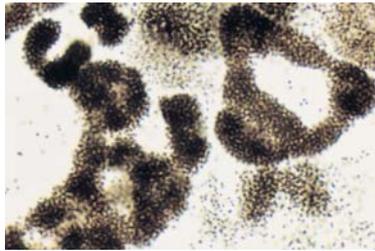
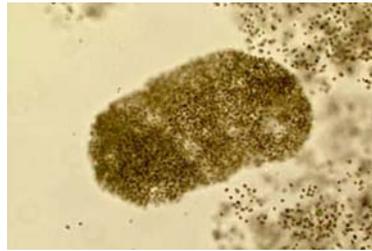
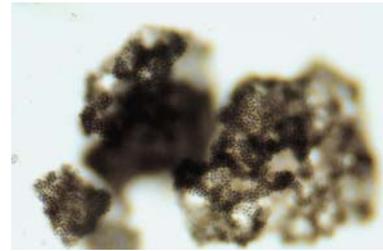
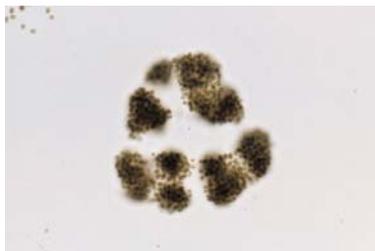
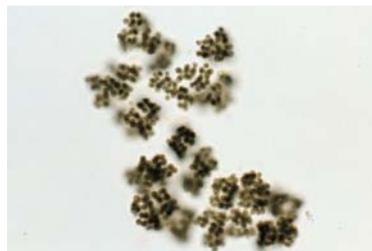
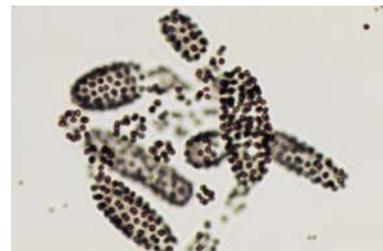
*M. aeruginosa**M. firma**M. ichthyoblabe**M. novacekii**M. viridis**M. wesenbergii*

Abb. 2: *Microcystis*-Morphotypen (<http://research.kahaku.go.jp/botany/aoko/aokokids/mycro-pictures.html>)

## 1.2.2 Ökologie

### 1.2.2.1 Habitat

*Microcystis* besetzt ein breites ökologisches Spektrum. In der Regel findet man sie im Süßwasser, seltener auch in Brack- und Salzwasser [31]. Algenblüten dieser Gattung sind sowohl in kleinen Tümpeln als auch in großen Seen der gemäßigten Breiten und Tropen anzutreffen. *Microcystis* ist – im Gegensatz zu *Planktothrix* und *Anabaena*, die eher in der nördlichen Hemisphäre auftreten – nahezu weltweit verbreitet [31]. Während in den Tropen ganzjährig *Microcystis*-Blüten auftreten, dominieren sie in den gemäßigten Breiten während der Sommermonate. Sie sind dabei aufgrund ihrer phototrophen Lebensweise an Licht gebunden. Nährstoffüberfluss begünstigt eine Massentwicklung. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur *buoyancy*-Regulation (siehe 1.2.2.2) bevorzugen sie stabile, weniger stark durchmischte Wasserkörper [32].

### 1.2.2.2 Ökostrategie – Koloniebildung und vertikale Migration

*Microcystis* gehört neben *Anabaena* und *Aphanizomenon* zu den koloniebildenden Ökostrategen. Durch den Zusammenschluss von mehreren Einzelzellen entstehen etwa 20 bis 500 µm große Aggregate, die von einer gelartigen Matrix geschützt werden. *Microcystis*-Kolonien können ihre vertikale Position in der Wassersäule

durch die Bildung von Kohlenhydraten (als Ballast) sowie Gasvesikeln (als Auftriebskörper) regulieren (Abb. 3) [33]. Nach Nährstoffaufnahme aus Sedimenten oder tieferen Gewässerschichten schweben sie nach Verbrauch der Kohlenhydrate (Respiration) und Neusynthese der Gasvesikel an die Oberfläche, wo sie die bevorzugten Temperatur- und Lichtverhältnisse vorfinden [34, 35, 36, 37]. Hierbei erhöht sich die Photosyntheserate und die gebildete Glucose wird in Form von Glycogen gespeichert, das nun seinerseits als Ballast wirkt – die *Microcystis*-Kolonie sinkt ab [38]. Die Bildung der Gasvakuolen und die Auftriebsregulation werden durch die Energie- (Licht) und Nährstoffzufuhr gesteuert [39, 40]. Laborexperimente zeigen, dass die Kolonien unter Schwachlicht bzw. bei Dunkelheit aufsteigen und bei höheren Lichtintensitäten ihre Auftriebskraft verlieren [38]. In Modellen wurde die Frequenz der vertikalen Migration anhand der Koloniegröße entsprechend des Stokeschen Gesetzes bestimmt (Abb. 3) [34, 35, 41]. Größere Kolonien steigen daher häufiger im Tagesverlauf auf und ab [42]. Für die Gasvesikelsynthese werden unter Schwachlichtbedingungen etwa 10 % der Proteinsynthese eingesetzt. Trotz dieses hohen Anteils nutzen *buoyante* Arten den Lichtgradienten effektiver und haben somit eine höhere Photosyntheserate als andere Spezies wie z.B. *Synechococcus*. In weniger turbulenten Seen haben daher buoyante Cyanobakterien einen Vorteil [43, 44, 45].

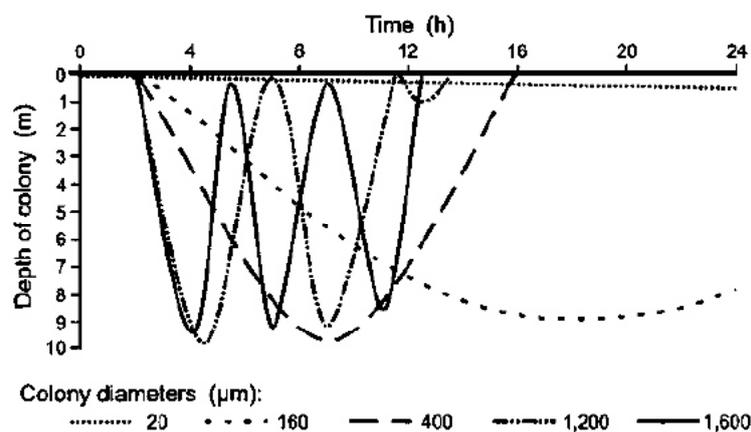


Abb. 3: Vertikale Migration von *Microcystis* in Abhängigkeit von der Koloniegröße, aus Mur *et al.* (1999) [42]

In einem mathematischen Modell wurde die Vertikalbewegung von *Microcystis aeruginosa* in Abhängigkeit von der Koloniegröße simuliert. Während kleine Kolonien kaum ( $< 20 \mu\text{m}$ ) oder nur einmal am Tag ( $< 160 \mu\text{m}$ ) auf- und absteigen, migrieren größere Kolonien ( $\sim 1600 \mu\text{m}$ ) bis zu dreimal am Tage auf und ab.

Nach Durchmischungen des Wasserkörpers durch starke Winde kommt es oft in den späten Sommermonaten zur Aufrahmung der Zellen (Bildung von so genannten

*scums*). Die durch die Turbulenzen nach oben beförderten hyperbuoyanten Kolonien sind nicht in der Lage, in tiefere Bereiche abzusinken und verbleiben daher an der Oberfläche [31]. Die dauerhafte, starke Sonneneinstrahlung und die erhöhten Temperaturen führen zur irreparablen Schädigung der Bakterien (Photooxidation) [46]. Nur Zellen, die nicht unmittelbar an die Oberfläche gelangen und bereits an die stärkeren Lichtintensitäten adaptiert waren, können diesen Stress überleben.

### 1.2.2.3 *Microcystis im Jahresverlauf*

In den gemäßigten Breiten beginnen die Zellen im Herbst abzusinken. Mit dem Temperaturabfall verringern sich Proteinsynthese, Photosyntheserate und Auftriebsverhalten [47]. Die Kohlenhydrate können in den Nächten nicht mehr abgebaut werden und wirken daher als Ballast [32]. Möglicherweise heften sich die Zellen auch an Eisenoxide bzw. Tonpartikel an, die während der herbstlichen Holomixis aus dem Hypolimnion in das Epilimnion gelangen [48]. Das Co-Präzipitat ist dichter als das umgebende Wasser und sinkt daher ab. Die Zellen überwintern im Sediment [32, 49, 50, 51]. Im Frühjahr erfolgt ein erneutes Durchmischen der Wassersäule, so dass einige Kolonien wieder ins Epilimnion gelangen [52]. Durch die steigenden Temperaturen und den stärkeren Lichteinfall werden die Proteinsynthese und damit auch die Gasvesikelsynthese angekurbelt [53]. Der Kohlenhydratballast wurde während der Ruhephase aufgebraucht und die Kolonien können nun aufsteigen [50]. Nur etwa 3 % dienen als Inokulum für die nächste pelagische Generation [51]. Möglicherweise sind auch die zunehmend anaeroben Verhältnisse Ursache für das Aufsteigen im Frühjahr [32]. Ab den frühen Sommermonaten treten auch größere Kolonien auf. Die typischen Algenblüten erscheinen allerdings erst in den Hoch- und Spätsommermonaten [54, 55].

## 1.3 **Microcystin**

### 1.3.1 Struktur und Eigenschaften

#### 1.3.1.1 *Strukturaufklärung*

Die Struktur des ursprünglich als Cyanoginosin bezeichneten Peptids wurde 1984 von Botes *et al.* publiziert [56]. Später wurde das Peptid entsprechend einer neuen Nomenklatur in Microcystin (MC) umbenannt [57]. Der Name leitet sich von

*Microcystis aeruginosa* ab, da das Peptid seiner Zeit aus dieser Spezies isoliert worden war. MC sind zyklische Heptapeptide mit einer Größe von etwa 900-1100 Da [58] (Abb. 4). Modifizierungen treten an allen 7 AS-Resten auf. Bisher sind mehr als 70 Varianten beschrieben worden [59]. In Struktur und Biosynthese dem MC sehr ähnlich, ist das Nodularin [60, 61, 62]. Diesem Pentapeptid fehlen die AS der Positionen 1 und 2 (1.3.2.2.2).

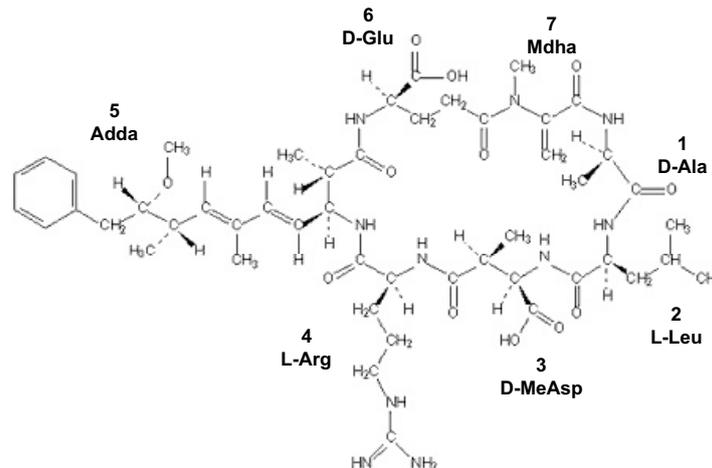


Abb. 4: Struktur MC-LR

Die allgemeine Struktur des zyklischen Heptapeptids MC lautet: Cyclo-D-Ala<sup>Pos 1</sup>-X<sup>Pos 2</sup>-D-MeAsp<sup>Pos 3</sup>-Z<sup>Pos 4</sup>-Adda<sup>Pos 5</sup>-D-Glu<sup>Pos 6</sup>-Mdha<sup>Pos 7</sup>. D-Ala steht für D-Alanin, D-MeAsp für D-erythro-β-Methylasparaginsäure, Mdha für N-Methyldehydroalanin, D-Glu für D-Glutamat und Adda für (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-Diensäure [56]. X und Z sind in der Regel L-AS, die dem Namen als Suffix angefügt werden. Die variablen AS der Strukturvariante MC-LR sind daher Leucin<sup>Pos2</sup> (L) und Arginin<sup>Pos4</sup> (R).

### 1.3.1.2 MC-Varianten und ihre Produzenten

MC-Produzenten sind neben *Microcystis* auch *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Anabaenopsis* und *Hapalosiphon* [63]. Nodularin konnte bisher nur in *Nodularia spumigena* gefunden werden. Einige MC-Varianten kommen in allen Taxa vor, andere sind dagegen artspezifisch [63]. Die Kombination verschiedener MC-Varianten ist von Stamm zu Stamm verschieden [64]. Einige Varianten treten nur in bestimmten Gebieten auf [63]. MC-LR ist die häufigste Variante und hat zudem den höchsten Toxizitätsgrad [63].

### 1.3.1.3 Chemische Eigenschaften der MC

MC sind sehr stabil gegen chemische Hydrolysen sowie Oxidation bei niedrigen pH-Werten [63]. In natürlicher Umgebung und bei Dunkelheit bleiben sie mehrere Monate oder Jahre stabil [65]. Bei niedrigen pH-Werten ( $\leq$  pH 6) und höheren

Temperaturen erfolgt ein schneller Abbau [66]. In der Natur unterliegen MC im Sonnenlicht einer langsamen Photodegradation [67, 68, 69].

Außer einigen Varianten mit hydrophoben Substituenten sind MC wasserlöslich und nicht membrangängig. Aufnahme und Abgabe bedürfen daher eines aktiven Transports [63].

### 1.3.2 Biosynthese und Regulation

#### 1.3.2.1 Durchschnittliche Netto-Produktion

Die durchschnittliche Konzentration von zellgebundenen MC liegt etwa zwischen 1 und 7000 µg/g Trockengewicht [63]. Außerdem können MC auch ungebunden im See in Konzentrationen von 0,02 bis 200 µg/L gemessen werden [70, 71]. Diese erheblichen Konzentrationsunterschiede werden durch verschiedene Umwelteinflüsse (1.3.2.3), durch die Tages- und Jahreszeit [51, 72, 73, 74, 75] und durch die Vermehrung und Verteilung der verschiedenen Spezies- und Genotypen bestimmt [74, 76]. Selbst innerhalb einer Art ist Komposition und Produktion stammspezifisch [74, 77]. Die höchsten Konzentrationen an MC/ Biomasse werden zu Beginn der Algenblüte gemessen [78, 79, 80, 81, 82]. Mit fortschreitender Entwicklung verringert sich das Verhältnis (MC/ Biomasse) [83, 84].

#### 1.3.2.2 Biosynthese von MC

##### 1.3.2.2.1 Nicht-ribosomale Peptidsynthese

Das niedrige Molekulargewicht, die zirkuläre Struktur und das Auftreten von ungewöhnlichen und nicht-proteinogenen AS sowie zahlreichen Modifizierungen und Varianten deuten an, dass MC nicht auf ribosomalen Wege gebildet werden. Möglich wird diese Art der Biosynthese durch einen Multienzymkomplex aus nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) und/ oder Polyketidsynthetasen (PKS). Diese Art der Peptidsynthese wurde in den sechziger Jahren entdeckt und tritt bei vielen Bakterien, aber auch bei Pilzen auf [85, 86]. PKS-Enzyme wurden auch in Pflanzen gefunden [87, 88].

Durch die NRPS werden die einzelnen AS nach dem so genannten „*Multiple-carrier-thio-template*“-Mechanismus in das Peptidgerüst eingebaut [89]. Die NRPS sind dabei in Modulen angeordnet (Abb. 5). Zahl der eingebauten AS und Sequenzabfolge

werden durch die Zahl und Reihenfolge der Module bestimmt [90]. Jedes Modul ist dabei für die Erkennung und Aktivierung einer AS und deren kovalente Bindung an die bestehende Peptidkette verantwortlich. Die nötigen Enzymaktivitäten werden durch die einzelnen Domänen im Modul realisiert (Abb. 5).

Polyketide entstehen aus der sequentiellen Kondensation kurzkettiger Carbonsäuren [91]. Analog zum NRPS-System sind auch die bakteriellen PKS des Typs I modular aufgebaut und die Sequenz daher in der Regel durch die Zahl der Module und deren Abfolge bestimmt (Abb. 5).

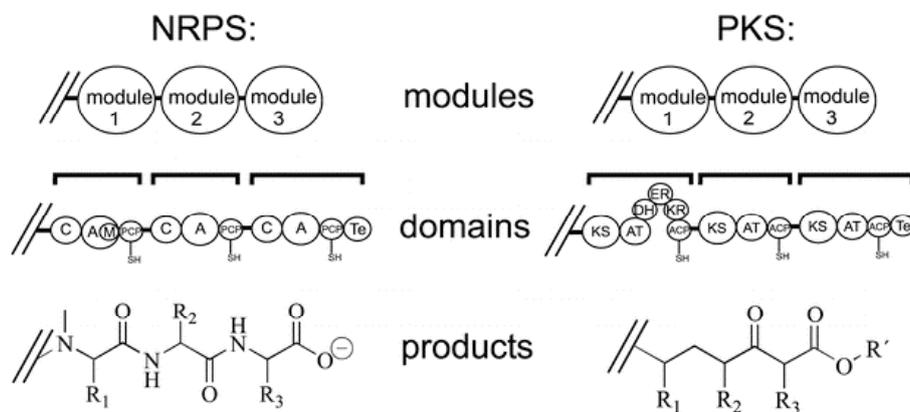
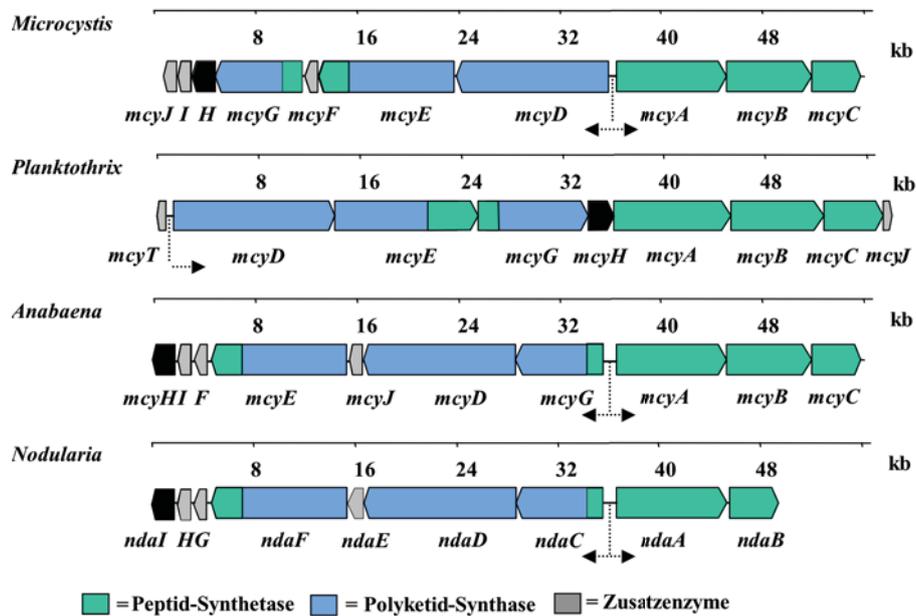


Abb. 5: NRPS und PKS-Domänen im Vergleich, aus Schwarzer und Marahiel, 2001 [90]

Sowohl NRPS als auch PKS bestehen aus einzelnen Modulen, deren Reihenfolge in der Regel auch die Sequenzabfolge bestimmt. Module wiederum setzen sich aus einzelnen Domänen zusammen, die jeweils bestimmte enzymatische Reaktionen katalysieren. Grundbestandteile eines jeden NRPS-Elongationsmoduls sind die Adenylierungsdomäne (A), die Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne (PCP) oder Thiolierungsdomäne und die Kondensationsdomäne (C) [92, , 93]. Zusätzlich können N- bzw. O-Methylierungs- (M), Oxidations- (O), Zyklisierungs- (Cy), Epimerase- (E), Racemase- (R) und Thioesterasedomänen (Te) eingebaut sein, die für die gleichnamigen Modifizierungen der AS bzw. letztere (Te-Domäne) für die Freisetzung/ Zyklisierung (Lacton- oder Lactamringe) des Peptids verantwortlich sind [90]. Das PKS-Basis-Modul besteht aus der Ketosynthase-Domäne (KS), der Acyltransferase-Domäne (AT), der Acyl-Carrier-Protein-Domäne (ACP) und der Thioesterase-Domäne (Te) [94]. Modifizierungen treten auch bei der Polyketidsynthese auf: Ketogruppen können durch Ketoreduktasen (KR) zu Hydroxylgruppen reduziert werden, Doppelbindungen werden durch Dehydratasen (DH) eingebaut und ungesättigte Ketide werden durch die Enoylreduktase (ER) reduziert.

#### 1.3.2.2.2 Genetische Basis der MC-Produktion und Biosynthese

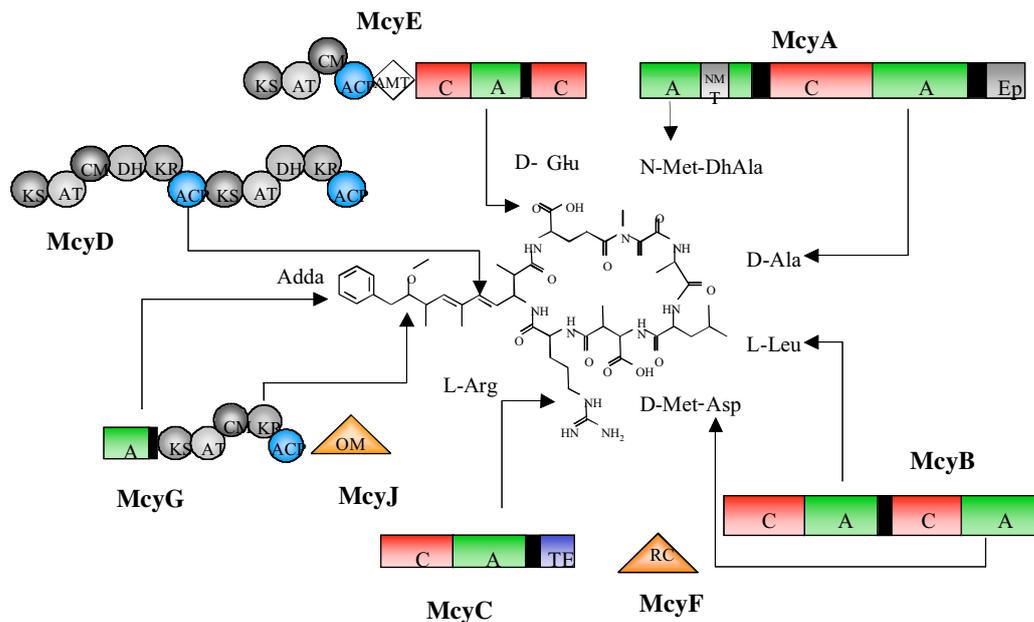
Die Gene für die MC-Biosynthese wurden zuerst in *Microcystis* nachgewiesen [95, 96, 97]. Mittlerweile sind die Gencluster aller vier Hauptproduzenten von MC bzw. Nodularin – *Microcystis* [98, 99], *Planktothrix* [100], *Anabaena* [101], *Nodularia* [102] – charakterisiert (Abb. 6). Während das Gencluster in beiden untersuchten *Microcystis*-Stämmen identisch ist, variiert es innerhalb der Gattungen.



**Abb. 6:** *mcy*- bzw. *nda*-Gencluster aus *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* und *Nodularia*, nach Börner und Dittmann, 2005 [103]

Die *mcy*-Gencluster der drei Gattungen *Microcystis*, *Planktothrix* und *Anabaena* sind etwa 55 kb lang. Das Gencluster von Nodularin besitzt dagegen eine Größe von nur 48 kb. Das Fehlen zweier AS (D-Ala, X) in der Struktur von Nodularin wird auf eine Deletion des letzten Moduls von *mcyA* und des ersten Moduls von *mcyB* zurückgeführt [62]. Zusätzlich hat sich die Spezifität des ersten Moduls von *mcyA* geändert, so dass anstelle von Mdha im MC *N*-Methyldehydrobutyrin (Mdhb) eingebaut wird. Die *mcy*-Gencluster unterscheiden sich außerdem in der Anordnung ihrer Gene, der Art und Zahl zusätzlicher Gene sowie der Promotorregion. Während das Cluster von *Planktothrix* einen unidirektionalen Promotor besitzt, haben die Cluster aus *Microcystis*, *Anabaena* und *Nodularia* einen bidirektionalen Promotor.

Das *mcy*-Gencluster in *Microcystis* ist 55 kb lang und besteht aus zwei bidirektionalen Operons [98, 104] (Abb. 6). Das erste Operon umfasst drei Gene (*mcyA-C*) in denen fünf NRPS-Module kodiert sind (Abb. 6). Das zweite Operon kodiert für zwei PKS-Module (*mcyD*), zwei NRPS/ PKS-Hybridenzyme (*mcyE*, *mcyG*) und für modifizierende Enzyme (*mcyF* [105], *mcyI* [98, 106], *mcyJ* [100]). 45 der postulierten 48 Biosyntheseschritte werden durch das *mcy*-Gencluster abgedeckt [98] (Abb. 7). McyH als in allen vier Gattungen auftauchendes, zusätzliches Gen weist Ähnlichkeiten zu ABC-Transportern auf und könnte somit für den Export von MC verantwortlich sein [107].



**Abb. 7: Biosynthese von MC-LR**, aus Börner und Dittmann, 2005 [103]

Für den Einbau und die Modifizierung von *N*-Methyl-dehydro-Alanin<sup>Pos7</sup> und D-Alanin<sup>Pos1</sup> ist McyA verantwortlich. L-Leucin<sup>Pos2</sup> und D-erythro- $\beta$ -iso-Aspartat<sup>Pos3</sup> werden durch McyB synthetisiert. McyC baut L-Arginin<sup>Pos4</sup> ein. Die vier PKS-Module von McyG, McyD, McyE sind an der Synthese von Adda<sup>Pos5</sup> beteiligt. Das NRPS-Modul von McyE ist für den Einbau von D-Glutamat<sup>Pos6</sup> verantwortlich. Die Methylierung von Adda sowie die Racemisierung von Aspartat werden durch zwei zusätzliche Enzyme (McyJ, McyF) katalysiert.

### 1.3.2.3 Regulation

#### 1.3.2.3.1 Regulationsebenen

Die nicht-ribosomale Peptidsynthese bedingt, dass neben der Expression auf Transkript- (*mcy*) und Protein- (Mcy) eine zusätzliche Peptidebene (MC) existiert. Alle drei Regulationsebenen können ihrerseits beeinflusst werden. Eine erhöhte Transkript-Akkumulation führt daher nicht automatisch zu einer höheren MC-Konzentration [103]. In den meisten Studien wird in Abhängigkeit von bestimmten Variablen unter Ausschluss der Transkript- und Proteinebene nur der intra- bzw. extrazelluläre Gehalt an MC gemessen.

#### 1.3.2.3.2 Detektion auf Peptidebene

Die MC-Produktion in *Microcystis* wurde in *batch*, in kontinuierlich wachsenden Kulturen und im Freiland untersucht. Mehrere Umweltparameter wurden selektiert, die die MC-Produktion beeinflussen sollen. Zum einen wurde ein Effekt von Temperatur [108, 109], pH-Wert [110, 111] sowie Lichtintensität und -qualität [108,

109, 112, 113, 114, 115] nachgewiesen und zum anderen der Einfluss von Nährstoffen (Phosphor, Stickstoff, Anorganischer Kohlenstoff) und Spurenelementen untersucht [108, 111, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127]. Ähnliche Studien wurden auch mit *Anabaena* und *Planktothrix* durchgeführt [128, 129, 130]. Einen klaren multiparametrischen Zusammenhang gibt es jedoch nicht. In den meisten Fällen sind die Ergebnisse der Einzelstudien aufgrund unterschiedlicher Stämme, Wachstumsbedingungen und Toxizitätsmessungen nicht übertragbar. Hesse und Kohl konnten zeigen, dass verschiedene toxische *Microcystis*-Stämme unterschiedlich auf Lichtstimuli bzw. Nährstoffe hinsichtlich ihrer MC-Produktion reagierten [131]. Zum Teil wurden sogar gegensätzliche Effekte beobachtet [132]. In Feldstudien von Jungmann *et al.* konnte sogar nachgewiesen werden, dass keiner der untersuchten Umweltparameter die MC-Produktion signifikant beeinflusste [133]. Der stabilste Parameter bleibt jedoch die Wachstumsrate, deren lineare Beziehung zur MC-Produktion auch durch Mangelzustände nicht beeinflusst wird [113, 116, 123, 125]. Der höchste MC-Gehalt wurde in der exponentiellen Wachstumsphase gemessen [63, 111, 124, 127, 134]. Des Weiteren wird eine Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus der Zellen beschrieben [135, 136].

#### 1.3.2.3.3 Detektion auf Transkriptebene

Studien zur Regulation auf Transkriptebene wurden vor allem durch Kaebernick *et al.* und Nishizawa *et al.* durchgeführt [96, 112, 137]. Promotoranalysen zeigten, dass die zwei polycistronischen Operons (Abb. 6) von einem zentralen, bidirektionalen Promotor – zwischen *mcyA* und *mcyD* liegend – transkribiert werden [137]. Beide polycistronischen Transkripte besitzen alternative Startpunkte. Dies führte zu unterschiedlich langen untranslatierten *Leader*-Sequenzen. Außerdem beeinflussten Lichtintensität und -qualität die Stärke der Transkript-Akkumulation. Die höchsten Transkriptmengen wurden unter Stark- und Rotlicht gemessen, während Blaulicht zu gegenteiligen Effekten führte. Des Weiteren hing die Transkript-Akkumulation von der Zelldichte ab [112]. Andere Stressfaktoren wie Methylviologen und erhöhte Salzkonzentrationen bewirkten ebenso eine verringerte Expression. Innerhalb des Promotorbereiches sind Bindestellen für zwei Transkriptionsfaktoren lokalisiert [137, 138, 139] (Elke Dittmann, persönliche Mitteilung): NtcA (globaler Stickstoffregulator

[140, 141, 142, 143]) und Fur (Sensor für Eisenmangel und oxidativen Stress [144, 145]). *In vitro*-Bindungsanalysen konnten bisher nur für das Fur-Protein gezeigt werden [138, 139].

#### 1.3.2.3.4 Detektion auf Proteinebene

Über die Prozessierung, die Zusammensetzung, die Aktivität sowie die Stabilität des riesigen Mcy-Multienzymkomplexes gibt es kaum Studien. Erste licht- sowie autoregulatorische Effekte konnten jedoch auch auf Proteinebene detektiert werden [103, 146].

#### 1.3.3 Abbau von MC im Ökosystem

MC sind außerordentlich stabil und unterliegen nach Freisetzung nur einer langsamen Photodegradation (siehe 1.3.1.3). Diese Peptide können jedoch durch einige ebenfalls in Süß- und Abwasser, aber auch im Sediment vorkommende Vertreter der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Proteobakterien abgebaut werden [147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154]. 1994 wurde durch Jones *et al.* erstmals ein solcher Stamm aus einem australischen See isoliert. Das als *Sphingomonas* spp. identifizierte Bakterium zählt zu den gramnegativen sporenbildenden Mikroorganismen und lebt aerob sowie chemo-organotroph. Diese und andere Vertreter wie *Sphingosinicella microcystinivorans* und *Paucibacter toxinivorans* besitzen Gene (*mlrA-D*), die für die Spaltung der MC notwendig sind [155, 156]. Durch die Microcystinase MlrA wird die Peptidbindung zwischen Adda und Arg gelöst [157, 158, 159]. Die so linearisierte Struktur ist 100 mal weniger toxisch als die zyklischen Varianten [160]. Außerdem bietet sie Angriffspunkte für die Peptidasen MlrB und MlrC, die das Molekül in die einzelnen AS zerlegen. MlrD kodiert für einen Transporter, der für die Aufnahme von MC verantwortlich ist (Spaltung erfolgt in den Zellen). Der Abbau der MC ist temperaturabhängig und kann  $5 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$  betragen [161].

#### 1.3.4 Toxikologie

##### 1.3.4.1 *Mechanismus*

Bisher wird angenommen, dass MC für alle Eukaryoten toxisch sind. In Abhängigkeit von ihrer Hydrophilie gelangen MC entweder passiv durch Permeation oder aktiv

über Transportsysteme in die Zellen [63]. Die meisten MC wie z.B. MC-LR und MC-RR sind jedoch hydrophob. In tierischen Organismen gelangen sie mit dem Anionentransportsystem (Gallensäure-) in die Leber bzw. Hepatopankreas und inhibieren die dort lokalisierten Proteinphosphatasen (PP) [162, 163, 164, 165, 166, 167]. Dabei bindet der Methyldehydroalanin-Rest (Mdha) des MC kovalent über eine Michaelis-Addition an bestimmte Cysteine der PP1 (Cys-273) und PP2A (Cys-266) [168, 169, 170]. Kristallisationsanalysen zeigten, dass dabei der Adda- und der Glutamat-Rest des sich sterisch kaum verändernden MC in die Nähe der katalytischen Untereinheit der PP gelangen und über hydrophobe Wechselwirkungen mit dieser interagieren [171, 172, 173, 174]. Bindungs- und Inhibitionsassays mit modifizierten MC-Varianten bzw. mutierten PP des entsprechenden Bereichs verifizierten die Analysen [169, 175, 176, 177, 178, 179, 180]. Die eigentliche Inhibition wird demnach durch die nicht-kovalenten Interaktionen ausgelöst [181]. Cyanobakterien verfügen zwar auch über PP, doch fehlt hier der entsprechende Interaktionsbereich [182]. PP sind Antagonisten der zellulären Kinasen, die für die Phosphorylierung diverser Strukturproteine und Enzyme verantwortlich sind. Durch die Blockierung der PP-Aktivität kommt es zu einer Hyperphosphorylierung insbesondere der Cytoskelettelemente (Dyneine, Mikrofilamente), die dadurch destabilisiert werden [183, 184]. Die daraus resultierenden Einblutungen führen letztlich zum hämorrhagischen Schock. Des Weiteren induzieren MC oxidativen Stress [185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193]. Über die Bildung freier Radikale (ROS) werden Lipide, Proteine und DNA beschädigt. Dies kann letztlich zu apoptotischen und nekrotischen Veränderungen führen [194, 195].

MC wechselwirken auch mit anderen Enzymen wie der  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase [196], der Aldehyd-Dehydrogenase [197] und weiteren Proteinen [198]. Neben einer kovalenten Bindung an Cysteine werden auch Interaktionen mit modifizierten Methionin-Resten (Homocystein) postuliert [196].

#### 1.3.4.2 Einfluss von MC auf aquatische Lebewesen

Phytoplankter gehören als Produzenten zur Basis des aquatischen Ökosystems. Daher werden die Folgen einer möglichen MC-Anreicherung in der Nahrungskette kontrovers diskutiert. Untersuchungen mit Daphnien beispielsweise zeigten aber, dass *Microcystis* nicht zu ihren bevorzugten Nahrungsquellen zählt [199]. In

Abhängigkeit von der Größe der Filterapparate können in der Regel nur einzellige und kleine *Microcystis*-Kolonien ( $< 20 \mu\text{m}$  für *D. galeata*) aufgenommen werden [31, 200]. Eine dauerhafte Exposition von Daphnien mit toxischen *Microcystis*-Stämmen führte bei diesen neben einer Reduktion von Körpergröße und Eiproduktion zu einer Lebenszeitverkürzung [201, 202, 203, 204, 205, 206]. Für einige Daphnien-Arten konnte gezeigt werden, dass deren PPs durch MC blockiert werden [207].

Muscheln sind in der Lage auch größere Kolonien ( $< 750 \mu\text{m}$ ) aufzunehmen [208, 209]. Bis auf eine geringere Ingestions- und Überlebensrate bei *Dreissena* spp.-Larven fanden sich keine weiteren negativen Effekte durch die Aufnahme von toxischen Kolonien [210].

MC können saisonal bedingt auch in erhöhten Konzentrationen frei im See gelöst sein. Dies kann bei *Chlamydomonas* das Wachstum inhibieren und in aquatischen Makrophyten zur Herabsetzung der photosynthetischen Sauerstofffreisetzung führen [211, 212]. Auf Invertebraten, Lurche und Fische wirkten die Peptide toxisch insbesondere in der Entwicklungs- und Wachstumsphase früher embryonaler Stadien. Eine Chronische Exposition beeinflusste die Reproduktionsrate negativ.

Die meisten Wasserbewohner verfügen über detoxifizierende bzw. konjugierende Enzyme (Phase I: Cytochrom-P-450-Monooxygenasen; Phase II: Glutathion-S-Transferasen; Phase III:  $\gamma$ -Glutamyltransferase und Dipeptidasen) [213, 214, 215, 216]. Durch die Konjugatbildung wird die Wasserlöslichkeit erhöht, was eine renale Ausscheidung bzw. bei Pflanzen die Translokation in Vakuolen erleichtert. MC und deren Konjugate können allerdings über den Blutstrom ins Intestinum sowie andere Bereiche des Körpers wie Gehirn und Muskeln gelangen und sich dort anreichern [217, 218, 219, 220, 221, 222].

Das größere Problem für die aquatischen Lebewesen stellt aber nicht die Produktion der toxischen Substanzen dar, sondern die massenhafte Vermehrung der Cyanobakterien [31]. Die großflächigen Matten führen zur Sauerstoffzehrung in den darunter liegenden Schichten. Dies kann zum Umkippen des Gewässers führen [223].

#### 1.3.4.3 Einfluss von MC auf nicht-aquatische Tiere

Die Gefahr der Intoxikation ist für planktonfressende Wasservögel weitaus größer als für Haus- und Weidetiere (1.1). Insbesondere für verschiedene Flamingo-Spezies

wird ein Zusammenhang von MC und saisonalen Massensterben angenommen [224, 225, 226, 227, 228, 229].

Beim Menschen besteht die Gefahr der oralen Aufnahme bei nicht oder falsch aufbereitetem Trinkwasser bzw. beim Baden (siehe 1.1) [216, 230, 231]. Letztere Gefahr wird jedoch durch das mit bloßem Auge erkennbare massenhafte Auftreten der Bakterien und den üblen Geruch, der von ihnen ausgeht, eingedämmt. Im Frühjahr und im Herbst lysieren viele Kolonien, so dass die MC frei werden und damit eine potentielle Gefahr darstellen [51]. In Abhängigkeit von der aufgenommenen Dosis können Hautirritationen, Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Gastro-, Hepatoenteritis und Pneumonie bis hin zu Todesfällen durch akutes Leberversagen (siehe 1.3.4.1) auftreten [59, 232, 233]. Bei chronischer Exposition können sich auch Lebertumore entwickeln [234, 235, 236, 237, 238, 239, 240].

### 1.3.5 Funktionshypothesen

#### 1.3.5.1 Vorbetrachtungen

##### 1.3.5.1.1 Evolution der *mcy*-Gene

Bislang gibt es keine Erkenntnisse über die tatsächliche Funktion der MC. Die Synthese solcher Metabolite ist jedoch, mit einem erheblichen energetischen Aufwand für die Zelle verbunden [98]. Somit ist anzunehmen, dass MC eine biologische Funktion übernehmen.

Rantala *et al.* konnten zeigen, dass die *mcy*-Gene schon früh in der Evolution entstanden sind [62]. Aufgrund der Größe der Gencluster, der Konservierung bestimmter Bereiche bei *Microcystis*, *Anabaena* und *Planktothrix* sowie der gemeinsamen Evolution mit *Housekeeping*-Genen wird ein lateraler Gentransfer ausgeschlossen. Es wird daher ein gemeinsamer Vorfahre für alle drei Genera postuliert [62]. In der Natur ko-existieren toxische und nicht-toxische Stämme sowohl bei *Microcystis* [96, 241, 242, 243, 244, 245] als auch bei *Planktothrix* [246, 247, 248, 249, 250] und *Anabaena* [251, 252]. Das Fehlen von *mcy*-Genen in einigen Stämmen wird auf einen Verlust jener im Laufe der Evolution zurückgeführt [103]. Erste Analysen zeigten, dass dies vermutlich auf eine Inaktivierung der Gene durch Mutationen (Punkt-, Transposons, Deletionen) zurückzuführen ist [246, 247, 249, 253].

Für die Funktion der MC existieren zahlreiche Hypothesen. Die meisten Hypothesen postulieren eine Funktion außerhalb der Zelle. Grundlage wäre ein aktiver Export des MC, der möglicherweise durch den McyH-Transporter – Teil des *mcy*-Genclusters – gewährleistet wird [107]. In der Tat konnte bisher, im Gegensatz zu den anderen cyanobakteriellen nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden, nur für MC gezeigt werden, dass diese auch im Medium nachweisbar sind [254]. Diese Funktionshypothesen basieren sowohl auf intra- als auch interspezifischen Wechselwirkungen. Letztere müssen sich aufgrund der frühen Evolution der *mcy*-Gene, also noch vor der Existenz von eukaryotischem Leben, sekundär entwickelt haben [62].

#### 1.3.5.1.2 Funktion anderer bakterieller, nicht-ribosomaler Peptide

Neben Cyanobakterien synthetisieren auch Actinomyceten, Streptomyceten sowie einige *Pseudomonas*- und *Bacillus*-Arten nicht-ribosomale Peptide. Die Funktion einiger dieser Peptide ist bereits aufgeklärt. Parallelen gibt es hinsichtlich des extrazellulären Wirkorts. Einige werden als Schutz gegen Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten gebildet [255], andere wiederum wirken immunsupprimierend auf den Wirtsorganismus. In dieser Schutzfunktion haben sich auch Symbiosen zwischen Eukaryoten und Prokaryoten entwickelt [256, 257]. *Paederus*-Käfer nutzen die Wirkung des Pederins, produziert von *Pseudomonas aeruginosa*, zur Verteidigung [256]. Neben dieser Schutzfunktion agieren nicht-ribosomale Peptide in Transportvorgängen. Zumeist pathogene Bakterien bilden zur Eisenaufnahme Siderophore bzw. Eisen-Chelatoren, die über NRPS/ PKS hergestellt werden [258, 259]. Einige nicht-ribosomale Peptide spielen bei der Zelldifferenzierung eine Rolle [260]. Im zunehmenden Maße wird aufgrund der Regulation von Antibiotika und Oberflächenfaktoren durch *Autoinducer* eine Rolle dieser Peptide in Zell-Zell-Interaktionen diskutiert [261, 262, 263]. Des Weiteren eignen sich diese Peptide/ Polyketide aufgrund ihrer Größe als Signal- oder regulatorische Moleküle [264]. In natürlich auftretenden Konzentrationen beeinflussen sie die Expression vieler Gene [265, 266].

### 1.3.5.2 Interspezifische Funktionshypothesen

Aufgrund der Toxizität der MC für Eukaryoten wurde postuliert, dass diese zur Abwehr potentieller Fressfeinde wie Daphnien produziert werden [267]. Da jedoch Studien bewiesen, dass die verringerte Ingestionsrate nicht auf die Toxizität, sondern auf die Unzulänglichkeit der Filterapparate zurückzuführen ist [199, 268], kann diese Annahme inzwischen als widerlegt angesehen werden.

Eine weitere interspezifische Funktionshypothese ist die der allelopathischen Wechselwirkungen oder – etwas weiter gefasst – des so genannten *cross talks* mittels MC. Demnach könnte das Wachstum einer Spezies durch bestimmte Faktoren, die von einer anderen Spezies sezerniert werden, gehemmt werden. Letztere verschafft sich dadurch einen Vorteil. Allelopathische Effekte, die auf die Wirkung von MC als extrazellulär sezernierter Faktor zurückzuführen sein sollen, wurden erstens zwischen Cyanobakterien und diversen aquatischen Bewohnern wie Daphnien, Makrophyten, Grünalgen sowie Dinoflagellaten [253, 269, 270, 271, 272, 273] beschrieben, zweitens zwischen einzelnen Cyanobakterienarten [272] und drittens zwischen verschiedenen Stämmen einer Gattung (siehe 1.3.5.3). Die allelopathischen Wechselwirkungen auf Basis von MC werden jedoch durch die hohe Verdünnungsrate der Faktoren im See und ihre im Laborexperiment oft in unnatürlich hohen Konzentrationen eingesetzten Mengen in Frage gestellt [132].

### 1.3.5.3 Intraspezifische Funktionshypothesen

Wechselwirkungen werden auch innerhalb der einzelnen cyanobakteriellen Gattungen diskutiert. Dabei soll dem MC die Rolle eines infochemischen Signals zukommen [146]. Die in einem Ökosystem oft ko-existierenden toxischen und nicht-toxischen Stämme könnten über dieses Signal miteinander kommunizieren [274]. Dieses soll sich insbesondere für die toxischen Kolonien zum Vorteil auswirken [146, 271, 275].

Kommunikation zwischen Bakterien wurde lange Zeit negiert. Erst die Entdeckung der Biolumineszenz bei *Vibrio fischeri* leitete ein Umdenken in den späten sechziger Jahren ein [276]. Grundlage einer multizellulären Kommunikation sind chemische Signale [277, 278]. Über die Form des *Quorum sensings* (wobei das Signal in der Regel mit zunehmender Zelldichte im Medium akkumuliert) wird eine Reihe von

Genen gleichzeitig in den Einzellern aktiviert, was sie befähigt, gemeinsam auf einen Umweltreiz zu reagieren [279, 280].

Multizelluläre Verhaltensweisen in Cyanobakterien wurden bisher nur im Zuge der Heterocystenbildung in *Anabaena* näher untersucht [281]. Sowohl *Anabaena* als auch *Microcystis* sind kolonieformende Bakterien [42]. In diesem Zellverband migrieren sie in der Wassersäule und agieren auf bestimmte Umweltreize. Die Dynamik der Koloniebildung in *Microcystis* und *Anabaena* ist jedoch wenig untersucht. Molekulare Untersuchungen zwischen MC-Produzent und MC-freier Mutante zeigten, dass in Abhängigkeit vom MC sowohl Proteine, die Ähnlichkeiten zu *Quorum-sensing*-regulierten Proteinen anderer Bakterien zeigen, als auch ein Lektin, das Zell-Zell-Kontakte in *Microcystis* vermittelt, unterschiedlich exprimiert sind [274, 282]. Anhand von Feldstudien wird außerdem ein Zusammenhang zwischen dem sogenannten Chemotyp, der aus der Gesamtheit aller produzierten nicht-ribosomalen Peptide eines Stammes resultiert, und dem Morphotyp einer Kolonie angenommen [245, 283]. In Freilandversuchen am Wannsee konnte gezeigt werden, dass sich unter den *M. aeruginosa*-Morphotypen vornehmlich toxische Genotypen finden. Kolonien vom *ichthyoblabe*-Typ wiesen dagegen nur zu 17 % und vom *wesenbergii*-Typ fast nie *mcyB*-Genotypen auf [245, 284, 285]. In Abhängigkeit vom Morphotyp variiert die Art der MC-Variante [285]. Es gibt allerdings auch Belege dafür, dass *M. wesenbergii* in einzelnen Fällen toxisch ist [28, 286, 287, 288]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die saisonalen Schwankungen in der MC-Detektion auf die alternierende Dominanz dieser Morphotypen (bzw. toxischen Genotypen) zurückzuführen ist [75, 289, 290]. Molekularbiologische Analysen mittels quantitativer *real-time*-PCR konnten diese Aussagen allerdings nicht bestätigen [252, 291]. Hier blieb die Zahl der *mcyB*-Genotypen während der gesamten Saison bei etwa 11 % (Wannsee, Deutschland) [252, 291].

Neben dem Morphotyp scheint auch die Koloniegröße durch die MC-Produktion beeinflusst zu werden. Während in den kleineren Kolonien wenige toxische Genotypen auftraten, konnte in fast allen größeren Kolonien das *mcyB*-Gen bzw. MC detektiert werden [82, 245, 292].

#### 1.3.5.4 Intrazelluläre Funktionshypothesen

Der größte Teil des synthetisierten MC verbleibt in den Zellen. Über Lokalisationsstudien mit einem Immunogold-markierten Antikörper konnten die

Peptide im inneren Nukleoplasma, in den Thylakoiden sowie in und um intrazelluläre Inklusionen wie den Polyphosphatkörperchen und den Carboxysomen detektiert werden [182, 293, 294].

Mit der Lokalisation im Nukleoplasma einhergehend wird eine Rolle im Zellzyklus während der Replikationsphase postuliert [120]. In Zusammenhang mit den Carboxysomen stehend wird eine Inhibition von RubisCO durch MC unter C-limitierenden Bedingungen diskutiert [75, 293].

Hesse *et al.* konnten Pigmentierungsunterschiede zwischen einem MC-Produzenten und der MC-freien Mutante in Abhängigkeit vom Licht feststellen [295]. Einen Einfluss von MC auf die Regulation der Lichtsammelkomplexe wird daher angenommen [295, 296]. In Konkurrenzexperimenten zwischen toxischen und nicht-toxischen Stämmen konnte gezeigt werden, dass nicht-toxische Stämme die besseren Konkurrenten um den Faktor Licht sind [289]. Dieser Ansatz soll den Shift von toxischen zu nicht-toxischen Genotypen während der Entwicklung der *Microcystis*-Blüten im Sommer erklären. Hesse und Kohl sowie Vezie *et al.* führten dies jedoch auf die veränderten Nährstoffbedingungen zurück [119, 297].

Laborexperimente von Utkilen *et al.* zeigten einen Einfluss von MC auf die Eisenassimilation von *Microcystis* [118]. Unterstützt werden diese Daten durch Promotorbindungsanalysen am *mcy*-Gencluster mit dem Fur-Protein [118, 138, 139]. Möglicherweise ist MC daher unter oxidativen Stressbedingungen von Bedeutung.

#### 1.4 Zielstellung

Cyanobakterielle Toxine stellen ein weltweites Problem in der Trinkwasserversorgung dar. Hinzu kommen ökologische Probleme wie die Anreicherung in der Nahrungskette und die jährlich auftretenden Algenblüten [11, 12]. Die biologische Funktion dieser Peptide ist jedoch weitgehend unklar. Ziel dieser Arbeit ist es daher, erstmals die physiologische Bedeutung eines der bekanntesten cyanobakteriellen Toxine, des Microcystins (MC), für die produzierende Art aufzuklären. Als Modellorganismus dient *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 [298].

Eine Untersuchung des putativen Zusammenhanges zwischen Sozialverhalten und MC ist aufgrund des Verlusts der Koloniebildung von PCC 7806 im Laufe der Kultivierung (seit 1972) erschwert [107, 299, 300]. Daher soll die Problematik erstmals auf molekularem Level analysiert werden. In proteomischen Vergleichen

zwischen Wt und MC-freien Mutanten (PCC 7806) sollen Kandidatengene selektiert werden, die im unmittelbaren Zusammenhang mit dem MC stehen. Für die 2D-Analyse soll die subzelluläre Fraktionierung für *Microcystis* optimiert werden. Über die Zuordnung, der in Wt und Mutanten differentiell exprimierten Spots zu bestimmten Stoffwechselwegen, kann auf die Bedeutung der MC geschlossen werden. Die Kandidaten müssen anschließend in weiteren Analysen verifiziert werden. Die Relevanz dieser Daten soll anhand von Freilandsituationen diskutiert werden.

Über die Zugabe von MC zu Kulturen (in natürlichen Konzentrationen) soll außerdem eine mögliche Rolle als Signalfaktor geprüft werden. Effekte deuten auf eine Rezeption von MC hin. Der putative Rezeptor kann möglicherweise mittels der proteomischen Studie oder in Bindungsassays ermittelt werden. Hierbei wäre auch zu klären, ob erstens die einzelnen MC-Varianten gleiche Funktionen erfüllen und zweitens, welche Rolle den anderen nicht-ribosomalen Peptiden zukommt. Die Ermittlung der Bedeutung von MC für *Microcystis* wäre Grundlage für eine vertiefende Funktionsanalyse in den anderen MC-produzierenden Gattungen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Kultivierung von *Microcystis aeruginosa* PCC 7806

Der in dieser Arbeit verwendete, 1972 aus dem Braakman Reservoir (Niederlande) isolierte Stamm PCC 7806 wurde von Dr. Rosemarie Rippka axenisiert. Die Kultivierung von PCC 7806 erfolgte in BG11-Medium (<http://www.pasteur.fr/recherche/banques/PCC/Media.htm/BG11>). Daneben wurde der Stamm auf BG11-Agar (Difco Bacto-Agar; c = 0,7 % (w/v)) angezogen. Den Medien der MC-freien Mutanten  $\Delta mcyB$  [299],  $\Delta mcyA$  [98] und  $\Delta mcyH$  [107] wurde Chloramphenicol in einer Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt. In Belichtungsexperimenten selbst wurde auf eine Antibiotikazugabe verzichtet, um einen Einfluss auf die Proteintranslation auszuschließen. Der Gasaustausch in den Flüssigkulturen wurde in Abhängigkeit vom Kulturvolumen entweder durch leichtes Schütteln des Erlenmeyerkolbens (80 rpm) oder durch Begasung mit Luft gewährleistet. Die Kulturen wuchsen bei 23°C unter Schwachlichtbedingungen ( $\sim 50 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; gemessen mit dem Model LI-250 Light Meter, LICOR).

Das Wachstum der sich unter diskontinuierlichen Bedingungen vermehrenden *Microcystis*-Kulturen (*in batch*) wurde zum einen spektrophotometrisch (Lamda 35 UV/Vis Spectrometer, PerkinElmer) bei 750 nm und zum anderen über die Ermittlung der Zellzahl (Zählkammer, Neubauer) verfolgt. Das für die diversen Versuchsreihen benutzte MC-LR wurde von Dr. Keishi Ishida isoliert.

### 2.2 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte unter Standardbedingungen [301] in LB-Medium bzw. LB-Agar bei 37°C. Für die Vermehrung rekombinanter Plasmide wurde der *E. coli*-Stamm XL1-blue mit folgenden genetischen Eigenschaften verwendet:

- XL1-blue (Stratagene): *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac[F'proAB lac<sup>f</sup>Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]*

Die Expression rekombinanter Proteine erfolgte in TM-Medium (Novagen) durch den *E. coli*-Stamm BL21:

- BL21(DE3) (Novagen): *F-*, *ompT*, *gal*, *dcm*, *lon*, *hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)*,  $\lambda$ (DE3)

### 2.3 Nukleinsäuren

#### 2.3.1 Präparation von Nukleinsäuren

##### 2.3.1.1 Präparation genomischer DNA aus *Microcystis* spp.

Die Präparation der genomischen DNA aus *Microcystis* erfolgte nach dem in Hisbergues *et al.* beschriebenen Protokoll [302].

##### 2.3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Mini- bzw. Midi-Plasmid-Präparationen wurden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt [301]. In Abhängigkeit vom weiteren Verwendungszweck (Sequenzierungen, Sondenherstellung)

wurden die Plasmide auch mit dem QIAprep® Miniprep Kit und dem QIAGEN® Plasmid Purification Kit der Firma Qiagen entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

#### 2.3.1.3 Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Im Agarosegel aufgetrennte DNA-Fragmente wurden nach dem von Qiagen entwickelten QIAquick Gel Extraction Kit-Protokoll präpariert.

#### 2.3.1.4 Präparation von Gesamt-RNA aus *Microcystis* spp.

Die Gesamt-RNA aus *Microcystis* wurde mit Trizol nach den Instruktionen der Herstellerfirma isoliert (Gibco BRL). Hierbei wurde eine Zentrifugation vor Chloroformzugabe zwischengeschaltet, um Zelltrümmer abzutrennen. Die RNA-Pellets wurden in DEPC-Wasser [301] gelöst. In der Regel wurde noch eine DNaseI-Behandlung (Fermentas) nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

#### 2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Qualität und Quantität der extrahierten Nukleinsäuren wurde in mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen überprüft. Die Nukleinsäuren wurden außerdem mittels eines Spektrophotometers (RNA/DNA Calculator GeneQuant II, Amersham Biosciences) quantifiziert. Dabei entspricht eine Optische Dichte ( $OD_{260}$ ) einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml und einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Der Grad der Verunreinigungen durch Proteine wurde anhand des Quotienten der Extinktionen bei 260 nm zu 280 nm ermittelt.

#### 2.3.3 Aufkonzentrieren und Reinigen von Nukleinsäuren

Nukleinsäure-Lösungen wurden in der Regel über Säulen aufreinigt bzw. aufkonzentriert (Qiagen, QIAquick PCR Purification Kit). RNA-Proben wurden alternativ auch über eine Natriumacetat/ Ethanol-Fällung [301] aufkonzentriert.

#### 2.3.4 Analyse von Nukleinsäuren

##### 2.3.4.1 Horizontale Agarosegelelektrophorese und Färbung von Nukleinsäuren

Für DNA-Proben einer Größe von 1-20 kb wurden 0,6-1,2 % Agarosegele verwendet, für kürzere Fragmente 1,5-2,0 % Agarosegele (Biozym). Die mit Ladepuffer versetzten Proben wurden anschließend auf das Gel aufgetragen. Der Lauf erfolgte je nach Kammergröße und Puffersystem (1x TAE-Puffer bzw. 0,5x TBE-Puffer) bei 5-10 V/cm. Als Marker wurde eine mit *Pst*I (Fermentas) restringierte λ-DNA (Fermentas) verwendet. Daneben kamen auch kommerzielle Marker wie der GeneRuler™ 100 bp Plus (#SM0323; Fermentas) zum Einsatz. Nukleinsäuren wurden durch den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid angefärbt, welches bereits den Gelen in einer Konzentration von 0,2 µg/ml zugefügt wurde. Die Visualisierung erfolgte unter dem UV-Transilluminator (Gel doc XR System, Bio-Rad).

DNA-Ladepuffer:	50 % (v/v) Glycerol, 1 mM EDTA; 0,005 % (w/v) Xylencyanol; 0,005 % (w/v) Bromphenolblau
1x TAE:	40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA
0,5x TBE:	45 mM Tris; 45 mM Borsäure; 0,5 mM EDTA

Zur elektrophoretischen Trennung der Gesamt-RNA wurde ein 1,5 % Agarosegel verwendet. Nach Aufschmelzen der Agarose und Abkühlen auf ca. 60°C wurde 10x MEN (1/10 von  $V_{\text{End}}$ ) und Formaldehyd (1/20 von  $V_{\text{End}}$ ) als denaturierendes Agens hinzugegeben. Nach Zugabe von Ladepuffer (2x RNA Loading Dye Solution, Fermentas) zu den RNA-Proben wurden diese für 5 min bei 65°C denaturiert. Der Lauf wurde in 1x MEN-Puffer je nach Kammergröße bei 8 V/cm durchgeführt. Als Marker dienten die RiboRuler™ RNA Ladders, Low Range und High Range der Firma Fermentas (#SM1833, #SM1823). Die Visualisierung erfolgte nach dem Lauf unter dem UV-Transilluminator (Gel doc XR System, Bio-Rad).

1x MEN: 20 mM MOPS; 5 mM Na-Acetat; 1 mM EDTA, pH 8,0

#### 2.3.4.2 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Sowohl die Sequenzreaktion als auch die Trennung und Computeranalyse der Reaktionsprodukte wurden durch die Firma DLMBC (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die einzusetzende Menge richtete sich nach den Angaben der Firma.

#### 2.3.4.3 Sequenzanalyse

Die Sequenzen wurden über die im Internet zugängigen Genomdatenbanken auf ihre Identität und Homologie zu den bestimmten Proteinen bzw. charakteristischen Domänen hin untersucht.

<http://genopole.pasteur.fr/maeru/IPFutil.html> (nur für Kooperationspartner des Genomprojektes zugänglich)  
<http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>  
<http://ca.expasy.org/>

Hinsichtlich der zellulären Lokalisation von Proteinen bzw. des Vorhandenseins bestimmter Signalpeptide wurden folgende Programme herangezogen:

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>  
<http://www.psort.org/psortb/>

Sequenzvergleiche (*alignments*) und -translationen wurden über die Webseite <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/> durchgeführt.

#### 2.3.4.4 PCR

PCR-Ansätze und -Reaktionen zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus genomischer *Microcystis*-DNA wurden unter Verwendung von AmpliTaqKits der Firma Qiagen nach deren Standardprotokoll durchgeführt. Die Primer (Tab. 1) wurden in der Regel mittels Primer3 Design ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) abgeleitet und die Schmelztemperaturen über Tm Calculator ([http://www.finnzymes.fi/Java/tm\\_determination.htm](http://www.finnzymes.fi/Java/tm_determination.htm)) ermittelt. Die über die PCR entstandenen Fragmente wurden anschließend in entsprechenden Agarosegelen (siehe 2.3.4.1.1) analysiert.

PCR-Ansätze und -Reaktionen zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus *E.coli*-Kulturen, so genannte *colony*-PCRs, wurden ebenfalls mittels des oben genannten Kits durchgeführt. Mit einer

sterilen Spitze wurden die zu untersuchenden Kolonien gepickt und in 10 µl *Aqua bidest.* aufgenommen. Anschließend wurde 1 µl der Zellsuspension für den PCR-Ansatz verwendet. Um nun in der anschließenden Reaktion ein Aufbrechen der Zellen zu ermöglichen, wurde der *preheating Step* (95°C) auf 10 min verlängert.

Für die Expression rekombinanter Proteine, bei der das zu amplifizierende PCR-Fragment als Matrize derer dient, muss die Zahl der eingebauten Mutationen während PCR minimiert werden. Die *Pfu*-Polymerasen der Firmen Promega und Fermentas verringern die Fehlerrate erheblich gegenüber der Standard *Taq*-Polymerase (Qiagen). PCR-Ansatz und -Reaktion erfolgten auch hier nach den Instruktionen der Hersteller (Promega, Fermentas).

Tab. 1: Liste der verwendeten Primer

Primername	Primersequenz (5' → 3')	Referenz
16SrRNA.fw	GCGTTATCCGGAATTATTGG	[112]
	TGTA AACGACGGCCAGTGAAGTCGTAACAAGC	[274]
16SrRNA.rv	CCACTAAGAACGAGGGTTGC	[112]
	TAGCAGGAAACAGCTATGACCCTCTGTGTGTGCCTAGGTATCC	[274]
604-BamHI.rv	GGATCCGTGATCCACGC	Diese Studie
604-NdeI.fw	CATATGAGTATCACACGGAGC	Diese Studie
CcmM.fw	AAACGCGCATAGACGAGAGT	Diese Studie
CcmM.rv	GTGGAGCGAAAACCGATAAA	Diese Studie
FbaA.fw	CTTGCTCCGGATCTGTCATT	Diese Studie
FbaA.rv	ACCGTAGTCCCCTATGTTG	Diese Studie
GlgC.fw	CGATTTCCGCAAGGAAATTA	Diese Studie
GlgC.rv	GGCTCCCATCAGCATTGTAT	Diese Studie
GvpC.fw	TCCTTCACCTGTTTGGCTCT	Diese Studie
GvpC.rv	CTTACGTCAACAGCGTCTGG	Diese Studie
MrpC169.fw	ACTGCAGCCACCAATAGCTT	Diese Studie
MrpC387.rv	CTGCGAAAATAGCATCAGCAG	Diese Studie
MrpC-BamHI.rv	GGATCCATCTAAGACGGAAGT	Diese Studie
MrpC-NdeI.fw	CATATGCAATTTATCGGTACA	Diese Studie
MrpCoSig.fw	CAATTTATCGGTACAGCATCC	Diese Studie
McyA-Cd1R	AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT	[302]
McyA-Cd1F	AAAATTAAGCCGTATCAAA	[302]
PpsA.fw	CGATTA AACCGGTCAGGAA	Diese Studie
PpsA.rv	TCGGCGATTTGGTCTTTTAC	Diese Studie
RbcL.fw	CGCGTTACCTTCGAGTTTA	Diese Studie
RbcL.rv	AACGTAACCGCTCCTACCTG	Diese Studie
RbcL.fw	GACGGGGAAACGGATATCTT	Diese Studie
RbcL-BamHI.rv	GGATCCGAGGGTATCCATAGCCTC	Diese Studie
RbcL-NdeI.fw	CATATGGTGCAAGCCAAATCC	Diese Studie
Spin35.fw	CGGATGCAAGTCTGTGTAATG	Diese Studie
Spin359.rv	GCTTGGGTAACGGTCTCTTG	Diese Studie
TrxM.fw	ACCTTGACTTGCCCTTTGAA	Diese Studie
TrxM.rv	GAATGTCAACATCGCACCAC	Diese Studie

#### 2.3.4.5 Nachweis spezifischer Nukleinsäuren

##### 2.3.4.5.1 Herstellung von Sonden

Doppelstrangmarkierte DNA-Sonden (für die Analyse in *Northern Blots*) wurden nach dem Prinzip der *random primed* Synthese mittels des HexaLabel™ DNA Labeling Kits (Fermentas) nach Instruktionen des Herstellers synthetisiert. Die Markierung erfolgte durch [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (Amersham).

##### 2.3.4.5.2 Northern Blot

Im Agarosegel aufgetrennte, einzelsträngige RNA-Moleküle wurden mittels der *Northern Blot*-Technik an eine Nitrocellulosemembran (Hybond™ N<sup>+</sup>, Amersham) gebunden. Der Transfer erfolgte dabei über Nacht mittels 6x SSC unter Ausnutzung der Kapillarkräfte [301]. Im Anschluss wurde die trockene Membran zur Quervernetzung mit UV-Licht behandelt (GS Gene Linker™, 312 nm, 150 mJ, 150 s).

20x SSC, pH 7,0: 175,3 g NaCl; 88,2 g Na-Citrat

### 2.3.4.5.3 Hybridisierung

Der Nachweis der spezifischen Nukleinsäure auf der Membran erfolgte durch eine Hybridisierung der markierten Sonde mit der komplementären Sequenz auf der Membran (Dauer etwa 18 h). Essentiell war dabei eine vorherige Prähybridisierung der Membran für mindestens 1 h. Die jeweilige Hybridisierungstemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur der Sonde. Diese wiederum hängt von der Sondenlänge, dem GC-Gehalt sowie der Salz- und Formamidkonzentration des Northern-Puffers ab. Die Hybridisierungstemperatur wurde etwa 20°C niedriger gewählt als die berechnete Schmelztemperatur:

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} - (16,6 * \lg[Na^+]) + 0,41 * (\%GC) - 0,63 * (\%Formamid) - \frac{600}{L}$$

$T_m$	[°C]	Schmelztemperatur der Sonde
[Na <sup>+</sup> ]	[mol/L]	Natriumionenkonzentration des Northern Puffers
% GC	[%]	GC-Gehalt der Sonde
% Formamid	[%]	Formamidgehalt des Northern Puffers
L	[bp]	Länge der Sonde

Anschließend konnten nach mehreren Waschschritten (Tab. 2) die Signale mittels des PhosphorImagers (Molecular Imager FX, Bio-Rad) detektiert werden (Screen ca. bis zu 12 h eingelegt). Die Auswertung erfolgte über Quantity One (Bio-Rad). Weitere Hybridisierungen konnten nach vorherigem Strippen der Membran in 0,1 % (w/v) SDS-Lösung (95°C, 15 min) durchgeführt werden.

Northern-Puffer: 50 % (v/v) Formamid; 7 % (w/v) SDS; 0,12 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2; 0,25 M NaCl

Tab. 2: Waschprotokoll für Northern Blots

Abfolge	ϑ in °C	t in min	Gehalt an SSC	Gehalt an SDS
1	22	15	2x	1 %
2	entspricht Hybridisierungstemperatur	15	1x	1 %
3	entspricht Hybridisierungstemperatur	15	1x	0,5 %
4	entspricht Hybridisierungstemperatur	15	0,5x	0,1 %

### 2.3.5 Klonierung

#### 2.3.5.1 Modifizierung von PCR-Fragmenten

Die Enden der über die *Pfu*-Polymerase (Fermentas) synthetisierten Fragmente mussten zur weiteren Klonierung adenyliert werden. Dem PCR-Ansatz wurde dazu *Taq*-Polymerase (0,1 U), dATP (C<sub>END</sub> = 2 mM) und *Taq*-Puffer (C<sub>END</sub> = 1x) hinzugegeben (Qiagen). Die Synthese erfolgte bei 72°C für 30 min.

#### 2.3.5.2 Einbau von PCR-Fragmenten in Vektoren

Zur Vervielfältigung von PCR-Fragmenten wurden diese – entsprechend den Herstellerangaben – in den pDrive-Vektor ligiert (QIAGEN® PCR Cloning Handbook). Für die Expression rekombinanter Proteine wurde der pET15b-Vektor (Novagen) verwendet. Der Einbau erfolgte nach Herstellerinstruktionen (Novagen). Religationen von bereits geschnittenen Vektoren wurden durch den Einsatz von CIAP (Fermentas) – durchgeführt nach dem Protokoll des Herstellers – vermieden.

### 2.3.5.3 Transformation von *E. coli*

Unter Ausnutzung der chemischen Kompetenz [301] wurden die jeweiligen *E. coli*-Stämme (2.2) unter Aufnahme der Plasmid-DNA transformiert.

### 2.3.5.4 Selektion und Konstruktanalyse

Die Selektion positiv transformierter Klone erfolgte auf LB-Agar unter Zusatz eines Antibiotikums. Die Wahl des Antibiotikums wird durch die eingebrachte Resistenzkassette bestimmt. Die Konzentration ist vom Replikationsmodus des Vektors abhängig [301]. Um die Insertion zu überprüfen, bieten einige Vektoren eine Blau/ Weiß-Selektion (pDrive, Qiagen; Protokoll nach Herstellerangaben), andere wurden über eine Restriktionsanalyse (Fermentas, Biolabs; Protokoll nach Herstellerangaben) oder einer Sequenzierung (2.3.4.2) verifiziert.

## 2.4 Proteinanalyse

### 2.4.1 Extraktion von Proteinen aus *Microcystis* spp.

Je nach Fragestellung wurden entweder alle zellulären Proteine [303] oder sukzessiv die Proteine der subzellulären Kompartimente (Medium, äußere Zellhülle, Cytoplasma, Membransysteme) extrahiert. Mediumproteine wurden einerseits analytisch über eine TCA-Fällung und andererseits präparativ mittels Ammoniumsulfatfällung gewonnen (2.4.3). An der Zelloberfläche assoziierte Proteine wurden erstens durch dreimalige Waschungen mit 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,8) bei 30°C analog zu dem bei *Nostoc* erprobten Protokoll [304] und zweitens über einen osmotischen Salz- oder Zuckerschock analog der Protokolle mit *Synechocystis* [305] und *Pseudomonas* [306] isoliert. Bei den Waschungen der *Microcystis*-Zellen kam es leider immer wieder zu einer Vermischung mit cytoplasmatischen Bestandteilen, da insbesondere die MC-freien Mutanten  $\Delta mcyA$ ,  $\Delta mcyB$  und  $\Delta mcyH$  schneller durch Scherkräfte in der Pipette platzen. Jegliche mechanische Beanspruchung wurde daher während der Extraktion vermieden. Kontaminationen wurden über eine Spektrumanalyse (220-750 nm) identifiziert. Cytoplasmatische Marker sind hierbei die Phycobiline (Phycocyanin:  $\lambda_{\max}$  620 nm). Insgesamt sind alle drei Isolationsmethoden möglich, jedoch haben sie einen unterschiedlichen Repräsentationscharakter hinsichtlich der Quantität der Proteine (Daten nicht gezeigt). Bei den Schockmethoden war zu beachten, dass die störenden Salze bzw. die Saccharose über Entsalzungssäulen oder Dialyse entfernt werden mussten. Die dann in 1-4 ml 500 mM Tris/ HCl-Puffer (pH 7,8) und 50 mM EDTA (mit 1 mM PMSF) aufgenommenen Zellen bzw. Spheroblasten wurden bei 900 Psi und 4°C in der French Press aufgeschlossen. Die anschließende Ultrazentrifugation (20000 x g, 4°C, 45 min) trennte cytoplasmatische Bestandteile von den schwereren Membranbestandteilen. Die Membranproteine wurden aus dem Pellet mittels eines speziellen harnstoffhaltigen Puffers extrahiert. Etwaige Zelltrümmer wurden durch eine erneute Zentrifugation (6000 x g, 4°C, 10 min) abgetrennt. Neben der Spektrumanalyse wurde der Erfolg der Fraktionierung über eine Coomassie-Färbung und über Immunodetektion abgeschätzt. Marker für die Mediumfraktion ist MrpC, für die Extrazelluläre Fraktion Mvn [282] und für die Cytoplasmatische Fraktion Rbcl [307] und FtsZ [308].

Membranpuffer: 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % (w/v) CHAPS, 1 % (w/v) DTT,  
2 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

#### 2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentration von Proteinen in Lösungen wurde zum einen nach der Bradford-Methode [309] und zum anderen nach der Lowry-Methode [310] bestimmt. Die Bradford-Methode wurde analog der Instruktionen des verwendeten Bio-Rad Protein Assays durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mittels einer BSA-Eichkurve. Die Lowry-Methode, angewendet insbesondere bei Phycobilin-haltigen Extrakten, wurde nach des in *Protein Methods* beschriebenen Protokolls durchgeführt [311]. Die Quantifizierung erfolgte ebenso mittels einer BSA-Eichkurve.

