

RNA-polymeraasin ω -alaysikön rooli *Synechocystis* syanobakteerin sopeutuessa typen puutostilaan

Molekyylibiotieteet: Molekulaarisen kasvibiologian
pro gradu -tutkielma

Laatija:
Joonas Silmu

Ohjaajat:
FT Juha Kurkela
Dos. Taina Tyystjärvi

26.5.2025
Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pro gradu -tutkielma

Oppiaine: Molekyylibiotieteet: Molekulaarinen kasvibiologia

Tekijä(t): Joonas Silmu

Otsikko: RNA-polymeraasin ω -alaysikön rooli *Synechocystis* syanobakteerin sopeutuessa typen puutostilaan

Ohjaaja(t): FT Juha Kurkela, Dos. Taina Tyystjärvi

Sivumäärä: 42 sivua

Päivämäärä: 26.5.2025

Syanobakteerit kykenevät selviytymään mitä erikoisimmista olosuhteista sopeuttamalla metaboliaansa ympäristön puutoksiin ja ylitarjontaan. Merkittävänä tekijänä tähän on geenien ilmenemisen valikointi, joka perustuu RNA-polymeraasin σ -faktoriin. σ -faktoreita on solussa erilaisia ja jokainen tunnistaa tiettyjä promoottorialueita, joille RNA-polymeraasi kiinnittyy transkription alussa. Tämän systeemin kautta solu reagoi muuttuviin olosuhteisiin lisäämällä tai vähentämällä tietyn σ -faktorin määrää. σ -faktorin kiinnittymiseen vaikuttaa RNA-polymeraasin pieni ω -alaysikkö. Ilman tätä alaysikköä RNA-polymeraasissa olevien σ -faktorien suhde häiriintyy. Tässä tutkielmassa selvitetään, että vaikuttaako RNA-polymeraasin ω -alaysikön puuttuminen typenpuutteeseen sopeutumiseen. Työssä verrattiin *Synechocystis* sp. PCC 6803 kontrollikannan ja Δ rpoZ-kannan (puuttuva ω -alaysikkö) fotosynteettisen hapentuoton eroja happielektrodilla sekä lisäksi fotosynteesin proteiini- ja kompleksien määriä. Western blot -tekniikalla tutkittiin fotosysteemi I:n, fotosysteemi II:n, fykobilisomin, NDH-1-kompleksin sekä ATP-syntaasin määriä mittaamalla komplekseista yhtä alaysikköä. Fykobilisomista mitattiin sekä fykosyaniinia että allofykosyaniinia. RT-qPCR-tekniikalla tutkittiin fykosyaniinin, allofykosyaniinin, fotosysteemi I:n, NDH-1:n ja ATP-syntaasin mRNA:n määrää. Tuloksissa havaittiin molemmilla kannoilla, että fotosysteemi II:n aktiivisuus putoaa ensimmäisen 4 tunnin aikana noin puoleen ja loppuu lähes kokonaan jo 24 tunnin typenpuutteen jälkeen, mutta proteiinien hajoamista havaittiin vain vähän ja pääasiassa fykobilisomiantennissa. Vaikka typenpuute ei vaikuttanut ATP-syntaasin määrään, niin merkittävänä havaintona proteiinia on paljon vähemmän kannalla, jolta ω -alaysikkö puuttuu. RT-qPCR-tuloksia ei pystytty käyttämään, sillä näytteet olivat epäpuhtaita epäonnistuneen DNAasi-käsittelyn vuoksi. Tämän koe olisi hyvä suorittaa uudelleen. Tämän lisäksi ehdotan MIMS-koetta vahvistamaan happielektrodin mittaustulokset. Tämän tutkielman tulosten perusteella voidaan todeta, että ω -alaysikön puuttuminen ei vaikuta typenpuutteeseen sopeutumiseen.

Avainsanat: fotosynteesi, hapentuotto, RNA-polymeraasi, *Synechocystis*, typenpuute, σ -faktori, ω -alaysikkö

Sisällysluettelo

1.1	Syanobakteerit ja fotosynteesi	6
1.1.1	Fotosynteettinen kasvutapa ja <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 malliorganismina	6
1.1.2	Fotosynteesin lineaarinen elektroninsiirtoketju	7
1.1.3	Syanobakteerien soluhengitys	9
1.2	Syanobakteerien hiilen sidonta ja typpimetabolia	10
1.2.1	Hiilen konsentroidimekanismin osat	10
1.2.2	Hiili- ja typpimetabolian tasapainotus syanobakteereissa	11
1.2.3	Syanofysiini sekä typen puutostila	12
1.2.4	C/N-suhteen vaikutus hiilen konsentroidiin sekä typpimetaboliaan	13
1.3	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803:n RNA-polymeraasi	14
1.3.1	RNA-polymeraasiydin ja σ -faktorit	14
1.3.2	ω -alaysikkö ja <i>Synechocystis</i> Δ rpoZ-kanta	16
1.4	Työn tarkoitus	17
2	Materiaalit ja menetelmät	18
2.1	Selukannat, kasvatusolosuhteet ja typenpuute	18
2.2	Fotosynteettisen aktiivisuuden mittaaminen happielektrodilla	18
2.2.1	Solujen kasvatus	18
2.2.2	Hapentuottomittaukset	19
2.3	Proteiinien tutkimus western blot-tekniikalla	19
2.3.1	Solujen kasvatus	19
2.3.2	Proteiinien eristys ja pitoisuuden määrittäminen	20
2.3.3	Western blot-menetelmä	20
2.4	mRNA:n kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR	21
2.4.1	Solujen kasvatus	21
2.4.2	RNA:n eristys	22
2.4.3	cDNA-synteesi ja RT qPCR	22
3	Tulokset	25
3.1	Happielektrodikokeet	25
3.1.1	Fotosynteesiaktiivisuus Δ rpoZ:lla ei eroa kontrollikannasta	25
3.1.2	PSII:n aktiivisuus laskee hyvin nopeasti typenpuutteessa	26
3.1.3	Soluhengitys vaihtelee suuresti typenpuutteessa	27
3.2	Proteiinimäärien vertailu western blot-menetelmällä	28
3.2.1	Fykobilisomin hajoaminen havaitaan vasta 24 tunnin typenpuutteessa	28
3.2.2	PS-kompleksit eivät hajoa typenpuutteen alussa	29

3.2.3	ATP-syntaasia on Δ rpoZ:lla kontrollikantaa vähemmän	31
3.2.4	NDH-1:n määrä vaihteli typenpuutteen aikana	32
3.3	RT qPCR-kokeet	32
3.3.1	RNA-konsentraatio saattaa olla Δ rpoZ:lla kontrollikantaa alhaisempi	32
3.3.2	qPCR-tuloksista todetaan näytteiden epäpuhtaus	33
4	Tulosten tarkastelu	34
5	Päätelmät	36
	Lähdeluettelo	37

Lyhenteet:

2-OG, 2-oksoglutaraatti

2-PGA, 2-fosfoglyseraatti

3-PGA, 3-fosfoglyseraatti

APC, Allofykosyaniini

ARTO, Vaihtoehtoinen terminaalioksidaasi

C/N-suhde, Hiilen pitoisuuden suhde typen pitoisuuteen

CBB-kierto, Calvin-Benson-Bassham-kierto

CO₂, Hiilidioksidi

COX, Sytokromi-c-oksidaasi

Cyd, Sytokromi-bd-kinolioksidaasi

Cyt b₆f, Sytokromi b₆f

DCBQ, 2,6-Dikloro-1,4-bentsokinoni

FeCy, Ammoniumferrosyanidi

FNR, Ferredoksiini-NADP-reduktaasi

GS-GOGAT-kierto, Glutamiini-glutamaatti-kierto

HCO₃⁻, Bikarbonaatti

NaHCO₃, Natriumbikarbonaatti

NDH-1, Tyypin 1 NAD(P)H-dehydrogenaasi

NH₄⁺, Ammoniumioni

OD₇₃₀, Optinen tiheys 730 nm:ssä

OEC, Happea tuottava kompleksi

PPFD, fotosynteesin valovuon tiheys

PS-kompleksit, Fotosysteemikompleksit

PSI, Fotosysteemi I

PSII, Fotosysteemi II

PTOX, Plastidin terminaalioksidaasi

R-PC, R-fykosyaniini

RT-qPCR, Reaaliaikainen kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio

RubisCO, Ribuloosi-1,5-bisfosfaattikarboksylaasi/oksygenaasi

SDH, Sukkinaatidehydrogenaasi

SDS, natriumdodekyylisulfaatti

TBS, Tris-puskuroitu suolaliuos

TTBS, Tween-20:a sisältävä TBS

Johdanto

1.1 Syanobakteerit ja fotosynteesi

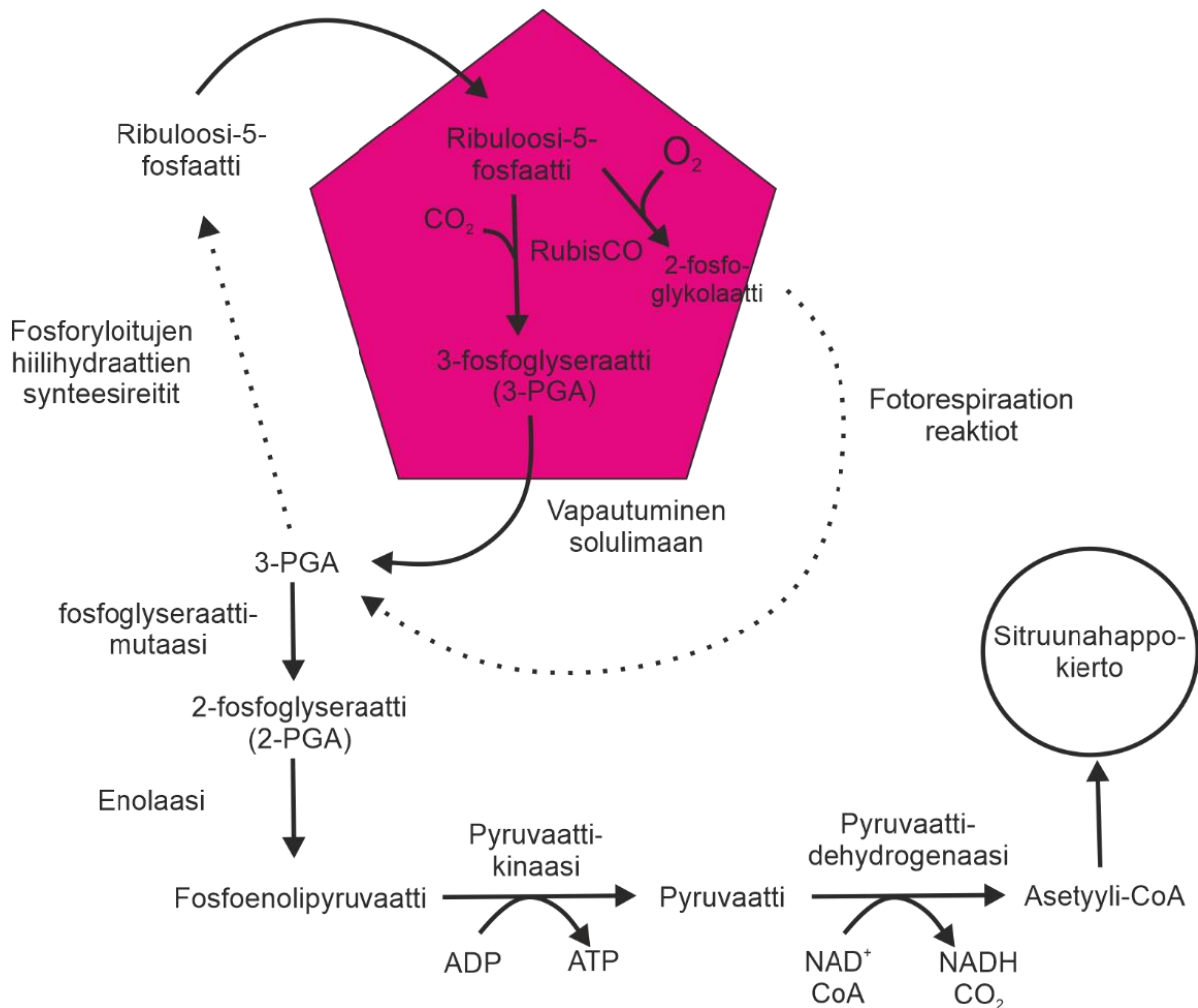
1.1.1 Fotosynteettinen kasvutapa ja *Synechocystis* sp. PCC 6803 malliorganismina

Syanobakteerit ovat laaja ryhmä yksi- ja monisoluisia prokaryootteja (Rippka et al. 1979). Syanobakteerit ovat fotoautotrofeja, eli käyttävät valoenergiaa fotosynteettisesti kasvaakseen (Vermaas 2001). Fotosynteesissä fotonien energian avulla solu tuottaa ATP:ta sekä NADPH:a. Fotosynteesiin kuuluu myös hiilensidontareaktiot, joiden avulla solu pystyy käyttämään ilman hiilidioksidia (CO_2) biomolekyylien tuottoon. *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Tästä eteenpäin *Synechocystis*) on makeassa vesistössä elävä yksisolainen syanobakteeri, josta on tehty syanobakteerien malliorganismi (Rippka ja muut 1979). Pallonmuotoiset *Synechocystis*-solut lisääntyvät heterotrofisten bakteerien tavoin solujakautumalla.

Syanobakteerien autotrofinen kasvu perustuu solunsisäiseen tylakoidikalvorakenteeseen kiinnittyneiden proteiinikompleksien absorboimasta valoenergiasta muunnetun kemiallisen energian, sekä solun sisään otetun CO_2 :n käyttämiseen ravintona (Vermaas 2001). Fykobilisomiantenni kerää valoenergiaa fotosysteemi II:lle (PSII), joka hajottaa vettä protoneiksi, elektroneiksi ja hapeksi. Protonit jäävät tylakoidikalvon sisään ja elektronit kulkeutuvat vastaanottajalta toiselle fotosynteettisessä elektroninsiirtoketjussa. Elektronien avulla solu tuottaa NADPH:ta ja protonien avulla ATP-syntaasi aktivoituu tuottamaan ATP:a.

Solu kuluttaa ATP:a ja NADPH:a erilaisiin toimintoihin, kuten biomassan tuottoon.

Fotoautotrofit saavat hiilirunkojensa rakennukseen tarvittavan hiilen ilman CO_2 :sta sekä ympäristön bikarbonaatista (HCO_3^-). Calvin-Benson-Bassham-kierrossa CO_2 sidotaan ribuloosi-5-fosfaattiin ja muodostuneesta 3-fosfoglyseraatista (3-PGA) solu voi valmistaa hiilirunkojen lähtöaineita, kuten pyruvaattia (Mills ja muut 2020). Syanobakteereille on kehittynyt hiilen konsentroitimekanismi tehostamaan hiilensidontaa (Raven ja muut 2017). Konsentroitimekanismiin kuuluu HCO_3^- :n sisäänottajia, CO_2 :n HCO_3^- :ksi muuttamiseen erikoistuneita NAD(P)H-dehydrogenaasi (NDH-1) -komplekseja sekä karboksisomi (Kurkela ja Tyystjärvi 2023). Karboksisomi on proteiiniukuoresta koostuva partikkeli, jonka sisällä on HCO_3^- :n CO_2 :ksi muuntava hiilihappoanhydraasi, sekä ribuloosi-1,5-bisfosfaattikarboksylaasi/oksygenaasi (RubisCO) -entsyymi, joka katalysoi ribuloosi-1,5-bisfosfaatin karboksylaatiota tuottaen 3-PGA:ta (kuva 1).



