

**Untersuchungen zur Polyaminbiosynthese bei Diatomeen:  
Charakterisierung einer Thermosperminsynthase aus der  
Diatomee *Thalassiosira pseudonana***

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES  
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT III – BIOLOGIE UND  
VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON  
PIERO RÖMER  
AUS CHEMNITZ

April 2008

Promotionsgesuch eingereicht am: 16.01.2008

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. M. Sumper

Prüfungsausschuss:

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. H. Tschochner

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Sumper
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Sternner
3. Prüfer: Prof. Dr. M. Thomm

Kolloquium am 05. März 2008

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

**Knott JM, Römer P, Sumper M**

FEBS Letters, Volume 581, Issue 16, 26 June 2007, Pages 3081-3086

Putative spermine synthases from *Thalassiosira pseudonana* and *Arabidopsis thaliana* synthesize thermospermine rather than spermine

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAPF	Butanol-Essigsäure-Pyridin-Formaldehyd
BAPW	Butanol-Essigsäure-Pyridin-Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
cpm	counts per minute
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
dTTP	Deoxythymintriphosphat
dGTP	Deoxyguanintriphosphat
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
dcSAM	decarboxyliertes S-Adenosylmethionin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	<i>decays per minute</i>
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FPLC	<i>Fast Protein, peptide and polynucleotide liquide chromatography</i>
GC-MS	Gaschromatograph-Massenspektrometer
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria-Broth</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of flight-Massenspektrometer</i>
min	Minute

mRNA	Boten-RNA
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen
NAPDH <sub>2</sub>	reduzierte Form von $\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-Polymerasenkettenreaktion
RACE	Schnelle Amplifizierung von cDNA-Enden
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	Einzelsträngig
SOC	Derivat von "Super optimal broth"-Medium
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit, Maß für Enzymmenge
UTR	Nicht translatierte Region
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid
ÜK	Übernachtkultur

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Die Diatomeen und ihre Bedeutung</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1.</b>	<b>Allgemeines</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2.</b>	<b>Morphologie und Einteilung</b>	<b>2</b>
<b>1.1.3.</b>	<b>Vermehrungszyklus</b>	<b>2</b>
<b>1.1.4.</b>	<b>Allgemeine Bedeutung der Diatomeen</b>	<b>3</b>
<b>1.2.</b>	<b>Die Biomineralisierung bei Diatomeen</b>	<b>4</b>
<b>1.2.1.</b>	<b>Allgemeine Begriffserklärung</b>	<b>4</b>
<b>1.2.2.</b>	<b>Ein Überblick über die Silaffine von <i>Cylindrotheca fusiformis</i></b>	<b>4</b>
<b>1.2.3.</b>	<b>Die langkettigen Polyamine und ihre Bedeutung nach dem Phasentrennungsmodell von SUMPER (2002)</b>	<b>7</b>
<b>1.3.</b>	<b>Ein Überblick über die Bedeutung von Polyaminen und deren Synthese</b>	<b>8</b>
<b>1.3.1.</b>	<b>Allgemeine Bedeutung der Polyamine</b>	<b>8</b>
<b>1.3.2.</b>	<b>Die Synthese von Polyaminen</b>	<b>9</b>
<b>1.3.3.</b>	<b>Die N-Aminopropyltransferasen</b>	<b>11</b>
<b>1.3.4.</b>	<b>Die Struktur einer Spermidinsynthase nach KOROLEV et al. (2002)</b>	<b>13</b>
<b>1.4.</b>	<b>Zielstellung dieser Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	<b>16</b>
<b>2.1.</b>	<b>Material</b>	<b>16</b>
<b>2.1.1.</b>	<b>Antibiotika</b>	<b>16</b>
<b>2.1.2.</b>	<b>Medien</b>	<b>16</b>
<b>2.1.3.</b>	<b>Organismen</b>	<b>19</b>
<b>2.1.4.</b>	<b>Vektoren</b>	<b>20</b>
<b>2.1.5.</b>	<b>Selbsthergestellte Lösungen und Puffer</b>	<b>23</b>
<b>2.1.6.</b>	<b>Verwendete Enzyme, Kits und Hilfsmittel für die Molekularbiologie</b>	<b>29</b>
<b>2.1.7.</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>31</b>
<b>2.1.8.</b>	<b>Oligonukleotide</b>	<b>32</b>
<b>2.1.9.</b>	<b>Geräte</b>	<b>32</b>
<b>2.2.</b>	<b>Allgemeine molekularbiologische Methoden</b>	<b>33</b>
<b>2.2.1.</b>	<b>Aufreinigung von Gesamt-RNA</b>	<b>33</b>

<b>2.2.2.</b>	<b>Isolierung von mRNA</b>	<b>33</b>
<b>2.2.3.</b>	<b>Aufreinigung von genomischer DNA</b>	<b>34</b>
<b>2.2.4.</b>	<b>Reverse Transkription</b>	<b>34</b>
<b>2.2.5.</b>	<b>Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Minipräparation)</b>	<b>35</b>
<b>2.2.6.</b>	<b>Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen</b>	<b>35</b>
<b>2.2.7.</b>	<b>Dephosphorylierung von linearer DNA</b>	<b>35</b>
<b>2.2.8.</b>	<b>Ligation von DNA-Fragmenten</b>	<b>35</b>
<b>2.2.9.</b>	<b>Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</b>	<b>36</b>
<b>2.2.10.</b>	<b>Phosphorylierung von 5'-DNA-Enden</b>	<b>36</b>
<b>2.2.11.</b>	<b>Agarosegelektrophorese</b>	<b>36</b>
<b>2.2.12.</b>	<b>Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäurelösungen</b>	<b>37</b>
<b>2.2.13.</b>	<b>Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>-Zellen</b>	<b>37</b>
<b>2.2.14.</b>	<b>Transformation kompetenter <i>E. coli</i>-Zellen</b>	<b>38</b>
<b>2.2.15.</b>	<b>Amplifikation von DNA-Fragmenten</b>	<b>38</b>
<b>2.2.16.</b>	<b>RACE-PCR</b>	<b>38</b>
<b>2.2.16.1.</b>	<b>Die 3'-RACE-PCR der Sequenz <i>TPS_41289</i></b>	<b>39</b>
<b>2.2.16.2.</b>	<b>Die 5'-RACE-PCR der Sequenz <i>TPS_41289</i></b>	<b>39</b>
<b>2.2.17.</b>	<b>Zielgerichtete Mutagenese durch Überhangverlängerung</b>	<b>40</b>
<b>2.2.18.</b>	<b>DNA-Sequenzierung</b>	<b>41</b>
<b>2.3.</b>	<b>Transformation der <i>TPS_41289</i>-Sequenz in <i>T. pseudonana</i></b>	<b>41</b>
<b>2.3.1.</b>	<b>Transformation von <i>T. pseudonana</i> mittels Biolistik</b>	<b>41</b>
<b>2.3.2.</b>	<b>DNA-Beschichtung der Wolfram-Partikel</b>	<b>42</b>
<b>2.3.3.</b>	<b>Aufbau für die Biolistik-Transformation</b>	<b>42</b>
<b>2.3.4.</b>	<b>Vorbereitung und Nachbehandlung der <i>T.pseudonana</i>-Zellen</b>	<b>43</b>
<b>2.3.5.</b>	<b>Induktion und Schnellnachweis der TpNR-Expressionskassette in der cDNA bzw. DNA von <i>T. pseudonana</i></b>	<b>44</b>
<b>2.3.6.</b>	<b>Southern-Blot</b>	<b>44</b>
<b>2.3.7.</b>	<b>Anfärbung der Nylonmembran</b>	<b>45</b>
<b>2.3.8.</b>	<b>Herstellung einer <math>^{35}\text{S}</math>-markierten DNA-Sonde</b>	<b>45</b>
<b>2.3.9.</b>	<b>Radioaktivitätsmessung</b>	<b>45</b>
<b>2.3.10.</b>	<b>DNA-DNA-Hybridisierung mit <math>^{35}\text{S}</math>-markierter DNA-Sonde</b>	<b>46</b>
<b>2.4.</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>46</b>
<b>2.4.1.</b>	<b>Herstellung von decarboxyliertem S-Adenosylmethionin</b>	<b>46</b>