#### 2.4.3 Reinigen und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Zum Aufkonzentrieren von Proteinlösungen wurden zum einen analytische Methoden und zum anderen präparative Verfahren benutzt. Zu den analytischen Methoden gehören die denaturierende Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) – insbesondere angewendet zur Fällung der Mediumproteine – und die Immunpräzipitation (2.4.4.3.3). Bei einer Endkonzentration von 10 % (v/v) TCA in der Lösung fiel ein großer Teil der Proteine aus. Diese wurden dann bei 10000 x g zentrifugiert und das Pellet dreimal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Nach Evaporation des Acetons wurden die Mediumproteine in Harnstoff-haltigem Puffer gelöst und analysiert. Eingesetzte präparative Isolationsmethoden waren neben der Ammoniumsulfatfällung (*salting out*) auch die Ultrafiltration (Microcon® YM-10, Centricon® YM-10; Millipore/ Amicon), die Dialyse (Visking® Dialysis Tubing,  $\varnothing$ 25 Angström, Ausschlussgröße kleiner 12000-14000 MWCO; Serva), chromatographische Verfahren (*His<sub>6</sub>-tagged purification*, Qiagen; Sephadex® G-25M Amersham) und die Lyophilisation. Präparative Isolationen wurden mit Ausnahme der Lyophilisation stets bei einer Temperatur von 4°C unter Zugabe von PMSF ( $c_{\text{END}}=1$  mM) ausgeführt. Die Dialyse erfolgte in der Regel über Nacht. Bei der *salting out*-Methode wurde Ammoniumsulfat entsprechend des Nomogramms unter ständigem Rühren der Proteinlösung hinzugefügt. Nach erreichter Sättigung (10-30 min) wurde die Probe bei 10000 x g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in TBS gelöst und der Überstand für eine erneute Fällung weiterer Proteine verwendet. Die übrigen Methoden wurden entsprechend den Angaben der Hersteller durchgeführt (Amicon, Amersham).

Mediumproteinpuffer: 8 M Harnstoff; 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01 M Tris/ HCl, pH 8,0  
1x TBS: 2 M Tris, pH 7,5; 4 M NaCl

#### 2.4.4 Analyse von Proteinextrakten

##### 2.4.4.1 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

##### 2.4.4.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen erfolgte in Acrylamidgelen (mit unterschiedlichem Vernetzungsgrad je nach Größe des zu untersuchenden Proteins) nach dem

Prinzip von Lämmli [312]. SDS im Probenpuffer sowie im Gel bewirken eine negative Gesamtladung des SDS-Proteinkomplexes und eine Denaturierung der Proteine unter Aufhebung der elektrostatischen Kräfte. Zusätzlich wurden dem Probenpuffer noch reduzierende Agenzien wie  $\beta$ -Mercaptoethanol oder DTT hinzugefügt, die alle kovalent geknüpften Bindungen wie Disulfidbrücken lösen. Gele dieser Art wurden zum einen in der Hoefer Kammer (Hoefer Mighty Small Vertical Electrophoresis Unit SE260) und zum anderen in der Mini-PROTEAN® 3 Cell der Firma Bio-Rad (je 25 mA/Gel) gefahren. Als Marker wurden der Prestained Protein Molecular Weight Marker (#SM0441) und die Page Ruler™ Pre- und Unstained Protein Ladder (#SM0671, #SM0661) der Firma Fermentas verwendet.

5x Probenpuffer:	250 mM Tris, pH 6,8; 10 % SDS; 50 % Glycerol; 0,5 % Bromphenolblau; 2 % $\beta$ -Mercaptoethanol
Acrylamid Stocklösung:	Gel 30 (Roth)
Sammelgel:	4 % PAA; 0,5 M Tris, pH 6,8; 0,1 % (w/v) SDS
Trenngele:	7,5-15 % PAA; 1,5 M Tris, pH 7,5; 0,1 % (w/v) SDS
Laufpuffer:	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

#### 2.4.4.1.2 Isoelektrische Fokussierung und 2-Dimensionale Elektrophorese (2D)

Proteomische Analysen von *Microcystis*-Extrakten wurden in Kooperation mit Dr. Martin Hagemann und Dr. Sabine Fulda durchgeführt. Hierbei wurden 400  $\mu$ g lyophilisierte, cytosolische Proteinextrakte nach der in Fulda *et al.* [305, 313] beschriebenen Methode in einem linearen pI-Bereich von 4 bis 7 und in einem Größenbereich von 10 bis etwa 120 kDa getrennt.

Zur Identifizierung MC-bindender Proteine wurden ebenfalls 2D-Gele angefertigt. Hierbei wurde 100  $\mu$ g Wt-Extrakt (PCC 7806) in IPG-Strips (pH 4-7, L; 13 cm; Amersham) in einer gekühlten (15°C) IEF-Apparatur der Firma Amersham (Multiphor™II Electrophoresis Unit) entsprechend den Anweisungen des Herstellers aufgetrennt (Tab. 3). Nach Denaturierung und Alkylierung der Proteine wie in Fulda *et al.* [305, 313] lief die zweite Dimension bei konstantem Strom (30 mA/Gel) für etwa 3-4 h in einem vertikalen, gekühlten (15°C) Kammersystem (Protean II xi; Bio-Rad).

Tab. 3: Fokussierprogramm

Fokussierabfolge	P in W	U in V	I in mA	t in h
Einlaufen der Proben	300	150	150	0,5
	300	500	150	6
Fokussierung	300	1500	150	2
	300	3500	41	12

#### 2.4.4.1.3 Blue Native-PAGE (BN-PAGE)

Die BN-PAGE von cytosolischen *Microcystis*-Proteinextrakten wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Ulf Dühring durchgeführt. Analog des Protokolls in Dühring *et al.* [314] wurden 500  $\mu$ g cytosolische, vorher über Säulen (VIVASPIN 500; 5000 MWCO; VIVASCIENCE) in ACA-Puffer umgepufferte und mit 10  $\mu$ l Coomassie Blue-Lösung (5% w/v; Serva) versetzte Extrakte von PCC 7806/ Wt und PCC 7806/  $\Delta$ mcyB-Mutante aufgetrennt. Sowohl das Equipment zum Gießen der Gele der ersten (4-16 % Gradientengele) und der zweiten Dimension (8 % SDS-PAA-Sammelgel; 15 % SDS-PAA-Trenngel) als auch das Kammersystem (Protean II xi) stammen von der Firma Bio-Rad. Für die zweite Dimension mussten die Gelstreifen vorher für 30 min bei 37°C in einer 2 % SDS/ 1 % DTT-Lösung denaturiert werden. Die Gele der ersten sowie auch der zweiten Dimension wurden auf eine PVDF-

Membran (Roth) geblottet. Vor der Immunodetektion wurden die Membranen entfärbt (80 % Methanol/ 20 % *Aqua bidest.*).

ACA-Puffer: 50 mM Bis-Tris/ HCl, pH 7,0; 750 mM  $\epsilon$ -amino-*n*-Capronsäure; 0,5 mM EDTA

#### 2.4.4.1.4 Färbung, Fixierung von Proteingelen

Zur Entfernung von SDS wurden die Gele mehrmals mit *Aqua monodest.* gespült. Kleine Proteingele wurden mit einer kolloidalen Coomassielösung (Roth) angefärbt. Dabei erfolgte Fixierung, Färbung und Entfärbung entsprechend den Herstellerangaben (Roth). Bei gering konzentrierten Proteinlösungen wurde eine Silberfärbung nach Blum *et al.* durchgeführt [315]. Für die Dokumentation wurden die Gele eingescannt und anschließend für 2 h bei 70°C unter Vakuum getrocknet (Gel Dryer Model, Bio-Rad). Die 2D-Gele wurden entsprechend dem Protokoll in Fulda *et al.* [305, 313] fixiert, angefärbt, entfärbt, dokumentiert und gelagert.

#### 2.4.4.1.5 Auswertung von 2D-Gelen

Für die Auswertung der 2D-Gele standen zwei verschiedene Software-Packete zur Auswahl: Delta2D Version 3.4 (Decodon) und MELANIE 3 (Geneva Bioinformatics SA). In beiden Programmen werden zuerst die Einzelgele den Vergleichsgruppen zugeordnet.

Bei der MELANIE-Software werden dann minimale und maximale Spotgröße sowie die Sensitivität mit der ein Spot detektiert wird, festgelegt. Darüber wird bestimmt, wie viele Spots registriert werden. Die Gele werden dann anhand markierter Spots, die in jedem Gel identisch sind, übereinander gelegt und fusioniert. Dieses gelang MELANIE in Abhängigkeit von der Gleichheit bzw. Ungleichheit der Gele und der Menge an zu vergleichenden Gelen nicht immer. Über drei statistische Tests (Student t-test, Wilcoxon-Test, Kolmogorov-Test) wurden die signifikanten Spots abgesichert.

Bei der Delta-2D-Software (mit freundlicher Unterstützung durch Tanja Kaan, Decodon) wurde zuerst eine Fusion aus allen Gelen erstellt. Spots gleicher Identität verschiedener Gele wurden über Vektoren verbunden (*warping*). Gelindifferenzen konnten so mittels des Programms ausgeglichen werden. Dabei wurden zuerst die Gele innerhalb einer Gruppe und dann zwischen den Gruppen aufeinander abgestimmt. Auf dem Fusionsbild wurden dann die Spots unter vorheriger Festlegung von minimaler und maximaler Spotgröße sowie der Sensitivität detektiert. Die Parameter wurden so gewählt, dass die Zahl der detektierten Spots relativ gut mit dem visuellen Eindruck des menschlichen Auges übereinstimmte. Im Anschluss daran wurden die Spots auf alle Gele reprojiziert. Bei der Auswertung der Gele wird jeweils die Intensität eines einzelnen Spots im Verhältnis zur Intensität aller Spots des Gels relativiert. Jeweils die Mediane (berechnet aus den relativen Spotintensitäten innerhalb einer Gruppe) wurden für die Regressionsanalyse verwendet. Statistisch abgesichert wurden die Daten durch einen t-Test. Kandidaten, wie die in einem Schmier auftretenden Phycobilliproteine, wurden aus der Kalkulation ausgeschlossen. Jeder ermittelte, differentielle Spot wurde nochmals per Auge verifiziert.

#### 2.4.4.2 *Identifizierung von Proteinspots bzw. -banden*

Die Identifizierung der Proteine wurde in Kooperation mit Dr. Stefan Mikkat (Universität Rostock/ Proteomikzentrum) durchgeführt. Unter sterilen Bedingungen wurden die betreffenden Spots mit

einem Skalpell ausgeschnitten bzw. mit einer Pipettenspitze gepickt, in ~20 µl Wasser aufgenommen und in spezielle Eppendorf Gefäße (Protein LoBind Tubes, Eppendorf) überführt. Die Vorbereitung der Gelstücke und die Peptidfragmentierung erfolgte entsprechend den Angaben in Fulda *et al.* [316]. Die Proben wurden anschließend auf einen 384/ 600 µm AnchorChip™ (Bruker Daltonik) appliziert und in einem Reflex III Massenspektrometer (Bruker Daltonik) nach der in Fulda *et al.* [316] beschriebenen Methode (MALDI-TOF) analysiert. Experimentell ermittelte Massenspektren wurden auch mit den theoretischen Massenspektren der Proteine aus dem vorläufigen *Microcystis* PCC 7806-Genomsequenzierungsprojekts (Pasteur Institut, Frankreich) verglichen. Gesicherte Identifizierungen lagen vor, wenn erstens der Score größer gleich des *identification threshold* von 50 war (Optimum >100), zweitens mindestens vier Peptidfragmente übereinstimmten und drittens die Sequenzabdeckung größer gleich 19 % (Optimum >25 %) war. Nicht-Abgesicherte Werte sowie Spots, in denen mehrere Proteine detektiert werden konnten, wurden ausgeschlossen. Für die Identifizierung von MrpC wurde das Protein zusätzlich mit der Endoprotease Asp-N (5 ng/µl in 3 mM Tris/ HCl, pH 8,5; Roche) für 5-8 h bei 37°C verdaut. Die Proben wurden über die MALDI-PSD-TOF-Methode (Bruker Daltonik) analysiert. Frühere 2D-Studien wurden in Kooperation mit Dr. Julia Kehr (MPI für Pflanzenphysiologie, Golm) durchgeführt. Dabei wurden die trypsinisierten Proben mittels Q-TOF analysiert [317]. Zum damaligen Zeitpunkt (2002) stand zum Sequenzabgleich nur die Cyanobase (<http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>) zur Verfügung.

#### 2.4.4.3 Nachweis spezifischer Proteine

##### 2.4.4.3.1 Herstellung von Antikörpern (AK)

Zur Herstellung eines polyklonalen AK gegen MrpC wurde das Protein mittels der *salting out*-Methode (2.4.3) aus dem Medium der  $\Delta mcyB$ -Mutante extrahiert. Dabei fiel das Protein bei einer gesättigten 10 % Ammoniumsulfatkonzentration aus. Die Immunisierung von zwei Meerschweinern (Applikationsmenge je 200 µg) erfolgte durch die Firma Pineda (<http://www.pineda-abservice.de/>). Die in Immunoblots eingesetzten Antiseren stammen vom 61. Immunisierungstag.

##### 2.4.4.3.2 Western Blot Analyse und Ponceaufärbung

Proteinmuster, aufgetrennt in PAA-Gelen, wurden in einer so genannten Nassblotapparatur der Firmen Bio-Rad (Mini Trans-Blot Cell und 16 cm x 20 cm Trans-Blot Cell) bzw. Hoefer (Hoefer™ TE 22 tank transfer unit) auf eine Nitrocellulose- bzw. PVDF-Membran Hybond™-C Extra, Hybond™ ECL™ oder Hybond™-P der Firma Amersham transferiert. Aktivierung, Äquilibrierung, Blot und Blocken der jeweiligen Membranen erfolgte nach Herstellerangaben (Amersham, Bio-Rad und Hoefer). Um die Qualität des Transfers und die Gleichheit der aufgetragenen Proteinmengen zu überprüfen, wurde vor dem Blocken der Nitrocellulosemembranen eine Ponceau S-Färbung [311] durchgeführt. Die eigentliche Detektion mittels spezifischem AK (Tab. 4) ist in zahlreichen Optimierungsversuchen auf den SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate Kit der Firma Pierce (Peroxidase Assay) bzw. auf das AlkPhos System [311] (Alkalischer Phosphatase Assay) angepasst. Dabei wurde der erste AK in der Regel über Nacht bei 4°C oder für 2 h bei RT und der zweite für 1h bei RT in PBS-Tween inkubiert. Die Waschungen richteten sich nach den Angaben des Membranherstellers

(Amersham). Nach Strippen mit dem Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Pierce) konnte die Membran für weitere Immunreaktionen verwendet werden.

Blotpuffer (Glycin-System): 25 mM Tris, 192 mM Glycin; (20 % (v/v) Methanol); 0,1 % (w/v) SDS  
 Blocking Lösung: 5 % Milchpulver in 1x PBS-Tween  
 1x PBS-Tween: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4; 0,01 % Tween 20  
 AlkPhos-Puffer: 100 mM Tris/ HCl, pH9,5; 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 AlkPhos-Substratlösung: 0,033 % (w/v) NBT; 0,0165 % (w/v) BCIP in AP-Puffer

Tab. 4: Liste der benutzten Antisera

AK	Antigen	AK-Klasse	Herkunft	Titer		Referenz
				AlkPhosSystem	PeroxSystem	
Anti-ATP	ATP aus <i>Synechocystis</i> PCC 6803	polyklonal	Mouse-IgG		1: 10000	[318]
Anti-CP12	CP12 aus <i>Synechococcus</i> PCC 7942	polyklonal	Mouse-IgG		1:3000-5000	[319]
Anti-FBP	FBP aus <i>Synechococcus</i> PCC 7942	polyklonal	Mouse-IgG		1: 3000	[320]
Anti-FtsZ	FtsZ aus <i>Anabaena</i>	polyklonal	Rabbit-IgG		1:10000	[321]
Anti-GAPDH	GAPDH aus <i>Synechococcus</i> PCC 7942	polyklonal	Mouse-IgG		1:3000	[319]
Anti-GlcNAc	N-Acetylglucosamine (O-linked)(RL2) aus der Lamina Fraktion der Kernhülle von Rattenleber	monoklonal	Mouse-IgG1		1:5000-1000	Alexis
Anti-His	<i>polyHistidine</i>	monoklonal	Mouse-IgG2A	1:3000	1:10000	Sigma
Anti-MC-LR	MC aus <i>Microcystis</i>	monoklonal	Mouse-IgG1		1:10000	Alexis
Anti-MrpC	MrpC aus <i>Microcystis</i> PCC 7806	polyklonal	Guinea pig-IgG	1:8000	1:5000-8000	diese Studie
Anti-Mvn	Mvn aus <i>Microcystis</i> PCC 7806	polyklonal	Rabbit-IgG	1:5000-8000		[282]
Anti-RbcL	Große UE der RubisCO aus <i>cucumber</i>	polyklonal	Rabbit-IgG	1:10000	1:20000	M. Gründel
Anti-goat conjugated with AlkPhos	IgGs aus <i>goat</i>	2. AK	Rabbit-IgG	1:10000-30000		Sigma
Anti-guinea pig conjugated with Perox	IgGs aus <i>guinea pig</i>	2. AK	Goat-IgG		1:10000	Sigma
Anti-guinea pig labeled with FITC	IgGs aus <i>guinea pig</i>	2. AK	Goat-IgG	(siehe 2.4.7)		Sigma
Anti-mouse conjugated with AlkPhos	IgGs aus <i>mouse</i>	2. AK	Goat-IgG	1:10000-30000		Sigma
Anti-mouse conjugated with horseradish Perox	IgGs aus <i>mouse</i>	2. AK	Sheep-IgG		1:50000	Amer-sham
Anti-rabbit conjugated with AlkPhos	IgGs aus <i>rabbit</i>	2. AK	Goat-IgG	1:10000-30000		Sigma
Anti-rabbit conjugated with Perox	IgGs aus <i>rabbit</i>	2. AK	Goat-IgG		1:50000	Sigma

#### 2.4.4.3.3 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation potentiell MC-bindender Proteine wurde der gegen MC gerichtete AK eingesetzt (Tab. 4). Kopplungsträger des Antigen-AK-Komplexes ist ProteinG-Sepharose (Amersham). Die Vorbehandlung der Sepharose und die Immunpräzipitation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Amersham; <http://www-biology.ucsd.edu/labs/aroian/protocols/IP.html>), wobei ein *preclearing* Schritt ausgelassen wurde. Es wurde 15 µg Proteinextrakt, aus cytosolischer und

Membranfraktion stammend, von PCC 7806/ Wt sowie 2,5 µg AK eingesetzt. Als Negativ-Kontrollen dienten Extrakte der PCC 7806/  $\Delta mcyB$ -Mutante und von *Synechocystis* PCC 6803. Im 0,1 x 16 x 16 cm<sup>3</sup> Gel (4 % PAA-Sammelgel, 15 % PAA-Trenngel) wurden jeweils mit und ohne AK inkubierte Präzipitate analysiert. Des Weiteren wurde der AK als Negativkontrolle aufgetragen. Banden, die nur im Wt-Extrakt mit AK auftraten, wurden ausgeschnitten und von Dr. Mikkat analysiert (2.4.4.2).

Extraktionspuffer: 500 mM Tris, pH 7,5; 50 mM EDTA; 0,1 mM PMSF

#### 2.4.4.3.4 AK-gekoppelte Bindungsanalyse

Für die Analyse MC-bindender Proteine wurde der gegen MC gerichtete AK (150 µg) (Tab. 4) an die Affi-Gel® 15-Matrix (Bio-Rad) entsprechend den Herstellerangaben (Bio-Rad) gekoppelt. Vorher für 3 h mit und ohne MC-LR ( $C_{\text{END}}=1$  mg/L) inkubierte, cytosolische Proteinextrakte (300 µg) von PCC 7806/ Wt und PCC 7806/  $\Delta mcyB$ -Mutante wurden zur Abtrennung von ungebundenem MC über eine PD10-Säule (Amersham) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt. Diese Proteinextrakte wurden dann über die AK-gekoppelte Säule gegeben. Nach im Protokoll vorgegebenen Waschungen (Bio-Rad) konnten die potentiell MC-bindenden Proteine eluiert werden. Die Proben wurden laut Vorschrift sofort mit 1/6 Volumen an 1,5 M Tris, pH 7,5 neutralisiert. Anschließend wurden sie über eine SDS-PAGE (4 % PAA-Sammelgel, 15 % PAA-Trenngel; 2.4.4.1.1) analysiert. Differentielle Banden wurden ausgeschnitten und von Dr. Mikkat analysiert (2.4.4.2).

Kopplungspuffer (PBS): 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4  
Probenpuffer: 500 mM Tris, pH 7,5; 50 mM EDTA; 0,1 mM PMSF  
Elutionspuffer: 0,1 M Glycin/ HCl, pH 2,5

#### 2.4.4.3.5 Nachweis von glycosylierten Proteinen

Glycoproteine, immobilisiert auf Nitrocellulosemembranen, wurden nach Methode B des Protokolls des DIG Glycan Detection Kit (Roche) detektiert. Als Positivkontrolle diente Transferrin.

#### 2.4.5 *Rekombinante Proteinexpression in E.coli*

Es wurden folgende aus *Microcystis*-stammende Proteine in *E.coli* exprimiert: MrpC, IPF 604.1 und RbcL. Die Genabschnitte, kodierend für MrpC, IPF 604.1 und RbcL, wurden nach Vermehrung im pDrive in die *NdeI* und *BamHI* Restriktionsschnittstellen des pET15b-Vektors (Novagen) inseriert. Dabei wurde bei der Amplifizierung dieser Gene aus *Microcystis* Primer verwendet, die ihrerseits neben der spezifischen Gensequenz noch die Restriktionssequenz von *NdeI* (fw-Primer) und *BamHI* (rv-Primer) besaßen (Tab. 1). Außerdem musste bei der Ableitung der Primer beachtet werden, dass das Startcodon und das Stopcodon des Genes weggelassen wird, weil erstens ermöglicht werden sollte, dass ein so genannter His\*tag®, integriert im pET-System und nützlich zur späteren Aufreinigung des Proteins, am N-Terminus des Proteins angehängen wird und zweitens die im pET-System integrierte Promotor- und Operatorregion vorgeschaltet wird, so dass eine Regulation der Genexpression möglich ist [301]. Klonierung und Proteinexpression erfolgte nach den Instruktionen des pET-Manuals (<http://www.merckbiosciences.co.uk/docs/docs/PROT/TB055.pdf>). Die so synthetisierten His<sub>6</sub>-markierten Proteine wurden über eine Nickel-Matrix der Firma Qiagen nach deren

Protokoll (QIAexpressionist™) isoliert und aufgereinigt. RbcL konnte in der löslichen Fraktion detektiert werden und somit nativ isoliert und aufgereinigt werden (Protokoll 9 und 12, QIAexpressionist™). Dagegen waren MrpC und IPF 604.1 zum größten Teil in der unlöslichen Fraktion und eine denaturierende sowie native Isolation und Aufreinigung wurden angeschlossen (Protokoll 9/10 und 12/17, QIAexpressionist™). Eine über Nacht andauernde Dialyse unter Zugabe von Glutathion (2 mM GSH; 0,2 mM GSSG) und PMSF ( $c_{\text{END}}=1$  mM) sollte eine Refaltung der Proteine ermöglichen. Zur Entfernung der Imidazol-Ionen wurden die Proben ebenfalls über Nacht im Puffer ohne Imidazol dialysiert (4°C). Anschließend wurden die Dialysate im SDS-Gel überprüft.

Renaturierungspuffer (604 <sub>denaturierend</sub> ):	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM Tris
Dialysepuffer (AtpD, Prk, 604 <sub>nativ</sub> ):	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8,0; 300 mM NaCl
Dialysepuffer (RbcL):	50 mM Hepes, pH 8,0; 40 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 20 mM MgCl <sub>2</sub>

#### 2.4.6 MC-Bindungsassays

Sowohl rekombinante, in *E.coli* exprimierte Proteine (RbcL, AtpD, Prk und IPF 604.1) als auch cytosolische Extrakte (100-200 µg) von *Microcystis* PCC 7806/ Wt, PCC 7806/  $\Delta mcyB$ , NIES 98 sowie *Synechocystis* PCC 6803 wurden mit MC (0, 1000, 10000 µg/L) bei 30°C für 1 h inkubiert. Dabei wurde vor Zugabe des MC eine Aktivierung der RubisCO in Aktivierungspuffer durchgeführt (30 min, 30°C). Nach Inkubation mit DTT (5 mM) wurden die denaturierten Proben im SDS-Gel separiert. In anschließenden Immunoblots mit einem spezifischen AK (Anti-RbcL, Anti-Atp, Anti-His für Prk und IPF 604.1) und einem AK gegen MC-LR (Alexis) wurden die Interaktionen zwischen dem betreffenden Protein und MC analysiert.

Bindungspuffer (RbcL, cytosolische Extrakte):	50 mM Hepes, pH 8,0; 40 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 20 mM MgCl <sub>2</sub>
Bindungspuffer (604, Prk, AtpD):	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8,0; 300 mM NaCl

#### 2.4.7 In situ-Funktionsanalyse von MrpC

Zellinteraktionsanalysen wurden mit PCC 7806 (Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante) und zwei koloniebildenden *Microcystis*-Stämmen (4C4 und 9E4) durchgeführt. Dabei wurde MrpC (natives MrpC; rekombinantes MrpC) den Kulturen in einer Konzentration von 10 µg/ml zugegeben. Ebenso wurde der gegen MrpC gerichtete AK in einer Konzentration von 5 µg/ml, eingesetzt. Kolonie- bzw. Aggregationsveränderungen wurden unter der Stereolupe (Stemi SV6, Zeiss) und dem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss) verfolgt und zu bestimmten Zeitpunkten (-2 min, 0 min, 2 min, 10 min, 30 min, 1 h) dokumentiert (Kamera ProgRes C12).

Für *in situ*-Lokalisationsstudien von MrpC wurden Zellen von *Microcystis* PCC 7806/ Wt, PCC 7806/  $\Delta mcyB$ , NIES 100 und *Synechocystis* PCC 6803 mit PBS-Puffer gewaschen. Danach erfolgte eine Fixierung in Formaldehyd (1 h, auf Eis). Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in GTE-Puffer resuspendiert und auf Objektträgern (vorher mit Poly-L-Lysine beschichtet) pipettiert. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger zuerst für 5 min in Methanol (bei -20°C) und dann für 30 sec in Aceton (bei -20°C) fixiert. Potentielle AK-Bindungsstellen wurden anschließend mit BSA blockiert (1h, RT). Danach wurden die Zellen in der ersten AK-Lösung (Anti-MrpC; 1:500) inkubiert (1h, RT). Nach zweimaligen Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe des zweiten FITC-markierten AK (Anti-*guinea pig* IgG; 1:100) (1h, RT). Am Ende wurden die Präparate in einer Propylgallat-haltigen Lösung

konserviert. Die Analyse erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Delta Vision spectris system; Applied Precision) mit Hilfe des softWorx-Softwarepackets. Zwei verschiedene Anregungs-/ Emissions-Filtersätze wurden hierbei verwendet: Der erste Filter (555 nm/ 617 nm) wurde zur Visualisierung der rötlichen Autofluoreszenz der Cyanobakterien und der zweite Filter (490 nm/ 528 nm) zur Visualisierung der grünen „FITC-Signale“ gewählt.

PBS-Puffer:	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
Fixierlösung:	3,7 % (v/v) Formaldehyd in PBS
GTE-Puffer:	50 mM Glucose; 20 mM Tris/ HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA, pH 8,0
Blocking-Lösung:	2 % BSA (w/v) in PBS
AK-Lösungen:	AK in PBS mit 2 % BSA (w/v)
Konservierungslösung:	4 % (v/v) n-Propylgallat in 87 % (v/v) Glycerol

## 2.5 MC-Quantifizierung mittels HPLC

Zur Quantifizierung von MC in zellulären Extrakten wurden das Peptid nach dem von Keishi Ishida beschriebenen Protokoll isoliert [322]. Anschließend wurden die Peptidextrakte in einem Methanol/ Wasser-Gemisch (2+8) gelöst, gefiltert (Acrodisc® 4 mm Syringe Filter; Ø 0,45 µm Nylon Membrane, PALL) und per HPLC (SHIMADZU, CLASS-VP) mit einem Fluss von 1 ml/ min über eine analytische RP<sub>18</sub>-Säule der Firma Waters (SymmetryShield™RP<sub>18</sub> 3.5 µm; 4.6 x 100 mm Column; P/N: 186000179), wobei eine Vorsäule (SymmetryShield™RP<sub>18</sub>3.5µm; P/N: 186000701) zwischengeschaltet wurde, nach dem in Tab. 5 aufgeführtem Protokoll analysiert. Eine Quantifizierung konnte mit Hilfe eines MC-LR Standards, freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Dr. Rainer Kurmayer, durchgeführt werden.

Zur Extraktion des extrazellulären MC wurde je 25 ml Medium filtriert (FP 30/ 0,45 CA-S, Schleicher & Schuell) und anschließend über Sep-Pak® Plus C18-Kartuschen (Waters) gegeben. Dies erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Anschließend wurden die Peptidextrakte analog zu oben per HPLC analysiert und quantifiziert.

HPLC-Module der Shimadzu-Anlage:	SYSTEM CONTROLLER SCL-10A SOLVENT DELIVERY MODULE LC-10AD, FCV-10AL DEGASSER DGU-14A AUTO INJECTOR SIL-10AD UV/VIS PHOTODIODE ARRAY DETECTOR SPD-M10A FRACTION COLLECTOR MODULE FRC-10A
Computersoftware zur Shimadzu-Anlage:	CLASS-VP

Tab. 5: HPLC-Laufprotokoll zur Analyse von zellulären und extrazellulären Peptidextrakten

Vorgang	Elutionsart	Verlauf in min	Eluentenverhältniss in %	
			A: Aqua bidest./ 0,05% TFA <sub>HPLCgrade</sub>	B: Acetonitril <sub>HPLCgrade</sub> / 0,05% TFA <sub>HPLCgrade</sub>
Vorspülen der Nadel	isokratisch	0,01	80	20
Injektion über 50µl Dosierschleife	isokratisch	1	80	20
Auftrennung der zu untersuchenden Peptide	Gradient	21	40	60
Elution unerwünschter Substanzen, Reinigen	Gradient	22	0	100
	Gradient	25	80	20
Äquilibrierung der Säule	isokratisch	30	80	20

## 2.6 Material

Die verwendeten Radiochemikalien wurden durch die Firma Amersham Buchler bereitgestellt. Die übrigen Chemikalien wurden von den Firmen Roth, ICN Biochemicals, Serva und Sigma bezogen (Tab. 6). Reinstwasser wurde durch eine Millipore Anlage der Firma USF gewonnen. Sowohl dNTPs als auch NTPs wurden von der Firma Fermentas verwendet. Die durch die Firmen Sigma sowie Eurogentec synthetisierten Oligonukleotide sind in der Tab. 1 aufgeführt. Alle anderen verwendeten Materialien werden in den jeweiligen Kapiteln beschrieben.

**Tab. 6: Liste der verwendeten Produktlieferanten mit jeweiligem Firmensitz**

<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Ambion, Inc.	Austin, USA
Amersham Biosciences Europe GmbH	Freiburg, Deutschland
Amersham Buchler GmbH & Co. KG	Braunschweig, Deutschland
Applied Biosystems	Weiterstadt, Deutschland
Applied Precision	Issaquah, USA
Biolabs	Frankfurt am Main, Deutschland
Bio-Rad Laboratories	Richmond, VA, USA
Biozym Diagnostik GmbH	Hameln, Deutschland
Boehringer GmbH	Mannheim, Deutschland
Bruker Daltonik	Bremen, Deutschland
C. Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Difco	Detroit, USA
DuPont de Nemours GmbH	Bad Homburg, Deutschland
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eurogentech	Seraing, Belgien
Fluka-Biochemika	Steinheim, Deutschland
Gibco/ BRL Life Technologies	New York, USA
Heraeus	Hanau, Deutschland
ICN Biochemicals/ MP Biomedicals	Irvine, USA
Invitrogen	Groningen, Niederlande
Invitrogen GmbH	Karlsruhe, Deutschland
MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Millipore Cooperation	Bedford, USA
Novagen	Nottingham, UK
PerkinElmer Instruments	Shelton, USA
Philipps Instruments	Niederlande
Promega Cooperation	Madison, USA
Qiagen	Hilden, Deutschland
Rank Brothers Ltd.	Bottisham, GB
Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
Schleicher & Schüll	Dassel, Deutschland
Serva Feinbiochemika & Co. KG	Heidelberg, Deutschland
Shimadzu	Kyoto, Japan
Sigma Chemical Company	St. Luis, USA
Stratagene	Amsterdam, Niederlande
USF, Seral Reinstwassersysteme GmbH	Deutschland
Visking	London, UK
Waters	Eschborn, Deutschland
Whatman Paper Ltd.	Maidstone, Großbritannien
Zeiss	Jena, Deutschland

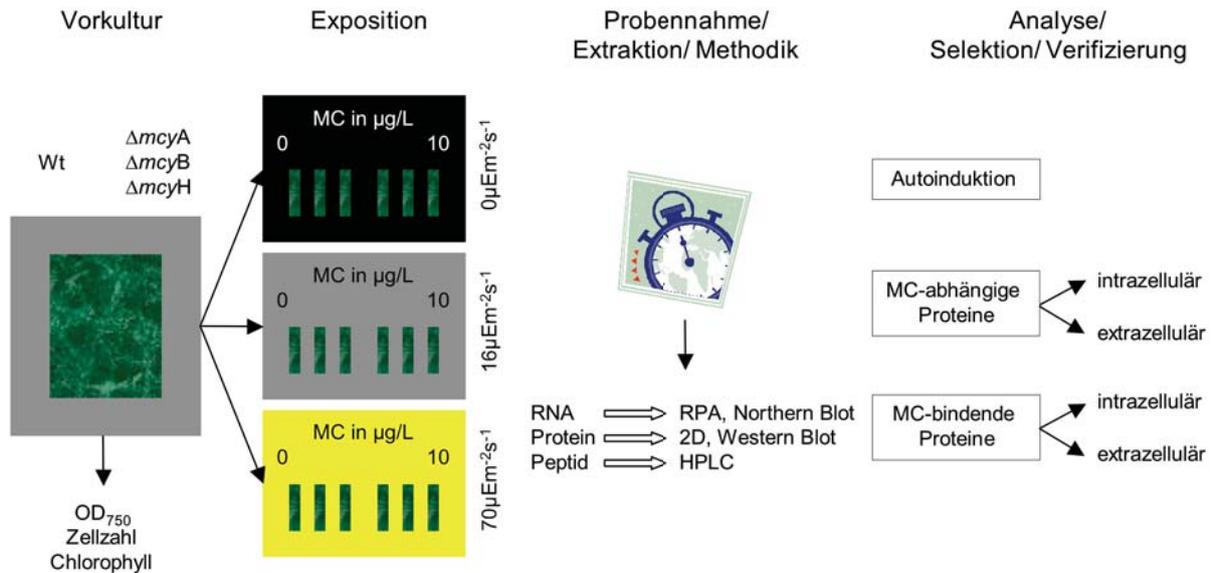
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die Funktionsanalyse von Microcystin in *M. aeruginosa* PCC 7806

Zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung von MC für die produzierende Art konzentrierte sich diese Arbeit auf die Gattung *Microcystis*. Eine klassische Funktionsanalyse ist die Inaktivierung des Gens über Insertion einer Resistenzkassette. Auf diesem Wege wurden *Knockouts* mehrerer MC-Biosynthesegene ( $\Delta mcyA$  [98],  $\Delta mcyB$  [299] und  $\Delta mcyH$  [107]) in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 erfolgreich durchgeführt. Während die Transkription der Gene durch die Insertion unbeeinflusst blieb, konnten in den Zellextrakten aller Mutanten weder Proteine des Mcy-Multienzymkomplexes noch deren Syntheseprodukte (MC) nachgewiesen werden [98].

Unterschiede zwischen Wt und Mutanten wurden sowohl auf Transkriptebene als auch auf Protein- und Peptidebene untersucht. Zu diesem Zweck wurden beide Stämme unter gleichen Bedingungen angezogen und in Belichtungsexperimenten analysiert (Abb. 8). Um unmittelbare, aber nicht adaptionsbedingte Effekte festzuhalten, erfolgte die Probennahme in der Regel nach 2 h.

Für die Konzeption der Belichtungsexperimente können aus der themenrelevanten Literatur keine klaren Richtlinien abgeleitet werden. Aus der Vielzahl der die MC-Produktion beeinflussenden Faktoren (1.3.2.3) galt es, sich auf die Wesentlichen und Umsetzbaren zu konzentrieren. Signifikant und am besten reproduziert, ist die Abhängigkeit der MC-Produktion von der Wachstumsrate [323]. Dieser Einfluss variiert in Abhängigkeit von der Lichtintensität [112, 113, 137]. Daher wurden als variable Faktoren die Lichtintensität und die Zelldichte gewählt. Um die Versuchsanordnung klein zu halten und damit auch eine Gleichbehandlung zu gewährleisten, wurden maximal drei zu vergleichende Lichtintensitäten (0, 16, 50 oder  $70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) und maximal zwei Zelldichten ( $\text{OD}_{750}$  0,5 und 1,0) gewählt (Abb. 8). Ausgehend von der Annahme, dass es sich bei MC um ein interzelluläres Signalmolekül handeln könnte, wurde MC (dritte Variable) dem Medium hinzugefügt. Hierbei wurde sich an MC-Konzentrationen, wie sie unter physiologischen Bedingungen auftreten, orientiert (1-100  $\mu\text{g/L}$ ) [128, 324].



**Abb. 8: Experimentelles Design der Belichtungsexperimente mit *Microcystis* PCC 7806**

Vorkulturen von Wt,  $\Delta mcyA$ ,  $\Delta mcyB$  bzw.  $\Delta mcyH$ -Mutanten wurden unter Schwachlichtbedingungen ( $16 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) angezogen. Nach Erreichen einer bestimmten Zelldichte wurde die Vorkultur auf kleinere *batch*-Gefäße verteilt. Diese wurden dann unter dunklen ( $0 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), Schwachlicht- ( $16 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) und Starklichtbedingungen ( $70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) und unter externer MC-Addition (0, 1, 10, 100  $\mu\text{g/L}$ ) exponiert. Die Probennahme erfolgte in der Regel nach 2 h. Nach Extraktion von RNA, Protein und MC wurde diese in 2D, RPA, Northern, Western Blots bzw. per HPLC analysiert. Es wurden autoregulatorische Studien durchgeführt sowie intrazelluläre und extrazelluläre MC-abhängige und MC-bindende Proteine selektiert und verifiziert.

Zu den konstanten Variablen gehörten neben der Komposition des Mediums (N-, P-Gehalt, pH-Wert) auch die Temperatur und die Luftzufuhr.

Die Proben wurden mit Hilfe von molekularen Techniken analysiert (Abb. 8). Als erstes wurden in proteomischen Studien Kandidatenproteine ermittelt, die differentiell in Wt und MC-freien Mutanten bzw. in Abhängigkeit von extern zugesetztem MC exprimiert waren. Diese Effekte sollten als zweites unter Verwendung spezifischer AK für einzelne Kandidaten verifiziert werden. Ob eine Regulation bereits schon auf Transkriptebene stattfindet, sollte als drittes durch *Northern Blot*-Analysen herausgestellt werden. Im Anschluss daran sollte als viertes die direkte bzw. indirekte Interaktion einzelner Kandidaten mit dem MC auch *in vitro* gezeigt werden. Erste Autoregulationsstudien, wie sie auch für andere Signalmoleküle (4.2.1.1) beschrieben sind, wurden in dieser Arbeit begonnen – eine Reproduktion der Daten steht jedoch noch aus.

## 3.2 Proteomische Expressionsanalyse von PCC 7806/ Wt und $\Delta mcyB$ -Mutante

### 3.2.1 Experimenteller Ansatz und Durchführung

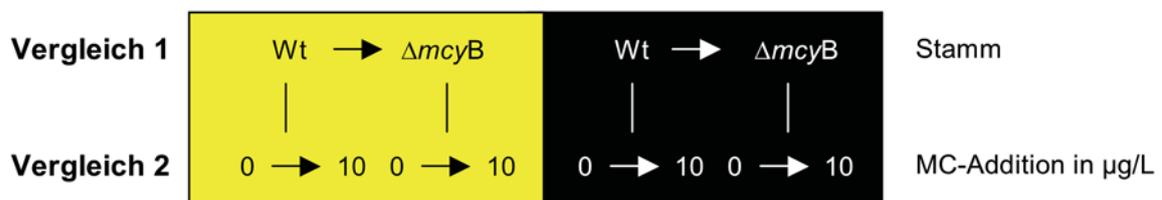
Insgesamt wurden drei proteomische Studien [303, 325] durchgeführt, wobei hier die Ergebnisse der letzten dargestellt werden. Im Belichtungsversuch wurden Kulturen von PCC 7806/ Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante mit einer  $OD_{750}$  von 1,0 unter Starklicht- ( $70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) und unter dunklen Bedingungen ( $0 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) exponiert. Einem Teil der Kulturen wurde MC-LR in einer Konzentration von  $10 \mu\text{g/L}$  zugegeben. Pro Bedingung existierten drei Replikate. Die Exposition endete nach 2 h. Nach Isolation der im Cytosol lokalisierten Proteine und Bestimmung der Proteinkonzentrationen [310] wurden die Quantität und Qualität der Extrakte via SDS-PAGE/ Coomassie-Färbung überprüft (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde jeweils  $200 \mu\text{g}$  Probe lyophilisiert. Die so konservierten Extrakte wurden nach der in Fulda *et al.* beschriebenen Methode aufgetrennt und gefärbt [316, 326]. Dabei wurden pro Bedingung je zwei bis drei Replika analysiert. Außerdem wurde jede Probe durch einen zweiten Lauf bestätigt (gilt insbesondere für alle Kontrollproben). Nach Computeranalysen der 2D-Gele mittels der MELANIE-Software und der Delta2D-Software, wobei insgesamt etwa 492 verschiedene Spots detektiert werden konnten, wurden stark abundante, differentiell sowie konstant (als Standard) in Wt und MC-freier Mutante exprimierte Spots (3.2.2) gepickt und per MALDI-TOF *peptide mass fingerprint* identifiziert. Von 129 gepickten Spots konnten 97 eindeutig identifiziert werden. Die übrigen Spots mussten aufgrund fehlender Spektren/ Hits, aufgrund nicht erfüllter Identitätskriterien (*score*, *coverage*, *match*) oder aufgrund von Verunreinigungen mit anderen Proteinen<sup>1</sup> bzw. Keratin aus der Analyse ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Die 97 identifizierten Proteine konnten 41 verschiedenen Enzymen zugewiesen werden (Anhang A). In Abb. 11 (nächstfolgendes Kapitel 3.2.2) sind diese Proteine den entsprechenden Spots im 2D-Gel zugeordnet. Qualität sowie Gelanomalitäten und Besonderheiten der aktuellen 2D-Studie werden in der Diskussion näher betrachtet.

---

<sup>1</sup> Die Proteinverunreinigung kann zum einen aufgrund von Sterilitätsproblemen (z.B. Kontamination mit voriger Probe) entstanden sein und zum anderen in der Abundanz einiger Proteine begründet sein. Stark abundante Proteine wie die Phycobiliproteine CpcA, CpcB und CpcL liefen im 2D-Gel oft als Schmier und überlagerten andere Proteine bzw. waren mit diesen assoziiert.

### 3.2.2 Selektion von MC-abhängigen Proteinen

Bei der Selektion von potentiellen MC-abhängigen Kandidaten wurden zwei Vergleichende Studien durchgeführt (Abb. 9). Zum einen wurde für jede Lichtbedingung die Wt-Gele mit den zugehörigen Mutanten-Gele verglichen (Abb. 9/ Vergleich 1), und zum anderen wurden für jede Lichtbedingung und jeden Stamm die Addition von MC (10 µg/L) entsprechenden Kontrollen (0 µg/L) gegenüber gestellt (Abb. 9/ Vergleich 2).

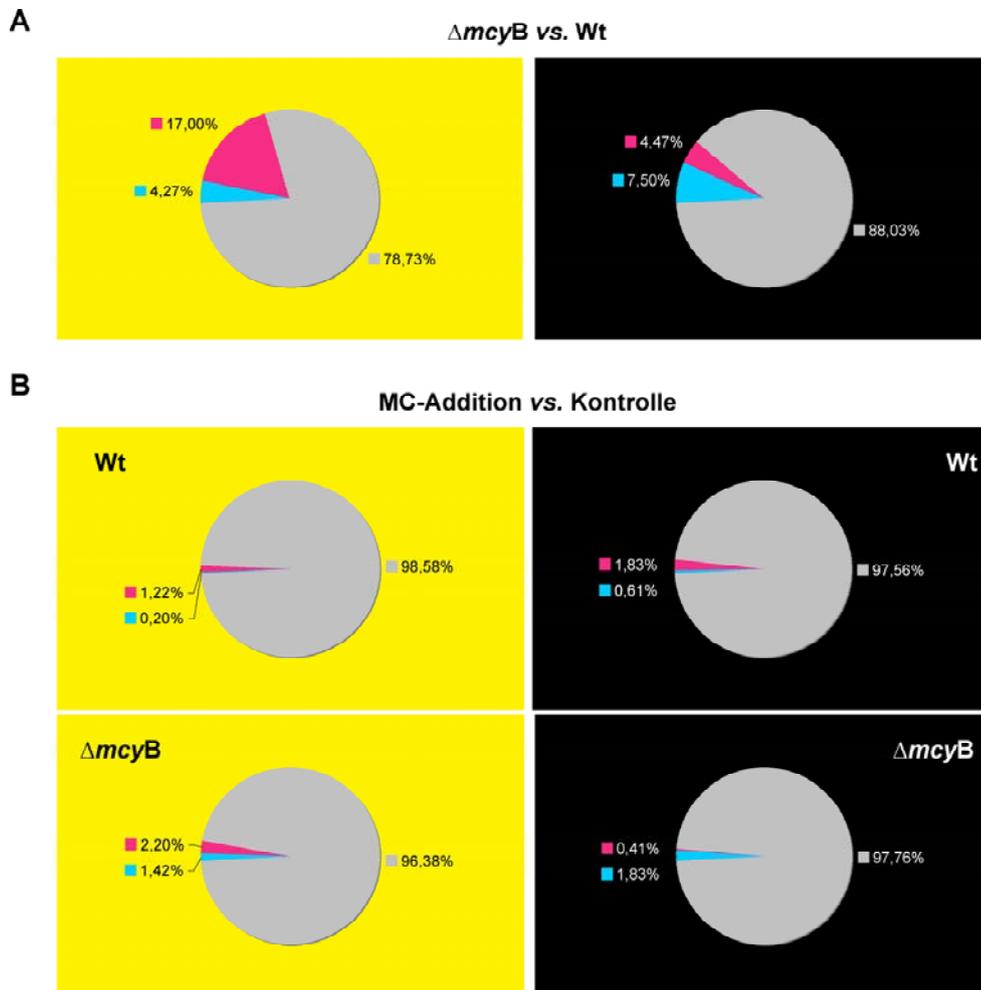


**Abb. 9: Vergleichsebenen des aktuellen *Microcystis*-Proteomprojekts**

Im ersten Vergleich wurde die Expression von PCC 7806/ Wt mit der MC-freien Mutante ( $\Delta mcyB$ ) unter Starklicht ( $70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , gelb) bzw. bei Dunkelheit ( $0 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , schwarz) verglichen. Dabei wurden alle Gele eines Stammes und einer Lichtbedingung (keine Unterscheidung zwischen MC-Addition und Kontrolle) gepoolt. Auf zweiter Ebene wurde der Effekt einer MC-Addition (verglichen mit einer Kontrolle) auf die intrazelluläre Proteinexpression von PCC 7806/ Wt und PCC 7806/  $\Delta mcyB$  unter Starklicht ( $70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , gelb) bzw. bei Dunkelheit ( $0 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , schwarz) untersucht.

Die Vergleichenden Analysen wurden mittels der Delta2D-Software und der Melanie-Software (2.4.4.1.5) durchgeführt. Selektierte Spots wurden anschließend auf ihre Distinktheit und Korrektheit<sup>2</sup> *per okulum* überprüft. Es ergab sich folgende prozentuale Verteilung: Von 492 detektierten Spots waren unter Starklichtbedingungen in der  $\Delta mcyB$ -Mutante (im Vergleich zum Wt) 4,27 % der Spots reprimiert und 17 % induziert, während es unter dunklen Bedingungen nur 7,5 % (Repressionen) bzw. 4,47 % (Induktionen) waren (Abb. 10/ A). Nach MC-Zugabe wurden unter Starklicht im Wt 0,2 % der Proteine bzw. Proteinvarianten reprimiert und 1,22 % induziert, während in der Mutante 1,42 % der Proteine reprimiert und 2,2% der Proteine induziert waren (Abb. 10/ B). Unter dunklen Bedingungen verringerte sich die Zahl der differentiellen Spots auf 0,61 % (Wt) bzw. 1,83 % ( $\Delta mcyB$ ) Repressionen und 1,83 % (Wt) bzw. 0,41 % ( $\Delta mcyB$ ) Induktionen. Bis auf wenige Ausnahmen waren alle im zweiten Vergleich (MC-Addition vs. Kontrolle) selektierten Spots auch differentiell in Wt und MC-freier Mutante exprimiert.

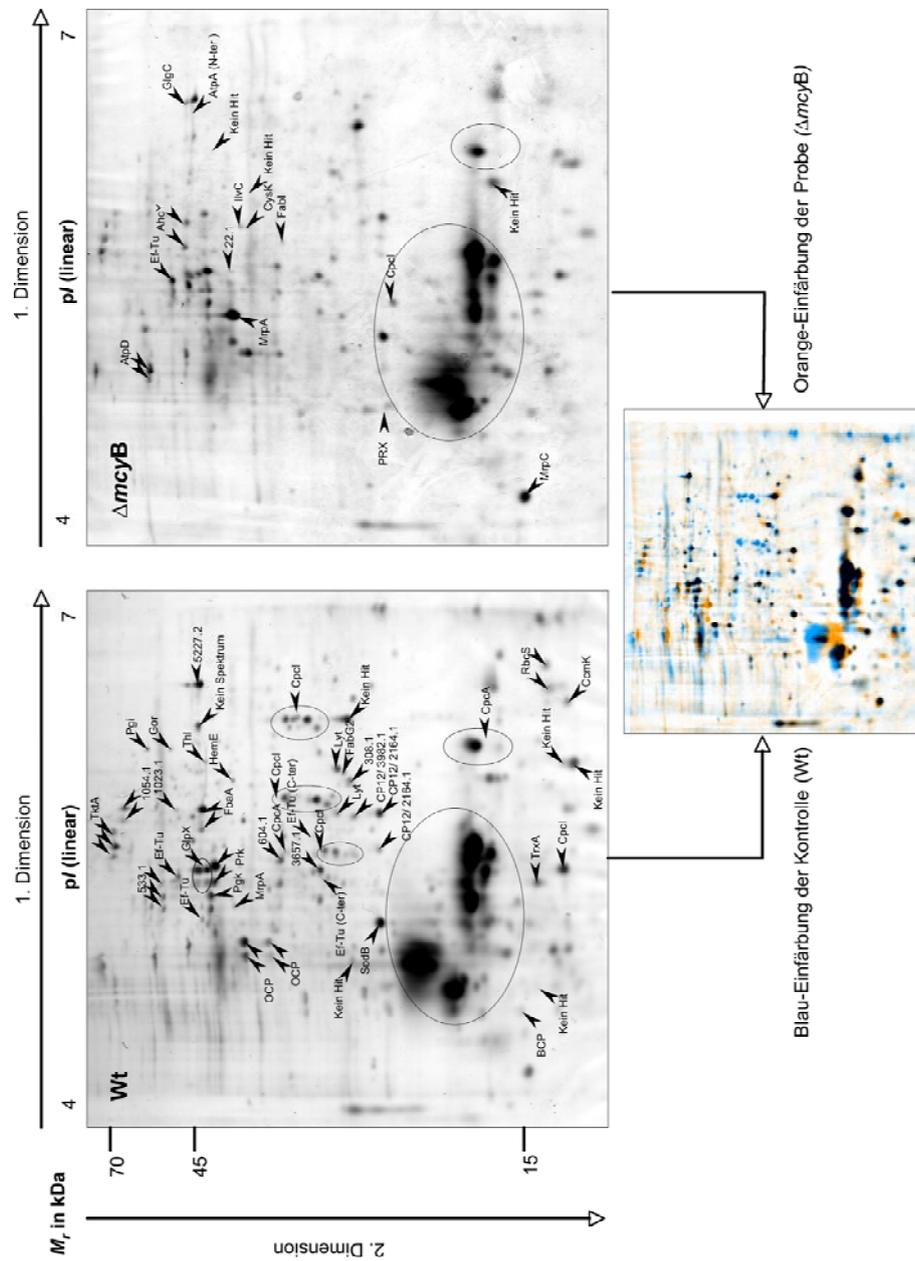
<sup>2</sup> Inkorrekte Hits gab es oft, wenn Farbrückstände im Gel auftraten oder die Spots nicht vom Softwareprogramm exakt übereinandergelegt wurden. Einige der vermeintlich differentiellen Kandidaten konnten nicht vom menschlichen Auge erfasst werden. Diese wurden daher aus der Analyse ausgeschlossen.



**Abb. 10: Prozentuale Verteilung differentiell und konstant exprimierter Proteine im aktuellen Proteomprojekt**

Grafisch dargestellt ist die prozentuale Verteilung von induzierten (violett) und reprimierten (türkis) Proteinen im Vergleich zu den konstant exprimierten Proteinen (grau). Dabei wurden zum einen Differenzen zwischen Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante (A) und zum anderen Effekte nach MC-Zugabe (B) in Abhängigkeit von der Lichtintensität ( $70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , gelb;  $0 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , schwarz) fixiert.

Ein Teil dieser differentiell sowie konstant exprimierten Proteine konnte identifiziert werden und wurde in Tab. 7 und Abb. 11 zusammengestellt. Viele Kandidaten konnten durch beide Computerprogramme (Delta 2D, Melanie) bestätigt werden (Tab. 7).



**Abb. 11: Überblick über die im *Microcystis*-Proteomprojekt identifizierte Proteine**

Die Identität der einzelnen Spots der aktuellen Proteomstudie ist in diesen 2D-Gele dargestellt (Pfeil und Gen- bzw. IPF-Kürzel). Dazu wurden 400 µg cytosolischer Proteinextrakt von PCC 7806/ Wt und PCC 7806/  $\Delta mcyB$  in der ersten Dimension entsprechend ihres pI (18 cm IPG-Strips, pH 4-7/ linear) und in der zweiten Dimension (12 % SDS-PAA-Gel) entsprechend ihres MW aufgetrennt. Anhand eines Markers konnten die Proteingrößen im Gel bestimmt werden. Differentielle und einige konstant exprimierte Proteine wurden gepickt und per MALDI-TOF analysiert. Eingekreist sind Anhäufungen von Phycobilproteinen im Gel, die zum Teil aus der Expressionsanalyse ausgeschlossen worden sind (größter Kreis im unteren Gelbereich). Mittels Delta2D werden die Gele unterschiedlich eingefärbt, so dass Differenzen besser erfasst werden können.

Viele der potentiellen MC-abhängigen Kandidaten stammten aus der Kategorie „Photosynthese“ und „Hypothetisch“. Die in der Lichtreaktion der Photosynthese involvierten Phycobiliproteine Cpcl und CpcA sowie die Thioredoxin-Reduktase und die ATP-Synthase in Form der  $\beta$ -Untereinheit waren sowohl unter Starklichtbedingungen als auch bei Dunkelheit differentiell zwischen Wt und Mutante exprimiert. Das 32 kDa große Phycobilisomen-*linker*-Polypeptid (Cpcl) reagierte außerdem auf die Addition von MC zu  $\Delta mcyB$ -Kulturen (Induktion unter Starklicht, Repression bei Dunkelheit) während bei der  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase (AtpD) nur im Wt Effekte (Induktion bei Dunkelheit) erzielt werden konnten. Neben den in der Lichtreaktion der Photosynthese involvierten Proteinen waren auch Enzyme, Struktur- und regulatorische Proteine der Dunkelreaktion betroffen. Zum Teil zueinander konträr verhielten sich die beiden alternativen CP12-Polypeptide (IPF 2164.1 und IPF 3982.1) (4.3.4.3). Beide möglicherweise an der Regulation des Calvin-Zyklus beteiligten Proteine reagierten sowohl auf die Zugabe von MC zu *Microcystis*-Kulturen als auch auf das Vorhandensein von MC in der Zelle (Vergleich  $\Delta mcyB$  vs. Wt). Das Strukturprotein CcmK, welches Bestandteil der Carboxysomenhülle ist, war sowohl unter Starklicht- als auch unter dunklen Bedingungen in der Mutante im Gegensatz zum Wt reprimiert (Abb. 12). Die Abundanz von Calvin-Enzymen wie RubisCO (RbcS, reprimiert bei 0 und  $70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), Phosphoribulokinase (Prk, reprimiert bei  $0 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) und Fructose-1,6-/Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (GlpX/ Fbpl, induziert bei  $0 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  und reprimiert bei  $70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) wurde durch das Vorhandensein von intrazellulärem MC (Vergleich  $\Delta mcyB$  vs. Wt) beeinflusst (Abb. 12). Die externe Zugabe von MC resultierte außerdem in einer stärkeren Abundanz der Phosphoribulokinase im Wt.

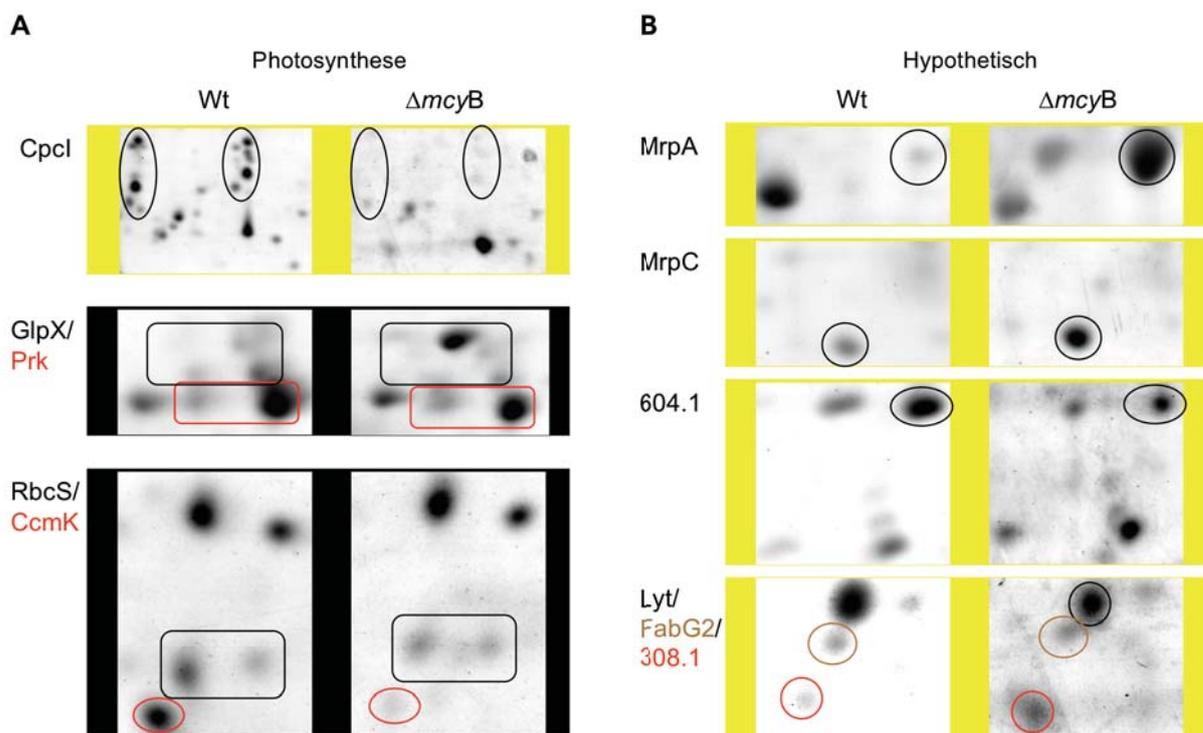
Tab. 7: Expressionsanalyse von *Microcystis* PCC 7806/ Wt und  $\Delta$ mcyB in Abhängigkeit von MC-Addition und Lichtintensität

Stoffwechselweg	IPF	Identität	MC-Addition vs. Kontrolle				$\Delta$ mcyB vs. Wt	
			70 $\mu$ Em <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>		0 $\mu$ Em <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>		70 $\mu$ Em <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	0 $\mu$ Em <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>
			Wt	$\Delta$ mcyB	Wt	$\Delta$ mcyB	$\mu$ Em <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	$\mu$ Em <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>
Photosynthese	2164.1	CP12 <sub>alternativ</sub> *		ind <sup>M</sup>	rep <sup>M</sup>		+6,2 <sup>D</sup>	-3,0 <sup>D,M</sup>
	3982.1	CP12 <sub>alternativ</sub> *	ind <sup>M</sup>					+2,9 <sup>D,M</sup>
	1614.1	TktA*	ind <sup>M</sup>	ind <sup>M</sup>			+3,6 <sup>D,M</sup>	
	2530.2	RbcS*					rep <sup>M</sup>	rep <sup>M</sup>
	5236.1	Prk*	ind <sup>M</sup>					-2,2 <sup>D,M</sup>
	3340.1	FbaA*					-3,1 <sup>D,M</sup>	-2,6 <sup>D,M</sup>
	331.1	GlpX/ Fbpl*					rep <sup>M</sup>	+4,4 <sup>D,M</sup>
	5496.2	CcmK*					-3,7 <sup>D,M</sup>	-5,7 <sup>D,M</sup>
	4222.1	CpcA*		+4,3 <sup>D</sup>		-3,4 <sup>D</sup>	-6,7 <sup>D</sup> bis	-7,4 <sup>D</sup> bis
	4223.1	Cpcl*					+54,1 <sup>D,M</sup>	+2,4 <sup>D,M</sup>
	4444.1	AtpA					ind <sup>M</sup>	-3,7 <sup>D</sup> ;
	2888.1	AtpD*			rep <sup>M</sup>			3,2 <sup>D</sup> -2,0 <sup>D</sup>
	1023.1	Thioredoxin-Reduktase*					+2,1/	rep <sup>M</sup>
							+3,1 <sup>D</sup>	rep <sup>M</sup>
Proteinbiosynthese	2236.1	Ef-Tu*				+7,7 <sup>D</sup>	-2,4 <sup>D</sup>	
Zelluläre Prozesse	3971.1	BCP			rep <sup>M</sup>			
	1847.1	Prx*			rep <sup>M</sup>		+2,2/	
Zentraler Intermediärmetabolismus	112.1	GlgC*				+3,4 <sup>D</sup>	+2,4 <sup>D,M</sup>	
Biosynthese/ AS	2058.1	CysK					+2,4 <sup>D</sup>	
	3940.1	IlvC*					rep <sup>M</sup>	
Biosynthese/ Cofaktoren/ Carrier	3724.1	Gor*		+4,0 <sup>D</sup>			rep <sup>M</sup>	
Energiemetabolismus	1077.1	HemE					-3,0 <sup>D</sup>	
	3006.1	AhcY*			ind <sup>M</sup>		-4,5 <sup>D</sup>	
						+3,5/	rep <sup>M</sup>	
						+4,3 <sup>D</sup>		
Fettsäuremetabolismus	942.1	Pgi					+3,5 <sup>D</sup>	
	4963.1	FabG2*					rep <sup>M</sup>	
	4962.1	Thl*			+3,8 <sup>D</sup>		rep <sup>M</sup>	
Anderes Hypothetisch	22.1	Oxidoreduktase*					rep <sup>M</sup>	
	3657.1		ind <sup>M</sup>				+3,0 <sup>D</sup>	
	5686.1	OCP*		+7,8 <sup>D</sup>			rep <sup>M</sup>	
	1054.1	Transketolase-ähnlich					+3,2 <sup>D,M</sup>	
	649.1	MrpA*					rep <sup>M</sup>	
	2697.1	MrpC					+35,3 <sup>D,M</sup>	
	571.1	Lyt*		+3,0 <sup>D,M</sup>		-8,8 <sup>D,M</sup>	ind <sup>M</sup>	
	533.1	*			rep <sup>M</sup>		+9,4 <sup>D,M</sup>	
							+8,3 <sup>D</sup>	
	604.1	*			rep <sup>M</sup>		+2,8/	
	308.1	*			+3,9 <sup>D</sup>		+3,9 <sup>D,M</sup>	
	5227.1	Chloroperoxidase					+3,6 <sup>D</sup>	
<b>Zusammenfassung</b>								rep <sup>M</sup>
		<b>% Repressionen</b>	<b>0,2</b>	<b>1,42</b>	<b>0,61</b>	<b>1,83</b>	<b>4,27</b>	<b>7,5</b>
		<b>% Induktionen</b>	<b>1,22</b>	<b>2,24</b>	<b>1,83</b>	<b>0,41</b>	<b>17,0</b>	<b>4,47</b>
		<b>% unverändert</b>	<b>98,58</b>	<b>96,38</b>	<b>97,56</b>	<b>97,76</b>	<b>78,73</b>	<b>88,03</b>
Biosynthese/ Cofaktoren/ Carrier	2161.1	TrxA						Konstante Expression
Energiemetabolismus	2454.1	Pgk						Konstante Expression
Fettsäuremetabolismus	2240.3	FabI						Konstante Expression
Zelluläre Prozesse	4715.1	SodB						Konstante Expression

In der Tabelle sind in Abhängigkeit von der Lichtintensität (70  $\mu$ Em<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, 0  $\mu$ Em<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) die identifizierten Proteine, die erstens nach Zugabe von MC zu *Microcystis*-Kulturen (PCC 7806/ Wt, PCC 7806/  $\Delta$ mcyB) im Vergleich zur Kontrolle induziert (+, ind) bzw. reprimiert (-, rep) waren, und die zweitens unterschiedliche Abundanzen in Wt (Wt) und Mutante ( $\Delta$ mcyB) zeigten, dargestellt. Mit einem roten Stern versehen, sind Proteine, die auf mehreren Vergleichsebenen differenziell exprimiert waren.

<sup>D</sup> als differentieller Spot per Delta 2D-Software ermittelt  
<sup>M</sup> als differentieller Spot per MELANIE-Software ermittelt

Aus der Proteingruppe deren Funktion bisher nur postuliert bzw. deren Funktion noch nicht bekannt ist, konnten mehrere potentielle MC-abhängige Kandidaten selektiert werden. Dazu zählten: Das potentielle Carotenoid-bindende Protein (OCP; IPF 5686.1), das *MC-related protein* MrpA (Abb. 12), das putative lytische Enzym (Lyt, IPF 571.1) (Abb. 12), das zu einem hypothetischen Protein aus *Trichodesmium erythraeum* ähnliche Protein (IPF 533.1) und die zwei mit hypothetischem Startpunkt ausgewiesenen Proteine (IPF 604.1 und IPF 308.1) (Abb. 12).



**Abb. 12: Expressionsmuster ausgewählter Kandidaten in PCC 7806/ Wt und  $\Delta mcyB$  in Abhängigkeit von der Lichtintensität**

Vergleichend dargestellt sind die Expressionsmuster (jeweils entsprechend farblich eingekreist) ausgewählter Kandidaten aus der Kategorie Photosynthese (A: Cpcl – 32 kDa *rod-core linker* Polypeptid; GlpX – Fructose-1,6-/ Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, Prk – Phosphoribulokinase, RbcS – kleine Untereinheit der RubisCO, CcmK - Carboxysomenhüllprotein) und Hypothetisch (B: MrpA, MrpC - *microcystin-related proteins*, IPF 604.1, Lyt – potentielles Lytisches Enzym, FabG2 – 3-Oxoacyl-[ACP]-Reduktase 2, IPF 308.1) in PCC 7806/ Wt und  $\Delta mcyB$  bei verschiedenen Lichtbedingungen (gelb –  $70 \mu Em^{-2}s^{-1}$ ; schwarz –  $0 \mu Em^{-2}s^{-1}$ ).

Die Zugabe bzw. das Vorhandensein von MC beeinflusste auch die Expression von Proteinen anderer Stoffwechselwege. So änderte sich die Abundanz folgender Proteine in mehr als nur einer der untersuchten Bedingungen: Elongationsfaktor Ef-Tu (Proteinbiosynthese), 2-Cys-Peroxiredoxin (Prx, Zelluläre Prozesse), Glucose-1-phosphat-Adenylyltransferase (GlgC, Zentraler Intermediärmetabolismus), Ketol-acid-reducto-losmerase (IlvC, Biosynthese von Aminosäuren), Glutathion-Reduktase

(Gor, Biosynthese Cofaktoren & Carrier), Adenosylhomocysteinase (AhcY, Energie-Metabolismus), Fructose-bisphosphat-Aldolase (FbaA, Energie-Metabolismus), 3-Oxoacyl-[Acyl-Carrier-Protein]-Reduktase 2 (FabG2, Fettsäuremetabolismus), Acetyl-CoA Thiolase (Thl, Fettsäuremetabolismus), Transketolase (IPF 1614.1) und Oxidoreduktase (IPF 22.1). Nur unter einer Bedingung differentiell exprimiert und daher nicht im engeren Kandidatenkreis waren die  $\alpha$ -Untereinheit der ATP-Synthase (AtpA), das Bacterioferritin-komigrierende Protein (BCP, IPF 3971.1), die Cystein-Synthase (CysK), die Uroporphyrinogen-Decarboxylase (HemE), die Glucose-6-phosphat-Isomerase (Pgi) sowie die Hypothetischen Proteine IPF 3657.1, IPF 1054.1 und IPF 5227.1 (Tab. 7).

Das hypothetische Protein MrpC war insbesondere unter Starklichtbedingungen stärker abundant in der MC-freien Mutante als im Wt (Abb. 12). Dieses Protein konnte neben RubisCO, Phosphoribulokinase, Phycobiliproteinen (CpcA, Cpci), Fructose-bisphosphat-Aldolase, MrpA-Protein und Lytischem Enzym auch in vorangegangenen 2D-Studien als MC-abhängige Proteine detektiert werden (Tab. 8). Hierbei war die Anzahl der Unterschiede mit der aktuellen Studie vergleichbar, die Identifizierung der Proteine der früheren 2D-Analysen war jedoch ohne Genom erschwert.

Von MC unbeeinflusst, und daher als Standard bzw. Markerproteine in dieser Fragestellung verwendbar, waren das Thioredoxin (TrxA, Biosynthese Cofaktoren & Carrier), die Phosphoglyceratkinase (Pgc, Energie-Metabolismus), das Enoyl-[Acyl-Carrier-Protein]-Reduktase (FabI, Fettsäuremetabolismus) und die Superoxid-dismutase (SodB, Zelluläre Prozesse) (Tab. 7).

Tab. 8: Vergleich der MC-abhängigen Proteine verschiedener Proteomikstudien

Stoffwechselweg/ Protein	Vorhergehende Studien [274, , 303] <sup>3</sup>	Aktuelle Studie
<b>Photosynthese (Lichtreaktion)</b>		
Phycobiliproteine	Cpcl, CpcG, CpcB, CpcA	Cpcl, CpcA, CpcB
ATP-Synthase		AtpD, AtpA
Thioredoxin-Reduktase		1023.1
<b>Photosynthese (Dunkelreaktion)</b>		
<b>Calvin-Zyklus</b>		
RubisCO	RbcL	RbcS
Phosphoribulokinase	Prk	Prk
Fructose-1,6-bisphosphatase		GlpX/Fbpl
Fructose-bisphosphat-Aldolase	FbaA	FbaA
Transketolase		TktA
<b>Carboxysomen</b>		
<i>CO<sub>2</sub> concentrating mechanism protein</i>		CcmK
<b>Regulatorische Proteine</b>		
CP12 <sub>alternativ</sub>		2164.1, 3982.1
<b>Energiemetabolismus</b>		
<b>Aminosäuren &amp; Amine</b>		
Adenosylhomocysteinase		AhcY
<b>Glykolyse</b>		
Glucose-6-phosphat-Isomerase		Pgi
<b>Fettsäuremetabolismus</b>		
Acetoacetyl-CoA-Thiolase		Thl
3-Oxoacyl-[Acyl-Carrier-Protein]-Reduktase 2		FabG2
<b>Biosynthese</b>		
<b>Aminosäuren</b>		
Cystein-Synthase		CysK
Ketol-acid-reducto-Isomerase		IivC
<b>Cofaktoren &amp; Carrier</b>		
Glutathion-Reduktase		Gor
Urophorphyrinogen-Decarboxylase		HemE
<b>Zelluläre Prozesse/ Detoxifikation</b>		
Peroxiredoxin		Prx
Bacterioferritin-ko-migrierendes Protein		BCP
<b>Zentraler Intermediärmetabolismus</b>		
<b>Glycoproteine &amp; Polysaccharide</b>		
Glucose-1-phosphat-Adenylyltransferase		GlgC
<b>Stickstoff</b>		
Glutaminsynthetase	GlnA	
<b>Proteinbiosynthese</b>		
Elongationsfaktor (Ef-Tu)		Ef-Tu
<b>Anderes/ Hypothetisch</b>		
Gasvesikelprotein	GvpC	
Oxidoreduktase		22.1
Lytisches Enzym	Lyt	Lyt
<i>MC-related proteins</i>	MrpA, MrpC	MrpA, MrpC
Hypothetisches Protein		604.1
Hypothetisches Protein		308.1
Hypothetisches Protein		533.1
Hypothetisches Protein		3657.1
Carotenoid-bindendes protein		OCP
Hypothetisches Protein		1054.1
Hypothetisches Protein		5227.2

Die Ergebnisse verschiedener Proteomikstudien (PCC 7806/  $\Delta mcyB$ - bzw.  $\Delta mcyA$  vs. Wt) zur Selektion MC-abhängiger wurden einander gegenübergestellt. Gemeinsamkeiten wurden rot hervorgehoben.

