

Die Biosynthese wasserlöslicher UV-Schutzsubstanzen (MAAs) und ihre Regulation in Cyanobakterien

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

dem Fachbereich Biologie/Chemie der
Universität Bremen
vorgelegt von

Anne Frida Magdalene Portwich

Bremen
Januar 2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1996 bis Januar 2000 am Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie in Bremen angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Widdel
2. Gutachter: Prof. Dr. Ferran Garcia-Pichel

Tag des Promotionskolloquiums: 24. März 2000

I N H A L T

Zusammenfassung.....	5
Summary.....	7
1 Einleitung.....	9
1.1 Biologische Schäden durch UV-Strahlung und Schutzmechanismen.....	12
1.2 Mycosporine-like amino acids (MAAs)	15
1.3 Biosynthesewege von Sekundärmetaboliten.....	20
1.4 Photorezeptoren.....	23
1.5 Das Cyanobakterium <i>Chlorogloeopsis</i> PCC 6912	26
1.6 Fragestellung	27
1.7 Literaturverzeichnis	28
2 Ergebnisse und Diskussion.....	39
2.1 Physiologie der MAA-Biosynthese	41
2.2 Biochemie der MAA-Biosynthese.....	45
2.3 UVB-Photorezeptor	47
2.4 Schlußbetrachtung	48
2.5 Literaturverzeichnis	50
3 Ultraviolet and osmotic stresses induce and regulate the synthesis of mycosporines in the cyanobacterium <i>Chlorogloeopsis</i> PCC 6912	55
4 Biosynthesis of mycosporine-like amino acids in the cyanobacterium <i>Chlorogloeopsis</i> PCC 6912	73
5 A novel prokaryotic UVB photoreceptor in the cyanobacterium <i>Chlorogloeopsis</i> PCC 6912.....	95
Erläuterungen zu den Publikationen	113
Danksagung	115

ZUSAMMENFASSUNG

Mycosporine-like amino acids (MAAs) sind Sekundärmetabolite, die in Cyanobakterien und einigen eukaryotischen Organismen (besonders in Pilzen und Algen) produziert werden. Sie bestehen aus einem Cyclohexengerüst, das mit ein oder zwei Aminen odere Aminosäuren substituiert ist. Das Absorptionsspektrum der MAAs weist ein einzelnes Maximum im UV-Bereich zwischen 310 und 360 nm auf, dessen Lage von den variablen Amino-Substituenten abhängig ist. MAAs wird eine Funktion als passive UV-Schutzsubstanzen zugeschrieben, die durch Absorption der Strahlung empfindliche Zellkomponenten wie DNA oder Proteine vor Schädigungen schützen („UV-Sunscreens“).

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Physiologie und die Biochemie der MAA-Biosynthese in dem Cyanobakterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912 untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß das Cyanobakterium die MAAs Mycosporin-Glycin und Shinorin synthetisieren kann. Ihre Biosynthese konnte durch UVB-Strahlung (280–320 nm) oder durch osmotischen Streß induziert werden. Die gleichzeitige Anwendung beider Streßfaktoren hatte einen synergistischen Effekt auf die MAA-Biosynthese. Dies deutet darauf hin, daß in Organismen, die wasserlösliche UV-Schutzsubstanzen intrazellulär anreichern, eine Regulation der Biosynthese sowohl durch UV-Strahlung als auch durch die externen osmotischen Bedingungen stattfindet. Obwohl osmotischer Streß die MAA-Synthese induzieren konnte, ergab ein Vergleich der Gehalte der Zuckerosmolyte (Glucose und Trehalose) mit demjenigen der MAAs, daß MAAs keine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichtes in diesem Organismus spielen.

Um den biosynthetischen Ursprung des MAA-Ringes und der Seitenketten aufzuklären, wurden Experimente mit Inhibitoren und radioaktiv markierten Substanzen durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigen die Annahme, daß die Biosynthese des MAA-Ringes aus dem Shikimat-Weg abzweigt. Außerdem konnte bewiesen werden, daß die Amino-Seitenketten der MAAs von den entsprechenden Aminosäuren abstammen und daß das monosubstituierte Mycosporin-Glycin die biosynthetische Vorstufe des bisubstituierten Shinorin ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die hohe MAA-Diversität, die in der Natur vorkommt, verursacht wird von Variationen der späten Biosyntheseschritte, dem Einbau der Aminosäuren.

Es konnte gezeigt werden, daß *Chlorogloeopsis* PCC 6912 einen Photorezeptor besitzt, der für die photosensorische Induktion der MAA-Synthese verantwortlich ist. Dies ist die erste Beschreibung eines UV-spezifischen Photorezeptors in einem Prokaryoten. Da Salzstreß die MAA-Biosynthese unter heterotrophen Bedingungen induzieren konnte, wurde deutlich, daß weder sichtbares Licht noch UV-Strahlung für die biochemischen

Reaktionen der MAA-Biosynthese notwendig sind. Demzufolge ist die UVB-Abhängigkeit zurückzuführen auf einen entsprechenden Photorezeptor. Ein Aktionsspektrum der Shinorin-Synthese zeigte ein einzelnes Maximum bei 310 nm und nahm im UVA-Bereich (320-400 nm) ab, wobei oberhalb von 340 nm keine Aktivität festgestellt wurde. Ein Pterin wird als Chromophor in Erwägung gezogen, da das Absorptionsspektrum von reduzierten Pterinen eine Ähnlichkeit mit dem Aktionsspektrum der Shinorin-Biosynthese aufweist und sowohl ein Inhibitor der Pterin-Biosynthese als auch ein Antagonist des angeregten Zustandes von Pterinen eine negative Wirkung auf die photosensorische Induktion der MAA-Biosynthese hatten.

SUMMARY

Mycosporine-like amino acids (MAAs) are secondary metabolites produced by cyanobacteria and some eukaryotic organisms, especially fungi and algae. They consist of a cyclohexene core substituted with one or two amines or amino acids. The absorption spectrum of MAAs contains a single peak in the UV region with a maximum that depends on the specific amino substituents and varies between 310 and 360 nm. MAAs presumably function as passive UV sunscreens by absorbing radiation before it can cause cellular damage in targets such as DNA and proteins.

In this study I investigated the physiology and biochemistry of MAA biosynthesis in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912. The cyanobacterium was found to produce the MAAs mycosporine-glycine and shinorine. Their biosynthesis could be induced specifically either by exposure to UVB radiation (280-320 nm) or by osmotic stress. A significant synergistic enhancement of MAA synthesis was observed when both stress factors were applied in combination. This finding is interpreted in terms of an adaptive necessity for a combined regulatory control responding to both UV and external osmotic conditions in organisms that accumulate water-soluble sunscreens intracellularly. Even though osmotic stress could induce MAA synthesis, a comparison of the intracellular contents of MAAs with those of sugar osmolytes (glucose and trehalose) indicated that MAAs played no significant role in attaining osmotic homeostasis in this organism.

With respect to the biosynthetic origin of core and side chains of the MAAs, results of tracer and inhibitor experiments strongly suggest that the MAA core is derived from the shikimate pathway. Furthermore, it was proven that the side chains of the MAAs stem from the corresponding amino acids and that the monosubstituted mycosporine-glycine is the biosynthetic precursor of the bisubstituted shinorine. These results support the idea that the large diversity of MAA molecules found in nature is caused by variations in the late steps of biosynthesis, which add amino-moieties to the core.

Chlorogloeopsis PCC 6912 was shown to contain a photoreceptor that mediates the photosensory induction of MAA synthesis by UV. This is the first UV-specific photoreceptor found in a prokaryote. Using salt induction experiments under heterotrophic growth conditions it became clear that neither visible light nor UV radiation are necessary for the biosynthetic reactions of MAA production. This indicated that a photoreceptor must be responsible for the UV photosensory capacity of the organism. An action spectrum of shinorine synthesis showed a distinct peak at 310 nm tailing down in the UVA region (320-400 nm) without activity above 340 nm. Since reduced pterins present

Summary

absorption spectra congruent with such an action spectrum, and since both an inhibitor of pterin biosynthesis and an antagonist of excited states of pterins depressed the photosensory efficiency of induction, I propose a pterin as a likely candidate for the chromophore of the photoreceptor.

Kapitel 1

Einleitung

1 EINLEITUNG

Sonnenstrahlung ist für viele Lebensformen essentiell, entweder als Energiequelle für die Photosynthese oder zur Orientierung in der Umwelt. Neben positiven Auswirkungen kann sie aber auch Zellschädigungen verursachen. Für diesen Effekt ist vor allem der Anteil des Sonnenlichtes mit Wellenlängen unter 400 nm verantwortlich (UV-Strahlung). Phototrophe Organismen, die aufgrund ihrer Abhängigkeit vom Licht als Energiequelle der Sonnenstrahlung ausgesetzt sind, erfahren häufig hohe Intensitäten von UV-Strahlung. Es ist deshalb für solche Organismen von Vorteil, über Mechanismen zu verfügen, die diesen Schädigungen vorbeugen oder sie rückgängig machen. Zu den vorbeugenden Mechanismen gehören die UV-Schutzsubstanzen („Sunscreens“), die einen Teil der UV-Strahlung absorbieren und dadurch die Dosis für die übrigen Zellkomponenten reduzieren. Eine entsprechende UV-Schutzfunktion wurde auch den MAAs (Abkürzung für „mycosporine-like amino acids“) zugeschrieben. Diese niedermolekularen, wasserlöslichen Metabolite, die aus einem mit ein oder zwei Aminen oder Aminosäuren substituierten Kohlenstoffring bestehen, zeichnen sich durch eine einzelne Absorptionsbande im UV-Bereich aus. Die Biosynthese dieser Metabolite kann durch UV-Strahlung angeregt werden. MAAs sind weit verbreitet, sie kommen unter anderem in Cyanobakterien vor. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die Physiologie, die Biochemie und der für die UV-Induktion verantwortliche Photorezeptor der MAA-Biosynthese in dem Cyanobakterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912 untersucht.

In dieser Einleitung wird eine kurze Einführung in Themen gegeben, die für diese Arbeit relevant sind. Zunächst wird näher auf biologische UV-Schädigungen und mögliche Schutzmechanismen unter besonderer Berücksichtigung der MAAs eingegangen. Anschließend folgt eine kurze Einführung in Biosynthesewege von Sekundärmetaboliten. Dann werden mögliche Chromophore von UVB-Photorezeptoren behandelt. Schließlich wird das Cyanobakterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912 vorgestellt. Am Ende des Kapitels werden die Fragestellungen, mit denen sich diese Arbeit befaßt, dargelegt.

1.1 Biologische Schäden durch UV-Strahlung und Schutzmechanismen

UV-Strahlung wird üblicherweise anhand ihrer Wirkung auf biologische Systeme in drei verschiedene Wellenlängenbereiche eingeteilt. In diesem Abschnitt werden nur die UVA-Strahlung (320–400 nm) und die UVB-Strahlung (280–320 nm) behandelt. Die solare UVC-Strahlung mit Wellenlängen unter 280 nm erreicht die Erdoberfläche nicht, da sie vollständig von der stratosphärischen Ozonschicht absorbiert wird, und spielt demzufolge in biologischen Systemen keine Rolle (Kasting *et al.*, 1992). UV-Strahlung verursacht Zellschäden, indem sie chemische Reaktionen von biologisch wichtigen Molekülen auslöst. Davon betroffen sind einerseits Moleküle, die die UV-Strahlung direkt absorbieren und sich dadurch chemisch verändern („primary effect“), andererseits Zellbestandteile, die indirekt durch Reaktionen mit von UV-Strahlung aktivierten Substanzen („photosensitizer“) geschädigt werden („secondary effect“) (Häder & Tevini, 1987; Spikes, 1989).

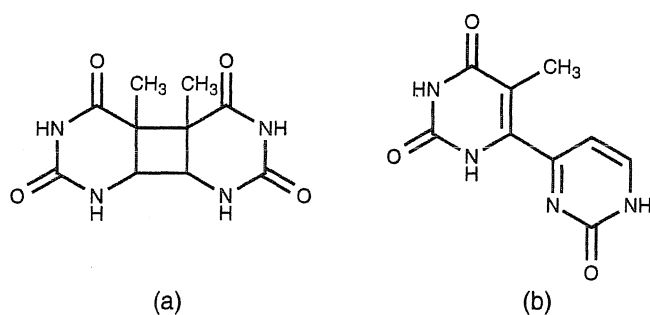


Abb. 1: DNA-Photoprodukte: (a) Cyclobutyl-Pyrimidin-Dimer, (b) Pyrimidin(6-4)pyrimidinon-Addukt

UVB-Strahlung wird hauptsächlich von Molekülen mit π -Elektronensystemen wie DNA-Basen und aromatischen Aminosäuren absorbiert. Besonders anfällig für Photoreaktionen sind die Pyrimidine Thymin und Cytosin, wobei die beiden häufigsten Photoprodukte der Cyclobutyl-Pyrimidin-Dimer (CPD; Abb. 1a) und das Pyrimidin(6-4)pyrimidinon-Addukt ((6-4)PD; Abb. 1b) sind (Jeffrey *et al.*, 1996; Weinbauer *et al.*, 1999). Beide Produkte können die DNA-Synthese und die Gen-Transkription inhibieren, allerdings ist das (6-4)PD-Addukt deutlich effektiver bei der Blockierung der DNA-Polymerase, so daß dieses Produkt wahrscheinlich für die meisten der lethalen UVB-Effekte verantwortlich ist (Jeffrey *et al.*, 1996). Um die UV-Schädigungen an Proteinen zu verstehen, wurde exemplarisch die Wirkung von UV-Strahlung auf die ATPase untersucht. Dabei wurden Koformationsänderungen und Verlust der Aktivität festgestellt (Chávez & Cuéllar, 1984). Das Aktionsspektrum für diesen Prozess besitzt ein Maximum bei 290 nm,

was dafür spricht, daß Tryptophanreste eine wichtige Rolle bei der UV-Absorption spielen (Murphy, 1983). Zahlreiche Studien zu UV-Effekten auf Membranen belegten akute Membranschäden, wobei jedoch kurze Bestrahlungszeiten mit intensiver UVC-Strahlung angewandt wurden, die nicht den natürlichen Bedingungen entsprachen (Murphy, 1983). Neuere Untersuchungen mit niedrigeren Dosen von UVB-Bestrahlung zeigten, daß Lipid- und Fettsäuremetabolismus je nach Spezies unterschiedlich auf die Strahlung reagierten und kein allgemein gültiges Muster festzustellen war (Goes *et al.*, 1994). Eine Gemeinsamkeit in vielen Fällen war allerdings die Verringerung mehrfach ungesättigter Fettsäuren nach UVB-Exposition, die auf eine Inhibition der Biosynthese zurückgeführt wurde (Goes *et al.*, 1994; Skerratt *et al.*, 1998).

Anders als bei der UVB-Strahlung spielt bei den von UVA-Strahlung verursachten Schäden Sauerstoff eine entscheidende Rolle (Tyrrell & Keyse, 1990). Dabei wird die UVA-Strahlung von Chromophoren wie Porphyrinen (Kjeldstad & Johnsson, 1986; Sammartano & Tuveson, 1987; Tuveson & Sammartano, 1986), Flavinen (Kramer & Ames, 1987) und Tryptophan (McCormick *et al.*, 1976) absorbiert, was zur Bildung von reaktiven Sauerstoffmolekülen wie Singulett-Sauerstoff oder Hydroperoxydionen führt, die wiederum mit empfindlichen Zellbestandteilen reagieren können (Tyrrell & Keyse, 1990). Zu solchen Reaktionen gehört die Peroxidation von Lipiden, die auf Radikalreaktionen der aktivierten Sauerstoffmoleküle mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren beruht und zu strukturellen Veränderungen in der Membran führen kann (Black, 1987). Verknüpfungen zwischen DNA und Proteinen, die wahrscheinlich bedeutendsten DNA-Reaktionen unter UVA-Strahlung, sind ebenfalls abhängig von Sauerstoff (Gantt *et al.*, 1979) und werden vermutlich von Porphyrinen als Photosensitizer verursacht (Peak *et al.*, 1985).

1.1.1 UV-Schäden in oxygenen phototrophen Organismen

Oxygene phototrophe Organismen sind aufgrund ihres Energiemetabolismus auf Licht angewiesen und deshalb häufig hohen UV-Belastungen ausgesetzt. Phänomenologisch macht sich die UV-Schädigung durch Hemmung des Wachstums und der Photosynthese bemerkbar (Cullen & Neale, 1994; Suresh Babu *et al.*, 1998). Diese Effekte beruhen zu einem Großteil auf der Photoinhibition der Photosynthese. Ursachen für diese Photoinhibition sind Veränderungen von Zellkomponenten, die zu Funktionsverlust führen können. Davon betroffen sind die Integrität der Thylakoidmembran, Enzyme wie ATP-Synthase und Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase (Rubisco) und in hohem Maße das

Photosystem II (Strid *et al.*, 1990; Strid *et al.*, 1994). Im Photosystem II wird die Photoinhibition vor allem durch die Beschädigung des D1-Proteins im Reaktionszentrum verursacht (Aro *et al.*, 1993).

Als Mikroorganismen sind Cyanobakterien aufgrund ihrer geringen Größe, die kurze Weglängen und damit eine geringe Abschwächung der UV-Strahlung in der Zelle zur Folge hat, prinzipiell besonders anfällig für UV-Schäden (Karentz *et al.*, 1994). Neben den bereits beschriebenen Auswirkungen von UV-Streß sind in Cyanobakterien besonders die als Antennenpigmente fungierenden Phycobilisomen betroffen. Die UV-Strahlung schädigt sowohl den Proteinanteil als auch die Bilin-Chromophore, was zu einem Funktionsverlust der Pigmente führt (Lao & Glazer, 1996). Auch die Stickstoff-Fixierung wird von UV-Streß beeinträchtigt. Einerseits kommt es zu einem Aktivitätsverlust der Nitrogenase, andererseits wird die Entwicklung von Heterocysten bei erhöhter UV-Strahlung gehemmt (Sinha *et al.*, 1996). Doch bereits während ihrer Evolution mußten Cyanobakterien in der Lage sein, hohe UV-Belastungen zu tolerieren, da ihre Ursprünge bis in die Zeit vor der Entstehung der Ozonschicht zurückreichen (Castenholz, 1997). Demzufolge ist zu erwarten, daß in Cyanobakterien Mechanismen entstanden sind, die sie vor den Beeinträchtigungen durch UV-Strahlung schützen.

1.1.2 Mechanismen zum Schutz vor UV-Schäden

UV-Schutzmechanismen werden in die Kategorien Prävention und Reparatur eingeteilt. Reparaturmechanismen dienen dazu, bereits entstandene Schäden rückgängig zu machen. Bestandteil eines solchen Reparaturmechanismus ist zum Beispiel die DNA-Photolyase, die DNA-Schäden behebt, indem sie unter Absorption von Licht die aus zwei Pyrimidinen entstandenen Cyclobutandimere spaltet (Strid *et al.*, 1994). Präventivmaßnahmen verhindern die Entstehung von UV-Schäden. Zu diesen Mechanismen gehört die Inaktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies. Dies geschieht entweder durch Antioxidantien wie Ascorbinsäure, Tocopherol und Carotinoide oder enzymatisch durch Superoxiddismutase, Katalase und Ascorbatperoxidase (Black, 1987). Eine weitere vorbeugende Maßnahme ist die Verminderung der UV-Intensität für den betroffenen Organismus, zum Beispiel durch ein Ausweichen in einen Lebensraum, in dem die UV-Intensität niedriger ist. So wurde in mikrobiellen Matten beobachtet, daß das Cyanobakterium *Microcoleus chthonoplastes* bei UV-Streß in tiefere Schichten der Matte ausweicht (Bebout & Garcia-Pichel, 1995). Der Entstehung von UV-Schäden kann auch

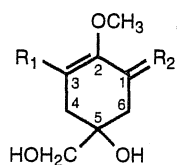


Abb. 2: Allgemeine Formel eines MAAs. R_1 und R_2 bezeichnen die variablen Substituenten, dabei handelt es sich entweder um ein Amin/Aminosäure oder um eine Hydroxylgruppe.

durch die Synthese von UV-Schutzsubstanzen vorgebeugt werden. Diese Moleküle absorbieren die einfallende UV-Strahlung und verhindern somit, daß zellschädigende Reaktionen biologisch wichtiger Moleküle stattfinden. In Menschen und Tieren erfüllt Melanin diese Funktion (Kollias *et al.*, 1991), während in Pflanzen Flavonoide für die UV-Absorption verantwortlich sind (Strid *et al.*, 1994). Einige Cyanobakterien synthetisieren das extrazelluläre Pigment Scytonemin, für das eine UV-Schutzfunktion nachgewiesen wurde (Garcia-Pichel & Castenholz, 1991; Garcia-Pichel *et al.*, 1992). In die Gruppe der UV-Sunscreens fallen aller Wahrscheinlichkeit nach auch die MAAs, die in Abschnitt 1.1.2 ausführlich behandelt werden.

Ein Maß für den UV-Schutz eines Sunscreens ist der Sunscreen-Faktor. Er wird definiert als der Anteil der auftreffenden Strahlung, der von dem Sunscreen absorbiert wird, und liegt zwischen 0 (kein Schutz) und 1 (völlige Abschirmung) (Garcia-Pichel & Castenholz, 1993). Für einen extrazellulären UV-Schutz ergibt sich der Sunscreen-Faktor (S) für eine bestimmte Wellenlänge (λ) aus der Transmission (T) der extrazellulären Schicht:

$$S(\lambda) = 1 - T(\lambda) \quad (1)$$

Für eine intrazelluläre Substanz muß über die gesamte Zelle integriert werden. Eine annähernde Lösung dieses Integrals (Garcia-Pichel & Castenholz, 1993) ergibt einen durchschnittlichen Sunscreen-Faktor, der von der Transmission der gesamten Zelle (T_d) wie folgt abhängt:

$$S(\lambda) = 1 - \frac{(T_d - 1)}{\ln T_d} \quad (2)$$

Damit ist ein intrazellulärer Sunscreen bei gleicher Konzentration um so effektiver, je größer der Zelldurchmesser ist (Garcia-Pichel, 1994).

1.2 Mycosporine-like amino acids (MAAs)

MAAs (mycosporine-like amino acids) sind Sekundärmetabolite, die aus einem Cyclohexengerüst bestehen, das mit einer Methoxygruppe (am Kohlenstoffatom C2), einer Hydroxymethylgruppe und einer Hydroxygruppe (beide an Position C5) substituiert ist. Zusätzlich trägt der Ring noch zwei weitere variable Substituenten an den Kohlenstoffatomen C1 und C3 (Abb.2). Bei den monosubstituierten MAAs ist der eine Rest ein Amin oder eine Aminosäure und der andere eine Hydroxylgruppe, so daß es sich bei dem Molekül um ein Enol handelt. Bei den bisubstituierten MAAs wird dieses Enol zu einem Enamin, da der Sauerstoff durch ein Amin oder eine Aminosäure ersetzt wird. Spektroskopisch zeichnen sich MAAs durch ein charakteristisches Absorptionsspektrum aus, das eine einzelne Absorptionsbande mit einem Maximum im UV-Bereich zwischen 310 und 360 nm hat. Die genaue Lage dieses Maximums ist abhängig von der Natur und der Anzahl der substituierenden Amine (Abb. 3). Eine blaue Fluoreszenz, wie sie von Yoshida und Sivalingam (1970) und auch in späteren Studien beschrieben wurde (Sinha *et al.*, 1998; Sivalingam *et al.*, 1976), konnte mit aufgereinigten MAAs nicht nachgewiesen werden (Garcia-Pichel, persönliche Mitteilung, und eigene Experimente). Die Tatsache, daß bei den Fluoreszenzmessungen von Yoshida und Sivalingam mit einer Wellenlänge angeregt wurde, bei der MAAs nicht absorbieren, läßt vermuten, daß andere Substanzen für die beobachtete Fluoreszenz verantwortlich waren.

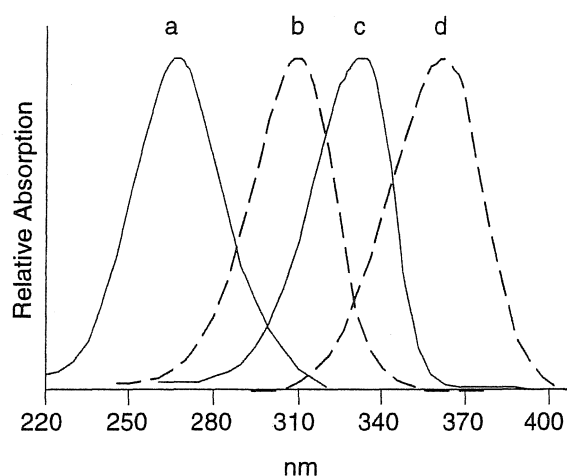


Abb. 3: Absorptionsspektren von (a) 6-Deoxygadusol (MAA-Gerüst ohne Aminosäuren), (b) monosubstituiertem MAA (Mycosporin-Glycin), (c) bisubstituiertem MAA (Shinorine), (d) wahrscheinlich bisubstituiertem MAA mit konjugierter Doppelbindung in der Seitenkette (unbekanntes MAA aus *Dactylococcopsis salina* PCC 8305).

Das Vorkommen von MAAs wurde zuerst für Pilze beschrieben, bei denen die Sporenbildung UV-induzierbar ist. Aus dem sporenbildenden Mycel wurden nach UV-Bestrahlung sogenannte P310-Substanzen isoliert, die sich durch ein Absorptionsmaximum bei 310 nm und eine sehr gute Wasserlöslichkeit auszeichneten. In dunkel-inkubierten Organismen konnten die Substanzen nicht nachgewiesen werden (Trione & Leach, 1969). Die erste chemisch charakterisierte Substanz dieser Klasse stammt aus *Stereum hirsutum* (Basidiomycet). Dabei handelte es sich um ein substituiertes Cyclohexen mit einem Serinolrest in der Seitenkette (Abb. 4b) (Favre-Bonvin *et al.*, 1976). Die Autoren gaben diesem Molekül den Name „Mycosporine“, da es aus den Sporen eines Pilzes isoliert wurde. Es wurde vermutet, daß Mycosporin und verwandte Substanzen Sporenbildung in Pilzen induzieren können; es wurde versucht, diese Funktion nachzuweisen (Trione & Leach, 1969), doch da die Experimente nicht mit einer vollständig aufgereinigten Substanz durchgeführt wurden, ist es ungewiss, ob der gemessene Effekt wirklich auf eine entsprechende Wirkung der MAAs zurückzuführen ist.

Substanzen mit sehr ähnlichen spektroskopischen Eigenschaften und verwandten chemischen Strukturen wurden in einer Vielzahl von autotrophen und heterotrophen Organismen nachgewiesen, unter anderen in Rotalgen (Takano *et al.*, 1978; Tsujino *et al.*, 1980), Dinoflagellaten (Carreto *et al.*, 1990), Korallen (Dunlap & Shick, 1998) und Seesternen (Nakamura *et al.*, 1981). In Anlehnung an die Namensgebung von Trione und Leach (1969) wurde diese Substanzklasse als „mycosporine-like amino acids“ bezeichnet, da das Cyclohexen in vielen Fällen mit ein oder zwei Aminosäuren substituiert ist. In

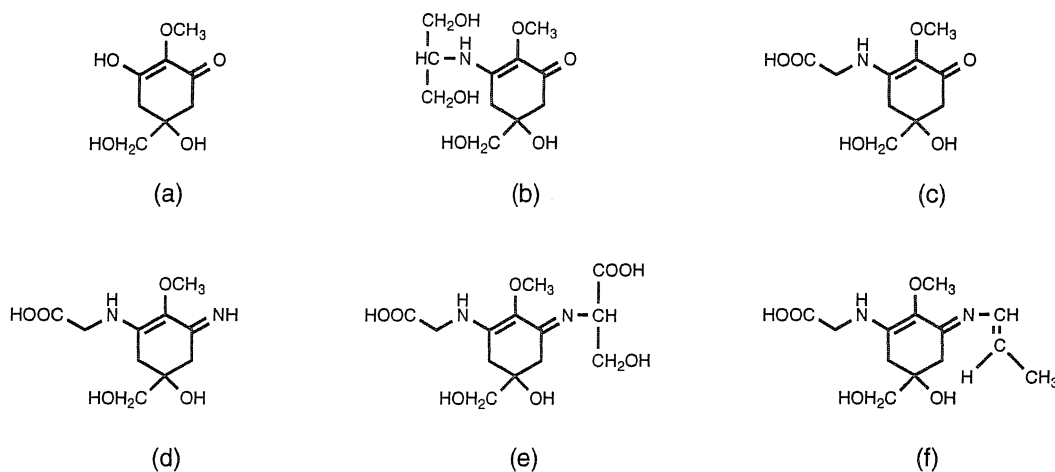


Abb. 4: Verschiedene MAAs und MAA-Derivate. In Klammern sind die Wellenlängen der Absorptionsmaxima angegeben. (a) 6-Deoxygadusol (268 nm bei pH ≤ 5), (b) Mycosporin (310 nm), (c) Mycosporin-Glycin (310 nm), (d) Palythin (320 nm), (e) Shinorin (333 nm), (f) Usujiren (*cis*, 354 nm), Palythen (*trans*, 360 nm).

einigen Fällen gibt der Name an, mit welchem Amin bzw. welcher Aminosäure der Ring substituiert ist, zum Beispiel bei Mycosporin-Glycin (Abb. 4c) (Ito & Hirata, 1977). In anderen Fällen bezieht sich der Name auf den Organismus, aus dem das MAA zuerst isoliert wurde (z.B. Palythinol aus der Seeanemone *Palythoa tuberculosa*; Takano *et al.*, 1978) oder auf den Lebensraum des Organismus (z.B. Shinorin (Abb. 4e) aus der Rotalge *Chondrus yendoi*, geerntet bei Shinori in Japan; Tsujino *et al.*, 1980).