Kuva 1: Hiilidioksidin (CO_2) liittyminen osaksi *Synechocystis*ksen metaboliaa. Karboksisomi, jossa hiilen sidonta tapahtuu, on merkitty punaisella. Karboksisomin Ribuloosi-1,5-bisfosfaatti karboksylaasi/oksygenaasi (RubisCO) sitoo CO_2 :a ribuloosi-5-fosfaattiin muodostaen 3-fosfoglyseraattia (3-PGA). Katkoviivaisella nuolella on välireaktioita, joita kuvassa ei esitetä. Fosforyloitujen hiilihydraattien synteesireiitit muodostavat kierron joka "ruokkii" RubisCO:a ribuloosi-5-fosfaatilla. RubisCO:n käyttäessä happea CO_2 :n sijaan syntyy 2-fosfoglykoolaattia, joka voidaan energiaa kuluttaen muuttaa 3-PGA:ksi. Tätä kutsutaan fotorespiraatioksi.

1.1.2 Fotosynteesin lineaarinen elektroninsiirtoketju

Fotosynteesin lineaarinen elektroninsiirtoketju on sarja tylakoidikalvolle kiinnittyneitä sekä tylakoidin läheisyydessä liikkuvia elektronin luovuttajia ja vastaanottajia (Vermaas 2001; Lea-Smith ja muut 2016) (Kuva 2). Tylakoidikalvon PSII:n absorboidessa valoenergiaa sen $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -rakenteesta koostuva happea tuottava kompleksi (Oxygen Evolving Complex; OEC) aktivoituu ja alkaa hajottamaan vettä. Veden hajoamisessa vapautuvat elektronit ohjataan elektroninsiirtoketjun kautta NADP^+ :lle. Tylakoidikalvon sisäpuolelle eli luumeniin kertyy protoneja OEC:sta sekä elektroninsiirtoketjun sytokromikompleksista (cyt b_6f) aiheuttaen varauseron luumenin ja soluliman välille. ATP-syntaasi hyödyntää tätä gradienttia

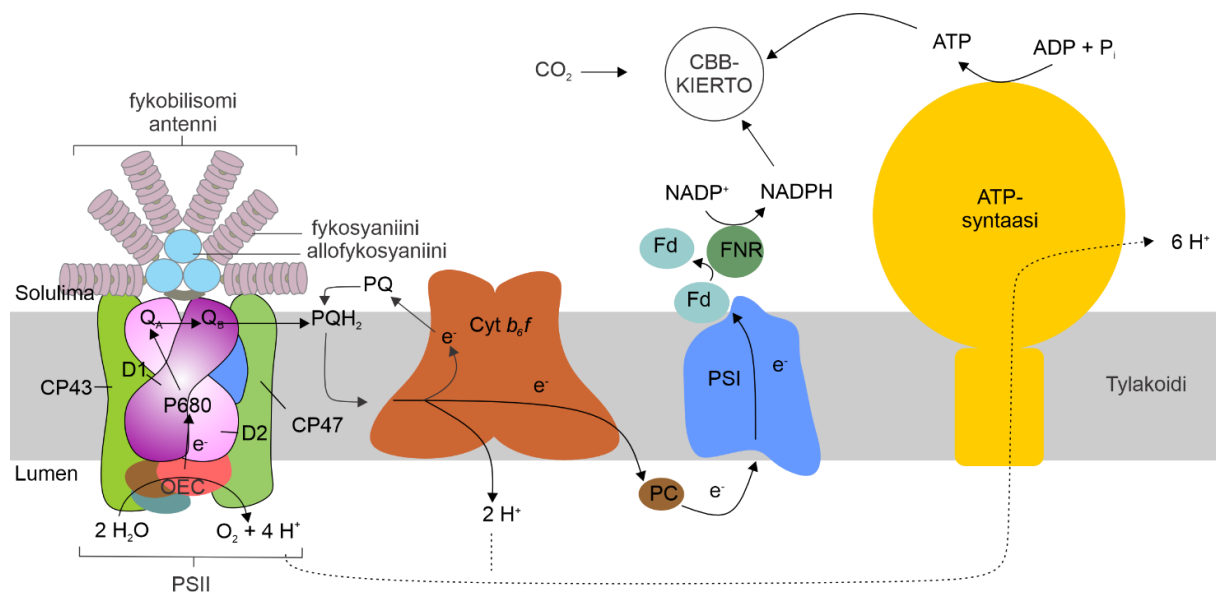
johtamalla protonit H^+ -kalvopumppurakenteensa läpi tylakoidikalvon luumenista solulimaan. Protonien virtaus pumpun läpi aktivoi ATP-syntaasin tuottamaan ATP:ta.

PSII on elektroninsiirtoketjun ensimmäinen proteiinikompleksi, joka koostuu OEC:n lisäksi klorofylliä sitovista proteiineista (D1, D2, CP43 ja CP47) sekä muutamista muista rakennealaysiköistä. PSII:een kuuluu myös feofytiinimolekyylille sekä plastokinonit Q_A ja Q_B (Gisriel ja muut 2021). Klorofylli on valoenergiaa absorboiva pigmenttimolekyylille. OEC:n aktivaatioon tarvittava energia tulee valoenergialla virittyneestä D1-D2 -heterodimeerin sitomasta P_{680}^+ reaktiokeskusklorofyllistä, jonka positiivinen varaus imee elektroneja sitä mukaa, kuin niitä siirtyy eteenpäin elektroninsiirtoketjussa. PSII:n valoenergian keräystä vahvistaa sen pinnalle kiinnittyvä fykobilisomi. Fykobilisomi on oranssia valoa absorboivaa fykosyanobilinipigmenttiä sitovasta fykosyaniinista sekä allofykosyaniinista (APC) koostuva proteiinikompleksi (Arteni ja muut 2009). Fykobilisomi kerää valoenergiaa, jonka se voi siirtää PSII:n CP43:n ja CP47:n sitoman klorofyllin kautta reaktiokeskusklorofyllille. APC on sylinterimäinen rakenne (Dominiguez-Martin ja muut 2022). Kolmesta APC-alaysiköstä koostuva fykobilisomiydin sitoo polymeeristä fykosyaniinia. Fykosyaniinin alaysiköt muodostavat antennimaisia sauvarakenteita, jotka absorboivat valoenergiaa. Yhdessä fykobilisomissa on kuusi fykosyaniinisauvaa, jotka koostuvat valoa absorboivan fykobilinipigmentin sisältämistä alaysiköistä sekä niiden välissä olevista rakennealaysiköistä. Fotonit kulkeutuvat fykosyaniinirakenteen sisällä pigmenttimolekyylien välisenä energiansiirtona APC:lle ja siitä edelleen PSII:lle. Valon keräämistehokkuus riippuu antennipolymeerien pituudesta, joka vaihtelee olosuhteiden mukaan. Fykobilisomi kiinnittyy PSII:een ydinproteiinien välityksellä.

Veden hajoamisessa muodostuva elektroni johdetaan PSII:n P_{680}^+ reaktiokeskusklorofyllille. PSII sitoo myös klorofyllin kaltaisen feofytiinimolekyylin, joka vastaanottaa reaktiokeskusklorofyllin elektroneja ja luovuttaa niitä Q_A -plastokinonille, (Vinyard ja muut 2013). Q_A siirtää elektronin Q_B -plastokinonille. Q_B vastaanottaa kaksi elektronia sekä kaksi protonia, jolloin siitä tulee plastokinoli. Plastokinoli irtoaa PSII:sta ja luovuttaa elektronit cyt b_6f :n rieske-domeenin rauta-rikkiklusterille (Lea-Smith ja muut 2016) (kuva 2). Cyt b_6f :ltä toinen elektroni palautuu takaisin plastokinonille ja toinen luovutetaan plastosyaniinille. Cyt b_6f vastaanottaa plastokinolilta myös kaksi protonia, jotka kompleksi luovuttaa luumeniin.

Plastosyaniini on pieni tylakoidikalvon luumenissa sijaitseva metalloproteiini, joka vastaanottaa cyt b_6f :n elektroneja ja siirtää niitä fotosysteemi I:lle (PSI) (Chitnis 2001). PSI

on PSII:n tavoin klorofylliä sitovista proteiinirakenteista koostuva valoenergiaa keräävä kompleksi. PSI:n P₇₀₀ reaktiokeskuschlorofyllin virittyminen reaktiokeskuksessa mahdollistaa elektronin siirtymisen reaktiokeskukseen. Reaktiokeskuksesta elektroni siirtyy muihin PSI:n sitomiin klorofylleihin. Samalla reaktiokeskus imee itselleen uuden elektronin plastosyaniinilta. Fyllokinoni on PSI:n sitoma molekyyli, joka vastaanottaa elektroneja klorofylliltä. Fyllokinonilta elektroni siirtyy rauta-rikkiklusterien kautta ferredoksiinille. Solulimassa ferredoksiini-NADP-reduktaasi (FNR) vastaanottaa ferredoksiinilta elektronin ja luovuttaa sen NADP⁺:lle tuottaen NADPH:a.



Kuva 2: Fotosynteesin lineaarinen elektroninsiirto. Fykobilisomiantenni kerää valoenergiaa fotosysteemi II:lle (PSII). Hapetta tuottava keskus (OEC) käyttää valoenergian veden hajotukseen. Reaktiossa syntyy luumeniin jääviä protoneja, PSII:een kulkeutuvia elektroneja sekä sivutuotteena happea. Protonit siirtyvät luumenista solulimaan ATP-syntaasin protonipumpun avulla. Samalla tuottuu ATP:ta. PSII siirtää keräämänsä elektronit plastokinonille (PQ), joka luovuttaa ne sytokromi b₆f:lle (cyt b₆f). Plastosyaniini (PC) vastaanottaa elektroneja cyt b₆f:ltä ja luovuttaa ne fotosysteemi I:lle (PSI). PSI kerää valoenergiaa, jonka avulla se pystyy siirtämään elektronit ferredoksiinille (Fd). Fd:lta elektronit siirtyvät ferredoksiini-NADP-reduktaasille (FNR) joka tuottaa NADP⁺:sta NADPH:a. Muokattu kuvista Sarvikas ja muut 2017.

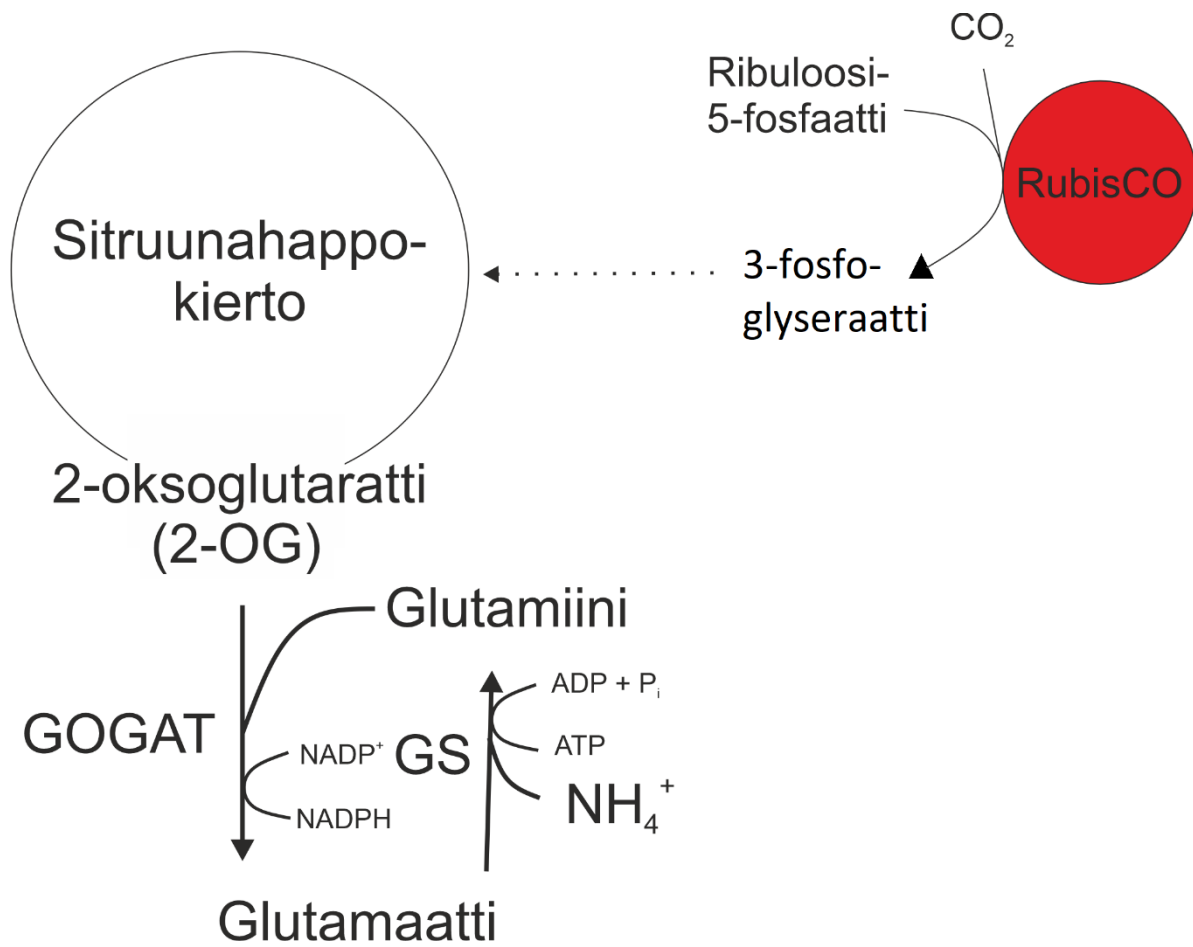
1.1.3 Syanobakteerien soluhengitys

Syanobakteereilla on hapen tuoton lisäksi happea kuluttavia proteiineja (Vermaas 2001; Lea-Smith ja muut 2016). Syanobakteerien soluhengitys on reaktio, josta vastaa tylakoidikalvon terminaalioksideaasi [Vaihtoehtoinen terminaalioksideaasi (ARTO), plastidin terminaalioksideaasi (PTOX), sytokromi-c-oksideaasi (COX) ja sytokromi-bd-kinolioksideaasi (Cyd)] (kuva 3). Terminaalioksideaasit tuottavat vettä hapesta, elektroneista ja protoneista. COX vastaanottaa elektronin cyt b₆f:ltä, kun taas muut terminaalioksideaasit vastaanottavat

Tuloksena syntyvä 2-fosfoglykolaatti kuljetetaan karboksisomin ulkopuolelle, jossa se muutetaan myrkyttömiksi yhdisteiksi, kuten 3-PGA:ksi pitkän, energiaa kuluttavan reaktiosarjan kautta. Fotorespiraatio ei ole energiataloudellisesti kannattavaa. Karboksisomin tehtävä on ehkäistä fotorespiraatiota konsentroimalla CO₂:a RubisCO:n läheisyyteen. Hiilirunkojen prekursorina solut käyttävät pyruvaattia, joka on lähtöaineena monelle biosynteesireitille, sekä toimii keskeisenä molekyylinä sitruunahappokierrossa. Syanobakteerit saavat pyruvaattinsa 2-PGA:sta. Vaihtoehtoisesti syanobakteerit voivat varastoida CBB-kierron hiilirunkoja tuottamalla 3-PGA:sta glykogeenia. (Mills ja muut 2020)

1.2.2 Hiili- ja typpimetabolian tasapainotus syanobakteereissa

Synechocystis ottaa kuljetusproteiinien (ammonium-, nitraatti- ja ureatransportti) avulla ympäristöstään tyypeä ammoniakkina, nitraattina ja ureana (Forchammer ja Selim 2020). Solulimassa nitraatti muutetaan nitriitin kautta ammoniumioniksi (NH₄⁺) nitraatti- ja nitriittireduktaasien avulla. Glutamiinisyntaasi käyttää NH₄⁺ -ioneja glutamiini-glutamaatti (GS-GOGAT) -kierrossa tuottaen glutamiinia (kuva 4). GS-GOGAT-syklissä tuotetaan myös glutamaattia liittämällä glutamiiniin sitruunahappokierron reaktiotuotteena syntyvää 2-oksoglutaraattia (2-OG). Typen metabolia on tästä syystä tiiviisti linkittynyt hiilen metaboliaan ja syanobakteerit säätelevät hiilen ja typen metaboliaa reagoimalla solunsisäisen hiilen ja typen suhteeseen (C/N-suhde) (Forchammer ja Selim 2020). Keskeisenä C/N-suhteen signaalintimolekyylinä toimii 2-OG, joka voi aktivoida tai estää säätelyproteiinien toimintaa. Kun tyypeä ei ole riittävästi, GS-GOGAT-kierto ei pysty kuluttamaan 2-OG:a, jolloin sitä kertyy soluun ja pystyy sitoutumaan signaalintiproteiineihin (Forchammer ja Schwarz 2019).



