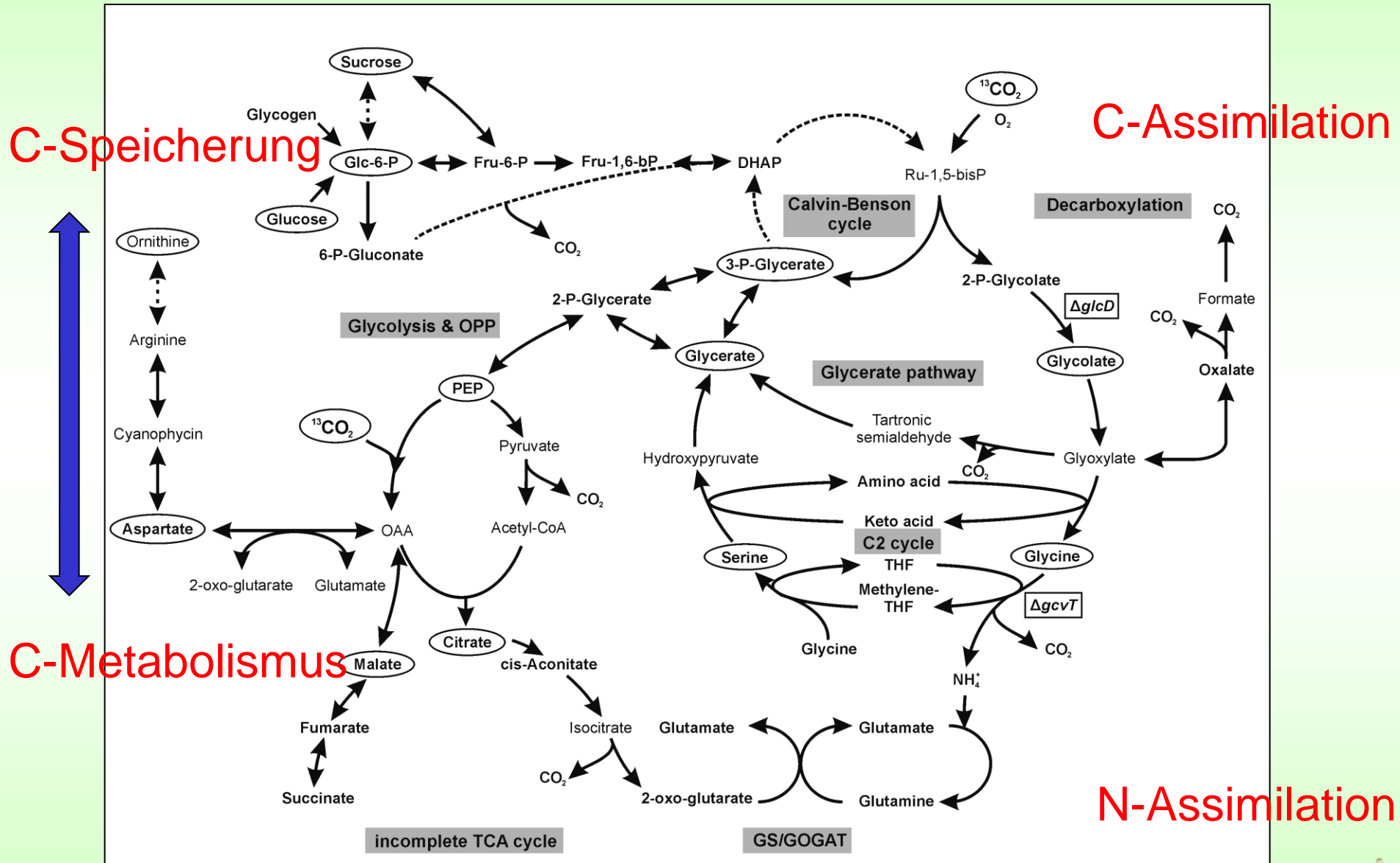


Regulation der C/N-Assimilation in autotrophen Zellen (Cyanobakterien)

Prof. Dr. Martin Hagemann

- Einführung in die Biochemie
- Regulation von N-Assimilationsgenen durch NtcA
- Regulation von C-Assimilationsgenen durch CcmR
- Das PII Protein als Sensor des N(/C) Verhältnis
- Ausblick zu C-Regulation

In photoautotrophen Zellen wird CO₂ und NH₃ assimiliert

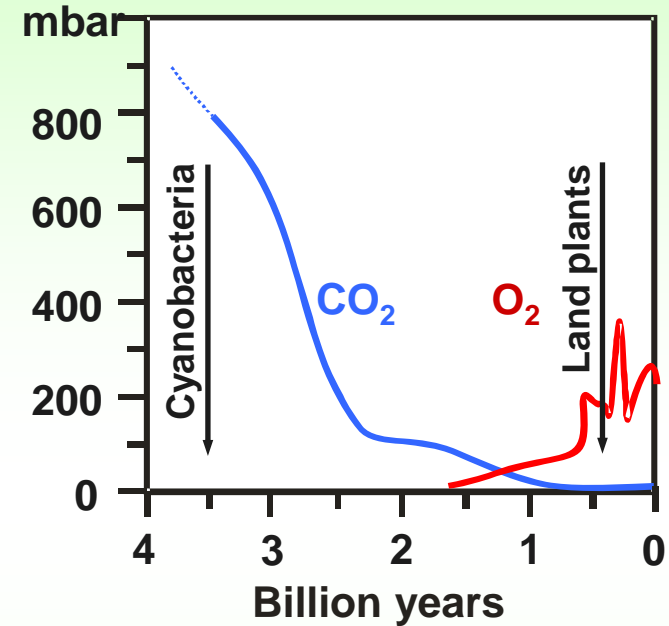


Die autotrophe CO₂-Fixierung erfolgt durch ein ineffizientes Enzym

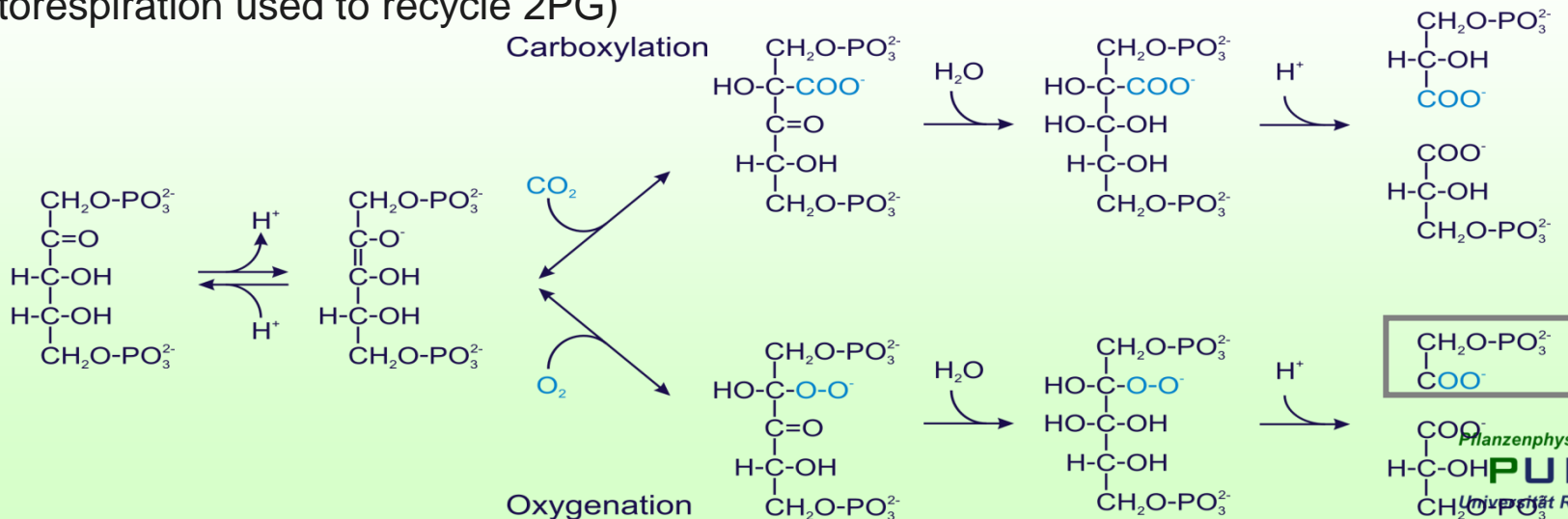
1. Problem: low affinity for CO₂

	Km (CO ₂) [μM]	Reference
<i>Spinacea oleracea</i>	21 ± 1	Spreitzer et al. 2005
<i>Anabaena variabilis</i>	293 ± 27	Badger 1980

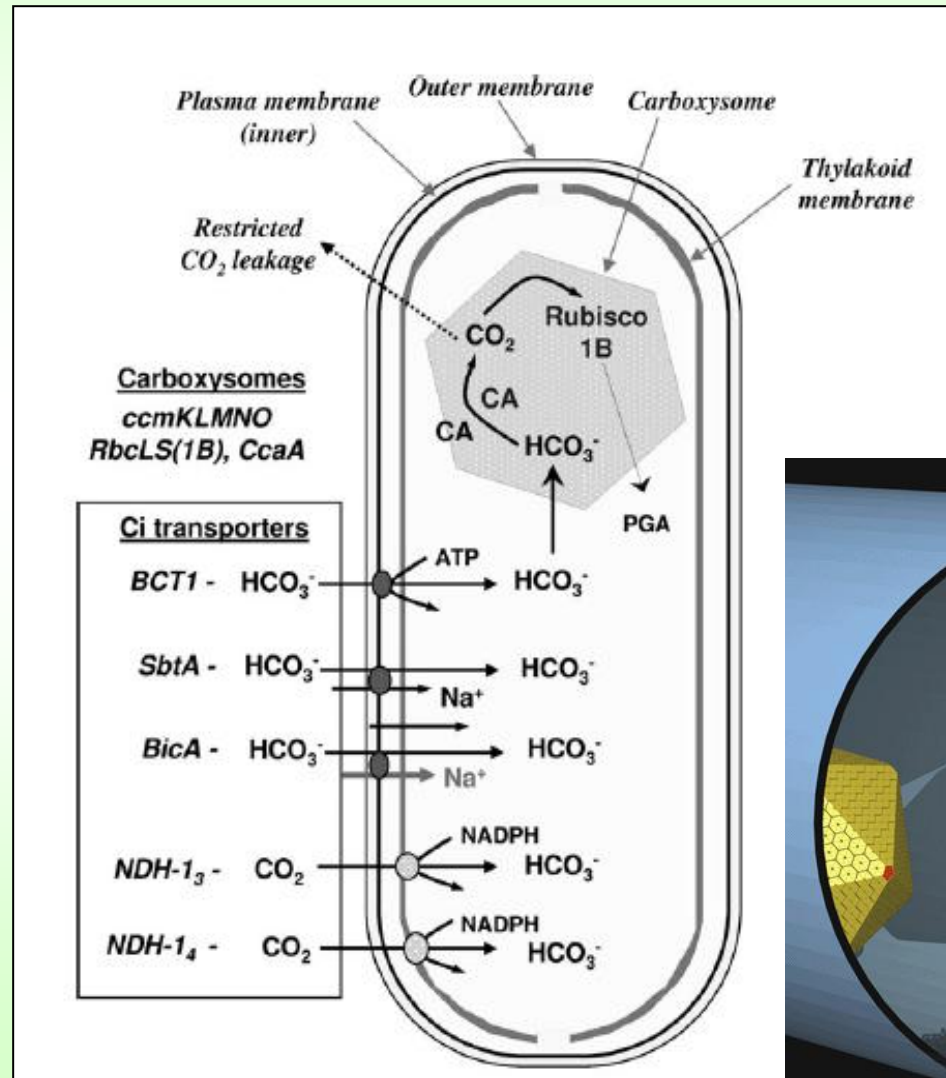
→ high content of Rubisco compensates in higher plants (up to 30% leaf protein)