Die erste Erwähnung von MAAs in Cyanobakterien stammt von Shibata (1969), der die Anwesenheit von farblosen, UV-absorbierenden, wasserlöslichen Substanzen in einigen Cyanobakterien aus dem Great Barrier Reef beschreibt. Er isolierte diese Substanzen aus filamentösen Cyanobakterien, die auf der Wasseroberfläche schwammen und bei denen es sich möglicherweise um *Trichodesmium* sp. handelte (Garcia-Pichel & Castenholz, 1993), und bezeichnete sie entsprechend ihres Absorptionsmaximums als S-320. Die Zuweisung zur Gruppe der MAAs und weitere Untersuchungen zum Vorkommen und zur Diversität von MAAs in Cyanobakterien wurden von Garcia-Pichel und Castenholz veröffentlicht (1993). Die Autoren untersuchten 20 verschiedene Cyanobakterienstämme, die aus Habitaten stammten, in denen sie häufig starker Sonneneinstrahlung ausgesetzt waren, und fanden in 13 MAA-positiven Stämmen insgesamt 13 verschiedene MAAs. Dabei wurden in manchen Stämmen bis zu vier verschiedene MAAs detektiert. Behandlung mit UV-Strahlung führte in allen Fällen zu einer Erhöhung des MAA-Gehaltes um das 2- bis 30-fache. Experimente zur zellulären Lokalisation der MAAs ergaben, daß der überwiegende Teil der MAAs im Cytoplasma enthalten ist. Eine Ausnahme bildet das von Scherer *et al.* (1988) aus der extrazellulären Polysaccharidmatrix des Cyanobakteriums *Nostoc commune* isolierte MAA¹. Die Lokalisation dieses MAAs außerhalb der Zelle wird ermöglicht durch kovalent an das MAA gebundene Oligosaccharide (Böhm *et al.*, 1995). Ebenso wie bei anderen Cyanobakterien wird die Biosynthese dieses MAAs durch UV-Licht gefördert (Ehling-Schulz *et al.*, 1997). Die Häufigkeit von MAAs in Cyanobakterien wurde von Appel und Garcia-Pichel (persönliche Mitteilung) anhand einer Vielzahl von verschiedenen Cyanobakterienstämmen untersucht. Das Ergebnis dieser Studie war, daß MAAs in etwa der Hälfte der untersuchten Stämme nachgewiesen werden konnten und daß diese MAAs eine hohe Diversität zeigten.

Die biologische Funktion der MAAs ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Bereits vor der Strukturaufklärung des ersten MAAs wurde vermutet, daß diese Substanzen als UV-

¹ Korrekterweise müßte der Singular von MAAs im Deutschen "die MAA" heißen (vgl. "die DNA"). Da sich im Sprachgebrauch allerdings inzwischen das Neutrum etabliert hat, wird in diesem Text ebenfalls diese Form verwendet.

Sunscreens wirken (Price & Forrest, 1969). Diese Annahme gründet einerseits auf dem auffälligen UV-Absorptionsspektrum der Metabolite und auf den hohen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 44\,700\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für Shinorin²), andererseits auf der häufig beobachteten Regulation der Biosynthese dieser Substanzen durch UV-Strahlung. In einigen Fällen wurde versucht, die UV-Schutzfunktion der MAAs nachzuweisen. Für ein solches Experiment benötigt man Zellen oder Individuen der gleichen Spezies mit unterschiedlichen MAA-Konzentrationen. Zwar ist es in vielen Fällen möglich, durch UV-Exposition Zellen mit erhöhtem MAA-Gehalt zu erhalten, gleichzeitig werden durch diese UV-Behandlung aber auch andere Schutzmechanismen induziert, so daß eine höhere UV-Resistenz nicht notwendigerweise von den MAAs verursacht wird. Um aktive UV-Schutzmechanismen unwirksam zu machen, wurden in der Studie von Garcia-Pichel *et al.* (1993) Zellen des Cyanobakteriums *Gloeocapsa* sp., die unterschiedliche Mengen an MAAs enthielten, getrocknet und anschließend UV-Streß ausgesetzt. Im trockenen Zustand waren keine enzymatischen Aktivitäten möglich, so daß ein Unterschied in der UV-Beständigkeit ausschließlich vom passiven Schutzmechanismus herrühren mußte. Nach der UV-Behandlung wurden die Zellen angefeuchtet, und das Ausmaß der Photoinhibition der Photosynthese wurde bestimmt. In Zellen mit einem hohen MAA-Gehalt war sie um etwa 25% geringer als in den Kontrollzellen, so daß ein positiver Effekt der MAAs bestätigt wurde. Adams und Shick (1996) haben mit dem Seeigel *Strongylocentrotus droebachiensis* ebenfalls Experimente zur UV-Schutzfunktion von MAAs durchgeführt. Die MAA-Konzentration in den Eiern wurde über die Nahrungszufuhr reguliert. Dadurch wurden Eier der gleichen Spezies mit unterschiedlichen MAA-Konzentrationen erhalten, ohne daß die Organismen vorher UV-Strahlung ausgesetzt waren, so daß mögliche Induktion von Reparaturmechanismen ausgeschlossen war. Gemessen wurde die Verzögerung der ersten Zellteilung unter UV-Einwirkung. Dabei stellte sich heraus, daß bei den Eiern, die größere Mengen an MAAs enthielten, die erste Zellteilung früher eintrat als bei den Eiern mit niedrigeren MAA-Konzentrationen. Diese Ergebnisse ebenso wie die Ergebnisse von anderen Autoren (Lesser, 1996; Neale *et al.*, 1998) stützen die These, daß MAAs zum UV-Schutz beitragen. Der Schutz war in keinem der Fälle vollständig, aber möglicherweise profitiert der

² Anhand des Moleküldurchmessers (etwa 0,7 nm) kann der theoretische Extinktionskoeffizient berechnet werden, der einer 100 %igen Absorption der auftreffenden Strahlung entspräche. Der tatsächliche Extinktionskoeffizient eines starken Absorbierers beträgt etwa 10 % dieses Wertes. Nach dieser Berechnung absorbiert ein Shinorin-Molekül 5 % der auftreffenden Strahlung, wobei berücksichtigt werden sollte, daß die Bestimmung des Moleküldurchmessers für ein asymmetrisches Molekül problematisch ist und der Wert 0,7 nm nur eine Näherung darstellt (Berechnung nach Cantor & Schimmel, 1980).

chemischen Struktur, die eine Ähnlichkeit mit den Zwischenprodukten des Shikimat-Weges aufweist, möglicherweise auch aus diesem Stoffwechselweg stammen, sollen die Reaktionen dieses Biosyntheseweges hier kurz vorgestellt werden. Ein alternativer Syntheseweg für die MAA-Biosynthese ist der Polyketid-Weg, der hier ebenfalls kurz beschrieben wird.

1.3.1 Der Shikimat-Weg

Der Shikimat-Weg, benannt nach einem Zwischenprodukt dieses Stoffwechselweges, dient primär zur Synthese von aromatischen Aminosäuren in Mikroorganismen und Pflanzen. Bei Tieren kommt dieser Stoffwechselweg nicht vor, so daß sie darauf angewiesen sind, diese dadurch für sie essentiellen Aminosäuren mit der Nahrung aufzunehmen. Die Reaktionen des Shikimat-Weges sind in Abbildung 5 dargestellt. Die Edukte für den Shikimat-Weg sind Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-phosphat, die unter Abspaltung von Phosphat zu 2-Keto-3-deoxyarabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP) kondensieren. Das Enzym DAHP-Synthase [EC 4.1.2.15], das diese Reaktion katalysiert, wird von bestimmten Produkten des Stoffwechselweges durch Rückkopplungshemmung kontrolliert. In vielen Organismen kommen mehrere Isoformen dieses Enzyms vor, die von unterschiedlichen Effektoren beeinflusst werden (Bentley, 1990). So wurden in dem Cyanobakterium *Anabaena variabilis* zwei Isozyme der DAHP-Synthase gefunden, die jeweils von Tyrosin oder Phenylalanin inhibiert und beide von Tryptophan stimuliert werden (Hall *et al.*, 1983; Niven *et al.*, 1988). In der folgenden Reaktion findet ein Ringschluß des DAHP zum Dehydroquinat statt, das anschließend über Dehydroshikimat und Shikimat zu Shikimat-3-phosphat umgewandelt wird. Durch den Einbau eines weiteren PEP-Moleküls entsteht 5-Enolpyruvylshikimat (EPSP). Die EPSP-Synthase [EC 2.5.1.19], die diesen Syntheseschritt katalysiert, ist der wichtigste Wirkungsort des Herbicides Glyphosat, das als kompetitiver Inhibitor dieses Enzyms wirkt (Bentley, 1990). Aus EPSP wird schließlich unter Abspaltung des Phosphatrestes Chorismat gebildet. An dieser Stelle spaltet sich der Syntheseweg in die Synthese von Phenylalanin und Tyrosin, die über Prephenat als Zwischenprodukt verläuft, und in die Synthese von Tryptophan, bei der zunächst Anthranilat gebildet wird. Die weiteren Reaktionen der Synthese der aromatischen Aminosäuren sollen hier nicht im einzelnen behandelt werden, da sie nicht mehr Teil des eigentlichen Shikimat-Weges sind (Bentley, 1990).

jeweilige Organismus entsprechend dem Prinzip eines „good improvement for a small investment“ (Garcia-Pichel *et al.*, 1993). Dennoch sollte man die Möglichkeit, daß MAAs eine andere oder eine zusätzliche Funktion haben können, nicht außer acht lassen. Die induzierende Wirkung auf die Sporenbildung in Pilzen wurde bereits erwähnt. Für monosubstituierte MAAs konnte *in vitro* eine antioxidierende Wirkung nachgewiesen werden (Dunlap & Yamamoto, 1995; siehe dazu auch Kapitel 5), die allerdings für bisubstituierte MAAs nicht festzustellen war. Aufgrund auffällig hoher MAA-Gehalte in Cyanobakterien von einem hypersalinen Standort wurde gemutmaßt, daß MAAs als Osmolyte fungieren können (Oren, 1997; siehe dazu auch Kapitel 3). Es ist deutlich, daß bei dem heutigen Wissensstands über MAAs weitere Kenntnisse zur Physiologie und Regulation der MAA-Biosynthese notwendig sind, um die Funktion dieser Metabolite besser verstehen zu können.

1.3 Biosynthesewege von Sekundärmetaboliten

Da MAAs nicht Bestandteil des Grundstoffwechsels der Zelle sind und nur in einigen bestimmten Organismen vorkommen, ordnet man sie der Gruppe der Sekundärmetabolite zu. In Cyanobakterien kommt eine Vielzahl unterschiedlicher Sekundärmetabolite vor. Dazu gehören flüchtige Verbindungen wie 2-Methylisoborneol und Geosmin, die weit verbreitet sind und den erdigen Geruch bei Cyanobakterienblüten auf Seen verursachen (Izaguirre *et al.*, 1982; Izaguirre & Taylor, 1998; Wu *et al.*, 1991). Gegenstand intensiver Forschung sind die cyanobakteriellen Toxine, die ebenfalls bei Cyanobakterienblüten auftreten. Ihre chemischen Strukturen sind sehr vielfältig, es kommen niedermolekulare Verbindungen wie das Neurotoxin Anatoxin-a (Carmichael, 1992; Devlin *et al.*, 1977) und komplexere Oligopeptide wie die als Hepatotoxine wirkenden Microcystine (Carmichael, 1992; Plumley, 1997) vor, die von nicht-ribosomalen Peptidsynthasen produziert werden. Die biologische Funktion von Sekundärmetaboliten ist in den meisten Fällen nicht geklärt. Ausnahmen bilden dabei zum Beispiel das von der Gattung *Scytonema* synthetisierte Cyanobacterin, das stark hemmend auf das Photosystem II von Algen und anderen Cyanobakterien wirkt (Gleason & Paulson, 1984; Lee & Gleason, 1994), und die antibakteriell wirkenden bromierten Biphenyle aus *Oscillatoria* (Unson *et al.*, 1994).

Die Ausgangsprodukte für Sekundärmetabolite sind Bestandteile des Grundstoffwechsels der Zelle. Ein Stoffwechselweg, von dem die Biosynthese vieler Sekundärmetabolite abzweigt, ist der Shikimat-Weg. Da die MAAs aufgrund ihrer

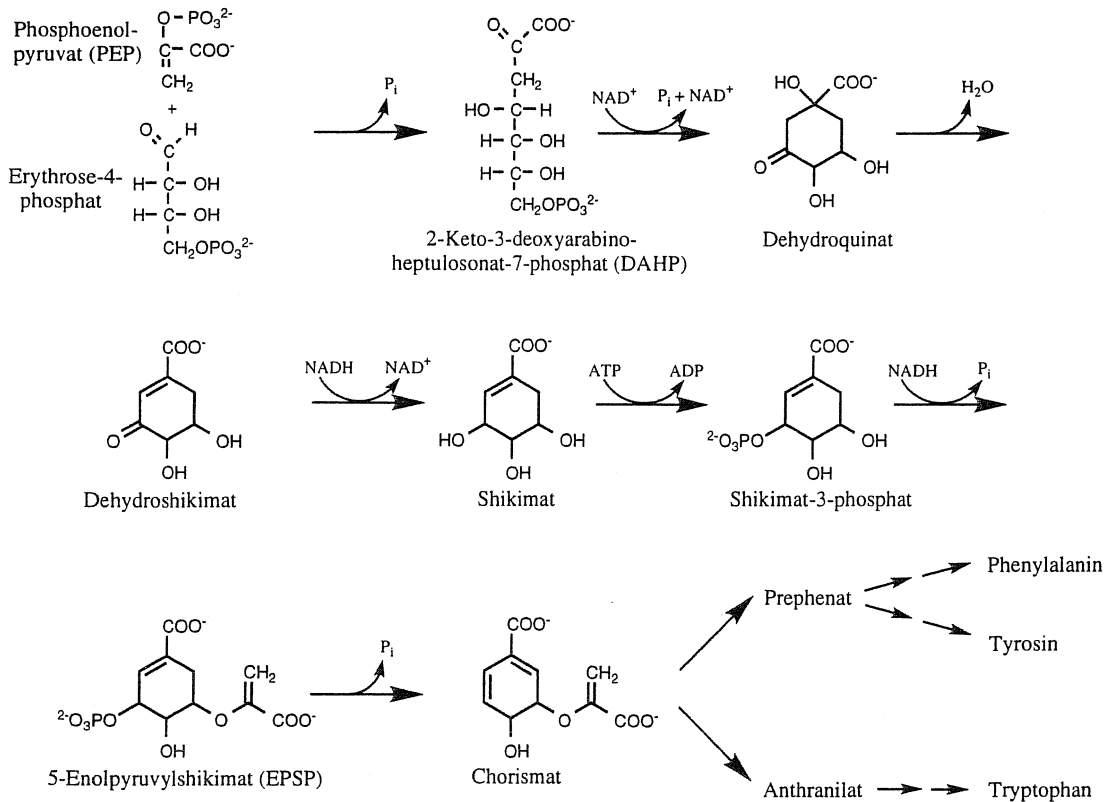


Abb. 5: Reaktionen des Shikimat-Weges.

Es gibt eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten in Pflanzen und Mikroorganismen, deren biosynthetische Vorstufen aus dem Shikimat-Weg stammen, von denen einige exemplarisch vorgestellt werden sollen. Aus DAHP oder Dehydroquinat können entweder 3-Hydroxy-5-aminobenzoat oder 3-Aminobenzoat entstehen. Diese Verbindungen sind mögliche Vorstufen von den sogenannten mC_7N -Einheiten, die in vielen Antibiotika (z.B. in Rifamycinen) enthalten sind. Sie bestehen aus einem C_6 -Ring mit einem weiteren C -Atom als Substituent und einem Stickstoffatom in *meta*-Stellung (Bentley, 1990). Metabolite, die wahrscheinlich aus Dehydroshikimat gebildet werden, sind Gallussäure und Protocatechusäure, die häufig in Pflanzen und auch in einigen eu- und prokaryotischen Mikroorganismen vorkommen (Bentley, 1990; Moorman *et al.*, 1992). Shikimat ist der Abzweigepunkt für die Cyclohexan-Gruppen, die in manchen Antibiotika vorkommen (Moore & Floss, 1994). Auch spätere Metabolite des Shikimat-Weges sind Vorstufen für Antibiotika. So wird Chloramphenicol aus Chorismat über das intermediär auftretende 4-Amino-4-deoxychorismat gebildet. Diese Beispiele stellen nur einen sehr kleinen Anteil der bekannten, vom Shikimat-Weg abstammenden Sekundärmetabolite dar. Der Anteil von unbekanntem Sekundärmetaboliten, die aus diesem Stoffwechselweg abstammen, ist möglicherweise noch beträchtlich größer (Bentley, 1990).

1.3.2 Der Polyketid-Weg

Viele Sekundärmetabolite, die nicht aus dem Shikimat-Weg stammen, werden über den Polyketid-Weg synthetisiert. Ähnlich wie bei der Fettsäurebiosynthese werden die Moleküle aus Acyl-Coenzym A-Monomeren aufgebaut. Dabei entstehen primär langkettige Moleküle mit zahlreichen Ketogruppen (daher die Bezeichnung Polyketid), doch ist diese ursprüngliche Form häufig aufgrund nachträglicher Modifikationen nicht mehr zu erkennen. Dennoch werden solche Moleküle wegen ihres biosynthetischen Ursprunges als Polyketide bezeichnet (Staunton & Wilkinson, 1998). Zentrale Enzyme bei der Polyketidbiosynthese sind die multifunktionalen Polyketidsynthasen. Diese großen Proteine sind verantwortlich für die Katalyse des Elongationsschrittes und damit verbundener Modifizierungsreaktionen von funktionellen Gruppen und ähneln den Fettsäuresynthasen (Cane *et al.*, 1998). Beispiele für Polyketide sind die Grundgerüste der Antibiotika Rifamycin und Erythromycin.

1.4 Photorezeptoren

Um auf äußere Einflüsse reagieren zu können, muß ein Organismus Informationen über die Umweltbedingungen erhalten können, dazu benötigt er Rezeptoren. Für phototrophe Organismen sind Photorezeptoren besonders wichtig, um Informationen über die Lichtverhältnisse zu erhalten. Den Bestandteil eines Photorezeptors, der für die Lichtabsorption verantwortlich ist, bezeichnet man als Chromophor. Dieser verändert sich unter Lichteinwirkung chemisch und wandelt so das Lichtsignal in ein chemisches Signal um. Bekannte photochemische Reaktionen sind Photoreduktion oder Photoisomerisierung, also die Umwandlung einer *cis*- in eine *trans*-Doppelbindung (Häder & Tevini, 1987).

Bekannte Funktionen von prokaryotischen Photorezeptoren sind die Bewegungssteuerung des Organismus innerhalb eines Lichtfeldes oder die Regulation der Genexpression. Drei Klassen von Chromophoren sind bekannt, die an diesen Reaktionen beteiligt sind: Tetrapyrrole (z.B. das im Phytochrom der Cyanobakterien enthaltene Phytochromobilin), Polyene (z.B. das Retinal des sensorischen Rhodopsins von Archaeobakterien) und Verbindungen, die einen aromatischen Ring enthalten (hierzu gehören Flavine und Pterine) (Hellingwerf *et al.*, 1996). Besonders gut charakterisiert ist der photosensorische Mechanismus in dem Archaeobakterium *Halobacterium salinarium*. In seiner Zellmembran sind die beiden Retinal-haltigen Proteine SRI und SRII (sensory

rhodopsin I und II) enthalten. Sie sind für die Lichtdetektion verantwortlich und steuern die Bewegungen des Flagellums von *H. salinarium* so, daß die Zelle sich in optimalen Lichtverhältnissen befindet, ohne durch zu hohe UV-Intensitäten geschädigt zu werden. An der Signalübertragung sind die beiden Proteine HtrI und HtrII beteiligt, die sich in der Membran im Komplex mit SRI bzw. SRII befinden. Sie weisen eine große Ähnlichkeit mit den MCPs (methyl-accepting chemotaxis proteins) auf, die in *E. coli* für die Chemotaxis verantwortlich sind und deren chemosensorische Empfindlichkeit über Methylierung und Demethylierung des Proteins gesteuert wird. Die Absorption eines Photons durch die SR-Proteine und die daraus resultierende *trans/cis*-Isomerisierung des Retinals führt zu einer Konformationsänderung der Htr-Proteine. Die weitere Signalkette ist noch nicht vollständig aufgeklärt, es wird aber vermutet, daß sie ähnlich verläuft wie die chemotaktische Reaktion in *E. coli*, bei der eine Histidin-Proteinkinase (CheA) Regulationsproteine (CheY) phosphoryliert, die dann an den Motor des Flagellums binden und eine Änderung des Drehsinnes verursachen. Gleichzeitig wird eine Methylesterase (CheB) aktiviert, die Methylreste vom MCP-Molekül abspaltet und es damit unempfindlicher macht, um so eine Anpassung an den äußeren Reiz zu erreichen (Armitage, 1997).

Reaktion auf Lichtverhältnisse wurden auch für Cyanobakterien beschrieben. Das filamentöse Cyanobakterium *Phormidium* orientiert sich in einem Lichtfeld, indem es Lichtintensitäten ausweicht, die zu hoch (step-up photophobic response) oder zu niedrig (step-down photophobic response) sind. Die Photorezeptormoleküle für die „step-down photophobic response“ sind die photosynthetischen Pigmente. Kommt die Zelle in ein Dunkelfeld, hat dies aufgrund der verringerten photosynthetischen Aktivität eine Abnahme des Membranpotentials zur Folge. Nach Häders Beobachtungen wird dieses Signal noch verstärkt durch das Öffnen von Ca^{2+} -Kanälen, was einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle zur Folge hat (Häder, 1988). Es wird angenommen, daß diese Änderung im Membranpotential der Auslöser ist für die Bewegungsreaktion der Zelle. Auch bei anderen Prokaryoten wurden Lichtreaktionen nachgewiesen, die auf keinen spezifischen Rezeptor zurückzuführen sind, sondern vielmehr vom Redoxzustand der Zelle abhängen, der bei phototrophen Mikroorganismen eine Funktion der Sättigung des photosynthetischen Elektronentransportes ist (Armitage, 1997). Das Aktionsspektrum der „step-up photophobic response“ in Cyanobakterien unterscheidet sich deutlich von demjenigen der „step-down photophobic response“. Einzelheiten zum Mechanismus dieses Vorganges sind noch nicht bekannt (Häder, 1988).

Spezifische Photorezeptoren für den UVB-Bereich wurden für Pflanzen und Pilze beschrieben, doch über die Struktur und die Wirkmechanismen dieser Photorezeptoren ist

nicht viel bekannt. Als Beispiel sei hier der UVB-Photorezeptor genannt, der die Biosynthese von Flavonoiden in Pflanzen kontrolliert (Beggs *et al.*, 1986). Das Aktionsspektrum dieses Photorezeptors zeigt ein Maximum bei 295 nm. Die Form und Lage des Aktionsspektrums weist eine Ähnlichkeit zu Absorptionsspektren von reduzierten Flavinen und Pterinen auf. Deshalb wurde vermutet, daß diese Moleküle Bestandteil des Photorezeptors sein könnten (Ensminger & Schäfer, 1992). Für die Hemmung des Hypokotylwachstums von Tomatenkeimlingen wurde ein ähnliches Aktionsspektrum gemessen. In diesem Fall wurde basierend auf Inhibitionsexperimenten ein Flavin als Photorezeptor vorgeschlagen (Ballaré *et al.*, 1995). Sowohl Flavine als auch Pterine besitzen Eigenschaften, die sie als Rezeptormoleküle für den UV-Bereich geeignet erscheinen lassen. So sind beide in der Lage, Radikale zu bilden (dies kann bei Elektronentransfer und Licht-vermittelten Reaktionen von Bedeutung sein), Redoxreaktionen einzugehen und UV-Strahlung zu absorbieren (Galland & Senger, 1988). Die Absorptionsspektren sind deutlich vom Oxidationszustand der Moleküle abhängig. Pterine haben in der oxidierten Form ein Absorptionsmaximum im UVA-Bereich, das sich

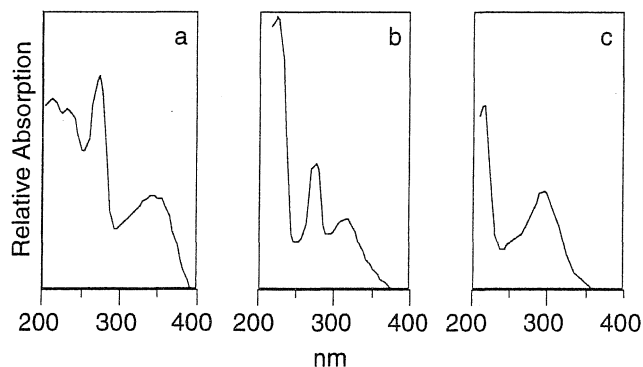


Abb. 6: Absorptionsspektren von 6,7-Dimethylpterin in 3 Oxidationszuständen.

(a) Oxidiert; (b) Dihydroform; (c) Tetrahydroform (nach Fuller *et al.*, 1971).

bei Reduktion in Richtung UVB-Bereich verschiebt (Abb. 6). Einer der am besten charakterisierten Photorezeptoren ist die DNA-Photolyase, die im blauen und im UVA Bereich absorbiert und zwei Chromophore enthält. Abhängig von diesen Chromophoren werden zwei Klassen von Photolyasen unterschieden: die Folat-Photolyasen, die ein Flavin und ein Folat (also ein Pterin) enthalten, und die Deazaflavin-Photolyasen, die anstelle des Folats ein Deazaflavin besitzen (Sancar, 1994). Zur Deazaflavin-Gruppe gehört die Photolyase aus dem Cyanobakterium *Anacystis nidulans* (Kim *et al.*, 1992; Malhotra *et al.*, 1992; Tamada *et al.*, 1995), während in *Escherichia coli* eine Folat-Photolyase nachgewiesen wurde (Sancar, 1994). Es konnte gezeigt werden, daß sowohl das Flavin als auch das Pterin als Rezeptormoleküle wirksam sind. Dabei findet innerhalb des Proteins

ein Energietransfer vom Pterin auf das Flavin statt, was vermuten läßt, daß das Pterin für die Absorption der kurzwelligeren und das Flavin für die Absorption der langwelligeren Strahlung verantwortlich ist (Ramsey *et al.*, 1992). In den Deazaflavin-Enzymen wird ein ähnlicher Mechanismus vermutet (Kim *et al.*, 1992).