<b>2.4.2.</b>	<b>SDS- und Native Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE bzw. Native PAGE)</b>	<b>47</b>
<b>2.4.3.</b>	<b>Elektrophoretischer Proteintransfer auf eine PVDF-Membran</b>	<b>48</b>
<b>2.4.4.</b>	<b>Gelfiltration an Superose 6</b>	<b>48</b>
<b>2.4.5.</b>	<b>Proteinbestimmung von löslichem Protein nach Bradford</b>	<b>49</b>
<b>2.4.6.</b>	<b>Gewinnung von zellfreien Rohextrakt aus Diatomeenzellen</b>	<b>49</b>
<b>2.4.7.</b>	<b>Gewinnung und Isolierung rekombinant exprimierter 6xHis-Tag-Proteine</b>	<b>49</b>
<b>2.4.8.</b>	<b>Miniverfahren</b>	<b>50</b>
<b>2.4.9.</b>	<b>Großverfahren</b>	<b>50</b>
<b>2.4.10.</b>	<b>Umpufferung, Diafiltration und Aufkonzentrierung von Protein</b>	<b>50</b>
<b>2.4.11.</b>	<b>N-Aminopropyltransferasetest</b>	<b>51</b>
<b>2.4.12.</b>	<b>Aufreinigung <sup>14</sup>C-markierter Polyamine aus dem Enzymansatz</b>	<b>51</b>
<b>2.4.13.</b>	<b>Dünnschichtchromatographie zur Identifizierung <sup>14</sup>C-markierter Polyamine</b>	<b>51</b>
<b>2.4.14.</b>	<b>Isolierung von Polyaminen aus Zellextrakt von <i>T. pseudonana</i></b>	<b>52</b>
<b>2.4.15.</b>	<b>Perethylierung von Polyaminproben aus <i>T. pseudonana</i></b>	<b>53</b>
<b>3.</b>	<b><u>Experimente und Ergebnisse</u></b>	<b>54</b>
<b>3.1.</b>	<b>Identifikation zweier N-Aminopropyltransferasesequenzen aus dem Genom von <i>T.pseudonana</i></b>	<b>54</b>
<b>3.1.1.</b>	<b>Datenbankanalyse</b>	<b>54</b>
<b>3.1.2.</b>	<b>Transkriptionsanalyse der putativen N-Aminopropyltransferasen durch RT-PCR</b>	<b>55</b>
<b>3.1.3.</b>	<b>Multiples Alignment der putativen N-Aminopropyltransferasen mit bekannten Spermidin- und Sperminsynthasen auf Proteinebene</b>	<b>56</b>
<b>3.1.4.</b>	<b>Aminosäuresequenzanalyse von TPS_108361 und TPS_41289</b>	<b>58</b>
<b>3.2.</b>	<b>Klonierung und heterologe Genexpression von TPS_108361 und TPS_41289</b>	<b>61</b>
<b>3.2.1.</b>	<b>Klonierung von TPS_41289 in pET-20b</b>	<b>61</b>
<b>3.2.2.</b>	<b>Heterologe Überexpression von TPS_41289</b>	<b>62</b>
<b>3.2.3.</b>	<b>Klonierung von TPS_108361 in pQE-30 UA</b>	<b>63</b>
<b>3.2.4.</b>	<b>Heterologe Überexpression von TPS_108361</b>	<b>65</b>

<b>3.3.</b>	<b>Nachweis der N-Aminopropyltransferaseaktivität bei TPS_108361 und TPS_41289</b>	<b>66</b>
<b>3.3.1.</b>	<b>Nachweis der Enzymaktivität bei TPS_108361</b>	<b>66</b>
<b>3.3.2.</b>	<b>Nachweis der Enzymaktivität bei TPS_41289</b>	<b>66</b>
<b>3.4.</b>	<b>Proteinbiochemische Charakterisierung von TPS_41289</b>	<b>67</b>
<b>3.4.1.</b>	<b>Ergebnis der N-terminalen Ansequenzierung vom rekombinanten TPS_41289</b>	<b>68</b>
<b>3.4.2.</b>	<b>Molekulargewichtsbestimmung von TPS_41289</b>	<b>68</b>
<b>3.4.2.1.</b>	<b>Molekulargewichtsbestimmung durch denaturierende PAGE</b>	<b>68</b>
<b>3.4.2.2.</b>	<b>Molekulargewichtsbestimmung durch Native PAGE</b>	<b>69</b>
<b>3.4.2.3.</b>	<b>Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration</b>	<b>70</b>
<b>3.4.3.</b>	<b>Bestimmung von inter- bzw. intramolekularen Disulfidbrücken</b>	<b>71</b>
<b>3.4.4.</b>	<b>Optimierung der Enzymaktivität bezüglich Temperatur und pH</b>	<b>72</b>
<b>3.4.5.</b>	<b>K<sub>M</sub>-Bestimmung von dcSAM und Spermidin</b>	<b>73</b>
<b>3.4.6.</b>	<b>Basenaustauschexperiment mit TPS_41289</b>	<b>76</b>
<b>3.5.</b>	<b>Unterscheidung der ACL5-Gruppe von der SPDS/SPMS-Gruppe bezüglich der Produktbildung</b>	<b>77</b>
<b>3.6.</b>	<b>Transformationsexperiment von TPS_41289 in <i>T. pseudonana</i> mit anschließender Polyaminanalyse transformierter <i>T. pseudonana</i>-Zellen</b>	<b>79</b>
<b>3.6.1.</b>	<b>Nachweis des Transformationserfolges auf Nukleinsäureebene</b>	<b>80</b>
<b>3.6.2.</b>	<b>Nachweis der TPS_41289-Überexpression durch Enzymtest im Rohextrakt</b>	<b>82</b>
<b>3.6.3.</b>	<b>Vergleichende Polyaminanalyse zwischen Wildtyp und Transformante von <i>T.pseudonana</i></b>	<b>84</b>
<b>3.7.</b>	<b>Nachweis einer Thermospermminsynthaseaktivität bei verschiedenen Diatomeenarten</b>	<b>87</b>
<b>4.</b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b>89</b>
<b>4.1.</b>	<b>Identifizierung von N-Aminopropyltransferasen in <i>T. pseudonana</i></b>	<b>89</b>
<b>4.2.</b>	<b>Besondere biochemische Merkmale der rekombinanten Thermo-spermminsynthase (TPS_41289)</b>	<b>90</b>
<b>4.3.</b>	<b>ACL5-ähnliche N-Aminopropyltransferasen und SPDS/SPMS-ähnliche N-Aminopropyltransferasen unterscheiden sich bezüglich des Reaktionsproduktes</b>	<b>91</b>

