



**UvA-DARE (Digital Academic Repository)**

**Dynamic changes in gene expression of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to nitrogen starvation**

Krasikov, V.

[Link to publication](#)

*Citation for published version (APA):*

Krasikov, V. (2012). *Dynamic changes in gene expression of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to nitrogen starvation.*

**General rights**

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Disclaimer/Complaints regulations**

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

## **Samenvatting en Discussie**

---

## Voorwoord

Dit proefschrift gaat over aanpassingen van cyanobacteriën aan nutriënt limitatie. Het onderzoek is uitgevoerd met het modelorganisme *Synechocystis* sp. stam PCC 6803 (hierna aangeduid met *Synechocystis*). In het bijzonder is stikstof limitatie bestudeerd met behulp van transcriptoom en proteoom methodes alsmede fysiologische experimenten. Om patronen van regulatie te identificeren, zijn geavanceerde experimentele technieken ontwikkeld en toegepast.

## Genoomsequenties voor expressie analyse

Tegenwoordig worden genoomsequenties van organismen veelvuldig bestudeerd. Het beantwoorden van vragen op het gebied van biodiversiteit is meestal gebaseerd op een beperkt aantal genen die geschikt zijn voor fylogenetische analyse (Woese, 1987; Pace, 2009; Rajendhran and Gunasekaran, 2011). Voor studies van gen expressie begint het puzzelwerk echter pas nadat een volledige genoomsequentie bekend is geworden (e.g., Lashkari *et al.*, 1997; Swarbreck *et al.*, 2008; Gnerre *et al.*, 2011). Nauwkeurige vergelijking van verschillende genoomsequenties kan leiden tot het herkennen van functionele eenheden in de sequenties die “open reading frames” (ORF) worden genoemd. Zulke functionele eenheden in het genomisch DNA vormen na transcriptie en translatie de basis voor cel eiwitten. Zelfs voor veelvuldig bestudeerde organismen zijn vele van de geïdentificeerde ORFs nog niet geassocieerd met een eiwitproduct. Deze ORFs vertegenwoordigen dus functioneel onbekende eiwitten. Of nog erger, voor veel ORF transcripten is nog onbekend of translatie tot een eiwit werkelijk plaatsvindt. Deze ORFs vertegenwoordigen derhalve hypothetische eiwitten. Ondanks het relatief kleine genoom van *Synechocystis* (3.6 Mbp), en het vroege moment waarop de volledige genoomsequentie bekend werd, is zelfs voor een groot aantal ORFs van dit modelorganisme nog steeds geen functie bekend. Transcriptie studies onder een reeks van verschillende omstandigheden kunnen regulatiepatronen aan het licht brengen met aanwijzingen over het functioneel gebruik van genproducten. Dit kan helpen om onbekende of hypothetische genproducten als functionele eiwitten te benoemen. Tijdens het werk dat wordt beschreven in dit proefschrift (Hoofdstuk 2) zijn enkele interessante ontdekkingen gedaan, waarbij ORFs voor onbekende en hypothetische eiwitten zijn geïdentificeerd als werkelijk coderende genen voor functionele enzymen.

## Klassieke DNA-macroarrays

Op het moment dat het werk voor dit proefschrift werd gestart, waren veel van de moderne onderzoeksinstrumenten nog niet beschikbaar. Ons onderzoek is begonnen met een klassiek transcriptoom platform, een zogenaamde genomische macroarray, dat collegiaal ter beschikking werd gesteld door een Japanse onderzoeksteam. Dit team had al in 1996 het genoom van *Synechocystis* als eerste volledig gesequenced fotosynthetische organisme op de kaart gezet (Kaneko *et al.*, 1996). Dit hoogtepunt inspireerde vele onderzoekers over de hele wereld om werk te gaan doen met de cyanobacterie *Synechocystis*.

Op basis van het genoom van *Synechocystis* werd een microarray ontworpen, waarbij enkelstrengs DNA constructen die voor de sequentie analyse waren gemaakt direct op blot materiaal werden aangebracht. Dit platform bevatte duizenden M13 clones gebaseerd op stukken van het *Synechocystis* chromosoom die door shearing (mechanisch breken) waren verkregen. Dit had tot gevolg dat in iedere spot op de microarray meerdere ORFs aanwezig waren. Vaak codeerden deze verschillende ORFs voor uiteenlopende functies in de celfysiologie, waardoor het bepalen van de expressie van iedere ORF nogal gehinderd werd. Desondanks was er op dat moment geen beter alternatief voorhanden, en hebben we ons gen-expressie onderzoek met deze microarrays opgestart. Door het verwijderen van het overheersend aanwezige cDNA gebaseerd op rRNA in de totale transcript pool (meer dan 90% van het totaal) kon de signaal/ruis verhouding aanzienlijk worden verbeterd. Het feit dat iedere spot op de microarray 1 tot 10 verschillende genen vertegenwoordigde, maakte interpretatie van de data echter zeker niet makkelijk.

