

# **Charakterisierung von „compatible solute“- Synthesen in Cyanobakterien und Rotalgen**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Nadin Pade, geb. am 20.02.1985 in Eisenhüttenstadt

Rostock, September 2012

urn:nbn:de:gbv:28-diss2013-0124-0

---

**Betreuer:** Prof. Dr. Martin Hagemann

**Gutachter:** Prof. Dr. Martin Hagemann

Prof. Dr. Ulf Karsten

**Tag der Verteidigung:** 14.12.2012

---

---

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Pade, N., Compaoré, J., Klähn, S., Stal, L.J. und Hagemann, M.** (2012) The marine cyanobacterium *Crocospaera watsonii* WH8501 synthesizes the compatible solute trehalose by a laterally acquired OtsAB fusion protein. *Environ Microbiol*, **14**: 1261-1271.

**Ernst zunehmende Forschung erkennt man daran,**

---

---

**dass plötzlich zwei Probleme existieren  
wo es vorher nur eines gegeben hat.**

**Thorsten Bende Veblen**

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Unsere Erde - ein dynamisches System .....</b>	<b>1</b>
1.2	<b>Osmoadaptation &amp; Osmoregulation.....</b>	<b>2</b>
1.3	<b>„Compatible solutes“ - kleine Moleküle gegen Stress.....</b>	<b>3</b>
1.4	<b>Die Verbreitung von „compatible solutes“ .....</b>	<b>6</b>
1.5	<b>Osmoadaptation von Cyanobakterien am Beispiel von <i>Synechocystis</i> .....</b>	<b>7</b>
1.5.1	Synthese von Glucosylglycerol (GG).....	9
1.5.2	Synthese von Trehalose .....	10
1.6	<b>Osmoadaptation von Rotalgen .....</b>	<b>11</b>
1.6.1	Floridosid & Isofloridosid.....	12
1.7	<b>Biotechnologische Anwendung von „compatible solutes“.....</b>	<b>13</b>
1.8	<b>Zielsetzung dieser Arbeit.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>Material &amp; Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1	<b>Organismen.....</b>	<b>15</b>
2.1.1	Klonierungsstämme .....	15
2.1.2	Expressionsstämme.....	15
2.1.3	Hefestämme von <i>Pichia pastoris</i> .....	15
2.1.4	Stämme von <i>Synechocystis</i> PCC6803 .....	15
2.2	<b>Plasmide &amp; Oligonukleotide.....</b>	<b>16</b>
2.2.1	Plasmide .....	16
2.2.2	Oligonukleotide .....	16
2.3	<b>Medien .....</b>	<b>16</b>
2.3.1	Flüssigmedium zur Kultivierung von <i>Synechocystis</i> .....	16
2.3.2	Festmedium zur Kultivierung von <i>Synechocystis</i> .....	17
2.3.3	Flüssig- und Festmedium zur Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	17
2.3.4	Flüssigmedium zur Kultivierung von <i>Pichia pastoris</i> .....	19
2.3.5	Festmedium zur Kultivierung von <i>Pichia pastoris</i> .....	19
2.4	<b>Kultivierungsbedingungen.....</b>	<b>20</b>
2.4.1	Kultivierung von <i>Synechocystis</i> .....	20
2.4.2	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	20
2.4.2.1	Kultivierung von LMG194 mit pBAD/HisA + <i>otsAB</i> .....	20
2.4.3	Kultivierung von <i>Pichia pastoris</i> .....	20
2.5	<b>Molekularbiologische Techniken.....</b>	<b>21</b>

2.5.1	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Synechocystis</i> .....	21
2.5.2	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Pichia pastoris</i> .....	21
2.5.3	Isolierung von Plasmiden aus <i>Escherichia coli</i> .....	21
2.5.4	Isolierung von DNA - Fragmenten aus Agarosegelen .....	21
2.5.5	Isolierung von RNA .....	21
2.5.5.1	Isolierung von RNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	21
2.5.5.2	Isolierung von RNA aus <i>Pichia pastoris</i> .....	22
2.5.6	cDNA - Synthese.....	22
2.5.7	Konzentrationsbestimmung von RNA.....	22
2.5.8	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	23
2.5.9	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	23
2.5.10	Polymerase Kettenreaktion (PCR) für die <i>in vitro</i> Transkription .....	23
2.5.11	PCR Kolonie-Screening von <i>Escherichia coli</i> .....	24
2.5.12	Agarose - Gelelektrophorese .....	24
2.5.13	Formaldehyd - Gelelektrophorese der RNA .....	24
2.5.14	Aufreinigung von PCR - Produkten für die <i>in vitro</i> Transkription .....	25
2.5.15	Klonierung von PCR - Fragmenten.....	25
2.5.16	Ligation.....	25
2.5.17	Restriktion .....	25
2.5.18	<i>In vitro</i> Transkription .....	25
2.5.19	Aufreinigung der mRNA mittels Ammonium / Ethanol Fällung .....	26
2.5.20	DNA Sequenzierung .....	26
<b>2.6</b>	<b>Techniken zur Manipulation von Zellen .....</b>	<b>27</b>
2.6.1	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen.....	27
2.6.2	Herstellung kompetenter <i>Pichia pastoris</i> Zellen .....	27
2.6.3	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	27
2.6.4	Transformation von <i>Synechocystis</i> .....	28
2.6.5	Transformation von <i>Pichia pastoris</i> .....	28
<b>2.7</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.7.1	Proteinaufreinigung über verschiedene Säulenmaterialien .....	28
2.7.1.1	Proteinaufreinigung über eine Ni - NTA Matrix .....	29
2.7.1.2	Proteinaufreinigung über eine Strep -Tactin® Matrix.....	30
2.7.1.3	Proteinaufreinigung über eine Amylose Matrix .....	30
2.7.2	Isolation von rekombinanten Protein aus „inclusion bodies“ .....	31
2.7.2.1	Lösen des Proteins aus „inclusion bodies“ .....	31
2.7.2.2	Faltung der Proteine.....	31
2.7.3	Umpuffern von Proteinen .....	32
2.7.4	<i>In vitro</i> Translation („Bilayer method“) .....	32
2.7.5	Proteinbestimmung nach Bradford .....	33
2.7.6	Eindimensionale SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - PAGE).....	33

2.7.7	Coomassie - Färbung .....	34
2.7.8	Western Blot.....	34
2.7.9	Ponceaurot-Färbung .....	35
2.7.10	Enzymatische Messungen .....	35
2.7.10.1	OtsA und OtsAB aus <i>Crocospaera watsonii</i> .....	35
2.7.10.2	OtsB aus <i>Crocospaera watsonii</i> .....	36
2.7.10.3	Floridosid-/Isofloridosid-Synthase aus <i>Galdieria sulphuraria</i> .....	37
<b>2.8</b>	<b>Analytische Methoden .....</b>	<b>37</b>
2.8.1	Nachweis niedermolekularer Substanzen aus Zellkulturen mittels Gas- chromatographie .....	37
2.8.1	Nachweis der Reaktionsprodukte mittels Gaschromatographie.....	37
2.8.2	Gaschromatographische Analysen .....	38
2.8.3	Gaschromatographische-massenspektrometrische Analysen .....	38
<b>2.9</b>	<b>Chemikalien &amp; Enzyme .....</b>	<b>38</b>
<b>2.10</b>	<b>Software und Datenbanken .....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b><i>Crocospaera watsonii</i> (WH8501) .....</b>	<b>40</b>
3.1.1	<i>In silico</i> Sequenzanalysen .....	40
3.1.2	Heterologe Expression von OtsAB aus <i>Crocospaera watsonii</i> .....	43
3.1.2.1	„Full-length“ Protein.....	43
3.1.2.2	„Full-length“ Protein - Aufreinigung aus „inclusion bodies“ .....	44
3.1.2.3	„Full-length“ Protein - variierende Expressionsbedingungen.....	44
3.1.2.4	„Full-length“ Protein - Enzymatische Analysen .....	46
3.1.2.5	„Truncated“ Proteine .....	48
3.1.2.6	„Truncated“ Proteine - Heterologe Expression .....	50
3.1.2.7	„Truncated“ Proteine - Aufreinigung aus „inclusion bodies“.....	51
3.1.2.8	„Truncated“ Proteine mit großen Affinitäts -„tags“ - Klonierungsprinzip .....	51
3.1.2.9	„Truncated“ Proteine mit großen Affinitäts -„tags“ - Heterologe Expression .....	52
3.1.2.10	Biochemische Charakterisierung der OtsA - und OtsB - Domäne.....	53
3.1.3	Komplementation salzsensitiver Mutanten .....	55
3.1.3.1	Komplementation von $\Delta ggpS::Sm$ .....	55
3.1.3.2	Komplementation <i>E. coli</i> Mutante FF4169 (MC4100 <i>otsA1::Tn10</i> )...	58
<b>3.2</b>	<b>Floridosid-/Isofloridosid-Synthase in <i>Galdieria sulphuraria</i> .....</b>	<b>59</b>
3.2.1	<i>In silico</i> Sequenzanalysen .....	59
3.2.2	Gensynthese putativer Floridosid-/Isofloridosid-Synthasen „by Mr. Gene“ .....	62
3.2.3	Expressionsstudien in prokaryotischen Expressionssystemen .....	62
3.2.3.1	„Full-length“ Proteine.....	63

3.2.3.2	Expression von „Truncated“ Proteinvarianten in <i>E. coli</i> .....	66
3.2.4	Expressionsstudien in eukaryotischen Expressionssystemen .....	68
3.2.4.1	<i>In silico</i> Analysen .....	68
3.2.4.2	Klonierungsstrategie .....	69
3.2.4.3	Transformation und Überprüfung des Mut-Phänotyps.....	70
3.2.4.4	Heterologe Expression in Hefe .....	72
3.2.4.5	RNA Isolierung .....	73
3.2.5	Zellfreie ( <i>in vitro</i> ) Expressionssysteme .....	74
3.2.1	Komplementation salzsensitiver <i>Synechocystis</i> Mutanten mit <i>GS10960</i> und <i>GS26940</i> .....	78
3.2.1.1	Komplementation von $\Delta$ <i>ggpS</i> ::Sm .....	78
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>80</b>
<b>4.1</b>	<b>Proteinfamilie der Glycosyltransferasen .....</b>	<b>80</b>
<b>4.2</b>	<b>Expressionsproblematik.....</b>	<b>82</b>
<b>4.3</b>	<b>OtsAB Fusionsprotein aus <i>Crocospaera watsonii</i> .....</b>	<b>84</b>
4.3.1	Horizontaler Gentransfer des OtsAB Fusionsproteins aus <i>C. watsonii</i> .....	86
<b>4.4</b>	<b>Floridosid-/Isofloridosid-Synthese in Rotalgen .....</b>	<b>88</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>114</b>
<b>9</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>115</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>116</b>
<b>11</b>	<b>Publikationen &amp; Tagungsbeiträge .....</b>	<b>117</b>



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Auswirkungen von hyper - oder hypotonischen Umweltbedingungen .....	1
Abbildung 2:	Model des „präferentiellen Ausschlusses“ .....	4
Abbildung 3:	Übersicht der chemisch strukturellen Hauptgruppen der „compatible solutes“ .....	5
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der 5 Phasen der Salzakklimation in <i>Synechocystis</i> im zeitlichen Verlauf nach einem Salzschock .....	8
Abbildung 5:	Cyanobakterielle Biosynthese von Glucosylglycerol .....	9
Abbildung 6:	Die fünf bekannten Biosynthesewege von Trehalose .....	10
Abbildung 7:	Ausschnitt des Alignments von OtsAB aus <i>C. watsonii</i> und nah verwandten Proteinen.....	41
Abbildung 8:	Phylogenetische Analysen des putativen OtsAB Proteins aus <i>C. watsonii</i> .....	42
Abbildung 9:	Heterologe Expression von OtsAB aus <i>C. watsonii</i> .....	43
Abbildung 10:	Aufreinigung von OtsAB aus "inclusion bodies" .....	44
Abbildung 11:	Heterologe Aufreinigung von <i>C. watsonii</i> OtsAB aus <i>E. coli</i> .....	46
Abbildung 12:	Analyse der Reaktionsprodukte der Enzymtests zur Charakterisierung von <i>C. watsonii</i> OtsAB .....	47
Abbildung 13:	Genlokalisierung von OtsAB und der putativen Glycosyl Hydrolase in den Genomen von <i>Crocospaera watsonii</i> (A) und <i>Microscilla marina</i> (B).....	48
Abbildung 14:	Amplifizierung der getrennten Domäne für <i>otsA</i> und <i>otsB</i> aus <i>C. watsonii</i> .....	49
Abbildung 15:	Screening vieler plasmidtragender <i>E. coli</i> -Klone mit <i>otsA</i> bzw. <i>otsB</i> Domänen aus <i>C. watsonii</i> .....	49
Abbildung 16:	Restriktionskontrolle der Plasmide mit <i>otsA</i> bzw. <i>otsB</i> Domäne aus <i>C. watsonii</i> .....	50
Abbildung 17:	Exemplarische Überprüfung der heterologen Expression von OtsA und OtsB aus <i>C. watsonii</i> .....	50
Abbildung 18:	Aufreinigung OtsA und OtsB aus "inclusion bodies" .....	51
Abbildung 19:	Restriktionskontrolle der Expressionsplasmide zur Erzeugung von MalE-Fusionsproteinen .....	52
Abbildung 20:	Aufreinigung des Fusionsproteins OtsB-MalE und OtsA-MalE .....	53
Abbildung 21:	Biochemische Charakterisierung der OtsB Domäne aus <i>C. watsonii</i> .....	54
Abbildung 22:	Biochemische Charakterisierung der OtsB Domäne aus <i>C. watsonii</i> .....	54
Abbildung 23:	Verifizierung des Genotyps mit dem <i>otsAB</i> -Gen aus <i>C. watsonii</i> komplementierten $\Delta ggpS::Sm$ Mutante von <i>Synechocystis</i> PCC6803 .....	55
Abbildung 24:	Gaschromatographische Analyse von <i>Synechocystis</i> PCC6803 Stämmen mit und ohne <i>otsAB</i> Expression .....	57
Abbildung 25:	Überprüfung des Phänotyps auf Minimal Medium mit und ohne Natriumchlorid .....	58
Abbildung 26:	Vergleich der Synthese verschiedener „compatible solutes“ .....	59
Abbildung 27:	Charakteristische Domänen der Gene <i>GS10960</i> und <i>GS26940</i> .....	60

Abbildung 28: Phylogenetische Analysen der putativen Floridosid-/Isofloridosid-Synthasen aus <i>Galdieria sulphuraria</i> .....	61
Abbildung 29: Vektorkarten der von „Mr. Gene“ hergestellten Plasmide mit den Genen <i>GS10960</i> bzw. <i>GS26940</i> aus <i>Galdieria sulphuraria</i> .....	62
Abbildung 30: Restriktion des <i>GS26940</i> Gens aus dem Synthesevektor und Kontrollrestriktion aus dem Expressionsvektor .....	63
Abbildung 31: Expression von <i>GS10960</i> in <i>E. coli</i> mit dem pET28a Vektor .....	64
Abbildung 32: Nachweis intakter mRNA für <i>GS10960</i> aus <i>Galdieria sulphuraria</i> in <i>E. coli</i> .....	66
Abbildung 33: Überprüfung der Klone zur Expression von den <i>Galdieria sulphuraria</i> -Domänen mittels Kontrollrestriktion.....	67
Abbildung 34: Heterologe Expression der Phosphatase- und der Synthase-Domäne aus <i>GS10960</i> .....	67
Abbildung 35: Codonnutzung der Gene aus <i>Galdieria sulphuraria</i> .....	69
Abbildung 36: Amplifizierung, Screening und Restriktion zur Expression der Proteine aus <i>G. sulphuraria</i> in <i>P. pastoris</i> .....	69
Abbildung 37: Kolonie - PCR und Restriktion von Expressionsplasmiden mit den Proteinen aus <i>G. sulphuraria</i> .....	70
Abbildung 38: Amplifizierung von <i>GS10960</i> aus chromosomaler DNA rekombinanter <i>P. pastoris</i> Zellen .....	70
Abbildung 39: Schematische Darstellung der Insertion des Plasmids pPICZαA in den intakten <i>AOX1</i> Locus.....	71
Abbildung 40: Überprüfung des Mut Phänotyps von <i>GS10960</i> Transformanden in <i>P. pastoris</i> .....	72
Abbildung 41: Expression von <i>GS10960</i> in <i>P. pastoris</i> mit dem pPICZαA Vektor.....	73
Abbildung 42: Nachweis intakter mRNA für die Rotalgengene in <i>P. pastoris</i> .....	74
Abbildung 43: Nachweis der erfolgreichen Amplifizierung des Templates für die <i>in vitro</i> Transkription .....	75
Abbildung 44: <i>In vitro</i> Translation von <i>GS10960</i> mit Hilfe des „wheat germ expressionsystem“ .....	75
Abbildung 45: Gaschromatographische und massenspektrometrische Analyse der Reaktionsprodukte aus dem Enzymtest mit dem <i>in vitro</i> translatiertem <i>GS10960</i> Protein aus <i>G. sulphuraria</i> .....	77
Abbildung 46: Verifizierung der mit den <i>GS10960</i> / <i>GS26940</i> Genen aus <i>G. sulphuraria</i> komplementierten $\Delta$ <i>ggpS</i> ::Sm Mutante von <i>Synechocystis</i> PCC6803 .....	78
Abbildung 47: Gaschromatographische und massenspektrometrische Analyse des Zellextrakts der mit dem <i>GS10960</i> Gen aus <i>G. sulphuraria</i> komplementierten $\Delta$ <i>ggpS</i> ::Sm Mutante von <i>Synechocystis</i> PCC6803 .....	79
Abbildung 48: $S_N1$ / $S_N2$ -ähnlicher Reaktionsmechanismus der $\alpha$ -1,3-Fucosyltransferase V.....	80
Abbildung 49: Faltungstypen von Glycosyltransferasen.....	81

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Von verschiedenen Organismen akkumulierte „compatible solutes“ .....	6
Tabelle 2:	PCR-Programm für die Amplifizierung des Templates für die <i>in vitro</i> Transkription ...	24
Tabelle 3:	Zusammensetzung des Transkriptionsansatzes .....	26
Tabelle 4:	Zusammensetzung des Translationsansatzes .....	32
Tabelle 5:	Zusammensetzung des Trenn - und Sammelgels.....	33
Tabelle 6:	Variierende Expressionsbedingungen und deren konkrete Umsetzung .....	45
Tabelle 7:	Variierte Expressionsbedingungen für GS10960 und GS26940 und deren konkrete Umsetzung.....	65
Tabelle A1:	Verwendete Klonierungsstämme von <i>Escherichia coli</i> .....	106
Tabelle A2:	Verwendete Expressionsstämme von <i>Escherichia coli</i> .....	106
Tabelle A3:	Verwendete Hefestämme von <i>Pichia pastoris</i> .....	106
Tabelle A4:	Verwendete Stämme von <i>Synechocystis</i> PCC6803 .....	107
Tabelle A5:	Verwendete Plasmide.....	107
Tabelle A6:	Verwendete Chaperon Plasmide.....	107
Tabelle A7:	Verwendete Oligonukleotide für Sequenzierungen .....	108
Tabelle A8:	Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der <i>Crocospaera watsonii</i> Konstrukte.....	109
Tabelle A9:	Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der GS10960 und GS26940 Konstrukte.....	110
Tabelle A10:	Verwendete Oligonukleotide für den Nachweis von cDNA aus GS10960 und GS26940.....	111
Tabelle A11:	Verwendete Oligonukleotide für die <i>in vitro</i> Transkription.....	111
Tabelle A12:	Accession Nummern und ORF Namen der Enzyme, die putativ in der Trehalose Synthese involviert sind.....	112
Tabelle A13:	Accession Nummern und ORF Namen der Enzyme, die putativ in der Trehalose bzw. in der Floridosid-/Isofloridosid-Synthese involviert sind.....	113

**Abkürzungsverzeichnis**

$\mu\text{mol g}^{-1}$	Mikromol je Gramm
ADP	Adenosindiphosphat
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
BLASTp	„Basic Local Alignment Search Tool“ für Proteine
Bp	Basenpaare
BSA	engl. für: „Bovine Serum Albumin“ (Rinderserumalbumin)
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i> ,	lat. für : und andere
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
GG	Glucosylglycerol
GgpS	Glucosylglycerolphosphat-Synthase
IPTG	Isopropyl-b-D-1-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	Marker
M	molar (Mol je Liter)
mM	millimolar (Millimol je Liter)
Ni-NTA	Nickel-Trinitrioloessigsäure
nM	Nanometer
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm gemessen
ORF	engl. für: „open reading frame“ (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCC	engl. für: „Pasteur Collection of Cyanobacteria“
PCR	engl für: „Polymerase Chain Reaction“ (Polymerase Kettenreaktion)
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Spezies
Strep	Streptomycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	engl. für: „untranslated region“ (nicht translatierter Bereich)
w/v	engl. für: „weight per volume“
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Unsere Erde - ein dynamisches System

Viele Lebewesen sind in ihrem natürlichen Lebensraum sich ständig schwankenden Umweltbedingungen ausgesetzt. Diese Veränderungen äußerer Bedingungen (Stressoren) führen zu einer Reaktion des Lebewesens, die letztlich zur Bewältigung besonderer Anforderungen befähigt. Stress hat aber auch eine evolutive Wirkung, mit der Folge, dass Belastungen besser ertragen und Stresstoleranzen entwickelt werden. Demnach kann Stress einen Teil zur Adaptation des einzelnen Individuums und damit zur Artentwicklung beitragen. Neben der evolutiven Anpassung unterscheidet man darüber hinaus auch die physiologische Anpassung (Akklimation), um den zellulären Metabolismus in einem Fließgleichgewicht zu halten (Homöostase). Dafür sind schnelle, flexible und effektive Anpassungsmechanismen notwendig, um auf Veränderungen in der Umwelt gezielt zu reagieren und um Habitate erfolgreich besiedeln zu können. Zu den möglichen Umweltfaktoren in unserer Natur zählen beispielsweise die Verfügbarkeit von Nährstoffen, der pH-Wert, die Temperatur, sowie Schwankungen in der Osmolarität, bedingt durch wechselnde Ionenzusammensetzung bzw. Wasserverfügbarkeit (Morbach und Krämer, 2002). Eine besondere Bedeutung kommt dem Stress durch hohe oder wechselnde Osmolaritäten zu, da die Weltmeere und andere salzbelastende Lebensräume über 70 % der Erdoberfläche einnehmen (Sommer, 1998). Während sich das Meerwasser durch eine recht einheitliche Salzkonzentration von etwa 35 ‰ auszeichnet, unterliegen andere Bereiche enormen Schwankungen. Zum einen findet man in den tropischen und subtropischen Randmeeren infolge starker Verdunstung und geringerem Wasseraustausch eine leicht erhöhte Salzkonzentration. Zum anderen weisen manche Randmeere, wie die Ostsee und die Hudson Bay, oder auch die zufließenden Flüsse, stark reduzierte Salzkonzentrationen von um die 0,3 ‰ auf (Wittig und Streit, 2004). Die Problematik, stark schwankender Osmolarität findet man aber auch in terrestrischen Ökosystemen. Mikroorganismen, die die oberen Bodenschichten besiedeln, sind ständig wechselnden osmotischen Verhältnissen ausgesetzt, die im Zuge von Austrocknung oder Niederschlägen entstehen (Galinski und Trüper, 1994; Ventosa *et al.*, 1998) (Abb. 1).

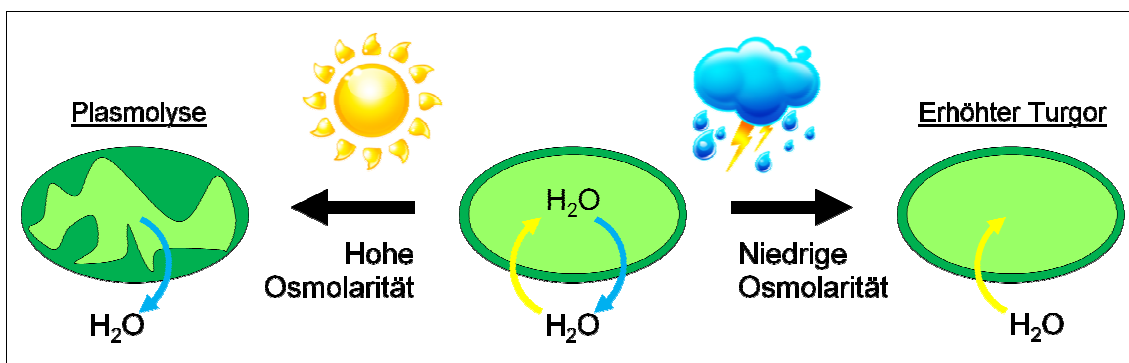


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Auswirkungen von hyper - oder hypotonischen Umweltbedingungen

Somit wird deutlich, dass der abiotische Umweltfaktor „Salinität“ einen großen Einfluss auf die Lebensräume und deren Besiedlung hat. Allerdings stellen nicht nur die hohen, sondern vor allem die

schwankenden Salzkonzentrationen für die Individuen des jeweiligen Lebensraumes eine Herausforderung dar. Der daraus resultierende Salzstress stellt darüber hinaus die Kombination zweier Stressoren dar. Zum einen ist das Wasserpotential gering und zum anderen übt die hohe Ionenkonzentration einen negativen Effekt auf den Metabolismus der Zelle aus. Das Wasserpotential ist eine thermodynamische Größe für die Wassersättigung eines Systems, wobei zwischen Systemen mit unterschiedlichen Wasserpotentialen ein Wassertransport zum System mit dem niedrigsten Wasserpotential hin verläuft. Definiert ist dieses als das chemische Potential des Wassers dividiert durch das molare Volumen (Scheffer *et al.*, 1992). Zur Wasseraufnahme muss in der Zelle demnach ein Wasserpotentialgradient zur Umwelt erschaffen und aufrechterhalten werden. Durch Wasseraufnahme entsteht auch ein Zellinnendruck (Turgor), der in Bakterien- und Pflanzenzellen nicht nur die Gestalt bestimmt sondern auch das Wachstum antreibt. Die Verfügbarkeit von Wasser ist daher von sehr hoher Bedeutung, da es das Leben und das Überleben von Zellen in entscheidendem Maße mitbestimmt (Potts, 1994). Das bedeutet demnach, dass Änderungen in der externen Osmolarität, (z.B. durch Trockenheit, Kälte, Wasserstress oder Ionenstress) mit einem osmotisch bedingten Wasserverlust oder mit Wasseraufnahme einhergehen. In der Konsequenz führt dies entweder zur Plasmolyse oder zum Platzen der Zellen unter hypotonen Bedingungen (Abb. 1). Um diese negativen Effekte zu vermeiden, ist eine Zelle immer darauf bedacht, das interne Wasserpotential konstant zu halten. Bei Schwankungen im Medium ist das Ziel der zellulären Akklimation das zelluläre Wasserpotential unter dem des externen Milieus einzustellen, um die Wasseraufnahme und den Turgor aufrecht zu erhalten (Galinski und Trüper, 1994; Kempf und Bremer, 1998; Poolman und Glaasker, 1998).

## 1.2 Osmoadaptation & Osmoregulation

Um osmotische Veränderungen und deren Konsequenzen auf zellulärer Ebene bewältigen zu können, haben Zellen effektive Mechanismen zur Osmoadaptation entwickelt. Sie müssen in der Lage sein osmotische Veränderungen zu sensieren und diese in korrespondierende Signale umzuwandeln. Dazu zählt die Aktivierung von Transportvorgängen, enzymatischen Funktionen oder Änderungen der Genexpression (Morbach und Krämer, 2002).

Die Salzanpassung auf zellulärer Ebene kann durch zwei verschiedene Strategien erfolgen. Zum einen durch die „salt-in-strategy“ und zum anderen durch die „salt-out-strategy“. Die „salt-in-strategy“ wird vor allem von extrem halophilen Organismen genutzt. Hierzu zählen die aeroben, extrem halophilen Archaea der Ordnung *Halobacteriales* (Galinski und Trüper, 1994), die anaeroben, halophilen Bakterien der Ordnung *Halanaerobiales* (Oren, 1992) und ein extrem halophiler Vertreter, *Salinibacter ruber* (Oren und Mana, 2002). Diese Strategie zeichnet sich durch die intrazelluläre Akkumulation von Kalium- und Chloridionen aus (Galinski und Trüper, 1994; Ventosa *et al.*, 1998), die es letztlich den Organismen erlaubt, Salzkonzentrationen bis hin zur Sättigung zu tolerieren (Müller und Oren, 2003). Das bedeutet, dass der gesamte Metabolismus, alle regulatorischen und metabolischen Funktionen, an die hohen Salzkonzentrationen angepasst sein muss (Galinski und Trüper, 1994). Diese weitgehenden Adaptationen wurden nur in wenigen Fällen erfolgreich etabliert, daher sind Vertreter der „salt-in-strategy“ auf wenige ökologische Nischen beschränkt.

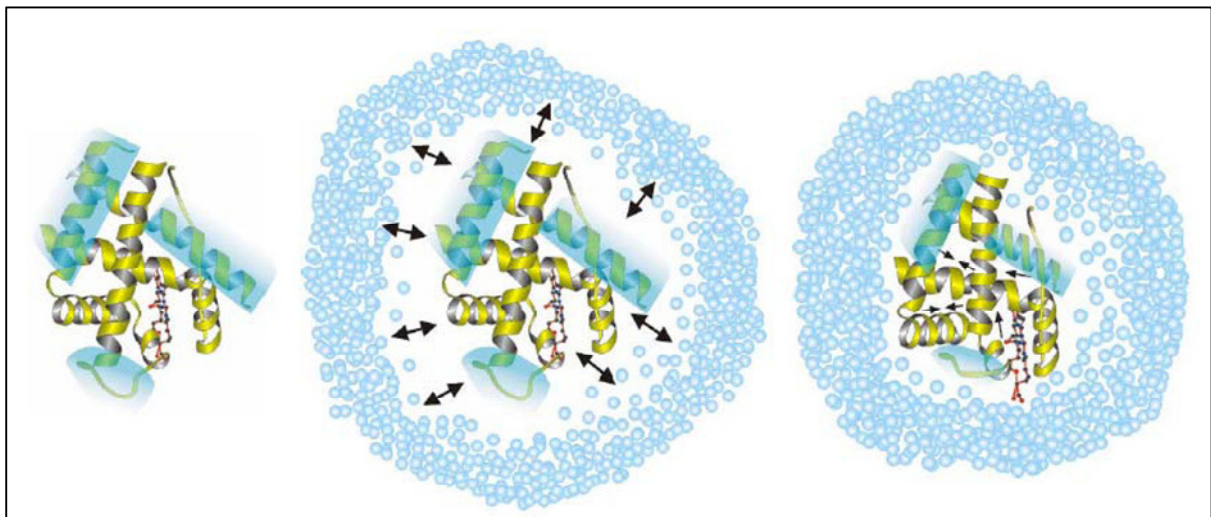
Die meisten Lebewesen, dazu zählen beispielsweise Bacteria, Archaea (Galinski und Trüper, 1994), Pilze, sowie pflanzliche, tierische und menschliche Zellen (Mc Neil *et al.*, 1999; Hohmann, 1997, Burg *et al.*, 1997), nutzen die sogenannte „salt-out-strategy“. Bei dieser Strategie wird die interne Ionenkonzentration auf einem niedrigen und konstanten Level gehalten. Nach einer Erniedrigung des Wasserpotentials durch Erhöhung externer Salzkonzentrationen werden durch aktive Transportvorgänge eindringende anorganische Ionen aus dem Cytoplasma exportiert. Neben diesen Transportprozessen kommt es zur Akkumulation niedermolekularer Verbindungen, den „compatible solutes“ (Bremer und Krämer, 2000). Viele Mikroorganismen sind neben der endogenen Synthese dieser Stoffe auch in der Lage diese Osmolyte aus der Umgebung aufzunehmen. Derartige Verbindungen werden entweder von anderen Organismen in die Umgebung abgegeben oder sie entstehen durch Abbauprozesse mikrobieller, pflanzlicher und tierischer Zellen, oder durch Wurzelexudation und Exkretion (Bremer und Krämer, 2000). Für die Aufnahme von Osmolyten gibt es zahlreiche Transporter, die darüber hinaus auch eine hohe Spezifität zu den transportierenden Verbindungen aufweisen. Beispielsweise sind die Transporter ProP, ProU und BetT aus *Escherichia coli* (Lucht und Bremer, 1994; Bremer und Krämer, 2000), BetP, EctP und ProP aus *Corynebacterium glutamicum* (Farwick *et al.*, 1995; Peter *et al.* 1998b) oder OpuABC aus *Lactococcus lactis* (van der Heide und Poolman, 2000) sehr gut untersuchte Transportsysteme für die „compatible solutes“ Prolin, Glycinbetain bzw. Ectoin.

### 1.3 „Compatible solutes“ - kleine Moleküle gegen Stress

Die funktionelle Gruppe der „compatible solutes“ wurde vor etwa 35 Jahren geprägt. Der Name „compatible solute“ impliziert, dass es sich hierbei um kleine organische Verbindungen handelt, die eine geringe molare Masse besitzen. Bei physiologischen pH-Wert sind „compatible solutes“ in der Regel elektrisch neutral. Darüber hinaus zeichnen sie sich durch eine hohe Löslichkeit in Wasser aus. Aufgrund dieser Eigenschaften besteht eine sehr geringe Interferenz mit dem zellulären Metabolismus (Brown, 1976). Somit können „compatible solutes“ bis zu molaren Konzentrationen akkumuliert werden, um das zelluläre Wasserpotential zu verringern (Kempf und Bremer, 1998) Dabei werden zelluläre Funktionen, wie DNA-Replikation, DNA-Proteininteraktion und Stoffwechselaktivitäten, nicht negativ beeinträchtigt (Record *et al.*, 1998). In der einfachsten Form besagt demnach die „compatible solute“-Hypothese, dass diese Stoffe beliebig austauschbar sind. Das heißt, dass eine Zelle durch eine Vielzahl von osmotisch aktiven Substanzen geschützt werden kann, unabhängig davon, ob diese unter normalen Bedingungen genutzt werden oder nicht (Yancey, 2005). Diese Hypothese wird durch die folgenden Experimente gestützt: Das Wachstum von *E. coli* in Gegenwart von Salz kann von zahlreichen Osmolyten im Medium, die das Bakterium unter Standardbedingungen nicht nutzt aber transportieren kann, verbessert werden (Hanson *et al.*, 1991). Das bedeutet, dass „compatible solutes“ entweder aus der Umgebung, beispielsweise aus dem Wachstumsmedium, aufgenommen oder mittels *de novo* Synthese in der Zelle akkumuliert werden können (Galinski und Trüper, 1994; Poolman und Glaasker, 1998). Bei vielen Bakterien wird die Aufnahme der Neusynthese bevorzugt, da dieser Vorgang schneller und energetisch günstiger ist (Oren, 1999). Durch die Akkumulation von osmotisch aktiven Substanzen in salzgestressten Zellen kann die Differenz im Wasserpotential ausgeglichen und der Turgor aufrechterhalten werden.

Neben der Aufgabe, die Zelle vor einem Wasserverlust zu bewahren, dienen „compatible solutes“ unter anderem auch als Stabilisatoren zum direkten Schutz der Aktivitäten von Enzymen, Membrankomplexen oder Membranstrukturen (protektive Wirkung) (Luzardo *et al.*, 2000; Borges *et al.*, 2002). Diese direkte Schutzwirkung erklärt auch, dass diese Stoffe Zellen und Makromoleküle vor hohen Temperaturen und ständigen Gefrier- und Auftauprozessen schützen können (Welsh, 2000; Brown, 1976; Galinski und Trüper, 1994). Auch bei der Neufaltung von Proteinen kann den „compatible solutes“ eine unterstützende Wirkung zugesprochen werden. Daher werden sie auch manchmal als niedermolekulare Chaperone bezeichnet (Diamant *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zur osmotischen Funktion der „compatible solutes“ ist die Schutzfunktion schwieriger zu verstehen, da eine direkte Interaktion dieser Substanzen mit Makromolekülen eher gering ist. Daher wird angenommen, dass die Schutzwirkung auf der Veränderung der Wasserstruktur beruht. Für die Erklärung der Schutzfunktion von „compatible solutes“ dient das Modell des „präferentiellen Ausschlusses“ (Arakawa und Timasheff, 1985).



**Abbildung 2: Model des „präferentiellen Ausschlusses“**

Abbildung A zeigt das Protein im nativen, gefalteten Zustand, in Abwesenheit von Stress. (B) Das Protein befindet sich im gestressten Zustand, wobei es seine native Struktur verliert und denaturiert. Die „compatible solutes“ sind in hellblau dargestellt und werden von der Hydrathülle des Proteins verdrängt. Folglich kommt es zur Ungleichverteilung der „compatible solutes“ im Raum. Da es sich hierbei um eine thermodynamisch ungünstige Situation handelt, (C) wird das Protein in seiner nativen Struktur gestärkt und stabilisiert (Arakawa und Timasheff, 1985; Bolen und Baskakov, 2001) (Bildquelle: Biotop AG, Witten)

„Compatible solutes“ stabilisieren die native Struktur von Proteinen durch präferentielle Hydratierung der Proteinoberfläche. Aufgrund dieser Interaktion kommt es letztlich zum Ausschluss der „compatible solutes“ aus der direkten Hydrathülle des Proteins, wobei die native tertiäre und quaternäre Struktur der Proteine stabilisiert wird (Abb. 2) (Arakawa und Timasheff, 1985; Timasheff, 1998; Bolen und Baskakov, 2001). Dadurch wird das frei werdende Wasser in die Richtung anderer Makromoleküle dirigiert, die dann durch den Erhalt der Hydrathülle vor Denaturierung geschützt sind (Record *et al.*, 1998; Wood, 1999; Bremer und Krämer, 2000). Dagegen stören anorganische Ionen in der Regel die



Hydrathülle und rufen eine Denaturierung der Proteine hervor (Bremer und Krämer, 2000). Daneben kann den „compatible solutes“ auch eine unterstützende Wirkung bei der Neufaltung von Proteinen zugesprochen werden (Diamant *et al.*, 2001).

„Compatible solutes“ lassen sich, aufgrund ihrer chemischen Struktur, in verschiedene Gruppen einteilen. Die erste Gruppe besteht aus den Zuckern, mit Trehalose oder Saccharose als typische Vertreter. Die zweite Gruppe bilden die Aminosäuren und deren Derivate, wie Prolin, Glycinbetain, Glutamat oder Ectoin. Eine weitere große Gruppe bilden die Polyole, deren Strukturen sehr reich an Hydroxylgruppen sind, wie bei Glycerol, Sorbitol oder Mannitol. Die Gruppe der Heteroside bildet eine hybride Struktur aus Polyolen und Zuckern, mit Glucosylglycerol, Galactosylglycerol oder Floridosid als prominente Beispiele. Im Pflanzenreich weniger vertreten, aber unter Tieren weitverbreitet sind zum einen Methylamine, mit Trimethylaminoxid (TMAO) und zum anderen die Dimethyl-Sulphonium-Verbindungen mit Dimethylsulfonylpropionat (DMSP) als Hauptvertreter (Brown, 1976; 1990; Csonka, 1989; Yancey, 2005) (Abb. 3).

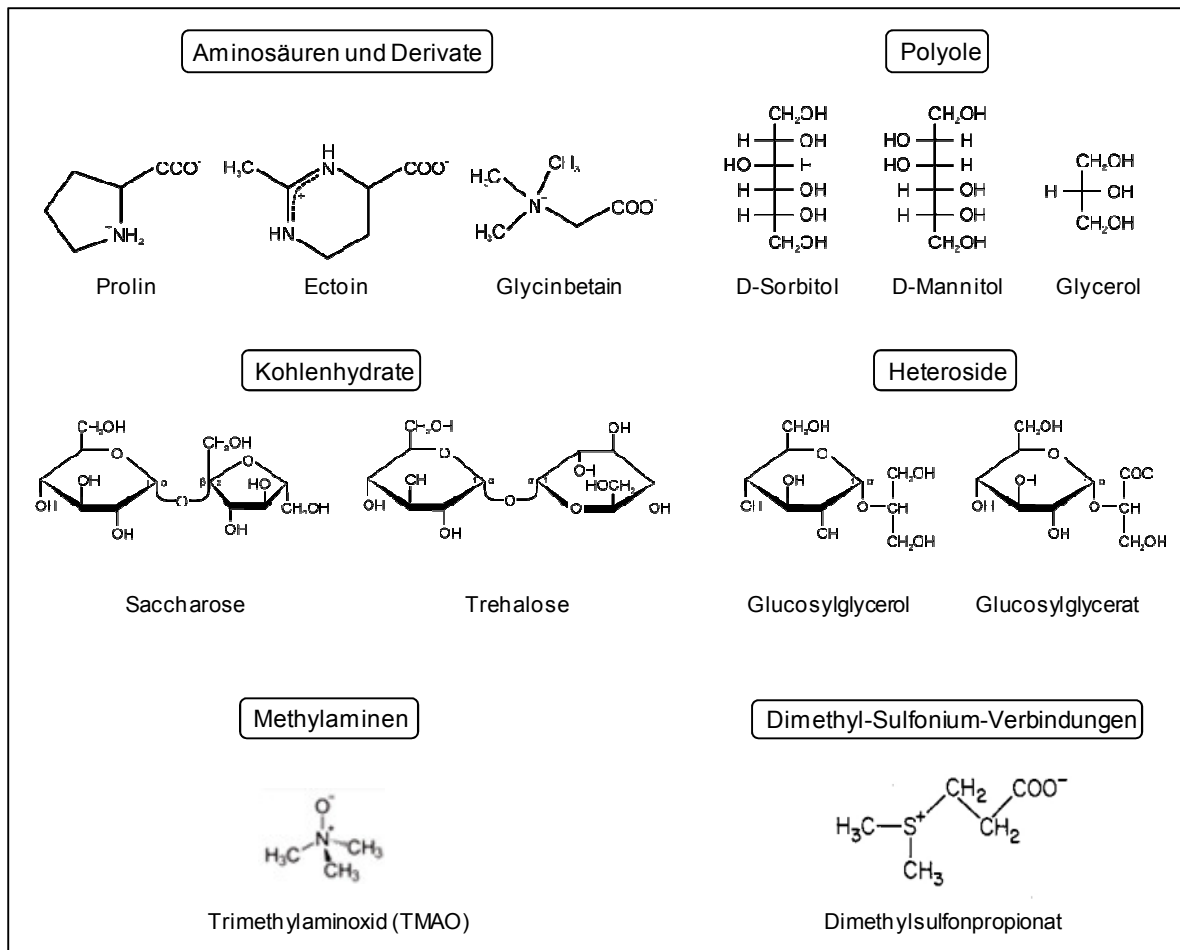


Abbildung 3: Übersicht der chemisch strukturellen Hauptgruppen der „compatible solutes“

## 1.4 Die Verbreitung von „compatible solutes“

„Compatible solutes“ findet man in allen drei Domänen des Lebens: Archaea, Bacteria und Eukarya. Eine kleine Auswahl verschiedener Osmolyte, die von den verschiedenen Vertretern genutzt werden, ist in der Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: Von verschiedenen Organismen akkumulierte "compatible solutes"**

<b>Organismus</b>	<b>„compatible solute“</b>	<b>Referenz</b>
<b>Cyanobakterien</b>	Saccharose / Trehalose	Reed <i>et al.</i> , 1985
	Glucosylglycerol	Borowitzka <i>et al.</i> , 1980
	Glucosylglycerat	Klähn <i>et al.</i> , 2010
	Glycinbetain	Fulda <i>et al.</i> , 1999; Mackay <i>et al.</i> , 1984
	Glutamatbetain	Mackay <i>et al.</i> , 1984
<b>Heterotrophe Bakterien</b>	Glutamat	
	Nε - Acetyl - β - Lysin	Triadó-Margarit <i>et al.</i> , 2011
	Prolin	Belitsky <i>et al.</i> , 2001
	Glycinbetain	Imhoff und Rodriguez-Valera, 1984
	Trehalose	Csonka, 1989
Ectoin / Hydroxyectoin	Ventosa <i>et al.</i> , 1998; Roberts, 2005	
<b>Hefe</b>	Glycerol	Larsson <i>et al.</i> , 1990
	Arabitol	Larsson <i>et al.</i> , 1990
	Sorbitol	Shen <i>et al.</i> , 1999
	Trehalose	Meikle <i>et al.</i> , 1988
<b>Archaea</b>	Glycinbetain	Robertson <i>et al.</i> , 1990
	Nε - Acetyl - β - Lysin	Spanheimer und Müller, 2008
	β - Glutamat	Robertson <i>et al.</i> , 1990
<b>Sulfat reduzierende Bakterien</b>	Trehalose	Welsh <i>et al.</i> , 1996
	Glycinbetain	Welsh <i>et al.</i> , 1996
	Nε - Acetyl - β - Lysin	Triadó-Margarit <i>et al.</i> , 2011
<b>Phototrophe Bakterien</b>	Saccharose / Trehalose	Welsh und Herbert, 1993; Severin <i>et al.</i> , 1992
	Glycinbetain	Welsh und Herbert, 1993; Severin <i>et al.</i> , 1992
	Ectoin / Hydroxyectoin	Severin <i>et al.</i> , 1992
	N - Acetylglutaminylglutamin Amid	Welsh und Herbert, 1993; Severin <i>et al.</i> , 1992
<b>Algen</b>	Saccharose	Kirst und Bisson, 1979; Kirst <i>et al.</i> , 1988
	Glycerol	Ginzburg, 1987
	Mannitol	Reed <i>et al.</i> , 1980; Kirst und Bisson, 1979
	Prolin	Schobert, 1980
	Glycinbetain	Dickson und Kirst, 1986
	Dimethylsulfoniopropionat	Dickson und Kirst, 1986
	Floridosid / Isofloridosid	Reed <i>et al.</i> , 1980; Kauss, 1977

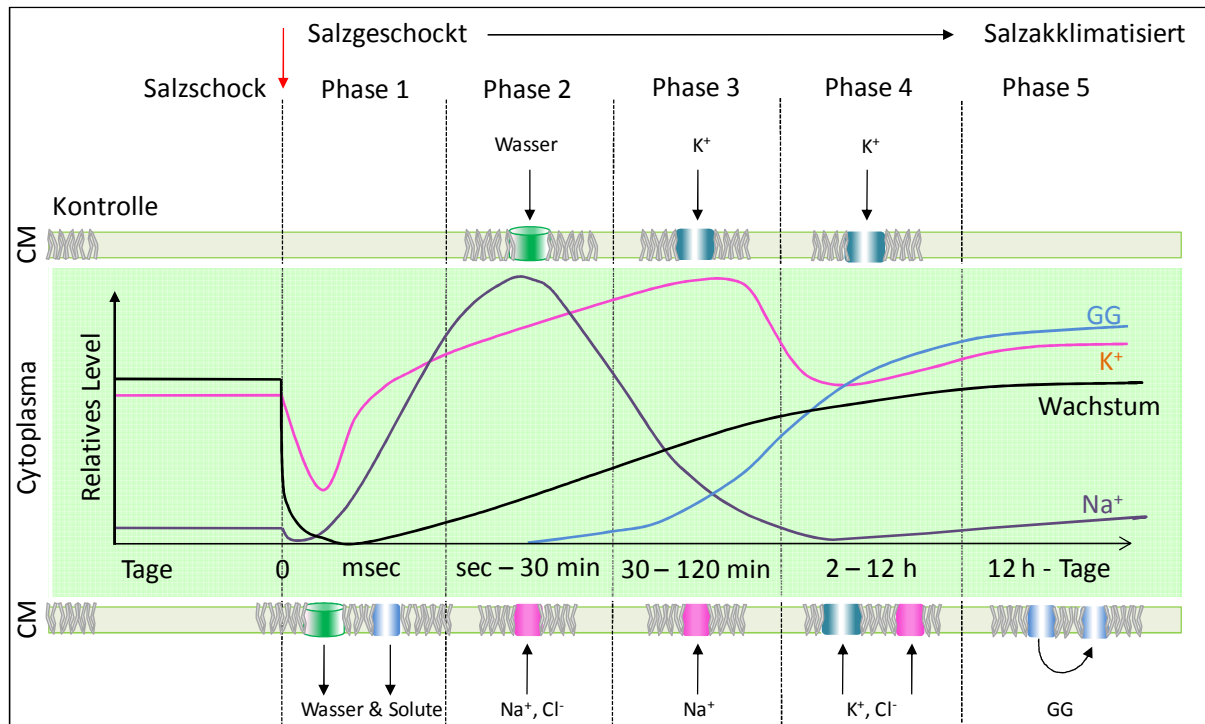
<b>Marine Tiere</b>	Taurin	Yin <i>et al.</i> , 2000
	Harnstoff	Peterson <i>et al.</i> , 1992
	Trimethylaminoxid (TMAO)	Yancey <i>et al.</i> , 2002
	Scyllo - Inositol	Yancey <i>et al.</i> , 2002

Beispielsweise kommt Glycinbetain in Vertretern aus allen drei Domänen des Lebens vor, wobei Taurin wiederum nur unter den marinen Lebewesen und vereinzelt bei einigen Organen von Säugetieren aufzufinden ist. Osmolyte, die der Gruppe der Kohlenhydrate angehören, kommen in Archaea, Pilzen, Algen, Pflanzen und in den Nieren von Säugetieren vor. Zucker, insbesondere Trehalose ist bei Bakterien, Archaea, Pilzen, Pflanzen und Tieren weit verbreitet. Dagegen ist Saccharose doch eher auf photosynthetisch aktive Organismen beschränkt. Allgemein betrachtet handelt es sich bei diesen Zuckern und einigen Polyolen um die dominierenden Osmolyte bei Organismen, die nicht nur Salzstress, sondern insbesondere Trocken- oder Gefrierstress tolerieren oder unterbinden wollen (Yancey, 2005). Darüber hinaus führt bei manchen Organismen erst die Mischung verschiedener „compatible solutes“ zur Salztoleranz. Grundsätzlich existiert aber kein einheitliches Konzept für die Verbreitung und Nutzung der verschiedenen Osmolyte. Auch bei der *in vitro* Schutzwirkung sind stoffspezifische Schwankungen in verschiedenen Testsystemen gefunden worden.