Kuva 4: GS/GOGAT-kierto. Glutamiinisyntaasi (GS) liittää ammoniumionin glutamaattiin tuottaen glutamiinia. Glutamiini-oksoglutaraattiaminotransferaasi (GOGAT) tekee glutamiinista glutamaattia 2-oksoglutaraatin (2-OG) avulla. GS kuluttaa ATP:a ja GOGAT kuluttaa NADPH:a. Glutamaatin valmistukseen vaadittava 2-OG tuotetaan sitruunahappokierrossa, joka yhdistää hiilimetabolian typpimetaboliaan. Katkoviivaisella nuolella on reaktioita, joita kuvassa ei esitetä.

1.2.3 Syanofysiini sekä typen puutostila

Syanobakteerit varastoivat typpeä aminohapoista koostuvaan syanofysiinimolekyyliin (Watzer ja Forchammer 2018). Syanofysiinisyntetaasi muodostaa syanofysiiniä ATP:ta kuluttavassa reaktiossa liittämällä arginiinia ja asparagiinihappoa vuorotellen kasvavan aminohappoketjun karboksyyli-päähän. Kun typpeä ei ole saatavilla, syanobakteeri menee kloroosiin (Forchammer ja Schwarz 2019). Kloroosissa solujen normaalit toiminnot hidastuvat ja typpeä vapautuu välttämättömien toimintojen ylläpitoon hajottamalla ensisijaisesti syanofysiiniä (Forchammer ja Selim 2020), mutta myös proteiineja.

Fykobilisomeja on syanobakteereissa erittäin paljon (Jahn ja muut 2018), jonka vuoksi niiden hajottaminen alkaa kloroosin alkuvaiheilla (Collier ja Grossman 1992). Fykobilisomeja hajotetaan myös siksi, että typenpuutteessa C/N-suhde on korkea, jolloin solu pyrkii hidastamaan hiilen metaboliaa, joka tarkoittaa myös fotosynteesin alasajoa. Fykobilisomin hajotus on riippuvainen NblA-proteiinista, joka sitoutuu fykosyaniinialayksikköön irrottaen

sen (Forchammer ja Schwarz 2019). NblB-proteiini irrottaa pigmenttimolekyylin NblA-fykosyaniinista, jonka jälkeen NblA sitoo fykosyaniinin Clp-proteaasiin joka hajottaa sen. Fykobilisomien sekä klorofyllin hajoaminen johtaa kloroosille tyypilliseen värinmuutokseen. Syanobakteerin nestekasvatus muuttuu kirkkaan vihreästä samean kellertäväksi. Keltainen väri johtuu solujen karotenoidipigmenteistä, jotka eivät hajoa sinertävän fykobiliinin tai vihertävän klorofyllin tavoin. Solut voivat toipua kloroosista, mikäli solujen ympäristöön tuodaan tyypiyhdisteitä. Syanobakteerit toipuvat paremmin kloroosista, mitä enemmän syanofysiiniä ne ovat pystyneet varastoimaan hyvissä kasvuolosuhteissa (Wutzer ja Forchammer 2018).

1.2.4 C/N-suhteen vaikutus hiilen konsentroitintaan sekä typpimetaboliaan

Hiilen konsentroitintimekanismeja sekä typpimetaboliaa säädellään usean transkriptiotekijän avulla. Hiilimetaboliaa säätelee RbcR (Bolay ja muut 2022), NdhR (Jiang ja muut 2017), CmpR (Omata ja muut 2001) sekä SyCRP1 (Bantu ja muut 2022). Typpimetaboliaa säätelee NtcA (Giner-Lamia ja muut 2017), sekä CfrA (Muro-Pastor ja muut 2020).

RbcR on RubisCO:n suuren alayksikön (*rbcL*) operonia aktivoiva transkriptiotekijä (Bolay ja muut 2022). RubisCO:n lisäksi RbcR aktivoi myös HCO_3^- :n symportti SbtA:n, karboksisomirakenteen (*ccmK*) ja NDH-1-kompleksin CupA-alayksikön (*ndhF3*) operoneja. Lyhyesti RbcR siis parantaa hiilen sisäänottoa sekä hiilen sidontaa. Syklinen AMP (cAMP) on korkeasta hiilipitoisuudesta viestivä signaalimolekyylä. cAMP:n reseptoriproteiini SyCRP1 on yleinen hiilen konsentroitinteenien hiljentäjä (Bantu ja muut 2022), joka hidastaa hiilen sidontaa, kun epäorgaanista hiiltä on ylimäärin. SbtB on myös cAMP:a sitova proteiini, joka inhiboi HCO_3^- :n symportti SbtA:ta sitoutumalla siihen (Fang ja muut 2021; Mantovani ja muut 2022). cAMP:ia sitova SyCRP1 häiritsee SbtA-SbtB-kompleksia ja toimii SbtB:n inhibiittorina (Bantu ja muut 2022). *sbtA* ja *sbtB* sijaitsevat samassa operonissa eli ne ilmenevät yhdessä.

Hiili/typpimetabolian säätelyn keskeisin signaalireitti on PII-proteiinien kautta tapahtuva säätely (Forchammer ja muut 2022). PII-proteiinit sitovat 2-OG:a. 2-OG viestii korkeasta C/N-suhteesta, jolloin sitä sitova PII aktivoi tyypin sisäänottokanavia. 2-OG:a sitova PII aktivoi myös typpimetabolian tärkeintä transkriptiotekijää, NtcA:ta, jolla on myös useita muita rooleja solun eri toiminnoissa. PII vaikuttaa NtcA:n aktivaatioon PipX-proteiinin kautta. PII inaktivoi PipX:a, mutta 2-OG:n liittyessä PII:een PipX vapautuu ja tehostaa NtcA:n säätelyaktiivisuutta sitoutumalla siihen. PII voi sitoa myös ADP:n tai ATP:n, jotka

viestivät energian saatavuudesta. PII-proteiini voi myös fosforyloitua kerran, kahdesti tai kolmesti (Forchhammer ja Selim 2020). Fosforyloitumisen taso on riippuvainen vallitsevasta C/N-suhteesta. Fosforylaation määrä on suurimmillaan typenpuutteessa ja pienimmillään, kun ammoniumionia on runsaasti saatavilla ympäristössä. Fosforyloituneen PII:n määrä nousee myös korkeassa CO₂:ssa sekä ympäristössä, jossa solun pitää pelkistää nitraattia ammoniumioniksi. Tästä voi päätellä fosforyloidun PII:n tehostavan ammoniumionin (sekä välillisesti glutamiinin) tuotantoa.

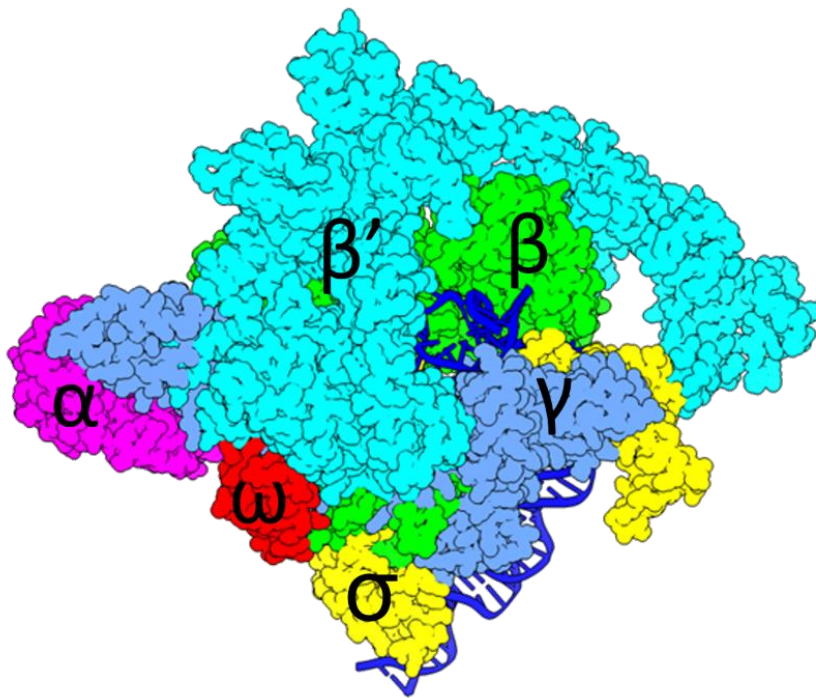
NtcA on typen ja hiilen metaboliaa sekä fotosynteesiä säätelevä transkriptiotekijä. NH₄⁺-ioni toimii viestintämolekyylinä, jonka pitoisuus vaikuttaa NtcA:n toimintaan (Giner-Lamia ja muut 2017). Typenpuutteessa NtcA lisää typen sisäänottajien ja ureaasin ilmenemistä sekä hiljentää PSII:n OEC:n ja HCO₃⁻:n muodostumista katalysoivan CupA-alayksikön ilmenemistä. Aikaisemmin mainittu hiilen sidontaa hiljentävä transkriptiotekijä SyCRP1 myös aktivoi NdhR:ää (Bantu ja muut 2022). NdhR on hiilen määrään reagoiva transkriptiotekijä, jonka aktiivisuus riippuu korkeassa C/N-suhteessa kertyvästä 2-OG:sta ja matalassa CO₂-pitoisuudessa kertyvästä 2-fosfoglykolaatista (Jiang ja muut 2017). 2-fosfoglykolaatti on RubisCO:n sivutuote, joka syntyy, kun entsyymi käyttää substraattina CO₂:n sijaan O₂:a (kuva 1). Kahden 2-OG-molekyylin sitoutuessa NdhR-tetrameeriin saa kompleksin sitoutumaan DNA:han hiljentäen hiilen konsentroidimekanismeja sekä itsesäätelöo omaa geeniekspressiotaan. 2-fosfoglykolaatin sitoutuessa NdhR irtoaa DNA:sta. CmpR on NdhR:n kaltainen transkriptiotekijä, joka 2-fosfoglykolaatin aktivoimana lisää BCT1:n ilmenemistä eli nostaa hiilen sisäänottokykyä (Omata ja muut 2001, Jiang ja muut 2017). CfrA on hiilen konsentroidimekanismin säätelijä, joka sopeuttaa solun typenpuutostilaan aktivoimalla varastosokeri glykogeneenin synteesiä (Muro-Pastor ja muut 2020). Typpimetabolian säätelijä NtcA:n havaitsema korkea C/N-suhde johtaa CrfA:n aktivaatioon. CfrA inhiboi pyruvaattidehydrogenaasin ilmenemistä ohjaten hiilen kulkemaan sitruunahappokierron sijaan glykogeneenin reaktioreitille.

1.3 *Synechocystis* sp. PCC 6803:n RNA-polymeraasi

1.3.1 RNA-polymeraasiydin ja σ -faktorit

RNA-polymeraasi on DNA:han sitoutuva proteiinikompleksi, joka tuottaa RNA:ta DNA:n templaattisekvenssin mukaisesti transkriptiossa. *Synechocystiksen* RNA-polymeraasin ydin (kuva 5) koostuu kahdesta α -alayksiköstä, β - sekä β' -alayksiköistä, γ -alayksiköstä ja ω -

alayksiköstä (Hasekorn ja Schneider 1988; Shen ja muut 2023). RNA-polymeraasi tarvitsee transkription aloitukseen varsinaisten ydinalayksiköiden lisäksi rakenteeseen viimeisenä liittyvän σ -faktorin (Imamura ja Asayama 2009; Srivastava ja muut 2020). σ -faktorit ovat ryhmä proteiinalayksiköitä, joiden tehtävänä on tunnistaa DNA:n promoottorialueita, joille RNA-polymeraasi voi kiinnittyä. σ -faktori osallistuu myös transkription aloituksessa DNA-juosteiden avaamiseen. *Synechocystiksellä* on yhteensä 9 erilaista σ -faktoria (SigA, SigB, SigC, SigD, SigE, SigF, SigG, SigH ja SigI).



Kuva 5: *Synechocystis* sp. PCC 6803:n RNA-polymeraasin rakenne. Rakenne koostuu dimeerisestä α -alayksiköstä (pinkki), β -alayksiköstä (vihreä), β' -alayksiköstä (vaaleansininen), γ -alayksiköstä (tummansininen), ω -alayksiköstä (punainen), sekä rakenteeseen liittyvästä σ -faktorista (keltainen, kuvassa SigA). Muokattu kuvasta Shen ja muut 2023.

Primäärinen (ryhmän 1) σ -faktori SigA on vastuussa solun välttämättömien toimintojen ylläpitoon tarvittavien geenien, kuten fotosysteemi (PS-) kompleksien, ilmenemisestä (Tuominen ja muut 2003, Imamura ja muut 2003). SigA on solulle välttämätön σ -faktori. Sekundaaristen σ -faktorien ryhmään 2 kuuluu SigB, SigC, SigD ja SigE, jotka parantavat solujen sopeutumista ja sietokykyä muuttuviin olosuhteisiin (Antal ja muut 2016).

Stressiolosuhteissa, kuten valoisuuden muutoksissa RNA-polymeraasiin sitoutuneen SigA:n määrä vähenee ja ryhmän 2 σ -faktorien määrä lisääntyy huomattavasti. SigB:n aktivoimien geenien on todettu vastaavan sopeutumisesta lämpö- ja valostressiin (Tuominen ja muut 2005; Summerfield ja Sherman 2007), typenpuutteeseen (Antal ja muut 2016) sekä suolapitoiseen ympäristöön (Nikkinen ja muut 2012). SigC:n aktivoimien geenien on todettu osallistuvan

solupopulaation kasvun stationääriseen vaiheeseen sopeutumiseen hidastamalla solun energiantuottoa sekä jakautumisaktiivisuutta (Asayama ja muut 2004; Kurkela ja muut 2025, käsikirjoitus). Lisäksi SigC on välttämätön kuumaan sopeutumiseen (Tuominen ja muut 2008). SigD:n aktivoimien geenien on todettu vastaavan reaktiivisten happilajien neutraloinnista (Li ja muut 2004) sekä typenpuutteeseen sopeutumisesta (Antal ja muut 2016). SigE:n geenien on todettu vaikuttavan typpimetabolian säätelyyn (Osanai ja muut 2006) sekä hiilihydraattien kataboliaan (Osanai ja muut 2011). Transkription säätelijä 6S-RNA:n on todettu sitoutuvan SigA-RNA-polymeraasiin ja tämän kautta säätelevän ryhmän 2 σ -faktorien geenien ilmenemistä (Heilmann ja muut 2017). Typenpuutteesta toipumisessa 6S-RNA helpottaa SigA:n sitoutumista RNA-polymeraasiin nopeuttaen solun normaalien toimintojen palautumista.

σ -faktorien ryhmään 3 kuuluvat SigF ja SigH. SigF:n geenien on osoitettu säätelevän pilusten muodostusta (Bhaya ja muut 1999) sekä proteiinien erityksen säätelyä ja suolastressin signaloinnin säätelyproteiineja (Flores ja muut 2018). SigH:n on todettu säätelevän lämpöshokkiin reagointia (Huckauf ja muut 2000). Ryhmän 4 σ -faktoreista (SigG ja SigI) ei tiedetä juuri mitään, mutta SigG:n on todettu olevan välttämätön solujen selviytymisen kannalta (Huckauf ja muut 2000). SigI:n on geenien ilmenemisen perusteella ehdotettu olevan kylmään sopeutumiselle merkittävä σ -faktori (Srivastava ja muut 2020).