Om onderscheid te kunnen maken tussen specifieke en algemene stress signalen van *Synechocystis* hebben we drie soorten stress opgelegd: 2 verschillende nutriënt limitaties en een hoge zoutstress (Hoofdstuk 2). Hoewel het niet mogelijk was om de statistische significantie van de waargenomen veranderingen in gen expressie te testen, waren we in staat om voor iedere stress conditie sets van verschillend tot expressie komende genen aan het licht te brengen door zorgvuldige vergelijking van de individuele blots. Dit maakte interpretatie van de waargenomen verschillen in gen expressie mogelijk door deze sets van genen te vergelijken met bekende metabole categorieën. Verschillende ORFs met verhoogde transcriptie tengevolge van zoutstress bleken te behoren tot onbekende en hypothetische eiwitten. Hiervan werden 2 ORFs uitgezocht voor nadere studie met behulp van knock-out mutagenese. Hierdoor werd bewijs gevonden voor de betrokkenheid van twee naast elkaar gelegen ORFs (*slr1208* en *ssr2016*) bij het cyclisch electronen transport rondom fotosysteem I van *Synechocystis* (Yeremenko et al, 2005). Ook werden specifieke veranderingen in gen expressie gevonden in response op fosfaatlimitatie. Deze studies toonden dus aan dat verschillende stress condities leiden tot duidelijke verschillen in gen expressie. De volledige microarray experimenten worden in meer detail besproken in het tweede hoofdstuk van dit proefschrift. Ondanks de nieuwe inzichten die hiermee werden verkregen, was de algemene conclusie dat betere experimentele technieken nodig waren om de doelstellingen van ons onderzoeksproject te realiseren.

### **Het tijdperk van de DNA microarrays**

In 2001 slaagden collega's in Japan erin om als eerste een microarray platform voor *Synechocystis* te ontwerpen dat was gebaseerd op cDNA probes voor individuele ORFs (Hihara *et al.*, 2001). Dit inspireerde onze groep om een eigen ontwerp te maken voor een *Synechocystis* microarray, met als doel om de moleculaire en fysiologische adaptaties aan verschillende stress condities verder te ontrafelen met behulp van transcriptie profielen. Belangrijke voorwaarden voor het ontwerp van dit nieuwe microarray platform waren onder

---

andere een hoge specificiteit van de probes en een statistisch verantwoord aantal probes voor iedere ORF. Daarom hebben we gekozen voor 60-mer oligonucleotide microarrays van producent Agilent. De microarray werd ontworpen door Dr. Eneas Aguirre von Wobeser, die op dat moment als AIO in ons laboratorium werkzaam was. Het ontwerp voor ‘onze’ DNA microarray was gebaseerd op de 3264 ORFs van *Synechocystis* die destijds bekend waren. Voor iedere ORF werden 1 tot 4 specifieke oligonucleotides geprint in een 11K ontwerp op een standaard glasplaatje. Meer recent heeft Cyanobase de *Synechocystis* annotatie aangepast, waardoor het *Synechocystis* chromosoom nu 3317 ORFs omvat en daarnaast ook 408 ORFs op plasmiden zijn benoemd (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>). Uitgebreide informatie over onze DNA microarray van *Synechocystis* is te vinden in het proefschrift van Aguirre von Wobeser (2010).