2. Problem: O₂ as competitive substrate (Photorespiration used to recycle 2PG)



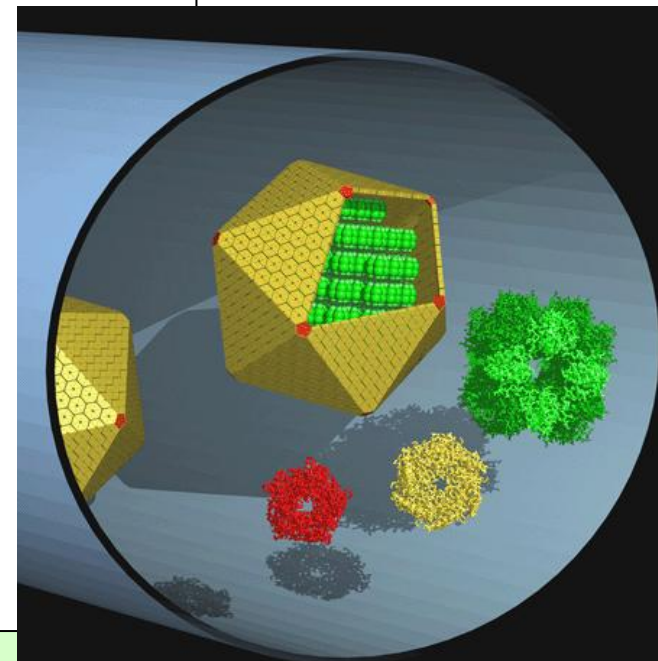
Cyanobakterien haben einen Kohlenstoff-Konzentrierungsmechanismus entwickelt



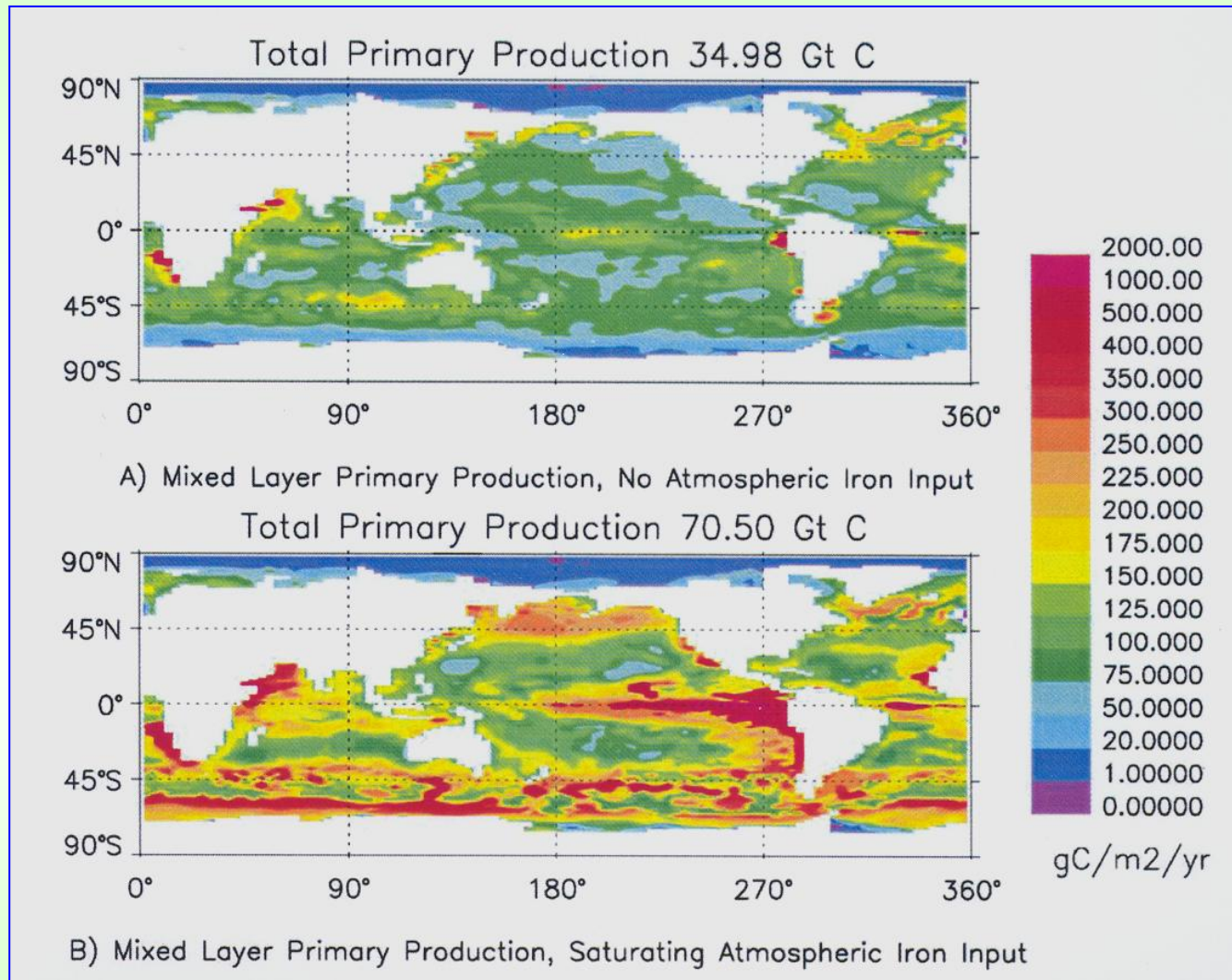
RubisCO ist im Carboxysom lokalisiert, einem prokaryot. Organell mit Proteinhülle. Dort setzt die Carbon-Anhydrase (CA) CO_2 frei und RubisCO ist gesättigt.

Transporter akkumulieren bis zu 1000fach Bicarbonat in der Zelle.

CO_2 -Mangel induziert Hoch-affine Transporter auf Genexpressionsebene.



Die autotrophe CO₂-Fixierung im Ozean ist v.a. Fe-limitiert

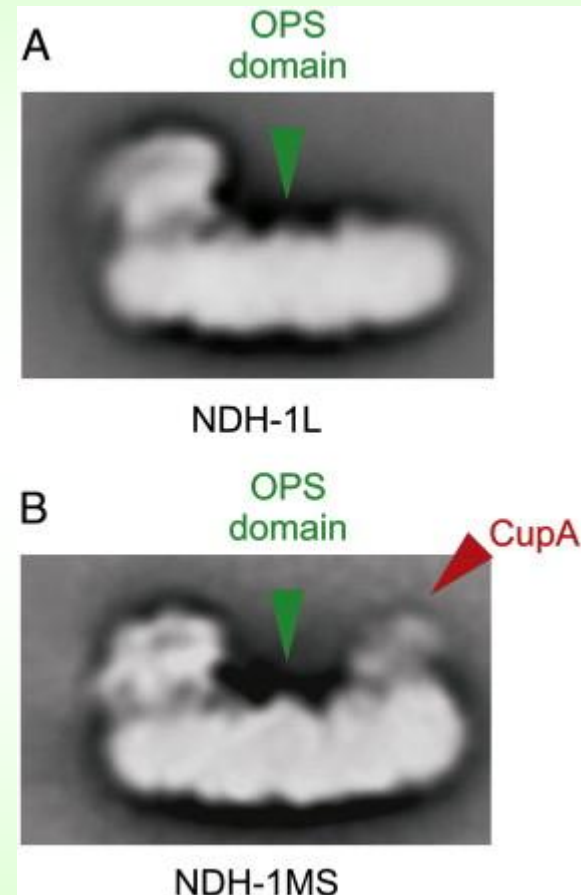


Ca. die Hälfte der Kohlenstofffixierung findet im Ozean statt, v.a. durch Cyanobakterien.
Zusatz von Eisen würde Produktion erhöhen und CO₂ vermindern!