<b>4.4..</b>	<b>SpeE aus <i>T. thermophilus</i> besitzt Thermosperminsynthaseaktivität</b>	<b>91</b>
<b>4.5.</b>	<b>ACL5 aus <i>A. thaliana</i> ist eine Thermosperminsynthase (KNOTT et al., 2007)</b>	<b>92</b>
<b>4.6.</b>	<b>Der Aminosäureaustausch von E156 gegen D156 bei TPS_41289 hatte geringen Einfluß auf die Produktbildung</b>	<b>93</b>
<b>4.7.</b>	<b>Thermospermin ist im cytosolischen Polyaminpool von <i>T. pseudonana</i> nicht nachweisbar</b>	<b>94</b>
<b>4.8.</b>	<b>N-Aminopropyltransferase-Enzymtests mit zellfreien Rohextrakten aus Diatomeen ergaben als Produkte Spermidin, Spermin und Thermospermin</b>	<b>95</b>
<b>4.9.</b>	<b>Ausblick</b>	<b>96</b>
<b>5.</b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b>98</b>
<b>6.</b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	<b>99</b>
	<b>Anhang</b>	<b>109</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>121</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>122</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Die Diatomeen und ihre Bedeutung

#### 1.1.1. Allgemeines

Diatomeen (griechisch: *diatémnein*, deutsch: durchschneiden, spalten) sind eukaryotische, einzellige Algen die im Süßwasser, an marinen Standorten, im Boden und im Oberflächenwasser auf Steinen vorkommen können. Aus fossilen Funden (Sedimentschichten aus Diatomeenschalen) weiß man, dass es Diatomeen seit mindestens 125 Millionen Jahren gibt (FALKOWSKI et al., 2004). Das Hauptmerkmal von Diatomeen ist, dass sie eine Zellwand aus Silikat ( $\text{SiO}_2 \times n\text{H}_2\text{O}$ ) aufweisen. Die Formenvielfalt solcher Diatomeenschalen (Frusteln) entspricht annähernd der Anzahl von Arten, die es in der Klasse der Diatomeen gibt und vermag auch fachfremde Personen aufgrund der filigranen Strukturen und Ästhetik solcher Diatomeenzellwände zu beeindrucken. Es wird vermutet, dass die Frusteln u.a. einen wichtigen Schutz vor Krankheiten, Parasiten und Fraßfeinden bieten.

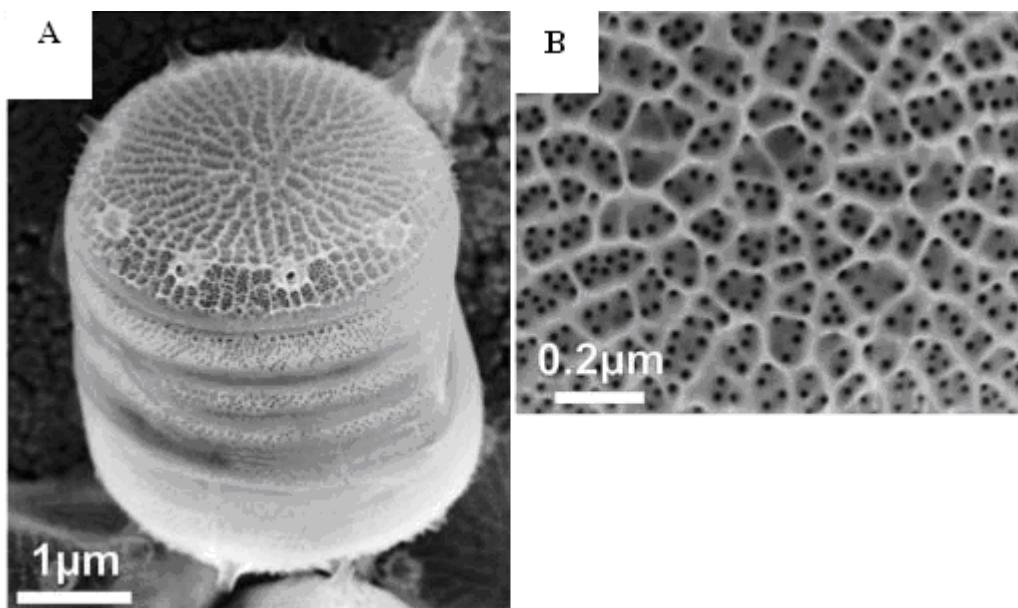


Abb. 1-1: A) Abbildung der Diatomee *Thalassiosira pseudonana* (Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Schale).  
B) Vergrößerte elektronenmikroskopische Darstellung der ornamentierten Schale von (A) .  
(Bildquelle: SUMPER und KRÖGER, 2004)

### **1.1.2. Morphologie und Einteilung**

Der Aufbau der Kieselalge kann folgendermaßen schematisch beschrieben werden: Die Algenzelle besteht aus zwei ineinander gestülpten Schalenhälften, gleichsam einer Petrischale, wobei die größere Hälfte (Epitheka) die kleinere Hälfte (Hypotheca) umfasst. Diese zwei Schalenhälften sind seitlich durch einen Gürtel miteinander verbunden (siehe Abb. 1-2). Die Diatomeen kann man aufgrund ihrer Schalensymmetrie in zwei große Ordnungen unterscheiden: Die Pennales sind bilateralsymmetrisch aufgebaut, die Centrales hingegen radiärsymmetrisch. Die Pennales können zudem in ihrer Valve eine längsverlaufende Raphe (Kanal) aufweisen, das der Fortbewegung dient.

### **1.1.3. Vermehrungszyklus**

Ein weiteres Merkmal ist die Fähigkeit der Diatomeen sich vegetativ zu vermehren, indem sich aus der Mutterzelle zwei neue Tochterzellen bilden. Dabei wird eine Mutterschalenhälfte an die Tochterzelle weitergegeben und eine neue silifizierte Schale, die Hypotheca, durch Biomineralisierung gebildet. Die Bildung der neuen Hypotheca geschieht in einem Zellkompartiment, dem SDV (*Silica deposition vesicle*), das  $\text{Si(OH)}_4$  enthält. Das SDV lagert sich während der Zellteilung an die Position der Zellmembran einer sich teilenden Zelle an, bei der die neue Zellwand gebildet werden soll. Nach Ausbildung der biomineralisierten Schale wird diese durch Exozytose freigesetzt (siehe Abb. 1-2).

Durch fortlaufende vegetative Vermehrung verkleinert sich die Größe der Diatomee bis zu einem absoluten Minimum, worauf die Zelle stirbt. Vor dem Absterben der Zelle besteht jedoch die Möglichkeit der sexuellen Fortpflanzung, wobei die Zellen Gameten bilden und durch Verschmelzung von Samen- und Eizelle neue einzellige Diatomeen gebildet werden können.