<sup>3</sup> Die Identifizierung der Proteine in diesen Studien konnte nur über einen Vergleich der Peptidfragmentmassen mit bereits in der Datenbank veröffentlichten Proteinsequenzen erreicht werden. Eine direkte Korrelation mit *Microcystis*-Sequenzen aus dem Genomprojekt war zu diesen Zeitpunkten (2001, 2002) noch nicht gegeben. So konnte etwa ein Viertel der Spots nicht identifiziert werden.

Beim Vergleich der Proteomstudien ist auffällig, dass insbesondere Proteine des Calvin-Zyklus und einige Hypothetische Proteine wiederholt als MC-abhängige Kandidaten detektiert werden konnten. Des Weiteren sind die quantitativen (Zahl der betroffenen Proteine) und qualitativen (Expressionsunterschiede) Effekte stärker als im Vergleich mit anderen Stoffwechselwegen. Daher wurden im Folgenden Interaktionen zwischen MC und photosynthetischen Proteinen (insbesondere Calvin-Enzymen) (3.3) sowie eines hypothetischen Proteins (MrpC) (3.4) näher untersucht. Letzterer Kandidat ist außerdem das Hauptprotein der Mediumfraktionen. Hierbei ist dieses, ebenso wie in den cytosolischen Extrakten, stärker in den MC-freien Mutanten exprimiert.

### **3.3 Der Einfluss von MC auf die Expression intrazellulärer Proteine: MC – Proteine der Photosynthese**

#### **3.3.1 Verifizierung der MC-abhängigen Expression von ATP-Synthase, FBP, (GAPDH) und CP12-Polypeptid**

Die in der proteomischen Studie (3.2.1) evaluierten Kandidatengene sollten nun in Immunoblots mittels spezifischer AK verifiziert werden. Der Hauptteil der selektierten Proteine ist in Prozessen der Dunkelreaktion der Photosynthese beteiligt. Daher konzentrierte sich die nun nachfolgende Analyse insbesondere auf Enzyme des Calvin-Zyklus. Durch Dr. Masahiro Tamoi, Dr. Cheng-Cai Zhang und Dr. Annegret Wilde wurden AK gegen das CP12-Polypeptid (CP12), die Fructose-1,6/Seduheptulose-1,7-bisphosphatase (FBP), die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die ATP-Synthase (ATP; Lichtreaktion) und ein Zellteilungsprotein (FtsZ) freundlicherweise zur Verfügung gestellt [318, 319, 320, 321]. Letzteres Protein diente als Standard. GAPDH war nicht über die 2D-Analyse identifiziert worden, steht aber unmittelbar im Zusammenhang mit der Phosphoribulokinase und dem CP12-Polypeptid [319] (4.3.4.3). Zusätzlich wurde der käuflich erworbene AK gegen MC-LR zur Verifizierung der Wt- und Mutantenproben getestet. Nach erfolgreichem *Strippen* wurden die Membranen für Rehybridisierungen verwendet.

Für alle Kandidaten konnte die differentielle Expression in Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante (3.2.2) bestätigt werden. Zu beobachtende Effekte in den Immunoblots entsprachen in ihrer Qualität und Quantität denen der proteomischen Studie (Dunkelproben:

Abb. 13; Daten nicht gezeigt für Starklichtproben). Während die Expression des Markerproteins (FtsZ) unter allen Bedingungen konstant war, war sowohl FBP als auch GAPDH in der Mutante (im Gegensatz zum Wt) induziert (Abb. 13). Bei der ATP-Synthase variierte neben dem Bandenmuster auch die Signalstärke der verschiedenen Banden (Abb. 13). Deutlicher als in der 2D-Analyse war der reprimierende Effekt von extern zugesetztem MC auf die Abundanz der ATP-Synthase im Vergleich zur Kontrolle. Die Spezifität dieses AK hinsichtlich der Detektion der einzelnen Untereinheiten ist nicht eindeutig geklärt (A. Wilde, persönliche Mitteilung). Vermutlich repräsentieren die verschiedenen Banden verschiedene Untereinheiten der ATP-Synthase. Inwiefern die in Tab. 7 selektierte  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase (51,5 kDa) detektiert worden ist, kann nicht eindeutig nachgewiesen werden. Interessant ist jedoch, dass es durch die An- bzw. Abwesenheit von MC ( $\Delta mcyB$  vs. Wt; MC-Addition vs. Kontrolle) zu einer veränderten Abundanz der verschiedenen Banden kommt.

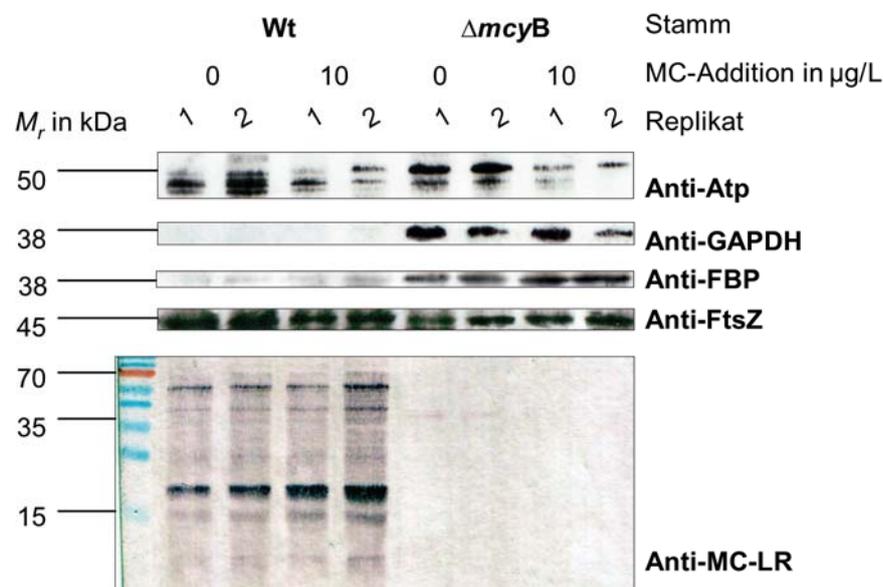


Abb. 13 Immunoblot gegen ATP/ FBP/ GAPDH vs. FtsZ/ MC

Die in der aktuellen 2D-Studie analysierten Extrakte wurden für die Verifizierung der differentiellen Expression einiger Kandidaten (nur Dunkelproben) verwendet. Zur Detektion der ATP-Synthase (ATP), der Fructose-1,6/ Seduheptulose-1,7-bisphosphatase (FBP), der Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), des als Standard verwendeten FtsZ-Proteins und des an cytosolische Proteine gebundenen MC-LR wurde 40  $\mu\text{g}$  löslicher Proteinextrakt von PCC 7806/ Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante (mit und ohne MC-Addition) in einem 15 % SDS-PAA-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblotet und in einer sukzessiven Immunoblotanalyse mittels spezifischer AK analysiert.

Unterschiedliche Expressionsmuster in PCC 7806/ Wt und MC-freier Mutante ergaben sich auch mittels des gegen das CP12-Polypeptid gerichteten AK (Abb. 14).

Während das eigentliche CP12-Polypeptid (IPF 141.1) eine Größe von 8,3 kDa (anhand der Gensequenz ermittelt) hat, sind die alternativen Proteine etwa 22,9 kDa (IPF 2164.1) und 22,6 kDa (IPF 3982.1) groß. Erste Analysen hinsichtlich der Komplexbildung (mittels BN-PAGE) zeigten ebenso ein unterschiedliches Expressionsmuster in PCC 7806/ Wt und  $\Delta mcyB$ . In Hybridisierungen (1. Dimension/ BN-PAGE) mit dem gegen das CP12-Polypeptid gerichteten AK (CP12-Polypeptid aus *Synechococcus*) konnten dabei zwei zusätzliche Banden in der  $\Delta mcyB$ -Mutante beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Inwiefern mittels des AK auch die alternativen CP12-Polypeptide erkannt werden, ist anhand der Größe der detektierten Signale möglich, jedoch nicht erwiesen.



**Abb. 14: Immunoblot gegen das CP12-Polypeptid**

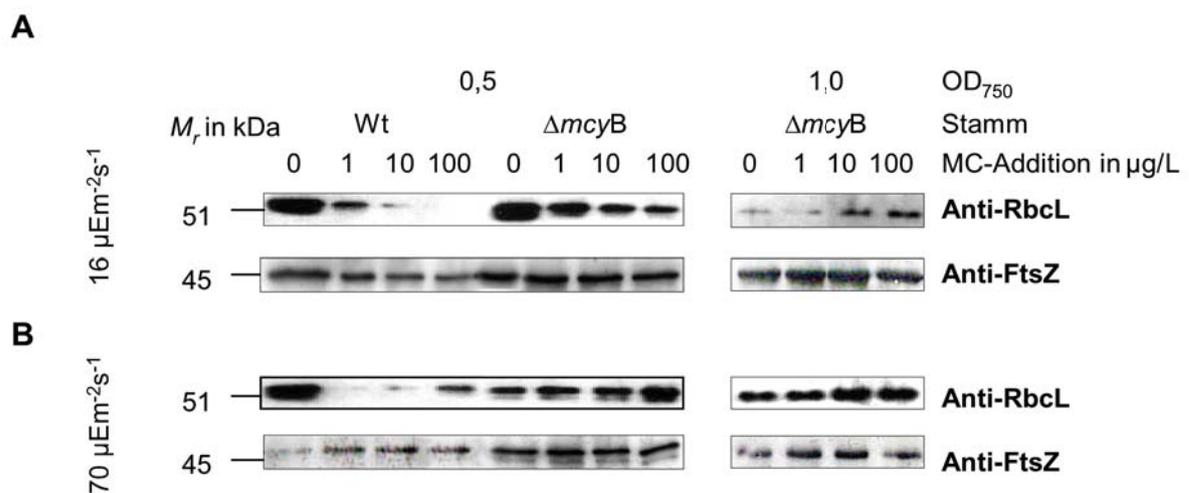
Die in der aktuellen 2D-Studie analysierten Extrakte wurden für die Verifizierung der differentiellen Expression der alternativen CP12-Polypeptide (nur Dunkelproben) verwendet. Dabei wurde 40  $\mu$ g löslicher Proteinextrakt von PCC 7806/ Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante in einem 15 % SDS-PAA-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und in einer Immunoblotanalyse mittels eines gegen das CP12-Polypeptid (aus *Synechococcus* PCC 7942) gerichteten AK analysiert.

Die Ergebnisse der proteomischen Studie konnten in Immunoblots gegen die Fructose-1,6/ Seduheptulose-1,7-bisphosphatase (FBP), die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und die ATP-Synthase (ATP) bestätigt werden. Die Ergebnisse werden durch die gleichgerichteten Effekte in beiden Replika, durch die konstante Expression des Standardproteins FtsZ und durch den Immunoblot gegen MC verifiziert (Abb. 13). In Letzterem konnten Signale nur im Wt detektiert werden.

### 3.3.2 Einfluß von MC auf die Expression von RubisCO

Die Fructose-1,6/ Seduheptulose-1,7-bisphosphatase (FBP) und die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) spielen insbesondere in der Reduktionsphase des Calvin-Benson-Bassham-Zyklus eine Rolle. Schlüsselenzym der  $\text{CO}_2$ -Fixierung ist jedoch RubisCO. Dieses Enzym konnte in beiden,

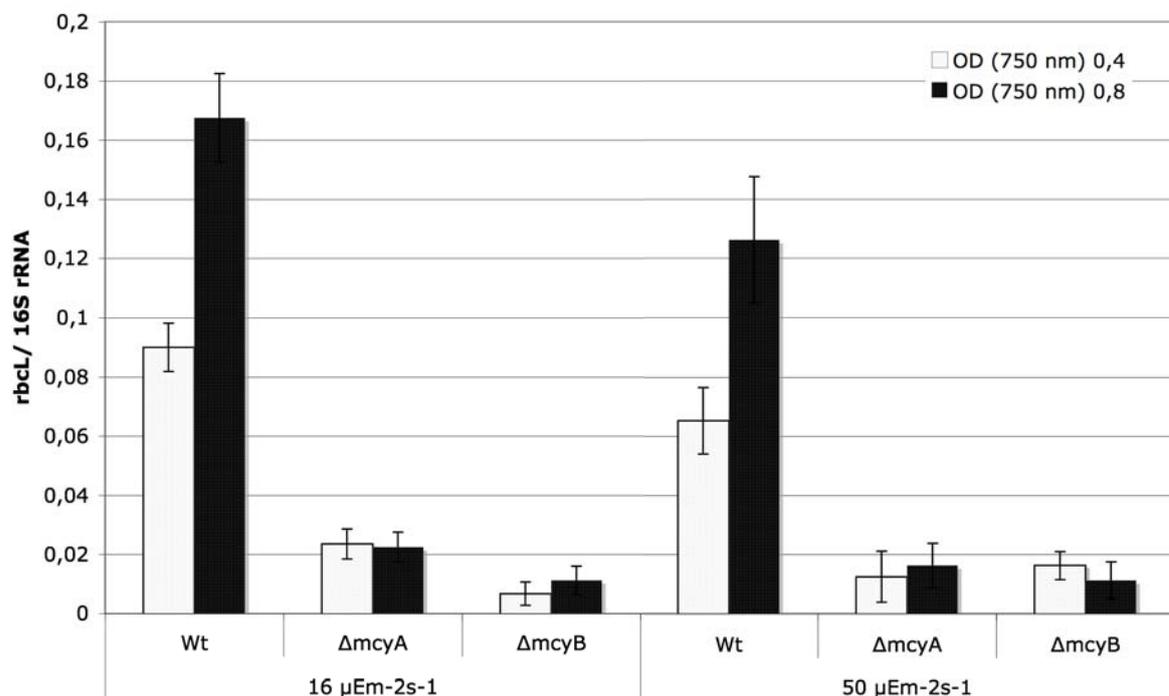
unabhängigen 2D-Studien als differentiell in Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante exprimiertes Protein identifiziert werden (Tab. 8). Die differentielle Expression dieses Enzyms wurde außerdem in Immunoblots gegen die große Untereinheit (RbcL) überprüft. In Abhängigkeit von extern zugesetztem MC zu Beginn des Belichtungsversuchs wurde die Abundanz des Proteins (RbcL) in PCC 7806/ Wt und PCC 7806/  $\Delta mcyB$  bei verschiedenen Lichtintensitäten untersucht. Unter Schwachlichtbedingungen sank die Abundanz von RbcL in Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante mit steigender MC-Konzentration im Medium, während die Expression des Standards (FtsZ) gleich blieb (Abb. 15/ A, OD<sub>750</sub> 0,5). Unter Starklichtbedingungen verhielten sich Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante konträr zueinander. Während im Wt ähnliche Effekte wie unter Schwachlichtbedingungen festgestellt werden konnten, stieg die Abundanz von RbcL in der Mutante mit steigender MC-Addition (Abb. 15/ B, OD<sub>750</sub> 0,5). Die Expression des Standards (FtsZ) änderte sich dagegen nicht. Bei höherer Zelldichte konnten generell positive Effekte von MC auf die RbcL-Abundanz bei gleichbleibendem Standard registriert werden (Abb. 15/ A & B, OD<sub>750</sub> 1,0), jedoch mit abgeschwächter Tendenz als bei geringerer Zelldichte. Weiterhin ist auffällig, dass in der  $\Delta mcyB$ -Mutante oft zwei Banden von RbcL (Abb. 15/ B, OD<sub>750</sub> 0,5; mit Pfeilen gekennzeichnet) im Immunoblot detektiert werden. Dies stimmt mit Ergebnissen früherer Studien überein, wo ebenfalls ein Zweibandemuster in den MC-freien Mutanten ( $\Delta mcyA$ ,  $\Delta mcyB$ ) im Gegensatz zum Wt beobachtet werden konnte [303].



**Abb. 15: Immunoblotanalyse von RbcL vs. FtsZ in PCC 7806/ Wt und PCC 7806/  $\Delta mcyB$**

In vergleichenden Immunoblots gegen RbcL und FtsZ wurde die Expression dieser Proteine unter Schwach- (A) und Starklicht (B) in Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante nach 2 h-Exposition in Abhängigkeit von der Zelldichte (OD<sub>750</sub> 0,5; 1,0) und von dem Medium zugesetztem MC (0, 1, 10, 100  $\mu\text{g/L}$ ) analysiert. Dabei wurden je 3  $\mu\text{g}$  (RbcL) und 20  $\mu\text{g}$  (FtsZ) lösliche Proteinfraction in einem 12,5 % SDS-PAA-Gel analysiert.

Ob die auf Proteinniveau sichtbaren Kurzzeiteffekte (2 h) in Konsequenz zu einer Regulation auf Transkriptebeine stehen, sollte durch *Northern Blots* gezeigt werden. Hierbei konnten geringere Transkriptakkumulationen in den MC-freien-Mutanten im Vergleich zum Wt (16S *rRNA* als Standard) detektiert werden (Abb. 16). Die Transkriptakkumulation von *rbcl* in Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante variierte jedoch nicht in Abhängigkeit von unterschiedlichen externen MC-Additionen (0, 1, 10, 100  $\mu\text{g/L}$ ; 2 h Exposition) (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 16: Transkriptakkumulation von *rbcl* in PCC 7806/ Wt und MC-freien Mutanten ( $\Delta mcyA$  und  $\Delta mcyB$ )**

In der Grafik ist die Transkriptakkumulation von *rbcl* (2 h Exposition) im Verhältnis zur 16S *rRNA* in PCC 7806/ Wt und MC-freien Mutanten  $\Delta mcyA$  und  $\Delta mcyB$  (je vier Replika) in Abhängigkeit von der Lichtintensität (Schwachlicht 16  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , mittelstarkes Licht 50  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) und der Zelldichte ( $\text{OD}_{750}$  0,4; 0,8) dargestellt. Dazu wurden je 10  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA in einem 1,2 % Agarosegel getrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Transkripte wurden anschließend mittels spezifischer, radioaktiv markierter Sonden detektiert. Die Quantifizierung erfolgte über Quantity One (BioRad).

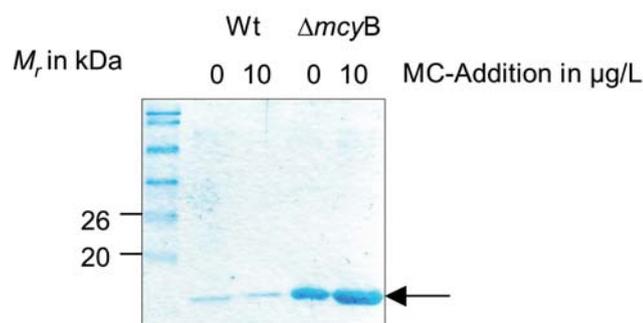
Sowohl durch 2D-Analysen als auch durch Immunoblots konnte der Einfluß von MC auf die Expression von Enzymen des Calvin-Benson-Bassham-Zyklus (GAPDH, FBP, RubisCO) gezeigt werden. Dabei führten in Abhängigkeit von der Lichtintensität und der Zelldichte schon geringe MC-Additionen (1  $\mu\text{g/L}$ ) zu einer veränderten Abundanz der großen Untereinheit der RubisCO in Wt- bzw.  $\Delta mcyB$ -Kulturen. Mit steigender MC-Konzentration im Kulturmedium nahmen die RbcL-Signale zu bzw. ab. Ebenso ist die *rbcl*-Transkriptakkumulation in PCC 7806/ Wt und MC-freien Mutanten unterschiedlich. Mögliche direkte Interaktionen zwischen MC und RubisCO

wurden im Zuge der Identifizierung MC-bindender Proteine näher untersucht (3.5). Zuvor wird jedoch ein weiteres im Proteomprojekt selektiertes, MC-abhängiges Protein (MrpC) näher charakterisiert (3.4).

### 3.4 Der Einfluss von MC auf die Expression extrazellulärer Proteine: MC – MrpC

#### 3.4.1 Identifizierung, Namensgebung und Besonderheiten von MrpC

Das 17 kDa große MrpC mit einem  $pI$  von 4,1 wurde sowohl in der aktuellen als auch in vorangegangenen proteomischen Studien (Tab. 8) als ein in den löslichen Extrakten der MC-freien Mutanten ( $\Delta mcyA$  und  $\Delta mcyB$ ) im Vergleich zum Wt stark exprimiertes Protein gefunden (Abb. 12). Analog zu den bereits veröffentlichten, ebenfalls in PCC 7806/ Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante differentiell exprimierten Proteinen (*MC related protein*) MrpA und MrpB [274], wurde dieses Protein MrpC genannt. Ein Protein ähnlicher Größe (14 kDa) konnte auch in den Mediumextrakten nachgewiesen werden. Es war das dominanteste Protein in diesen Fraktionen, wobei sich auch hier analoge Expressionsunterschiede zwischen Wt und Mutante zeigten (Abb. 17; gilt auch für  $\Delta mcyA$  und  $\Delta mcyH$ : Daten nicht gezeigt).



**Abb. 17: Differentielle Expression von MrpC in Mediumproteinextrakten von PCC 7806/ Wt und PCC 7806/  $\Delta mcyB$**

20  $\mu$ l Mediumproteinextrakte von PCC 7806/ Wt und PCC 7806/  $\Delta mcyB$  (2 h Starklichtexposition –  $70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , MC-Addition – 0, 10  $\mu\text{g/L}$ ) wurden in einem 15 % SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden mittels kolloidaler Coomassielösung angefärbt. Das Protein (14 kDa) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

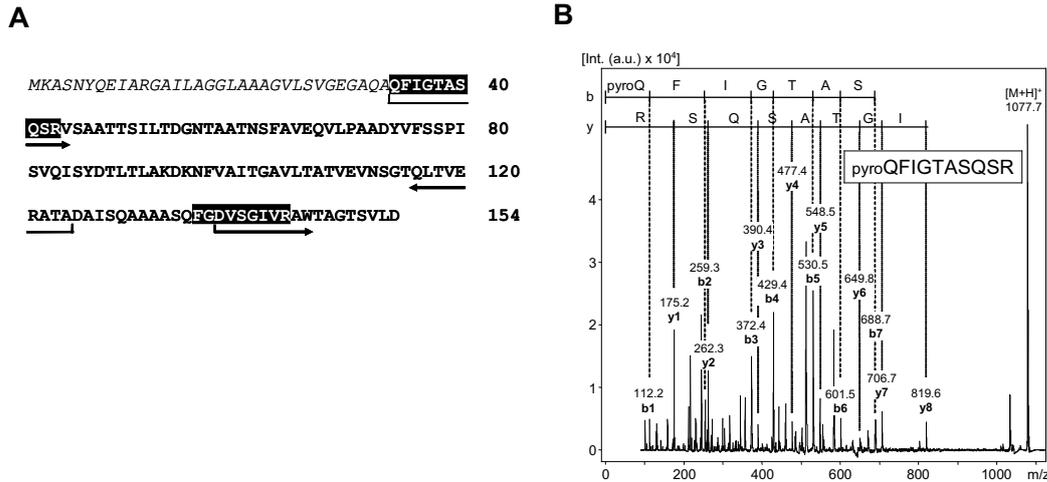
Beide Proteine wurden aus 2D- (lösliche Fraktion) bzw. 1D-Gelen (Mediumfraktion) isoliert, trypsinisiert und sequenziert. Die Q-TOF-Sequenzen der trypsinisierten Fragmente beider Proteine stimmten überein (Tab. 9). Dies war Anhaltspunkt dafür, dass es sich um ein und dasselbe Protein handeln könnte.

Tab. 9: Massenspektren der trypsinisierten Fragmente von MrpC nach Q-TOF-Analyse

Extrakt	m/z	Sequenz
Mediumspot	475	FGDVSG(I/L)VR
Mediumspot, Cytosolischer Spot	488	GDVSG(I/L)VR
Mediumspot, Cytosolischer Spot	539	(I/L)GTASQSR

In der Tabelle sind die ermittelten Massen pro Ladung (m/z) der trypsinisierten Fragmente von MrpC – gepickt aus 2D-Gelen löslicher Extrakte und ausgeschnitten aus 1D-Gelen von Mediumextrakten – den entsprechenden Peptidfragmenten zugeordnet.

Mit dem Fortschreiten des *Microcystis*-Genomprojektes konnten die Peptidmuster dem IPF 2679.1 zugeordnet werden. Jedoch ist die Sequenzabdeckung relativ gering (Abb. 18). Zusätzliche MALDI-TOF-Untersuchungen führten zu gleichen Ergebnissen (Abb. 18). *In silico*-Analysen von *mrpC* zeigten, dass erstens in der Aminosäuresequenz möglicherweise ein Signalpeptid verankert ist – mit einer Schnittstelle zwischen der 33. und der 34. Aminosäure, dass zweitens dieses Protein vermutlich außerhalb der Zelle lokalisiert ist, und dass drittens die Sequenz reich an Serinen und Threoninen ( $\Sigma$  18,7 %) ist. Die Vorhersage eines Signalpeptids (Sequenz lässt auf Sec-abhängigen Transportweg schließen, 4.4.2) sowie der extrazellulären Lokalisierung gaben erste Hinweise auf einen möglichen Export von MrpC. Serin- und Threonin-reiche Sequenzen deuteten auf eine Modifizierung des Proteins durch O-Glykosylierungen hin. Glykosylierungen und andere Modifizierungen erschweren eine einfache Identifizierung mittels MALDI-TOF (S. Mikkat, persönliche Mitteilung). Dies könnte zum einen die geringe Sequenzabdeckung der MrpC-Fragmente mit dem IPF 2679.1 erklären (Abb. 18) und zum anderen die Differenzen zwischen theoretischen (ohne Signalsequenz: 12 kDa) und im Coomassie-Gel sowie per MALDI-TOF ermittelten MW (17 kDa und 14 kDa).



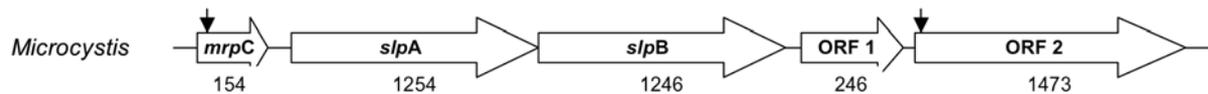
**Abb. 18: MrpC-AS-Sequenz und N-terminale Prozessierung**

Die MALDI-Spektren der mit Trypsin und Asp-N verdauten MrpC-Fragmente zeigten zwei intensive Peaks ( $m/z$  949,5 entspricht FGDVSGIVR;  $m/z$  1077,5 entspricht pyroQFIGTASQSR) (A, schwarze Boxen). Pfeile deuten zusätzliche posttranslationale Modifizierungen an, die zu einem Massenunterschied (im Gegensatz zu den berechneten Massen) führten. Die Signalsequenz ist kursiv hervorgehoben. In Abbildung B ist das PSD-Spektrum eines Peptidfragments ( $m/z$  1077,5) dargestellt. Die AS-Sequenz konnte dem 34. bis 43. AS-Rest von MrpC (pyroQFIGTASQSR), mit einer Modifizierung des N-terminalen Glutaminrests zu Pyroglutamat, zugeordnet werden.

Zusätzliche PSD-Analysen der Proteinspots aus cytosolischer und Mediumfraktion konnten zum einen eindeutig beide Sequenzen dem IPF 2679.1 und damit MrpC zuordnen und zum anderen die Signalpeptidschnittstelle zwischen der 33. AS und 34. AS bestätigen. Nach Abspaltung der Signalsequenz ergab sich aufgrund einer spezifischen Modifizierung (N-Pyrrolidon carboxyl-) des verbleibenden N-terminalen Glutaminrestes ein Unterschied von -17 kDa zwischen theoretischer Masse und experimentell ermittelter Masse ( $Q^P$ FIGTASQSR:  $m/z_{\text{experimentell}}$  1077,5  $\leftrightarrow$  QFIGTASQSR:  $m/z_{\text{theoretisch}}$  1094,5) (Abb. 18/ B). Unter Berücksichtigung dieser Voraussetzungen konnte MrpC in der MS/MS-Datenbanksuche mit den Parametern *no enzyme cleavage specificity* und *Pyro-glu (N-term Q)* mit signifikantem Ergebnis identifiziert werden. Diese Art des N-terminalen Processings ist auch für andere extrazelluläre Proteine aus Pro- und Eukaryoten beschrieben worden [327]. Die massenspektroskopischen Analysen zeigten aber, dass auch das aus dem Cytosol isolierte MrpC diesen modifizierten N-Terminus besitzt. Somit ist das vermeintlich cytosolische Protein ein bereits sezerniertes Protein, das vermutlich im Zuge der sukzessiven Extraktion nicht vollständig mit den Medium- bzw. Zelloberflächenfraktionen isoliert werden konnte. Der Unterschied zwischen der 17 kDa (detektiert im Cytosol und an der Zelloberfläche; siehe später Abb. 24) und der 14 kDa (detektiert an der Zelloberfläche und im Medium; siehe später Abb. 24) besteht

demnach nicht in der abgespaltenen Signalsequenz, sondern in dem Verlust anderer Modifizierungen wie Glycosylierungen (S. Mikkat, persönliche Mitteilung).

Stromabwärts von *mrpC*<sup>4</sup> (IPF 2679.1) liegen, in gleicher Leserichtung weisend, vier weitere ORFs<sup>10</sup> (Abb. 19).

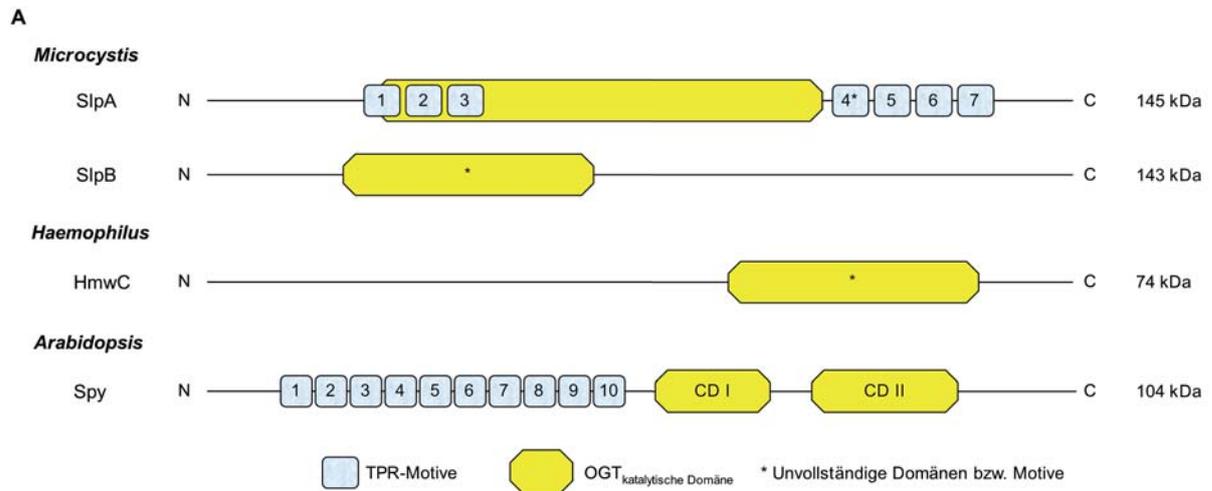


**Abb. 19: Lokalisation von *mrpC* im Genom von *Microcystis* PCC 7806**

Das Gen *mrpC* aus *Microcystis* PCC 7806 liegt in einem Cluster mit vier weiteren ORFs (*slpA*, *slpB*, ORF 1, ORF 2). *SlpA* und *SlpB* (*Slp* steht für *Spindly like protein*) zeigen Ähnlichkeiten zum Spindly-Protein aus *Arabidopsis* (Abb. 20). Diese Enzyme besitzen N-Acetylglucosaminyltransferasen-Domänen (OGT), die N-Acetylglucosamin (GlcNAc) auf Serin- und Threonin-Reste der Zielproteine übertragen (Abb. 20). Die Länge der AS-Sequenz wurde den jeweiligen Genen angefügt. Putative Signalpeptide wurden mit einem Pfeil markiert.

Blast-Analysen der translatierten Nukleotidsequenzen ergaben, dass die zwei nächstfolgenden Gene von *mrpC* Ähnlichkeiten zum Spindly-Protein aus *Arabidopsis thaliana* aufweisen (Abb. 20/B). Daher wurden beide Gene als *Spindly-like proteins slpA* und *slpB* bezeichnet. Sowohl *SlpA* als auch *SlpB* besitzen wie das *Arabidopsis*-Homolog eine N-Acetylglucosamintransferase (OGT)-Domäne über die N-Acetylglucosamin (GlcNAc) auf die Serin- und Threoninreste der Zielproteine übertragen werden (Abb. 20/A). In der Regel vermitteln *Tetratricopenta-Repeat* (TPR)-Motive diese Protein-Protein-Interaktionen (4.4.2). In *Microcystis* besitzt das erste der beiden Spindly-ähnlichen Proteine (*SlpA*) sieben TPR-Motive (Abb. 20/A). *SlpB* dagegen hat zwar keine TPR-Motive, jedoch befindet sich je eine Methyltransferase-Domäne am N- und am C-Terminus.

<sup>4</sup> Die Transkriptionsstartpunkte aller ORF's dieses Genclusters konnten aufgrund der geringen bzw. partiellen Ähnlichkeit zu bisher bekannten Proteinen nicht eindeutig bestimmt werden. Vorhersagen über mögliche Signalpeptide und der subzellulären Lokalisation der Proteine konnten daher nur als Anhaltspunkte bzw. Idee zur weiteren Versuchsplanung dienen.



**B**

Stamm/ Gen	% Identität zu Spy	% Ähnlichkeit zu Spy	AS-Länge	Referenz
<i>Microcystis</i>				
SlpA	32	49	709	
SlpB	43	60	363	
<i>Haemophilus</i>				
HmwC	40	51	54	Grass <i>et al.</i> , 2003

**Abb. 20: Vergleich von Spindly (Spy) aus Arabidopsis vs. Spindly-Homologa aus Microcystis (SlpA, SlpB) und Haemophilus (HmwC) hinsichtlich des Vorkommens und der Lokalisation von OGT-Domänen und TPR-Motiven**

Vergleichend dargestellt ist die Domänen-Architektur (NCBI) der *Microcystis*-Spindly-Homologa (SlpA, SlpB), des *Haemophilus*-Spindly-Homologs (HmwC) und des Spindly (Spy) aus *Arabidopsis* (A) (Alignment Anhang E). Alle Proteine haben eine Spy-Domäne (gelb), die eine *O-linked* N-Acetylglucosamintransferase-Aktivität (OGT) besitzt. SlpA und Spy enthalten zudem TPR-Motive (hellblau) (A). Die Prozentzahlen der identischen sowie ähnlichen AS der bakteriellen Spindly-Homologa zu Spindly aus *Arabidopsis* sind in der Tabelle aufgelistet (B).

Akzeptoren des Zuckerestes (GlcNAc) könnten aufgrund der auffälligen Zahl an Serinen und Threoninen die Translationsprodukte der Gene *mrpC* ( $\Sigma$  19 %), ORF 1 ( $\Sigma$  27 %) und ORF 2 ( $\Sigma$  18 %) sein (Abb. 19). Alle drei Gene zeigten keine signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen (Daten nicht gezeigt). ORF 2 enthält ebenfalls eine Signalsequenz. Diese Daten korrelieren mit der über PSORT vorhergesagten Lokalisation in der Äußeren Membran (Daten nicht gezeigt). Für SlpA, SlpB und ORF 1 konnten keine subzelluläre Lokalisation abgeleitet werden (Daten nicht gezeigt). MrpC selbst hatte jedoch eine sehr schwache Ähnlichkeit zu Oberflächenproteinen (Adhesinen) pathogener Bakterien wie *Haemophilus influenzae* (HmwA: 26 % identische und 41 % ähnliche AS, Überlappung 107 AS). Hierbei wird HmwA (*high molecular weight protein*) durch HmwC (Abb. 20) glycosyliert, das wie Spindly, SlpA und SlpB ebenfalls eine OGT-Domäne besitzt. Beide Gene liegen in einem Gencluster (*hmwABC*) (4.4.2).

Welche Funktion MrpC in *Microcystis* erfüllt und welche Verbindung zwischen MrpC und dem MC besteht, sollte im Folgenden näher untersucht werden.

### 3.4.2 Verbreitung des *mrpC*-Gens innerhalb der *Microcystis*-Spezies

Die Verbreitung des *mrpC*-Gens sowie des *slpA*-Gens innerhalb der Gattung *Microcystis* sollte in Korrelation zum Auftreten toxischer Genotypen [302] analysiert werden (Stämme im Anhang B aufgelistet). Die Gene wurden jeweils über eine PCR mittels spezifischer Primer (McyA-Cd1F/ McyA-Cd1R; MrpC169.fw/ MrpC387.rv; Spin35.fw/ Spin359.rv) amplifiziert und im Agarosegel analysiert (Abb. 21). Dabei wurde die Stringenz durch eine um 2°C niedrigere *annealing*-Temperatur herabgesetzt, um geringfügige Abweichungen der Sequenzen im Vergleich zu PCC 7806 auszugleichen.

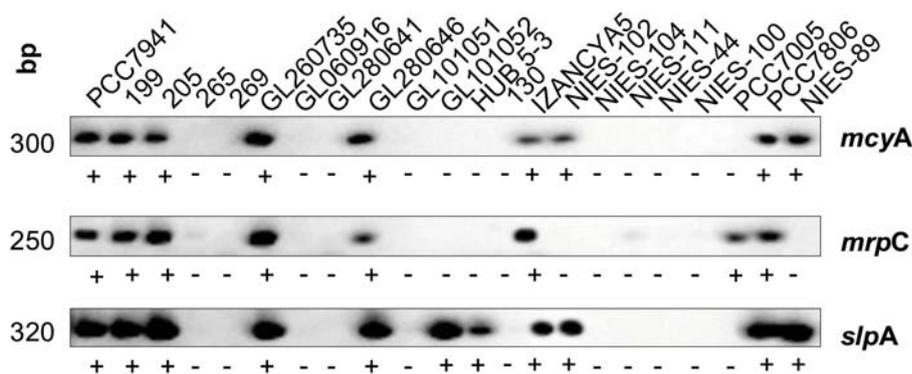


Abb. 21: *mrpC*-Screening in verschiedenen *Microcystis*-Stämmen

Das Vorkommen der Gene *mcyA*, *mrpC* und *slpA* wurde in 22 verschiedenen *Microcystis*-Stämmen mittels PCR und anschließender Analyse in 1,2 % Agarosegelen überprüft (+ Gen vorhanden; - Gen nicht vorhanden). Eine Negativkontrolle (Wasser) wurde durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

Von zweiundzwanzig untersuchten *Microcystis*-Stämmen waren neun toxische und dreizehn nicht-toxische Stämme vertreten (Zusammenfassung siehe Anhang B). Diese Daten korrelieren mit HPLC- und PCR-Analysen der Stämme früherer Studien [302]. In sieben von neun toxischen Stämmen und in nur einem von dreizehn nicht-toxischen Stämmen konnte ein positives *mrpC*-Signal detektiert werden (Abb. 21). Für die *slpA*-Verbreitung ergab sich ein ähnliches Muster. Das Gen war in allen toxischen Stämmen und in nur zwei nicht-toxischen Stämmen vertreten (Abb. 21). Diese Daten unterstützen eine enge Korrelation zwischen dem Auftreten toxischer Genotypen und der Verbreitung des *mrpC*- bzw. *slpA*-Gens.

### 3.4.3 Prozessierung und Differentielle Expression von MrpC in PCC 7806/ Wt und $\Delta mcyB$ -Mutante

#### 3.4.3.1 Transkription von *mrpC*

Die Transkriptakkumulation von *mrpC* sowie die Möglichkeit einer gemeinsamen Transkription mit *slpA*, *slpB*, ORF 1 und ORF 2 wurde in Northern Blots überprüft. Die Transkriptakkumulation von *mrpC* in Relation zu einem Standard (16S *rRNA*) variierte weder signifikant zwischen den untersuchten Variablen (Lichtintensität, Dauer der Licht-/Dunkelexposition, MC-Addition zu den Kulturen) innerhalb eines Stammes noch zwischen den einzelnen Stämmen (Wt,  $\Delta mcyB$ ,  $\Delta mcyH$ ) (Abb. 22). Daher sind die auf Proteinebene detektierten Expressionsunterschiede zwischen Wt und MC-freien Mutanten nicht durch unterschiedliche Transkriptakkumulationen bedingt.

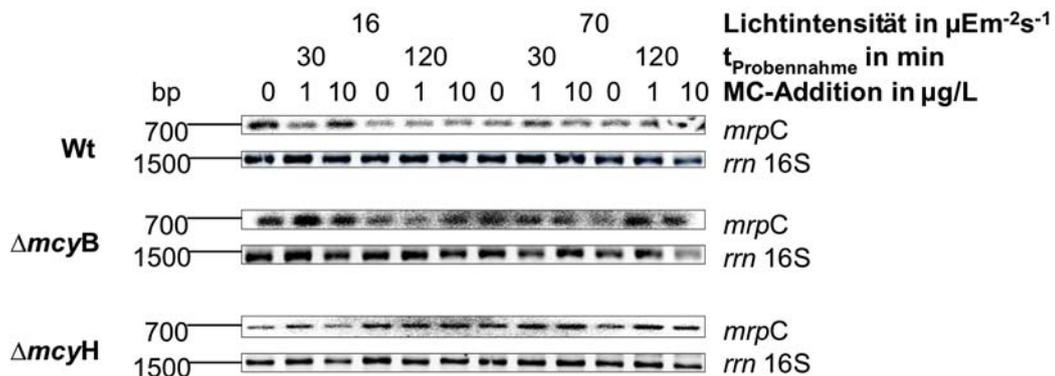


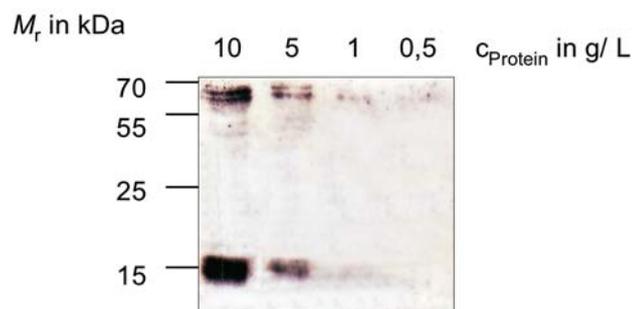
Abb. 22: Northern Blot-Analyse der *mrpC* vs. *rrn16S* -Transkriptakkumulation

In 1,2 % Agarosegelen wurde je 3  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA getrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Über eine Hybridisierung mit einer [ $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP]-radioaktiv markierten, *mrpC*- sowie *rrn 16S*-spezifischen DNA-Sonde wurden die Transkripte auf der Membran mittels des Phosphoimagers detektiert.

Anhand einer RNA-Leiter konnte die Größe der Signalbande (*mrpC*) auf 700 bp bestimmt werden. Diese Größe konnte in Northern Blots unterschiedlicher Belichtungsversuche bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Diskrepanz zwischen Transkript- und Genclusterlänge wird *mrpC* mit keinem der stromabwärts liegenden Gene transkribiert. Gleiches gilt auch für das *slpA*-Gen (Daten nicht gezeigt). *MrpC*-Transkripte konnten außerdem auch in Freilandproben detektiert werden (Daten nicht gezeigt), dass die Relevanz dieses Proteins für *Microcystis* unterstreicht.

### 3.4.3.2 Herstellung eines Antikörpers gegen MrpC

Um die Expression und Modifizierung von MrpC in verschiedenen zellulären und extrazellulären Fraktionen zu untersuchen, wurde ein AK hergestellt. Dabei wurde das Protein aus dem Medium (300 ml) der MC-freien Mutante  $\Delta mcyB$  über eine Ammoniumsulfatfällung isoliert. Nach Entfernung der Salze mittels Dialyse wurde der Extrakt auf seine Qualität und Quantität in einem 15 % SDS-PAA-Gel geprüft (Daten nicht gezeigt). Durch die Firma Pineda-AK-Service wurde der polyklonale AK gegen MrpC hergestellt. Die vom 61. Immunisierungstag (Meerschwein) stammenden Antiseren wurden zum einen auf ihre Bindungsfähigkeit zum Antigen und zum anderen auf ihre Bindungskapazität überprüft. Mittels dieser Antiseren konnte die 17 kDa große Isoform des Proteins in cytosolischen Extrakten von PCC 7806/  $\Delta mcyB$  detektiert werden (Abb. 23). Mit steigender Proteinmenge nahm auch die Signalstärke in linearer Weise zu (Abb. 23). Welche der zusätzlichen Banden (55-70 kDa) entweder auf spezifische Interaktionen multimerer Isoformen von MrpC mit dem AK oder auf Kreuzreaktionen zurückzuführen sind, ließe sich nur durch einen Knockout klären. Eine Mutagenese von *mrpC* in *Microcystis* PCC 7806 war bisher erfolglos.



**Abb. 23: Überprüfung der Bindungsfähigkeit und -kapazität des AK gegen MrpC**

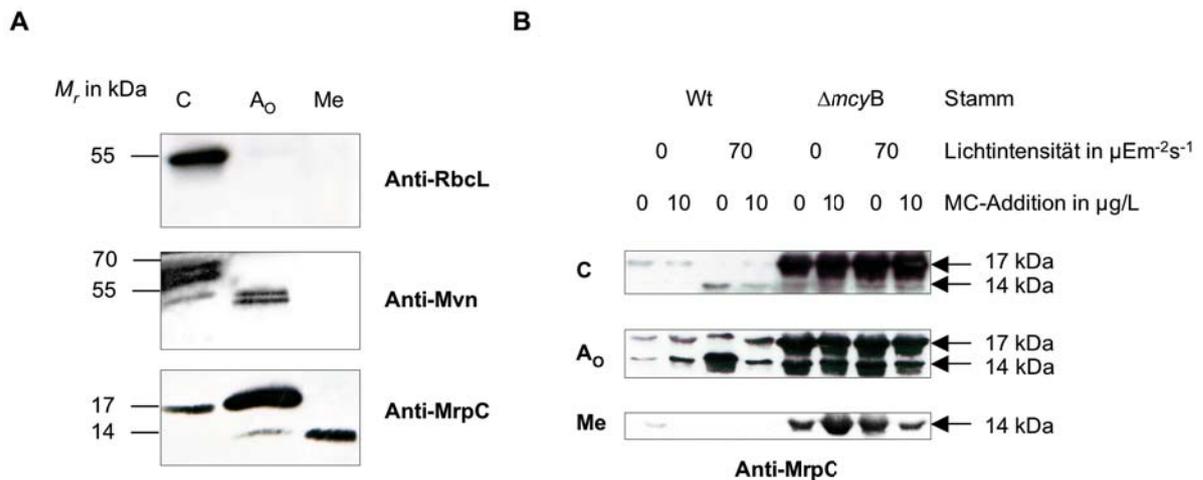
In einem 15 % SDS-PAA-Gel wurde cytosolischer Extrakt von PCC 7806/  $\Delta mcyB$  in unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen. Nach Transfer auf eine Membran wurde in einem Immunoblot so die Bindungsfähigkeit und -kapazität des gegen MrpC gerichteten AK getestet.

### 3.4.3.3 Expression von MrpC in zellulären und extrazellulären Extrakten

Mit Hilfe des AK konnte nun die Subzelluläre Lokalisierung, die Expression und die Modifizierung von MrpC in verschiedenen Extrakten von Wt und MC-freien Mutanten untersucht werden. Dazu wurden Medium-, zelloberflächenassoziierte und cytosolische Proteinfraction extrahiert. Da während der Probenaufbereitung eine

Vermischung einzelner Kompartimente mit anderen nicht auszuschließen war, wurden in Immunoblots gegen charakteristische Proteine die einzelnen Fraktionen auf ihre Reinheit geprüft. Dabei kann die Reinheit nur in entgegengesetzter Richtung zur sukzessiven Extraktion (2.4.1) gewährleistet werden, d.h. cytosolische Proteine sollten nicht in Zelloberflächen- und Mediumfraktion zu finden sein. Aufgrund dieser Methode könnten aber Medium- und/ oder Zelloberflächenproteine in der cytosolischen Fraktion detektiert werden. Dies erklärt, warum die bereits sezernierte Form von MrpC (17 kDa) in den cytosolischen Extrakten beobachtet wurde. Jedoch konnte RubisCO, als abundantes, cytosolisches Protein, nur in gleichnamiger Fraktion detektiert werden (Abb. 24/ A). Der AK gegen Microvirin (Mvn) wurde verwendet, um den zelloberflächenassoziierten Proteinextrakt abzusichern [282]. Dieser reagierte spezifisch mit Proteinen dieser Fraktion, aber nicht mit Proteinen der Mediumfraktion (Abb. 24/ A). Anschließend wurden die Membranen in Immunoblots gegen MrpC eingesetzt. Im cytosolischen Extrakt der  $\Delta mcyB$ -Mutante konnte die 17 kDa große Isoform detektiert werden (Abb. 24/ A). An der Zelloberfläche wurde sowohl die 17 kDa große Variante als auch die 14 kDa große Isoform erkannt (Abb. 24/ A). In der Mediumfraktion konnte nur die kleinere Größe beobachtet werden (Abb. 24/ A). Zusätzlich wurden zur Absicherung der Ergebnisse die 17 kDa-Bande des Cytosols, die 17 und 14 kDa-Banden der Zelloberflächenfraktion und die 14 kDa des Mediums mittels PSD analysiert. Alle vier Banden konnten eindeutig als MrpC identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch ließen auch hier die umfangreichen Modifizierungen eine einfache Identifizierung über MALDI-TOF nicht zu.

Die Analyse zeigte, dass die charakteristischen Proteine in den einzelnen Fraktionen vertreten waren und die Medium- und Zelloberflächenfraktionen nicht mit cytosolischen Proteinen kontaminiert waren.



**Abb. 24: Differentielle Expression von MrpC in PCC 7806/ Wt und PCC 7806/  $\Delta mcyB$**

In Immunoblots gegen RbcL, Mvn und MrpC wurden die subzellulären Fraktionen (C-Cytosol; A<sub>0</sub>-Zelloberfläche; Me-Medium) von PCC 7806/ Wt (Daten nicht gezeigt) und  $\Delta mcyB$ -Mutante (A) geprüft. Des Weiteren wurde in Immunoblots gegen MrpC die differentielle Expression des Proteins in Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante in der cytosolischen (10  $\mu$ g), extrazellulären (Zelloberfläche, 10  $\mu$ g) und Mediumfraktion (20  $\mu$ l) in Abhängigkeit von der Lichtintensität (2 h Exposition unter Starklicht- bzw. dunklen Bedingungen) und einer MC-Addition analysiert (B). Beide Isoformen von MrpC wurden jeweils mit einem Pfeil und entsprechender Größe gekennzeichnet.

Um den Einfluss von MC auf die Expression von MrpC näher zu beleuchten, wurden die subzellulären Extrakte von PCC 7806/ Wt und PCC 7806/  $\Delta mcyB$  in Immunoblots in Abhängigkeit von der Lichtintensität und einer MC-Addition vergleichend analysiert. Die generell stärkere Expression von MrpC in den MC-freien Mutanten konnte auch mittels dieser Methode gezeigt werden (Abb. 24; für  $\Delta mcyA$  und  $\Delta mcyH$  Daten nicht gezeigt). In der cytoplasmatischen Fraktion beider Stämme konnte vornehmlich die größere Isoform (17 kDa), in der extrazellulären Fraktion (Zelloberfläche) beide Isoformen und im Medium nur die kleinere Isoform (14 kDa) detektiert werden (Abb. 24). Während der Einfluss der Lichtintensität gering war, konnte durch Zugabe von MC (insbesondere zu Wt-Kulturen) die Abundanz der kleineren Isoform beeinflusst werden. Die Addition von MC bewirkte eine Repression der 14 kDa-Isoform unter Starklichtbedingungen und eine Induktion unter dunklen Bedingungen (Abb. 24). Zur Kontrolle der Äquivalenz der aufgetragenen Proteinmengen wurden Coomassie-Gele von sowohl cytosolischen als auch zelloberflächenassoziierten Proteinproben angefertigt. Sie zeigten eine gleich starke Färbung (Daten nicht gezeigt) und bestätigen damit die Effekte. Für die Mediumfraktionen konnte diese Äquivalenz aufgrund eines fehlenden Standards und der geringen Proteinmenge nicht nachgewiesen werden. Die Proben wurden jedoch analog aufgearbeitet und gleiche Volumina in der Gelelektrophorese eingesetzt.

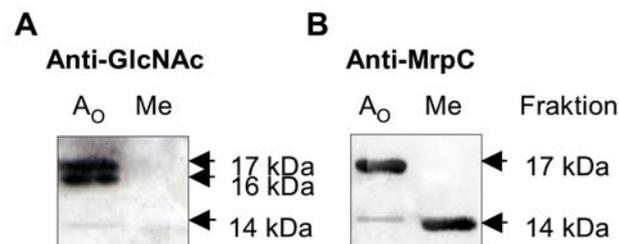
Die Analysen zeigten, dass die Abundanzen beider Isoformen von MrpC ganz wesentlich durch das Vorhandensein von MC in und außerhalb der Zellen bestimmt werden. Ebenso konnte MrpC auch in Extrakten anderer *Microcystis*-Stämme (MRD, MRC, CBS [253]) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

#### 3.4.3.4 Glycosylierung von MrpC

Die Serin- und Threonin-reiche Sequenz von MrpC und die in direkter Nachbarschaft lokalisierten, OGT-Domänen besitzenden Gene *slpA* und *slpB* lassen auf eine mögliche O-Glycosylierung des Proteins rückschließen (3.4.1). Diese Modifizierungshypothese wird zum einen durch den geringen Sequenzabgleich der trypsinierten Fragmente und zum anderen durch die größeren MW im Vergleich zum berechneten MW unterstützt (3.4.1). Neben GlcNAc-Modifizierungen treten noch weitere Glycosylierungen auf (S. Mikkat, persönliche Mitteilung). Der Glycosylierungsstatus von MrpC wurde in Western Blots mittels des *DIG Glycan Detection Kits* bestimmt. Die entsprechenden Kontrollen wurden mit positivem Ergebnis durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Neben Signalen im höher molekularen Bereich ( $\geq 30$  kDa) traten auch zwei spezifische Signale auf Höhe 17 kDa und 14 kDa in den Zelloberflächenfraktionen von Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante auf (Daten nicht gezeigt). Im Medium konnten dagegen nur einige der größeren Signalbanden ( $\geq 30$  kDa) detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse wurden durch vergleichende Immunoblots gegen MrpC und GlcNAc verifiziert (Abb. 25). In den Zelloberflächenfraktionen konnten auf Höhe sowohl von 17 kDa als auch von 14 kDa GlcNAc-Signale detektiert werden (Abb. 25). Zusätzlich wurde eine etwa 16 kDa große, glycosylierte Bande beobachtet, die nicht im Immunoblot gegen MrpC zu sehen war (Abb. 25). Keine GlcNAc-Signale konnten bei der im Medium lokalisierten Isoform (14 kDa) detektiert werden. Inwiefern das Vorhandensein von MC die Glycosylierung von MrpC beeinflusst, lässt sich aufgrund der geringeren Abundanz des Proteins im Wt und der hohen Detektionsgrenze beider Methoden nicht ableiten.

Die spezifischen Signale des GlcNAc-AK und das Vorhandensein von OGT-Domänen in *slpA* und *slpB* im Gencluster von *mrpC* sowie die Serin- und Threonin-reiche Sequenz unterstützen die Hypothese, dass MrpC über eine O-glycosidische Bindung von GlcNAc im posttranslationalen Status modifiziert wird. Die GlcNAc-Modifizierungen der Adhesine pathogener Bakterien sind von entscheidender

Bedeutung für die Zell-Wirtszell-Wechselwirkung (4.4.2). Inwiefern diese Glycosylierungen für die Stabilität und Aktivität von MrpC sowie für Zell-Zell-Interaktionen von Bedeutung sind, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Mutagenesen von *mrpC* (z.B. Einführung von Punktmutationen in Glycosylierungsbereichen) und von *slpA* und *slpB* (Knockouts) sowie eine gemeinsame heterologe Genexpression waren bisher erfolglos.



**Abb. 25: Glycosylierung von MrpC**

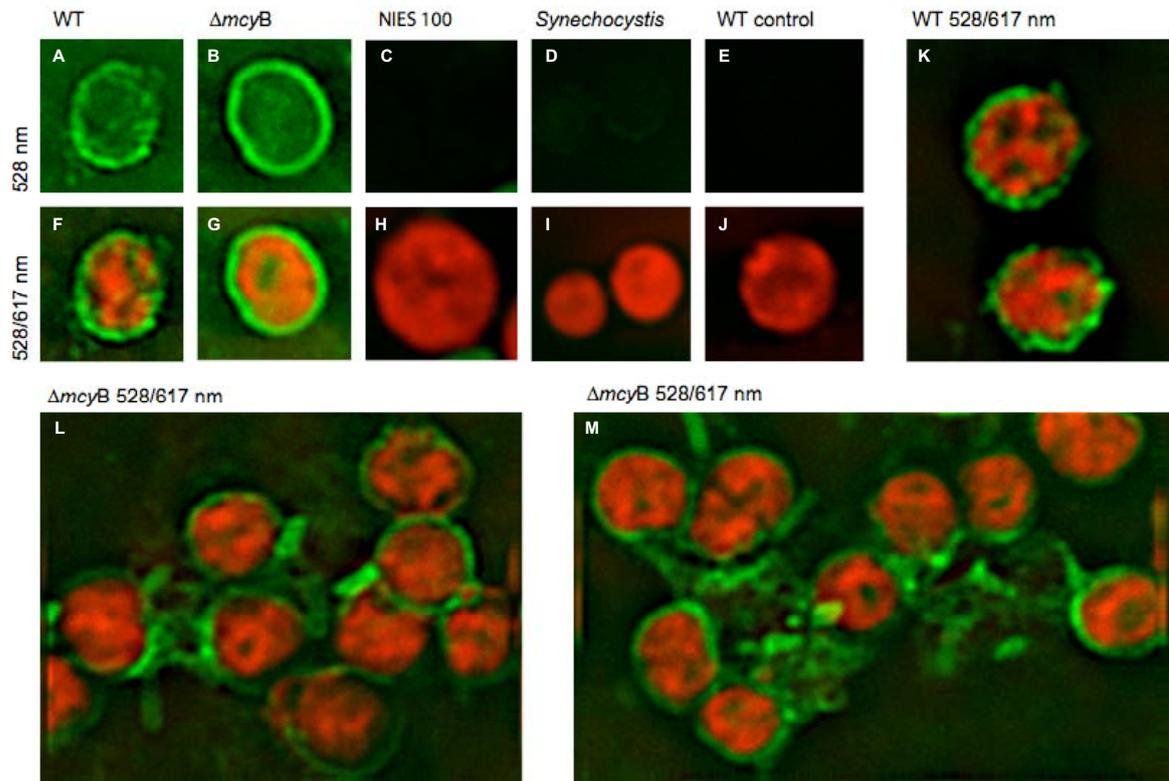
In Immunoblots gegen GlcNAc (A) und MrpC (B) wurde der Glycosylierungsstatus von MrpC an der Zelloberfläche (A<sub>0</sub>) und im Medium (Me) analysiert (15% SDS-PAA-Gele; Peroxidase-Assay). Dabei wurden 10 µg Zelloberflächenextrakt und 20 µl Mediumextrakt der PCC 7806/  $\Delta mcyB$ -Mutante eingesetzt.

#### 3.4.4 *In situ*-Analyse von MrpC

Aufgrund der posttranslationalen Modifizierungen (Signalpeptid, Glycosylierung) und des Exports an die Zelloberfläche bzw. ins Medium könnte MrpC eine extrazelluläre Funktion in *Microcystis* haben. Als Medium- oder an die Zelloberfläche assoziierter Faktor könnte MrpC, ähnlich den Adhesinen pathogener Bakterien, in Zell-Zell-Interaktionen involviert sein. Dies sollte durch Lokalisationsstudien und Additionsexperimente näher beleuchtet werden.

Mit Hilfe des MrpC-AK und eines FITC-markierten AK konnte das Protein auch *in situ* an einem Immunofluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden (Abb. 26). Beim Vergleich der Bilder war die starke Abundanz des Proteins in der Mutante ( $\Delta mcyB$ ) im Vergleich zum Wt (PCC 7806) deutlich sichtbar. MrpC-Signale konnten dabei an der Zelloberfläche in Form einer Corona beobachtet werden. Als Negativkontrollen dienten *Synechocystis* PCC 6803 und der nicht-toxische *Microcystis*-Stamm NIES 100. Des Weiteren wurde zur Kontrolle eine Probe von PCC 7806/ Wt ohne AK inkubiert. Hier konnte, wie in allen Bildern, nur die Autofluoreszenz der grünen Zellen detektiert werden. Ebenso ist die verstärkte Abundanz des Proteins im Medium der MC-freien Mutanten auch *in situ* sichtbar. MrpC scheint hierbei eine zellvernetzende

Wirkung zu haben. Möglicherweise führt die erhöhte Sekretion von MrpC in den MC-freien Mutanten zu dem verstärkten Aggregationsverhalten dieser Zellen, das bereits durch Dittmann *et al.* und Tillett *et al.* beobachtet worden ist [98, 299].



**Abb. 26: In situ-Lokalisation von MrpC**

Mittels Immunofluoreszenz wurden die grünen FITC-Signale (Emissionsfilter 528 nm) zum Nachweis von MrpC in *Microcystis* PCC 7806/ Wt (A, F, K) und *Microcystis* PCC 7806/  $\Delta mcyB$  (B, G, L, M) detektiert. Als Negativkontrollen dienten *Microcystis* NIES 100 (C, H), *Synechocystis* PCC 6803 (D, I) und *Microcystis* PCC 7806 ohne eine AK-Inkubation (E, J). Zusätzlich wurde die Autofluoreszenz der Zellen (rote Fluoreszenz; Emissionsfilter 617 nm) dokumentiert (F-M).

Weiterhin wurde MrpC erfolgreich in *E.coli* exprimiert (Daten nicht gezeigt). Der rekombinante MrpC-Extrakt und das über eine Ammoniumsulfatfällung aus dem Medium von PCC 7806/  $\Delta mcyB$  gewonnene Protein wurden in Additionsexperimenten ( $c_{\text{End}} = 0,5 \text{ mg/L}$ ) eingesetzt. Sowohl unter der Stereolupe als auch unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten keine morphologischen Veränderungen innerhalb von zwei Stunden bei PCC 7806/ Wt, PCC 7806/  $\Delta mcyB$  sowie dem toxischen und kolonieformenden *Microcystis*-Stamm 4C4 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ebenso brachten Einzel- und kombinierte Zugaben von MrpC-AK und MrpC keine Effekte (Daten nicht gezeigt).

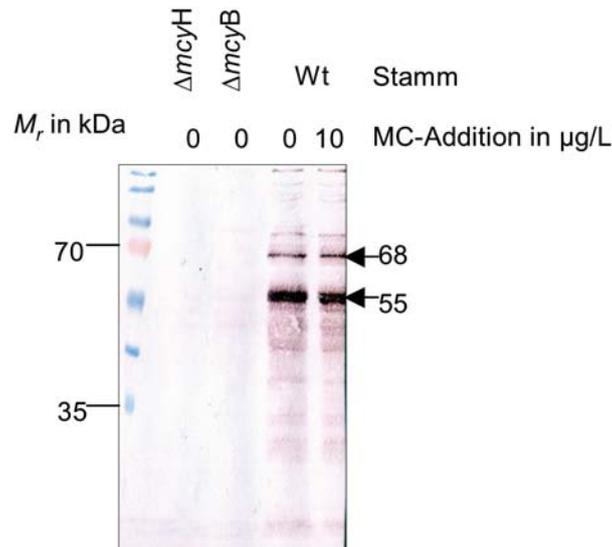
Die Lokalisationsstudien unterstützen die Hypothese, dass MrpC als Zelloberflächenfaktor in *Microcystis* agiert. Aufgrund der genetischen Umgebung von

*mrpC*, der Parallelen zu Adhesinen pathogener Bakterien und der engen Korrelation zwischen toxischen Genotypen und dem Auftreten des *mrpC*-Gens innerhalb der Gattung *Microcystis* einerseits und der Expression und Prozessierung dieses Hauptoberflächenproteins andererseits bleibt MrpC ein potentielles Schlüsselprotein bei der Aufklärung der Funktion der MC in *Microcystis*-Zell-Zell-Interaktionen.

### 3.5 MC-Bindungsanalysen

#### 3.5.1 Bindungsfähigkeit der MC an zelluläre Proteine

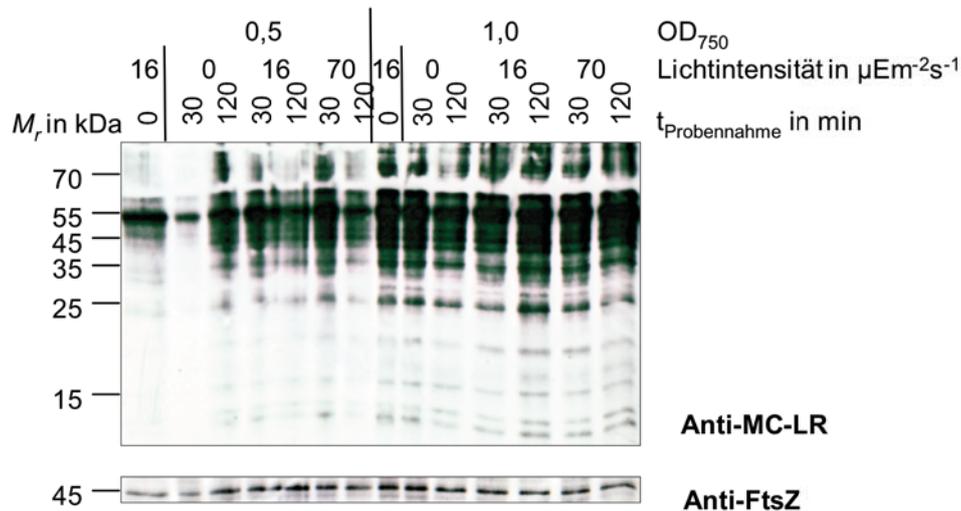
Die differentielle Expression einiger mittels 2D selektierter Kandidaten (Zelloberflächenproteine, Calvin-Enzyme) könnte auf eine direkte Interaktion mit MC zurückzuführen sein. Lokalisationsstudien zeigten, dass der größte Teil der synthetisierten MC sich an distinkten Orten (Nukleoplasma, Thylakoidmembranen, Carboxysomen, Polyphosphatkörperchen) in den Zellen befindet [293, 294, 328]. Nur kleine Mengen werden ins Medium abgegeben [128, 324, 329]. Möglicherweise bindet MC, ähnlich des Mechanismus der Inhibition von PP (siehe Einleitung), über den Dehydroalaninrest an die Cysteinreste bestimmter Proteine. Dies beeinflusst vermutlich die Abundanz und Aktivität der Proteine. Unter Verwendung eines spezifischen AK gegen MC wurde eine mögliche Protein-MC-Wechselwirkung untersucht (Abb. 27). Als Kontrollen dienten Proteinextrakte MC-freier Mutanten (Abb. 27) und *Synechocystis* spp. PCC 6803 (Daten nicht gezeigt). Während in den Negativkontrollen keine Banden zu sehen waren, konnten in den Wt-Extrakten trotz denaturierender (SDS) und reduzierender ( $\beta$ -Mercaptoethanol) Bedingungen mehrere starke MC-Signale detektiert werden (insbesondere auf Höhe von 55 und 68 kDa) (Abb. 27). Da MC eine Größe von circa 1 kDa hat (4.2.1.1), können diese höher molekularen Banden nur auf eine Wechselwirkung des Peptids mit zellulären Proteinen zurückzuführen sein.



**Abb. 27: Anti-MC-LR Immunoblotanalyse von PCC 7806/ Wt und PCC 7806/  $\Delta mcyB$**

In Immunoblots gegen MC wurden die cytosolischen Extrakte von PCC 7806/ Wt (10  $\mu\text{g}$ ) mit denen der MC-freien Mutanten PCC 7806/  $\Delta mcyB$  (10  $\mu\text{g}$ ) und  $\Delta mcyH$  (10  $\mu\text{g}$ ) verglichen (10 % SDS-PAGE; Alkalischer Phosphatase-Assay).

Die intrazelluläre MC-Konzentration ändert sich während des Wachstums von PCC 7806 in Abhängigkeit vom Licht [113]. Ob diese Variation sich in einem unterschiedlichen Bindungsmuster bzw. in unterschiedlichen Bindungsstärken widerspiegelt, wurde in Immunoblots gegen MC und FtsZ (Standard) geprüft. Beim Vergleich von Extrakten niedriger Zelldichte ( $\text{OD}_{750}$  0,5) mit denen höherer Zelldichte ( $\text{OD}_{750}$  1,0) nahm die Quantität und Qualität des Signalmusters bis auf die 55 kDa-Bande zu (Abb. 28). Letztere zeigte bei beiden Zelldichten ein etwa gleich starkes Signal. Eine 30-minütige oder 2-stündige Exposition unter Stark-, Schwachlicht oder bei Dunkelheit zeigte jedoch keine Effekte. Die Zugabe von MC zu den Kulturen brachte auch keine Veränderungen im Bindungsmuster (Daten nicht gezeigt). Ebenso konnten per HPLC keine Veränderungen in der MC-Konzentration detektiert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 28: Anti-MC-LR-Immunoblotanalyse von PCC 7806/ Wt unter verschiedenen Lichtbedingungen und Zelldichten**

MC-bindende Proteine in cytosolischen Extrakten von PCC 7806/ Wt wurden in einer Immunoblotanalyse mit Hilfe eines gegen MC gerichteten AK detektiert. PCC 7806/ Wt wurde dazu unter Schwachlichtbedingungen ( $16 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) bis zu einer  $\text{OD}_{750}$  von 0,5 und 1,0 angezogen und dann für 2 h unter dunklen ( $0 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), Schwachlicht- ( $16 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) und Starklichtbedingungen ( $70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) exponiert. Die Probennahme erfolgte nach 0, 30 und 120 min.

Die Immunoblotanalysen zeigten, dass MC möglicherweise zelluläre Bindepartner besitzen. Im Folgenden sollten diese MC-bindenden Proteine identifiziert und verifiziert werden.

### 3.5.2 Selektion und Identifizierung der potentiellen MC-Bindepartner

Die im Immunoblot gegen MC detektierten Proteine könnten potentielle Bindepartner der MC auch *in vivo* sein. Die Identifizierung dieser Kandidaten stand in den nächstfolgenden Analysen im Vordergrund. Dazu wurden MC-Signale der Immunoblots von 2D-Gelen auf die entsprechenden, parallel gelaufenen, mit Coomassie gefärbten Gele projiziert. Die betreffenden Spots wurden gepickt und identifiziert (Tab. 10). Dieses Verfahren wurde mit Wt-Proben von zwei unterschiedlichen Belichtungsversuchen durchgeführt. Weiterhin wurden eine Immunopräzipitation und eine Kopplungsanalyse durchgeführt (Tab. 10). Über die Wechselwirkung von AK und MC wurde hierbei versucht, die entsprechenden Bindepartner zu eluieren und anschließend mittels MALDI-TOF zu identifizieren.

Von je 10 in beiden 2D-Analysen gepickten Spots konnten 4 in der ersten und 5 in der zweiten eindeutig identifiziert werden (Tab. 10). Aus Gelen der Immunopräzipitate wurden ebenfalls 10 Banden ausgeschnitten. Diese wurden jedoch in der MALDI-TOF-Analyse durch die Immunglobuline des AK überlagert. Im Eluat der

Kopplungsanalyse konnten nur zwei Proteine detektiert werden, die als Phycobiliproteine CpcA und CpcB erkannt wurden (Tab. 10). Durch die 2D-Analysen wurde ebenfalls ein Phycobiliprotein (CpcA) sowie RubisCO, die Phosphoribulokinase, die Glutathionreduktase und die Hypothetischen Proteine mit der IPF-Nr. 5227.1 und 604.1 identifiziert (Tab. 10). Letzteres Protein wurde in beiden voneinander unabhängigen Analysen gefunden. RubisCO konnte zum einen in Form der großen Untereinheit (RbcL) und in Form der kleinen Untereinheit (RbcS) bestätigt werden.

Tab. 10: Identifizierung potentieller MC-bindender Proteine

Stoffwechselweg/ Protein	2D-Analyse (I)		2D-Analyse (II)		Kopplungsanalyse	
	Protein	Score	Protein	Score	Protein	Score
<b>Photosynthese</b>	Phycobiliproteine	CpcA	159, 149			
	RubisCO	RbcL <sup>5</sup>	107	RbcS	108	CpcA, CpcB
	Phosphoribulokinase			Prk	74	105, 64
<b>Hypothetisch</b>						
	IPF 604.1	604.1	61	604.1	88	
	IPF 5227.1			5227.1	183	
<b>Biosynthese Carrier</b>						
	Glutathionreduktase			Gor	94	

In der Tabelle sind die MALDI-TOF-Ergebnisse der identifizierten Spots (mit Score) aus beiden unabhängigen 2D-Analysen und der Kopplungsanalyse dargestellt.