Regulation von Genen für die C-Assimilation

CcmR (Repressor) und CmpR regulieren CCM-Gene

Anpassung an CO₂-Mangel erhöht CO₂-Affinität!
CcmR-Mutation erhöht CO₂-Affinität unter Hoch-CO₂
z.B. CO₂ Domäne in Ndh1



Bindung des TF CmpR wird durch 2-Phosphoglycolat aktiv Aktiviert ein HCO_3^- Aufnahmesystem

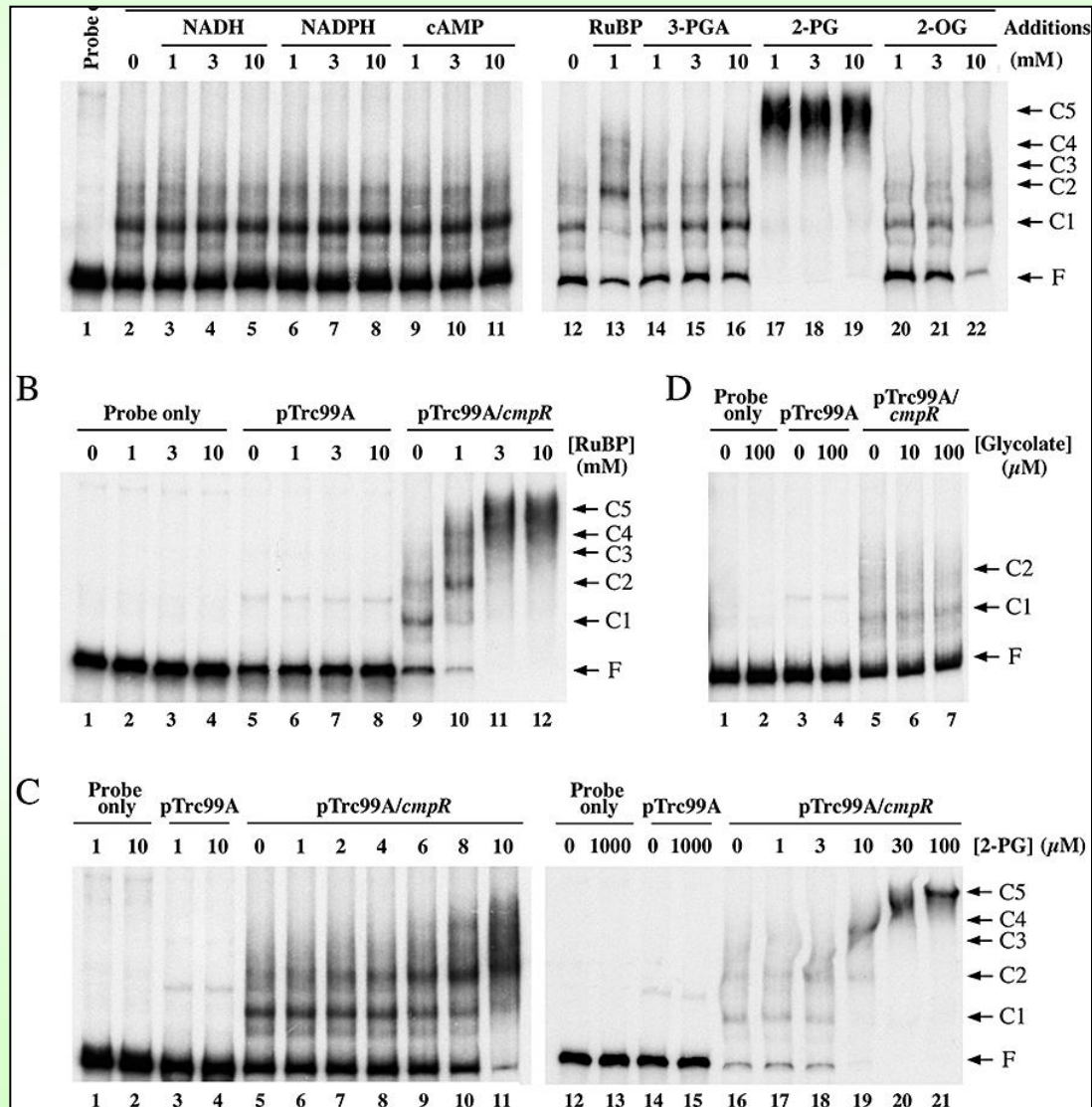


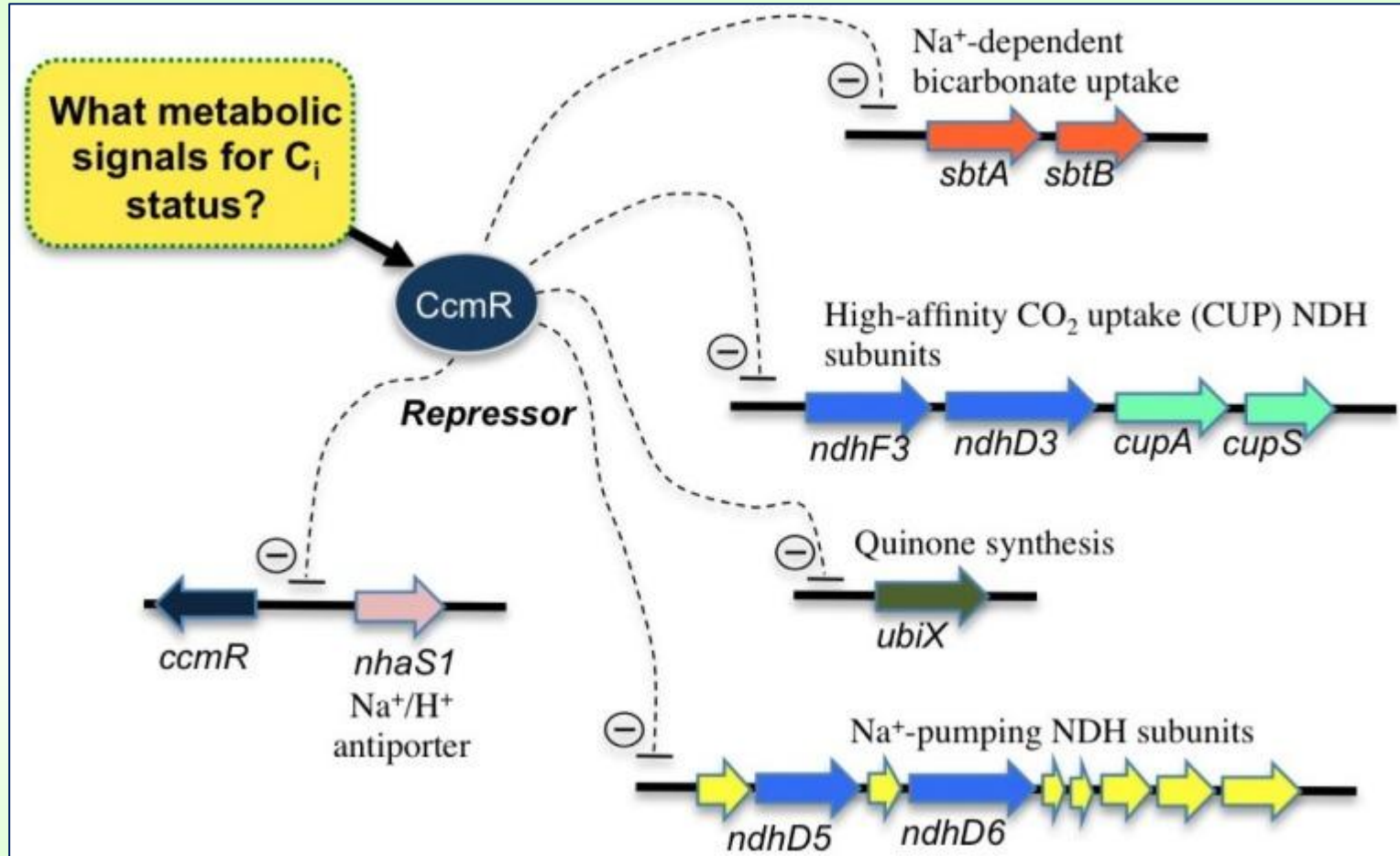
Fig. 6. Mobility shift assays showing the effects of various metabolites and signalling molecules on binding of CmpR to the *cmp* operon regulatory region.

A. Effects of various compounds in the millimolar concentration range. Extract of *E. coli* harbouring pTrc99A/*cmpR* was added to the reaction mixtures to give 1 μg of total protein (lanes 2–22). NADH (lanes 3–5), NADPH (lanes 6–8), cAMP (lanes 9–11), RuBP (lane 13), 3-PGA (lanes 14–16), 2-PG (lanes 17–19) and 2-OG (lanes 20–22) were added to give the indicated final concentrations.

B. Effects of different concentrations of RuBP. C. Effects of different concentrations of 2-PG. D. Effects of different concentrations of glycolate.

In (B)–(D), extracts of *E. coli* harbouring pTrc99A and pTrc99A/*cmpR* were added to the reaction mixtures as indicated, giving 1 μg of total protein. RuBP, 2-PG and glycolate were added to give the indicated final concentrations in (B), (C) and (D) respectively. Mobility shift assays were performed as described in the legend to Fig. 5. C1–C5, DNA–protein complexes; F, free probe.

Viele Gene der CO₂-Assimilation werden durch CcmR reprimiert – Wie ist die Signalkette?



PLoS One. 2012;7(7):e41286. doi: 10.1371/journal.pone.0041286. Epub 2012 Jul 20.

Regulation of the cyanobacterial CO₂-concentrating mechanism involves internal sensing of NADP⁺ and α-ketogutarate levels by transcription factor CcmR.

Daley SM, Kappell AD, Carrick MJ, Burnap RL.

Microbiology and Molecular Genetics, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, United States of America.

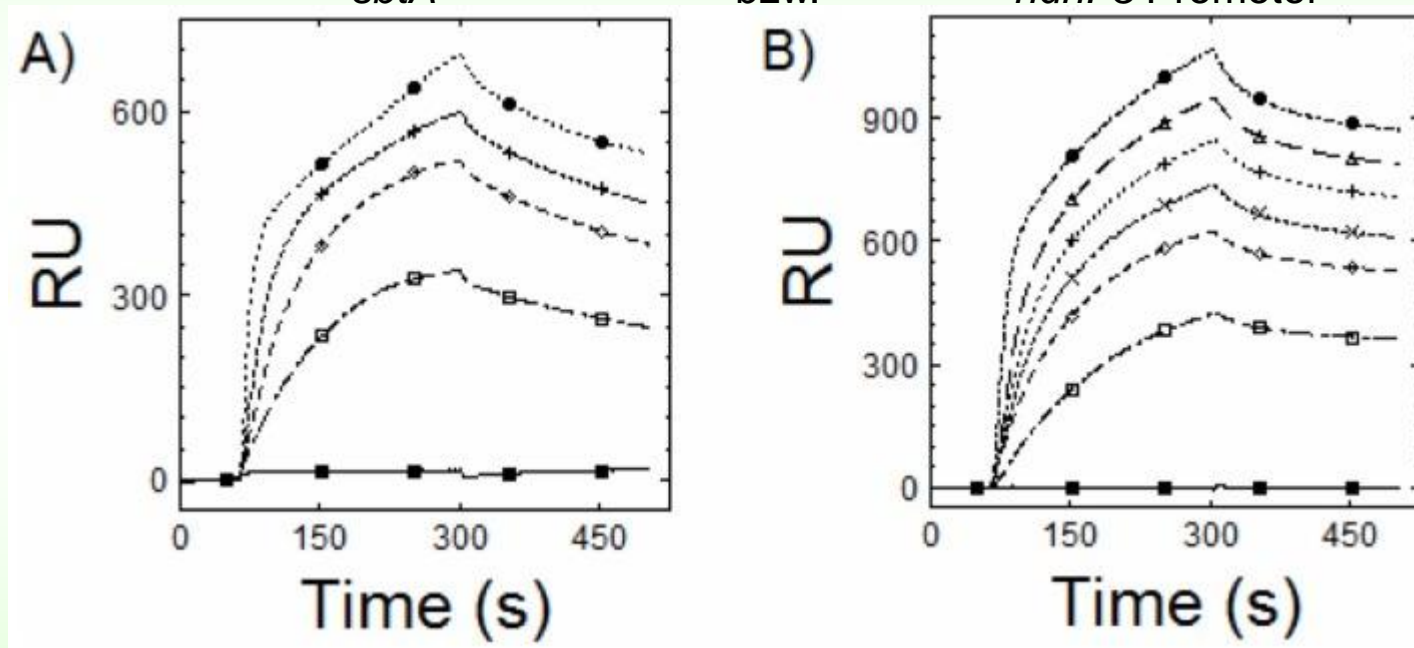
Viele Gene der CO₂-Assimilation werden durch CcmR reprimiert – CcmR bindet an Promotoren!