### Werken met DNA microarrays

Voor ieder microarray experiment is zorgvuldige data analyse noodzakelijk om een statistisch significant patroon van gen expressie te bepalen. Hoofdstuk 3 van dit proefschrift beschrijft het data analyse traject dat we hebben ontwikkeld om relatieve veranderingen in gen expressie te beschrijven. De data analyse was gebaseerd op een veel gebruikte open-source programmeertaal voor statistische analyse met de naam “R” ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). In het bijzonder heb ik gebruik gemaakt van het Bioconductor project, dat R software verschaft voor wetenschappers en programmeurs die werken in de bioinformatica en computationele biologie (Gentleman, 2008; [www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)). De bioconductor software is specifiek ontworpen voor de analyse en visualisatie van genomische data. Mijn data analyse traject was gebaseerd op Limma, een software pakket met lineaire modellen voor de analyse van planmatig ontworpen microarray experimenten en het bepalen van veranderingen in relatieve gen expressie (Smyth, 2005). Het verwerken van de data omvatte import van de ruwe microarray data, correctie voor achtergrond ruis, en data normalisatie (Smyth and Speed, 2003). Veranderingen in de relatieve expressie van genen werden geanalyseerd door de genormaliseerde data van de stress behandeling en controle te fitten met een lineair model, gevolgd door het testen van de statistische significantie met empirische Bayesiaanse statistiek op basis van de ‘false discovery rate’ (Smyth, 2004). Bij iedere stap van de analyse inspecteerden we de data door gebruik te maken van intensiteits plots voor individuele microarrays, box plots, en hiërarchische clustering van de microarrays. Tenslotte werden de uitkomsten van de data analyse gevisualiseerd als MA-plots, Venn diagrammen en ‘heat-maps’ van specifieke groepen genen (Hahne *et al.*, 2008). Het uitdokteren en toepassen van deze nieuwe statistische technieken was tamelijk lastig, en tegenwoordig worden dit soort specialistische taken vaak uitbesteed aan bioinformatici. Terugblikkend heeft de ontwikkeling van een geschikte methode voor data analyse een grote hoeveelheid tijd en inspanning gekost, maar toen dat eenmaal tot een goed einde was gebracht kon het echte onderzoek starten.

## Testen van DNA microarrays

Als eerste test hebben we met het nieuw ontworpen microarray platform een aantal pilot experimenten gedaan. Deze bestonden uit “dye-swap” technische hybridisaties van 3 biologische replica’s van cultures blootgesteld aan 12 uur stikstofgebrek die werden vergeleken met 3 stikstofrijke cultures van *Synechocystis*. Het tijdpunt van 12 uur is bewust gekozen omdat dan de cellulaire aanpassing aan stikstofgebrek al is gestart. Dit werd zichtbaar in een duidelijke verandering van kleur van de cellen, van helder groen naar geel. Toch was de verwachting dat de veranderingen in de fysiologie op dit tijdstip nog niet al te dramatisch zouden zijn. Karakteristiek is dat cellen voedingsstoffen zoals stikstof intern kunnen opslaan, waardoor het cel metabolisme doorgaat tot een flinke tijd nadat de stikstof uit de externe leefomgeving is weggehaald (Görl *et al.*, 1998; Sauer *et al.*, 2001). In dit opzicht verschilt een gebrek aan voedingsstoffen enigszins van andere stress situaties zoals pH, zout, temperatuur, osmotische of licht stress, met vaak een directer effect op de cel functie.

Verscheidene voedingsstoffen kunnen potentieel de groei van cyanobacteriën beperken in natuurlijke wateren, waaronder C, N, P en Fe. Van deze voedingsstoffen is stikstofgebrek gekozen als onderwerp voor mijn onderzoek, omdat stikstof veel voorkomt in de macromoleculen waaruit levende cellen bestaan, terwijl er toch betrekkelijk weinig informatie bestaat over de transcriptoom response van cyanobacteriën op stikstoflimitatie. Een goede uitzondering vormt het werk van Osanai *et al.* (2006), die het transcriptoom van *Synechocystis* bestudeerden na 4 uur stikstofgebrek. Een periode van 4 uur zonder stikstof lijkt relatief lang in vergelijking tot de snelheid waarmee *Synechocystis* zijn gen expressie kan aanpassen aan veranderende condities. Maar omdat cyanobacteriën een tijd lang kunnen doorgroeien op hun interne nutriënt reserves, zie je na 4 uur toch alleen maar een initiële response op stikstofgebrek. Osanai *et al.* (2006) benadrukten de interessante inductie van genen betrokken bij suiker catabolisme en stikstof assimilatie, terwijl ze ook melding maakten van de vermindering van expressie van fotosynthese en ribosoom genen. In hun werk werd echter geen aandacht besteed aan genen die op langere termijn reageerden op stikstofgebrek.