Als potentielle MC-bindende Proteine wurden in photosynthetische Prozesse involvierte Proteine wie die Phycobiliproteine, die RubisCO, die Phosphoribulokinase, ein bei der Biosynthese von Cofaktoren fungierendes Enzym – die Glutathionreduktase – und zwei Hypothetische Proteine mit der IPF-Nr. 5227.1 und 604.1 selektiert. Die enge Verbindung dieser Proteine mit dem MC wurde durch die proteomischen Expressionsstudien gestützt (siehe Diskussion). Alle ermittelten Bindepartner wurden auch differentiell in PCC 7806/ Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante gefunden (Tab. 11). Neben hypothetischen Proteinen sind lichtabhängige Proteine, wie RubisCO, Phosphoribulokinase und Phycobiliproteine, potentielle Interaktionspartner des MC.

Die Bestätigung dieser Proteine über zwei unabhängige experimentelle Studien lassen auf eine hohe MC-Implikation schließen. Möglicherweise ist die differentielle Abundanz dieser Kandidaten in Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante, auf eine direkte Wechselwirkung mit MC zurückzuführen. Die Wechselwirkung sollte im Folgenden näher untersucht werden.

<sup>5</sup> Diese Proteinprobe enthielt auch Fragmente der  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase (AtpD) mit einem Score von 85.

Tab. 11: Gemeinsamkeiten des 2D- und des Bindungspartnerselektionsprojekts

Stoffwechselweg	Wt vs. Mutanten	MC-Bindungspartner
<b>Photosynthese (Lichtreaktion)</b>		
	ATP-Synthase	AtpD
	Phycobiliproteine	CpcA, Cpcl
		CpcA, CpcB
<b>Photosynthese (Dunkelreaktion)</b>		
<b>Calvin-Zyklus</b>		
	RubisCO	RbcS, RbcL
	Phosphoribulokinase	Prk
	Fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	GlpX/ Fbpl
	Fructose-bisphosphat-Aldolase	FbaA
<b>CO<sub>2</sub>-Konzentrierung</b>		
	Carbon concentrating mechanism Protein	CcmK
<b>Regulatoren</b>		
	CP12 <sub>alternativ</sub>	Alr0765/ ORF 2164.1 Alr0765/ ORF 3982.1
<b>Biosynthese Cofaktoren &amp; Carrier</b>		
	Glutathion-Reduktase	Gor
		Gor
<b>Hypothetische Proteine</b>		
		IPF 604.1
	Chloroperoxidase	IPF 5227.1
		IPF 5227.1

Gegenübergestellt sind die Proteine der Stoffwechselwege, die zum einen differentiell in PCC7806/ Wt und PCC7806/  $\Delta$ mcyB exprimiert worden sind und zum anderen als potentielle Microcystin-bindende Kandidaten selektiert worden sind.

### 3.5.3 Verifizierung der Bindungspartner *in vitro* – MC-Bindungsassays

#### 3.5.3.1 Vorbetrachtungen/ Vorversuche zum Mechanismus der möglichen MC-Protein-Interaktion

Proteinbindungsstudien von MC wurden bisher nur mit eukaryotischen Zellextrakten zur Aufklärung der Toxizitätsmechanismen durchgeführt. Die hepatotoxische Wirkung beruht hauptsächlich auf einer Inhibition der Proteinphosphatasen 1 und 2A (PP1/ PP2A) [164, 169, 170, 173, 178, 180, 330, 331, 332, 333, 334, 335]. Über eine Michaelis-Addition entsteht zwischen der Thiolgruppe eines Cystein-Restes der PP (Cys<sub>273</sub>) und dem Methyl-Dehydroalanin-AS-Rest (Mdha) des MC eine kovalente Bindung [168]. Dabei bindet MC mit extrem hoher Affinität an diesen in allen PP1/ PP2A-Familien konservierten Bereich [168]. Diese Interaktion kann nicht durch eine Hitzeinkubation oder eine Behandlung mit Proteasen, DTT, SDS und Säuren gelöst werden [336].

Analog zum Mechanismus in Eukaryoten könnten bestimmte Cystein-Reste in bakteriellen Proteinen potentielle Bindungsstellen des MC sein. Daher wurde ein Teil der in 3.5.2 und 3.2.2 selektierten Kandidaten auf ihren Cystein-Gehalt untersucht (Tab. 12). Im Vergleich mit nicht-toxischen *Microcystis*-Stämmen und anderen Cyanobakterien wurden die Anzahl und das Auftreten dieser AS-Reste ermittelt (Tab. 12). Diese könnten die putativen Bindestellen der MC in toxischen Stämmen darstellen. Cysteine enthielten folgende Proteine: RubisCO (RbcL),

Phosphoribulokinase (Prk),  $\beta$ -UE der ATP-Synthase (AtpD) und vereinzelt auch das 32,1 kDa- Phycocyanin-assoziiertes-linker-Polypeptid (Cpcl). Mit bis zu 12 Cysteinen in *Microcystis* und *Crocospaera*<sup>6</sup> ist RbcL eines der Cystein-reichsten Proteine überhaupt. Keines der Cysteine von RbcL war jedoch in anderen Cyanobakterien (bis auf ein Cystein in *Thermosynechococcus*) einmalig vorhanden. Je eines der in Prk und in AtpD detektierten Cysteine von *Microcystis* PCC 7806 war ein Unikat. Diese zusätzlichen Cysteine wurden auch noch in der Prk-Sequenz eines *Prochlorococcus*-Stammes (MIT 9313) und von *Gloeobacter* gefunden. Zusätzliche Cysteinreste in Phycobiliproteinen waren stets die Ausnahme (nur bei Cpcl von PCC 7806 und *Thermosynechococcus* BP-1).

Tab. 12: Vergleich der Zahl der Cysteinreste in RbcL-, Prk-, AtpD- und Cpcl-AS-Sequenzen verschiedener Cyanobakterien

Spezies/ Stamm	MC-Produzent	RbcS	RbcL	Prk	AtpD	CpcA	Cpcl	IPF 604.1	IPF 5227.2
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	+	3/ 0	12/ 0	5/ 1	2/ 1	2/ 0	1/ 1	2/ 2	0
<i>Synechocystis</i> spp. PCC 6803	-	3/ 0	11/ 0	4/ 0	1/ 0	1/ 0	0	∅	∅
<i>Nostoc</i> spp. PCC 7120		2/ 0	7/ 0	4/ 0	0	2/ 0	0	∅	1/ 1
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	+	2/ 0	7/ 0	4/ 0	0	2/ 0	0	2/ 2	∅
<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	+	2/ 0	7/ 0	4/ 0	0	2/ 0	0	0	1/ 1
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	-	5/ 1	9/ 1	4/ 0	1/ 0	2/ 0	1/ 1	∅	∅
<i>Synechococcus</i> spp. WH 8102	-	1/ 0	9/ 2		1/ 1	2/ 0		∅	∅
<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS 101	-	3/ 0	10/ 0	4/ 0	0	2/ 0		∅	∅
<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	-	4/ 0	10/ 0	5/ 3	1/ 0	2/ 0	0	∅	∅
<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501		2/ 0	12/ 0		1/ 0	2/ 0		∅	∅
<i>Prochlorococcus marinus</i> MED 4	-	1/ 0	11/ 0	2/ 0	0	2/ 0		∅	∅
<i>Prochlorococcus marinus</i> SS 120	-	1/ 0	11/ 0	2/ 0	0	2/ 0		∅	∅
<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT 9313	-	1/ 0	11/ 0	3/ 1	1/ 0	2/ 0		∅	∅

Sequenzen von RbcL, Prk, AtpD und Cpcl verschiedener Cyanobakterienstämme wurden miteinander bezüglich der Anzahl (erste Zahl) und Lokalisation der Cysteinreste innerhalb der Sequenz verglichen. Wurden zusätzliche Cysteine detektiert, die nicht in anderen Stämmen vorkamen, wurde dies in Form der zweiten Zahl erwähnt (hervorgehoben durch eine Rotmarkierung). Lagen keine Cysteinreste vor, wurden diese mit einer 0 gekennzeichnet; Konnten keine entsprechenden Gene detektiert werden, wurde dies mit dem Symbol ∅ markiert; Lagen keine Sequenzen vor, blieb das betreffende Feld frei. Des Weiteren wurden die MC-Produzenten hervorgehoben (+).

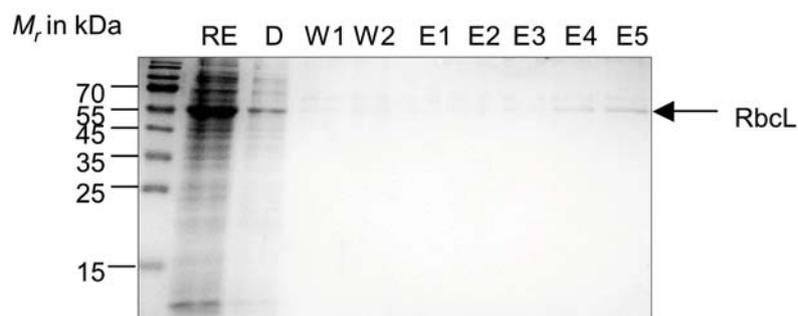
Möglicherweise unterscheiden sich toxische und nicht-toxische *Microcystis*-Stämme in der Zahl der Cysteine. Sequenzvergleiche von *rbcL* zeigten jedoch keine einzige AS-Substitution (DNA-Lösungen freundlicherweise durch A. M. Castets zur Verfügung gestellt, Pasteur Institut/ Paris; siehe Anhang C).

<sup>6</sup> Das *Crocospaera*-Genom-Sequenzierungsprojekt ist ebenfalls noch nicht abgeschlossen. Alle Analysen haben daher einen vorläufigen Status.

*Microcystis* PCC 7806 besitzt im Vergleich mit anderen Cyanobakterien die meisten Cysteine in den AS-Sequenzen von RbcL, Prk, AtpD und Cpcl. In der Sequenz der letzten drei Proteine gab es immer ein Unikat. Ob diese oder auch andere, konservierte Cysteinreste potentielle Bindestellen des MC sind, könnte durch geeignete Punktmutationen im MC-bindenden Protein oder durch ein am Dehydroalanin-Rest modifiziertes MC überprüft werden (4.2.2).

### 3.5.3.2 *In vitro*-Bindungsassays von MC an RubisCO

Einige der über MALDI-TOF identifizierte Bindepartner des MC (3.5.2) sollten in *E.coli* heterolog exprimiert werden, um diese in anschließenden Assays auf ihre Bindungskapazität zu prüfen. Für diese Versuche wurden die große Untereinheit der RubisCO, die Phosphoribulokinase, die  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase und der IPF 604.1 erfolgreich in den *E. coli*-Expressionsstamm BL-21 kloniert und exprimiert (Daten nicht gezeigt). Die Proteine wurden unter nativen Bedingungen aufgereinigt (RbcL: Abb. 29).

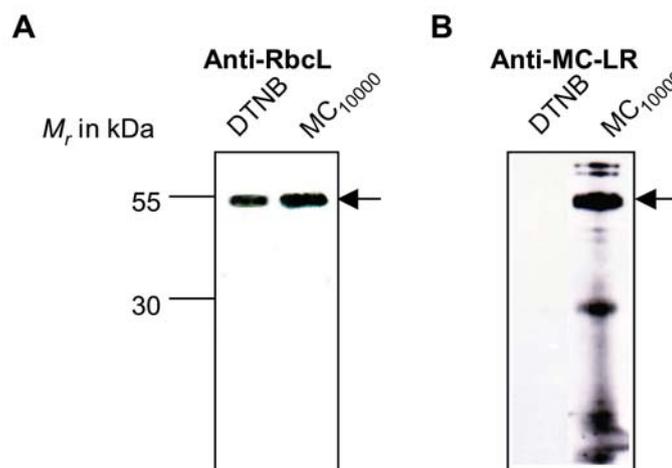


**Abb. 29: Native Aufreinigung von RbcL**

RbcL (PCC 7806) wurde nach Fusion mit 6 Histidinresten am N-terminus in *E.coli* BL21 exprimiert, über eine  $\text{Ni}^{2+}$ NTA-Agarose unter nativen Bedingungen aufgereinigt (RE - Rohextrakt, D - Durchlauf, W1/ W2 - Waschungen, E1 bis E5 - Eluate) und im 12,5 % SDS-PAA-Gel mit anschließender Coomassiefärbung analysiert. RbcL ist mit einem Pfeil im Coomassie-gefärbten Gel markiert. Das Protein konnte auch in Immunoblots der einzelnen Fraktionen mittels eines AK gegen RbcL sowie Polyhistidine identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Nach Entfernung des Imidazols und Umpufferung mittels Dialyse wurde etwa 700 ng (ad 2 ml) rekombinantes Protein für die Assays verwendet. Dabei wurde versucht, den Redoxzustand der Cysteine über die Zugabe von Oxidationsmitteln (DTNB) bzw. Reduktionsmitteln (DTT) zu beeinflussen. Vorlage für die Bindungsassays waren die Versuche von Marcus *et al.* [337]. Dazu wurden die Proben mit DTNB (Blockierung der Cysteinreste, Oxidationsmittel) oder MC für 1 h bei 30 °C behandelt. Anschließend wurden die Fraktionen mit DTT inkubiert.

Immunoblots gegen MC einerseits und gegen das rekombinante Protein andererseits sollten die Bindung verdeutlichen. Dies konnte in den so konzipierten Assays nur für die große Untereinheit der RubisCO (RbcL) erfolgreich gezeigt werden (Abb. 30). Im Immunoblot gegen RbcL und im Immunoblot gegen MC waren die Signale auf gleicher Höhe (Abb. 30/ A & B). Ohne MC-Zugabe konnte zwar RubisCO, aber nicht MC detektiert werden (Abb. 30/ A & B).



**Abb. 30: MC-Bidungsassay mit rekombinantem RubisCO-Enzym (RbcL)**

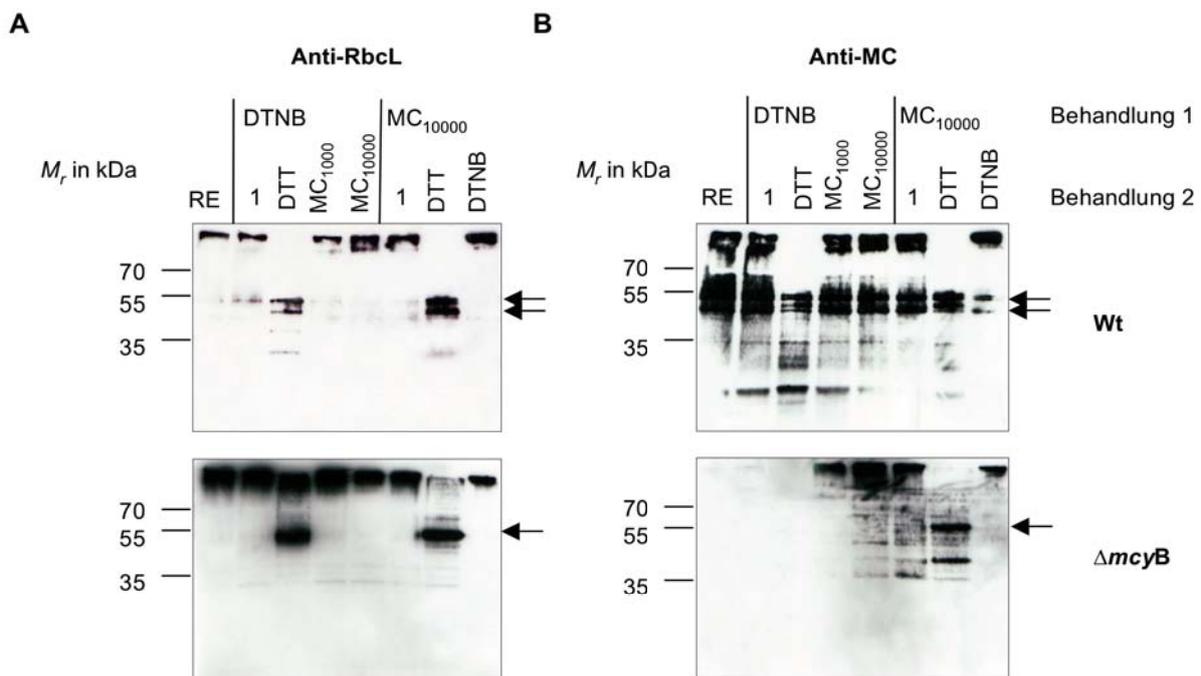
Nach Aktivierung der RubisCO wurde die Probe geteilt und je mit DTNB (1 mM) und MC (10000 µg/L) behandelt (1 h, 30°C). Nach einer weiteren Aliquotierung wurden die Proben mit DTT (5 mM) für 1 h bei 30°C inkubiert. Nach anschließender Hitzeinaktivierung wurden die Proteine in einem 12,5 % SDS-PAA-Gel aufgetrennt und in Immunoblots gegen MC (B) und gegen die große Untereinheit der RubisCO (A) analysiert. Einander entsprechende Größen (RbcL-His<sub>6</sub>: ~ 55 kDa) in beiden Immunoblots wurden mit einem Pfeil hervorgehoben.

Durch *in vitro*-Assays mit rekombinant in *E. coli* exprimiertem Protein (RbcL) konnte eine Bindung von MC an RubisCO gezeigt werden.

### 3.5.3.3 *In vivo*-Bindungsassays von MC an RubisCO

Eine Bindung von MC an RubisCO konnte *in vitro* (3.5.3.2) bereits gezeigt werden und sollte nun auch *in vivo* überprüft werden. Dazu wurden Proben von PCC 7806/ Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante verwendet. Die Proteinextrakte wurden mittels Dialyse umgepuffert. Die Assays wurden entsprechend des Konzepts in 3.5.3.2 durchgeführt. Jedoch wurden nach der DTNB- bzw. MC-Inkubation die Proben aliquotiert, und neben DTT auch DTNB und MC (verschiedene Konzentrationen) den jeweiligen

Proben hinzugefügt. Nicht mit DTT-behandelte Proben trennten sich jedoch aufgrund der schwachen denaturierenden Bedingungen schlechter im SDS-PAA-Gel auf. Sowohl im Wt als auch in der Mutante konnte RbcL in allen DTT-behandelten Proben mit einer Größe von etwa 52 kDa detektiert werden (Abb. 31/ A). MC-Signale in DTT-behandelten Proben konnten in der  $\Delta mcyB$ -Mutante nur nach vorheriger Inkubation mit MC auf exakt der gleichen Höhe von RbcL nachgewiesen werden (Abb. 31/ B). Im Wt traten neben anderen Banden auf Höhe von RbcL Signale (~ 52 kDa) im Immunoblot gegen MC auf. Jedoch werden auch die weiteren, typischen MC-Signalbanden detektiert (Vergleiche Abb. 27). Die entsprechenden Signale in allen nicht mit reduzierendem Agens behandelten Proben konnten meist nur in höher molekularer Form detektiert werden. Die Mutantenproben waren auch hier eine gute Kontrolle. Nur in mit MC inkubierten Extrakten konnten MC-Signale beobachtet werden (Abb. 31/ B).



**Abb. 31: MC-Bindungsassays von Proteinextrakten aus PCC 7806/ Wt, PCC 7806/  $\Delta mcyB$**

Cytosolische Extrakte von PCC 7806/ Wt und PCC 7806/  $\Delta mcyB$  wurden nach Umpufferung in RubisCO-Aktivierungspuffer für 30 min bei 30°C inkubiert (Aktivierung von RubisCO). Anschließend wurden die Proben mit DTNB (1 mM) bzw. MC (10000  $\mu\text{g/L}$ ) behandelt (1 h, 30 °C) (Behandlung 1/1). Nach einer weiteren Aliquotierung wurden die Proben je mit DTT (5 mM), DTNB (1 mM) oder MC (1000 und 10000  $\mu\text{g/L}$ ) ebenfalls für 1 h bei 30°C inkubiert (Behandlung 2). Nach anschließender Hitzeinaktivierung in entsprechendem Ladepuffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol wurden die Proteine in einem 12,5 % SDS-PAA-Gel aufgetrennt und in Immunoblots gegen MC (B) und gegen RubisCO (A) analysiert. Einander entsprechende Größen (RbcL: ~ 52 kDa) in den Immunoblots wurden mit einem Pfeil hervorgehoben.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch *in vivo* MC möglicherweise an RubisCO bindet. Ob diese Interaktion spezifischer Natur ist, bleibt jedoch offen.

Analoge Bindungsassays mit einem nicht-toxischen *Microcystis*-Stamm (NIES 98) und *Synechocystis* PCC 6803 zeigten, dass MC auch hier an Proteine bindet. Während die MC-Signale in *Synechocystis*-Extrakten eher unspezifischer Art waren konnten in NIES 98-Extrakten auf Höhe der RbcL-Banden ebenso MC-Signale detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise konnten letztere nur bei einer Erstbehandlung mit MC jedoch nicht bei voriger DTNB-Behandlung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise blockiert DTNB die freien Cysteine, so dass MC in einer sekundären Behandlung nicht binden kann. Dies unterstützt unsere Hypothese von einer möglichen Bindung der MC an die Cysteinreste der großen Untereinheit der RubisCO. Dieser Bindungsmechanismus liegt vermutlich auch bei anderen Protein-MC-Wechselwirkungen zugrunde. Die Spezifität dieser Bindung könnte durch entsprechende Punktmutationen im Zielprotein untersucht werden.

## 4 Diskussion

Die Idee mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden der physiologischen Funktion von MC in *Microcystis* näher zu kommen, konnte in dieser Arbeit erstmals umfassend umgesetzt werden. Durch sie konnten existierende Thesen geprüft bzw. neue Theorien entwickelt werden. Diese Dissertationsschrift kann sowohl methodisch als auch durch die gewonnenen Erkenntnisse den Grundstock für nachfolgende Studien bilden.

### 4.1 Grundelemente der molekularen MC-Funktionsanalyse in *Microcystis* PCC 7806

#### 4.1.1 Knockout-Mutanten

Die Funktion der MC wurde oft über den Vergleich von toxischen und nicht-toxischen *Microcystis*-Stämmen untersucht. Obwohl aus phylogenetischer Sicht die einzelnen Stämme eng miteinander verwandt sind [28, 338], unterscheiden sie sich nicht nur hinsichtlich der Produktion von MC [245, 288, 302], sondern auch von anderen nicht-ribosomalen Peptiden [285, 339] und vermutlich auch im Proteinspektrum. Mit dem erfolgreichen Knockout mehrerer Biosynthesegene in *Microcystis* [98, 107, 299] ist es erstmals möglich, über den Vergleich von Wt und Mutanten Phänotypen zu untersuchen, die ausschließlich auf diesen genetischen Unterschied zurückzuführen sind. Veränderungen auf molekularer, zellulärer sowie morphologischer Ebene geben Aufschluss über die intraspezifische Funktion von MC in *Microcystis*. Diese Effekte müssten durch eine Remutagenese der MC-freien Mutanten bestätigt werden. Nach Komplementation der Mutation über eine erneute Rekombination des intakten Gens bzw. über einen *plasmid-rescue* müsste sich der Wt-Phänotyp zeigen. Somit wäre bewiesen, dass die Effekte ausschließlich auf die Wirkung der MC zurückzuführen sind. Aufgrund der geringen Transformationsrate von *Microcystis* waren diese Versuche bisher erfolglos. Limitierend hierbei ist die große Zahl an Restriktionsendonukleasen [340]. Um trotzdem sichere Aussagen treffen zu können, wurden in die Analyse alle drei, voneinander unabhängigen Mutanten ( $\Delta mcyA$ ,  $\Delta mcyB$ ,  $\Delta mcyH$ ) einbezogen [98, 107, 299]. Eine weitere Möglichkeit der molekularen Funktionsanalyse ist die heterologe Genexpression. Aufgrund der

enormen Größe des *mcy*-Clusters (55 kb in PCC 7806) ist diese Art der Analyse, mit den zurzeit möglichen gentechnischen Methoden auszuschließen. Lediglich Einzelenzyme des Multienzymkomplexes konnten erfolgreich in *Synechocystis* exprimiert und deren Aktivität bestimmt werden [105].

Mit der Fokussierung der Funktionsanalyse auf den *M. aeruginosa*-Stamm PCC 7806 sind im Vorfeld Einschränkungen gegeben. Dieser Stamm ist erstens nicht mehr in der Lage, das für *Microcystis* typische Kolonieverhalten auszuführen. Der Verlust sozialer Verhaltensweisen unter artifiziellen Bedingungen wird auch in anderen Bakterien beschrieben [341]. Implikationen zwischen MC und dem Kolonieverhalten können daher nur eingeschränkt abgeleitet werden. Zweitens wird mit *M. aeruginosa* PCC 7806 ein bestimmter toxischer Morphotyp (*M. aeruginosa*) und drittens ein bestimmter Chemotyp (MC; Cyanopeptolin [342, 343]; Aeruginosin – K. Ishida, persönliche Kommunikation; Microcyclamid – N. Ziemert, persönliche Kommunikation) gewählt. Letzterer bedingt nicht nur ein bestimmtes Spektrum an zusätzlichen nicht-ribosomalen Peptiden sondern auch an bestimmten MC-Varianten [245, 283, 285, 344, 345]. Außerdem ist die Produktionsrate (MC) zwischen den einzelnen toxischen Stämmen (z.B. in Abhängigkeit vom Licht) unterschiedlich [297]. Die MC-abhängigen Effekte gelten daher vorläufig nur für PCC 7806 und müssen in anderen toxischen Stämmen überprüft werden.

#### 4.1.2 Determination der Variablen

Als Variablen zur Untersuchung der MC-Funktion wurden Lichtintensität (Dunkelheit, Starklicht) und Zelldichte gewählt. Wechselnde Lichtintensitäten und -qualitäten sind aufgrund der migrierenden Lebensweise von *Microcystis* von großer Relevanz. Lichtqualitätseffekte auf die MC-Produktion konnten bisher nur in wenigen Experimenten gezeigt werden – Lichtintensitätseffekte konnten dagegen durch mehrere Studien bestätigt werden [112, 113]. Veränderungen in der Lichtqualität werden über Photorezeptoren perzeptiert, Veränderungen in der Lichtquantität werden über redoxsensitive Regulatoren, die wiederum Fluktuationen im Elektronenfluß der photosynthetischen Elektronentransportkette messen, detektiert [346, 347].

Als Reaktion auf wechselnde Lichtbedingungen ändert sich die Expression einiger Gene sogleich - andere werden erst nach längerer Lichteinwirkung induziert bzw.

reprimiert [348]. Die 2 h-Exposition stellt somit eine Momentaufnahme dar und muß für andere Zeitintervalle sowie Lichtbedingungen bestätigt werden. Die Wahl der Zelldichte als zweite Variable erfolgte zum einen aufgrund der wachstumsabhängigen MC-Produktion (höchste Produktionsrate am Ende der exponentiellen Wachstumsphase) [113] und zum anderen aufgrund der von Dittmann *et al.* und später auch Schatz *et al.* postulierten Signalfunktion von MC in der interzellulären Kommunikation [146, 274]. Vergleichende Untersuchungen *Quorum-sensing*-regulierter Prozesse werden in der Regel in der späten exponentiellen Wachstumsphase – nach Akkumulation des Autoinducers (Signalmoleküls) im Medium – durchgeführt [349, 350, 351]. Daher erfolgte die Selektion MC-abhängiger Proteine insbesondere in dieser Wachstumsphase (OD<sub>750</sub> 1,0). In *Quorum sensing*-regulierten Systemen wird außerdem über die Zugabe des Signalmoleküls zu Mutantenkulturen (Knockout in der Signalproduktion) in der Regel eine Reversion zum Wt erreicht. Daher wurde MC (dritte Variable) den Kulturen in natürlich vorkommenden Konzentrationen (1, 10, 100 µg/L) zugegeben.

#### 4.1.3 Globale molekulare Analysen: Proteomik *versus* Microarray

Potentielle Kandidaten, die im Zusammenhang mit der MC-Funktion stehen, könnten im globalen Screening in bioinformatischen, transkriptomischen und/ oder proteomischen Studien erfasst werden. So führten *in silico*-Analysen zur Identifizierung der so genannten *mcy*-Box, die innerhalb des *mcy*-Clusters als auch im Promotorbereich des *mvn*-Gens, kodierend für das Lektin Microvirin (MVN), lokalisiert ist [282]. Transkriptom- bzw. Transkriptanalysen wären insbesondere zur Überprüfung der Signalthypothese (Autoregulation) wertvoll [352]. In vielen Fällen werden diese Effekte jedoch nicht auf Protein-Niveau umgesetzt. Biologische Funktionen werden weitestgehend durch Proteine realisiert, so dass proteomische Studien eher das wirkliche Bild der physiologischen Zusammenhänge („molekularer Phänotyp“) widerspiegeln [353]. Durch proteomische Studien wird eine globale Analyse der Proteine und ihrer Expressionsprofile in einem bestimmten biologischen Prozess sichtbar [354]. Zwischen den einzelnen Proteinmolekülen können funktionelle Zusammenhänge aufgezeigt werden [355]. Des Weiteren können hypothetische und unbekannte Proteine charakterisiert werden [354]. Aus der Literatur sind jedoch bisher keine Beispiele bekannt, in denen die Funktion eines

nicht-ribosomalen Peptids mittels dieses globalen Ansatzes untersucht worden ist. Lediglich Transkriptomstudien zur Überprüfung der Wirkung von Antibiotika auf die Genexpression zeigten, dass etwa 5 % aller Promotoren in *Salmonella typhimurium* durch subinhibierende Konzentrationen von Erythromycin und Rifampicin (ebenfalls nicht-ribosomale Peptide) beeinflusst werden [266]. Zur Analyse der Genexpression durch Signalmoleküle wurden dagegen sowohl Transkriptom- als auch proteomische Studien einzelner subzellulärer Kompartimente durchgeführt [351, 356, 357, 358]. Basis einer guten Trennung der Proteine im 2D-Gel ist die subzelluläre Fraktionierung [359]. Die Differenzierung der einzelnen Zellkompartimente bietet den Vorteil, nicht nur das Proteingemisch hochauflösend, mit wenigen Überlagerungen aufzutrennen, sondern auch erste Schlussfolgerungen über Isoformen, zelluläre Lokalisierungen und Aktivitäten zu treffen. Proteine, die in mehreren Isoformen auftreten, sind Folgen alternativen Splicings, Protein-Processings, co- und posttranslationaler Modifizierungen oder Fragmentierungen [360]. Letztere können auch während des Laufs entstehen [361]. Allerdings geht auch ein Teil der Proteine durch die Fraktionierung verloren. Vermischungen, Löslichkeitsprobleme (insbesondere bei Membranproteinen), Artefakte bezüglich spontaner Bindungen, Degradationen können während der Extraktionsprozedur auftreten. Daher repräsentieren die detektierten Proteine in den einzelnen Fraktionen niemals das gesamte Spektrum des Zellkompartiments.

## **4.2 Selektion der MC-abhängigen Stoffwechselwege**

### 4.2.1 Evaluation der aktuellen 2D-Studie

#### 4.2.1.1 Zusammenfassung der 2D-Analysen und Wertung der Ergebnisse

Die MC-abhängigen Effekte waren unter Starklichtbedingungen generell stärker als bei Dunkelheit. Diese Daten korrelieren mit der stärkeren Expression sowohl der *mcy*-Gene [112] als auch deren Translations- (McyF) [103] und Syntheseprodukte (MC) [113] bei höheren Lichtintensitäten in der exponentiellen Wachstumsphase. Weiterhin waren die Unterschiede zwischen Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante (12-21 %) weitaus größer als die durch eine MC-Addition ausgelösten Effekte (1-4 %). Dieser enorm hohe Wert (bis zu 21 %) verdeutlicht, dass der Verlust des MC in der Mutante eine Vielzahl von Expressionsunterschieden zur Folge hat. Aufgrund dieser Daten ist eine Funktion von MC als Fressschutz eher auszuschließen und stattdessen eine

physiologische Funktion anzunehmen. Eine klassische Signalwirkung, wie sie für andere interzelluläre Signalmoleküle beschrieben worden ist [351, 358], kann ebenso negiert werden. Es werden zwar ähnlich starke Effekte, wie für andere Signalmoleküle beschrieben, detektiert (Tab. 13) – durch die Zugabe von MC zu Kulturen der  $\Delta mcyB$ -Mutante konnte jedoch keine Reversion zum Wt erreicht werden. Ebenso konnte die Autoinduktion nicht in jeder Wachstumsphase und nicht bei jeder Lichtbedingung nachgewiesen werden (vorläufige Daten). Dies verdeutlicht die Bedeutung des intrazellulären MC. Im Vergleich mit interzellulären Signalmolekülen anderer Bakterien werden zwar ähnliche extrazelluläre Konzentrationen gemessen, es kommt jedoch nicht zu einer intrazellulären Akkumulation (Tab. 13). Allerdings kann in *Pseudomonas* die Reversion auch nicht in jeder Wachstumsphase nachgewiesen werden [362]. Dieses Phänomen wird auf Inhibitoren zurückgeführt, die erst am Ende der exponentiellen Wachstumsphase verbraucht sind. Erst dann können die im Medium akkumulierten AHL-Signalmoleküle wirken.

Tab. 13: Vergleich von MC mit anderen Signalmolekülen

Signalmolekül	AI-2	AHL	Oligopeptide	MC
<b>Produzenten</b>	Grampositive, gramnegative Bakterien	Gramnegative Bakterien	Grampositive Bakterien	Cyanobakterien
<b>Größe</b>	~ 1000 Da	~ 1000 Da	~ 1000 Da	~ 1000 Da
<b>Metabolische Kosten</b>	Niedrig	Moderat	Hoch	Sehr hoch
<b>Spezifität</b>	Niedrig	Moderat	Hoch	?
<b>Signalübertragung</b>	Diffusion extrazellulärer Rezeptor	Diffusion intrazellulärer Rezeptor	Aktiver Transport extrazellulärer Rezeptor	Aktiver Transport? extrazellulärer Rezeptor?
<b>Extrazelluläre Konzentration</b>	0,08-0,8 nM	1-10 nM		1-10 nM
<b>Intrazelluläre Konzentration</b>	Kein Nachweis	Kein Nachweis		0,01-100 pmol/ Zelle
<b>Effekte einer Signalmoleküladdition auf Proteinebene (2D)</b>		<i>Sinorhizobium</i> : 5 % <i>Burkholderia</i> : 5,6 % <i>Pseudomonas</i> : 23,7 %		Starklicht: Wt: 1,42 %; $\Delta mcyB$ : 3,66 % Dunkelheit: Wt: 2,44 %; $\Delta mcyB$ : 2,24 %
<b>Effekte einer Signalmoleküladdition auf Transkriptebene (Mikroarrays)</b>		<i>Pseudomonas</i> : 10 %		
<b>Zielproteine der Signalmoleküle</b>		cytosolische Proteine, Zelloberflächenproteine, sezernierte Proteine		cytosolische Proteine, Zelloberflächenproteine, sezernierte Proteine?
<b>Referenz</b>	[350, 351, 358, 363, 364, 365]			[271]

Möglicherweise liegt der komplexen Lebensweise von *Microcystis* eine neue Form der interzellulären Kommunikation zugrunde, an der MC als Signalmolekül, jedoch nicht im klassischen Sinne, beteiligt ist. Die Funktion eines nicht-ribosomalen Peptids als Signalmolekül in *Quorum sensing*-regulierten Prozessen wäre ein Novum innerhalb der bereits bekannten Systeme. Die Interaktion über ein Signalmolekül

bedingt, dass dieses aus der Zelle entlassen werden muss, um andere Zellen zu erreichen. In diesem offenen System kann das Signal schnell verdünnt werden. Daher werden zum einen Signalmoleküle in „größeren Mengen“ produziert und sind zum anderen über einen „längeren Zeitraum“ stabil [366]. Die umgebenden Bedingungen müssen so beschaffen sein, dass sie eine Diffusion des Signals zulassen und größere Verdünnungen durch Fluktuationen verhindern [366]. MC sind äußerst stabil sowie temperatur- und proteaseresistent und werden in entsprechenden Mengen synthetisiert (1.3.1.3). Obgleich *Microcystis* aufgrund seiner buoyanten Lebensweise nicht so turbulente Seen bevorzugt, würde es durch die täglichen Durchmischungen zu Verdünnungen kommen. Hinzu kommt die vertikale Migration, die eine Konzentration an distinkten Orten unmöglich macht. Jedoch wäre eine Wirkung innerhalb der Kolonie gegeben. Hydrophobe, sezernierte Polysaccharide in *E. coli* führen zur Schaffung von Mikrokosmen, die eine Diffusion von AHL ermöglichen [367]. In *Microcystis* würde die Schleimschicht aus Polysacchariden ähnliche Bedingungen schaffen und eine Diffusion ohne Verdünnung innerhalb der Kolonie ermöglichen [368, 369].

#### 4.2.1.2 Validierung der identifizierten Spots im Vergleich mit anderen proteomischen Studien zu Cyanobakterien

Grundlage proteomischer Studien ist die Identifizierung der Proteine über Sequenzabgleiche mittels der entsprechenden Genomdatenbank bzw. der verwandter Spezies. Bis jetzt sind 20 verschiedene cyanobakterielle Genome veröffentlicht (Auszug siehe Tab. 14), wobei etwa 892-1000 orthologe Proteine detektiert werden konnten [370]. Aufgrund des gemeinsamen Ursprungs der Cyanobakterien sind Homologien in Sequenz, Funktion und Regulation vieler Gene anzunehmen. Proteomische Analysen wurden bisher nur von *Synechocystis*, *Nostoc* und *Anabaena* veröffentlicht.

Tab. 14: Vergleich einiger sequenzierter, cyanobakterieller Genome hinsichtlich Größe, GC-Gehalt und Zahl der proteinkodierenden Gene

	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	<i>Synechococcus</i> spp. WH 8102	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	<i>Nostoc</i> <sup>7</sup> PCC 7120	<i>Nostoc punctiforme</i>	<i>Gleobacter violaceus</i> PCC 7421	<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS 101	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806
Genomgröße in kb	2696	2434	2594	3573	7100	~9500	4659	7750	~5200
GC-Gehalt in %	55,5	58,5	53,9	47,7	41,2	41,5	62	~35	~40
Anzahl der Proteinkodierenden Gene	2525	2526	2475	3264	6133	7432	4430	5266	~6000
Datenbank	Cyano-Base <sup>8</sup>	JGI/DOE <sup>9</sup>	Cyano-Base	Cyano-Base	CyanoBase	JGI/DOE	Cyano-Base	JGI/DOE	Pasteur Institut
Referenz	[371]	[372]	[373]	[374]	[375]	[376]	[377]		

Mit der Detektion von etwa 492 verschiedenen Proteinspots mittels Coomassiegefärbter 2D-Gele in dieser *Microcystis*-Studie konnte vermutlich nur ein Teil der im Cytoplasma lokalisierten Proteine detektiert werden. In anderen proteomischen Analysen cytosolischer, cyanobakterieller Extrakte konnten in *Synechocystis* PCC 6803 900-1100, in *Nostoc commune* DRH1 750 und in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 400 verschiedene Proteinspots ermittelt werden [304, 307, 316, 378]. Unterschiedliche Wachstumsexperimente in Abhängigkeit diverser Stimuli, unterschiedliche Extraktions-, Elektrophorese- und Färbemethoden sowie die Verwendung unterschiedlicher Softwareprogramme zur Auswertung der 2D-Gele führten zu diesem nicht einheitlichen Bild. Des Weiteren war die Hauptintension dieser proteomischen Studie nicht die Erfassung aller MC-abhängigen Kandidaten. Nur die stärksten und eindeutigsten Spots sollten bestimmt werden.

Alle in dieser Studie identifizierten Proteine, mit Ausnahme der *Microcystis* spezifischen Proteine<sup>10</sup>, konnten auch in *Synechocystis* oder *Nostoc* in der cytoplasmatischen Fraktion lokalisiert werden [304, 307, 316, 378, 379]. Des Weiteren konnte die lichtregulierte Expression der großen und kleinen Untereinheit der RubisCO, der Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase und der Phycobiliproteine auch in dieser Studie nachvollzogen werden [348, 380].

Die apparanten Massen und pI-Werte der meisten Proteine stimmen mit den theoretischen, in der *Microcystis*-Genomdatenbank ermittelten Massen überein

<sup>7</sup> Der Stamm PCC 7120 wurde früher als *Anabaena* klassifiziert. Die Reklassifizierung zu *Nostoc* erfolgte 2004.

<sup>8</sup> CyanoBase: <http://www.kazusa.or.jp/cyanobase/>

<sup>9</sup> JGI/DOE: <http://www.jgi.doe.gov>

<sup>10</sup> Zu den *Microcystis*-spezifischen Proteinen zählen neben MrpA die Proteine MrpC und das zu *Pseudomonas aeruginosa* ähnliche Lytische Enzym.

(Anhang A). Einige Proteine<sup>11</sup> konnten, wie auch in anderen proteomischen Studien, in verschiedenen Isoformen detektiert werden (Anhang A) [316, 378, 379].

#### 4.2.2 Kandidatenselektion: Differentielle Kandidaten *versus* Bindepartner

Die Kandidatenselektion erfolgte über zwei Softwareprogramme (Delta2D; Melanie). Während beim Vergleich von Wt und MC-freier Mutante oft konforme Ergebnisse erreicht wurden, konnte im Vergleich zwischen MC-Addition und Kontrolle nur einige Kandidaten durch beide Softwareprogramme bestätigt werden. Diese Divergenz ist unter anderem durch die geringere Stichprobenzahl im zweiten Vergleich bedingt. Unterschiede beider Vergleiche wurden prozentual erfasst, jedoch nicht in ihrer Gesamtheit analysiert und identifiziert. Diese proteomische Studie spiegelt somit nicht die Gesamtheit aller MC-abhängigen Proteine wider. Insbesondere abundante, gut separierte Proteinspots, die in mehr als nur einer Versuchsbedingung markante unterschiedliche Expressionslevel zeigten, wurden ausgestanzt.

In dieser Studie konnte außerdem nachgewiesen werden, dass MC an zelluläre Proteine binden. Mittels eines spezifischen, gegen MC gerichteten Antikörpers konnte im Immunoblot von Wt-Extrakten mehrere MC-Signale beobachtet werden. In den Extrakten von MC-freien Mutanten konnten dagegen keine Banden detektiert werden. Die Daten werden durch die Assoziation von MC mit bestimmten zellulären Strukturen wie dem Nukleoid, den Thylakoiden, den Polyphosphatkörperchen und den Carboxysomen unterstützt [293, 294, 328]. Zur Identifizierung dieser potentiellen Bindepartner wären die Methoden der Wahl die Immunpräzipitation oder die AK-Kopplung gewesen. Erste Versuche brachten jedoch nicht den gewünschten Erfolg. Daher wurden Extrakte des Wt über 2D aufgetrennt und geblottet. Die entsprechenden MC-Signale wurden auf ein zweites mit Coomassie gefärbtes Gel projiziert, ausgestanzt und identifiziert. Alle Bindepartner wurden auch in der vorausgegangenen, vergleichenden proteomischen Studie als potentielle MC-abhängige Kandidaten selektiert. Die differentielle Expression dieser Kandidaten geht möglicherweise auf eine Interaktion von MC mit diesen Proteinen zurück. Die Relevanz dieser Bindung *in vivo* wird durch die gezielte Bindung von MC an Proteine

---

<sup>11</sup> Transketolase (TktA/ CbbT), Adenosylhomocysteinase (AhcY), Fructose-bisphosphat-Aldolase (FbaA), Transketolase-ähnliches Protein (IPF 1054.1), Hypothetisches Protein (IPF 533.1), CP12-Polypeptid<sup>alternativ</sup> (IPF 2164.1), kleine Untereinheit der RubisCO (RbcS), Phosphoribulokinase (Prk), die Fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (GlpX), Carotenoid-bindendes Protein (IPF 5686.1) und  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase (AtpD)

wie RbcL in  $\Delta mcyB$ -Extrakten einerseits sowie die indifferente Bindung (Schmier) von MC an *Synechocystis*-Proteine andererseits deutlich. Während das reaktive Potential von MC also auch mit anderen Proteinen gezeigt werden kann, kommt es in PCC 7806 zu einer Bindung an spezifische Proteine. Trotz denaturierender und reduzierender Bedingungen während der Elektrophorese kann diese Interaktion nicht zerstört werden. Dies ließ auf eine kovalente Bindung schließen. Diese Art der Wechselwirkung zwischen MC und einem Protein ist bereits von eukaryotischen Proteinphosphatasen (PP) bekannt [168]. Zwischen dem Dehydroalanin-Rest des MC und einem Cystein der PP wird dabei eine kovalente Bindung geschlossen [168] (Abb. 32).

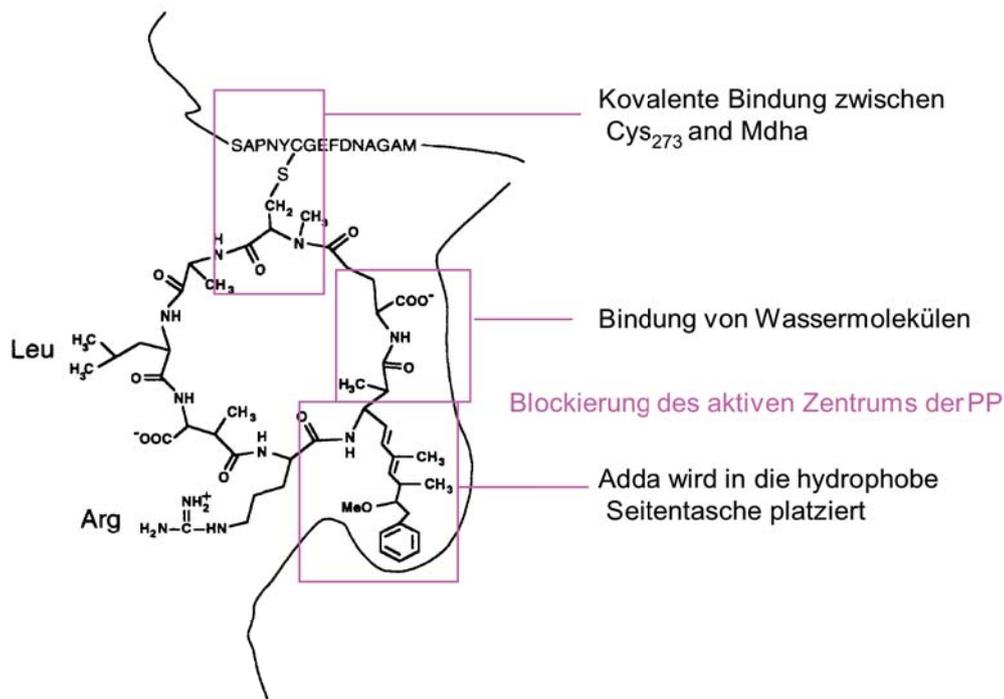


Abb. 32: Modell der Interaktion von MC mit PP1, aus MacKintosh [168]

Der Dehydroalanin-Rest (Maha) des MC bindet kovalent an den Cystein-Rest (273) der PP1. Dadurch werden der Glutamat-Rest und Adda in die Nähe des aktiven Zentrums platziert, das eine Inhibition der PP zur Folge hat.

Viele der putativen Bindungspartner besitzen Cysteinreste. In einigen konnten im Vergleich mit anderen Cyanobakterien sogar zusätzliche Cysteinreste detektiert werden. Assays mit einem am Dehydroalanin-Rest modifiziertem MC oder mit an spezifischen Cysteinresten substituierten Zielproteinen könnten diese Art der Bindung verifizieren [381]. Ebenso könnte durch den Einsatz von Oxidationsmitteln (DTNB) und Reduktionsmitteln diese Interaktion beeinflusst werden (erste Versuche

dieser Art wurden bereits in dieser Arbeit begonnen). Die Cysteinreste vieler Kandidaten sind nicht nur für die Ausbildung von Disulfidbrücken wichtig, sondern auch für die Regulation von Multi- bzw. Oligomerisierung, Aktivität und Degradation. Interaktionen mit dem MC könnten zu unterschiedlichen Abundanzen führen. Zur Untersuchung der Implikation von MC mit den einzelnen Kandidaten wird im Folgenden insbesondere auf die Zahl von Cysteinen und deren Rolle in der Proteinregulation eingegangen.

Neben einer möglichen Bindung an MC wurden die Kandidaten hinsichtlich ihrer Bedeutung in bestimmten Stoffwechselwegen (Schlüsselproteine) klassifiziert (Tab. 15). Schlüsselproteine katalysieren in der Regel eine der ersten und zugleich irreversiblen Reaktionen im jeweiligen Stoffwechselweg [382]. Daher werden viele Stoffwechselwege über eine Regulation dieser Schlüsselproteine kontrolliert. Eine hohe Implikation von MC besteht außerdem, wenn mehrere Proteine dieses Weges als differentielle Kandidaten selektiert werden konnten.

Die Mehrzahl der identifizierten Kandidaten ist in lichtabhängige Prozesse involviert. Die Bedeutung dieser und die möglichen Zusammenhänge mit MC werden im nächsten Kapitel diskutiert (4.3). Andere Kandidaten sind möglicherweise in Zell-Zell-Interaktionen involviert und werden im übernächsten Kapitel näher beleuchtet (4.4). Nur wenige Kandidaten ordnen sich nicht in dieses Bild und werden daher separat diskutiert (4.5). Die strenge Zuordnung der Kandidaten, wie sie durch die Cyanobase (<http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>) vorgegeben, wurde dabei aufgehoben.

Tab. 15: Klassifizierung der MC-abhängigen Kandidaten

Klassifizierung	Verweis	Bedeutung	Differentielle Expression unter mehreren Bedingungen	Durch Delta2D und Melanie bestätigt	Einfluss einer MC-Addition	Durch zwei unabhängige 2D-Studien bestätigt <sup>12</sup>	Putativer MC-Bindungspartner	Implikation von MC
Lichtabhängige Prozesse	4.3	<b>Photosynthese/ Lichtreaktion</b> Phycobiliproteine: CpcA, CpcI Chlorophyll-Biosynthese: HemE ATP-Synthase: AtpA, AtpD Elektronencarrier-Reduktasen: Gor, 1023.1	Ja Nein Ja Ja	Ja Nein Ja Nein	Ja Nein Ja Ja	Ja Nein Nein Nein	Ja Nein Ja Ja	hoch
		<b>Protektion</b> Carotenoid-bindendes Protein: OCP AhpC/TSA-Familie: 2-Cys Prx, BCP, Chlorperoxidase Oxidoreduktase	Ja Ja Ja	Ja Ja Ja	Ja Ja Nein	Nein Nein Nein	Nein Ja Nein	
		<b>Photosynthese/ Dunkelreaktion</b> RubisCO: RbcS, RbcL Carboxysomen: CcmK GAPDH (gap2), alternative CP12-Polypeptide, PRK FBP (GlpX/ FbpI) FbaA Transketolasen: TktA, 1054.1	Ja Ja Ja Ja Ja Ja	Nein Ja Ja Ja Ja Ja	Ja Nein Ja Nein Nein Ja	Ja Nein Ja Nein Ja Nein	Ja Nein Ja Nein Nein Nein	
		<b>Glycogensynthese</b> ADP-Glucose-Pyrophosphorylase: GlgC	Ja	Ja	Nein	Nein	nein	
		<b>Microcystin related proteins</b> MrpA MrpC	Ja (Ja)	Ja (Ja)	Nein Nein	Ja Ja	Nein Nein	
		<b>Zellwand</b> Lyritisches Enzym	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	
		<b>Glycolyse</b> Glucose-6-phosphat-Isomerase (Pgi)	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	
		<b>Proteinbiosynthese</b> Elongationsfaktor Ef-Tu	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	
		<b>Biosynthese von AS</b> Cystein-Synthase (CysK) Ketol-acid-reucto-Isomerase (IlvC)	Nein Ja	Nein Nein	Nein Nein	Nein Nein	Nein Nein	
		<b>Methionin-Rückgewinnung</b> Adenosylhomocysteinase: AhcY	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	
<b>Fettstoffwechsel</b> $\beta$ -Ketoacyl-[ACP]-Reduktase (FabG2) Acetoacetyl-CoA-Thiolase (Thl)	Ja Ja	Ja Ja	Nein Ja	Nein Nein	Nein Nein			
<b>Hypothetische Proteine</b> IPF 308.1 IPF 604.1 IPF 533.1 IPF 3657.1	Ja Ja Ja Nein	Nein Ja Ja Nein	Ja Ja Ja Ja	Nein Nein Nein Nein	Nein Ja Nein Nein			
<b>Anderes</b>	4.5						niedrig	

<sup>12</sup> Nur in der aktuellen proteomischen Studie standen bereits Sequenzen der noch unveröffentlichten *Microcystis*-Genomdatenbank zur Verfügung. In den vorigen proteomischen Studien wurden nur wenige differentielle Spots analysiert.

#### 4.2.3 Mögliche Interaktionsmechanismen zur Regulation der Abundanz von Proteinen

Die unterschiedlichen Abundanzen der Proteine in Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante können verschiedene Ursachen haben. MC kann dabei (1) die Transkription/ -rate, (2) die Transkriptstabilität, (3) die Translation/ -rate, (4) die Stabilität des Proteins/ des Proteinkomplexes oder (5) die Interaktionspartner bestimmter Proteine beeinflussen [383].

*Northern Blot*-Analysen zeigten, dass die differentielle Abundanz der Kandidaten im 2D eher nicht auf eine unterschiedliche Transkriptakkumulation in Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante zurückzuführen ist (gezeigt für ***ccmM***<sup>13</sup>, ***fbaA***, ***glgC***, ***gvpC***, ***trxM***, ***mrpC***). Lediglich für ***rbcL*** konnte eine geringere Transkriptakkumulation in den MC-freien Mutanten nachgewiesen werden. Dieser Effekt konnte auch für ***rbcS*** durch A. Mlouka (N. Tandeau de Marsac, persönliche Mitteilung) bestätigt werden.

Die geringen Transkriptionsunterschiede verdeutlichen, dass viele der MC-abhängigen Expressionsunterschiede vermutlich auf Proteinebene reguliert werden. Möglicherweise beeinflusst MC aber auch die Transkription anderer Gene (z.B. Interaktion mit Transkriptionsfaktoren), deren Produkte für die unterschiedliche Expression einiger Kandidaten verantwortlich sind. Dies könnte in Mikro- oder Makroarraystudien untersucht werden. Hinweise für einen Einfluss auf die *De novo*-Synthese (z.B. Interaktion mit Translationsfaktoren) könnten über *Pulse-chase*-Experimente gewonnen werden. Einige Proteinkandidaten interagieren jedoch direkt mit dem MC, wie die Bindungsstudien zeigten. Möglicherweise kommt es zu Konformationsänderungen, die die Stabilität und Aktivität des Proteins in der Zelle beeinflussen [382]. Allgemein können Konformationsänderungen durch allosterische Wechselwirkungen (z. B. Substratbindung), durch Modifizierungen (z.B. Phosphorylierungen, Glycosylierungen) und durch Protein-Protein-Interaktionen (Stabilisierung durch Chaperone, Komplexbildung, Oligomerisierung) ausgelöst werden. Neben anderen AS spielen insbesondere die Cystein-Reste hierbei eine große Rolle. Über die Oxidation oder Reduktion der Thiolgruppe des Cysteins werden sowohl die Enzymaktivität als auch die Oligomerisierung, Komplexbildung und Degradation von Proteinen reguliert. Die Abundanz und Aktivität vieler im 2D

---

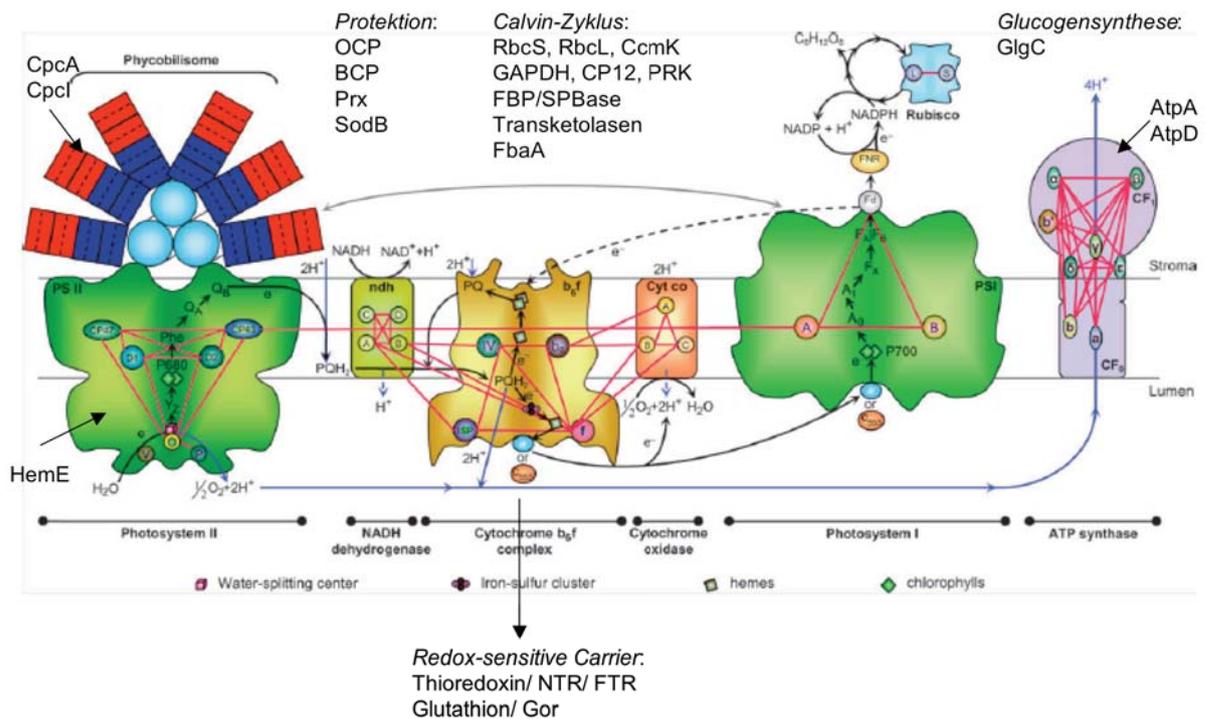
<sup>13</sup> Im Folgenden werden zur besseren Abgrenzung alle über die aktuelle 2D-Studie identifizierten Kandidaten fett hervorgehoben.

selektierter Kandidaten wird über den Redoxstatus ihrer Cysteine geregelt. Über die Fähigkeit von MC an Cysteine zu binden, ist möglicherweise ein Mechanismus gefunden, der die erhöhte bzw. erniedrigte Abundanz einiger Kandidaten in Abhängigkeit vom MC erklärt.

### 4.3 Der Einfluss von MC in lichtabhängige bzw. assoziierte Prozesse

#### 4.3.1 Einordnung der Kandidaten

Viele der im 2D selektierten, MC-abhängigen Kandidaten sind in photosynthetische Prozesse involviert (Abb. 33). Die Lichtreaktion zur Reduktion des Ferredoxin/Thioredoxin-Systems und zur Bildung von ATP und NADPH findet in den Thylakoidmembranen statt. Die Dunkelreaktion erfolgt im Cytosol bzw. in den Carboxysomen und dient der Fixierung von CO<sub>2</sub>.



**Abb. 33: Einordnung der selektierten Kandidaten in photosynthetische und assoziierte Prozesse (Abbildung nach Shi et al. [384])**

Die Lichtadsorption erfolgt im Wesentlichen durch die Phycobilisomen. Zwei Proteine dieser Lichtantennen wurden selektiert: die  $\alpha$ -UE des Phycocyanins (CpcA) und das 32 kDa *rod-core linker*-Polypeptid (Cpcl). Aus der Chlorophyllbiosynthese wurde die Uroporphyrinogen-Decarboxylase (HemE) identifiziert. Zur Protektion dienen das Carotenoid-bindende Proteine (OCP), die Peroxiredoxine (Prx; BCP) und die Superoxiddismutase. Einige Untereinheiten der ATP-Synthase sowie redox-sensitive Carrier (Thioredoxin) und ihre Reduktasen (Thioredoxin-Reduktase, Glutathion-Reduktase) wurden ebenfalls identifiziert. Des Weiteren wurden fast alle Enzyme sowie regulatorische und Strukturproteine des Calvin-Zyklus detektiert. Dazu zählen die RubisCO (RbcS, RbcL), die Phosphoribulokinase (PRK), die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, Gap2), die Fructose-1,6-bisphosphatase/ Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (FBP/SBPase, GlpX/Fbpl), die Fructose-6-phosphat-Aldolase (FbaA), die Transketolase (TktA) sowie alternative CP12-Polypeptide und ein Carboxysomenhüllprotein (CcmK). Aus dem Glycogenstoffwechsel wurde die Pyrophosphorylase (GlgC) identifiziert.

Mit der Fokussierung auf cytoplasmatische Proteine liegt der Schwerpunkt dieser Studie im Bereich der Dunkelreaktion. Das integrale Proteinspektrum der Thylakoidmembranen könnte analog der normalen 2D-Gelelektrophorese mittels BN-PAGE, einer speziellen Methode zur Analyse insbesondere von Membrankomplexen, analysiert werden [314, 385].

#### 4.3.2 Die licht- und redoxregulierte Transkription

Die Genexpression wird in photosynthetischen Organismen maßgeblich durch den Faktor Licht gesteuert. Drei  $\sigma$ -Faktoren (SigB, SigC, SigD) sind dabei von entscheidender Bedeutung. In ihrer Kombination modulieren sie die Transkription einer Reihe licht- bzw. dunkelregulierter Gene [386]. SigB ist unter oxidativen Bedingungen (Dunkelheit) und SigD unter reduktiven Bedingungen (Licht) aktiv. SigC verhindert die Expression von SigB bei Licht.

Für fast alle in diesem Kapitel eingeordneten Kandidaten konnte eine lichtabhängige Expression in *Synechocystis* nachgewiesen werden. Nach Akklimatisierung von *Synechocystis*-Zellen im Starklicht werden nach 2 h folgende Gene herabreguliert: PS-Komponenten wie *psa*- und *psb*-Gene und Antennenproteine wie ***hem***-, ***chl***-, ***apc***- und ***cpc***-Gene sowie das ***trxA***-Gen. Induziert sind dagegen: ***rbc*** und ***ccm***; ***pgk***; ***groESL***, ***sodB***, die Glutathion-Peroxidase, ***ocp***, ***rpl*** sowie ***rps*** [348]. Des Weiteren soll die ***gap2***-Expression sowohl durch Licht als auch durch trophische Bedingungen reguliert sein [387, 388]. Diese Licht- bzw. Dunkeleffekte konnten auch in dieser proteomischen Studie für *Microcystis* PCC 7806 detektiert werden.

Die gemeinsame Regulation vieler photosynthetischer Gene ist durch die Anordnung in Operons bedingt. Mit zunehmender Divergenz der Arten kommt es jedoch zum Operonsplitting, so dass sich neue Regulationsebenen eröffnen [384]. Die differentielle Expression nur einer der Operonprodukte (z.B. *cpc*-Gene, *ccm*-Gene, *hem*-Gene) im 2D-Gel kann aber ebenso auf eine nachträgliche Regulierung zurückzuführen sein. Die Unterschiede könnten aber auch durch Fraktionierungs-, Löslichkeits-, Kontaminations- und Identifizierungsprobleme bedingt sein.

Einige Kandidaten sind von zusätzlichen Faktoren wie Temperatur [389], Osmolarität und Osmolalität [390], CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit [391], oxidativer [392] und Eisenmangel-Stress [393] abhängig. Zu diesen zählen: ***ocp***, ***atp***, ***cpcBA***, ***rbcLS***, ***trxA***, ***prk***, ***fbaA***, ***fbpl***, ***pgi*** sowie Gene für die Fettsäuredesaturase, einige stickstoffregulierte und

Hitzeschock-Gene [394, 395, 396, 397, 398, 399]. Die Transkription dieser Gene wird über den intrazellulären Redoxlevel, der letztlich durch den Photonenflux bestimmt wird, reguliert [400]. Möglicherweise ist der Redoxstatus des Plastoquinon-Pools hierbei von entscheidender Bedeutung. Die Daten werden durch Experimente mit Inhibitoren der photosynthetischen Elektronentransportkette unterstützt [394, 395, 396, 397, 398, 399]. Das „Redox-Signal“ wird dabei möglicherweise durch redoxsensitive Proteinkinasen an einen *response*-Regulator weitergeleitet bzw. durch redoxsensitive Transkriptionsfaktoren, die die Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten messen, aufgenommen [392, 400].

Möglicherweise beeinflusst MC die Perzeption oder Weiterleitung des „Redoxsignals“. Diese Hypothese wird durch die unterschiedlichen Pigmentverhältnisse in Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante evidiert [295]. In dieser Studie wurden die Chromophor-bindenden Proteine **CpcA ( $\alpha$ -UE des Phycocyanins)** und **OCP (*orange carotenoid binding-Protein*)** als differentielle Kandidaten identifiziert. Beide sind an der Energiedissipation zwischen beiden PS beteiligt und wirken so indirekt auf den Redoxzustand des Plastoquinon-Pools [401, 402]. Die Expression beider Proteine war sowohl vom intrazellulären als auch vom extrazellulären MC abhängig.

#### 4.3.3 Bedeutung und Regulation der an der Lichtreaktion beteiligten sowie assoziierten, MC-abhängigen Proteine

##### *Lichtreaktion*

Der erste Schritt der Photosynthese besteht in der Lichtabsorption und -sammlung. In Anpassung an ihre wässrige Umgebung besitzen Cyanobakterien und Rotalgen andere Antennenkomplexe als höhere Pflanzen. Mittels der Phycobilisomen sind sie in der Lage, auch das grüne und gelbe Licht (470 nm bis 650 nm) zu absorbieren. Die angeregten Elektronen werden in diesem Lichtsammelkomplex weitergeleitet bis sie das Reaktionszentrum (Chlorophyll a) erreicht haben. Dort erfolgt die Ladungstrennung. Cyanobakterien sowie Algen und Pflanzen besitzen zwei Reaktionszentren: Das PS I (700 nm) erzeugt Reduktionsäquivalente in Form von NADPH und das PS II (680 nm) überträgt die Elektronen des Wassers auf ein Chinon und entwickelt gleichzeitig Sauerstoff. Der Elektronenfluss zwischen den PS

erzeugt einen transmembranalen Protonengradienten, der zum Antrieb der ATP-Synthese (Photophosphorylierung) genutzt wird.

#### *Die Phycobilisomen - Phycobiliproteine*

Die Phycobilisomen (PBS) sind sehr große Komplexe aus vielen Phycobiliproteinuntereinheiten, die jeweils zahlreiche kovalent gebundene Biline als prosthetische Gruppen und verbindende Polypeptide enthalten. Die sauren Phycobiliproteine bestehen jeweils aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, an der jeweils ein oder mehrere Tetrapyrrol-Chromophore kovalent über Thioether-Bindungen an Cystein-Reste gebunden sind [403]. Die basischen *Linker*-Polypeptide sind zum einen für die Assemblierung und Erhaltung des PBS-Komplexes verantwortlich und gewährleisten zum anderen den unidirektionalen Energietransfer von der Peripherie bis zum Reaktionszentrum [404].

Die im Zusammenhang mit MC identifizierten Phycobiliproteine sind zum einen die  **$\alpha$ -Untereinheit des Phycocyanins (CpcA)** und das **32 kDa Rod-core linker-Polypeptid (Cpcl)**. Beide Proteine konnten in mehr als nur einem Spot detektiert werden. Während einige Spots unter den gegebenen Bedingungen induziert waren, waren andere gleichzeitig reprimiert. Dies zeigt an, dass Implikationen zwischen MC und diesen Proteinen äußerst unsicher sind. Die Gelanomalien sind auch aus anderen Studien bekannt [304, 307, 316, 378, 379]. Ursache dieser Artefakte sind die starke Abundanz dieser Proteine (Phycocyanine können 30 % bis zu 50 % vom Gesamtprotein ausmachen [405]) und deren Neigung zur spontanen Aggregation [406]. Ebenso sind C-terminale Modifizierungen des Phycobilisomen **32,1 kDa Linker-Polypeptids Rod1** bereits aus anderen proteomischen Studien bekannt [316, 378]. Die *Linker*-Polypeptide sind trotz Zugabe von Proteinase-Inhibitoren sehr anfällig für proteolytische Degradationen [407]. Sowohl CpcA als auch Cpcl konnten jedoch bereits in vorangegangenen Studien selektiert werden. Weitere Kandidaten früherer Analysen waren die  $\beta$ -Untereinheit des Phycocyanins (CpcB) und ein weiteres *Rod-core linker*-Polypeptid (CpcG) [303]. Das CpcA- sowie CpcB-Protein konnten außerdem als potentielle MC-bindende Proteine identifiziert werden, wobei CpcA in zwei unabhängigen Analysen detektiert worden ist. Viele der Phycobiliproteine sind redoxreguliert und besitzen Cysteine – eine mögliche Bindungsstelle für MC. Diese sind jedoch mehr oder weniger in allen Cyanobakterien konserviert. Interessanterweise enthält nur das Cpcl-Protein in *Thermosynechococcus elongatus*

BP-1 und *Microcystis* PCC 7806 ein zusätzliches Cystein, das zwischen beiden Gattungen verschieden ist.

#### *Chlorophyll-Biosynthese*

Von der **Uroporphyrinogen-Decarboxylase (HemE**, Enzym der Chlorophyll-Biosynthese) ist bekannt, dass die Transkription, zusammen mit anderen *hem*-Genen, unter Starklicht in *Synechocystis* PCC 6803 herabreguliert ist. Unterschiede in der HemE-Abundanz zwischen Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante (4,5-fach reprimiert) werden jedoch im Dunklen beobachtet. Dies wird durch Pigmentanalysen von Hesse *et al.* [295] unterstützt. In der  $\Delta mcyB$ -Mutante konnte dabei eine 20 % geringere Pigmentkonzentration (insbesondere das Chlorophyll a) als im Wt gemessen werden. Weitere Enzyme dieses Biosyntheseweges wurden allerdings nicht gefunden. Wechselwirkungen mit MC erfolgen wahrscheinlich auf indirektem Wege.

#### *Carotenoid-bindendes Protein (OCP)*

Die Bedeutung der **Carotenoid-bindenden Proteine (OCP)** ist bisher noch nicht eindeutig geklärt, es gibt jedoch Anhaltspunkte für eine mögliche Transportfunktion [408] sowie für eine Funktion als Photorezeptor und Mediator des Energiedissipationsmechanismus (*state transition*) [402]. Die Rekonfiguration des lichtsammelnden Komplexes ist besonders unter Schwachlichtbedingungen von Bedeutung, um die Effizienz der Lichtausbeute zu maximieren [401]. Der Transport der Carotenoide in die äußere Membran, Zellwand und Plasmamembran zum Aufbau eines photoprotektiven Schilds gegen UV-Licht sowie zur Gewährleistung der Membranfluidität [409] wird möglicherweise auch durch die Carotenoid-bindenden Proteine bewerkstelligt [408]. *In vivo* Studien in mehreren cyanobakteriellen Spezies zeigten, dass die Level der Carotenoid-Glycoside, der sekundären Carotenoide und der Carotenoid-bindenden Proteine mit zunehmender Lichtintensität ansteigen [410, 411, 412]. Letzteres ist vermutlich auf die licht- und redoxregulierte Transkription zurückzuführen [348, 397].

Das **Carotenoid-bindende Protein (OCP-orange carotenoid binding protein)** konnte sowohl in apparanter Form (37 kDa) als auch in kleinerer Form (30 kDa) in der aktuellen 2D-Studie detektiert werden. Letzteres ist möglicherweise ein proteolytisches Zwischenprodukt. Sowohl N- als auch C-terminale Restriktionen des OCP-Proteins führen zu dem etwa 16 kDa RCP-Protein (*red carotenoid protein*)

[408]. Des Weiteren konnten im Wt zwei zusätzliche, in ihrem *pI*-modifizierte Formen beobachtet werden. Das OCP war etwa 2- bis 3-fach stärker in der  $\Delta mcyB$ -Mutante im Vergleich zum Wt exprimiert. Der gesteigerte OCP-Level in der Mutante könnte aufgrund der geringen Pigmentkonzentration (20 % geringer) notwendig sein [295]. Interessanterweise konnte unter Starklicht in der Mutante nach MC-Zugabe eine etwa 8-fach gesteigerte Expression beobachtet werden. Dies ist, im Vergleich mit anderen Kandidaten, die stärkste Reaktion auf eine MC-Addition. Dies macht deutlich, dass ebenso das extrazelluläre MC die Genexpression bestimmter Proteine beeinflussen kann. Das OCP-Protein ist möglicherweise eines dieser regulierten Proteine. Interessanterweise sind kolonieformende *Microcystis*-Freilandstämme resistenter gegen oxidative Schäden als homogen verteilte Laborstämme unter gleichen Versuchsbedingungen [413]. Außerdem steigt mit fortschreitender Blütenbildung im Sommer das Carotenoid/ Chlorophyll a-Verhältnis in den an der Oberfläche befindlichen *Microcystis*-Populationen an [414]. Dies führt unter anderem zu einer effizienteren Photosynthese (insbesondere in Hinsicht auf die CO<sub>2</sub>-Fixierung). Gleichzeitig fördert es die Persistenz der Blüte an der Oberfläche.