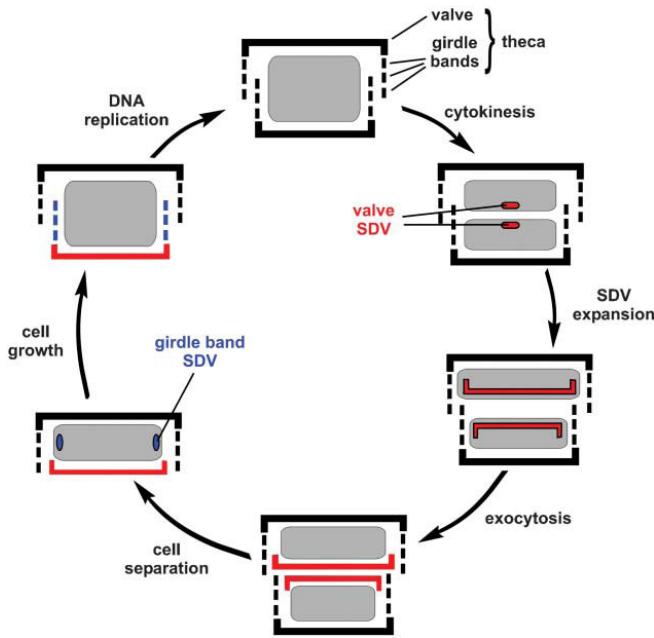


Abb. 1-2: Schematische Darstellung eines Zellzyklus einer Diatomee. Die silifizierte Zellwand wurde schwarz dargestellt, der Protoplast grau, die neugebildete Hypotheka rot hervorgehoben. (Bildquelle: SUMPER und KRÖGER, 2004)

#### 1.1.4. Allgemeine Bedeutung der Diatomeen

Die Kieselalgen sind aus vielerlei Sicht von Bedeutung: In der Limnologie verwendet man Kieselalgen als Indikatororganismen zur Gewässergütebeurteilung (ELORANTA und SOININEN, 2002), ebenso können diese Algen auch bei gerichtsmedizinischen Fällen (z. B. bei der Untersuchung von Wasserleichen) Hinweise geben, da der Nachweis von Diatomeen in den Organen (Lunge, Herz, Niere) als Hinweis für einen Ertrinkungstod gilt (INCZE et al., 1955). Weiterhin machen Diatomeen einen beträchtlichen Anteil des Phytoplanktons aus, das in den Weltmeeren vorkommt. Damit verbunden stellen Sie eine wichtige Funktion bei der photosynthetischen Fixierung von CO<sub>2</sub> dar und damit auch bei der Bildung organischer Verbindungen, die den Anfang der Nahrungskette im Meer ausmachen. Es wird geschätzt, dass die organische Primärproduktion der Diatomeen ca. 40% der gesamten Erde ausmacht (ARMBRUST et al., 2004). Zudem spielen Diatomeen eine wichtige Rolle bei der dauerhaften Bindung von CO<sub>2</sub>, da Diatomeen, die nicht gefressen bzw. bakteriell zersetzt werden, mit der Zeit absterben und auf den Meeresboden der Tiefsee sinken, von wo das in den Diatomeenresten fixierte CO<sub>2</sub> nicht mehr in der Atmosphäre freigesetzt werden kann.

Aus wirtschaftlicher Sicht betrachtet sind die fossilen Reste (Kieselgur) der Diatomeen interessant, das als industrieller Rohstoff dient und Verwendung bei der Herstellung von Dynamit, Zahnpasta, Filter, Insektizide und Reflexionsmaterial findet.

Für die Grundlagenforschung, vor allem in der Biomineralisierungsforschung, bieten sich Kieselalgen als exzellentes Modellorganismus an, aufgrund ihres verhältnismäßig kleinen Genoms, ihrer einfachen Kultivierbarkeit, den kurzen Generationszeiten und ihrer Fähigkeit zu biomineralisieren.

## **1.2. Die Biomineralisierung bei Diatomeen**

### **1.2.1. Allgemeine Begriffserklärung**

Die Fähigkeit eines Organismus anorganische Minerale abzulagern, um beispielsweise Gehäuse oder Skelette zu bilden, ist als Biomineralisierung bekannt. Diese Fähigkeit ist sowohl bei Bakterien (Absonderung von  $\text{CaCO}_3$  bei *Bacillus cereus*), Pflanzen (Bildung von Phytolithen bei monokotylen Pflanzen) und Tieren (Bildung von silikathaltigen Skleriten bei Kieselschwämmen, Knochen- und Zahnbildung etc. bei Vertebraten) zu beobachten.

Die Fähigkeit von Kieselalgen silikathaltige Zellwände zu bilden, die zudem feinste Strukturen (Poren und wabenartige Musterungen) in der Größenordnung von nm bis  $\mu\text{m}$  aufweisen, gaben Anlass dazu, die Mechanismen der Biomineralisierung von Diatomeen zu erforschen, um neue Anwendungen in der Material- und Nanotechnologie zu eröffnen.

### **1.2.2. Ein Überblick über die Silaffine von *Cylindrotheca fusiformis***

Seit den 1990er Jahren wurden von KRÖGER und SUMPER die Zusammensetzung von Diatomeenzellwänden, speziell von *Cylindrotheca fusiformis*, untersucht. Hierbei wurden drei unterschiedliche Klassen von Proteinen ausgemacht, die mit der Zellwand assoziiert sind: Pleuraline, Frustuline und Silaffine.

Bei den Pleuralinen handelt es sich um sehr saure, prolinreiche Proteine, die in den Pleuralbändern vorkommen. Diese Pleuralbänder sind silikathaltige Strukturen, die an den Überlappzonen der Silikathalbschalen vorkommen. Es wird davon ausgegangen, dass diese Pleuraline eine regulatorische Funktion bezüglich des Zusammenhalts beider Halbschalen erfüllen (KRÖGER und WETHERBEE, 2000). Die Frustuline (calciumbindende Glykoproteine) hingegen kommen als äußere zellwandumgebende Proteinschicht auf der Diatomeenschale vor, die über Calciumbrückenbindungen miteinander verbunden sind.

(KRÖGER et al., 1996). Aufbauend auf den Untersuchungen von BIDLE und AZAM (1999) wird davon ausgegangen, dass Frustuline eine Schutzfunktion gegen eine drohende Auflösung der silikathaltigen Zellwand im umgebenden aquatischen Medium haben könnten (KRÖGER, 2001).

Die Silaffine (benannt aufgrund ihrer Affinität zu Kieselsäure) sind, im Gegensatz zu Pleuralinen und Frustulinen, direkt an der Biomineralisierung beteiligt. Diese kurzen Peptide sind in silikathaltigen Zellwänden fest eingeschlossen und konnten weder durch auskochen mit SDS, noch mit EDTA von der Zellwand herausgelöst werden. Erst eine Behandlung mit HF führte zu einer Auflösung des Silikats und zu einer Isolierung der Silaffine. Diese drei unterschiedlich identifizierten Silaffine hatten eine apparetive molekulare Masse zwischen 4 bis 17 kDa und hatten die Fähigkeit *in vitro* in einer phosphatgepufferten Si(OH)<sub>4</sub>-Lösung das Silikat zu präzipitieren, wobei Silikat/Silaffin-haltige Nanokügelchen entstanden, die ein Durchmesser von 500 – 700 nm aufwiesen (KRÖGER et al., 1999). Die Strukturen zweier Silaffine, Sil1-A<sub>1</sub> und Sil1-A<sub>2</sub> von *C. fusiformis*, wurden von KRÖGER et al. (1999 und 2001) genauer untersucht. Dabei wurde herausgefunden, dass die Silaffine Sil1-A<sub>1</sub> bzw. Sil1-A<sub>2</sub> aus 15 bzw. 18 Aminosäuren bestehen. Diese Silaffine besitzen vier Lysine, die posttranslational modifiziert werden. Hierbei wurden Lysinmodifikationen entdeckt, wie z.B. ε-N,N,N,-Trimethyl-δ-hydroxyllysin bei Sil1-A<sub>1</sub>, ε-N,N-Dimethyllysin bei Sil1-A<sub>1</sub> und Sil1-A<sub>2</sub>, sowie Lysine deren ε-Aminogruppe ein langkettiges lineares Polyamin trägt (bei beiden Silaffinen). Das langkettige Polyamin erscheint die geeignete chemische Gruppe zu sein, die die Polykondensation und Präzipitation der Monokieselsäure zu Silikat führt. Aufgrund ihres polymeren und kationischen Charakters kann sie über ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen mit silikathaltigen Molekülen interagieren (KRÖGER et al., 1999).