Uit ons 12 uur experiment konden we afleiden dat ons microarray platform in technisch opzicht prima voldeed, zeer reproduceerbare resultaten opleverde, alsmede biologisch interessante data. In reactie op stikstofgebrek vonden we repressie van genen voor het fotosynthese apparaat, waaronder vele genen van fotosysteem I en II, fycobilisoom genen, alle subunits van het ATP synthase, en een aantal genen die betrokken zijn bij CO<sub>2</sub> fixatie. Dit terwijl stikstof assimilatie genen juist sterker tot expressie werden gebracht. Ook observeerden we inductie van genen die coderen voor terminale oxidases en hydrogenases. Verder zagen we dat verschillende ORFs die coderen voor hypothetische of onbekende eiwitten reageerden op stikstofgebrek, wat een bijdrage kan leveren aan de verdere ontrafeling van de functies van deze genen. Als geheel gaf dit experiment inzicht op welke wijze cellen hun interne stikstofreserves kunnen herverdelen en hun fysiologie kunnen aanpassen aan stikstofgebrek. De resultaten van dit test experiment staan beschreven in Hoofdstuk 4 en vormden een goed beginpunt voor verdere experimenten.

---

## Microarray onderzoek naar geleidelijke veranderingen in continu cultures

Het onderzoek werd vervolgd met een studie naar de totale genoom response van *Synechocystis* op een geleidelijke overgang van stikstof limitatie naar licht-gelimiteerde condities, en vervolgens weer terug naar stikstof limitatie (Hoofdstuk 5). Dit onderzoek werd uitgevoerd met continu cultures. In een continu cultuur is experimentele controle over de specifieke groeisnelheid van de organismen door de pomp in te stellen op een vaste verdunningssnelheid. Bij het begin van het experiment waren de cellen aangepast aan stikstof limitatie. Deze cellen investeren redelijkerwijze al hun mogelijkheden in het verzamelen van stikstof uit hun leefomgeving. We vervolgden veranderingen in de celfysiologie en het transcriptoom na toevoeging van een hoge dosis stikstof in het groeimedium, met als doel om vast te stellen hoe deze cyanobacterie zal reageren op de opheffing van stikstof limitatie.

In macroscopisch opzicht kreeg de cultuur een meer groene kleur na de stikstof toevoeging en namen de aantallen cellen sterk toe. Dit is een goede indicatie dat de groeicondities veranderden van stikstof limitatie naar licht limitatie. De microarray experimenten lieten talloze veranderingen in het transcriptoom zien. Analyse van de microarray data bracht acht clusters van gereguleerde genen aan het licht, waarbij ieder cluster een ander tijdspad van genregulatie liet zien bij de overgang van stikstof naar lichtlimitatie. We onderzochten mogelijke correlaties tussen deze veranderingen in gen expressie en fysiologische parameters die gelijktijdig werden gemeten. Als voorbeeld werd gevonden dat een aantal fotosynthese genen een gezamenlijk cluster vormden dat werd onderdrukt tijdens stikstof limitatie maar werd geïnduceerd tijdens licht limitatie. Het gedrag van dit cluster van genen kwam uitstekend overeen met fysiologische parameters als specifieke groeisnelheid, licht extinctie coëfficiënt, fotosynthese capaciteit en maximale elektronen transport snelheid. Een ander cluster omvatte genen betrokken bij de stikstof assimilatie en dit cluster vertoonde het omgekeerde beeld: inductie tijdens stikstof limitatie maar repressie tijdens licht-gelimiteerde groei.

Speciale aandacht werd besteed aan de vergelijking van onze bevindingen met bestaande data van andere laboratoria, zoals de batch cultuur experimenten van Osanai *et al.* (2006), waarin *Synechocystis* was blootgesteld aan 4 uur stikstofgebrek. Hoewel vele genen vergelijkbaar reageerden in beide experimenten, waren er ook een aantal verschillen tussen onze resultaten en die van Osanai. Dit kan het gevolg zijn van verschillen in groeicondities. In continu culture is sprake van geleidelijke veranderingen in nutriënt limitatie waarbij de nutriënten nooit volledig uitgeput raken door de continue instroom van vers medium, terwijl in batch cultuur een traject wordt ingezet op weg naar complete stikstofuitputting.

Deze continu cultuur experimenten staan beschreven in Hoofdstuk 5 (Aguirre von Wobeser *et al.*, 2011) en verschaffen inzicht in vele genen waarvan de transcriptie verandert bij de overgang van stikstof naar licht limitatie. De resultaten demonstreren dat continu cultures toegang bieden tot diepgaand onderzoek naar veranderingen in gen transcriptie terwijl de cellen blijven groeien.