#### *Protektion*

Neben dem Carotenoid-bindenden Protein (OCP) wurden weitere lichtregulierte, in protektive Mechanismen involvierte Enzyme wie die **Peroxiredoxine** identifiziert. Diese dienen dazu, toxische Sauerstoffderivate, die während zellulärer Prozesse gebildet werden, zu detoxifizieren.

Das **Peroxiredoxin (2-Cys Prx; IPF 1847.1)** und das **Bacterioferritin-komigrierende Protein (BCP oder Prx-Q; IPF 3971.1)** sowie die als **hypothetisches Protein detektierte Oxidoreduktase (IPF 22.1)** gehören zur TSA/AhpC-Familie. Diese Familie enthält Proteine, die sowohl eine Wasserstoffperoxid-Reduktase-Aktivität (AhpC) als auch ein Thiol-spezifisches Antioxidans (TSA) besitzen. BCP gehören zur Gruppe der Peroxiredoxine, die alle eine Thioredoxin-abhängige Peroxidaseaktivität haben [415]. Peroxiredoxine haben sich vermutlich gleichsam mit dem photosynthetischen System entwickelt und werden über ihre konservierten Cysteinreste reguliert [416]. Die Oligomerisierung der 2-Cys Prx ist redoxsensitiv [417]. BCP (oder auch Prx-Q genannt) agiert dagegen in seiner monomeren Form. Erste Analysen hinsichtlich Zahl und Identität der Peroxiredoxine in Cyanobakterien geben ein sehr unterschiedliches Bild [417].

Möglicherweise fungiert auch die hypothetische **Chloroperoxidase** als detoxifizierendes Enzym. Dieses Protein zeichnet sich durch zwei Enzymaktivitäten aus: einer Peroxidase- und einer Halogenase-Aktivität. Die Rolle von Chloroperoxidasen in Cyanobakterien ist noch nicht geklärt. In anderen Organismen spielen sie beim Aufbau von Haemproteinen und bei der Abwehr eine Rolle [418].

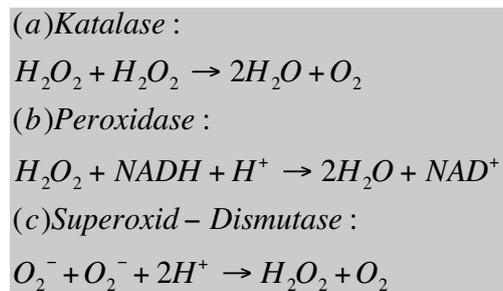


Abb. 34: Detoxifizierende Reaktionen, katalysiert durch die Katalase, die Peroxidase und die Superoxid-Dismutase

Implikationen von MC in detoxifizierende Prozesse sind anhand dieser Daten schwer abzuschätzen. Die Proteine waren meist nur unter wenigen Bedingungen und nur über eine Softwareanalyse als differentielle Spots identifiziert worden. Hinzu kommt, dass einer der markanten Vertreter, die **Superoxiddismutase** (Abb. 34), unter allen Bedingungen konstant exprimiert war. Die MC-Effekte müssten in weiteren Experimenten verifiziert werden, um klare Schlussfolgerungen ziehen zu können. Allerdings gehört die Chloroperoxidase zu den putativen MC-bindenden Proteinen. Das Protein besitzt allerdings keine Cysteinreste. Das *Nostoc*-Homolog verfügt dagegen über einen Cysteinrest. Die Interaktion zwischen dem Protein und MC in *Microcystis* ist daher unklar.

#### Die ATP-Synthase

Die ATP-Synthase wird auch als F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>-Komplex bezeichnet. F<sub>0</sub> besteht aus vier verschiedenen Untereinheiten und leitet Protonen durch die Thylakoidmembran. F<sub>1</sub> katalysiert die Bildung von ATP aus ADP und P<sub>i</sub> und hat die Untereinheitenstruktur α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γδ<sub>ε</sub>. Die α- und β-Untereinheiten (**atpA** und **atpB** – im Genom von PCC 7806 **atpD** genannt) enthalten die Bindungs- und Katalysezentren für ATP und ADP. Die δ-Untereinheit (eigentlich **atpD** genannt) bindet F<sub>1</sub> an F<sub>0</sub> und die γ-Untereinheit (**atpG**) kontrolliert den Protonenfluss. Die ε-Untereinheit (**atpC**) hemmt im Dunkeln die katalytische Aktivität des Komplexes, um eine verschwenderische Hydrolyse von ATP zu verhindern.

Die ATP-Synthase ist in die Thylakoidmembran integriert. Möglicherweise sind daher die in dieser 2D-Studie und im Immunoblot (Analyse der cytosolischen Fraktionen) detektierten Unterschiede zwischen Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante Extraktionsartefakte. Inwiefern daher die unter einer Bedingung selektierte, verkürzte Proteinvariante (N-terminales Fragment) von **AtpA** eine biologische Funktion besitzt oder ein nur während der Extraktion oder des Laufs entstandenes Abbauprodukt ist, ist nicht bekannt. Unter mehreren Bedingungen differentiell exprimiert waren beide Isoformen der  $\beta$ -Untereinheit (**AtpD**). Dieses Protein war unter Starklichtbedingungen in der Mutante im Vergleich zum Wt induziert, während sie bei Dunkelheit reprimiert war. Die MC-Zugabe führte im Wt bei Dunkelheit zu einer geringeren Abundanz des Proteins. Die Transkription der *atp*-Gene ist redoxreguliert. Unterschiedliche Redoxlevel in Wt und MC-freien Mutanten könnten zu dieser differentiellen Expression führen. **AtpD** ist aber auch ein potentieller Bindepartner von MC, so dass die unterschiedlichen Abundanzen auch auf eine Protein-Peptid-Wechselwirkung zurückzuführen sein könnte. In der *atpD*-Sequenz von *Microcystis* konnte ein zusätzliches Cystein identifiziert werden. Obgleich ein erfolgreicher Nachweis der Bindung *in vitro* und *in vivo* noch aussteht, bleibt dieses ein mögliches, direkt mit dem MC interagierendes Protein. Außerdem ist die ATP-Synthase auch in Eukaryoten einer der Zielproteine von MC [196].

#### *Thioredoxin - Thioredoxin-Reduktase/ Glutathion – Glutathion-Reduktase*

Sowohl **Thioredoxin** (ein etwa 12 kDa großes Protein mit zwei freiliegenden, eng benachbarten Cysteinresten) als auch Glutathion (cysteinhaltiges Tripeptid) sind eine der wichtigsten Elektronencarrier in allen Lebewesen. Des Weiteren regulieren beide die Aktivität von Enzymen über die Reduktion von Disulfidbrücken [382]. Sie wirken daher sowohl als Sulfhydrylpuffer als auch als Antioxidans in der Zelle. Die anschließende Reduktion der Carrier erfolgt durch die **Reduktasen (Thioredoxin~, Glutathion~)**.

Cyanobakterielle Genome besitzen zwischen 1 bis 8 *trx*-Gene sowie alle notwendigen Komponenten zur Thioredoxinreduktion [419] (Auszug Tab. 16). Die Rolle der einzelnen Thioredoxine in der Redoxregulation ist nicht eindeutig geklärt. Die nötigen Reduktionsäquivalente werden über das photosynthetische Elektronentransportsystem mittels des Ferredoxin-abhängigen Thioredoxin-Reduktase-System (FTR) bereitgestellt. In einigen cyanobakteriellen Gattungen

existiert daneben ein **NADPH-abhängiges Thioredoxin-Reduktase-System (NTR)**, deren Rolle in der Redoxregulation unklar ist [419].

Tab. 16: *trx*-, FTR- und NTR-Gene in Cyanobakterien

	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	<i>Synechococcus</i> spp. WH 8102	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	<i>Nostoc</i> PCC 7120	<i>Nostoc punctiforme</i>	<i>Gleobacter violaceus</i> PCC 7421	<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS 101	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806
<b>TrxA m-Typ</b>	YP 172974	SYNW 0724	TII0812	SII0623	M1: AIIr0052 M2: AII1866	ZP00110 673	GII0880	M1: ZP006 73421 M2: ZP006 73420	5139.1 3727.1
<b>TrxB x-Typ</b>	YP 173010	SYNW 1878	-	SIIr1139	AII2341	ZP00108 082	-	ZP006 74596	5441.3
<b>TrxC</b>	YP 172828	-	TII2087	SII1057	AIIr3955	ZP00107 265	-	ZP006 72151	4985.1
<b>TrxQ y-Typ</b>	-	-	TIIr2286	SIIr0233	AII1893	ZP00105 968	-	ZP006 73542	4468.1
<b>Andere</b>	-	-	-	-	AIIr2205 AII2367 AII7641	-	-	-	<b>2161.1</b>
<b>FTR-System</b>									
<b>Kat. Kette</b>	YP 173067	SYNW 0318	TII0113	SII0554	AIIr4065	ZP001 09445	-	ZP006 75198	4257.1
<b>Var. Kette</b>	YP 171128	SYNW 0521	TsI1517	SsR0330	AII2469	ZP001 10201	-	ZP006 72209	4860.2
<b>NTR-System</b>	YP 171611	SYNW 0687	TII1924	SIIr0600	1: aIIr2204 2: aII0737 3: aII4510	ZP00109 021	1: gII2934 2: gIIr0719	ZP003 26438	<b>1023.1</b>

Aus der Gruppe der Elektronencarrier wurden interessanterweise nur die entsprechenden NADPH-abhängigen Reduktasen (**Glutathion-Reduktase/ Gor**, **NADPH-abhängige Thioredoxin-Reduktase/ IPF 1023.1**) als differentielle Kandidaten selektiert. Die Carrier selbst (nur gezeigt für Thioredoxin/ **IPF 2161.1**) wiesen eine konstante Expression auf. Das **Gor-Protein** reagierte außerdem auf eine externe MC-Addition (4-fache Induktion in der Mutante unter Starklichtbedingungen) und ist putativer Bindepartner des MC. Neben der lichtregulierten Transkription der Gene ist für das **gor**-Gen ein weiterer Regulationsmechanismus bekannt [420]. Dabei ist in *Nostoc* PCC 7120 die Bindung des Transkriptionsfaktors NtcA an den Promotor des **gor**-Gens vom Redoxstatus der Cysteinreste des NtcA-Proteins abhängig. Diese werden wiederum durch den zellulären Redoxstatus reguliert [420]. Möglicherweise sind auch hier unterschiedliche Redoxlevel in Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante für die differentielle Abundanz dieses Proteins verantwortlich. Ebenso sind aufgrund der Bindungsanalysen direkte Interaktionen von MC mit dem Protein möglich und

könnten die Abundanz beeinflussen. Aufgrund einer geringeren Abundanz oder Aktivität der Reduktasen könnten durch eine Nicht-Überführung der Carrier in den reduktiven Zustand die entsprechenden Carrier-regulierten Prozesse (CO<sub>2</sub>-Fixierung, Glycolyse, Glycogensynthese, Stickstoff-Metabolismus, oxidative Stressantwort, Proteinsynthese und -faltung [419]) nicht gesteuert werden. Möglicherweise erklärt sich so, dass viele Zielproteine von TrxA sich mit den potentiellen MC-abhängigen Kandidaten überschneiden (Tab. 17).

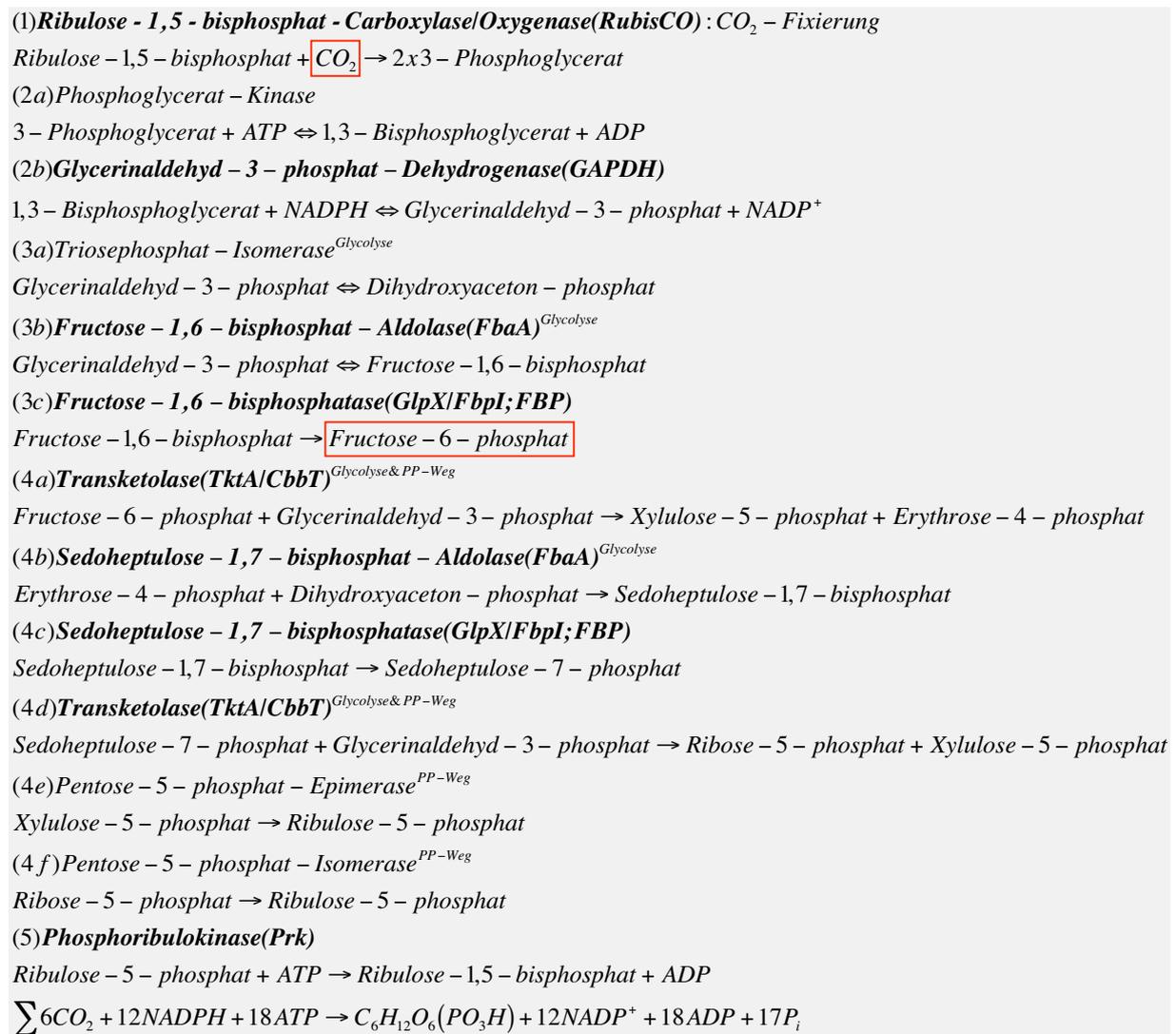
Tab. 17: Vergleich Zielgene Thioredoxin und MC-Kandidaten

Putative TrxA-Zielproteine [421] [422]	Putative MC-abhängige Kandidaten; Putative MC-Bindepartner
<b>Calvin-Zyklus, CO<sub>2</sub>-Fixierung</b> RubisCO Phosphoribulokinase Carbon concentrating mechanism-Proteine CP12	RbcL Prk CcmK CP12-Alternative
<b>Calvin-Zyklus, Glycolyse, PP-Weg</b> Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase, Klasse II Glycerinaldehyd-3-phosphat-DH (Gap2) Phosphoglycerat-Kinase Pyruvat DH (E2) Transketolase	FbaA Gap2 konstant TktA; IPF 1054.1
<b>Glycogenstoffwechsel</b> Phosphoglucomutase ADP-Glucose Pyrophosphorylase Glycogen-Synthase (Glg2) Glucan branching Enzym (GlgB) Glycogenphosphorylase	GlgC
<b>Zucker-Nukleotid-Metabolismus</b> GDP-Mannose Dehydratase Zucker-Nukleotid-Epimerase	
<b>Schwefel-Metabolismus</b> Sulfat-Adenylyltransferase Ferrodoxin-Sulfit-Reduktase	
<b>Stickstoff-Metabolismus</b> Ferrodoxin-GOGAT (GlsF) NADH-GOGAT (GltB) Argininsuccinat-DH Argininsuccinat-Lyase	
<b>Tetrapyrrol-Synthese</b> Porphobilinogen-Synthase	
<b>Antwort auf oxidativen Stress</b> 1-Cys Peroxiredoxin (Prx) YLR109-Homolog (Typ II Prx) Catalase-Peroxidase (KatG)	2-Cys Peroxiredoxine (Prx, BCP)
<b>Lichtsammelkomplex</b> Phycobilisomen core linker Peptid (L <sub>C</sub> ) Phycobilisomen core-membrane linker Peptid (L <sub>CM</sub> ) Phycocyanin-β-UE	CpcB
<b>RNA-Metabolismus</b> RNA-Polymerase β'-UE RNA-Polymerase β-UE Polyribonukleotid-Nukleotidyl-Transferase	
<b>Proteinsynthese/ Faltung</b> Valyl-tRNA-Synthetase Lysyl-tRNA-Synthetase Translationelongationsfaktor EF-G Translationelongationsfaktor EF-Tu 30S ribosomales Protein S3 60 kDa Chaperonin 1 (GroEL)	Ef-Tu
<b>Redoxregulation</b> Thioredoxin	Konstant
<b>Hypothetisch</b> Slr 1855	

#### 4.3.4 Dunkelreaktion/ Calvin-Benson-Bassham-Zyklus oder Reduktiver Pentose-Phosphat-Zyklus

##### 4.3.4.1 Bedeutung, Ablauf und Einordnung der Kandidaten

Der Weg des Kohlenstoffs wurde erstmals 1945 durch Melvin Calvin und seinen Mitarbeitern rückverfolgt. Dabei dient das durch die Wirkung des Lichtes erzeugte NADPH und ATP in der anschließenden Dunkelreaktion der Konvertierung von CO<sub>2</sub> in organische Kohlenstoffbausteine (Fructose-6-phosphat) (Abb. 35). Der Zyklus besteht im Wesentlichen aus drei Schritten: erstens der CO<sub>2</sub>-Fixierung über die Carboxylierung von Ribulose-1,5-bisphosphat (**RubisCO**, **CCM**), zweitens der Reduktion von 3-Phosphoglycerat zu Glycerinaldehyd-3-phosphat unter Verbrauch von ATP und NADPH (**GAPDH**) und drittens der Regeneration des CO<sub>2</sub>-Akzeptors (**TktA**, **FbaA**, **FBP**, **PRK**) (Abb. 35). Die Photosyntheseleistung wird dabei weniger durch die Fixierungsrate der RubisCO, sondern wesentlich durch das Regenerationsvermögen des Calvin-Zyklus bestimmt [423, 424]. Die Licht/ Dunkel-Regulation des Calvin-Zyklus wird in den Pflanzen durch thiolmodulierende Enzyme reguliert. Diese Regulation ist notwendig, da die CO<sub>2</sub>-Konzentration während der nächtlichen Perioden nicht merklich absinkt [425]. In Cyanobakterien sinkt dagegen die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Nacht, so dass RubisCO automatisch deaktiviert wird. Der Calvin-Zyklus der Cyanobakterien wird daher weitestgehend unabhängig vom Ferredoxin/ Thioredoxin-System reguliert. Entscheidend hierbei ist ein kleines Polypeptid (**CP12**), das durch eine reversible Komplexbildung mit PRK und GAPDH in Abhängigkeit von NADPH den Calvin-Zyklus steuert. Der Calvin-Zyklus ist somit bei Licht aktiviert, während er bei Dunkelheit inaktiviert ist.



**Abb. 35: Reaktionen des Calvin-Benson-Bassham-Zyklus**

Enzyme, die differentiell in Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante detektiert worden sind, wurden in dieser schematischen Darstellung des Calvin-Benson-Bassham-Zyklus fett hervorgehoben. Des Weiteren wurden Enzyme, die in mehreren Stoffwechselwegen involviert sind, entsprechend markiert.

#### 4.3.4.2 $CO_2$ -Fixierung: Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/ Oxygenase (RubisCO)

Der erste Schritt der Dunkelreaktion wird durch die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/ Oxygenase (RubisCO) katalysiert. Diese ist in den Carboxysomen lokalisiert und besteht aus acht kleinen (RbcS) und acht großen (RbcL) Untereinheiten  $[(L_2)_4(S_2)_4]$  [426, 427].

*CO<sub>2</sub>-konzentrierende Mechanismen/ Carboxysomen*

Als Reaktion auf sich verändernde CO<sub>2</sub>-Bedingungen sind CO<sub>2</sub>-konzentrierende Mechanismen (CCM) und RubisCO koevolviert [428]. Zwischen der Effizienz der CCM und der Ineffizienz der RubisCO besteht eine inverse Korrelation [428]. Die Verfügbarkeit des inorganischen Kohlenstoffs im Gewässer wird durch die Wassertemperatur, den pH-Wert, den Gasaustausch mit der Atmosphäre und die photosynthetischen und respiratorischen Aktivitäten der Plankton- und benthischen Bewohner bestimmt. Für die Aufnahme des inorganischen Kohlenstoffs haben sich in Cyanobakterien verschiedene C<sub>i</sub>-Transportsysteme entwickelt [429] (Abb. 36). Die Aktivierung der Transportsysteme hängt vom zyklischen sowie vom linearen Elektronenfluss ab [428, 430]. Letzteres wird maßgeblich durch das Verhältnis von PSI/PSII gesteuert, das wiederum von diversen Umweltbedingungen wie der C<sub>i</sub>-Verfügbarkeit abhängt. Eine Konzentrierung der Metabolite in den Zellen kann nur durch Mikrokompartimente in Form polyhedraler Inklusionen ermöglicht werden [431]. Die Anreicherung von CO<sub>2</sub> erfolgt hierbei in den Carboxysomen, die das RubisCO-Enzym enthalten [428]. Über die an den Carboxysomen assoziierte Carbonic-Anhydrase wird Bicarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) in Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) umgewandelt, das sich aufgrund der Diffusionsbarriere durch die hydrophoben **Ccm**-Proteine in den Carboxysomen anreichert [432, 433]. Die erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration aktiviert erstens die RubisCO, steigert zweitens die Affinität für CO<sub>2</sub> und wirkt drittens durch seine Involvierung im C<sub>i</sub>-Transmembranflux auf die Dissipation der Lichtenergie und die Erhaltung des internen pH-Werts [434, 435].

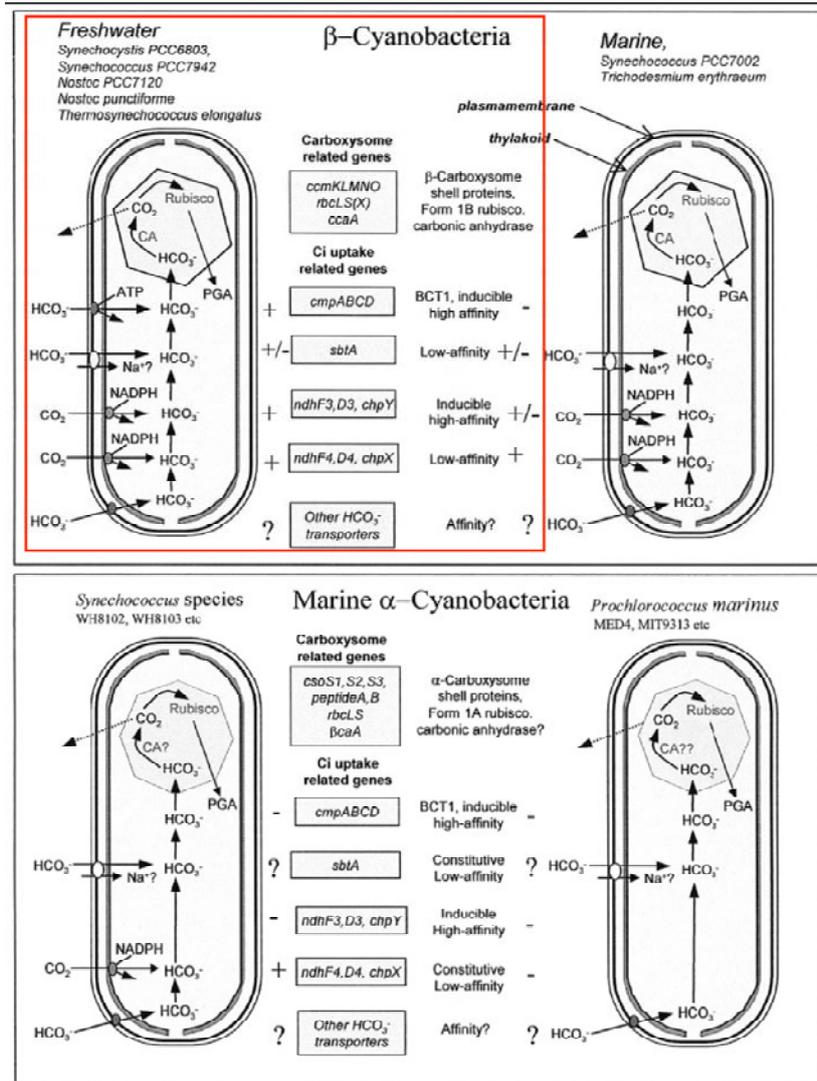


Abb. 36: Kohlenstoff-konzentrierende Mechanismen der Cyanobakterien, nach Badger [434]

Die verschiedenen Kohlenstoff-konzentrierenden Mechanismen der Cyanobakterien sind in diesen Modellen vergleichend dargestellt. *Microcystis* gehört zur Gruppe der im Süßwasser vorkommenden  $\beta$ -Cyanobakterien (rot eingrahmt).

### Biogenese

Zusammen mit *rbcl* (große Untereinheit) und *rbcs* (kleine Untereinheit) wird *rbcx* (Chaperon) transkribiert [436]. Für die Multimerisierung der einzelnen Rbc-Untereinheiten sind sowohl RbcX als auch RbcS verantwortlich [437]. Die kleine Untereinheit ist außerdem für die Assemblierung der Carboxysomen sowie für die Stabilität und Inkorporation der RubisCO in die Carboxysomen von entscheidender Bedeutung [438]. Hierbei ist vermutlich die Homologie von RbcS zu CcmM (Hüllprotein der Carboxysomen) wichtig [428]. Weitere Hüllproteine sind CcmK (Hauptbestandteil der  $\beta$ -Carboxysomenhülle [439]) und CcmN [440]. Die Bedeutung von CcmL ist noch unklar. Es wird vermutet, dass in den Cyanobakterien die

RubisCO während des gesamten Wachstums in Carboxysomen lokalisiert ist [440]. In anderen Organismen wie *H. neopolitanus* variiert dagegen der Anteil der Carboxysomen-gebundenen RubisCO mit der Verfügbarkeit des inorganischen Kohlenstoffs [440].

#### Implikationen von MC

Eine Implikation von MC auf RubisCO wurden erstmals durch Jähnichen *et al.* postuliert [75]. Diese Hypothese wird durch Immunogoldanalysen von Gerbersdorf unterstützt, wonach MC insbesondere im peripheren Bereich der Carboxysomen detektiert werden [293] (Abb. 37).

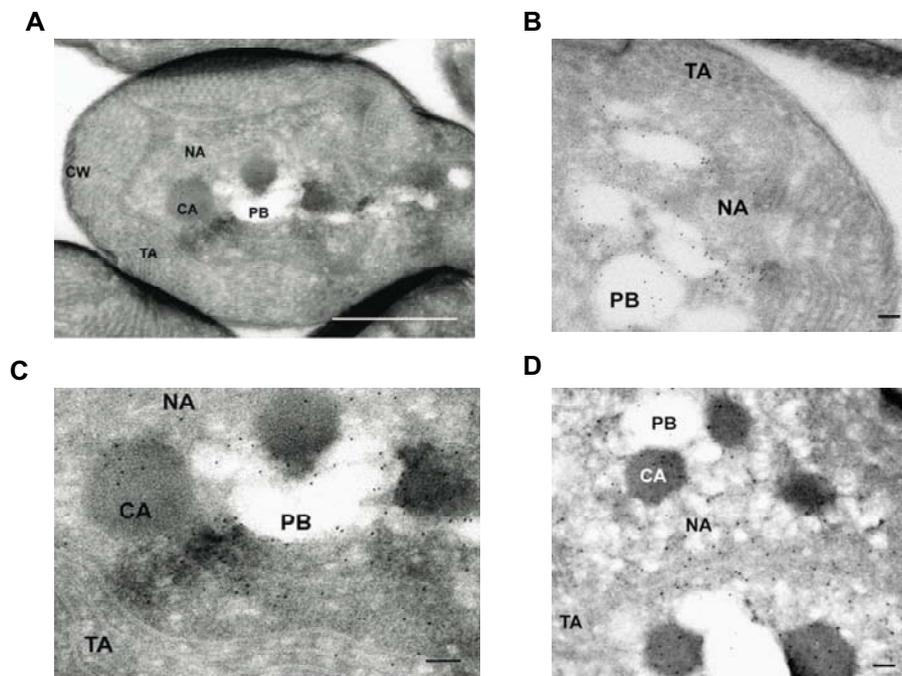


Abb. 37: *In situ*-Detektion von MC in PCC 7806/Wt, aus Gerbersdorf [293]

MC wurde über eine Immunogoldanalyse in den subzellulären Bereichen von PCC 7806/ Wt-Zellen, exponiert für 8 Tage unter mittelstarkem Licht ( $25 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), detektiert. Die einzelnen Abbildungen zeigen unterschiedliche Ausschnitte (B-D; Skala entspricht  $0,1 \mu\text{m}$ ) der *Microcystis*-Zelle (A; Skala entspricht  $1 \mu\text{m}$ ). MC-Signale werden insbesondere in der Zellwand (CW), im nukleoplasmatischen Raum (NA) sowie in der Peripherie der Polyphosphatkörperchen (PB) und der Carboxysomen (CA) beobachtet. Geringere Mengen werden in den Thylakoiden (TA) detektiert. Entsprechende Negativkontrollen mit der  $\Delta\text{mcyB}$ -Mutante wurden durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

Der Einfluß von MC auf RubisCO konnte auch in dieser Studie durch mehrere, unabhängige Versuche bestätigt werden. Dabei werden generell geringere Transkriptmengen in den MC-freien Mutanten gemessen. Für die *ccm*-Gene konnte dagegen eine äquivalente Transkriptakkumulation beobachtet werden. Die Transkription beider Operons wird durch Licht [348] und  $\text{CO}_2$ -Verfügbarkeit (negatives *CO<sub>2</sub> response element*) [436, 441] reguliert. Die RubisCO-Expression wird

außerdem durch die Circadiane Uhr und den Redoxstatus moduliert [348, 397]. Frühere Studien zeigten jedoch, dass Wt und MC-freie Mutanten gleiche *rbcL*-Oszillationsmuster haben [303]. Der Transkriptionsfaktor NtcA stimuliert ebenso die *rbc*-Transkription [442]. Weiterhin konnte in *Chlamydomonas* gezeigt werden, dass sich am N-Terminus der großen Untereinheit ein RNA-Erkennungsmotiv befindet [443]. Unter oxidativen Bedingungen werden die Thiol-Gruppen der großen Untereinheit durch Glutathion oxidiert, was wiederum eine Assoziation mit Chaperonen verhindert [444]. So kommt es zur Exposition des RNA-Erkennungsmotivs, das nun jegliche Transkripte inklusive der eigenen *rbcL*-Transkripte bindet. Auf diese Art wird eine weitere Translation verhindert (Translationsarrest der RbcL) [445, 446].

Möglicherweise sind unterschiedliche Redoxlevel oder eine veränderte Signaltransduktion Ursache der geringeren Transkriptakkumulation in der MC-freien Mutante. Ebenso sind Interaktionen mit Induktoren oder Repressoren vorstellbar. Inwiefern MC die Translation analog des in *Chlamydomonas* entdeckten Regulationsmechanismus beeinflusst, kann nicht abgeleitet werden.

Neben den Effekten auf Transkriptionsebene beeinflusst MC auch die Abundanz des RubisCO-Proteins. Vermutlich ist eine direkte Wechselwirkung von MC mit den Cysteinresten des Proteins Ursache der differentiellen Expression. Cysteine spielen beim *cross-linking* der großen Untereinheiten eine entscheidende Rolle (Multimersierung). Außerdem hängt der Degradationsprozess der RubisCO von oxidativen und glycosylierenden Modifizierungen ab. Eine Oxidation der Cysteine fördert die Proteolyse des Enzyms ebenso wie eine nicht-enzymatische Glycosylierung [447]. Eine mögliche Implikation von MC in Oligomerisierungs- bzw. Degradationsprozesse wird durch das auftretende RbcL-Zweibandenpattern in den MC-freien Mutanten (im Wt meist nur eine Bande sichtbar) unterstützt. In *Chlamydomonas reinhardtii* konnte gezeigt werden, dass diese zweite Bande ein proteolytisches Fragment der großen Untereinheit ist [448]. Durch die Oxidation der Cysteine entstehen Konformationsänderungen, die den unstrukturierten Teil des N-Terminus für Proteasen zugänglich machen. Dies führt zu einem kürzeren Fragment. Substitutionen der Cysteine gegen redoxinsensitive AS ändern die Zugänglichkeit der RubisCO für Proteasen [337, 449]. Möglicherweise verhindert MC – durch eine Bindung an die Cysteine (anhand der Bindungsstudien wahrscheinlich) – eine Oxidation derer. Durch das Fehlen von MC in der Mutante werden diese bei

Redoxveränderungen (z.B. Stress) möglicherweise oxidiert und das Enzym wird fragmentiert. Möglicherweise interagiert MC mit einem der in *Microcystis* (im Gegensatz zu anderen Cyanobakterien) zusätzlichen Cysteinreste (RbcL: 12 $\Leftrightarrow$ 9-10; RbcS: 3 $\Leftrightarrow$ 1-2). Jedoch unterscheiden sich toxische und nicht-toxische Genotypen weder in der Zahl der Cysteine noch in der *rbcL*-Sequenz. Die Bindung von MC an die Cysteinreste von RubisCO könnten durch Basensubstitutionen im RubisCO-Enzym bzw. durch ein am Dehydralaninrest modifiziertes MC überprüft werden.

Mit der Integration der RubisCO in die Carboxysomen ist die Frage verbunden, wenn RubisCO eines der Interaktionspartner des MC ist, wie gelangt MC zu seinem Zielprotein. Dies geschieht möglicherweise während der Assemblierung in die Carboxysomen oder – ähnlich anderen Metaboliten – durch die hexameren Poren und Lücken [439].

Externe Zugaben von MC hatten ebenfalls einen Einfluss auf die Abundanz von RbcL. Hier konnte gezeigt werden, dass die induzierenden sowie reprimierenden Effekte in Abhängigkeit von Stamm, Lichtbedingung und Zelldichte nicht auf eine veränderte *rbcL*-Transkriptakkumulation innerhalb der vier zu vergleichenden Proben (0, 1, 10, 100  $\mu\text{g/L}$  MC) zurückzuführen sind. Obgleich Transkription und Translation in Prokaryoten zeitlich nur wenig voneinander getrennt sind, muss diese Schlussfolgerung hinsichtlich des Wirkorts des MC-Signals aufgrund der gleichzeitigen Probennahme für eine RNA- und Proteinextraktion in weiteren Experimenten geprüft werden. Aus diesen Resultaten ist jedoch offensichtlich, dass MC perzeptiert wird und die Wirkkonzentration durchaus im Bereich der natürlich vorkommenden extrazellulären Konzentrationen liegt. Wie das MC-Signal seinen Wirkort erreicht, kann derzeit nur spekuliert werden. Eine direkte Permeation durch die Membran ist jedoch aufgrund der chemischen Struktur von MC-LR eher auszuschließen. Die induzierenden bzw. reprimierenden Effekte in der Mutante werden vermutlich durch unbekannte Mechanismen oder Redoxänderungen ausgelöst. Diese werden möglicherweise auch durch ein externes MC-Signal ausgelöst und beeinflussen die Abundanz und möglicherweise auch die Oligomerisierung der RubisCO. Faktoren, die in Abhängigkeit von der Zelldichte im Medium akkumulieren, könnten das MC-Signal modifizieren und so den Einfluss der Zelldichte erklären.

#### 4.3.4.3 GAPDH-CP12-PRK und FBP/SBP

Neben RubisCO sind weitere Enzyme des Calvin-Zyklus als in Wt und MC-freier Mutante differentiell exprimierte Kandidaten selektiert worden. Zu diesen gehören die **Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)**, die **Fructose-1,6-bisphosphatase/ Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (FBP/SBP)** und die **Phosphoribulokinase (PRK)**. Im Gegensatz zu den plastidären Enzymen fehlen diesen cyanobakteriellen Homologa die redoxsensitiven Cysteinreste (GAPDH, FBP) bzw. wichtige, dazwischen liegenden Genabschnitte (PRK) [450, 451, 452]. Gegen Behandlungen mit Wasserstoffperoxid, jedoch nicht mit DTT, sind diese Enzyme resistent. Eine Regulation dieser Enzyme, gleich dem System in den Plastiden, über das Ferredoxin-abhängige Thioredoxin-System findet in Cyanobakterien nicht statt [319]. Die Aktivierung bzw. Deaktivierung der Enzyme der Reduktion von Bisphosphoglycerat zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAPDH) und der Rückgewinnung des CO<sub>2</sub>-Akzeptors (PRK) erfolgt durch die Bildung eines Supramolekularen Komplexes. Dies wird durch ein kleines Peptid, das **CP12**-Polypeptid, ermöglicht [453, 454].

#### *CP12-Polypeptide (chloroplast protein)*

**CP12**-Polypeptide sind in allen oxygen-phototrophen Organismen vorhanden. Sie enthalten an ihrem C-Terminus zwei konservierte Cysteinreste [455]. In einigen CP12-Polypeptiden ist ein zusätzliches Cystein-Paar am N-Terminus lokalisiert. Die Aktivierung erfolgt über die Oxidation bzw. Reduktion der Cysteinreste durch Thioredoxin [454]. CP12-Polypeptide gehören aufgrund ihrer AS-Zusammensetzung zu den intrinsisch unstrukturierten Proteinen (IUP). Aufgrund ihrer inhärenten Flexibilität vermitteln IUP typischerweise Protein-Protein-Interaktionen und fördern die Bildung Supramolekularer Komplexe [456].

#### *Steuerung der Aktivität von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; Gap2) und Phosphoribulokinase (PRK) durch CP12*

Einige Enzyme des Calvin-Zyklus sind ebenso in der Glykolyse und im oxidativen Pentose-Phosphat-Weg aktiv (Abb. 35). Ausnahme bilden die zwei folgenden Enzyme: **GAPDH** und **PRK**. In der Regel besitzen Cyanobakterien nämlich zwei *gap*-Gene (auch PCC 7806), wobei Gap1 als Dehydrogenase in der Glykolyse und **Gap2** im Calvin-Zyklus aktiv ist [457]. PRK und GAPDH (Gap2) werden durch die Eingliederung in den Supramolekularen Komplex, wobei das CP12-Protein als

Gerüst fungiert, deaktiviert [319, 454]. Die Assoziation bzw. Dissoziation des Komplexes wird in Cyanobakterien durch das Verhältnis von NADP(H) zu NADH bestimmt [319]. Dieses Verhältnis ändert sich in Abhängigkeit von den Lichtbedingungen (Dunkelheit: 3,8; Licht: 6,5). Oxidierende Bedingungen (Dunkelheit) fördern die Komplexbildung während reduzierende Bedingungen (Licht) zu einer Dissoziation führen (Abb. 38).

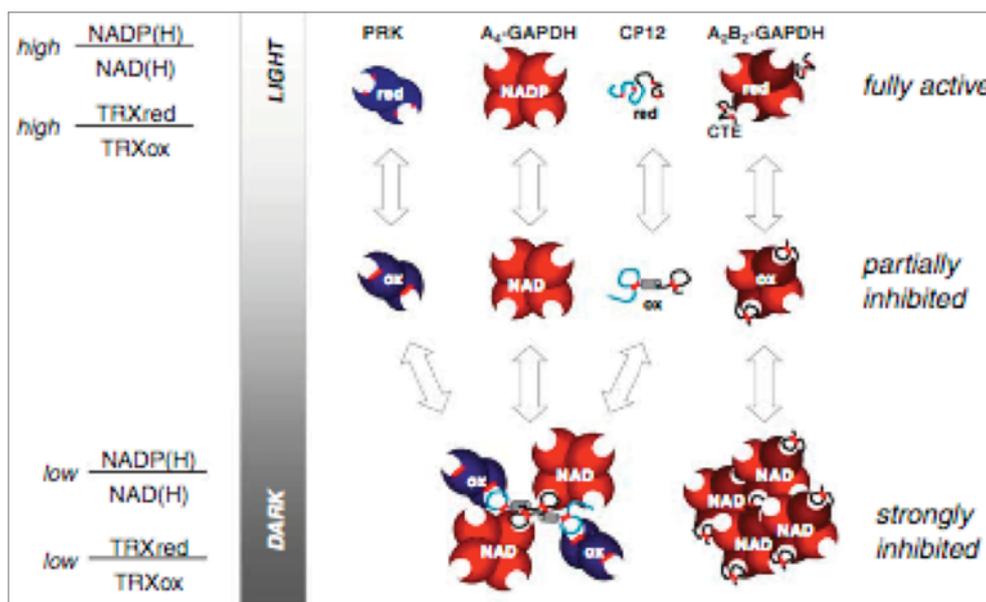


Abb. 38: CP12-GAPDH-PRK-Interaktion aus Trost *et al.* [458]

Schematische Übersicht über Interaktion und Regulation des GAPDH-CP12-PRK-Komplexes. Licht fördert die Dissoziation des Komplexes. Reduzierte Formen von PRK sowie die in der NADP-bindenden Konformation GAPDH sind unter diesen Bedingungen aktiv während die oxidierte Formen von CP12 nicht mit den Partnern interagieren kann. Unter dunklen Bedingungen werden CP12 und PRK oxidiert und GAPDH in die NAD-bindende Konformation gebracht. Nach Bindung von GAPDH an CP12 kann auch PRK in den Komplex integriert werden. Die Bildung des Komplexes bewirkt eine Inaktivierung von GAPDH sowie PRK.

Möglicherweise führen die erhöhten Mengen an negativ geladenen Phosphatgruppen von NADP<sup>+</sup> und NADPH (bei Lichteinfluss) durch die Bindung an CP12 zur Zerstörung der elektrostatischen Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Epitopen von PRK und GAPDH und den negativ geladenen Resten der Peptidschleifen von CP12 [319]. Wenn NADPH ausreichend vorhanden ist, bindet zuerst GAPDH (Tetramer) an die C-terminale Schleife des CP12-Polypeptids [319, 454]. Dazu muss die vorher unstrukturierte Konformation des CP12-Polypeptids durch eine Oxidation in eine flexible, strukturierte Form überführt werden [459]. Nach Bindung von GAPDH an das CP12-Polypeptid ist die Bindung von PRK (Dimer) an die N-terminale Schleife des CP12-Polypeptids erleichtert, denn

die Affinität von PRK zu GAPDH *per se* ist relativ gering [456]. Eine mögliche Redoxregulation von PRK und CP12-Polypeptid in Cyanobakterien ist noch nicht eindeutig geklärt. Jedoch soll nur die oxidierte PRK-Form an den N-Terminus von CP12 binden können [319, 454]. Durch NADPH wird eine reversible Dissoziation des Komplexes erreicht [454]. CP12-Mutanten von *Synechococcus* wachsen normal unter kontinuierlichen Lichtbedingungen. In einem Tag/ Nacht-Rhythmus ist jedoch das Wachstum beeinträchtigt [319]. Das CP12-Polypeptid ist daher für die Feinmodulation des Calvin-Zyklus unter verschiedenen Lichtbedingungen verantwortlich.

*Fructose-1,6-bisphosphatase/ Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (FBP/SBPase; Fbpl/GlpX) und Glycogensynthese*

Das aus FBP und SBP kombinierte Enzym wurde bisher nur in Cyanobakterien sowie wenigen anderen Bakterien (z. B. *Rhodospseudomonas*, *Nocardia*, *Hydrogenomonas*, *Xanthobacter*, *Alcaligenes* und *Nitrobacter*) gefunden. Es katalysiert sowohl die Hydrolyse von Fructose-1,6-bisphosphat als auch die Hydrolyse von Sedoheptulose-1,7-bisphosphat [320, 451]. **Fbpl** unterscheidet sich in der Primärsequenz von den pflanzlichen FBPs und zeigt Ähnlichkeiten zu dem **GlpX**-Protein aus *E.coli*, das in der Gluconeogenese involviert ist [451]. Über die Evolution dieses Proteins wird derzeit noch diskutiert. Möglicherweise fungiert es als regulatorischer Faktor der Photosynthese anstelle einer Licht/ Dunkel-Regulation in höheren Pflanzen. Mit der Entwicklung dieses Enzyms in Cyanobakterien ist es möglich, Calvin-Zyklus und Gluconeogenese gemeinsam zu regulieren und oxidativen Stress besser zu tolerieren [320]. Mit der Synthese von Fructose-6-phosphat durch die FBPase ist außerdem einer der Verzweigungspunkte erreicht, wo Metabolite den Calvin-Zyklus verlassen und zur Glycogenbiosynthese verwendet werden. Glycogen, ein Glucose-Polymer aus  $\alpha$ -1,4- und  $\alpha$ -1,6-glycosidischen Verbindungen, dient der Zelle als Energiespeicherstoff. Einer der ersten Schritte der Glycogensynthese wird durch die **Glucose-1-phosphat-Adenyltransferase** oder auch **ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (GlgC)** katalysiert [382].

*Transketolasen*

Transketolasen transferieren zwei Kohlenstoffhydroxyethylgruppen mittels des Cofaktors Thiamindiphosphat (ThDP) von einem Keton-Donor zu einem Aldose-Akzeptor. Diese Enzyme sind ubiquitär verbreitet und spielen eine essentielle Rolle

im Metabolitentransfer zwischen oxidativen und reduktiven (Calvin-Zyklus) Pentose-Phosphat-Zyklus. In *Rhodobacter sphaeroides* konnte gezeigt werden, dass das CbbT-Protein ausschließlich im Calvin-Zyklus fungiert [460]. Es besitzt ein bestimmten Cystein-Rest (Cys<sub>160</sub>), über welchem die Bindung des Kofaktors ermöglicht wird [460]. In dieser Studie konnte zum einen die **Transketolase (TktA)** selbst und zum anderen ein **Transketolase-ähnliches Protein (IPF 1054.1)** identifiziert werden.

#### *Fructose-bisphosphat-Aldolase (FbaA)*

Im Gegensatz zu GAPDH (*gap2*) existieren für die **Fructose-bisphosphat-Aldolase (FbaA)** nicht zwei Gene in den Cyanobakterien. FbaA ist sowohl im Calvin-Zyklus als auch in der Glycolyse aktiv. Neben anderen glycolytischen Enzymen wird *fbaA* durch ein Zweikomponentensystem reguliert, das sowohl durch Licht als auch bei Glucosemangel aktiviert wird [461].

#### *Implikationen von MC im Calvin-Zyklus*

Die meisten in der 2D-Studie identifizierten, MC-abhängigen Proteine sind im Calvin-Zyklus involviert. Viele von ihnen sind ausschließlich in diesem Zyklus aktiv und besetzen dort Schlüsselpositionen. Daher ist eine Implikation von MC in diesem lichtabhängigen Prozess sehr hoch.

Viele Enzyme des Calvin-Zyklus sind stark präsent in den Zellen (bis auf FBP/SBPase). Während **RubisCO** und **PRK** bei Dunkelheit schwächer in der MC-freien Mutante exprimiert sind, sind **GAPDH** und **FBP** hier stärker exprimiert. Dies konnte durch zwei unabhängige Softwareprogramme sowie durch Immunoblots bestätigt werden. Nur für wenige Enzyme (PRK, RbcL, TktA) konnte auch eine direkte Reaktion auf eine MC-Addition beobachtet werden. **RubisCO** und **PRK** wurden zudem als MC-Bindungspartner identifiziert. Diese Art der Interaktion konnte durch Immunoblotanalysen für RbcL verifiziert werden. **Ccm**-Proteine entsprechen dem Expressionsmuster von RubisCO, das die gemeinsame licht- und CO<sub>2</sub>-abhängige Regulation unterstützt. Eine generell niedrigere **ccm**-Transkriptakkumulation in den MC-freien Mutanten, wie für *rbcL* gezeigt, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die Transkription von *rbc*-, *ccm*- und *gap2*-Gen ist licht- (Steuerung durch den Elektronenfluss vom PSI [388, 399, 462]), die von *prk*, *fbpl*, *fbaA* aber auch *rbcLXS* ist redoxreguliert [394, 395, 396, 397, 398, 399]. Generell werden **RubisCO** und

**GAPDH** eher auf Transkriptniveau reguliert, während die **PRK**-Expression posttranslational über das Ferredoxin/ Thioredoxin-System kontrolliert wird [387]. Inwiefern die unterschiedlichen **GAPDH**-Abundanzen in Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante, ähnlich wie für *rbcL* gezeigt, daher auf eine transkriptregulierte Expression zurückzuführen sind, wurde jedoch nicht überprüft. Die Aktivitäten von **FbaA** (*fbaA*) und **FBP/ SBP** (*fbpI glpX*) wiederum werden durch ihre Substrate reguliert [387]. Durch Northern Blot-Analysen konnte ausgeschlossen werden, dass die differentielle Expression von **FbaA** (3-fach schwächer exprimiert als im Wt unter Starklicht und bei Dunkelheit) auf eine unterschiedliche Transkriptakkumulation zurückzuführen ist. Auch die stärkere Expression des **GlgC**-Protein unter Starklicht (2,6-fach) und bei Dunkelheit (4,3-fach) in der  $\Delta mcyB$ -Mutante ist nicht durch eine unterschiedliche Transkriptakkumulation bedingt.

Eine weitere interessante Entdeckung dieser 2D-Studie ist die differentielle Expression von alternativen CP12-Polypeptiden in Abhängigkeit vom MC. In *Microcystis* PCC 7806 existieren vier dieser CBS-Domänen (benannt nach der Cystathionin- $\beta$ -Synthetase, in welcher diese Domäne erstmalig entdeckt worden ist) enthaltende Polypeptide, wobei das kürzeste (IPF 141.1/ 8,3 kDa) den CP12-Polypeptiden aus *Synechocystis* PCC 6803 (*ssl13364*) und *Nostoc* PCC 7120 (*asl12850* und *asr0905*) ähnelt (Alignment siehe Anhang D). Alle vier Gene liegen verstreut im *Microcystis*-Genom. Die zusätzlichen CP12-Polypeptide (**IPF 2164.1**, **IPF 3982.1**, IPF 6461.1; ca. 23 kDa) sind länger, besitzen einen zusätzlichen, N-terminalen Cystein-Rest und ähneln in ihrer Sequenz einem aus *Nostoc* PCC 7120 (*alr0765*) bekanntem Protein. Eines der C-terminalen Cysteinreste fehlen jedoch in Alr0765 sowie IPF 3982.1 und IPF 6461.1. In *Anabaena variabilis* ist ebenso ein verlängertes CP12-Polypeptid detektiert worden. Hier wird vermutet, dass das CP12-Polypeptid mit dem ORF4-Protein fusioniert wurde ( $\Sigma$  ORF3) [454, 463]. Dieses so verlängerte CP12-Polypeptid (ORF3) liegt in einem Operon, das für die Untereinheiten der NADPH-abhängigen bidirektionalen Hydrogenase kodiert [464]. Daher könnte ORF3 (verlängertes CP12-Polypeptid) eine signifikante Rolle in der Regulation der heterocystenspezifischen Hydrogenaseaktivität (NADPH-abhängige reversible Dissoziation des Proteinkomplexes) haben [454]. *Microcystis* ist jedoch nicht in der Lage den Luftstickstoff zu fixieren und bildet keine Heterocysten. Die Bedeutung dieser zusätzlichen CP12-Polypeptide in dieser Spezies sowie die Möglichkeit einer Genfusion wären in weiteren Analysen zu klären.

**IPF 2164.1** und **IPF 3982.1** waren gegensätzlich in der Mutante im Gegensatz zum Wt unter dunklen Bedingungen exprimiert. **IPF 2164.1** war unter Starklicht sogar 6-fach stärker in der Mutante exprimiert. Beide Proteine reagierten auf eine externe MC-Addition. Ob auch das eigentliche CP12-Polypeptid (IPF 141.1) differentiell in Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante exprimiert ist, lässt sich anhand der 2D-Ergebnisse nicht klären. Vermutlich konnte dieses Protein aufgrund seiner kleinen Größe entweder nicht identifiziert (kein Hit im MALDI) werden oder nicht in 12,5 % 2D-Gelen erfasst werden. Erste Analysen von cytosolischen Extrakten mittels SDS-PAGE sowie von cytosolischen Proteinkomplexen mittels BN-PAGE offenbarten in anschließenden Immunoblots gegen CP12 ein unterschiedliches Bandenpattern in Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante. Dabei tauchte die kleinere, eigentliche CP12-Form, abgeschätzt anhand des Molekulargewichts (8 kDa), nur im Wt auf. Eine Detektion der alternativen CP12-Polypeptide mittels dieses Antikörpers ist aufgrund der Bandengröße (23 kDa) möglich, jedoch nicht eindeutig. Das Ergebnis zeigt, dass die unterschiedlichen Abundanzen der Calvin-Enzyme möglicherweise auf veränderte Komplexbildungen mit den einzelnen CP12-Polypeptiden zurückzuführen sind. Interessantester Kandidat ist dabei das CP12-Polypeptid mit der **IPF-Nr. 2164.1**, da es sowohl den zusätzlichen Cysteinrest am N-Terminus als auch den am C-Terminus besitzt. Des Weiteren liegt es in einem putativen Operon zusammen mit dem über 2D identifiziertem Thioredoxin (im Genom als TrxA bezeichnet). Möglicherweise unterliegen beide der gleichen Transkriptionskontrolle. Ihre Proteine werden jedoch in Abhängigkeit vom MC unterschiedlich reguliert.

Zusammenfassend treten in der Mutante verstärkt Enzyme auf, die am Aufbau von Zuckerderivaten beteiligt sind – wie **GAPDH**, **FBP** und **TktA** sowie **GlgC**. Diese Beobachtung wird durch elektronenmikroskopische Bilder unterstützt, in welchem eine vermehrte Glycogenbildung in der  $\Delta mcyB$ -Mutante von *Planktothrix agardhii* CYA 126 detektiert werden konnte (G. Christiansen, persönliche Mitteilung). Im Wt sind dagegen das CO<sub>2</sub>-fixierende Enzym (**RubisCO**) und die an der Regeneration des CO<sub>2</sub>-Akzeptors mitwirkende **PRK** verstärkt. Möglicherweise interagiert MC mit RubisCO und PRK direkt, während die anderen Enzyme durch die Beeinflussung des photosynthetischen Elektronenflusses oder der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten in ihrer Expression und/oder Aktivität beeinflusst werden. Ob PRK ähnlich wie RubisCO auf beiden Expressionsebenen reguliert wird, müsste in nachfolgenden Experimenten geprüft werden. Die ökologische Bedeutung der MC-

Implikation im Calvin-Zyklus wird in einer der letzten zusammenfassenden Kapitel diskutiert (4.6).

Im nächstfolgenden Abschnitt werden MC-abhängige Proteine untersucht, die möglicherweise direkt oder indirekt in Zell-Zell-Interaktionen involviert sind (4.4).

#### 4.4 Implikationen von MC in Zell-Zell-Interaktionen

Implikationen von MC in Zell-Zell-Interaktionen wurden erstmals durch Kehr *et al.* postuliert [282]. Die Implikation beruht auf der differentiellen Expression von Microvirin (MVN), einem extrazellulären Mannose-bindenden Lektin, in Wt und MC-freien Mutanten [282]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass über eine kovalente Bindung von MC an die Cysteinreste des Proteins die Oligomerisierung der MVN-Monomere beeinflusst wird (Jan-Christoph Kehr, persönliche Mitteilung). Die in der Regel als Multimere agierenden Lektine haben aufgrund ihrer zuckerbindenden Eigenschaften eine zellvernetzende Wirkung [465]. Sie spielen daher insbesondere bei der Wirtszellerkennung (pathogene Bakterien) und der Ausbildung von Biofilmen eine Rolle [306, 466, 467]. Möglicherweise wird über die Beeinflussung des Oligomerisierungszustandes des Lektins durch MC, die Zellaggregation gesteuert. Dem MVN könnte daher in der postulierten Morphotyp-Chemotyp-Korrelation eine besondere Bedeutung zukommen (1.3.5.3).

Zell-Zell-Interaktionen werden im Wesentlichen durch extrazelluläre Proteine/Faktoren ermöglicht. Im Folgenden werden zwei solcher hypothetischen Proteine und ein durch Mediumfaktoren beeinflusstes Protein vorgestellt. Alle drei Proteine wurden über 2D als MC-abhängige Kandidaten selektiert.

##### 4.4.1 MrpA – ein durch Mediumfaktoren reguliertes, hypothetisches Protein in *Microcystis*

Das *MC related protein A* (MrpA) wurde bereits in einer der vorigen proteomischen Studien als differentieller Spot in Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante detektiert [274]. Zusammen mit *mrpA* wird *mrpB* transkribiert. Beide Genprodukte sind den Proteinen RhiA und B aus *Rhizobium* ähnlich [274]. Die in einem Operon organisierten *rhiABC*-Gene (*rhizosphere expressed*) sind *quorum sensing* reguliert [468, 469]. Die Aktivierung der Gene erfolgt durch den AHL/ RhiR-Komplex, wobei RhiR ein LuxR-Typ Regulator ist [468, 469]. Die Funktion der Rhi-Proteine ist jedoch weitgehend unklar. Aufgrund

dieser Parallelen wurde vermutet, dass MrpA sowie MC in *Quorum-sensing*-ähnliche Prozesse in *Microcystis* involviert sind.

Im Gegensatz zur ersten 2D-Studie, wo MrpA ausschließlich in Wt-Extrakten detektiert werden konnte [274], ist MrpA in der aktuellen proteomischen Studie eines der dominantesten Proteine in den  $\Delta mcyB$ -Extrakten. MrpA ist hier etwa 35-fach stärker exprimiert. Die Belichtungsexperimente beider Studien wurden unter den gleichen Lichtbedingungen ( $70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) sowie in der gleichen Wachstumsphase (späte exponentielle Phase) durchgeführt. Ebenso erfolgten die Probenahmen zu gleichen Zeiten (2 h). Der entscheidende Unterschied besteht jedoch in der Mediumkomposition. In der ersten Studie erfolgte ein Mediumwechsel kurz vor Belichtung [274] – in der aktuellen Studie dagegen nicht. Für *Quorum-sensing*-regulierte Prozesse ist die Akkumulation des *Autoinducers* in der späten exponentiellen Wachstumsphase jedoch von entscheidender Bedeutung [470]. Ebenso ist die Konzentration anderer Mediumfaktoren in diesem Zusammenhang wichtig [362]. Dieser indirekte Nachweis verdeutlicht, dass erstens die MrpA-Expression durch Mediumfaktoren beeinflusst wird und zweitens nicht MC das interzelluläre Signal für die Aktivierung der MrpA-Expression ist. In Abhängigkeit von bisher unbekanntem Mediumfaktoren kommt es in der  $\Delta mcyB$ -Mutante zur Induktion bzw. Repression des Proteins. Möglicherweise beeinflusst MC die Abundanz, Aktivität oder auch Stabilität eines Medium- bzw. putativen Signalfaktors, so dass es im Wt zu einer geringeren Expression von MrpA im Vergleich zur Mutante kommt. Dies könnte auf eine Interaktion des extrazellulären MC mit dem Mediumfaktor zurückzuführen sein. Durch die Wechselwirkung wird die Signalfunktion des Mediumfaktors inhibiert. Andererseits könnte auch das intrazelluläre MC die Expression oder auch die Sekretion des Mediumfaktors beeinflussen.

#### 4.4.2 MrpC – ein Zell-Zell-Kontakte vermittelndes, glycosyliertes Protein in toxischen *Microcystis*-Stämmen

##### *MrpC – Identifizierung, Translokation und Glycosylierung*

Das in dieser Studie in Abhängigkeit von MC selektierte Protein wurde analog zu MrpA und MrpB MrpC (*MC related protein*) genannt. MrpC ist sowohl in extrazellulären als auch in cytosolischen Extrakten jeweils stärker in der  $\Delta mcyB$ -Mutante exprimiert. Dieses konnte zum einen durch Coomassie-gefärbte Gele und

zum anderen mittels eines gegen MrpC gerichteten Antikörpers gezeigt werden. Die Spezifität des in dieser Studie hergestellten Antikörpers ließe sich erst nach einem Knockout von *mrpC* endgültig überprüfen. So können die höher molekularen Banden Oligomerisierungsprodukte von MrpC sein oder unspezifische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen darstellen. Trotz mehrerer Versuche war ein Knockout des Gens bisher erfolglos. Ursache dafür könnte die hohe Zahl an Endonukleasen sein [340, 471]. *Northern Blot*-Analysen zeigten, dass die stärkere Abundanz des Proteins in den MC-freien Mutanten nicht auf unterschiedliche Transkriptakkumulationen zurückzuführen ist.

Die Detektion von MrpC in extrazellulären Extrakten bedingt einen Transport des Proteins über die Plasmamembran. *In silico*-Analysen offenbarten eine 33 AS lange Signalsequenz, deren Struktur auf einen posttranslationalen Sec-abhängigen Transport schließen lässt [472, 473] (Abb. 39).

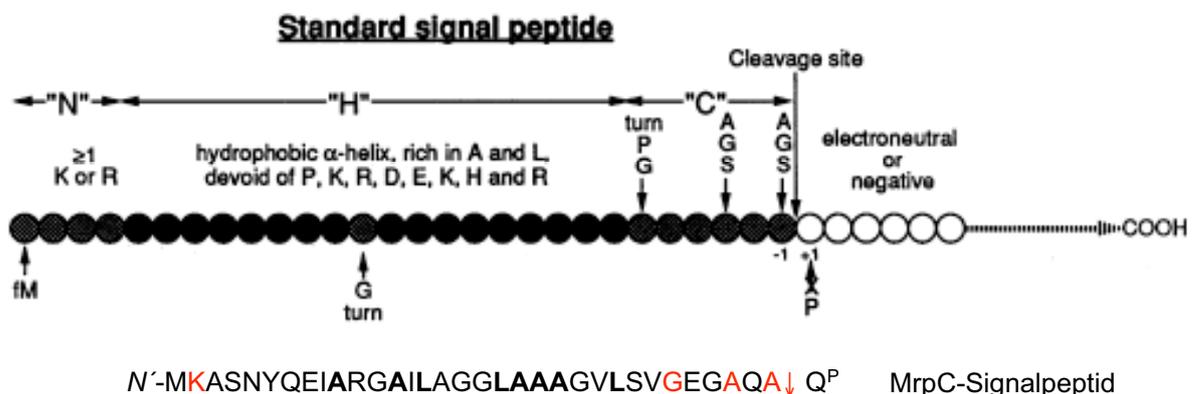


Abb. 39: Vergleich MrpC-Signalpeptid mit dem „Standard-Sec-Signalpeptid“ nach Pugsley (1993) [472]

Die MrpC-Sequenz entspricht in ihrer Anordnung und in ihren Strukturmerkmalen dem typischen Signalpeptid des Sec-Transportweges. Die N-terminale Region besitzt den typischen Lysin-Rest (K), die Kernregion besteht hauptsächlich aus hydrophoben AS wie Alanin (A) und Leucin (L). Der C-terminale Teil beginnt mit einer Biegung am Glycin-Rest (G) und endet mit dem typischen AxX-Motiv. Der Glutamat-Rest (Q) des verbleibenden Peptids wird zu Pyroglutamat zyklisiert. Beim Sec-abhängigen Transportweg bindet das cytosolische Chaperon SecB an das entstehende Präprotein am Ribosom [474, , 475, , 476], verhindert so die Faltung und Aggregation des Proteins [477] und erhält somit das Protein in einen „translokationskompetenten Status“ [478, , 479]. SecB führt das Präprotein anschließend zu der membranintegrierten ATPase SecA und vermittelt eine Interaktion beider. Während der Translokation durch die Plasmamembran wird die Signalsequenz durch die Signalpeptidase abgeschnitten.

Die Präform von MrpC (vor Abspaltung der Signalsequenz) konnte jedoch nicht in den cytosolischen Extrakten identifiziert werden. PSD-Analysen zeigten, dass „das cytosolische Protein“ der 17 kDa-Form der Zelloberflächenfraktion entspricht. Beide Proteine haben einen modifizierten N-terminalen Glutamatrest (Pyroglutamat-Zyklisierung), der nach Abspaltung der Signalsequenz entsteht. Diese Art der N-

terminalen Modifizierung wurde auch für andere extrazelluläre Proteine von Pro- und Eukaryoten beschrieben [327]. Somit ist das im Cytosol detektierte Protein ein bereits sezerniertes Protein. Während keine cytosolischen Proteine in beiden extrazellulären Fraktionen (Zelloberfläche, Medium) zu finden waren (Immunoblot gegen RbcL), konnten MVN-Banden auch in der cytosolischen Fraktion jedoch nicht im Medium nachgewiesen werden. Die Zelloberflächenfraktion konnte somit nicht klar von der cytosolischen Fraktion getrennt werden. Hierfür ist weitere Optimierungsarbeit nötig.

Eine ungewöhnlich geringe Sequenzabdeckung im MALDI sowie die Abweichung zwischen berechnetem und in Western Blots ermitteltem Molekulargewicht (17 kDa<sub>prozessiert</sub> im Vergleich zu 12 kDa<sub>prozessiert</sub>) wiesen auf umfangreiche Modifizierungen hin. Im Laufe der PSD-Analysen des Proteins traten für Glycosylierungen typische Peptidfragmentverluste auf [480, 481]. In den meisten Bakterien sind Glycoproteine und die Komponenten der Glycosylierungsmaschinerie in zueinander benachbarten Genen organisiert [482]. Stromabwärts von *mrpC* liegen die Gene *slpA* und *slpB*. Beide kodieren für eine N-Acetylglucosamintransferase (OGT), von denen bekannt ist, dass sie N-Acetylglucosamin (GlcNAc) in einer O-glycosidischen Bindung auf Serin und Threonin-Reste des Zielproteins übertragen [483]. *MrpC* sowie die weiter stromabwärts liegenden ORF1 und ORF2 haben mit 18-20 % einen ungewöhnlich hohen Anteil an Serinen und Threoninen. Diese Form der Glycosylierung für *MrpC* konnte in Immunoblots gegen GlcNAc bestätigt werden. Dabei trägt nur die 17 kDa-Form diese Modifizierung. Bei der kleineren, ins Medium abgegebenen 14 kDa-Form konnte diese Art der Glycosylierung nicht nachgewiesen werden. PSD-Analysen zeigten außerdem, dass beide Proteinformen hochgradig mit weiteren Zuckerresten modifiziert sind.

#### *Funktion der Glycosylierung extrazellulärer Proteine in anderen Bakterien*

Die Glycosylierung als eine Form der posttranslationalen Modifizierung ist in Bakterien bisher nur wenig untersucht worden. Jedoch wurde im Zuge der Untersuchung der Äußeren Membran, der Zelloberfläche und des Mediums eine Reihe glykosylierter Proteine entdeckt [484, 485]. Glycoproteine sind unter anderem an der Ausbildung extrazellulärer Strukturen wie Fimbrien und Pili [486, 487] aber auch in Zell-Zell- [488, 489] bzw. Zell-Oberflächen-Wechselwirkungen (*non-pilus* oder afimbriale Adhesine) [490] beteiligt (siehe Review [485]). Insbesondere

pathogene Bakterien nutzen die adhesiven Eigenschaften für eine Zell-Wirtszell-Interaktion. Adhesine grampositiver Bakterien sind zum Beispiel Hsa aus *Streptococcus gordonii* [491], Fap1 aus *Streptococcus parasanguis* [492], SraP aus *Staphylococcus aureus* [493] und SrpA aus *Streptococcus sanguis* [494]. Zu den Zell-Zell-interagierenden Proteinen gramnegativer Bakterien gehören zum Beispiel das HmWA aus *Haemophilus influenzae* [495] und das Autotransporter-Protein Ag43 aus *Escherichia coli* [496, 497]. MrpC besitzt zwar nur eine sehr geringe Homologie zu Adhesinen, die Zell-Zell-vernetzende Wirkung wird jedoch durch die Fluoreszenzbilder deutlich. Adhesine besitzen in der Regel membranverankernde Sequenzen (C-Terminus), die eine Fixierung an der Oberfläche ermöglichen. MrpC (17 kDa) ist jedoch viel kleiner als die bisher bekannten Proteine ( $\varnothing$  150 kDa), und eine Verankerungssequenz ist anhand der Primärsequenz nicht zu erkennen. Möglicherweise übernimmt eines der im Operon lokalisierten Gene diese Funktion. In welchem Kompartiment die Glycosylierung bakterieller, extrazellulärer Proteine stattfindet, ist strittig. Man vermutet analog der Prozesse im eukaryotischen Endoplasmatischen Retikulum eine extrazelluläre Glycosylierung. In *Mycobacterium tuberculosis* findet die Glycosylierung durch membranverankerte Mannosyltransferasen während der Translokation statt [498]. Jedoch konnte gerade für viele Adhesine gramnegativer und grampositiver Bakterien gezeigt werden, dass die Glycosylierung noch vor der Translokation, also im Cytosol stattfindet [492, 499, 500]. Hierbei trägt die Glycosylierung inner- wie außerhalb der Zelle zur Stabilität des Proteins (konformationserhaltend, Schutz vor proteolytischer Zersetzung) bei [501, 502].

#### *Funktion der O-GlcNAc-Modifizierung in anderen Organismen*

Das O-glycosidisch verknüpfte N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) wurde erstmalig in tierischen Geweben durch Torres und Hart entdeckt [503]. Hierbei stellt die Glycosylierung einen wichtigen Gegenspieler zur Phosphorylierung von Proteinen dar und hat Einfluß auf die Multimerisierung des Proteins [504]. Enzyme mit OGT-Aktivitäten sind bei Transkriptions-, Proliferations-, Apoptoseprozessen, proteasomischen Degradationen und an der Zusammensetzung der Histone beteiligt [504]. Prominenteste Beispiele sind die Insulin-Signalkaskade in tierischen Geweben und die Gibberellin-Signalkaskade in Pflanzen. In letzterem ist SPINDLY mit seiner OGT-Domäne eines der globalen negativen Regulatoren der Gibberellin-Biosynthese

[505]. Diese Enzyme bestehen aus der am N-terminalen Ende lokalisierten Information über die Art des Zielproteins, TPR-Domänen, einer *linker*-Region und der am C-Terminus lokalisierten katalytischen Domäne [504]. TPR-Motive sind 34 AS lange Wiederholungssequenzen (*tetratricopeptide repeat*), die ubiquitär von den Bakterien bis hin zu höheren Eukaryoten verbreitet sind und Protein-Protein-Interaktionen sowie Multimerisierungen vermitteln [506]. O-Glycosylierungen in Bakterien sind bisher kaum beschrieben. *N-linked* Glycosylierungen sind oft leichter zu identifizieren, weil die Bindungsstellen eine Consensus-Sequenz (Asn-X-Ser/Thr) aufweisen. Für *O-linked* Glycosylierungen gibt es keine Consensus-Sequenz. Außerdem werden hier die Bindestellen von zusätzlichen Ser oder Thr-Resten flankiert, so dass allein aus der Primärsequenz nicht auf diese zu schließen sind [481].

In *Microcystis* PCC 7806 sind zwei SPINDLY-ähnliche Proteine (SlpA, SlpB) identifiziert worden, wobei SlpA im Gegensatz zu SlpB TPR-Motive besitzt und eine höhere Ähnlichkeit zum SPINDLY-Homolog aus *Arabidopsis* aufweist. SPINDLY-ähnliche Proteine, jedoch meist ohne TPR-Motive, wurden auch in anderen Bakterien gefunden. Die genetische Organisation und GlcNAc-Modifizierung bakterieller Adhesine weisen Ähnlichkeiten zum *mrpC/ slpA/ slpB*-Gencluster auf. In *Haemophilus* zum Beispiel wird das *High molecular weight*-Protein (HmwA) durch die SPINDLY-ähnliche OGT (HmwC) mit GlcNAc im Cytoplasma glykosyliert [495]. Danach wird HmwA über das SEC-System durch die innere Membran unter Abspaltung des Signalpeptids (68 AS) transportiert [507]. Mittels HmwB, das über eine Transmembrandomäne in der Äußeren Membran verankert ist, wird das glykosylierte HmwA an die Oberfläche des Bakteriums transloziert (*two-partner secretion system*) [508]. Dabei wird nochmals eine Signalsequenz (441 AS) abgespaltet [509]. HmwB als Immunoglobulin-ähnliches Chaperon ist auch für die Stabilität von HmwA im Periplasma von Bedeutung [507, 510]. Alle drei Proteine werden in einem Gencluster kodiert [511]. Über eine Interaktion von HmwA mit Glycorezeptoren der Wirtszelle wird eine Adhesion des Bakteriums an die Wirtszelle (Epithelzellen) vermittelt [511, 512, 513, 514]. Ähnlich den Modifizierungen von HmwA durch HmwC könnte MrpC durch SlpA oder SlpB im Cytoplasma glykosyliert werden. Möglicherweise kommt auch MrpC wie HmwA eine Rolle in Zell-Zell-Interaktionen zu.