Allerdings gibt es auch Hinweise, dass bestimmte Verbindungen bei Salzstress wirksamer sind als andere. Bei *Bacillus* - Arten (Kuhlmann und Bremer, 2001) und unter den Cyanobakterien wurde eine Korrelation zwischen dem Habitat und dem synthetisierten Osmolyt entdeckt (Reed *et al.*, 1986). Bei Cyanobakterien akkumulieren gering halotolerante Stämme (*Nostoc* sp. PCC 7120) Saccharose und Trehalose und können damit Salzkonzentrationen bis zu 0,7 M NaCl tolerieren. Marine Cyanobakterien (*Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Synechococcus* sp. PCC 7002) mit einer moderaten Salztoleranz, bis zu 1,8 M NaCl, synthetisieren Glucosylglycerol, wohingegen Cyanobakterien, wie *Aphanothece halophytica*, die in hypersalinen Lebensräumen (bis zu 2,7 M NaCl) leben, vorrangig Glycinbetain akkumulieren (Reed, 1986). Bei der Akkumulation von „compatible solutes“ handelt es sich jedoch nur um einen Teil des multifaktoriellen Prozesses der Osmoadaptation.

### 1.5 Osmoadaptation von Cyanobakterien am Beispiel von *Synechocystis*

Eine Erhöhung des Salzgehalts führt zu zwei entscheidenden Konsequenzen. Einerseits sinkt das Wasserpotential und andererseits hat die hohe Ionenkonzentration einen negativen Effekt auf den Metabolismus der Zelle. Vertreter der „salt-out-strategy“ verfolgen das Prinzip, den Turgor der Zelle bei konstant niedriger Ionenkonzentration aufrecht zu halten. Der osmotische Ausgleich erfolgt fast ausschließlich über die Synthese von „compatible solutes“. Um dies zu gewährleisten sind zahlreiche Prozesse miteinander verknüpft, wie die Ionenhomöostase, die Synthese von osmotisch aktiven Substanzen und deren Transport (Abb. 4).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der 5 Phasen der Salzakklimatation in *Synechocystis* im zeitlichen Verlauf nach einem Salzschock** (aus Pade und Hagemann, 2012) (Skalierung nicht maßstabsgerecht)

In den ersten Millisekunden nach dem Salzschock kommt es zu einem sehr schnellen Ausstrom von Wasser und anderen niedermolekularen Verbindungen (Blumwald *et al.*, 1983; Matsuda *et al.*, 2004). Dieser Ausstrom wird von Aquaporinen und mechanosensitiven Kanälen vermittelt (Shapiguzov *et al.*, 2005) und führt zu einem Schrumpfen der Zelle. Diese Volumen- und Wasserabnahme wird in der zweiten Phase durch den Einstrom von Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> kompensiert (Reed *et al.*, 1985a). Die damit einhergehende Erhöhung der Ionenkonzentration führt letztlich zur Erhöhung des Wasserpotentials, was wiederum zur Rückkehr von Wasser führt. Damit ist die Volumenregeneration abgeschlossen und die maximale Na<sup>+</sup> - Ionen Konzentration im Cytoplasma erreicht (Blumwald *et al.*, 1983). Da Na<sup>+</sup> - Ionen in hohen Konzentrationen jedoch toxisch sind und den Metabolismus negativ beeinträchtigen, erfolgt in der dritten Phase der Salzakklimatation von *Synechocystis* ein Austausch der Na<sup>+</sup> - Ionen gegen K<sup>+</sup> - Ionen (Reed *et al.*, 1985a). Nach etwa 20 - 30 Minuten erreicht die Na<sup>+</sup> - Konzentration in der Zelle einen Wert, wie er auch in akklimatisierten Zellen gemessen werden kann (Reed *et al.*, 1986). Dennoch hat der Einstrom von Na<sup>+</sup> - Ionen aber auch eine regulatorische Funktion, indem die K<sup>+</sup> - Aufnahme über das Ktr - System (Matsuda *et al.*, 2004) sowie die Synthese von „compatible solutes“, wie Glucosylglycerol aktiviert wird. Denn in der vierten Phase werden die anorganischen Ionen gegen „compatible solutes“ ausgetauscht, sodass in Abhängigkeit zur Salzkonzentration, in den darauffolgenden 3 bis 8 Stunden die Ionenkonzentration wieder bis auf das initiale Level sinkt. Demnach übernehmen allein diese Substanzen die Aufgabe der Aufrechterhaltung des Turgors und des osmotischen Potentials. Nach 24 Stunden hat sich ein neues homöostatisches Gleichgewicht eingestellt, das durch eine geringe Ionen - und eine sehr hohe Osmolytkonzentration gekennzeichnet ist (Abb. 4).

### 1.5.1 Synthese von Glucosylglycerol (GG)

Hierbei handelt es sich um das erste „compatible solute“, das in Cyanobakterien entdeckt wurde (Borowitzka *et al.*, 1980; Kollman *et al.*, 1979). Glucosylglycerol konnte mittlerweile in über 60 cyanobakteriellen Stämmen identifiziert werden, wobei einige Stämme aber auch andere „compatible solutes“, wie Saccharose oder Trehalose in geringen Mengen synthetisieren (Hagemann, 2011). Die Synthese von Glucosylglycerol in Cyanobakterien wurde in den vergangenen Jahren intensiv untersucht, wobei Glucosylglycerol als „compatible solute“ in heterotrophen Bakterien noch weitestgehend unbekannt war. So konnte nicht nur in diversen *Pseudomonas*-Stämmen, sondern auch in *Stenotrophomonas rhizophila* eine salzabhängige GG - Akkumulation nachgewiesen werden (Pocard *et al.*, 1994; Mikkat *et al.*, 2000; Roder *et al.*, 2005).

Die Synthese von GG erfolgt nach dem typischen Biosyntheseweg für Glykoside. Hierbei handelt es sich um einen sogenannten Zweischruttmeechanismus, bei dem ADP-Glukose und Glycerol-3-Phosphat als Substrate genutzt werden (Hagemann und Erdmann, 1994). Die Kondensation von Glycerol-3-Phosphat und ADP-Glukose zu Glucosylglycerol-3-Phosphat wird katalysiert von der Glucosylglycerol-Phosphat-Synthase (GgpS, E.C.2.4.1.213), wobei ADP frei wird. Der zweite Schritt, dieser enzymatischen Gesamtreaktion wird von der Glucosylglycerol-Phosphat Phosphatase (GgpP, E.C.3.1.3.69) katalysiert. Hierbei erfolgt die Abspaltung des Phosphats von dem phosphorylierten Intermediat, sodass Glucosylglycerol und anorganisches Phosphat entsteht (Abb. 5). Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Phosphatase sehr spezifisch für Glucosylglycerol-Phosphat ist. Untersuchungen einer Mutante, die einen Defekt in der Phosphatase aufwies, zeigten, dass kein anderes Enzym in der Lage war, diesen Ausfall zu kompensieren (Hagemann *et al.*, 1997).

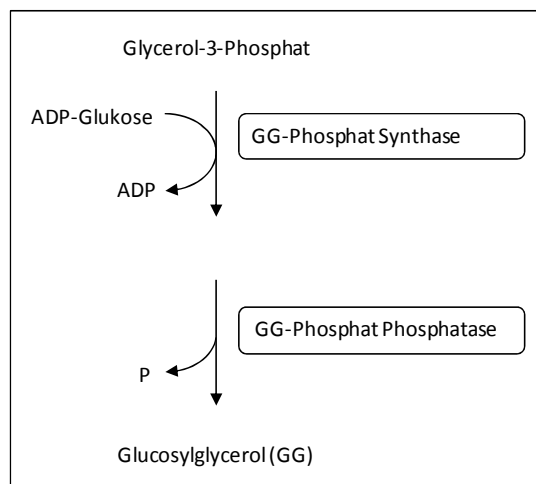


Abbildung 5: Cyanobakterielle Biosynthese von Glucosylglycerol

### 1.5.2 Synthese von Trehalose

Trehalose, als nicht-reduzierender Zucker, gehört zu den „compatible solutes“, die nahezu ubiquitär synthetisiert und genutzt werden. In Prokaryoten kann die weiteste Verbreitung der Trehalose-Biosynthesewege nachvollzogen werden. Darüber hinaus war es sogar möglich das Vorhandensein mehrerer Biosynthesewege in einem Organismus nachzuweisen. Diese Tatsache liefert einen möglichen Hinweis darauf, dass die Synthese von Trehalose auch unter schwankenden Umweltbedingungen essentiell ist. Beispielsweise konnten drei verschiedene Biosynthesewege für Trehalose in dem Gram-positiven *Corynebacterium glutamicum* identifiziert werden (Wolf *et al.*, 2003). Es existieren insgesamt 5 verschiedene Biosynthesewege für Trehalose, wobei der erste vor fast 60 Jahren entdeckt wurde (Cabib und Leloir, 1958) und in Eubakterien, Archaea, Pilzen, Insekten und Pflanzen beschrieben werden konnte (Abb. 6). Hierbei handelt es sich um den TPS/TPP-Biosyntheseweg, der sich aus zwei enzymatischen Reaktionen zusammensetzt, ähnlich zur Synthese von Glucosylglycerol. Im ersten Schritt erfolgt die Kondensation von UDP-Glukose und Glukose-6-Phosphat zu Trehalose-6-Phosphat, wobei dieser Schritt von der Trehalose-6-Phosphat-Synthase katalysiert wird. Im Folgenden kommt es zur Dephosphorylierung des Intermediates zu Trehalose durch die Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase, wobei anorganisches Phosphat frei wird (Elbein *et al.*, 2003; De Smet *et al.*, 2000) (Abb. 6 A).

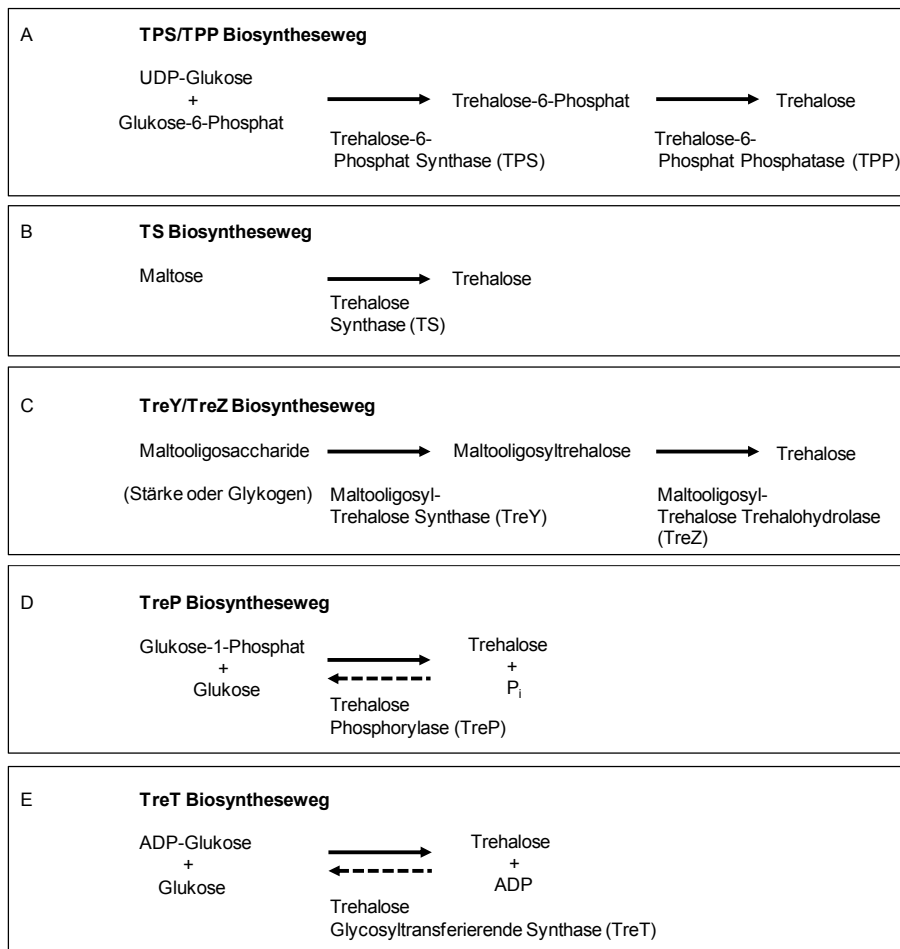


Abbildung 6: Die fünf bekannten Biosynthesewege von Trehalose

Der zweite Biosyntheseweg konnte in *Pimelobacter* sp. identifiziert werden. Hierbei ist das Ausgangssubstrat Maltose, wobei die Trehalose-Synthase die  $\alpha$ 1- $\alpha$ 4 Verbindung zu einer  $\alpha$ 1- $\alpha$ 1 Verbindung isomerisiert und dadurch Trehalose synthetisiert (Abb. 6 B) (Elbein *et al.*, 2003). Bei dem dritten Syntheseweg für Trehalose handelt es sich um den sogenannten TreY/TreZ Biosyntheseweg, der beispielsweise in dem Cyanobakterium *Nostoc (Anabena)* 7120 verifiziert werden konnte und den Syntheseweg für Trehalose in Cyanobakterien darstellt (Kato *et al.*, 2004). Aber auch in den thermophilen Archaea der Gattung *Sulfolobus* konnte dieser Weg beschrieben werden. Hierbei erfolgt die Umformung von Maltodextrin (Maltooligosaccharide, Glycogen und/oder Stärke) zu Trehalose. Auch in diesem Fall sind zwei enzymatische Schritte beteiligt, die zum einen von der Maltooligosyl-Trehalose-Synthase (TreY) und zum anderen von der Maltooligosyl-Trehalose-Trehalohydrolase (TreZ) katalysiert werden. Ersteres leitet die Reaktion durch die Transglykosylierung des letzten Glukose Moleküls am Ende des Polymers ein. Das bedeutet, dass aus der  $\alpha$ 1- $\alpha$ 4 Verbindung eine  $\alpha$ 1- $\alpha$ 1 Verbindung wird und damit Maltooligosyltrehalose als Intermediat entsteht. Der letzte Schritt umfasst die hydrolytische Abspaltung der Trehalose vom Ende des Maltooligosylpolymers durch die Trehalohydrolase (TreZ) (Elbein *et al.*, 2003) (Abb. 6 C). Der vierte Biosyntheseweg ist charakterisiert durch die Hydrolyse von Trehalose in Gegenwart von anorganischem Phosphat. Jedoch ist hierbei nicht ganz geklärt, ob dieses Enzym an der Synthese von Trehalose *in vivo* beteiligt ist, da jene Aktivität lediglich *in vitro* gezeigt werden konnte (Schiraldi *et al.*, 2002; Wannet *et al.*, 1998) (Abb. 6 D). Bei dem fünften Syntheseweg handelt es sich um einen neuartigen Weg für die Synthese von Trehalose. Entdeckt wurde dieser in dem thermophilen Archaeon *Thermococcus litoralis*. Dieser Biosyntheseweg zeichnet sich durch die reversible Formation von Trehalose aus ADP-Glukose und Glukose aus, wobei dieser Schritt von der glykosyltransferierenden-Synthase (TreT) katalysiert wird (Qu *et al.*, 2004) (Abb. 6 E).

## 1.6 Osmoadaptation von Rotalgen

Rotalgen kommen in tropischen, warmen aber auch in kühleren Regionen auf unserer Erde vor. Man unterscheidet etwa 4000-6000 Arten, die in mindestens 680 Gattungen gruppiert sind. Darunter findet man nur eine geringe Zahl an Einzellern, wie Cyanidium, oder extremophile Vertreter, die vor allem an heißen Quellen vorkommen. Bei der Mehrheit der Rotalgen handelt es sich um komplexe makroskopische Strukturen, die vorwiegend im Meer anzutreffen sind. Nur für weniger als 100 Arten ist das Süßwasser der Lebensraum. Marine Algen in Ästuaren oder in Gezeitenregionen sind in ihrem Lebensraum ständig schwankenden Salinitäten ausgesetzt. Demnach müssen diese in der Lage sein, Schwankungen im externen osmotischen Druck und Schwankungen in den externen Ionenkonzentrationen zu tolerieren.

Ähnlich wie bei Cyanobakterien, ist die Antwort auf moderate Schwankungen in der Salinität ein sehr gut regulierter, zweiphasiger Prozess. In der ersten Phase, der 5-10 Sekunden in Mikroalgen und Minuten bis Stunden in Makroalgen andauert, kommt es zu einer sehr schnellen Änderung des Turgors bzw. des Volumens. Diese Änderung ist abhängig davon, ob die Zellen eine Zellwand besitzen oder nicht und resultiert in einem massiven Wasserein- oder -ausstrom. Die Richtung ist dabei abhängig vom osmotischen Gradienten. Die zweite Phase umfasst die osmotische Anpassung. Diese ist charakterisiert durch die Akkumulation osmotisch aktiver Substanzen (Kirst, 1989). Bei

diesen „compatible solutes“ handelt es sich in vielen Fällen um Komponenten, die Ähnlichkeiten zu dem Hauptphotosyntheseprodukt Florideenstärke besitzen (Ben-Amotz und Avron, 1983; Kremer und Kirst, 1981).

Die folgenden „compatible solutes“ konnten in den verschiedenen Rotalgen identifiziert werden: Mannitol in den *Caloglossa stipitata* (Karsten und West, 1993), Sorbitol in *Bangiopsis subsimplex* (Eggert *et al.*, 2007), Dulcitol in *Bostrychia simpliciuscula* (Karsten *et al.*, 1994), Floridosid in *Bangia atropurpurea* (Reed, 1985b), L-Isofloridosid in *Porphyra columbina* (Karsten *et al.*, 1993), Digeneasid in *Bangiopsis subsimplex* (Eggert *et al.*, 2007) und Digalactosylglycerol in *Hypoglossum barbatum* (Karsten *et al.*, 2005). In der vorliegenden Dissertation soll besonderes Augenmerk auf die Synthese und Funktion von Floridosid bzw. Isofloridosid gelegt werden.

### 1.6.1 Floridosid & Isofloridosid

Als Kohlenstoffreserve dient den Rotalgen Florideenstärke, die in cytoplasmatischen Granula gespeichert wird. Florideenstärke ist in ihrer Molekülstruktur dem Amylopektin ähnlich, chemisch gesehen aber mit dem tierischen Glykogen näher verwandt als mit der pflanzlichen Stärke. Die Florideenstärke stellt wahrscheinlich den Pool für das „compatible solute“ Floridosid dar. Bei Floridosid [ $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1-2)-glycerol] handelt es sich um „das“ Speicher- und Photosyntheseprodukt der Rotalgen: In *Rhodymenia palmata* (Colin und Gueguen, 1930) wurde dieses „compatible solute“ zum ersten Mal identifiziert, wobei die Struktur von Putman und Hassid (1954) aus *Iradaea laminarioides* aufgeklärt wurde (Cole und Sheath, 1990). Lindberg (1955) konnte darüber hinaus zeigen, dass eine isomere Form von Floridosid existiert, nämlich das Isofloridosid [ $\alpha$ -D-Galactopyranosyl-(1-1)-Glycerol]. Wickberg (1958) konnte folglich sogar zeigen, dass in der Ordnung Bangiales eine D- und L-Form des Isofloridosids existiert, wobei Nagashima (1976) zu dem Schluss kam, dass Floridosid das einzige „compatible solute“ in allen *Rhodophyta* sei, ausgenommen ist hierbei die Ordnung der Ceramiales, deren Osmolyt Digeneasid [O- $\alpha$ -D-Mannopyranosyl-(1-2)-Glycerinsäure] darstellt (Karsten, 1999, Cole und Sheath, 1990). Das „compatible solute“ Isofloridosid hingegen kommt nur in der Ordnung der Bangiales vor. Darüber hinaus konnte Craigie *et al.* (1986) in  $^{14}\text{C}$ -Markierungen zeigen, dass der radioaktive Kohlenstoff sehr langsam von Floridosid auf Isofloridosid übertragen wird. Das unterstützt die Annahme, dass die isomere Form vielmehr das Produkt einer sehr langsamen Isomerisierung als ein direktes Produkt der Photosynthese ist. Erste Untersuchungen zur Floridosid Synthese wurden von Kremer und Kirst (1981) und Kauss *et al.* (1977, 1979) vorgenommen. In  $^{14}\text{C}$  markierten Analysen konnte gezeigt werden, dass Glycerol und Floridosid-Phosphat sehr schnell markiert wurden, wobei radioaktiver Kohlenstoff erst im Nachhinein in Floridosid nachgewiesen werden konnte. Entsprechend der Kinetik dieses Einbaus konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei Glycerol und Floridosid-Phosphat um Vorläufermoleküle handelt. Diese Annahme wurde gestärkt durch die Entdeckung zweier Enzyme in Gesamtzellextrakten. Hierbei handelte es sich um die Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, die das Glycerol-3-Phosphat aus Dihydroxyaceton-Phosphat bereitstellt und um eine Galactosyltransferase (Floridosid/Isofloridosid-Phosphat-Synthase), welche für die Kondensation von UDP-Galaktose und Glycerol-3-Phosphat zu Floridosid-Phosphat verantwortlich ist. Letztlich ist lediglich eine Dephosphorylierung des Floridosid-Phosphats notwendig um Floridosid zu bilden. Innerhalb der



osmotischen Akklimation spielt die Floridosid/Isofloridosid-Phosphat-Synthase die entscheidende Rolle. Etwa eine Minute nach dem Einsetzen eines hyperosmotischen Stresses, wird die Synthese dieses Enzyms gestartet (Schobert *et al.*, 1972). Die Aktivierung des Synthesewegs soll durch eine Veränderung in der Zusammensetzung der Lipid-Doppelschicht, aufgrund des Schrumpfprozesses der mit dem Verlust des Wassers aus der Zelle einhergeht, ausgelöst werden (Kauss, 1986). Darüber hinaus wird spekuliert, dass durch die Veränderung der Lipid-Doppelschicht eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird, die in der Formierung eines Calcium/Calmodulin-Komplexes resultiert, welcher wiederum eine membrangebundene Serin-Protease aktiviert. Diese Serin-Protease kann in der löslichen Form nunmehr die Floridosid-Phosphat-Synthase aktivieren. Man nimmt an, dass die Aktivierung, durch die Spaltung einer kleinen inaktiven Untereinheit vom Proteinkomplex erfolgt (Kirst, 1989). Etwa nach 60-90 Minuten nach dem Anstieg der Osmolarität im Medium hat der Floridosid/Isofloridosid Pool ein hohes „steady state“ Level im Modell *Poteroochromonas* erreicht (Kauss *et al.*, 1978). Es muss betont werden, dass für all diese Prozesse bisher keines der beteiligten Proteine oder gar Gene zweifelsfrei identifiziert werden konnten.

### **1.7 Biotechnologische Anwendung von „compatible solutes“**

Für die Biotechnologie sind „compatible solute“ insofern interessant, da diese nicht nur einzelne Makromoleküle, sondern auch ganze Zellen gegen Schädigung durch physikalischen Stress schützen (Borges *et al.*, 2002). Aufgrund dessen finden diese Substanzen ein breites Anwendungsspektrum, angefangen bei dem Schutz und der Stabilisierung von Proteinen, über die Erhöhung der Spezifität von biochemischen Reaktionen, bis hin zur Kosmetik-Industrie (Lentzen und Schwarz, 2006). Auch in Hautpflegeprodukten finden „compatible solutes“ mittlerweile ihren Einsatz. Über 220 Ectoin-enhaltende Pflegeprodukte sind mittlerweile auf dem Markt zu finden ([www.biotop.de](http://www.biotop.de)). Aber auch Hydroxyectoin und Glucosylglycerol sind innerhalb der Kosmetikindustrie auf dem Vormarsch (Biotop AG). Das „compatible solutes“ eine Schutzfunktion bei hohen Temperaturen besitzen, unterstreicht die Tatsache, dass diese osmotisch aktiven Substanzen zum Schutz der Polymerase in Polymerase-Ketten-Reaktionen eingesetzt werden. Durch den Einsatz von Ectoin, Hydroxyectoin oder Glycinbetain in PCR Kits erfolgt eine Optimierung der Reaktion (biotop AG, Witten). Weiterhin konnte auch gezeigt werden, dass „compatible solutes“ einen Einfluss auf die Interaktion von DNA mit Proteinen (Courtenay *et al.*, 2000) und auf die chemischen Eigenschaften der DNA haben (biotop AG, Witten).

## 1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Bei Datenbankrecherchen wurden interessanterweise in dem Genom eines marinen Cyanobakteriums keine Gene für die Glucosylglycerol-Biosynthese gefunden. Hierbei handelt es sich um *Crocospaera watsonii* (strain WH8501) (<http://genome.jgi-psf.org/crowa/crowa.home.html>) ein marines, einzelliges, diazotrophisch lebendes Cyanobakterium. Der Lebensraum dieses Cyanobakteriums ist der tropische und subtropische Ozean, wobei man annimmt, dass dieser Organismus aufgrund seiner Fähigkeit Stickstoff zu fixieren, einen wesentlichen Beitrag zum marinen Stickstoff-Kreislauf leistet (Zehr *et al.*, 2007).

Mittels „BLAST search“ Analysen konnte im Genom von *C. watsonii* anstelle von Genen für die Biosynthese von GG ein Gen für die Trehalose-Biosynthese entdeckt werden. Im Gegensatz zu anderen Trehalose-akkumulierenden Cyanobakterien gab es im Genom von *C. watsonii* jedoch lediglich ein Protein für den OtsA/B-Biosyntheseweg und keines für den TreY/TreZ-Weg. Im Gegensatz zu *E. coli*, wo es sich bei OtsA und OtsB um separate Proteine handelt, schien *C. watsonii* ein Fusionsprotein aus Synthase und Phosphatase aufzuweisen. Ähnliche Fusionsproteine sind bereits aus Pflanzen und Hefen, wie *Saccharomyces cerevisiae* bekannt. Das Ziel dieses Teilprojektes ist es, die Funktionalität des putativen OtsAB-Fusionsproteins nachzuweisen und damit zu zeigen, dass marine Cyanobakterien nicht zwingend auf die Synthese von GG angewiesen sind, um in marinen Habitaten zu wachsen.

Im zweiten Teilprojekt der vorliegenden Arbeit wird angestrebt, erstmals Gene für die Osmolytsynthese in Rotalgen zu identifizieren. Dabei wurde *Galdieria sulphuraria* als Modellorganismus genutzt, dessen Genomsequenz bekannt ist (A.P.M. Weber unveröffentlichte Daten). *Galdieria sulphuraria* gehört zu den extremophilen Mikroorganismen. Es ist eine drei bis zehn Mikrometer kleine, einzellige Rotalge, die bei Temperaturen zwischen 45 und 60 °C, in einem extrem sauren, schwefelhaltigen Milieu (pH 0,05-3) vorkommt. Sie kann auch in Gegenwart toxischer Metalle sowie unter einer 1-3 Zentimeter dicken Steinschicht überleben. (Barbier *et al.*, 2005; [www.tagesspiegel.de](http://www.tagesspiegel.de)). Diese Fähigkeiten beruhen sicher darauf, dass *Galdieria sulphuraria* einen sehr vielseitigen Metabolismus besitzt. Dieser Organismus ist in der Lage photoautotroph, heterotroph und mixoautotroph zu wachsen sowie 50 verschiedene Kohlenstoffquellen, wie Zucker, Zucker-Alkohole, Intermediate des Tricarbonsäurezyklus und Aminosäuren zu metabolisieren (Rigano *et al.*, 1976, 1977; Gross und Schnarrenberger, 1995). Diese metabolische Flexibilität, bezugnehmend auf die Nutzung verschiedener Kohlenhydrate spiegelt sich auch in den Transportern wider, die im Genom kodiert sind (Oesterheld *et al.*, 1999; Oesterheld und Gross, 2002).

Darüber hinaus ist bekannt, dass *Galdieria sulphuraria* das „compatible solute“ Floridosid/Isofloridosid zu synthetisieren vermag (Barbier *et al.*, 2005, De Lucca und Moretti, 1983). Allerdings sind die korrespondierenden Gene für die Synthese noch nicht bekannt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit besteht somit darin, die Gene für eine Floridosid-/Isofloridosid-Phosphat-Synthase zu identifizieren und durch biochemische Analysen deren Funktionalität zu verifizieren.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Organismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen sind in den Tabellen A1 bis A5 des Anhangs aufgeführt. Sie umfassen Bakterienstämme der Spezies *Escherichia coli* und *Synechocystis* PCC6803 sowie Hefen der Spezies *Pichia pastoris*.

#### 2.1.1 Klonierungsstämme

Die Stämme DH5 $\alpha$  und XL1 blue wurden lediglich zur Klonierung und Plasmidanreicherung genutzt, da diese Klonierungsstämme eine hohe Transformationseffizienz besitzen. Der Stamm Top10 wurde für Klonierungsarbeiten um *Pichia pastoris* genutzt und für Expressionsarbeiten in *E. coli*.

#### 2.1.2 Expressionsstämme

Die Expressionstämme BL21(DE3) und Lemo(DE3) eignen sich für den Einsatz eines pET-Expressionssystems, da diese Stämme ein  $\lambda$ (DE3)-Lysogen enthalten, das wiederum unter Kontrolle des lacUV5-Promotors steht und die cDNA für die T7-RNA-Polymerase trägt. Bei beiden Stämmen ist darüber hinaus die Lon-Protease inaktiviert. Die OmpT-Protease liegt bei den drei *E. coli* Stämmen BL21(DE3), Lemo(DE3) und Arctic Express inaktiviert vor und ermöglicht somit die Expression rekombinanter Proteine. Die Lemo21(DE3) Zellen vereinen zum einen die charakteristischen Merkmale des „host strains“ BL21(DE3) und zum anderen die Möglichkeit die Expression schwieriger Klone zu justieren. Diese Justierung erfolgt über die Modifikation des Lysozym Levels (*lysY*), wobei es sich hierbei um den natürlichen Inhibitor der T7 RNA Polymerase handelt. Die Modulation des Lysozym Levels erfolgt durch die Zugabe von L-Rhamnose. Unter Verwendung des pBAD/HIS A Expressionsvektor empfiehlt es sich *E. coli* Stämme zu nutzen, die genotypisch durch *recA* und *endA* charakterisiert sind. Stämme, die diesen Genotyp aufweisen, sind LMG194 und Top10. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie L-Arabinose transportieren, aber nicht mehr metabolisieren können. Ferner ist dies ein essentieller Punkt, wenn man mit L-Arabinose induziert und ein konstantes Level des Induktors in der Zelle gewährleisten will.

#### 2.1.3 Hefestämme von *Pichia pastoris*

Für die Herstellung kompetenter Zellen, wurde zum einen der Wildtyp X-33 genutzt und zum anderen der Stamm KM71H. Die beiden Stämme GS115/Albumin und GS115/pPICZ/lacZ sind die Kontrollstämme für die Überprüfung der Expressionsparameter. Ersteres sekretiert dabei das Protein ins Medium, wobei Letzteres das Protein intrazellulär akkumuliert.

#### 2.1.4 Stämme von *Synechocystis* PCC6803

Der Wildtyp *Synechocystis* PCC6803 wurde bei allen Untersuchungen als Kontrolle mitgeführt, wobei mit der Mutante die Komplementation erfolgte. Gleichzeitig wurde auch die nicht komplementierte Mutante in den Untersuchungen als Kontrolle mitgeführt.

## 2.2 Plasmide & Oligonukleotide

### 2.2.1 Plasmide

Die verwendeten Klonierungs- und Expressionsvektoren sind in der Tabelle A5 des Anhangs aufgeführt.

### 2.2.2 Oligonukleotide

In den Tabellen A7 bis A11 des Anhangs sind die verwendeten Oligonukleotide für Sequenzierungen und Klonierungen zusammengefasst. Die Oligonukleotide wurden bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert und in einer Stammlösung von 100 pmol/μl bei -20 °C gelagert. Für die Amplifikation mittels PCR wurden diese in einer Konzentration von 5 pmol/μl Lösung eingesetzt.

## 2.3 Medien

### 2.3.1 Flüssigmedium zur Kultivierung von *Synechocystis*

**BG11-Medium** (mit 20 mM TES, pH 8,0 mit KOH eingestellt)

#### Stammlösung 1

Zitronensäure Monohydrat	0,3 g
Ammonium Eisen (III)-Citrat	0,3 g
EDTA Dinatriumsalz	0,05 g
<i>ad</i> 100 ml <i>A. dest.</i>	

#### Stammlösung 2

NaNO <sub>3</sub>	30 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,78 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,5 g
<i>ad</i> 1000 ml <i>A. dest.</i>	

#### Stammlösung 3

CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	1,9 g
<i>ad</i> 100 ml <i>A. dest.</i>	

#### A6-Lösung

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,81 g
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,22 g
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,08 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,021 g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,0494 g
<i>ad</i> 1000 ml <i>A. dest.</i>	

**1 M TES-KOH (pH 8,0)**

TES 114,625 g

in 400 ml *A. dest.* lösen, mit KOH auf pH 8,0 einstellen und auf 500 ml *A. dest.* auffüllen.

**Flüssig BG11-Medium (pH 8,0)**

Stocklösung 1 2 ml  
 Stocklösung 2 50 ml  
 Stocklösung 3 2 ml  
 A6-Lösung 1 ml  
 1 M TES-KOH (pH 8,0) 20 ml

*ad* 1000 ml *A. dest.*

**2.3.2 Festmedium zur Kultivierung von *Synechocystis***

**BG11-Kobe-Agar (pH 8,0)**

Für das Gießen der Agarplatten wurden zwei doppelt konzentrierte Lösungen angesetzt, die nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von etwa 50 °C miteinander gemischt und ausplattiert wurden.

**Lösung 1**

Stocklösung 1 1 ml  
 Stocklösung 2 25 ml  
 Stocklösung 3 1 ml  
 A6-Lösung 0,5 ml  
 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5H<sub>2</sub>O 1,5 g  
 1 M TES-KOH (pH 8,0) 10 ml

*ad* 250 ml *A. dest.*

**Lösung 2:**

Agar 7,5 g  
*ad* 250 ml *A. dest.*

Zum Flüssig-, wie auch zum Festmedium wurden Antibiotika mit folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

Streptomycin 50 µg/ml  
 Kanamycin 50 µg/ml

**2.3.3 Flüssig- und Festmedium zur Kultivierung von *Escherichia coli***

**LB-Medium (Luria Miller)**

Dieses Standardmedium wurde von Carl Roth (Karlsruhe) käuflich erworben und gemäß den Herstellerangaben angesetzt.

Für die Kultivierung von *E. coli* auf LB-Agarplatten wurde ebenfalls LB-Agar (Lennox) von Carl Roth (Karlsruhe) genutzt und entsprechend den Angaben des Herstellers angesetzt.

**M9 Minimalmedium** (Sambrook und Russell, 2001)

Dieses Minimalmedium setzte sich zusammen aus:

1 x M9 Salz  
2 mM MgSO<sub>4</sub>  
0,1 mM CaCl<sub>2</sub>  
0,4 % Glukose  
*ad mit A. dest.*

Die einfach konzentrierte M9-Salzlösung ergibt sich aus einer 5-fach konzentrierten Stammlösung:

64 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O  
15 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
2,5 g NaCl  
5 g NH<sub>4</sub>Cl  
1 % (v/v) Casaminosäuren  
*ad 1000 ml A. dest.*

Für die Kultivierung von *E. coli* auf M9-Agarplatten wurden doppelt konzentrierte Lösungen angesetzt, die nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von etwa 50 °C miteinander gemischt und ausplattiert wurden.

**Lösung 1**

2 x M9-Salze  
4 mM MgSO<sub>4</sub>  
0,2 mM CaCl<sub>2</sub>  
2 % (v/v) Casaminosäuren  
*ad mit A. dest.*

**Lösung 2**

Agar 7,5 g  
*ad 250 ml A. dest.*

Zum Flüssig-, wie auch zum Festmedium wurden Antibiotika mit folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

Kanamycin	50 µg/ml
Chloramphenicol	34 µg/ml
Tetrazyklin	5 µg/ml
Gentamycin	20 µg/ml
Ampicillin	50 µg/ml
Zeocin™ (Invitrogen)	25 µg/ml

Für die Blau-Weiß-Selektion wurde dem LB-Agar vor dem Gießen zusätzlich 50 mg/ml (Endkonzentration 100 µg/ml) IPTG und 20 mg/ml X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktopyranosid) in DMF (Endkonzentration 40 µg/ml) zugesetzt.

### 2.3.4 Flüssigmedium zur Kultivierung von *Pichia pastoris*

#### “Yeast Extract Peptone Dextrose” Medium (YPD/YEPD)

Für dieses Anzuchtmedium wurden 10 g Hefeextrakt und 20 g Pepton in 900 ml A. dest. gelöst und für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Nachdem das Medium abgekühlt war, erfolgte die Zugabe von 100 ml einer 10-fach konzentrierten Dextroslösung (20 %).

#### “Buffered Glycerol Komplex” Medium / “Buffered Methanol Komplex” Medium (BMGY/BMMY)

10 g Hefeextrakt und 20 g Pepton wurden in 700 ml A. dest. gelöst und für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Nachdem das Medium abgekühlt war, erfolgte die Zugabe folgender Komponenten:

- 100 ml 1 M Kalium-Phosphat Puffer, pH 6,0
- 100 ml 10-fach konzentriertes YNB [13,4 % (w/v) yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acids]
- 2 ml 500-fach konz. Biotin [0,02 % (w/v)]
- 100 ml 10-fach konz. Glycerol [10 % (v/v)] für BMGY
- 100 ml 10-fach konz. Methanol [10 % (v/v)] für BMMY

### 2.3.5 Festmedium zur Kultivierung von *Pichia pastoris*

#### YPD Agar-Medium

Für die Kultivierung von *Pichia pastoris* auf Festmedium wurde YPD Agar-Medium verwendet. Dazu wurde dem YPD-Medium (10 g Hefeextrakt und 20 g Pepton) zusätzlich 20 g Agar-Agar Koble beigefügt und bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Nachdem das Medium abgekühlt war, erfolgte die Zugabe von 100 ml einer 10 konzentrierten Dextroslösung (20 %).

#### MDH Agar-Medium

Für die Verifizierung des Mut Phänotyps von *Pichia pastoris* wurden MDH Agar-Medium verwendet. Dazu wurde 400 ml bidest. Wasser mit 7,5 g Agar-Agar Koble I bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Nachdem das Medium abgekühlt war, erfolgte die Zugabe von:

- 50 ml einer 10-fach konzentrierten YNB-Lösung [13,4 % (w/v) yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acids]
- 1 ml 500-fach konz. Biotin [0,02 % (w/v)]
- 50 ml 10-fach konz. Dextrose [20 % (v/v)]

#### MMH Agar-Medium

Die Vorgehensweise entspricht der Herstellung von MDH Agar-Medium. Jedoch wird anstelle der 50 ml 10-fach konz. Dextrose [20 % (v/v)] für MMH Agar-Medium 50 ml 10-fach konz. Methanol [10 % (v/v)] verwendet.

Alle, den Medien nachträglich zugefügten Komponenten, wurden steril filtriert. Zum Flüssig-, wie auch zum Festmedium wurde Zeocin™ (Invitrogen) in einer Endkonzentrationen von 100 µg/ml zugesetzt.

## 2.4 Kultivierungsbedingungen

### 2.4.1 Kultivierung von *Synechocystis*

Die Kultivierung von *Synechocystis* erfolgte unter phototrophen Bedingungen (kontinuierliche Belichtung) und bei einer Temperatur von 30 °C auf BG11 Agarplatten (30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), in BG11-Flüssigmedium (30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und kontinuierlichem Schütteln von 150 Upm) oder in BG11-Flüssigmedium bei einer Lichtintensität von (100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und einer kontinuierliche Begasung mit einem 3 %igen (v/v)  $\text{CO}_2$ /Luftgemisch). Zur Erhaltung der Zellen in Flüssigmedium über einen längeren Zeitraum erfolgte die Kultivierung bei einer Temperatur von 20 °C und einer Lichtintensität von ca. 15  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Zur Langzeitaufbewahrung wurde 800  $\mu\text{l}$  Flüssigkultur mit 200  $\mu\text{l}$  DMSO versetzt und bei -80 °C gelagert. Der axenische Charakter einer *Synechocystis*-Kultur wurde nach Ausstrich von ca. 200  $\mu\text{l}$  Zellsuspension auf LB-Agarplatten und mindestens 48-stündiger Inkubation im Dunkeln bei 30 °C überprüft.

### 2.4.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte über Nacht bei 37 °C entweder in LB-Flüssigmedium (125 Upm Schüttelintensität) oder auf LB-Agarplatten im Brutschrank. Zur Erhaltung von *E. coli*-Stämmen wurden 500  $\mu\text{l}$  Zellkultur mit 125  $\mu\text{l}$  Glycerol (96 %) versetzt und bei -80 °C gelagert.

#### 2.4.2.1 Kultivierung von LMG194 mit pBAD/HisA + *otsAB*

Die Vorkultur wurde über Nacht in LB-Medium (2 % NaCl) angezogen und am Folgetag in frisches Medium 5 %ig überimpft. Im Anschluss erfolgte die Kultivierung des Expressionsstammes in LB-Medium [50  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin, 5 mM Glycinbetain, 2 % (w/v) NaCl, 250 mM Sorbitol] bei 20 °C.

Nach 6 Stunden erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit Arabinose (0,002 %). Die Kultur wurde über Nacht bei 20 °C und kontinuierlichem Schütteln (125 Upm) inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Ernte der Zellen.

### 2.4.3 Kultivierung von *Pichia pastoris*

*Pichia pastoris* wurde direkt aus einem bei -80 °C gelagerten Glycerolstock auf festem YPD Agar-Medium (2.2.5) ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die bewachsenen Agarplatten wurden bis zum weiteren Einsatz bei 4 °C aufbewahrt oder direkt zur Anzucht von Vorkulturen in Flüssigmedium verwendet. Hierbei wurde jeweils eine einzelne Hefekolonie in 25 ml Flüssigmedium angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 250 Upm schüttelnd inkubiert.



## 2.5 Molekularbiologische Techniken

### 2.5.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *Synechocystis*

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *Synechocystis* wurden 500 µl Zellkultur mit 500 µl Phenol (pH 7,5-8) gemischt und für 10 Minuten bei 65 °C zum Aufschluss der Zellen inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 500 µl Chloroform und eine gründliche Durchmischung. Nach einem Zentrifugationsschritt bei (16000 x g, 5 Minuten) wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und zur vollständigen Entfernung des Phenols erneut mit 500 µl Chloroform versetzt. Nach wiederholter Zentrifugation wurde der wässrige Überstand mit der gelösten DNA in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

### 2.5.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *Pichia pastoris*

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *Pichia pastoris* erfolgte nach dem Protokoll von Ausubel *et al.*, 1994.

### 2.5.3 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*

Die Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit Hilfe des Illustra Miniprep Plasmid-Kit (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers isoliert.

### 2.5.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die gewünschte Bande wurde mit Hilfe eines Skalpell und unter UV-Bestrahlung aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe des Nucleo Spin® Extract Kits (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben, wobei lediglich die Elutionsvolumina der DNA angepasst wurden (30 µl H<sub>2</sub>O).

### 2.5.5 Isolierung von RNA

#### 2.5.5.1 Isolierung von RNA aus *Escherichia coli*

Die RNA wurde unter Nutzung einzelner Komponenten des NucleoSpin RNA Plant Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) isoliert. Für den Zellaufschluss wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut und mit 400 µl Lysozym (100 mg/ml) für 6 Minuten bei 42 °C inkubiert. Zu dieser Zellsuspension wurde im Anschluss 350 µl Lysis-Puffer RA1 (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) und 3,5 µl β-Mercaptoethanol gegeben und kurz gemischt. Die darauffolgenden Schritte wurden entsprechend dem Macherey-Nagel Protokoll 5 durchgeführt. Dabei wurde jedoch der DNA-Verdau durch die Zugabe von 2 µl DNaseI (Fermentas, St. Leon-Rot) und einem 30-minütigen Inkubationsschritt bei Raumtemperatur erweitert. Der Erfolg des DNase-Verdau wurde anschließend durch Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese (2.4.10) und einer Kontroll-PCR überprüft und der DNase Verdau bei noch vorhandenen Kontaminationen wiederholt.

### **2.5.5.2 Isolierung von RNA aus *Pichia pastoris***

Für die Isolierung von RNA aus *Pichia pastoris* wurden die Zellpellets einer 10 ml Kulturprobe mit 400 µl AE Puffer (50 mM Natriumacetat, pH 5,3; 1 mM EDTA) versetzt. Nach der Zugabe von 40 µl 10 % SDS wurden die Proben für 20 Sekunden stark gemischt. Das Gemisch wurde folgend mit dem gleichen Volumenteil Phenol (pH 4-5, Carl Roth, Karlsruhe) versehen und erneut stark gemischt (20-30 Sek.) Im Anschluss erfolgten zwei Inkubationsschritte (4 Minuten bei 65 °C und 2 Minuten bei -20 °C) und ein Zentrifugationsschritt (14000 x g; 2 Min; 4 °C). Der wässrige Überstand wurde dann in ein neues Eppendorfgefäß überführt, im gleichen Volumen mit einem Phenol/Chloroform Gemisch (1:1) versetzt und erneut für 20 Sekunden stark durchmischt. Die Phasentrennung erfolgte durch erneute Zentrifugation (14000 x g, 2 Min, 4 °C). Die obere Phase wurde abermals abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt und zur Fällung der RNA 40 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,3) und dem zweieinhalbfachen Volumen an 100 %igem Ethanol versehen und für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (14000 x g). Nach Entfernung des Ethanols wurde das Pellet mit 80 %igem Ethanol gewaschen, die RNA pelletiert und im laminaren Luftstrom getrocknet. Folgend wurde die RNA in 30 µl sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

### **2.5.6 cDNA-Synthese**

Die Synthese der cDNA erfolgte mit der M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase (Promega, Mannheim). Zu Beginn wurde zu 2 µg RNA, 0,5 µg Oligo (dT)-Primer (Fermentas, St. Leon-Rot) gegeben und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 13 µl gebracht. Anschließend wurde der Ansatz 5 Minuten bei 70 °C und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde kurz anzentrifugiert und anschließend mit 4 µl Reaktionspuffer [M-MLVReverseTranscriptase 5x Reaction Buffer (Promega; Mannheim)] und 2 µl dNTP-Mix (10 mM) versehen. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 1 µl „Reverse Transkriptase“ (Promega, Mannheim, 200 U/µl), wobei eine leichte Durchmischung und eine 60-minütige Inkubation bei 42 °C sich anschlossen. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte bei 70 °C für 5 Minuten Die so gewonnene cDNA wurde 1:10 verdünnt und stand nun für PCR-Reaktionen zur Verfügung.

### **2.5.7 Konzentrationsbestimmung von RNA**

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption unverdünnter RNA, gegen den Elutionspuffer als Referenz bei 260 nm bzw. 280 nm an dem NanoDrop 2000 Spektrophotometer (Thermo Scientific, USA). Eine Absorption von 1,0 bei 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Der Quotient beider Messwerte zeigte die Reinheit der isolierten Nukleinsäure an.

### 2.5.8 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption unverdünnter DNA, gegen den Elutionspuffer als Referenz bei 260 nm bzw. 280 nm an dem NanoDrop 2000 Spektrophotometer (Thermo Scientific, USA). Eine Absorption von 1,0 bei 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Der Quotient beider Messwerte zeigt die Reinheit der isolierten Nukleinsäure an.

### 2.5.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde in abgewandelter Weise nach dem Protokoll von Mullis *et al.* (1986) durchgeführt. Ein typischer PCR-Ansatz beinhaltete dabei die DNA Matrize (1 µl), dNTPs, Reaktionspuffer, Starter-Oligonukleotide (je 1 µl), H<sub>2</sub>O (2 µl) und die Polymerase. Dabei wurde ein Taq-Mastermix (5 µl) der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Dieser bestand bereits aus dNTPs, Puffer und der Taq-Polymerase. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler mit beheizbarer Deckplatte (TPersonal, Biometra GmbH, Göttingen). Ein typisches PCR-Protokoll war folgendermaßen aufgebaut: Der erste Schritt des Programmes war die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C für 2 min. Danach wurden 30mal die folgenden Schritte wiederholt: 30 sec bei 95 °C (Denaturierung), 1-1,5 Minuten bei 50-60 °C (Anlagerung der Starter-Oligonukleotide), 0,5-3 Minuten bei 72 °C (Polymerisation). Am Ende dieser Wiederholungen wurde für weitere 5 Minuten bei 72 °C die finale Polymerisation eingeleitet, bei der die Verlängerung von Abbruchfragmenten stattfand. Die zyklische Wiederholung von Denaturierung, Annealing und Polymerisation resultieren in einer exponentiellen Amplifikation der Ziel-DNA, da auch die synthetisierte DNA jeweils als Matrize fungierte. Die so amplifizierten DNA-Fragmente wurden für weitere molekulare Untersuchungen eingesetzt.