1.3.2 ω -alayksikkö ja *Synechocystis* Δ rpoZ-kanta

RNA-polymeraasin ω -alayksikkö on pienikokoinen proteiini (kuva 5), joka löytyy bakteereista sekä joistakin levistä (Gunnelius ja muut 2014a); aitotumallisilla lajeilla on ω -alayksikön homologi. RNA-polymeraasin kaikki alayksiköt ω -alayksikköä lukuunottamatta ovat välttämättömiä polymeraasin toiminnalle (Gunnelius ja muut 2014a). *rpoZ*-geenin koodaama ω -alayksikön rooli RNA-polymeraasissa liittyy σ -faktorien kiinnittymiseen (Kurkela ja muut 2021). *Synechocystiksestä* on tehty Δ rpoZ -mutantti, jolla ω -alayksikön geeniekspressio on estetty liittämällä *rpoZ* -sekvenssin keskelle kanamysiiniresistenssigeeni (Gunnelius ja muut 2014a). Mutanttikanta kasvaa hyvin pienellä erotuksella hitaammin kuin alkuperäinen kanta. Tavallisissa kasvatusolosuhteissa (32 °C, ilman CO₂-pitoisuus sekä 40 μ mol fotoneja/m²/s:n jatkuva valaistus) Δ rpoZ:n geeniekspressiossa on kuitenkin eroja villityypin kantaan. Δ rpoZ-kanta on myös kykenemätön kasvamaan 40 °C:n lämpötilassa (Gunnelius ja muut 2014b) tai 3 %:n CO₂-pitoisuudessa (Kurkela ja muut 2017). Jälkimmäisessä koeolosuhteessa havaittiin Δ rpoZ-solujen räjähtävän, jonka osoitettiin

johtuvan puutteellisen soluseinäsynteesin vaikutuksesta solurakenteen vahvuuteen (Kurkela ja muut 2025, käsikirjoitus). Δ rpoZ-kannan typpimetabolian geenit myös ilmenevät vähemmän normaalioloissa verrattuna villityyppiin. Kasvua hidastavaa SigC:tä on myös havaittu Δ rpoZ-kannan RNA-polymeraasissa tavallista enemmän korkeassa hiilidioksidissa, joka myös hankaloittaa sopeutumista (Kurkela ja muut 2025, käsikirjoitus).

1.4 Työn tarkoitus

Aikaisempi tutkimus on osoittanut, että ω -alaysiköllä on vaikutus *Synechocystiksen* geeniekspressioon ja sopeutumiskykyyn. *Synechocystiksen* hiilimetabolian säätely on vahvasti sidoksissa typpimetabolian säätelyyn. Koska Δ rpoZ-kannan typpimetabolian geeniekspressio ja korkean CO₂-pitoisuuden sietokyky poikkeavat normaalista kannasta, on syytä tutkia puutteellisen ω -alaysikön vaikutuksia myös typenpuutostilaan sopeutumisessa.

Tämän tutkielman tarkoitus oli selvittää, vaikuttaako *Synechocystiksen* RNA-polymeraasin ω -alaysikön puuttuminen typenpuutteeseen sopeutumiseen. Asiaa tutkittiin fotosynteesiaktiivisuuden sekä fotosynteesigeenien proteiinikompleksien ja mRNA-transkriptien kautta. Tuloksia vertailtiin glukoositoleranttiin *Synechocystis* GT-T-kantaan (Koskinen ja muut 2023), jonka pohjalta Δ rpoZ-kanta oli tuotettu. Sekä elektronin vastaanottajista riippuvaa, että PSII:n tehokkuudesta riippuvaa fotosynteesiaktiivisuutta mitattiin happielektrodin avulla. Proteiinien ilmenemistä tutkittiin western blot-tekniikan avulla ja transkriptiota tutkittiin reaaliaikaisella kvantitatiivisella polymeraasiketjureaktiolla (RT-qPCR).

2 Materiaalit ja menetelmät

2.1 Solukannat, kasvatusolosuhteet ja typenpuute

Koeorganismina käytettiin *Synechocystis* sp. PCC 6083 syanobakteeria, jonka kannat olivat kontrollikantana käytetty glukoositolerantti GT-T (Williams 1988; Koskinen ja muut 2023) sekä GT-T-kannasta tehty $\Delta rpoZ$ -mutantti, jonka RNA-polymeraasista puuttuu ω -alayyksikkö. $\Delta rpoZ$ -kanta oli tuotettu siirtämällä kanamysiiniresistenssigeeni vastakkaiseen lukusuuntaan keskelle *rpoZ*-geenin sekvenssiä (Gunnelius ja muut 2014a).

Kasvatusolosuhteina käytettiin 32 °C:n lämpötilaa, ilman CO₂-pitoisuutta, 40 μmol fotoneja/m²/s:n fotosynteettisen valovuon tiheyttä (PPFD) (lamput Osram/Phillips; värit 865 ja 840), sekä nestekasvatuksissa lisäksi 90 rpm:n ravistelua. Kasvatukseen käytettiin BG-11:a (pH 7,5; säädetty hepes-NaOH:lla; tyypipitoisuus 149,6 mg/l; typenlähteenä NaNO₃) sekä ylläpitomaljoilla, että nesteenä 100 ml:n erlenmeyer-pulloissa. $\Delta rpoZ$ -kannan maljakasvatuksissa käytettiin 50 μM kanamysiiniä antibioottiselektiona. $\Delta rpoZ$ -solut otettiin pakastetuista varastosoluista maljalle.

Nestekasvatukset laitettiin typenpuutteeseen siten, että solut sentrifugoitiin 5300 x g 7 min, jonka jälkeen supernatantti poistettiin ja solusakka resuspenoitettiin typettömään BG-11:a. Tämä pesu tehtiin 3 kertaa, jonka jälkeen resuspenoiduista soluista valmistettiin typettömään BG-11:a 30 ml nestekasvatukset (RT-qPCR-kokeissa 35 ml). Jokaista koetta varten kerättiin solunäytteitä typenpuutteen eri vaiheista, sekä normaalista kasvuolosuhteista.

2.2 Fotosynteettisen aktiivisuuden mittaus happielektrodilla

2.2.1 Solujen kasvatus

Happielektrodimittauksia varten soluja kasvatettiin ensin n. 5 päivää maljalla, josta solut siirrettiin nestekasvatukseen. Nestekasvatus aloitettiin spektrofotometrin 730 nm:n aallonpituudesta mitatun optisen tiheyden (OD₇₃₀) arvosta 0,06 ja solujen annettiin kasvaa arvoon ~1. Tämän jälkeen kasvatuksista otettiin standardiolosuhteiden näyte (5 ml) ja loput solut laitettiin typenpuutteeseen (OD₇₃₀=0,6). Kasvatuksista otettiin kolme 5 ml:n näytettä 4, 8, 24 ja 50 tunnin (fotosynteettisen elektroninsiirron aktiivisuusmittaus) sekä 4, 23 ja 48 tunnin (PSII:n aktiivisuusmittaus) jälkeen typenpuutteenkasvatuksen aloituksesta. Näytteiden ottohetkellä kasvatuksen OD₇₃₀-arvo mitattiin.

2.2.2 Hapentuottomittaukset

Happielektrodi (Hansatech) kalibroitiin mittaamalla veden happipitoisuus ennen ja jälkeen happea sitovan natriumditioniitin lisäystä. Kalibraatiokäyrän ääripäiden välistä etäisyyttä käytettiin hapentuoton laskukaavassa. Hapentuottomittauksessa happielektrodin näytekammioon pipetoitiin 1 ml soluja. Mittauksissa soluja valaistiin saturoivalla valolla (PPFD oli $\sim 2100 \mu\text{mol fotoneja/m}^2/\text{s}$) ja näytekammio pidettiin $32 \text{ }^\circ\text{C}$:n lämpöisenä sen ympäri virtaavan lämpimän veden avulla ja näytettä sekoitettiin mittausten aikana.

Fotosynteettisen elektroninsiirron mittaamisessa näytekammioon lisättiin solujen lisäksi natriumbikarbonaattia (NaHCO_3) $10 \mu\text{M}$:n pitoisuuteen. Ennen mittaamisen aloitusta solujen annettiin olla saturoivassa valossa n. 2 min, jonka jälkeen hapentuottoa mitattiin n. 3 min piirturin avulla, johon elektrodin saama signaali johdettiin. Mitatun tuottokäyrän kulmakerroin laskettiin manuaalisesti viivoitinta käyttäen. Hapentuotto laskettiin kaavalla 1.

$$\frac{\text{tuottokäyrän kulmakerroin (cm/min)}}{\text{kalibraatio-suoran pituus (cm)}} * \frac{\text{veden happipitoisuus } \left(\mu\frac{\text{mol}}{\text{ml}}\right)}{OD_{730}} * 60 \text{ min/h} \quad (1)$$

PSII-aktiivisuuden mittauksissa näytteisiin lisättiin $0,5 \mu\text{M}$ 2,6-Dikloro-1,4-bentsokinonia (DCBQ) sekä $0,5 \mu\text{M}$ ammoniumferrosyanidia (FeCy). DCBQ vastaanottaa elektroneja plastokinolilta ja luovuttaa niitä FeCy :lle Ennen mittaamisen aloittamista näytekammio pimennettiin peittämällä se kankaalla. PSII-aktiivisuutta mitattiin n. 2 min pimeässä sekä n. 2 min saturoivassa valossa (PPFD oli $\sim 2100 \mu\text{mol fotoneja/m}^2/\text{s}$). PSII-mittaustuloksen kulmakertoimen arvosta vähennettiin pimeässä mitattu soluhengityksen kulmakerroin, jolloin saatua arvoa käytettiin kaavan 1 tuottokäyrän kulmakertoimena.

2.3 Proteiinien tutkimus western blot-tekniikalla

2.3.1 Solujen kasvatusta

Western blot-kokeita varten soluja kasvatettiin 5 päivää maljalla sekä nesteessä.

Nestekasvatus aloitettiin OD_{730} -arvosta 0,06. Solut laitettiin typenpuutteeseen, kun nestekasvatuksen OD_{730} oli ~ 1 . Typenpuute aloitettiin säätämällä resuspentoitujen solujen OD_{730} arvoon $\sim 0,8$. Solut kerättiin 4, 7 ja 24 tunnin typenpuutteen jälkeen sentrifugoimalla ne $5300 \times g$ 5 min, jonka jälkeen supernatantti poistettiin ja solusakka jäädytettiin nestetyypellä sekä säilöttiin $-20 \text{ }^\circ\text{C}$:n. Jokaista aikapistettä kohden oli oma 30 ml:n kasvatuksensa. Standardiolojen näyte kerättiin typenpuutteen aloituksen yhteydessä.

2.3.2 Proteiinien eristys ja pitoisuuden määrittäminen

Western blot -koetta varten tehdyistä solusakasta eristettiin totaaliproteiini (kolme biologista toistoa GT-T- ja Δ rhoZ-kantojen kasvusta typenpuutteessa 0, 4, 7 ja 24 tunnin ajalta). Solut suspentoitiin 600 μ l STNE-puskuriin (10 mM pH 8,0 Tris-HCl; 400 mM sakkaroosi, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA) ja niitä sentrifugoitiin 1 min 18400 x g 4 °C:n lämpötilassa. Supernatantti poistettiin ja solusakka suspentoitiin 180 μ l STNE-puskuriin. Solut rikottiin lisäämällä näytteisiin lasikuulia (Sigma Aldrich) ja vorteksoimalla kolme kertaa 2 min. Näytteitä pidettiin jäällä noin 6 min vorteksointien välillä. Tämän jälkeen näytteitä sentrifugoitiin kahdesti 600 x g 4 min 4 °C:n lämpötilassa. Molempien sentrifugointien jälkeen supernatanttiin jääneet proteiinit kerättiin talteen. Totaaliproteiininäytteiden pitoisuus määritettiin sekä Lowryn menetelmällä, että BioDrop-laitteella.

2.3.3 Western blot-menetelmä

Totaaliproteiinista määritettiin PSI:n PsaB:n, PSII:n CP43:n, fykobilisomin fykosyaniinin (R-PC) sekä APC:n, ATP-syntaasin AtpB:n ja NDH1:n NdhH proteiinien määrää.

Totaaliproteiinista valmistettiin 20 μ l:n SDS-PAGE-geelijaonäytteet, jotka pipetoitiin kaivoihin kokonaisuudessaan. Näytteiden proteiinimäärä oli fykobilisomiproteiinien määrittämisessä 1,6 μ g, CP43:n määrittämisessä 5 μ g, PsaB:n määrittämisessä 7 μ g ja NdhH:n sekä AtpB:n määrittämisessä 15 μ g. Geelijaonäytteet sisälsivät proteiinilaimennosten lisäksi Laemmli-latauspuskuria (valmiissa ajonäytteessä 10 % glyserolia, 2 % natriumdodekyylisulfaattia (SDS), 5 % merkaptoetanolia, 1 % bromofenolisinistä ja 62,5 mM tris-emästä). Näytteitä inkuboitiin 75 °C:ssa 10 min, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin 2 min 13500 x g. BioRad:n mini protean TGX 4-15 %:n gradienttigelille pipetoitiin näytteiden lisäksi myös 5 μ l Dual color- sekä 1 μ l Magic mark- proteiinimarkkeria. Elektroforeesin ajoliuos sisälsi 25 mM Tris:a, 192 mM glysiiniä sekä 1% SDS. Geeliä ajettiin BioRad:n mini-PROTEAN tetra cell -ajolaitteella 200 V:n jännitteellä n. 30 min.

Geielektroforeesin jälkeen proteiinit siirrettiin polyvinylideenifluoridi-membraanille (Millipore). Membraani aktivoitiin 100 % metanolilla. Blottauspaperit, geelit ja membraanit kasteltiin siirtopuskurilla, joka sisälsi 48 mM Tris:a, 39 mM glysiiniä, 0,0375 % SDS:a ja 20 % metanolia. Membraani ja geeli laitettiin blottauspaperien väliin, jonka jälkeen proteiineja siirrostettiin BioRad:n Transblot-siirrostuslaitteella 65 min. Siirrostukseen käytetty

sähkövirran voimakkuus laskettiin kaavalla: $I=A*0,9$, jossa I=sähkövirta ja A= membraanin pinta-ala.

Siirrostetut membraanit huuhdeltiin Tris-puskuroidulla suolaliuoksella (TBS; 300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5). Membraaneja blokattiin tunnin ajan TBS-puskurissa, johon oli lisätty 5 % maitojauhetta, jonka jälkeen ne huuhdeltiin kahdesti 0,05 % Tween-20:a sisältävällä TBS-puskurilla (TTBS). Tämän jälkeen membraaneja käsiteltiin kohdeproteiiniin sitoutuvassa primäärisessä vasta-aineessa (Agrisera) n. vuorokausi. Primääriset vasta-aineet valmistettiin 1 % maitojauhetta sisältävään TTBS-liuokseen ja vasta-ainepitoisuudet olivat 1:3000 (anti-R-PC, AS08 278), 1:5000 (anti-APC, AS08 277; anti-AtpB, AS03 030; anti-PsaB, AS10 695; ja anti-NdhH, AS16 4065), 1:6000 (anti-CP43, AS11 1787). Vasta-aineinkubaation jälkeen membraaneja pestiin 3 kertaa 5 min TTBS:llä, jonka jälkeen niitä inkuboitiin sekundäärisessä vasta-aineessa (Anti-rabbit IgG(H+L), Invitrogen, OR 97402) 2 tuntia. Sekundäärinen vasta-aine valmistettiin 1 % maitojauhetta sisältävään TTBS:ään ja vasta-ainepitoisuus oli 1:50000. Sekundäärisen vasta-aineinkubaation jälkeen membraania pestiin ensin 3 kertaa TTBS:llä 5 min, sitten 2 kertaa TBS:llä 2 min ja lopuksi 5 min 0,1 M Tris-HCl-puskurissa (pH 9,5). Tämän jälkeen membraania inkuboitiin 5 min Novox-kemiluminesenssiluoksessa (Invitrogen). Inkuboidut membraanit suljettiin muovikääreeseen kehitystä varten. Membraani valotettiin röntgenfilmille (Fujifilm), jota kehitettiin kehiteliuoksessa (Afga G150) n. 2 min, jonka jälkeen se huuhdeltiin vedellä ja fiksausliuoksella (Afga G354) n. 30 s.