Promotorbindung *in vitro* – DNA-Proteinkomplexe in der Plasmonresonanz-Spektroskopie

sbtA

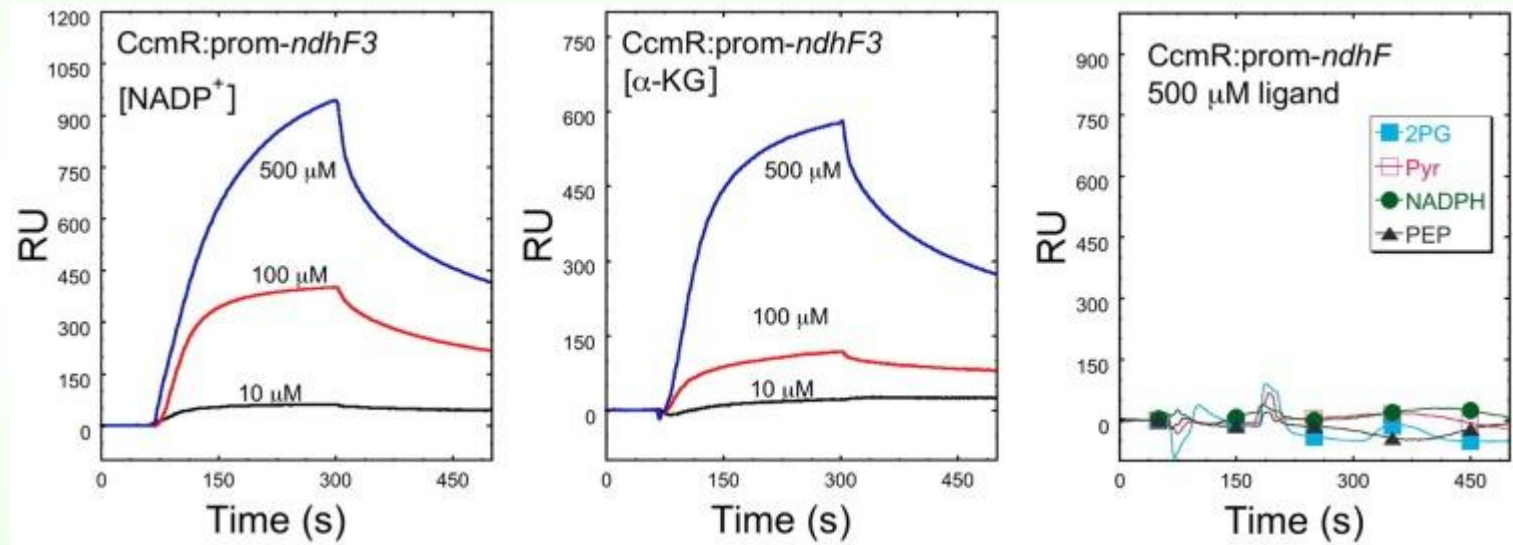
bzw.

ndhF3 Promotor

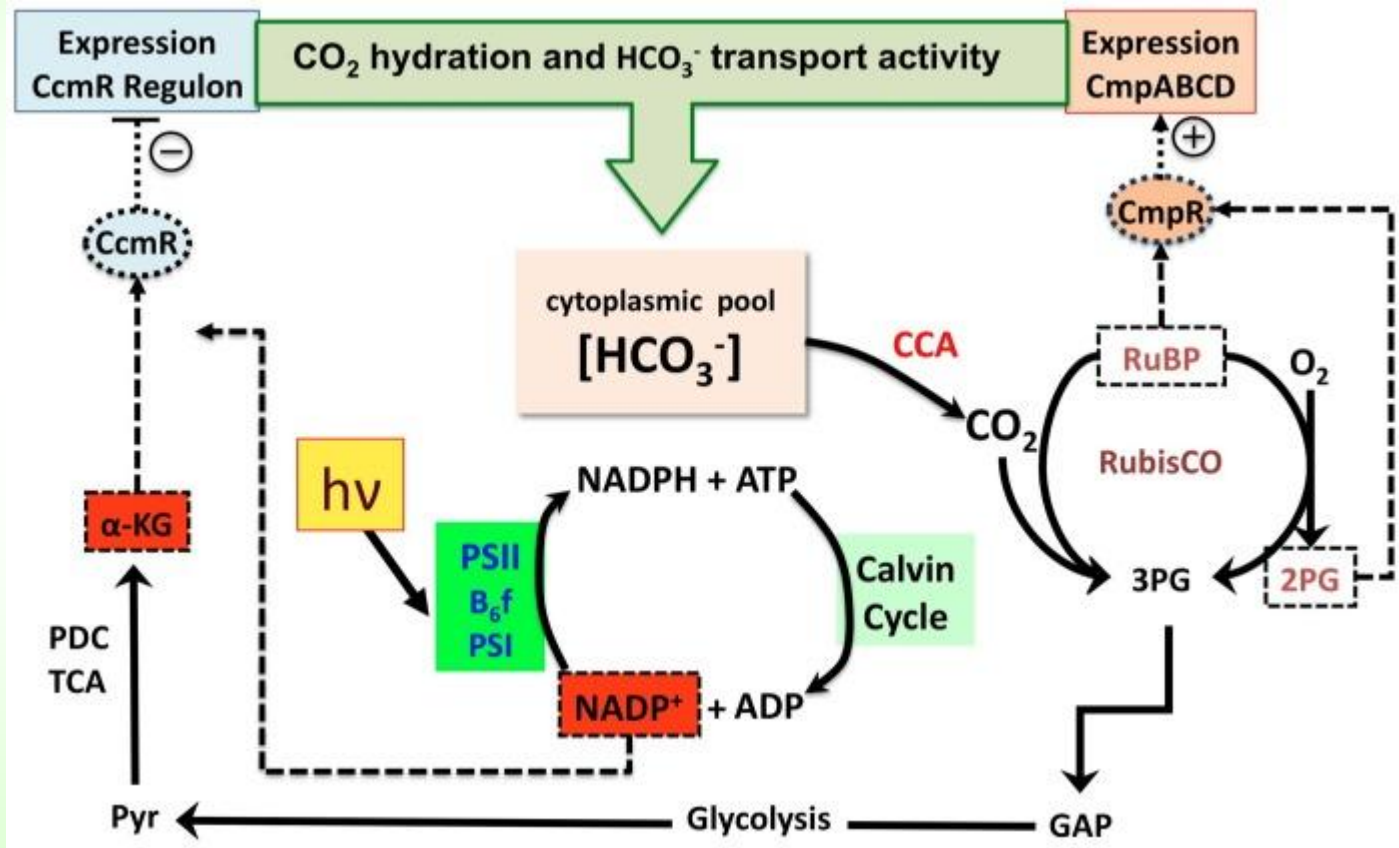


Viele Gene der CO₂-Assimilation werden durch CcmR reprimiert –NADP⁺ und 2OG wirken als Corepressoren!

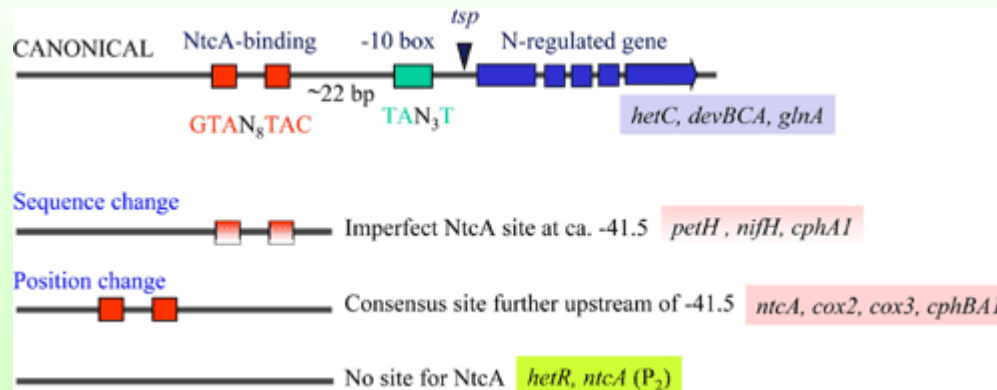
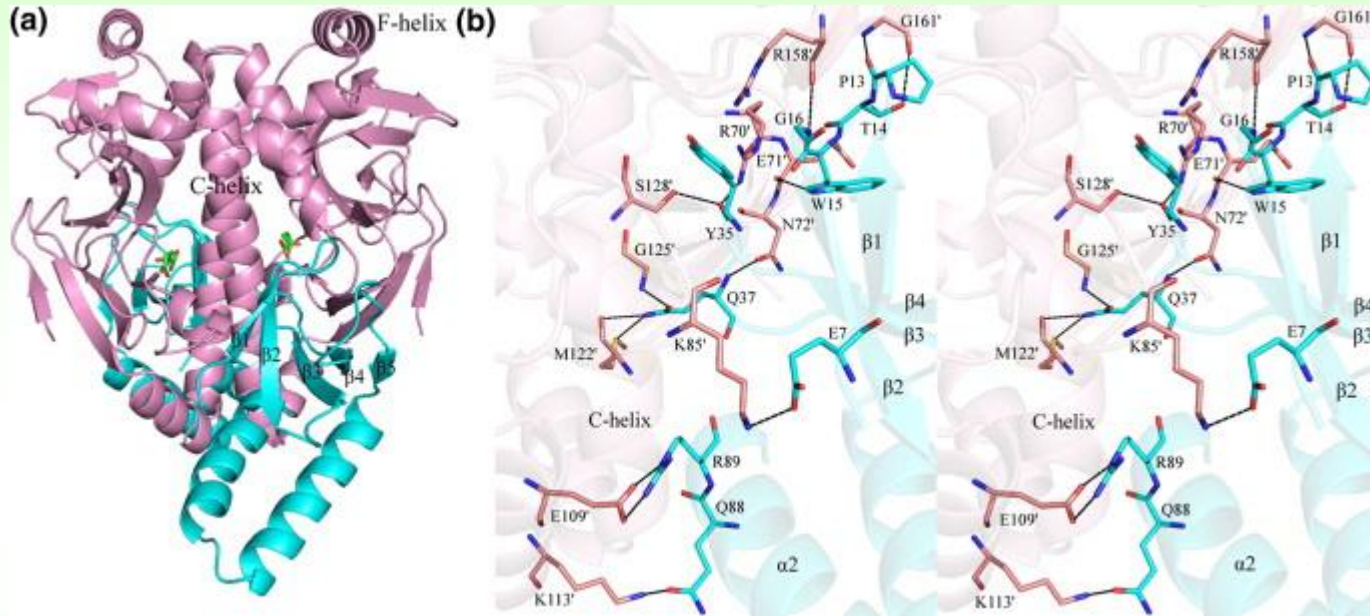
Promotorbindung *in vitro* – DNA-Proteinkomplexe in der Plasmonresonanz-Spektroskopie
ndhF3 Promotorbindung durch CcmR in Gegenwart verschiedener Metaboliten