### 2.5.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR) für die *in vitro* Transkription

Dieser PCR-Ansatz, mit einem Gesamtvolumen von 3 x 50 µl, setzt sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

	Finale Konzentration:
10 µl 5 x Phusion Puffer mit MgCl <sub>2</sub>	1 x
1 µl 10 mM dNTP Mix	200 µM (jeweils)
2,5 µl 10 µM pEU3_PCR_fw	0,5 µM
2,5 µl 10 µM pEU3_PCR_rev	0,5 µM
0,5 µl Phusion DNA Polymerase (2 U/µl)	1 U/50 µl
x µl Plasmid-DNA (Template)	0,1 ng/50 µl
x µl Nuklease freies Wasser	

Der PCR-Ansatz wurde in einen, auf 95 °C vorgeheizten Thermocycler gestellt, wobei das folgende PCR-Programm durchlaufen wurde:

**Tabelle 2: PCR-Programm für die Amplifizierung des Templates für die *in vitro* Transkription**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	98 °C	0,5 Minuten	1 Zyklus
Denaturierung	98 °C	10 Sekunden	
Annealing	58 °C	30 Sekunden	40 Zyklen
Elongation	72 °C	3,5 Minuten	
Finale Elongation	72 °C	5 Minuten	1 Zyklus
Haltezeit	20 °C	undefiniert	1 Zyklus

### 2.5.11 PCR Kolonie-Screening von *Escherichia coli*

Das Screening putativ plasmidtragender *E. coli*-Klone erfolgte mittels Kolonie-PCR. Mit einem Zahnstocher wurden die *E. coli*-Klone von der Transformations-Platte in ein Eppendorfgefäß mit 30 µl H<sub>2</sub>O gegeben, wobei gleichzeitig die Überimpfung auf eine Masterplatte erfolgen konnte. Die Zellen wurden durch eine Hitzebehandlung (100 °C, 5 Min) aufgeschlossen. 1-2 µl dieser aufgeschlossenen Zellsuspension wurden dann direkt dem PCR-Ansatz zugefügt.

### 2.5.12 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden über eine Agarose-Gelelektrophorese in horizontalen Gelkammern aufgetrennt. Hierfür wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,8 % (w/v) verwendet. Die Agarose wurde in 0,5-fachem TBE-Puffer (Stammlösung 5-fach konzentriert: 54 g Tris; 27,5 g Borsäure; 20 ml EDTA, ad 1000 ml A. dest., pH 8,0) durch kurzes Aufkochen gelöst. Als Laufpuffer wurde der TBE-Puffer verwendet. Um die Nukleinsäuren anzufärben, wurde der verflüssigten Agarose Ethidiumbromid (1/10.000-stel Volumen der Agarose; Stammlösung 10mg/ml) zugesetzt. Zur Erhöhung der Probedichte und farblichen Markierung der aufzutrennenden Nukleinsäure-Lösung wurden die Proben mit 0,2 Vol. Stopp-Mix (40 % Glycerol 96 %; 0,1 % SDS; 0,1 M EDTA, 0,025 % Bromphenolblau, pH 7,0) versetzt, auf das Agarosegel aufgetragen und durch Anlegen einer Spannung von 80 V getrennt. Als Größenstandard diente der Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Die DNA wurde nach der Elektrophorese auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

### 2.5.13 Formaldehyd-Gelelektrophorese der RNA

Die RNA-Fragmente wurden ebenfalls über eine Agarose-Gelelektrophorese in horizontalen Gelkammern aufgetrennt. Für die Gele wurden 1,3 g Agarose in 73 ml H<sub>2</sub>O und 10 ml 10 x MOPS-Puffer aufgelöst. Der abgekühlten Agarose wurden schließlich 17 ml Formaldehyd zugesetzt, wobei das Gel sofort im Anschluss gegossen wurde. Zu 21 µl Denaturierungslösung (pro Probe: 2,5 µl 10 x MOPS-Puffer; 12,5 µl Formamid; 4 µl Formaldehyd; 0,5 µl Ethidiumbromid und 1,5 µl Stopplösung) wurde 6 µl RNA (gewünschte RNA-Menge entsprechend in H<sub>2</sub>O verdünnen, z.B. 10 µg) gegeben. Die

Denaturierung der RNA erfolgte bei 68 °C für 10 Minuten. Nach kurzzeitiger Inkubation auf Eis konnten die Proben aufs Gel aufgetragen werden. Das Formaldehyd-Gel wurde bei 60-80 V für 3-4 h laufen gelassen.

#### **2.5.14 Aufreinigung von PCR-Produkten für die *in vitro* Transkription**

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das QIAGEN Purification Kit (Hilden) verwendet, wobei das Protokoll des Herstellers eingehalten wurde. Für die Aufreinigung der PCR-Produkte für die *in vitro* Transkription wurde das QIAGEN PCR Purification Kit verwendet. Die 3 x 50 µl PCR Ansätze wurden vereint und mit 750 µl PB Puffer versetzt. Die weitere Vorgehensweise entsprach dem Protokoll des Herstellers.

#### **2.5.15 Klonierung von PCR-Fragmenten**

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten in den Vektor pGEM®-T (Promega, Madison, USA) nutzte man die Tatsache, dass die Taq-Polymerase in der PCR immer ein überhängendes Adenin an das 3'-Ende der amplifizierten DNA hängte. Durch das überhängende Thymin am Vektor pGEM®-T wurde die Ligationseffizienz stark erhöht. Der Reaktionsansatz setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen: 1-3 µl PCR-Produkt, 10 µl 2x Ligase Puffer (Promega, Madison, USA), 1 µl T4 Ligase (Promega, Madison, USA), 0,5 µl pGEM®-T, *ad* 20 µl x µl H<sub>2</sub>O. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4 °C oder für 2 h bei Raumtemperatur. Der Ligationsansatz konnte dann für eine Transformation in *E. coli* genutzt werden.

#### **2.5.16 Ligation**

Die kovalente Verknüpfung zweier DNA-Enden wird als Ligation bezeichnet. Mittels der T4 Ligase wird eine Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe des einen DNA Fragments und der 3'-OH-Gruppe des anderen Endes geschlossen. Zur Klonierung von PCR-Fragmenten in kompatible Vektoren wurde die T4 Ligase von Fermentas (St. Leon-Rot) genutzt. Der Reaktionsansatz (4-5 µl PCR-Produkt, 2 µl 10x Ligase Puffer (Fermentas), 1 µl T4 Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot), 1-2 µl Vektor, *ad* 20 µl x µl H<sub>2</sub>O) wurde entweder über Nacht bei 4 °C oder 1-3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zielfragment und linearisiertes Plasmid wurden im Verhältnis 3:1 in den Ligationsansatz gegeben.

#### **2.5.17 Restriktion**

Der enzymatische Verdau der DNA wurde durch Restriktionsendonukleasen der Firmen New England Biolabs (Frankfurt/Main) oder MBI Fermentas (St. Leon-Roth) in den mitgelieferten Puffern durchgeführt. Plasmid-DNA wurde mit 1-2 U/µg DNA mindestens 1 h verdaut.

#### **2.5.18 *In vitro* Transkription**

Der Transkriptionsansatz (100 µl), der sich aus den folgenden Komponenten zusammensetzte, wurde auf Eis gelagert und lediglich durch leichtes auf und ab Pipettieren gemischt.

**Tabelle 3: Zusammensetzung des Transkriptionsansatzes**

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
5 x Transkriptionspuffer	30 µl	1,5 x
25 mM rNTP Mix	15 µl	3,75 mM
RNase Inhibitor (40 U/µl)	2,5 µl	1,0 U/µl (100 U)
SP6 RNA Polymerase (80 U/µl)	3 µl	2,4 U/µl (240 U)
DNA Template (300 ng)	10 µl	30 ng/µl
Nuclease-freies Wasser	39,5 µl	

Der *in vitro* Transkriptionsansatz wurde bei 38 °C für 4 h inkubiert und im Anschluss für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgesäß überführt und die mRNA mittels Formaldehyd-Gelelektrophorese überprüft.

#### **5 x Transkriptionspuffer**

400 mM HEPES-KOH (pH 7,8)

80 mM Magnesium Acetat

10 mM Spermidine

50 mM DTT

Der 5 x Transkriptionspuffer wurde sterilfiltriert und in Aliquots bei -20 °C gelagert.

#### **2.5.19 Aufreinigung der mRNA mittels Ammonium/Ethanol Fällung**

Der Reinheitsgrad der mRNA ist von entscheidender Bedeutung für die *in vitro* Translation. Je reiner die mRNA, desto höher ist der Gehalt an Protein. Die RNA des Transkriptionsansatzes wurde durch Zugabe von 13 µl 7,5 M NH<sub>4</sub>Ac und 250 µl 100 %igen Ethanol (eiskalt) gefällt. Dieser Ansatz wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss bei 12000 x *g* für 20 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Daraufhin wurde das Pellet in 800 µl eiskaltem 70 %igem Ethanol resuspendiert und in einem weiteren Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 4 °C abermals pelletiert. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Die pelletierte mRNA wurde anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und im Anschluss in 20-30 µl Nuclease-freiem Wasser gelöst. Die mRNA kann in 10 µl Aliquots bei -80 °C gelagert werden.

#### **2.5.20 DNA Sequenzierung**

Die Sequenzierung von Plasmid DNA wurde von SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Hierzu wurden 600-700 ng DNA und 20 pmol Primer in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 10 mM TRIS-HCl auf ein Gesamtvolumen von 7 µl aufgefüllt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm BioEdit (Version 7.0.9.0; Hall, 1999).

## 2.6 Techniken zur Manipulation von Zellen

### 2.6.1 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach Hanahan (1983) in einer modifizierten Form. Zu Beginn erfolgte die Kultivierung des Rezipientenstammes in  $\phi$ -Broth-Medium (2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 0,4 %  $\text{MgSO}_4$ ; 10 mM KCl), indem etwa 3 ml mit einer Einzelkolonie beimpft wurden. Die Inkubation erfolgte schüttelnd bei 37 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden mit 1 ml dieser Übernachtskultur, 100 ml frisches  $\phi$ -Broth-Medium beimpft. Diese Kultur wurde im Anschluss bei 37 °C, geschüttelt und bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von ca. 0,48 angezogen. Um letztlich kompetente Zellen zu erzeugen, wurde die Kultur nach dem Erreichen der entsprechenden Wachstumsphase für 10 Minuten auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden die Zellen abzentrifugiert (4 °C, 950 x g, 5 min), der Überstand vollständig entfernt und das gewonnene Zellpellet stets im Eisbad gelagert. Das Pellet wurde in 30 ml eiskaltem TJB 1 (100 mM RbCl, 50 mM  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 30 mM K-Acetat, 10 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 15 % Glycerol, pH 5,8) resuspendiert und die Suspension 5 Minuten auf Eis gelagert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt folgte das Resuspendieren des Zellpellets in 4 ml TJB 2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 15 % Glycerol, pH 7,0). Aus dieser Zellsuspension wurden 100  $\mu\text{l}$  Aliquots in Eppendorfgefäße abgefüllt, in flüssigem  $\text{N}_2$  schockgefroren und bis zum weiteren Einsatz bei -80 °C gelagert.

### 2.6.2 Herstellung kompetenter *Pichia pastoris* Zellen

Die Herstellung kompetenter *Pichia pastoris* Zellen für die Elektroporation erfolgte nach dem Standardprotokoll (Invitrogen, Version H, 2005). Um eine Transformation nach der Lithiumchlorid-Methode durchzuführen wurden die Zellen wie folgt präpariert: *P. pastoris* wurde in 50 ml YPD-Medium (2.2.4) bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,8-1,0 bei 30 °C angezogen. Anschließend wurden die Zellen geerntet, mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen und bei 1500 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das überstehende Wasser wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml Lithiumchlorid (100 mM) resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Im Anschluss wurden die Zellen bei maximaler Geschwindigkeit für 15 Sek pelletiert und das Lithiumchlorid entfernt. Schlussendlich wurde das Zellpellet in 400  $\mu\text{l}$  Lithiumchlorid (100 mM) resuspendiert und 50  $\mu\text{l}$  Aliquots für anschließende Transformation angefertigt.

### 2.6.3 Transformation von *Escherichia coli*

Die bei -80 °C gelagerten *E. coli*-Zellen (DH5 $\alpha$ ) wurden auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden Fremd-DNA versehen. Der Ansatz wurde 15 Sekunden auf Eis inkubiert, bevor die Zellen einem Hitzeschock von 42 °C für 1 Minute ausgesetzt wurden. Anschließend wurden die Zellen nochmals für 5 Minuten auf Eis gelagert und folglich mit 800  $\mu\text{l}$  SOC-Medium versetzt. Dieser Ansatz wurde bei 37 °C für 1 h inkubiert, wobei die Selektionierung durch das Ausplattieren auf antibiotikahaltige Agarplatten erfolgte.

## **SOC-Medium**

Für die Herstellung von SOC-Medium wurde 2 ml einer 20 %igen Glukoselösung mit LB-Medium auf 100 ml aufgefüllt.

### **2.6.4 Transformation von *Synechocystis***

Zur Transformation von *Synechocystis* wurden 2 ml einer Kultur mit einer  $OD_{750}$  von ca. 2 zentrifugiert (2500 x g, 2 min). Das Pellet wurde folglich in 1/100stel Volumen frischem BG11 resuspendiert und ca. 1 µg DNA zugesetzt. Die Eppendorfgefäße wurden im Anschluss bei 30 °C im Dunkeln über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf BG11-Kobe-Agarplatten ausplattiert und 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert. Daraufhin erfolgte die erstmalige Unterschichtung mit dem entsprechenden Antibiotikum in einer Konzentration von 10 µg/ml. Durch weiteres Unterschichten mit Antibiotikum wurde der Selektionsdruck nach weiteren 2-3 Tagen erhöht. Während Wildtypzellen in der Regel nach 2 Wochen lysiert waren, wurden die ersten resistenten grünen Zellkolonien auf der Agarplatte sichtbar, welche für weitere Experimente verwendet wurden.

### **2.6.5 Transformation von *Pichia pastoris***

Die Elektroporation von *Pichia pastoris* erfolgte nach dem Standardprotokoll (Invitrogen, Version H, 2005). Für die Transformation über die Lithiumchlorid-Methode wurden die angefertigten 50 µl Aliquots genutzt. Durch Zentrifugation dieser LiCl-Zellsuspension wurden die Zellen pelletiert, so dass der Überstand abermals abgenommen werden konnte. Für jede Transformation wurden die folgenden Reagenzien in der vorgegebenen Reihenfolge zu den Zellen gegeben.

240 µl 50 % PEG-3350  
36 µl 1M LiCl  
25 µl 2 mg/ml einzelsträngige DNA  
(vor dem Einsatz 5 Minuten kochen)  
5-10 µg Plasmid-DNA in 50 µl Wasser

Im Anschluss wurde der Ansatz etwa eine Minute ordentlich durchmischt und für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Daraufhin erfolgte ein Hitzeschock von 42 °C für etwa 20-25 Minuten. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt und der Abnahme der Transformationslösung wurde das Zellpellet in 1 ml YPD resuspendiert und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Nach einer sowie nach 4 Stunden wurden jeweils 25-100 µl auf YPD-Agarplatten in Anwesenheit von 100 µg/ml Zeocin™ ausplattiert und für 2-5 Tage bei 30 °C inkubiert.

## **2.7 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.7.1 Proteinaufreinigung über verschiedene Säulenmaterialien**

Die Kulturen wurden für die Proteinaufreinigung über eine Ni-NTA Matrix, eine Strep-Tactin® Matrix oder eine Amylose Matrix abzentrifugiert (3000 x g, 10 Min, 4 °C). Das Pellet wurde ab diesem



Zeitpunkt immer auf Eis gelagert und in 10 ml kaltem Homogenisationspuffer aufgenommen. Zu dem resuspendierten Zellpellet wurde immer frisch 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 1 mM PMSF gegeben. Im Anschluss erfolgte eine Ultraschallbehandlung (3 x 30 Sekunden bei einer Intensität von 90, zwischen den Behandlungen 2 Min. Inkubation auf Eis). Der Erfolg des Zellaufschlusses wurde mikroskopisch untersucht und bei nahezu 100 % aufgeschlossener Zellen, wurden diese bei 13000 x g für 15 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet beinhaltet die unlösliche Membranfraktion und im Überstand befanden sich die löslichen Zellbestandteile, die folglich auf die verschiedenen Säule gegeben wurden. Das Zellpellet sowie etwa 500  $\mu$ l des Überstandes wurden für die Analyse mittels SDS-PAGE aufbewahrt.

### 2.7.1.1 Proteinaufreinigung über eine Ni-NTA Matrix

Für diese Untersuchungen wurde das „PreBond™ Ni-Chelating-Resin (Invitrogen, Karlsruhe) genutzt. Hierbei wurde die Ni-NTA Agarose in der Flasche invertiert, so dass ein homogenes Gemisch vorlag. Von dieser resuspendierten Ni-NTA-Agarose wurden 2-3 Säulenvolumen (ein Säulenvolumen = 1 ml) in eine 10-ml Aufreinigungssäule gegeben. Die Ni-NTA Granula setzten sich nach etwa (5-10 Minuten) ab, so dass im Anschluss die Säule mit dem 6-fachen Säulenvolumen an Homogenisationspuffer äquilibriert werden konnte. Nach vollständigem Durchlaufen des Puffers konnten nun die löslichen Zellbestandteile, der Überstand, auf die Säule gegeben werden. Der Durchlauf wurde als einzelne Fraktion aufgefangen und aufbewahrt. Es folgte eine Waschung mit dem Homogenisationspuffer und 2 Waschungen mit dem Waschpuffer, wobei auch die Durchläufe dieser Waschungen aufgefangen und für spätere Analysen auf Eis gelagert wurden. Daraufhin wurde mein Protein durch kompetitive Verdrängung in 3 Elutionsschritten mit 1,5 ml Elutionspuffer von der Ni-NTA Matrix eluiert. Durch eine darauffolgende Proteinbestimmung der einzelnen Fraktionen und der Beladung eines SDS-Gels mit 10  $\mu$ g Protein konnte der Grad der Aufreinigung untersucht werden.

Homogenisationspuffer:	20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,8) (für die Aufreinigung von OtsAB aus pBAD/His A wurde ein 20 mM Tris/HCl Puffer, pH 7,8 genutzt) 200 mM Natriumchlorid
Waschpuffer:	20 mM Natriumphosphatpuffer / Tris/HCl Puffer (pH 7,8) 200 mM Natriumchlorid 40 mM Imidazol
Elutionspuffer für 1. und 2 Elution:	20 mM Natriumphosphatpuffer / Tris/HCl Puffer (pH 7,8) 200 mM Natriumchlorid 300 mM Imidazol
Elutionspuffer für die 3. Elution:	20 mM Natriumphosphatpuffer / Tris/HCl Puffer (pH 7,8) 200 mM Natriumchlorid 600 mM Imidazol

### 2.7.1.2 Proteinaufreinigung über eine Strep-Tactin® Matrix

Für diese Untersuchungen wurde das *Strep-Tactin*® Sepharose (IBA, Göttingen) genutzt. Dazu wurde die Sepharose in der Flasche invertiert, so dass ein homogenes Gemisch vorlag. Von dieser resuspendierten Sepharose wurden 2-3 Säulenvolumen (ein Säulenvolumen = 1 ml) in eine 10-ml Aufreinigungssäule gegeben. Die *Strep-Tactin*® Sepharose setzte sich nach etwa (5-10 Minuten) ab, so dass im Anschluss die Säule mit dem 4-fachen Säulenvolumen an Puffer W äquilibriert werden konnte, sodass die Matrix letztlich keine Gelbfärbung mehr aufwies. Nach vollständigem Durchlaufen des Puffers konnten nun die löslichen Zellbestandteile, der Überstand, auf die Säule gegeben werden. Der Durchlauf wurde als einzelne Fraktion aufgefangen und aufbewahrt. Es folgten drei Waschungen mit dem Puffer W, wobei auch die Durchläufe dieser Waschungen aufgefangen und für spätere Analysen auf Eis gelagert wurden. Daraufhin wurde mein Protein durch kompetitive Verdrängung in 3 Elutionsschritten mit 1,5 ml Puffer E von der *Strep-Tactin*® Matrix eluiert. Durch eine darauffolgende Proteinbestimmung der einzelnen Fraktionen und der Beladung eines SDS-Gels mit 10 µg Protein konnte der Grad der Aufreinigung untersucht werden. Zur Regeneration der Matrix wurde mit 3 x 5 ml Puffer R gewaschen, so dass sich eine Gelbfärbung des Säulenmaterials wieder einstellte.

Puffer W:	100 mM Tris-HCl (pH 8) 150 mM Natriumchlorid 1 mM EDTA
Puffer E:	100 mM Tris-HCl (pH 8) 150 mM Natriumchlorid 1 mM EDTA 2,5 mM Desthiobiotin
Puffer R:	100 mM Tris-HCl (pH 8) 150 mM Natriumchlorid 1 mM EDTA 1 mM HABA (hydroxy-azophenyl-benoic acid)

### 2.7.1.3 Proteinaufreinigung über eine Amylose Matrix

Für diese Untersuchungen wurde das Amylose Resin (NEB, Frankfurt/Main) genutzt. Dazu wurde die Matrix in der Flasche invertiert, so dass ein homogenes Gemisch vorlag. Von dieser resuspendierten Amylose Matrix wurden 2-3 Säulenvolumen (ein Säulenvolumen=1 ml) in eine Aufreinigungssäule (10 ml) gegeben. Die Amylose Granula setzten sich nach etwa (5-10 Minuten) ab, so dass im Anschluss die Säule mit dem 8-fachen Säulenvolumen an „Column“ Puffer äquilibriert werden konnte. Nach vollständigem Durchlaufen des Puffers konnten nun die löslichen Zellbestandteile, der Überstand, auf die Säule gegeben werden. Der Durchlauf wurde als einzelne Fraktion aufgefangen und aufbewahrt. Es folgte eine Waschung mit dem „Column“ Puffer (12-faches Säulenvolumen), wobei auch dieser Durchlauf aufgefangen und für spätere Analysen auf Eis gelagert wurde. Daraufhin wurde mein Protein durch kompetitive Verdrängung in 5 Elutionsschritten mit 2 ml Elutionspuffer von der Amylose

Matrix eluiert. Durch eine darauffolgende Proteinbestimmung der einzelnen Fraktionen und der Beladung eines SDS-Gels mit 10 µg Protein konnte der Grad der Aufreinigung untersucht werden. Die Regeneration der Matrix erfolgte durch die folgenden Waschschrte:

Wasser (3-fachem Säulenvolumen)  
0,1 % SDS (3-fachem Säulenvolumen)  
Wasser (1-fachem Säulenvolumen)  
„Column“ Puffer (3-fachem Säulenvolumen)

„Column“ Puffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,4)  
200 mM Natriumchlorid  
1 mM EDTA

Elutionspuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,4)  
200 mM Natriumchlorid  
1 mM EDTA  
10 mM Maltose

## **2.7.2 Isolation von rekombinanten Protein aus „inclusion bodies“**

### **2.7.2.1 Lösen des Proteins aus „inclusion bodies“**

Um rekombinante Proteine aus den „inclusion bodies“ auf zu reinigen, wurde das Zellpellet in 50 mM Hepes (NaOH pH 7,5) resuspendiert (200-1000 ml Bakteriensuspension in 4-20 ml Puffer mit 0,5 mg/ml Lysozym versehen und für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von TritonX100 (1 % Endkonzentration) und 1 mM PMSF. Eine Ultraschall- (6 x 15 Sekunden bei einer Intensität von 100, zwischen den Behandlungen Inkubation 1 Minute auf Eis) und DNase-Behandlung schlossen sich an. Für die DNase Behandlung wurde die DNase und die Inkubationsvorschrift von Fermentas (St. Leon-Rot) genutzt. Demzufolge wurde zu der mit Ultraschall behandelten Zellsuspension 25 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM CaCl<sub>2</sub> gegeben und mit 5 µl DNase bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (20000 x g, 30 Min, 4 °C) wurde das Pellet zwei Mal mit TBS (1 % Triton) gewaschen und erneut zentrifugiert (20000 x g, 30 Min, 4 °C). Nach diesen Waschungen konnte das Pellet in 2 ml Hepes-Puffer (50 mM Hepes-NaOH pH 7,5; 6 M Guanidin HCl; 25 mM DTT) gelöst und bei 4 °C für eine Stunde inkubiert werden. Die unlöslichen Partikel wurden folgedessen abzentrifugiert und die Proteinkonzentration nach Quantifizierung auf 1 mg/ml mit dem Hepes-Guanidin Puffer eingestellt.

### **2.7.2.2 Faltung der Proteine**

Dieser Schritt schloss sich unmittelbar an die Zellyse an und wurde zügig bei 4 °C durchgeführt. Dazu wurden die Proteine in einem Verhältnis von 1:10 in Faltungspuffer (50 mM Hepes-NaOH pH 7,5; 0,2 M NaCl; 1 mM DTT und 1M NDSB256-Dimethylbenzylammoniumpropansulfonat) gelöst wobei die

Proteinkonzentration bei diesem Schritt nicht größer als 0,1 mg/ml sein durfte. Im Anschluss wurden die Proteine gegen den gewünschten Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,2 M NaCl) dialysiert.

### 2.7.3 Umpuffern von Proteinen

Zum einen erfolgte die Umpufferung mittels Dialyse und zum anderen unter Verwendung von Vivaspin 6 Säulen (Sartorius, Göttingen). Die Dialyse diente dabei nicht nur der Entfernung von Salzen aus den Proteinlösungen, sondern ermöglichte auch einen Pufferaustausch. Hierfür nutzt man Dialyseschläuche mit kleinen Poren, so dass Salze bzw. Moleküle mit kleinem Molekulargewicht hindurch diffundieren können, wobei große Substanzen, wie Proteine zurückgehalten werden. Die Proteinlösungen wurden in den Dialyseschlauch gefüllt, der jedoch nur zu 2/3 gefüllt war, da sich durch Wassereinwanderung während des Dialysevorganges das Volumen im Schlauch erhöht. Die Enden wurden verschlossen und im Anschluss in ein Becherglas mit dem gewünschten Puffer gehängt. Für kleine Probenvolumina wurden spezielle Konstruktionen aus kleinen Probenkammern (Eppendorf-Tabes) verwendet. Diese wurden auf der offenen Seite mit einer Dialysemembran abgedichtet. Es wurden 2-3 Pufferwechsel, mit einer Äquilibrierungszeit von 4-6 h bei 4 °C durchgeführt.

Um Proteine zu konzentrieren wurden spezielle Zentrifugationsröhrchen (Vivaspin 6, Sartorius, Göttingen) verwendet. Dabei wurde das Lösungsmittel durch die Zentrifugalkraft durch eine Membran gepresst, wobei größere Moleküle entsprechend der Ausschlussgrenze zurück blieben. Infolgedessen konnte so ebenfalls ein Pufferwechsel erfolgen.

### 2.7.4 *In vitro* Translation („Bilayer method“)

Die „Bilayer reaction“ wurde in 96-multi-well Mikrotiter Platten durchgeführt. Dazu wurde 200 µl der 1 x SUB-AMIX Lösung in die „Wells“ pipettiert. Dieser SUB-AMIX wurde folglich mit den 50 µl des Translationsansatzes vorsichtig unterschichtet, so dass sich 2 definierte Schichten bildeten. Inkubiert wurde der Ansatz bei 26 °C für 16 Stunden.

Der Translationsansatz (50 µl) setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

**Tabelle 4: Zusammensetzung des Translationsansatzes**

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
4 x SUB-AMIX	3,75 µl	0,75 –fach
Nuklease-freies Wasser	23 µl	
RNasin Inhibitor (40 U/µl)	1,25 µl	1 U/µl
Creatin Kinase (1 mg/ml)	2 µl	0,04 µg/ml
„wheat embryo extract“ (240 OD/ml)	10 µl	60 OD/ml
mRNA	10 µl	

### 2.7.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in zellfreien Extrakten erfolgte nach Bradford (1976). Das Bradford-Reagenz (Roti®-Nanoquant-Reagenz) wurde von der Carl Roth GmbH (Karlsruhe) käuflich erworben. Für die Proteinbestimmung wurden 200 µl von verdünnten Proteinlösungen mit 1 ml Bradford-Reagenz gemischt und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm mit einer Küvette im Varian Cary 50 Bio UV-Visible Spectrometer bestimmt. Es wurde eine Rinderserumalbumin (Sigma Aldrich, Taufkirchen) (BSA)-Stammlösung in einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. Für die Erstellung einer Eichgerade wurden 0,1 µg/µl BSA eingesetzt, wobei dies einer absoluten Proteinkonzentration von 0 bis 10 µg entsprach.

### 2.7.6 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach Ihrer Größe erfolgte in 12 %igen SDS-Polyacrylamidgelen nach Lämmli (1970) in Mini-Protean II Gelelektrophoresen von BIO-RAD. Die in der Tabelle 4 zusammengefassten Mengenverhältnisse des Trenn- und Sammelgels beziehen sich jeweils auf 2 Gele.

**Tabelle 5: Zusammensetzung der des Trenn- und Sammelgels**

	Trenngel (12 %)	Sammelgel
Acrylamid*	4 ml	1,8 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	1 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8*	2,5 ml	-
A. dest.	2,5 ml	3,8 ml
APS*	22 µl	24 µl
Temed*	22 µl	24 µl

Lösungen (\*):

Acrylamid: 30 % Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid in Verhältnis (37, 5:1)  
Carl Roth, Karlsruhe)

APS: Ammoniumpersulfat, 10 %ige (w/v) Lösung in A. bidest

Temed: N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin

3 x Probenpuffer (Lämmli): 3 ml Glycerol  
0,3 ml β-Mercaptoethanol  
0,9 g SDS  
3,75 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8  
750 µl 0,1 % Bromphenolblau

5 x Laufpuffer: 30 g TRIS  
142 g Glycin  
10 g SDS  
ad 2 L A. dest.

Bei der Gebrauchslösung handelte es sich um einen 1-fach Puffer.

Als Marker wurde entweder der „prestained protein ladder“ oder der „unstained protein molecular weight marker“ von Fermentas genutzt.

### 2.7.7 Coomassie-Färbung

Nachdem die Proteine gelelektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt wurden, erfolgte eine Coomassie-Färbung nach Sambrook *et al.* (1989). Zunächst wurden die Proteine 1 h in 50 % Methanol und 10 % Essigsäure fixiert und anschließend für 1 h mit 50 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,1 % Coomassie Brilliant Blue G-250 gefärbt. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte über Nacht in 10 % Essigsäure und 20 % Methanol.

### 2.7.8 Western Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine von dem Polyacrylamid-Gel, durch ein senkrecht angelegtes Feld auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-ECL, GE Healthcare, Freiburg) transferiert. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen bleiben die Proteine an der Oberfläche haften. Die Membran und die Whatman-Filterpapiere wurden zur Äquilibrierung in 1-fach konz. Transferpuffer (100 ml 10 x Transferpuffer, 700 ml *A. dest.*, 200 ml Methanol) gelegt und wie folgt auf eine Blottapparatur gestapelt: 3 Whatman-Papiere (GE Healthcare Europe GmbH), gefolgt von der äquilibrierten Membran, darauf wurde das Polyacrylamid-Gel luftblasenfrei gelegt und zuletzt mit 3 weiteren Whatman-Papiere bedeckt. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte bei 0,8 -1 mA/cm<sup>2</sup> Oberfläche für 1,5 h. Die Nitrozellulosemembran wurde danach in 1-fach konz. TBS überführt und die Proteine durch eine Färbung mit Ponceau S (2.7.9) sichtbar gemacht. Nach dem Transfer wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in Blockierungslösung (5 %iger Magermilch für Detektion His-getagter Proteine, 3 %igem biotinfreien BSA für die Detektion von Strep-getagten Proteinen) inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit dem Anti-His-HRP Antikörper (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) oder dem Strep-Tactin Antikörper (IBA Biotechnology, Göttingen). Dafür wurde der Anti-His-HRP Antikörper in 10 ml 5 %iger Magermilch (1:10000) und der Strep-Tactin Antikörper in 10 ml 3 %igem biotinfreien BSA (1:4000) verdünnt. Die Inkubation erfolgte schüttelnd entweder über Nacht bei 4 °C oder bei Raumtemperatur für 2 h. Im Anschluss wurde die Membran mit 1-fach konz. TBS-Triton (1 x 15 Minuten und 2 x 5 Min), schüttelnd und bei Raumtemperatur gewaschen. Da beide Antikörper bereits mit einer Meerrettichperoxidase, bzw. mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert sind, fällt der Einsatz des zweiten Antikörpers weg. Somit kann direkt nach dem Waschen der Membran der immunologische Nachweis erfolgen.

10x Transferpuffer	29 g Glycin
	58 g TRIS
	3,7 g SDS
	<i>ad 1 L A. dest.</i>

### **Variante A: alkalische Phosphatase-Konjugat**

Zu Beginn erfolgte eine 5 minütige Äquilibrierung der Membran mit Puffer 3 (1M TRIS-HCl, pH 9,5; 5 M NaCl; 1 M MgCl<sub>2</sub>; *ad* 1L *A. dest.*; pH mit 10 N NaOH auf 9,5). Die Membran wurde im Dunkeln mit der Färbelösung (10 ml Puffer 3, 45 µl NBT, 35 µl BCIP) inkubiert. Nach etwa 15 Minuten konnten Banden detektiert werden, wobei die Reaktion durch intensives Waschen mit *A. dest.* abgestoppt wurde.

NBT	18,75 mg Nitrotetrazoliumblau <i>ad</i> 1 ml <i>A. dest.</i>
BCIP (X-Phosphat):	50 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat p-Toluidinsalz <i>ad</i> 1 ml Dimethylformamid (DMF)

### **Variante B: Peroxidase (Chemielumineszenz/ECL):**

Nach dem Waschen der Membran wurde vorsichtig das Chemolumineszenz-Gemisch (1:1 aus Lösung 1 und 2 auf die Membran verteilt. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms (Hyperfilm-MP Amersham)

ECL-Lösung 1:	250 mM Luminol (in DMSO) 90 mM p-Coumaric-Acid (in DMSO) 1 M TRIS-HCl, pH 8,5
ECL-Lösung 2:	30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 M TRIS-HCl, pH 8,5

### **2.7.9 Ponceaurot-Färbung**

Diese Färbung ist geeignet um Proteine nach dem Transfer von dem Acrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran zu visualisieren. Sie dient vor allem dem Anzeigen des Proteinstandards, der im Folgenden markiert wurde. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran etwa 2 Minuten in der Färbelösung inkubiert und im Anschluss mit *A. dest.* gewaschen um die überschüssige Farbe zu entfernen.

Ponceau-Reagenz:	1 g Ponceau-Rot (0,1 %) 50 ml Eisessig (5 % Essigsäure) <i>ad</i> 1 L <i>A. dest.</i>
------------------	---

### **2.7.10 Enzymatische Messungen**

#### **2.7.10.1 OtsA und OtsAB aus *Crocospaera watsonii***

Für die Messungen der enzymatischen Aktivität des Fusionsproteins OtsAB aus *Crocospaera watsonii* wurde ein 50 µl Ansatz genutzt. Dieser enthielt:

2,5 mM Glukose-6-Phosphat  
2,5 mM UDP-/ADP-/GDP-Glukose  
2,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
2,5 mM KCl  
100 µg gereinigtes Enzym  
ad 50 µl Tris/HCl, pH 7,4 mit 200 mM NaCl

Die enzymatische Reaktion verlief bei 28 °C, wobei die Reaktion im Anschluss durch Erhitzen auf 100 °C für 5 Minuten gestoppt wurde. Nachfolgend wurde der Reaktionsansatz mit einer alkalinen Phosphatase für 2 h bei 37 °C behandelt (CIAP, Fermentas, St. Leon-Rot), um auch noch vorliegende Intermediate (Trehalose-6-Phosphat) zu dephosphorylieren.

#### **2.7.10.2 OtsB aus *Crocospaera watsonii***

Zum einen wurde die enzymatische Aktivität mittels gaschromatographischer Analysen untersucht um das Produkt des Reaktionsansatzes zu bestätigen und zum anderen wurde ein spektrophotometrischer Enzymsatz, bei dem der Gehalt an freiem Phosphat ermittelt wurde, durchgeführt.

##### **Gaschromatograpische Analyse**

Das Reaktionsvolumen von 50 µl setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

2 mM Trehalose-6-Phosphat  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM TRIS/HCl (pH 7,4) mit 100 Mm NaCl  
20 µg des rekombinanten Proteins

Das Reaktionsgemisch wurde für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert, wobei die Reaktion im Anschluss bei 100 °C für 5 Minuten gestoppt wurde. Daraufhin konnte die Aufarbeitung und Derivatisierung erfolgen.

##### **Spektrophotometrische Analysen**

Hierbei wurde die Freisetzung von anorganischem Phosphat, aufgrund der Dephosphorylierung von Trehalose-6-Phosphat, bestimmt. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 200 µl durchgeführt. Dieser Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

2 mM Trehalose-6-Phosphat  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM TRIS/HCl (pH 7,4) mit 100 Mm NaCl  
20 µg des rekombinanten Proteins

Das Reaktionsgemisch wurde für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert, wobei die Reaktion im Anschluss durch ein 5-minütiges Erhitzen auf 100 °C abgestoppt wurde. Die Messung der Konzentration des anorganischem Phosphats in diesem enzymatischem Ansatz erfolgt nach dem Protokoll von Chen *et al.* (1956).



### 2.7.10.3 Floridosid/Isofloridosid-Synthase aus *Galdieria sulphuraria*

Für die Messungen der enzymatischen Aktivität der Floridosid/Isofloridosid aus *G. sulphuraria* wurde ein 100 µl Ansatz genutzt. Dieser enthielt:

40 mM Glycerol-3-Phosphat  
10 mM UDP-Galaktose  
10 mM MgSO<sub>4</sub>  
50 µl des „wheat germ extracts“ mit dem translatierten Protein  
ad 100 µl Tris/HCl, pH 8

Die enzymatische Reaktion verlief bei 30 °C, wobei die Reaktion im Anschluss durch Erhitzen auf 100 °C für 5 Minuten gestoppt wurde. Nachfolgend wurde der Reaktionsansatz mit einer alkalinen Phosphatase für 2 h bei 37 °C behandelt (CIAP, Fermentas, St. Leon-Rot), um auch noch vorliegende Intermediate (Floridosid/Isofloridosid-Phosphat) zu dephosphorylieren.

## 2.8 Analytische Methoden

### 2.8.1 Nachweis niedermolekularer Substanzen aus Zellkulturen mittels Gaschromatographie

Zur Messung des Gehaltes interner Osmolyte wurde 2 ml einer Kultur 5 Minuten bei 20000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellpellets bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Zur Aufarbeitung erfolgte das Resuspendieren des Zellpellets in 1 ml Ethanol (100 %) mit internem Standard. Nach einer zweistündige Inkubation bei 65 °C, wurden die Proben anschließend abzentrifugiert (44500 x g, 10 Minuten bei 4 °C) und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei 4 °C gelagert. Das Pellet wurde abermals mit 500 µl Ethanol (ohne internen Standard) versetzt und über Nacht bei 65 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben, die das zweite Mal mit Ethanol versetzt wurden, abzentrifugiert und die Überstände beider Tage miteinander vereint. Diese wurden dann in einer Lyophylle gefriergetrocknet um das gefriergetrocknete Probenmaterial folglich mit 500 µl HPLC-H<sub>2</sub>O zu waschen. Für eine halbe Stunde wurden die Proben mit dem Wasser schüttelnd inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Auch dieser Überstand wurde gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Probenmaterial war nun bereit für die Derivatisierung.

### 2.8.1 Nachweis der Reaktionsprodukte mittels Gaschromatographie

Die Reaktionsprodukte der verschiedenen enzymatischen Reaktionen wurden durch Zugabe von 200 µl 80 % Aceton präzipitiert. Zu jeder Probe wurde 50 µg Sorbitol gegeben, der in diesem Fall als interner Standard fungiert und quantitative Analysen erlaubt. Nach einem Zentrifugationsschritt (44500 x g, 10 Minuten, 4 °C) erfolgte die Überführung des Überstands in ein neues Eppendorfgefäß und die Gefrier Trocknung in der Lyophylle. Das gefriergetrocknete Probenmaterial stand der Derivatisierung und der Untersuchung mittels Gaschromatograph nun zur Verfügung.

### 2.8.2 Gaschromatographische Analysen

Zur Derivatisierung wurden die Proben in 65 µl Pyridin/Methoxylamin-Gemisch (20 mg Methoxylamin in 1 ml Pyridin lösen) aufgenommen, anschließend gemischt und für 90 Minuten bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Dabei bewirkte O-Methoxylamin, dass die offenkettige Struktur der Kohlenhydrate stabilisiert wurde, damit alle Hydroxylgruppen bei der anschließenden Behandlung mit 35 µl MSTFA für 90 Minuten bei 65 °C für die Silylierung zugänglich waren. Anschließend wurden die Proben mittels Gaschromatograph (FOCUS GC Model AS 3000 der Firma Thermo Scientific, Dreieich) analysiert. Zur Auftrennung wurde eine Kapillarsäule des Typs TR-5MS (30 m Länge, 0,25 mm ID, 0,25 µm Film) der Firma Thermo Scientific, Dreieich, verwendet, wobei als Trägergas Stickstoff genutzt wurde. Für die gaschromatographischen Analysen der Reaktionsprodukte mit dem OtsAB Protein aus *C. watsonii* wurde das folgende Temperaturprogramm gewählt. Injiziert wurde bei einer Anfangstemperatur von 160 °C, welche 2 Minuten beibehalten wurde. Im Anschluss wurde mit 10 °C/Minute auf eine Temperatur von 280 °C geheizt. Diese Endtemperatur wurde für 5 Minuten gehalten. Für die gaschromatographischen Analysen der Reaktionsprodukte der Proteine aus *G. sulphuraria* wurde ein ähnliches Temperaturprogramm gewählt. Der Unterschied bestand in dem Temperaturanstieg, der in diesem Fall nur bei 5 °C/Minuten lag.

### 2.8.3 Gaschromatographische-massenspektrometrische Analysen

Für die Analysen bezüglich der Floridosid-/Isofloridosid-Synthese erfolgte eine Gaschromatographie in Kopplung mit Massenspektrometrie. Diese Arbeiten wurden von Dr. Wolfgang Ruth (Universität Rostock, Institut für Chemie, Abteilung Analytische und Technische Chemie) durchgeführt. Für die GC-MS Messungen wurden die trockenen Proben durch Zugabe von 300 µl Pyridin und 300 µl BSTFA und durch Inkubation für 60 Minuten bei 60 °C und 600 Upm im Thermoschüttlern derivatisiert. Nachdem die Proben abgekühlt waren, konnten die eigentlichen GC-MS Messungen erfolgen. Die Bedingungen für den GC entsprachen dem Temperaturprogramm aus 2.8.2 für die Analyse der Reaktionsprodukte der Proteine aus *G. sulphuraria*. Bei dem Gaschromatograph handelte es sich um ein Trace GC Ultra mit Autosampler Tri Plus (Thermo Scientific, Dreieich). Beim Trägergas handelte es sich um Helium.

Für die massenspektrometrischen Analysen wurde eine „ion trap“ (Ionenfalle), ITQ 1100 (Thermo Scientific, Dreieich) verwendet. Hierbei wurde die Elektronenstoß-Ionisation mit einer Ionisierung (EI) von 70 eV genutzt. Die Quelltemperatur lag bei 200 °C und der Massebereich bei 50-1000 amu.

## 2.9 Chemikalien & Enzyme

Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Die verwendeten Enzyme stammten von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt/Main).

## 2.10 Software und Datenbanken

Zur Erstellung von Gen-, Restriktions- und Vektorkarten wurde das Programm „Clone Manager 7, version 7.11“ eingesetzt. Die Suche nach homologen Proteinen erfolgte über das Programm „BLAST“ (Altschul *et al.*, 1997) des NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Multiple Sequenzvergleiche von Proteinen wurden mit dem Programm „Bio Edit Sequence Alignment Editor“ version 7.0.9.0. (Hall, 1999) durchgeführt, wobei für die phylogenetische Analysen das Programm „MEGA 4“ (Tamura *et al.*, 2007) genutzt wurde. Für BLAST-Analysen und Ermittlungen von Sequenzdaten innerhalb des Genoms von *Cyanidioschyzon merolae* und *Crocospaera watsonii* wurden die folgenden Datenbanken verwendet: (<http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/>; <http://genome.jgi-psf.org/crowa/crowa.home.html>).

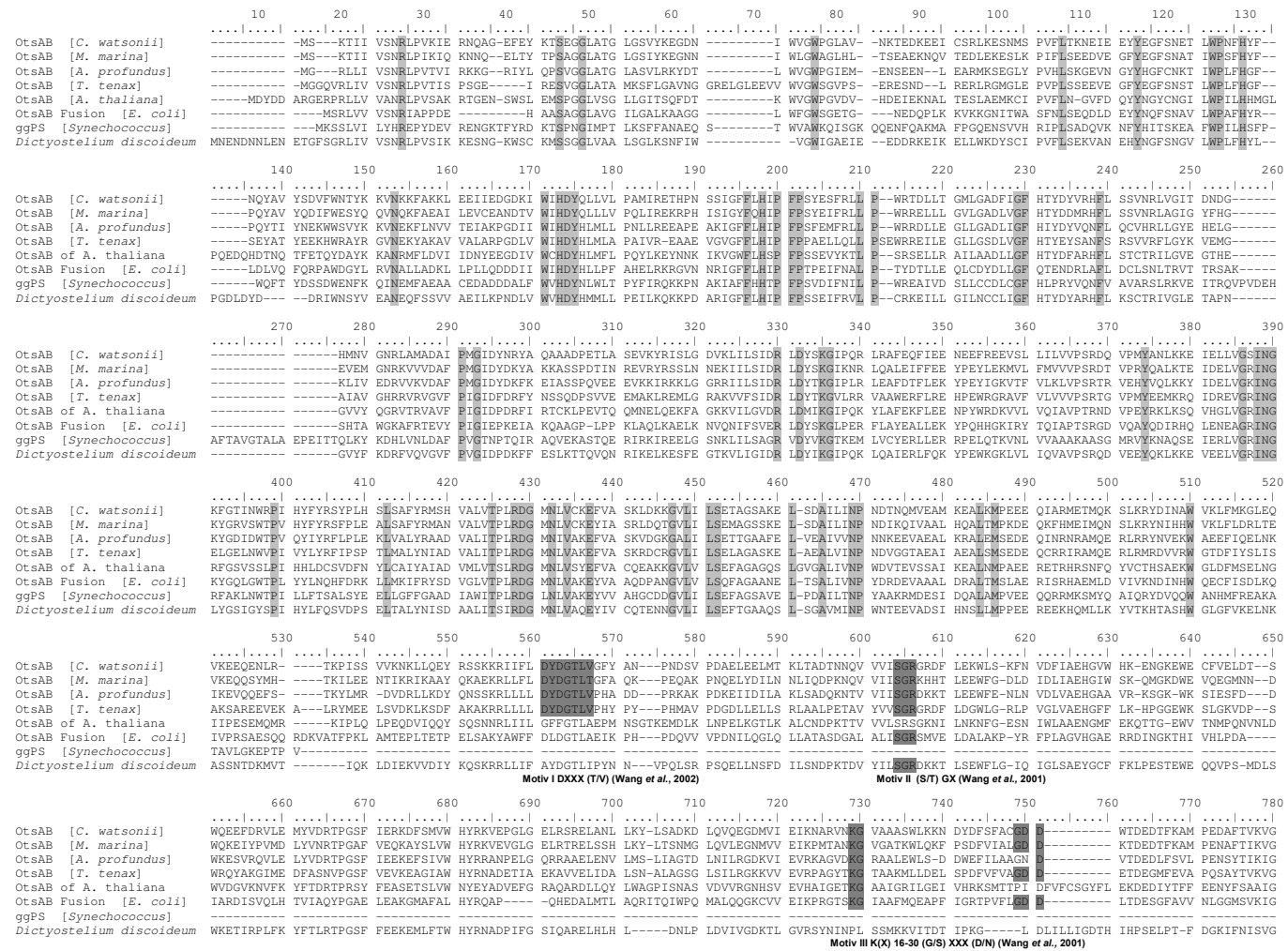
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 *Crocospaera watsonii* (WH8501)

##### 3.1.1 *In silico* Sequenzanalysen

BLASTp Analysen (Altschul *et al.*, 1997), mit der Glucosylglycerol-Phosphat-Synthase (GgpS) aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Marin *et al.*, 1998) identifizierten im Genom von *C. watsonii* ein Gen (ORF 3659 auf dem Contig 343), das für ein Protein mit hoher Ähnlichkeit zu dem Schlüsselenzym der Glucosylglycerol-Synthase kodiert. Nähere Analysen zeigten, dass der ORF 3659 eher ein Protein für die Trehalose-Synthase sein könnte. Daher wurde in weitergehenden Untersuchungen neben GgpS-Proteinen aus verschiedenen Cyanobakterien auch Trehalose-Phosphat-Phosphatasen/Synthasen aus unterschiedlichen Organismengruppen in die Datenbankanalysen einbezogen. Auf Grundlage dieser Proteinsequenzen wurde ein Alignment erstellt (Abb.7). Aus dem Proteinsequenzvergleich wird deutlich, dass es sich bei dem ORF 3659 nicht um ein GgpS Protein handelt. Bei allen Glucosylglycerol-Phosphat-Synthasen wurde eine charakteristische Insertion von etwa 20 Aminosäuren (Position 250 bis 271 in der GgpS von *Synechocystis* sp. PCC 7002; Abb. 7; Hagemann *et al.*, 2008) nachgewiesen, die in Trehalose-Phosphat-Synthasen und auch bei dem putativen OtsAB Protein (ORF 3659) aus *C. watsonii* fehlt. BLASTp Analysen mit dem putativen OtsAB Protein (ORF 3659) aus *C. watsonii* identifizierten zahlreiche Proteine, die eine hohe Ähnlichkeit zu dem Template besaßen und zumeist auch als putative Trehalose-Phosphat-Synthasen/Phosphatasen annotiert waren. Weiterhin zeigte die Analyse, dass kein Protein mit hoher Ähnlichkeit zu ORF 3659 in anderen Cyanobakteriengenomen kodiert ist. Da Trehalose-Phosphat-Synthasen/Phosphatasen aus Organismen aller drei Domänen des Lebens bekannt sind, konnte auf der Grundlage der Proteinsequenzen Cluster-Analysen vorgenommen werden. Der OtsAB Stammbaum (Abb. 8), der nach dem Neighbor-Joining Verfahren errechnet wurde, ist in 3 große Claden gegliedert: zwei Claden mit prokaryotischen Sequenzen und eine mit eukaryotischen Sequenzen aus Ascomyceten und Pflanzen. Das putative OtsAB Protein von *C. watsonii* befindet sich mit verwandten Sequenzen aus heterotrophen Bakterien und Archaea in einem Cluster. Bei den heterotrophen Bakterien handelt es sich in erster Linie um marine Vertreter der *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides* (CFB) Gruppe, wobei die größte Ähnlichkeit zu einem Protein aus *Microscilla marina* ATCC 23134 gefunden wurde. Dieses monophyletische Cluster besteht aus putativen prokaryotischen OtsAB Fusionsproteinen, deren Funktionalität bisher nicht überprüft ist. Das bedeutet, dass deren vermutete Fähigkeit Trehalose synthetisieren zu können, nicht verifiziert wurde. Die zweite Clade setzt sich aus den Proteinen der Pflanzen und Ascomyceten zusammen, wobei „Bootstrap“-Werte von 99-100 % stark für einen gemeinsamen Vorläufer sprechen. Das dritte Cluster umfasst nochmals viele prokaryotische OtsAB Proteine, darunter die charakterisierten Enzyme zur Trehalose-Biosynthese aus dem am besten untersuchten Prokaryoten *E. coli* (Kaasen *et al.*, 1992). Es muss erwähnt werden, dass für diese Analysen die separaten Proteine OtsA und OtsB aus *E. coli* und anderen Bakterien manuell fusioniert wurden. Das heißt, in diesem Cluster befinden sich Trehalose-Synthaseenzyme, bei denen die beiden enzymatischen Aktivitäten auf getrennten Proteinen zu finden sind.