2.4 mRNA:n kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR

2.4.1 Solujen kasvatus

RT-qPCR-kokeita varten soluja kasvatettiin 5 päivää maljalla, josta ne siirrettiin nestekasvatukseen. 35 ml:n nestekasvatus aloitettiin OD_{730} -arvosta 0,2 ja päätettiin arvoon ~1. Kasvatukset jaettiin kahtia (OD_{730} ~0,5) ja annettiin taas kasvaa ~1:n arvoon. Typenpuute aloitettiin säätämällä resuspentoidut solut OD_{730} -arvoon ~0,7. Kasvatuksista kerättiin 4, 7 ja 24 tunnin typenpuutteen jälkeen 8 ml:n näyte, joka sentrifugoitiin $3900 \times g$ 7 min, jonka jälkeen supernatantti poistettiin ja solusakka jäädytettiin nestetypellä sekä säilöttiin $-20 \text{ }^\circ\text{C}$:n. Standardioloista kerättiin 10 ml:n näyte. Jokaisesta aikapisteestä mitattiin OD_{730} .

2.4.2 RNA:n eristys

RT qPCR:ta varten valmistetut solunäytteet suspensoitiin 1 ml resuspensiopuskuriin (0,3 M sakkaroosia, 10 mM natriumasetaattia pH 4,5 ja 60 mM natrium-EDTA:ta pH 8.0) ja näyte jaettiin kahtia. Näytteitä sentrifugoitiin 1 min 14000 x g huoneenlämmössä. Supernatantti poistettiin ja sakka resuspentoitiin 250 µl:n jääkylmää resuspensiopuskuria sekä 375 µl:n lyysispuskuria (2 % SDS:a, 10 mM natriumasetaattia pH 4,5).

Näytteitä uutettiin fenoli-kloroformiliuoksella (1:1), jota lisättiin näytetilavuuden verran. Uutto tehtiin inkuboimalla vorteksoituja näytteitä 3 min 60 °C:ssa ja sentrifugoimalla 5 min 14000 x g huoneenlämmössä. Ylempi nestefaasi kerättiin talteen ja uutto toistettiin vielä kahteen kertaan ilman kuumakäsittelyä. Tämän jälkeen näytteeseen lisättiin sen tilavuuden verran 100 %:sta kloroformia. Näytteet vorteksoitiin ja sentrifugoitiin 2 min 14000 x g huoneenlämmössä. Ylempi nestefaasi otettiin talteen. RNA saostettiin lisäämällä näytteisiin jääkylmää 100 %:sta etanolia 67,6 %:n lopulliseen pitoisuuteen sekä jääkylmää litiumkloridia 54 mM:n pitoisuuteen. RNA:n annettiin saostua -20 °C:ssa noin vuorokausi.

Tämän jälkeen RNA kerättiin sentrifugoimalla näytteitä 20 min 18000 x g 4 °C:ssa.

Supernatantti poistettiin ja RNA-sakka pestiin lisäämällä näyteputkeen 70 %:sta etanolia ja vorteksoimalla sekä sentrifugoimalla 10 min 18000 x g 4 °C:ssa. Supernatantti poistettiin ja RNA ilmakeivattiin huoneenlämmössä. Sakka resuspentoitiin 35 µl MilliQ-veteen ja kasvatusvaiheessa sekä eristyksen alussa kahtia jaetut näytteet yhdistettiin samaan näyteputkeen. RNA-näytteille tehtiin DNAasikäsittely Thermo Fischer Scientificin Turbo DNA Free -kitillä valmistajan ohjeen mukaan. Näytteiden RNA-pitoisuus mitattiin tämän jälkeen BioDrop-laitteella.

2.4.3 cDNA-synteesi ja RT qPCR

1 µg RNA:sta syntetisoitiin cDNA:ta käänteiskopioijaentsyymien avulla käyttäen Biorad:n iScript cDNA synthesis kittiä valmistajan ohjeita seuraten. Synteesissä valmistettiin myös negatiivinen kontrolli, joka ei sisältänyt käänteiskopioijaentsyymiä (-RT). cDNA synteesiin käytetyt ajat ja lämpötilat on koottu taulukkoon 1. Synteesi tehtiin BioRad T100 Thermal Cycler -laitteella. Synteesin jälkeen cDNA laimennettiin 1:5 ja säilöttiin -20 °C:een.

Taulukko 1: cDNA-synteesiin käytetty ajo-ohjelma.

cDNA-synteesi	Lämpötila (°C)	Kesto (min)
Kiinnittymisvaihe	25	5
Synteesivaihe	72	20
käänteiskopioijan inaktivaatio	95	1
PCR:n lopetus	4	∞

qPCR:llä mitattiin *atpB*:n, *ndhH*:n, *apcB*:n, *cpcA*:n ja *psbC*:n mRNA:n määrää.

Referenssigeeninä käytettiin *rnpB*:tä. Alukkeiden sekvenssit näkyvät taulukossa 2. cDNA:sta ja -RT-kontrollista tehtiin 2 teknistä toistoa jokaiselle alukeparille. qPCR-kokeissa käytettiin vain yhtä biologista toistoa. Leima-aineena käytettiin BioRad:n iQ SYBR Green:iä. 25 µl:n näytteessä alukkeita oli 0,5 µM ja 5 µl cDNA:ta. PCR tehtiin BioRad:n iQ5 PCR-laitteella käyttäen taulukon 3 ajo-ohjelmaa. Ajossa mitattiin myös sulamiskäyrä PCR-sykliden jälkeen ennen viimeistä 4 °C:en vaihetta.

Taulukko 2: qPCR:n käytettyjen alukkeiden sekvenssit.

Alukkeen kohdegeeni	Forward-sekvenssi:	Reverse-sekvenssi:
<i>psbC</i>	5'-AGGTGAAGGCTTGGGATTGG-3'	5'-ACAGCTTGGGTGCTTTGTCT-3'
<i>atpB</i>	5'-CGGCTAAAGTGGCAAACACC-3'	5'-AACATCCTTGC GGACGAGTT-3'
<i>ndhH</i>	5'-GGGCCAAACTCCCTTCTTT-3'	5'-AGGGCAAATCCACAGCTACC-3'
<i>cpcA</i>	5'-GCTTGGGCAGCACCATTAC-3'	5'-GCTTTCGGTCGTCTACGTCA-3'
<i>apcB</i>	5'-CCAGTGTAATCAGCGCCAAC-3'	5'-GACGTCGGAGTACAACAGGG-3'
<i>rnpB</i>	5'-GTGAGGACAGTGCCACAGAA-3'	5'-CCTTGCACCCTTACCCTT-3'

Taulukko 3: qPCR:n käytetty ajo-ohjelma.

qPCR-ajo	Lämpötila (°C)	Kesto (s)	Syklimäärä
Ensimmäinen denaturaatio	95	180	1
Toistuva denaturaatio	95	10	40
Kiinnittymisvaihe	57	30	
DNA-synteesi	72	20	
PCR:n lopetus	4	∞	1

PCR-ajon taulukoimia kynnysarvoja käyttämällä laskettiin kantojen välinen RNA-pitoisuuden ero käyttäen kaavaa 2, jossa CS on vertailtava kontrollikanta ja CT on kynnysyykli.

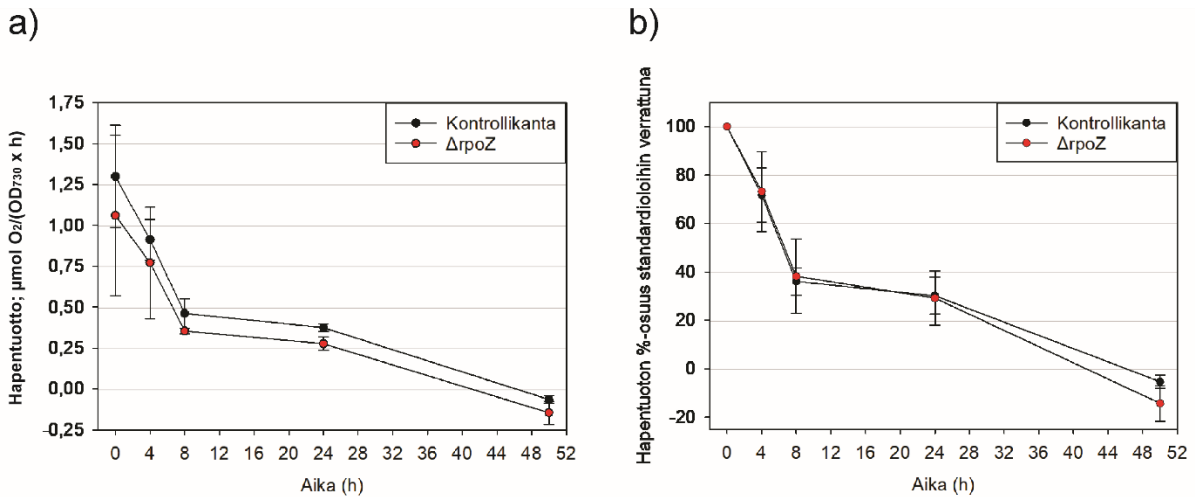
$$\log_2\{2^{[CT(CS\ geeni)-CT(CS\ referenssi)]-[CT(\Delta rpoZ\ geeni)-CT(\Delta rpoZ\ referenssi)]}\} \quad (2)$$

3 Tulokset

3.1 Happielektrodikokeet

3.1.1 Fotosynteesiaktiivisuus Δ rpoZ:lla ei eroa kontrollikannasta

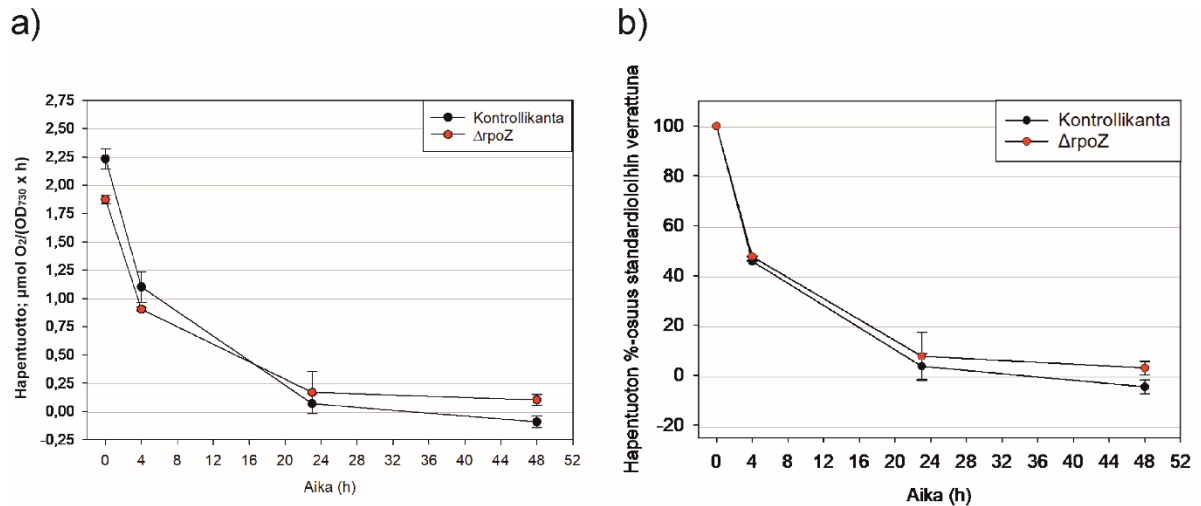
Synechocystis Δ rpoZ-kannan sopeutumista typenpuutteeseen lähdettiin selvittämään, sillä kannan typpimetabolian geeniekspressiossa oli havaittu poikkeavuuksia normaaliolosuhteissa. GT-T-kontrollikannan ja Δ rpoZ-kannan fotosynteesiaktiivisuutta typenpuutteen ensimmäisen kahden päivän ajalta mitattiin hapen tuottonopeuden kautta happielektrodilla tarkoituksena selvittää, muuttuuko fotosynteesimekanismien sopeutuminen typenpuutetilaaan, kun solulta puuttuu RNA-polymeraasin ω -alaysikkö. Solunäytteisiin lisättiin 10 μ M NaHCO₃:a ja näytettä valaistiin saturoivalla valoa (valovuon tiheys on \sim 2100 μ mol fotoneja/m²/s), jotta PS-kompleksien tehokkuus olisi maksimissa, ja jotta CO₂ ei olisi toimintaa rajoittava tekijä. Mittauksissa havaitaan *Synechocystiksen* nopea reagointi typenpuutteeseen hapen tuottonopeuden laskuna (kuva 6). Molemmilla kannoilla fotosynteettinen aktiivisuus vähenee noin 70 %:iin 4 tunnin jälkeen ja alle 40 %:iin 8 tunnin jälkeen standardioloihin verrattuna. Mielenkiintoisena havaintona fotosynteettisen aktiivisuuden muutos 8 ja 24 tunnin aikavälillä on hyvin vähäistä. Kahden päivän jälkeen molempien kantojen hapenkulutus on suurempaa, kuin sen tuotto [kulutus kontrollikannalla 0,06 μ mol O₂/(OD₇₃₀ x h) ja Δ rpoZ-kannalla 0,14 μ mol O₂/(OD₇₃₀ x h)]. 8 ja 24 tunnin välillä aktiivisuuden muutos on hyvin vähäistä molemmilla kannoilla. Muutosnopeudessa ei kantojen välillä ole eroa.



Kuva 6: *Synechocystisen* hapentuotto typenpuutteessa kontrollikannalla sekä ΔrpoZ :lla. Hapentuottoa mitattiin Clark-tyypin elektrodilla. Mittausaikapisteet olivat 0h, 4h, 8h, 24h ja 50h. Tuotto mitattiin 1 ml:n solunäytteestä 32 °C:n lämpötilassa, $\sim 2100 \mu\text{mol}$ fotoneja/m²/s:n saturoivassa valossa ja 10 μM :n NaHCO₃:ssa. a) Hapentuoton laskennallinen arvo [$\mu\text{mol O}_2/(\text{OD}_{730} \times \text{h})$]. Hapen tuoton ja kulutuksen netto 50 tunnin typenpuutteen jälkeen oli kontrollikannalla -0,06 ja ΔrpoZ -kannalla -0,14 tarkoittaen, että happea kuluu nopeammin, kuin sitä tuottuu. b) Hapentuoton %-osuus standardiolosuhteista.