1.5 Das Cyanobakterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912

Cyanobakterien sind wahrscheinlich die größte, diverseste und am weitesten verbreitete Gruppe von photosynthetischen Prokaryoten (Stanier & Cohen-Bazire, 1977). Im Gegensatz zu anderen photosynthetischen Bakterien enthalten Cyanobakterien zwei Photosysteme, Chlorophyll a und betreiben, ähnlich wie die Pflanzen, oxygene Photosynthese. Morphologisch unterscheidet man zwischen unizellulären und filamentösen Arten. Etliche Cyanobakterienstämme sind in der Lage, molekularen Stickstoff zu fixieren, so daß sie nicht auf Stickstoffverbindungen aus ihrer Umwelt angewiesen sind sondern den in der Luft enthaltenen Stickstoff zum Einbau in ihre Biomasse nutzen können. Viele filamentöse Stämme bilden dazu spezialisierte Zellen aus (Heterocysten), in denen die sauerstoffempfindliche Nitrogenase vor Sauerstoff geschützt ist. Zu diesen filamentösen, heterocystenbildenden Stämmen gehört auch das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Cyanobakterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912³. Es wurde von Mitra (1950) aus Böden in der Nähe der indischen Stadt Allahabad isoliert. Beim Wachstum auf festem Substrat zeichnet sich der Organismus durch die Ausbildung einer etwa 500 µm dicken, amorphen Kruste aus. Mikroskopisch besteht diese Kruste aus großen, losen und unregelmäßig angeordneten Zellhaufen („Cluster“), die aus rundlichen Zellen aufgebaut sind. Von Fay *et al.* (1964) wird die Entstehung eines solchen Clusters beschrieben. Zu Beginn bildet sich ein kurzes bewegliches Filament (4-6 Zellen lang) mit relativ kleinen Zellen aus (Hormogonium). Anschliessend wachsen die Zellen in der Größe und teilen sich zunächst nur in einer Ebene, so daß die ursprüngliche Form des Filamentes erhalten bleibt. Später findet auch Querteilung und damit die Ausbildung des Clusters statt. Die jeweiligen Wachstumsbedingungen haben einen ausgeprägten Einfluß auf die Zelleigenschaften, bei viel Licht und hohen Temperaturen herrschen große Zellen vor, während bei weniger Licht und niedrigeren Temperaturen häufiger kleinere Zellen

³ PCC = Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria; der Stamm ist auch in anderen Kultursammlungen enthalten, dort aufgeführt als: ATCC 27193 (American Type Culture Collection), SAUG 1411/1 (Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen).

ausgebildet werden (Fay *et al.*, 1964). Die Heterocysten werden nur ausgebildet, wenn die Zellen in Gegenwart von extrem niedrigen Konzentrationen an gelösten Stickstoffverbindungen kultiviert wurden (Mitra & Pandey, 1966). *Chlorogloeopsis* PCC 6912 ist auch in der Lage, aerob im Dunkeln unter heterotrophen Bedingungen zu wachsen. Dabei ist Saccharose als Substrat am geeignetsten (Fay, 1965).

Abgesehen von den rein morphologischen Untersuchungen bezieht sich das bisherige wissenschaftliche Interesse an diesem Stamm hauptsächlich auf den Stickstoffhaushalt (Fay, 1965; Marco & Orús, 1993; Orús & Marco, 1991) und auf die Transportsysteme für anorganischen Kohlenstoff (Skleryk *et al.*, 1997) und Phosphat (Avendaño & Valiente, 1994). Für die vorliegende Arbeit wurde dieser Organismus ausgewählt, weil er MAAs synthetisieren kann (siehe auch Kapitel 3) und im Vergleich zu anderen MAA-produzierenden Stämmen unter Kulturbedingungen ein gutes Wachstum zeigte. Von Vorteil für einige Experimente war außerdem seine Fähigkeit, im Dunkeln heterotroph zu wachsen.

1.6 Fragestellung

Es war die Aufgabe dieser Arbeit, die MAA-Biosynthese in Cyanobakterien zu untersuchen. Zunächst sollte anhand eines geeigneten Cyanobakteriums die Physiologie der MAA-Biosynthese in diesem Organismus charakterisiert werden (Kapitel 3). Aufbauend auf diesen Kenntnissen sollten *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen durchgeführt werden, um den biosynthetischen Ursprung des MAA-Ringes und der MAA-Seitenketten aufzuklären, und diese Ergebnisse mit früheren Untersuchungen, die mit einem Pilz durchgeführt wurden (Favre-Bonvin *et al.*, 1987), verglichen werden (Kapitel 4). Außerdem sollte der Mechanismus der UV-Detektion, der für die MAA-Biosynthese verantwortlich ist, untersucht und ein mutmaßlicher Photorezeptor charakterisiert werden (Kapitel 5).

1.7 Literaturverzeichnis

Adams, N. L. & M. J. Shick (1996). Mycosporine-like amino acids provide protection against ultraviolet radiation in eggs of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Photochem. Photobiol.* **64**, 149-158.

Armitage, J. P. (1997). Behavioural responses of bacteria to light and oxygen. *Arch. Microbiol.* **168**, 249-261.

Aro, E.-M., I. Virgin & B. Andersson (1993). Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* **1143**, 113-134.

Avendaño, M. d. C. & E. F. Valiente (1994). Effect of sodium on phosphate uptake in unicellular and filamentous cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* **35**, 1097-1101.

Ballaré, C. L., P. W. Barnes & S. D. Flint (1995). Inhibition of hypocotyl elongation by ultraviolet-B radiation in de-etiolating tomato seedlings. I. The photoreceptor. *Physiol. Plant.* **93**, 584-592.

Bebout, B. M. & F. Garcia-Pichel (1995). UV B-induced vertical migrations of cyanobacteria in a microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4215-4222.

Beggs, C. J., E. Wellmann & H. Grisebach (1986). *Photocontrol of flavonoid biosynthesis*. In: Kendrick, R. E. & Kronenberg, G. H. M. (Eds.), *Photomorphogenesis in plants*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp. 467-499.

Bentley, R. (1990). The shikimate pathway - a metabolic tree with many branches. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**, 307-384.

Black, H. S. (1987). Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. *Photochem. Photobiol.* **46**, 213-221.

Böhm, G. A., W. Pfeleiderer, P. Böger & S. Scherer (1995). Structure of a novel oligosaccharide-mycosporine-amino acid ultraviolet A/B sunscreen pigment from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Biol. Chem.* **270**, 8536-8539.

Cane, D. E., C. T. Walsh & C. Khosla (1998). Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science* **282**, 63-68.

Cantor, C. R. & P. R. Schimmel (1980). *Biophysical Chemistry. Part II: Techniques for the study of biological structure and function.* W. H. Freeman and Company, New York.

Carmichael, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *J. App. Bacteriol.* **72**, 445-459.

Carreto, J. I., M. O. Carignan, G. Daleo & S. G. De Marco (1990). Occurrence of mycosporine-like amino acids in the red-tide dinoflagellate *Alexandrium excavatum*: UV-photoprotective compounds? *J. Plankton Res.* **12**, 909-912.

Castenholz, R. W. (1997). Multiple strategies for UV tolerance in cyanobacteria. *The Spectrum* **10**, 10-16.

Chávez, E. & A. Cuéllar (1984). Inactivation of mitochondrial ATPase by ultraviolet light. *Arch. Biochem. Biophys.* **230**, 511-516.

Cullen, J. J. & P. J. Neale (1994). Ultraviolet radiation, ozone depletion, and marine photosynthesis. *Photosynth. Res.* **39**, 303-320.

Devlin, J. P., O. E. Edwards, P. R. Gorham, N. R. Hunter, R. K. Pike & B. Stavric (1977). Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h. *Can. J. Chem.* **55**, 1367-1371.

Dunlap, W. C. & J. M. Shick (1998). Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: a biochemical and environmental perspective. *J. Phycol.* **34**, 418-430.

Dunlap, W. C. & Y. Yamamoto (1995). Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comp. Biochem. Physiol.* **112B**, 105-114.

Ehling-Schulz, M., W. Bilger & S. Scherer (1997). UV-B induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Bacteriol.* **179**, 1940-1945.

Ensminger, P. A. & E. Schäfer (1992). Blue and ultraviolet-B light photoreceptors in parsley cells. *Photochem. Photobiol.* **55**, 437-447.

Favre-Bonvin, J., N. Arpin & C. Brevard (1976). Structure de la mycosporine (P 310). *Can. J. Chem.* **54**, 1105-1113.

Favre-Bonvin, J., J. Bernillon, N. Salin & N. Arpin (1987). Biosynthesis of mycosporines: mycosporine glutaminol in *Trichothecium roseum*. *Phytochem.* **26**, 2509-2514.

Fay, P. (1965). Heterotrophy and nitrogen fixation in *Chlorogloea fritschii*. *J. Gen. Microbiol.* **39**, 11-20.

Fay, P., H. D. Kumar & G. E. Fogg (1964). Cellular factors affecting nitrogen fixation in the blue-green alga *Chlorogloea fritschii*. *J. Gen. Microbiol.* **35**, 351-360.

Fuller, R. C., G. W. Kidder, N. A. Nugent, V. C. Dewey & R. N. (1971). The association and activities of pteridines in photosynthetic systems. *Photochem. Photobiol.* **14**, 359-371.

Galland, P. & H. Senger (1988). The role of pterins in the photoreception and metabolism of plants. *Photochem. Photobiol.* **48**, 811-820.

Gantt, R., G. M. Jones, E. V. Stephens, A. E. Baeck & K. K. Sanford (1979). Visible light-induced DNA crosslinks in cultured mouse and human cells. *Biochim. Biophys. Acta* **565**, 231+240.

Garcia-Pichel, F. (1994). A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnol. Oceanogr.* **39**, 1704-1717.

Garcia-Pichel, F. & R. W. Castenholz (1991). Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *J. Phycol.* **27**, 395-409.

Garcia-Pichel, F. & R. W. Castenholz (1993). Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 163-169.

Garcia-Pichel, F., N. D. Sherry & R. W. Castenholz (1992). Evidence for an ultraviolet sunscreen role of the extracellular pigment scytonemin in the terrestrial cyanobacterium *Chlorogloeopsis* sp. *Photochem. Photobiol.* **56**, 17-23.

Garcia-Pichel, F., C. E. Wingard & R. W. Castenholz (1993). Evidence regarding the UV sunscreen role of a mycosporine-like compound in the cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 170-176.

Gleason, F. K. & J. L. Paulson (1984). Site of action of the natural algicide, cyanobacterin, in the blue-green alga, *Synechococcus* sp. *Arch. Microbiol.* **138**, 273-277.

Goes, J. I., N. Handa, S. Taguchi & T. Hama (1994). Effect of UV-B radiation on the fatty acid composition of the marine phytoplankter *Tetraselmis* sp.: relationship to cellular pigments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **114**, 259-274.

Häder, D.-P. (1988). Signal perception and amplification in photoresponses of cyanobacteria. *Biophys. Chem.* **29**, 155-159.

Häder, D.-P. & M. Tevini (1987). *General Photobiology*. Pergamon Press, Oxford.

Hall, G. C., M. B. Flick & R. A. Jensen (1983). Regulation of the aromatic pathway in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 6301 (*Anacystis nidulans*). *J. Bacteriol.* **153**, 423-428.

Hellingwerf, K. J., W. D. Hoff & W. Crielelaard (1996). Photobiology of microorganisms: how photosensors catch a photon to initialize signalling. *Mol. Microbiol.* **21**, 683-693.

Ito, S. & Y. Hirata (1977). Isolation and structure of a mycosporine from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Tetrahedron Lett.* **28**, 2429-2430.

Izaguirre, G., C. J. Hwang, S. W. Krasner & M. J. McGuire (1982). Geosmin and 2-methylisoborneol from cyanobacteria in three water supply systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 708-714.

Izaguirre, G. & W. D. Taylor (1998). A *Pseudoanabaena* species from castaic lake, California, that produces 2-methylisoborneol. *Wat. Res.* **32**, 1673-1677.

Jeffrey, W. H., P. Aas, M. M. Lyons, R. B. Coffin, R. J. Pledger & D. L. Mitchell (1996). Ambient solar radiation-induced photodamage in marine bacterioplankton. *Photochem. Photobiol.* **64**, 419-427.

Karentz, D., M. L. Bothwell, R. B. Coffin, A. Hanson, G. J. Herndl, S. S. Kilham, M. P. Lesser, M. Lindell, R. E. Moeller, D. P. Morris, P. J. Neale, R. W. Sanders, C. S. Weiler & R. G. Wetzel (1994). Impact of UV-B radiation on pelagic freshwater ecosystems: Report of working group on bacteria and phytoplankton. *Ergebn. Limnol.* **43**, 31-69.

Kasting, J. F., H. D. Holland & L. R. Kump (1992). *Atmospheric evolution: the rise of oxygen*. In: Schopf, J. W. & Klein, C. (Eds.), *The proterozoic biosphere: a multidisciplinary study*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 159-163.

Kim, S.-T., P. F. Heelis & A. Sancar (1992). Energy transfer (deazaflavin-FADH₂) and electron transfer (FADH₂-T<>T) kinetics in *Anacystis nidulans* photolyase. *Biochem.* **31**, 11244-11248.

Kjeldstad, B. & A. Johnsson (1986). An action spectrum for blue and near ultraviolet inactivation of *Propionibacterium acnes*; with emphasis on a possible porphyrin photosensitization. *Photochem. Photobiol.* **43**, 67-70.

Kollias, N., R. M. Sayre, L. Zeise & M. R. Chedekel (1991). Photoprotection by melanin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **9**, 135-160.

Kramer, G. F. & B. N. Ames (1987). Oxidative mechanisms of toxicity of low-intensity near-UV light in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **169**, 2259-2266.

Lao, K. & A. N. Glazer (1996). Ultraviolet-B photodestruction of a light-harvesting complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5258-5263.

Lee, E.-S. J. & F. K. Gleason (1994). A second algicidal natural product from the cyanobacterium, *Scytonema hofmanni*. *Plant Sci.* **103**, 155-160.

Lesser, M. P. (1996). Acclimation of phytoplankton to UV-B radiation: oxidative stress and photoinhibition of photosynthesis are not prevented by UV-absorbing compounds in the dinoflagellate *Prorocentrum micans*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **132**, 287-297.

Malhotra, K., S.-T. Kim, C. Walsh & A. Sancar (1992). Roles of FAD and 8-hydroxy-5-deazaflavin chromophores in photoreactivation by *Anacystis nidulans* DNA photolyase. *J. Biol. Chem.* **267**, 15406-15411.

Marco, E. & M. I. Orús (1993). Trichlorfon-induced inhibition of nitrate and ammonium uptake in cyanobacteria. *J. Exp. Bot.* **44**, 501-508.

McCormick, J. P., J. R. Fischer, J. P. Pachlatko & A. Eisenstark (1976). Characterization of a cell-lethal product from the photooxidation of tryptophan: hydrogen peroxide. *Science* **191**, 468-469.

Mitra, A. K. (1950). Two new algae from indian soils. *Ann. Bot.* **14**, 457-464.

Mitra, A. K. & D. C. Pandey (1966). On a new genus of the blue-green alga *Chlorogloeopsis* with remarks on the production of heterocysts in the alga. *Phycos* **5**, 106-114.

Moore, B. S. & H. G. Floss (1994). Biosynthetic studies on the origin of the cyclohexancarboxylic acid moiety of ansatrienin A and ω -cyclohexyl fatty acids. *J. Nat. Prod.* **57**, 382-386.

Moorman, T. G., J. M. Becerril, J. Lydon & S. O. Duke (1992). Production of hydroxybenzoic acids by *Bradyrhizobium-japonicum* strains after treatment with glyphosate. *J. Agricult. Food Chem.* **40**, 289-293.

Murphy, T. M. (1983). Membranes as targets of ultraviolet radiation. *Physiol. Plant.* **58**, 381-388.

Nakamura, H., J.-i. Kobayashi & Y. Hirata (1981). Isolation and structure of a 330 nm UV-absorbing substance, Asterina-330 from the starfish *Asterina pectinifera*. *Chem. Lett.*, 1413-1414.

Neale, P. J., A. T. Banaszak & C. R. Jarriel (1998). Ultraviolet sunscreens in *Gymnodium sanguineum* (dinophyceae) mycosporine-like amino acids protect against inhibition of photosynthesis. *J. Phycol.* **34**, 928-938.

Niven, G. W., N. W. Kerby, P. Rowell & W. D. P. Stewart (1988). The regulation of aromatic amino acid biosynthesis in amino acid liberating mutant strains of *Anabaena variabilis*. *Arch. Microbiol.* **150**, 272-277.

Oren, A. (1997). Mycosporine-like amino acids as osmotic solutes in a community of halophilic cyanobacteria. *Geomicrobiol. J.* **14**, 231-240.

Orús, M. I. & E. Marco (1991). Heterocyst structure alteration and O₂-mediated inhibition of dinitrogen fixation by Trichlorfon in *Anabaena* PCC 7119. *J. Exp. Bot.* **42**, 1595-1600.

Peak, J. G., M. J. Peak, R. S. Sikorski & C. A. Jones (1985). Induction of DNA-protein crosslinks in human cells by ultraviolet and visible radiations: action spectrum. *Photochem. Photobiol.* **41**, 295-302.

Plumley, F. G. (1997). Marine algal toxins: biochemistry, genetics, and molecular biology. *Limnol. Oceanogr.* **42**, 1252-1264.

Price, J. H. & H. S. Forrest (1969). 310 m μ absorbance in *Physalia physalis*: distribution of the absorbance and isolation of a 310 m μ absorbing compound. *Comp. Biochem. Physiol.* **30**, 879-888.

Ramsey, A. J., J. L. Alderfer & M. S. Jorns (1992). Energy transduction during catalysis by *Escherichia coli* DNA photolyase. *Biochem.* **31**, 7134-7142.

Sammartano, L. J. & R. W. Tuveson (1987). *Escherichia coli* strains carrying the cloned cytochrome *d* terminal oxidase complex are sensitive to near-UV inactivation. *J. Bacteriol.* **169**, 5304-5307.

Sancar, A. (1994). Structure and function of DNA photolyase. *Biochem.* **33**, 2-9.

Scherer, S., T. W. Chen & P. Böger (1988). A new UV-A-B protecting pigment in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Plant Physiol.* **88**, 1055-1057.

Shibata, K. (1969). Pigments and a UV-absorbing substance in corals and a blue-green alga living in the Great Barrier Reef. *Plant Cell Physiol.* **10**, 325-335.

Sinha, R. P., M. Klisch, A. Gröniger & D.-P. Häder (1998). Ultraviolet-absorbing/screening substances in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **47**, 83-94.

Sinha, R. P., N. Singh, A. Kumar, H. D. Kumar, M. Häder & D.-P. Häder (1996). Effects of UV irradiation on certain physiological and biochemical processes in cyanobacteria. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **32**, 107-113.

Sivalingam, P. M., T. Ikawa & K. Nisizawa (1976). Physiological roles of a substance 334 in algae. *Bot. Mar.* **19**, 9-21.

Skerratt, J. H., A. D. Davidson, P. D. Nichols & T. A. McMeekin (1998). Effect of UV-B on lipid content of three antarctic marine phytoplankton. *Phytochem.* **49**, 999-1007.

Skleryk, R. S., P. N. Tyrrell & G. S. Espie (1997). Photosynthesis and inorganic carbon acquisition in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* sp. ATCC 27193. *Physiol. Plant.* **99**, 81-88.

Spikes, J. D. (1989). *Photosensitization*. In: Smith, K. C. (Ed.), *The science of photobiology*, Plenum Press, New York, pp. 79-110.

Stanier, R. Y. & G. Cohen-Bazire (1977). Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**, 225-274.

Staunton, J. & B. Wilkinson (1998). *The biosynthesis of aliphatic polyketides*. In: Leeper, F. J. & Vederas, J. C. (Eds.), *Biosynthesis. Polyketides and vitamins*, Vol. 195, Springer-Verlag, Berlin, pp. 49-92.

Strid, Å., W. S. Chow & J. M. Anderson (1990). Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis in *Pisum sativum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1020**, 260-268.

Strid, Å., W. S. Chow & J. M. Anderson (1994). UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynth. Res.* **39**, 475-489.

Suresh Babu, G., P. C. Joshi & P. N. Viswanathan (1998). UVB-induced reduction in biomass and overall productivity of cyanobacteria. *Biochem. Biophysic. Res. Comm.* **244**, 138-142.

Takano, S., A. Nakanishi, D. Uemura & Y. Hirata (1978). Isolation and structure of a 334 nm UV-absorbing substance, porphyra-334, from the red alga *Porphyra tenera* Kjellmann. *Chem. Lett.*, 419-420.

Takano, S., D. Uemura & Y. Hirata (1978). Isolation and structure of two new amino acids, palythanol and palythene, from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Tetrahedron Lett.* **49**, 4909-4912.

Tamada, T., H. Nishida, K. Inaka, A. Yasui, P. E. de Ruiter, A. P. M. Eker & K. Miki (1995). A new crystal form of photolyase (photoreactivating enzyme) from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Struct. Biol.* **115**, 37-40.

Trione, E. J. & C. M. Leach (1969). Light-induced sporulation and sporogenic substances in fungi. *Phytopathol.* **59**, 1077-1083.

Tsujino, I., K. Yabe & I. Sekikawa (1980). Isolation and structure of a new amino acid, Shinorine, from the red alga *Chondrus yendoi* Yamada et Mikami. *Bot. Mar.* **23**, 65-68.

Tuveson, R. W. & L. J. Sammartano (1986). Sensitivity of a *HemA* mutant *Escherichia coli* cells to inactivation by near-UV light depends on the level of supplementation with δ -aminolevulinic acid. *Photochem. Photobiol.* **43**, 621-626.

Tyrrell, R. M. & S. M. Keyse (1990). New trends in photobiology. The interaction of UVA radiation with cultured cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **4**, 349-361.

Unson, M. D., N. D. Holland & D. J. Faulkner (1994). A brominated secondary metabolites synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Mar. Biol.* **119**, 1-11.

Weinbauer, M. G., S. W. Wilhelm, C. A. Suttle, R. J. Pledger & D. L. Mitchell (1999). Sunlight-induced DNA damage and resistance in natural viral communities. *Aquat. Microb. Ecol.* **17**, 111-120.

Wu, J.-T., P.-I. Ma & T.-L. Chou (1991). Variation of geosmin content in *Anabaena* cells and its relation to nitrogen utilization. *Arch. Microbiol.* **157**, 66-69.

Yoshida, T. & P. M. Sivalingam (1970). Isolation and characterization of the 337m μ UV-absorbing substance in red alga, *Porphyra yezoensis* UEDA. *Plant Cell Physiol.* **11**, 427-434.

Kapitel 2

Ergebnisse und Diskussion

2 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Physiologie und die Biochemie der MAA-Biosynthese in dem Cyanobakterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912 untersucht. Dabei wurden Hinweise auf einen für die Induktion der MAA-Biosynthese verantwortlichen Photorezeptor gefunden und dieser Rezeptor charakterisiert. Die Ergebnisse der folgenden drei Publikationen werden in diesem Kapitel zusammengefaßt und im Zusammenhang diskutiert. Dabei werden Aspekte, die in den Publikationen nicht oder nur kurz behandelt werden, ausführlicher erörtert.

2.1 Physiologie der MAA-Biosynthese

Das Cyanobakterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912 produziert unter UV-Streß die zwei MAAs Shinorin und Mycosporin-Glycin, die konstitutiv nicht synthetisiert werden. Dabei konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, daß es sich hierbei um eine echte, von Proteinbiosynthese abhängige Induktion handelt. Aber auch osmotischer Streß hat eine Induktion der MAA-Biosynthese zur Folge, wobei ionische Substanzen (Salze) wirksamer als nicht-ionische (Saccharose) sind. Für andere Streßfaktoren (Hitze, Kälte, oxidativer Streß) konnte keine induktive Wirkung auf die MAA-Biosynthese nachgewiesen werden. Also handelt es sich bei der MAA-Biosynthese in diesem Organismus um eine spezifische Streßantwort und nicht um einen Bestandteil der allgemeinen Streßreaktion („general stress response“), zu der zum Beispiel die Synthese von Proteasen und Chaperonen gehört und die unter der Kontrolle eines bestimmten Sigmafaktors steht (Brahamsha & Haselkorn, 1992; Hecker *et al.*, 1996; Hecker & Völker, 1998).

Die zelluläre Zusammensetzung der MAAs war abhängig von der Art des Streßfaktors. Unter UV-Streß wurde überwiegend Shinorin synthetisiert, während unter Salzstreß Mycosporin-Glycin das Hauptprodukt war. Wenn die Zellen sowohl Salz- als auch UV-Streß ausgesetzt waren, konnte ein synergistischer Effekt auf die Mycosporin-Glycin-Synthese, jedoch nicht auf die Shinorin-Synthese beobachtet werden. Vielmehr blieb die Shinorin-Konzentration konstant unter verschiedenen Salzkonzentrationen und war nur abhängig von der UV-Dosis. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde die Beziehung zwischen Shinorin-Biosynthese und Mycosporin-Glycin-Biosynthese

untersucht, um die Regulation zu verstehen, die die unterschiedlichen *in vivo*-Konzentrationen verursacht (siehe Abschnitt 2.2.2 und Kapitel 4).

2.1.1 Berechnung des Sunscreen-Faktors für Shinorin *in vivo*

Die Berechnung des Sunscreen-Faktors wird im vorliegenden Fall anhand des Shinorin-Gehaltes durchgeführt, da Shinorin das Hauptprodukt unter UV-Streß ist. Dieser Wert liegt in der Größenordnung von 5 $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht, was einem Anteil am Trockengewicht von unter 0,2% entspricht. Mit Hilfe der Daten von Fay *et al.* (1964) zu Zellzahl, Zellgröße und Trockengewicht dieses Cyanobakteriums kann die MAA-Konzentration in der Zelle berechnet werden. Der Shinorin-Gehalt von 5 $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht entspricht damit einer Konzentration von 1,5 mM. Aus diesem Wert kann mit den in Abschnitt 1.1.2 aufgeführten Formeln der Sunscreen-Faktor berechnet werden. Für eine einzelne *Chlorogloeopsis*-Zelle mit einem Durchmesser von 4 μm ergibt sich ein Sunscreen-Faktor von 0,03 (bei 333 nm). Im Vergleich zu anderen Cyanobakterien ist dies ein niedriger Wert, der auf einen geringen spezifischen MAA-Gehalt zurückzuführen ist (Garcia-Pichel & Castenholz, 1993). Man sollte dabei allerdings berücksichtigen, daß dieser Stamm für über 40 Jahre in Kultur gehalten wurde und in dieser Zeit keinem UV-Streß ausgesetzt war, so daß die Zellen nicht nach der Fähigkeit, hohe Konzentrationen von MAAs anzureichern, selektiert wurden. Deshalb ist es denkbar, daß die Zellen aufgrund von Mutationen nicht mehr in der Lage sind, die gleichen MAA-Konzentrationen zu akkumulieren wie zum Zeitpunkt der Isolation. Ähnlich niedrige MAA-Werte wurden für einige Cyanobakterienstämme, die schon seit vielen Jahre in Kultur waren, von Appel und Garcia-Pichel in ihrer Untersuchung von PCC-Stämmen gefunden (persönliche Mitteilung, siehe auch Abschnitt 1.2), während die von Garcia-Pichel und Castenholz (1993) untersuchten Stämme, die deutlich höhere MAA-Gehalte aufwiesen, alle innerhalb eines Jahres vor der Studie isoliert worden waren. Doch auch die niedrigen MAA-Konzentrationen bieten *Chlorogloeopsis* PCC 6912 einen Schutz vor UV-Strahlung, wenn man die charakteristische Cluster-Bildung dieses Cyanobakteriums berücksichtigt. Für eine Zelle, die sich in einem Cluster unter einer Shinorin-haltigen Zelle befindetet, berechnet sich der Sunscreen-Faktor aus der Abschirmung durch die oberen Zelle ($S = 0,06$, berechnet nach Formel (1), da in diesem Fall die obere Zelle wie ein extrazellulärer Schutz wirkt) und der eigenen Abschirmung ($S = 0,03$). Das bedeutet, daß bereits für die zweite Zelle in einem Cluster fast 10% der auftreffenden UV-Photonen absorbiert werden. In einer 500

µm dicke Kruste, wie sie von Mitra (1950) beschrieben wurde, sind demzufolge die unteren Zellschichten durch die Absorption der überliegenden Zellen in hohem Maße vor UV-Strahlung geschützt. Im Einklang mit dieser Überlegung steht auch die Beobachtung von Fay *et al.* (1964), daß unter höheren Lichtintensitäten größere *Chlorogloeopsis*-Zellen ausgebildet wurden, da durch eine Vergrößerung des Zelldurchmessers auch der UV-Schutz durch Sunscreens für die einzelne Zelle vergrößert wird (Garcia-Pichel, 1994). Alle diese Daten bestätigen die Annahme, daß Shinorin als UV-Sunscreen in *Chlorogloeopsis* PCC 6912 fungiert.