## Veranderingen in genoom expressie door stikstofgebrek in batch culture

Stikstofgebrek in batch cultures zal naar verwachting andere groeicondities opleggen dan stikstof limitatie in continu culture. Hoewel cellen enige tijd kunnen blijven groeien op basis van interne stikstofreserves zullen ze uiteindelijk hun groei afbreken wanneer alle beschikbare stikstof in de batch culture op is. Om te onderzoeken of dit leidt tot verschillen in genoom transcriptie volgden we temporele veranderingen in het transcriptoom gedurende stikstofgebrek in batch culture (Hoofdstuk 6; Krasikov *et al.*, 2012). Stikstofgebrek werd experimenteel opgelegd door een plotselinge overgang van nitraat-rijk medium naar nitraat-vrij medium. De celfysiologie en het totale transcriptoom werden geanalyseerd op diverse tijdstippen, van 6 uur tot 4 dagen na verwijdering van stikstof uit het medium. Vervolgens bestudeerden we het *Synechocystis* transcriptoom in de herstelfase, na het opnieuw toevoegen van nitraat in het medium.

De resultaten toonden een geleidelijke respons van de cellen op stikstofgebrek, bestaande uit drie belangrijke fases: (1) een onmiddellijke respons, (2) korte termijn aanpassingen, en (3) overleving op de lange duur. Als onmiddellijke respons op het verwijderen van stikstof uit het medium vervolgden cellen hun groei met versterkte expressie van transport en opname systemen voor stikstof assimilatie en een tijdelijke toename van fotosysteem I en fycobilisoom gerelateerde genen. De tweede fase werd gekenmerkt door een geleidelijke afname van de groeisnelheid, van de stikstof:koolstof verhouding in de cellen, en van het fycocyanine gehalte. Interessant genoeg bleven de activiteiten van fotosystemen I en II goed bewaard tijdens deze fase, zoals werd vastgesteld met metingen van de fotosynthese en ademhalings capaciteit. Ook na afbraak van de fycobilisomen behielden cellen hun capaciteit voor door chlorofyl excitatie gedreven fotosynthese. Het transcriptoom van deze fase toonde verlaging van genen die coderen voor de fycobilisomen en voor koolstoffixatie. Bovendien waren eiwitten die betrokken zijn bij de koolstoffixatie na 12 uur stikstofgebrek 2,2 maal minder aanwezig, wat goed overeenstemt met de eveneens 2 maal lagere transcript aanwezigheid van de betreffende genen. Genen die coderen voor terminale oxidases en hydrogenases werden juist geïnduceerd, waarschijnlijk in verband met hun rol bij het wegwerken van een teveel aan elektronen dat ontstaat door de verminderde koolstoffixatie en stikstof assimilatie. In de laatste fase stopte de groei en bijna alle andere activiteiten van *Synechocystis*, zoals bleek uit metingen van fysiologische parameters. Opmerkelijk was dat de transcriptie van genen die coderen voor fotosysteem I (PSI) nog enigszins bleef doorgaan, dit in tegenstelling tot de sterk gedaalde expressie van genen betrokken bij fotosysteem II, de fycobilisomen en koolstoffixatie.

We denken dat de resterende transcriptie van PSI genen, tezamen met de gecontinueerde inductie van stikstof-assimilatie genen, de cellen in staat stelt om snel te herstellen zodra er weer stikstof beschikbaar komt. Het snelle herstel werd aangetoond door de inductie van vele genen na toevoeging van stikstof aan de gehongerde cellen, hoewel een aanzienlijk aantal interessante genen niet onmiddellijk reageerde op de stikstof verrijking.

Over het geheel genomen laten de resultaten zien dat genen op verschillende tijdschalen



---

reageren, wat leidt tot een geleidelijke respons van cyanobacteriën op tamelijk plotselinge veranderingen in de beschikbaarheid van voedingsstoffen in de omgeving.

## Vooruitzichten

Ons onderzoek verschaft inzicht in de samenhang tussen verschillende moleculaire en fysiologische aanpassingen van cyanobacteriën in respons op stikstofgebrek. Ook biedt het suggesties voor toekomstig vervolgonderzoek. Regulatie netwerken die betrokken zijn bij aanpassingen aan stress condities zijn tamelijk complex. Het doorgronden van deze netwerken vereist een integrale aanpak, gebruik makend van informatie van het genoom, transcriptoom en proteoom in combinatie met fysiologische experimenten. Hierbij kan vergelijkende genomics een belangrijke rol spelen, waarbij de resultaten van verschillende stress condities naast elkaar worden gelegd om vast te stellen welke veranderingen in gen expressie kunnen dienen als indicator voor specifieke milieuomstandigheden. Zulke genetische indicatoren zijn ook interessant voor toepassingen in veldonderzoek, bijvoorbeeld om nutriënt limitatie vast te stellen.