3.1.2 PSII:n aktiivisuus laskee hyvin nopeasti typenpuutteessa

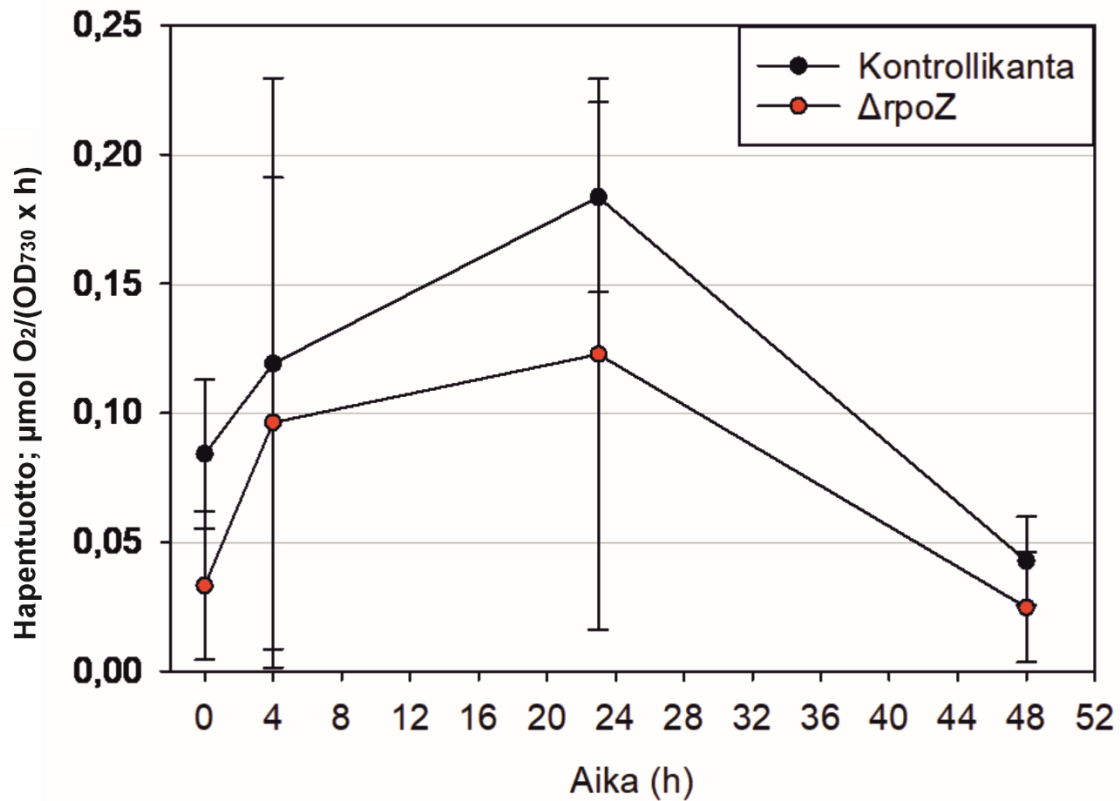
Myös PSII:n hapentuottoaktiivisuutta mitattiin happielektrodilla kahden päivän typenpuutteen aikavälillä. Mitattuun näytteeseen lisättiin elektronin vastaanottavaa kinonia ja näytettä valaistiin saturoivalla valolla ($\sim 2100 \mu\text{mol}$ fotoneja/m²/s), jotta PSII:n ulkopuoliset rajoitukset poistuvat. Mittauksissa havaitaan hapentuoton voimakas lasku typenpuutteen alkuvaiheessa (kuva 7). 4 tunnin jälkeen hapentuotto on n. 45 % standardioloihin verrattuna ja 23 tunnin jälkeen vain ~ 10 % standardiolosuhteiden arvosta. Kontrollikannan aktiivisuus on standardiolloissa hieman mutanttia korkeampi. Kahden päivän jälkeen hapen kulutus on kontrollikannalla tuottoa suurempi [nettokulutus 0,09 $\mu\text{mol O}_2/(\text{OD}_{730} \times \text{h})$]. ΔrpoZ -kannalla tuotto on kahden päivän jälkeen vielä hieman kulutusta korkeammalla [nettotuotto 0,10 $\mu\text{mol O}_2/(\text{OD}_{730} \times \text{h})$].



Kuva 7: *Synechocystis* PSII:n hapentuotto typenpuutteessa kontrollikannalla sekä ΔrpoZ:lla. Mittausaikapisteet olivat 0h, 4h, 23h ja 48h. Tuotto mitattiin 1 ml:n solunäytteestä 32 °C:n lämpötilassa ja ~2100 μmol fotoneja/m²/s:n saturoivassa valossa. Mitattavassa näytteessä oli myös 0,5 μM PSII:n elektronin vastaanottaja DCBQ:a ja 0,5 μM DCBQ:ta hapettavaa amoniumferrosyanidia. a) Hapentuoton laskennallinen arvo [μmol O₂/(OD₇₃₀ x h)]. Hapen tuoton ja kulutuksen netto 48 tunnin typenpuutteen jälkeen oli kontrollikannalla -0,09 ja ΔrpoZ-kannalla 0,10 tarkoittaen, että kontrollikanta kuluttaa hieman enemmän happea, kuin sitä tuottuu. Samalla ΔrpoZ-kannan tuotto on hieman kulutusta korkeammalla. b) Hapentuoton %-osuus standardiolosuhteista.

3.1.3 Soluhengitys vaihtelee suuresti typenpuutteessa

PSII-mittausten yhteydessä otettiin myös pimeämittaus PSII:n aktiivisuuden sammuttamiseksi ennen hapentuoton mittausta. Pimeämittauksista havaittiin mahdollinen lievä hapenkulutuksen kasvu typenpuutetilän edetessä (kuva 8). Molemmat kannat saattavat lisätä hapen kulutusta ensimmäisen 24 tunnin aikana, jonka jälkeen kulutus romahtaa. Hapenkulutuksessa oli kuitenkin suurta vaihtelua sekä biologisten, että teknisten toistojen välillä johtaen suuriin keskivirhearvoihin. Keskimäärin kontrollikannalla hapen kulutusta esiintyi hieman enemmän verrattuna mutanttikantaan. Erot ovat silti pienet. Pimeämittaukset selittävät myös PSII-mittauksista (kuva 7) havaitun eron 48 tunnin kohdalla, jossa kontrollikannan kulutus havaittiin tuottoa suuremmaksi.



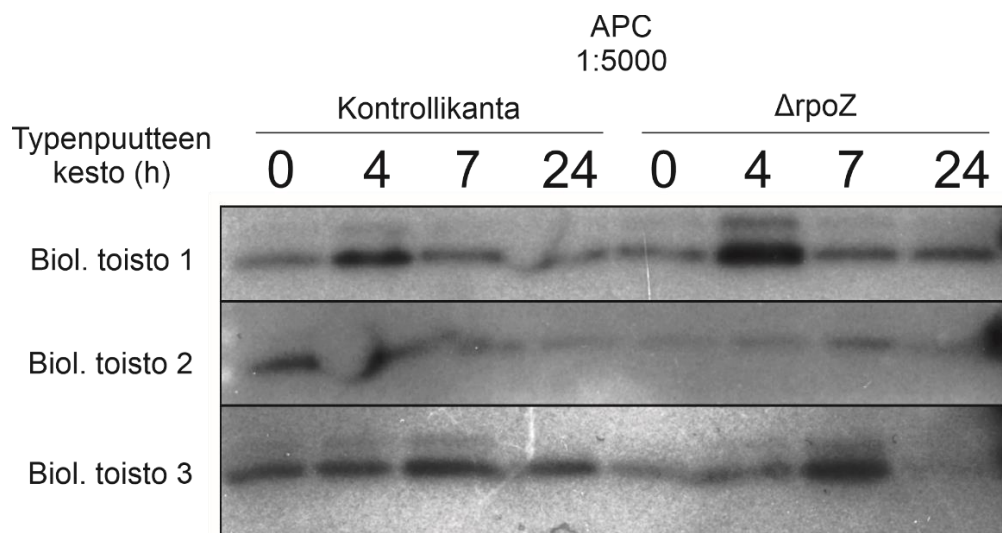
Kuva 8: Pimeässä mitattu *Synechocystis* hapenkulutus typenpuutteessa kontrollikannalla sekä $\Delta rpoZ$:lla. Mittausaikapisteet olivat 0h, 4h, 23h ja 48h. Kulutus mitattiin 32 °C:ssa 1 ml:n näytteestä, johon oli lisätty 0,5 μ M DCBQ:a ja 0,5 μ M ammoniumferrosyanidia.

3.2 Proteiinimäärien vertailu western blot-menetelmällä

3.2.1 Fykobilisomin hajoaminen havaitaan vasta 24 tunnin typenpuutteessa

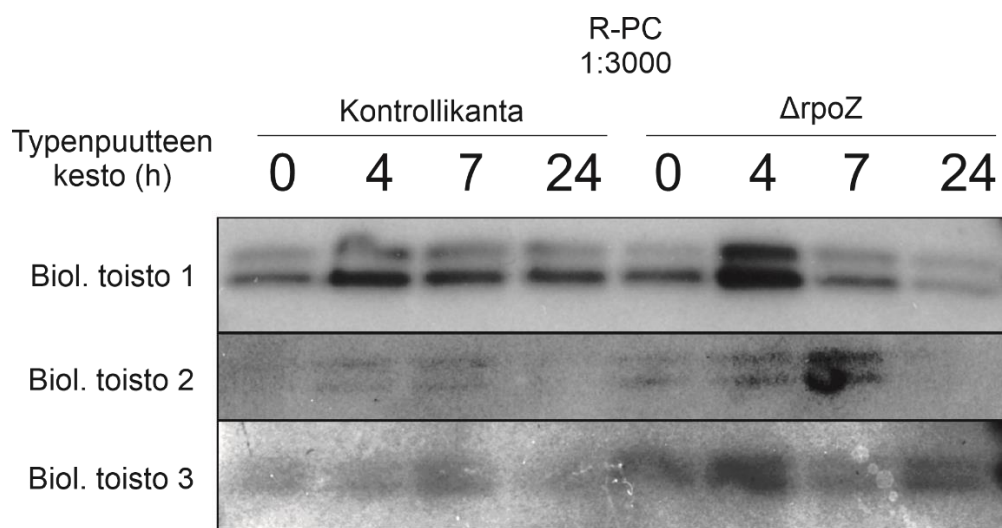
Happielektrodin mittaustuloksista (kuva 6 ja kuva 7) havaitun fotosynteesiaktiivisuuden nopean laskun vuoksi tutkittiin fotosynteesiin liittyvien proteiinien ilmenemistä. Valoenergiaa keräävän fykobilisomiproteiinin tiedetään hajoavan typenpuutteessa, jonka vuoksi lähdettiin selvittämään, että eroaako $\Delta rpoZ$ -kannan fykobilisomin hajoaminen GT-T-kannasta.

Fykobilisomiproteiinien määrää mitattiin 4, 7 ja 24 tunnin typenpuutteesta sekä kontrolliolosuhteista western blot -menetelmällä. *Synechocystis* GT-T- ja $\Delta rpoZ$ -kannoille tehtiin 3 biologista toistoa. Fykobilisomin ydinproteiini APC:n määrä standardiolosuhteissa vaikuttaa vähäisemmältä kuin typenpuutteen alussa (kuva 9). Biologiset toistot eroavat toisistaan jonkin verran, mutta kantojen välillä ei vaikuta olevan eroja. Ottaen huomioon kaikki toistot, vaikuttaa siltä, että APC ei 24 tunnin aikana ehdi hajoamaan.



Kuva 9: Allofykosyaninin (APC) määrä 0, 4, 7 ja 24 tunnin typenpuutteessa kontrollikannalla sekä Δ rhoZ:lla. Vasta-ainekonsentraatio oli 1:5000 ja SDS-PAGE-geelillä ajettu näyte sisälsi 1,6 μ g totaaliproteiinia.

Fykobilisomin antennirakenteen proteiini R-PC:n tulokset olivat osiltaan samankaltaisia kuin APC:n (kuva 10), mutta 24 tunnin näytteessä vaikuttaisi tapahtuneen hajoamista molemmilla kannoilla. R-PC:n määrä vaikuttaa standardioloissa vähäiseltä suhteessa 4 tunnin typenpuutteeseen molemmilla kannoilla, kuten havaittiin myös APC:lla (kuva 9). Sekä APC-että R-PC-membraaneja yritettiin Coomassie-värjätä, mutta ladatun proteiinin määrä oli menetelmän havaitsemisrajan alapuolella.

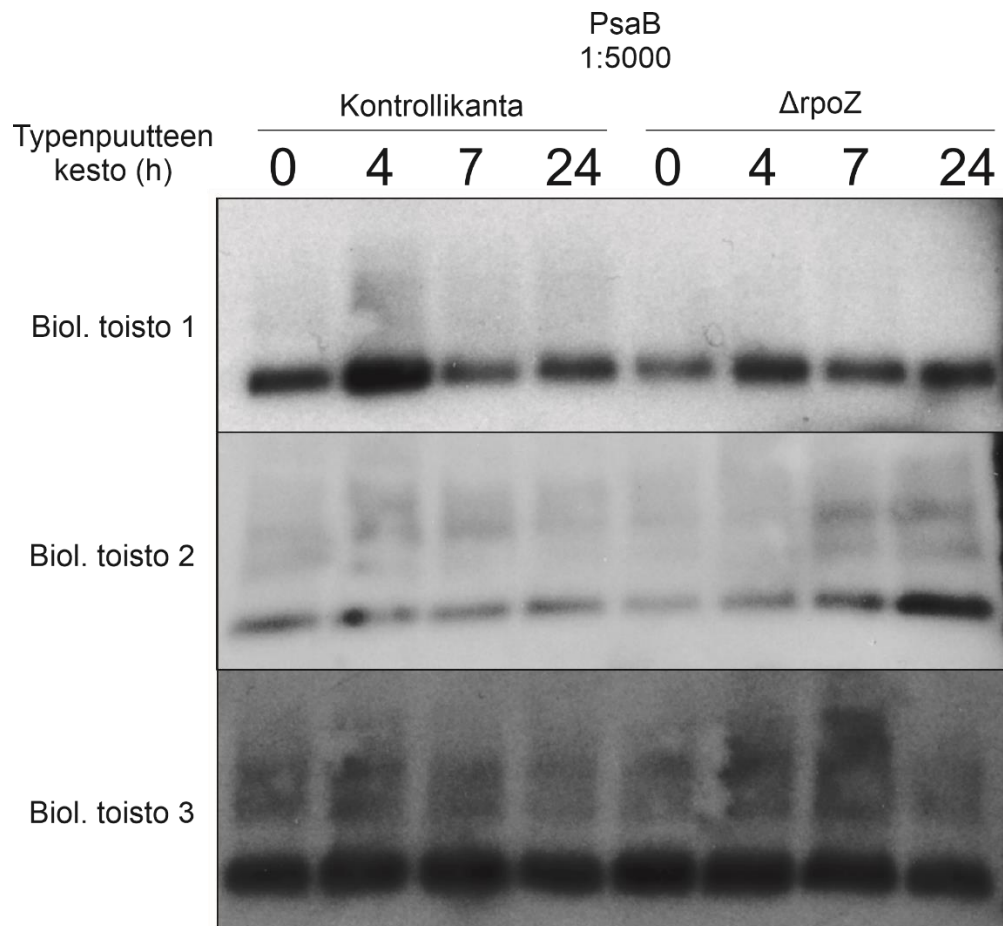


Kuva 10: R-fykosyaninin (R-PC) määrä 0, 4, 7 ja 24 tunnin typenpuutteessa kontrollikannalla sekä Δ rhoZ:lla. Vasta-ainekonsentraatio oli 1:3000 ja SDS-PAGE-geelillä ajettu näyte sisälsi 1,6 μ g totaaliproteiinia.