2.1.2 Die physiologische Bedeutung von MAAs unter osmotischem Streß

Das Cyanobakterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912 ist der erste Organismus, für den eine Induktion der MAA-Biosynthese durch osmotischen Streß beobachtet wurde. Auf den ersten Blick stützt diese Tatsache die Vermutung von Oren (1997), daß MAAs als Osmolyte fungieren könnten. Jedoch macht der MAA-Gehalt nur 2% des Gehaltes der beiden bekannten Osmolyte Saccharose und Trehalose in diesem Cyanobakterium aus. Der Effekt der MAAs ist demzufolge sehr gering, und es ist anzunehmen, daß sie dem Organismus nicht primär als Osmolyte dienen. Da oxidativer Streß eine Folge von Salzstreß sein kann (Dionisio-Sese & Tibta, 1998; Hernández *et al.*, 1993), ist es auch denkbar, daß der Organismus mit der Synthese von MAAs auf diesen erhöhten oxidativen Streß reagiert. Dies gilt besonders, wenn man berücksichtigt, daß für Mycosporin-Glycin eine antioxidierende Wirkung *in vitro* nachgewiesen wurde (Dunlap & Yamamoto, 1995). Allerdings produzierten die Zellen keine MAAs, wenn sie ausschließlich unter oxidativem Streß standen (Wachstum in einem sauerstoffundurchlässigen Gefäß oder in Gegenwart von Methylenblau). Diese Beobachtung steht im Einklang mit Untersuchungen an dem MAA-produzierenden Cyanobakterium *Chlorogloeopsis* sp. Stamm O-89-Cgs(1), bei dem nach langfristigen Inkubationen mit Stickstoff-, Luft- oder Sauerstoff-Begasung in keinem der Ansätze MAA-Synthese festzustellen war (Sawall und Garcia-Pichel, persönliche Mitteilung). Außerdem wird das Mycosporin-Glycin-Molekül unter oxidierenden Bedingungen abgebaut (Dunlap & Yamamoto, 1995). Ein solcher Abbau konnte unter Salzstreß jedoch nicht beobachtet werden (siehe Abschnitt 2.2.2). Auch die Synthese von Shinorin unter Salz-Streß läßt sich durch diese Hypothese nicht erklären, da Shinorin keine antioxidierende Wirkung besitzt. Demnach bleibt die Funktion von MAAs unter Salzstreß unklar.

Die synergistische Wirkung von Salz- und UV-Streß auf den MAA-Gehalt läßt sich mit einer osmotischen Kontrolle der Biosynthese erklären. Als niedermolekulare, wasserlösliche Substanzen tragen MAAs zum osmotischen Druck in der Zelle bei. Dementsprechend sollte ihre Biosynthese so reguliert werden, daß Schäden durch eine zu hohe Konzentration vermieden werden (Garcia-Pichel, 1994). Ein erhöhter extrazellulärer osmotischer Druck, wie er durch die Zugabe von Salz entsteht, ermöglicht den Zellen eine höhere Akkumulation von MAAs. Allerdings haben die MAAs mit einer Konzentration von 1.5 mM, wie sie bei UV-Streß auftritt (siehe Abschnitt 2.1.1), nur einen geringen Anteil am intrazellulären Druck der Zelle: nach der van't Hoff-Gleichung üben sie einen osmotischen Druck von 4 kPa aus (Bergethon, 1998). Vergleicht man diesen Wert mit dem intrazellulären Druck, der bei gramnegativen Bakterien zwischen 500 und 600 kPa liegt (Booth, 1999), ist der Beitrag der MAAs geringer als 1 %. Es erscheint zunächst unwahrscheinlich, daß solch eine niedrige Konzentration von physiologischer Bedeutung für die Zelle sein kann. Man sollte jedoch berücksichtigen, daß die ursprünglichen MAA-Konzentrationen in diesem Organismus möglicherweise höher waren (siehe Abschnitt 2.1.1) und daß außerdem die MAAs nur einen kleinen Teil der wasserlöslichen Metabolite in der Zelle ausmachen, die alle zum osmotischen Druck beitragen, so daß Änderungen in der Konzentration einzelner Metabolite in der Summe zu beträchtlichen Druckänderungen führen könnten. Es ist vorstellbar, daß für solche gelösten Metabolite eine generelle osmotische Regulation existiert, um die *in vivo*-Konzentrationen zu steuern. Daß osmotische Effekte ein Problem für die Zelle darstellen können, läßt sich auch daran erkennen, daß viele wichtige Substrate in Form von Polymeren gespeichert werden (Cyanophycin, Polyphosphat, Glykogen), da sie in der gebundenen Form osmotisch nicht aktiv sind.

Es ist auffällig, daß ausschließlich die Mycosporin-Glycin-Konzentration auf die Erhöhung des extrazellulären Druckes reagiert. Da Mycosporin-Glycin eine direkte Vorstufe in der Biosynthese von Shinorin ist (siehe Abschnitt 2.2.2), könnte dies bedeuten, daß die Biosynthese bis zum Mycosporin-Glycin osmotisch reguliert ist, während die Shinorin-Biosynthese ausschließlich unter Kontrolle der UV-Dosis steht.

2.1.3 Transport von MAAs

Wenn *Chlorogloeopsis*-Zellen nach einer Woche Wachstum in NaCl-haltigem Medium in Medium ohne NaCl transferriert wurden (hypoosmotischer Schock), wurden die in der

Zelle enthaltenen MAAs spontan an die Umgebung abgegeben. Eine Abgabe von MAAs an das Medium wurde bereits von Vernet und Whitehead (1996) für den Dinoflagellaten *Lingulodinium polyedra* beschrieben. In dem Fall handelte es sich allerdings um Zellen, die unter UV-Streß standen, und die Autoren konnten nicht ausschließen, daß eine Lyse der Zellen für die Abgabe der MAAs verantwortlich war. Bei *Chlorogloeopsis* PCC 6912 wurde dagegen keine Beschädigung der Zellen beobachtet. Vielmehr findet die Abgabe der MAAs bei hypoosmotischem Druck wahrscheinlich durch mechanosensitive Kanäle statt, die bei vielen Mikroorganismen und auch bei Cyanobakterien nachgewiesen wurden (Moe *et al.*, 1998). Durch diese Kanäle werden bei einem hypoosmotischen Schock niedermolekulare Substanzen ausgeschüttet, um den intrazellulären Druck zu senken. Während davon alle im Cytoplasma gelösten Substanzen betroffen sind, wurde jedoch nachgewiesen, daß bestimmte Substanzen gegenüber anderen bevorzugt abgegeben werden (Ruffert *et al.*, 1997). Ein entsprechender Effekt wurde auch bei der MAA-Abgabe beobachtet, bei der Mycosporin-Glycin gegenüber Shinorin bevorzugt wird. Die Vermutung, daß durch diese Kanäle permanent eine langsame Abgabe von MAAs stattfindet („Leakage“) und auf diese Weise die Zusammensetzung der MAAs in der Zelle beeinflußt wird (siehe Kapitel 3), wurde durch Experimente mit radioaktiv markierten MAAs widerlegt. Dabei konnte nachgewiesen werden, daß die MAA-Moleküle über längere Zeit *in vivo* stabil sind und weder abgebaut noch abgegeben werden (siehe Abschnitt 2.2.2 und Kapitel 4). Ein aktiver Transport von MAAs in die Zelle konnte nicht nachgewiesen werden, weder für Zellen, bei denen die MAA-Biosynthese durch UV- oder Salzstreß induziert waren, noch für Zellen, die unter ungestreßten Bedingungen wuchsen.

2.2 Biochemie der MAA-Biosynthese

Die Biosynthese der MAAs wurde *in vivo* mit radioaktiv markierten Substanzen und spezifischen Inhibitoren untersucht. Von Interesse waren der Ursprung des MAA-Ringes und der Seitenketten. Frühere Untersuchungen an Eukaryoten deuten darauf hin, daß die Biosynthese des MAA-Ringes vom Shikimat-Weg abzweigt (Favre-Bonvin *et al.*, 1987, siehe auch Kapitel 4). Außerdem sollte geklärt werden, ob Mycosporin-Glycin eine direkte Vorstufe von bisubstituierten MAAs ist.

2.2.1 Ursprung des MAA-Ringes und der Seitenketten

Es wurde ein spezifischer Einbau von Pyruvat, nicht aber von Acetat in den MAA-Ring festgestellt. Außerdem hatte Tyrosin, das in Cyanobakterien über eine Rückkopplungshemmung das erste Enzym des Shikimat-Weges inhibiert (siehe Abschnitt 1.3.1), einen negativen Effekt auf die MAA-Biosynthese. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme von Favre-Bonvin *et al.* (1987), daß die Biosynthese des MAA-Ringes vom Shikimat-Weg abzweigt. Diese Ähnlichkeit zwischen der MAA-Biosynthese in dem prokaryotischen Cyanobakterium mit dem von Favre-Bonvin *et al.* untersuchten eukaryotischen Pilz läßt vermuten, daß die MAA-Synthese in diesen beiden Organismen einen gemeinsamen Ursprung hat (siehe auch Garcia-Pichel, 1998).

Hinsichtlich der Herkunft der MAA-Seitenketten konnte hiermit zum ersten Mal nachgewiesen werden, daß diese von den entsprechenden Aminosäuren abstammen. Versuche, den Einbau der Aminosäuren in die MAAs *in vitro* nachzuweisen, waren nicht erfolgreich. Bei diesen *in vitro*-Assays wurden zu Zellextrakten außer den entsprechenden Substraten (Mycosporin-Glycin oder 6-Deoxygadusol und radioaktiv markierte Aminosäuren) Lösungen von Nucleosidtriphosphaten hinzugefügt, da angenommen wurde, daß diese für den Ablauf der Reaktion, zum Beispiel zur Aktivierung des Ringes, notwendig seien. Einerseits kann das Scheitern dieser Versuche auf methodische Probleme zurückzuführen sein, andererseits ist es aber auch möglich, daß die Aktivierung über einen anderen Mechanismus erfolgt. Denkbar wäre zum Beispiel die Knüpfung einer Bindung zwischen dem MAA-Ring und einem Sulfidrest des entsprechenden Enzyms ähnlich wie bei der nicht-ribosomalen Peptidsynthese (Stachelhaus & Marahiel, 1995). Ein Hinweis auf den zweiten Mechanismus könnte der negative Effekt sein, den der Inhibitor Cerulenin schon in geringen Konzentrationen auf die MAA-Biosynthese hat. Dieser Inhibitor wirkt auf Enzyme mit einem Pantetheinrest (Kohlenstoffkette mit einer Sulfhydrylgruppe) im aktiven Zentrum wie Polyketid- und Fettsäuresynthasen, die einen ähnlichen Mechanismus wie die nicht-ribosomalen Peptidsynthasen besitzen (Hiltunen & Söderhäll, 1992; Omura & Takeshima, 1974). Unter der Annahme, daß Cerulenin den Einbau der Aminosäuren hemmt, wäre eine Anreicherung des unsubstituierten MAA-Ringes in entsprechenden Zellextrakten zu erwarten. In diesen Fällen wurde jedoch kein freies 6-Deoxygadusol in entsprechenden Zellextrakten nachgewiesen. Dementsprechend konnte keine der Theorien für den Reaktionsmechanismus des Einbaus der Aminosäuren eindeutig belegt werden.

2.2.2 Biosynthese von bisubstituierten MAAs

Mit radioaktiv markiertem Glycin wurden MAAs *in vivo* markiert, und die Lokalisation dieser Markierung über die Zeit verfolgt („pulse-chase experiment“). Dieses Experiment ergab, daß das monosubstituierte Mycosporin-Glycin die direkte Vorstufe des bisubstituierten Shinorins ist. Damit wurde zum ersten Mal ein biosynthetischer Zusammenhang zwischen verschiedenen MAAs in einem Organismus nachgewiesen. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, daß Mycosporin-Glycin der Vorläufer aller bisubstituierter MAAs ist, die ein Glycin in einer Seitenkette tragen. Wenn diese Annahme zutrifft, sollten in allen Organismen, die solche MAAs produzieren, Spuren von Mycosporin-Glycin zu finden sein. Dies ist nicht der Fall (Karentz *et al.*, 1991), allerdings ist es möglich, daß in den entsprechenden Fällen die Mengen an Mycosporin-Glycin so gering waren, daß sie unterhalb der Detektionsgrenze lagen.

Die Experimente mit radioaktiv markierten MAAs erlaubten außerdem eine Aussage über die Umsatzrate von MAAs. Es wurde festgestellt, daß die MAAs *in vivo* weder unter Salz- noch unter UV-Streß abgebaut oder abgegeben wurden. Diese Untersuchungen bieten damit einen deutlichen Vorteil gegenüber früheren Studien, in denen nur die Konzentrationen der Metabolite im Fließgleichgewicht („steady state“) bestimmt werden konnten, ohne Informationen über die Umsatzrate der MAAs zu liefern (Jokiel *et al.*, 1997; Lesser, 1996; Riegger & Robinson, 1997).

2.3 UVB-Photorezeptor

In dieser Arbeit wurde bewiesen, daß für die Induktion der MAA-Biosynthese in *Chlorogloeopsis* PCC 6912 ein Photorezeptor verantwortlich ist, der ausschließlich auf UVB- und kurzwellige UVA-Strahlung reagiert. Somit ist dies der erste Hinweis auf einen UVB-Photorezeptor in einem Prokaryoten. Das Aktionsspektrum zeigt ein einzelnes Maximum bei 310 nm und fällt in Richtung des langwelligeren UVA-Bereiches ab. Oberhalb von 340 nm wurde keine Aktivität mehr festgestellt. Bei Anwendung von polychromatischer UV-Strahlung verschiedener Wellenlängenbereiche stellte sich heraus, daß sich der Bereich unterhalb von 305 nm negativ auf den MAA-Gehalt auswirkt, auch wenn die Zellen gleichzeitig der Strahlung ausgesetzt sind, die eine maximale Induktion der MAA-Biosynthese bewirkt. Dementsprechend konnte das Aktionsspektrum für den kurzwelligeren UVB-Bereich nicht exakt bestimmt werden, so daß es möglich ist, daß der

Photorezeptor in diesem Bereich ein zweites Maximum besitzt. Die Form und Lage des Aktionsspektrum ähnelt dem Absorptionsspektrum eines reduzierten Pterins. Diese Tatsache und die Wirkung spezifischer Inhibitoren lassen vermuten, daß es sich bei dem Chromophor des Photorezeptors um ein Pterin handelt.

Die negative Wirkung von kurzweiliger UVB-Strahlung auf den MAA-Gehalt ist hinsichtlich einer geschädigten stratosphärischen Ozonschicht (Farman *et al.*, 1985; Jones & Shanklin, 1995; Solomon, 1990) von Bedeutung, da deren Abnahme zu einer Intensitätszunahme von eben dieser Strahlung führt (National Research Council Report, 1982; Crutzen, 1992). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, daß durch diese Strahlung der UV-Schutzmechanismus beeinträchtigt wird. Damit tritt eine zusätzliche Schädigung der Zellen durch UV-Strahlung längerer Wellenlängen auf, da diese Strahlung nicht mehr ausreichend von den MAAs absorbiert werden kann.

2.4 Schlußbetrachtung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die MAA-Biosynthese in dem Cyanobakterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912 unter der Kontrolle verschiedener Faktoren steht. Das Zusammenwirken dieser Faktoren ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Die Wirkung von UV-Strahlung steht im Einklang mit der Annahme, daß MAAs als UV-Sunscreens wirken, ebenso wie die Tatsache, daß das Hauptprodukt unter UV-Strahlung Shinorin ist, welches einen um 35% höheren Extinktionskoeffizienten als Mycosporin-Glycin besitzt und somit UV-Strahlung effektiver absorbieren kann. Ihre Photostabilität *in vivo* spricht ebenfalls für ihre Rolle als passive UV-Schutzsubstanzen. Unerwartet war allerdings die Wirkung von osmotischem Streß auf die MAA-Biosynthese, da dies ihrer ausschließlichen Rolle als UV-Sunscreens zu widersprechen scheint. Doch da die Möglichkeit, daß sie als Osmolyte oder Antioxidantien fungieren, ausgeschlossen werden kann, muß es eine alternative Erklärung geben. Man sollte dabei berücksichtigen, daß die Experimente dieser Arbeit unter Laborbedingungen durchgeführt wurden, die nicht notwendigerweise den natürlichen Bedingungen entsprechen, unter denen diese Regulationsmechanismen entstanden sind. In der Natur werden Streßsituationen in vielen Fällen nicht isoliert auftreten, vielmehr ist zu erwarten, daß sie voneinander abhängen. So kann osmotischer Streß die Folge von Austrocknung sein, die verursacht wird von starker Sonneneinstrahlung, so daß osmotischer Streß und UV-Streß gleichzeitig auftreten. Außerdem kann die Austrocknung der Umwelt auch eine Austrocknung der Zellen zur

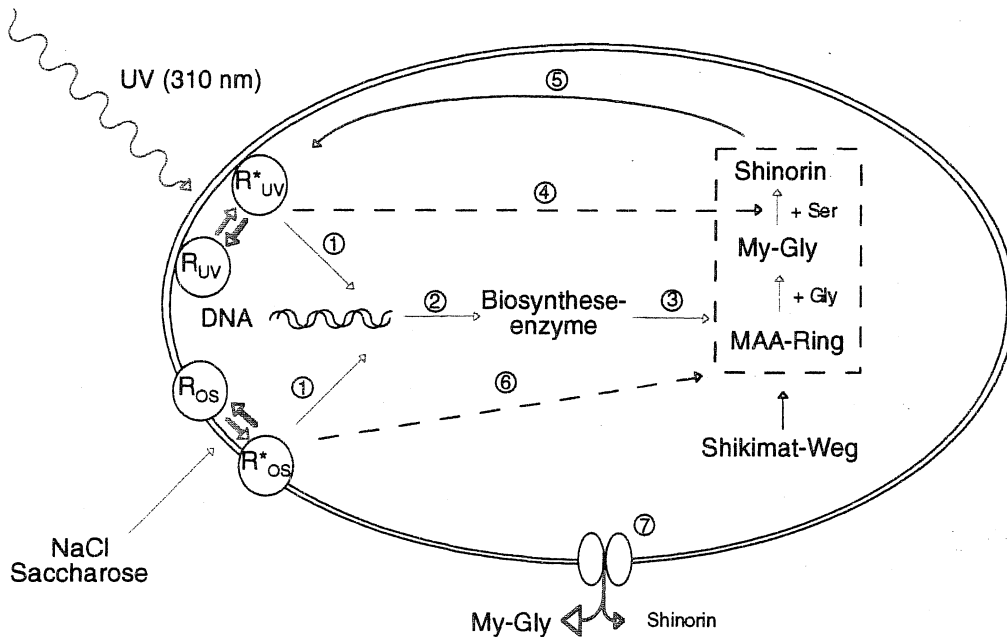


Abb.1: Schematische Darstellung der hypothesierten Regulationsmechanismen, die die MAA-Biosynthese in *Chlorogloeopsis* PCC6912 kontrollieren. Positive (grüne Pfeile), negative (rote Pfeile) und regulierende (schwarze gestrichelte Pfeile) Effekte sind dargestellt. UV-Strahlung oder osmotischer Druck werden von entsprechenden Rezeptoren (R_{UV} oder R_{OS}) detektiert, die in ihre aktive Form überführt werden (R^*_{UV} oder R^*_{OS}) und das Signal in der Zelle weiterleiten (1). Dies hat die Genexpression der MAA-Biosyntheseenzyme zur Folge (2), die wiederum die MAA-Biosynthese katalysieren (3). Dabei wird die Shinorin-Synthese direkt von der UV-Intensität kontrolliert (4), rein physikalisch findet eine Regulation über eine Beschattung des Photorezeptors durch Shinorin und Mycospurin-Glycin statt (5). Die gesamte MAA-Synthese steht unter osmotischer Kontrolle (6). Durch mechanosensitive Kanäle findet bei einem hypoosmotischen Schock eine MAA-Abgabe statt (7).

Folge haben. Demzufolge wäre ein Organismus, der unter osmotischem Streß UV-Schutzsubstanzen synthetisiert, optimal an seine Umweltbedingungen angepaßt. Einerseits ermöglicht ihm die Synthese von Mycospurin-Glycin, der direkten biosynthetischen Vorstufe des eigentlichen Sunscreen-Moleküls, eine schnelle Reaktion auf eventuell auftretenden UV-Streß, andererseits ist die Synthese von passiven Schutzsubstanzen bei bevorstehender Austrocknung von Vorteil, da aktive Schutzmechanismen gegen UV-Strahlung im trockenen Zustand nicht wirksam sind. Doch diese Annahmen sind spekulativ und müssen durch weitere Untersuchungen an diesem und anderen MAA-produzierenden Cyanobakterien belegt werden.

Hinsichtlich der UV-Detektion des untersuchten Cyanobakteriums ist auffällig, daß das Maximum des Aktionsspektrums der Shinorin-Biosynthese um 20 nm verschoben zum Absorptionsmaximum von Shinorin liegt. Eine solche Verschiebung ist von Vorteil für den Organismus, denn sie ermöglicht ihm eine bessere Anpassung an die

Strahlungsbedingungen als Zellen mit einem Rezeptor, der auf kürzere oder längere Wellenlängen reagiert. Denn einerseits detektiert der Rezeptor noch im Bereich der Strahlung, die von Shinorin zum Schutz der Zelle absorbiert wird. Andererseits ist das Detektionsmaximum weit genug vom Absorptionsmaximum von Shinorin entfernt, um zu verhindern, daß der Rezeptor nach einer geringen Akkumulation von Shinorin die Induktionsstrahlung nicht mehr detektieren kann. Dies hätte periodische Schwankungen in der Konzentration des Sunscreens aufgrund der verzögerten Biosynthese und damit eine Verminderung der Schutzwirkung zur Folge, da der Rezeptor die Shinorin-Biosynthese erst wieder anregen könnte, wenn die Konzentration des Sunscreens unter einen bestimmten Schwellenwert gefallen wäre.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten einige Fragen zur MAA-Biosynthese beantwortet werden, allerdings wurde dadurch auch eine Vielzahl neuer Fragen aufgeworfen. Eine genaue Kenntnis der Biosynthesereaktionen ist notwendig, um die Regulation durch die verschiedenen Umweltfaktoren besser verstehen zu können. Hilfreich für diese Aufgabe wäre die Untersuchung von Mutanten, die sich in der Regulation oder der MAA-Biosynthese vom Wildtyp unterscheiden. Im Rahmen dieser Arbeit ist erfolglos versucht worden, solche Mutanten von *Chlorogloeopsis* PCC 6912 zu erzeugen („random cartridge mutagenesis“ nach Chauvat *et al.*, 1989; Hagemann & Zuther, 1992), diese Versuche sollten in der Zukunft intensiviert werden oder die Experimente an einem MAA-produzierenden Cyanobakterium durchgeführt werden, das für molekularbiologische Techniken zugänglicher ist. Weiterhin wäre es von Interesse, wieweit diese Erkenntnisse auf andere MAA-produzierende Organismen übertragbar sind. Dabei sind die Ergebnisse zu den Biosyntheseprozessen wahrscheinlich allgemein gültig, während der Photorezeptor möglicherweise spezifisch für Cyanobakterien ist.

2.5 Literaturverzeichnis

Bergethon, P. R. (1998). *The physical basis of biochemistry*. Springer-Verlag, New York.

Booth, I. R. (1999). *Adaptation to extreme environments*. In: Lengeler, J. W., Drews, G. & Schleger, H. G. (Eds.), *Biology of the prokaryotes*, Thieme, Stuttgart.

Brahamsha, B. & R. Haselkorn (1992). Identification of multiple RNA polymerase sigma factor homologs in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120: cloning, expression, and inactivation of the *sigB* and *sigC* genes. *J. Bacteriol.* **174**, 7273-7282.

Chauvat, F., P. Rouet, H. Bottin & A. Boussac (1989). Mutagenesis by random cloning of an *Escherichia coli* kanamycin resistance gene into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: Selection of mutants defective in photosynthesis. *Molecular and General Genetics* **216**, 51-59.

Crutzen, P. J. (1992). Ultraviolet on the increase. *Nature* **356**, 104-105.

Dionisio-Sese, M. L. & S. Tibta (1998). Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci.* **135**, 1-9.

Dunlap, W. C. & Y. Yamamoto (1995). Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comp. Biochem. Physiol.* **112B**, 105-114.

Farman, J. C., B. G. Gardiner & J. D. Shanklin (1985). Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO_x/NO_x interaction. *Nature* **315**, 207-210.

Favre-Bonvin, J., J. Bernillon, N. Salin & N. Arpin (1987). Biosynthesis of mycosporines: mycosporine glutaminol in *Trichothecium roseum*. *Phytochem.* **26**, 2509-2514.

Fay, P., H. D. Kumar & G. E. Fogg (1964). Cellular factors affecting nitrogen fixation in the blue-green alga *Chlorogloea fritschii*. *J. Gen. Microbiol.* **35**, 351-360.

Garcia-Pichel, F. (1994). A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnol. Oceanogr.* **39**, 1704-1717.

Garcia-Pichel, F. (1998). Solar ultraviolet and the evolutionary history of cyanobacteria. *Origins Life Evol. Biosphere* **28**, 321-347.

Garcia-Pichel, F. & R. W. Castenholz (1993). Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 163-169.

Hagemann, M. & E. Zuther (1992). Selection and characterization of mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 unable to tolerate high salt concentrations. *Arch. Microbiol.* **158**, 429-434.

Hecker, M., W. Schumann & U. Völker (1996). Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **19**, 417-428.

Hecker, M. & U. Völker (1998). Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the σ^B regulon. *Mol. Microbiol.* **29**, 1129-1136.

Hernández, J. A., F. J. Corpas, M. Gómez, L. A. del Río & F. Sevilla (1993). Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiol. Plant.* **89**, 103-110.

Hiltunen, M. & K. Söderhäll (1992). Inhibition of polyketide synthesis in *Alternaria alternata* by the fatty acid synthesis inhibitor cerulenin. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1043-1045.

Jokiel, P. L., M. P. Lesser & M. E. Ondrusek (1997). UV-absorbing compounds in the coral *Pocillopora damicornis*: Interactive effects of UV radiation, photosynthetically active radiation, and water flow. *Limnol. Oceanogr.* **42**, 1468-1473.

Jones, A. E. & J. D. Shanklin (1995). Continued decline of total ozone over Halley, Antarctica, since 1985. *Nature* **376**, 409-411.

- Karentz, D., F. S. McEuen, M. C. Land & W. C. Dunlap (1991).** Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. *Mar. Biol.* **108**, 157-166.
- Lesser, M. P. (1996).** Acclimation of phytoplankton to UV-B radiation: oxidative stress and photoinhibition of photosynthesis are not prevented by UV-absorbing compounds in the dinoflagellate *Prorocentrum micans*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **132**, 287-297.
- Mitra, A. K. (1950).** Two new algae from indian soils. *Ann. Bot.* **14**, 457-464.
- Moe, P. C., P. Blount & C. Kung (1998).** Functional and structural conservation in the mechanosensitive channel MscL implicates elements crucial for mechanosensation. *Mol. Microbiol.* **28**, 583-592.
- National Research Council Report (1982).** Ozone-layer depletion, Washington, D.C.
- Omura, S. & H. Takeshima (1974).** Inhibition of the biosynthesis of leucomycin, a macrolide antibiotic, by cerulenin. *J. Biochem.* **75**, 193-195.
- Oren, A. (1997).** Mycosporine-like amino acids as osmotic solutes in a community of halophilic cyanobacteria. *Geomicrobiol. J.* **14**, 231-240.
- Riegger, L. & D. Robinson (1997).** Photoinduction of UV-absorbing compounds in Antarctic diatoms and *Phaeocystis antarctica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **160**, 13-25.
- Ruffert, S., C. Lambert, H. Peter, V. F. Wendisch & R. Krämer (1997).** Efflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity. *Eur. J. Biochem.* **247**, 572-580.
- Solomon, S. (1990).** Progress towards a quantitative understanding of Antarctic ozone depletion. *Nature* **347**, 347-354.
- Stachelhaus, T. & M. A. Marahiel (1995).** Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **125**, 3-14.

Vernet, M. & K. Whitehead (1996). Release of ultraviolet-absorbing compounds by the red-tide dinoflagellate *Lingulodinium polyedra*. *Mar. Biol.* **127**, 35-44.