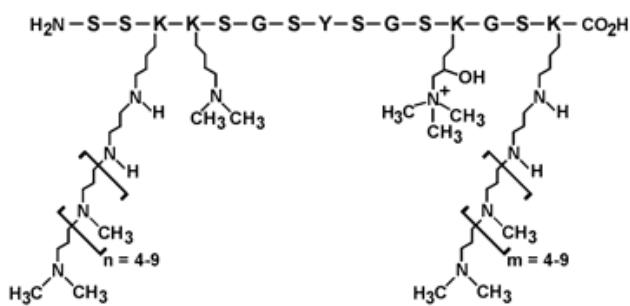
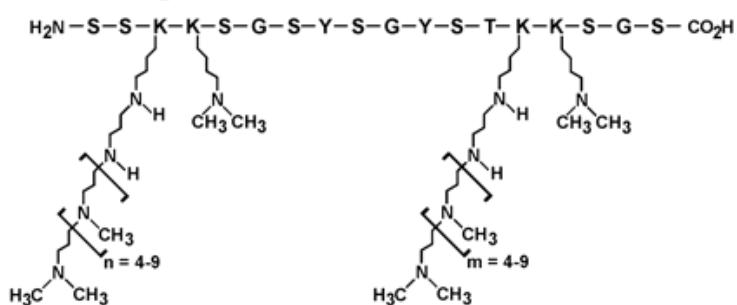
**Silaffin-1A<sub>1</sub>****Silaffin-1A<sub>2</sub>**

Abb. 1-3:

Aufbau der Silaffine – 1A<sub>1</sub> und 1A<sub>2</sub> aus *C. fusiformis*: Die Aminosäuren wurden im Einbuchstabencode angegeben, die Lysinmodifikationen sind in ihrer chemischen Struktur dargestellt.  
(Bildquelle: KRÖGER et al., 2001)

Wie in Abb. 1-3 zu sehen ist, verfügen beide Silaffine über eine Vielzahl von Serinen, die ein potenzielles Ziel für Phosphorylierungen darstellen können. Allerdings wurde vermutet, dass aggressive HF zu einer Abspaltung von posttranslationellen Modifikationen, wie zum Beispiel Phosphatgruppen, geführt hat. In der Tat konnte, nach dem natSil-1A<sub>1</sub> unter schonenden Bedingungen aufgereinigt wurde, festgestellt werden, dass die Serine phosphoryliert waren und dass die Phosphatgruppen (bzw. zugegebene Phosphationen) stimulierend auf die Silikatpräzipitation einwirken. Dabei wird vermutet, dass aufgrund des zwitterionischen Charakters (negative Ladung der Phosphatreste und positive Ladung der Polyaminseitenketten) es zu elektrostatischen Interaktionen kommt, die zur Bildung großer Aggregationen von Silaffinmolekülen führt, die eine Voraussetzung für die Bildung von Biosilikat sind (KRÖGER et al., 2002).

Im Unterschied zu natSil-1A<sub>1</sub> und natSil-1A<sub>2</sub> hatte natSil-2 von *C. fusiformis* keine Befähigung zur Silikatpräzipitationen. Wurden natSil-1A<sub>2</sub> und natSil-2 gemischt, so trat eine Hemmung bei der Silikatpräzipitation auf, worauf die Schlussfolgerung gezogen wurde, dass natSil-2 eine regulatorische Funktion bei der Biomineralisierung haben könnte. Untersuchungen an dem Peptid zeigten, dass natSil-2 ebenso Lysinmodifikationen aufweist, so wie sie für Sil-1A<sub>1</sub>/ Sil-1A<sub>2</sub> beschrieben wurden. Jedoch enthält natSil-2 neben Phosphatgruppen noch weitere Zuckerreste, die sich hemmend auf den

Silikatpräzipitationsprozeß auswirken. Hingegen konnte HF-behandeltes Sil-2, dem die posttranslationellen Modifikationen (Phosphat- und Zuckergruppen) fehlen, in einer phosphatgepufferten  $\text{Si}(\text{OH})_4$ -Lösung Silikat präzipitieren (POULSEN et al., 2003). Weiterhin wurde beobachtet, dass in einem bestimmten Mischungsverhältnis von natSil1/natSil2 ausgefallenes Silikat poröse Strukturen aufweist, wie man sie von elektronenmikroskopischen Nahaufnahmen von Diatomeenschalen kennt.

### **1.2.3. Die langkettigen Polyamine und ihre Bedeutung nach dem Phasentrennungsmodell von SUMPER (2002)**

Eine weitere für die Biomineralisierung wichtige Komponente sind freie langkettige Polyamine, die nicht an Silaffinen kovalent gebunden sind, jedoch genauso Silikatpräzipitationsaktivität zeigen (KRÖGER et al., 2000). Diese Polyamine sind genauso wie die Silaffine in der silifizierten Diatomeenschale eingeschlossen und konnten nur durch HF-Spaltung isoliert werden. Untersuchungen von KRÖGER et al. (2000), SUMPER et al., (2005) und SUMPER und LEHMANN (2006) zeigten, dass die Strukturen der Polyamine bezüglich der Kettenlänge und des Methylierungsgrades, sowie des Gehalts an quaternären N-Atomen artspezifisch ist. Diese Artspezifität der Polyamine könnte auch Grund für die Formen- bzw. Strukturvielfalt der silifizierten Diatomeenschale sein. Durch Inkubation von Silaffinen mit Polyaminen aus *Nitschia angularis* konnte gezeigt werden, dass die Polyamine die Form der entstehenden Silikat-Nanokügelchen beeinflusst (KRÖGER et al., 2000). Weiterhin wurde ein Phasentrennungsmodell von SUMPER (2002) vorgeschlagen, das eine Erklärung abliefern könnte, wie die nanometergroßen Feinstrukturen (z.B. wabenartige Musterungen der Schale von *Coscinodiscus wailesii*) entstehen. Dabei wird vermutet, dass innerhalb des SDV eine engbepackten Anordnung von Polyamintröpfchen besteht, die innerhalb einer wässrigen  $\text{Si}(\text{OH})_4$ -Lösung vorliegen. An den Grenzflächen zwischen der Polyaminlösung und der wässrigen Lösung kommt es zu einer Polymerisierung und Präzipitierung der Monokieselsäure zu Silikat. Auf diese Weise entstehen wabenartige Silikatstrukturen. Noch feinere Silikatstrukturen treten auf, wenn durch fortschreitende Silikatpräzipitierung, die mit einer Abnahme von Polyaminen verbunden ist, die Polyamintröpfchen schrumpfen und es damit zu einer Dispersion eines Tröpfchens zu vielen kleinen Tröpfen kommt, wodurch noch feinere Silikatstrukturen aufgrund der Polymerisierung der Monokieselsäure zu Silikat an den Grenzflächen der Tröpfchen entstehen.