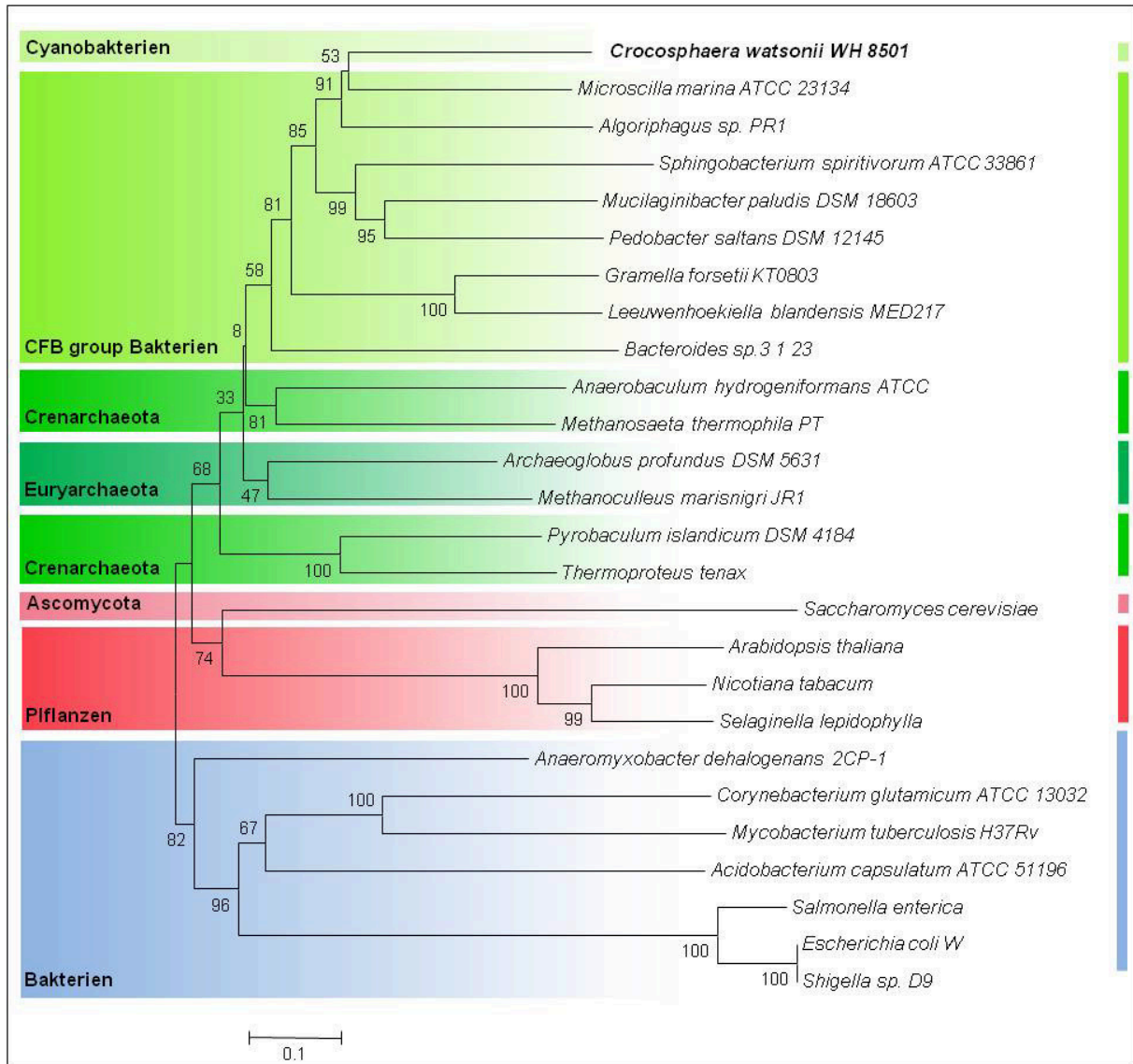
# Ergebnisse



**Abbildung 7: Ausschnitt des Alignments von OtsAB aus *C. watsonii* und nah verwandten Proteinen**

Dieser Teilbereich des Alignments zeigt die konservierten Domänen der Synthase (N-terminal) bzw. Phosphatase (C-terminal) Anteilen. Die hoch konservierten Aminosäuresequenzen sind dunkelgrau und die Konsensus-Sequenzen sind in hellgrau markiert.

## Ergebnisse



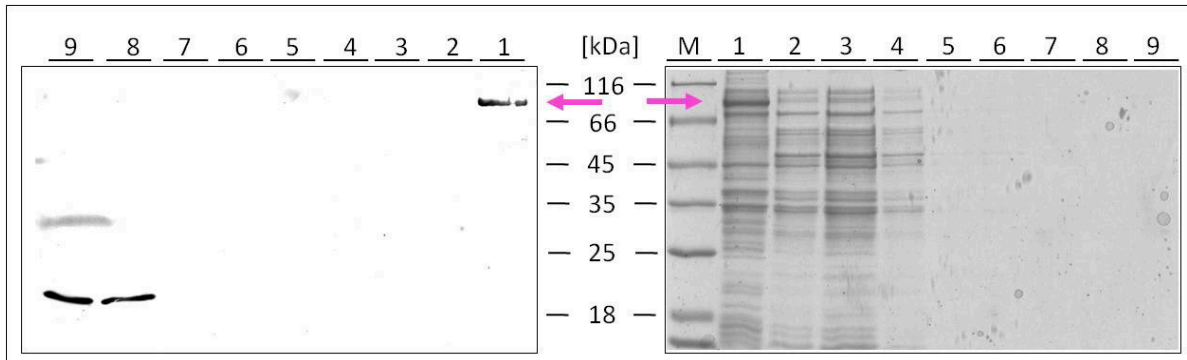
**Abbildung 8: Phylogenetische Analysen des putativen OtsAB Proteins aus *C. watsonii***

Dieser, nach dem Neighbor-Joining Verfahren erstellter Stammbaum, basiert auf den Aminosäuresequenzvergleichen der Trehalose-6-Phosphat-Synthasen/Phosphatasen (OtsAB) aus verschiedenen Organismen. Eine Skalierung des Abstands ist in der unteren linken Ecke zu sehen. Weitere Informationen, wie die Accession Nummern sind im Anhang zu finden.

### 3.1.2 Heterologe Expression von OtsAB aus *Crocospaera watsonii*

#### 3.1.2.1 „Full-length“ Protein

Aus den Vorarbeiten von Dr. Stephan Klähn standen bereits zahlreiche Expressionskonstrukte mit dem *OtsAB* Gen zur Verfügung. Vorversuche zeigten, dass das Protein erfolgreich heterolog zu exprimieren war, jedoch vollständig in einer unlöslichen Form, in sogenannten „inclusion bodies“, vorlag (Abb. 9).



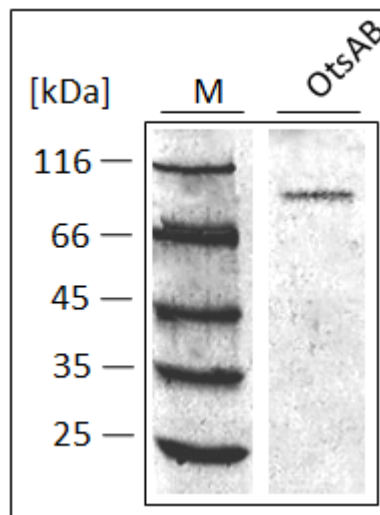
**Abbildung 9: Heterologe Expression von OtsAB aus *C. watsonii***

Abgebildet ist eine exemplarische Aufreinigung des heterolog exprimierten OtsAB Proteins aus *Crocospaera watsonii* mit Hilfe des Expressionsvektors pASK-IBA6 in *E. coli*. Auch bei der Nutzung eines anderen Expressionsvektors konnte das Protein lediglich im Pellet detektiert werden. Rechts ist das mit Coomassie gefärbte SDS - Acrylamidgel dargestellt und links der dazugehörige Western Blot, wobei die Nummerierung von 1-9 für die verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung stehen. Das bedeutet, in Spur 1 ist die unlösliche Fraktion (Pellet), in der zweiten Spur der Überstand und in der dritten Spur der Durchlauf aufgetragen. Nachfolgend befinden sich in der vierten bis sechsten Spur die drei Waschungen und in der siebten bis neunten Spur die drei Elutionen. Die SDS-PAGE wurde einheitlich mit 10 µg Protein beladen. Mit dem Pfeil ist das OtsAB Protein (83 kDa) markiert, welches lediglich im Pellet nachzuweisen war. (siehe Western Blot mit Strep-„tag“- spezifischem Antikörper gegen das rekombinante Protein, links).

Die in Abbildung 9 dargestellte Expression des OtsAB Proteins basiert auf der Klonierung in den pASK-IBA6 Vektor. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der Nutzung der *E. coli* Vektoren pASK-IBA7+, pASK-IBA43+, pBAD/HisA und pET28a beobachtet. Die Anzucht erfolgte bei 30 °C, wobei in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,6 - 0,8$ ) durch Zugabe von Anhydrotetrazyklin induziert wurde. Die Aufreinigung erfolgte über eine *Strep*-Tactin Matrix. Mittels der, an den Strep-„tag“ Antikörper (IBA, Göttingen) fusionierten, alkalinen Phosphatase konnte OtsAB auch in einem Western Blot nachgewiesen werden, jedoch lediglich im Pellet als „inclusion bodies“. Diese können beispielsweise durch eine zu hohe Expressionsrate oder aufgrund von Toxizität des rekombinanten Proteins entstehen. Vom Prinzip handelt es sich um eine Akkumulation unlöslicher Aggregate (Kane *et al.*, 1988; Fahnert *et al.*, 2004) in denen das Protein in stark verdichteter, parakristalliner Struktur vorliegt. Diese Einschlusskörper bestehen in der Regel aus vollständig synthetisierten Proteinen, die jedoch häufig eine Störung in ihrer Tertiärstruktur aufweisen (Fuchs, 2007).

### 3.1.2.2 „Full-length“ Protein - Aufreinigung aus „inclusion bodies“

Auch wenn die Proteinakkumulation in der Form von „inclusion bodies“ oft als unerwünscht erachtet wird, gibt es auch Vorteile. Beispielsweise wird das gewünschte Protein in sehr großen Mengen in den „inclusion bodies“ exprimiert und ist aufgrund der Größe und Dichte des Einschlusskörpers leicht aufzureinigen. Darüber hinaus ist das Protein innerhalb der „inclusion bodies“ vor proteolytischem Abbau geschützt. Angesichts der Homogenität des Proteins (wenige Verunreinigungen), in diesen unlöslichen Aggregaten, minimiert sich die Zahl der Aufreinigungsschritte erheblich (Singh und Panda, 2005). Demzufolge wurde auch hier versucht das OtsAB Fusionsprotein aus den „inclusion bodies“ aufzureinigen. Für diese Untersuchungen wurde der Expressionsstamm LMG194 mit dem pBAD/His A + *otsAB* Konstrukt gewählt. Die Zellen wurden nach Protokoll (2.7.2) aufgeschlossen und das Zellpellet für die Aufreinigung der „inclusion bodies“ verwendet. Das Lösen der Einschlusskörper erfolgte unter Verwendung von 6 M Guanidin-HCl. Anhand der unter 2.7.2 beschriebenen Methoden war es möglich das „full-length“ Protein OtsAB kontaminationsfrei aufzureinigen (Abb. 10).



**Abbildung 10: Aufreinigung von OtsAB aus "inclusion bodies"**

Abgebildet ist das mit Coomassie gefärbte Gel des OtsAB Fusionsproteins aus *Crocospaera watsonii*. Entsprechend den Erwartungen konnte ein Protein mit der Größe von 83 kDa aufgereinigt werden.

Mit diesem aufgereinigten Protein wurden enzymatische Reaktionen (siehe 2.7.10) durchgeführt, die im Anschluss gaschromatographisch auf das Endprodukt Trehalose untersucht wurden. In den gaschromatographischen Analysen konnte jedoch keine enzymatisch produzierte Trehalose bei Einsatz von rekombinanten Proteinen aus „inclusion bodies“ nachgewiesen werden.

### 3.1.2.3 „Full-length“ Protein – variierende Expressionsbedingungen

Durch Variieren der Expressionsbedingungen ist es möglich die Bildung von „inclusion bodies“ zu unterbinden (Baneyx, 1999). Eine kleine Auswahl der möglichen Variationen ist in Tabelle 6 zusammengefasst, die konkret in unterschiedlichen Versuchsansätzen umgesetzt wurden.

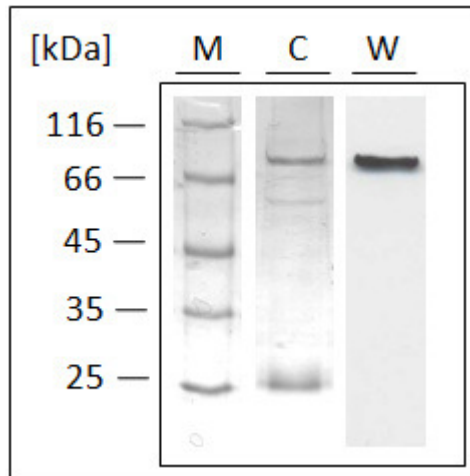


**Tabelle 6: Variierende Expressionsbedingungen und deren konkrete Umsetzung**

Variieren der Expressionsbedingungen durch Nutzung...	Konkrete Versuchsbedingungen umfassten die Nutzung von... / Anzucht bei... / Induktion mit...
unterschiedlicher Expressionsstämme	BL21, Top10, LMG194 und Lemo21 DE3
unterschiedlicher Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Promotoren	pET28a mit T7 Promoter pASK-IBA Serie mit tet Promoter pBAD/HIS A mit araBAD Promoter
unterschiedlicher Induktorkonzentrationen	variierenden IPTG- und Arabinose-Konzentrationen
unterschiedlicher Expressionstemperaturen	30 °C oder 37 °C mit oder ohne „Shift“ auf kühlere Temperaturen nach der Induktion oder komplette Anzucht und Expression bei 20 °C
unterschiedlicher Induktionszeitpunkte	in der lag, log und stationären Wachstumsphase
periplasmatischer Expressionsbedingungen hyperosmotischer Bedingungen	pASK-IBA6 Sorbitol und Glycinbetain

Aus der Tabelle 6 ist zu entnehmen, dass bereits die Klonierung in unterschiedliche Expressionsvektoren erfolgte und somit auch unterschiedliche Promotoren genutzt wurden. Darüber hinaus wurden die Expressionsplasmide in verschiedene Expressionswirte transformiert, wobei hier auf die Kompatibilität des Vektors zum „Host“ beachtet werden musste. Beispielsweise ist es nicht möglich ein T7-Expressionssystem (pET28a) in TOP10 oder LMG194, aufgrund der fehlenden T7-Polymerase, zu nutzen. Weiterhin wurden verschiedene Induktorkonzentrationen zur Aktivierung der Genexpression genutzt, wobei die Zugabe des Induktors wiederum in unterschiedlichen Wachstumsphasen erfolgte. Da die Kultivierungstemperatur sowie die Temperatur nach der Induktion eine wesentliche Rolle im Bezug auf die lösliche Expression der Proteine spielt (Schein und Noteborn, 1988; Kataeva *et al.*, 2005), wurden diese ebenfalls erniedrigt. Aber auch die Lokalisierung des exprimierten Proteins kann entscheidend sein, um die Bildung von „inclusion bodies“ zu unterbinden (Mergulhao *et al.*, 2005). So erfolgte beispielsweise die Klonierung in den Expressionsvektor pASK-IBA6, bei dem die Sekretion des rekombinanten Proteins ins Periplasma erfolgt. Lediglich durch die Kombination vieler veränderter Parameter war es möglich das Fusionsprotein OtsAB aus *C. watsonii* in löslicher Form heterolog zu exprimieren. Diese Ergebnisse konnten mit dem Expressionswirt LMG194 und dem Expressionsvektor pBAD/His A + *otsAB* erzielt werden. Die folgenden Parameter waren für eine lösliche Expression des Proteins unumgänglich, (i) Anzucht der Expressionskultur bei 20 °C für 6h auf LB-Medium, (ii) in Gegenwart hyperosmotischer Bedingungen durch Zusatz von Glycinbetain, Sorbitol und NaCl zum LB-Medium, (iii) Induktion mit 0,002 % Arabinose, (iv) Zellernte nach Wachstum über Nacht bei 20 °C. Mit diesen Expressionsbedingungen konnte OtsAB in löslicher Form exprimiert werden (Abb. 11). Mithilfe von Vivaspin-6-Röhrchen (Sartorius, Göttingen) war es möglich das Imidazol und das Salz aus dem Puffer zu entfernen. Resuspendiert wurde das Protein in

einem Puffer bestehend aus 50 mM Tris/HCl, pH 7,4 und 100 mM NaCl. Im Anschluss wurden enzymatische Untersuchungen vorgenommen.

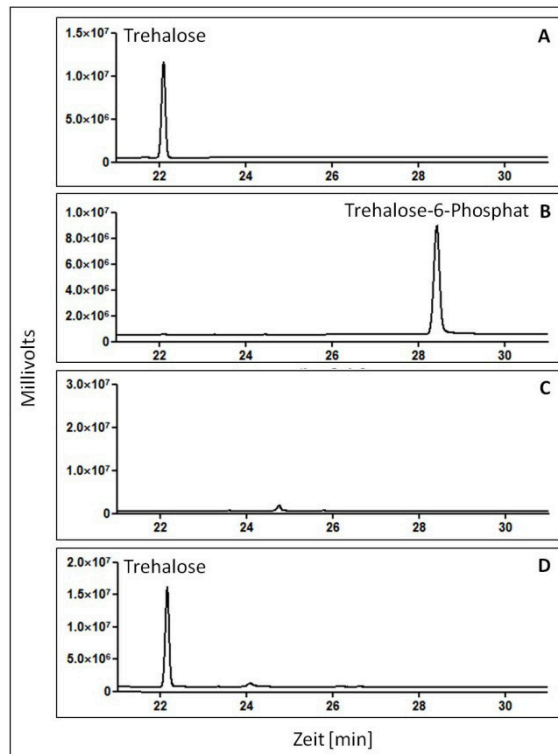


**Abbildung 11: Heterologe Aufreinigung von *C. watsonii* OtsAB aus *E. coli***

Links ist das mit Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgel (C) dargestellt und rechts davon der dazugehörige Western Blot (W). Bei den zwei Proteinen, die sich ebenfalls in der Elutionsfraktion befinden, handelt es sich um ein 60 kDa Chaperonin und um eine FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase (22 kDa).

#### 3.1.2.4 „Full-length“ Protein - Enzymatische Analysen

Mit dem aufgereinigten OtsAB Fusionsprotein wurden enzymatische Messungen durchgeführt. Als Kontrolle wurde der Expressionstamm LMG194 mit dem leeren pBAD/His A Expressionsvektor transformiert und gemeinsam mit dem pBAD/HIS A + *otsAB*- Expressionsklon unter identischen Expressionsbedingungen mitgeführt. Darüber hinaus wurde ein Kontrollenzymtest mit hitze-inaktiviertem Protein bzw. ohne Proteinzusatz parallel mitgeführt. Bei dem Enzymtest wurden die Ausgangssubstrate Glukose-6-Phosphat mit UDP-/ADP-oder GDP-Glukose zu Trehalose-6-Phosphat umgesetzt, wobei dieser Schritt von der Synthase-Domäne katalysiert wird. Das phosphorylierte Intermediat wird wiederum von der Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase zu dem Endprodukt, dem „compatible solute“ Trehalose umgesetzt, beziehungsweise dephosphoryliert, wobei anorganisches Phosphat frei wird (Klähn und Hagemann, 2011). Entsprechend der bekannten Substratspezifität von OtsA-Proteinen wurden die Ausgangssubstrate UDP-/ADP-oder GDP-Glukose und Glukose-6-Phosphat zum Enzymtest gegeben und das Reaktionsgemisch bei 28 °C inkubiert. Folglich wurde die Reaktion abgestoppt und mit alkalischer Phosphatase behandelt, um noch im Reaktionsansatz vorliegendes Zwischenprodukt (Trehalose-6-Phosphat) zu dephosphorylieren. Somit war es möglich die Gesamtmenge an synthetisierter Trehalose quantifizieren zu können. Die Quantifizierung erfolgte mittels gaschromatographischer Analysen, wobei 50 µg Sorbitol als interner Standard zugesetzt wurde.

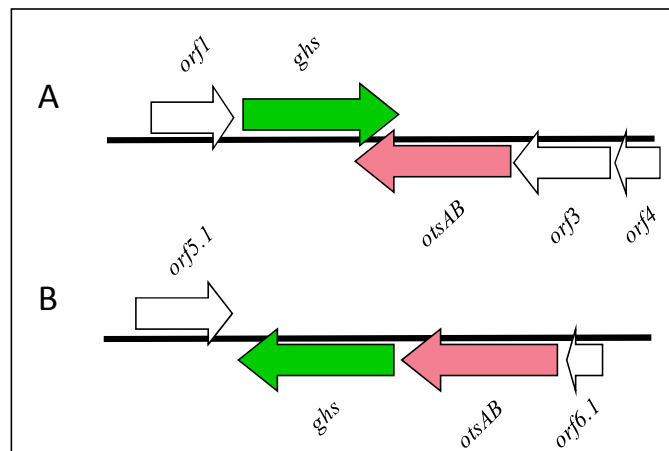


**Abbildung 12: Analyse der Reaktionsprodukte der Enzymtests zur Charakterisierung von *C. watsonii* OtsAB**

Diese gaschromatographischen Analysen zeigen die Bildung von Trehalose in Versuchsansätzen mit dem vollständigen OtsAB Fusionsprotein. In (A) ist das Chromatogramm der reinen Trehalose als Standard abgebildet und in (B) der Standard von Trehalose-6-Phosphat. Abbildung (C) zeigt die enzymatische Reaktion mit der Elutionsfraktion des leeren Vektors und (D) das Reaktionsprodukt der enzymatischen Reaktion mit dem Fusionsprotein OtsAB mit den Substraten Glukose-6-Phosphat und UDP-Glukose.

In Abbildung 12 ist zu erkennen, dass in Abhängigkeit des als Eingangssubstrat genutzten aktivierten Zuckers UDP-Glukose Trehalose synthetisiert werden konnte. Geringe Mengen an Trehalose konnten auch mit ADP-Glukose erzielt werden, wobei jedoch GDP-Glukose zu keiner enzymatischen Trehalosebildung führte. Letztlich war es möglich eine Aktivität von 2,5 nmol Trehalose min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> OtsAB Fusionsprotein zu messen. Die Kontrollen bestätigten, dass es mit dem Fusionsprotein OtsAB aus *C. watsonii* tatsächlich zur Umsetzung von Glukose-6-Phosphat und UDP-Glukose gekommen ist. Um die relativ geringe Aktivität des Enzyms zu steigern wurden verschiedene Variationen des Enzymtests überprüft. So konnte Pan *et al.* (1996) in ihren Untersuchungen an der Trehalose-Phosphat-Synthase aus *Mycobacterium smegmatis* zeigen, dass die Aktivität durch die Zugabe von Heparin um das Dreifache erhöht wurde, wenn UDP-Glukose als Glykosyl-Donor verwendet wird. Heparinmoleküle sind variabel veresterte Glycosaminoglykane mit einer Molmasse von 4000 bis 40000 Dalton, bestehend aus einer alternierenden Reihenfolge von D-Glukosamin und einer Uronsäure (D-Glukuronsäure). Aufgrund der zahlreichen Sulfat- und Carboxylreste im Molekül ist Heparin stark negativ geladen und bildet somit unter physiologischen Bedingungen Komplexe mit basischen Proteinen (Pan *et al.*, 1996). Allerdings führte die Zugabe von verschiedenen Mengen (0-10 µg) Heparin zum Reaktionsansatz zu keiner Steigerung der OtsAB Aktivität (Daten nicht dargestellt).

Untersuchungen der Arbeitsgruppe Sievers (Universität Essen) an einem ähnlichen OtsAB Fusionsprotein aus *Thermoproteus tenax* zeigten, dass nur durch Zugabe eines kleinen Proteins, eine OtsAB-Aktivität detektiert werden konnte (mündliche Mitteilung). Bei diesem Protein handelte es sich um eine putative Glycosyl Hydrolase, wobei das kodierende Gen stromabwärts des *otsAB* Gens im *T. tenax* Genom lokalisiert ist. Untersuchungen der Nachbarschaft von *otsAB* aus *Crocospaera watsonii* verwiesen ebenfalls auf ein Gen, welches stromabwärts lokalisiert ist und für eine Glycosyl Hydrolase kodiert (Abb. 13). Zudem konnte auch in dem Genom von *Microscilla marina* die gleiche Genanordnung gefunden werden (Abb. 13). Da die Vermutung nahe lag, dass es sich hierbei vielleicht um ein regulatorisches Protein handeln könnte, wurde die putative Glycosyl Hydrolase aus *C. watsonii* ebenfalls heterolog exprimiert und zum Enzymtest gegeben.



**Abbildung 13: Genlokalisierung von OtsAB und der putativen Glycosyl Hydrolase in den Genomen von *Crocospaera watsonii* (A) und *Microscilla marina* (B)**

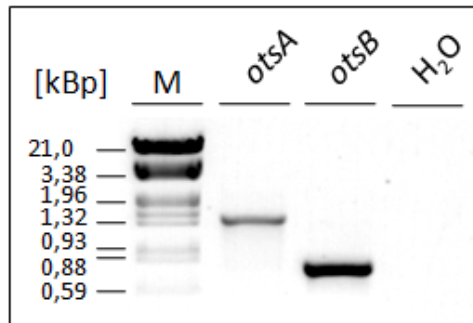
A: Das stromabwärts von *otsAB* gelegene *orf1* kodiert für eine Oxidoreduktase. Die ORFs stromaufwärts von *otsAB* kodieren für die folgenden Proteine: *ghs*, Glycosyl Hydrolase; *orf3*, Protein unbekannter Funktion; *orf4*, Transposase (Quelle: *Crocospaera watsonii* WH8501, NZ\_AADV02000019). B: Das *otsAB* Gene von *M. marina* liegt ebenfalls in unmittelbarer Nachbarschaft des *ghs* Gens, das für eine Glycosyl Hydrolase kodiert. Stromauf- und -abwärts sind die Gene *orf5.1* und *orf 6.1* lokalisiert, die für Proteine unbekannter Funktion kodieren (Quelle: *Microscilla marina* ATCC 23134, NZ\_AAWS01000064) (Pade *et al.*, 2012).

Durch die Zugabe dieses Proteins konnte jedoch keinerlei Effekt auf die Enzymaktivität beobachtet werden (Daten nicht dargestellt).

### 3.1.2.5 „Truncated“ Proteine

Die Einführung von sogenannten Affinitäts-„tags“, bei denen es sich lediglich um kleine Peptide (z.B. bilden 6 Histidine den His-„tag“ bzw. besteht der Strep-„tag“ aus 8 charakteristischen Aminosäuren (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys)) handelt, hat die Anreicherung rekombinanter Proteine stark vereinfacht. Für die folgenden Untersuchungen wurden jeweils Expressionsvektoren gewählt, die beide „tags“ oder nur einen als Feature tragen. Da es sich bei OtsAB um ein Fusionsprotein aus Synthase- und Phosphatase-Domäne handelt, sollte es prinzipiell auch möglich sein, beide Proteine separat voneinander heterolog zu exprimieren. Die Amplifizierung der beiden Genkonstrukte

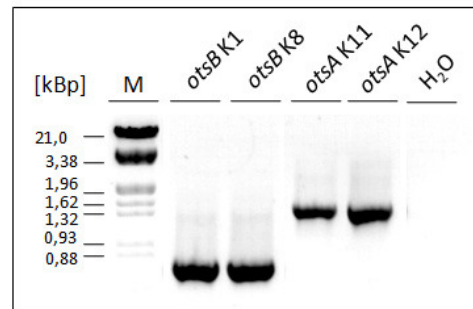
resultierte in den folgenden Fragmentgrößen: Synthase-Domäne (*otsA*) 1451 Bp und Phosphatase-Domäne (*otsB*) 735 Bp (Abb. 14).



**Abbildung 14: Amplifizierung der getrennten Domäne für *otsA* und *otsB* aus *C. watsonii***

Die hier abgebildeten PCR-Produkte wurden mit der folgenden Primerkonstellation erstellt: Cro\_HE\_TPS\_fw, Cro\_HE\_TPS\_rev, Cro\_HE\_P\_fw und Cro\_HE\_P\_rev.

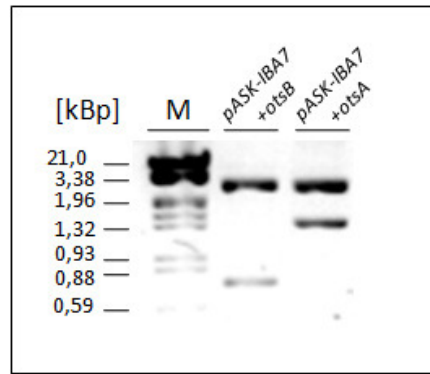
Diese Amplifikate wurden in pGEM®-T kloniert. Korrekte Klone wurden mittels Kolonie-PCR auf den Besitz des Inserts überprüft (Abb. 15).



**Abbildung 15: Screening vieler plasmidtragender *E. coli*-Klone mit *otsA* bzw. *otsB* Domänen aus *C. watsonii***

Hierbei handelt es sich um eine exemplarische Darstellung der Amplifikation beider Genkonstrukte per Kolonie-PCR. Die hier abgebildeten PCR-Produkte wurden mit der folgenden Primerkonstellation erstellt: Cro\_HE\_TPS\_fw, Cro\_HE\_TPS\_rev, Cro\_HE\_P\_fw und Cro\_HE\_P\_rev.

Aus korrekten Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert. Da die Oligonukleotide mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *SacI* und *HindIII* versehen waren, konnte nun mit Hilfe dieser Restriktionsenzyme das Insert aus pGEM®-T geschnitten werden. Nach der Elution der beiden Genkonstrukte, erfolgte deren Ligation in ausgewählte Expressionsvektoren (z.B. pASK-IBA7), die ebenfalls mit *SacI* und *HindIII* geschnitten wurden (Abb. 16).



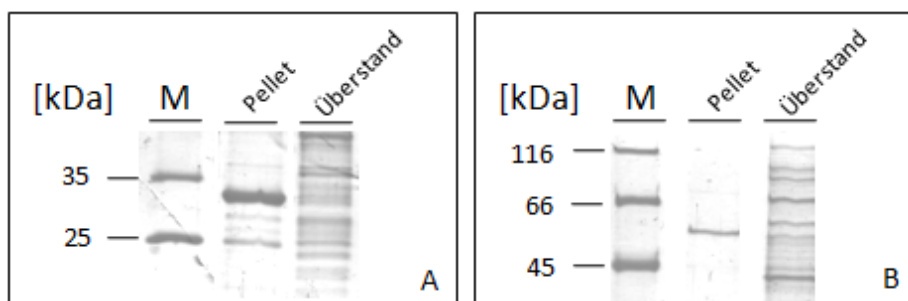
**Abbildung 16: Restriktionskontrolle der Plasmide mit *otsA* bzw. *otsB* Domäne aus *C. watsonii***

Hierbei handelt es sich um eine exemplarische Darstellung der Restriktion von zwei ausgewählten Plasmiden. Durch die Nutzung von *SacI* und *HindIII* als Restriktionsenzyme ist es möglich die *otsA* bzw. die *otsB* Domäne aus pASK-IBA7 zu schneiden.

Im Anschluss wurde der Expressionsstamm BL21(DE3) mit diesen Ligationsansätzen transformiert. Alle ausgewählten Klone konnten in der Kolonie-PCR, in der Restriktion, wie auch in der Sequenzierung bestätigt werden. Folglich war es möglich proteinbiochemische Untersuchungen vorzunehmen.

### 3.1.2.6 „Truncated“ Proteine – Heterologe Expression

Korrekte Klone wurden in einer Testexpression auf die Bildung rekombinanter Proteine hin überprüft. Dazu wurden zum Zeitpunkt 0, 2, 4 und 4-16 Stunden nach der Induktion Proben für eine eindimensionale SDS-PAGE genommen. Im Polyacrylamid-Gel ist zu erkennen, dass die Synthese OtsA, wie auch die Phosphatase OtsB ausschließlich in der unlöslichen Fraktion, in sogenannten „inclusion bodies“ vorliegen (Abb. 17). Entsprechend der Arbeiten zur Expression des „full-length“ Protein OtsAB wurden auch in diesem Fall unterschiedliche Expressionsbedingungen getestet (Tabelle 6), um die Proteine in der löslichen Fraktion zu erhalten. Doch leider blieben diese Bemühungen erfolglos. Die OtsA bzw. die OtsB Domänen lagen immer nur in „inclusion bodies“ vor.

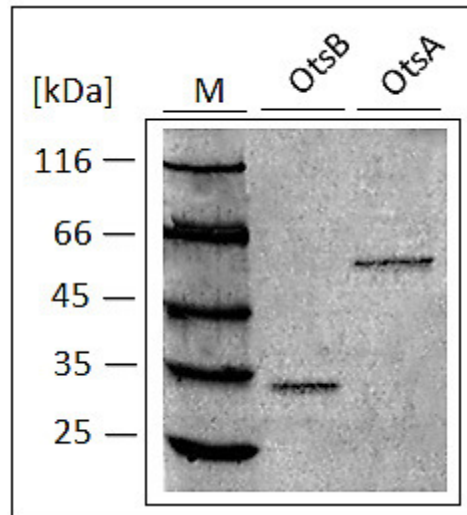


**Abbildung 17: Exemplarische Überprüfung der heterologen Expression von OtsA und OtsB aus *C. watsonii***

Abgebildet sind die Coomassie-Gele der heterologen Expression von OtsB (A) und OtsA (B), unterteilt in unlöslicher und löslicher Fraktion. Hierbei handelt es sich um eine exemplarische Darstellung, da auch mit allen anderen Expressionskonstrukten das gleiche Ergebnis erzielt werden konnte.

### 3.1.2.7 „Truncated“ Proteine – Aufreinigung aus „inclusion bodies“

Auch in diesem Fall, wurde versucht, die Synthase- bzw. die Phosphatase-Domäne aus den „inclusion bodies“ aufzureinigen. Die Vorgehensweise entspricht genau jener, mit der auch bereits das OtsAB Fusionsprotein aufgereinigt werden konnte (siehe 2.7.2). Für diese Untersuchungen wurden die Synthase und die Phosphatase in dem Expressionsstamm BL21(DE3) exprimiert, wobei die Konstrukte in dem Expressionsvektor pASK-IBA 7 vorlagen. Dabei war es schließlich möglich die beiden Proteine OtsA und OtsB kontaminationsfrei aufzureinigen (Abb. 18).



**Abbildung 18: Aufreinigung OtsA und OtsB aus „inclusion bodies“**

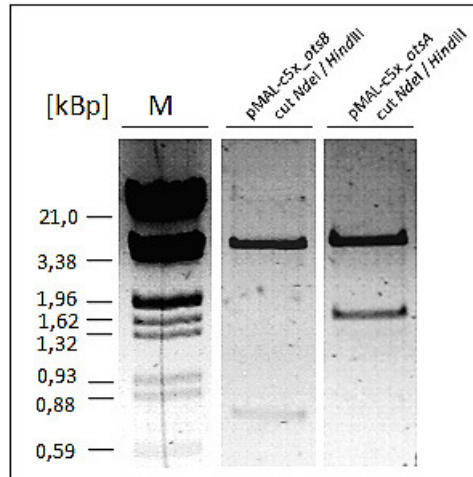
Abgebildet ist das Coomassie-Gel der OtsA und OtsB Protein aus *C. watsonii*. Entsprechend den Erwartungen konnten Proteine mit einer Größe von 56 und 28 kDa aufgereinigt werden.

Anschließend erfolgten enzymatische Messungen mit den aufgereinigten Proteinen. In den gaschromatographischen Analysen konnte jedoch keinerlei Aktivität mit den aus „inclusion bodies“ gewonnenen OtsA bzw. OtsB Domänen nachgewiesen werden.

### 3.1.2.8 „Truncated“ Proteine mit großen Affinitäts-„tags“ - Klonierungsprinzip

Neben Peptiden als „tags“ sind große Affinitäts-„tags“, wie z.B. das Calmodulin-Binde-Peptid, die Chitin-Binde-Domäne, die Gluthation-S-Transferase (GST) oder aber das Maltose-Binde-Protein (MBP), populär. Letzteres ist mit seiner Größe von 40 kDa mit Abstand das größte „tag“-System. Die herausragende Eigenschaft des MBP-„tags“ ist die Erhöhung der Löslichkeit des Fusionspartners (Hammarström *et al.*, 2001). Somit war es vielversprechend dieses System zur Gewinnung von löslichen OtsAB Proteinvarianten zu nutzen. Für diese Untersuchungen wurde das „pMAL™ Protein Fusion and Purification System“ von New England Biolabs (Frankfurt/Main) genutzt. Das bedeutet, dass die Zielfragmente in den pMAL Vektor stromabwärts des *malE* Gens „in frame“ kloniert wurden. Dabei kodiert das *malE* Gen das Maltose-Binde-Protein (MBP) (Guan *et al.*, 1987). Die Gene *otsA* und *otsB* wurden erfolgreich über pGEM®-T in den Expressionsvektor pMAL-c5x kloniert (Abb. 19). Somit

standen die Konstrukte nach der Transformation in *E. coli* BL21 für heterologe Proteinexpressionen zur Verfügung.



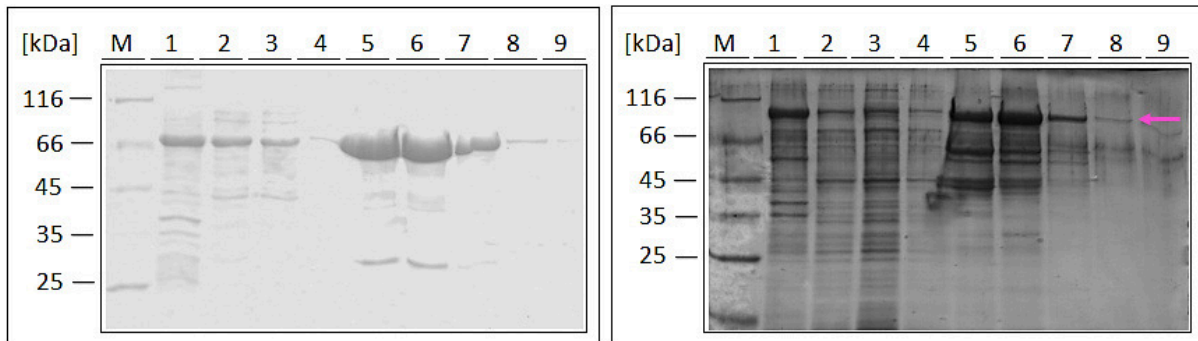
**Abbildung 19: Restriktionskontrolle der Expressionsplasmide zur Erzeugung von MalE-Fusionsproteinen**

Abgebildet ist die Restriktion mit *NdeI* und *HindIII* von pMAL-c5x + *otsA* und pMAL-c5x + *otsB*. Die erwarteten Fragmentgrößen von 5616 Bp für den verdauten Expressionsvektor pMAL-c5x, 737 Bp für *otsB* bzw. 1457 Bp für *otsA* konnten nachgewiesen werden.

### 3.1.2.9 „Truncated“ Proteine mit großen Affinitäts-„tags“ - Heterologe Expression

Für die heterologe Expression von OtsA und OtsB wurde eine Kultur mit einer  $OD_{600}$  von 0,05 angesetzt. Nach 2 Stunden des optimalen Wachstums bei 37 °C erfolgte die Induktion mit 1 mM IPTG. Danach wurden die Kulturen für die Proteinexpression bei 20 °C für 3 Stunden inkubiert. Die Proteinaufreinigung erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll. Die Aufreinigung der Phosphatase (OtsB) zeigt eindrucksvoll, dass mit Hilfe des Maltose-Binde-Proteins die Löslichkeit um ein Vielfaches erhöht ist (Abb. 20). Mit dem Mal-Expressionsystem konnte ein Fusionsprotein bestehend aus MalE (43 kDa) und OtsB (28 kDa), sowie aus MalE und *otsA* (56 kDa) löslich aufgereinigt werden.



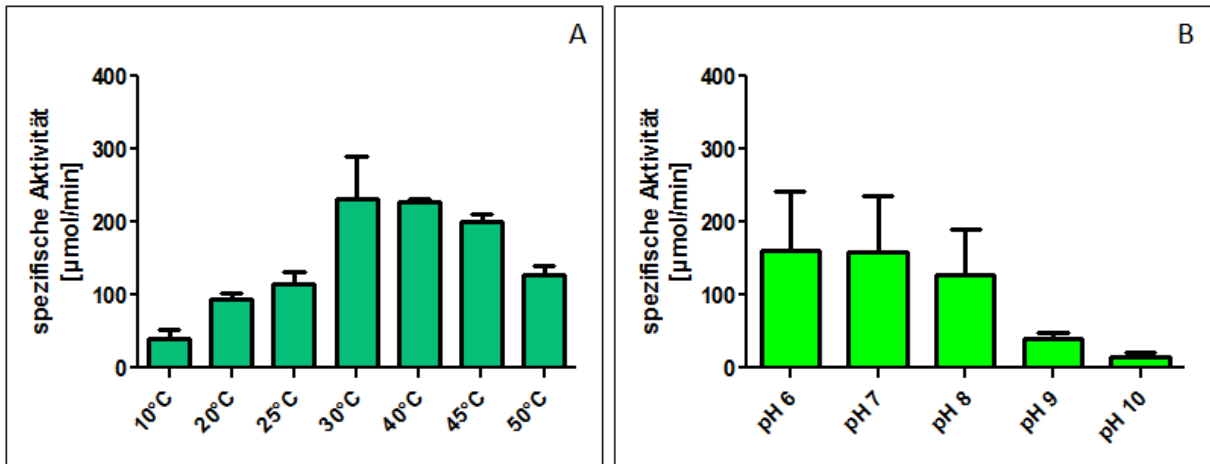


**Abbildung 20: Aufreinigung des Fusionsproteins OtsB-MalE und OtsA-MalE**

Abgebildet sind die Aufreinigungen des heterolog exprimierten OtsB-MalE und des OtsA-MalE Fusionsproteins aus *C. watsonii*. Die Nummerierungen von 1-9 stehen für die verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung. Das bedeutet, in Spur 1 ist die unlösliche Fraktion (Pellet), in der zweiten Spur der Überstand und in der dritten Spur der Durchlauf aufgetragen. Nachfolgend befinden sich in der vierten bis sechsten Spur die drei Waschfraktionen und in der siebten bis neunten Spur die drei Elutionen. Die SDS-PAGE wurde einheitlich mit 10 µg Protein beladen.

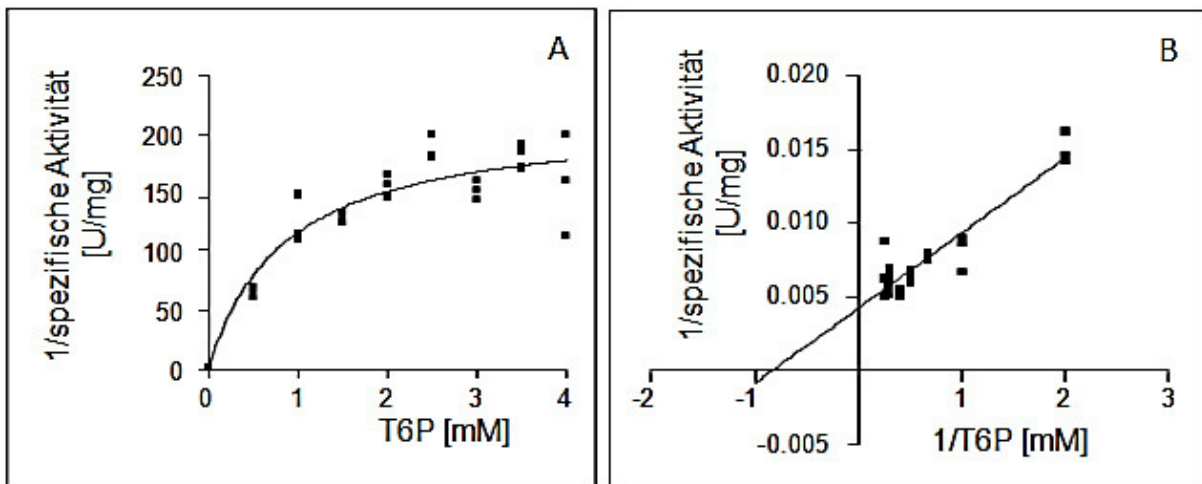
### 3.1.2.10 Biochemische Charakterisierung der OtsA- und OtsB- Domäne

Da es nicht möglich war die Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase ohne das Maltose-Binde-Protein für die biochemische Charakterisierung zu nutzen, erfolgte eine eingeschränkte Charakterisierung mit dem MalE-Fusionsprotein. Die Enzymaktivität wurde einerseits, indirekt durch Ermittlung des Gehalts an frei werdendem, anorganischem Phosphat und zum anderen durch die gaschromatographische Analyse der Freisetzung von Trehalose aus Trehalose-6-Phosphat, verifiziert. Für ersteres wurde eine Methode von Chen *et al.* (1956) genutzt. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte analog zu den Messungen, die mit dem „full-length“ OtsAB Protein durchgeführt wurden. Die Reaktionsansätze wurden nachträglich einer Phosphatase Behandlung unterzogen, um das möglicherweise vorliegende Intermediat, Trehalose-6-Phosphat zu dephosphorylieren. Gaschromatographisch konnten anschließend das Endprodukt Trehalose nachgewiesen werden. Die biochemischen Untersuchungen der OtsA Domäne lies auf keine Aktivität des Enzyms schließen, gaschromatographisch war es nicht möglich Trehalose zu detektieren. In ersten Untersuchungen der otsB Domäne zeigte sich, dass dieses Enzym aktiv war. Um die optimalen Testbedingungen zu finden und letztlich den Km-Wert bestimmen zu können, wurde zu Beginn die Abhängigkeit der OtsB-Aktivität vom pH Wert und der Inkubationstemperatur untersucht. OtsB hat ein Temperaturoptimum bei 30 °C (Abb. 21 A), wobei sich die Aktivität von 25 °C auf 30 °C nahezu verdoppelt und umgekehrt von 45 °C zu 50 °C nahezu halbiert. Bei den Messungen zur pH-Abhängigkeit (Abb. 21 B) wurde ein weiter Bereich von pH 6 - pH 8 gefunden, bei dem die spezifische OtsB-Aktivität weitestgehend konstant war. So war gewährleistet, dass das Protein in dem ausgewählten Puffer mit dem pH-Wert von 7,4 optimale spezifische Aktivität zeigt. Danach erfolgten Messungen in Abhängigkeit verschiedener Trehalose-6-Phosphat Konzentrationen. Aus Abbildung 22 wird ersichtlich, dass die Aktivität ab einer Konzentration von 2 mM in den sättigenden Bereich übergeht. Nach Lineweaver-Burk konnte ein Km-Wert von 1,2 mM Trehalose-6-Phosphat ermittelt werden, wobei dieser Wert dem Km der Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase aus *Mycobacterium smegmatis* ähnelt (Matula *et al.*, 1971; Klutts *et al.*, 2002).



**Abbildung 21: Biochemische Charakterisierung der OtsB Domäne aus *C. watsonii***

Die Aktivität des rekombinanten MalE-OtsB Fusionsproteins wurde bei verschiedenen Temperaturen (A) und bei verschiedenen pH-Werten (B) ermittelt.