Kapitel 3

Ultraviolet and osmotic stresses induce and regulate the synthesis of mycosporines in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912

Anne Portwich and Ferran Garcia-Pichel

Archives of Microbiology 172: 187-192 (1999)

A B S T R A C T

The cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912 was found to synthesize and accumulate two putative UV-sunscreen compounds of the mycosporine (mycosporine-like amino acid, MAA) type: mycosporine-glycine and shinorine. These MAAs were not constitutively present in the cells; their synthesis could be induced specifically either by exposure to UVB radiation (280-320 nm) or by osmotic stress, but not by other stress factors such as heat or cold shock, nutrient limitation, or photooxidative stress. A significant synergistic enhancement of MAA synthesis was observed when both stress factors were applied in combination. Although osmotic stress could induce MAA synthesis, comparison of the intracellular contents of MAAs with those of sugar osmolytes (glucose and trehalose) indicated that MAAs play no significant role in attaining osmotic homeostasis. UVB strongly enhanced the accumulation of shinorine, whereas osmotic stress had a more pronounced effect on mycosporine-glycine. This differential effect on the steady-state contents of each MAA could be explained either by differential regulation of biosynthesis or by differential loss rates of MAAs (leakage) under each condition. A preferential leakage of mycosporine-glycine from the cells after a hypoosmotic shock was detected. The results are interpreted in terms of an adaptive necessity for a combined regulatory control responding to both UV and external osmotic conditions in organisms that accumulate water-soluble sunscreens intracellularly.

INTRODUCTION

Mycosporines (mycosporine-like amino acids; MAAs) are small, water-soluble molecules whose spectrum has a sharp absorption band in the UV with maxima between 310 and 360 nm. Chemically, MAAs consist of a substituted cyclohexene core condensed with one or two amines, most commonly amino acids (see Fig. 1). MAAs were first isolated from mycelia of sporulating fungi (Trione & Leach, 1969; Favre-Bonvin *et al.*, 1976), but have been also found in a large variety of other microorganisms and macroorganisms, mainly from the marine environment (Karentz *et al.*, 1991). The occurrence of hydrophilic UV-absorbing compounds in cyanobacteria was first described by Shibata (1969). Garcia-Pichel and Castenholz (1993) have reported the widespread occurrence of MAAs in cyanobacterial strains isolated from habitats exposed to strong insolation.

Regarding the biological function of these metabolites in cyanobacteria, there exists strong evidence that their primary function is to protect the cell from UV damage by absorbing incoming UV radiation (Garcia-Pichel *et al.*, 1993), i.e. they function as UV sunscreens. In contrast to scytonemin, a cyanobacterial UV-absorbing pigment that accumulates in the extracellular sheath (Garcia-Pichel & Castenholz, 1991), MAAs are most commonly intracellular (Garcia-Pichel & Castenholz, 1993), although mycosporines covalently linked to oligosaccharide compounds accumulate in the extracellular slime in at least one species (Böhm *et al.*, 1995). As small solutes in the cell sap, they are bound to exert a certain intracellular osmotic pressure and to contribute to turgor; thus, their accumulation in large amounts may cause physiological side effects (Garcia-Pichel, 1994), making a regulatory limitation of MAA accumulation necessary in order to maintain homeostasis. Alternative biological functions for MAAs have been suggested. Dunlap and Yamamoto (1995) have found a moderate antioxidant activity in mycosporine-glycine, but not in shinorine. Oren (1997) has suggested that MAAs may also function as osmolytes because high concentrations of MAAs can be found in natural microbial populations living in hypersaline environments.

We studied the production, regulation, and composition of MAAs in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912 in an attempt to unravel possible physiological interactions between UV and osmotic effects.

MATERIAL AND METHODS

Organism and growth conditions

Stock cultures of the diazotrophic, moderately thermophilic cyanobacterial strain *Chlorogloeopsis* PCC 6912 were grown in batch cultures at 28°C in liquid nitrogen-free BG11₀ medium (Rippka *et al.*, 1979) buffered with 6 mM glycylglycine (pH 7.5) and supplemented with 5 mM NaHCO₃. They were subsequently incubated under continuous white light from cool-white fluorescent light tubes at a quantum irradiance of 50 μmol m⁻²sec⁻¹. For UVB stress experiments, cells were grown as filter cultures (Garcia-Pichel *et al.*, 1992) to prevent self-shading effects and to ensure even dosage. Succinctly, the cells were filtered on preweighed polycarbonate membrane filters (Isopore Membrane Filters, Millipore, Bedford, Mass., USA; 1.2 μm pore size, 25-mm diameter) and were incubated floating on BG11₀ medium within plastic petri dishes. Preliminary experiments showed that, in this strain, self-shading effects did not influence the specific MAA content if the amount of cells on the filter was kept below 1 mg dry biomass per filter (2 cm²). For the UVB time course experiment, cells were grown in batch culture under constant stirring. UVB radiation was provided by Philips TL 20W/12 RS tubes as filtered through plastic petri dish covers and was applied for 4 h daily. This set-up provided a dosage of 0.80 W m⁻² (high dose), 0.26 W m⁻² (medium dose) or 0.13 W m⁻² (low dose) of UVB irradiance spectrally centered around 313 nm (Garcia-Pichel *et al.*, 1993). All experiments were done under high UVB dose unless stated otherwise. For osmotic stress experiments, cells were grown in batch or filter cultures, as needed, in BG11₀ medium supplemented with 5 mM NaHCO₃ and appropriate solute additions. For oxidative stress, medium with 1 mM methylene blue (Sigma, Germany) was used. For temperature stress experiments, the cells were grown in batch cultures at 10, 18, 28, 40, and 50°C. BG11₀ medium without iron and EDTA was used for iron deficiency experiments. In all stress experiments (except the time course experiment), samples were taken after 1 week of growth.

Growth rate estimates

Gravimetric measurements of biomass were used to assess growth as previously published (Garcia-Pichel & Castenholz, 1991). Instantaneous growth rates were estimated assuming exponential growth kinetics and were calculated from two dry weight determinations at the beginning and end of the experiment.

Antibiotics

Stock solutions of chloramphenicol and rifampicin (Sigma, Germany) were prepared according to Gerhardt *et al.* (1994). Briefly, chloramphenicol was dissolved in ethanol at a concentration of 34 mg ml⁻¹, and rifampicin was dissolved as 2 mg ml⁻¹ in 10% (v/v) aqueous methanol. The final concentration in the medium was 50 µg ml⁻¹ for both antibiotics. Control cultures were grown with equivalent concentrations of ethanol or methanol to compensate for effects caused by the solvent. We found rifampicin to be photolabile under white light, and chloramphenicol to be unstable under UVB radiation. To compensate for this, media containing rifampicin were replaced by fresh medium daily in all treatments, and media with chloramphenicol were exchanged daily in the treatments with UVB exposure. The daily replacement of antibiotics was sufficient to suppress growth almost completely (data not shown).

Extraction and quantification of MAAs

Cells were recovered from the cultures either by retrieving and blotting the filters or by centrifugation (4,000 × *g*, 20 min, 20°C). Small, water-soluble cell components were extracted from the cells by submersion in 25% (v/v) aqueous methanol for 3–4 h at 45°C. The extract was further purified from macromolecular cell components by centrifugal ultrafiltration in Centricon-10 filter tubes (molecular weight cut-off 10,000 Da; Amicon, Beverly, Mass., USA) and was dried in a vacuum evaporator. The residual matter was dissolved in 25% (v/v) aqueous methanol and analyzed by HPLC. The HPLC solvent system was that of Stochaj *et al.* (1994) with slight modifications. MAAs were separated using a 25-cm Knauer Spherisorb S C8 and guard at a column oven temperature of 60°C. The mobile phase, consisting of 75% aqueous methanol and 0.1% acetic acid (v/v), was applied at a flow rate of 0.7 ml min⁻¹, and the MAAs were detected online with a Waters 996 photodiode array detector by obtaining full spectra between 220 and 450 nm.

Determination of MAA leakage to the growth medium and extracellular MAA degradation

In order to study MAA leakage from the cells, the spent medium of batch cultures grown under various conditions (with/without 342 mM NaCl, with/without UVB exposure) was concentrated under vacuum, dialyzed for 2 days in dialysis tubes with molecular mass cut-

offs of 100 Da (Spectra/Por, Boehringer Ingelheim, Germany) to remove the salts, and taken to dryness. The residual matter was dissolved in 25% aqueous methanol and analyzed by HPLC as above. In separate experiments, cells were grown in BG11₀ medium containing 513 mM NaCl for 1 week and then were transferred to BG11₀ medium without NaCl. Typical MAA absorption in the medium was monitored over time by spectrophotometry. After 150 min, the experiment was stopped and the MAA content in the cells and in the medium was analyzed by HPLC. In order to obtain an estimate of the stability of MAAs leaked into the medium, extracted MAAs were added to the medium of cultures growing with and without additional UVB, and the amount of MAAs in the medium was estimated by their absorption. Controls were carried out by measuring MAA degradation rates in medium without cells.

Determination of osmolytes

Osmolytes were measured according to Schoor *et al.* (1995). Briefly, cells were harvested by centrifugation, and low-molecular-mass compounds were extracted by submersion in 80% aqueous ethanol (v/v) for 3 h at 65°C. Sorbitol (50 µg) was added as internal standard. The supernatant was dried, redissolved in distilled water, and centrifuged (16,000 × *g*, 30 min). The procedure was repeated with absolute ethanol, and the supernatant was dried after centrifugation. The residual matter was dissolved in water (HPLC grade) and analyzed by HPLC (Schoor *et al.*, 1995).

RESULTS

MAAs in *Chlorogloeopsis* PCC 6912

Chlorogloeopsis PCC 6912 cells grown under UVB contained two UV-absorbing substances with absorption maxima at 310 and 333 nm, respectively. These two substances were identified by comparison with primary standards in the HPLC system as mycosporine-glycine (Ito & Hirata, 1977) and shinorine (Tsuji *et al.*, 1980) (Fig. 1).

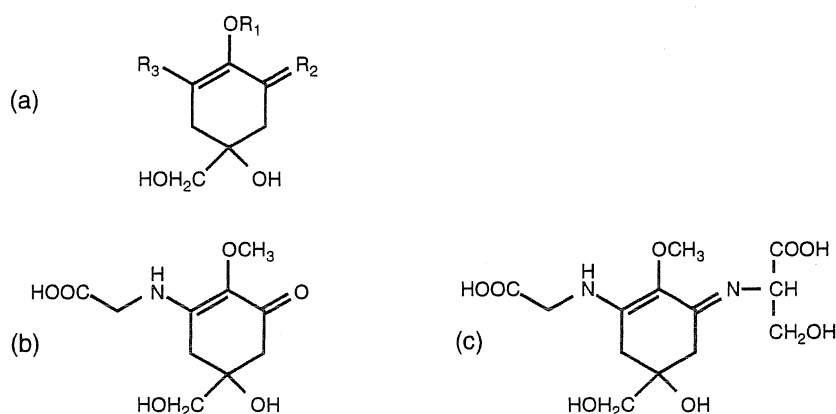


Fig. 1: (a) Generic structure of mycosporines. $R_1 = \text{H}$ or CH_3 ; $R_2, R_3 = \text{amine}$ (amino, amino acid, amino alcohol); (b) mycosporine-glycine ($\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$); (c) shinorine ($\lambda_{\text{max}} = 334 \text{ nm}$)

MAA synthesis is induced by UVB radiation

No MAAs were detected in cell extracts from *Chlorogloeopsis* grown under white light without supplementary UVB. After UVB exposure, the specific total MAA content increased until it reached a steady state after approximately 3 days (Fig. 2). The synthesis and accumulation of MAAs could be inhibited by addition of the antibiotics chloramphenicol and rifampicin (both had a bacteriostatic effect) to the growth medium (Fig. 2). Since chloramphenicol inhibits translation and rifampicin interferes with transcription, this implies that both steps are involved in the induction of MAA biosynthesis. The specific MAA content could reach values of up to $5 \mu\text{mol}$ per gram of dry weight ($\sim 0.15 \%$ dry wt.), a relatively low value in comparison with other MAA-producing strains (Garcia-Pichel & Castenholz, 1993). Under our irradiation conditions, the MAA that was preferentially synthesized under UVB stress was shinorine; it accounted for about 80% (mol/mol) of total MAA; the relative contribution of shinorine to total MAA, however, was lower at lower UV intensities (data not shown).

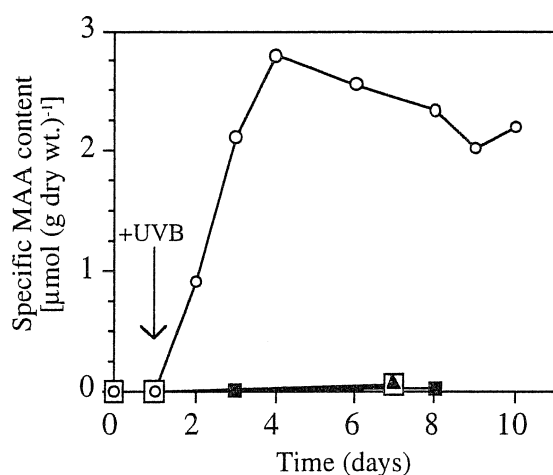


Fig. 2: Specific content of total MAA per dry weight of *Chlorogloeopsis* grown under UVB radiation (4 h day⁻¹) without antibiotics (open circles) and with the addition of chloramphenicol (solid squares) and rifampicin (solid triangles). Control cultures were grown without UVB (open squares).

MAA synthesis is induced by ionic stress

Chlorogloeopsis PCC 6912 has a low salt tolerance, growing in media containing maximally 0.7 M NaCl. Adding NaCl to the growth medium influenced the production of MAAs in *Chlorogloeopsis* PCC 6912: in combination with UVB radiation, NaCl led to an increase in the specific content of MAA. NaCl also had an effect on MAA synthesis when the cells were not exposed to UVB. In this case, NaCl alone could also induce MAA synthesis (Fig. 3). This was a true induction as well, since it could be inhibited by the addition of either chloramphenicol or rifampicin (data not shown). The MAA content in *Chlorogloeopsis* PCC 6912 was a function of the external NaCl concentration and reached its maximum at 513 mM NaCl, decreasing above that salinity (Fig. 3). Other salts (Na₂SO₄, KCl, and MgCl₂) were also tested for their ability to induce MAA synthesis and were found to have a similar effect as NaCl (data not shown).

With respect to the relative contents of mycosporine-glycine and shinorine, differences became conspicuous upon comparing salt and UVB experiments. The main MAA accumulated under UVB stress was shinorine (80 % of total MAA mol/mol). Under salt stress, both MAAs were produced, but mycosporine-glycine was more dominant (especially at high salinity). Under combined UVB and salt stress, specific MAA contents were up to threefold higher than in cells grown under UVB without salt. This was the result of a high accumulation of mycosporine-glycine. The shinorine content remained

relatively constant up to 342 mM NaCl and even decreased at concentrations above this value (Fig. 3).

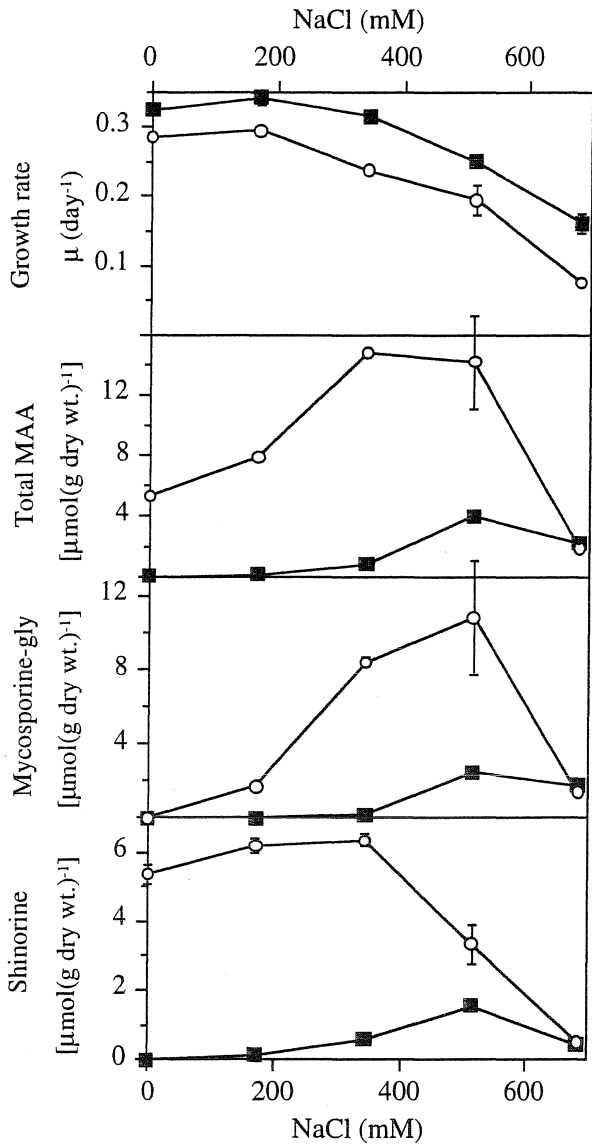


Fig. 3: Growth rates and specific MAA content per dry weight of *Chlorogloeopsis* cells grown in different NaCl concentrations with (open circles) and without (solid squares) UVB. Given are the mean values of 3 independent subcultures \pm SD.

MAA synthesis is induced by osmotic stress

Sucrose was added to the medium to exert osmotic stress without ionic stress. External sucrose could induce the synthesis of MAA, albeit the steady-state specific contents reached were substantially lower than those attained in the case of Na⁺ (Fig. 4).

Synergistic effects of osmotic and UVB stresses were also detected (Fig. 4), a situation comparable to the synergistic effect found for UVB and salt. In this experiment, two different UVB doses and two osmotic treatments were applied. In all samples, an increase in the UVB dose resulted in an increase in the amount of total MAA.

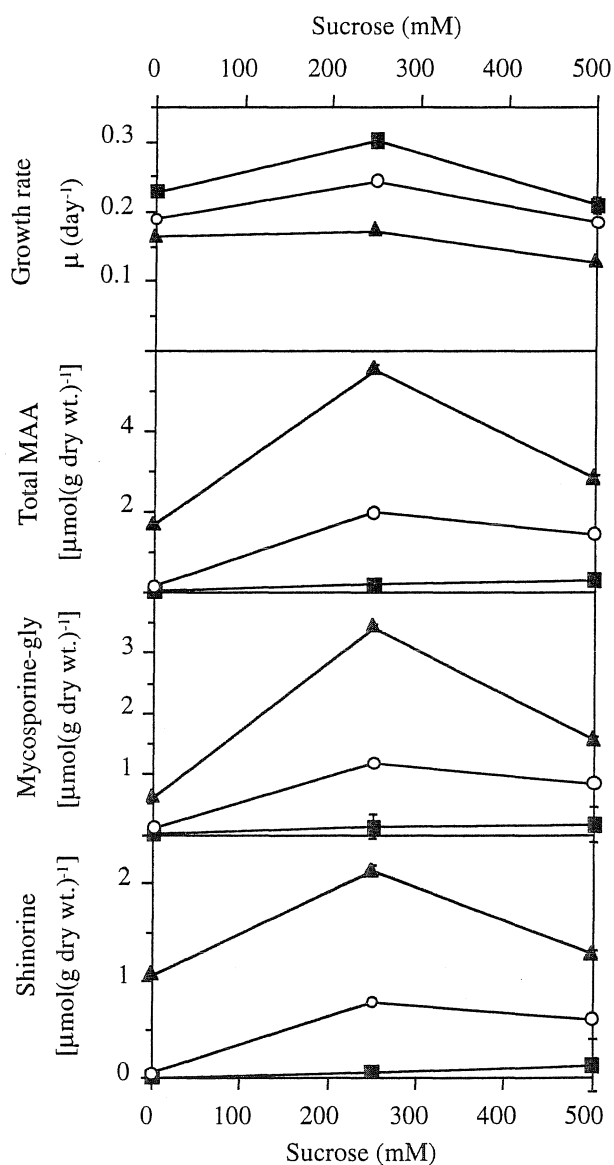


Fig. 4: Growth rates and specific MAA content per dry weight of *Chlorogloeopsis* cells grown in different sucrose concentrations with two different UVB intensities (low dose, 0.13 Wm⁻² (open circles); medium dose, 0.26 Wm⁻² (solid triangles)) and without UVB (solid squares). Given are the mean value of 3 independent subcultures ± SD.

MAA synthesis is not induced by other stress factors

To determine whether induction of MAA was under the control of general stress response mechanisms, alternative stress factors were tested. Methylene blue in the medium was used as a source of singlet oxygen that would cause additional oxidative stress (Martin & Martin, 1987). Cells were also cultivated at five different temperatures (10, 18, 28, 40, and 50°C) to test for temperature stress responses. Medium depleted of iron was used to test for nutrient deficiency. No MAA synthesis was observed under any of these growth conditions.

MAAs leak to the medium under hypoosmotic shock

After transferring MAA-producing cells from BG11₀ medium with 513 mM NaCl to BG11₀ medium without NaCl (sudden hypoosmotic shock), leakage of MAA into the medium was clearly detected. An absorption peak at 312 nm that increased linearly with the logarithm of time appeared in the medium (Fig. 5). The immediate response and the log-linear kinetics speak for a process of leakage and against an active extrusion of the compounds. This fast loss of MAAs was not caused by cell lysis since no phycobilins

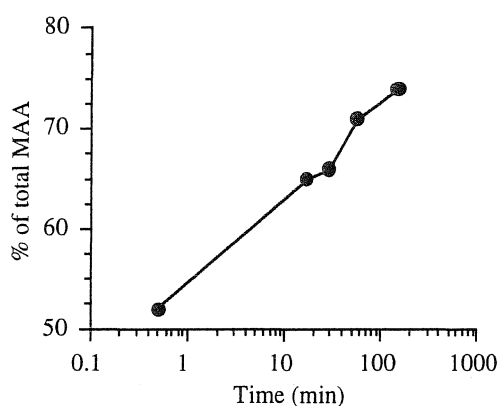


Fig. 5: Kinetics of MAA leakage to the medium after a hypoosmotic shock (time 0).

were detected in the medium. After 150 minutes, 75% of the total amount of MAAs was found in the medium and only 25% remained in the cells. The mycosporine-glycine/shinorine molar ratio in the medium was 16, whereas in the cells, it was 4 after the shock, indicating a strong preferential leakage of mycosporine-glycine over shinorine. However, no MAAs were detected in the spent medium of batch cultures of MAA-producing *Chlorogloeopsis* under any condition tested. Since monosubstituted MAAs are sensitive to photodegradation reactions in the presence of photosensitizers (Bernillon *et al.*,

1990), it is a possibility that slowly leaking MAAs are photodegraded, preventing net accumulation in the medium. MAAs added to the medium of these cultures, indeed decreased at a rate that would be sufficient to overcome the leakage rates (data not shown). It could not be distinguished whether this decrease in free MAAs was due to *in situ* degradation or due to active uptake by the cells.

MAAs do not act as osmolytes

Osmolytes were determined in cultures grown under various salt concentrations within the range of 0-855 mM NaCl. The total amount of osmolytes was directly proportional to salinity. Intracellular concentrations of sucrose - the principal osmolyte - increased with external salinity up to 513 mM NaCl. At higher salinities, trehalose - the second osmolyte - became quantitatively more important. The specific content of MAAs in the same cells amounted to less than 5 % of the total specific molar content of osmolytes (Fig. 6).

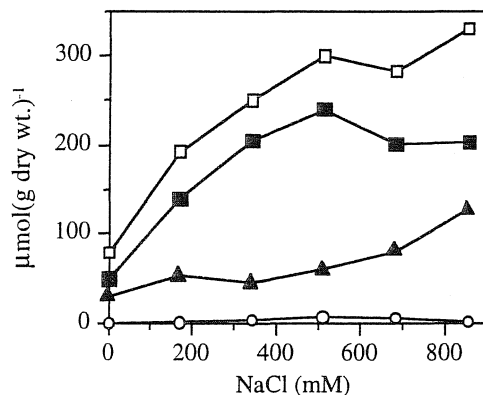


Fig. 6: Specific content of the osmolytes sucrose (solid squares) and trehalose (solid triangles), the sum of both osmolytes (open squares), and the specific content of mycosporines (open circles) per dry weight (DW) in *Chlorogloeopsis* PCC 6912 at various salt concentrations

DISCUSSION

Chlorogloeopsis PCC 6912 is the first cyanobacterium for which a true induction of MAA synthesis has been clearly demonstrated not only by the absence of detectable amounts of these metabolites in unstressed cells, but also by the inhibitory effects on MAA synthesis induction of antibiotics interfering with protein synthesis. In most other cyanobacteria, a small amount of MAAs is detected even under unstressed conditions, with exposure to UVB stress leading to a substantial increase in the MAA concentrations (Garcia-Pichel *et al.*, 1998; Garcia-Pichel *et al.*, 1993). Inhibition of MAA synthesis induction by the antibiotics leads us to assume that the sensory mechanisms involved in this process act at the level of gene expression. Shinorine has also been identified in many other cyanobacterial strains and, thus, seems to be a very common cyanobacterial MAA (Karsten & Garcia-Pichel, 1996; Garcia-Pichel *et al.*, 1998).

As it is usual in many cyanobacteria, the production of MAAs was under the control of UVB exposure so that not only could induction of synthesis could be elicited by UVB, but also the steady-state MAA contents in the cells reflected the UVB dose. This is in agreement with their proposed role as UV sunscreens. However, the effects of osmotic stress (either salts or other solutes) on MAA synthesis, which included true induction, have no precedent in the literature. That other environmental stress factors such as temperature, oxidative stress, or iron deficiency did not induce MAA synthesis, leads us to conclude that induction of MAA synthesis is specific to UVB and osmotic stresses, and is not under the control of general stress response mechanisms.

That the two MAAs synthesized by *Chlorogloeopsis* respond differently to UVB and salt could be explained by two different mechanisms: differential leakage or differential synthesis. Leakage of MAA to the medium has been detected in dinoflagellates (Vernet & Whitehead, 1996). The differential-leakage hypothesis implies that the steady-state amounts of the two MAAs synthesized reflect not only the rates of synthesis, but also the loss rates due to leakage. We could demonstrate preferential leakage of mycosporine-glycine in *Chlorogloeopsis* after hypoosmotic shock. It is conceivable that the preferential leakage of mycosporine-glycine (M_r 245) has to do with its smaller size (shinorine: M_r 332) since the processes of leakage in bacteria are mediated by highly conserved mechanosensitive channel proteins that show preference for particular solutes (Moe *et al.*, 1998). This scenario is in agreement with our experimental observations: in media with higher salinity, the extracellular osmotic pressure reduces the leakage of mycosporine-glycine, resulting in enhanced internal net accumulation of this metabolite.

Differential synthesis implies that each stress factor can cause induction of the biosynthetic pathway, but each regulates the synthesis of particular metabolites differently, leading to divergent final concentrations. In this case, UVB would primarily enhance the production of shinorine, whereas osmotic stress would preferentially activate the synthesis of mycosporine-glycine. Since a combination of these two environmental cues has a synergistic effect on the synthesis of mycosporine-glycine while shinorine concentrations remain constant, it must be concluded that the concentration of shinorine is strictly controlled by UVB dose while that of mycosporine-glycine is enhanced by salinity and UVB synergistically. It is not intuitively easy to offer an interpretation for the physiological significance of such a regulatory distinction. Unfortunately, nothing is known about the late steps of the biosynthetic pathway of mycosporines so that a more sound interpretation of the present results must await advances in biochemical studies.

The physiological necessity of an osmotic regulation of MAA could be interpreted under two different hypotheses. One could assume that MAAs also act as osmolytes (Oren, 1997), but this is highly unlikely, because other osmolytes that exist in PCC 6912 in much larger quantities fulfil this function, and the osmotic effect of MAAs in their presence is negligible. Alternatively, one could assume that MAAs serve primarily a sunscreen function (Garcia-Pichel *et al.*, 1993; Adams & Shick, 1996) but are under osmotic control in order to avoid osmotic side effects of high accumulations (increased turgor, high leakage rates) so that accumulations of large amounts are allowed only when the presence of external solutes counteracts the effects of intracellular ones. This seems to us a plausible hypothesis, although it does not necessarily require that MAA synthesis also be induced under salt stress alone. More information at the biochemical (and possibly molecular) level is required in order to elucidate the nature of the regulatory system of MAA synthesis in cyanobacteria.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank R. Appel for help in the laboratory and M. Hagemann (University of Rostock, Germany) for measuring the osmolytes. This research was supported by the EC program "Biodiversity: Applied and Systematic Investigation of Cyanobacteria" (BASIC; contract no. BIO4-CT96-0256) and by the Max-Planck-Gesellschaft.