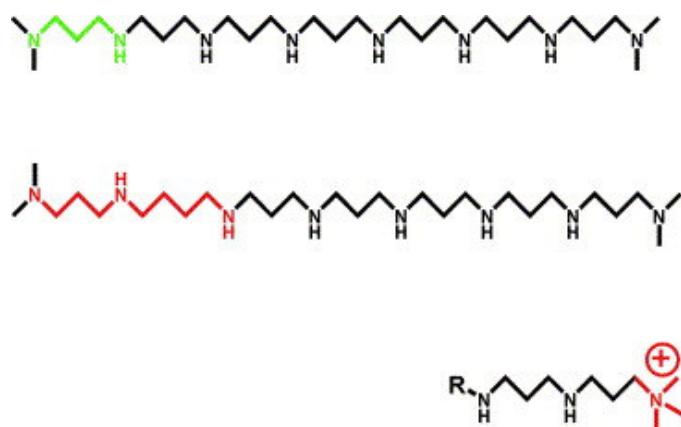


Abb. 1-4: Strukturen von freien langkettigen Polyaminen, die aus der Schale von *T. pseudonana* isoliert und analysiert wurden (SUMPER et al., 2005).

### **1.3. Ein Überblick über die Bedeutung von Polyaminen und deren Synthese**

#### **1.3.1. Allgemeine Bedeutung der Polyamine**

Polyamine sind kationische und amphiphile Moleküle, die ubiquitär bei fast allen Organismen vorhanden sind. Polyamine wurden bei Archaeen (HAMANA et al., 2003), Bakterien (HAMANA et al., 1992), Pflanzen und Pilzen (HAMANA und MATSUZAKI, 1985) und Tieren (HAMANA et al., 2004) nachgewiesen. Die am häufigsten vorkommenden Polyamine sind Putrescin und Spermidin und teilweise Spermin.

Untersuchungen zeigten, dass ein Großteil der Polyamine mit der DNA und RNA assoziiert sind. Bei *E. coli* war Spermidin zu 95% in DNA/RNA-Fraktionen nachgewiesen worden (MIYAMOTO et al., 1993), wobei Untersuchungen von KIRINO et al. (1990), PINGOUD et al. (1984), und RUIZ-HERRERA et al. (1995) darauf hindeuten, dass Polyamine (konzentrationsabhängig) inhibitorisch auf DNA/RNA-Nukleasen und Cytosin-DNA-Methylasen wirken. Weiterhin zeigten *in vitro* Versuche, dass Polyamine bei physiologischen Konzentrationen vor oxdidativen Schäden der DNA schützen (KHAN et al. 1992), sowie bei thermophilen Organismen die DNA vor thermischer Denaturierung bewahren (OSHIMA, 2007). Untersuchungen von CHATTOPADHYAY et al. (2003) zeigten, dass Spermidin ein Vorläufermolekül für die Synthese von Hypusin (Hydroxyputrescylsin) ist, das eine ungewöhnliche Aminosäuremodifikation bei dem eukaryontischen Translations-initiationsfaktor eIF5A ist. In der Tat konnte bei spermidinsynthasedefizienten Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden, dass ohne Zugabe von Spermidin bzw. Spermin im Medium kein Wachstum der Mutantenkultur möglich war (HAMASAKI-KATAGIRI,

1997). Hingegen führte bei Mutanten von *E. coli*, die aufgrund einer Deletion im S-Adenosylmethionin-decarboxylasegen kein Spermidin herstellen konnten, zu keiner signifikanten Störung im Wachstum von diesen Mutanten, wobei der Mangel an Spermidin vermutlich aufgrund des Vorkommens von Putrescin kompensiert werden konnte (XIE et al., 1993). Weiterhin nehmen Polyamine Einfluss auf die Proteinaktivität und Proteinstabilität: So wurde berichtet, dass ein Anstieg der Polyaminkonzentration zu einer Repression der Ornithin-decarboxylaseaktivität führt, während geringe Polyaminkonzentrationen zu einer erhöhten Ornithin-decarboxylaseaktivität führen. Zudem fördern erhöhte Polyaminkonzentrationen die Translation eines Antizyms (AZ), das an Ornithin-decarboxylase (ODC) bindet und den Abbau des AZ/ODC-Komplexes durch das 26S-Proteasom einleitet (WALLACE et al., 2003).

### **1.3.2. Die Synthese von Polyaminen**

Die Polyamine werden ausgehend von den Aminosäuren Arginin und Methionin synthetisiert. Methionin wird mit ATP durch Katalyse von S-Adenosylmethioninsynthase in das Produkt S-Adenosylmethionin umgesetzt und durch S-Adenosylmethionin-decarboxylase in decarboxyliertes S-Adenosylmethionin (dcSAM) umgewandelt. Das dcSAM erfüllt eine Funktion als Aminopropyl-donor bei der Synthese von Polyaminen.

Arginin wird durch Arginase in Ornithin und Harnstoff umgewandelt, wobei Ornithin durch Einsatz von Ornithin-decarboxylase zu Putrescin decarboxyliert wird. In einigen Bakterien und bei *Arabidopsis thaliana*, bei denen es keine Ornithin-decarboxylase gibt, wird Arginin durch eine Arginin-decarboxylase zu Agmatin decarboxyliert und durch eine Agmatinureohydrolase zu Putrescin hydrolysiert. Putrescin und dcSAM wird durch die Katalyse von Spermidinsynthase zu Spermidin und 5'-Methylthioadenosin (MTA) umgesetzt. Spermidin kann mit dcSAM -soweit Sperminsynthase vorhanden ist- zu Spermin und MTA umgesetzt werden (siehe Abb. 1-5/A). Ein Spezialfall bei der Synthese von Polyaminen liegt bei dem thermophilen Bakterium *Thermus thermophilus* vor. Bei diesem Bakterium wurde entdeckt, dass die Synthese von Spermidin nicht über Putrescin läuft. Stattdessen wird Arginin zunächst zu Agmatin decarboxyliert und Agmatin durch eine Agmatin-N-Aminopropyltransferase zu Aminopropylagmatin aminopropyliert. Das Enzym Aminopropylagmatinureohydrolase hydrolysiert dann das Aminopropylagmatin zu Spermidin und Harnstoff (siehe Abb. 1-5/B).

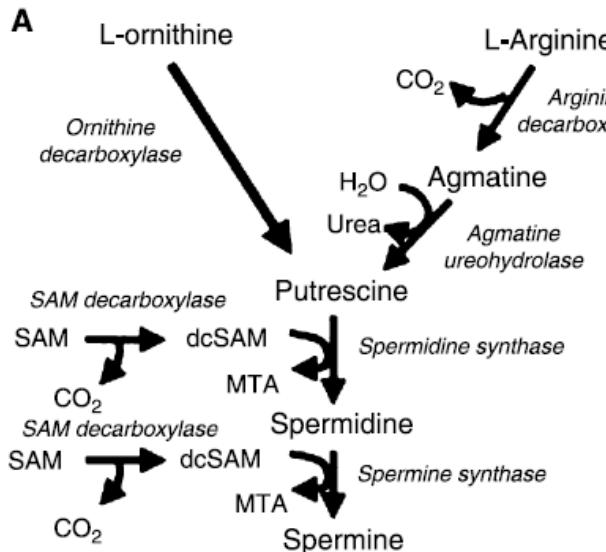


Abb. 1-5/A: Pflanzlicher bzw. bakterieller Polyaminsyntheseweg (Abbildung von OSHIMA, 2007).