**Abbildung 22: Biochemische Charakterisierung der OtsB Domäne aus *C. watsonii***

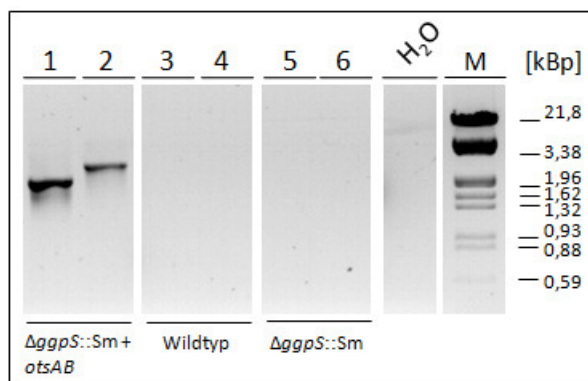
Die Aktivität des rekombinanten MalE-OtsB Fusionsproteins wurde mit verschiedenen Trehalose-6-Phosphat Konzentrationen ermittelt und nach Michaelis-Menten (A) bzw. Lineweaver-Burk (B) dargestellt.

### 3.1.3 Komplementation salzsensitiver Mutanten

Da sich die Erzeugung löslicher, enzymatisch aktiver OtsAB Proteine als schwierig erwies, wurde nach Alternativen zum Funktionsnachweis dieses *C. watsonii* Proteins gesucht. Glucosylglycerol-Synthesemutanten von *Synechocystis* 6803 ließen sich durch Trehalosezugabe- und -aufnahme phänotypisch komplementieren (Mikkat *et al.*, 1997), so dass dieses System hier Anwendung fand. Für die Komplementation standen zwei verschiedene salzsensitive Mutanten zur Verfügung. Zum einen die *Synechocystis* Mutante  $\Delta ggpS::Sm$  (Hagemann *et al.*, 2008), die einen Defekt in dem *ggpS* Gen, für die Glucosylglycerol-Synthese, aufweist und zum anderen die salzsensitive *E. coli* Mutante FF4169 (MC4100 *otsA1::Tn10*; Giaver *et al.*, 1988), die eine Deletion im *otsA* Gen trägt.

#### 3.1.3.1 Komplementation von $\Delta ggpS::Sm$

Aus den Vorarbeiten von Dr. Stephan Klähn standen für die weiteren Untersuchungen eine komplementierte  $\Delta ggpS::Sm$ -Mutante mit dem *otsAB*-Gen aus *C. watsonii* zur Verfügung. Dabei stand das *otsAB*-Gen unter Kontrolle des *ggpS*-Promotorbereichs -303 bis +384. Somit konnte ein Salzschock-Experiment durchgeführt werden, um die Mutante unter Salzstressbedingungen phänotypisch zu untersuchen. Hierzu sollte die Akkumulation von GG beim Wildtyp, Saccharose bei der  $\Delta ggpS::Sm$ -Mutante und Trehalose bei der komplementierten  $\Delta ggpS::Sm$ -Mutante, in Abhängigkeit zur Zeit nach einem Salzschock verfolgt werden. Bevor der eigentliche Versuch gestartet wurde, erfolgte die Isolierung chromosomaler DNA und die Verifizierung der komplementierten  $\Delta ggpS::Sm$ -Mutante (Abb. 23). Aus dieser Abbildung wird ersichtlich, dass die komplementierte Mutante das gesamte Konstrukt, bestehend aus Promoter und *otsAB* im Genom trägt. Im Wildtyp und auch in der Mutante konnte weder *otsAB* (2181 Bp), noch *ggPS\_prom* + *otsAB* (2871 Bp) amplifiziert werden.



**Abbildung 23: Verifizierung des Genotyps der mit dem *otsAB*-Gen aus *C. watsonii* komplementierten  $\Delta ggpS::Sm$  Mutante von *Synechocystis* 6803**

Für diese Untersuchung wurde die chromosomale DNA der Mutante, des Wildtyps und der komplementierten Mutante sowie genspezifische Primer genutzt. In der Spur 1, 3 und 5 sollte nur das *otsA* Konstrukt amplifiziert werden mittels der Oligonukleotide Croco\_comp1\_5' und Croco\_comp1\_3'. Die Spuren 2, 4 und 6 zeigen die Amplifikation des *otsAB* Konstrukts mit dem *ggpS*-Promotor, wobei dieses mit Hilfe der folgenden Oligonukleotide amplifiziert werden konnten: proggpS\_5' und Croco\_comp1\_3'.

Am Versuchstag wurden die Vorkulturen durch Verdünnen mit BG11-Medium ohne Natriumchlorid auf eine  $OD_{750} = 1,0$  eingestellt. Nach einer 2 stündigen Adaptationsphase erfolgte die Entnahme von Probenmaterial nicht salzbelasteter Zellen. Danach wurden diese Zellen mit 2 % und 3 % NaCl geschockt. Zwei, 24 und 48 Stunden nach der Salzzugabe wurden weitere Proben genommen, die für die analytische Auswertung am Gaschromatograph genutzt wurden. Unter Kontrollbedingungen zeigen alle Kulturen weder eine Akkumulation von Glucosylglycerol noch von Saccharose oder Trehalose. Bereits mit der ersten Probennahme (2 Stunden nach Salzzugabe) können geringe Mengen (264 nmol/ml Kulturvolumen) Glucosylglycerol im Wildtyp nachgewiesen werden. Nach 24 h bzw. 48 h steigt die Menge an Glucosylglycerol im Wildtyp an. Vergleicht man die Akkumulation von Glucosylglycerol im Wildtyp in Gegenwart von 2 % bzw. 3 % NaCl, so wird deutlich, dass es eine salzabhängige Akkumulation von Glucosylglycerol im Wildtyp gibt. Darüber hinaus kann weder Trehalose, noch Saccharose in osmotisch aktiven Mengen im Wildtyp nachgewiesen werden. Die  $\Delta ggpS::Sm$ -Mutante zeigt auch nach den gaschromatographischen Analysen entsprechend dem Genotyp keine Akkumulation von GG. Dafür wird in Anwesenheit von 2 % NaCl Saccharose in Abhängigkeit zur Zeit akkumuliert. Nach 24 h kann das erste Mal Saccharose detektiert werden, wobei dieser Wert nach 48 h auf das 7,5 fache ansteigt. Der Salzschock mit 3 % NaCl zieht keinen deutlichen Anstieg der Saccharose Konzentration im Verlauf der Zeit nach sich. Trehalose ist auch in der  $\Delta ggpS::Sm$ -Mutante nicht detektierbar. Die Analyse der komplementierte  $\Delta ggpS::Sm$ -Mutante zeigt ebenfalls keine signifikante Trehaloseakkumulation. Auch hier konnte Saccharose als einziges Osmoprotektant nachgewiesen werden (Abb. 24).

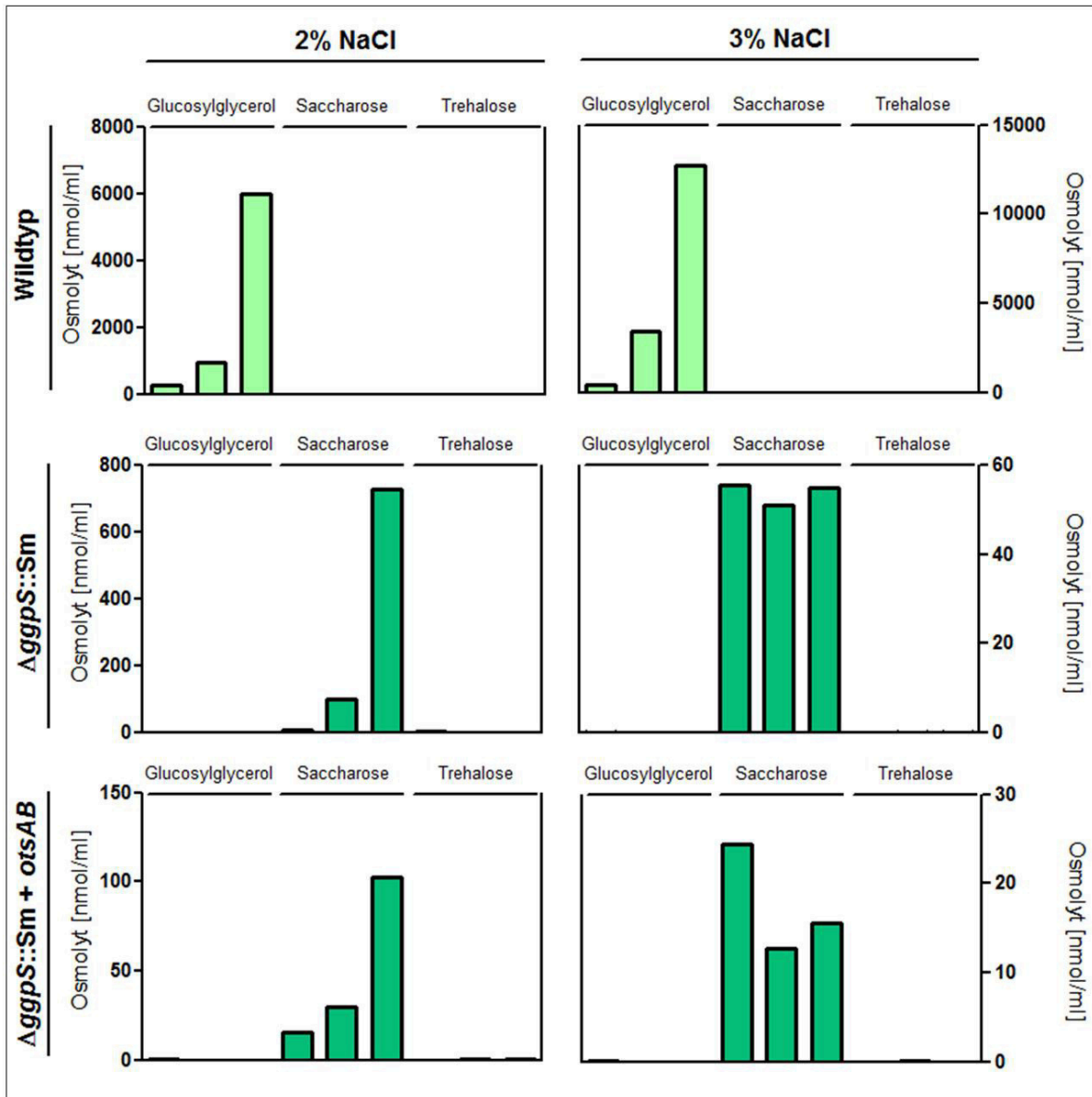
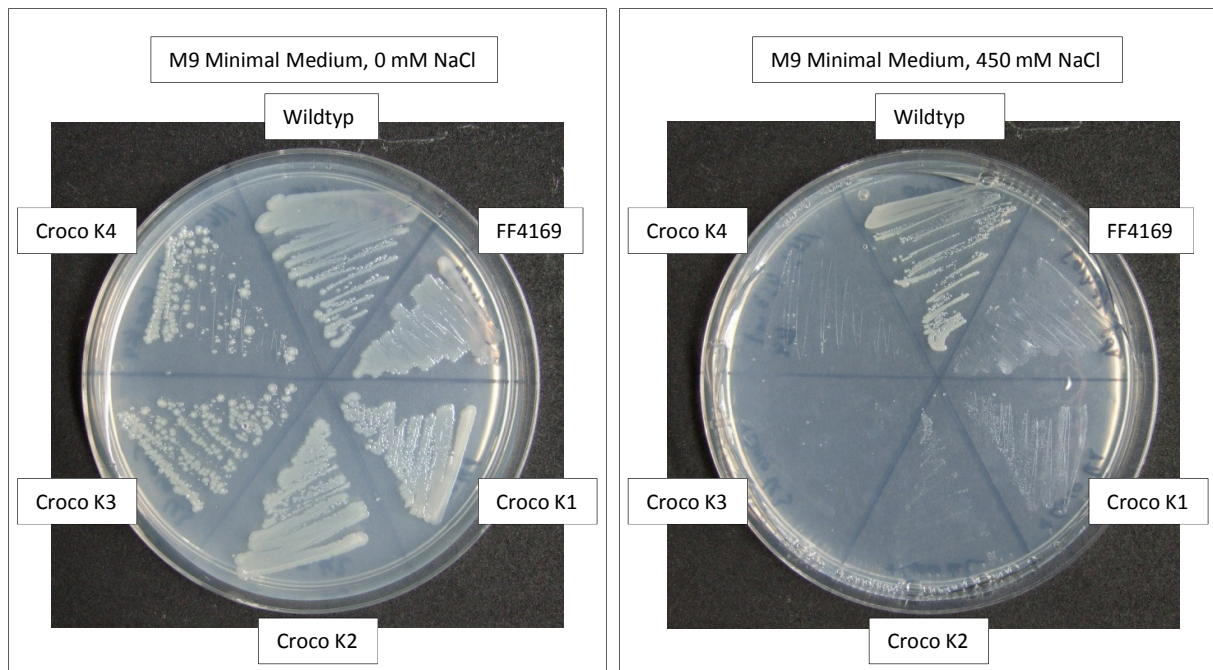


Abbildung 24: Gaschromatographische Analyse von *Synechocystis* 6803 Stämmen mit und ohne *otsAB* Expression

Abgebildet ist der intrazelluläre Osmolytgehalt des Wildtyps, der  $\Delta ggpS::Sm$  Mutante und der komplementierten Mutante  $\Delta ggpS::Sm + otsAB$ . Dieser Gehalt wurde bei 2 % und bei 3 % NaCl mit Hilfe des internen Standards Sorbitol (50  $\mu$ g) quantifiziert.

### 3.1.3.2 Komplementation der *E. coli* Mutante FF4169 (MC4100 *otsA1::Tn10*)

Für eine weitere Komplementation stand die *E. coli* Mutante FF4169 (MC4100 *otsA1::Tn10*) zur Verfügung. Hier wurde ein Transposon in das *otsA* Gen eingefügt, so dass dieser Stamm nicht mehr in der Lage ist, Trehalose zu synthetisieren. Da *E. coli* jedoch in der Lage ist „compatible solutes“ auch aus dem umgebenden Medium aufzunehmen, wurde für diese Untersuchungen ein Minimal Medium gewählt. Die Komplementation erfolgte über den pGA-mcs\_otsB + *otsAB* Vektor. In diesem Vektor steht das *otsAB* Gen aus *C. watsonii* unter Kontrolle der *otsB* Promotorsequenz aus *E. coli* (MC4100), um eine stressgerechte Expression des Fusionsproteins OtsAB herbeizuführen. Nach erfolgreicher Transformation in die Mutante FF4169 wurden 4 Klone ausgewählt und phänotypisch untersucht. Durch die Komplementation wurde eine Revertierung des salzsensitiven Phänotyps der komplementierten Mutante und somit ein verbessertes Wachstum im Vergleich zur Mutante FF4169 erwartet. Um dies nachvollziehen zu können, wurden als Kontrollen die Mutante FF4169 und der Wildtyp MC4100 mitgeführt. Um einen ersten Hinweis auf das allgemeine Wachstumsverhalten der Komplementanten zu erhalten, wurden Plattentests mit und ohne Natriumchlorid gemacht.



**Abbildung 25: Überprüfung des Phänotyps auf Minimal Medium mit und ohne Natriumchlorid**

Die vier ausgewählten Rekombinanten (Croco K1, Croco K2, Croco K3 und Croco K4) wurden mit dem Wildtyp und der Mutante FF4169 auf M9 Minimal Medium mit und ohne Natriumchlorid ausgestrichen.

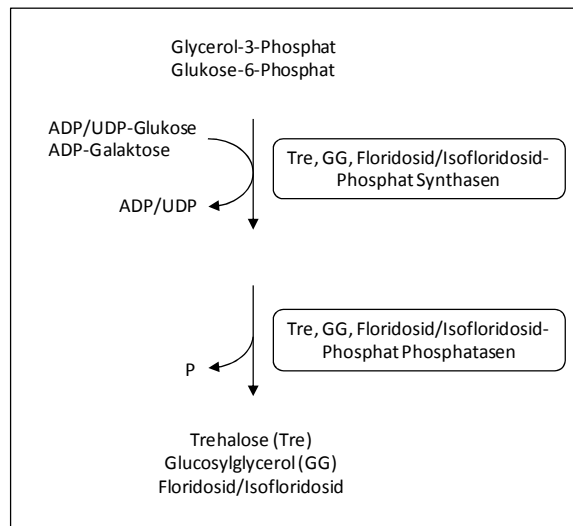
In Abbildung 25 (links, 0 mM NaCl) ist das Wachstum in Abwesenheit von Natriumchlorid zu sehen. Dabei wird deutlich, dass der Wildtyp MC4100, die Mutante FF4169 und die ersten zwei Komplementanten ein annähernd gleiches Wachstum aufzeigten. Die letzten beiden Komplementanten zeigten ein leicht reduziertes Wachstum im Vergleich zu den anderen Kulturen. Dem gegenüber steht der Plattentest, der in Anwesenheit von 450 mM Natriumchlorid durchgeführt wurde (Abb. 25). Der Wildtyp zeigte ein eindeutiges Wachstum, wenngleich die Wachstumsrate

reduziert war. Die Mutante hingegen zeigte keinerlei Wachstum, wobei eine leichter Schmier zu erkennen war. Interessanterweise sind die ersten beiden Komplementanten, die bereits ohne NaCl ein sehr gutes Wachstum zeigten, dazu befähigt kleine Kolonien zu bilden. Möglicherweise war das ein Hinweis auf eine sehr geringe Reversion zum salztoleranten Phänotyp. Um diesen Hinweis nachzugehen, wurden gaschromatographische Untersuchungen durchgeführt. Diese ergaben jedoch keinen Hinweis darauf, dass die *E. coli* Mutante FF4169 tatsächlich komplementiert wurde und nun wieder in der Lage war, Trehalose mit dem OtsAB Protein aus *C. watsonii* zu synthetisieren.

### 3.2 Floridosid-/Isofloridosid-Synthese in *Galdieria sulphuraria*

#### 3.2.1 *In silico* Sequenzanalysen

Innerhalb dieses Promotionsprojektes sollte herausgefunden werden, welche Proteine für die Biosynthese von Floridosid bzw. Isofloridosid in Rotalgen verantwortlich sind. Dazu wurden die Biosynthesewege anderer osmotisch aktiver Substanzen betrachtet, wie beispielsweise der von GG oder der von Trehalose (Abb. 26). Im Vergleich zu dem putativen Syntheseweg von Floridosid/Isofloridosid wird klar, dass es sich vermutlich um (ein) Enzym(e) handeln könnte, welche(s) einen ähnlichen Zweischnittmechanismus vollziehen kann (Kauss, 1977; Kremer und Kirst, 1981). Das bedeutet, dass das gesuchte Enzym womöglich die Kondensation von Glycerol-3-Phosphat und ADP/UDP-Galaktose katalysiert und im Idealfall noch eine Phosphatase-Domäne trägt, die letztlich auch die Dephosphorylierung des phosphorylierten Intermediates vollzieht.

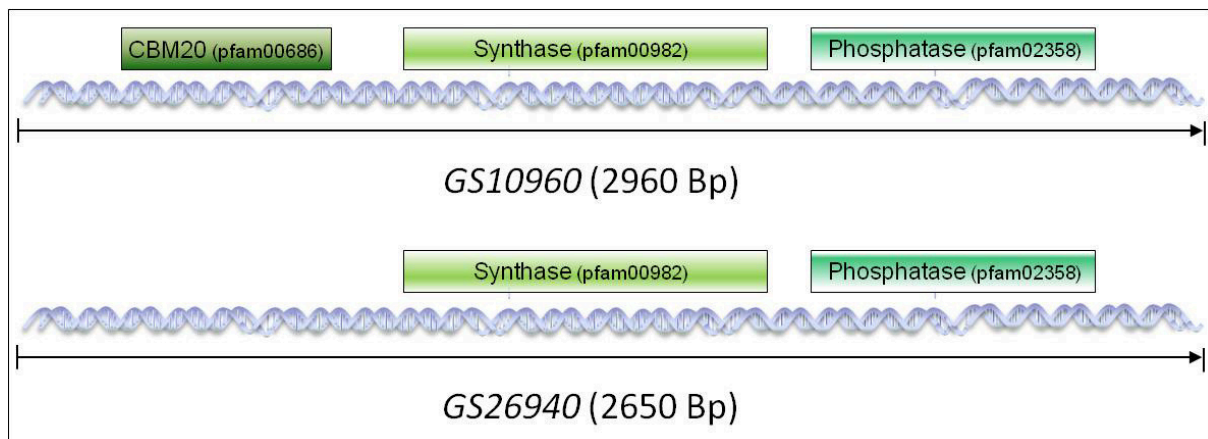


**Abbildung 26: Vergleich der Synthese verschiedener "compatible solutes"**

Die Trehalose-Synthese wird über den OtsAB Syntheseweg z.B. von *C. watsonii* vollzogen und die Synthese von GG wird von *Synechocystis* sp. PCC6803 gemacht. Bei der Floridosid-/Isofloridosid-Synthese handelt es sich um einen putativen Weg, der z.B. in der Rotalge *Galdieria sulphuraria* für die Synthese dieser „compatible solutes“ verantwortlich sein könnte.

Mittels BLASTp-Analysen, bei denen die Trehalose-6-Phosphat-Synthase aus *Arabidopsis* bzw. die GG-Phosphat-Synthase aus *Synechocystis* als Template verwendet wurden, konnten im *Galdieria*-

Genom 4 Proteine (GS10960, GS26940, GS01890 und GS22110) identifiziert werden, die hohe Ähnlichkeiten zu diesen Proteinen aufwiesen. Von diesen Vier wurden zwei Proteine ausgewählt, die in Clusteranalysen etwas entfernter von typischen Trehalose-6-Phosphat-Synthasen standen. Die kodierende Sequenz der Gene *GS10960* bzw. *GS26940* wurde mittels Gensynthese erzeugt (Abb. 27). Beide Gene kodieren für Proteine, die durch eine Synthase- und eine Phosphatase-Domäne charakterisiert sind. Interessanterweise trägt das Protein GS10960 noch eine CBM20 Domäne. Hierbei handelt es sich um eine sogenannte „starch-binding domain“. Ungefähr 10 % aller amylolytischer Enzyme besitzen eine solche Domäne, um Stärke zu binden und dann abzubauen (Tibbot *et al.*, 2002; Hostinova *et al.*, 2003).



**Abbildung 27: Charakteristische Domänen der Gene *GS10960* und *GS26940***

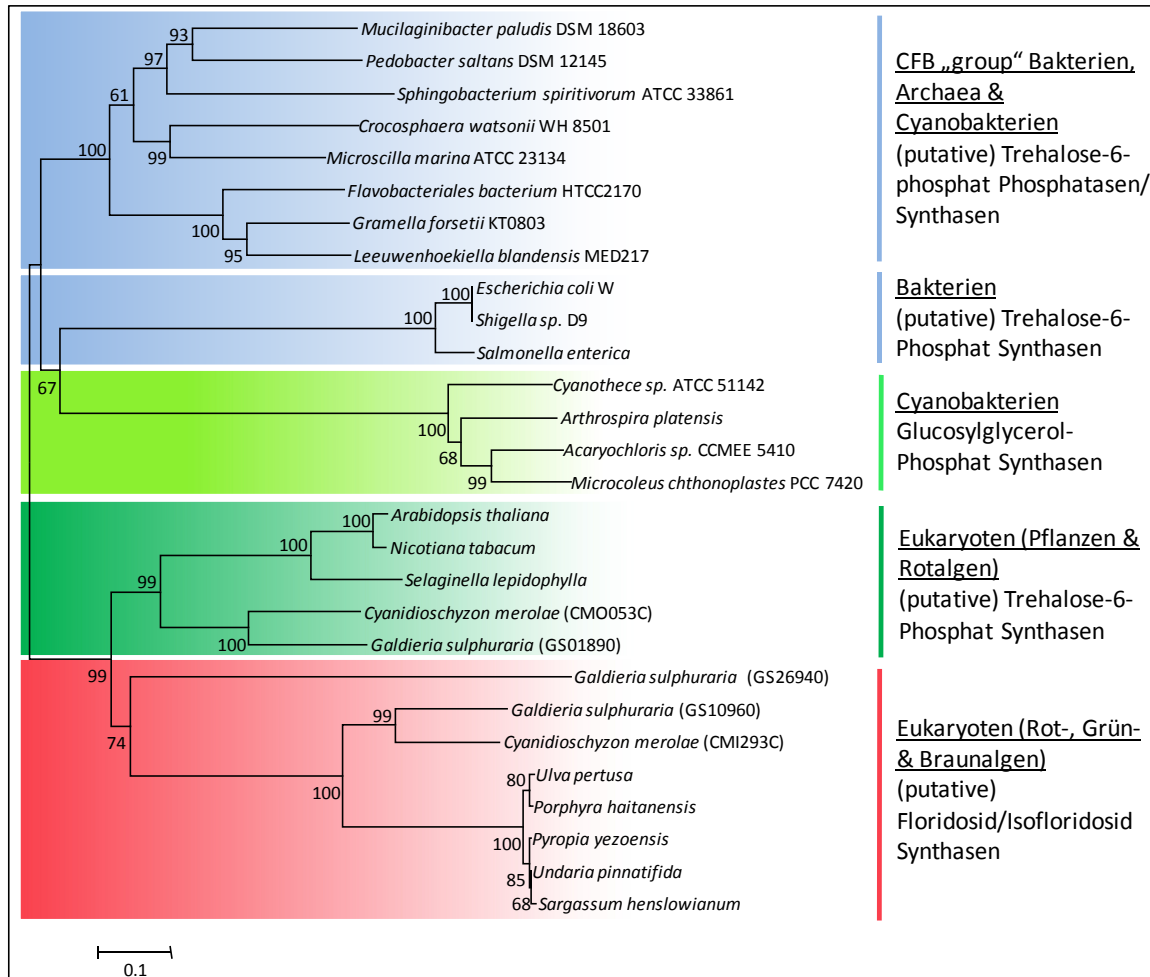
Beide Gene zeichnen sich durch das Vorhandensein einer Synthase- und Phosphatase-Domäne aus. Darüber hinaus trägt das Gen *GS10960* zusätzlich eine CBM20 Domäne zur Stärkebindung.

Um die putative Funktion dieser Proteine weiter einzugrenzen, wurde deren Ähnlichkeit zu anderen Proteinen in phylogenetischen Studien untersucht. Dazu wurde in den Datenbanken nach GgpS-Proteinen aus verschiedenen Cyanobakterien, sowie nach Trehalose-6-Phosphat-Phosphatasen/Synthasen aus unterschiedlichen Organismengruppen recherchiert. Auf Grundlage dieser Proteinsequenzen wurde ein Alignment erstellt. Dabei wird zum einen deutlich, dass es sich bei den beiden Proteinen *GS10960* und *GS26940* keinesfalls um ein GgpS Protein handelt, denn alle Glucosylglycerol-Phosphat-Synthasen besitzen eine charakteristische Insertion von etwa 20 Aminosäuren (Position 266 bis 285 in der GgpS von *Synechocystis* sp. PCC 7002; Daten hier nicht gezeigt; Hagemann *et al.*, 2008). Diese Insertion fehlt bei den putativen Floridosid-/Isofloridosid-Synthese Proteinen aus *Galdieria sulphuraria*.

Weitere BLASTp Analysen, die mit den putativen *Galdieria*-Proteinen als Template durchgeführt wurden, identifizierten zahlreiche, als putative Trehalose-6-Phosphat-Synthasen annotierte Proteine. Darunter befinden sich uncharakterisierte Proteine aus Rotalgen. Im Stammbaum (Abb. 28), der auf Grundlage dieser Aminosäuresequenzen errechnet wurde, bilden die Proteine aus Rotalgen mit unseren putativen Floridosid-/Isofloridosid-Synthasen ein gemeinsames Cluster. Darüber hinaus befinden sich in diesem Cluster auch Proteine aus Braunalgen (*Sargassum henslowianum* und



*Undaria pinnatifida*) und einer Grünalge (*Ulva pertusa*), wobei Bootstrap-Werte von 80-100 % auf einen gemeinsamen Ursprung hinweisen könnten. Unmittelbare Schwesterngruppe zu den putativen Floridosid-/Isofloridosid-Synthasen ist die Clade der (putativen) Trehalose-6-Phosphat-Synthasen aus Pflanzen und Algen. In den weiteren Claden sind zum einen die prokaryotischen Trehalose-6-Phosphat-Synthase Proteinsequenzen bzw. die cyanobakteriellen GgpS-Sequenzen zusammengefasst.

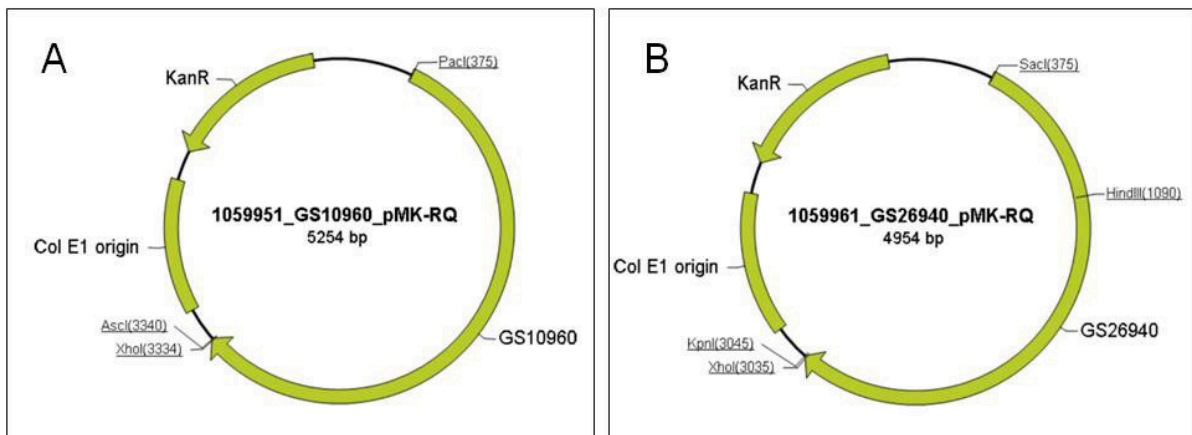


**Abbildung 28: Phylogenetische Analysen der putativen Floridosid-/Isofloridosid-Synthasen aus *Galdieria sulphuraria***

Der Neighbor-Joining Stammbaum gruppiert Aminosäuresequenzen der putativen Floridosid-/Isofloridosid-Synthasen aus *Galdieria sulphuraria* und (putativer) Trehalose-6-Phosphat-Synthasen und Glucosylglycerol-Phosphat-Synthasen aus verschiedenen Organismen. Eine Skalierung des Abstands ist in der unteren linken Ecke zu sehen. Weitere Informationen, wie die Accession Nummern der analysierten Proteine sind im Anhang zu finden.

### 3.2.2 Gensynthese putativer Floridosid-/Isofloridosid-Synthasen „by Mr. Gene“

Aufgrund der Tatsache, dass es nicht möglich war „full-length“ cDNA von *GS10960* und *GS26940* zu erhalten (mündliche Mitteilung A.P.W. Weber, Universität Düsseldorf), wurden die Gene, ausgehend von der vorhandenen DNA Sequenz, in vollständiger Länge synthetisiert. Darüber hinaus wurde das „codon usage“ an *E. coli* angepasst, um die Expression in heterologen Systemen zu optimieren. Die Klonierung störende Restriktionsschnittstellen wurden ebenfalls beseitigt. Die doppelsträngige DNA-Sequenz wurde dann in einen Vektor, in unserem Fall pMK-RQ kloniert, der mittels DNA-Sequenzierung verifiziert wurde. Aus den Vektorkarten (Abb. 29) wird ersichtlich, dass speziell ausgewählte Restriktionsschnittstellen vor und hinter den Genkonstrukten die Klonierung in Expressionsvektoren ermöglichte.



**Abbildung 29: Vektorkarten der von „Mr. Gene“ hergestellten Plasmide mit den Genen *GS10960* bzw. *GS26940* aus *Galdieria sulphuraria***

In A ist die Vektorkarte von pMK-RQ mit *GS10960* dargestellt, wobei die Resistenzkassette für Kanamycin der Selektionierung positiver Klone dient. Der Col E1 origin ist notwendig, damit diese Plasmide in *E. coli* auch repliziert werden. In B ist analog dazu pMK-RQ mit *GS26940* abgebildet.

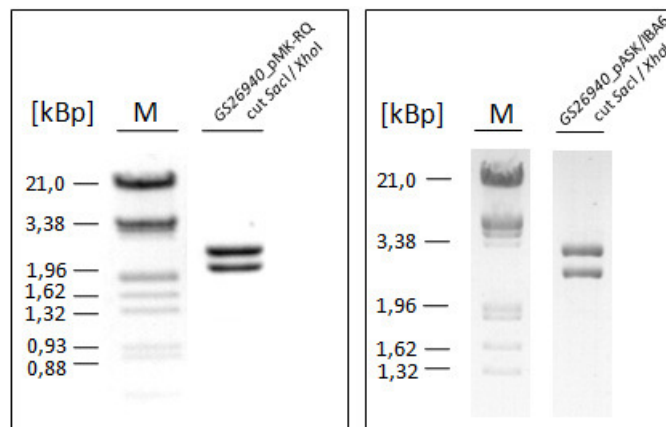
### 3.2.3 Expressionsstudien in prokaryotischen Expressionssystemen

Das Bakterium *E. coli* ist der meist genutzte Organismus für heterologe Proteinexpressionen, um auf diese Weise große Mengen an rekombinanten Proteinen zu gewinnen. Die kodierende Sequenz wird dazu in einen Expressionsvektor kloniert, wobei das klonierte Gen unter Kontrolle eines bakteriellen Promotors steht. Für die Expression in einem *E. coli* Expressionssystem stand eine Vielzahl verschiedener Expressionsvektoren zur Auswahl, wobei jeder für sich interessante Eigenschaften für eine erfolgreiche Synthese bereithält. So erlaubt beispielsweise ein Polyhistidin-„tag“ (6-8 Aminosäuren) die einfache Aufreinigung des exprimierten Proteins mit Hilfe von „immobilized metal affinity chromatography“ (IMAC). Darüber hinaus existieren noch zahlreiche andere „tags“ die letztlich eine erfolgreiche Aufreinigung des Proteins gewährleisten sollen. Hin und wieder treten jedoch auch im Expressionssystem *E. coli* die einen oder anderen Probleme auf (siehe Kapitel 3.1.2). Heterolog exprimierte Proteine sind häufig nicht löslich, sondern akkumulieren in Einschlusskörpern („inclusion bodies“). Versuche, die aus „inclusion bodies“ aufgereinigten Proteine im Anschluss durch

Rückfaltung in den nativen Zustand zu überführen, verlaufen nicht immer erfolgreich. Weitere Probleme treten bei eukaryotischen Proteinen auf, die für Ihre biochemische Aktivität bestimmte posttranslationale Modifizierungen (z.B. Glykosylierungen) benötigen, die im prokaryotischen Wirt nicht möglich sind (Clark & Pazdernik, 2009).

### 3.2.3.1 „Full-length“ Proteine

Für die Klonierung der zwei Genkonstrukte (*GS10960* und *GS26940*) aus *G. sulphuraria* standen zahlreiche Expressionsvektoren zur Verfügung. Da die Schnittstellen vor und hinter den Genen wählbar waren, erfolgte lediglich die Restriktion mit *NdeI* und *XhoI* für die Klonierung in pET28a (Abb. 30). *GS26940* konnte darüber hinaus auch mit *SacI* und *XhoI* aus dem Synthesevektor pMK-RQ geschnitten werden und folglich sofort in Expressionsvektoren der pASK-IBA Serie ligiert werden.



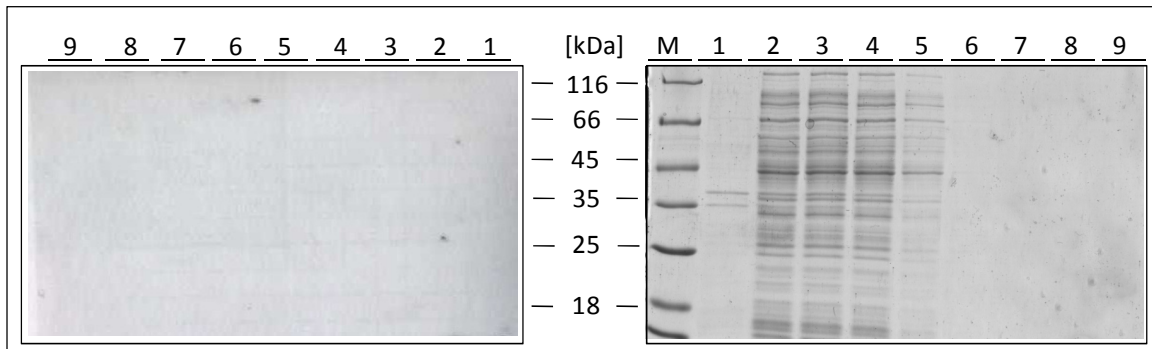
**Abbildung 30: Restriktion des *GS26940* Gens aus dem Synthesevektor und Kontrollrestriktion aus dem Expressionsvektor**

Hierbei handelt es sich um eine exemplarische Darstellung der Restriktion von *GS26940* aus dem Synthesevektor pMK-RQ durch die Nutzung von *SacI* und *XhoI*. Die erwarteten Fragmentgrößen sind 2694 Bp für *GS26940* und 2300 Bp für pMK-RQ. *GS26940* konnte folglich in den Expressionsvektor pASK/IBA6 ligiert werden. Zur Überprüfung wurde das Plasmid nochmal mit *SacI* und *XhoI* verdaut. Die erwarteten Fragmentgrößen sind 2694 Bp für *GS26940* und 3289 Bp für pASK/IBA6.

Für die Klonierung von *GS10960* und *GS26940* in andere Expressionsvektoren musste der Umweg über die Amplifikation mit spezifischen Oligonukleotiden und die Zwischenklonierung über pGEM®-T gegangen werden. Mit Hilfe dieser Klonierungsstrategien war es möglich, die *Galdieria*-Gene in verschiedene Expressionsvektoren, wie pET28a, pBAD/HIS A, pASK/IBA6, pASK/IBA7 oder pASK/IBA43 zu klonieren, so dass heterologe Expressionsstudien folgen konnten.

### Heterologe Expression in *E. coli*

Korrekte Klone mit dem *GS10960* Gen in pET28a wurden in einer Testexpression auf die Bildung rekombinanter Proteine hin überprüft. Dazu wurden zum Zeitpunkt 0, 2, 4 und 4-16 Stunden nach der Induktion, Proben für eine eindimensionale SDS-PAGE genommen.



**Abbildung 31: Expression von GS10960 in *E. coli* mit dem pET28a Vektor**

Abgebildet ist eine Aufreinigung des Zellextrakts des Expressionsstamms BL21, der mit dem Konstrukt pET28a + *GS10960* transformiert wurde. Diese Aufreinigung steht exemplarisch für alle heterologen Expressionen von *GS10960* und *GS26940*, basierend auf verschiedenen Expressionsvektoren und Expressionsstämmen. Wie hier gezeigt, konnte mit keiner Expressionsvariante rekombinantes Protein synthetisiert werden. Auf der rechten Seite ist das mit Coomassie gefärbte SDS- Acrylamidgel dargestellt und links der dazugehörige Western Blot mit dem His-„tag“ spezifischen Antikörper, wobei die Nummerierungen von 1-9 für die verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung stehen. Das bedeutet, in Spur 1 ist die unlösliche Fraktion (Pellet), in der zweiten Spur der Überstand und in der dritten Spur der Durchlauf aufgetragen. Nachfolgend befinden sich in der vierten bis sechsten Spur die drei Waschungen und in der siebten bis neunten Spur die drei Elutionen. Die SDS-PAGE wurde einheitlich mit 10 µg Protein beladen.

Leider war es mit diesem, wie auch mit allen anderen Expressionsvektoren nicht möglich, rekombinantes Protein in *E. coli* zu synthetisieren. Doch wie zuvor mit dem OtsAB Protein aus *Crocospaera watsonii*, könnte durch Veränderung einzelner Parameter eine Expression des gewünschten Proteins ermöglicht werden. In der Tabelle 7 ist zusammengefasst welche Variationen bei den Versuchen zur Expression der *Galdieria*-Proteine in *E. coli* konkret umgesetzt wurden.

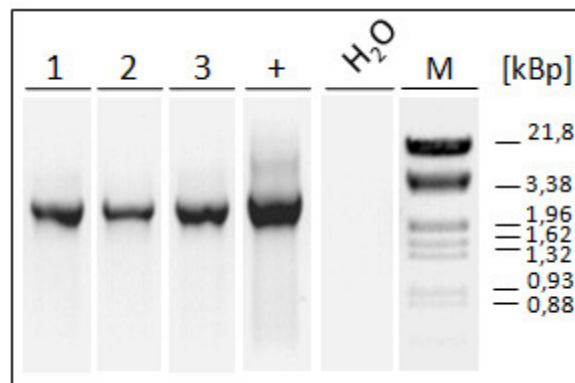
**Tabelle 7: Variierte Expressionsbedingungen für GS10960 und GS26940 und deren konkrete Umsetzung**

Variieren der Expressionsbedingungen durch Nutzung...	Konkrete Versuchsbedingungen umfassten die Nutzung von... / Anzucht bei... / Induktion mit...
unterschiedlicher Expressionsstämme	BL21, Top10, LMG194 und Lemo21 DE3, Arctic Express
unterschiedlicher Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Promotoren	pET28a mit T7 Promoter pASK-IBA Serie mit tet Promoter pBAD/HIS A mit araBAD Promoter
unterschiedlicher Induktorkonzentrationen	variierenden IPTG- und Arabinose-Konzentrationen
unterschiedlicher Expressionstemperaturen	30 °C oder 37 °C mit oder ohne „Shift“ auf kühlere Temperaturen nach der Induktion oder komplette Anzucht und Expression bei 11 °C, 16 °C oder 20 °C
unterschiedlicher Induktionszeitpunkte	in der lag, log und stationären Wachstumsphase
Periplasmatischer Expressionsbedingungen hyperosmotischer Bedingungen	pASK-IBA6 Sorbitol und Glycinbetain
unterschiedlicher Expressionsmedien	TB-Medium, LB-Medium, 2xYT-Medium und RM-Medium
Coexprimierter Chaperone	BL21(DE3) mit verschiedenen Plasmiden, die die Gene für verschiedene Chaperone tragen

Zusätzlich zu den bereits erwähnten Expressionsvariationen (3.1.2.3), wurden hier noch weitere Untersuchungen gemacht. Beispielsweise wurden unterschiedliche *E. coli* - Nährmedien genutzt, denen Salz sowie Sorbitol und Glycinbetain zugesetzt wurden. Darüber hinaus bestand nun auch die Möglichkeit, die Expressionstemperatur bis auf 11 °C zu senken. Dies konnte mit Hilfe des Arctic Express Expressionsstamms bewerkstelligt werden. Jene Zellen exprimieren die kälteinduzierbaren Chaperonine Cpn10 und Cpn60 des psychrophilen Bakteriums *Oleispira antarctica*. Dabei besitzen diese Chaperonine eine 74 %- und 54 %ige Ähnlichkeit zu der Aminosäuresequenz aus GroEL und GroES aus *E. coli*. Weiterhin standen verschiedene BL21(DE3) Expressionsstämme zur Verfügung, die mit unterschiedlichen Chaperon-Plasmiden transferiert wurden. Bei den Plasmiden handelte es sich um die Chaperon-Konstrukte 1-5 (2.2.1). Leider war es auch nach Nutzung dieser zusätzlichen Optionen nicht möglich die „full-length“ Proteine GS10960 und GS26940 heterolog in *E. coli* zu erhalten.

### RNA-Isolation

Um zu überprüfen ob während der Induktionsphase mRNA der *Galdieria*-Gene in den Expressionsstämmen vorlag, wurde jeweils 2 ml Kulturvolumen entnommen und zur RNA Isolation genutzt. Im Anschluss wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und mittels spezifischer Oligonukleotide auf das Vorhandensein der *GS10960* und *GS26940* mRNA analysiert. Mittels der Oligonukleotide konnten die „full-length“ Fragmente von *GS10960* mit einer Größe von 2960 Bp amplifiziert werden (Abb. 32). Dieses Ergebnis zeigt, dass intakte mRNA des *GS10960* Gens in den Expressionsstämmen im induzierten Zustand vorlagen. Auch für das *GS26940* Rotalgengens konnte das Vorhandensein intakter mRNA nachgewiesen werden (Daten nicht abgebildet).

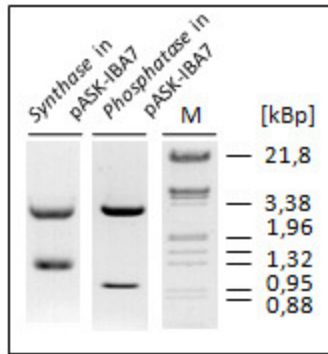


**Abbildung 32: Nachweis intakter mRNA für *GS10960* aus *Galdieria* in *E. coli***

Dargestellt sind die cDNA-Fragmente nach einer Agarose-Gelelektrophorese. (1-cDNA aus pASK-IBA7 *GS10960*, 2-cDNA aus pBAD/HIS A *GS10960*, 3-cDNA aus pET28a *GS10960*, + Positivkontrolle mit DNA des Vektors pMK-RQ *GS10960*)

#### 3.2.3.2 Expression von „Truncated“ Proteinvarianten in *E. coli*

Entsprechend dem Herangehen bei OtsAB aus *C. watsonii* lassen sich die *Galdieria*-Proteine ebenfalls in eine Synthase- und Phosphatase-Domäne unterteilen. Dadurch ist es möglich, die beiden Domänen getrennt voneinander zu exprimieren. Diese Untersuchungen wurden lediglich mit dem *GS10960* Konstrukt durchgeführt. Das Gen für die Synthase, ohne die CBM20 Domäne, hat damit eine Länge von 1431 Bp, wobei das Gen, welches die für die Phosphatase kodiert, eine Größe von 1008 Bp besitzt. Nach der Genamplifikation sowie der Zwischenklonierung in pGEM®-T wurden die Domänen in unterschiedliche Expressionsvektoren eingebracht (Abb. 33).

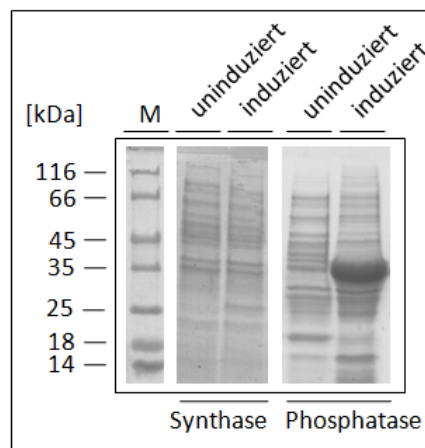


**Abbildung 33: Überprüfung der Klone zur Expression von *Galdieria*-Domänen mittels Kontrollrestriktion**

Die Genabschnitte für die Phosphatase-, wie auch für die Synthase-Domäne von *GS10960* wurden in den Expressionsvektor pASK-IBA7 kloniert. Die Restriktion erfolgte mit *SacI* und *XhoI*. In beiden Fällen konnte die erwartete Fragmentgröße von 1431 Bp und 1008 Bp für das Synthasegen und das Phosphatasegen erzielt werden. Der geschnittene Vektor besitzt eine Größe von 3267 Bp.

### Expression in *E. coli*

Korrekte Klone wurden in einer Testexpression auf die Bildung rekombinanter Proteine hin überprüft. Dazu wurden zum Zeitpunkt 0, 2, 4 und 4-16 h nach der Induktion Proben für eine eindimensionale SDS-PAGE genommen (Abb. 34). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Phosphatase-Domäne heterolog exprimiert wird. Jedoch zeigt die Coomassie gefärbte SDS-PAGE und der Western Blot keine heterologe Expression der Synthase-Domäne von *GS10960* mit einer Größe von 55 kDa.



**Abbildung 34: Heterologe Expression der Phosphatase- und der Synthase-Domäne aus *GS10960***

Auftrennung des Gesamtproteinextraktes der induzierten und nicht induzierten Kulturen mittels SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie-Blau (Phosphatase-Domäne ca. 38 kDa, Synthase-Domäne ca. 55 kDa).

### 3.2.4 Expressionsstudien in eukaryotischen Expressionssystemen

Eukaryotische Expressionssysteme ermöglichen im Vergleich zu den prokaryotischen Systemen modifizierte und gefaltete Proteine in bestimmten Kompartimenten innerhalb oder außerhalb der Zelle zu exprimieren. Hefen stellen ein Bindeglied zwischen prokaryotischen Expressionssystemen und eukaryotischen Insekten- und Säugerzellsystemen dar. Für diese Untersuchungen stand *Pichia pastoris* als Expressionsstamm zur Verfügung. Diese Hefeart zeigt eine hohe Expressionsrate, die in der Nutzung des starken AOX1 Promotors begründet liegt.

#### 3.2.4.1 *In silico* Analysen

Für die Expression ausgewählter Proteine in unterschiedlichen Organismen, muss man beachten, dass synonyme Codone unterschiedlich häufig genutzt werden (Bennetzen und Hall, 1982; Sharp *et al.*, 1986). Das „codon usage“ der beiden Genkonstrukte (*GS10960/GS26940*) aus *G. sulphuraria* wurde bei der Synthese für *E. coli* als Expressionswirt optimiert, so dass diese nun möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Expression in *Pichia pastoris* hätten. Um zu überprüfen ob eine ungünstige Codonkombinationen vorliegt, wurde der „Codon-Adaptation-Index“ (CAI) durch *in silico* - Analysen ([www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare\\_codon](http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare_codon)) bestimmt. Der CAI dient als Maß der Anpassung einer gegebenen Sequenz an das optimale „codon usage“ des Referenzorganismus (Sharp und Li, 1987). Dieser Index kann zwischen 0 und 1 schwanken. Dabei steht ein CAI von 1 für die ausschließliche Nutzung optimaler Codone. Für *GS10960* ergab sich ein CAI von 0,65 und für *GS26940* konnte ein CAI von 0,67 für die Expression in *P. pastoris* ermittelt werden. Aus Abbildung 35 wird ersichtlich, dass 5 % der genutzten Codone in *GS10960* eine frequenzielle Nutzung unter 30 % aufweisen, wobei es sich bei *GS26940* nur um 4 % handelt. Darüber hinaus kann auch der GC Gehalt einen Einfluss auf die Transkription haben. Betrachtet man den GC-Gehalt beider Gene, so wird ersichtlich, dass mit einem Wert von 49,64 % für *GS10960* bzw. 48,8 % für *GS26940*, es zu keinerlei Schwierigkeiten kommen sollte. Zusammenfassend erlauben alle ermittelten Parameter eine Proteinexpression in *P. pastoris*, wenn gleich die Höhe der erwarteten Expression eher gering ist.