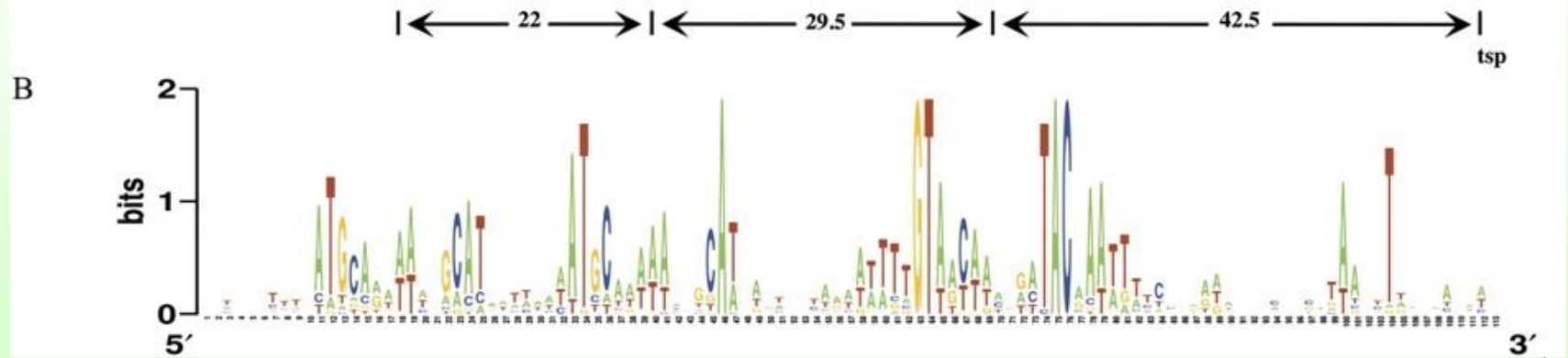
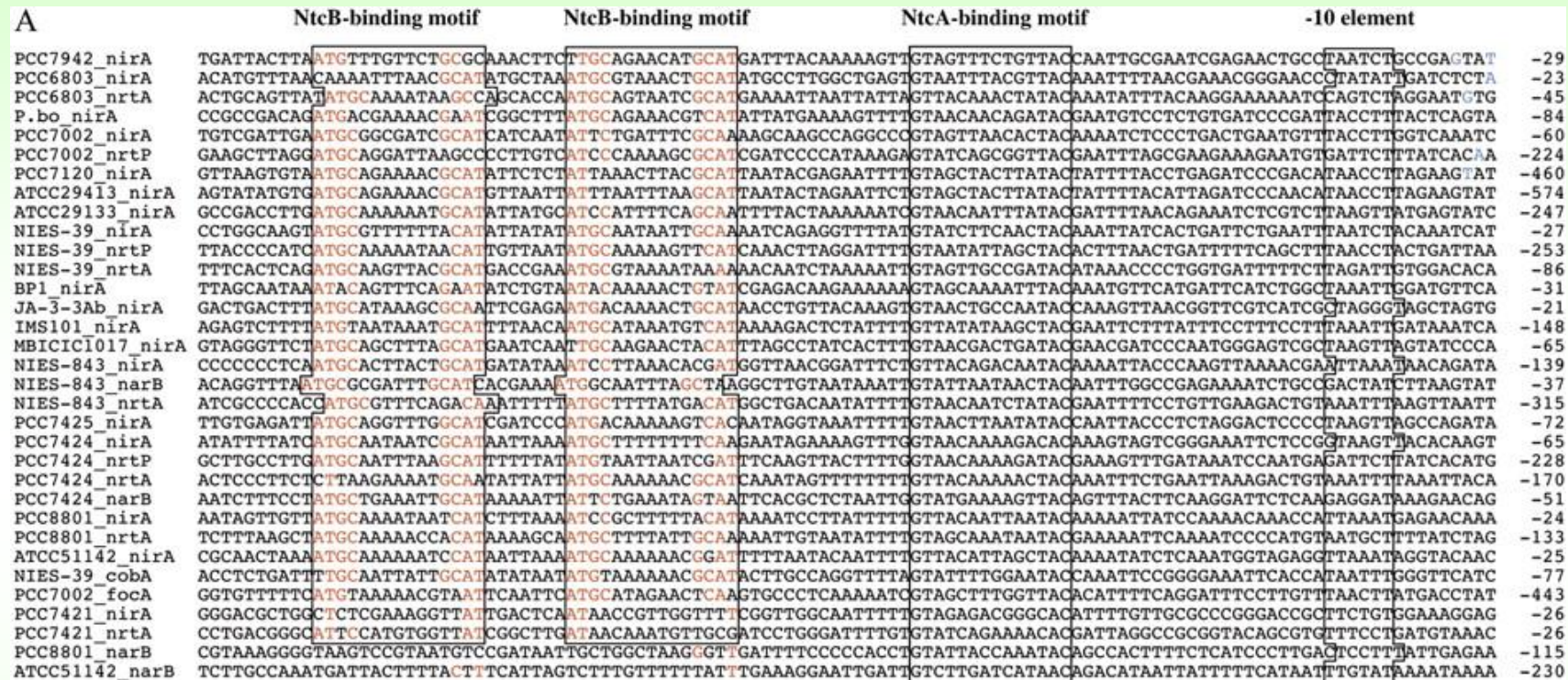
Modell zur Regulation der CO₂-Assimilation in Abhängigkeit von Metaboliten 2PG wirkt als Aktivator, NADP⁺ und 2OG wirken als Corepressoren!



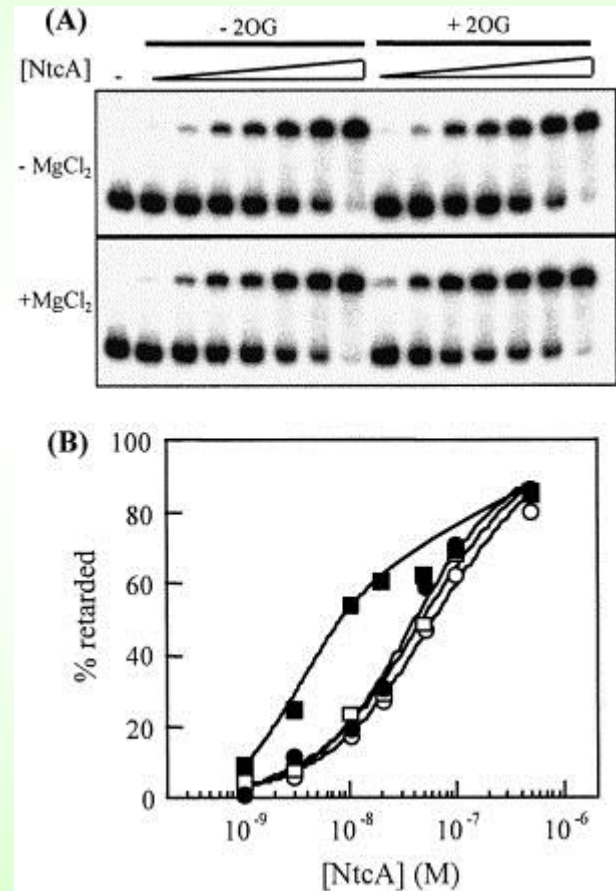
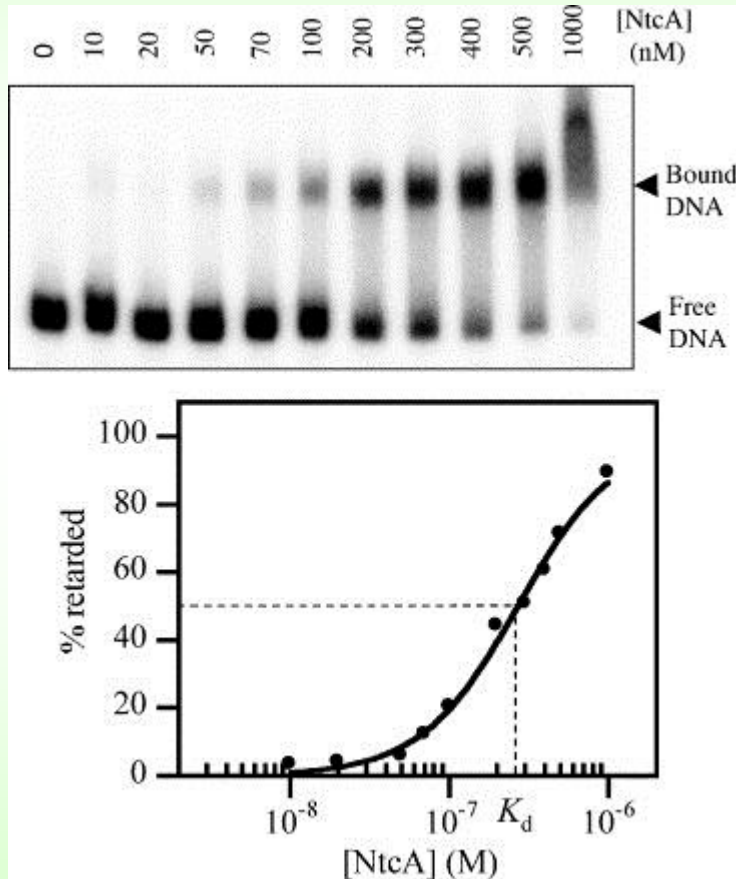
Gene der N-Assimilation werden durch den positiven Regulator NtcA aktiviert