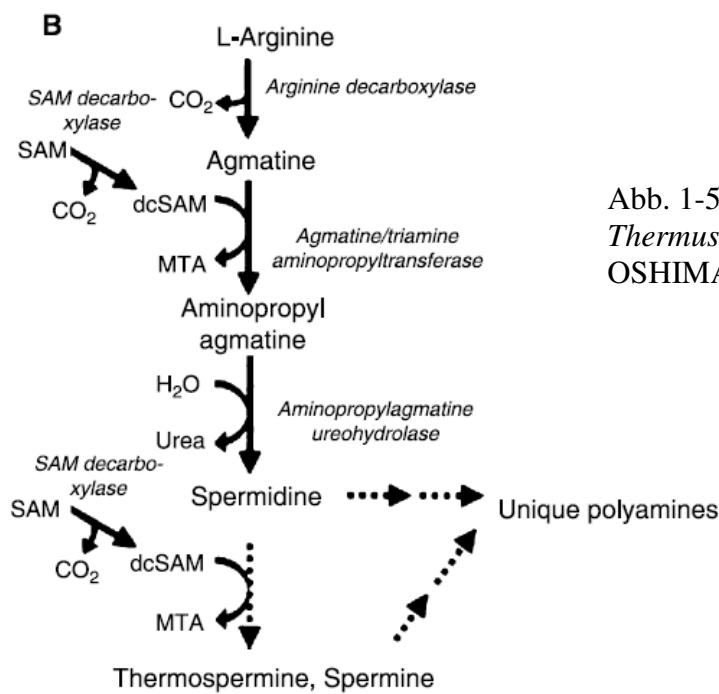


Abb. 1-5/B: Polyaminsyntheseweg bei *Thermus thermophilus* (Abbildung von OSHIMA, 2007).

Erwähnenswert ist, dass bei *T. thermophilus* 16 unterschiedliche Polyamine nachweisbar sind, die sich bezüglich der Kettenlänge (von Diaminen bis zur Stufe von Hexaminen) und bezüglich der Verzweigung unterscheiden. Untersuchungen zeigten, dass diese Polyamine im Zusammenhang der Proteinsynthese bei hohen Temperaturen und bei der DNA-Stabilität bei hohen Temperaturen einen wichtigen Beitrag liefern (OSHIMA, 2007). Die Synthese der Polyamine ist bei *T. thermophilus* nach derzeitigem Kenntnisstand nur bis zur Stufe von Spermidin aufgeklärt. Die an der Bildung von Thermospermin bis Caldohexamid etc. beteiligten Enzyme sind unbekannt, wobei festzustellen ist, dass *T. thermophilus* nur eine

*SpeE*-Sequenz im Genom aufweist, die für ein Protein mit Agmatin-N-Aminopropyltransferaseaktivität codiert.

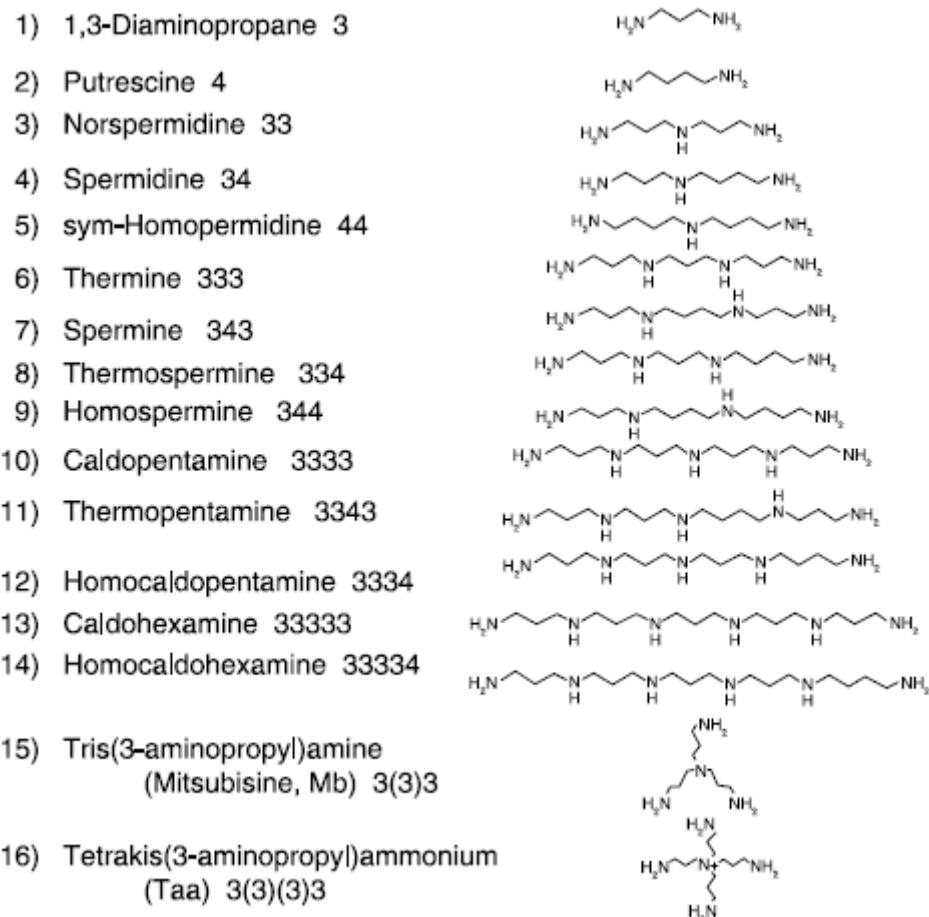


Abb. 1-6: Überblick über die 16 nachgewiesenen Polyamine von *T. thermophilus* (Abbildung von OSHIMA, 2007).

Wie aus Abbildung 1-5 deutlich wurde, erfüllen N-Aminopropyltransferasen eine wichtige Funktion bei der Kettenverlängerung von Polyaminen, bei dem eine Aminopropylgruppe von dcSAM auf eine Aminogruppe von einem Empfänger-Polyamin übertragen wird.

### 1.3.3. Die N-Aminopropyltransferasen

Die am besten untersuchten N-Aminopropyltransferasen sind die Spermidinsynthase, Spermins synthase und die bereits erwähnte Agmatin-N-Aminopropyltransferase von *T. thermophilus*. Spermidin-N-Aminopropyltransferasen kommen hauptsächlich bei Eukaryonten vor, wie Pflanzen (HANZAWA et al., 2000), Pilze (HAMASAKI-KATAGIRI, 1998) und Tiere (HANNONEN et al., 1972 und PAJULA et al., 1979). Die Spermins synthase von *Bos taurus* wurde von PAJULA et al. (1979) aufgereinigt und biochemisch

charakterisiert. Es ist ein homodimeres Enzym von 88 kDa und zeigt eine strikte Substratspezifität hinsichtlich Spermidin. Die Funktion von Spermidin-N-Aminopropyltransferasen wurde weiterhin in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), in *Mus musculus* und *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) untersucht. Bei *S. cerevisiae* konnten keinerlei negative Effekte bei einer sperminsynthasedefizienten Mutante beobachtet werden, womit eine genaue physiologische Funktion der Sperminsynthase von *S. cerevisiae* nicht exakt erklärt werden konnte (HAMASAKI-KATAGIRI et al., 1998). Hingegen führte der Verlust der Sperminsynthase in einer Mausmutante zu schwerwiegenden Konsequenzen, wobei die Mutante nicht fortpflanzungsfähig war, postnatale Entwicklungsverzögerungen aufwies, Verhaltensstörungen zeigte, taub war und tendenziell eine kürzere Lebenserwartung aufwies (WANG et al., 2004). In *A. thaliana* wurden zwei mutmaßliche Sperminsynthasen, *SPMS* und *ACL5*, gefunden. Der Phänotyp einer *acl5*-Nullmutante zeigte Zwergenwuchs, aufgrund des geringeren Zellwachstums in den Internodien der Pflanze (HANZAWA, 2000). Zudem wurde eine Doppelmutante von *A. thaliana* hergestellt, die *spms*- und *acl5*-defizient war. Diese Doppelnullmutante wies ebenso den gleichen Phänotyp wie von HANZAWA et al. (2000) beschrieben auf, wobei ein zusätzlicher Effekt der *spms*-Nullmutation nicht zu beobachten war (IMAI et al., 2004). Spätere Untersuchungen von YAMAGUCHI et al. (2006) ergaben jedoch, dass der Verlust der Sperminsynthase in der Mutante zu einer Hypersensitivität in Bezug auf Salzstress führt, wobei die Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp kaum trockenresistent war. Im Rahmen dieser Doktorarbeit und durch Einsatz genauerer Analysemethoden konnte im Übrigen gezeigt werden, dass zwar *SPMS1* von *A. thaliana* eine Sperminsynthase ist, jedoch bei *ACL5* es sich vielmehr um eine Thermosperminsynthase handelt (KNOTT et al., 2007).