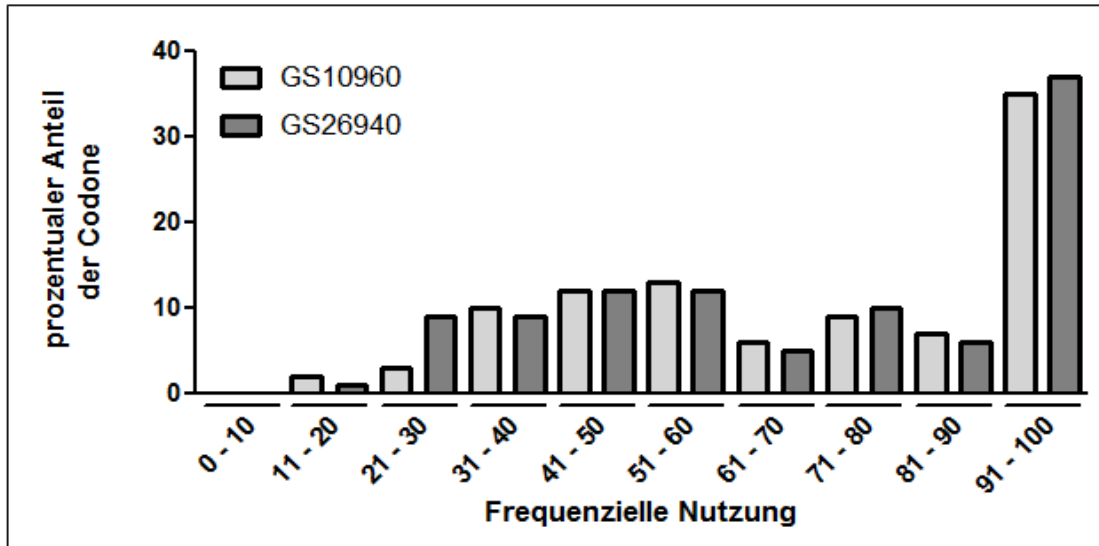


Abbildung 35: Codonnutzung in den *Galdieria*-Genen

Dargestellt ist die prozentuale Häufigkeit der Codone in den Gene *GS10960* und *GS26940* in Abhängigkeit ihrer frequenziellen Nutzung in *Pichia pastoris*. Der Wert 100 entspricht dem bestgenutzten Codon im Expressionsorganismus.

### 3.2.4.2 Klonierungsstrategie

Beide *Galdieria*-Gene wurden in den Expressionsvektor pPICZαA kloniert. Mittels genspezifischen Oligonukleotiden erfolgte die Amplifizierung von *GS10960* und *GS26940* (Abb. 36 A). Entsprechend dem Protokoll wurden Genfragmente aus dem Agarosegel eluiert und in pGEM®-T kloniert und durch Sequenzierung verifiziert. Eine Überprüfung der selektierten Klone mittels Kolonie-PCR und die daraus resultierende Restriktion der Genkonstrukte *GS10960* und *GS26940* aus dem Shuttlevektor schloss sich an (Abb. 36 B).

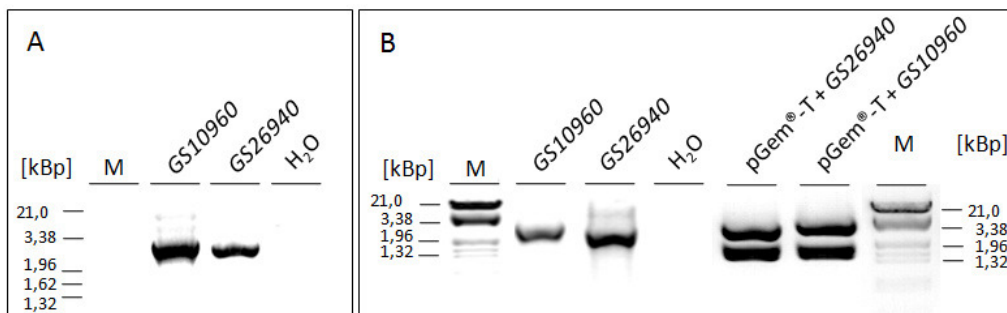
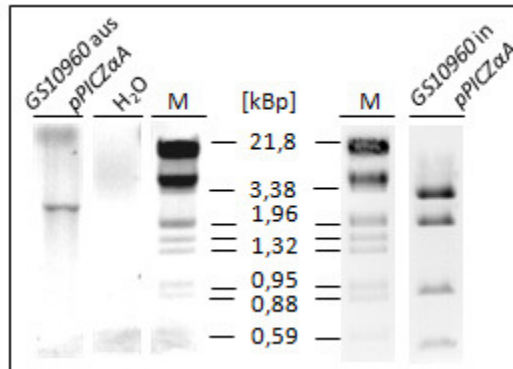


Abbildung 36: Amplifizierung, Screening und Restriktion zur Expression der *Galdieria*-Proteine in *P. pastoris*

In Abbildung A sind die PCR-Produkte beider Gene dargestellt (Primer: GS10\_alpha\_fw, GS10\_alpha\_rev, GS26\_alpha\_fw und GS260\_alpha\_rev). Die Überprüfung positiver Klone erfolgte mittels Kolonie-PCR. Beide Gene konnten nachgewiesen werden. Die Restriktion der Plasmide aus ausgewählten Klone zeigt das erwartete Bandenmuster: pGEM®-T mit 3003 Bp, *GS10960* mit 2950 Bp bzw. *GS26940* mit 2650 Bp.

Danach konnte die Ligation in den finalen Expressionsvektor pPICZαA und die Transformation in den *recA* und *endA* *E. coli* Stamm TOP10 erfolgen. Die isolierten Plasmide korrekter Transformanden wurden zur Verifizierung nochmals einer Kontrollrestriktion und einer Sequenzüberprüfung durch Seqlab unterzogen (Abb. 37).

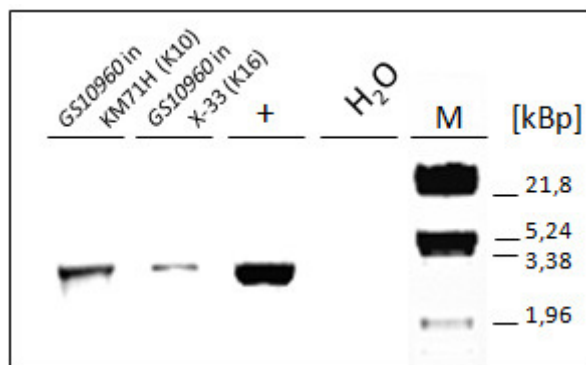


**Abbildung 37: Kolonie-PCR und Restriktion von Expressionsplasmiden mit den *Galdieria*-Proteinen**

Links vom Längenstandard ist das Screening nach positiven Klonen via Kolonie-PCR exemplarisch abgebildet. Rechts vom Längenstandard ist eine exemplarische Kontrollrestriktion dargestellt. Die Restriktion mit *EcoRI* und *BamHI* führte zu folgenden Fragmentgrößen: 143 Bp, 1924 Bp, 465 Bp, 861 Bp und 3124 Bp.

### 3.2.4.3 Transformation und Überprüfung des Mut-Phänotyps

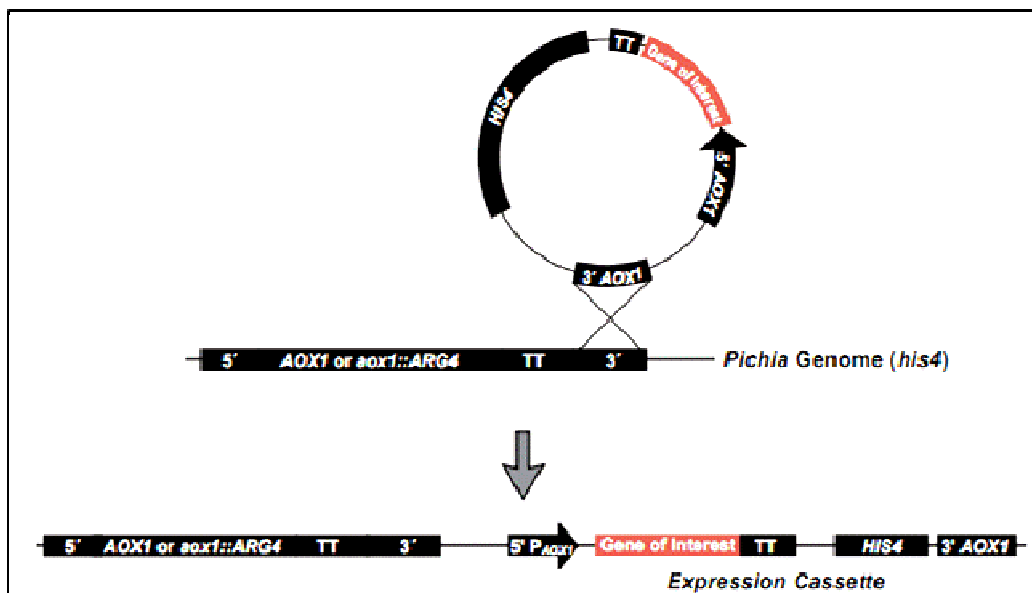
Die Transformation der methylotrophen Hefe *P. pastoris* erfolgte wie unter 2.6.5 beschrieben und führte zur Erzeugung positiver Klone. Zwei der ausgewählten Klone wurden mittels Amplifizierung des Genkonstrukts *GS10960* verifiziert (Abb. 38). Dabei liegen die Konstrukte zum einen im Expressionsstamm X-33 und zum anderen in KM71H vor.



**Abbildung 38: Amplifizierung von *GS10960* aus chromosomaler DNA rekombinanter *P. pastoris* Zellen**

Mit Hilfe der Primerkombination *GS10\_α\_fw* und *GS10\_α\_rev* konnte das Gen *GS10960* amplifiziert werden. Als Positivkontrolle wurde Plasmid-DNA (pPICZαA + *GS10960*) genutzt.

Bevor mit den Transformanten weiter gearbeitet werden konnte, mussten die Klone auf ihren Mut-Phänotyp untersucht werden. Im Hinblick auf die Nutzung von Methanol als Kohlenstoffquelle unterscheidet man drei Phänotypen: I Mut<sup>+</sup> („methanol utilization plus“), d.h. beide AOX Gene sind intakt und aktiv; II Mut<sup>S</sup> („methanol utilization slow“), d.h. nur das AOX1 Gen ist deletiert; III Mut<sup>-</sup> („methanol utilization minus“), d.h. beide AOX Gene sind deletiert und ein Wachstum in Gegenwart von Methanol als einzige Kohlenstoffquelle ist nicht möglich (Cereghino und Cregg, 2000). Beim Expressionsstamm KM71H waren alle Zeocin<sup>™</sup> resistenten Transformanten, aufgrund der Unterbrechung des AOX1 Gens Mut<sup>S</sup>. Transformationen in den Stamm X-33 mit einem linearisierten Konstrukt begünstigen die „single crossover“ Rekombination in den AOX1 Locus. Demnach sind die meisten Transformanten Mut<sup>+</sup>. Nichtsdestotrotz besteht aber auch die Möglichkeit, dass aufgrund der AOX1 Sequenz im Plasmid, ein Rekombinationsereignis über die 3' AOX1 Region erfolgt und damit das wildtypische AOX1 Gen unterbrochen wird (Abb. 39). Die Folge sind Mut<sup>S</sup> Stämme (Invitrogen, Version H, 2005).

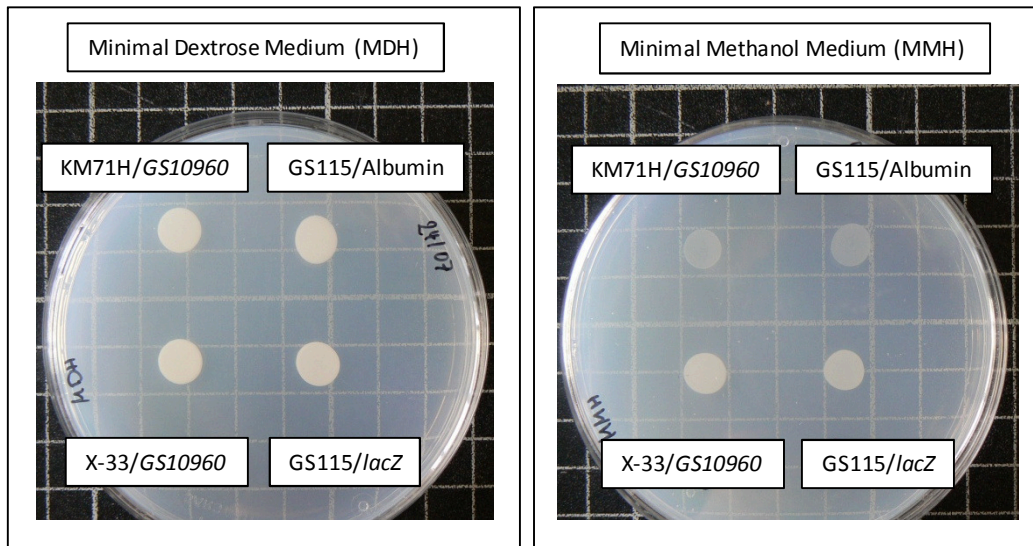


**Abbildung 39: Schematische Darstellung der Insertion des pPICZαA Plasmids in den intakten AOX1 Locus**

Diese Abbildung zeigt das Ergebnis der Insertion des linearisierten Plasmids an das 3' Ende des AOX1 Locus. Dieses Rekombinationsereignis kann aber auch an der 5' AOX1 Region des Plasmids erfolgen, so dass die Insertion, bestehend aus AOX1 Promotor, „gene of interest“ und His4 (Expressionskassette) am 5' Ende des AOX1 Locus positioniert ist (Invitrogen, Version H, 2005).

Für die Untersuchung meiner Transformanten hinsichtlich des Mut-Phänotyps wurde jeweils eine Kolonie ausgewählt und auf methanolhaltige bzw. -freie Agarplatten überimpft. Nach etwa 2 Tagen bei 30 °C zeigte sich, dass die Transformante (K10) mit KM71H als Expressionsstamm lediglich auf methanolfreien (MDH) Agarplatten zu Wachstum befähigt war, wohingegen auf Agarplatten mit Methanol nur sehr geringes Wachstum zu verzeichnen war. Daher kann mit Sicherheit davon

ausgegangen werden, dass die Transformante (K10) mit KM71H als Expressionsstamm Mut<sup>S</sup> ist. Die Transformante (K16) mit X-33 als Expressionsstamm war in der Lage auf beiden Agarplatten zu wachsen, wobei dies den Mut<sup>+</sup> Phänotyp eindeutig charakterisiert. Zur Kontrolle wurden die Stämme GS115/Albumin und GS115/*lacZ* mitgeführt, von denen man aufgrund von Herstellerangaben (Invitrogen) weiß, dass der erstere Mut<sup>S</sup> und der letztere Mut<sup>+</sup> ist.

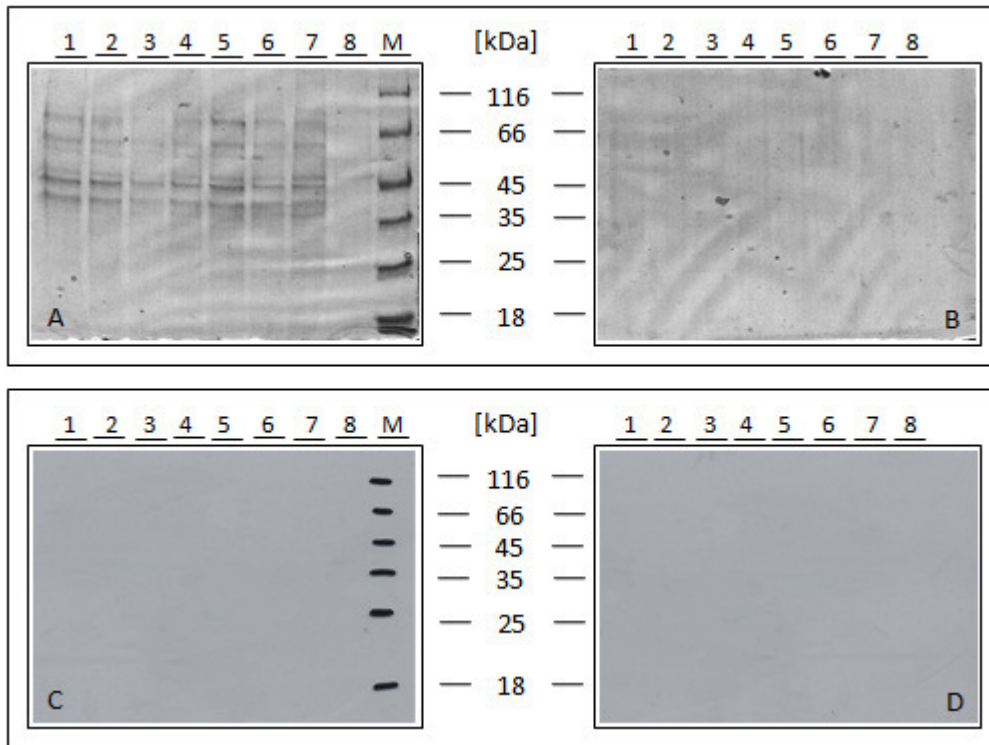


**Abbildung 40: Überprüfung des Mut Phänotyps von GS10960 Transformanden in *P. pastoris***

Links ist das Wachstum der Hefen auf Minimal-Dextrose-Medium abgebildet und rechts das Wachstum auf Minimal-Methanol-Medium. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die Mut<sup>S</sup> Stämme, wie KM71H mit dem GS10960 Konstrukt und der Kontrollstamm GS115/Albumin nur sehr langsam auf dem MMH-Medium wachsen. In Gegenwart von Dextrose (MDH) zeigen alle Hefen keinen abweichenden Phänotyp.

#### 3.2.4.4 Heterologe Expression in Hefe

Die ausgewählten Klone wurden in einer Testexpression auf die Bildung rekombinanter Proteine hin überprüft. Während der Expressionsstudien wurden Proben für die Analysen mittels SDS-PAGE und für RNA-Isolierungen entnommen. Unter Verwendung des pPICZαA Vektors wurde eine extrazelluläre Expression des Proteins GS10960 mit einer Größe von 112 kDa erwartet (Abb. 41). Leider konnte im Überstand der abzentrifugierten Zellen kein Protein nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob die Sekretion des Proteins möglicherweise nicht erfolgreich war, wurde ebenfalls der Gesamtzellextrakt aufgetragen. Doch auch die genauere Untersuchung der Expression mittels Western Blot mit einem His-„tag“ Antikörper zeigte keinerlei spezifischen Nachweis einer rekombinanten Proteinbande.

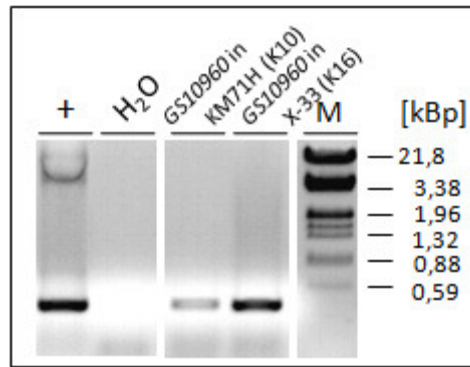


**Abbildung 41: Expression von GS10960 in *P. pastoris* mit dem pPICZ $\alpha$ A Vektor**

Abgebildet ist eine exemplarische Aufreinigung des Zellextrakts des von *Pichia pastoris* (X-33), der mit dem Konstrukt pPICZ $\alpha$ A + GS10960 transformiert wurde. Diese Aufreinigung steht exemplarisch für alle heterologen Expressionen von GS10960 in verschiedenen Expressionsstämmen (X-33 oder KM71H) sowie unter Nutzung unterschiedlicher Expressionsbedingungen. Im oberen Teil der Abbildung (A/B) sind die mit Coomassie gefärbten SDS-Acrylamidgelen dargestellt und darunter die dazugehörige Western Blots (A=C; B=D), wobei die Nummerierungen von 1-8 für die verschiedenen Probenahmen (0h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h) stehen. In A und C ist der Gesamtzellextrakt aufgetragen, wobei in B und D der Überstand des abzentrifugierten Zellpellets aufgetrennt wurde. Spur 1 zeigt die Probe vor der Induktion, wohingegen in Spur 8 die Probe der 120 h Expressionskultur aufgetragen wurde. Die SDS-PAGE des Gesamtzellextrakts wurde einheitlich mit 10  $\mu$ g Protein beladen. Der Western Blot (C, D) sollte unter Verwendung eines His-Antikörpers das mit einem His-„tag“ versehene rekombinante GS10960 Protein nachweisen.

### 3.2.4.5 RNA Isolierung

Um zu überprüfen ob während der Induktionsphase mRNA der *Galdieria*-Gene in den Expressionsstämmen vorlag, wurden jeweils 10 ml Kulturvolumen abzentrifugiert und das Pellet zur RNA Isolation genutzt. Im Anschluss wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und mittels PCR auf das Vorhandensein der GS10960 und GS26940 mRNA analysiert. Mittels der 3'-Ende spezifischer Oligonukleotide konnten die erwarteten Fragmente mit einer Größe von etwa 380 Bp vom Ende der Rotalgengene amplifiziert werden (Abb. 42) Dieses Ergebnis zeigt, dass intakte mRNA der Gene in den Expressionsstämmen im induzierten Zustand vorlag.

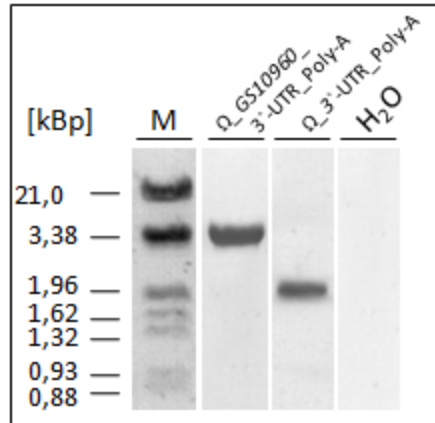


**Abbildung 42: Nachweis intakter mRNA für die Rotalgengene in *P. pastoris***

Amplifiziert wurde ein Teilfragment aus der GS10960 cDNA mit den Oligonukleotiden cDNA\_10\_2\_fw und GS10\_α\_rev. Als Positivkontrolle diente DNA des Plasmids pPICZαA + GS10960.

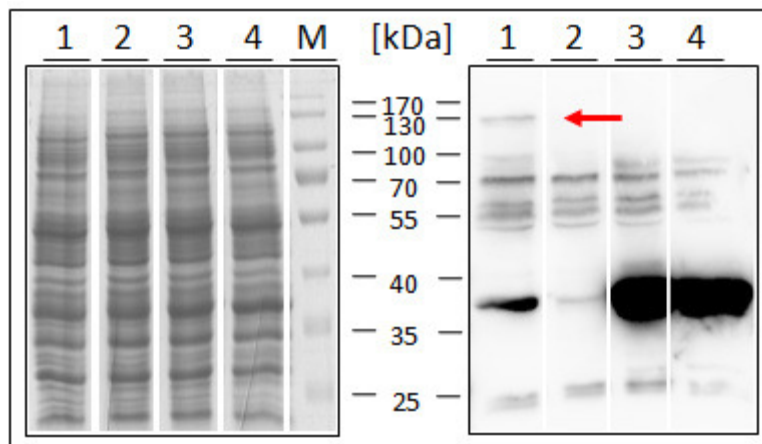
### 3.2.5 Zellfreie (*in vitro*) Expressionssysteme

Für die zellfreie (*in vitro*) Expression von GS10960 und GS26940 aus *G. sulphuraria* wurde ein Weizenkeimsystem verwendet. Hierfür wurde GS10960 in den Vektor pNL23 kloniert, der auf pEU3 basiert und Proteine mit einem N-terminalen His-„tag“ versieht. pEU3 Vektoren basieren wiederum auf einem pUC Vektor der für pflanzliche Translationssysteme genutzt wird. Dieser ist mit einem SP6 Promotor und einem „omega translation enhancer“ versehen. Die 5`-UTR Omega Sequenz stammt vom Tabakmosaikvirus und ermöglicht die Translation von Proteinen aus einer „non-capped“ mRNA. Neben der 5`-UTR beinhaltet der Vektor auch eine aus 558 Nukleotiden bestehenden 3`-UTR Sequenz der Dihydrofolat Reduktase (DHFR) aus *E. coli*. Darüber hinaus kodiert der Vektor einen aus 34 Nukleotiden bestehenden Poly-A-Schwanz. GS10960 und GS26940 wurden über eine Zwischenklonierung via pGEM®-T in pNL23 kloniert. Zur Verifizierung wurden Restriktionsanalysen und Sequenzierungen durchgeführt. Die zellfreie (*in vitro*) Expression beruht auf einen Zweischnittmechanismus, bei der die Transkription und die Translation in zwei voneinander unabhängigen Reaktionen erfolgten. Für die *in vitro* Transkription wurde ein Template mittels „proofreading“ Polymerase amplifiziert. Dieses Template besteht aus dem SP6 Promoter, dem „omega translation enhancer“, dem mit einem His-„tag“ versehenen Konstrukt aus *G. sulphuraria* und der 3`-UTR Region mit dem Poly-A-Schwanz. Um die Qualität des PCR-Produkts zu überprüfen wurde es gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 43). Die *in vitro* Translation erfolgte nach den Vorgaben in 2.7.4. Das exprimierte Protein wurde in einer SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot immunologisch detektiert (Abb. 44).



**Abbildung 43: Nachweis der erfolgreichen Amplifizierung des Templates für die *in vitro* Transkription**

Spur 1 - Amplifikat mit einer erwarteten Größe von 5028 Bp; Spur 2 - Kontroll-PCR mit dem leeren pNL23-Vektor mit einer erwarteten Größe von 2058 Bp; Spur 3 - Wasserkontrolle ohne Template.



**Abbildung 44: *In vitro* Translation von GS10960 mit Hilfe des „wheat germ expressionsystem“**

Abgebildet ist eine exemplarische Aufreinigung des Translationsansatzes aus der *in vitro* Translation, unter Einsatz der mRNA (Protein aus *G. sulphuraria* mit einer Größe von etwa 115 kDa, roter Pfeil) Links: Coomassie gefärbte SDS-PAGE; Rechts: der dazugehörige Western Blot. Spur 1 - Translationsansatz mit mRNA des *Galdieria*-Proteins; Spur 2 - Ansatz ohne mRNA als negative Kontrolle; Spur 3. und 4 zwei Positivkontrollen (pMSU 362). Die SDS-PAGE wurde einheitlich mit 40 µl des Translationsansatzes beladen.

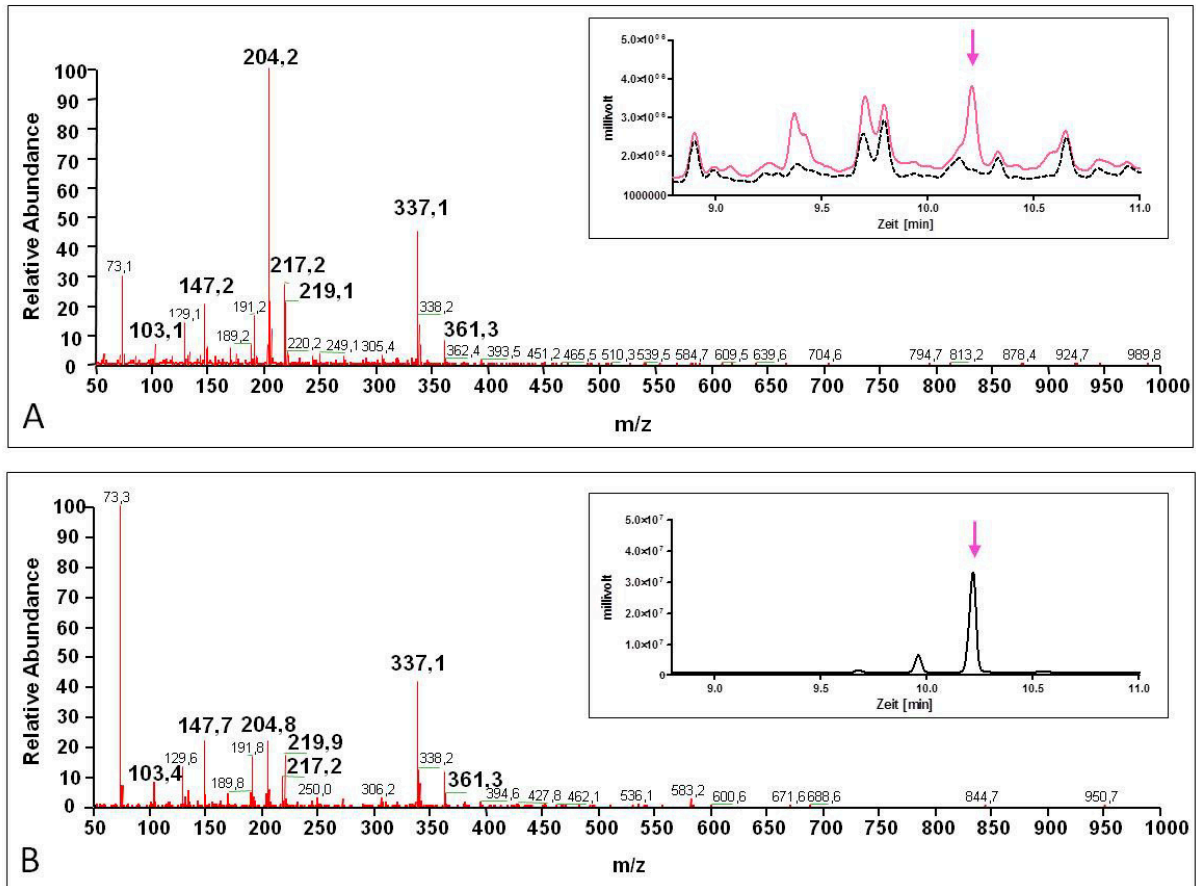
Im Western-Blot Spur 1 konnte im *in vitro* Translationsansatz mit *GS10960* mRNA ein Protein von ca. 115 kDa detektiert werden, dass in den anderen Ansätzen nicht auftaucht. Die Positivkontrolle zeigt, den Erwartungen entsprechend ein Protein mit einer Größe von 36 kDa. Damit konnte gezeigt werden, dass der Translationsansatz („wheat germ extract“) erfolgreich zur Expression der gewünschten Proteine geführt hat. In der negativen Kontrolle wurde anstelle von mRNA Wasser eingesetzt. Daher traten hier bei der SDS-PAGE wie auch im Western-Blot lediglich die Proteine des Translationsansatzes auf. Demnach stammen die zahlreichen unspezifische Signale des Western-Blots von den Proteinen des Translationsansatzes. Betrachtet man die erste Spur genauer, entspricht das detektierte Protein mit einer Größe von etwa 130 kDa nicht ganz unseren Erwartungen (115 kDa).

Trotz dieser leichten Abweichung kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um das GS10960 Protein aus *G. sulphuraria* handelt. Somit war es möglich das Protein *in vitro* zu exprimieren.

Für die folgenden enzymatischen Messungen wurde der gesamte Translationsansatz aus dem „wheat germ extract“ mit dem exprimierten Protein verwendet. Es wurde 50 µl des Translationsansatzes in einen enzymatischen Test für 16 Stunden bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle diente der Translationsansatz, in dem anstelle von mRNA mit Nuklease-freiem Wasser gearbeitet wurde. Bei dem Enzymtest wurden die Ausgangssubstrate Glycerol-3-Phosphat mit UDP-Galaktose eingesetzt. Dabei sollte zunächst Floridosid/Isofloridosid-Phosphat durch die Synthase-Domäne entstehen, wobei das phosphorylierte Intermediat durch die Phosphatase-Domäne zu dem Endprodukt, dem „compatible solute“ Floridosid/Isofloridosid umgesetzt werden sollte. Die Reaktion wurde nach 16 Stunden abgestoppt und mit alkalischer Phosphatase nachbehandelt, um noch vorliegende Zwischenprodukte (Floridosid/Isofloridosid-Phosphat) im Reaktionsansatz zu dephosphorylieren, um die Gesamtmenge an synthetisiertem Floridosid/Isofloridosid mittels Gaschromatographie quantifizieren zu können. Unser Gaschromatographie-System wurde zuvor mittels isoliertem Floridosid aus *Delisea pulchra* und isoliertem Floridosid/Isofloridosid Mix aus *Porphyra perforata* und *Porphyra yezoensis* (freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Prof. Dr. Karsten und Dr. Kenji Ishihara) geeicht. Die gaschromatographischen Analysen der Enzymtests zeigten einen eindeutigen Peak (pink) mit einer für Isofloridosid charakteristischen Retentionszeit von ca. 10,25 Min, der in der Negativkontrolle (keine mRNA) nicht auftrat. Das Massenspektrum dieser Peaks zeigte ebenfalls die charakteristischen Massen für Floridosid/Isofloridosid. Mithilfe dieser Untersuchungen konnte eindeutig bewiesen werden, dass das *in vitro* translatierte GS10960 Protein Isofloridosid synthetisieren kann. Damit handelt es sich bei diesem Protein um die gesuchte Isofloridosid-Synthase/Phosphatase aus *G. sulphuraria*.



## Ergebnisse



**Abbildung 45: Gaschromatographische und massenspektrometrische Analyse der Reaktionsprodukte aus dem Enzymtest mit *in vitro* translatiertem GS10960 Protein aus *G. sulphuraria***

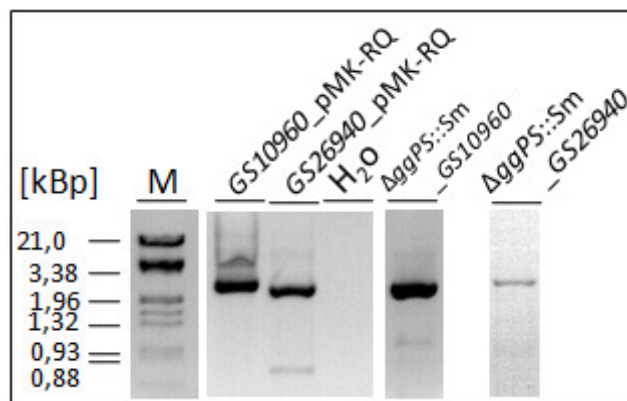
Abbildung A zeigt das Ergebnis der Analyse der Reaktionsprodukte der enzymatischen Reaktionen mit dem *in vitro* translatierten GS10960 Protein aus *G. sulphuraria* (Chromatogramm in pink). Die Reaktionsprodukte der enzymatischen Reaktion mit dem Translationsansatz ohne mRNA ist als schwarz gestrichelte Linie dargestellt (Negativkontrolle). Der Pfeil zeigt auf den Isofloridosidpeak. Abbildung B stellt das Gaschromatogramm bzw. das Massenspektrum des Floridosid/Isofloridosid Standards dar. Die Retentionszeiten und Massenspektren (charakteristische Massen für Floridosid und Isofloridosid (m/z): 103, 147, 204, 217, 219, 237, 261; Meng *et al.*, 1987) der neusynthetisierten Substanz im Enzymtest sowie vom Isofloridosidstandard sind identisch.

### 3.2.1 Komplementation salzsensitiver *Synechocystis* Mutanten mit GS10960 und GS26940

Da sich die Erzeugung löslicher, enzymatisch aktiver Proteine für die Floridosid-/Isofloridosid-Synthese als schwierig erwies, wurde nach Alternativen zum Funktionsnachweis dieser Proteine aus *G. sulphuraria* gesucht. Somit fand die GG-Synthesemutante von *Synechocystis* 6803 hier Anwendung.

#### 3.2.1.1 Komplementation von $\Delta ggpS::Sm$

Auch für diese Untersuchungen wurde die  $\Delta ggpS::Sm$ -Mutante von *Synechocystis* 6803 für Komplementationszwecke herangezogen. Für diese Arbeiten wurden die beiden Konstrukte (GS10960 und GS26940) aus *G. sulphuraria* in den Vektor pIGA-mcs kloniert. Diese Konstrukte standen unter Kontrolle des *ggpS*-Promotorbereichs -303 bis +384, so dass eine salzregulierte Expression ermöglicht wurde. Dieses Konstrukt wurde erfolgreich in die  $\Delta ggpS::Sm$ -Mutante transformiert. Die rekombinanten *Synechocystis*-Klone wurden genotypisch verifiziert (Abb. 46). In darauf folgenden Salzschock-Experimenten sollte die Mutante unter Salzstressbedingungen phänotypisch untersucht werden. Hierzu sollte die Akkumulation von GG im Wildtyp, Saccharose in der  $\Delta ggpS::Sm$ -Mutante und Saccharose, sowie Floridosid/Isofloridosid bei der komplementierten  $\Delta ggpS::Sm$ -Mutante in Abhängigkeit zur Zeit nach einem Salzschock verfolgt werden.

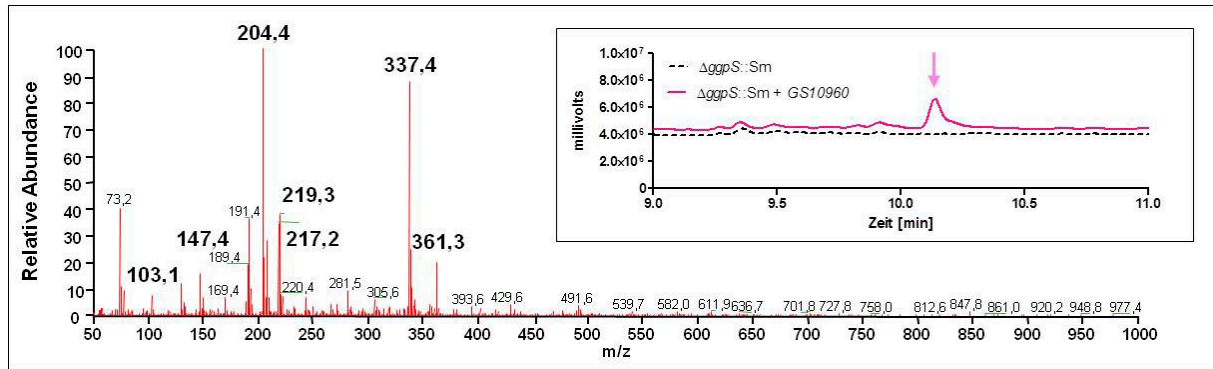


**Abbildung 46: Verifizierung der mit den GS10960/GS26940 Genen aus *G. sulphuraria* komplementierten  $\Delta ggpS::Sm$  Mutante von *Synechocystis* 6803**

Für diese PCR wurde die chromosomale DNA der komplementierten Mutante, sowie genspezifische Primer genutzt. Folgende Oligonukleotide wurden eingesetzt: GS10\_SacI\_rev, GS26\_SacI\_rev, GS10\_XbaI\_fw, GS26\_XbaI\_fw. Spur 1 und 2 - Positivkontrolle unter Verwendung der Plasmide pMK-RQ + GS10960/GS26940; Spur 3 - Wasserkontrolle ohne Template; Spur 4 - Amplifikation von GS10960 aus der chromosomalen DNA der Transformante  $\Delta ggpS::Sm\_GS10960$ ; Spur 5 - Amplifikation von GS26940 aus der chromosomalen DNA der Transformante  $\Delta ggpS::Sm\_GS26940$ .

Die Vorgehensweise entspricht dem Versuchsablauf bei der Komplementation der  $\Delta ggpS::Sm$  Mutante von *Synechocystis* 6803 mit dem *otsAB* Gen. Der Wildtyp, wie auch die  $\Delta ggpS::Sm$  Mutante verhielten sich den Erwartungen entsprechend (Daten hier nicht gezeigt, siehe 3.1.3.1) Die gaschromatographische und massenspektrometrische Analyse der komplementierten  $\Delta ggpS::Sm$ -

Mutante zeigte, das in diesem Stamm Isofloridosid in sehr geringen Mengen synthetisiert wurde. Abbildung 47 zeigt, dass in den Zellextrakten der komplementierten Mutante ein Peak mit der für Isofloridosid charakteristischen Retentionszeit auftrat, dessen Massenspektrum für Floridosid/Isofloridosid charakteristische Bruchstücke aufwies.



**Abbildung 47: Gaschromatographische und massenspektrometrische Analyse des Zellextrakts der mit dem GS10960 Gen aus *G. sulphuraria* komplementierten  $\Delta ggpS::Sm$  Mutante von *Synechocystis* 6803**

Die Abbildung (rechts oben) zeigt das Ergebnis der gaschromatographischen Analyse des Zellextrakts der  $\Delta ggpS::Sm$  Mutante (Negativkontrolle, schwarz gestrichelte Linie) und der mit dem GS10960 Gen aus *G. sulphuraria* komplementierten  $\Delta ggpS::Sm$  Mutante (Chromatogramm in pink). Der Pfeil zeigt auf den Isofloridosidpeak. Abbildung (links unten) zeigt das Massenspektrum des Isofloridosidpeaks. Die Retentionszeiten und Massenspektren (charakteristische Massen für Floridosid und Isofloridosid sind ( $m/z$ ) 103, 147, 204, 217, 219, 237, 261; Meng *et al.*, 1987) der neusynthetisierten Substanz im Enzymtest sowie vom Isofloridosidstandard sind identisch.

## 4 Diskussion

### 4.1 Proteinfamilie der Glycosyltransferasen

Die beiden putativen Floridosid-/Isofloridosid-Synthasen/Phosphatasen aus *Galdieria sulphuraria* sowie die Trehalose-6-Phosphat-Synthase/Phosphatase aus *Crocospaera watsonii* gehören zu der Superfamilie der Glycosyltransferasen (GTs) (EC 2.4.x.y). Hierbei handelt es sich um eine große Gruppe von Enzymen, die in der Biosynthese von Oligosacchariden und Polysacchariden involviert sind. Glycosyltransferasen transferieren Zuckerreste eines aktivierten Donor Substrates, in der Regel ein Nukleotid-Zucker, auf einen Akzeptor. Hierbei kann es sich entweder um ein Lipid, ein Protein, DNA, ein Oligosaccharid oder um ein kleines Akzeptormolekül handeln (Breton *et al.*, 2001; Radomska-Pandya *et al.*, 1999). Dabei kann die Glykosylierungsreaktion entweder über eine Inversion oder eine Retention an die C1-Position des Donor-Zuckers erfolgen. Der Akzeptor stellt damit ein Nukleophil dar und greift das Kohlenstoffatom in erster Position in einer  $S_N1/S_N2$ -ähnlichen Reaktion an (Abb. 48; Murray *et al.*, 1997).

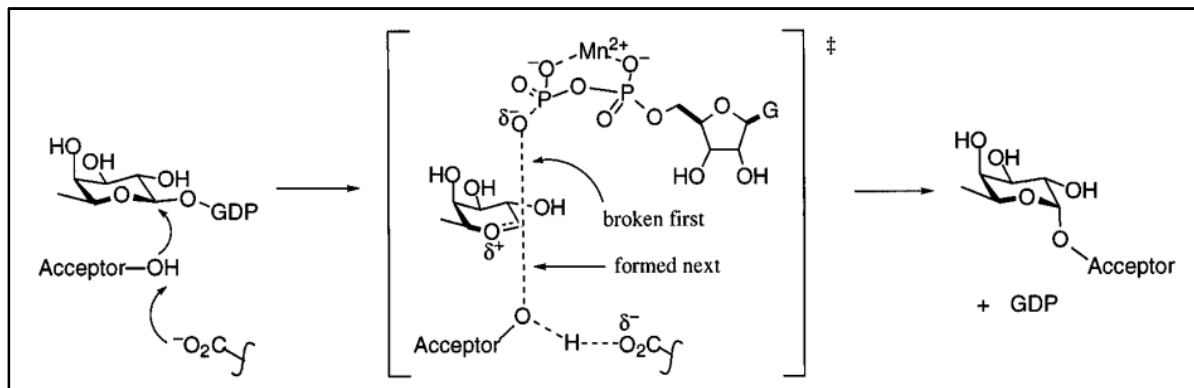
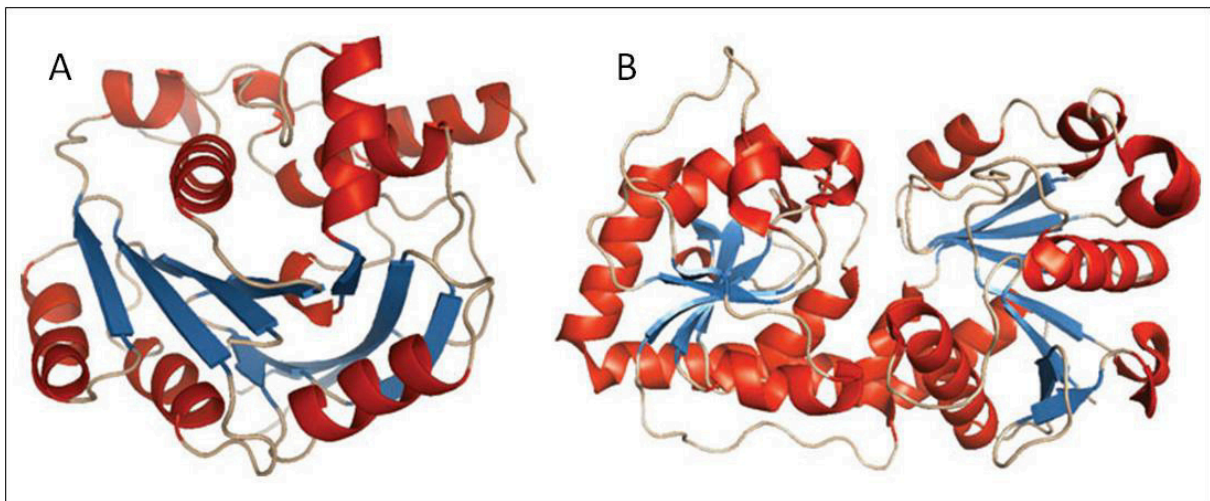


Abbildung 48:  $S_N1/S_N2$ -ähnlicher Reaktionsmechanismus der  $\alpha$ -1,3-Fucosyltransferase V (Murray *et al.*, 1997)

Eine  $S_N2$ -Reaktion setzt sich formal aus 2 Schritten zusammen: (i) die Addition des Nucleophils und (ii) die Eliminierung der Abgangsgruppe. Die Addition des Nucleophils erfolgt so, dass das Nucleophil und die Abgangsgruppe linear zueinander angeordnet sind (Rückseitenangriff). Während sich die Bindung zum Nucleophil ausbildet, wird die zur Austrittsgruppe gelöst. Viele Glycosyltransferasen weisen keine strikte Substratspezifität auf, wobei jedoch für den Zuckerdonor meist eine hohe Spezifität besteht. Die meisten Glycosyltransferasen bevorzugen UDP-D-Glukose, wobei aber auch Enzyme beschrieben wurden, die UDP-Glukuronsäure (Sawada *et al.*, 1999), UDP-D-Xylose (Martin *et al.*, 1999) oder UDP-L-Rhamnose übertragen. Ebenso konnte, neben den Ergebnissen dieser Arbeit mit dem GS10960 Protein aus *G. sulphuraria*, bereits gezeigt werden, dass UDP-D-Galaktose als aktivierter Zucker genutzt wird (Miller *et al.*, 1999). Gleiches traf auf OtsAB aus *C. watsonii* zu, während die GG-Synthese streng von ADP-Glukose abhängig ist (Hagemann und Erdmann, 1994).

Glycosyltransferasen sind entsprechend der Ähnlichkeiten ihrer Aminosäuresequenz in Familien eingeteilt (Coutinho *et al.*, 2003; [www.cazy.org](http://www.cazy.org)). Es gibt drei monophyletische Gruppen von Glycosyltransferasen. Über 75 % aller bekannten Transferasen gehören zu der GPGTF/GT-B

Superfamilie. Daneben gibt es noch die Nucleosid-Diphosphozucker Transferasen (GT-A) und die GT-C Superfamilie, die vor allem membrangebundene Glycosyltransferasen beinhaltet, die wiederum durch ein DXD-Motiv im ersten extrazellulären Loop gekennzeichnet sind (Liu und Mushegian, 2003). Die beiden putativen Floridosid-/Isofloridosid-Synthasen/Phosphatasen aus *Galdieria sulphuraria* sowie die Trehalose-6-Phosphat-Synthase/Phosphatase aus *Crocospaera watsonii* gehören zu der Superfamilie der Glycosyltransferasen vom GT-B Typ. Charakteristisch für diesen Faltungstyp sind die zwei Rossmann-ähnlichen Domänen, die über eine Linker-Region und eine katalytischen Region miteinander verbunden sind. In der Spalte zwischen den beiden Domänen befindet sich das aktive Zentrum des Enzyms (Lairson *et al.*, 2008).



**Abbildung 49: Faltungstypen von Glycosyltransferasen**

A: Faltungstyp GT-A. Abgebildet ist die Röntgenkristallstruktur der invertierenden Glycosyltransferase SpsA aus *Bacillus subtilis*. Zwei eng assoziierte  $\beta/\alpha/\beta$  Domänen führen zu einem zentralen  $\beta$ -Faltblatt. B: Faltungstyp GT-B. Abgebildet ist die Kristallstruktur des Bakteriophagen T4  $\beta$ -Glucosyltransferase. Die beiden Rossmann-ähnlichen Domänen sind locker assoziiert. In der Spalte zwischen den beiden Domänen befindet sich das katalytisch-aktive Zentrum (Lairson *et al.*, 2008).