*Funktion von MrpC in der Aggregation toxischer Microcystis-Zellen und Implikationen von MC auf die Abundanz und Oligomerisierung extrazellulärer Proteine*

Bereits mit der Entdeckung von Microvirin (MVN) konnte ein Zusammenhang zwischen MC und einem extrazellulären Protein nachgewiesen werden. Über die Bindung von MC an bestimmte Cysteine dieses Proteins wird der Oligomerisierungszustand des Proteins beeinflusst (Jan-Christoph Kehr, persönliche Mitteilung). Die an die Zuckerreste von glycosylierten Zelloberflächenproteinen bindenden Lektine sind nur im multimeren Zustand funktionstüchtig [515]. Über eine MC-MVN-Interaktion wird möglicherweise die Zell-Zell-Vernetzung beeinflusst [282]. Interessanterweise werden einige Lektine von *Pseudomonas* neben Virulenzfaktoren und anderen Proteinen durch Signalmoleküle induziert [516, 517].

MrpC besitzt keine Cysteine. Eine direkte Interaktion zwischen MrpC und MC über diesen Mechanismus ist demnach auszuschließen. Wie erklärt sich jedoch die verstärkte Abundanz des Proteins in den Extrakten der MC-freien Mutante? Auf Transkriptebene werden keine Unterschiede detektiert. Möglicherweise beeinflusst MC die Glycosylierung und damit die Stabilität des Proteins. Aufgrund der geringeren Abundanz des Proteins im Wt sind quantitative Aussagen hinsichtlich der GlcNAc-Modifizierung allein von den Western Blots jedoch nicht möglich. PSD-Analysen wurden bislang nur von dem stark abundanten MrpC-Protein der  $\Delta mcyB$ -Mutante durchgeführt. Jedoch korrelieren die detektierten Proteinmengen an der Zelloberfläche mit denen im Medium. Unter Annahme, dass der Verlust des GlcNAc-Zuckerrests ebenso wie in *Haemophilus* zur Sekretion des Proteins ins Medium führt, ist ein Einfluss von MC auf diese Art der Modifizierung zu negieren. Fluoreszenzbilder zeigten, dass durch die starke Abundanz des Proteins in der  $\Delta mcyB$ -Mutante es zu einer Quervernetzung der Zellen kommt, was sich in einer erhöhten Aggregationstendenz der Mutanten äußert. Möglicherweise ist der eigentliche Funktionsort von MC nicht die Zelloberfläche sondern das Medium. Interessanterweise wird die Abundanz der kleineren MrpC-Form (sezernierte Form) durch eine externe MC-Addition sowohl im Wt als auch in der Mutante beeinflusst, die der größeren dagegen kaum. Möglicherweise beeinflusst MC auch hier den Oligomerisierungszustand des Proteins. Die differentielle Abundanz könnte aber auch über andere Interaktionspartner geregelt werden. Diese Interaktionspartner könnten die Stabilität des Proteins bzw. die Abundanz der einzelnen Isoformen beeinflussen. Ob der im Medium agierende Interaktionspartner derselbe ist, der zur

generellen Akkumulation des Proteins in der Mutante führt, bleibt unklar. Bisher konnten noch keine extrazellulären Bindepartner von MC (bis auf MVN, Jan-Christoph Kehr, persönliche Mitteilung) identifiziert werden. Dies ist vermutlich, auf das Detektionslimit des AK zurückzuführen. Die Wirkung des additiven MC auf MrpC ist außerdem lichtabhängig. Im Dunkeln kommt es sowohl im Wt als auch in der Mutante durch die MC-Addition zu einer verstärkten Abundanz. Unter Starklicht kehren sich die Verhältnisse um. Offensichtlich wird einer der putativen Interaktionspartner des MrpC lichtabhängig reguliert, denn die MrpC-Expression ist wie die Northern Blots zeigen vom Licht unabhängig. Dieser steuert in Abhängigkeit vom extrazellulären MC die Abundanz von MrpC im Medium. MC beeinflusst möglicherweise die Stabilität des Interaktionspartners oder die Interaktion mit MrpC *per se*. Dieses hat letztlich Auswirkungen auf die Stabilität von MrpC und damit auf die Abundanz dieses Proteins. Über die Abundanz des MrpC wird dann möglicherweise der Grad der Quervernetzung bzw. der Abstand der Zellen zueinander bestimmt. Eine direkte Korrelation zwischen MrpC-Konzentration im Medium und Aggregationstendenz wurde jedoch nicht untersucht. Eine solche Studie wird erschwert, da in *E. coli* die zahlreichen Modifizierungen von MrpC nicht simuliert werden können und so rekombinantes MrpC keine Effekte auf *Microcystis*-Zellen hatte. Ob dieser Interaktionspartner des Mediums derselbe ist wie der, der zur Akkumulation des Proteins an der Zelloberfläche führt, ist unklar. Inwiefern dabei Glycosylierungen eine Rolle spielen, kann derzeit noch nicht abgeschätzt werden. Obwohl noch viele offene Fragen sind, zeigt dieses Beispiel jedoch, dass intra- sowie extrazelluläres MC nicht nur die Abundanz cytosolischer Proteine (RubisCO) sondern auch extrazellulärer Proteine beeinflusst. MrpC als ein glycosyliertes, extrazelluläres Protein beeinflusst die Aggregation von Zellen und ist damit höchstwahrscheinlich an der Morphotypausprägung beteiligt. Das Vorkommen des *mrpC*-Gens in fast ausschließlich toxischen Stämmen unterstützt den funktionellen Zusammenhang von MC und MrpC. Mit einer Implikation von MrpC in der Morphotypausprägung der Kolonie ist somit auch ein Einfluss von MC gegeben. Die Bedeutung dieser Interaktion für die Ökostrategie von *Microcystis*, insbesondere unter Berücksichtigung nicht-toxischer Stämme, wird in einem globalerem Rahmen am Ende der Arbeit diskutiert (4.6.2).

#### 4.4.3 Andere in ihrer Abundanz durch MC beeinflusste Oberflächenproteine

##### *Lytisches Enzym*

Lysozyme sind essentiell für die *de novo*-Synthese der Zellwand während des Zellwachstums und der Zellteilung. Diese 1,4- $\beta$ -*N*-Acetylmuramidasen spalten die glycosidische Bindung zwischen dem C<sub>1</sub> der *N*-Acetylmuraminsäure und dem C<sub>4</sub> des *N*-Acetylglucosamins der bakteriellen Peptidoglycanschicht. Die Spezifität der einzelnen Lysozyme ist jedoch sehr unterschiedlich [518].

In der aktuellen sowie in früheren proteomischen Studien wurde ein solches lytisches Enzym (einem Protein aus *Pseudomonas aeruginosa* ähnlich), differentiell in Wt und MC-freien Mutanten (8-fach gesteigerte Abundanz in der MC-freien Mutante) exprimiert, identifiziert [303]. Eine Implikation von MC auf die Abundanz dieses Proteins wurde durch die doppelte Verifizierung beider Softwareprogramme deutlich. Zusätzlich reagierte dieses Protein in der MC-freien Mutante stark auf eine externe MC-Addition. Während unter Starklicht die Abundanz um das Dreifache verstärkt wurde, sank sie bei Dunkelheit um das 9-fache. Ob diese Effekte bereits auf Transkriptebene detektiert werden können, wurde nicht überprüft. Jedoch zeigten Untersuchungen in Abhängigkeit vom Circadianen Rhythmus weder Unterschiede in der Transkriptakkumulation noch im Oszillationsmuster zwischen Wt und MC-freien Mutanten [303]. Möglicherweise resultiert die differentielle Abundanz in einer veränderten Suszeptibilität der Wt und Mutantenzellen für mechanische Beanspruchungen (z.B. durch Scherrkräfte der Pipette). Dies könnte ein Grund dafür sein, warum Mutantenzellen während der Extraktionsprozedur leichter aufbrechen als Wt-Zellen.

#### 4.5 Implikationen von MC in anderen Stoffwechselprozessen

Einige Stoffwechselwege sind nur durch wenige Kandidaten repräsentiert. Eine MC-Implikation ist daher unklar. Meist sind weder Schlüsselproteine vertreten noch konnten die Proteine unter mehreren Bedingungen als differentielle Kandidaten selektiert werden. Des Weiteren wurden die Unterschiede meist nur durch ein Softwareprogramm bestätigt.

Zu diesen Kandidaten zählen aus der Glycolyse die **Glucose-6-phosphat-Isomerase/ Pgi** (den zweiten Schritt der Glycolyse katalysierend), aus dem Energiemetabolismus die **Adenosylhomocysteinase/ AhcY** (Spaltung von S-

Adenosylhomocystein zur Rückgewinnung von Methionin), aus der Biosynthese von AS die **Cystein- oder Cystathionin-Synthase/ CysK** (Kondensation von Serin und Homocystein) und die **Ketol-acid-reducto-Isomerase/ IlvC** (Synthese von Valin aus Puryvat und von Isoleucin aus Threonin), aus dem Fettstoffwechsel die  **$\beta$ -Ketoacyl-[ACP]-Reduktase/ FabG2** (erster Reduktionsschritt der Fettsäuresynthese) und die **Acetoacetyl-CoA-Thiolase** (Abbau der Fettsäuren) und aus der Proteinbiosynthese der **Elongationsfaktors Ef-Tu** (Transport der Aminoacyl-tRNAs zur A-Stelle des Ribosoms). Neben anderen Proteinen (Glutathion-Peroxidase, TrxA, SodB, OCP GroEL1, DnaK2, GrpE) gehört der Elongationsfaktor Ef-Tu zu den generellen Proteinen, die unter Stressbedingungen vermehrt gebildet werden [316]. Die im 2D detektierten Fragmentierungen des Proteins waren auch aus anderen proteomischen Studien bekannt [307, 316].

Neben den bereits eingestuften hypothetischen Proteinen wurden noch vier weitere hypothetische Proteine detektiert: Das sind zum einen die mit hypothetischem Startpunkt ausgewiesenen und jetzt durch die Proteomik hinsichtlich ihrer Größe bestätigten ORFs **IPF 308.1** und **IPF 604.1** und zum anderen der **IPF 533.1** und der **IPF 3657.1**. Letztere zwei zeigen Ähnlichkeit zu einem Protein aus *Trichodesmium* (IPF 533.1) bzw. *Thermoplasma* (IPF 3657.1). Der interessanteste Kandidat ist das Protein mit der IPF-Nr. 604.1. Obgleich dieses Gen nur in wenigen toxischen Stämmen nachgewiesen werden konnte, ist es in PCC 7806 potentieller Bindepartner des MC. Aufgrund der fehlenden Cysteine ist die Bindung vermutlich nicht kovalenter Art. Erwähnenswert ist auch, dass das homologe Protein zu IPF 533.1 in *Trichodesmium*, unmittelbar stromabwärts von *mrpAB* lokalisiert ist. Das IPF 533.1-Protein ist wie MrpA in der  $\Delta mcyB$ -Mutante stärker exprimiert. Möglicherweise spielen alle drei Proteine in der komplexen Lebensweise eine Rolle, denn *Trichodesmium* ist ebenso wie *Microcystis* in der Lage, Kolonien zu bilden und vertikal in der Wassersäule zu migrieren [519].

## 4.6 Hypothese zur Funktion des MC

### 4.6.1 Die MC-Funktion innerhalb der Gattung *Microcystis*

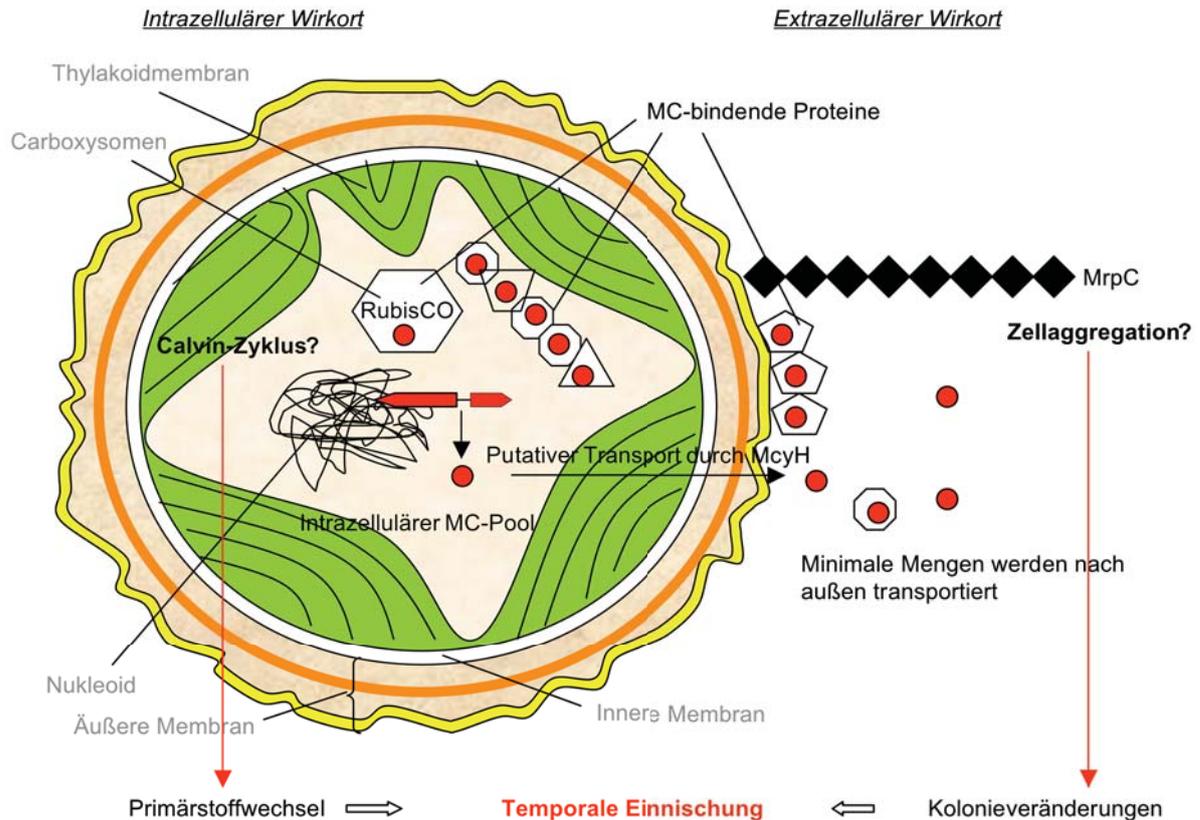
Die in mehreren proteomischen Studien detektierten, bis zu 20 % Unterschiede in Wt und  $\Delta mcyB$ -Mutante zeigen, dass MC nicht ausschließlich als Schutz gegen Fressfeinde synthetisiert wird. Viele Proteine des Primärstoffwechsels insbesondere

Proteine des Calvin-Zyklus sind hierbei betroffen. MC übernimmt daher vermutlich eine physiologische Funktion innerhalb der Art.

Wurde diese Funktion ursprünglich hinsichtlich eines interzellulären Signalmoleküls diskutiert, stehen diese Daten eher für eine Redoxfunktion. Als kleines, mit spezifischen Strukturmerkmalen versehenes Molekül agiert MC nicht nur innerhalb, sondern auch außerhalb der Zelle (Abb. 40). Eine Perzeption über einen Rezeptor sowie ein spezifischer Transport konnte bisher nicht gezeigt werden, jedoch könnte der putative ABC-Transporter *McyH* diese Funktion übernehmen. Spezifische Bindungen von MC an Proteine wie sie für intrazelluläre Proteine detektiert wurden, konnten für extrazelluläre Proteine (MVN) bisher nur *in vitro* gezeigt werden (Jan-Christoph Kehr, persönliche Mitteilung). Eine Beeinflussung weiterer sezernierter Faktoren ist wahrscheinlich. Die Kombination dieser Mediumfaktoren in Abhängigkeit von einer bestimmten extrazellulären MC-Konzentration ist möglicherweise entscheidend für die Abundanz einiger Proteine (RubisCO, *MrpA*) auch innerhalb der Zelle. Möglicherweise werden auf diese Art und Weise Stoffwechselprozesse innerhalb der Kolonie synchronisiert. Inwiefern eine Funktion auch außerhalb der Kolonie erfüllt werden kann, ist aufgrund der Verdünnungseffekte im See schwer abzuschätzen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass additives MC auf die Morphologie und Photosyntheserate anderer Phytoplankter einen Einfluss hat [271]. Im Inneren der Zelle akkumuliert MC in weit höherem Maße. Etwa nur 5 % des MC wird nach außen sezerniert. Die Lokalisation an distinkten Orten in der Zelle wird vermutlich größtenteils durch eine Bindung an bestimmte Proteine erreicht (Abb. 40). Durch seine Reaktivität ist MC in der Lage an Thiolgruppen kovalent zu binden. Dieser Bindungsmechanismus, gezeigt für eukaryotische Proteinphosphatasen, beeinflusst auch die Konformation des Holoproteins. Konformationsänderungen gehen oft mit einer veränderten Aktivität und Stabilität einher. Über die Oxidation und Reduktion der Thiolgruppen können sowohl die Aktivität als auch die Stabilität von Proteinen gesteuert werden. Beide Mechanismen könnten Grundlage für die differentielle Abundanz vieler Kandidaten sein. Ob die Effekte positiver oder negativer Natur sind, hängt oft von den Lichtverhältnissen bzw. den zellulären Redoxverhältnissen ab. Einige Proteine entsprechen potentiellen Bindungspartnern von MC in der Zelle. Dazu zählen einige PBS-Proteine, die RubisCO, die PRK, die *Gor* und zwei hypothetische Proteine. Die anderen Kandidaten könnten durch eine Interaktion von MC mit Thioredoxin/ Reduktase bzw. Glutathion/ Reduktase

beeinflusst werden. MC könnte auch den Elektronenfluss in der photosynthetischen Transportkette beeinflussen und so zu unterschiedlichen Expressionen führen. Dieses würde unter anderem auch Auswirkungen auf den zellulären Redoxzustand haben, der seinerseits entsprechende Gene aktiviert bzw. Proteine moduliert. Inwiefern sich daraus eine Funktion in oxidativen Stresssituationen ableiten lässt, kann aus diesen Ergebnissen noch nicht geschlussfolgert werden. Physiologische Vergleiche zwischen Wt und MC-freier Mutante würden hier zur Aufklärung beitragen.

Unter oxidativen Stress geraten die Kolonien insbesondere während der Mattenbildung. Zur Zeit der größten Blütenbildung wird jedoch eine verhältnismäßig geringe MC-Konzentration gemessen. Die höchsten MC-Konzentrationen werden zu Beginn der Reinvasion detektiert. In diesem Stadium ist das Kolonieverhalten noch sehr dynamisch. Photosynthetische Prozesse müssen den Licht-, C<sub>i</sub>-Verhältnissen und der Koloniegröße angepasst werden. Gerade die größten Kolonien migrieren am häufigsten im Laufe des Tages auf und ab und besitzen oft ausschließlich toxische Genotypen [292, 520]. Die Prozesse müssen während dieses dynamischen Verhaltens optimal aufeinander abgestimmt werden (Synchronisation). So hat MC möglicherweise zwei Wirkorte: Zum einen ist ein kleiner Teil des MC in kommunikativen Prozessen involviert, jedoch vermutlich nicht das eigentliche Signalmolekül, und zum anderen ist der größere Teil an licht-/ redoxregulierten Prozessen im Innern der Zelle beteiligt. Interne physiologische Prozesse werden so möglicherweise morphologischen Veränderungen angepasst und *vice versa* (Abb. 40).



**Abb. 40: Schematische Darstellung der aktuellen Arbeitshypothese zur Funktion von MC in *Microcystis***

MC wird durch das Mcy-Multienzymkomplex in Abhängigkeit von der Lichtintensität und der Wachstumsphase synthetisiert. Etwa 5 % des MC wird ebenfalls in Abhängigkeit von der Lichtintensität und der Wachstumsphase nach außen sezerniert (möglicherweise über McyH). Die distinkte Lokalisation von MC innerhalb der Zelle geht einher mit der Bindung von MC an die Cysteinreste bestimmter Proteine. Zu diesen Proteinen gehören zwei Vertreter des Calvin-Zyklus: RubisCO und Phosphoribulokinase. Über die Bindung wird die Stabilität und möglicherweise auch Oligomerisierung der Proteine beeinflusst. Ebenso beeinflusst MC die Abundanz und Oligomerisierung extrazellulärer Faktoren, möglicherweise auch über eine direkte Interaktion. Diese Faktoren sind insbesondere in Zell-Zell-Interaktionen involviert. In Anpassung an die migrierende Lebensweise werden so Primärstoffwechsel und morphologische Veränderungen aufeinander abgestimmt.

#### 4.6.2 Toxische versus nicht-toxische Genotypen

Erfüllt MC in toxischen *Microcystis*-Stämmen eine essentielle Funktion, so bleibt die Frage, warum nicht-toxische Stämme die Gene für die MC-Biosynthese im Laufe der Evolution verloren haben. Über Vor- oder Nachteil der MC-Produktion für die produzierende Art gibt es verschiedene Ansichten. Einige behaupten, die toxischen Kolonien seien die besseren Konkurrenten um den Faktor Licht, andere behaupten die nicht-toxischen Kolonien wären im Vorteil [289].

Möglicherweise steht aber nicht die Konkurrenz im Vordergrund sondern die gemeinsame Existenz in einem Ökosystem. Im Rahmen dieser Dissertation wurden Freilandstudien an der Quitzdorfer Talsperre im Juni und August 2005 (geleitet von Dr. Sabine Jähnichen, TU Dresden) durchgeführt, die zeigten, dass die einzelnen Morphotypen unterschiedliche temporale Nischen besetzen (siehe Anhang F). Die temporale Nischenbesetzung durch verschiedene Phytoplankter wird insbesondere

durch unterschiedliche  $\text{CO}_2$ -Spezifitätsfaktoren der RubisCO und der CCM des Calvin-Zyklus aber auch unterschiedliche *rbc*-Oszillationsmuster möglich [521, 522]. Möglicherweise wird durch die Implikation von MC auf RubisCO und andere Calvin-Proteine die temporale Einnischung gesteuert (Abb. 41). Hierzu muss vermutlich, der Primärstoffwechsel an die dynamischen Prozesse angepasst werden. Mikroaudiographien von *Microcystis* mit markierten  $^{14}\text{CO}_2$  zeigten, dass gerade in großen Kolonien ( $>100\ \mu\text{m}$ ) bei Lichtexposition die Verfügbarkeit des inorganischen Kohlenstoffs für die einzelnen Zellen unterschiedlich ist [523]. Die höchste  $\text{CO}_2$ -Assimilation kann hier in den peripheren Zellen detektiert werden. Offensichtlich wird bei einer geringen  $\text{CO}_2$ -Verfügbarkeit im wässrigen Milieu, d.h. während Perioden intensiver Photosynthese, die Diffusion des Gases zu den internen Zellen durch entsprechende Barrieren verhindert. Bei Dunkelheit kommt es wieder zur Angleichung. Möglicherweise spielt MC in der Feinabstimmung der Zellen innerhalb der Kolonie eine Rolle.

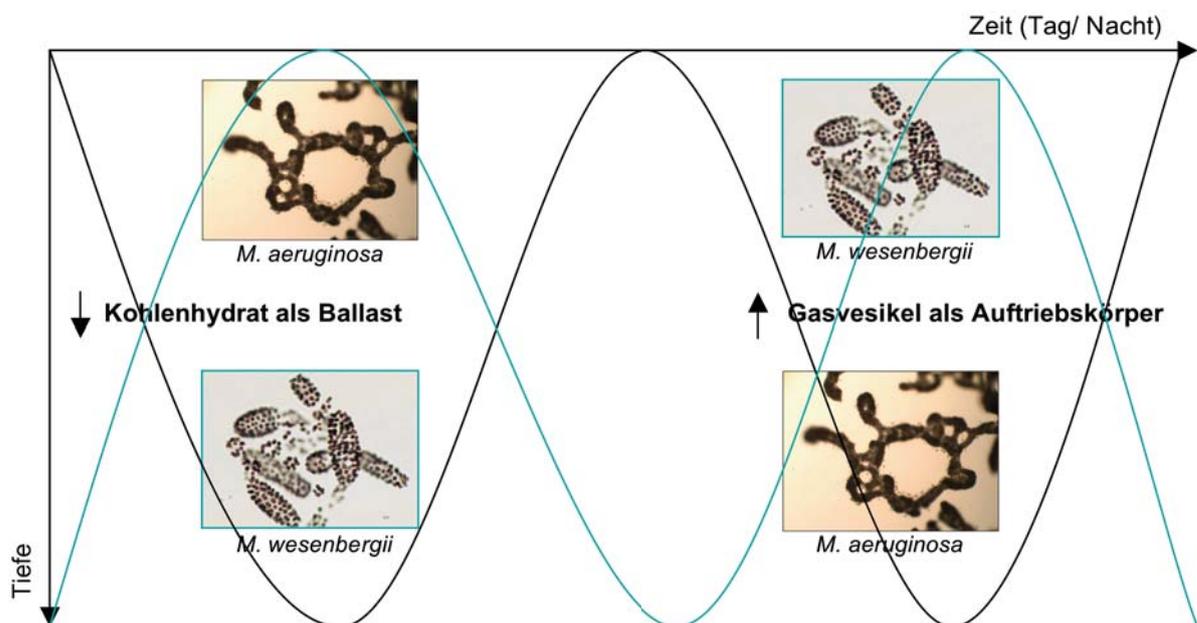


Abb. 41: Modell der temporalen Einnischung der verschiedenen Morphotypen in einem Ökosystem

Vereinfacht dargestellt ist die temporale Einnischung zweier Morphotypen (*M. aeruginosa*, *M. wesenbergii*) im Tag/ Nacht-Verlauf. Möglicherweise wird über den Einfluss von MC auf den Primärstoffwechsel (Kohlenhydratballast, Gasvesikelsynthese) die temporale Einnischung und damit die Koexistenz verschiedener Morphotypen in einem Ökosystem ermöglicht.

Neben der Implikation im Calvin-Zyklus beeinflusst MC die Abundanz extrazellulärer Proteine. Oberflächenproteine wie MrpC verändern das Aggregationsverhalten und

könnten somit die Struktur und das Aussehen der Kolonie beeinflussen. Eine Korrelation zwischen Morphotyp und Chemotyp wird auch durch Fastner *et al.* sowie Via-Ordorika *et al.* postuliert [245, 284]. Die Detektion von *mrpC*-Genen in fast ausschließlich toxischen Stämmen macht den Zusammenhang zwischen beiden deutlich und deutet möglicherweise auf eine Koevolution von „Morphogenen“ mit NRPS-Genen hin.

Ein weiterer strittiger Punkt ist, ob die einzelnen Peptide eines Stammes innerhalb der Zelle gleiche oder verschiedene Funktionen übernehmen. In Anbetracht der energieaufwendigen Synthese ist eine gleichgerichtete Entwicklung der Gencluster im Laufe der Evolution eher auszuschließen. Die vermutlich durch unterschiedliche Duplikationen und Rekombinationen entstandenen Gencluster ermöglichen nicht nur vielfältige Strukturvarianten [524], sondern vermutlich auch vielfältige Funktionen. Doppel- oder Mehrfachpeptidmutanten würden hier zur Aufklärung beitragen. Möglicherweise sind einige Strukturvarianten von essentieller Bedeutung. Die Diversität der Derivate zeigt jedoch an, dass keine bestimmte MC-Variante von eminenter Bedeutung ist. Eine solche Stringenz wäre auch durch die nicht-ribosomale Peptidsynthese nicht gegeben. Es wird jedoch beobachtet, dass Modifizierungen am Dehydroalanin-Rest des MC, also die AS, die mit den Cysteinen der Zielproteine reagiert, verhältnismäßig selten sind [345]. Möglicherweise erfolgt hier eine Selektion nach bestimmten strukturellen Merkmalen.

#### 4.6.3 Projektion der Funktionshypothese auf andere MC-Produzenten

Die Gene für die MC-Biosynthese sind aus einem gemeinsamen Vorfahren hervorgegangen [62, 103]. Die Primärfunktion dieser Peptide sollte daher in allen MC-Produzenten identisch sein. Jedoch verfolgen *Planktothrix*, *Anabaena* und *Microcystis* unterschiedliche Ökostrategien (Tab. 18), so dass es möglicherweise zu einer Funktionsdivergenz gekommen sein könnte. Die Funktionshypothese von MC anhand des Modells *Microcystis* müsste in den anderen Gattungen überprüft werden. Untersuchungen mit MC-freien Mutanten zeigten, dass in *Microcystis* das Fehlen von MC Auswirkungen auf die Abundanz der Calvin-Enzyme hatte, während bei *Planktothrix* ein verändertes *Buoyancy*-Verhalten festgestellt wurde [525]. In *Microcystis* wird die Auftriebskraft einer Kolonie aufgrund der Inkollabilität der Gasvesikel bei normalen Druckverhältnissen weitestgehend über den

Kohlenhydratballast reguliert [526]. Demzufolge wird über die Kontrolle der Photosynthese die *Buoyancy* bestimmt [527]. Im Gegensatz zu *Planktothrix* konnte jedoch der MC-Einfluß auf die *Buoyancy* von *Microcystis* aufgrund des Verlusts der Koloniebildung von PCC 7806 nicht untersucht werden.

Tab. 18: Vergleich der Lebensweisen der MC-Produzenten *Microcystis*, *Anabaena* und *Planktothrix*

Kriterium	<i>Microcystis</i>	<i>Anabaena</i>	<i>Planktothrix</i>	Referenz
<b>MC</b>				
<b>Toxische Genotypen</b>	Ja	Ja	Ja	[31]
<b>Häufigkeit natürlicher Mutanten</b>	Gering	Selten	Häufig	
<b>Intrazelluläre Toxinkonzentration</b>	Mittel	Mittel	Hoch	
<b>Extrazelluläre Toxinkonzentration</b>				
<b>Andere Nicht-ribosomale Peptide</b>	Ja	Ja	Ja	
<b>Zellmorphologie</b>	Cocoid	Cocoid	Einzelfilamente	
<b>Soziales Verhalten</b>				
<b>Art</b>	Koloniebildung	Filamentbildung	∅ (Urchin-like)	[31]
<b>Spezielle Strukturen</b>	Extrazelluläre Schleimschicht	∅		
<b>Habitat</b>	Flachseen	Flachseen	Tiefere Seen	
<b>Wachstum</b>				
<b>Wachstumsraten</b>	0,25-0,8/d	0,8-1,2/d	0,6/d	[528]
<b>Temperaturoptimum</b>	27-32 °C	24-35 °C	19-27 °C	
<b>Lichtsensitivität</b>	Mittel	Mittel	Hoch	
<b>Photosynthetische Leistung</b>	0,1-13,5 mg <sub>C</sub> /mg <sub>Chla</sub> *h		0,7-4,3 mg <sub>C</sub> /mg <sub>Chla</sub> *h	
<b>Buoyancy</b>				
<b>Verhalten</b>	Vertikale Migration	Vertikale Migration	Stratifizierung	[529] [520]
<b>Gasvesikel</b>	Ja	Ja	Ja	
<b>Druck in MPa</b>	0,6-1,1	0,4-0,8	0,7-1,2	
<b>Regulation der Buoyancy über</b>	Kohlenhydratballast	Turgordruck	GVP-Synthese/ Ausdünnung nach Teilung	
<b>Carboxysomen</b>				
<b>Lokalisation in der Zelle</b>	Zentral	Zentral/ peripher		[530] [429]
<b>Carboxysomen-Form</b>	Hexagonal	4, 5, 6-seitig		
<b>Carboxysomen-Größe</b>	100-130 nm	100-900 nm		
<b>Carboxysomen-Typ</b>	β-Form	β-Form	β-Form	
<b>RubisCO-Form</b>	1B	1B	1B	
<b>Merkmale MC-freier Mutanten im Vergleich zum Wt</b>				
<b>Morphologischer Ebene</b>	Vermehrte Aggregationstendenz		Verändertes Buoyancy-Verhalten	[98, 299, 525]
<b>Zellulärer Ebene</b>			Vermehrte Glycogen-Anhäufung	
<b>Molekularer Ebene</b>	Veränderte Expression von Calvin-Zyklus-Proteinen sowie „Morphogenen“			[303] und aktuelle Studie

Die Synthese von nicht-ribosomalen Peptiden ist vermutlich mit der komplexen Lebensweise dieser Cyanobakterien assoziiert. In dieser Studie wurde erstmalig die Funktion eines solchen nicht-ribosomalen Peptids in Cyanobakterien untersucht. Die Ergebnisse unterstreichen einen engen Zusammenhang zwischen Sekundär- und Primärstoffwechsel. Das nicht-ribosomale Peptid Microcystin übernimmt dabei eine physiologische Funktion innerhalb der produzierenden Art.

## Referenzen

- [1] Linne, C. (1753): Species Plantarum, Tom II, Stockholm.
- [2] Rippka, R. and Cohen-Bazire, G. (1983): The cyanobacteriales: a legitimate order based on the type strain *Cyanobacterium stanieri*?, *Ann Microbiol (Paris)* (vol. 134B), No. 1, pp. 21-36. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6416126](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6416126)
- [3] Stanier, R. Y. and Cohen-Bazire, G. (1977): Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria, *Annu Rev Microbiol* (vol. 31), pp. 225-74. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=410354](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=410354)
- [4] Schopf, J. W. and Packer, B. M. (1987): Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia, *Science* (vol. 237), pp. 70-3. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11539686](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11539686)
- [5] Dismukes, G. C.; Klimov, V. V.; Baranov, S. V.; Kozlov, Y. N.; DasGupta, J. and Tyryshkin, A. (2001): The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 98), No. 5, pp. 2170-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11226211](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11226211)
- [6] Kutschera, U. and Niklas, K. J. (2005): Endosymbiosis, cell evolution, and speciation, *Theory Biosci* (vol. 124), No. 1, pp. 1-24. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17046345](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17046345)
- [7] McFadden, G. I. (1999): Endosymbiosis and evolution of the plant cell, *Curr Opin Plant Biol* (vol. 2), No. 6, pp. 513-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10607659](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10607659)
- [8] Hald, J.C. (1833): *Bidrag til Kundskab om de danske Provindsers naervaerende Tilstand I oekonomisk Henseende*, Copenhagen, Denmark, Ottende Stykke, Ringjobing Amt, Landhusholdningsselskabet
- [9] Francis, G. (1878): Poisonous Australian lake, *Nature* (vol. 18), pp. 11-12.
- [10] Benecke, B. (1884): Wasserblüthe, *Berichte des Fischerei-Vereins der Provinzen Ost- und Westpreußen, Miscellen* (vol. 1), pp. 11-12.
- [11] Carmichael, W. W. (1994): The toxins of cyanobacteria, *Sci Am* (vol. 270), No. 1, pp. 78-86. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8284661](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8284661)
- [12] Falconer, Ian R. (1993): *Algal toxins in seafood and drinking water*, Academic Press, London San Diego, ISBN: 0122479904 (alk. paper).
- [13] Falconer, I. R. and Buckley, T. H. (1989): Tumour promotion by *Microcystis* sp., a blue-green alga occurring in water supplies, *Med J Aust* (vol. 150), No. 6, p. 351. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2497311](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2497311)
- [14] Codd, G. A.; Morrison, L. F. and Metcalf, J. S. (2005): Cyanobacterial toxins: risk management for health protection, *Toxicol Appl Pharmacol* (vol. 203), No. 3, pp. 264-72. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15737680](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15737680)
- [15] Byth, S. (1980): Palm Island mystery disease, *Medical Journal of Australia* (vol. 2), pp. 40-42.
- [16] Griffiths, D.J., Saker, M.L. and Hawkins, P.R. (1998): Cyanobacteria in a small tropical reservoir, *Journal of the Australian Water and Wastewater Association* (vol. 25), pp. 14-19.

- [17] Jochimsen, E. M.; Carmichael, W. W.; An, J. S.; Cardo, D. M.; Cookson, S. T.; Holmes, C. E.; Antunes, M. B.; de Melo Filho, D. A.; Lyra, T. M.; Barreto, V. S.; Azevedo, S. M. and Jarvis, W. R. (1998): Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil, *N Engl J Med* (vol. 338), No. 13, pp. 873-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9516222](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9516222)
- [18] Pouria, S.; de Andrade, A.; Barbosa, J.; Cavalcanti, R. L.; Barreto, V. T.; Ward, C. J.; Preiser, W.; Poon, G. K.; Neild, G. H. and Codd, G. A. (1998): Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil, *Lancet* (vol. 352), No. 9121, pp. 21-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9800741](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9800741)
- [19] Reynolds, C. S. (1991): Toxic blue-green algae: The "problem" in perspective, *Freshwater Forum. Ambleside* (vol. 1), No. 11, pp. 29-38.
- [20] Krishnamurthy, T.; Carmichael, W. W. and Sarver, E. W. (1986): Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). I. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*, *Toxicon* (vol. 24), No. 9, pp. 865-73. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3101230](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3101230)
- [21] Runnegar, M. T.; Kong, S. and Berndt, N. (1993): Protein phosphatase inhibition and in vivo hepatotoxicity of microcystins, *Am J Physiol* (vol. 265), No. 2 Pt 1, pp. G224-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8396333](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8396333)
- [22] (1998): Finalization of the document "Cyanobacteria, their toxins, water and health" : report on a WHO editorial meeting, Bad Elster, Germany, 10-15 November 1997, EUR/HFA target 20, Copenhagen,.
- [23] Kützing (1833): *Linnaea* (vol. 8).
- [24] Rippka, R. (1988): Isolation and purification of cyanobacteria, *Methods Enzymol* (vol. 167), pp. 3-27. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3148836](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3148836)
- [25] Geitler, Lothar (1971): *Cyanophyceae*, Johnson Reprint Corp., New York,.
- [26] Geitler, Lothar and Pascher, Adolf (1925): *Cyanophyceae, Cyanochlorininae = Chlorobacteriaceae*, *Die Süsswasser-flora Deutschlands, èOsterreichs und der Schweiz ; Hft. 12*, G. Fischer, Jena.
- [27] Komárek, Jirí and Anagnostidis, Konstantinos (1999): *Cyanoprokaryota*, Fischer, Stuttgart, ISBN: 3-437-35408-6 (Tl. 1) 3-8274-0919-5 (Tl. 2).
- [28] Otsuka, S.; Suda, S.; Li, R.; Watanabe, M.; Oyaizu, H.; Matsumoto, S. and Watanabe, M. M. (1999): Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence, *FEMS Microbiol Lett* (vol. 172), No. 1, pp. 15-21. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10079523](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10079523)
- [29] Otsuka, S.; Suda, S.; Shibata, S.; Oyaizu, H.; Matsumoto, S. and Watanabe, M. M. (2001): A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützing ex Lemmermann 1907 under the rules of the Bacteriological Code, *Int J Syst Evol Microbiol* (vol. 51), No. Pt 3, pp. 873-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11411709](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11411709)
- [30] Kondo, R.; Yoshida, T.; Yuki, Y. and Hiroishi, S. (2000): DNA-DNA reassociation among a bloom-forming cyanobacterial genus, *Microcystis*, *Int J Syst Evol Microbiol* (vol. 50 Pt 2), pp. 767-70. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10758887](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10758887)

- [31] Visser, P.M., Ibelings, B.W., Mur, L.R., and Walsby, A.E. (2005): The ecophysiology of the harmful cyanobacterium *Microcystis*, Huisman, J., Matthijs, H.C.P., and Visser, P.M.. Harmful cyanobacteria (vol. 3) pp. 109-141, Springer, Dordrecht.
- [32] Reynolds, C S, Jaworski, G H M, Cmiech, H A , Leedale, G F (1981): On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* KÜTZ. EMEND. ELENKIN, Porc. R. Soc. London, Ser. B (vol. 293), pp. 419-477.
- [33] Utkilen, H. C.; O. M. Skulberg and and Walsby, A. E. (1985): Buoyancy regulation and chromatic adaptation in planktonic *Oscillatoria* species: adaptive strategies for optimising light adsorption in stratified lakes, Arch. Hydrobiol. (vol. 104), pp. 407-417.
- [34] Visser , PM; J, Passarge and LR, Mur (1997): Modelling vertical migration of the cyanobacterium *Microcystis*., Hydrobiologia 1997 AUG 8;349:99-109.
- [35] Rabouille, S.; Thebault, J. M. and Salencon, M. J. (2003): Simulation of carbon reserve dynamics in *Microcystis* and its influence on vertical migration with Yoyo model, C R Biol (vol. 326), No. 4, pp. 349-61. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12876887](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12876887)
- [36] Ibelings, B. W.; Mur, L. R.; Kinsman, R. and and Walsby, A.E. (1991): *Microcystis* changes its buoyancy in response to the average irradiance in the surface mixed layer, Archiv für Hydrobiologie. Stuttgart (vol. 120), No. 4, pp. 385-401.
- [37] Wallace, B. B. and and Hamilton, D. P. (1999): The Effect of Variations in Irradiance on Buoyancy Regulation in *Microcystis aeruginosa* Limnology and Oceanography (vol. 44), No. 2, pp. 273-281.
- [38] Thomas, R. H., A. E. Walsby (1985): Buoyancy regulation in a strain of *Microcystis*, J. Gen. microbiol. (vol. 131), pp. 799-809.
- [39] Oliver, R L and Ganf, G G (2000): Freshwater blooms, Whitton, B A and Potts, M, The ecology of cyanobacteria pp. 149-194.
- [40] Konopka, A.; Kromkamp, J. C. and and Mur, L. R. (1987): Buoyancy regulation in phosphate-limited cultures of *Microcystis aeruginosa*, FEMS Microbiology Ecology (vol. 45), No. 3, pp. 135-142.
- [41] Kromkamp, J. and Walsby, A. E. (1990): A computer model of buoyancy and vertical migration in cyanobacteria, JOURNAL OF PLANKTON RESEARCH (vol. 12), No. 1, pp. 161-183.
- [42] Mur, L. R., Skulberg, O.M., and Utkilen, H. (1999): Cyanobacteria in the environment, Chorus, I., and Bartram, J., Toxic cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management pp. 25-54, E & FN Spon, London and New York.
- [43] Huisman, J.; Sharples, J.; Stroom, J. M.; Visser, P. M.; Kardinaal, W. E. A.; Verspagen, J. M. H. and Sommeijer, B. (2004): Changes in turbulent mixing shift competition for light between phytoplankton species, Ecology (vol. 85), No. 11, pp. 2960-2970.
- [44] Visser , PM; BW, Ibelings; B, Vanderveer; J, Koedood and LR, Mur (1996): Artificial mixing prevents nuisance blooms of the cyanobacterium *Microcystis* in Lake Nieuwe Meer, the Netherlands., Freshwater Biol 1996 OCT;36(2):435-450.
- [45] Walsby, A. E.; Hayes, P. K.; Boje, R. and and Stal, L. J. (1997): The selective advantage of buoyancy provided by gas vesicles for planktonic cyanobacteria in the Baltic Sea, New Phytologist (vol. 136), No. 3, pp. 407-417.
- [46] Ibelings, B. W. (1996): Changes in photosynthesis in response to combined irradiance and temperature stress in cyanobacterial surface waterblooms, Journal of Phycology (vol. 32), No. 4, pp. 549-557.
- [47] Visser , PM, BW Ibelings, LR Mur (1995): Autumnal sedimentation of *Microcystis* spp as result of an increase in carbohydrate ballast at reduced temperature, Journal of Plankton Research 17: 5 (MAY 1995), pp. 919-933 KW+ BUOYANCY REGULATION; DARK RESPIRATION; AERUGINOSA KUTZ; GAS VESICLES; PHOTOSYNTHESIS; GROWTH; LIGHT; LAKE; ENVIRONMENTS; FIELD TGA No. RJ545 Discipl. AquaTlc Sciences Document ArTlcle Language English Address PM Visser, Univ Amsterdam, Microbiol Lab, Nieuwe Achtergracht 127, 1018 Ws Amsterdam, Netherlands ISBN/ISSN 0142-7873 Publisher Oxford Univ Press United Kingdom, Walton St, Journals Dept, Oxford, England OX2 6DP.
- [48] Oliver, R. L. ; Thomas, R. H.; Reynolds, C. S. and and Walsby, A. E. (1985): The Sedimentation of Buoyant *Microcystis* Colonies Caused by Precipitation with an Iron-

- Containing Colloid Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences (vol. 223), No. 1233, pp. 511-528.
- [49] Tsujimura, S.; H, Tsukada; H, Nakahara; T, Nakajima and M, Nishino (2000 SEP): Seasonal variations of *Microcystis* populations in sediments of Lake Biwa, Japan., *Hydrobiologi* (vol. 434), No. 1-3, pp. 183-192.
- [50] Preston, T.; Stewart, W. D. P. and Reynolds, C. S. (1980): Bloom-Forming Cyanobacterium *Microcystis-Aeruginosa* Overwinters On Sediment Surface, *Nature* (vol. 288), No. 5789, pp. 365-367.
- [51] Ihle, T.; Jähnichen, S., and Benndorf, J. (2005): Wax and Wane of *Microcystis* (Cyanophyceae) and microcystins in lake sediments: a case study in Quitzdorf Reservoir (Germany), *J Phycol* (vol. 41), pp. 479-488.
- [52] Verspagen, J. M. H.; Snelder, Eofm; Visser, P. M.; Huisman, J.; Mur, L. R. and Ibelings, B. W. (2004): Recruitment of benthic *Microcystis* (Cyanophyceae) to the water column: Internal buoyancy changes or resuspension?, *Journal of Phycology* (vol. 40), No. 2, pp. 260-270.
- [53] Deacon, C., A.E. Wlasby (1990): Gas vesicle formation in the dark, and in light of different irradiances by the cyanobacterium *Microcystis* sp., *Br. Phycol. J.* (vol. 25), pp. 133-139.
- [54] Wetzel, R.G. (2001): *Limnology: Lake and River Ecosystems*, third. ed., Academic Press, San Diego, USA.
- [55] Howard, A. (2001): Modeling movement patterns of the cyanobacterium, *Microcystis*, *Ecol Appl* (vol. 11), No. 1, pp. 304-310.
- [56] Botes, D. P., Tuinman, A.A., Wessels, P.L., Viljoen, C.C., and Kruger, H. (1984): The Structure of Cyanoginosin-LA, a Cyclic Heptapeptide Toxin from the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* (vol. 4), No. 223, pp. 2311-2318.
- [57] Carmichael, W. W.; Beasley, V.; Bunner, D. L.; Eloff, J. N.; Falconer, I.; Gorham, P.; Harada, K.; Krishnamurthy, T.; Yu, M. J.; Moore, R. E. and et al. (1988): Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae), *Toxicon* (vol. 26), No. 11, pp. 971-3. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3149803](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3149803)
- [58] Maizels, M. and Budde, W. L. (2004): A LC/MS method for the determination of cyanobacteria toxins in water, *Anal Chem* (vol. 76), No. 5, pp. 1342-51. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14987091](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14987091)
- [59] Codd, G.A., Lindsay, J., Young, F.M., Morrison L.F., and Metcalf, J.S. (2005): Harmful cyanobacteria - From mass mortalities to management measures, Huisman, J., Matthijs, H.C.P., and Visser, P.M.. *Harmful cyanobacteria* (vol. 3) pp. 1-23, Springer, Dordrecht.
- [60] Jungblut, A. D. and Neilan, B. A. (2006): Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria, *Arch Microbiol* (vol. 185), No. 2, pp. 107-14. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16402223](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16402223)
- [61] Moffitt, M. C. and Neilan, B. A. (2004): Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins, *Appl Environ Microbiol* (vol. 70), No. 11, pp. 6353-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15528492](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15528492)
- [62] Rantala, A.; Fewer, D. P.; Hisbergues, M.; Rouhiainen, L.; Vaitomaa, J.; Borner, T. and Sivonen, K. (2004): Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 101), No. 2, pp. 568-73. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14701903](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14701903)
- [63] Sivonen, K., and Jones, G. (1999): *Cyanobacterial Toxins*, Chorus, I., and Bartram, J., *Toxic cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management* pp. 55-124, E & FN Spon, London and New York.
- [64] Watanabe, Mariyo F. (1996): *Toxic microcystis*, CRC Press, Boca Raton, Fla. <etc.>, ISBN: 0-8493-7693-9.

- [65] Lahti, K.; J. Rapala; M. Fardig; M. Niemela and K. Sivonen (1997): Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR in particulate material and dissolved in lake water., *Water Res* 1997 MAY;31(5):1005-1012.
- [66] van Apeldoorn, M. E.; van Egmond, H. P.; Speijers, G. J. and Bakker, G. J. (2007): Toxins of cyanobacteria, *Mol Nutr Food Res* (vol. 51), No. 1, pp. 7-60. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17195276](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17195276)
- [67] Chen, W.; Gan, N. Q. and Song, L. R. (2004): Photodegradation dynamics of pure microcystin variants with illumination of fixed wavelength UV-lights, *Acta Chimica Sinica* (vol. 62), No. 2, pp. 142-147.
- [68] Feitz, A. J. and Waite, T. D. (2003): Kinetic modeling of TiO<sub>2</sub>-catalyzed photodegradation of trace levels of microcystin-LR, *Environ Sci Technol* (vol. 37), No. 3, pp. 561-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12630473](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12630473)
- [69] Loftis, K. M.; O'Shea, K. and Rein, K. (2004): Photodegradation and oxidation of microcystin, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* (vol. 227), pp. U625-U625.
- [70] McDermott, C. M.; Feola, R. and Plude, J. (1995): Detection of cyanobacterial toxins (microcystins) in waters of northeastern Wisconsin by a new immunoassay technique, *Toxicon* (vol. 33), No. 11, pp. 1433-42. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8744983](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8744983)
- [71] Chorus, Ingrid and Bartram, Jamie (1999): Toxic cyanobacteria in water : a guide to their public health consequences, monitoring, and management, E & FN Spon, London ; New York, ISBN: 0419239308 (pb alk. paper).
- [72] Kotak, B G, AKY Lam, EE Prepas, SL Kenefick, SE Hrudey (1995): Variability of the hepatotoxin microcystin-LR in hypereutrophic drinking water lakes, *Journal of Phycology* 31: 2 (APR 1995), pp. 248-263 KW cyanobacteria; diel variation; drinking water supply; hepatotoxin; microcystin-LR; Microcystis aeruginosa; sPGTII variation; temporal variation KW+ BLUE-GREEN-ALGAE; ANABAENA-FLOS-AQUAE; CYANOBACTERIUM OSCILLATORIA-AGARDHII; ENVIRONMENTAL-FACTORS; NODULARIA-SPUMIGENA; TOXIC CYANOBACTERIA; TUMOR PROMOTION; NATURAL BLOOMS; PEPTIDE TOXINS; AERUGINOSA TGA No. QW011 Discipl. Aquatic Sciences Document Article Language English Address BG Kotak, Univ Alberta, Dept Biol Sci, Edmonton, Ab T6G 2E9, Canada ISBN/ISSN 0022-3646 Publisher Phycological Soc Amer Inc, 810 East 10TH St, Lawrence, KS 66044.
- [73] Kotak, B. G.; Lam, A. K. Y.; Prepas, E. E. and Hrudey, S. E. (2000): Role of chemical and physical variables in regulating microcystin-LR concentration in phytoplankton of eutrophic lakes, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* (vol. 57), No. 8, pp. 1584-1593.
- [74] Fastner, J; M, Erhard; W, Carmichael W; F, Sun; L, Rinehart K; H, Röncke and I, Chorus (1999): Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the genera *Microcystis* and *Planktothrix* in German freshwaters, *Arch. Hydrobiol.* (vol. 145), No. 2, pp. 147-163.
- [75] Jahnichen, S.; Petzoldt, T. and Benndorf, J. (2001): Evidence for control of microcystin dynamics in Bautzen reservoir (Germany) by cyanobacterial population growth rates and dissolved inorganic carbon, *Arch Hydrobiol* (vol. 150), No. 2, pp. 177-196.
- [76] Chorus, Ingrid (2001): Cyanotoxins : occurrence, causes, consequences, Springer, Berlin, ISBN: 3-540-64999-9.
- [77] Rohrlack, T., Henning, M., and Kohl, J.G. (2001): Isolation and Characterization of colony-forming *Microcystis aeruginosa*-strains, Chorus, I., Cyanotoxins - Occurrence, Causes, Consequences pp. 152-159, Springer, Berlin and Heidelberg.
- [78] Wicks, R. J. and Thiel P.O. (1990): Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertrophic African reservoir, *Environ. Sci. Technol.* (vol. 24), pp. 1413-1418.
- [79] Watanabe, M. M.; Kaya, K. and Takamura, N. (1992): Fate of the Toxic Cyclic Heptapeptides, the Microcystins, from Blooms of *Microcystis* (Cyanobacteria) in a Hypertrophic Lake, *Journal of Phycology* (vol. 28), No. 6, pp. 761-767.

- [80] Jacoby, J M; C, Collier D; B, Welch E; J, Hardy F and M, Crayton (2000): Environmental factors associated with a toxic bloom of *Microcystis aeruginosa*, Can J Fish Aquat (vol. 57), pp. 231-240.
- [81] Cronberg, G.; Annadotter, H. and Lawton, L. A. (1999): The occurrence of toxic blue-green algae in Lake Ringsjon, southern Sweden, despite nutrient reduction and fish biomanipulation, Hydrobiologia (vol. 404), pp. 123-129.
- [82] Jungmann, D.; Ludwichowski, K. U.; Faltin, V. and Benndorf, J. (1996): Field study to investigate environmental factors that could effect microcystin synthesis of a Mycrocystis population in the Bautzen reservoir, Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie (vol. 81), No. 4, pp. 493-501.
- [83] Kotak, B. G.; Lam, A. K. Y.; Prepas, E. E.; Kenefick, S. L. and Hrudey, S. E. (1995): Variability of the Hepatotoxin Microcystin-Lr in Hypereutrophic Drinking-Water Lakes, Journal of Phycology (vol. 31), No. 2, pp. 248-263.
- [84] Vasconcelos, V. M. and Pereira, E. (2001): Cyanobacteria diversity and toxicity in a wastewater treatment plant (Portugal), Water Res (vol. 35), No. 5, pp. 1354-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11268858](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11268858)
- [85] von Dohren, H. (1995): Peptides, Biotechnology (vol. 28), pp. 129-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8688622](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8688622)
- [86] Kleinkauf, H. and Gevers, W. (1969): Nonribosomal polypeptide synthesis: the biosynthesis of a cyclic peptide antibiotic, gramicidin S, Cold Spring Harb Symp Quant Biol (vol. 34), pp. 805-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4314922](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4314922)
- [87] Abe, I.; Oguro, S.; Utsumi, Y.; Sano, Y. and Noguchi, H. (2005): Engineered biosynthesis of plant polyketides: chain length control in an octaketide-producing plant type III polyketide synthase, J Am Chem Soc (vol. 127), No. 36, pp. 12709-16. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16144421](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16144421)
- [88] Abe, I.; Utsumi, Y.; Oguro, S. and Noguchi, H. (2004): The first plant type III polyketide synthase that catalyzes formation of aromatic heptaketide, FEBS Lett (vol. 562), No. 1-3, pp. 171-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15044020](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15044020)
- [89] Stein, T.; Vater, J.; Kruff, V.; Otto, A.; Wittmann-Liebold, B.; Franke, P.; Panico, M.; McDowell, R. and Morris, H. R. (1996): The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates, J Biol Chem (vol. 271), No. 26, pp. 15428-35. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8663196](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8663196)
- [90] Schwarzer, D. and Marahiel, M. A. (2001): Multimodular biocatalysts for natural product assembly, Naturwissenschaften (vol. 88), No. 3, pp. 93-101. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11402845](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11402845)
- [91] Katz, L. and Donadio, S. (1993): Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics, Annu Rev Microbiol (vol. 47), pp. 875-912. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8257119](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8257119)
- [92] von Dohren, H.; Dieckmann, R. and Pavela-Vrancic, M. (1999): The nonribosomal code, Chem Biol (vol. 6), No. 10, pp. R273-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10508683](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10508683)
- [93] Stachelhaus, T.; Mootz, H. D. and Marahiel, M. A. (1999): The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases, Chem Biol (vol. 6), No. 8, pp. 493-505. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10421756](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10421756)

- [94] Cane, D. E. and Walsh, C. T. (1999): The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases, *Chem Biol* (vol. 6), pp. R319-R325.
- [95] Dittmann, E.; A, Neilan B; M, Erhard; H, von Döhren and T, Börner (1997): Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, *Molecular Microbiology* (vol. 26), No. 4, pp. 779-787.
- [96] Nishizawa, T.; Asayama, M.; Fujii, K.; Harada, K. and Shirai, M. (1999): Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp, *J Biochem (Tokyo)* (vol. 126), No. 3, pp. 520-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10467167](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10467167)
- [97] Meissner, K.; Dittmann, E. and Borner, T. (1996): Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes, *FEMS Microbiol Lett* (vol. 135), No. 2-3, pp. 295-303. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8595871](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8595871)
- [98] Tillett, D.; Dittmann, E.; Erhard, M.; von Dohren, H.; Borner, T. and Neilan, B. A. (2000): Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system, *Chem Biol* (vol. 7), No. 10, pp. 753-64. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11033079](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11033079)
- [99] Nishizawa, T.; Ueda, A.; Asayama, M.; Fujii, K.; Harada, K.; Ochi, K. and Shirai, M. (2000): Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin, *J Biochem (Tokyo)* (vol. 127), No. 5, pp. 779-89. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10788786](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10788786)
- [100] Christiansen, G.; Fastner, J.; Erhard, M.; Borner, T. and Dittmann, E. (2003): Microcystin biosynthesis in planktothrix: genes, evolution, and manipulation, *J Bacteriol* (vol. 185), No. 2, pp. 564-72. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12511503](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12511503)
- [101] Rouhiainen, L.; Vakkilainen, T.; Siemer, B. L.; Buikema, W.; Haselkorn, R. and Sivonen, K. (2004): Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90, *Applied and Environmental Microbiology* (vol. 70), No. 2, pp. 686-692.
- [102] Moffitt, M. C. and Neilan, B. A. (2004): Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins, *Applied and Environmental Microbiology* (vol. 70), No. 11, pp. 6353-6362.
- [103] Börner, T., and Dittmann, E. (2005): *Molecular biology of cyanobacterial toxins - Genetic basis of microcystin production*, Huisman, J., Matthijs, H.C.P., and Visser, P.M.. *Harmful cyanobacteria* (vol. 3) pp. 25-40, Springer, Dordrecht.
- [104] Kaebernick, M.; Dittmann, E.; Borner, T. and Neilan, B. A. (2002): Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide, *Applied and Environmental Microbiology* (vol. 68), No. 2, pp. 449-455.
- [105] Sielaff, H.; Dittmann, E.; Tandeau De Marsac, N.; Bouchier, C.; Von Dohren, H.; Borner, T. and Schwecke, T. (2003): The *mcyF* gene of the microcystin biosynthetic gene cluster from *Microcystis aeruginosa* encodes an aspartate racemase, *Biochem J* (vol. 373), No. Pt 3, pp. 909-16. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12713441](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12713441)
- [106] Pearson, L. A.; Barrow, K. D. and Neilan, B. A. (2006): Characterization of the 2-hydroxy acid dehydrogenase, *McyI*, encoded within the microcystin biosynthesis gene cluster of *Microcystis aeruginosa* PCC7806, *J Biol Chem*. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17142460](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17142460)
- [107] Pearson, L. A.; Hisbergues, M.; Borner, T.; Dittmann, E. and Neilan, B. A. (2004): Inactivation of an ABC transporter gene, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the

- cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, *Appl Environ Microbiol* (vol. 70), No. 11, pp. 6370-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15528494](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15528494)
- [108] Watanabe, M. F. and Oishi, S. (1985): Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions, *Appl Environ Microbiol* (vol. 49), No. 5, pp. 1342-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3923932](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3923932)
- [109] van der Westhuizen, A.J. and Eloff J.N. and Kruger G.H.J. (1986): Effect of temperature and light (fluence rate) on the composition of toxin of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UV-006), *Arch. Hydrobiol.* (vol. 108), pp. 145-154.
- [110] van der Westhuizen, A.J. and Eloff J.N. (1983): Effect of the culture age and pH of culture medium on the growth and the toxicity of the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*, *Z. Pflanzenphysiol.* (vol. 110), pp. 157-163.
- [111] Song, L, Sano, T, Li, R; Watanabe, M M; Liu, Y and Kaya, K (1998): Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions, *Phycological Research* (vol. 46), pp. 19-23.
- [112] Kaebernick, M.; Neilan, B. A.; Borner, T. and Dittmann, E. (2000): Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster, *Appl Environ Microbiol* (vol. 66), No. 8, pp. 3387-92. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10919796](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10919796)
- [113] Wiedner, C.; Visser, P. M.; Fastner, J.; Metcalf, J. S.; Codd, G. A. and Mur, L. R. (2003): Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806, *Appl Environ Microbiol* (vol. 69), No. 3, pp. 1475-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12620831](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12620831)
- [114] Utkilen, H. and Gjolme, N. (1992): Toxin Production by *Microcystis aeruginosa* as a Function of Light in Continuous Cultures and Its Ecological Significance, *Appl Environ Microbiol* (vol. 58), No. 4, pp. 1321-1325. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16348697](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16348697)
- [115] Lee, S. J.; Jang, M. H.; Kim, H. S.; Yoon, B. D. and Oh, H. M. (2000): Variation of microcystin content of *microcystis aeruginosa* relative to medium N:P ratio and growth stage, *J Appl Microbiol* (vol. 89), No. 2, pp. 323-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10971766](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10971766)
- [116] Rapala, J.; Sivonen, K.; Lyra, C. and Niemela, S. I. (1997): Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli, *Appl Environ Microbiol* (vol. 63), No. 6, pp. 2206-12. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9172340](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9172340)
- [117] Tonk, L.; Visser, P. M.; Christiansen, G.; Dittmann, E.; Snelder, E. O.; Wiedner, C.; Mur, L. R. and Huisman, J. (2005): The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity, *Appl Environ Microbiol* (vol. 71), No. 9, pp. 5177-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16151102](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16151102)
- [118] Sivonen, K. (1990): Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains, *Appl Environ Microbiol* (vol. 56), No. 9, pp. 2658-66. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2125814](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2125814)
- [119] Hesse, K., J.-G. Kohl (2001): Effects of light and nutrient supply on growth and microcystin content of different strains of *Microcystis aeruginosa*, *Chorus, Cyanotoxins occurrence, causes, consequences*, Springer, Berlin, heidelberg.

- [120] Kardinaal, W.E.A., and Visser, P.M. (2005): Dynamics of cyanobacterial toxins - sources of variability in microcystin concentrations, Huisman, J., Matthijs, H.C.P., and Visser, P.M.. Harmful cyanobacteria (vol. 3) pp. 41-63, Springer, Dordrecht.
- [121] Jungmann, D, Ludwichowski KU, Faltin V, Benndorf J (1996): A field study to investigate environmental factors that could effect microcystin synthesis of a microcystis poulation in the Bautzen reservoir, Int. Revue ges. hydrobiol. (vol. 81), No. 4, pp. 493-501.
- [122] Downing, T. G.; Meyer, C.; Gehringer, M. M. and van de Venter, M. (2005): Microcystin content of *Microcystis aeruginosa* is modulated by nitrogen uptake rate relative to specific growth rate or carbon fixation rate, Environ Toxicol (vol. 20), No. 3, pp. 257-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15892070](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15892070)
- [123] Long, B. M.; Jones, G. J. and Orr, P. T. (2001): Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate, Appl Environ Microbiol (vol. 67), No. 1, pp. 278-83. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11133456](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11133456)
- [124] Orr, P.T. and G.J., Jones (1998): Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures, Limnology & Oceanography (vol. 43), No. 7, pp. 1604-1614.
- [125] Watanabe, M. F.; Harada, K.-I.; Matsuura, K.; Watanabe, M. and Suzuki, M. (1989): Heptapeptide toxin production during the batch culture of two *Microcystis* species (cyanobacteria), J. Appl. Phycol. (vol. 1), pp. 161-165.
- [126] Kameyama, K.; Sugiura, N.; Inamori, Y. and Maekawa, T. (2004): Characteristics of microcystin production in the cell cycle of *Microcystis viridis*, Environmental Toxicology (vol. 19), No. 1, pp. 20-25.
- [127] Kaya, K. and Watanabe, M. M. (1990): Microcystin composition of an axenic clonal strain of *Microcystis viridis* and *Microcystis viridis*-containing waterblooms in Japanese freshwaters, Journal of Applied Phycology (vol. 2), pp. 173-178.
- [128] Harada, K. (2004): Production of secondary metabolites by freshwater cyanobacteria, Chem Pharm Bull (Tokyo) (vol. 52), No. 8, pp. 889-99. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15304980](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15304980)
- [129] Bittencourt-Oliveira Mdo, C.; Kujbida, P.; Cardozo, K. H.; Carvalho, V. M.; Moura Ado, N.; Colepicolo, P. and Pinto, E. (2005): A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komarek et al, Biochem Biophys Res Commun (vol. 326), No. 3, pp. 687-94. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15596154](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15596154)
- [130] Kaebernick, M.; Dittmann, E.; Borner, T. and Neilan, B. A. (2002): Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide, Appl Environ Microbiol (vol. 68), No. 2, pp. 449-55. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11823177](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11823177)
- [131] Martin-Luna, B.; Hernandez, J. A.; Bes, M. T.; Fillat, M. F. and Peleato, M. L. (2006): Identification of a Ferric uptake regulator from *Microcystis aeruginosa* PCC7806, FEMS Microbiol Lett (vol. 254), No. 1, pp. 63-70. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16451180](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16451180)
- [132] Martin-Luna, B.; Sevilla, E.; Hernandez, J. A.; Bes, M. T.; Fillat, M. F. and Peleato, M. L. (2006): Fur from *Microcystis aeruginosa* binds in vitro promoter regions of the microcystin biosynthesis gene cluster, Phytochemistry (vol. 67), No. 9, pp. 876-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16600317](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16600317)
- [133] Aldehni, M. F. and Forchhammer, K. (2006): Analysis of a non-canonical NtcA-dependent promoter in *Synechococcus elongatus* and its regulation by NtcA and PII, Arch Microbiol (vol. 184), No. 6, pp. 378-86. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16311758](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16311758)
- [134] Espinosa, J.; Forchhammer, K.; Burillo, S. and Contreras, A. (2006): Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA, *Mol Microbiol* (vol. 61), No. 2, pp. 457-69. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16796668](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16796668)
- [135] Fadi Aldehni, M.; Sauer, J.; Spielhaupter, C.; Schmid, R. and Forchhammer, K. (2003): Signal transduction protein P(II) is required for NtcA-regulated gene expression during nitrogen deprivation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942, *J Bacteriol* (vol. 185), No. 8, pp. 2582-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12670983](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12670983)
- [136] Forchhammer, K. (2004): Global carbon/nitrogen control by PII signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets, *FEMS Microbiol Rev* (vol. 28), No. 3, pp. 319-33. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15449606](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15449606)
- [137] Escolar, L.; Perez-Martin, J. and de Lorenzo, V. (1999): Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein, *J Bacteriol* (vol. 181), No. 20, pp. 6223-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10515908](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10515908)
- [138] Nunoshiba, T.; Obata, F.; Boss, A. C.; Oikawa, S.; Mori, T.; Kawanishi, S. and Yamamoto, K. (1999): Role of iron and superoxide for generation of hydroxyl radical, oxidative DNA lesions, and mutagenesis in *Escherichia coli*, *J Biol Chem* (vol. 274), No. 49, pp. 34832-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10574955](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10574955)
- [139] Schatz, D.; Keren, Y.; Vardi, A.; Sukenik, A.; Carmeli, S.; Borner, T.; Dittmann, E. and Kaplan, A. (2007): Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins, *Environ Microbiol* (vol. 9), No. 4, pp. 965-70. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17359268](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17359268)
- [140] Christoffersen, K.; Lyck, S. and Winding, A. (2002): Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins, *Aquatic Microbial Ecology* (vol. 27), No. 2, pp. 125-136.
- [141] Cousins, I T, DJ Bealing, HA James, A Sutton (1996): Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations, *Water Research* 30: 2 (FEB 1996), pp. 481-485 KW blue-green algae; algal toxins; microcystin-LR; biodegradation KW+ CYANOBACTERIA; RR TGA No. TM416 Discipl. Environment / Ecology Document Article Language English Address HA James, Water Res Ctr PLC, Henley Rd, Marlow SL7 2HD, Bucks, England ISBN/ISSN 0043-1354 Publisher Pergamon-Elsevier Science Ltd, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, England OX5 1GB.
- [142] Holst, T.; Jorgensen, N. O.; Jorgensen, C. and Johansen, A. (2003): Degradation of microcystin in sediments at oxic and anoxic, denitrifying conditions, *Water Res* (vol. 37), No. 19, pp. 4748-60. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14568062](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14568062)
- [143] Ishii, H.; Nishijima, M. and Abe, T. (2004): Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacterium, *Water Res* (vol. 38), No. 11, pp. 2667-76. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15207597](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15207597)
- [144] Jones, G. J.; Bourne, D. G.; Blakeley, R. L. and Doelle, H. (1994): Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria, *Nat Toxins* (vol. 2), No. 4, pp. 228-35. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7952948](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7952948)
- [145] Rapala, J.; Berg, K. A.; Lyra, C.; Niemi, R. M.; Manz, W.; Suomalainen, S.; Paulin, L. and Lahti, K. (2005): *Paucibacter toxinivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades cyclic

- cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularin, *Int J Syst Evol Microbiol* (vol. 55), No. Pt 4, pp. 1563-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16014482](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16014482)
- [146] Saitou, T, Sugiura N, Itayama T, Inamori Y, Matsumura M (2003): Degradation characteristics of microcystins by isolated bacteria from Lake Kasumigaura, *JOURNAL OF WATER SUPPLY RESEARCH AND TECHNOLOGY-AQUA* 52 (1): 13-18 FEB 2003.
- [147] Valeria, A. M.; Ricardo, E. J.; Stephan, P. and Alberto, W. D. (2006): Degradation of Microcystin-RR by *Sphingomonas* sp. CBA4 isolated from San Roque reservoir (Cordoba - Argentina), *Biodegradation*. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16485086](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16485086)
- [148] Bourne, D. G.; Riddles, P.; Jones, G. J.; Smith, W. and Blakeley, R. L. (2001): Characterisation of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR, *Environ Toxicol* (vol. 16), No. 6, pp. 523-34. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11769251](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11769251)
- [149] Saito, T.; Okano, K.; Park, H. D.; Itayama, T.; Inamori, Y.; Neilan, B. A.; Burns, B. P. and Sugiura, N. (2003): Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, *mlrA*, from new bacteria isolated from Japanese lakes, *FEMS Microbiol Lett* (vol. 229), No. 2, pp. 271-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14680710](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14680710)
- [150] Bourne, D. G.; Blakeley, R. L.; Riddles, P. and Jones, G. J. (2006): Biodegradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR in natural water and biologically active slow sand filters, *Water Research* (vol. 40), No. 6, pp. 1294-1302.
- [151] Bourne, D. G.; Jones, G. J.; Blakeley, R. L.; Jones, A.; Negri, A. P. and Riddles, P. (1996): Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR, *Appl Environ Microbiol* (vol. 62), No. 11, pp. 4086-94. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8899999](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8899999)
- [152] Imanishi, S.; Kato, H.; Mizuno, M.; Tsuji, K. and Harada, K. (2005): Bacterial degradation of microcystins and nodularin, *Chemical Research in Toxicology* (vol. 18), No. 3, pp. 591-598.
- [153] Duy, T. N.; Lam, P. K.; Shaw, G. R. and Connell, D. W. (2000): Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water, *Rev Environ Contam Toxicol* (vol. 163), pp. 113-85. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10771585](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10771585)
- [154] Park, H. D.; Sasaki, Y.; Maruyama, T.; Yanagisawa, E.; Hiraishi, A. and Kato, K. (2001): Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake, *Environ Toxicol* (vol. 16), No. 4, pp. 337-43. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11501283](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11501283)
- [155] Eriksson, J. E.; Gronberg, L.; Nygard, S.; Slotte, J. P. and Meriluoto, J. A. (1990): Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin, *Biochim Biophys Acta* (vol. 1025), No. 1, pp. 60-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2369577](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2369577)
- [156] Honkanen, R. E.; Zwiller, J.; Moore, R. E.; Daily, S. L.; Khatra, B. S.; Dukelow, M. and Boynton, A. L. (1990): Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases, *J Biol Chem* (vol. 265), No. 32, pp. 19401-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2174036](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2174036)
- [157] MacKintosh, C.; Beattie, K. A.; Klumpp, S.; Cohen, P. and Codd, G. A. (1990): Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants, *FEBS Lett* (vol. 264), No. 2, pp. 187-92. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2162782](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2162782)
- [158] Yoshizawa, S.; Matsushima, R.; Watanabe, M. F.; Harada, K.; Ichihara, A.; Carmichael, W. W. and Fujiki, H. (1990): Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity, *J Cancer Res Clin Oncol* (vol. 116), No. 6, pp. 609-14. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2174896](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2174896)
- [159] Falconer, I. R.; Dornbusch, M.; Moran, G. and Yeung, S. K. (1992): Effect of the cyanobacterial (blue-green algal) toxins from *Microcystis aeruginosa* on isolated enterocytes from the chicken small intestine, *Toxicon* (vol. 30), No. 7, pp. 790-3. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1509499](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1509499)
- [160] Fischer, W. J.; Altheimer, S.; Cattori, V.; Meier, P. J.; Dietrich, D. R. and Hagenbuch, B. (2005): Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin, *Toxicol Appl Pharmacol* (vol. 203), No. 3, pp. 257-63. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15737679](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15737679)
- [161] MacKintosh, R. W.; Dalby, K. N.; Campbell, D. G.; Cohen, P. T.; Cohen, P. and MacKintosh, C. (1995): The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1, *FEBS Lett* (vol. 371), No. 3, pp. 236-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7556599](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7556599)
- [162] Runnegar, M.; Berndt, N.; Kong, S. M.; Lee, E. Y. and Zhang, L. (1995): In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 216), No. 1, pp. 162-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7488083](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7488083)
- [163] Craig, M.; Luu, H. A.; McCready, T. L.; Williams, D.; Andersen, R. J. and Holmes, C. F. (1996): Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases, *Biochem Cell Biol* (vol. 74), No. 4, pp. 569-78. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8960363](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8960363)
- [164] Barford, D. and Keller, J. C. (1994): Co-crystallization of the catalytic subunit of the serine/threonine specific protein phosphatase 1 from human in complex with microcystin LR, *J Mol Biol* (vol. 235), No. 2, pp. 763-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8289294](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8289294)
- [165] Goldberg, J.; Huang, H. B.; Kwon, Y. G.; Greengard, P.; Nairn, A. C. and Kuriyan, J. (1995): Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1, *Nature* (vol. 376), No. 6543, pp. 745-53. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7651533](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7651533)
- [166] Maynes, J. T.; Luu, H. A.; Cherney, M. M.; Andersen, R. J.; Williams, D.; Holmes, C. F. and James, M. N. (2006): Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to motuporin and dihydromicrocystin-LA: elucidation of the mechanism of enzyme inhibition by cyanobacterial toxins, *J Mol Biol* (vol. 356), No. 1, pp. 111-20. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16343532](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16343532)
- [167] Xing, Y.; Xu, Y.; Chen, Y.; Jeffrey, P. D.; Chao, Y.; Lin, Z.; Li, Z.; Strack, S.; Stock, J. B. and Shi, Y. (2006): Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins, *Cell* (vol. 127), No. 2, pp. 341-53. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17055435](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17055435)
- [168] Rinehart, K. L., Namikoshi, M., Choi, B. W. (1994): Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria), *J Applied Phycology* (vol. 6), pp. 159-176.
- [169] Stotts, R. R.; Namikoshi, M.; Haschek, W. M.; Rinehart, K. L.; Carmichael, W. W.; Dahlem, A. M. and Beasley, V. R. (1993): Structural Modifications Imparting Reduced Toxicity in Microcystins from *Microcystis* Spp, *Toxicon* (vol. 31), No. 6, pp. 783-789.