REFERENCES

- Adams, N. L. & M. J. Shick (1996).** Mycosporine-like amino acids provide protection against ultraviolet radiation in eggs of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Photochem. Photobiol.* **64**, 149-158.
- Bernillon, J., E. Parussini, R. Letoublon, J. Favre-Bonvin & N. Aprin (1990).** Flavin-mediated photolysis of mycosporines. *Phytochem.* **29**, 81-84.
- Böhm, G. A., W. Pfeleiderer, P. Böger & S. Scherer (1995).** Structure of a novel oligosaccharide-mycosporine-amino acid ultraviolet A/B sunscreen pigment from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Biol. Chem.* **270**, 8536-8539.
- Dunlap, W. C. & Y. Yamamoto (1995).** Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comp. Biochem. Physiol.* **112B**, 105-114.
- Favre-Bonvin, J., N. Aprin & C. Brevard (1976).** Structure de la mycosporine (P 310). *Can. J. Chem.* **54**, 1105-1113.
- Garcia-Pichel, F. (1994).** A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnol. Oceanogr.* **39**, 1704-1717.
- Garcia-Pichel, F. & R. W. Castenholz (1991).** Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *J. Phycol.* **27**, 395-409.
- Garcia-Pichel, F. & R. W. Castenholz (1993).** Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 163-169.
- Garcia-Pichel, F., U. Nübel & G. Muyzer (1998).** The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* **169**, 469-482.

Garcia-Pichel, F., N. D. Sherry & R. W. Castenholz (1992). Evidence for an ultraviolet sunscreen role of the extracellular pigment scytonemin in the terrestrial cyanobacterium *Chlorogloeopsis* sp. *Photochem. Photobiol.* **56**, 17-23.

Garcia-Pichel, F., C. E. Wingard & R. W. Castenholz (1993). Evidence regarding the UV sunscreen role of a mycosporine-like compound in the cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 170-176.

Gerhardt, P., R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg (1994). *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington D.C.

Ito, S. & Y. Hirata (1977). Isolation and structure of a mycosporine from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Tetrahedron Lett.* **28**, 2429-2430.

Karentz, D., F. S. McEuen, M. C. Land & W. C. Dunlap (1991). Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. *Mar. Biol.* **108**, 157-166.

Karsten, U. & F. Garcia-Pichel (1996). Carotenoids and mycosporine-like amino acid compounds in members of the genus *Microcoleus* (cyanobacteria): a chemostatic study. *System. Appl. Microbiol.* **19**, 285-294.

Martin, B. B. & D. F. Martin (1987). Effects of four dyes on rates of oxygen production by three filamentous algae. *Microbios Lett.* **35**, 151-154.

Moe, P. C., P. Blount & C. Kung (1998). Functional and structural conservation in the mechanosensitive channel MscL implicates elements crucial for mechanosensation. *Mol. Microbiol.* **28**, 583-592.

Oren, A. (1997). Mycosporine-like amino acids as osmotic solutes in a community of halophilic cyanobacteria. *Geomicrobiol. J.* **14**, 231-240.

Rippka, R., J. Deruelles, J. Waterbury, M. Herdman & R. Y. Stanier (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**, 1-61.

Schoor, A., N. Erdmann, U. Effmert & S. Mikkat (1995). Determination of the cyanobacterial osmolyte glucosylglycerol by high-performance liquid chromatography. *J. Chromat. A* **704**, 89-97.

Shibata, K. (1969). Pigments and a UV-absorbing substance in corals and a blue-green alga living in the Great Barrier Reef. *Plant Cell Physiol.* **10**, 325-335.

Stochaj, W. R., W. C. Dunlap & J. M. Shick (1994). Two new UV-absorbing mycosporine-like amino acids from the sea anemone *Anthopleura elegantissima* and the effects of zooxanthellae and spectral irradiance on chemical composition and content. *Mar. Biol.* **118**, 149-156.

Trione, E. J. & C. M. Leach (1969). Light-induced sporulation and sporogenic substances in fungi. *Phytopathol.* **59**, 1077-1083.

Tsujino, I., K. Yabe & I. Sekikawa (1980). Isolation and structure of a new amino acid, Shinorine, from the red alga *Chondrus yendoi* Yamada et Mikami. *Bot. Mar.* **23**, 65-68.

Vernet, M. & K. Whitehead (1996). Release of ultraviolet-absorbing compounds by the red-tide dinoflagellate *Lingulodinium polyedra*. *Mar. Biol.* **127**, 35-44.

Kapitel 4

Biosynthesis of mycosporine-like amino
acids in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis*
PCC 6912

Anne Portwich and Ferran Garcia-Pichel

Submitted for publication to Journal of Natural Products

ABSTRACT

We used radiolabelled tracers and inhibitors to investigate the biosynthetic pathway of mycosporine-like amino acids (MAAs) in the cyanobacterium (blue-green alga) *Chlorogloeopsis* PCC 6912. Because feeding ^{14}C -pyruvate resulted in labeling of the core cyclohexenone (**1**), whereas feeding ^{14}C -acetate did not (in spite of strong cellular uptake), and because MAA synthesis was depressed in the presence of externally administered tyrosine (5 mM), a known feedback inhibitor of the shikimate pathway in cyanobacteria, we conclude that **1** in cyanobacteria is derived from the shikimate pathway as has been suggested for eukaryotic organisms. We used radiolabelled amino acids to determine the origin of the variable MAA side chains. We detected specific incorporation of ^{14}C -glycine and ^{14}C -serine into the corresponding side chains of mycosporine-glycine (**2**) and shinorine (**3**), showing that free amino acids are their direct precursors. A pulse-chase experiment using ^{14}C -glycine demonstrated that the monosubstituted **2** is a direct precursor of the bisubstituted **3**. These results support the idea that the large diversity of MAA molecules found in nature is caused by variations in the late steps of biosynthesis, which add amino-moieties to the core. In particular, we can postulate the existence of a shinorine synthase catalyzing the condensation of mycosporine-glycine and serine in this cyanobacterium.

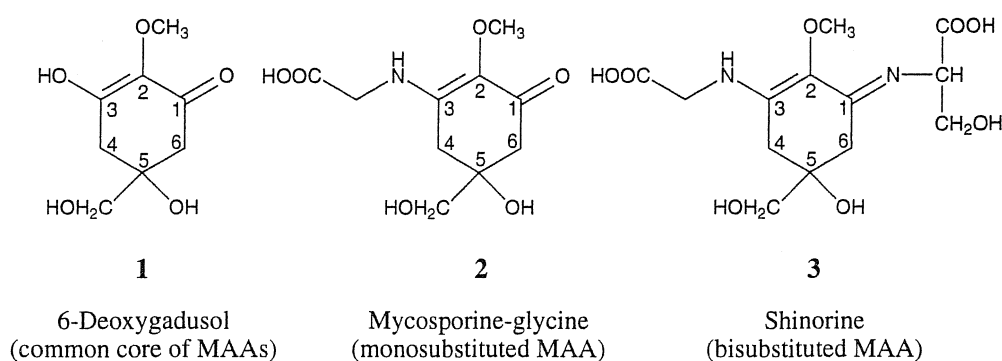
INTRODUCTION

Mycosporines (mycosporine-like amino acids; MAAs) are secondary metabolites from a number of different prokaryotic and eukaryotic organisms among them fungus and cyanobacteria (Cockell & Knowland, 1999; and references therein). Chemically, they consist of a substituted cyclohexene core linked with one or two amines, most commonly amino acids. Research on MAAs has focussed mainly on their distribution and diversity (Garcia-Pichel & Castenholz, 1993; Karentz *et al.*, 1991; Shick *et al.*, 1992) and on their putative function as UV sunscreens (Garcia-Pichel *et al.*, 1993; Riegger & Robinson, 1997; Staunton & Wilkinson, 1998). Only Favre-Bonvin *et al.* (1987) studied the biosynthetic pathway of mycosporine glutaminol (an MAA) in the Deuteromycete *Trichothecium roseum*. The main focus of their work was to elucidate the origin of the MAA core (**1**) which can be derived either from the shikimate or the polyketide pathway (Favre-Bonvin *et al.*, 1987). To distinguish between these two possibilities, they fed potential radiolabelled precursors to the fungus and found evidence in favor of the shikimate pathway. The shikimate origin of MAAs is in agreement with the patterns of MAA distribution in nature that have emerged thereafter: animals, lacking the shikimate pathway do not synthesize MAAs but take them up via the food chain instead. Recently, Shick *et al.* (1999) detected an inhibitory effect of the herbicide glyphosate (N-(phosphonomethyl)glycine) on the MAA content under UV radiation in the coral *Stylophora pistillata*. Glyphosate is an inhibitor of the shikimate pathway; its main target is EPSP synthase [EC 2.5.1.19] that catalyzes a late step in the pathway, but it also has an inhibitory effect on earlier enzymes like synthase [EC 4.1.2.15] (Bentley, 1990).

In contrast, no study has focussed on the origin of the amino side chains attached to C1 and C3 of the core. The simplest hypothesis is that they result from condensation reactions of common amino acids and **1**. It has been shown that the regulation of the biosynthesis of different MAAs varying in the side chains can be complex (Portwich & Garcia-Pichel, 1999), so that it is necessary to understand the biochemical reactions to fully understand this process.

The organism chosen for this study, the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912, produces the monosubstituted MAA mycosporine-glycine (**2**) and the bisubstituted MAA shinorine (**3**) (Portwich & Garcia-Pichel, 1999). Neither one is produced under unstressed conditions but their synthesis can be induced either by salt or UV stress. In this organism, **2** is the main product under salt stress while UV irradiation leads to a higher accumulation of **3**. Exposing cells to a combination of UV and salt stress has a synergistic effect on the cellular content of **2** while the content of **3** remains constant and depends only on the UV

dose (Portwich & Garcia-Pichel, 1999). The aims of this study were i) to corroborate the results of Favre-Bonvin *et al.* for a cyanobacterium (prokaryote), ii) to clarify the origin of the side chains, and iii) to elucidate the biosynthetic relationship between **2** and **3**.



RESULTS AND DISCUSSION

Uptake of radiolabelled compounds

Since we wanted to carry out pulse-chase experiments with various organic compounds, we first tested whether *Chlorogloeopsis* PCC 6912 was able to take up these exogenously supplied substances. This was necessary because phototrophic organisms like cyanobacteria are usually not very proficient in taking up extracellular substances. The cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912, however, can grow heterotrophically on certain carbon sources in the dark (Fay, 1965) and therefore must have uptake capacities for these substances. Furthermore, an amino acid transport system in cyanobacteria has been described by Montesinos *et al.* (1997). We detected unspecific incorporation of radiolabel into the biomass using ^{14}C -pyruvate, ^{14}C -acetate and the amino acids ^{14}C -alanine, ^{14}C -glycine and ^{14}C -serine, but no incorporation of ^3H -shikimate. The compounds that could be taken up by the cyanobacterium were used for our study.

MAA production under different growth conditions

We used growth conditions that resulted in optimized rates of cellular MAA synthesis, so that i) the final MAA content attained was high and ii) the rate of increase of MAA content was fast. These requirements were met by a combination of UV and salt stress as was described before (Portwich & Garcia-Pichel, 1999). To prevent damage to the general metabolism of the cells, these stress factors were applied consecutively and not simultaneously thus dividing the incubation in two growth phases. In phase I the cells were exposed to salt stress only, while in phase II additional UV stress was applied. The typical development of the cellular MAA content in the two phases is presented in figure 1. In phase I both **2** and **3** were produced with **2** as the main product. In phase II the amounts of **2** and **3** increased by three- and twofold respectively. While the specific content of **3** reached a steady state after two days, the content of **2** did not reach steady state during the course of the experiment. On incubation day 6, **2** accounted for 70% of total MAA. The moment of addition and removal of the radiolabelled compounds was varied in the different experiments (see experimental section).

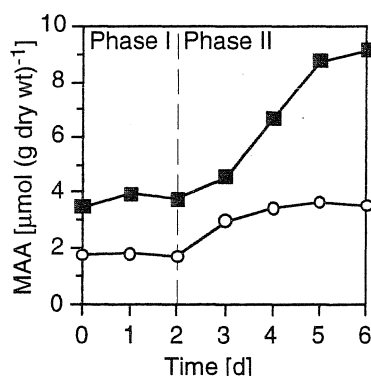


Fig. 1: Specific content of MAAs per dry weight (solid squares, **2**; open circles, **3**) from cells grown under two different growth conditions: phase I (only salt stress) and phase II (salt stress and UV stress). On day 0 the cells had been growing in phase I for 4 days.

Origin of the cyclohexene core in mycosporine-glycine

We incubated the cells with either ^{14}C -acetate or ^{14}C -pyruvate and monitored ^{14}C -radioactivity in **2** and **1** over time. We obtained **1** by hydrolysis of **2**. When ^{14}C -acetate was provided, we detected only very small incorporation of the label into **1**. ^{14}C -Pyruvate, however, was readily incorporated into the core (Fig. 2). As soon as the radiolabelled pyruvate was removed from the medium no further increase in the specific label of **1** was

detected, as was to be expected in a pulse-chase experiment for a precursor. To standardize the specific incorporation rates shown in figure 2 and to make them truly comparable we calculated an enrichment coefficient. The specific label in **1** [Bq mg^{-1}] was

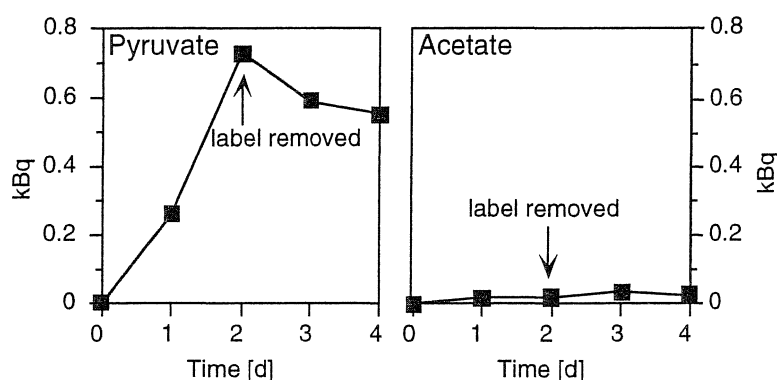


Fig. 2: Radioactivity of the MAA core **1** per subculture in cultures grown in the presence of ^{14}C -pyruvate and ^{14}C -acetate.

divided by the specific label retained in the washed, bulk cell pellet [Bq mg^{-1}], thus obtaining a dimensionless coefficient that is high for a specific incorporation of a compound and low for a non-specific incorporation. It is evident that pyruvate was enriched in **1** while acetate was not (Fig. 3). We also determined the label in the side chain by subtracting the label in **1** from the label in the intact MAA **2**. For ^{14}C -pyruvate this value was very low indicating that 94-99% of the total label in **2** was located in the core. Unfortunately for ^{14}C -acetate this determination was hampered by a high background radioactivity making the quantification of the label in **2** inaccurate.

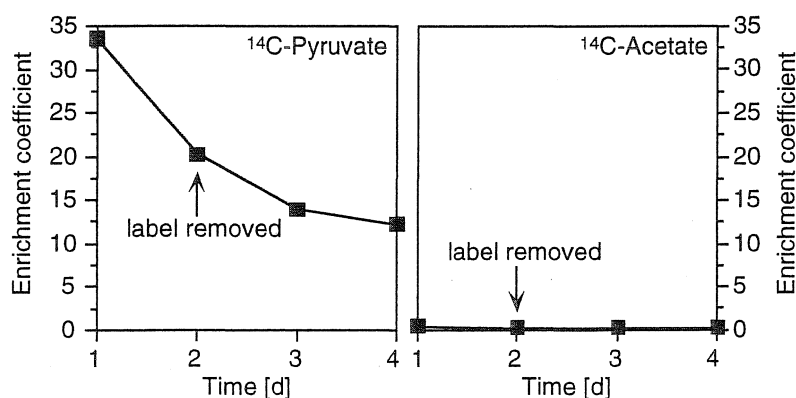
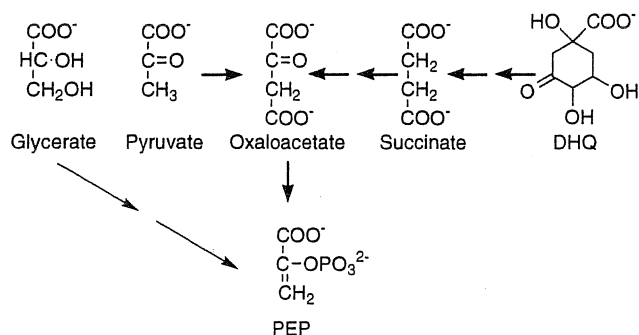


Fig. 3: Enrichment coefficient of label in **1** from cultures grown in the presence of ^{14}C -pyruvate and ^{14}C -acetate.

Favre-Bonvin *et al.* (1987) had investigated the biosynthesis of mycosporine glutaminol in a fungus and found a specific incorporation of glycerate but not of acetate into **1**. Since glycerate and pyruvate are similar molecules that can both be converted to phosphoenolpyruvate (PEP) (scheme 1) we conclude that our results for a cyanobacterium



Scheme 1: Metabolic sources for phosphoenolpyruvate (PEP).

are in agreement with their results for a fungus. Since PEP is one of the precursors of the shikimate pathway (scheme 2) Favre-Bonvin *et al.* suggested that **1** is derived from this pathway. The shikimate pathway is known to supply precursor for many secondary metabolites (1990), among them antibiotics like rifamycin and chloramphenicol. An alternative hypothetical pathway for MAA biosynthesis is the polyketide pathway that uses C₂- and C₃-units to build up carbon chains. This possibility can be excluded because acetate (a known precursor of the polyketide pathway) was not enriched in the MAA core, neither in the fungus nor in the cyanobacterium. Favre-Bonvin *et al.* attempted to obtain additional evidence for the shikimate pathway hypothesis by feeding the fungus with radiolabelled dehydroquinone (DHQ), an early intermediate of the pathway. They detected incorporation of the label both into the core and into the side chain. Although it is tempting to interpret this result in the light of DHQ being a direct precursor of **1**, as they did, one should keep in mind that DHQ is readily catabolized in fungus and can yield acetate and PEP as products (scheme 1) (Favre-Bonvin *et al.*, 1987). Therefore, incorporation of radiolabel into the core after DHQ feeding does not necessarily mean that DHQ is a direct precursor of the core.

We decided to use specific inhibitors to find further evidence for the origin of the MAA core. Unfortunately, most known and commercially available inhibitors of the shikimate pathway affect enzymes that are beyond the assumed debranching point, for example shikimate dehydrogenase [EC 1.1.1.25] and EPSP synthase (Zollner, 1993). Therefore, we added aromatic amino acids to the growth medium of cells under salt stress instead. They act as feedback inhibitors of the shikimate pathway in many organisms

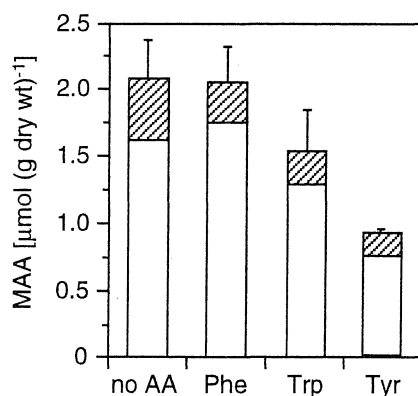
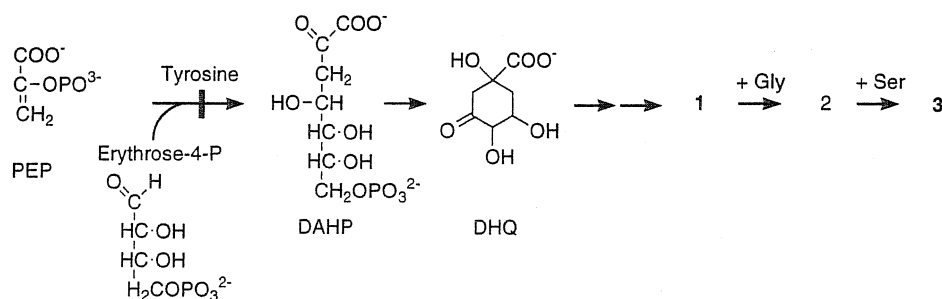


Fig. 4: Specific content of MAAs (open bars, 2; hatched bars, 3) per dry weight from cells grown in the presence of different aromatic amino acids under salt stress. Given are the mean values of 3 independent subcultures \pm SD.

among them also cyanobacteria (Bentley, 1990). Furthermore, they can be taken up by cyanobacterial cells (Mandalka, 1999; Montesinos *et al.*, 1997). The effects of the aromatic amino acids were diverse; phenylalanine did not influence the steady state concentration of MAAs, while tryptophan caused a slight reduction and tyrosine reduced the MAA contents significantly (Fig. 4). Thus, tyrosine has a clear inhibitory effect on the synthesis of MAAs under salt stress. It is known for cyanobacteria that tyrosine can act as a feedback inhibitor of the DAHP synthase, the first enzyme in the shikimate pathway (scheme 2) responsible for the condensation of PEP and erythrose-4-phosphate (Hall *et al.*, 1983; Niven *et al.*, 1988). This result supports the shikimate theory for the origin of the MAA core. When this experiment was carried out under UV induction all aromatic amino acids caused a reduction of the MAA contents which could be due to photochemical processes of the aromatic amino acids in the medium (Karentz *et al.*, 1994) causing degradation of MAAs (Bernillon *et al.*, 1990).

Similar inhibitor experiments were carried out by Shick *et al.* who used the shikimate pathway inhibitor glyphosate in the coral *Stylophora pistillata* (Shick *et al.*, 1999). We also investigated whether glyphosate had an inhibitory effect on MAA synthesis in



Scheme 2: Hypothetical biosynthetic pathway of compounds 1, 2 and 3.

Chlorogloeopsis PCC 6912 and detected a 30%-reduction of the MAA content under UV exposure but no reduction under salt stress (data not shown). Therefore, we conclude that the glyphosate effect on the MAA content under UV radiation was probably not caused by a specific inhibition of the shikimate pathway. Similar effects were observed with a number of other potential inhibitors indicating that inhibitor experiments requiring UV exposure should be carefully interpreted. In our case we could use two different ways of inducing MAA synthesis. Only if an inhibitor affected both UV and salt induced MAA synthesis it was assumed that it interfered specifically with the biosynthesis of these metabolites.

Taking all of our results into account we conclude that in cyanobacteria the MAA core **1** most likely is derived from the shikimate pathway as was suggested by Favre-Bonvin *et al.* in fungus. Thus, the biosynthetic pathway of MAAs is very similar and possibly identical in eukaryotes and in prokaryotes. This implies that the development of MAA synthesis has been a comparably early event during evolution as has been suggested before (Garcia-Pichel, 1998). Whether **1** is really an intermediate of the biosynthetic pathway as shown in scheme 2 or whether the incorporation of the side chains takes place at an earlier step of the biosynthesis could not be determined. There have been reports on the occurrence of free **1** in an MAA producing fungus (Lemoine *et al.*, 1985) but this could also have been due to degradation processes. We, however, never detected free **1** in extracts of *Chlorogloeopsis* PCC 6912.

Inhibitors of the polyketide pathway

Among the inhibitors we tested for their effects on MAA production were also two inhibitors of the polyketide pathway, cerulenin and tricyclazole. Although the mode of action of these inhibitors is still under investigation it is generally assumed that cerulenin interferes with the condensation step in polyketide synthesis as well as in lipid biosynthesis (Hiltunen & Söderhäll, 1992; Omura & Takeshima, 1974) and that tricyclazole affects the reductase enzymes involved in the synthesis of certain polyketides (Lazarovits *et al.*, 1989). The two inhibitors were added to the growth medium of cells under salt stress. Both substances caused a decrease of the MAA contents as compared to controls; at a concentration of 50 µg ml⁻¹ tricyclazole reduced the MAA concentration to 70%, while cerulenin caused a complete synthesis inhibition (Fig. 5). This effect was also seen under UV induction. It is a possibility, though, that cerulenin interfered with the development of heterocysts since it has been shown for a *Nostoc* strain that a polyketide-synthase-like gene

is involved in the production of functional heterocysts (Campbell *et al.*, 1997). Impaired nitrogen fixation might indirectly cause a reduction of metabolites like MAAs that contain groups with reduced nitrogen. To exclude this possibility we added ammonium as a nitrogen source to the medium. MAA biosynthesis was also inhibited under this condition by cerulenin (data not shown). Thus, cerulenin can be regarded as a potent inhibitor of MAA production in this organism.

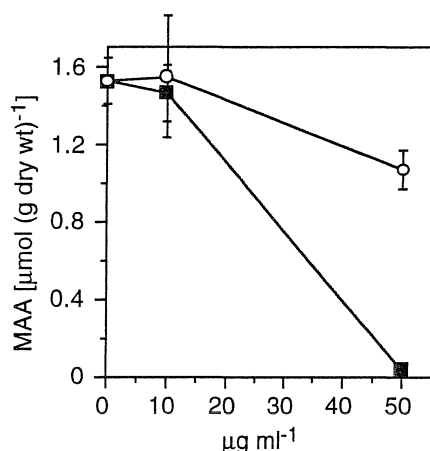


Fig. 5: Specific content of MAAs per dry weight from cells grown in the presence of cerulenin (solid squares) and tricyclazole (open circles) under salt stress. Given are the mean values of 3 independent subcultures \pm SD.

We can rule out the possibility that **1** is synthesized via the polyketide pathway because we detected no specific incorporation of acetate (for a hypothetical biosynthetic pathway of MAAs involving acetate see Favre-Bonvin *et al.*, 1987). Therefore, we suggest that possibly one of the enzymes involved in the MAA synthesis has an active site that bears a similarity to the active site of polyketide synthases. But alternative explanations for the interpretation of this result, e.g. allosteric interactions are also feasible.

Incorporation of radiolabelled amino acids

We also wanted to elucidate the origin of the amino side chains. For this we performed pulse-chase experiments with radiolabelled amino acids. The incorporation of ¹⁴C-alanine into **2** and **3** was very weak (Fig. 6) as was expected, since no MAA in *Chlorogloeopsis* PCC 6912 contains an alanine residue in a side chain. ¹⁴C-Glycine and ¹⁴C-serine were both incorporated into **2** and **3** and this incorporation ceased immediately after label removal from the medium (Fig. 6). The enrichment coefficient for the different amino

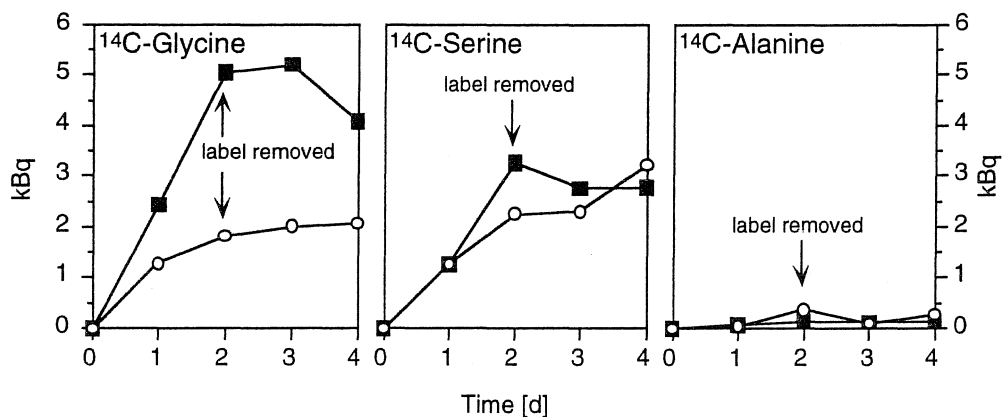


Fig. 6: Radioactivity of **2** (solid squares) and **3** (open circles) per subculture in cultures grown in the presence of ^{14}C -glycine, ^{14}C -serine and ^{14}C -alanine.

acids (Fig. 7) shows clearly that both glycine and serine were specifically incorporated into both **2** and **3**. The distribution of the radiolabel between core and side chains was determined for **2**. In the sample labelled with ^{14}C -glycine, 96% of the label was found in the side chain while in the samples labelled with ^{14}C -alanine and ^{14}C -serine 100% of the label was in **1**. This explains ^{14}C -serine incorporation into **2** and is also in good agreement with the results obtained with ^{14}C -pyruvate (see above) since both alanine and serine can be metabolically converted to pyruvate.