De technische mogelijkheden groeien snel en verdere integratie van nieuwe technieken ligt voor de hand. Omdat bijvoorbeeld veranderingen in gen expressie niet noodzakelijkerwijze overeenkomen met veranderingen in eiwit expressie zijn high-throughput proteoom experimenten van aan stress onderworpen cultures gewenst. Dit kan worden gerealiseerd met een kwantitatieve aanpak die recent is toegepast op *Synechocystis* na blootstelling aan lage CO<sub>2</sub> concentraties, door middel van op iTRAQ gebaseerde proteomics (Battchikova *et al.*, 2010). Een andere moderne benadering is volledige metabolomics, waarbij wordt onderzocht of veranderingen in metaboliet spiegels overeenkomen met de beperkingen en mogelijkheden die gereguleerde gen expressie en translatie opleggen.

Een ander belangrijk gebied met de potentie voor een groot aantal nieuwe doorbraken betreft de opheldering van het aanzienlijke aantal ORFs op het *Synechocystis* chromosoom waaraan nog geen functie is toegekend. Nauwkeurige analyse van de expressie van deze ORFs onder verschillende stress condities kunnen potentiële doelen voor knock-out en/of overexpressie mutanten opleveren, waarmee de functies van de betreffende genen zichtbaar gemaakt kunnen worden. Zulke benaderingen kunnen niet alleen ontdekkingen opleveren over de rol van onbekende genen, maar zullen ook ons begrip vergroten over de relatie tussen koolstof en stikstof assimilatie, fotosynthese en energie metabolisme in cyanobacteriën.

Recent is een nieuwe visie ontwikkeld over regulatie netwerken in cyanobacteriën. In verschillende studies werd gemeld dat niet-coderende RNAs (ncRNA) en antisense RNAs (asRNA) betrokken zijn bij de gen regulatie in cyanobacteriën in response op omgevingsstress (Georg and Hess, 2011; Gierga *et al.*, 2012). Het gevestigde voorbeeld van asRNA in *Synechocystis* is IsrR – 177 nt asRNA dat complementair is met het centrale gebied van het isiA mRNA, en aldus de hoeveelheid actief transcript kan reguleren voor het ijzerstress induceerbare eiwit IsiA (Dühning *et al.*, 2006). Georg *et al.* (2009) identificeerden 60 ncRNAs en 73 asRNAs in *Synechocystis* en stelden dat asRNA de transcriptie van wel 10%

van de genen van *Synechocystis* zou kunnen beïnvloeden. Zeer recent werd gerapporteerd dat ongeveer een kwart van de eiwit coderende genen beschikt over antisense transcripten in *Synechocystis*, en ook dat het *Synechocystis* chromosoom codeert voor rond de 300 ncRNAs (Mitschke *et al.*, 2011). Tot nu toe zijn er functionele aanwijzingen voor de betrokkenheid van asRNAs bij koude stress, hoog licht stress, ijzer- en koolstoflimitatie. Het lijkt mogelijk om probes voor ncRNA en asRNA in het microarray ontwerp op te nemen, en om het onderzoek uit te breiden naar hun rol in bijvoorbeeld stikstof limitatie.

Tenslotte wil ik opmerken dat het vroege initiatief om ons eigen microarray platform te ontwerpen en beschikbaar te maken voor anderen goed is ontvangen door de internationale onderzoeksgemeenschap, zoals blijkt uit verschillende gemeenschappelijke publicaties (Eisenhut *et al.*, 2007; Tuominen *et al.*, 2008; Schriek *et al.*, 2008; Hackenberg *et al.*, 2009 and 2012). Ondertussen zijn er nieuwe technieken ontwikkeld. Zo heeft het concept van tiling arrays het ontwerpen van arrays aanzienlijk versneld omdat tiling arrays het ontwerpen van specifieke probes voor bekende genen overbodig maken maar simpelweg een groot aantal aansluitende probes gebruiken die het gehele genoom omvatten. Tiling arrays bieden een hoger oplossend vermogen voor transcriptomen van cyanobacteriën zoals onlangs werd aangetoond voor *S. elongatus* PCC 7942 (Vijayan *et al.*, 2011), wat het mogelijk maakt om operons op meer overtuigende wijze aan te tonen dan met de huidige ORF gebaseerde arrays, terwijl ook transcripten voor ncRNAs en asRNA kunnen worden bepaald (Georg *et al.*, 2009). Omdat tiling arrays niet worden beïnvloed door gen annotatie kunnen ze het ontdekken van onbekende en hypothetische ORFs en de metabole controle ervan vergemakkelijken. DNA microarrays zijn nu goedkoop genoeg voor direct gebruik in ecologische studies. Voor uitgebreide analyses kunnen microarray toepassingen worden aangevuld met directe RNA sequentie bepaling (Mitschke *et al.*, 2011).