- [170] Zhang, L.; Zhang, Z.; Long, F. and Lee, E. Y. (1996): Tyrosine-272 is involved in the inhibition of protein phosphatase-1 by multiple toxins, *Biochemistry* (vol. 35), No. 5, pp. 1606-11. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8634292](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8634292)
- [171] Huang, H. B.; Horiuchi, A.; Goldberg, J.; Greengard, P. and Nairn, A. C. (1997): Site-directed mutagenesis of amino acid residues of protein phosphatase 1 involved in catalysis and inhibitor binding, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 94), No. 8, pp. 3530-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9108010](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9108010)
- [172] Dawson, J. F.; Luu, H. A.; Bagu, J. R. and Holmes, C. F. (2000): Mutation of the toxin binding site of PP-1c: comparison with PP-2B, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 270), No. 2, pp. 543-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10753661](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10753661)
- [173] Maynes, J. T.; Perreault, K. R.; Cherney, M. M.; Luu, H. A.; James, M. N. and Holmes, C. F. (2004): Crystal structure and mutagenesis of a protein phosphatase-1:calcineurin hybrid elucidate the role of the beta12-beta13 loop in inhibitor binding, *J Biol Chem* (vol. 279), No. 41, pp. 43198-206. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15280359](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15280359)
- [174] Hastie, C. J.; Borthwick, E. B.; Morrison, L. F.; Codd, G. A. and Cohen, P. T. (2005): Inhibition of several protein phosphatases by a non-covalently interacting microcystin and a novel cyanobacterial peptide, nostocyclin, *Biochim Biophys Acta* (vol. 1726), No. 2, pp. 187-93. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16046071](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16046071)
- [175] Shi, L.; Carmichael, W. W. and Kennelly, P. J. (1999): Cyanobacterial PPP family protein phosphatases possess multifunctional capabilities and are resistant to microcystin-LR, *J Biol Chem* (vol. 274), No. 15, pp. 10039-46. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10187782](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10187782)
- [176] Falconer, I. R. and Yeung, D. S. (1992): Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by Microcystis toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins, *Chem Biol Interact* (vol. 81), No. 1-2, pp. 181-96. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1370395](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1370395)
- [177] Hamm-Alvarez, S. F.; Wei, X.; Berndt, N. and Runnegar, M. (1996): Protein phosphatases independently regulate vesicle movement and microtubule subpopulations in hepatocytes, *Am J Physiol* (vol. 271), No. 3 Pt 1, pp. C929-43. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8843724](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8843724)
- [178] Botha, N.; Gehringer, M. M.; Downing, T. G.; van de Venter, M. and Shephard, E. G. (2004): The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells, *Toxicol* (vol. 43), No. 1, pp. 85-92. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15037033](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15037033)
- [179] Bouaicha, N. and Maatouk, I. (2004): Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes, *Toxicol Lett* (vol. 148), No. 1-2, pp. 53-63. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15019088](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15019088)
- [180] Ding, W. X. and Nam Ong, C. (2003): Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity, *FEMS Microbiol Lett* (vol. 220), No. 1, pp. 1-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12644220](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12644220)
- [181] Ding, W. X.; Shen, H. M.; Zhu, H. G. and Ong, C. N. (1998): Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes, *Environ Res* (vol. 78),

- No. 1, pp. 12-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9630440](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9630440)
- [182] Jos, A.; Pichardo, S.; Prieto, A. I.; Repetto, G.; Vazquez, C. M.; Moreno, I. and Camean, A. M. (2005): Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions, *Aquat Toxicol* (vol. 72), No. 3, pp. 261-71. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15820106](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15820106)
- [183] Moreno, I.; Pichardo, S.; Jos, A.; Gomez-Amores, L.; Mate, A.; Vazquez, C. M. and Camean, A. M. (2005): Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally, *Toxicon* (vol. 45), No. 4, pp. 395-402. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15733560](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15733560)
- [184] Zegura, B.; Lah, T. T. and Filipic, M. (2006): Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells, *Mutat Res*. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16996296](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16996296)
- [185] Zegura, B.; Lah, T. T. and Filipic, M. (2004): The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage, *Toxicology* (vol. 200), No. 1, pp. 59-68.
- [186] Zegura, B.; Sedmak, B. and Filipic, M. (2003): Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2, *Toxicon* (vol. 41), No. 1, pp. 41-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12467660](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12467660)
- [187] Dawson, R. M. (1998): The toxicology of microcystins, *Toxicon* (vol. 36), No. 7, pp. 953-62. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9690788](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9690788)
- [188] Ding, W. X.; Shen, H. M. and Ong, C. N. (2000): Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes, *Hepatology* (vol. 32), No. 3, pp. 547-55. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10960448](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10960448)
- [189] Mikhailov, A.; Harmala-Brasken, A. S.; Hellman, J.; Meriluoto, J. and Eriksson, J. E. (2003): Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR, *Chem Biol Interact* (vol. 142), No. 3, pp. 223-37. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12453662](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12453662)
- [190] Chen, T.; Cui, J.; Liang, Y.; Xin, X.; Owen Young, D.; Chen, C. and Shen, P. (2006): Identification of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase as a potential target for microcystin-LR, *Toxicology* (vol. 220), No. 1, pp. 71-80. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16413648](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16413648)
- [191] Imanishi, S. and Harada, K. (2004): Proteomics approach on microcystin binding proteins in mouse liver for investigation of microcystin toxicity, *Toxicon* (vol. 43), No. 6, pp. 651-659.
- [192] Jungmann, D, Henning M, Jüttner F (1991): Are the same compounds in *Microcystis* responsible for toxicity to daphnia and inhibition of its filtering rate  $\beta$ , *Int. Revue ges. Hydrobiol.* (vol. 76), No. 1, pp. 47-56.
- [193] Hanazato, T. (1996): Toxic cyanobacteria and the zooplankton community, Watanabe, M.F., Harada, K., Carmichael, W.W., and Fujiki, H. , *Toxic Microcystis* pp. 79-102, CRC Press, New York.
- [194] Lampert, W (1981): Toxicity of blue-green *Microcystis aeruginosa*- Effective defence mechanism against grazing pressure by daphnia, *Verh.Internat.Verein. Limnolog.* 1981 (vol. 21), pp. 1436-1440.

- [195] Reinikainen, M, Walls M, Ketola M (1994): Acute toxicity of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (strain 7820) to *Daphnia pulex*, Arch Hydrobiol, Alogological studies (vol. 75), pp. 229-237.
- [196] Hietala , J, M Reinikainen, M Walls (1995): Variation in life history responses of *Daphnia* to toxic *Microcystis aeruginosa*, Journal of Plankton Research 17: 12 (DEC 1995), pp. 2307-2318 KW+ BLUE-GREEN-ALGAE; ZOOPLANKTON; CLADOCERANS; PULEX; CYANOBACTERIA; MECHANISMS; SURVIVAL; MAGNA TGA No. TT395 Discipl. AquaTlc Sciences Document Article Language English Address J Hietala, Univ Turku, Dept Biol, Ecol Zool Lab, SF-20500 Turku, Finland ISBN/ISSN 0142-7873 Publisher Oxford Univ Press United Kingdom, Walton St, Journals Dept, Oxford, England OX2 6DP.
- [197] Thostrup, L. and Christoffersen, K. (1999): Accumulation of microcystin in *Daphnia magna* feeding on toxic *Microcystis*, Archiv Fur Hydrobiologie (vol. 145), No. 4, pp. 447-467.
- [198] Rohrlack, T; M, Henning and JG, Kohl (1999): Does the toxic effect of *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia galeata* depend on microcystin ingestion rate?. Arch Hydrobiol 1999 NOV;146(4):385-395.
- [199] Rohrlack , T; M, Henning and JG, Kohl (1999): Mechanisms of the inhibitory effect of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia galeata*'s ingestion rate., J Plankton Res 1999 AUG;21(8):1489-1500.
- [200] Demott, W R, S Dhawale (1995): Inhibition of in vitro protein phosphatase activity in three zooplankton species by microcystin-LR, a toxin from cyanobacteria, Archiv Fur Hydrobiologie 134: 4 (OCT 1995), pp. 417-424 KW+ BLUE-GREEN-ALGAE; CHEMICAL DEFENSES; DAPHNIA; AERUGINOSA; TOXICITY; POTENT TGA No. TE869 Discipl. AquaTlc Sciences Document Article Language English Address WR Demott, Indiana Univ Purdue Univ, Dept Biol, FT Wayne, IN 46805 USA ISBN/ISSN 0003-9136 Publisher E Schweizerbart'Sche Verlags, Naegle U Obermiller, Johannesstrasse 3A, D 70176 Stuttgart, Germany.
- [201] Pires, L. M. D. and Van Donk, E. (2002): Comparing grazing by *Dreissena polymorpha* on phytoplankton in the presence of toxic and non-toxic cyanobacteria, Freshwater Biology (vol. 47), No. 10, pp. 1855-1865.
- [202] Ten Winkel, E.H. and Davids, C. (1982): Food selection by *Dreissena polymorpha* Pallas (Molluska: Bivalvia), Freshwat. Biol. (vol. 12), pp. 553-558.
- [203] Pires, LMD, Kusserow R, Van Donk E (2003): Influence of toxic and non-toxic phytoplankton on feeding and survival of *Dreissena polymorpha* (Pallas) larvae, HYDROBIOLOGIA (vol. 491), No. 1-3, pp. 193-200.
- [204] Kearns, K. D. and Hunter, M. D. (2001): Toxin-Producing *Anabaena flos-aquae* Induces Settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a Competing Motile Alga, Microb Ecol (vol. 42), No. 1, pp. 80-86. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12035083](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12035083)
- [205] Pflugmacher, S. (2002): Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems, Environ Toxicol (vol. 17), No. 4, pp. 407-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12203964](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12203964)
- [206] Pflugmacher, S.; Wiegand, C.; Beattie, K. A.; Krause, E.; Steinberg, C. E. and Codd, G. A. (2001): Uptake, effects, and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant *Phragmites australis* (cav.) trin. ex steud, Environ Toxicol Chem (vol. 20), No. 4, pp. 846-52. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11345462](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11345462)
- [207] Pflugmacher, S.; Wiegand, C.; Oberemm, A.; Beattie, K. A.; Krause, E.; Codd, G. A. and Steinberg, C. E. (1998): Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication, Biochim Biophys Acta (vol. 1425), No. 3, pp. 527-33. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9838216](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9838216)
- [208] Beattie, K. A.; Ressler, J.; Wiegand, C.; Krause, E.; Codd, G. A.; Steinberg, C. E. and Pflugmacher, S. (2003): Comparative effects and metabolism of two microcystins and

- nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*, *Aquat Toxicol* (vol. 62), No. 3, pp. 219-26. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12560170](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12560170)
- [209] Dittmann, E. and Wiegand, C. (2006): Cyanobacterial toxins--occurrence, biosynthesis and impact on human affairs, *Mol Nutr Food Res* (vol. 50), No. 1, pp. 7-17. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16304634](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16304634)
- [210] Magalhaes, V. F.; Marinho, M. M.; Domingos, P.; Oliveira, A. C.; Costa, S. M.; Azevedo, L. O. and Azevedo, S. M. (2003): Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ), *Toxicon* (vol. 42), No. 3, pp. 289-95. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14559080](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14559080)
- [211] Magalhaes, V. F.; Soares, R. M. and Azevedo, S. M. (2001): Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk, *Toxicon* (vol. 39), No. 7, pp. 1077-85. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11223098](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11223098)
- [212] Xie, L.; Xie, P.; Guo, L.; Li, L.; Miyabara, Y. and Park, H. D. (2005): Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China, *Environ Toxicol* (vol. 20), No. 3, pp. 293-300. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15892067](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15892067)
- [213] Cazenave, J.; Bistoni Mde, L.; Pesce, S. F. and Wunderlin, D. A. (2006): Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR, *Aquat Toxicol* (vol. 76), No. 1, pp. 1-12. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16263184](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16263184)
- [214] Cazenave, J.; Bistoni Mde, L.; Zwirnmann, E.; Wunderlin, D. A. and Wiegand, C. (2006): Attenuating effects of natural organic matter on microcystin toxicity in zebra fish (*Danio rerio*) embryos -- benefits and costs of microcystin detoxication, *Environ Toxicol* (vol. 21), No. 1, pp. 22-32. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16463263](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16463263)
- [215] Cazenave, J.; Wunderlin, D. A.; Bistoni, M. D. L.; Ame, M. V.; Krause, E.; Pflugmacher, S. and Wiegand, C. (2005): Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis* - A field and laboratory study, *Aquatic Toxicology* (vol. 75), No. 2, pp. 178-190.
- [216] Fogg, G. E. (1973): *The Blue-green algae*, Academic Press, London, New York., ISBN: 0122616502.
- [217] Kotut, K.; Ballot, A. and Krienitz, L. (2006): Toxic cyanobacteria and their toxins in standing waters of Kenya: implications for water resource use, *J Water Health* (vol. 4), No. 2, pp. 233-45. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16813016](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16813016)
- [218] Alonso-Andicoberry, C.; Garcia-Villada, L.; Lopez-Rodas, V. and Costas, E. (2002): Catastrophic mortality of flamingos in a Spanish national park caused by cyanobacteria, *Vet Rec* (vol. 151), No. 23, pp. 706-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12503790](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12503790)
- [219] Codd, G. A.; Metcalf, J. S.; Morrison, L. F.; Krienitz, L.; Ballot, A.; Pflugmacher, S.; Wiegand, C. and Kotut, K. (2003): Susceptibility of flamingos to cyanobacterial toxins via feeding, *Vet Rec* (vol. 152), No. 23, pp. 722-3. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12825708](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12825708)
- [220] Koenig, R. (2006): Ornithology. The pink death: die-offs of the lesser flamingo raise concern, *Science* (vol. 313), No. 5794, pp. 1724-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16990528](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16990528)

- [221] Krienitz, L.; Ballot, A.; Kotut, K.; Wiegand, C.; Putz, S.; Metcalf, J. S.; Codd, G. A. and Pflugmacher, S. (2003): Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya, *Fems Microbiology Ecology* (vol. 43), No. 2, pp. 141-148.
- [222] Matsunaga, H.; Harada, K. I.; Senma, M.; Ito, Y.; Yasuda, N.; Ushida, S. and Kimura, Y. (1999): Possible cause of unnatural mass death of wild birds in a pond in Nishinomiya, Japan: sudden appearance of toxic cyanobacteria, *Nat Toxins* (vol. 7), No. 2, pp. 81-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10495470](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10495470)
- [223] Falconer, I. R. (2005): Is there a human health hazard from microcystins in the drinking water supply?, *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* (vol. 33), No. 1, pp. 64-71.
- [224] Falconer, I. R. (1999): An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water, *Environmental Toxicology* (vol. 14), No. 1, pp. 5-12.
- [225] Turner, P. C.; Gammie, A. J.; Hollinrake, K. and Codd, G. A. (1990): Pneumonia associated with contact with cyanobacteria, *Bmj* (vol. 300), No. 6737, pp. 1440-1. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2116198](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2116198)
- [226] Falconer, I. R.; Beresford, A. M. and Runnegar, M. T. (1983): Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*, *Med J Aust* (vol. 1), No. 11, pp. 511-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6405136](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6405136)
- [227] Lankoff, A.; Bialczyk, J.; Dziga, D.; Carmichael, W. W.; Lisowska, H. and Wojcik, A. (2006): Inhibition of nucleotide excision repair (NER) by microcystin-LR in CHO-K1 cells, *Toxicol.* URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16989880](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16989880)
- [228] Nishiwaki-Matsushima, R.; Ohta, T.; Nishiwaki, S.; Suganuma, M.; Kohyama, K.; Ishikawa, T.; Carmichael, W. W. and Fujiki, H. (1992): Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR, *J Cancer Res Clin Oncol* (vol. 118), No. 6, pp. 420-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1618889](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1618889)
- [229] Ohta, T.; Nishiwaki, R.; Yatsunami, J.; Komori, A.; Suganuma, M. and Fujiki, H. (1992): Hyperphosphorylation of cytokeratins 8 and 18 by microcystin-LR, a new liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes, *Carcinogenesis* (vol. 13), No. 12, pp. 2443-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1282096](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1282096)
- [230] Yu, S.; Zhao, N. and Zi, X. (2001): [The relationship between cyanotoxin (microcystin, MC) in pond-ditch water and primary liver cancer in China], *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* (vol. 23), No. 2, pp. 96-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11783030](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11783030)
- [231] Ueno, Y.; Nagata, S.; Tsutsumi, T.; Hasegawa, A.; Watanabe, M. F.; Park, H. D.; Chen, G. C.; Chen, G. and Yu, S. Z. (1996): Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay, *Carcinogenesis* (vol. 17), No. 6, pp. 1317-21. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8681449](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8681449)
- [232] Fujiki, H., E Sueoka, M Suganuma (1996): *Carcinogenesis of microcystins*, Toxic Microcystis (1996) pp. 203-232 TGA No. BE38W Discipl. \*Current Book Contents\* Document Article Language English Address H Fujiki, Saitama Canc Ctr, Res Inst, Ina, Saitama, JaPgn Editor MF Watanabe, K Harada, WW Carmichael, H Fujiki ISBN/ISSN 0-8493-7693-9 Publisher CRC Press Inc, 2000 Corporate Blvd NW, Boca Raton, FL 33431.
- [233] Kuiper-Goodman, T., Falconer, I., and Fitzgerald, J. (1999): *Human Health Aspects*, Chorus, I., and Bartram, J., *Toxic cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management* pp. 125-160, E & FN Spon, London and New York.

- [234] Vezie, C.; Brient, L.; Sivonen, K.; Bertru, G.; Lefevre, J. and Salkinoja-Salonen, M. (1998): Variation of Microcystin Content of Cyanobacterial Blooms and Isolated Strains in Lake Grand-Lieu (France), *Microb Ecol* (vol. 35), No. 2, pp. 126-35. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9541549](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9541549)
- [235] Neumann, U.; Campos, V.; Cantarero, S.; Urrutia, H.; Heinze, R.; Weckesser, J. and Erhard, M. (2000): Co-occurrence of non-toxic (cyanopeptolin) and toxic (microcystin) peptides in a bloom of *Microcystis* sp. from a Chilean lake, *Syst Appl Microbiol* (vol. 23), No. 2, pp. 191-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10930070](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10930070)
- [236] Baker, J. A.; Entsch, B.; Neilan, B. A. and McKay, D. B. (2002): Monitoring changing toxigenicity of a cyanobacterial bloom by molecular methods, *Appl Environ Microbiol* (vol. 68), No. 12, pp. 6070-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12450830](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12450830)
- [237] Welker, M.; von Dohren, H.; Tauscher, H.; Steinberg, C. E. W. and Erhard, M. (2003): Toxic *Microcystis* in shallow lake Muggelsee (Germany) - dynamics, distribution, diversity, *Archiv Fur Hydrobiologie* (vol. 157), No. 2, pp. 227-248.
- [238] Via-Ordorika, L.; Fastner, J.; Kurmayer, R.; Hisbergues, M.; Dittmann, E.; Komarek, J.; Erhard, M. and Chorus, I. (2004): Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in European freshwater bodies: detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies, *Syst Appl Microbiol* (vol. 27), No. 5, pp. 592-602. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15490561](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15490561)
- [239] Christiansen, G.; Kurmayer, R.; Liu, Q. and Borner, T. (2006): Transposons inactivate biosynthesis of the nonribosomal peptide microcystin in naturally occurring *Planktothrix* spp, *Appl Environ Microbiol* (vol. 72), No. 1, pp. 117-23. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16391033](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16391033)
- [240] Kurmayer, R.; Christiansen, G.; Fastner, J. and Borner, T. (2004): Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp, *Environ Microbiol* (vol. 6), No. 8, pp. 831-41. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15250885](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15250885)
- [241] Kurmayer, R.; Christiansen, G.; Gumpenberger, M. and Fastner, J. (2005): Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*, *Microbiology* (vol. 151), No. Pt 5, pp. 1525-33. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15870462](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15870462)
- [242] Mbedi, S.; Welker, M.; Fastner, J. and Wiedner, C. (2005): Variability of the microcystin synthetase gene cluster in the genus *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria), *FEMS Microbiol Lett* (vol. 245), No. 2, pp. 299-306. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15837386](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15837386)
- [243] Wiedner C, mbedi S, Welker M, Fastner J (2005): Detection of microcystin-producing cyanobacteria of the genus *Planktothrix* with PCR-based methods, *IGB*, 101-107, 1081
- [244] Rantala, A.; Rajaniemi-Wacklin, P.; Lyra, C.; Lepisto, L.; Rintala, J.; Mankiewicz-Boczek, J. and Sivonen, K. (2006): Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene *E* (*mcyE*) PCR and associations with environmental factors, *Appl Environ Microbiol* (vol. 72), No. 9, pp. 6101-10. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16957235](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16957235)
- [245] Vaitomaa, J.; Rantala, A.; Halinen, K.; Rouhiainen, L.; Tallberg, P.; Mokolke, L. and Sivonen, K. (2003): Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase *e* copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes, *Appl Environ Microbiol* (vol. 69), No. 12, pp. 7289-97. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14660378](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14660378)
- [246] Kaebernick, M.; Rohrlack, T.; Christoffersen, K. and Neilan, B. A. (2001): A spontaneous mutant of microcystin biosynthesis: genetic characterization and effect on *Daphnia*, *Environ Microbiol* (vol. 3), No. 11, pp. 669-79. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11846757](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11846757)
- [247] Harada, K.; Mayumi, T.; Shimada, T.; Fujii, K.; Kondo, F.; Park, H. D. and Watanabe, M. F. (2001): Co-production of microcystins and aeruginopeptins by natural cyanobacterial bloom, *Environ Toxicol* (vol. 16), No. 4, pp. 298-305. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11501278](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11501278)
- [248] Kleinkauf, H. and von Dohren, H. (1990): Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics, *Eur J Biochem* (vol. 192), No. 1, pp. 1-15. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2205497](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2205497)
- [249] Piel, J. (2002): A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 99), No. 22, pp. 14002-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12381784](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12381784)
- [250] Piel, J.; Hui, D.; Wen, G.; Butzke, D.; Platzer, M.; Fusetani, N. and Matsunaga, S. (2004): Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 101), No. 46, pp. 16222-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15520376](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15520376)
- [251] Crosa, J. H. and Walsh, C. T. (2002): Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria, *Microbiol Mol Biol Rev* (vol. 66), No. 2, pp. 223-49. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12040125](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12040125)
- [252] Yu, S.; Fiss, E. and Jacobs, W. R., Jr. (1998): Analysis of the exochelin locus in *Mycobacterium smegmatis*: biosynthesis genes have homology with genes of the peptide synthetase family, *J Bacteriol* (vol. 180), No. 17, pp. 4676-85. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9721311](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9721311)
- [253] Black, T. A. and Wolk, C. P. (1994): Analysis of a Het- mutation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 implicates a secondary metabolite in the regulation of heterocyst spacing, *J Bacteriol* (vol. 176), No. 8, pp. 2282-92. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8157596](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8157596)
- [254] Davies, J. (2006): Are antibiotics naturally antibiotics?, *J Ind Microbiol Biotechnol* (vol. 33), No. 7, pp. 496-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16552582](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16552582)
- [255] Kleerebezem, M. and Quadri, L. E. (2001): Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior, *Peptides* (vol. 22), No. 10, pp. 1579-96. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11587786](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11587786)
- [256] Stein, T. (2005): *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions, *Mol Microbiol* (vol. 56), No. 4, pp. 845-57. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15853875](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15853875)
- [257] Davies, J. (2007): Small molecules: the lexicon of biodiversity, *J Biotechnol* (vol. 129), No. 1, pp. 3-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17208324](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17208324)

- [258] Tsui, W. H.; Yim, G.; Wang, H. H.; McClure, J. E.; Surette, M. G. and Davies, J. (2004): Dual effects of MLS antibiotics: transcriptional modulation and interactions on the ribosome, *Chem Biol* (vol. 11), No. 9, pp. 1307-16. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15380191](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15380191)
- [259] Goh, E. B.; Yim, G.; Tsui, W.; McClure, J.; Surette, M. G. and Davies, J. (2002): Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 99), No. 26, pp. 17025-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12482953](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12482953)
- [260] Christoffersen, K. (1996): Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic ecosystems, *Phycologia* (vol. 36), pp. 42-50.
- [261] Rohrlack, T.; Dittmann, E.; Henning, M.; Borner, T. and Kohl, J. G. (1999): Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *Appl Environ Microbiol* (vol. 65), No. 2, pp. 737-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9925609](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9925609)
- [262] Sukenik, A., Eshol, R., Livne, A. et al. (2002): Inhibition of growth and photosynthesis of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* by *Microcystis* sp. (cyanobacteria): A novel allelopathic mechanism, *Limnol Oceanogr* (vol. 47), No. 6, pp. 1656-1663.
- [263] Vardi, A.; Schatz, D.; Beeri, K.; Motro, U.; Sukenik, A.; Levine, A. and Kaplan, A. (2002): Dinoflagellate-cyanobacterium communication may determine the composition of phytoplankton assemblage in a mesotrophic lake, *Curr Biol* (vol. 12), No. 20, pp. 1767-72. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12401172](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12401172)
- [264] Sedmak, B. and Elerseck, T. (2005): Microcystins Induce Morphological and Physiological Changes in Selected Representative Phytoplanktons, *Microb Ecol*. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16215645](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16215645)
- [265] Babica, P.; Blaha, L. and Marsalek, B. (2006): Exploring the natural role of microcystins - A review of effects on photoautotrophic organisms, *Journal of Phycology* (vol. 42), No. 1, pp. 9-20.
- [266] Wiegand, C.; Peuthert, A.; Pflugmacher, S. and Carmeli, S. (2002): Effects of microcin SF608 and microcystin-LR, two cyanobacterial compounds produced by *Microcystis* sp., on aquatic organisms, *Environ Toxicol* (vol. 17), No. 4, pp. 400-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12203963](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12203963)
- [267] Dittmann, E.; Erhard, M.; Kaebernick, M.; Scheler, C.; Neilan, B. A.; von Dohren, H. and Borner, T. (2001): Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, *Microbiology* (vol. 147), No. Pt 11, pp. 3113-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11700361](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11700361)
- [268] Sedmak, B, Kosi G (1998): The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation, *Journal of Plankton Research* (vol. 20), No. 4, pp. 691-708.
- [269] Hanzelka, B. L. and Greenberg, E. P. (1996): Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis, *J Bacteriol* (vol. 178), No. 17, pp. 5291-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8752350](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8752350)
- [270] Hardman, A. M.; Stewart, G. S. and Williams, P. (1998): Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek* (vol. 74), No. 4, pp. 199-210. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10081580](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10081580)

- [271] West, S. A.; Griffin, A. S.; Gardner, A. and Diggle, S. P. (2006): Social evolution theory for microorganisms, *Nat Rev Microbiol* (vol. 4), No. 8, pp. 597-607. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16845430](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16845430)
- [272] Bassler, B. L. (2002): Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria, *Cell* (vol. 109), No. 4, pp. 421-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12086599](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12086599)
- [273] Bassler, B. L. (1999): How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing, *Curr Opin Microbiol* (vol. 2), No. 6, pp. 582-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10607620](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10607620)
- [274] Zhang, C. C.; Laurent, S.; Sakr, S.; Peng, L. and Bedu, S. (2006): Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: a chorus of signals, *Mol Microbiol* (vol. 59), No. 2, pp. 367-75. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16390435](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16390435)
- [275] Kehr, J. C.; Zilliges, Y.; Springer, A.; Disney, M. D.; Ratner, D. D.; Bouchier, C.; Seeberger, P. H.; de Marsac, N. T. and Dittmann, E. (2006): A mannan binding lectin is involved in cell-cell attachment in a toxic strain of *Microcystis aeruginosa*, *Mol Microbiol* (vol. 59), No. 3, pp. 893-906. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16420359](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16420359)
- [276] Welker, M.; Brunke, M.; Preussel, K.; Lippert, I. and von Dohren, H. (2004): Diversity and distribution of *Microcystis* (Cyanobacteria) oligopeptide chemotypes from natural communities studied by single-colony mass spectrometry, *Microbiology* (vol. 150), No. Pt 6, pp. 1785-96. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15184565](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15184565)
- [277] Kurmayer, R.; Dittmann, E.; Fastner, J. and Chorus, I. (2002): Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany), *Microb Ecol* (vol. 43), No. 1, pp. 107-18. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11984633](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11984633)
- [278] Fastner, J.; Erhard, M. and von Dohren, H. (2001): Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis* spp. (cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *Appl Environ Microbiol* (vol. 67), No. 11, pp. 5069-76. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11679328](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11679328)
- [279] Neilan, B. A.; Jacobs, D.; Del Dot, T.; Blackall, L. L.; Hawkins, P. R.; Cox, P. T. and Goodman, A. E. (1997): rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*, *Int J Syst Bacteriol* (vol. 47), No. 3, pp. 693-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9226902](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9226902)
- [280] Otsuka, S.; Suda, S.; Li, R.; Watanabe, M.; Oyaizu, H.; Matsumoto, S and Watanabe, M M (1999): Characterization of morphospecies and strains of the genus *Microcystis* (cyanobacteria) for a reconsideration of the species classification, *Phycol Res* (vol. 47), No. 3, pp. 189-197.
- [281] Pan, H.; Song, L.; Liu, Y. and Borner, T. (2002): Detection of hepatotoxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples, *Arch Microbiol* (vol. 178), No. 6, pp. 421-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12420161](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12420161)
- [282] Kardinaal, W. E.; Tonk, L.; Janse, I.; Hol, S.; Slot, P.; Huisman, J. and Visser, P. M. (2007): Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis*, *Appl Environ Microbiol* (vol. 73), No. 9, pp. 2939-46. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17337540](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17337540)
- [283] Carmichael, W. W. and Gorham, P. R. (1981): The Mosaic Nature of Toxic Blooms of Cyanobacteria, Carmichael, W. W., *The Water Environment: Algal Toxins and Health* pp. 161-172, Plenum Press, New York.
- [284] Kurmayer, R. and Kutzenberger, T. (2003): Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp, *Appl Environ Microbiol* (vol. 69), No. 11, pp. 6723-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14602633](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14602633)
- [285] Kurmayer, R.; Christiansen, G. and Chorus, I. (2003): The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp. and determines its microcystin net production in Lake Wannsee, *Appl Environ Microbiol* (vol. 69), No. 2, pp. 787-95. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12570996](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12570996)
- [286] Gerbersdorf, S. U. (2006): An advanced technique for immuno-labelling of microcystins in cryosectioned cells of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (cyanobacteria): implementations of an experiment with varying light scenarios and culture densities, *Toxicon* (vol. 47), No. 2, pp. 218-28. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16376961](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16376961)
- [287] Young, F. M.; Thomson, C.; Metcalf, J. S.; Lucocq, J. M. and Codd, G. A. (2005): Immunogold localisation of microcystins in cryosectioned cells of *Microcystis*, *J Struct Biol* (vol. 151), No. 2, pp. 208-14. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16054393](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16054393)
- [288] Kameyama, K.; Sugiura, N.; Inamori, Y. and Maekawa, T. (2004): Characteristics of microcystin production in the cell cycle of *Microcystis viridis*, *Environ Toxicol* (vol. 19), No. 1, pp. 20-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14758590](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14758590)
- [289] Hesse, K.; Dittmann, E. and Borner, T. (2001): Consequences of impaired microcystin production for light- dependent growth and pigmentation of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, *FEMS Microbiol Ecol* (vol. 37), No. 1, pp. 39-43.
- [290] Lyck, S (2004): Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*, *JOURNAL OF PLANKTON RESEARCH* 26 (7): 727-736 JUL 2004 (vol. 26), pp. 727-736.
- [291] Hesse, K., and Kohl, J.G. (2001): Effects of light and nutrient supply on growth and microcystin content of different strains of *Microcystis aeruginosa*, Chorus, I., *Cyanotoxins - Occurrence, Causes, Consequences* pp. 104-115, Springer, Berlin and Heidelberg.
- [292] Vezie, C.; Rapala, J.; Vaitomaa, J.; Seitsonen, J. and Sivonen, K. (2002): Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations, *Microb Ecol* (vol. 43), No. 4, pp. 443-54. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11953809](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11953809)
- [293] Utkilen, H. and Gjolme, N. (1995): Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*, *Appl Environ Microbiol* (vol. 61), No. 2, pp. 797-800. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7574617](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7574617)
- [294] Rippka, R.; Deruelles, J.; Waterbury, J. B.; Herdman, M. and Stanier, R. Y. (1979): Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria, *J Gen Microbiol* (vol. 111), pp. 1-61.
- [295] Dittmann, E.; Neilan, B. A.; Erhard, M.; von Dohren, H. and Borner, T. (1997): Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, *Mol Microbiol* (vol. 26), No. 4, pp. 779-87.

- URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9427407](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9427407)
- [296] Tillett, D.; Dittmann, E.; Erhard, M.; vonDohren, H.; Borner, T. and Neilan, B. A. (2000): Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide- polyketide synthetase system, *Chem Biol* (vol. 7), No. 10, pp. 753-764.
- [297] Sambrook, J., Russel, D.W. (2001): *Molecular Cloning - A laboratory manual*, third. ed., Irwin, Nina, Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [298] Hisbergues, M.; Christiansen, G.; Rouhiainen, L.; Sivonen, K. and Borner, T. (2003): PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera, *Arch Microbiol* (vol. 180), No. 6, pp. 402-10. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14551674](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14551674)
- [299] Claußner, Y. (2002): *Molekulare Analyse von Microcystis aeruginosa PCC 7806 und Microcystin-freien Mutanten*, Diplomarbeit, Institut für Biologie/ Genetik, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- [300] Ehling-Schulz, M.; Schulz, S.; Wait, R.; Gorg, A. and Scherer, S. (2002): The UV-B stimolon of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* comprises early shock proteins and late acclimation proteins, *Mol Microbiol* (vol. 46), No. 3, pp. 827-43. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12410839](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12410839)
- [301] Fulda, S., Mikkat, S., Schroder, W., Hagemann, M. (1999): Isolation of salt-induced periplasmic proteins from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *Arch Microbiol* (vol. 171), No. 3, pp. 214-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10201099](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10201099)
- [302] Tielker, D.; Hacker, S.; Loris, R.; Strathmann, M.; Wingender, J.; Wilhelm, S.; Rosenau, F. and Jaeger, K. E. (2005): *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation, *Microbiology* (vol. 151), No. Pt 5, pp. 1313-23. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15870442](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15870442)
- [303] Kurian, D.; Jansen, T. and Maenpaa, P. (2006): Proteomic analysis of heterotrophy in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Proteomics* (vol. 6), No. 5, pp. 1483-94. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16421936](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16421936)
- [304] Zhang, C. C.; Huguenin, S. and Friry, A. (1995): Analysis of genes encoding the cell division protein FtsZ and a glutathione synthetase homologue in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120, *Res Microbiol* (vol. 146), No. 6, pp. 445-55. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8525061](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8525061)
- [305] Bradford, M.M. (1976): A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* (vol. 72), pp. 248-254.
- [306] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* (vol. 19), pp. 265-275.
- [307] Bollag, D.M., Edelman, S.J. (1991): *Protein Methods*, Wiley-Liss, Inc., New York.
- [308] Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of Bacteriophage T4, *Nature* (vol. 227), pp. 680-685.
- [309] Huang, F.; Fulda, S.; Hagemann, M. and Norling, B. (2006): Proteomic screening of salt-stress-induced changes in plasma membranes of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *Proteomics* (vol. 6), No. 3, pp. 910-20. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16400685](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16400685)
- [310] Duhring, U.; Irrgang, K. D.; Lunser, K.; Kehr, J. and Wilde, A. (2006): Analysis of photosynthetic complexes from a cyanobacterial ycf37 mutant, *Biochim Biophys Acta* (vol. 1757), No. 1, pp. 3-11. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16364235](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16364235)
- [311] Blum, H.; Beier, H. and Gross, H.J. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis* (vol. 8), pp. 93-99.
- [312] Fulda, S.; Mikkat, S.; Huang, F.; Huckauf, J.; Marin, K.; Norling, B. and Hagemann, M. (2006): Proteome analysis of salt stress response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *Proteomics* (vol. 6), No. 9, pp. 2733-45. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16572470](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16572470)
- [313] Kehr, J., Haebel, S., Blechschmidt-Schneider, S., Willmitzer, L., Steup, M., Fisahn, J. (1999): Analysis of phloem protein patterns from different organs of *Cucurbita maxima* Duch. by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectroscopy combined with sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis, *Planta* (vol. 207), No. 4, pp. 612-619.
- [314] Duhring, U.; Axmann, I. M.; Hess, W. R. and Wilde, A. (2006): An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene *isiA*, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 103), No. 18, pp. 7054-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16636284](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16636284)
- [315] Tamoi, M.; Miyazaki, T.; Fukamizo, T. and Shigeoka, S. (2005): The Calvin cycle in cyanobacteria is regulated by CP12 via the NAD(H)/NADP(H) ratio under light/dark conditions, *Plant J* (vol. 42), No. 4, pp. 504-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15860009](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15860009)
- [316] Tamoi, M.; Murakami, A.; Takeda, T. and Shigeoka, S. (1998): Acquisition of a new type of fructose-1,6-bisphosphatase with resistance to hydrogen peroxide in cyanobacteria: molecular characterization of the enzyme from *Synechocystis* PCC 6803, *Biochim Biophys Acta* (vol. 1383), No. 2, pp. 232-44. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9602137](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9602137)
- [317] Kuhn, I.; Peng, L.; Bedu, S. and Zhang, C. C. (2000): Developmental regulation of the cell division protein FtsZ in *Anabaena* sp. strain PCC 7120, a cyanobacterium capable of terminal differentiation, *J Bacteriol* (vol. 182), No. 16, pp. 4640-3. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10913101](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10913101)
- [318] Ishida, K. and Murakami, M. (2000): Kasumigamide, an antialgal peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *J Org Chem* (vol. 65), No. 19, pp. 5898-900. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10987919](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10987919)
- [319] Orr, P. T. and Jones, G. J. (1998): Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen limited *Microcystis aeruginosa* cultures, *Limnol Oceanogr* (vol. 43), pp. 1604-1614.
- [320] Park, H. D.; Watanabe, M. F.; Harda, K.; Nagai, H.; Suzuki, M.; Watanabe, M. and Hayashi, H. (1993): Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters, *Nat Toxins* (vol. 1), No. 6, pp. 353-60. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8167957](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8167957)
- [321] Ziemert, N. (2004): Untersuchung Microcystin-abhängiger Proteine in einer Microcystin-freien McyB-Mutante von *Microcystis aeruginosa* mittels 2-DE-Analyse, Studienjahresarbeit, Institut für Biologie/ Molekulare Ökologie, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- [322] Fulda, S.; Huang, F.; Nilsson, F.; Hagemann, M. and Norling, B. (2000): Proteomics of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Identification of periplasmic proteins in cells grown at low and high salt concentrations, *Eur J Biochem* (vol. 267), No. 19, pp. 5900-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10998049](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10998049)
- [323] Lambert-Buisine, C.; Willery, E.; Loch, C. and Jacob-Dubuisson, F. (1998): N-terminal characterization of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin, *Mol Microbiol* (vol.

- 28), No. 6, pp. 1283-93. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9680216](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9680216)
- [324] Shi, L.; Carmichael, W. W. and Miller, I. (1995): Immuno-gold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells, *Arch Microbiol* (vol. 163), No. 1, pp. 7-15. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7710323](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7710323)
- [325] Rivasseau, C.; Martins, S. and Hennion, M. C. (1998): Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography, *J Chromatogr A* (vol. 799), No. 1-2, pp. 155-69. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9550107](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9550107)
- [326] Eriksson, J. E.; Paatero, G. I.; Meriluoto, J. A.; Codd, G. A.; Kass, G. E.; Nicotera, P. and Orrenius, S. (1989): Rapid microfilament reorganization induced in isolated rat hepatocytes by microcystin-LR, a cyclic peptide toxin, *Exp Cell Res* (vol. 185), No. 1, pp. 86-100. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2806414](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2806414)
- [327] Marcus, Y.; Altman-Gueta, H.; Finkler, A. and Gurevitz, M. (2003): Dual role of cysteine 172 in redox regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity and degradation, *J Bacteriol* (vol. 185), No. 5, pp. 1509-17. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12591867](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12591867)
- [328] Lyra, C.; Suomalainen, S.; Gugger, M.; Vezie, C.; Sundman, P.; Paulin, L. and Sivonen, K. (2001): Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera, *Int J Syst Evol Microbiol* (vol. 51), No. Pt 2, pp. 513-26. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11321098](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11321098)
- [329] Saker, M. L.; Fastner, J.; Dittmann, E.; Christiansen, G. and Vasconcelos, V. M. (2005): Variation between strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from a Portuguese river, *J Appl Microbiol* (vol. 99), No. 4, pp. 749-57. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16162225](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16162225)
- [330] Takahashi, I.; Hayano, D.; Asayama, M.; Masahiro, F.; Watahiki, M. and Shirai, M. (1996): Restriction barrier composed of an extracellular nuclease and restriction endonuclease in the unicellular cyanobacterium *Microcystis* sp, *FEMS Microbiol Lett* (vol. 145), No. 1, pp. 107-11. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8931334](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8931334)
- [331] Holland, B. (2004): Conference Opening, EURESCO CONFERENCE: Bacterial Neural Networks, San Feliu (Spain).
- [332] Bister, B.; Keller, S.; Baumann, H. I.; Nicholson, G.; Weist, S.; Jung, G.; Sussmuth, R. D. and Juttner, F. (2004): Cyanopeptolin 963A, a chymotrypsin inhibitor of *Microcystis* PCC 7806, *J Nat Prod* (vol. 67), No. 10, pp. 1755-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15497957](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15497957)
- [333] Martin, C.; Oberer, L.; Ino, T.; Konig, W. A.; Busch, M. and Weckesser, J. (1993): Cyanopeptolins, new depsipeptides from the cyanobacterium *Microcystis* sp. PCC 7806, *J Antibiot* (Tokyo) (vol. 46), No. 10, pp. 1550-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8244882](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8244882)
- [334] Fastner, J., Erhard, M., and Neumann, U. (2001): Microcystin variants in *Microcystis* and *Planktothrix* dominated field samples, *Chorus, I., Cyanotoxins - Occurrence, Causes, Consequences* pp. 148-152, Springer, Berlin and Heidelberg.
- [335] Welker, M. and von Dohren, H. (2006): Cyanobacterial peptides - nature's own combinatorial biosynthesis, *FEMS Microbiol Rev* (vol. 30), No. 4, pp. 530-63. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16774586](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16774586)
- [336] Mullineaux, C. W. (2001): How do cyanobacteria sense and respond to light?, *Mol Microbiol* (vol. 41), No. 5, pp. 965-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11555279](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11555279)
- [337] Pfanschmidt, T. (2003): Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes, *Trends Plant Sci* (vol. 8), No. 1, pp. 33-41. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12523998](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12523998)
- [338] Hihara, Y.; Kamei, A.; Kanehisa, M.; Kaplan, A. and Ikeuchi, M. (2001): DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light, *Plant Cell* (vol. 13), No. 4, pp. 793-806. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11283337](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11283337)
- [339] Dunlap, P. V. (1999): Quorum regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*, *J Mol Microbiol Biotechnol* (vol. 1), No. 1, pp. 5-12. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10941779](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10941779)
- [340] Wagner, V. E.; Bushnell, D.; Passador, L.; Brooks, A. I. and Iglewski, B. H. (2003): Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment, *J Bacteriol* (vol. 185), No. 7, pp. 2080-95. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12644477](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12644477)
- [341] Arevalo-Ferro, C.; Hentzer, M.; Reil, G.; Gorg, A.; Kjelleberg, S.; Givskov, M.; Riedel, K. and Eberl, L. (2003): Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics, *Environ Microbiol* (vol. 5), No. 12, pp. 1350-69. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14641579](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14641579)
- [342] Kleerebezem, M.; Bongers, R.; Rutten, G.; de Vos, W. M. and Kuipers, O. P. (2004): Autoregulation of subtilin biosynthesis in *Bacillus subtilis*: the role of the spa-box in subtilin-responsive promoters, *Peptides* (vol. 25), No. 9, pp. 1415-24. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15374645](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15374645)
- [343] Zhu, H.; Bilgin, M. and Snyder, M. (2003): Proteomics, *Annu Rev Biochem* (vol. 72), pp. 783-812. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14527327](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14527327)
- [344] Cordwell, S. J. (2004): Exploring and exploiting bacterial proteomes, *Methods Mol Biol* (vol. 266), pp. 115-35. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15148417](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15148417)
- [345] Bradshaw, R. A. and Burlingame, A. L. (2005): From proteins to proteomics, *IUBMB Life* (vol. 57), No. 4-5, pp. 267-72. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16036609](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16036609)
- [346] Arevalo-Ferro, C.; Reil, G.; Gorg, A.; Eberl, L. and Riedel, K. (2005): Biofilm formation of *Pseudomonas putida* IsoF: the role of quorum sensing as assessed by proteomics, *Syst Appl Microbiol* (vol. 28), No. 2, pp. 87-114. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15830802](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15830802)
- [347] Batzilla, C. F.; Rachid, S.; Engelmann, S.; Hecker, M.; Hacker, J. and Ziebuhr, W. (2006): Impact of the accessory gene regulatory system (Agr) on extracellular proteins, *codY* expression and amino acid metabolism in *Staphylococcus epidermidis*, *Proteomics* (vol. 6), No. 12, pp. 3602-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16691552](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16691552)

- [348] Riedel, K.; Arevalo-Ferro, C.; Reil, G.; Gorg, A.; Lottspeich, F. and Eberl, L. (2003): Analysis of the quorum-sensing regulon of the opportunistic pathogen *Burkholderia cepacia* H111 by proteomics, *Electrophoresis* (vol. 24), No. 4, pp. 740-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12601746](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12601746)
- [349] Klose, J. (2002): Proteomanalyse, *BIOspektrum* (vol. 1), pp. 91-94.
- [350] Lutter, P.; Meyer, H. E.; Langer, M.; Witthohn, K.; Dormeyer, W.; Sickmann, A. and Bluggel, M. (2001): Investigation of charge variants of rViscumin by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, *Electrophoresis* (vol. 22), No. 14, pp. 2888-97. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11565784](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11565784)
- [351] Berven, F. S.; Karlsen, O. A.; Murrell, J. C. and Jensen, H. B. (2003): Multiple polypeptide forms observed in two-dimensional gels of *Methylococcus capsulatus* (Bath) polypeptides are generated during the separation procedure, *Electrophoresis* (vol. 24), No. 4, pp. 757-61. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12601748](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12601748)
- [352] Yarwood, J. M.; Volper, E. M. and Greenberg, E. P. (2005): Delays in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled gene expression are conditional, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 102), No. 25, pp. 9008-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15956210](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15956210)
- [353] Keller, L. and Surette, M. G. (2006): Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective, *Nat Rev Microbiol* (vol. 4), No. 4, pp. 249-58. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16501584](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16501584)
- [354] Yan, A.; Huang, X.; Liu, H.; Dong, D.; Zhang, D.; Zhang, X. and Xu, Y. (2007): An rhl-like quorum-sensing system negatively regulates pyoluteorin production in *Pseudomonas* sp. M18, *Microbiology* (vol. 153), No. Pt 1, pp. 16-28. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17185531](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17185531)
- [355] Chen, H.; Teplitski, M.; Robinson, J. B.; Rolfe, B. G. and Bauer, W. D. (2003): Proteomic analysis of wild-type *Sinorhizobium meliloti* responses to N-acyl homoserine lactone quorum-sensing signals and the transition to stationary phase, *J Bacteriol* (vol. 185), No. 17, pp. 5029-36. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12923075](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12923075)
- [356] Horswill, A. R.; Stoodley, P.; Stewart, P. S. and Parsek, M. R. (2007): The effect of the chemical, biological, and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities, *Anal Bioanal Chem* (vol. 387), No. 2, pp. 371-80. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17047948](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17047948)
- [357] Kolter, R. and Greenberg, E. P. (2006): Microbial sciences: the superficial life of microbes, *Nature* (vol. 441), No. 7091, pp. 300-2. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16710410](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16710410)
- [358] Jurgens, U. J.; Martin, C. and Weckesser, J. (1989): Cell wall constituents of *Microcystis* sp. PCC 7806, *FEMS Microbiol Lett* (vol. 53), No. 1-2, pp. 47-51. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2515100](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2515100)
- [359] Plude, J. L.; Parker, D. L.; Schommer, O. J.; Timmerman, R. J.; Hagstrom, S. A.; Joers, J. M. and Hnasko, R. (1991): Chemical Characterization of Polysaccharide from the Slime Layer of the Cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* C3-40, *Appl Environ Microbiol* (vol. 57), No. 6, pp. 1696-1700. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16348506](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16348506)
- [360] Mulikdjanian, A. Y.; Koonin, E. V.; Makarova, K. S.; Mekhedov, S. L.; Sorokin, A.; Wolf, Y. I.; Dufresne, A.; Partensky, F.; Burd, H.; Kaznadzey, D.; Haselkorn, R. and Galperin, M. Y. (2006): The cyanobacterial genome core and the origin of photosynthesis, *Proc Natl Acad Sci*

- U S A (vol. 103), No. 35, pp. 13126-31. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16924101](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16924101)
- [361] Sugita, C.; Ogata, K.; Shikata, M.; Jikuya, H.; Takano, J.; Furumichi, M.; Kanehisa, M.; Omata, T.; Sugiura, M. and Sugita, M. (2007): Complete nucleotide sequence of the freshwater unicellular cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 6301 chromosome: gene content and organization, *Photosynth Res*. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17211581](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17211581)
- [362] Palenik, B.; Brahamsha, B.; Larimer, F. W.; Land, M.; Hauser, L.; Chain, P.; Lamerdin, J.; Regala, W.; Allen, E. E.; McCarren, J.; Paulsen, I.; Dufresne, A.; Partensky, F.; Webb, E. A. and Waterbury, J. (2003): The genome of a motile marine *Synechococcus*, *Nature* (vol. 424), No. 6952, pp. 1037-42. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12917641](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12917641)
- [363] Nakamura, Y.; Kaneko, T.; Sato, S.; Ikeuchi, M.; Katoh, H.; Sasamoto, S.; Watanabe, A.; Iriguchi, M.; Kawashima, K.; Kimura, T.; Kishida, Y.; Kiyokawa, C.; Kohara, M.; Matsumoto, M.; Matsuno, A.; Nakazaki, N.; Shimpo, S.; Sugimoto, M.; Takeuchi, C.; Yamada, M. and Tabata, S. (2002): Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (supplement), *DNA Res* (vol. 9), No. 4, pp. 135-48. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12240836](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12240836)
- [364] Kaneko, T.; Sato, S.; Kotani, H.; Tanaka, A.; Asamizu, E.; Nakamura, Y.; Miyajima, N.; Hirose, M.; Sugiura, M.; Sasamoto, S.; Kimura, T.; Hosouchi, T.; Matsuno, A.; Muraki, A.; Nakazaki, N.; Naruo, K.; Okumura, S.; Shimpo, S.; Takeuchi, C.; Wada, T.; Watanabe, A.; Yamada, M.; Yasuda, M. and Tabata, S. (1996): Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement), *DNA Res* (vol. 3), No. 3, pp. 185-209. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8905238](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8905238)
- [365] Kaneko, T.; Nakamura, Y.; Wolk, C. P.; Kuritz, T.; Sasamoto, S.; Watanabe, A.; Iriguchi, M.; Ishikawa, A.; Kawashima, K.; Kimura, T.; Kishida, Y.; Kohara, M.; Matsumoto, M.; Matsuno, A.; Muraki, A.; Nakazaki, N.; Shimpo, S.; Sugimoto, M.; Takazawa, M.; Yamada, M.; Yasuda, M. and Tabata, S. (2001): Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *DNA Res* (vol. 8), No. 5, pp. 205-13; 227-53. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11759840](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11759840)
- [366] Meeks, J. C.; Elhai, J.; Thiel, T.; Potts, M.; Larimer, F.; Lamerdin, J.; Predki, P. and Atlas, R. (2001): An overview of the genome of *Nostoc punctiforme*, a multicellular, symbiotic cyanobacterium, *Photosynth Res* (vol. 70), No. 1, pp. 85-106. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16228364](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16228364)
- [367] Nakamura, Y.; Kaneko, T.; Sato, S.; Mimuro, M.; Miyashita, H.; Tsuchiya, T.; Sasamoto, S.; Watanabe, A.; Kawashima, K.; Kishida, Y.; Kiyokawa, C.; Kohara, M.; Matsumoto, M.; Matsuno, A.; Nakazaki, N.; Shimpo, S.; Takeuchi, C.; Yamada, M. and Tabata, S. (2003): Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids (supplement), *DNA Res* (vol. 10), No. 4, pp. 181-201. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14621296](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14621296)
- [368] Hunsucker, S. W.; Klage, K.; Slaughter, S. M.; Potts, M. and Helm, R. F. (2004): A preliminary investigation of the *Nostoc punctiforme* proteome, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 317), No. 4, pp. 1121-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15094385](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15094385)

- [369] Simon, W. J.; Hall, J. J.; Suzuki, I.; Murata, N. and Slabas, A. R. (2002): Proteomic study of the soluble proteins from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 using automated matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight peptide mass fingerprinting, *Proteomics* (vol. 2), No. 12, pp. 1735-42. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12469343](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12469343)
- [370] Choi, J. S.; Kim, D. S.; Lee, J.; Kim, S. J.; Kim, S. I.; Kim, Y. H.; Hong, J.; Yoo, J. S.; Suh, K. H. and Park, Y. M. (2000): Proteome analysis of light-induced proteins in *Synechocystis* sp. PCC 6803: identification of proteins separated by 2D-PAGE using N-terminal sequencing and MALDI-TOF MS, *Mol Cells* (vol. 10), No. 6, pp. 705-11. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11211877](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11211877)
- [371] Stotts, R. R.; Namikoshi, M.; Haschek, W. M.; Rinehart, K. L.; Carmichael, W. W.; Dahlem, A. M. and Beasley, V. R. (1993): Structural modifications imparting reduced toxicity in microcystins from *Microcystis* spp, *Toxicon* (vol. 31), No. 6, pp. 783-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8342176](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8342176)
- [372] Stryer, Lubert (1995): *Biochemie* (vol. 4. Auflage), Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- [373] Seyffert, W.; Gassen, H.G.; Hess, O.; Jäckle, H. and Fischbach, K.-F. (1998): *Seyffert - Lehrbuch der Genetik*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- [374] Shi, T.; Bibby, T. S.; Jiang, L.; Irwin, A. J. and Falkowski, P. G. (2005): Protein interactions limit the rate of evolution of photosynthetic genes in cyanobacteria, *Mol Biol Evol* (vol. 22), No. 11, pp. 2179-89. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16014867](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16014867)
- [375] Andaluz, S.; Lopez-Millan, A. F.; De las Rivas, J.; Aro, E. M.; Abadia, J. and Abadia, A. (2006): Proteomic profiles of thylakoid membranes and changes in response to iron deficiency, *Photosynth Res* (vol. 89), No. 2-3, pp. 141-55. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16969715](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16969715)
- [376] Imamura, S.; Asayama, M.; Takahashi, H.; Tanaka, K.; Takahashi, H. and Shirai, M. (2003): Antagonistic dark/light-induced SigB/SigD, group 2 sigma factors, expression through redox potential and their roles in cyanobacteria, *FEBS Lett* (vol. 554), No. 3, pp. 357-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14623094](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14623094)
- [377] Yang, C.; Hua, Q. and Shimizu, K. (2002): Integration of the information from gene expression and metabolic fluxes for the analysis of the regulatory mechanisms in *Synechocystis*, *Appl Microbiol Biotechnol* (vol. 58), No. 6, pp. 813-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12021803](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12021803)
- [378] Figge, R. M.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. and Cerff, R. (2000): The carbon metabolism-controlled *Synechocystis* gap2 gene harbours a conserved enhancer element and a Gram-positive-like -16 promoter box retained in some chloroplast genes, *Mol Microbiol* (vol. 36), No. 1, pp. 44-54. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10760162](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10760162)
- [379] Suzuki, I.; Kanesaki, Y.; Mikami, K.; Kanehisa, M. and Murata, N. (2001): Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis*, *Mol Microbiol* (vol. 40), No. 1, pp. 235-44. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11298290](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11298290)
- [380] Kanesaki, Y.; Suzuki, I.; Allakhverdiev, S. I.; Mikami, K. and Murata, N. (2002): Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 290), No. 1, pp. 339-48. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11779175](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11779175)

- [381] Wang, H. L.; Postier, B. L. and Burnap, R. L. (2004): Alterations in global patterns of gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to inorganic carbon limitation and the inactivation of *ndhR*, a LysR family regulator, *J Biol Chem* (vol. 279), No. 7, pp. 5739-51. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14612435](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14612435)
- [382] Li, H. and Sherman, L. A. (2000): A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803, *J Bacteriol* (vol. 182), No. 15, pp. 4268-77. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10894737](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10894737)
- [383] Singh, A. K.; McIntyre, L. M. and Sherman, L. A. (2003): Microarray analysis of the genome-wide response to iron deficiency and iron reconstitution in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant Physiol* (vol. 132), No. 4, pp. 1825-39. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12913140](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12913140)
- [384] Alfonso, M.; Perewoska, I. and Kirilovsky, D. (2001): Redox control of *ntcA* gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Nitrogen availability and electron transport regulate the levels of the NtcA protein, *Plant Physiol* (vol. 125), No. 2, pp. 969-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11161053](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11161053)
- [385] Alfonso, M.; Perewoska, I. and Kirilovsky, D. (2000): Redox control of *psbA* gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Involvement of the cytochrome b(6)/f complex, *Plant Physiol* (vol. 122), No. 2, pp. 505-16. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10677443](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10677443)
- [386] El Bissati, K. and Kirilovsky, D. (2001): Regulation of *psbA* and *psaE* expression by light quality in *Synechocystis* species PCC 6803. A redox control mechanism, *Plant Physiol* (vol. 125), No. 4, pp. 1988-2000. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11299378](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11299378)
- [387] Hihara, Y.; Sonoike, K.; Kanehisa, M. and Ikeuchi, M. (2003): DNA microarray analysis of redox-responsive genes in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *J Bacteriol* (vol. 185), No. 5, pp. 1719-25. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12591891](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12591891)
- [388] Navarro, F.; Martin-Figueroa, E. and Florencio, F. J. (2000): Electron transport controls transcription of the thioredoxin gene (*trxA*) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant Mol Biol* (vol. 43), No. 1, pp. 23-32. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10949371](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10949371)
- [389] Reyes, J. C. and Florencio, F. J. (1995): Electron transport controls transcription of the glutamine synthetase gene (*glnA*) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant Mol Biol* (vol. 27), No. 4, pp. 789-99. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7727755](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7727755)
- [390] Nakamura, K. and Hihara, Y. (2006): Photon flux density-dependent gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is regulated by a small, redox-responsive, LuxR-type regulator, *J Biol Chem* (vol. 281), No. 48, pp. 36758-66. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17035238](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17035238)
- [391] Mullineaux, C. W. and Emlyn-Jones, D. (2005): State transitions: an example of acclimation to low-light stress, *J Exp Bot* (vol. 56), No. 411, pp. 389-93. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15582926](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15582926)
- [392] Wilson, A.; Ajlani, G.; Verbavatz, J. M.; Vass, I.; Kerfeld, C. A. and Kirilovsky, D. (2006): A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in cyanobacteria, *Plant Cell* (vol. 18), No. 4, pp. 992-1007. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16531492](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16531492)
- [393] Lomax, T. L.; Conley, P. B.; Schilling, J. and Grossman, A. R. (1987): Isolation and characterization of light-regulated phycobilisome linker polypeptide genes and their transcription as a polycistronic mRNA, *J Bacteriol* (vol. 169), No. 6, pp. 2675-84. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3108238](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3108238)
- [394] Glazer, A. N. (1985): Light harvesting by phycobilisomes, *Annu Rev Biophys Biophys Chem* (vol. 14), pp. 47-77. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3924069](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3924069)
- [395] Grossman, A. R.; Schaefer, M. R.; Chiang, G. G. and Collier, J. L. (1993): The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions, *Microbiol Rev* (vol. 57), No. 3, pp. 725-49. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8246846](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8246846)
- [396] Tandeau de Marsac, N. (1977): Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria, *J Bacteriol* (vol. 130), No. 1, pp. 82-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=856789](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=856789)
- [397] Betz, M.; Ruegsegger, U.; Esteban, A. M.; Sidler, W. A. and Zuber, H. (1993): Reconstitution of the core complex (alpha beta)<sub>3</sub>APCLC8.9 of the phycobilisome from *Mastigocladus laminosus* using the Lc8.9 linker polypeptide overexpressed in *Escherichia coli*, *Biol Chem Hoppe Seyler* (vol. 374), No. 7, pp. 435-43. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8216894](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8216894)
- [398] Kerfeld, C. A. (2004): Structure and function of the water-soluble carotenoid-binding proteins of cyanobacteria, *Photosynth Res* (vol. 81), No. 3, pp. 215-25. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16034528](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16034528)
- [399] Jurgens, U. J. and Weckesser, J. (1985): Carotenoid-containing outer membrane of *Synechocystis* sp. strain PCC6714, *J Bacteriol* (vol. 164), No. 1, pp. 384-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3930470](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3930470)
- [400] Ivanov, A. G.; Miskiewicz, E.; Clarke, A. K.; Greenberg, B. M. and Huner, N. P. (2000): Protection of photosystem II against UV-A and UV-B radiation in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*: the role of growth temperature and growth irradiance, *Photochem Photobiol* (vol. 72), No. 6, pp. 772-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11140265](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11140265)
- [401] Ehling-Schulz, M.; Bilger, W. and Scherer, S. (1997): UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*, *J Bacteriol* (vol. 179), No. 6, pp. 1940-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9068639](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9068639)
- [402] Varkonyi, Z.; Masamoto, K.; Debreczeny, M.; Zsiros, O.; Ughy, B.; Gombos, Z.; Domonkos, I.; Farkas, T.; Wada, H. and Szalontai, B. (2002): Low-temperature-induced accumulation of xanthophylls and its structural consequences in the photosynthetic membranes of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*: an FTIR spectroscopic study, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 99), No. 4, pp. 2410-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11842219](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11842219)
- [403] Eloff, J. N.; Steinitz, Y. and Shilo, M. (1976): Photooxidation of cyanobacteria in natural conditions, *Appl Environ Microbiol* (vol. 31), No. 1, pp. 119-26. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=821394](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=821394)

- [404] Paerl, H.W.; Tucker, J. and Bland, P.T. (1983): Carotenoid enhancement and its role in maintaining blue-green algal (*Microcystis aeruginosa*) surface blooms *Limnol Oceanogr* (vol. 28), No. 5, pp. 847-857.
- [405] Kong, W.; Shiota, S.; Shi, Y.; Nakayama, H. and Nakayama, K. (2000): A novel peroxiredoxin of the plant *Sedum lineare* is a homologue of *Escherichia coli* bacterioferritin co-migratory protein (Bcp), *Biochem J* (vol. 351), No. Pt 1, pp. 107-114. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10998352](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10998352)
- [406] Jeong, W.; Cha, M. K. and Kim, I. H. (2000): Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the thiol-specific antioxidant protein (TSA)/Alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family, *J Biol Chem* (vol. 275), No. 4, pp. 2924-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10644761](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10644761)
- [407] Stork, T.; Michel, K. P.; Pistorius, E. K. and Dietz, K. J. (2005): Bioinformatic analysis of the genomes of the cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus elongatus* PCC 7942 for the presence of peroxiredoxins and their transcript regulation under stress, *J Exp Bot* (vol. 56), No. 422, pp. 3193-206. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16284092](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16284092)
- [408] Jacks, T. J.; De Lucca, A. J.; Rajasekaran, K.; Stromberg, K. and van Pee, K. (2000): Antifungal and peroxidative activities of nonheme chloroperoxidase in relation to transgenic plant protection, *J Agric Food Chem* (vol. 48), No. 10, pp. 4561-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11052700](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11052700)
- [409] Florencio, F. J.; Perez-Perez, M. E.; Lopez-Maury, L.; Mata-Cabana, A. and Lindahl, M. (2006): The diversity and complexity of the cyanobacterial thioredoxin systems, *Photosynth Res* (vol. 89), No. 2, pp. 157-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16969714](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16969714)
- [410] Jiang, F.; Mannervik, B. and Bergman, B. (1997): Evidence for redox regulation of the transcription factor NtcA, acting both as an activator and a repressor, in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120, *Biochem J* (vol. 327 ( Pt 2)), pp. 513-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9359424](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9359424)
- [411] Lindahl, M. and Florencio, F. J. (2003): Thioredoxin-linked processes in cyanobacteria are as numerous as in chloroplasts, but targets are different, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 100), No. 26, pp. 16107-12. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14673118](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14673118)
- [412] Perez-Perez, M.E.; Florencio, F.J. and Lindahl, M. (2006): Selecting thioredoxins for disulphide proteomics: target proteomes of three thioredoxins from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Proteomics* (vol. 6), pp. 186-195.
- [413] Poolman, M. G.; Fell, D. A. and Thomas, S. (2000): Modelling photosynthesis and its control, *J Exp Bot* (vol. 51 Spec No), pp. 319-28. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10938839](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10938839)
- [414] Harrison, E. P.; Olcer, H.; Lloyd, J. C.; Long, S. P. and Raines, C. A. (2001): Small decreases in SBPase cause a linear decline in the apparent RuBP regeneration rate, but do not affect Rubisco carboxylation capacity, *J Exp Bot* (vol. 52), No. 362, pp. 1779-84. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11520866](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11520866)
- [415] Perchorowicz, J. T.; Raynes, D. A. and Jensen, R. G. (1981): Light limitation of photosynthesis and activation of ribulose biphosphate carboxylase in wheat seedlings, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 78), No. 5, pp. 2985-2989. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16593018](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16593018)

- [416] Watson, G. M. and Tabita, F. R. (1997): Microbial ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: a molecule for phylogenetic and enzymological investigation, *FEMS Microbiol Lett* (vol. 146), No. 1, pp. 13-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8997702](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8997702)
- [417] Watson, G. M.; Yu, J. P. and Tabita, F. R. (1999): Unusual ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase of anoxic Archaea, *J Bacteriol* (vol. 181), No. 5, pp. 1569-75. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10049390](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10049390)
- [418] Kaplan, A. and Reinhold, L. (1999): CO<sub>2</sub> Concentrating Mechanisms in Photosynthetic Microorganisms, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* (vol. 50), pp. 539-570. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15012219](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15012219)
- [419] Badger, M. R.; Price, G. D.; Long, B. M. and Woodger, F. J. (2006): The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO<sub>2</sub> concentrating mechanism, *J Exp Bot* (vol. 57), No. 2, pp. 249-65. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16216846](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16216846)
- [420] Tchernov, D.; Helman, Y.; Keren, N.; Luz, B.; Ohad, I.; Reinhold, L.; Ogawa, T. and Kaplan, A. (2001): Passive entry of CO<sub>2</sub> and its energy-dependent intracellular conversion to HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in cyanobacteria are driven by a photosystem I-generated delta muH<sup>+</sup>, *J Biol Chem* (vol. 276), No. 26, pp. 23450-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11297562](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11297562)
- [421] Bobik, T. A. (2006): Polyhedral organelles compartmenting bacterial metabolic processes, *Appl Microbiol Biotechnol* (vol. 70), No. 5, pp. 517-25. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16525780](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16525780)
- [422] So, A. K.; Espie, G. S.; Williams, E. B.; Shively, J. M.; Heinhorst, S. and Cannon, G. C. (2004): A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (epsilon class) is a component of the carboxysome shell, *J Bacteriol* (vol. 186), No. 3, pp. 623-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14729686](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14729686)
- [423] Kaplan, A.; Helman, Y.; Tchernov, D. and Reinhold, L. (2001): Acclimation of photosynthetic microorganisms to changing ambient CO<sub>2</sub> concentration, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 98), No. 9, pp. 4817-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11320226](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11320226)
- [424] Badger, M. R. and Price, G. D. (2003): CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution, *J Exp Bot* (vol. 54), No. 383, pp. 609-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12554704](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12554704)
- [425] Tchernov, D.; Hassidim, M.; Luz, B.; Sukenik, A.; Reinhold, L. and Kaplan, A. (1997): Sustained net CO<sub>2</sub> evolution during photosynthesis by marine microorganisms, *Curr Biol* (vol. 7), No. 10, pp. 723-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9368754](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9368754)
- [426] Onizuka, T.; Akiyama, H.; Endo, S.; Kanai, S.; Hirano, M.; Tanaka, S. and Miyasaka, H. (2002): CO<sub>2</sub> response element and corresponding trans-acting factor of the promoter for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes in *Synechococcus* sp. PCC7002 found by an improved electrophoretic mobility shift assay, *Plant Cell Physiol* (vol. 43), No. 6, pp. 660-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12091720](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12091720)
- [427] Onizuka, T.; Endo, S.; Akiyama, H.; Kanai, S.; Hirano, M.; Yokota, A.; Tanaka, S. and Miyasaka, H. (2004): The *rbcX* gene product promotes the production and assembly of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase of *Synechococcus* sp. PCC7002 in