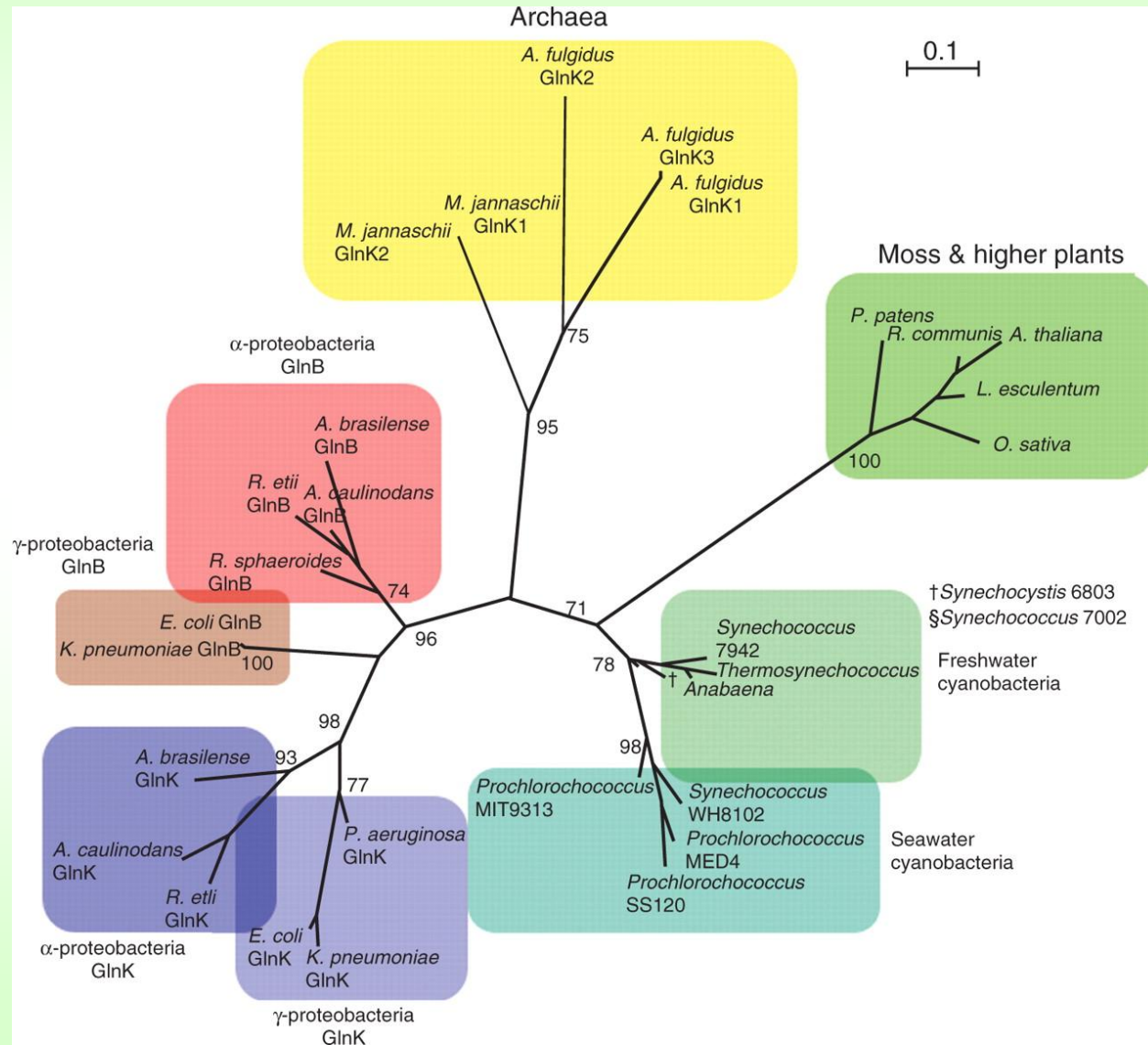
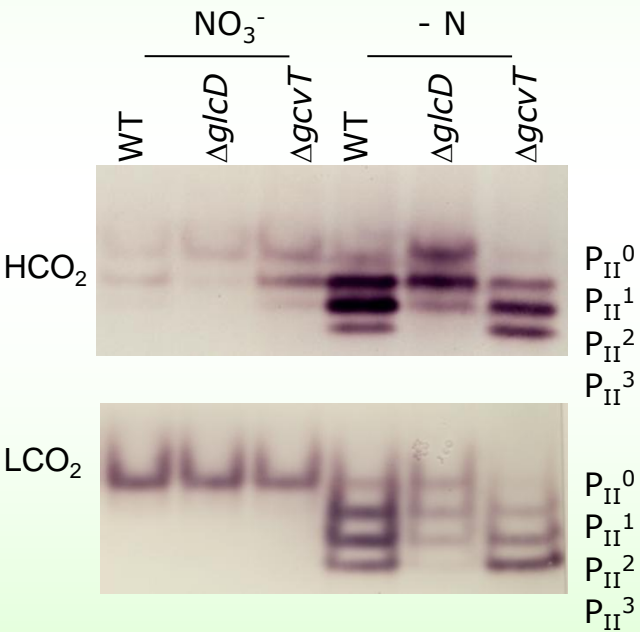
Die NtcA-Bindestelle erlaubt Vorhersagen über N-regulierte Gene