Ecologische studies zullen profiteren van kennis over de relatieve expressie van “reporter genen” voor specifieke milieucondities. Een voorbeeld van dergelijk werk was de studie van fosfaatlimitatie in zoetwater fytoplankton (Dignum *et al.*, 2004). Ons onderzoek heeft een lijst van potentieel interessante ‘reporter genen’ voor stikstof limitatie aan het licht gebracht. Genen die stikstof limitatie weergeven kunnen samen met andere reporter genen voor bijvoorbeeld P, C en Fe limitatie worden geprint op kleinschalige array platforms voor snelle evaluatie van limiterende factoren door eindgebruikers in de wereld van het waterbeheer. Het idee is om deze expressie arrays te combineren met probes voor biodiversiteit analyse, waardoor onderzoek naar de nutriënt limitatie van een leefmilieu kan worden gecombineerd met inzicht in de soortenrijkdom en seizoensgebonden veranderingen daarin. Dit soort data dragen naar alle waarschijnlijkheid bij aan een beter ‘early-warning’ systeem dat kan waarschuwen voor nabije veranderingen in de kwaliteit van het oppervlakte water, bijvoorbeeld om milieuomstandigheden aan te duiden die van voordeel zijn voor ongewenste soorten zoals de schadelijke cyanobacterie *Microcystis*.

In conclusie, dit proefschrift beschrijft hoe we deel hebben genomen aan het snel ontwikkelende gebied van de microarray analyse, vanaf de opkomst van deze techniek tot

---

een eerste waardevol produkt. Een nieuw ontwikkeld microarray platform maakte volledige genoom expressie studies van cyanobacteriën mogelijk. Dit leverde nieuwe inzichten op over de moleculaire en fysiologische aanpassingen van cyanobacteriën aan stikstof limitatie. In bredere zin draagt dit werk bij aan een beter begrip van de wijze waarop aquatische microorganismen omgaan met veranderingen in hun leefomgeving, en daarmee verschaft het een nieuwe blik op de intrigerende complexiteit van microbiëel leven in aquatische ecosystemen.

## Referenties

- Aguirre von Wobeser E (2010) Genome-wide expression analysis of environmental stress in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. PhD thesis. University of Amsterdam, the Netherlands
- Aguirre von Wobeser E, Ibelings BW, Bok J, Krasikov V, Huisman J, Matthijs HCP (2011) Concerted changes in gene expression and cell physiology of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 during transitions between nitrogen and light-limited growth. *Plant Physiol* **155**: 1445-1457
- Battchikova N, Vainonen JP, Vorontsova N, Keränen M, Carmel D, Aro EM (2010) Dynamic changes in the proteome of *Synechocystis* 6803 in response to CO<sub>2</sub> limitation revealed by quantitative proteomics. *J Proteome Res* **9**: 5896-5912
- Dignum M, Hoogveld HL, Matthijs HCP, Laanbroek HJ, Pel R (2004) Detecting the phosphate status of phytoplankton by enzyme-labelled fluorescence and flow cytometry. *FEMS Microbiol Ecol* **48**: 29-38
- Dühring U, Axmann I M., Hess WR, Wilde A (2006) An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene *isiA*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 7054-7058
- Eisenhut M, Aguirre von Wobeser E, Jonas L, Schubert H, Ibelings BW, Bauwe H, Matthijs HCP, Hagemann M (2007) Long-term response toward inorganic carbon limitation in wild type and glycolate turnover mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol* **144**: 1946-1959
- Gentleman R (2008) R programming for bioinformatics. Computer science and data analysis series. CRC Press, Boca Raton, USA
- Georg J, Voss B, Scholz I, Mitschke J, Wilde A, Hess WR (2009) Evidence for a major role of antisense RNAs in cyanobacterial gene regulation. *Mol Syst Biol* **5**: 305
- Georg J, Hess WR (2011) Regulatory RNAs in cyanobacteria: developmental decisions, stress responses and a plethora of chromosomally encoded cis-antisense RNAs. *Biol Chem* **392**: 291-297
- Gierga G, Voss B, Hess WR (2012) Non-coding RNAs in marine *Synechococcus* and their regulation under environmentally relevant stress conditions. *ISME J* doi: 10.1038/ismej.2011.215, Epub ahead of print
- Gnerre S, Maccallum I, Przybylski D, Ribeiro FJ, Burton JN, Walker BJ, Sharpe T, Hall G, Shea TP, Sykes S, Berlin AM, Aird D, Costello M, Daza R, Williams L, Nicol R, Gnirke A, Nusbaum C, Lander ES, Jaffe DB (2011) High-quality draft assemblies of mammalian genomes from massively parallel sequence data. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 1513-1518
- Görl M, Sauer J, Baier T, Forchhammer K (1998) Nitrogen-starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942: adaptation to long-term survival. *Microbiology* **144**: 2449-2458
- Hackenberg C, Engelhardt A, Matthijs HCP, Wittink F, Bauwe H, Kaplan A, Hagemann M (2009) Photorespiratory 2-phosphoglycolate metabolism and photoreduction of O<sub>2</sub> cooperate in high-light acclimation of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Planta* **230**: 625-637
- Hackenberg C, Huege J, Engelhardt A, Wittink F, Laue M, Matthijs HCP, Kopka J, Bauwe H, Hagemann M (2012) Low-carbon acclimation in carboxysome-less and photorespiratory mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Microbiology* **158**: 398-413