- Escherichia coli, Plant Cell Physiol (vol. 45), No. 10, pp. 1390-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15564522](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15564522)
- [428] Spreitzer, R. J. (2003): Role of the small subunit in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Arch Biochem Biophys (vol. 414), No. 2, pp. 141-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12781765](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12781765)
- [429] Kerfeld, C. A.; Sawaya, M. R.; Tanaka, S.; Nguyen, C. V.; Phillips, M.; Beeby, M. and Yeates, T. O. (2005): Protein structures forming the shell of primitive bacterial organelles, Science (vol. 309), No. 5736, pp. 936-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16081736](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16081736)
- [430] Cannon, G. C.; Bradburne, C. E.; Aldrich, H. C.; Baker, S. H.; Heinhorst, S. and Shively, J. M. (2001): Microcompartments in prokaryotes: carboxysomes and related polyhedra, Appl Environ Microbiol (vol. 67), No. 12, pp. 5351-61. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11722879](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11722879)
- [431] Harano, K.; Ishida, H.; Kittaka, R.; Kojima, K.; Inoue, N.; Tsukamoto, M.; Satoh, R.; Himeno, M.; Iwaki, T. and Wadano, A. (2003): Regulation of the expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (EC 4.1.1.39) in a cyanobacterium, Synechococcus PCC7942, Photosynth Res (vol. 78), No. 1, pp. 59-65. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16245064](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16245064)
- [432] Ramasubramanian, T. S.; Wei, T. F. and Golden, J. W. (1994): Two Anabaena sp. strain PCC 7120 DNA-binding factors interact with vegetative cell- and heterocyst-specific genes, J Bacteriol (vol. 176), No. 5, pp. 1214-23. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8113160](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8113160)
- [433] Yosef, I.; Irihimovitch, V.; Knopf, J. A.; Cohen, I.; Orr-Dahan, I.; Nahum, E.; Keasar, C. and Shapira, M. (2004): RNA binding activity of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit from Chlamydomonas reinhardtii, J Biol Chem (vol. 279), No. 11, pp. 10148-56. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14679208](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14679208)
- [434] Irihimovitch, V. and Shapira, M. (2000): Glutathione redox potential modulated by reactive oxygen species regulates translation of Rubisco large subunit in the chloroplast, J Biol Chem (vol. 275), No. 21, pp. 16289-95. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10821870](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10821870)
- [435] Cohen, I.; Knopf, J. A.; Irihimovitch, V. and Shapira, M. (2005): A proposed mechanism for the inhibitory effects of oxidative stress on Rubisco assembly and its subunit expression, Plant Physiol (vol. 137), No. 2, pp. 738-46. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15681660](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15681660)
- [436] Cohen, I.; Sapir, Y. and Shapira, M. (2006): A conserved mechanism controls translation of Rubisco large subunit in different photosynthetic organisms, Plant Physiol (vol. 141), No. 3, pp. 1089-97. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16731581](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16731581)
- [437] Houtz, R. L. and Portis, A. R., Jr. (2003): The life of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase--posttranslational facts and mysteries, Arch Biochem Biophys (vol. 414), No. 2, pp. 150-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12781766](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12781766)
- [438] Marin-Navarro, J. and Moreno, J. (2003): Modification of the proteolytic fragmentation pattern upon oxidation of cysteines from ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Biochemistry (vol. 42), No. 50, pp. 14930-8. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14674769](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14674769)
- [439] Moreno, J. and Spreitzer, R. J. (1999): C172S substitution in the chloroplast-encoded large subunit affects stability and stress-induced turnover of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, *J Biol Chem* (vol. 274), No. 38, pp. 26789-93. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10480884](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10480884)
- [440] Kobayashi, D.; Tamoi, M.; Iwaki, T.; Shigeoka, S. and Wadano, A. (2003): Molecular characterization and redox regulation of phosphoribulokinase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Plant Cell Physiol* (vol. 44), No. 3, pp. 269-76. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12668773](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12668773)
- [441] Tamoi, M.; Ishikawa, T.; Takeda, T. and Shigeoka, S. (1996): Molecular characterization and resistance to hydrogen peroxide of two fructose-1,6-bisphosphatases from *Synechococcus* PCC 7942, *Arch Biochem Biophys* (vol. 334), No. 1, pp. 27-36. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8837735](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8837735)
- [442] Tamoi, M.; Ishikawa, T.; Takeda, T. and Shigeoka, S. (1996): Enzymic and molecular characterization of NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Synechococcus* PCC 7942: resistance of the enzyme to hydrogen peroxide, *Biochem J* (vol. 316 ( Pt 2)), pp. 685-90. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8687418](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8687418)
- [443] Graciet, E.; Lebreton, S. and Gontero, B. (2004): Emergence of new regulatory mechanisms in the Benson-Calvin pathway via protein-protein interactions: a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/CP12/phosphoribulokinase complex, *J Exp Bot* (vol. 55), No. 400, pp. 1245-54. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15047759](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15047759)
- [444] Wedel, N. and Soll, J. (1998): Evolutionary conserved light regulation of Calvin cycle activity by NADPH-mediated reversible phosphoribulokinase/CP12/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complex dissociation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 95), No. 16, pp. 9699-704. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9689144](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9689144)
- [445] Pohlmeier, K.; Paap, B. K.; Soll, J. and Wedel, N. (1996): CP12: a small nuclear-encoded chloroplast protein provides novel insights into higher-plant GAPDH evolution, *Plant Mol Biol* (vol. 32), No. 5, pp. 969-78. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8980547](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8980547)
- [446] Trost, P.; Fermani, S.; Marri, L.; Zaffagnini, M.; Falini, G.; Scagliarini, S.; Pupillo, P. and Sparla, F. (2006): Thioredoxin-dependent regulation of photosynthetic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: autonomous vs. CP12-dependent mechanisms, *Photosynth Res* (vol. 89), No. 3, pp. 1-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17031544](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17031544)
- [447] Koksharova, O.; Schubert, M.; Shestakov, S. and Cerff, R. (1998): Genetic and biochemical evidence for distinct key functions of two highly divergent GAPDH genes in catabolic and anabolic carbon flow of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant Mol Biol* (vol. 36), No. 1, pp. 183-94. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9484473](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9484473)
- [448] Trost, P.; Fermani, S.; Marri, L.; Zaffagnini, M.; Falini, G.; Scagliarini, S.; Pupillo, P. and Sparla, F. (2006): Thioredoxin-dependent regulation of photosynthetic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: autonomous vs. CP12-dependent mechanisms, *Photosynth Res* (vol. 89), No. 2-3, pp. 263-75. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17031544](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17031544)

- [449] Graciet, E.; Gans, P.; Wedel, N.; Lebreton, S.; Camadro, J.M. and and Gontero, B. (2003): The Small Protein CP12: A Protein Linker for Supramolecular Complex Assembly, *Biochemistry* (vol. 42), pp. 8163-8170.
- [450] Bobst, C.E. and and Tabita, F.R. (2004): The role of cysteine 160 in thiamine diphosphate binding of the Calvin-Benson-Bassham cycle transketolase of *Rhodobacter sphaeroides*, *Arch Biochem Biophys* (vol. 426), pp. 43-54.
- [451] Tabei, Y.; Okada, K. and Tsuzuki, M. (2007): Sll1330 controls the expression of glycolytic genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 355), No. 4, pp. 1045-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17331473](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17331473)
- [452] Garcia-Dominguez, M. and Florencio, F. J. (1997): Nitrogen availability and electron transport control the expression of *glnB* gene (encoding PII protein) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant Mol Biol* (vol. 35), No. 6, pp. 723-34. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9426594](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9426594)
- [453] Masepohl, B.; Scholisch, K.; Gorlitz, K.; Kutzki, C. and Bohme, H. (1997): The heterocyst-specific *fdxH* gene product of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 is important but not essential for nitrogen fixation, *Mol Gen Genet* (vol. 253), No. 6, pp. 770-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9079890](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9079890)
- [454] Schmitz, O.; Boison, G.; Hilscher, R.; Hundeshagen, B.; Zimmer, W.; Lottspeich, F. and Bothe, H. (1995): Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria, *Eur J Biochem* (vol. 233), No. 1, pp. 266-76. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7588754](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7588754)
- [455] Sharon, N. (1987): Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease, *FEBS Lett* (vol. 217), No. 2, pp. 145-57. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2885220](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2885220)
- [456] Loris, R.; Tielker, D.; Jaeger, K. E. and Wyns, L. (2003): Structural basis of carbohydrate recognition by the lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*, *J Mol Biol* (vol. 331), No. 4, pp. 861-70. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12909014](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12909014)
- [457] Imberty, A.; wimmerova, M.; Mitchell, E. P. and Gilboa-Garber, N. (2004): Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insight into the molecular basis for host glycan recognition, *Microbes Infect* (vol. 6), No. 2, pp. 221-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15049333](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15049333)
- [458] Gray, K. M.; Pearson, J. P.; Downie, J. A.; Boboye, B. E. and Greenberg, E. P. (1996): Cell-to-cell signaling in the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium leguminosarum*: autoinduction of a stationary phase and rhizosphere-expressed genes, *J Bacteriol* (vol. 178), No. 2, pp. 372-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8550455](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8550455)
- [459] Rodelas, B.; Lithgow, J. K.; Wisniewski-Dye, F.; Hardman, A.; Wilkinson, A.; Economou, A.; Williams, P. and Downie, J. A. (1999): Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (*rhi*) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *J Bacteriol* (vol. 181), No. 12, pp. 3816-23. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10368158](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10368158)
- [460] Miller, M. B. and Bassler, B. L. (2001): Quorum sensing in bacteria, *Annu Rev Microbiol* (vol. 55), pp. 165-99. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11544353](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11544353)
- [461] Lyra, C.; Halme, T.; Torsti, A. M.; Tenkanen, T. and Sivonen, K. (2000): Site-specific restriction endonucleases in cyanobacteria, *J Appl Microbiol* (vol. 89), No. 6, pp. 979-91. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11123471](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11123471)
- [462] Pugsley, A. P. (1993): The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria, *Microbiol Rev* (vol. 57), No. 1, pp. 50-108. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8096622](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8096622)
- [463] Emanuelsson, O. (2002): Predicting protein subcellular localisation from amino acid sequence information, *Brief Bioinform* (vol. 3), No. 4, pp. 361-76. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12511065](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12511065)
- [464] Kumamoto, C. A. and Gannon, P. M. (1988): Effects of *Escherichia coli* secB mutations on pre-maltose binding protein conformation and export kinetics, *J Biol Chem* (vol. 263), No. 23, pp. 11554-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3042772](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3042772)
- [465] Fekkes, P.; den Blaauwen, T. and Driessen, A. J. (1995): Diffusion-limited interaction between unfolded polypeptides and the *Escherichia coli* chaperone SecB, *Biochemistry* (vol. 34), No. 31, pp. 10078-85. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7543278](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7543278)
- [466] Randall, L. L. and Hardy, S. J. (1995): High selectivity with low specificity: how SecB has solved the paradox of chaperone binding, *Trends Biochem Sci* (vol. 20), No. 2, pp. 65-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7701564](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7701564)
- [467] Lecker, S. H.; Driessen, A. J. and Wickner, W. (1990): ProOmpA contains secondary and tertiary structure prior to translocation and is shielded from aggregation by association with SecB protein, *Embo J* (vol. 9), No. 7, pp. 2309-14. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2192862](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2192862)
- [468] Driessen, A. J.; Fekkes, P. and van der Wolk, J. P. (1998): The Sec system, *Curr Opin Microbiol* (vol. 1), No. 2, pp. 216-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10066476](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10066476)
- [469] den Blaauwen, T. and Driessen, A. J. (1996): Sec-dependent preprotein translocation in bacteria, *Arch Microbiol* (vol. 165), No. 1, pp. 1-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8639021](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8639021)
- [470] Reinhold, B. B.; Hauer, C. R.; Plummer, T. H. and Reinhold, V. N. (1995): Detailed structural analysis of a novel, specific O-linked glycan from the prokaryote *Flavobacterium meningosepticum*, *J Biol Chem* (vol. 270), No. 22, pp. 13197-203. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7768917](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7768917)
- [471] Greis, K. D.; Hayes, B. K.; Comer, F. I.; Kirk, M.; Barnes, S.; Lowary, T. L. and Hart, G. W. (1996): Selective detection and site-analysis of O-GlcNAc-modified glycopeptides by beta-elimination and tandem electrospray mass spectrometry, *Anal Biochem* (vol. 234), No. 1, pp. 38-49. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8742080](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8742080)
- [472] Power, P. M. and Jennings, M. P. (2003): The genetics of glycosylation in Gram-negative bacteria, *FEMS Microbiol Lett* (vol. 218), No. 2, pp. 211-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12586395](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12586395)
- [473] Hart, G. W.; Haltiwanger, R. S.; Holt, G. D. and Kelly, W. G. (1989): Nucleoplasmic and cytoplasmic glycoproteins, *Ciba Found Symp* (vol. 145), pp. 102-12, discussion 112-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2507249](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2507249)

- [474] Messner, P.; Allmaier, G.; Schaffer, C.; Wugeditsch, T.; Lortal, S.; Konig, H.; Niemetz, R. and Dorner, M. (1997): Biochemistry of S-layers, FEMS Microbiol Rev (vol. 20), No. 1-2, pp. 25-46. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9276927](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9276927)
- [475] Upreti, R. K.; Kumar, M. and Shankar, V. (2003): Bacterial glycoproteins: functions, biosynthesis and applications, Proteomics (vol. 3), No. 4, pp. 363-79. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12687605](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12687605)
- [476] Hoiczky, E. and Baumeister, W. (1997): Oscillin, an extracellular, Ca<sup>2+</sup>-binding glycoprotein essential for the gliding motility of cyanobacteria, Mol Microbiol (vol. 26), No. 4, pp. 699-708. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9427400](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9427400)
- [477] Brahmsha, B. (1996): An abundant cell-surface polypeptide is required for swimming by the nonflagellated marine cyanobacterium Synechococcus, Proc Natl Acad Sci U S A (vol. 93), No. 13, pp. 6504-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8692845](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8692845)
- [478] Takeuchi, K.; Taguchi, F.; Inagaki, Y.; Toyoda, K.; Shiraishi, T. and Ichinose, Y. (2003): Flagellin glycosylation island in Pseudomonas syringae pv. glycinea and its role in host specificity, J Bacteriol (vol. 185), No. 22, pp. 6658-65. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14594840](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14594840)
- [479] Doig, P.; Kinsella, N.; Guerry, P. and Trust, T. J. (1996): Characterization of a post-translational modification of Campylobacter flagellin: identification of a sero-specific glycosyl moiety, Mol Microbiol (vol. 19), No. 2, pp. 379-87. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8825782](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8825782)
- [480] Castric, P. (1995): pilO, a gene required for glycosylation of Pseudomonas aeruginosa 1244 pilin, Microbiology (vol. 141 ( Pt 5)), pp. 1247-54. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7773418](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7773418)
- [481] Takahashi, Y.; Konishi, K.; Cisar, J. O. and Yoshikawa, M. (2002): Identification and characterization of hsa, the gene encoding the sialic acid-binding adhesin of Streptococcus gordonii DL1, Infect Immun (vol. 70), No. 3, pp. 1209-18. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11854202](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11854202)
- [482] Chen, Q.; Wu, H. and Fives-Taylor, P. M. (2004): Investigating the role of secA2 in secretion and glycosylation of a fimbrial adhesin in Streptococcus parasanguis FW213, Mol Microbiol (vol. 53), No. 3, pp. 843-56. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15255897](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15255897)
- [483] Siboo, I. R.; Chambers, H. F. and Sullam, P. M. (2005): Role of SraP, a Serine-Rich Surface Protein of Staphylococcus aureus, in binding to human platelets, Infect Immun (vol. 73), No. 4, pp. 2273-80. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15784571](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15784571)
- [484] Plummer, C.; Wu, H.; Kerrigan, S. W.; Meade, G.; Cox, D. and Ian Douglas, C. W. (2005): A serine-rich glycoprotein of Streptococcus sanguis mediates adhesion to platelets via GPIb, Br J Haematol (vol. 129), No. 1, pp. 101-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15801962](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15801962)
- [485] Grass, S.; Buscher, A. Z.; Swords, W. E.; Apicella, M. A.; Barenkamp, S. J.; Ozchlewski, N. and St Geme, J. W., 3rd (2003): The Haemophilus influenzae HMW1 adhesin is glycosylated in a process that requires HMW1C and phosphoglucomutase, an enzyme involved in lipooligosaccharide biosynthesis, Mol Microbiol (vol. 48), No. 3, pp. 737-51. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12694618](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12694618)
- [486] Moormann, C.; Benz, I. and Schmidt, M. A. (2002): Functional substitution of the TibC protein of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains for the autotransporter adhesin heptosyltransferase of the AIDA system, *Infect Immun* (vol. 70), No. 5, pp. 2264-70. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11953358](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11953358)
- [487] Sherlock, O.; Dobrindt, U.; Jensen, J. B.; Munk Vejborg, R. and Klemm, P. (2006): Glycosylation of the self-recognizing *Escherichia coli* Ag43 autotransporter protein, *J Bacteriol* (vol. 188), No. 5, pp. 1798-807. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16484190](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16484190)
- [488] VanderVen, B. C.; Harder, J. D.; Crick, D. C. and Belisle, J. T. (2005): Export-mediated assembly of mycobacterial glycoproteins parallels eukaryotic pathways, *Science* (vol. 309), No. 5736, pp. 941-3. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16081738](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16081738)
- [489] Bensing, B. A.; Gibson, B. W. and Sullam, P. M. (2004): The *Streptococcus gordonii* platelet binding protein GspB undergoes glycosylation independently of export, *J Bacteriol* (vol. 186), No. 3, pp. 638-45. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14729688](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14729688)
- [490] Takamatsu, D.; Bensing, B. A. and Sullam, P. M. (2004): Four proteins encoded in the *gspB-secY2A2* operon of *Streptococcus gordonii* mediate the intracellular glycosylation of the platelet-binding protein GspB, *J Bacteriol* (vol. 186), No. 21, pp. 7100-11. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15489421](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15489421)
- [491] Curtis, M. A.; Thickett, A.; Slaney, J. M.; Rangarajan, M.; Aduse-Opoku, J.; Shepherd, P.; Paramonov, N. and Hounsell, E. F. (1999): Variable carbohydrate modifications to the catalytic chains of the RgpA and RgpB proteases of *Porphyromonas gingivalis* W50, *Infect Immun* (vol. 67), No. 8, pp. 3816-23. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10417143](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10417143)
- [492] Benz, I. and Schmidt, M. A. (2001): Glycosylation with heptose residues mediated by the *aah* gene product is essential for adherence of the AIDA-I adhesin, *Mol Microbiol* (vol. 40), No. 6, pp. 1403-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11442838](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11442838)
- [493] Torres, C. R. and Hart, G. W. (1984): Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc, *J Biol Chem* (vol. 259), No. 5, pp. 3308-17. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6421821](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6421821)
- [494] Love, D. C. and Hanover, J. A. (2005): The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code", *Sci STKE* (vol. 2005), No. 312, p. re13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16317114](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16317114)
- [495] Swain, S. M.; Tseng, T. S.; Thornton, T. M.; Gopalraj, M. and Olszewski, N. E. (2002): SPINDLY is a nuclear-localized repressor of gibberellin signal transduction expressed throughout the plant, *Plant Physiol* (vol. 129), No. 2, pp. 605-15. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12068105](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12068105)
- [496] Tseng, T. S.; Swain, S. M. and Olszewski, N. E. (2001): Ectopic expression of the tetratricopeptide repeat domain of SPINDLY causes defects in gibberellin response, *Plant Physiol* (vol. 126), No. 3, pp. 1250-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11457975](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11457975)

- [497] Grass, S. and St Geme, J. W., 3rd (2000): Maturation and secretion of the non-typable *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin: roles of the N-terminal and C-terminal domains, *Mol Microbiol* (vol. 36), No. 1, pp. 55-67. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10760163](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10760163)
- [498] Bakaletz, L. O. and Barenkamp, S. J. (1994): Localization of high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* by immunoelectron microscopy, *Infect Immun* (vol. 62), No. 10, pp. 4460-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7927710](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7927710)
- [499] Barenkamp, S. J. and Leininger, E. (1992): Cloning, expression, and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*, *Infect Immun* (vol. 60), No. 4, pp. 1302-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1548058](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1548058)
- [500] St Geme, J. W. and and Grass, S. (1998): Secretion of the *Haemophilus influenzae* HMW1 and HMW2 adhesins involves a periplasmic intermediate and requires the HMWB and HMWC proteins, *Mol Microbiol* (vol. 27), No. 3, pp. 617-630.
- [501] Barenkamp, S. J. and St Geme, J. W., 3rd (1994): Genes encoding high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* are part of gene clusters, *Infect Immun* (vol. 62), No. 8, pp. 3320-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8039903](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8039903)
- [502] St Geme, J. W., 3rd (1994): The HMW1 adhesin of nontypeable *Haemophilus influenzae* recognizes sialylated glycoprotein receptors on cultured human epithelial cells, *Infect Immun* (vol. 62), No. 9, pp. 3881-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8063405](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8063405)
- [503] Noel, G. J.; Love, D. C. and Mosser, D. M. (1994): High-molecular-weight proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* mediate bacterial adhesion to cellular proteoglycans, *Infect Immun* (vol. 62), No. 9, pp. 4028-33. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8063423](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8063423)
- [504] Dawid, S.; Grass, S. and St Geme, J. W., 3rd (2001): Mapping of binding domains of nontypeable *Haemophilus influenzae* HMW1 and HMW2 adhesins, *Infect Immun* (vol. 69), No. 1, pp. 307-14. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11119519](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11119519)
- [505] Brandley, B. K. and Schnaar, R. L. (1986): Cell-surface carbohydrates in cell recognition and response, *J Leukoc Biol* (vol. 40), No. 1, pp. 97-111. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3011937](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3011937)
- [506] Diggle, S. P.; Cornelis, P.; Williams, P. and Camara, M. (2006): 4-quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives, *Int J Med Microbiol* (vol. 296), No. 2-3, pp. 83-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16483840](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16483840)
- [507] Winzer, K.; Falconer, C.; Garber, N. C.; Diggle, S. P.; Camara, M. and Williams, P. (2000): The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS, *J Bacteriol* (vol. 182), No. 22, pp. 6401-11. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11053384](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11053384)
- [508] Nakimbugwe, D.; Masschalck, B.; Deckers, D.; Callewaert, L.; Aertsen, A. and Michiels, C. W. (2006): Cell wall substrate specificity of six different lysozymes and lysozyme inhibitory activity of bacterial extracts, *FEMS Microbiol Lett* (vol. 259), No. 1, pp. 41-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16684100](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16684100)

- [509] Villareal, T. A. and Carpenter, E. J. (2003): Buoyancy regulation and the potential for vertical migration in the oceanic cyanobacterium *trichodesmium*, *Microb Ecol* (vol. 45), No. 1, pp. 1-10. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12481233](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12481233)
- [510] Thomas, R.H. and Walsby, A.E. (1985): Buoyancy regulation in a strain of *Microcystis*, *Journal of General Microbiology* (vol. 131), pp. 799-809.
- [511] Tortell, P.D. (2000): Evolutionary and ecological perspectives on carbon acquisition in phytoplankton, *Limnol Oceanogr* (vol. 45), No. 3, pp. 744-750.
- [512] Paul, J. H.; Kang, J. B. and Tabita, F. R. (2000): Diel Patterns of Regulation of *rbcL* Transcription in a Cyanobacterium and a Pymnesiophyte, *Mar Biotechnol* (NY) (vol. 2), No. 5, pp. 429-436. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11246409](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11246409)
- [513] Paerl, H. W. (1983): Partitioning of CO<sub>2</sub> Fixation in the Colonial Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*: Mechanism Promoting Formation of Surface Scums, *Appl Environ Microbiol* (vol. 46), No. 1, pp. 252-259. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16346344](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16346344)
- [514] Jenke-Kodama, H.; Sandmann, A.; Muller, R. and Dittmann, E. (2005): Evolutionary implications of bacterial polyketide synthases, *Mol Biol Evol* (vol. 22), No. 10, pp. 2027-39. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15958783](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15958783)
- [515] Petzoldt, A. (2005): Function and Effects of the Cyanotoxin Microcystin in *Planktothrix agardhii*, Diploma thesis, Institut für Biologie/ Molekulare Ökologie, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- [516] Kromkamp, J.C. and Mur, L.R. (1984): Buoyant density changes in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* due to changes in the cellular carbohydrate content, *FEMS Microbiology Letters* (vol. 25), pp. 105-109.
- [517] Walsby, A. E. (1972): Structure and function of gas vacuoles, *Bacteriol Rev* (vol. 36), No. 1, pp. 1-32. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4337701](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4337701)
- [518] Robarts, R.D. and Zohary, T. (1987): Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* (vol. 21), pp. 391-399.
- [519] Reynolds, C. S.; Oliver, R.L. and Walsby, A.E. (1987): Cyanobacterial dominance: the role of buoyancy regulation in dynamic lake environments, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* (vol. 21), pp. 379-390.
- [520] Codd, G. A. (1988): Carboxysomes and ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase, *Adv Microb Physiol* (vol. 29), pp. 115-64. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2837891](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2837891)

## Abkürzungsverzeichnis

Zur Abkürzung der Aminosäuren wurde sowohl der Einbuchstabencode als auch der Dreibuchstabencode verwendet. Die chemischen Elemente wurden durch die jeweiligen Symbole abgekürzt.

∅	durchschnittlich
Σ	Summenzeichen
(d)NTP	(Desoxy-)Nukleosintriphosphate: (d)ATP, (d)CTP, (d)GTP, (d)TTP, (Adenosin~, Cytosin~, Guanosin~, Thymin~)
2D	Zweidimensionale Gelelektrophorese
A.	<i>Anabaena</i>
Abb.	Abbildung
ACP	Acyl-Carrier-Protein
Adda	(2S, 3S, 8S, 9S)-3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-diensäure
ADP	Adenosindiphosphat
AhcY	Adenosylhomocysteinase
AHL	Acylhomoserinlacton
Ahp	Wasserstoffperoxid-Reduktase
AI-2	Autoinducer 2
AK	Antikörper
AlkPhos	Detektion über einen mit Alkalischer Phosphatase gekoppelten sekundären Antikörper
A <sub>o</sub>	Oberfläche
apc	Allophycocyanin-Gene
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
Atp	ATP-Synthase

---

BCP	Bacterioferritin-komigrierendes Protein
Bis-Tris	Bis-(2-Hydroxyethyl)-imino-tris(hydroxymethyl)-methan
BN-PAGE	Blau-Native-Polyacrylamidgelelektrophorese
bp	Basenpaare
BS	Biosynthese
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
cbb	Gene des Calvin-Benson-Bassham-Zyklus
CBS	benannt nach der Cystathionin-Beta-Synthase, in welchem die Domäne erstmalig entdeckt worden ist
CCM, ccm	carbon concentrating mechanism
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylamino]-propansulfat
Chl	Chlorophyll
chl	Chlorophyll-Biosynthesegene
C <sub>i</sub>	inorganischer Kohlenstoff
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
CoA	Coenzym A
CP12	Chloroplast protein
Cpc	Phycocyanin-Gene
CYA	Cyanobakterienstämme aus der NIVA-Kollektion (Norwegian Institute for Water Research)
CysK	Cystein-Synthase
Da	Dalton
DFG	Deutsche Forschungsgesellschaft
DH	Dehydrogenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	2,2'-Dinitro-5,5'-dithio-dibenzoessäure
DTT	Dithiothreitol

<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ef-Tu	Elongationsfaktor Ef-Tu
EU	Europäische Union
FabG2	$\beta$ -Ketoacyl-[ACP]-Reduktase
FbaA	Fructose-bisphosphat-Aldolase
FBP/ SBP	Fructose-1,6-bisphosphatase/ Seduheptulose-1,7-bisphosphatase
FITC	Fluoreszein-5-isothiocyanat
FtsZ	Zellteilungprotein (filamentous temperature sensitive)
g	Erdbeschleunigung
GAPDH, gap	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC-Gehalt	Gehalt der Sequenz an den Basen Guanosin und Cytosin
GDP	Guanosindiphosphat
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GlgC	ADP-Glucose-Pyrophosphorylase
GlnA	Glutaminsynthetase (Gln – Glutamin)
glpX/fbpI	Fructose-1,6-bisphosphatase/ Seduheptulose-1,7-bisphosphatase
Gor	Glutathion-Reduktase
groESL	Chaperone (Hitzeschockproteine)
GSH	reduzierte Form des Glutathions
GSSG	oxidierte Form des Glutathions
GVP, gvp	Gasvesikelproteine
Hem	Gene für die Hem-Biosynthese
HMW	high molecular weight protein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i.p.	intraperitoneal
IEF	Isoelektrische Fokussierung

---

IlvC	Ketol-acid-reducto-Isomerase
IPF	Individual Protein File
IPG	pH-Gradientengele zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Isoelektrischen Punkt
ITS	Internal Transcribed Spacer
kat	katalytisch
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
LB	Luria Broth
Lyt	Lytisches Enzym
<i>M.</i>	<i>Microcystis</i>
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight
MC	Microcystin
$M_r$	Molekulargewicht
Mrp	microcystin related protein
MVN, mvn	Microvirin
MWCO	Molecular weight cut-off
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NIES	National Institute for Environmental Science, Tsukuba, Japan
NRP	Nicht-ribosomales Peptid
NRPS	Nicht-ribosomale Peptidsynthetase
NtcA	Globaler Stickstoffregulator ( <u>N</u> itrogen <u>C</u> ontrol transcription factor)
OCP, ocp	Orange Carotenoid binding Protein
OD	Optische Dichte, gemessen bei der als Suffix angefügten Wellenlänge
O-GlcNAc	N-Acetylglucosamin (über eine O-glucosidische Bindung verknüpft)
OGT	N-Acetylglucosamintransferase (O-glucosidische Bindung)

---

ORF	Offener Leserahmen (Open Reading Frame)
<i>P.</i>	<i>Planktothrix</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phycobilisomen
PC	Phycocyanin
PCC	Pasteur Culture Collection
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PEPCY	<u>Peptides in Cyanobacteria</u>
PeroxBio	Detektion über einen mit Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper
pgi	Glucose-6-phosphat-Isomerase
Pgk	Phosphoglycerat-Kinase
<i>pI</i>	Isoelektrischer Punkt
$P_i$	Pyrophosphat
PKS	Polyketidsynthase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Proteinphosphatasen
PP-Weg	Oxidativer Pentose-Phosphat-Weg
PRK, prk	Phosphoribulokinase
Prx	Peroxiredoxin
PS	Photosystem
PSD	Post-source decay
QS	Quorum Sensing
Q-TOF	Quadrupole – time of flight
RbcL	große Untereinheit der RubisCO
RbcS	kleine Untereinheit der RubisCO
rDNA	ribosomale DNA

---

RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reversed Phase (HPLC-Säule)
RPA	RNase Protection Assay
rpl	Gene für 50S ribosomale Proteine
rpm	Rotationen pro Minute
rps	Gene für 30S ribosomale Proteine
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RubisCO	<u>R</u> ib <u>u</u> lose-1,5- <u>b</u> isphosphat- <u>C</u> arboxylase/ <u>O</u> xxygenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Proteins of the General <u>S</u> ecretory Pathway
Sig	Sigmafaktor
Slp	Spindly-like Proteins
SodB	Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Tetrafluoressigsäure
Thl	Acetoacetyl-CoA-Thiolase
Tkt	Transketolase
Tm	Schmelztemperatur des Primers (Melting Temperature)
TPR	Tetratricopeptide Repeat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan
Trx	Thioredoxin
Tsa	Thiol-spezifisches Antioxidans
Tween-20	Polyaethylenglycolsorbitanmonolaurat
UDP	Uridindiphosphat
UE	Untereinheit

---

UV	Ultraviolettes Licht
var	variable
vs.	<i>versus</i>
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
w/w	weight per weight
Wdhlg.	Wiederholungen
WHO	World Health Organization
Wt	Wildtyp

## Anhang

### Anhang A: Spotidentifizierung der aktuellen 2D-Studie

Dargestellt ist die Liste der per MALDI-TOF *peptide mass fingerprint* eindeutig identifizierten Spots unter Zuordnung ihrer Rolle zu bestimmten Stoffwechselwegen (entsprechend farbig unterlegt). Die Tabelle wurde durch Angaben zum *pI* und zum Molekulargewicht *M<sub>r</sub>*, der Proteine sowie der Identitätskriterien (*score*, *coverage*, *match*) ergänzt. Besonderheiten wurden entsprechend kommentiert.

IPF <sup>14</sup>	Gen	Identität	Spezieshomolog	Proteinfamilie/ Aktivität	Bedeutung/ Stoffwechselweg <sup>15</sup>	<i>pI</i>	<i>M<sub>r</sub></i> , kDa	Score	Cov.	Match	Kommentar
2058.1	CysK	Cystein-Synthase K/M/ Cystein-Synthase A	<i>Crocospaera watsonii</i>	Serin-Familie	Biosynthese/ Aminosäuren/ Serin Familie/ Schwefel Assimilation Cystein-Biosynthese (L- Cystein aus L-Serin)	5,23	34,3	125	41	9	
3940.1	IlvC	Ketol-acid-reducto- Isomerase	<i>Anabaena</i> spp.	Ketol-acid-reducto- Isomerase-Familie	Biosynthese/ Aminosäuren/ Verzweigte Ketten-Familie L-Isoleucin-Biosynthese (L- Isoleucin aus 2- Oxobutanoat: Schritt 2) L-Valin-Biosynthese ( L- Valin aus Pyruvat: Schritt 2)	5,43	36	188	45	13	
3724.1	Gor	Glutathion-Reduktase	<i>Crocospaera watsonii</i>	Klasse-I Pyridin-Nukleotid- disulfid- Oxidoreduktase- Familie	Biosynthese/ Cofaktoren & Carrier/ Glutathion- Metabolismus	5,9	49,2	79	19	9	
1077.1	HemE	Uroporphyrinogen- Decarboxylase	<i>Synechocystis spp.</i>	Uroporphyrinogen- Decarboxylase-Familie	Biosynthese/ Cofaktoren & Carrier/ Porphyrin	5,78	39,2	144/ 109	36/ 29	10/ 9	abgesichert durch Wdhlg. <sup>16</sup>
2161.1	TrxA	Thioredoxin	<i>Anabaena</i> spp.		Biosynthese/ Cofaktoren & Carrier/ Porphyrin	4,9	12,2	108	60	6	
3006.1	AhcY	Adenosylhomocysteinase	<i>Synechocystis spp.</i>	Adenosylhomocysteinase- Familie	Energie-Metabolismus/ Aminosäuren & Amine Aktivierter Methyl-Zyklus	5,44 (exp. 5,2; 5,4)	46	168/ 157 143/ 215	34/ 38 31/ 40	13/ 15 10/ 16	p/Isoformen (2), abgesichert durch Wdhlg.
2454.1	Pgk	Phosphoglyceratkinase	<i>Crocospaera watsonii</i>	Phosphoglyceratkinase- Familie	Energie-Metabolismus/ Glycolyse	4,9	42,5	108	27	8	
942.1	Pgi	Glucose-6-phosphat- Isomerase	<i>Crocospaera watsonii</i>	GPI-Familie	Energie-Metabolismus/ Glycolyse	6,11	58	239	36	16	

<sup>14</sup> IPF-Nr.-Vergabe entsprechend der Annotation im *Microcystis*-Genomprojekt, Stand Januar 2007 (101. *assembling*-Runde)

<sup>15</sup> Klassifizierung entsprechend der Einteilung der Enzyme in der Cyanobase/ *Synechocystis* & *Anabaena*

<sup>16</sup> „abgesichert durch Wdhlg.“ – Spots gleichen *pI*- und *M<sub>r</sub>*-Werts wurden aus verschiedenen Gelen gepickt und als das gleiche Protein identifiziert

IPF <sup>14</sup>	Gen	Identität	Spezieshomolog	Proteinfamilie/ Aktivität	Bedeutung/ Stoffwechselweg <sup>15</sup>	pI	M <sub>r</sub> in kDa	Score	Cov.	Match	Kommentar
4963.1	FabG2	(Phosphoglucose- isomerase) 3-Oxoacyl-[Acyl-Carrier- Protein]-Reduktase 2	<i>Synechocystis</i> spp.	Dehydrogenasen/ Reduktasen (SDR) Familie	Fettsäure-, Phospholipid-, Sterol-Metabolismus Biosynthese/ Fettsäuren (erster Reduktionsschritt)	5,74	25,2	117	48	10	
2240.3	FabI	Enoyl-[Acyl-Carrier-Protein] reductase [NADH] ( <i>short</i> <i>chain</i> )	<i>Crocospaera</i> <i>watsonii</i>	NADH-abhängige Dehydrogenasen/ Reduktasen (SDR)-Familie FabI-Unterfamilie	Fettsäure-, Phospholipid-, Sterol-Metabolismus Biosynthese/ Fettsäuren (zweiter Reduktionsschritt)	5,32	32,6	114	39	11	
4962.1	ThI	Acetyl-CoA- Acetyltransferase / Acetoacetyl-CoA-Thiolase	<i>Synechocystis</i> spp.		Fettsäure-, Phospholipid-, Sterol-Metabolismus	5,93	41	109	26	9	
22.1		Gli3460 Protein	<i>Gloeobacter</i> <i>violaceus</i>	<i>probable oxidoreductase</i>	Anderes	5,09	38	134	32	10	
5686.1	OCP	wasserlösliches Carotenoid- bindendes Protein (Slr1963 Protein)	<i>Synechocystis</i> spp.		Hypothetisch	4,97 (exp. 3,7; 4,8; 4,9)	37 (exp. 37; 30)	113 110 180 144	25 28 42 36	9 10 15 11	p-Isoformen (2), unterschiedliche Größenfragmente (2)
1054.1		Hypothetisches Protein (Gli 3465)	<i>Gloeobacter</i> <i>violaceus</i>	Transketolase-ähnliches Protein	Hypothetisch (konserviert)	5,66 (exp. 5,4; 5,6)	68,5	132 168	22 29	10 14	p-Isoformen (2)
649.1	MrpA	<u>MC</u> <i>related protein</i>	<i>Microcystis</i> <i>aeruginosa</i>		Hypothetisch/ Anderes	4,85	35,9	104/ 145	28/ 43	6/ 10	abgesichert durch Wdhlg.
2679.1	MrpC	<u>MC</u> <i>related protein</i>	<i>Microcystis</i> <i>aeruginosa</i>	Zelloberfläche?	Hypothetisch/ Anderes	4,2	15,5 (exp. 17)	durch PSD identifiziert; m/z 949,5 und 1077,5 (Trypsin); m/z 2020,1 (Asp-N)			
533.1		Hypothetisches Protein Tery1090	<i>Trichodesmium</i> <i>erythraeum</i>		Hypothetisch/ Keine Ähnlichkeit	5,44 (exp. 4,9; 5,1; 5,3)	71	186/ 173 207/ 177/ 128 185/ 178	21/ 23 25/ 21/ 16 22/ 22	13/ 14 15/ 13/ 10 14/ 14	p-Isoformen (3); abgesichert durch 2-3 Wdhlg.
604.1		Keine Ähnlichkeit, hypothetischer Startpunkt			Hypothetisch/ Keine Ähnlichkeit	5,22	31	118 111	34/ 40	9/ 9	abgesichert durch Wdhlg.
308.1		Keine Ähnlichkeit, hypothetischer Startpunkt			Hypothetisch/ Keine Ähnlichkeit	6,27	22,8	105	39	7	
5227.2		Alr0672 Protein (ähnlich zu Vanadium Chlorperoxidase)	<i>Anabaena</i> spp.		Hypothetisch/ Keine Ähnlichkeit	6,5	46,5	197	47	17	
3657.1		TVG0570508 Protein	<i>Thermoplasma</i> <i>volcanium</i>		Hypothetisch/ Keine Ähnlichkeit	5,11	28,4	86	29	7	
571.1	Lyt	Lysozym, putativ	<i>Pseudomonas</i>	Chitinase	Hypothetisch/	7,04	21,1	163	41	10	Korrekte Größe,

IPF <sup>14</sup>	Gen	Identität	Spezieshomolog	Proteinfamilie/ Aktivität	Bedeutung/ Stoffwechselweg <sup>15</sup>	pI	M <sub>r</sub> in kDa	Score	Cov.	Match	Kommentar
			<i>syringae</i>		Zellwandkatabolismus?	(exp. 5,04 und 5,5)		89	29	6	inkorrekt p/ bei beiden p/- Isoformen (2)
2164.1		Alr0765 Protein	<i>Anabaena</i> spp.	CBS-containing membrane protein, CP12-Polypeptid	Photosynthese Regulation?	5,5 (exp. 5,3; 5,5)	23,5	131 125	43 35	10 8	p/-Isoformen (2)
3982.1		Alr0765 Protein	<i>Anabaena</i> spp.	CBS-containing membrane protein, CP12-Polypeptid	Photosynthese Regulation?	5,19	22,6	95	38	6	
2530.2	RbcS	Ribulose-bisphosphat-Carboxylase/ Oxygenase, kleine UE	<i>Synechococcus</i> spp.	RubisCO (kleine UE)-Familie	Photosynthese CO <sub>2</sub> -Fixierung/ Calvin Zyklus	7,33 (exp. ca. 7,0; 7,3)	13	94 76	63 46	6 5	p/-Isoformen (2)
5236.1	Prk	Phosphoribulokinase/ Phosphopentokinase	<i>Synechocystis</i> spp.	Phosphoribulokinase-Familie	Photosynthese CO <sub>2</sub> -Fixierung/ Calvin Zyklus	5,06 (exp. 4,9; 5,0)	37,8	141/ 102 91	32/ 32 21	10/ 9 7	p/-Isoformen (2); abgesichert z. T. durch Wdhlg.
3340.1	FbaA	Fructose-1,6-bisphosphat/sedoheptulose-1,7-bisphosphat-Aldolase Klasse II	<i>Synechococcus elongatus</i>	Fructose-bisphosphat-Aldolase-Aktivität	Photosynthese CO <sub>2</sub> -Fixierung/ Calvin Zyklus	5,39 (exp. 5,3; 5,5)	39	141/ 148 131/ 107	23/ 30 21/ 26	10/ 11 8/ 10	p/-Isoformen (2); abgesichert durch Wdhlg.
331.1	GlpX/ Fbpl	Fructose-1,6-sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	<i>Synechocystis</i> spp.		Photosynthese CO <sub>2</sub> -Fixierung/ Calvin Zyklus Glycerol-Metabolismus	5,03 (exp. 4,9; 5,0)	37,5 (exp. 43; 45)	82/ 134 93/ 111 107 56	22/ 24 20/ 24 24 18	11/ 14 10/ 12 10 8	p/-Isoformen (2), unterschiedliche Größenfragmente (2); abgesichert z. T. durch Wdhlg.
1614.1	TktA/ CbbT	Transketolase	<i>Synechococcus</i> spp.	Transketolase-Aktivität	Photosynthese CO <sub>2</sub> -Fixierung/ Calvin Zyklus	5,38 (exp. 5,2; 5,3; 5,4)	72	120 152 101	20 23 20	12 14 12	p/-Isoformen (3)
5496.2	CcmK	Carbon dioxide concentrating mechanism protein	<i>Synechococcus</i> spp.	Bakterielle Mikrokompartmente-Protein-Familie	Photosynthese CO <sub>2</sub> -Fixierung/ Carboxysomenhülle	7,7	12	94	61	5	
4223.1	Cpcl	32,1 kDa linker polypeptide, Phycocyanin-assoziiert, rod1	<i>Synechocystis</i> spp.	Phycobilisome linker-Proteinfamilie	Photosynthese Lichtsammelkomplex/ Phycobilisomen	9,5 (exp. von 5,0 bis ca. 7)	32,1 (exp. von 12 bis 32)	105 103 121 115 115 114 68 93	27 23 27 29 27 27 21 23	9 7 8 11 7 9 6 7	Unterschiedliche p/-Isoformen und Größenfragmente (13), z. T. vom theoretischen Wert abweichend

IPF <sup>14</sup>	Gen	Identität	Spezieshomolog	Proteinfamilie/ Aktivität	Bedeutung/ Stoffwechselweg <sup>15</sup>	pI	M <sub>r</sub> in kDa	Score	Cov.	Match	Kommentar
								56 60 109 93 60	15 17 35 25 24	4 6 7 7 7	
4222.1	CpcA	Phycocyanin $\alpha$ -UE	<i>Spirulina maxima</i>		Photosynthese Lichtsammelkomplex/ Phycobilisomen	5,9 (exp. 2x 6; 1x 5,4)	17,5 (exp. 17; 16; 30)	136 62 123	66 38 57	9 5 8	Unterschiedliche p-Isoformen und Größenfragmente (3); z. T. vom theoretischen Wert abweichend
4444.1	AtpA	ATP-Synthase F1 $\alpha$ -UE	<i>Synechocystis</i> spp.	ATPase ( $\alpha/\beta$ -UE)-Familie	Photosynthese/ ATP- Synthese (Protonen gekoppelt)	4,76 (exp. ~7,0)	54 (exp. 45)	105/ 69	21/ 12	11/ 5	Verändertes Verhalten in pI und M <sub>r</sub> (N-terminales Fragment vermutet); abgesichert durch Wdhlg.
2888.1	AtpD (Synonym für AtpB)	ATP-Synthase F1 $\beta$ -UE	<i>Synechocystis</i> spp.	ATPase	Photosynthese/ ATP- Synthese (Protonen gekoppelt)	4,6 (exp. 4,5; 4,6)	51,5	97/ 227/ 200 204/ 198/ 148	20/ 48/ 42 36/ 43/ 33	7/ 17/ 18 14/ 15/ 12	p-Isoformen (2); abgesichert durch 3 Wdhlg.
1023.1		Thioredoxin-Reduktase	<i>Anabaena</i> spp.	Thioredoxin-disulfid- Reduktase-Aktivität	Photosynthese/ löslicher Elektronencarrier	5,5	49,5	125	24	9	
2236.1	Tuf	Elongationsfaktor (Ef- <u>Iu</u> )	<i>Anabaena</i> spp.	Translationsfaktor Nukleotidyltransferase- Aktivität	Proteinbiosynthese/ Translation	5,04 (exp. 5,04; 5,2; 5,5c- ter)	44,8 (exp. 45; 49; 30c-ter)	39/ 110 196 59c-ter	8/ 25 45 22c- ter	3/ 10 15 7c-ter	Unterschiedliche p-Isoformen und Größenfragmente (3); z. T. durch Wdhlg. abgesichert
3971.1	BCP	Redoxin/ Thioredoxin- ähnliches Protein	<i>Trichodesmium</i> <i>erythraeum</i>	Peroxiredoxin (PRX)- Familie, <i>Bacteroferritin</i> <i>comigratory</i> protein (BCP)-Unterfamilie	Zelluläre Prozesse/ Detoxifikation/ Antioxidans	4,46	15,8	98	31	5	
1847.1	Prx	Peroxiredoxin (Alr4641)	<i>Anabaena</i> spp.	AhpC/Tsa-Familie	Zelluläre Prozesse/ Detoxifikation	4,52	21,9	74	30	4	
4715.1	SodB	Superoxiddismutase (Fe- abhängig)	<i>Synechocystis</i> spp.	Eisen/ Mangan- Superoxiddismutase- Familie	Zelluläre Prozesse/ Detoxifikation/ Thioredoxin- Metabolismus	4,95	21,8	58	22	4	
112.1	GlgC	Glucose-1-phosphat- Adenylyltransferase	<i>Crocospira</i> <i>watsonii</i>	Zentraler Intermediärmetabolismus/	Zentraler Intermediärmetabolismus/	7,03	48	269	44	20	

IPF <sup>14</sup>	Gen	Identität	Spezieshomolog	Proteinfamilie/ Aktivität	Bedeutung/ Stoffwechselweg <sup>15</sup>	pI	M <sub>r</sub> in kDa	Score	Cov.	Match	Kommentar
					Polysaccharide & Glycoproteine/ Glycogen Biosynthese (erster Schritt)						

**Anhang B: *mrpC*-Screening in verschiedenen *Microcystis*-Stämmen**

Stamm	Toxizität	Geographische Herkunft	<i>mcyA</i>	<i>mrpC</i>	<i>slpA</i>
130	NT	Säyteenjärvi See, Finnland	-	-	-
199	H	Rusutjärvi See, Finnland	+	+	+
205	H	Mallusjärvi See, Finnland	+	+	+
265	NT	Tuusulanjärvi See, Finnland	-	-	-
269	NT	Raisiojoki See, Finnland	-	-	-
GL260735	H	Grand-Lieu See, Frankreich	+	+	+
GL060916	NT	Grand-Lieu See, Frankreich	-	-	-
GL280641	NT	Grand-Lieu See, Frankreich	-	-	-
GL280646	H	Grand-Lieu See, Frankreich	+	+	+
GL101051	NT	Grand-Lieu See, Frankreich	-	-	-
GL101052	NT	Grand-Lieu See, Frankreich	-	-	+
HUB 5-3	NT	Pechlitzsee, Deutschland	-	-	+
IZANCYA5	H	Mira See, Portugal	+	+	+
PCC 7005	NT	Mendota See, USA	-	+	-
PCC 7941	H	Little Rideau See, Kanada	+	+	+
PCC 7806	H	Braakman Reservoir, Niederlande	+	+	+
NIES-44	NT	Kasumigaura See, Japan	-	-	-
NIES-89	H	Kawaguchi See, Japan	+	-	+
NIES-100	N	Kasumigaura See, Japan	-	-	-
NIES-102	H	Kasumigaura See, Japan	+	-	+
NIES-104	NT	Unbestimmt, Japan	-	-	-
NIES-111	NT	Kasumigaura See, Japan	-	-	-

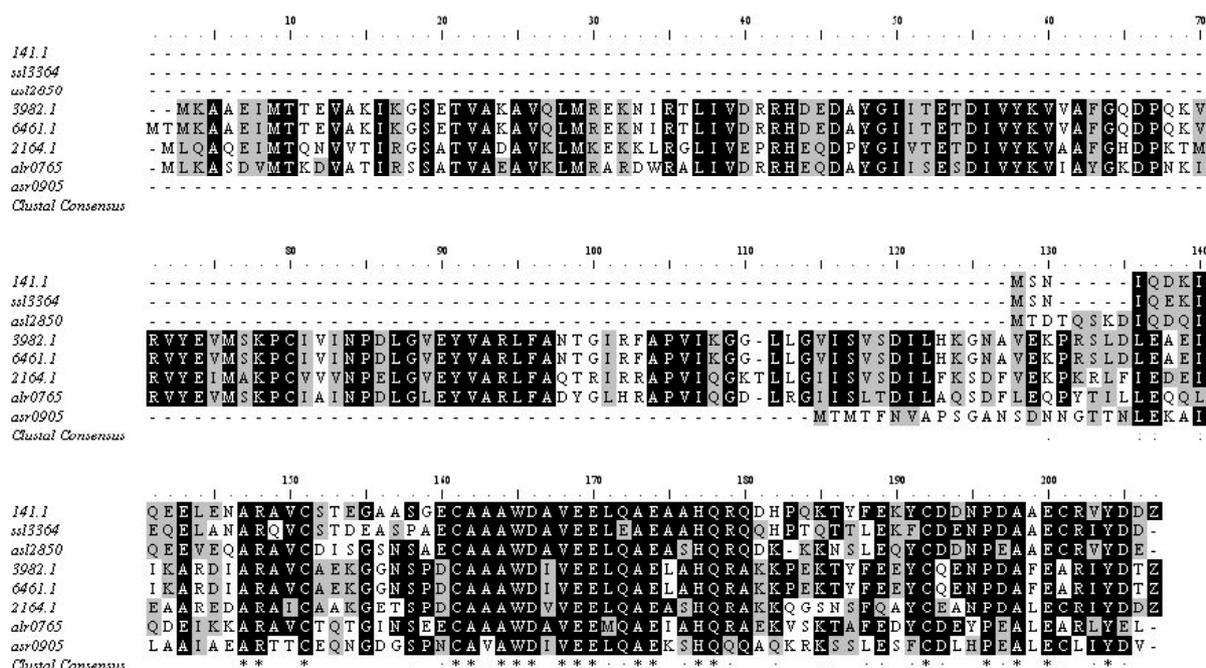
H	Hepatotoxisch
N	Neurotoxisch
NT	Nicht-toxisch
+	vorhanden
-	nicht vorhanden

**Anhang C: Stämme zur Sequenzierung der *rbcl*-Sequenz**

Zum Vergleich der *rbcl*-Sequenz wurden fünf toxische und vier nicht-toxische Stämme (PCC 7806, PCC 7820, PCC 7941, PCC 9432, PCC 9603, PCC 9622, PCC 9624, PCC 9807, PCC 9809), freundlicherweise durch A. M. Castets (Pariser Pasteur Institut, Microbiologie des Cyanobacterie) zur Verfügung gestellt, sequenziert.

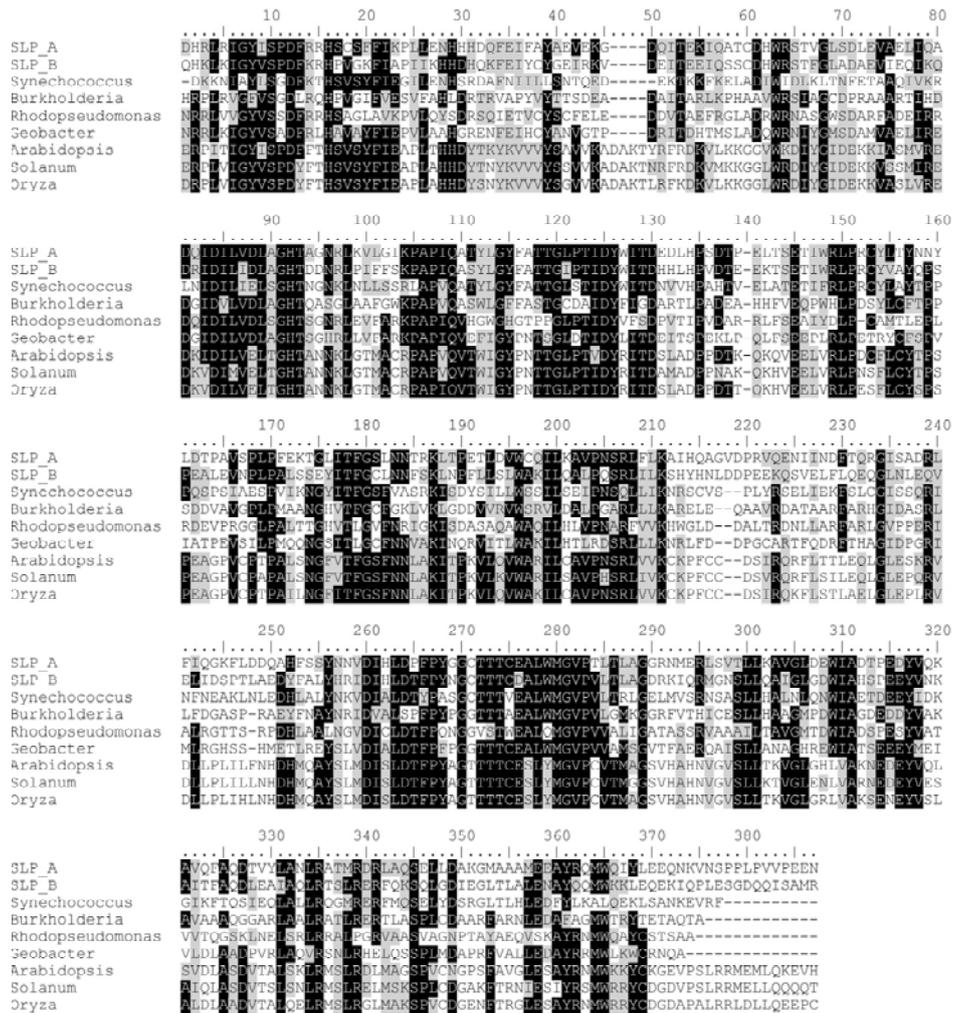
**Anhang D: Alignments der CP12-Polypeptide aus *Microcystis* PCC 7806 und *Nostoc* PCC 7120**

Die vorhergesagten AS-Sequenzen verschiedener cyanobakterieller CP12-Polypeptide wurden in einem *Alignment* miteinander verglichen. Verschiedene Schattierungen zeigen konservierte AS-Reste an (Schwarz: 75-100 % Übereinstimmungen, Grau: 40-75 % Übereinstimmungen). Die AS-Sequenzen der CP12-Polypeptide von *Synechocystis* PCC 6803 (*ssl3364*) und *Nostoc* PCC 7120 (*asl2850*, *alr0765*, *asr0905*) wurden der Cyanobase (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>) entnommen. Die entsprechenden *Microcystis*-Sequenzen (141.1, 3982.1, 6461.1, 2164.1) entstammen der Genomdatenbank des Pariser Pasteur Instituts (Stand April 2007).



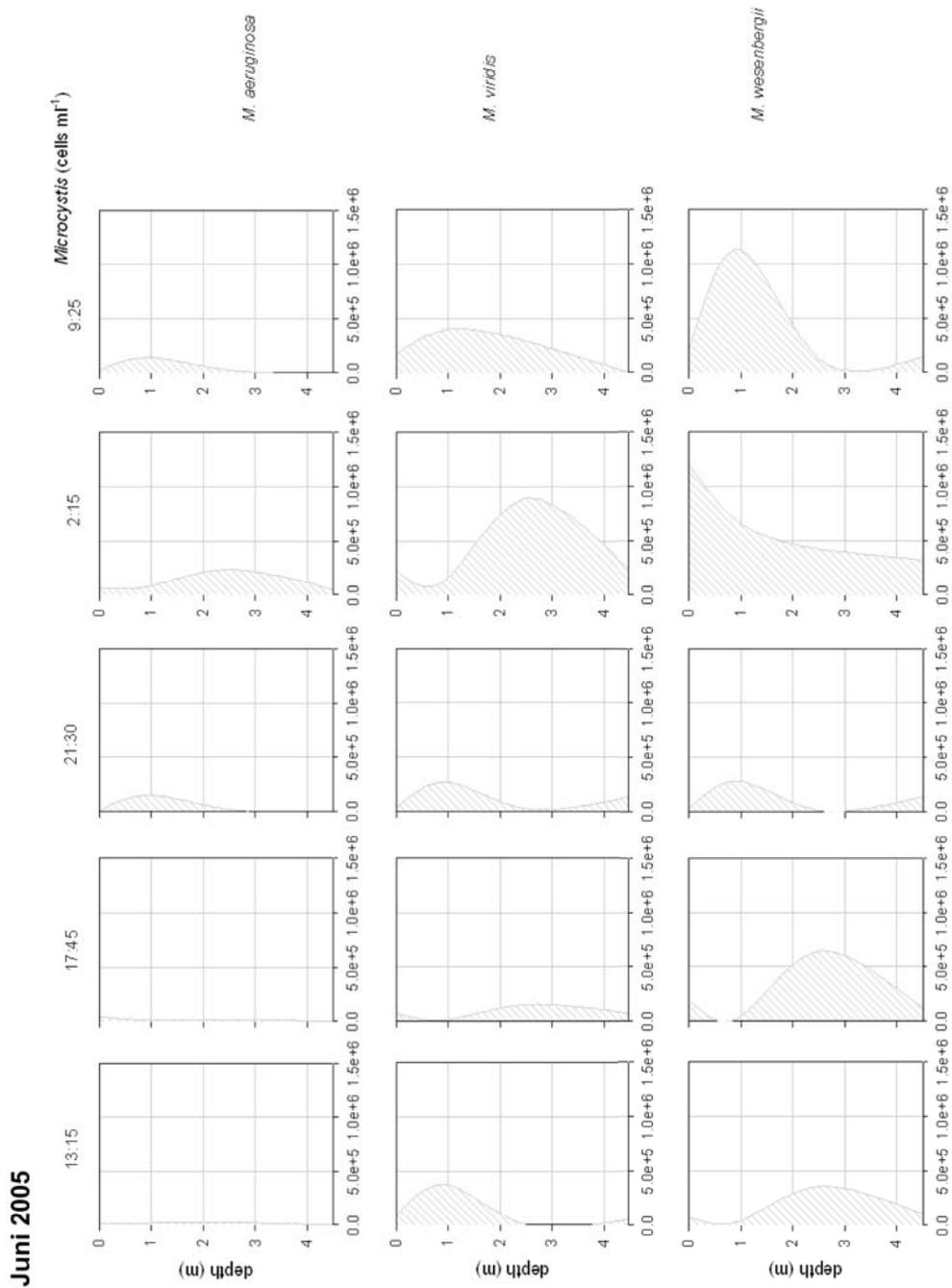
Anhang E: Alignments der SPY-Domänen verschiedener Spindly- bzw. Spindly-ähnlichen Proteine aus Cyanobakterien und Pflanzen

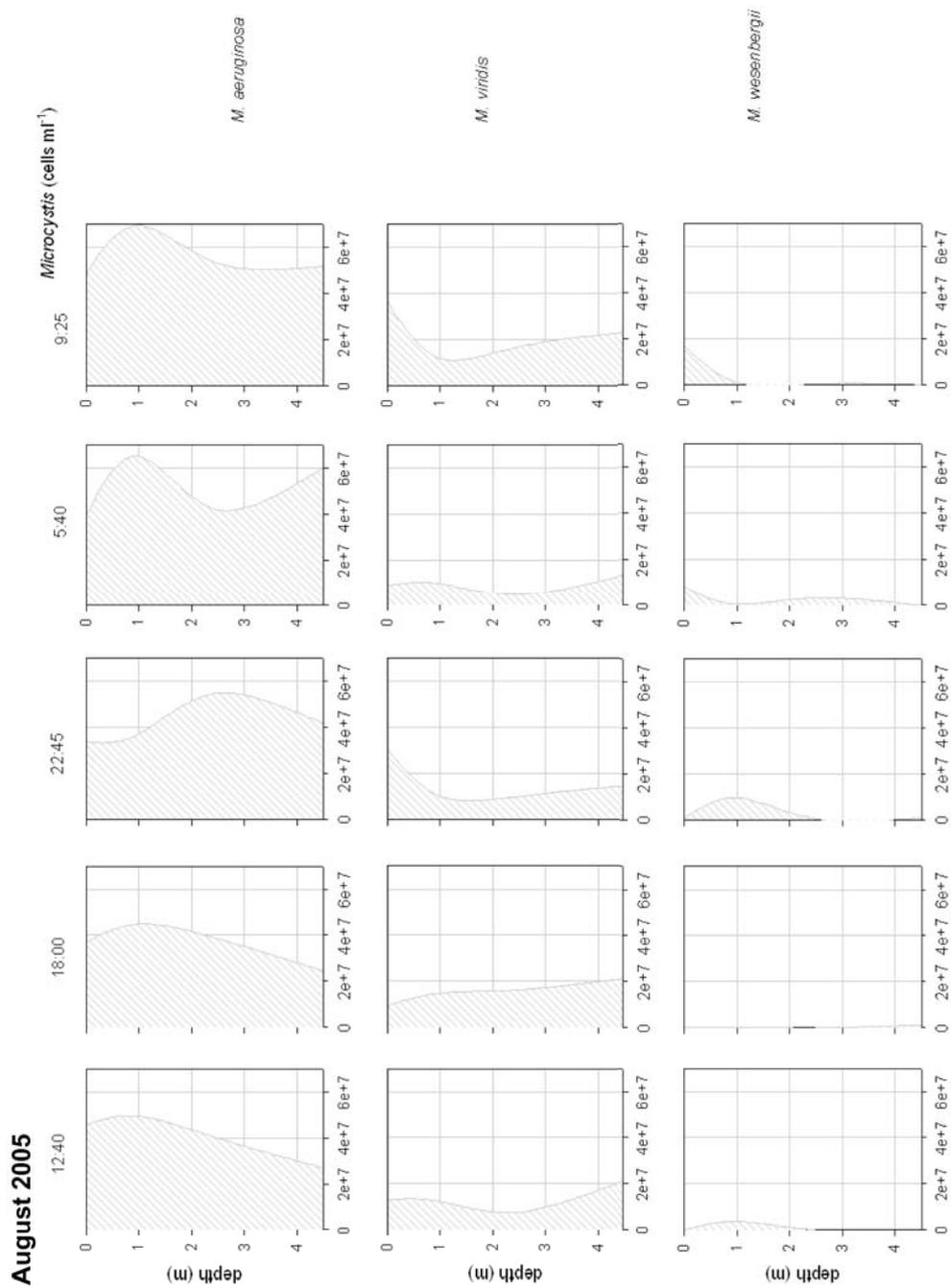
Die SPY-Domänen verschiedener Spindly- bzw. Spindly-ähnlichen Proteine wurden in einem Alignment miteinander verglichen. Verschiedene Schattierungen zeigen konservierte AS-Reste an (Schwarz: 75-100 % Übereinstimmungen, Grau: 40-75 % Übereinstimmungen). Die AS-Sequenzen der SPY-Domänen der Spindly- bzw. Spindly-ähnlichen Proteine entstammen der Microcystis-Genomdatenbank des Pariser Pasteur Instituts (SlpA, SlpB) und der NCBI-Datenbank (Synechococcus, Rhodospseudomonas, Burkholderia, Geobacter, Arabidopsis, Solanum, Oryza).



**Anhang F: *Microcystis*-Morphotypenverteilung an der Quitzdorfer Talsperre (Sachsen) im Juni und August 2005**

In Kooperation mit Dr. Sabine Jähnichen und Tilo Ihle (Technische Universität Dresden/ Hydrobiologie) und freundlicher Unterstützung durch die ortsansässigen Stauwarte wurden Freilandversuche an der Quitzdorfer Talsperre (Sachsen) im Sommer 2005 (Juni und August) durchgeführt. Es erfolgten insgesamt fünf Probennahmen innerhalb eines Tag/ Nachtverlaufs. An einem fixen Punkt im Stausee wurden Proben aus 4 verschiedenen Tiefen entnommen. Diese wurden mit Hilfe eines Ruttner-Schöpfers gewonnen. Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der einzelnen Morphotypen wurden Aliquots jeder Fraktion unter dem Mikroskop analysiert. Die Daten wurden von Dr. Sabine Jähnichen ausgewertet und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.





---

## Curriculum vitae

### Persönliche Daten

Geburtsdatum/ -ort: 16.03.1975/ Berlin  
Nationalität: Deutsch  
Familienstand: Verheiratet (geb. Claußner)  
Kinder: 2 (geb. 2000, 2008)

### Beruflicher Werdegang

06/07-05/08 Leiterin des Projekts „Manipulation des C-Stoffwechsels von Cyanobakterien“ an der Humboldt-Universität zu Berlin/ Institut für Biologie/ Biochemie der Pflanzen  
10/02-03/07 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Humboldt-Universität zu Berlin/ Institut für Biologie/ Molekulare Ökologie & Genetik/ AG Toxische Cyanobakterien  
02/00-08/00 Technische Assistentin der Klinischen Pharmakologie der Schering AG  
03/98-02/00 Studentische Tutorin an der Humboldt-Universität zu Berlin/ Institut für Biologie/ Genetik/ AG Phylogenie Filamentöser Pilze

### Ausbildung

Seit 10/02 Promotion auf dem Gebiet der Molekularbiologie an der Humboldt-Universität zu Berlin (betreut durch Prof. Dr. Elke Dittmann und Prof. Dr. Thomas Börner)  
Thema: Molekulare Funktionsanalyse von Microcystin in *Microcystis*  
10/97-08/02 Biologie-Studium an der Humboldt-Universität zu Berlin  
Spezialisierung: Molekularbiologie, Mikrobiologie, Parasitologie/ Virologie  
Abschluss: Diplom mit Sehr gut

09/94-07/97                      Ausbildung zur Biologielaborantin bei der Schering AG

Abschluss: Mit Auszeichnung

09/81-07/94                      Heinrich-Schliemann-Gymnasium in Berlin

Hauptfächer: Latein, Biologie

Abschluss: Abitur

### **Kenntnisse und Fähigkeiten**

Sprachen                              Englisch fließend in Wort und Schrift; Grundkenntnisse in Russisch und Spanisch; Großes Latinum

Computer                             Versierter Umgang mit Microsoft Office Suite & Macintosh Software sowie mit Genom- und Proteindatenbanken

### **Externe Forschungsaufenthalte**

02/07-03/07                      Macroarray-Analysen von *Microcystis*; Pasteur Institut in Paris/ Frankreich (Prof. Dr. Nicole Tandeau de Marsac)

03/06                                  RubisCO-Projekt an der Hebrew University in Jerusalem/ Israel (Prof. Dr. Aaron Kaplan)

01/06-02/06                      *Microcystis*-Proteomstudie in Zusammenarbeit mit der Universität Rostock (Prof. Dr. Martin Hagemann)

06/05-08/05                      *Microcystis*-Freilanduntersuchungen in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Dresden (Dr. Sabine Jähnichen)

### **Stipendium**

01/06-08/06                      Stipendiatin des Berliner Programms zur Förderung der Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre

## Wissenschaftliche Beiträge

### Publikationen

Kehr, J.C., Zilliges, Y., Springer, A., Disney, M.D., Ratner, D.D., Bouchier, C., Seeberger, P.H., Tandeau de Marsac, N., and E. Dittmann (2006): *A mannan binding lectin is involved in cell-cell attachment in a toxic strain of Microcystis aeruginosa*. *Molecular Microbiology* (59/3): 893-906.

Zilliges, Y., Kehr, J.C., Mikkat, S., Bouchier, C., Tandeau de Marsac, N., Börner, T., and E. Dittmann (2008): *An extracellular glycoprotein is implicated in cell-cell contacts in the toxic cyanobacterium Microcystis aeruginosa PCC 7806*; *Journal of Bacteriology* (190/8): 2871-2879.

Frangeul, L. and Quillardet, P., Humbert, J.F., Castets, A.M., Matthijs, H., Cortez, D., Tolonen, A., Zhang, C.C., Gribaldo, S., Billault, A., Lepelletier, E., Kehr, J.C., Zilliges, Y., Ziemert, N., Dittmann, E., Bouchier, C. and Tandeau de Marsac, N. (2008): *Highly plastic genome of Microcystis aeruginosa PCC 7806, a ubiquitous freshwater cyanobacterium*; accepted by BMC Genome

*In Vorbereitung:*

Zilliges, Y., Kehr, J.C., Mikkat, S., Hagemann, M., Börner, T., Tandeau de Marsac, N., and E. Dittmann (2008): *Posttranslational modification by the nonribosomal peptide microcystin modulates protein expression in M. aeruginosa PCC 7806 - a global assessment*; wird eingereicht bei PLoS Biology

Zilliges, Y., Kehr, J.C., and E. Dittmann (2008): *Microcystin's Influence on Calvin Cycle Proteins*; wird eingereicht bei PNAS

Jähnichen, S., Zilliges, Y., Ihle, T., and J. Benndorf (2008): *Temporal niche formation of different Microcystis morphotypes*

### Konferenzbeiträge

#### Vorträge

*Annual VAAM conference, Jena 2006*

Zilliges, Y., Kehr, J.C., Börner, T., Tandeau de Marsac, N., and E. Dittmann: *Insights into the role of microcystin for Microcystis aeruginosa PCC 7806*

*6<sup>th</sup> International Workshop on Molecular Biology of Cyanobacteria, Gdansk 2005*

Zilliges, Y., Kehr, J.C., Börner, T., Tandeau de Marsac, N., and E. Dittmann: *Insights into the role of microcystin for Microcystis aeruginosa PCC 7806*

*6<sup>th</sup> International Conference on Toxic Cyanobacteria, Bergen 2004*

Claußner, Y., Tandeau de Marsac, N., Börner, T., and E. Dittmann: *Microcystin – an intercellular signalling molecule in Microcystis?*

**Poster**

*4<sup>th</sup> Euroconference on the Molecular Bioenergetics of Cyanobacteria, San Feliu de Guixols 2005 (EURESCO)*

Zilliges, Y., Börner, T., and E. Dittmann: Towards microcystin's function

*EURESCO conference/ Bacterial neural networks, San Feliu de Guixols 2004*

Claußner, Y., Börner, T., and E. Dittmann: Light dependent intercellular signalling by microcystin, a cyanobacterial toxin

*3<sup>th</sup> EuroConference on the Molecular Bioenergetics of Cyanobacteria, Acquafredda di Maratea 2003 (EURESCO)*

Claußner, Y., Börner, T., and E. Dittmann: Towards Microcystin's function

**Workshops**

*PEPCY-EU-Treffen, Berlin 2006 & 2002, Copenhagen 2004, Amsterdam 2003*

Zilliges, Y., and T. Börner

*Microcystis-Morphotypen, Berlin 2005*

Kehr, J.C., Welker, M., Zilliges, Y., Chorus, I., and E. Dittmann

*Microcystin-Genotypen, Stechlinsee 2004*

Dittmann, E., Jähnichen, S., Ihle, T., Kehr, J.C., Mbedi, S., Claußner, Y., and C. Wiedner

---

## Danksagung

Meinen langjährigen Betreuern Frau Prof. Dr. Elke Dittmann und Herrn Prof. Dr. Thomas Börner danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas. Durch ihr konstruktives und kritisches Engagement haben sie diese Arbeit maßgeblich beeinflusst. Ich danke ihnen für die angenehme Zusammenarbeit und das in mich gesetzte Vertrauen.

Den Mitarbeitern der AG Molekulare Ökologie und der AG Genetik danke ich für die herzliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre. Herrn Jan-Christoph Kehr danke ich besonders für seinen unermüdlichen Einsatz bei der computertechnischen Umsetzung der Dissertation. Nadine Ziemert, Elena Laufer, Stefan Börno und Ramona Günther sowie Jana Müller und Katrin Hinrichs danke ich für ihre praktische Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt den externen Kooperationspartnern dieses Projekts Herrn Prof. Dr. Martin Hagemann (Universität Rostock), Herrn Dr. Stefan Mikkat (Universität Rostock), Frau Dr. Sabine Jähnichen (Technische Universität Dresden), Herrn Prof. Dr. Aaron Kaplan (Hebrew University of Jerusalem) und Frau Prof. Dr. Nicole Tandeau de Marsac (Pariser Pasteur Institut).

Finanziell gefördert wurde diese Arbeit durch die Europäische Union (PEPCY-Projekt), durch die Deutsche Forschungsgesellschaft und durch das Berliner Programm zur Förderung der Chancengleichheit von Frauen in Forschung und Lehre.

Abschließend danke ich meinem lieben Mann, meinen Eltern und Schwiegereltern sowie den Familien Menzel, Hampel, Hellmich und Kaltwasser für ihre stetige Unterstützung bei der Betreuung unseres Sohnes Christoph.

## **Selbständigkeitserklärung**

Gemäß §6 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Berlin, den 23.07.2007

Yvonne Zilliges