Hoch konservierte Bereiche befinden sich vorwiegend im C-terminalen Bereich der Proteine, welcher letztlich für die Nucleotid Bindung verantwortlich ist. Im N-terminalen Bereich, in dem Loops und Helices nahe dem aktiven Zentrum liegen, existieren großen Variationsmöglichkeiten, die in den zahlreichen Akzeptormolekülen begründet sind. Charakteristische peptidische Motive sind vor allem Glutamat Reste und Glycin reiche Loops, die mit den Ribose- und Phosphat-Resten des Nucleotid-Donor interagieren (Wrabl und Grishin, 2001). Darüber hinaus katalysieren Glycosyltransferasen vom GT-B Typ eine Glykosylierungsreaktion unter Retention ( $\alpha \rightarrow \alpha$ ) der Konfiguration des anomeren  $C_{\alpha}$ -Atoms (Kapitonov und Yu, 1999). Mittlerweile konnten 1250 Glycosyltransferasen der Familie 20 ausgemacht werden, wobei lediglich 49 dieser Proteine auch charakterisiert sind ([www.cazy.org/GT20](http://www.cazy.org/GT20)). Zu den wohl bekanntesten und charakterisierten Glycosyltransferasen dieser Familie zählen beispielsweise die  $\alpha,\alpha$ -Trehalose-Phosphat-Synthase (OtsA) aus *E. coli*, die Trehalose-Phosphat-Synthase aus *Thermus thermophilus* RQ-1, die 3 Trehalose-6-Phosphat-Synthasen (Tps1, Tps2 und Tps3) aus *Arabidopsis thaliana*, die GG-Phosphat-Synthase aus *Synechocystis* sowie die

$\alpha,\alpha$ -Trehalose-Phosphat-Synthasen aus *Aspergillus niger* und *Saccharomyces cerevisiae*. Alle diese Proteine haben eines gemeinsam, ihnen fehlt die Phosphatase-Domäne. Dadurch unterscheiden sie sich erheblich von den beiden Fusionsproteinen aus *C. watsonii* und *G. sulphuraria*. Allerdings wurden auch GG-Syntheseenzyme gefunden, die kombinierte Synthase-/Phosphatase-Domänen besitzen (Hagemann *et al.*, 2008).

## 4.2 Expressionsproblematik

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit wird deutlich, dass die Expression dieser Glycosyltransferasen der Familie 20 in Kombination mit einer Phosphatase-Domäne mit einigen Problemen behaftet war. So trat eine starke Tendenz zur Bildung von „inclusion bodies“ bei der Expression des „full-length“ oder des „truncated“ OtsAB Proteins aus *C. watsonii* auf. Auch die Variation zahlreicher Expressionsparameter konnte die Formation dieser Einschlusskörper nicht unterbinden. Ähnliche Schwierigkeiten traten bei der Expression von GgpPS-Proteinen aus heterotrophen Bakterien auf (Hagemann *et al.*, 2008). Blackwell und Horgan beschrieben 1991 eine Methode, mit der die Expression eines Proteins, welches normalerweise in *E. coli* in „inclusion bodies“ akkumuliert wird, nun in einer löslichen und aktiven Form synthetisiert werden konnte. Diese Methode nutzt den osmotischen Stress, um letztlich die Aufnahme eines „compatible solutes“ aus dem Medium zu erleichtern. „Compatible solutes“ stabilisieren die native Struktur von Proteinen durch präferentielle Hydrierung der Proteinoberfläche. Aufgrund dieser Interaktion kommt es letztlich zum Ausschluss der „compatible solutes“ aus der direkten Hydrathülle des Proteins, wobei die native tertiäre und quaternäre Struktur der Proteine stabilisiert wird (Abb. 2) (Arakawa und Timasheff, 1985; Timasheff, 1998; Bolen und Baskakov, 2001) und die Bildung von „inclusion bodies“ unterdrückt wird. Eine Erniedrigung der Temperatur kann ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Unterdrückung der Bildung von „inclusion bodies“ haben. Unter Anbetracht dieser Tatsachen gelang es Blackwell und Horgan (1991) die Menge an löslichem und aktivem Protein enorm zu steigern. Die Ergebnisse dieser Arbeit spiegeln den Erfolg dieser Methode wider. Auch hier ist es gelungen durch Zugabe von Salz und Osmolyten das OtsAB Fusionsprotein aus *C. watsonii* aufzureinigen und Aktivität nachzuweisen (Pade *et al.*, 2012).

Um der Frage nachzugehen, aus welchen Gründen die Expression der Gene aus *G. sulphuraria* gescheitert ist, wurden die einzelnen Ebenen von der DNA bis hin zum Protein analysiert. Das Ausbleiben einer Proteinexpression kann auf einen Klonierungsfehler zurückgeführt werden. Dieser Punkt kann aufgrund von positiven Sequenzierungen ausgeschlossen werden. Daran schließt sich die Transkription an, die Synthese der RNA. Wie aus den Ergebnissen entnommen werden konnte, war es mit allen gewählten Expressionssystemen möglich intakte mRNA der Gene aus *G. sulphuraria* zu erhalten. Das bedeutet demnach, dass ein entscheidendes Problem auf dem Weg von der mRNA hin zum Protein besteht. Möglicherweise wird der Translationsprozess in irgendeiner Art und Weise inhibiert, so dass es nicht möglich ist Protein zu synthetisieren. Eine Inhibierung der Translation kann aufgrund von Sekundärstrukturen in der RNA verursacht werden. Nach der Transkription der DNA entsteht immer eine einzelsträngige RNA, wobei dieser Einzelstrang meist eine rechtsgängige Helix-Konformation annimmt, in der die Stapelkräfte der Basen dominieren. Alle selbstkomplementären

Sequenzen im Molekül führen zur Bildung komplexerer Strukturen. Die Sekundärstruktur einer RNA beschreibt demnach welche Basen miteinander komplementär reagieren (Nelson und Cox, 2001). Die Anzahl der möglichen Sekundärstrukturen einer RNA verhält sich exponentiell zur Länge der RNA Sequenz. So existieren beispielsweise für eine Sequenz der Länge von 200 Bp mindestens  $10^{50}$  mögliche Strukturen. Die Ausbildung von Sekundärstrukturen ist demnach eine Möglichkeit zur Kontrolle der Translation. Als Beispiel für diese Kontrolle kann die RNA des Virus M 12 herangezogen werden. Die RNA dieses Virus kodiert im Wesentlichen für drei Proteine, das Maturationsprotein, das Hüllprotein und die Replikase. Diese RNA bildet eine stabile Sekundärstruktur zwischen einem Stück des Maturationsgens und dem Start-Codon des Hüllproteins, so dass das Start-Codon für die Translation des Hüllproteins verschlossen ist. Erst nach der Synthese der Replikase wird der RNA-Strang repliziert und die Sekundärstruktur gelöst, wodurch das Start-Codon des Hüllproteins für die Translation zugänglich ist. Weitere Mechanismen zur Regulation des Translationsniveaus ist die Regulation der Halbwertszeit der mRNA oder die Manipulation der für die Proteinsynthese notwendiger Faktoren (Hirsch-Kauffmann und Schweiger, 2006). Bezugnehmend auf die Expression der Proteine aus *G. sulphuraria* könnten die letzten beiden Punkte wohl ausgeschlossen werden. Beispielsweise konnte während der Proteinexpression in *E. coli* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion intakte mRNA nachgewiesen werden, so dass wir in diesem Fall nicht davon ausgehen könnten, dass die Halbwertszeit für eine mögliche Expression des Proteins zu gering sei. Darüber hinaus, sollte in den vorliegenden Expressionsstämmen keine Manipulation der für die Proteinsynthese notwendigen Faktoren vorliegen, da die Expression anderer Proteine (z.B. Phosphatase-Domäne) problemlos erfolgte. Somit bestände durchaus die Möglichkeit, dass sich eine energetisch starke Sekundärstruktur innerhalb der Synthase-Domäne ausbildet, die möglicherweise zum Abbruch der Translation führt. Alternativ könnte es zur Ausbildung einer starken Sekundärstruktur im Bereich des Start-Codons gekommen sein, so dass die Translation letztlich gar nicht beginnt. Darüber hinaus muss es sich um einen Inhibierungsprozess handeln, der in Kombination mit zellulären Bestandteilen erfolgt, da lediglich die *in vivo* Synthese der Proteine aus *G. sulphuraria* unterdrückt wurde. Wie die Ergebnisse zeigen, war es möglich das GS10960 Protein *in vitro* zu exprimieren.

### 4.3 OtsAB Fusionsprotein aus *Crocospaera watsonii*

Analysen des Genoms von *C. watsonii* (<http://genome.jgi-psf.org/crowa.home.html>) offenbarten, dass dieses marine Cyanobakterium keine Gene für die Synthese von GG (Hagemann, 2011) besitzt. Anstelle dessen konnten Gene für die Synthese von Trehalose identifiziert werden. Interessanterweise erfolgte diese Synthese aber nicht über den aus Cyanobakterien bekannten TreY/TreZ Biosyntheseweg (Higo *et al.*, 2006), sondern über den OtsAB Biosyntheseweg, der als erstes in *E. coli* entdeckt und beschrieben wurde (Giaever *et al.*, 1988; Kaasen *et al.*, 1992). Jedoch muss man bedenken, dass das Genom von *C. watsonii* noch nicht komplett bekannt ist und lediglich in vielen Contigs vorliegt. Doch betrachtet man sich zusätzlich die unvollständigen Genome weiterer *Crocospaera* Stämme (WH0003, WH8502, WH0401, WH0402, WH0005) so können auch in diesen, identische Gene für das *otsAB* Gene aus *C. watsonii* WH8501 identifiziert werden (z.B. ORF EHJ11581 von WH0003). Ebenso konnte auch in allen diesen Stämmen keine Gene für die GG Biosynthese und für die Synthese von Trehalose über den alternativen TreY/TreZ Biosyntheseweg gefunden werden (S. Bench und J. Zehr, mündliche Mitteilung). Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass Trehalose das „compatible solute“ in *C. watsonii* ist, obwohl vorhergehende Studien zeigten, dass Trehalose oder Saccharose allein ein Wachstum unter marinen Bedingungen nicht ermöglichen (Hagemann, 2001). Doch bei genaueren Betrachtungen weisen einige Untersuchungen auf eine Trehalose Akkumulation in marinen Cyanobakterien hin. Hierbei handelt es sich zum einen um *Lyngbya aestuarii* CCY9616 (PCC 8106) und zum anderen um marine, mattenformende, filamentöse Cyanobakterien (Stal und Reed, 1987). Dass es sich bei Trehalose um ein echtes „compatible solute“ handelt, zeigen die Ergebnisse der Analyse des Osmolytspektrums und des Transkriptlevels bei verschiedenen Salzkonzentrationen (Pade *et al.*, 2012). Diese Daten zeigen eindrucksvoll, dass Trehalose in Abhängigkeit zur Salinität akkumuliert wurde, wobei das Transkriptlevel von *otsAB* mit diesem Anstieg korreliert.

Um die Funktionalität, des Proteins zu überprüfen, mussten heterologe Expressionsstudien gemacht werden, da kein Protokoll für die direkte Mutation von Genen in *C. watsonii* existiert. Die Ergebnisse zeigen, dass es möglich war das „full-length“ Protein (OtsAB) rekombinant aufzureinigen und dessen biochemische Eigenschaften zu analysieren. Im Vergleich zur GG-Synthese, bei der ADP-Glukose gegenüber UDP-Glukose in Cyanobakterien bevorzugt wird (Hagemann und Erdmann, 1994), konnte mit dem OtsAB Fusionsprotein aus *C. watsonii* eine umgekehrte Präferenz nachgewiesen werden. Somit war es letztlich möglich eine Enzymaktivität von 2,5 nmol Trehalose min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> OtsAB Fusionsprotein zu ermitteln. Vergleichend dazu konnte mit der Trehalose-6-Phosphat-Synthase aus *Saccharomyces cerevisiae* ein Aktivität von 30-34 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> Protein ermittelt werden (van der Cammen *et al.*, 1989). Dies verdeutlicht die geringe Aktivität des Enzyms, was letztlich mit der schlechten Expressierbarkeit des Proteins einhergeht.

Untersuchungen der Arbeitsgruppe Sievers (Universität Essen) an einem ähnlichen OtsAB Fusionsprotein aus *Thermoproteus tenax* zeigten, dass nur durch Zugabe eines zusätzlichen, kleinen Proteins, eine OtsAB-Aktivität detektiert werden konnte (mündliche Mitteilung). Bei diesem Protein handelte es sich um eine putative Glykosyl-Hydrolase, wobei das kodierende Gen stromabwärts des



*otsAB* Gens im *T. tenax* Genom lokalisiert ist. Eine ähnliche Genorganisation konnte in den Genomen von *C. watsonii* und *M. marina* nachgewiesen werden (Abb. 12). Die Vermutung lag dementsprechend nahe, dass es sich hierbei um ein regulatorisches Protein handeln könnte. Ähnliche regulatorische Proteine konnten in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt werden. So wird die Trehalose-Synthese in *S. cerevisiae* von einem Proteinkomplex katalysiert, der aus vier Untereinheiten besteht. Eines dieser Untereinheiten ist die Trehalose-6-Phosphat-Synthase (TPS1), die ebenfalls zu den Glycosyl Transferasen der Familie 20 zählt. Darüber hinaus gibt es die Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase (TPS2) und zwei regulatorische Proteine (TPS3 und TSL1) (Bell *et al.*, 1998). Novak *et al.* (2011) konnten zeigen, dass das Schlüsselenzym des Biosynthesewegs von GG (GgpS) von Nukleinsäure inhibiert wird. Das Protein ist in der Lage DNA, RNA und Heparin über salzabhängige elektrostatische Wechselwirkungen an das negativ geladene Rückgrat des Polyanions zu binden. Das bedeutet, dass die GgpS Aktivität in Gegenwart von 200 mM NaCl in Anwesenheit von DNA etwa um das 100-fache, im Vergleich zu 0 mM NaCl, gesteigert werden konnte (Novak *et al.*, 2011). Jedoch resultierte die Anwendung dieser Methodik bei dem *OtsAB* Protein aus *C. watsonii* in keine Steigerung der Enzymaktivität.

Ganz allgemein betrachtet, besitzt *C. watsonii* nur einen engen Salztoleranzbereich, wobei dieser Aspekt möglicherweise in der Synthese und Akkumulation von Trehalose als „compatible solute“ begründet liegt. Das bedeutet, dass mit sinkendem und steigendem Salzgehalt die Zellen das Wachstum einstellen. Ein ähnliches Verhalten konnte bereits in marinem Picoplankton analysiert werden. Auch diese Stämme konnten lediglich geringe Schwankungen in der Salinität tolerieren (Klähn *et al.*, 2010). Studien an diesen Picoplanktern zeigten, dass unter Stickstoff limitierenden Bedingungen ein weiteres „compatible solute“ akkumuliert wurde. Hierbei handelte es sich um Glucosylglycerat (GGA). Die Synthese dieses „compatible solutes“ wird nicht nur von marinen Organismen bevorzugt, sondern spielt zudem eine zentrale Rolle im Wechselspiel zwischen der Salinität und der Stickstoffverfügbarkeit. In marinen Habitaten ist das Wachstum abhängig von der Menge an verfügbarem Stickstoff, der in dem Oberflächenwasser oligotropher (sub)tropischer Ozeane nahe am Detektionslimit von 5-50 nM liegt (Capone *et al.*, 2008). Marine Cyanobakterien wie *Crocospaera*, *Trichodesmium* oder *Cyanothece* sind nicht auf den gebundenen Stickstoff in deren Lebensräumen angewiesen, da diese Organismen in der Lage sind atmosphärischen Stickstoff zu fixieren. *C. watsonii* zählt zu den wichtigsten Stickstofffixierern in den oligotrophen, tropischen und subtropischen Ozeanen. Unter den Cyanobakterien, zeigen die *Crocospaera* Stämme eine bemerkenswert geringe Diversität. Das bedeutet, dass die Abweichungen in den Nukleotidsequenzen unter 1 % liegen, wohingegen die Abweichung in marinen planktonischen Cyanobakterien, die nicht in der Lage sind Stickstoff zu fixieren, bis zu 15 % erreichen können (Zehr *et al.*, 2007).

#### 4.3.1 Horizontaler Gentransfer des OtsAB Fusionsproteins aus *Crocospaera watsonii*

Der Erwerb von Erbsubstanz außerhalb der vertikalen Erbfolge bezeichnet man als horizontalen Gentransfer. Man unterscheidet verschiedene Mechanismen des Gentransfers in Bakterien. Dazu zählen die Aufnahme von freier DNA aus der Umgebung und deren Integration in das Genom (Transformation), die Übertragung von DNA zwischen einer Donor- und Rezipientenzelle durch einen komplexen Mechanismus, der einen engen Zellkontakt erfordert (Konjugation) und den durch Phagen vermittelte Transfer von DNA (Transduktion). Die natürliche Kompetenz ist ein Transformationsmechanismus, bei dem Zellen in der Lage sind freie DNA aus der Umwelt aufzunehmen. Dieser Mechanismus ist aus zahlreichen Bakterien und Archaeen bekannt (Zaneveld *et al.*, 2008, Dubnau, 1999). Die natürliche Transformation wurde 1928 zum ersten Mal dokumentiert, und diente letztlich dem Nachweis, dass die DNA das genetische Material darstellt (Griffith, 1928, Avery *et al.*, 1944). Die natürliche Kompetenz wird häufig in Abhängigkeit verschiedener Umweltbedingungen ausgebildet. Zum Beispiel wird die natürliche Kompetenz in *Vibrio cholera* durch Chitin, eine kritische Populationsdichte, Nährstoffmangel oder sinkende Wachstumsraten induziert (Meibom *et al.*, 2005). In *Neisseria gonorrhoeae* hingegen besteht eine natürliche Kompetenz in allen Wachstumsphasen hinweg (Hamilton und Dillard, 2006). Die gerichtete Übertragung von DNA durch Zellkontakt zwischen einer Donor- und Rezipientenzellen bezeichnet man als Konjugation. Dieser DNA-Transfer ist weit verbreitet und kommt in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, wie auch in Crenarchaeoten vor (Stedmann *et al.*, 2000) und leistet einen wesentlichen Beitrag zum horizontalen Gentransfer. Dieser DNA Transfer wird über das „type IV secretory system (TIVSSs)“ vermittelt. Nicht nur Plasmide, konjugative Transposons, integrative und konjugative Elemente (ICEs), sondern auch Chromosomenabschnitte und gesamte Chromosomen können konjugativ übertragen werden (Wilham, 2008). Die Transduktion als ein weiterer Mechanismus zur Übertragung von DNA wird von Phagen vermittelt, wobei man zwischen einer allgemeinen und einer spezifischen Transduktion unterscheiden kann (Fuchs, 2007).

*Crocospaera watsonii* ist das einzige Cyanobakterien, in dessen Genom das *otsAB* Gen, welches für die Trehalose-Synthese verantwortlich ist, identifiziert werden konnte. Eng verwandte marine Cyanobakterien wie *Cyanothece* spp. oder *Synechococcus* sp.PCC7002 haben dagegen GG-Synthesegene. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Trehalose-Synthese in den Cyanobakterien in der Regel nach einem alternativen Biosyntheseweg, den sogenannten TreY/TreZ-Syntheseweg, verläuft. Aufgrund dieser Tatsachen kann man annehmen, dass dieses Gen über ein horizontales Gentransferereignis in das Genom von *Crocospaera watsonii* gelangt ist (<http://genome.jgi-psf.org/crowa/crowa.home.html>). Darüber hinaus wird diese Annahme, durch das Vorhandensein ähnlicher OtsAB Sequenzen in den Genomen von allen *Crocospaera* Stämmen unterstützt. Dies impliziert die Vermutung, dass sich dieser laterale Genstransfer in der frühen Geschichte dieser Cyanobakterienart ereignet haben muss. Außerdem lassen die großen Ähnlichkeiten zu OtsAB Proteinen aus marinen „CFB group“ Bakterien die Vermutung zu, dass dieses Gentransferereignis von diesen heterotrophen Bakterien ausgegangen sein muss. Bei Betrachtung des ersten Clusters (Abb. 27) wird ersichtlich, dass auch einige archaeale OtsAB Proteine in diesem inbegriffen sind. Diese Erkenntnis führt zur Annahme, dass dieses Konstrukt auch zwischen „CFB group“ Bakterien und

Archaea ausgetauscht wurde. Die größte Ähnlichkeit konnte zu der Trehalose-6-Phosphat-Synthase/Phosphatase aus *Microscilla marina* analysiert werden (Identität 57 %, Ähnlichkeit 74 %). Das OtsAB Protein aus *Crocospaera watsonii* hat höchstwahrscheinlich seinen Ursprung in *Microscilla marina*, wobei dies von der Tatsache gestützt wird, dass in beiden Organismen stromabwärts des *otsAB* Gens eine Glycosyl-Hydrolase zu finden ist (*ghs*, Abb. 12). Darüber hinaus befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu dem *otsAB* Gen aus *Crocospaera watsonii* eine Transposase (*orf3*). Diese Transposase ist der nächste Hinweis, dass dieses Genkonstrukt über einen horizontalen Gentransfer in das Genom von *Crocospaera watsonii* gelangt ist. Damit einher geht die Tatsache, dass das Genom von *Crocospaera watsonii* als Beispiel für die evolutionäre Strategie der DNA Neuordnung angesehen wird. Diese extensive Genomumgestaltung wird von mobilen Elementen und Transposasen vollzogen. Dieses Genom trägt die höchste Transposonfrequenz, die unter den Cyanobakterien bekannt ist. Über 400 mobile Elemente, vor allem Transposasen und Insertionssequenzen sind zu finden (Zehr *et al.*, 2007). Transposasen gehören wie Insertionssequenzen zu den sogenannten transponierbaren Elementen, die in der Lage sind ihre genetische Position innerhalb der Zelle zu verändern (Craig *et al.*, 2002). Beide Elemente haben zwei wichtige Eigenschaften gemeinsam. Beide tragen Gene, die für eine Transposase kodieren, und beide Elemente besitzen kurze, umgekehrte Wiederholungssequenzen an den Enden ihrer DNA (Madigan und Martinko, 2006). Diese zwei Eigenschaften sind unerlässlich für das Transpositionereignis.

Um der Vermutung weiter nachzugehen, dass OtsAB aus *C. watsonii* tatsächlich über einen horizontalen Gentransfer in das Genom gelangt ist, gibt es noch weitere Ansätze zur Erkennung eines solchen Transferereignisses. Kompositorische Ansätze gehen davon aus, dass Sequenzeigenschaften des Genoms innerhalb einer Art relativ konserviert sind und sich zwischen verschiedenen Taxa unterscheiden. Wichtige Sequenzeigenschaften sind hierbei der GC-Gehalt, die Häufigkeit des Gebrauchs verschiedener Codone und Aminosäuren oder die Häufigkeit verschiedener Dinukleotid-Folgen. Darüber hinaus weist die Integration einer Sequenz in ein tRNA-Gen und die Anwesenheit typischer Phagengene auf einen Induktionsvorgang hin (Garcia-Vallve *et al.*, 2000; Wilharm, 2008). Weiterführende Analysen des *otsAB* Gens aus *Crocospaera watsonii* zeigen Auffälligkeiten im GC-Gehalt. Das gesamte Genom von *Crocospaera watsonii* besitzt einen Gehalt von 37 %, wobei der GC-Gehalt des putativ horizontal transferierten Gens *otsAB* einen erhöhten Wert von 41 % aufweist. Untersuchungen des umgebenden Genbereichs offenbaren keinen Hinweis auf die Integration in ein tRNA-Gen, wobei diese Analysen nur eingeschränkt getätigt werden konnten, da das *otsAB* Gen am Ende eines recht kurzen Contigs vorliegt. Letztlich weist alles darauf hin, dass über einen horizontalen Gentransfer, das *otsAB* Gen in das Genom von *Crocospaera watsonii* transferiert wurde, um eventuell den Verlust eines GG-Synthesegens auszugleichen.

#### 4.4 Floridosid-/Isofloridosid-Synthese in Rotalgen

Das Heterosid Floridosid [ $\alpha$ -D-Galactopyranosyl-(1-2)-Glycerol] ist das Photosynthese- und Speicherprodukt in Rotalgen. Ausgenommen hiervon ist die Ordnung Ceramiales. Diese synthetisieren und akkumulieren das chemisch verwandte Digeneasid [ $\alpha$ -D-Mannopyranosyl-(1-2)-Glycerat] (Kirst, 1980). Darüber hinaus konnten in der Ordnung der Bangiales (*Porphyra* und *Bangia*) zwei isomere Formen von Floridosid identifiziert werden, D-Isofloridosid [ $\alpha$ -D-Galactopyranosyl-(1-1)-Glycerol-D-Glycerol] und L-Isofloridosid [ $\alpha$ -D-Galactopyranosyl-(1-1)-Glycerol-L-Glycerol] (Wickberg, 1958; Meng *et al.*, 1987; Karsten *et al.*, 1993). Alle drei Heteroside zusammen können letztlich bis zu 30 % der Trockenmasse von Rotalgen ausmachen (Karsten *et al.*, 1993). Die Zusammensetzung dieser Heteroside jedoch kann sich in verschiedenen *Porphyra* Arten in Bezug auf das saisonale Wachstum voneinander unterscheiden. Das bedeutet, dass die Aktivität der Floridosid-Synthese in *P. perforata* von der Jahreszeit abhängig ist (Meng und Srivastava, 1993). So konnte beispielsweise ein starker Anstieg der enzymatischen Aktivität zwischen Februar und April/Mai analysiert werden, wobei dies mit einem starken Anstieg an Floridosid einhergeht (Karsten, 1999). In anderen *Porphyra* Spezies, wie *P. dioica* scheint die Heterosid-Konzentration in Abhängigkeit zur Tageslänge zu variieren. Das heißt, dass die höchsten Konzentrationen im Sommer verzeichnet werden konnten. Diese Schwankungen deuten daraufhin, dass die Floridosidmenge im engen Zusammenhang mit der Florideenstärke zu sehen ist.

Neben diesen Makroalgen gibt es bei den Rotalgen auch Vertreter der Ordnung der Cyanidiales. Hierbei handelt es sich um kleine, unizelluläre, evolutionär uralte Rotalgen, die an extreme Standorte adaptiert sind. Zu dieser Gruppe zählen die drei Gattungen *Cyanidioschyzon*, *Cyanidium* und *Galdieria*. Diese Organismen wecken großes Interesse aufgrund der Tatsache, dass diese Rotalgen im Vergleich zu anderen Eukaryotes nicht nur extreme Standorte besiedeln, sondern vor allem auch eine hohe Resistenz gegenüber toxischen Metallionen und anderen Stressoren aufweisen (Yoshimura *et al.*, 1999; Nagasaka *et al.*, 2002; 2004). Doch neben diesen Eigenschaften ist vor allem *Galdieria sulphuraria* in der Lage in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen (10 %) zu leben (Albertano *et al.*, 2000). Neben *G. sulphuraria* ist auch *C. merolae* ein sehr interessanter Vertreter der Gattung Cyanidiales, nicht zuletzt aufgrund der Tatsache, dass sich beide Organismen durch gewisse Merkmale voneinander unterscheiden (Albertano *et al.*, 2000). Dazu gehört z.B. die Art der Fortpflanzung. *G. sulphuraria* vermehrt sich über Endosporenbildung, wohingegen *C. merolae* sich zweiteilt. Das besondere Interesse liegt aber vor allem auf der außergewöhnlichen und metabolischen Vielseitigkeit von *G. sulphuraria* im Vergleich zu *C. merolae*. *G. sulphuraria* ist in der Lage photoautotroph, heterotroph und mixotroph zu wachsen, wobei dieser Organismus über 50 verschiedenen Kohlenstoffquellen (Zucker, Zuckeralkohole, Intermediate des Tricarbonsäurezyklus und Aminosäuren) verstoffwechseln kann (Rigano *et al.*, 1976, 1977; Gross und Schnarrenberger, 1995; Oesterheld *et al.*, 1999). Um diese unterschiedlichen Zucker in den zentralen Kohlenstoff-Kreislauf einzuschleusen, sind eine Vielzahl verschiedener Zucker-Kinasen notwendig. Im Genom von *G. sulphuraria* sind putative Gluco-, Galacto-, Fructo-, Glycero-, Xylulo- und Ribokinasen kodiert (Barbier *et al.*, 2005). Obwohl *C. merolae* nicht in der Lage ist heterotroph zu wachsen, konnte in dessen Genom das gleiche Spektrum an Zucker-Kinasen identifiziert werden. Ein weiterer wichtiger Punkt in

dem Kohlenstoffmetabolismus ist die Synthese von Stärke, als schnell zugänglicher Kohlenstoffspeicher. Rotalgen synthetisieren die sogenannte Florideenstärke, die im Cytosol akkumuliert wird. Diese Florideenstärke unterscheidet sich zu der Stärke aus grünen Pflanzen durch das Fehlen von Amylose (Meeuse und Kreger, 1954; Meeuse, 1960; Nagashima *et al.*, 1971). Auch wenn man anfänglich davon ausging, dass *C. merolae* keine Florideenstärke besäße, konnte Coppin *et al.* (2005) zeigen, dass nicht nur *G. sulphuraria*, sondern auch *C. merolae* die semikristalline Stärke synthetisiert. In den meisten Rhodophyta stellte Florideenstärke die Quelle für photosynthetisch fixierten Kohlenstoff dar, wobei sie unter bestimmten Wachstumsbedingungen in cytosolischen Granula bis zu 80 % des totalen Zellvolumens ausmachen können (Ekman *et al.*, 1991).

Der Glucan-Metabolismus in *G. sulphuraria* und *C. merolae* ähnelt den aus anderen Rotalgen (Viola *et al.*, 2001), wobei zahlreiche Gene in den Genomen identifiziert werden konnten, die möglicherweise für die Biosynthese und der Spaltung des Glucans verantwortlich sind (Barbier *et al.*, 2005). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit  $\alpha$ -(1,4)-Glucan mit Hilfe von  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Amylasen zu spalten. In den *in silico* Analysen konnte gezeigt werden, dass das hier untersuchte Gen *GS10960* eine CBM20 Domäne besitzt. BLASTp Analysen im Genom ([www.merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp](http://www.merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp)) von *C. merolae* offenbarten ein Protein (CMI293C), welches eine hohe Ähnlichkeit („Identities“ 55 %, „Positives“ 64 %) zu dem *GS10960* Protein aus *G. sulphuraria* besitzt und ebenfalls eine CBM20 Domäne am C-terminalen Ende trägt. Die phylogenetischen Untersuchungen zeigten, dass genau dieses Protein (CMI293C) mit den beiden *Galdieria*-Proteinen (*GS26940* und *GS10960*) sowie einer weiteren putativen Floridosid-/Isofloridosid-Synthase ein gemeinsames Cluster bilden. Da De Luca und Moretti bereits 1983 zeigen konnten, dass *C. merolae* und *G. sulphuraria* Floridosid und Isofloridosid synthetisieren, liegt somit die Vermutung nahe, dass es sich bei dem homologen Protein aus *Cyanidioschyzon* ebenfalls um die Floridosid-/Isofloridosid-Synthase handelt.

Ein weiterer Hinweis, dass es sich bei diesen beiden Proteinen um die potentiellen Kandidaten für die Floridosid-/Isofloridosid-Synthese handelt, ist die Tatsache, dass beide eine C-terminale CBM20 Domäne tragen. Hierbei handelt es sich um eine sogenannte „starch-binding-domain“. Diese Domäne verleiht die Eigenschaft Stärke zu binden und abzubauen (Machovič *et al.*, 2005). Damit geht die Vermutung einher, dass diese Domäne Florideenstärke bindet und abbaut, sobald die Synthese von Floridosid/Isofloridosid notwendig ist. Die sogenannten „starch-binding-domains“ (SBD) sind in verschiedenen Familien der „carbohydrate-binding modules“ (CBM) klassifiziert. Momentan sind 6 verschiedene SBD-Familien bekannt: CBM20, CBM21, CBM25, CBM26, CBM34 und CBM41 (Machovič *et al.*, 2005). Etwa 10 % aller amolytischen Enzyme besitzen ein CBM, um letztlich Stärke binden und abbauen zu können. Einige amolytische Enzyme besitzen jene Fähigkeiten auch ohne die Existenz der CBM Domänen, jedoch kommen diese nur in begrenzter Anzahl vor (Tibbot *et al.*, 2002; Hostinova *et al.*, 2003). Die Bindung von Enzymen an unlösliche Polysaccharid-Oberflächen, z.B. Stärke-Granula, wie Florideenstärke oder kristalline Cellulose, wird von CBM-Domänen gesteigert. Hierbei wird angenommen, dass diese die Struktur und die Konformation des Polymers verzerren, so dass ein Abbau erleichtert wird (Christiansen *et al.*, 2009).

Neben den komplexen Oligosacchariden synthetisieren Cyanidiales auch einige wichtige Disaccharide. Trehalose, als ein nicht-reduzierender Zucker, dient beispielsweise in Hefen und Pflanzen als Signalmolekül um metabolische Biosynthesewege zu dirigieren oder zu kontrollieren. Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass Trehalose, Proteine und zelluläre Membranen vor Denaturierung und Inaktivierung schützt (Madin und Crowe, 1975).

Mit der anfänglichen Aufklärung des enzymatischen Biosynthesewegs von Floridosid/Isofloridosid (Kauss, 1969) begann die Suche nach dem Enzym, welches diese Reaktion von Glycerol-3-Phosphat und UDP-Galaktose über ein phosphoryliertes Intermediat bis hin zum dephosphorylierten Endprodukt Floridosid/Isofloridosid katalysiert. 1971 konnten Kauss und Schobert die Existenz eines Enzyms, welches diese Reaktion katalysiert, aufzeigen. Die Inkubation von Zellextrakt aus *Ochromonas malhamensis* in Gegenwart von UDP-Galaktose und radioaktiv markiertem Glycerol-3-Phosphat resultierte in einer neuen radioaktiven Substanz, wobei dieses Produkt nach Dephosphorylierung als Isofloridosid identifiziert werden konnte (Kauss und Schobert, 1971). Neben den Messungen am Zellextrakt aus *O. malhamensis*, konnte eine Floridosid-Phosphat-Synthase aus *Porpyra perforata* teilweise aufgereinigt werden. Auch in diesen Untersuchungen konnte eine Aktivität des entsprechenden Enzyms mit Glycerol-3-Phosphat und UDP-Galaktose nachgewiesen werden (Meng und Srivasta, 1991). Jedoch war bis heute nicht bekannt, welches Gen für dieses Enzyme kodiert.

Analysen machten auf zwei Gene (*GS10960* und *GS26940*) aus *G. sulphuraria* aufmerksam, die potentielle Kandidaten für die Synthese von Floridosid/Isofloridosid sein könnten. Diese Vermutung wurde durch phylogenetische Analysen gestärkt. In diesen Analysen bilden die putativen Floridosid-/Isofloridosid-Synthasen aus *G. sulphuraria* mit nicht charakterisierten Glucosyltransferasen aus Rotalgen, die ebenfalls diese „compatible solutes“ akkumulieren, ein von Trehaloseenzymen separiertes Cluster. Um diese Annahme experimentell zu bestätigen, mussten diese Proteine rekombinant hergestellt werden, da Rotalgen nur sehr eingeschränkt genetisch manipulierbar sind. Trotz der unerwartet großen Schwierigkeiten in der Erzeugung der Proteine, mit Hilfe gebräuchlicher Expressionssysteme, konnte die Annahme bestätigt werden, dass es sich bei *GS10960* und *GS26940* um Enzyme handelt, die die Biosynthese von Floridosid/Isofloridosid katalysieren. Durch die *in vitro* Translation gelang es letztlich geringe Mengen des Proteins *GS10960* herzustellen und deren Aktivität zu testen. Dabei bestätigten chemische Analysen, dass das rekombinante Protein *GS10960* Isofloridosid aus UDP-Glukose und Glycerol-3-Phosphat bildet. Nicht nur die gaschromatographischen, sondern vor allem die massenspektrometrischen Analysen bewiesen eindeutig, die enzymabhängige Synthese von Floridosid/Isofloridosid. Der Vergleich mit Referenzsubstanzen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ulf Karsten und Dr. Kenji Ishihara), die Floridosid und Isofloridosid in variierenden Verhältnissen enthielten, ließen den Schluss zu, dass es sich bei dem ersten Peak um Floridosid handelt und der zweite Peak charakteristisch für Isofloridosid ist. Mit den Proteinen *GS10960* und *GS26940* aus *G. sulphuraria* wurde Isofloridosid als das Hauptendprodukt der enzymatischen Reaktion identifiziert (Abb. 43). Somit scheint Isofloridosid zumindest hier das direkte Syntheseprodukt darzustellen. Zuvor war es umstritten, ob und wie die Synthese von Isofloridosid erfolgt. Zunächst wurde der Biosyntheseweg von Floridosid in

verschiedenen Rotalgen verifiziert (Kremer und Kirst, 1981). Dagegen konnte für die Synthese von D- und L-Isofloridosid in der Ordnung der Bangiales kein experimenteller Nachweis erbracht werden. In der Literatur ist man sich uneinig, ob die Synthese von D- und/oder L-Isofloridosid aus der Aktivität eines Enzyms resultiert, welches letztlich eine Kondensationsreaktion am C-1 des Glycerols vollzieht, oder ob D-/L-Isofloridosid aus Floridosid durch formale Umlagerung entsteht (Karsten, 1999; Meng und Srivastava, 1991). Darüber hinaus wurde diskutiert, inwieweit die Synthese von D-/L-Isofloridosid über ein anderes Enzym erfolgt könnte und ob es möglich wäre, dass die Synthese über einen gänzlich anderen Biosyntheseweg mit anderen Substraten erfolgt (Meng und Srivastava, 1991). Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass es in *G. sulphuraria* ein Enzym gibt, welches die Synthese von Isofloridosid unter Verwendung von Glycerol-3-Phosphat und UDP-Galaktose direkt katalysiert. Inwieweit daraus durch Umlagerung Floridosid, das auch in *G. sulphuraria* vorkommt, entsteht oder eine andere Glycosyltransferase für die spezifische Synthese dieses Stoffes verantwortlich ist, kann hier nicht abschließend geklärt werden.

## 5 Zusammenfassung

„Compatible solutes“ sind kleine organische Moleküle, die in der Akklimation an verschiedene Arten von Stress, wie Temperatur, Salinität oder Trockenheit eine bedeutende Rolle innerhalb des Organismus einnehmen (Brown, 1976). Das Augenmerk dieser Arbeit wurde auf die Akkumulation von „compatible solutes“ in Cyanobakterien und Rotalgen gelegt. Das Screening des Genoms von *Crocospaera watsonii* WH8501 zeigte entgegen den Erwartungen, dass dieses marine, einzellige, stickstofffixierende Cyanobakterium keine Gene für die Synthese von Glucosylglycerol besitzt, wobei GG in den allermeisten marinen Cyanobakterien das dominierende „compatible solute“ darstellt. Anstelle dessen konnten Gene für die Synthese von Trehalose identifiziert werden, wobei es sich bei dem kodierenden Protein um ein Fusionsprotein, bestehend aus einer Synthase- und einer Phosphatase-Domäne, handelt. Demnach wird Trehalose in *Crocospaera watsonii* vermutlich nicht über den aus Cyanobakterien bekannten TreY/TreZ-Biosyntheseweg synthetisiert, sondern über den sogenannten OtsAB-Biosyntheseweg, der erstmals in *E. coli* beschrieben wurde. Die Zellen von *C. watsonii* zeigten nicht nur eine salzabhängige Expression des *otsAB* Gens, sondern vor allem auch eine salzabhängige Akkumulation von Trehalose (Pade *et al.*, 2012). Die biochemischen Untersuchungen des „full-length“ OtsAB Proteins zeigten, dass dieses Enzym eine aktive Trehalose-6-Phosphat-Synthase/Phosphatase darstellt. Weiterführende Untersuchungen offenbarten, dass in keinem anderen Cyanobakteriengenom ein ähnliches Gen vorliegt. Somit drängt sich die Vermutung auf, dass dieses Gen über einen horizontalen Gentransfer in das Genom von *C. watsonii* gelangt ist. Dieses Transferereignis scheint sehr früh in der evolutiven Entwicklung der *Crocospaera* Stämme erfolgte zu sein.

Weiterhin wurde die Synthese der „compatible solutes“ Floridosid/Isofloridosid bei Rotalgen untersucht. Das Heterosid Floridosid [ $\alpha$ -D-Galactopyranosyl-(1-2)-Glycerol] ist ein dominierendes Photosynthese- und Speicherprodukt in Rotalgen mit Ausnahme von Vertretern der Ordnung der Ceramiales. Als Modellorganismus für diese Untersuchungen diente *Galdieria sulphuraria*. Bei dem Organismus handelt es sich um eine extremophile, kleine, unizelluläre Rotalge, die an heißen und sauren Habitaten vorkommt (Ciniglia *et al.*, 2004). Basierend auf Genomanalysen wurden zwei Gene in *Galdieria sulphuraria* identifiziert, die als potentielle Floridosid-/Isofloridosid-Synthaseenzyme in Frage kamen. Beide Gene wurden synthetisiert und sollten für die funktionelle Verifizierung zur Gewinnung rekombinanter Proteine exprimiert werden. Es erwies sich als unmöglich, diese Proteine rekombinant nach Genexpression in *E. coli* sowie der Hefe *P. pastoris* zu gewinnen. Letztlich konnte nach *in vitro* Translation, unter Nutzung von Weizenkeimbryos (Sawasaki *et al.*, 2002), das GS10960 Protein aus *Galdieria sulphuraria* exprimiert und analysiert werden. Mithilfe biochemischer Untersuchungen konnte die Aktivität dieses Proteins nachgewiesen werden. Gaschromatographische und massenspektrometrische Analysen bestätigten die Hypothese, dass es sich bei dem Protein GS10960 um eine Isofloridosid-Synthase/Phosphatase handelt. Das rekombinante Protein war in der Lage, Isofloridosid aus UDP-Galaktose und Glycerol-3-Phosphat zu synthetisieren. Die Fähigkeit zur Isofloridosid-Synthese wurde auch nach Expression dieses Gens in *Synechocystis* 6803 Mutanten bestätigt. Auch hier wurden eindeutig geringe Isofloridosidmengen detektiert. Mit dem GS10960



Protein aus *G. sulphuraria* konnte erstmalig eine Isofloridosid-Synthase/Phosphatase aus Rotalgen funktionell verifiziert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Albertano, P., Ciniglia, C., Pinto, G. und Pollio, A.** (2000) The taxonomic position of *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* and *Galdieria*: an update. *Hydrobiologia* **433**: 137-143.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.
- Arakawa, T. und Timasheff, S.N.** (1985) The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J* **47**: 411–414.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K.** (1994) Current Protocols in Molecular Biology (New York: Greene Publishing Associates and WileyInterscience)
- Avery, O.T., Macleod, C.M. und McCarty, M.** (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. **2**: 137-158.
- Baneyx, F.** (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **10**: 411–421.
- Barbier, G., Oesterhelt, C., Larson, M.D., Halgren, R.G., Wilkerson, C., Garavito, R.M., Benning, C. und Weber, A.P.M.** (2005) Comparative genomics of two closely related unicellular thermo-acidophilic red algae, *Galdieria sulphuraria* and *Cyanidioschyzon merolae*, reveals the molecular basis of the metabolic flexibility of *Galdieria sulphuraria* and significant differences in carbohydrate metabolism of both algae. *Plant Physiol* **137**: 460–474.
- Belitsky, B.R., Brill, J., Bremer, E. und Sonenshein, A.L.** (2001) Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 4389–4392.
- Bell, W., Sun, W., Hohmann, S., Wera, S., Reinders, A., Virgilio, C. de, Wiemken, A. und Thevelein, J.M.** (1998) Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J Biol Chem* **273**: 33311–33319.
- Ben-Amotz, A. und Avron, M.** (1983) Accumulation of Metabolites by Halotolerant Algae and its Industrial Potential. *Annu.Rev.Microbiol* **37**: 95–119.
- Bennetzen, J.L. und Hall, B.D.** (1982) Codon selection in yeast. *J Biol Chem* **257**: 3026–3031.
- Bisson, M und Kirst, G.O.** (1980) *Lamprothamnium*, a euryhaline charophyte I. Osmotic relations and membrane potential at steady state. *J Exp Bot* **31**: 1223–1235.
- Blackwell, J.R. und Horgan, R.** (1991) A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett* **295** (1-3), 10–12.
- Blumwald, E., Mehlhorn, R.J. und Packer, L.** (1983) Ionic Osmoregulation during Salt Adaptation of the Cyanobacterium *Synechococcus* 6311. *Plant Physiol* **73**: 377–380.
- Bolen, D. und Baskakov, I.V.** (2001) The Osmophobic Effect: Natural Selection of a Thermodynamic Force in Protein Folding. *J.Mol.Biol* **310**: 955–963.
- Borges, N., Ramos, A., Raven, N.D.H., Sharp, R.J. und Santos, H.** (2002) Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes. *Extremophiles* **6**: 209–216.

- Borowitzka, L.J., Demmerle, S., Mackay, M.A. und Norton, R.S.** (1980) Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of osmoregulation in a blue-green alga. *Science* **210**: 650–651.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem* **72**: 248–254.
- Bremer, E. und Krämer, R.** (2000) Coping with the osmotic challenges: Osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In *Bacterial stress response*. Hengge-Aronis, R. (Eds). ASM Press, Washington, DC.
- Breton, C., Mucha, J. und Jeanneau, C.** (2001) Structural and functional features of glycosyltransferases. *Biochimie* **83**: 713–718.
- Brown, A.D.** (1976) Microbial water stress. *Bacteriol.Rev* **40**: 803–846.
- Burg, M., Kwon, E. und Kültz, D.** (1997) Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annu Rev Physiol* **59**: 437-455.
- Cabib, E. und Leloir, L.F.** (1958) The biosynthesis of trehalose phosphate. *J Biol Chem* **231**: 259–275.
- Capone, D.G., Bronk, D.A., Mulholland, M.R. und Carpenter, E.J.** (2008) *Nitrogen in the Marine Environment*. Amsterdam: Elsevier.
- Cereghino, J.L. und Cregg, J.M.** (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 45–66.
- Chen, P.S., Toribara, T.J. und Warner, H.** (1956) Microdetermination of Phosphorus. *Anal Chem* **28**: 1756-1758.
- Christiansen, C., Hachem, M.A., Janeček, Š., Viksø-Nielsen, A., Blennow, A. und Svensson, B.** (2009) The carbohydrate-binding module family 20-diversity, structure, and function. *FEBS J* **276**: 5006–5029.
- Ciniglia, C., Yoon, H.S., Pollio, A., Pinto, G. und Bhattacharya, D.** (2004) Hidden biodiversity of the extremophilic Cyanidiales red algae. *Mol Ecol* **13**: 1827–1838.
- Clark, D. und Pazdernik, N.** (2009) *Molekulare Biotechnologie: Grundlagen und Anwendungen*. Spektrum, Heidelberg.
- Colin, H. und Gueguen, E.** (1930) The constitution of the principle sugar of *Rhododymenia palmata*. *Acad. Sci.* **191**: 163–164.
- Cole, K.M. und Sheath, R.** (1990) *Biology of the red algae*. Cambridge University Press, New York.
- Coppin, A., Varre, J.-S., Lienard, L., Dauvillee, D., Guerardel, Y., Soyer-Gobillard, M.-O., Buleon, A., Ball, S. und Tomavo, S.** (2005). Evolution of plant-like crystalline storage polysaccharide in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* argues for a red alga ancestry. *J Mol Evol* **60**: 257–267.
- Courtenay, E.S., Capp, M.W., Anderson, C.F. und Record, M.T.** (2000) Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: implications for the action of osmoprotectants in vivo and for the interpretation of "osmotic stress" experiments *in vitro*. *Biochemistry* **39**: 4455–4471.
- Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J. und Henrissat, B.** (2003) An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol* **328**: 307–317.
- Craig N. L., Craigie, R., Gellert, M. und Lambozitz, A.** (2002) *Mobile DNA II*. Washington DC: American Society for Microbiology Press.

- Craigie, J.S., McLachlan, J. und Tochter, R.D.** (1968) Some neutral constituents of the Rhodophyceae with special reference to the occurrence of the floridosides. *Can J Bot* **46**: 605–611.
- Csonka, L.N.** (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev* **53**: 121–147.
- De Luca, P. und Moretti, A.** (1983) Floridosides in *Cyanidium caldarium*, *Cyanidioschyzon merolae* and *Galdieria sulphuraria* (Rhodophyta, Cyanidiphyceae). *J Phycol* **19**: 368–369.
- De Smet, K.A., Weston, A., Brown, I.N., Young, D.B. und Robertson, B.D.** (2000) Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiology* **146**: 199–208.
- Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D. und Goloubinoff, P.** (2001) Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses. *J Biol Chem* **276**: 39586–39591.
- Dickson, D. und Kirst, G.O.** (1986) The role of dimethylsulphoniopropionate, glycine betaine and homarine in osmoacclimation of *Platymonas subcordiformis*. *Planta* **167**: 536–543.
- Dubnau, D.** (1999) DNA uptake in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **53**: 217–244.
- Eggert, A., Nitschke, U., West, J.A., Michalik, D. und Karsten, U.** (2007) Acclimation of the intertidal red alga *Bangiopsis subsimplex* (Stylonematophyceae) to salinity changes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **343**: 176–186.
- Ekman, P., Yu, S. und Pedersen, M.** (1991) Effects of altered salinity, darkness and algal nutrient status on floridoside and starch content,  $\alpha$ -galactosidase activity and agar yield of cultivated *Gracilaria sordida*. *British Phycological Journal* **26**: 123–131.
- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I. und Carroll, D.** (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* **13**: 17–27.
- Fahnert, B., Lilie, H. und Neubauer, P.** (2004) Inclusion bodies: formation and utilisation. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **89**: 93–142.
- Farwick, M., Siewe, R.M. und Krämer, R.** (1995) Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **177**: 4690–4695.
- Fuchs, G.** (2007) Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart New York, Georg Thieme Verlag.
- Fulda, S., Huckauf, J., Schoor, A. und Hagemann, M.** (1999) Analysis of stress responses in the cyanobacterial strains *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Synechocystis* sp. PCC 6803, and *Synechococcus* sp. PCC 7418: Osmolyte accumulation and stress proteins synthesis. *J Plant Physiol* **154**: 240–249.
- Galinski, E.A. und Trüper, G.H.** (1994) Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev* **15**: 95–108.
- Garcia-Vallve, S., Romeu, A. und Palau, J.** (2000) Horizontal gene transfer in bacterial and archaeal complete genomes. *Genome Res* **10**: 1719–1725.
- Giaever, H.M., Styrvold, O.B., Kaasen, I. und Strom, A.R.** (1988) Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* **170**: 2841–2849.
- Ginzburg, M.** (1987) *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. *Adv. Bot. Res.* **14**: 93–183.
- Griffith, F.** (1928) The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* **27**: 113–159.