3.2.2 PS-kompleksit eivät hajoa typenpuutteen alussa

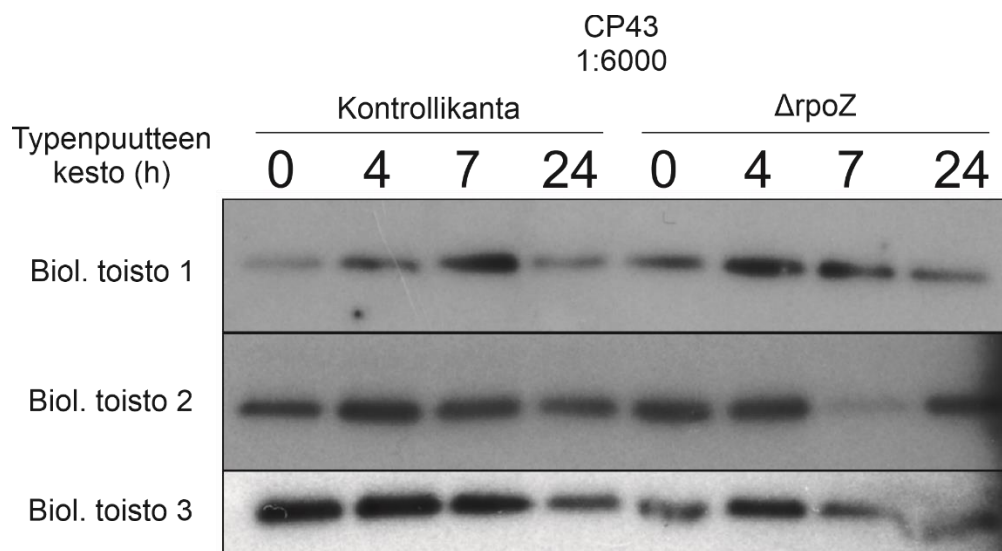
Fykobilisomin lisäksi tutkittiin PS-kompleksien ilmenemistä typenpuutteessa mittaamalla PSI:n PsaB-alayksikön ja PSII:n CP43-alayksikön määrää western blot -menetelmällä. PsaB:n

ja CP43:n määrää mitattiin 4, 7 ja 24 tunnin typenpuutteesta sekä kontrolliolosuhteista. *Synechocystis* GT-T- ja Δ rpoZ-kannasta oli 3 biologista toistoa. PSI:n reaktiokeskusproteiini PsaB:n määrässä (kuva 11) ei havaittu muutoksia kantojen välillä eikä myöskään typenpuutteen suhteen.



Kuva 11: PsaB:n määrä 0, 4, 7 ja 24 tunnin typenpuutteessa kontrollikannalla sekä Δ rpoZ:lla. Vasta-ainekonsentraatio oli 1:5000 ja SDS-PAGE-geelillä ajettu näyte sisälsi 10 μ g totaaliproteiinia.

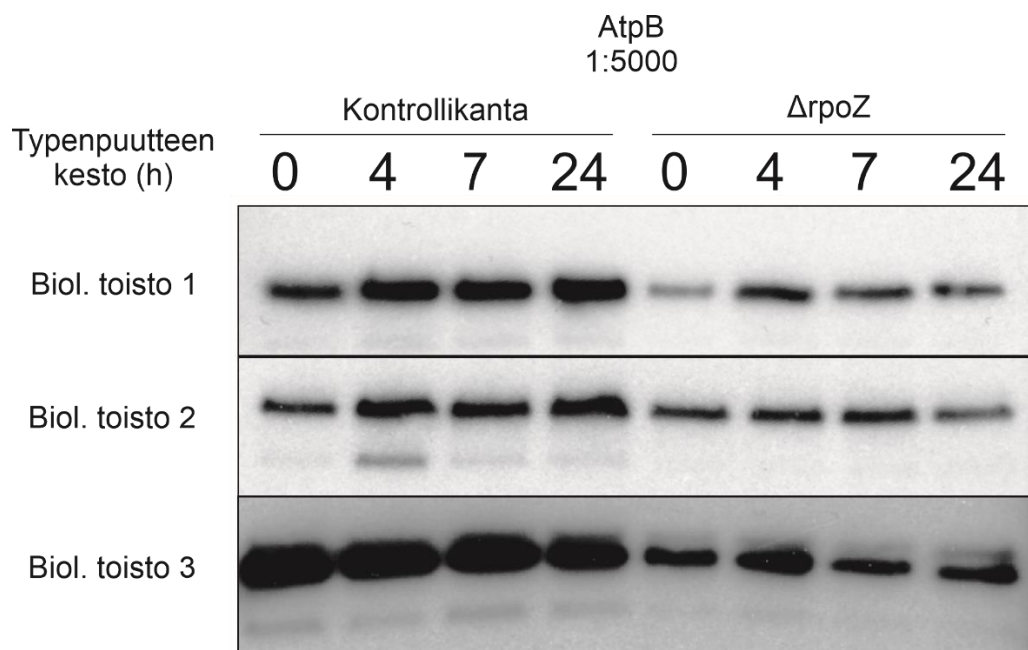
PSII:n klorofylliä sitovan CP43-alayksikön määrää on hankala arvioida biologisten toistojen erilaisuuden vuoksi (kuva 12). CP43:n määrä vaikuttaa vähenevän hieman 7 ja 24 tunnin välillä molemmilla kannoilla.



Kuva 12: CP43:n määrä 0, 4, 7 ja 24 tunnin typenpuutteessa kontrollikannalla sekä Δ rpoZ:lla. Vasta-ainekonsentraatio oli 1:6000 ja SDS-PAGE-geelillä ajettu näyte sisälsi 5 μ g totaali proteiinia.

3.2.3 ATP-syntaasia on Δ rpoZ:lla kontrollikantaa vähemmän

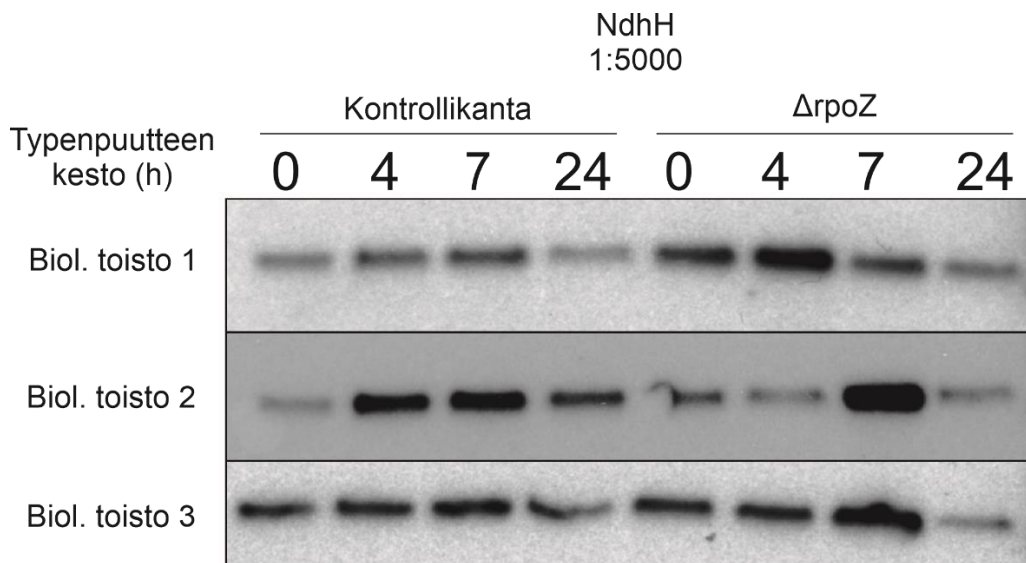
ATP-syntaasi on myös osa fotosynteesiä, joten sen määrää tutkittiin myös western blot -menetelmällä. ATP-syntaasista mitattiin β -alaysikön (AtpB) määrää 4, 7 ja 24 tunnin typenpuutteesta sekä kontrolliolosuhteista. *Synechocystis* GT-T- ja Δ rpoZ-kannasta oli 3 biologista toistoa. AtpB:n määrä on kontrollikannalla huomattavasti suurempi kuin Δ rpoZ:lla (kuva 13). Typenpuute ei vaikuta ATP-syntaasin määrään kummallakaan kannalla.



Kuva 13: AtpB:n määrä 0, 4, 7 ja 24 tunnin typenpuutteessa kontrollikannalla sekä Δ rpoZ:lla. Vasta-ainekonsentraatio oli 1:5000 ja SDS-PAGE-geelillä ajettu näyte sisälsi 15 μ g totaali proteiinia.

3.2.4 NDH-1:n määrä vaihteli typenpuutteen aikana

NDH-1 osallistuu soluhengitykseen sekä hiilimetaboliaan. Tämän vuoksi myös sen ilmenemistä tutkittiin western blot -menetelmällä. NDH-1:n H-alayksikön (NdhH) määrää mitattiin normaalioloissa sekä 4, 7 ja 24 tunnin typenpuutteessa. NDH-1 proteiinikompleksin määrä alkoi vähentyä vasta 7 tunnin typenpuutteen kohdalla molemmilla kannoilla (kuva 14). Saattaa olla, että etenkin kontrollikannalla mutta myös Δ rpoZ:lla NDH-1:n määrä kasvaa typenpuutteen alussa standardioloihin verrattuna.



Kuva 14: NdhH:n määrä 0, 4, 7 ja 24 tunnin typenpuutteessa kontrollikannalla sekä Δ rpoZ:lla. Vasta-ainekonsentraatio oli 1:5000 ja SDS-PAGE-geelillä ajettu näyte sisälsi 15 μ g totaaliproteiinia.

3.3 RT qPCR-kokeet

3.3.1 RNA-konsentraatio saattaa olla Δ rpoZ:lla kontrollikantaa alhaisempi

Western blot- kokeiden tuloksia (kuva 9, kuva 10, kuva 11, kuva 12, kuva 13 ja kuva 14) haluttiin tukea tutkimalla myös geenien ilmenemistä. Kvantitatiivisella PCR-kokeella mitattiin mRNA:n eroavaisuuksia *Synechocystis* GT-T- ja Δ rpoZ-kannan välillä. Tätä varten typenpuutteessa kasvatetuista soluista eristettiin RNA:ta, jonka määrä mitattiin. Δ rpoZ:lta saatiin eristettyä vähemmän RNA:ta suhteessa näytteen OD₇₃₀-arvoon, kuin kontrollikannalta (taulukko 4). RNA:n määrä vaikuttaisi vähenevän 24 tunnin typenpuutteen jälkeen molemmilla kannoilla. Δ rpoZ:n RNA-pitoisuus on keskimäärin noin puolet kontrollikannasta. Tulos on kuitenkin vain yhdestä biologisesta näytteestä.

Taulukko 4: qPCR:n käytettyjen näytteiden eristetyn RNA:n määrä suhteutettuna OD₇₃₀-arvoon. 0h:n näytteisiin käytettiin 10 ml soluja, 4, 7 ja 24 tunnin typenpuutenäytteisiin käytettiin 8 ml soluja.

	totRNA mg/OD ₇₃₀ /1ml soluja
Kontrollikanta 0h	1,135397412
Kontrollikanta 4h	2,624313187
Kontrollikanta 7h	1,827589419
Kontrollikanta 24h	0,840342078
ΔrpoZ 0h	0,696866607
ΔrpoZ 4h	0,739341085
ΔrpoZ 7h	0,82877843
ΔrpoZ 24h	0,419727979

3.3.2 qPCR-tuloksista todetaan näytteiden epäpuhtaus

Typenpuutteessa olleista GT-T- ja ΔrpoZ -soluista eristetystä RNA:sta valmistettiin cDNA:ta, jota käytettiin kvantitatiiviseen PCR:oon. cDNA-synteesin yhteydessä valmistettiin myös negatiivinen kontrolli -RT. PCR-tulosten negatiivisten kontrollien kynnysarvot (taulukko 5) olivat alhaisia johtuen epäpuhtaasta cDNA:sta, joten tuloksista ei saatu.

Taulukko 5: qPCR:n kynnysarvojen keskiarvot.

Kontrollikanta (GT-T) sekä ΔrpoZ typenpuutteessa (0, 4, 7, ja 24 tuntia). Tutkitut geenit ovat *atpB*, *ndhH*, *psbC*, *apcB*, *cpcA* sekä referenssigeeni *rnpB*. -RT -näytteet ovat negatiivisia kontrolleja, joita ei käsitelyä käänteistranskriptaasilla.

	<i>atpB</i>	<i>atpB</i> -RT	<i>ndhH</i>	<i>ndhH</i> -RT	<i>psbC</i>	<i>psbC</i> -RT	<i>apcB</i>	<i>apcB</i> -RT	<i>cpcA</i>	<i>cpcA</i> -RT	<i>rnpB</i>	<i>rnpB</i> -RT
GT-T 0h	21,94	23,72	22,04	23,62	21,84	25,04	20,8	24,15	18,95	26,74	14,76	23,98
GT-T 4h	26,58	31,66	27,25	32,23	28,21	32,07	25,85	29,52	26,2	33,72	16,94	30,90
GT-T 7h	21,92	24,92	20,92	25,73	20,93	25,93	20,96	23,87	19,13	27,98	14,53	25,77
GT-T 24h	24,93	25,52	24,24	26,18	23,90	25,70	23,5	25,05	22,82	28,05	16,70	26,11
ΔrpoZ 0h	23,87	28,8	22,80	28,73	23,06	28,44	21,92	27,09	19,49	30,55	15,46	28,78
ΔrpoZ 4h	28,63	29,11	25,89	30,13	29,41	30,05	27,11	28,52	25,68	31,96	22,58	29,99
ΔrpoZ 7h	26,73	33,63	23,94	32,96	26,07	32,72	24,33	30,79	23,49	34,39	18,33	31,00
ΔrpoZ 24h	31,6	32,12	31,19	33,30	31,36	33,49	29,15	30,76	29,38	34,64	24,86	31,96

4 Tulosten tarkastelu

Typenpuutteeseen sopeutuminen vaikuttaa hyvin samanlaiselta kontrollikannan ja $\Delta\rho Z$ -kannan välillä. Hapentuotto laskee molemmilla kannoilla samalla tavalla. $\Delta\rho Z$ -kannalla vaikuttaisi kuitenkin olevan hieman tavallista vähempi hapenkulutus ja normaalioloissa hieman alhaisempi hapentuotto. NDH-1:n määrä vaikuttaa myötäilevän hapenkulutusta siten, että sen määrä joko pysyy samana tai hieman nousee typenpuutteen ensimmäisten tuntien aikana ja laskee 24 tuntiin mennessä. Hapenkulutusta tulisi kuitenkin tutkia suoraan terminaalioksideaseista, joka ei tässä tutkimuksessa ollut mahdollista. Fotosynteettistä aktiivisuutta kannattaisi tutkia myös MIMS (Membrane Inlet Mass Spectrometer):llä, jolla hapen määrää voi dokumentoida tarkemmin.

Fykobilisomin hajoaminen typenpuutteessa, joka on tunnettu tapahtuma (Collier ja Grossman 1992), ei vaikuta eroavan kantojen välillä. Mielenkiintoisin havainto oli kuitenkin, että 4 tunnin typenpuutteessa molemmilla kannoilla fykobilisomiproteiini antoi erittäin voimakkaan signaalin. Syynä tähän saattaa olla totaaliproteiinin koostumuksen eroavaisuudet normaalioloihin nähden, mutta varmasti ei voi sanoa. APC:n määrä ei ehdi muuttumaan 24 tunnin aikana, joka on ymmärrettävää, sillä fykobilisomin hajotus alkaa sauvarakenteista (Forchammer ja Schwarz 2019). Tämän lisäksi on havaittu, että solu säilyttää osan fykobilisomin ydinrakenteista pidempiaikaisessa typenpuutteessa suojaamalla niitä hajotukselta fosforyloinnin kautta (Forchammer ja Schwarz 2019). Fykosyaniinin määrässä havaittiin hyvin vähän hajoamista. Richaud ja muut (2001) ovat todenneet fykosyainia hajottavan NblA-proteiinin geenien transkription aktivoituvan jo kahden tunnin typenpuutteen aikana. Lisäksi Krauspe ja muut (2022) havaitsivat fykosyaniinin hajotuksesta syntyviä aminohappoja 24 tunnin typenpuutteen jälkeen. Aminohappojen alkuperä todistettiin mutantilla, jolta puuttui fykobilisomin hajotukseen tarvittava NblD-proteiini.