NtcA bindet in Abhängigkeit von Signalen an den Promotor – v.a. 2-Oxoglutarat

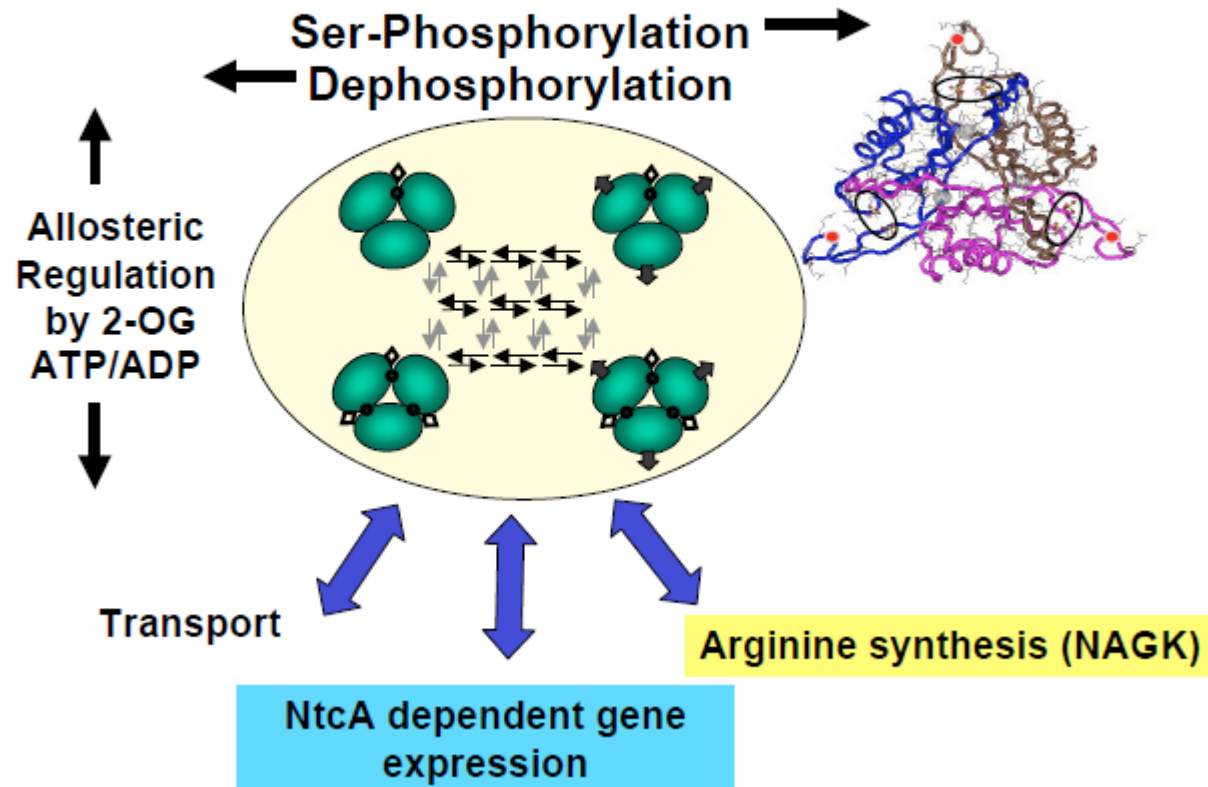


Das trimere PII Protein sensiert Änderungen im C/N Gehalt

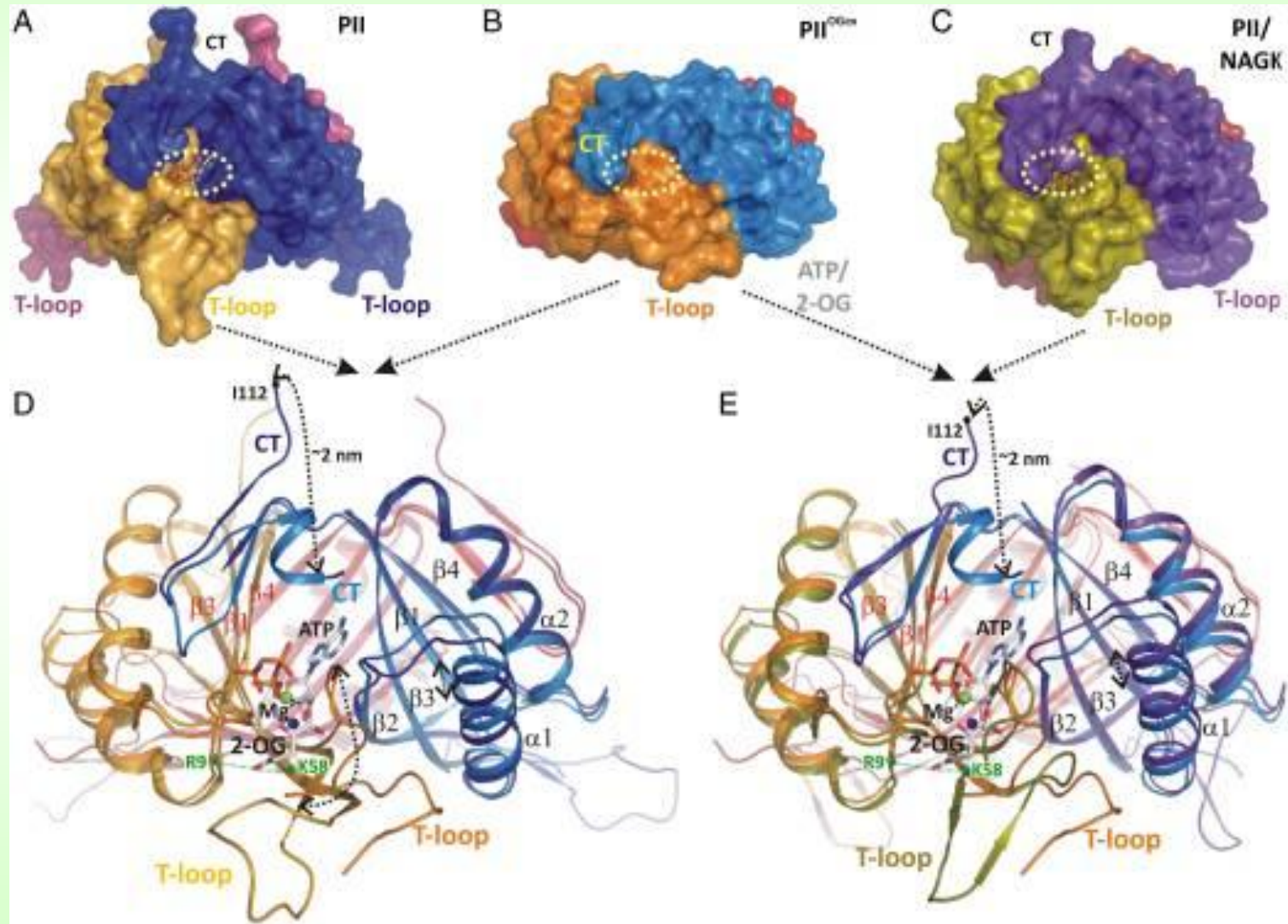


Das trimere PII Protein sensiert Änderungen im C/N Gehalt

PII Signaling in Cyanobacteria



Das trimere PII Protein verändert seine Struktur nach Bindung von 2-Oxoglutarat – NAGK-Aktivierung



Ein Adapterprotein verbindet PII und NtcA - PipX

PII control over NtcA : mediated by PipX

Yeast-Two Hybrid Screening:



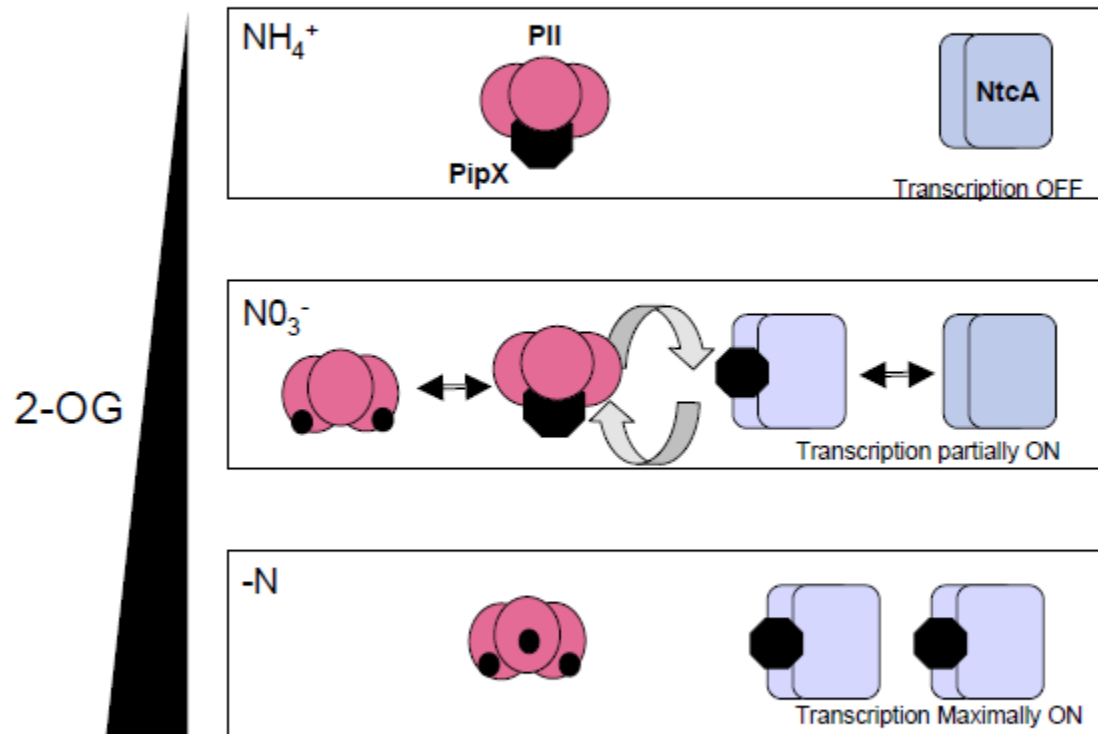
Biochemistry:

Interaction impaired by
ATP + 2-oxoglutarate
Insensitive towards
PII-Phosphorylation

Interaction
stimulated by 2-
oxoglutarate

2-Oxoglutarat übersetzt N-Mangel/Überschuss in NtcA-Akt.

PipX is a transcriptional co-activator of NtcA



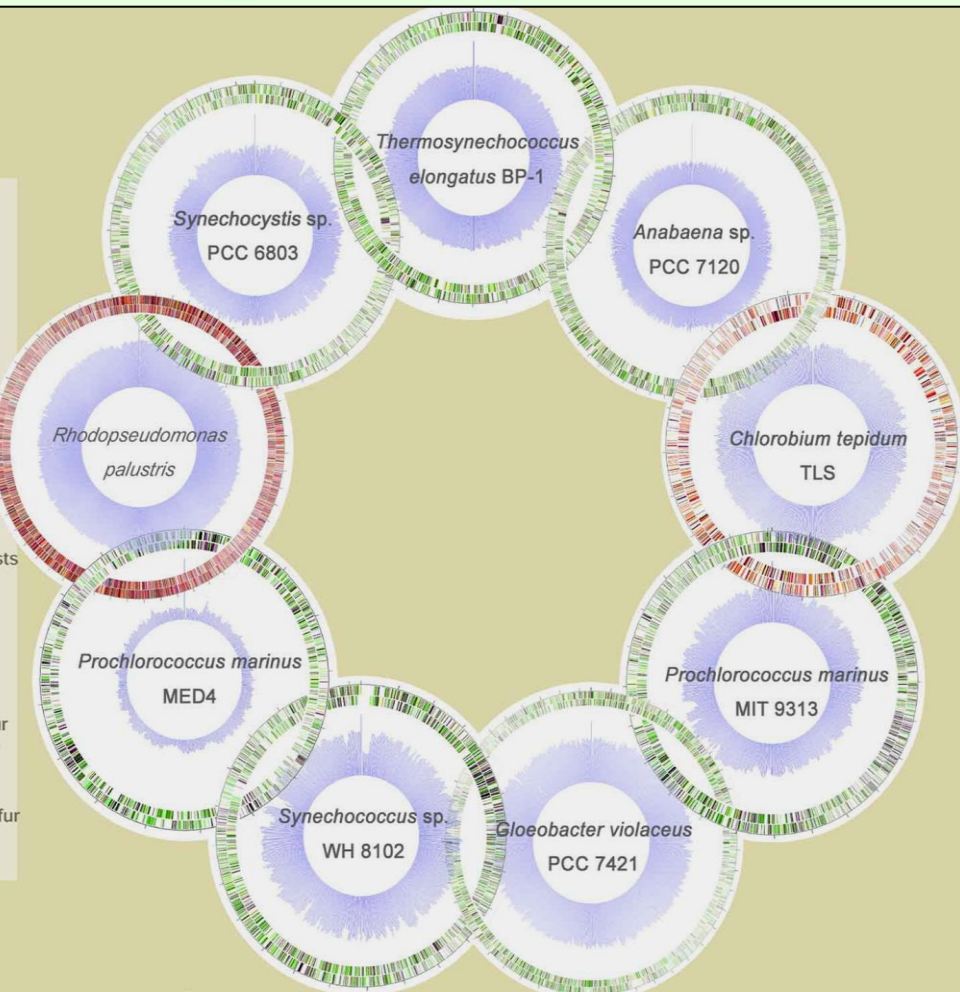
Espinosa et al., *Mol. Microbiol.* **61**: 457-466

**PII-Mutanten zeigten keine Änderung CO₂-regulierter Gene -
nur N-regulierte Gene waren dereguliert.**

Wir vermuten einen spezifischen CO₂-Aktivator?

**Wie ist das Ganze in Pflanzen reguliert?
Dort existieren PII sowie Homologe zu CcmR/NtcA etc.**

Zur Zeit sind ca. 130 Cyanobakteriengenome bekannt



***Synechocystis* sp. PCC 6803 – 3,57 Mbp**
Einzellig, euryhalin, transformierbar, 1996

***Nostoc punctiforme* ATCC 29133 – 9,76 Mbp**
Fädig, N-Fixierer, symbiotisch, konjugierbar

***Anabaena* sp. PCC 7120 – 6,41 Mbp**
Fädig, N-Fixierer, konjugierbar

***Gloeobacter violaceus* – 4,66 Mbp**
Einzellig, evolutionär alt, kein Thylakoidsystem

***Thermosynechococcus elongatus* – 2,60 Mbp**
Einzellig, thermophil, transformierbar

***Synechococcus* sp. WH8102 – 2,43 Mbp**
Einzellig, ozeanisch

***Prochlorococcus marinus* MIT9313 – 2,4 Mbp**
Einzellig, ozeanisch, Schwachlicht, mit Chl b

***Prochlorococcus marinus* MED4 – 1,66 Mbp**
Einzellig, ozeanisch, Starklichtstamm, mit Chl b

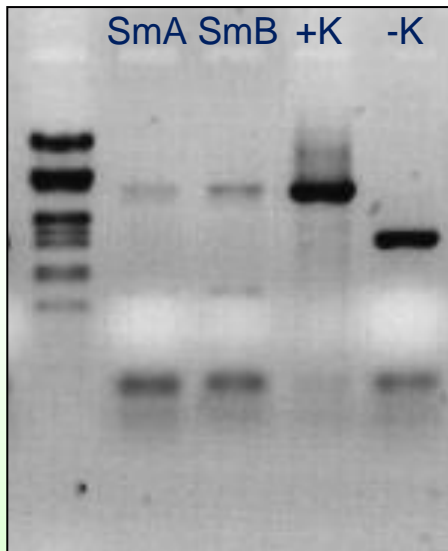
Mutationen in möglichen Transkriptionsfaktoren