- Hahne F, Huber W, Gentleman R, Falcon S (2008) Bioconductor Case Studies. Use R! Series. Springer, New York, USA
- Hihara Y, Kamei A, Kanehisa M, Kaplan A, Ikeuchi M (2001) DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. *Plant Cell* **13**: 793-806
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirotsawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* **3**: 185-209
- Krasikov V, Aguirre von Wobeser E, Dekker HL, Huisman J, Matthijs HCP (2012) Time-series resolution of gradual nitrogen starvation and its impact on photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Physiol Plant* **145**: 426-439
- Lashkari DA, DeRisi JL, McCusker JH, Namath AF, Gentile C, Hwang SY, Brown PO, Davis RW (1997) Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 13057-13062
- Mitschke J, Georg J, Scholz I, Sharma CM, Dienst D, Bantscheff J, Voss B, Steglich C, Wilde A, Vogel J, Hess WR (2011) An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 2124-2129
- 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
- Pace NR (2009) Mapping the tree of life: progress and prospects. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 565-576
- Rajendhran J, Gunasekaran P (2011) Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiol Res* **166**: 99-110
- Sauer J, Schreiber U, Schmid R, Volker U, Forchhammer K (2001) Nitrogen starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942: low-level photosynthesis as a mechanism of long-term survival. *Plant Physiol* **126**: 233-243
- Schriek S, Aguirre von Wobeser E, Nodop A, Becker A, Ibelings BW, Bok J, Staiger D, Matthijs HCP, Pistorius EK, Michel KP (2008) Transcript profiling indicates that the absence of PsbO affects the coordination of C and N metabolism in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Physiol Plant* **133**: 525-543
- Smyth GK, Speed T (2003) Normalization of cDNA microarray data. *Methods* **31**: 265-273
- Smyth GK (2004) Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**: Article 3
- Smyth GK (2005) Limma: linear models for microarray data. In: Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor. Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W (eds.), Springer, New York, pp. 397-420
- Swarbreck D, Wilks C, Lamesch P, Berardini TZ, Garcia-Hernandez M, Foerster H, Li D, Meyer T, Muller R, Ploetz L, Radenbaugh A, Singh S, Swing V, Tissier C, Zhang P, Huala E (2008) The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Res* **36**: D1009-D1014
- Tuominen I, Pollari M, Aguirre von Wobeser E, Tyystjärvi E, Ibelings BW, Matthijs HCP, Tyystjärvi T (2008) Sigma factor SigC is required for heat acclimation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *FEBS Lett* **582**: 346-350
- Vijayan V, Jain IH, O'Shea EK (2011) A high resolution map of a cyanobacterial transcriptome. *Genome Biol* **12**: R47
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221-271
- Yeremenko N, Jeanjean R, Prommeenate P, Krasikov V, Nixon PJ, Vermaas WF, Havaux M, Matthijs HCP (2005) Open reading frame *ssr2016* is required for antimycin A-sensitive photosystem I-driven cyclic electron flow in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **46**: 1433-1436