- Gross, W. und Schnarrenberger, C.** (1995). Purification and characterization of a galactose-1-phosphate: UDP-glucose uridylyltransferase from the red alga *Galdieria sulphuraria*. *Eur J Biochem* **234**: 258–263.
- Guan, C., Li, P., Riggs, P.D. und Inouye, H.** (1987) Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene*. **67**: 21-30.
- Hagemann, M. und Erdmann, N.** (1994) Activation and pathway of glucosylglycerol synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* **140**: 1427–1431.
- Hagemann, M., Ribbeck-Busch, K., Klähn, S., Hasse, D., Steinbruch, R. und Berg, G.** (2008) The Plant-Associated Bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* Expresses a New Enzyme for the Synthesis of the Compatible Solute Glucosylglycerol. *Journal of Bacteriology* **190**: 5898–5906.
- Hagemann, M., Schoor, A., Jeanjean, R., Zuther, E. und Joset, F.** (1997) The *stpA* gene from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 encodes the glucosylglycerol-phosphate phosphatase involved in cyanobacterial osmotic response to salt shock. *J.Bacteriol* **179**: 1727–1733.
- Hagemann, M.** (2011) Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. *FEMS Microbiology Reviews* **35**: 87–123.
- Hall, T.** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp* **41**: 95-98.
- Hamilton, H.L. und Dillard, J.P.** (2006) Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Mol Microbiol* **59**: 376–385.
- Hammarström, M., Hellgren, N., van Den Berg, S., Berglund, H. und Härd, T.** (2001) Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Sci* **11**: 313–321.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557–580.
- Hanson, A.D., Rathinasabapathi, B., Chamberlin, B. und Gage, D.A.** (1991) Comparative physiological evidence that  $\beta$ -alaninebetaine and choline-0-sulfate act as compatible osmolytes in halophytic *Limonium* species. *Plant Physiol*: **97**: 1199-1205
- Higo, A., Katoh, H., Ohmori, K., Ikeuchi, M. und Ohmori, M.** (2006) The role of a gene cluster for trehalose metabolism in dehydration tolerance of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiology* **152**: 979–987.
- Hirsch-Kauffmann, M. und Schweiger, M.** (2006) Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Hohmann, S.** (1997). Shaping up: the response of yeast to osmotic stress. In: *Yeast stress responses*. Hohmann, S. und Mager, W. H. (Herausg.), Springer-Verlag, New York.
- Hostinova, E., Solovicova, A., Dvorsky, R. und Gasperik, J.** (2003) Molecular cloning and 3D structure prediction of the first raw-starch-degrading glucoamylase without a separate starch-binding domain. *Arch Biochem Biophys* **411**: 189–195.
- Imhoff, J.F. und Rodriguez-Valera, F.** (1984) Betaine is the main compatible solute of halophilic eubacteria. *J Bacteriol* **160**: 478–479.
- Kaasen, I., Falkenberg, P., Styrvold, O.B. und Strom, A.R.** (1992) Molecular cloning and physical mapping of the *otsBA* genes, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*: evidence that transcription is activated by *katF* (AppR). *J Bacteriol* **174**: 889–898.

- Kane, J.F und Hartley, D.** (1988) Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *TIBTECH* **6**: 95–101.
- Kapitonov, D. und Yu, R.K.** (1999) Conserved domains of glycosyltransferases. *Glycobiology* **9**: 961–978.
- Karsten, U.** (1999) Seasonal variation in heteroside concentrations of field-collected *Porphyra* species (Rhodophyta) from different biogeographic regions. *New Phytol* **143**: 561–571.
- Karsten, U. und West, J.A.** (1993) Ecophysiological studies 454 on six species of the mangrove red algal genus *Caloglossa*. *Aust. J. Plant Physiol.* **20**: 729–739.
- Karsten, U. Barrow, K.D. und King, R.J.** (1993) Floridoside, L-Isofloridoside, and D-Isofloridoside in the Red Alga *Porphyra columbina* (Seasonal and Osmotic Effects). *Plant Physiol* **103**: 485–491.
- Karsten, U., Michalik, D. und West, J.A.** (2005) A new unusual low molecular weight carbohydrate in the red algal genus *Hypoglossum* (Delesseriaceae, Ceramiales) and its possible function as osmolyte. *Planta* **222**: 319–326.
- Karsten, U., Koch, S., West, J.A. und Kirst, G.O.** (1994) The intertidal red alga *Bostrychia simpliciuscula* Harvey ex. J. Agardh from a mangrove swamp in Singapore: acclimation to light and salinity. *Aquat. Bot.* **48**: 313–323.
- Kataeva, I., Chang, J., Xu, H., Luan, C.-H., Zhou, J., Uversky, V.N., Lin, D., Horanyi, P., Liu, Z.J., Ljungdahl, L.G., Rose, J., Luo, M. und Wang, B.-C.** (2005) Improving solubility of *Shewanella oneidensis* MR-1 and *Clostridium thermocellum* JW-20 proteins expressed into *Escherichia coli*. *J Proteome Res* **4**: 1942–1951.
- Katoh, H., Asthana, R.K. und Ohmori, M.** (2004) Gene expression in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120 under desiccation. *Microb.Ecol* **47**: 164–174.
- Kauss, H.** (1977) Biochemistry of osmotic regulation. *Intern Rev Biochem* **13**: 119–140.
- Kauss, H.** (1979) Biochemie der osmotischen Regulation bei *Poteroiochromonas malhamensis*. *Ber Deutsch Bot Ges* **92**: 11–22.
- Kauss, H. und Schobert, B.** (1971) First demonstration of UDP-GAL: sn-glycero-3-phosphoric acid 1-alpha-galactosyl-transferase and its possible role in osmoregulation. *FEBS Lett* **19**: 131–135.
- Kauss, H.** (1986) A membrane-derived proteinase capable of activating a galactosyl-transferase involved in volume regulation of *Poteroiochromonas*. In *Plant Proteolytic Enzymes*. Dalling, M.J. (Eds.) CRC Press, Boca Raton.
- Kempf, B. und Bremer, E.** (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol* **170**: 319–330.
- Kirst, G.O. und Bisson, M.** (1979) Regulation of turgor pressure in marine algae: ions and low-weight organic compounds. *Aust J Plant Physiol* **6**: 539–556.
- Kirst, G.O.** (1980) Low mw carbohydrates and ions in Rhodophyceae: quantitative measurement of floridoside and digeneaside. *Phytochemistry* **19**: 1107–1110.
- Kirst, G.O.** (1989) Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**: 21–53.
- Kirst, G.O., Janssen, M.I.B. und Winter, U.** (1988) Ecophysiological investigations of *Chara vulgaris* grown in a brackish water lake: ionic changes and accumulation of sucrose in the vacuolar sap during sexual reproduction. *Plant Cell Environ* **11**: 55–61.

- Klähn, S. und Hagemann, M.** (2011) Compatible solute biosynthesis in cyanobacteria. *Environ. Microbiol* **13**: 551–562.
- Klähn, S., Steglich, C., Hess, W.R. und Hagemann, M.** (2010) Glucosylglycerate: a secondary compatible solute common to marine cyanobacteria from nitrogen-poor environments. *Environmental Microbiology* **12**: 83–94.
- Klutts, S.** (2002) Purification, Cloning, Expression, and Properties of Mycobacterial Trehalose-phosphate Phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 2093–2100.
- Kollman, V., Hanners, L.J., London, R.E., Adame, E.G. und Walker, T.E.** (1979) Photosynthetic preparation and characterization of <sup>13</sup>C -labeled carbohydrates in *Agmenellum quadruplicatum*. *Carbohydr. Res* **73**: 193–202.
- Kremer, B. und Kirst, G.O.** (1981) Biosynthesis of 2-O-D-glycerol- $\alpha$ -D-galactopyranoside (Floridoside) in marine Rhodophyceae **23**: 349–357.
- Kuhlmann, A.U. und Bremer, E.** (2002) Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* **68**: 772–783.
- Lairson, L.L., Henrissat, B., Davies, G.J. und Withers, S.G.** (2008) Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem* **77**: 521–555.
- Lämml, U.K.** (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680 – 685.
- Larsson, C., Morales, C., Gustafsson, L. und Adler, L.** (1990) Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *J Bacteriol* **172**: 1769–1774.
- Lentzen, G. und Schwarz, T.** (2006). Extremolytes: Natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**: 623–634.
- Lindberg, B.** (1955) Low-molecular carbohydrates in algae. XI. Investigation of *Porphyra umbilicalis*. *Acta Chem Scand* **9**: 1097–1099.
- Liu, J. und Mushegian, A.** (2003) Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. *Protein Sci* **12**: 1418–1431.
- Liu, M. und Hellebust, J.A.** (1976) Effects of salinity changes on growth and metabolism of the marine centric diatom *Cyclotella cryptica*. *Canadian Journal of Botany* **54**: 930–937.
- Lucht, J.M. und Bremer, E.** (1994) Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system proU. *FEMS Microbiol Rev* **14**: 3–20.
- Luzardo, M.C., Amalfa, F., Nuñez, A.M., Diaz, S., Biondi de Lopez, A.C. und Disalvo, E.A.** (2000) Effect of trehalose and sucrose on the hydration and dipole potential of lipid bilayers. *Biophys J* **78**: 2452–2458.
- Machovič, M., Svensson, B., MacGregor, E.A. und Janeček, Š.** (2005) A new clan of CBM families based on bioinformatics of starch-binding domains from families CBM20 and CBM21. *FEBS J* **272** **21**: 5497–5513.
- Mackay, M.A., Norton, R.S. und Borowitzka, L.J.** (1984) Organic Osmoregulatory Solutes in Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* **130**: 2177–2191.
- Madigan, M. und Martinko, J.** (2006) Brock Mikrobiologie. 11th ed. Pearson Studium, München.
- Madin, K.A.C. und Crowe, J.H.** (1975) Anhydrobiosis in nematodes: carbohydrate and lipid metabolism during dehydration. *J Exp Zool.* **193**: 335-342.

- Marin, K., Zuther, E., Kerstan, T., Kunert, A. und Hagemann, M.** (1998) The ggpS gene from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 encoding glucosyl-glycerol-phosphate synthase is involved in osmolyte synthesis. *J. Bacteriol* **180**: 4843–4849.
- Martin, D.D., Ciulla, R.A. und Roberts, M.F.** (1999) Osmoadaptation in archaea. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1815–1825.
- Matsuda, N., Kobayashi, H., Katoh, H., Ogawa, T., Futatsugi, L., Nakamura, T., Bakker, E.P. und Uozumi, N.** (2004) Na<sup>+</sup>-dependent K<sup>+</sup> uptake Ktr system from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its role in the early phases of cell adaptation to hyperosmotic shock. *J. Biol. Chem* **279**: 54952–54962.
- Matula, M., Mitchell, M. und Elbein, A.D.** (1971) Partial purification and properties of a highly specific trehalose phosphate phosphatase from *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **107**: 217–222.
- Mc Neil, S. D., Nuccio, M. L. und Hanson, A. D.** (1999) Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol* **120**: 945-950.
- Meeuse, B.J. und Kreger, D.R.** (1954) On the nature of floridean starch and Ulva starch. *Biochim Biophys Acta* **13**; 593–595.
- Meibom, K.L., Blokesch, M., Dolganov, N.A., Wu, C.-Y. und Schoolnik, G.K.** (2005) Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science* **310**: 1824–1827.
- Meikle, A.J., Reed, R.H. und Gadd, G.M.** (1988). Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes in whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **134**: 3049–3060.
- Meng, J., Rosell, K. und Srivastava, L.** (1987) Chemical characterization of floridosides from *Porphyra perforata*. *Carbohydrate Research* **2**: 171–180.
- Meng, J. und Srivastava, L.** (1991) Partial purification and characterization of floridoside phosphate synthase from *Porphyra perforata*. *Phytochemistry* **30**: 1763–1766.
- Meng, J. und Srivastava L.** (1993) Variations in floridoside content and floridoside phosphate synthase activity in *Porpyra perforata* (Rhodophyta). *J Phycol* **29**: 82–84.
- Mergulhao, F.J.M., Summers, D.K. und Monteiro, G.A.** (2005) Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv* **23**: 177–202.
- Mikkat, S., Effmert, U. und Hagemann, M.** (1997) Uptake and use of the osmoprotective compounds trehalose, glucosylglycerol, and sucrose by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Arch. Microbiol* **167**: 112–118.
- Mikkat, S., Galinski, E.A., Berg, G., Minkwitz, A. und Schoor, A.** (2000) Salt adaptation in pseudomonads: characterization of glucosylglycerol-synthesizing isolates from brackish coastal waters and the rhizosphere. *Syst Appl Microbiol* **23**: 31–40.
- Miller, K.D., Guyon, V., Evans, J.N.S., Shuttleworth, W.A. und Taylor, L.P.** (1999) Purification, cloning, and heterologous expression of a catalytically efficient flavonol 3-O-galactosyltransferase expressed in the male gametophyte of *Petunia hybrida*. *J. Biol. Chem.* **274**: 34011-34019.
- Morbach, S. und Krämer, R.** (2002) Body shaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria. *ChemBiochem* **5**: 384–397.
- Müller, V. und Oren, A.** (2003) Metabolism of chloride in halophilic prokaryotes. *Extremophiles* **7**: 261–266.



- Mullis, K.B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986) *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. **51**: 263-73.
- Murray, B.W., Wittmann, V., Burkart, M.D., Hung, S.C. und Wong, C.H. (1997) Mechanism of human alpha-1,3-fucosyltransferase V: glycosidic cleavage occurs prior to nucleophilic attack. *Biochemistry* **36**: 823–831.
- Nagasaka, S., Nishizawa, N.K., Mori, S. und Yoshimura, E.Y. (2004) Metal metabolism in the red alga *Cyanidium caldarium* and its relationship to metal tolerance. *Biometals* **17**: 177–181.
- Nagasaka, S., Nishizawa, N.K., Negishi, T., Satake, K., Mori, S. und Yoshimura, E. (2002) Novel iron-storage particles may play a role in aluminum tolerance of *Cyanidium caldarium*. *Planta* **215**: 399–404.
- Nagashima, H. (1976) Distribution of low-molecular weight carbohydrates in marine red algae. *Bull Jap. Soc. Phycol.* **24**: 103-110.
- Nagashima, H., Nakamura, S., Nishizawa, K. und Hori, T. (1971). Enzymic synthesis of floridean starch in a red alga, *Serraticardia maxima*. *Plant Cell Physiol* **12**: 243–253.
- Nelson, D. und Cox, M. (2001) *Lehninger Biochemie*, 3rd ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H. und Yura, T. (1998) Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1694–1699.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Yanagi, H. und Yura, T. (2000) Overexpression of Trigger Factor Prevents Aggregation of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 884-889
- Novak, J.F., Stirnberg, M., Roenneke, B. und Marin, K. (2011) A novel mechanism of osmosensing, a salt-dependent protein-nucleic acid interaction in the cyanobacterium *Synechocystis* Species PCC 6803. *J.Biol.Chem* **286**: 3235–3241.
- Oesterheld, C., Schnarrenberger, C. und Gross, W. (1999). Characterization of a sugar/polyol uptake system in the red alga *Galdieria sulphuraria*. *Eur J Phycol* **34**: 271–277.
- Oesterheld, C. und Gross, W. (2002) Different sugar kinases are involved in the sugar sensing of *Galdieria sulphuraria*. *Plant Physiol* **128**: 291–299.
- Oren, A. (1992) The genera *Haloanaerobium*, *Halobacteroides* and *Sporohalobacter*. In *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. Balows, A., Trüper, H., Dworkin, M., Harder, W. und Schleifer, K.-H. (Eds). Springer-Verlag, New York. pp. 1893–1900.
- Oren, A. (1999) Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol.Mol.Biol.Rev* **63**: 334–348.
- Oren, A. und Mana, L. (2002) Amino acid composition of bulk protein and salt relationships of selected enzymes of *Salinibacter ruber*, an extremely halophilic bacterium. *Extremophiles* **6**: 217–223.
- Pade, N., Compaore, J., Klähn, S., Stal, L.J. und Hagemann, M. (2012) The marine cyanobacterium *Crocospaera watsonii* WH8501 synthesizes the compatible solute trehalose by a laterally acquired OtsAB fusion protein. *Environ Microbiol* **14**: 1261–1271.
- Pade, N. und Hagemann, M. (2012) Cyanobacterial Salt Stress Acclimation: genetic manipulation and regulation. In *Stress biology of cyanobacteria: molecular mechanisms to cellular responses*. Srivastava, A.K., Rai, A.N. und Neilan, B.A. (Eds). CRC Press/ Taylor and Francis

- Pan, Y.T., Carroll, J.D. und Elbein, A.D.** (2002) Trehalose-phosphate synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. Cloning, expression and properties of the recombinant enzyme. *Eur J Biochem* **269**: 6091–6100.
- Pan, Y.T., Drake, R.R. und Elbein, A.D.** (1996) Trehalose-P synthase of mycobacteria: its substrate specificity is affected by polyanions. *Glycobiology* **6**: 453–461.
- Peter, H., Weil, B., Burkovski, A., Krämer, R. und Morbach, S.** (1998) *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *J Bacteriol* **180**: 6005–6012.
- Peterson, D.P., Murphy, K.M., Ursino, R., Streeter, K. und Yancey, P.H.** (1992) Effects of dietary protein and salt on rat renal osmolytes: covariation in urea and GPC contents. *Am J Physiol* **263**: 594–600.
- Pocard, J.A., Smith, L.T., Smith, G.M. und Le Rudulier, D.** (1994) A prominent role for glucosylglycerol in the adaptation of *Pseudomonas mendocina* SKB70 to osmotic stress. *J Bacteriol* **176**: 6877–6884.
- Poolman, B. und Glaasker, E.** (1998) Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol* **29**: 397–407.
- Potts, M.** (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev* **58**: 755–805.
- Putman, E.W. und Hassid, W.Z.** (1954) Sugar transformation in leaves of *Canna indica*. I. Synthesis and inversion of sucrose. *J Biol Chem* **207**: 885–902.
- Qu, Q., Lee, S.-J. und Boos, W.** (2004) TreT, a novel trehalose glycosyltransfering synthase of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *J Biol Chem* **279**: 47890–47897.
- Radomska-Pandya, A., Czernik, P.J., Little, J.M., Battaglia, E. und Mackenzie, P.I.** (1999) Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Rev* **31**: 817–899.
- Record, M.T., JR, Courtenay, E.S., Cayley, S. und Guttman, H.J.** (1998) Biophysical compensation mechanisms buffering *E. coli* protein-nucleic acid interactions against changing environments. *Trends Biochem Sci* **23**: 190–194.
- Reed, R.H., Borowitzka, L.J., Mackay, M.A., Chudek, J.A., Foster, R., Warr, S.R.C., Moore, D.J. und Stewart, W.D.P.** (1986) Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett* **39**: 51–56.
- Reed, R.H., Collins, J.C. u. Russell, G.** (1980) The Effects of Salinity upon Galactosyl-Glycerol Content and Concentration of the Marine Red Alga *Porphyra purpurea* (Roth) C.Ag. *J. Exp. Bot.* **31**: 1539–1554.
- Reed, R.H. und Stewart, W.D.P.** (1985) Osmotic adjustment and organic solute accumulation in unicellular cyanobacteria from freshwater and marine habitats. *Mar Biol* **88**: 1–9.
- Reed, R.H., Warr, S.R.C., Richardson, D.L., Moore, D.J. und Stewart, W.D.P.** (1985a) Multiphasic osmotic adjustment in a euryhaline cyanobacterium. *FEMS Microbiol. Lett* **28**: 225–229.
- Reed, R.H.** (1985b) Osmoacclimation in *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta, Bangiales): the osmotic role of floridoside. *Brit. Phycol. J.* **20**: 211–218.
- Rigano, C., Aliotta, G., Rigano, V.D., Fuggi, A. und Vona, V.** (1977) Heterotrophic growth patterns in the unicellular alga *Cyanidium caldarium*. A possible role for threonine dehydrase. *Arch Microbiol* **113**: 191–196.

- Rigano, C., Fuggi, A., Di Martino Rigano, V. und Aliotta, G.** (1976) Studies on utilization of 2-ketoglutarate, glutamate and other amino acids by the unicellular alga *Cyanidium caldarium*. *Arch Microbiol* **107**: 133–138.
- Roberts, M.F.** (2005) Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* 1:5.
- Robertson, D.E., Roberts, M.F., Belay, N., Stetter, K.O. und Boone, D.R.** (1990) Occurrence of beta-glutamate, a novel osmolyte, in marine methanogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **56**: 1504–1508.
- Roder, A., Hoffmann, E., Hagemann, M. und Berg, G.** (2005) Synthesis of the compatible solutes glucosylglycerol and trehalose by salt-stressed cells of *Stenotrophomonas* strains. *FEMS Microbiol Lett* **243**: 219–226.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA.
- Sambrook, J. und Russell, D.** (2001) Molecular Cloning. A laboratory manual., 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sawasaki, T., Hasegawa, Y., Tsuchimochi, M., Kamura, N., Ogasawara, T., Kuroita, T. und Endo, Y.** (2002) A bilayer cell-free protein synthesis system for high-throughput screening of gene products. *FEBS Lett* **514**: 102–105.
- Scheffer, F., Schachtschabel, P. und Fischer, W.R.** (1992) Lehrbuch der Bodenkunde. Spektrum Verlag. Stuttgart.
- Schein, C. und Noteborn, M.** (1988) . Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. **6**: 291–294.
- Schiraldi, C., Di Lernia, I. und De Rosa, M.** (2002) Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends Biotechnol* **20**: 420–425.
- Schobert, B., Untner, E. und Kauss, H.** (1972) Isofloridoside and osmoregulation in *Ochromonas malhamensis*. *Z. Pflanzenphysiol.* **67**: 385–398.
- Schobert, B.** (1980) Proline catabolism, relaxation of osmotic strain and membrane permeability in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Physiol Plant* **50**: 37-42.
- Severin, J., Wohlfarth, A. und Galinski, E.** (1992) The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *J Gen Microbiol* **138**: 1629–1638.
- Shapiguzov, A., Lyukevich, A.A., Allakhverdiev, S.I., Sergeyenko, T.V., Suzuki, I., Murata, N. und Los, D.A.** (2005) Osmotic shrinkage of cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803 by water efflux via aquaporins regulates osmotic stress-inducible gene expression. *Microbiology* **151**: 447–455.
- Sharp, P.M. und Li, W.H.** (1987) The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res* **15**: 1281–1295.
- Sharp, P.M., Tuohy, T.M. und Mosurski, K.R.** (1986) Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Res* **14**: 5125–5143.
- Shen, B., Hohmann, S., Jensen, R.G. und Bohnert, H.J.** (1999) Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. *Plant Physiol* **121**: 45–52.
- Singh, S.M. und Panda, A.K.** (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience -and Bioengineering* **99**: 303–310.

- Sommer, U.** (1998) *Biologische Meereskunde*. Heidelberg. Springer-Verlag.
- Spanheimer, R. und Müller, V.** (2008) The molecular basis of salt adaptation in *Methanosarcina mazei* Gö1. *Arch Microbiol* **190**: 271–279.
- Stal, L. und Reed, R.** (1987). Low-molecular mass carbohydrate accumulation in cyanobacteria from a marine microbial mat in response to salt **45**: 305–312.
- Stedman, K.M., She, Q., Phan, H., Holz, I., Singh, H., Prangishvili, D., Garrett, R. und Zillig, W.** (2000) pING family of conjugative plasmids from the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus*: insights into recombination and conjugation in Crenarchaeota. *J Bacteriol* **182**: 7014–7020.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. und Kumar, S.** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596–1599.
- Tibbot, B.K., Wong, D.W.S. und Robertson, G.H.** (2002). Studies on the C-terminal region of barley  $\alpha$ -amylase 1 with emphasis on raw starch-binding. *Biologia* **11**: 229-238.
- Timasheff, S.N.** (1998) In disperse solution, "osmotic stress" is a restricted case of preferential interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** **13**: 7363–7367.
- Triadó-Margarit, X., Vila, X. und Galinski, E.** (2011) Accumulation of N( $\epsilon$ )acetyl- $\beta$ -Lysine as an osmoadaptive strategy under salt stress conditions in Green Sulfur Bacteria and *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* **70**: 159–167.
- van der Cammen, A., Francois, J. und Hers, H.G.** (1989) Characterization of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem* **182**: 613–620.
- van der Heide, T. und Poolman, B.** (2000) Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7102–7106.
- Ventosa, A., Nieto, J.J. und Oren, A.** (1998) Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 504–544.
- Viola, R., Nyvall, P. und Pedersen, M.** (2001) The unique features of starch metabolism in red algae. *Proc Biol Sci* **268**: 1417–1422.
- Wang, W., Kim, R., Jancarik, J., Yokota, H. und Kim, S.H.** (2001) Crystal structure of phosphoserine phosphatase from *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile, at 1.8 Å resolution. *Structure* **9**: 65–71.
- Wang, W., Cho, H.S., Kim, R., Jancarik, J., Yokota, H., Nguyen, H.H., Grigoriev, I.V., Wemmer, D.E. und Kim, S.-H.** (2002) Structural characterization of the reaction pathway in phosphoserine phosphatase: crystallographic "snapshots" of intermediate states. *J Mol Biol* **319**: 421–431.
- Wannet, W.J.B., Huub, J.M., Op den Camp, Wisselink, H.W., van der Drift, C., van Griensven, J.L.D. und Vogels, G.D.** (1998) Purification and characterization of trehalose phosphorylase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Biochim Biophys Acta* **1425**: 177–188.
- Welsh, D.T. und Herbert, R.** (1993). Identification of organic solutes accumulated in purple and green sulfur bacteria during osmotic stress using natural abundance  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *FEMS Microbiol Ecol* **13**: 145-150.
- Welsh, D.T.** (2000) Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol. Rev* **24**: 263–290.

- Welsh, D.T., Lindsay, Y.E., Caumette, P., Herbert, R.A. und Hannan, J.** (1996) Identification of trehalose and glycine betaine as compatible solutes in the moderately halophilic sulfate reducing bacterium *Desulfovibrio halophilus*. *FEMS Microbiol Lett* **140**: 203-207.
- Wickberg, W.** (1958) Synthesis of 1- glyceritol D-galactopyranosides. *Anal. Biochem* **12**: 1187–1201.
- Wilharm, G.** (2008) Horizontaler Gentransfer. DNA-Austausch über Artgrenzen hinweg. *Biol unserer Zeit* **38**: 294–303.
- Wittig, R. und Streit, B.** (2004) Ökologie. Eugen Ulmer Verlag. Stuttgart.
- Wolf, A., Krämer, R. und Morbach, S.** (2003) Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress. *Mol Microbiol* **49**: 1119–1134.
- Wood, J.M.** (1999) Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* **63**: 230–262.
- Wrabl, J.O. und Grishin, N.V.** (2001) Homology between O-linked GlcNAc transferases and proteins of the glycogen phosphorylase superfamily. *J Mol Biol* **314**: 365–374.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. und Somero, G.N.** (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214–1222.
- Yancey, P.H.** (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol* **208**: 2819–2830.
- Yancey, P.H., Blake, W.R. und Conley, J.** (2002) Unusual organic osmolytes in deep-sea animals: adaptations to hydrostatic pressure and other perturbants. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **133**: 667–676.
- Yin, M., Palmer, H.R., Fyfe-Johnson, A.L., Bedford, J.J., Smith, R.A. und Yancey, P.H.** (2000) Hypotaurine, N-methyltaurine, taurine, and glycine betaine as dominant osmolytes of vestimentiferan tubeworms from hydrothermal vents and cold seeps. *Physiol Biochem Zool* **73**: 629–637.
- Yoshimura, E., Nagasaka, S., Yoshiyuki, S., Satake, K. und Mori, S.** (1999) Extraordinary High Aluminium Tolerance of the Acidophilic Thermophilic Alga, *Cyanidium caldarium*. *Soil Sci. Plant Nutr.* **45**: 721-724.
- Zaneveld, J.R., Nemergut, D.R. und Knight, R.** (2008) Are all horizontal gene transfers created equal? Prospects for mechanism-based studies of HGT patterns. *Microbiology* **154**: 1–15.
- Zehr, J.P., Bench, S.R., Mondragon, E.A., McCarren, J. und DeLong, E.F.** (2007) Low genomic diversity in tropical oceanic N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 17807–17812.

## 7 Anhang

**Tabelle A1: Verwendete Klonierungsstämme von *Escherichia coli***

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5α™	F <sup>-</sup> <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i>	Invitrogen
XL1 blue	Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), λ- <i>endA1 gyrA96(nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'</i> [::Tn10 <i>proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15] hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> )	Stratagene
TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> λ <sup>-</sup>	Invitrogen

**Tabelle A2: Verwendete Expressionsstämme von *Escherichia coli***

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7</i> <i>gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ])	Invitrogen
TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> λ <sup>-</sup>	Invitrogen
LMG194	F <sup>-</sup> Δ <i>lacX74 galE thi rpsL ΔphoA</i> (Pvu II) Δ <i>ara714 leu::Tn10</i>	Invitrogen
Lemo21(DE3)	<i>fhuA2</i> [lon] <i>ompT gal</i> (λ DE3) [ <i>dcm</i> ] Δ <i>hsdS</i> / pLemo(Cam <sup>R</sup> ) λ DE3 = λ sBamHlo ΔEcoRI-B <i>int::(lacI::PlacUV5::T7</i> <i>gene1) i21 Δnin5</i> pLemo = pACYC184- <i>PrhaBAD-lysY</i>	NEB
Arctic	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm+</i> Tetr <i>gal</i> /λ(DE3) <i>endA</i>	Agilent
Express(DE3)	Hte [cpn10cpn60Gentr], pLysS, Cm <sup>R</sup>	Technologies

**Tabelle A3: Verwendete Hefestämme von *Pichia pastoris***

Stamm	Genotyp	Phänotyp	Referenz
X-33	Wildtyp	Mut <sup>+</sup>	Invitrogen
KM71H	<i>arg4 aox1::ARG4</i>	Mut <sup>S</sup> , Arg <sup>+</sup>	Invitrogen
GS115/Albumin	<i>HIS4</i>	Mut <sup>S</sup>	Invitrogen
GS115/pPICZ/lacZ	<i>his4</i>	His <sup>-</sup> , Mut <sup>+</sup>	Invitrogen

Tabelle A4: Verwendete Stämme von *Synechocystis* PCC6803

Stamm	Genotyp	Phänotyp	Referenz
<i>Synechocystis</i> PCC6803	Wildtyp	-	Ripka <i>et al.</i> , 1979
$\Delta ggpS::Sm$	$\Delta ggpS::Sm$	Salzsensitiv	Marin <i>et al.</i> , 1998

Tabelle A5: Verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Fusionspartner	Position des Fusionspartners	Expressionsort	Referenz
pASK-IBA6	Amp	StreptII	N-Terminus	Periplasma	IBA
pASK-IBA7+	Amp	StreptII	N-Terminus	Cytoplasma	IBA
pASK-IBA43+	Amp	StreptII/His6	C-/ N-Terminus	Cytoplasma	IBA
pBAD/ HIS A	Amp	His6	N-Terminus	Cytoplasma	Invitrogen
pET28a	Km	His6	N-Terminus	Cytoplasma	Novagen
pGEM-T	Amp	-	-	-	Promega
pIGA-mcs	Amp/Km	-	-	Cytoplasma	S. Klähn, (unveröffentlicht)
pNL23	Amp	His6	N-Terminus	-	N. Linka, (unveröffentlicht)
pMAL-c5x	Amp	MBP	N-Terminus	Cytoplasma	NEB
pPICZ $\alpha$ A	Zeo	His6	C-Terminus	extrazellulär	Invitrogen

Tabelle A6: Verwendete Chaperon Plasmide

Nr.	Plasmid	Chaperone	Promoter	Induktor	Resistenz Marker	Referenz
1	pG-KJE8	dnaK-dnaJ-grpE groES-groEL	<i>araB Pzt-1</i>	L-Arabinose Tetrazyklin	Cm	Nishihara <i>et al.</i> (1998, 2000)
2	pGRO7	groES-groEL	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm	Nishihara <i>et al.</i> (1998)
3	pKJE7	dnaK-dnaJ-grpE	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm	Nishihara <i>et al.</i> (1998)
4	pG-Tf2	groES-groEL-tig	<i>Pzt-1</i>	Tetrazyklin	Cm	Nishihara <i>et al.</i> (2000)
5	pTf16	tig	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm	Nishihara <i>et al.</i> (2000)

Tabelle A7: Verwendete Oligonukleotide für Sequenzierungen

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bindungsstelle [Bp]*
<b><u>Allgemeine Oligonukleotide</u></b>		
pUC-fw	GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	-
pUC-rew	AGCGGATAACAATTTTCACACAGG	-
pBAD_fw	CTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTT	-
pBAD_rev	TCAGACCGCTTCTGCGTTCTGATTTA	-
AOX1_fw	GCAAATGGCATTCTGACATCC	-
AOX1_rev	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	-
RS2_fw	TAGCCGAAGTGTAGGCCCGT	-
aphII_rev	TTGATAATCCTGATATGATA	-
<b><u>Spezielle Oligonukleotide</u></b>		
GS10960_1_fw	ACCTGATGGTACTGCCTAGTCAACTG	998-1024
GS10960_1_rev	CAGTTGACTAGGCAGTACCATCAGGT	998-1024
GS10960_2_fw	TCACCAAACCTGGGACTGGGTTTTGGTGT	1985-2012
GS10960_2_rev	ACACCAAACCCAGTCCCAGTTTGGTGA	1985-2012
GS26940_1_fw	CTAGTCTGGTCGGTTTCCACAACAT	770-795
GS26940_1_rev	ATAGTTGTGGAAACCGACCAGACTAG	770-795
GS26940_2_fw	AACCGTTAGTCGCTGGTATCAAATTC	1848-1873
GS26940_2_rev	GAATTTGATACCAGCGACTAACGGTT	1848-1873

\*ausgehend von der 1. Base im Startcodon jedes Gens.



Tabelle A8: Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der *Crocospaera watsonii* Konstrukte

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Verwendungszweck
Cro_HE_TPS_fw	GAGCTCATGTCAAAAACATCATTGT	Klonierung der Synthase in
Cro_HE_TPS_rev	AAGCTTCTAAAGTTTATTTTTGACCACTGA	Expressionsvektoren
Cro_HE_P_fw	GAGCTCTTGCAAGAATACCGTAGCTC	Klonierung der Phosphatase in
Cro_HE_P_rev	AAGCTTCTACTGATTAGCTAGGCTCAA	Expressionsvektoren
Cro_pMAL_P_fw	CATATGTTGCAAGAATACCGTAGCTC	Klonierung der Phosphatase in
Cro_pMAL_TpS_fw	CATATGATGTCAAAAACATCATTGT	pMAL-c5x
Ots_prom5'	GGGTACCTAACGGTTGGCTGTTCTTCG	Klonierung des <i>otsAB</i>
Ots_prom3'	GGGTACCCACCCGGTTCTCCTCCTTCT	Promoters aus <i>E.coli</i> in pIGA- mcs
Cro_HE_GH_fw	GAGCTCATGAACGAAGCAAAAGACA	Klonierung der Glycosyl-
Cro_HE_GH_rev	AAGCTTTCAGTAGAAGTTGGGTAAAT	Hydrolase in Expressionsvektoren
Croco_compl.5'	GGGTACCATGTCAAAAACATCATTGT	Komplementationexperimente
Croco_compl.3'	GGAGCTCGGAATTCCTACTGATTAGCT	mit pIGA_mcs

Tabelle A9: Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der *GS10960* und *GS26940* Konstrukte

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Verwendungszweck
GS10960_NdeI_fw	CATATGATGGAGCAGTCCGCCAA	-----
GS10960_rev	CTCGAGTCAGAAGGATTTCTCGAA	Klonierung von <i>GS10960</i> und
GS26940_SacI_fw	GAGCTCCATATGATGGACCTGTGC	<i>GS26940</i> in verschiedene
GS26940_NdeI_fw	CATATGATGGACCTGTGCTGTTTCG	Expressionsvektoren
GS26940_rev	CTCGAGTTAGGACTGATTACCAT	
GS10960_NheI_fw	GCTAGCATGGAGCAGTCCGCCAA	
GS26940_NheI_fw	GCTAGCATGGACCTGTGCTGTTTCG	
GS10960_SacI_fw	GAGCTCATGATGGAGCAGTCCGCCAA	-----
GS10_alpha_fw	GGTACCATGGAGCAGTCCGCC	
GS10_alpha_rev	TCTAGACAGAAGGATTTCTCG	Klonierung <i>GS10960</i> in
GS26_alpha_fw	GGTACCATGGACCTGTGCTG	pPICZαA für die heterologe
GS26_alpha_rev	TCTAGATAGGACTGATTACCA	Expression in <i>Pichia pastoris</i>
GS10_Syn_rev	CTCGAGTCACAGGTCAGCCAG	-----
GS10_Syn_fw	GAGCTCATGCTGCTGATTGTC	Klonierung des Synthesegens
GS10_Syn_NdeI_fw	CATATGATGCTGCTGATTGTC	aus <i>GS10960</i> in
GS10_Syn_BamHI_rev	GGATCCTCACAGGTCAGCCAG	verschiedene
		Expressionsvektoren
GS10_Phos_rev	CTCGAGTCAGAAGGATTTCTC	-----
GS10_Phos_NdeI_fw	CATATGATGGAACGTGCTTCT	Klonierung des
GS10_Phos_fw	GAGCTCATGGAACGTGCTTCT	Phosphatasegens aus
GS10_Phos_BamHI_rev	GGATCCTCAGAAGGATTTCTC	<i>GS10960</i> in verschiedene
		Expressionsvektoren
GS10_PspXI_fw	ACTCGAGTTATGGAGCAGTCC	-----
GS10_XbaI_rev	TCTAGATCAGAAGGATTTCTC	Klonierung von <i>GS10960</i> und
GS26_PspXI_fw	GCTCGAGTTATGGACCTGTGC	<i>GS26940</i> in pNL23 für die <i>in</i>
GS26_XbaI_rev	TCTAGATTAGGACTGATTACC	<i>vitro</i> Translation
GS10960_XbaI_fw	TCTAGAATGATGGAGCAGTCC	-----
GS26940_XbaI_fw	TCTAGAATGGACCTGTGCTGTTTC	Klonierung von <i>GS10960</i> und
GS10960_SacI_rev	GAGCTCTCAGAAGGATTTCTCGAA	<i>GS26940</i> in pIGA_mcs
GS26940_SacI_rev	GAGCTCTTAGGADTGATTACCAT	

Tabelle A10: Verwendete Oligonukleotide für den Nachweis von cDNA aus *GS10960* und *GS26940*

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bindungsstelle [Bp]*
cDNA_26_2_fw	TGGTGAGTGGCAAGCACGTGAGCTGCA	2271-2297
cDNA_10_2_fw	CCGGCAACGGTTGGGTACAAGTCCGTC	2573-2599

\*ausgehend von der 1. Base im Startcodon jedes Gens.

Tabelle A11: Verwendete Oligonukleotide für die *in vitro* Transkription

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Verwendungszweck
pEU3_PCR_fw	CACATACGATTTAGGTGACACTATAGAA	Amplifizierung des Templates für die <i>in vitro</i> Transkription
pEU3_PCR_rev	GATAATCTCATGACCAAATCCCTTA	

**Tabelle A12: Accession Nummern und ORF Namen der Enzyme, die putativ in der Trehalose-Synthese involviert sind.**

Organismen	Accession Nummern /ORF Name		
	OtsA	OtsB	OtsAB
<b>Cyanobakterien</b>			
<i>Crocospaera watsonii</i> WH8501	-	-	ZP_00516247
<b>Bakterien</b>			
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	NP_601825	NP_601827.1	-
<i>Escherichia coli</i> W	ZP_07593804.1	ZP_07593803.1	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> 02_1987	ZP_03417706.1	NP_217889	-
<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar</i> <i>Virchow str.</i> SL491	EDZ01753	EDZ01101	-
<i>Shigella sp.</i> D9	ZP_05431767.1	ZP_08391345.1	-
<i>Acidobacterium capsulatum</i> ATCC 51196	YP_002755982	YP_002755981	-
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-1	-	-	YP_002490901
<b>CFB Gruppe</b>			
<i>Microscilla marina</i> ATCC 23134	-	-	ZP_01694364.1
<i>Algoriphagus sp.</i> PR1	-	-	ZP_07722327
<i>Gramella forsetii</i> KT0803	-	-	YP_861082
<i>Mucilaginibacter paludis</i> DSM 18603	-	-	ZP_07746436
<i>Pedobacter saltans</i> DSM 12145	-	-	YP_004275356
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i> ATCC 33861	-	-	ZP_07082803
<i>Leeuwenhoekiella blandensis</i> MED217	-	-	ZP_01060785
<i>Bacteroides sp.</i> 3_1_23	-	-	ZP_07040740
<b>Crenarchaeota</b>			
<i>Anaerobaculum hydrogeniformans</i> ATCC BAA-1850	-	-	ZP_06439121
<i>Methanosaeta thermophila</i> PT	-	-	YP_843228
<i>Pyrobaculum islandicum</i> DSM 4184	-	-	YP_930845
<i>Thermoproteus tenax</i>	-	-	CAF18468
<b>Eukaryota</b>			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	-	-	DAA11920
<i>Selaginella Lepidophylla</i>	-	-	AAD00829.1
<i>Nicotiana tabacum</i>	BAI99252.1	BAI99253	-
<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-	NP_173142
<b>Euryarchaeota</b>			
<i>Archaeoglobus profundus</i> DSM 5631	-	-	YP_003401312
<i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1	-	-	YP_001048121

**Tabelle A13: Accession Nummern und ORF Namen der Enzyme, die putativ in der Trehalose bzw. in der Floridosid-/Isofloridosid-Synthese involviert sind.**

<b>Organismen</b>	<b>Accession Nummern /ORF Name</b>
<b>Cyanobakterien</b>	
<i>Crocospaera watsonii</i> WH8501	ZP_00516247
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	YP_001803806
<i>Arthrospira platensis</i> str. Paraca	ZP_06380107
<i>Acaryochloris</i> sp. CCME 5410	ZP_09250227
<i>Microcoleus chthonoplastes</i> PCC 7420	ZP_05025446
<b>Bakterien</b>	
<i>Escherichia coli</i> W	ZP_07593804.1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> 02_1987	ZP_03417706.1
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Virchow</i> str. SL491	EDZ01753
<i>Shigella</i> sp. D9	ZP_05431767.1
<b>CFB Gruppe &amp; Archaea</b>	
<i>Microscilla marina</i> ATCC 23134	ZP_01694364.1
<i>Flovobacteriales bladensis</i> HTCC 2170	YP_003863652.1
<i>Gramella forsetii</i> KT0803	YP_861082
<i>Mucilaginibacter paludis</i> DSM 18603	ZP_07746436
<i>Pedobacter saltans</i> DSM 12145	YP_004275356
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i> ATCC 33861	ZP_07082803
<i>Leeuwenhoekiella blandensis</i> MED217	ZP_01060785
<b>Eukarya (Pflanzen, Rot-, Braun- &amp; Grünalgen)</b>	
<i>Selaginella Lepidophylla</i>	AAD00829.1
<i>Nicotiana tabacum</i>	BAI99252.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_173142
<i>Cyanidioschyzon merolae</i> (CM2362)	CMO053C
<i>Cyanidioschyzon merolae</i> (CM3596)	CMI293C
<i>Galdieria sulphuraria</i> (GS10960)	-
<i>Galdieria sulphuraria</i> (GS26940)	-
<i>Galdieria sulphuraria</i> (GS01890)	-
<i>Sargassum henslowianum</i>	ADB19856.1
<i>Pyropia yezoensis</i>	AAW27916.1
<i>Undaria pinnatifida</i>	ADB19855.1
<i>Ulva pertusa</i>	ABG75731.1
<i>Porphyra haitanensis</i>	ABG75728.1

## 8 Danksagung

Prof. Dr. Hermann Bauwe danke ich für die Möglichkeit der Bearbeitung und Durchführung der Promotion in den Laboren der Abteilung Pflanzenphysiologie.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Hagemann für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung. Seine vielen Anregungen, seine Offenheit für Fragen und Probleme, aber auch sein Optimismus in allen Phasen haben die Entwicklung meiner Arbeit entscheidend beeinflusst.

Für die vielfältige Unterstützung, insbesondere während meiner Einarbeitung im Labor danke ich Dr. Stephan Klähn, Fred Möke, Doreen Schwarz und Claudia Hackenberg. Ein besonderes Dankeschön richtet sich an Manja Henneberg und Klaudia Michl für die Durchführung der GC- und HPLC-Analysen. Aber auch der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für das angenehme Arbeitsklima und die hervorragende Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Laboralltag danken.

Prof. Dr. Lucas Stal und Justine Compaoré dank ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit an dem *Crocospaera watsonii* Projekt.

Für den Fortgang meiner Arbeit möchte ich mich zum einen bei Dr. Wolfgang Ruth für die Hilfestellung bei der Durchführung der GC-MS-Analysen bedanken. Zum andern richtet sich aber auch ein Dankeschön an Prof. Dr. Andreas Weber, der mir die Möglichkeit bot, in den Laboren seiner Arbeitsgruppe Biochemie der Pflanzen an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf, Experimente zur *in vitro* Translation durchzuführen. In diesem Zusammenhang möchte ich mich besonders bei Dr. Nicole Linka und Lisa Lesson für die praktische Unterstützung in Düsseldorf bedanken.

Besonders dankbar bin ich meinen Eltern, für die fortwährende Unterstützung und Motivation in allen Lebenslagen. Ihr habt mir die Kraft gegeben auf sich selbst zu Vertrauen und motiviert mit Mut und Entschlossenheit meinen Weg zu gehen.

## 9 Erklärung

gemäß § 4 der Promotionsordnung  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock, den 24. September 2012

Nadin Pade

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Nadin Pade  
Geburtsdatum: 20. Februar 1985  
Geburtsort: Eisenhüttenstadt  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

1991 – 1997 Grundschule 4, An der Schleuse 3, Eisenhüttenstadt  
1997 – 2004 Fürstenberger Gymnasium, Fürstenberger Str. 13, Eisenhüttenstadt  
Abschluss: Abitur (Note 1,6)

### Hochschulstudium

10/2004 – 6/2009 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main  
mit den Schwerpunktfächern Mikrobiologie, Biochemie und Genetik  
  
8/2008 – 6/2009 Diplomarbeit am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Johann Wolfgang Universität in Frankfurt am Main  
Abteilung Molekulare Mikrobiologie & Bioenergetik  
„Die Stressantwort in *Halobacillus halophilus*: Untersuchungen zur Respiration, Zusammensetzung und Regulation der Atmungskette“  
Abschluss: Diplom (Note: 1,3)

### Dissertation

seit 2/2010 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Rostock  
Abteilung für Pflanzenphysiologie

### Forschungsaufenthalte & Praktika

10/2009 Praktikum im Internationalen Laboratorium für Biotechnologie und Consulting in Potsdam  
  
27.07.2012 – 01.08.2012 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Biochemie der Pflanzen  
Analysen zur Expression von Proteinen aus *Galdieria sulphuraria* mittels *in vitro* Translation

Rostock, den 24. September 2012



## 11 Publikationen & Tagungsbeiträge

**Pade, N., Compaoré, J., Klähn, S., Stal, L.J. und Hagemann, M.** (2012) The marine cyanobacterium *Crocosphaera watsonii* WH8501 synthesizes the compatible solute trehalose by a laterally acquired OtsAB fusion protein. *Environ Microbiol*, **14**: 1261-1271.

**Pade, N. und Hagemann, M.** (2012) Cyanobacterial Salt Stress Acclimation: genetic manipulation and regulation. In *Stress biology of cyanobacteria: molecular mechanisms to cellular responses*. Srivastava, A.K., Rai, A.N. und Neilan, B.A. (Eds). CRC Press/ Taylor and Francis

### **Workshop on Adaptation of microorganism to osmotic challenges 2010**

Trehalose accumulation in the N<sub>2</sub>-fixing unicellular cyanobacterium *Crocosphaera watsonii*.

### **8th European Workshop on Molecular Biology of Cyanobacteria 2011**

Nadin Pade, Justine Compaore, Stephan Klähn, Lucas J. Stal, Martin Hagemann

The marine cyanobacterium *Crocosphaera watsonii* WH8501 synthesizes the compatible solute trehalose by a laterally acquired OtsAB fusion protein

(Poster präsentierende Person ist unterstrichen)