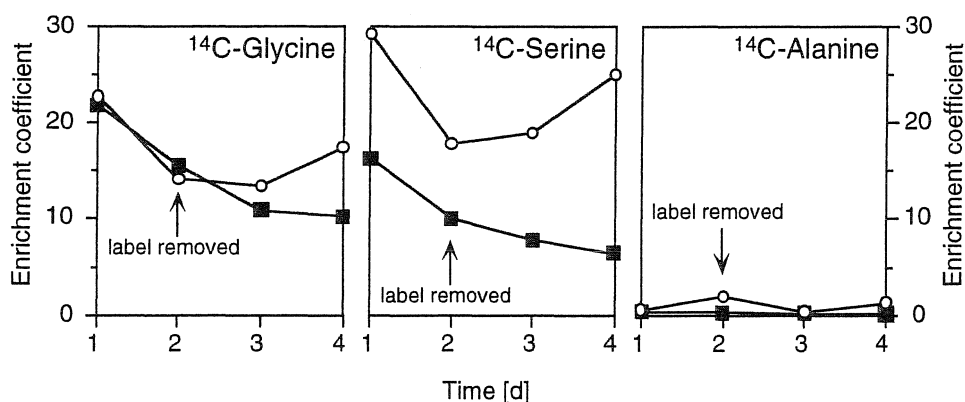


Fig. 7: Enrichment coefficient of label in **2** (solid squares) and **3** (open circles) from cultures grown in the presence of ^{14}C -glycine, ^{14}C -serine and ^{14}C -alanine.

These results show that the side chains in the MAAs are derived from the corresponding amino acids. For ^{14}C -glycine this is shown directly by the hydrolysis of **2** and the determination of the label in the side chain. We did not hydrolyze **3** but we were able to prove indirectly that both side chains in **3** are derived from the corresponding amino acids since the bisubstituted MAA **3** is derived directly from the monosubstituted

MAA **2** (see section below). This proves not only that glycine is incorporated into the side chain at C3 of **3** but also that the higher enrichment of ^{14}C -serine in **3** (Fig. 7) must stem from an incorporation of serine into the side chain at C1.

Mycosporine-glycine is the precursor of shinorine

The two MAAs **2** and **3** differ chemically only in one side chain, therefore our hypothesis was that the monosubstituted **2** is a biosynthetic precursor of the bisubstituted **3**. We carried out a pulse-chase experiment with ^{14}C -glycine to support this assumption. As shown in figure 8 the total radiolabel in the two MAA pools was almost the same in phase I of the incubation. In phase II when the synthesis of **3** was enhanced by UV radiation (see also fig. 1) the label in the pool of **3** increased as the label in the pool of **2** decreased in a stoichiometry of 1:1. The sum of both MAA pools did not change significantly during the experiment. Thus, we conclude that **2** must be the precursor of **3**.

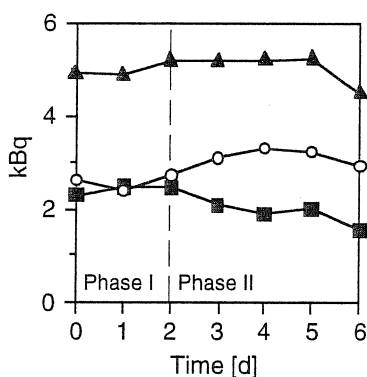


Fig. 8: Radioactivity of **2** (solid squares) and **3** (open circles) and sum of both (solid triangles) per subculture in cultures grown in the presence of ^{14}C -glycine.

All these results support the idea that the last step of the biosynthesis of **3** is the condensation of **2** with a serine molecule (scheme 2). Possibly, such a condensation of **2** with an amino acid is a common reaction for bisubstituted MAAs since most of them carry a glycine residue at C3 (Karentz *et al.*, 1991). Under this assumption, one should expect to find **2** in every organism that produces bisubstituted MAAs. This is not the case although **2** is a comparably common MAA (Karentz *et al.*, 1991). Possibly, the contents of **2** are in some cases too low to be detected or are masked by high amounts of other MAAs. This final step in the biosynthesis of **3** is known to be controlled by the UV dosage in *Chlorogloeopsis* PCC 6912. As has been shown before for this cyanobacterium, under

combined UV and salt stress, **2** accumulates as a function of both stress factors synergistically while the content of **3** is merely controlled by the UV dosage and does not increase when salt is added (Portwich & Garcia-Pichel, 1999). Since the biosyntheses of **2** and **3** are so closely coupled, an increase in the **2** content should also lead to an increase in the **3** content unless the conversion of **2** to **3** is strictly regulated. In this case this regulation seems to be carried out by UV. Therefore, we assume that this cyanobacterium contains a photoregulated shinorine synthase.

Additional implications

The diversity of MAAs found in nature is due to variations in the amino residue at C1 (Dunlap & Shick, 1998). This diversity must be caused by a late enzyme in the pathway that is responsible for the incorporation of the second amino acid. Possibly, there exists an array of closely related enzymes with differing substrate specificities. In organisms producing several bisubstituted MAAs it is also feasible that they possess only one enzyme with a broader substrate range.

Our data contain also evidence concerning the *in vivo* stability of MAAs in *Chlorogloeopsis* PCC 6912. As shown in figure 8 the total radiolabel in the MAAs remained relatively constant both under salt and under UV stress. This implies that no rapid turnover of MAAs was taking place during time periods of days. Therefore, they fulfill a passive function in the organisms, which is in agreement with their putative role as UV sunscreens. It has been suggested that **2** serves as an antioxidant to protect cells against photooxidative stress (Dunlap & Yamamoto, 1995). In that case, however, **2** should be degraded under these conditions and a constant steady state concentration would only be possible when accompanied by a high turnover rate. Assuming that in our experiments the cells were experiencing oxidative stress (which is likely for a phototrophic organism under UV exposure) we do not find evidence for this possible function of **2** *in vivo*.

EXPERIMENTAL

Organism and growth conditions

Stock cultures of the diazotrophic, moderately thermophilic cyanobacterial strain *Chlorogloeopsis* PCC 6912 were grown in batch cultures as published before (Portwich & Garcia-Pichel, 1999). For experiments, cells were grown as filter cultures (Garcia-Pichel *et al.*, 1992), which simplified transfer between different media. Succinctly, the cells were filtered on pre-weighed polycarbonate membrane filters (Isopore Membrane Filters, 1.2 μm pore size, 25 mm diameter, Millipore, MA, USA) and incubated floating on BG11₀ medium within plastic Petri dishes at an incubation temperature of 28°C. The visible light in all experiments was provided by cool-white fluorescent light tubes at a quantum irradiance of 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$. For some experiments NaCl (342 or 517 mM as stated) or NH₄Cl (3.7 mM) was added to the BG11₀ medium. In experiments with UVB radiation this was provided by F15 T8 UVB tubes (Sankyo, Japan). Gravimetric measurements of biomass were used to assess growth as previously published (Garcia-Pichel & Castenholz, 1991). For the pulse-chase experiments the cells were first grown on medium containing 342 mM NaCl for at least 3 days (phase I). In phase II the cells were additionally exposed to UV radiation (0.3 W m⁻²).

Addition of radiolabelled compounds

The radiolabelled compounds [1-¹⁴C]acetate, [1-¹⁴C]pyruvate, [U-¹⁴C]alanine, [1-¹⁴C]glycine, [3-¹⁴C]serine (Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden) and [3-³H]shikimate (American Radiolabelled Chemicals Inc., St. Louis, MO, USA) were added separately to the filter cultures. To test for incorporation into the MAAs the radiolabelled amino acids were added to a final concentration of 37 kBq ml⁻¹ (corresponding to 6.6 μM alanine, 17.5 μM glycine and 18.5 μM serine) and acetate and pyruvate to a concentration of 50 kBq ml⁻¹ (corresponding to 25 μM acetate and 60 μM pyruvate) to filter cultures immediately at the beginning of phase II. Filters were harvested daily for 4 days starting when the radiolabelled compound had been added. After 2 days in phase II the medium was exchanged for medium without the radiolabelled substance. MAAs were extracted and the radioactivity in extract and cell pellet and the specific activity of the MAAs and of **1** after hydrolysis were measured (see below).

To investigate whether **2** is a biosynthetic precursor of **3**, MAAs were labelled *in vivo* by the addition of [1-¹⁴C]glycine to a concentration of 50 kBq ml⁻¹ (corresponding to 23.7

μM) to cells that had been growing in phase I for 1 day. After 3 days the cells were transferred to label-free medium. Filters were harvested directly after the medium exchange and then daily for the next 6 days. Phase II was started 2 days after the label was removed. MAAs were extracted and the radioactivity in extract and cell pellet and the specific activity of the MAAs were measured.

Addition of inhibitors

Phenylalanine, tryptophan and tyrosine (Sigma, Germany) were separately dissolved in BG11₀ medium or in 513 mM NaCl containing BG11₀ medium to a concentration of 5 mM and sterile-filtered (0.2 μm). A stock solution of glyphosate (Monsanto, Belgium) was neutralized, sterile-filtered and added to medium to a final concentration of 20 mM. The inhibitors of the polyketide pathway cerulenin (Sigma, Germany) and tricyclazole (Riedel-de Haën, Germany) were dissolved in 100% ethanol at a concentration of 10 mg ml⁻¹ and added to the growth medium to a final concentration of 10 or 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (corresponding to 45 and 224 μM for cerulenin and 53 and 264 μM for tricyclazole). In all experiments involving addition of ethanolic solutions equal amounts of ethanol were added to control cultures. Cells were grown on these media for 3 days.

Extraction and quantification of MAAs

MAAs were extracted as described before (Portwich & Garcia-Pichel, 1999). Briefly, cells were submerged in 25% (v/v) aqueous methanol and shaken for 3 h at 45°C. The extract was dried, and the residual matter was dissolved in 25% (v/v) aqueous methanol and applied to the HPLC. Two different HPLC methods were used to separate and fractionate the two different MAAs. In both cases the HPLC column was a 25 cm Knauer Hypersil-ODS (5 μm) with integrated pre-column at a column oven temperature of 30°C and at a flow rate of 0.7 ml min⁻¹. For the fractionation of **3** the solvent system was that of Stochaj *et al.* (1994) with 75% aqueous methanol and 0.1% acetic acid (v/v) as mobile phase. **2** was fractionated following the protocol of Nakamura *et al.* (1982) with 0.1% acetic acid (v/v) as mobile phase. The MAAs were detected online with a Waters 996 photodiode array detector. The MAA content per mg dry weight of biomass and per filter culture was calculated.

Determination of radiolabel in MAAs

To quantify the specific radiolabel of the MAAs HPLC fractions of 100-200 μ l were collected. These fractions were diluted with 1 ml of water to measure the absorption spectrum in the spectrophotometer and to calculate the MAA content in the fraction. The extinction coefficients to calculate the concentrations of the different compounds were obtained from the literature (28100 for **2** methyl ester at 310 nm according to Ito & Hirata, 1977; 44700 for **3** at 333 nm according to Tsujino *et al.*, 1980). The radioactivity of an aliquot of the fraction was measured by liquid scintillation counting with the scintillation cocktail Ultima Gold XR (Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA). Counting efficiencies were found to be as follows: 5 ml scintillation liquid + 0.9 ml aqueous solution: 92%; 5 ml scintillation liquid + 0.2 ml cell suspension: 60%. To ensure that the radioactivity that was measured really stemmed from the MAA or from **1** the HPLC-peaks were divided into different fractions while collecting and the distribution of radiolabel and absorption were compared for these fractions. If the curves of the two parameters had the same shape we assumed that the MAAs were the source of the radioactivity in the fractions. The specific label of the MAAs was calculated from the fraction with the highest absorption. Each filter culture was treated as an independent subculture and the specific label in the respective compound per subculture was determined.

Hydrolysis of **2**

The label in **1** was determined by hydrolysis of **2**. This was done by collecting the HPLC fraction of **2** and incubating it at 80°C for 2 hours to hydrolyze the molecule to obtain free glycine and **1** (Ito & Hirata, 1977). The solution was reapplied to the HPLC and fractions of **1** characterized by its absorption peak at 268 nm were collected. Each fraction was diluted with 0.1% aqueous acetic acid and the specific radioactivity of the cyclohexenone determined as described above (with an extinction coefficient of 15700 for cyclohexenone at 268 nm according to Lemoyne *et al.*, 1985).

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the EC program "Biodiversity: Applied and Systematic Investigation of Cyanobacteria" (BASIC), contract no. BIO4-CT96-0256, and by the Max Planck society. We thank Monsanto, Belgium for a generous gift of glyphosate.

REFERENCES

- Bentley, R. (1990).** The shikimate pathway - a metabolic tree with many branches. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**, 307-384.
- Bernillon, J., E. Parussini, R. Letoublon, J. Favre-Bonvin & N. Arpin (1990).** Flavin-mediated photolysis of mycosporines. *Phytochem.* **29**, 81-84.
- Campbell, E. L., M. F. Cohen & J. C. Meeks (1997).** A polyketide-synthase-like gene is involved in the synthesis of heterocyst glycolipids in *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133. *Arch. Microbiol.* **167**, 251-258.
- Cockell, C. S. & J. Knowland (1999).** Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol. Rev.* **74**, 311-345.
- Dunlap, W. C. & J. M. Shick (1998).** Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: a biochemical and environmental perspective. *J. Phycol.* **34**, 418-430.
- Dunlap, W. C. & Y. Yamamoto (1995).** Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comp. Biochem. Physiol.* **112B**, 105-114.
- Favre-Bonvin, J., J. Bernillon, N. Salin & N. Arpin (1987).** Biosynthesis of mycosporines: mycosporine glutaminol in *Trichothecium roseum*. *Phytochem.* **26**, 2509-2514.
- Fay, P. (1965).** Heterotrophy and nitrogen fixation in *Chlorogloea fritschii*. *J. Gen. Microbiol.* **39**, 11-20.

Garcia-Pichel, F. (1998). Solar ultraviolet and the evolutionary history of cyanobacteria. *Origins Life Evol. Biosphere* **28**, 321-347.

Garcia-Pichel, F. & R. W. Castenholz (1991). Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *J. Phycol.* **27**, 395-409.

Garcia-Pichel, F. & R. W. Castenholz (1993). Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 163-169.

Garcia-Pichel, F., N. D. Sherry & R. W. Castenholz (1992). Evidence for an ultraviolet sunscreen role of the extracellular pigment scytonemin in the terrestrial cyanobacterium *Chlorogloeopsis* sp. *Photochem. Photobiol.* **56**, 17-23.

Garcia-Pichel, F., C. E. Wingard & R. W. Castenholz (1993). Evidence regarding the UV sunscreen role of a mycosporine-like compound in the cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 170-176.

Hall, G. C., M. B. Flick & R. A. Jensen (1983). Regulation of the aromatic pathway in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 6301 (*Anacystis nidulans*). *J. Bacteriol.* **153**, 423-428.

Hiltunen, M. & K. Söderhäll (1992). Inhibition of polyketide synthesis in *Alternaria alternata* by the fatty acid synthesis inhibitor cerulenin. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1043-1045.

Ito, S. & Y. Hirata (1977). Isolation and structure of a mycosporine from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Tetrahedron Lett.* **28**, 2429-2430.

Karentz, D., M. L. Bothwell, R. B. Coffin, A. Hanson, G. J. Herndl, S. S. Kilham, M. P. Lesser, M. Lindell, R. E. Moeller, D. P. Morris, P. J. Neale, R. W. Sanders, C. S. Weiler & R. G. Wetzel (1994). Impact of UV-B radiation on pelagic freshwater ecosystems: Report of working group on bacteria and phytoplankton. *Ergebn. Limnol.* **43**, 31-69.

Karentz, D., F. S. McEuen, M. C. Land & W. C. Dunlap (1991). Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. *Mar. Biol.* **108**, 157-166.

Lazarovits, G., R. W. Steele, V. J. Higgins & A. Stoessl (1989). Tricyclazole as an inhibitor of polyketide metabolism in the onion pink root rot pathogen, *Pyrenochaeta terrestris*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **34**, 277-287.

Lemoyne, F., J. Benillon, J. Favre-Bonvin, M. L. Bouillant & N. Arpin (1985). Occurrence and characteristics of amino alcohol and cyclohexenone. Components of fungal mycosporines. *Z. Naturforsch.* **40 C**, 612-616.

Mandalka, A. (1999). Synthese und Regulation des UV-Schutzpigmentes Scytonemin an Modellmikroorganismen. Diplomarbeit, Universität Bremen, Germany.

Montesinos, M. L., A. Herrero & E. Flores (1997). Amino acid transport in taxonomically diverse cyanobacteria and identification of two genes encoding elements of a neutral amino acid permease putatively involved in recapture of leaked hydrophobic amino acids. *J. Bacteriol.* **179**, 853-862.

Nakamura, H., J.-i. Kobayashi & Y. Hirata (1982). Separation of mycosporine-like amino acids in marine organisms using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.* **250**, 113-115.

Niven, G. W., N. W. Kerby, P. Rowell & W. D. P. Stewart (1988). The regulation of aromatic amino acid biosynthesis in amino acid liberating mutant strains of *Anabaena variabilis*. *Arch. Microbiol.* **150**, 272-277.

Omura, S. & H. Takeshima (1974). Inhibition of the biosynthesis of leucomycin, a macrolide antibiotic, by cerulenin. *J. Biochem.* **75**, 193-195.

Portwich, A. & F. Garcia-Pichel (1999). Ultraviolet and osmotic stresses induce and regulate the synthesis of mycosporines in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912. *Arch. Microbiol.* **172**, 187-192.

Riegger, L. & D. Robinson (1997). Photoinduction of UV-absorbing compounds in Antarctic diatoms and *Phaeocystis antarctica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **160**, 13-25.

Shick, J. M., W. C. Dunlap, B. E. Chalker, A. T. Banaszak & T. K. Rosenzweig (1992). Survey of ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in organs of coral reef holothuroids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **90**, 139-148.

Shick, J. M., S. Romaine-Lioud, C. Ferrier-Pages & J.-P. Gattuso (1999). Ultraviolet-B radiation stimulates shikimate pathway-dependent accumulation of mycosporine-like amino acids in the coral *Stylophora pistillata* despite decreases in its population of symbiotic dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.* **44**, 1667-1682.

Staunton, J. & B. Wilkinson (1998). *The biosynthesis of aliphatic polyketides*. In: Leeper, F. J. & Vederas, J. C. (Eds.), *Biosynthesis. Polyketides and vitamins*, Vol. 195, Springer-Verlag, Berlin, pp. 49-92.

Stochaj, W. R., W. C. Dunlap & J. M. Shick (1994). Two new UV-absorbing mycosporine-like amino acids from the sea anemone *Anthopleura elegantissima* and the effects of zooxanthellae and spectral irradiance on chemical composition and content. *Mar. Biol.* **118**, 149-156.

Tsujino, I., K. Yabe & I. Sekikawa (1980). Isolation and structure of a new amino acid, Shinorine, from the red alga *Chondrus yendoi* Yamada et Mikami. *Bot. Mar.* **23**, 65-68.

Zollner, H. (1993). *Handbook of Enzyme Inhibitors*. VCH Verlag, Weinheim.

Kapitel 5

A novel prokaryotic UVB photoreceptor in
the cyanobacterium *Chlorogloeopsis*

PCC 6912

Anne Portwich and Ferran Garcia-Pichel

Photochemistry and Photobiology 71: 493-499 (2000)

ABSTRACT

We present evidence for the presence and nature of a UVB-specific photoreceptor in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912. The photoreceptor mediates at least the photosensory induction of mycosporine-like amino acid (MAA) synthesis. Because MAA synthesis in this organism can also be induced under salt stress, we could distinguish between the photosensory and the purely biochemical requirements of MAA synthesis. Neither visible light nor UV radiation were necessary for the biosynthetic process, thus indicating that the UVB dependence of biosynthesis is based on a UV photosensory capacity of the organism. An action spectrum of the MAA synthesis showed a distinct peak at 310 nm tailing down in the UVA region with no detected activity above 340 nm. We found that radiation below 300 nm caused significant inhibition of synthesis of MAAs indicating that the action spectrum at these wavelengths may not have been satisfactorily resolved. We propose that a pterin is a good candidate for a photoreceptor chromophore since i) reduced pterins present absorption spectra congruent with the action spectrum obtained, and ii) an inhibitor of the biosynthetic pathway of pterins and an antagonist of excited states of pterins both depressed the photosensory efficiency of induction but not its chemosensory efficiency.

INTRODUCTION

Cyanobacteria, like all phototrophic organisms, must withstand the negative effects of solar radiation due to their obligatory requirement for light. A large portion of these negative effects arise from the UV component of sunlight, and are known to cause, for example, photoinhibition of photosynthesis and DNA damage (Karentz *et al.*, 1994; and references therein). Phototrophic organisms in general and cyanobacteria in particular, have developed different mechanisms during their evolutionary history to palliate or counteract these harmful UV effects (Castenholz, 1997). There is evidence that some of these responses, at least in cyanobacteria, are induced or enhanced specifically by exposure to UVB radiation, and not by UVA or visible light. Notable among these are the photomotility escape responses of *Microcoleus chthonoplastes*, a filamentous marine cyanobacterium (Bebout & Garcia-Pichel, 1995) and the induction or enhancement in the synthesis of putative sunscreen compounds of the mycosporine-like type (mycosporine-like amino acids, MAAs) in a variety of cyanobacteria (Ehling-Schulz *et al.*, 1997; Garcia-Pichel *et al.*, 1993; Portwich & Garcia-Pichel, 1999). MAAs are a family of small water-soluble molecules characterized by a sharp UV absorption peak with maxima that lie between 310 and 360 nm, depending on the nature of the side chains.

All of these data point to the existence among prokaryotes of a photoreceptor specific for UVB yet to be described. However, alternative mechanistic explanations to the organismal responses to UVB described above that do not necessitate the presence of a specific photoreceptor are in principle possible. Thus, it is possible that cells sense the cellular effects of UVB (i.e. DNA damage, photooxidation products) and not UVB itself. In the case of the MAA synthesis it is also a possibility that UVB dependent photoenzymes are involved in their yet unknown biosynthetic pathway, rendering the concentrations of final products dependent on UV exposure.

We chose to analyze the photosensory induction of the MAA synthesis in the metabolically versatile cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912 for a more detailed study of such a putative UVB photoreceptor. *Chlorogloeopsis* PCC 6912 produces two MAAs, shinorine and mycosporine-glycine, with shinorine as the main product under UVB radiation. But, importantly, we have recently described that in this organism MAA synthesis is not only inducible by UVB stress but also by osmotic stress (Portwich & Garcia-Pichel, 1999). This gave us the opportunity to distinguish between photosensory and biosynthetic processes.

MATERIAL AND METHODS

Organism and growth conditions

Stock cultures of the diazotrophic, moderately thermophilic cyanobacterial strain *Chlorogloeopsis* PCC 6912 were grown in batch cultures as previously published (Portwich & Garcia-Pichel, 1999). For experiments, cells were grown as filter cultures (Garcia-Pichel *et al.*, 1992), which ensure homogeneous dosage and avoid self-shading effects. Succinctly, cell suspensions were filtered on pre-weighed polycarbonate membrane filters (Isopore Membrane Filters, 1.2 μm pore size, 25 mm diameter, Millipore, MA, USA) and incubated floating on BG11₀ medium within plastic Petri dishes. Gravimetric measurements of biomass were used to assess growth as previously published (Garcia-Pichel & Castenholz, 1991). Instantaneous growth rates were estimated using an exponential growth model and calculated from two dry weight determinations at the beginning and the end of each incubation.

Action spectroscopy

For action spectroscopy, filter cultures were irradiated constantly from above for a period of 72 h. Monochromatic radiation at defined wavelengths was achieved using a 150 W Xe arc lamp (no. 6256, Oriel, Stratford, CT, USA) in a housing equipped with a collimating quartz lens. The visible and UVA components were filtered down by a dichroic mirror and the exiting beam directed towards an Oriel 1/8 m monochromator with a 1200 line/mm grating blazed at 350 nm and two variable slit assemblies. Fluence rates were measured with a research radiometer (IL 1700, International Light, Newburyport, Mass., USA) coupled to a photomultiplier power supply (IL 760, International Light) and a monochromator (IL 783, International Light). For each experiment a spectrum was taken to control wavelength, photon fluence rate and bandwidth of irradiation. Half-maximal bandwidth was between 8 and 10 nm in all experiments. Background visible light was provided by a fiber optic halogen lamp (KL-1500, Schott, Germany) equipped with a collimating lens and an IR cut-off filter at a constant photon fluence rate (400-700 nm) of 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. The experiments were carried out at room temperature. We detected trace amounts of shinorine in the control cells although it has been shown that this strain does not produce shinorine under sustained exponential growth in unstressed conditions (Portwich & Garcia-Pichel, 1999). To compensate for this, subcultures were used as controls in every single treatment and the amount of shinorine in the control cells was

subtracted from the amount of shinorine in the UV-exposed cells. Levels of shinorine in the controls were always below 5% of the maximal contents achieved.

Irradiation with polychromatic UV

In some experiments we used polychromatic UV radiation of increasingly shorter wavelengths. For this we used the same UV source as for the action spectrum, but leaving out the monochromator, and used a series of long-pass glass filters instead (cut-offs at 295, 305, 320, and 335 nm; Schott, Germany). To ensure even dosage of all samples the petri dishes with the filter cultures were placed on a slowly rotating turntable. Two different UV conditions were used, a high (0.16 Wm^{-2}) and a low (0.07 Wm^{-2}) fluence rate. Fluence rates were measured with a UVB specific sensor coupled to the research radiometer (IL 1700). The experiments were carried out at room temperature and under the same visible light conditions as described for the action spectrum.

Heterotrophic growth

For heterotrophic growth in the dark, sucrose (3 mM) was added to the BG11₀ mineral medium. In some cases NaCl was added also to a final concentration of 513 mM. UVB radiation was provided in this case by Philips TL 20W/12 RS fluorescence tubes and filtered through a UV band pass filter (UG 5, Schott, Germany) to create a visible-free UVB-source. This set-up provided a dosage of 0.5 Wm^{-2} of UVB irradiance, spectrally centred around 313 nm (Garcia-Pichel *et al.*, 1993). The experiment was carried out at 28°C.

Inhibitors and antagonist

The inhibitors of pterin synthesis 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidine (DAHP) and *N*-acetylserotonin (NAS) were added as sterile-filtered ($0.2 \mu\text{m}$) solutions to the medium at a final concentration of 5 mM. Phenylacetic acid (PAA), a quencher of excited states of flavins and pterins, was dissolved in 100 % ethanol and added to the medium at a final concentration of 1 mM. In experiments involving addition of ethanolic solutions, equal

amounts of 100 % ethanol were added to control cultures. UVB radiation was provided by Philips TL 20W/12 RS fluorescence tubes.

Extraction and quantification of MAAs

MAAs were extracted and quantified as previously described (Portwich & Garcia-Pichel, 1999). Briefly, cells were submerged in 25% (v/v) aqueous methanol and shaken for 3 h at 45°C. The extract was dried in a vacuum evaporator, the residual matter dissolved in 25% (v/v) aqueous methanol, separated by HPLC and detected using an online UV/VIS diode array detector.

RESULTS

MAA biosynthesis requires neither visible nor UV radiation

In order to prove that the UV-induction of MAA synthesis in *Chlorogloeopsis* PCC 6912 was a true photosensory process and not due to the presence of putative photoenzymes in its biosynthetic pathway, we tested the ability of *Chlorogloeopsis* to induce and synthesize MAAs in the dark. It is known that this cyanobacterium can grow in the absence of visible light on several exogenous sugars, especially on sucrose (Evans *et al.*, 1976). We

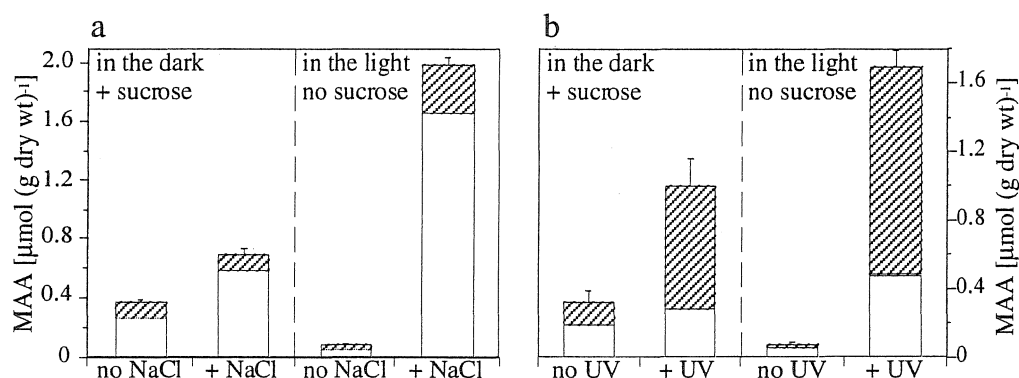


Fig. 1: Specific content of MAAs (hatched bars: shinorine, open bars: mycosporine-glycine) per dry weight from cells grown under heterotrophic conditions (a) with/without UV exposure, (b) with/without salt stress. Given are the mean values of 3 independent subcultures \pm SD.

incubated cells in the dark on sucrose-containing medium and provided conditions that were known to induce MAA synthesis in the light. MAA synthesis occurred both by the addition of salt or by irradiation with a visible-free UVB source (Fig. 1). This proves that neither visible light nor UV radiation are an absolute requirement for the biochemical processes of the biosynthesis.