Bachelorarbeit von Friedrich Kirsch

Untersuchung von Mutanten

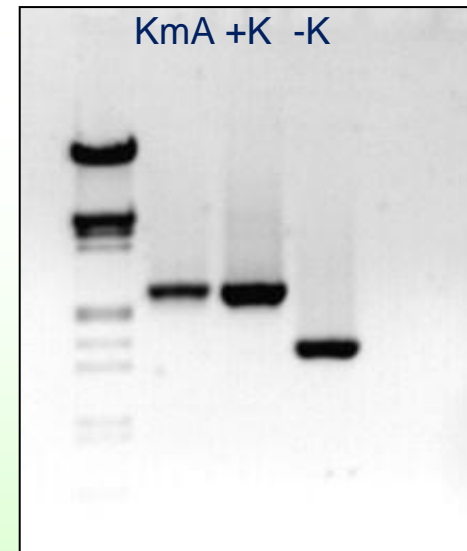
	Größe des PCR-Produkts
<i>sll8020</i> (WT)	1396 bp
<i>sll8020::Sm</i>	2772 bp
<i>slr0449</i> (WT)	1554 bp
<i>slr0449::Km</i>	2281 bp

$\Delta sll8020$



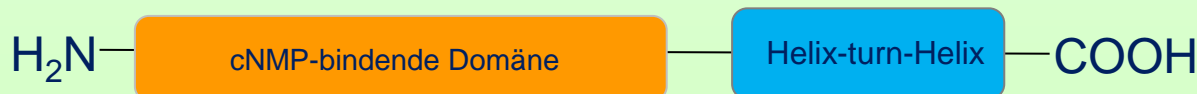
← Mutante
← WT-Gen

$\Delta slr0449$



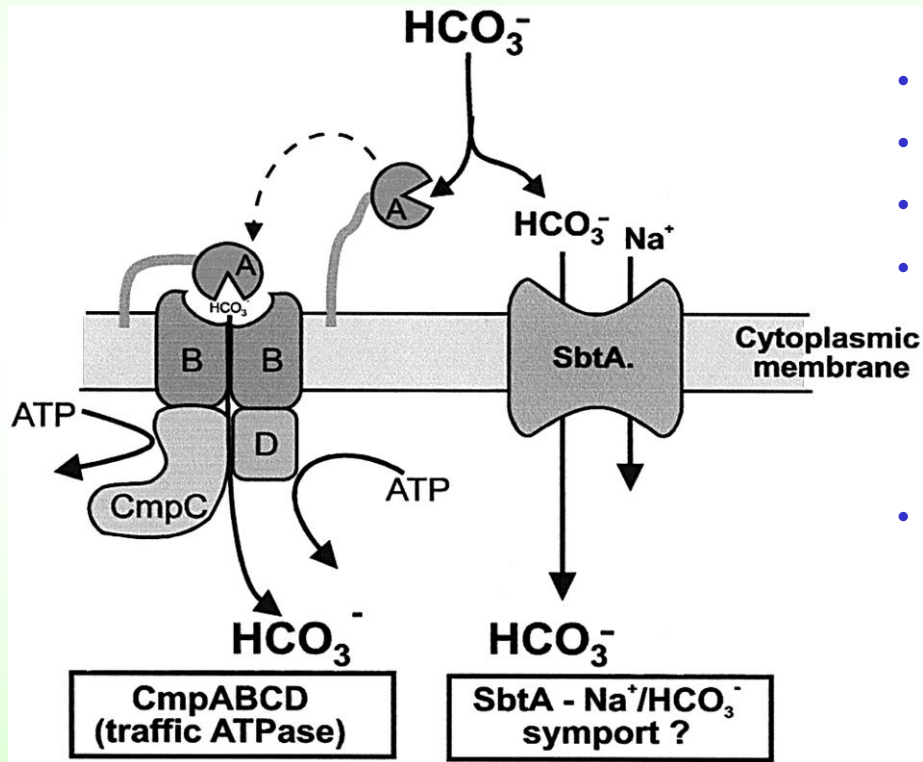
← Mutante
← WT-Gen

Mögliche Struktur von Slr0449 (ähnlich CAP!)



Expressionsuntersuchungen von CCM-Genen

Vergleich der Expression der CCM-Gene *sbtA* und *cmpA*



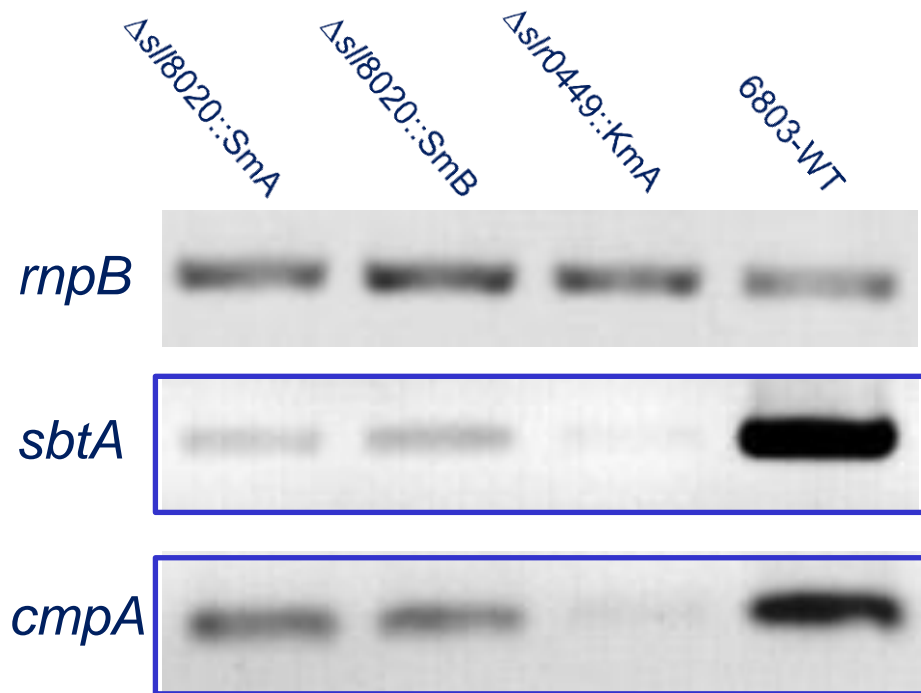
- Induktion beider Gene durch CO_2 -Mangel
- Transport von Bicarbonat
- SbtA: Na^+ -abhängiger Transport
- CmpA: Untereinheit von ABC-Transporter (ATP-Binding-Cassette)
- In Cyanobakterien sind insgesamt 5 Aufnahmesysteme für CO_2 bzw. HCO_3^- bekannt

Badger M R , Price G D J. Exp. Bot. 2003;54:609-622

©2003 by Oxford University Press

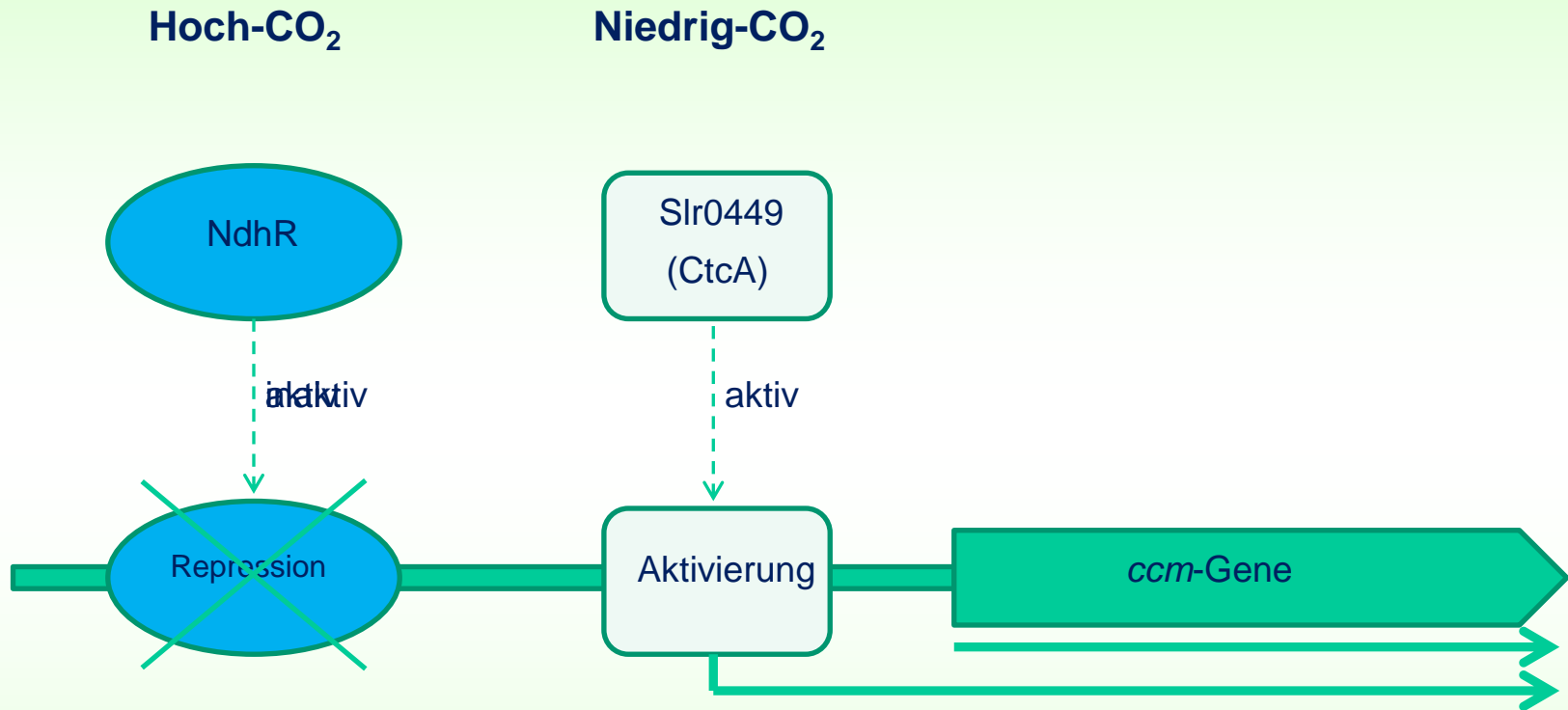
Expressionsuntersuchungen von CCM-Genen

Genexpression bei Niedrig-CO₂



Den Erwartungen entsprechend erfolgte die Expression von *sbtA* und *cmpA* bei CO₂-Mangel...
...allerdings unterschiedlich stark!

Modell zur transkriptionellen Regulation des CCM



Für die Expression der Gene des CCM ist neben der Inaktivierung des Repressors noch eine aktivierende Komponente erforderlich, die als CtcA (Slr0449) bezeichnet wird.

Mutationen in möglichen PII-Analogen

Masterarbeit von Florian Hase