Molempien kantojen PS-komplekseissa ja erityisesti PSI:ssä ei juurikaan tapahdu hajoamista typenpuutteen ensimmäisen päivän aikana. Tämä kertoo, että fotosynteettisen aktiivisuuden lasku johtuu enimmäkseen fykobilisomin hajoamisesta eikä PS-kompleksien puutteesta. PSII alkaa hajoamaan vasta ensimmäisen päivän loppupuolella, todennäköisesti vasta, kun kompleksissa ei ole enää fykobilisomia. Li ja Sherman (2002) raportoivat kontrollikannan PSI:n vähenevän hieman 4 päivän typenpuutteessa. ATP-syntaasin määrässä havaitaan kantojen välillä suuri ero, mutta typenpuute ei näytä vaikuttavan tähän kompleksiin kummallakaan kannalla.

mRNA:n tutkimus tulisi suorittaa uudelleen, mutta tässä työssä siihen ei ollut aikaa. Esimerkiksi $\Delta rpoZ$:n RbcR- ja NtcA-transkriptiotekijöitä kannattaisi tutkia enemmän. RNA-konsentraatio vaikuttaisi laskevan molemmilla kannoilla typenpuutteen edetessä (taulukko 4), mutta biologisia toistoja ei tehty, joten tulos on epäluotettava. Lisäksi $\Delta rpoZ$:n RNA-konsentraatio näyttää olevan paljon kontrollikantaa alhaisempi. Tämä vertautuu kuitenkin OD_{730} -arvoon eikä solutiheyteen. OD_{730} -arvo ei vastaa solumäärää, mikäli solujen koko on eri. Jatkotutkimuksena voisi tutkia, vastaako $\Delta rpoZ$:n solukoko GT-T-kantaa.

Tuotetut tulokset ovat hyvin lyhyeltä typenpuutteen ajalta, jossa kloroosin värinmuutosta ei vielä juurikaan havaitse paljailla silmillä. Pidempiaikaista puutostilaa ja uudelleentoipumista kannattaisi tutkia. Etenkin uudelleentoipuminen saattaa olla erilaista $\Delta rpoZ$:lla, sillä RNA-polymeraasiin kiinnittyneiden σ -faktorien suhde toisiinsa vaihtuu olosuhteiden muuttuessa (Antal ja muut 2016). Puutteellinen ω -alaysikkö vaikuttaa suoraan σ -faktorien affiniteettiin kiinnittyä polymeraasiin, joten on perusteltua olettaa poikkeavuutta.

5 Päätelmät

Synechocystis sopeutuu typenpuutteeseen hidastamalla fotosynteesin aktiivisuuden minimiin ja hajottamalla ei-välttämättömiä proteiineja, kuten fykobilisomia. Δ rpoZ-kanta toimii samalla tavoin, vaikka sen geeniekspressiota on muutettu poistamalla RNA-polymeraasirakenteesta ω -alaysikkö. Työssä testattu hypoteesi oli, että Δ rpoZ-kannan sopeutuminen typenpuutteeseen eroaisi kontrollikannasta, sillä kannalla on vaikeuksia sopeutua korkeaan hiilidioksidipitoisuuteen sekä korkeaan lämpötilaan, joten oli syytä olettaa ongelmia myös typen puutostilaan sopeutumisessa. Tulos osoitti hypoteesin vääräksi.

Lähdeluettelo

- Antal, T., Kurkela, J., Parikainen, M., Kårlund, A., Hakkila, K., Tyystjärvi, E., Tyystjärvi, T. (2016) Roles of group 2 sigma factors in acclimation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to nitrogen deficiency. *Plant Cell Physiol.* **57**:1309–1318
- Arteni, A.A., Ajlani, G., Boekema, E.J. (2009) Structural organisation of phycobilisomes from *Synechocystis* sp. strain PCC6803 and their interaction with the membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**:272–279
- Asayama, M., Imamura, S., Yoshihara, S., Miyazaki, A., Yoshida, N., Sazuka, T., Kaneko, T., Ohara, O., Tabata, S., Osanai, T., Tanaka, K., Takahashi, H., Shirai, M. (2004) SigC, the group 2 sigma factor of RNA polymerase, contributes to the late-stage gene expression and nitrogen promoter recognition in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**:477–487
- Bantu, L., Chauhan, S., Srikumar, A., Hirakawa, Y., Suzuki, I., Hagemann, M., Prakash, J.S.S. (2022) A membrane-bound cAMP receptor protein, SyCRP1 mediates inorganic carbon response in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta* **1865**:194803
- Battchikova, N., Eisenhut, M., Aro, E.-M. (2011) Cyanobacterial NDH-1 complexes: Novel insights and remaining puzzles. *Biochim. Biophys. Acta* **1807**:935–944
- Bhaya, D., Watanabe, N., Ogawa, T., Grossman, A.R. (1999) The role of an alternative sigma factor in motility and pilus formation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:3188–3193
- Bolay, P., Schlüter, S., Grimm, S., Riediger, M., Hess, W.R., Klähn, S. (2022) The transcriptional regulator RbcR controls ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *New Phytol.* **235**:432–445
- Chitnis, P.R. (2001) Photosystem I: function and physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**:593-626
- Collier, J.L., Grossman, A.R. (1992) Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *J. Bacteriol.* **174**:4718–4726
- Domínguez-Martín, M.A., Sauer, P.V., Kirst, H., Sutter, M., Bina, D., Greber, B.J., Nogales, E., Polívka, T., Kerfeld, C.A. (2022) Structures of a phycobilisome in light-harvesting and photoprotected states. *Nature* **609**:835–845

- Fang, S., Huang, X., Zhang, X., Zhang, M., Hao, Y., Guo, H., Liu, L.-N., Yu, F., Zhang, P. (2021) Molecular mechanism underlying transport and allosteric inhibition of bicarbonate transporter SbtA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **118**:e2101632118
- Flores, C., Santos, M., Pereira, S.B., Mota, R., Rossi, F., De Philippis, R., Couto, N., Karunakaran, E., Wright, P.C., Oliveira, P., Tamagnini, P. (2019) The alternative sigma factor SigF is a key player in the control of secretion mechanisms in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Environ. Microbiol.* **21**:343–359
- Forchhammer, K., Schwarz, R. (2019) Nitrogen chlorosis in unicellular cyanobacteria – a developmental program for surviving nitrogen deprivation. *Environ. Microbiol.* **21**:1173–1184
- Forchhammer, K., Selim, K.A. (2020) Carbon/nitrogen homeostasis control in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **44**:33–53
- Forchhammer, K., Selim, K.A., Huergo, L.F. (2022) New views on PII signaling: from nitrogen sensing to global metabolic control. *Trends Microbiol.* **30**:722–735
- Giner-Lamia, J., Robles-Rengel, R., Hernández-Prieto, M.A., Muro-Pastor, M.I., Florencio, F.J., Futschik, M.E. (2017) Identification of the direct regulon of NtcA during early acclimation to nitrogen starvation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Nucleic Acids Res.* **45**:11800–11820
- Gisriel, C.J., Wang, J., Liu, J., Flesher, D.A., Reiss, K.M., Huang, H.-L., Yang, K.R., Armstrong, W.H., Gunner, M.R., Batista, V.S., Debus, R.J., Brudvik, G.W. (2021) High-resolution cryo-electron microscopy structure of photosystem II from the mesophilic cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **119**:e2116765118
- Gunnelius, L., Hakkila, K., Kurkela, J., Wada, H., Tyystjärvi, E., Tyystjärvi, T. (2014a) The omega subunit of the RNA polymerase core directs transcription efficiency in cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* **42**:4606-4614
- Gunnelius, L., Kurkela, J., Hakkila, K., Koskinen, S., Parikainen, M., Tyystjärvi, T. (2014b) The ω subunit of RNA polymerase is essential for thermal acclimation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS ONE* **9**:e112599
- Heilmann, B., Hakkila, K., Georg, J., Tyystjärvi, T., Hess, W.R., Axmann, I.M., Dienst, D. (2017) 6S RNA plays a role in recovery from nitrogen depletion in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *BMC Microbiol.* **17**:229

- Huckauf, J., Nomura, C., Forchhammer, K., Hagemann, M. (2000) Stress responses of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 mutants impaired in genes encoding putative alternative sigma factors. *Microbiology* **146**:2877–2889
- Imamura, S., Asayama, M. (2009) Sigma factors for cyanobacterial transcription. *Gene Regul. Syst. Bio.* **3**:GRSB.S2090
- Jahn, M., Vialas, V., Karlsen, J., Maddalo, G., Edfors, F., Forsström, B., Uhlén, M., Käll, L., Hudson, E.P. (2018) Growth of cyanobacteria is constrained by the abundance of light and carbon assimilation proteins. *Cell Rep.* **25**:478-486
- Jiang, Y.-L., Wang, X.-P., Sun, H., Han, S.-J., Li, W.-F., Cui, N., Lin, G.-M., Zhang, J.-Y., Cheng, W., Cao, D.-D., Zhang, Z.-Y., Zhang, C.-C., Chen, Y., Zhou, C.-Z. (2018) Coordinating carbon and nitrogen metabolic signaling through the cyanobacterial global repressor NdhR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**:403–408
- Koskinen, S., Kurkela, J., Linhartová, M., Tyystjärvi, T. (2023) The genome sequence of *Synechocystis* sp. PCC 6803 substrain GT-T and its implications for the evolution of PCC 6803 substrains. *FEBS Open Bio* **13**:701–712
- Krauspe, V., Timm, S., Hagemann, M., Hess, W.R. (2022) Phycobilisome breakdown effector NblD is required to maintain cellular amino acid composition during nitrogen starvation. *J. Bacteriol.* **204**:e00158-21
- Kurkela, J., Fredman, J., Salminen, T.A., Tyystjärvi, T. (2021) Revealing secrets of the enigmatic omega subunit of bacterial RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* **115**:1–11
- Kurkela, J., Hakkila, K., Antal, T., Tyystjärvi, T. (2017) Acclimation to high CO₂ requires the ω subunit of the RNA polymerase in *Synechocystis*. *Plant Physiol.* **174**:172–184
- Kurkela, J., Tyystjärvi, T. (2024) Inorganic carbon sensing and signalling in cyanobacteria. *Physiol. Plant.* **176**:e14140
- Kurkela, J., Vuorijoki, L., Vakal, S., Turunen, O., Koskinen, S., Ray, M., Hess, W.R., Salminen, T.A., Tyystjärvi, T. (manuscript) Inorganic carbon levels regulate growth via SigC signaling cascade in 4 cyanobacteria.
- Lea-Smith, D.J., Bombelli, P., Vasudevan, R., Howe, C.J. (2016) Photosynthetic, respiratory and extracellular electron transport pathways in cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1857**:247–255
- Li, H., Sherman, L.A. (2002) Characterization of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and Δ nbl mutants under nitrogen-deficient conditions. *Arch. Microbiol.* **178**:256-266

- Li, H., Singh, A.K., McIntyre, L.M., Sherman, L.A. (2004) Differential gene expression in response to hydrogen peroxide and the putative PerR regulon of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **186**:3331–3345
- Mantovani, O., Reimann, V., Haffner, M., Herrmann, F.P., Selim, K.A., Forchhammer, K., Hess, W.R., Hagemann, M. (2022) The impact of the cyanobacterial carbon-regulator protein SbtB and of the second messengers cAMP and c-di-AMP on CO₂-dependent gene expression. *New Phytol.* **234**:1801–1816
- Mills, L.A., McCormick, A.J., Lea-Smith, D.J. (2020) Current knowledge and recent advances in understanding metabolism of the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biosci. Rep.* **40**:BSR20193325
- Muro-Pastor, M.I., Cutillas-Farray, Á., Pérez-Rodríguez, L., Pérez-Saavedra, J., Vega-de Armas, A., Paredes, A., Robles-Rengel, R., Florencio, F.J. (2020) CfrA, a novel carbon flow regulator, adapts carbon metabolism to nitrogen deficiency in cyanobacteria. *Plant Physiol.* **184**:1792–1810
- Nikkinen, H-L., Hakkila, K., Gunnelius, L., Huokko, T., Pollari, M., Tyystjärvi, T. (2012) The SigB σ factor regulates multiple salt acclimation responses of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* **158**:514-523
- Omata, T., Gohta, S., Takahashi, Y., Harano, Y., Maeda, S. (2001) Involvement of a CbbR homolog in low CO₂-induced activation of the bicarbonate transporter operon in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* **183**:1891–1898
- Omata, T., Price, G.D., Badger, M.R., Okamura, M., Gohta, S., Ogawa, T. (1999) Identification of an ATP-binding cassette transporter involved in bicarbonate uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:13571–13576
- Osanai, T., Imamura, S., Asayama, M., Shirai, M., Suzuki, I., Murata, N., Tanaka, K. (2006) Nitrogen induction of sugar catabolic gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.* **13**:185–195
- Osanai, T., Oikawa, A., Azuma, M., Tanaka, K., Saito, K., Hirai, M.Y., Ikeuchi, M. (2011) Genetic engineering of group 2 σ factor SigE widely activates expressions of sugar catabolic genes in *Synechocystis* species PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **286**:30962–30971
- Price, G.D., Woodger, F.J., Badger, M.R., Howitt, S.M., Tucker, L. (2004) Identification of a SulP-type bicarbonate transporter in marine cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:18228–18233

- Raven, J.A., Beardall, J., Sánchez-Baracaldo, P. (2017) The possible evolution and future of CO₂-concentrating mechanisms. *J. Exp. Bot.* **68**:3701–3716
- Richaud, C., Zabulon, G., Joder, A., Thomas, J. (2001) Nitrogen or sulfur starvation differentially affects phycobilisome degradation and expression of the *nblA* gene in *Synechocystis* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **183**:2989-2994
- Schneider, G.J., Hasekorn, R. (1988) RNA polymerase subunit homology among cyanobacteria, other eubacteria and archaeobacteria. *J. Bacteriol.* **170**:4136–4140
- Shen, L., Lai, G., You, L., Shi, J., Wu, X., Puiu, M., Gu, Z., Feng, Y., Yuzenkova, Y., Zhang, Y. (2023) An SI3- σ arch stabilizes cyanobacteria transcription initiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **120**:e2219290120
- Shibata, M., Katoh, H., Sonoda, M., Ohkawa, H., Shimoyama, M., Fukuzawa, H., Kaplan, A., Ogawa, T. (2002) Genes essential to sodium-dependent bicarbonate transport in cyanobacteria. *J. Biol. Chem.* **277**:18658–18664
- Srivastava, A., Summers, M.L., Sobotka, R. (2020) Cyanobacterial sigma factors: Current and future applications for biotechnological advances. *Biotechnol. Adv.* **40**:107517
- Stanier, R.Y., Deruelles, J., Rippka, R., Herdman, M., Waterbury, J.B. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology* **111**:1–61
- Summerfield, T.C., Sherman, L.A. (2007) Role of sigma factors in controlling global gene expression in light/dark transitions in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **189**:7829–7840
- Tuominen, I., Pollari, M., Tyystjärvi, E., Tyystjärvi, T. (2005) The SigB σ factor mediates high-temperature responses in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *FEBS Lett.* **580**:319-323
- Tuominen, I., Pollari, M., von Wobesser, E.A., Tyystjärvi, E., Ibelings, B.W., Matthijs, H.C.P., Tyystjärvi, T. (2008) Sigma factor SigC is required for heat acclimation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *FEBS Lett.* **582**:346-350
- Tuominen, I., Tyystjärvi, E., Tyystjärvi, T. (2003) Expression of primary sigma factor (PSF) and PSF-like sigma factors in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **185**:1116–1119
- Vermaas, W.F. (2001) Photosynthesis and respiration in cyanobacteria. *Encyclopedia of Life Sciences, Wiley*
- Vinyard, D.J., Ananyev, G.N., Dismukes, G.C. (2013) Photosystem II: the reaction center of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **82**:577-606

- Watzer, B., Forchhammer, K. (2018) Cyanophycin synthesis optimizes nitrogen utilization in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**:e01298-18
- Williams, J.G.K. (1988) Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods Enzymol.* **167**:766-778