Dependence of shinorine synthesis on UVB fluence

We chose to monitor the cellular content of shinorine in order to characterize the putative UVB receptor, instead of the content of total MAAs or of mycosporine-glycine. This is because shinorine is under the direct control of UVB and it is the most abundant MAA under this condition (Portwich & Garcia-Pichel, 1999). To determine an action spectrum of a biological process the Bunsen-Roscoe Law of Reciprocity needs to be validated first. The measurable effect caused by UV irradiation should be a function only of total dose and independent of the irradiation time or irradiance (De Fabo, 1980). This was verified by exposing samples to the same dose (13 kJm^{-2}) over a 72 hour period but at two different fluence rates of UVB light (0.2 and 0.1 Wm^{-2}) for two different time intervals (one or two 6 hour irradiation intervals during 24 hours). The shinorine content in all samples was not significantly different confirming that reciprocity holds for the process studied (data not shown).

Action spectrum for the induction of shinorine synthesis

We sought to establish relationships between the monochromatic UV-dosage and the steady-state cellular content of shinorine in *Chlorogloeopsis* cells. We varied the dosage by varying the fluence rate but keeping always irradiation time of 72 hours invariant. According to preliminary experiments (Portwich & Garcia-Pichel, 1999), this period of time is sufficient to elicit photosensory and biosynthetic events leading to the accumulation of shinorine. Separate experiments showed that neither near UVA radiation, nor visible radiation can elicit mycosporine synthesis in *Chlorogloeopsis* PCC 6912 (data not shown). Therefore, efforts were concentrated in the UVB region. We found that radiation below 290 nm was extremely harmful for the organism, preventing measurements at these wavelengths. Thus, we limited our experiments to the wavelength range between 290 and 340 nm.

For each wavelength control cultures were grown simultaneously under the same growth conditions but without UV exposure. To monitor the possible interference of generalized UV damage to the cells on the outcome of the action spectrum, we measured gravimetrically growth yield of the treatment and control cultures during the incubation. In most incubations the growth rates of the UV exposed cells were in the order of 80% of the growth rates of the controls. In these cases we assumed that no significant inhibition of general metabolism was taking place. Only in a few cases the growth rate was depressed below 50% of the control rates suggesting serious damage to the cells. These cases are marked with open circles in figure 2. For most wavelengths and above a certain threshold dose, a linear relation between dose and shinorine content was found. Straight lines were fitted through the data points above the threshold by the least-squares method (Fig. 2). At 300 and 305 nm the linear model was only valid for photon fluences below 0.1 and 0.2 mol m⁻² respectively; at higher photon fluences, steady state levels of shinorine content were lower (Fig. 2) indicating a possible inhibition of the process or a degradation of shinorine molecules. In these cultures, cell growth was significantly depressed, supporting the view that generalized photodamage may have prevented the biosynthetic response. For 305 nm, this inhibition was evident only at photon fluence higher than 0.2 mol photons m⁻², still allowing a linear regression with the data points obtained at lower fluences. At 300 nm,

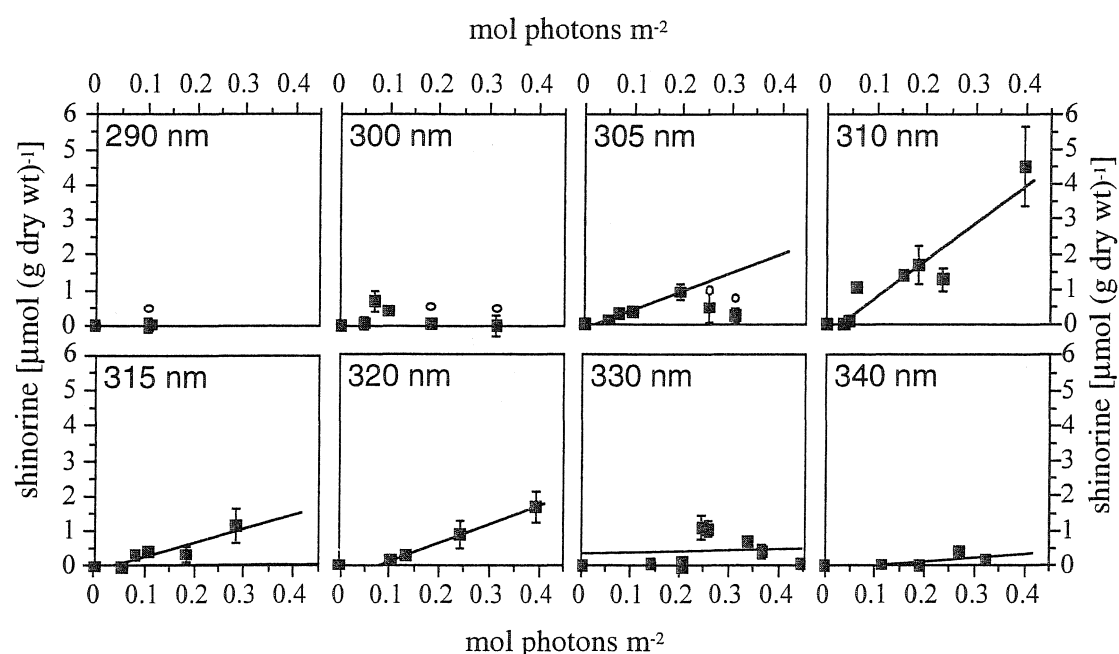


Fig. 2: Specific content of shinorine reached in *Chlorogloeopsis* PCC 6912 as a function of the UV photon fluence of different wavelengths. For each wavelength and photon fluence, the mean values of 3 independent subcultures \pm SD are given. The samples where a significant growth inhibition was detected are marked with open circles.

fluences higher than $0.1 \text{ mol photons m}^{-2}$ already impaired growth markedly, making a statistically robust regression impossible. At 330 nm the shinorine content also decreased at higher photon fluences but without a reduction of growth rate, so that in this case all data points were taken into account for the linear regression. An action spectrum (Fig. 3) was then constructed by plotting the slopes of the regressed lines. The slopes can be defined as the “induction efficiency” at a certain wavelength and have the units of shinorine content [$\mu\text{mol (g dry wt)}^{-1}$] per mol photons m^{-2} . They were plotted against the corresponding wavelength. The action spectrum has a pronounced single peak at 310 nm and tails into the UVA region. The spectrum decreases to shorter UVB-wavelengths, but it cannot be excluded that a second peak might appear below 305 nm since measurements at these wavelengths were hampered by inhibitory effects of this radiation.

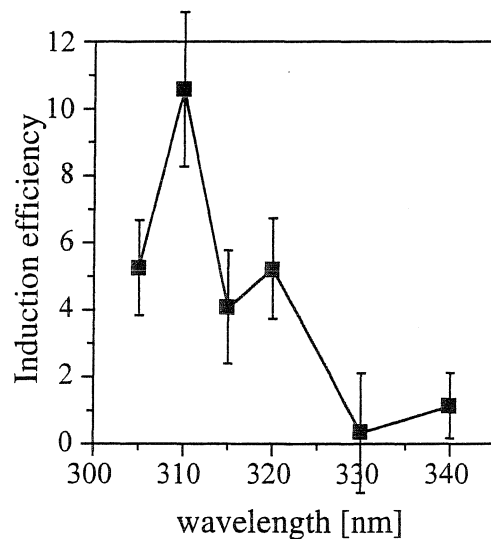


Fig. 3: Action spectrum of the induction of shinorine synthesis constructed from data in fig. 2. The induction efficiency is defined as shinorine content [$\mu\text{mol (g dry wt)}^{-1}$] synthesized per mol photons m^{-2} of a certain wavelength. Error bars represent the 90%-confidence interval.

Negative effects of short-wavelength UVB on shinorine content

We used experiments with polychromatic UV radiation of increasingly shorter wavelengths to unveil possible distortions in the action spectrum due to inhibitory effects of short-wavelength UVB. This was done to clarify whether the observed decrease in efficiency below 305 nm (Fig. 2) was real or caused by inhibitory effects. For this purpose we used long pass filters having 50% transmission points at 335, 320, 305 and 295 nm sequentially. Each addition of shorter wavelengths resulted in an increase in shinorine content up to the 305 nm-filter, as expected. The addition of radiation below 305 nm (295 nm-filter) led to a small increase in the shinorine content when intensities were low, but to a marked reduction when intensities were high (Fig. 4). This demonstrates that far UVB-radiation can reduce the contents of shinorine making a determination of the action spectrum of the photoreceptor at these wavelengths uncertain.

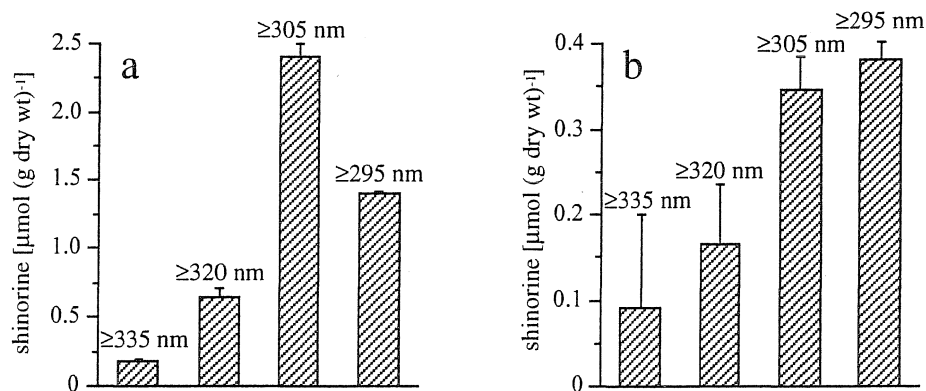


Fig. 4: Specific content of MAAs per dry weight from cells grown under different portions of the UV spectrum and two different photon fluence rates: (a) high fluence rate, (b) low fluence rate. The wavelengths written on top of the bars specify the UV radiation used for induction. Given are the mean values of 3 independent subcultures \pm SD.

Inhibitors of pterin-synthesis

Pterins have been suggested as candidates for UVB photoreceptors in higher plants (Galland & Senger, 1988). To investigate whether this class of compounds could play a role in the UVB sensing responsible for the shinorine synthesis, cells were grown in the presence of the specific inhibitors of pterin synthesis *N*-acetylserotonin (NAS) and 2,4-

diamino-6-hydroxypyrimidine (DAHP) (Maier & Ninnemann, 1995). After 3 days of growth in the presence of the inhibitors cells were exposed to UVB stress or salt stress for 72 hours to induce MAA synthesis. The inhibitors were also present in the medium during the induction period. DAHP in the medium caused a significant reduction of the MAA content both in cells growing under UV and under salt stress (Fig. 5). This indicates that even though a clear effect was found, this was either not specific for the photosensory induction, or it was a double inhibition of both photosensory and biosynthetic mechanisms. NAS, however, diminished the MAA content in UV stressed cells but not in salt stressed cells (Fig. 5) supporting the idea that a specific inhibition of the UVB photosensory ability was achieved. This implies that pterins could well be involved in the mechanism of UVB detection.

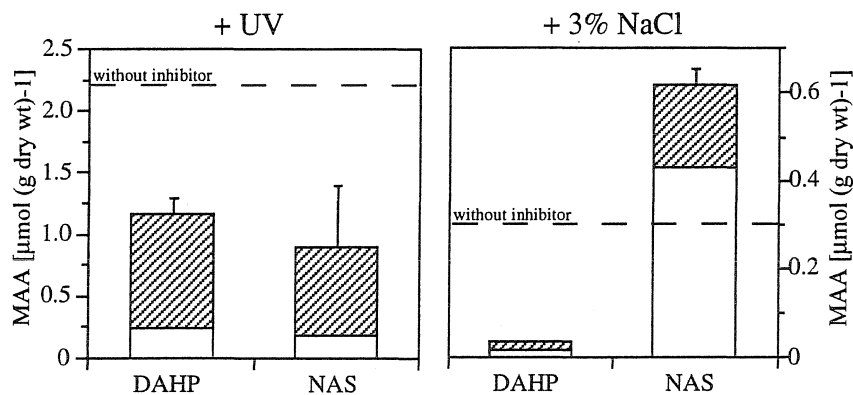


Fig. 5: Specific content of MAAs (hatched bars: shinorine, open bars: mycosporine-glycine) per dry weight from cells grown in the presence of inhibitors of pterin synthesis. The dashed line in the graph represents the value of total MAA content in the controls. Given are the mean values of 3 independent subcultures \pm SD.

Effect of PAA

We used solutions of phenylacetic acid (PAA) known to quench excited states of pterins (Vierstra & Poff, 1981) and then induced MAA synthesis either by UVB irradiation or by salt stress. The added PAA had no apparent effect on the salt-induced MAA production but depressed the shinorine content in the UVB exposed cells (Fig. 6), thus having an effect only on the photosensory induction of MAAs. This is in good agreement with the results obtained with the inhibitor of pterin biosynthesis.

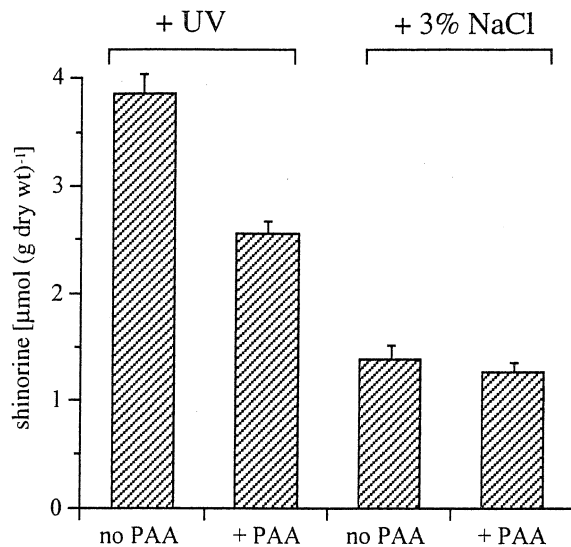


Fig. 6: Specific content of shinorine per dry weight from cells grown in the presence of PAA (1 mM) under UV or salt stress. Given are the mean value of 3 independent subcultures \pm SD.

DISCUSSION

Many biological processes in cyanobacteria such as the synthesis of photosystem II reaction center proteins and phycobilisome synthesis are regulated by light (Golden, 1995). However, the information on both the nature of the regulating mechanisms and on the putative photoreceptors is limited. The biosynthesis of the sunscreen shinorine in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912 is also photoregulated. So far, only a few publications have focussed on the wavelength dependency of MAA synthesis in cyanobacteria. Garcia-Pichel *et al.* (1993) characterized the effect of polychromatic radiation centered at different wavelengths on the MAA production in the cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. They found that UV radiation around 320 nm was the most effective while only a small increase in MAA content was attained with radiation centered at 365 nm, and neither blue, green, nor red light caused any significant effects. Ehling-Schulz *et al.* (1997) applied two different light conditions to enhance MAA synthesis in the cyanobacterium *Nostoc commune* by using a UVB light source with and without a 315-nm cutoff filter and detected MAA production only without the filter. The wavelength dependency of MAA synthesis has also been investigated in other organisms revealing some interesting diversity. Thus, for example the wavelengths between 370 and 460 nm were most effective for 11 different species of Antarctic diatoms, while the

prymnesiophyte *Phaeocystis antarctica* investigated in the same study showed a maximal increase in MAA concentration at 340 nm (Riegger & Robinson, 1997). Since there are such apparent differences among the photosensory processes controlling MAA production in different organisms there might also be a diversity in the photoreceptors involved.

The wavelength dependency of the induction of MAA biosynthesis in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912 can be attributed only to the characteristics of the photoreceptor and is not influenced by the action of possible biosynthetic photoenzymes since MAA synthesis induced by salt stress can also take place in the dark under heterotrophic conditions. Thus, at least for this cyanobacterium, it is not true that MAA synthesis does depend on photosynthetic activity as was assumed by Carreto *et al.* (1990). It is more likely that the only requirement for MAA synthesis is the supply with energy for biosynthesis. This is the first report providing evidence for a UVB photoreceptor in a prokaryote. Other processes in cyanobacteria also show a response to UVB-radiation, e.g. migrations of *Microcoleus chthonoplastes* in microbial mats (Bebout & Garcia-Pichel, 1995); we do not yet know if these processes are under the control of the same photoreceptor.

That the action spectrum for the induction of shinorine synthesis has a distinct peak at 310 nm suggests that the cyanobacterial photoreceptor differs from most UVB photoreceptors described in higher plants. These usually have a peak below 300 nm in common (Ensminger, 1993) and none around 310 nm. Still, one should keep in mind that variations in the local environment of the chromophore can influence its spectral properties (Ensminger, 1993). Iseki and Wada (1995), however, described a photoreceptor in *Bryopsis plumosa*, a coenocytic marine green alga, that showed a small peak in the action spectrum at 310 nm and a much more pronounced peak at 260 nm. In our case, wavelengths below 300 nm were not effective in inducing shinorine synthesis, but we also have reason to believe that this was the result of an inhibitory effect of this radiation. Thus, we cannot exclude the possibility that the chromophore of the cyanobacterial photoreceptor has a second peak at shorter UVB wavelengths that is masked *in vivo* by inhibitory effects.

By incubating cells under UV radiation with increasingly shorter wavelengths, we showed that the UV radiation below 300 nm has a negative effect on the shinorine content either by interfering with MAA synthesis or by enhancing the degradation of these metabolites. These results bear implications for estimating the UV resistance of this organism under a decreasing ozone layer. The reduction of the ozone layer leads to an intensity increase of UVB radiation at shorter wavelengths (Jagger, 1985). Judging from our data, this would cause a reduced shinorine content leading to a diminished shielding

efficiency for wavelengths around 330 nm (because shinorine has an absorption peak at 333 nm and a half-maximal bandwidth of 34 nm). Thus, the higher proportion of UVB radiation of shorter wavelengths would not only cause the known damage to cell components (Karentz *et al.*, 1994) but would also lead to a higher sensitivity of the organism to UV radiation of longer wavelengths.

There are different possible candidates for photoreceptor molecules absorbing strongly in the UVB region (Ballaré *et al.*, 1995). The possibility that the response is caused by DNA damage as has been reported for other genes before (Walker, 1984) can be rejected because the action spectrum does not show the characteristics of a DNA damage action spectrum (Quaite *et al.*, 1992). A possible candidate for the receptor is a reduced pterin (tetrahydroform). The fully reduced tetrahydropterin form of 6,6-dimethylpterin for example has absorption peaks at 223 and 306 nm. Furthermore, there have been reports on the wide occurrence of biopterin glucosides in cyanobacteria (Matsunaga *et al.*, 1993; Wachi *et al.*, 1995) including those in the tetrahydropterin form (Grether *et al.*, 1996). Both an inhibitor of pterin biosynthesis and an antagonist of excited pterin states led to a reduction of shinorine content under UV induction but not under salt induction. Thus, we conclude that a reduced pterin is a probable candidate for the UVB photoreceptor responsible for the induction of shinorine synthesis. However, further evidence like creation and investigation of mutants that show no or enhanced reactivity towards UV radiation will be necessary to confirm this.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by the EC program "Biodiversity: Applied and Systematic Investigation of Cyanobacteria" (BASIC), contract no. BIO4-CT96-0256, and by the Max Planck society.

REFERENCES

Ballaré, C. L., P. W. Barnes & S. D. Flint (1995). Inhibition of hypocotyl elongation by ultraviolet-B radiation in de-etiolating tomato seedlings. I. The photoreceptor. *Physiol. Plant.* **93**, 584-592.

Bebout, B. M. & F. Garcia-Pichel (1995). UV B-induced vertical migrations of cyanobacteria in a microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4215-4222.

Carreto, J. I., M. O. Carignan, G. Daleo & S. G. De Marco (1990). Occurrence of mycosporine-like amino acids in the red-tide dinoflagellate *Alexandrium excavatum*: UV-photoprotective compounds? *J. Plankton Res.* **12**, 909-912.

Castenholz, R. W. (1997). Multiple strategies for UV tolerance in cyanobacteria. *The Spectrum* **10**, 10-16.

De Fabo, E. (1980). *On the nature of the blue light photoreceptor: still an open question.* In: Senger, H. (Ed.), *The blue light syndrome*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 187-197.

Ehling-Schulz, M., W. Bilger & S. Scherer (1997). UV-B induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Bacteriol.* **179**, 1940-1945.

Ensminger, P. A. (1993). Control of development in plants and fungi by far-UV radiation. *Physiol. Plant.* **88**, 501-508.

Evans, E. H., I. Foulds & N. G. Carr (1976). Environmental conditions and morphological variation in the blue-green alga *Chlorogloea fritschii*. *J. Gen. Microbiol.* **92**, 147-155.

Galland, P. & H. Senger (1988). The role of pterins in the photoreception and metabolism of plants. *Photochem. Photobiol.* **48**, 811-820.

Garcia-Pichel, F. & R. W. Castenholz (1991). Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *J. Phycol.* **27**, 395-409.

Garcia-Pichel, F., N. D. Sherry & R. W. Castenholz (1992). Evidence for an ultraviolet sunscreen role of the extracellular pigment scytonemin in the terrestrial cyanobacterium *Chlorogloeopsis* sp. *Photochem. Photobiol.* **56**, 17-23.

Garcia-Pichel, F., C. E. Wingard & R. W. Castenholz (1993). Evidence regarding the UV sunscreen role of a mycosporine-like compound in the cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 170-176.

Golden, S. S. (1995). Light-responsive gene expression in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* **177**, 1651-1654.

Grether, T., J. Maier, U. Karsten, F. Garcia-Pichel & H. Ninnemann (1996). UV-light induction of biosynthesis of pteridine glycosides of cyanobacteria from microbial mats. *International meeting on UV/blue light: perception and responses in plants and microorganisms*, Philipps-Universität, Marburg, Germany.

Iseki, M. & S. Wada (1995). Action spectrum in the ultraviolet region for phototropism of *Bryopsis* rhizoids. *Plant Cell Physiol.* **36**, 1033-1040.

Jagger, J. (1985). *Solar-UV actions on living cells*. Praeger Publishers, New York.

Karentz, D., M. L. Bothwell, R. B. Coffin, A. Hanson, G. J. Herndl, S. S. Kilham, M. P. Lesser, M. Lindell, R. E. Moeller, D. P. Morris, P. J. Neale, R. W. Sanders, C. S. Weiler & R. G. Wetzel (1994). Impact of UV-B radiation on pelagic freshwater ecosystems: Report of working group on bacteria and phytoplankton. *Ergebn. Limnol.* **43**, 31-69.

Maier, J. & H. Ninnemann (1995). Biosynthesis of pteridines in *Neurospora crassa*, *Phycomyces blakesleeanus* and *Euglena gracilis*: detection and characterization of biosynthetic enzymes. *Photochem. Photobiol.* **61**, 43-53.

Matsunaga, T., J. G. Burgess, N. Yamada, K. Komatsu, S. Yoshida & Y. Wachi (1993). An ultraviolet (UV-A) absorbing biopterin glucoside from the marine planktonic cyanobacterium *Oscillatoria* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 250-253.

Portwich, A. & F. Garcia-Pichel (1999). Ultraviolet and osmotic stresses induce and regulate the synthesis of mycosporines in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912. *Arch. Microbiol.* **172**, 187-192.

Quaite, F. E., B. M. Sutherland & J. C. Sutherland (1992). Action spectrum for DNA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion. *Nature* **358**, 576-578.

Riegger, L. & D. Robinson (1997). Photoinduction of UV-absorbing compounds in Antarctic diatoms and *Phaeocystis antarctica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **160**, 13-25.

Vierstra, R. D. & K. L. Poff (1981). Mechanisms of specific inhibition of phototropism by phenylacetic acid in corn seedling. *Plant Physiol.* **670**, 1011-1015.

Wachi, Y., J. G. Burgess, K. Iwamoto, N. Yamada, N. Nakamura & T. Matsunaga (1995). Effect of ultraviolet-A (UV-A) light on growth, photosynthetic activity and production of biopterin glucoside by the marine UV-A resistant cyanobacterium *Oscillatoria* sp. *Biochim. Biophys. Acta* **1244**, 165-168.

Walker, G. C. (1984). Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **48**, 60-93.

ERLÄUTERUNGEN ZU DEN PUBLIKATIONEN

Diese Dissertation beruht zu einem großen Teil auf drei Publikationen (Kapitel 3-5). Alle Publikationen basieren auf Ideen, die gemeinsam von Anne Portwich und Ferran Garcia-Pichel entwickelt wurden. Alle Experimente wurden von Anne Portwich konzipiert und durchgeführt, mit Ausnahme der HPLC-Auftrennungen der Zuckerosmolyte, die im Labor von Martin Hagemann (Universität Rostock) durchgeführt wurde (siehe Kapitel 3). Die Manuskripte wurden von Anne Portwich unter redaktioneller Mitwirkung von Ferran Garcia-Pichel erstellt.

DANKSAGUNG

Diese Dissertation wurde innerhalb von drei Jahren am Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie in der Gruppe Mikrosensoren durchgeführt. Die Frage, was ich denn eigentlich thematisch in der Mikrosensorengruppe zu suchen hätte, habe ich häufig gehört. Aber auch wenn ich mit meinem Thema eine Außenseiterposition in dieser Arbeitsgruppe eingenommen habe, habe ich mich doch nicht als solcher gefühlt und habe immer interessierte wenn auch zeitweise etwas irritierte Gesprächspartner gefunden. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die in dieser Zeit auf die eine oder andere Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Ferran Garcia-Pichel, der mir einerseits viel Freiraum bei meiner Arbeit ließ, andererseits immer wieder Impulse in die richtige Richtung gab. Dankeschön auch an Ramona, mit der ich gemeinsam meine ersten Erfahrungen mit Cyanobakterien und MAAs gemacht habe und die mir bei HPLC-Problemen immer zur Seite stand. Ein ganz herzliches Dankeschön an alle Kollegen, die sich mit mir ein Arbeitszimmer geteilt haben: Eric, mit dem ich in den ersten anderthalb Jahren viel Spaß hatte; Olivier, dem ich meine einzige Messung mit Mikrosensoren verdanke; Rebecca, die mich immer wieder aufgebaut hat; und Christine und Felix, die mir in den letzten Monaten am Institut Asyl gewährt haben. Ein ganz besonderer Dank gebührt Sijla und Roland, die viel zur guten Atmosphäre in der Mikrosensorgruppe beigetragen haben. Bedanken möchte ich mich auch bei unseren TAs Anja, Cäcilia, Gaby und Vera, die bei Problemen im Labor immer hilfsbereit waren.

Weiterhin danke ich Rudolf Amann dafür, daß ich in seinem Labor die (leider erfolglose) molekularbiologische Arbeit durchführen durfte, und Katrin Ravenschlag, die mich bei dieser Arbeit unterstützt hat. Martin Hagemann von der Universität Rostock möchte ich an dieser Stelle auch für Ratschläge und für die freundliche Bereitstellung eines Plasmides danken.

Einige Personen waren besonders an dem Prozess der Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt, denen ich danken möchte: Armin und Felix fürs Korrekturlesen und Björn für Hilfe bei Layout- und Computerproblemen. Mein besonderer Dank gilt Susanne, Marlene und Ferran für ihre Gastfreundschaft während eines einwöchigen Aufenthaltes in Phoenix. Ich danke meinem Doktorvater Prof. Widdel für die Begutachtung dieser Arbeit und allen weiteren Mitgliedern des Prüfungskomitees für ihre Zeit und Mühe.