Die Spermidinsynthase wurde in vielen Organismen aufgereinigt bzw. wurde das Enzym heterolog überexprimiert und biochemisch untersucht, so z.B. von *Thermotoga maritima* (KOROLEV et al., 2002) *Glycine max* (YOON et al., 2000), *Caenorhabditis elegans* (DUFE et al., 2005), *Plasmodium falciparum* (HAIDER, 2005) und *Helicobacter pylori* (LEE et al., 2005) etc. Fast alle Spermidinsynthasen, bis auf wenige Ausnahmen, sind homodimere Proteine, deren monomere Untereinheit zwischen 30 bis 40 kDa groß ist. Die Spermidinsynthase von *Glycine max* hingegen kommt als monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 74 kDa vor, während die Spermidinsynthase von *T. maritima* als homotetrameres Protein vorliegt. Spermidinsynthasen verfügen weiterhin in einem alkalischen pH-Bereich zwischen pH 7,5 und pH 10,5 über optimale Reaktionsbedingungen.

Zudem wurde beobachtet, dass neben einer Putrescin-N-Aminopropyltransferaseaktivität es bei einigen Spermidinsynthasen auch sehr geringe Aktivitäten bezüglich der Aminopropylgruppenübertragung auf 1,3-Diaminopropan und Spermidin gibt (KOROLEV et al., 2002).

### **1.3.4. Die Struktur einer Spermidinsynthase nach KOROLEV et al. (2002)**

KOROLEV et al. (2002) publizierten zum ersten Mal eine hochauflösende Röntgenkristallstruktur von der Spermidinsynthase aus *T. maritima* mit dem Multisubstratinhibitor S-adenosyl-1,8-diamino-3-thiooctane (AdoDATO). Wie zuvor beschrieben, besteht das Enzym aus vier Untereinheiten. Jede Untereinheit besteht aus einer N-terminalen-β-strängigen Domäne, sowie aus einer C-terminalen Domäne, die eine sogenannte Rossmann-Faltung (Nukleoditbindemotiv) aufweist. Die Oligomerisierung wird durch vier N-terminale Haarnadelstrukturen zustandegebracht. Die Struktur der Spermidinsynthase zeigte weiterhin spezielle Bindetaschen für die Substrate, zudem eine Schleife, den „gate keeping loop“ (bestehend aus den Aminosäureresten 171-180 von *T. maritima*), die das aktive Zentrum des Enzyms abschirmt und das bei Substratbindung eine Konformationsänderung durchmacht. Die Strukturanalyse der Spermidinsynthase ergab, dass Asp170, die bei allen N-Aminopropyltransferasen konserviert vorkommt, eine Deprotonierungsfunktion für die Aminogruppe des zu aminopropylierenden Putrescins hat. Ser171 und Tyr76 sollen bei der Bindung bzw. richtigen Koordinierung des Putrescins eine Rolle spielen und Asp173 soll mit der distalen Aminogruppe vom Putrescin interagieren (KOROLEV et al., 2002 und IKEGUCHI et al., 2006).

Weitere Strukturen von Spermidinsynthase wurden von *Caenorhabditis elegans* (DUFE et al., 2005), *Plasmodium falciparum* (BURGER et al., 2006) und von *Homo sapiens* (WU et al., 2007) untersucht und publiziert.

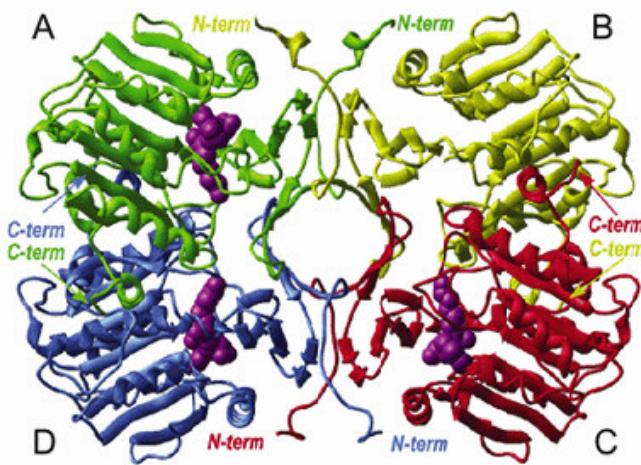


Abb. 1-7: Aufbau der Spermidinsynthase von *T. maritima* in einer Schleifenstruktur: Die Untereinheiten A, B, C, D wurden in grün, gelb, rot und blau dargestellt, der Multisubstratinhibitor AdoDATO magentafarben angegeben (Abbildung von KOROLEV et al., 2002).

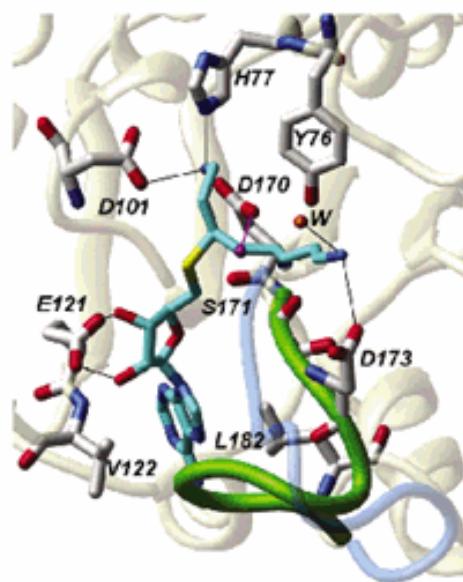


Abb. 1-8: Struktur des aktiven Zentrums von der Spermidinsynthase aus *T. maritima*: Die katalytisch bedeutsamen Aminosäurereste, sowie AdoDATO wurden in „*ball and stick*“-Darstellung hervorgehoben, W ist ein Wassermolekül, das deprotonierende Asp170 in Interaktion mit der Position, das die anzugreifende Aminogruppe von Putrescin einnehmen würde, wurde magentafarben hervorgehoben. Die grün dargestellte Schleife repräsentiert die flexible „*gate keeping loop*“, die in geschlossener Form das gebundene Substrat abschirmt. In Abwesenheit des Substrats würde die „*gate keeping loop*“ in offener Form zu sehen sein (hellblau durchscheinend dargestellt).

#### **1.4. Zielstellung dieser Arbeit**

Aus der Schale von *T. pseudonana*, deren Genom 2004 durchsequenziert wurde, wurden langkettige Polyamine isoliert, die von ihrer Kettenlänge Oktamine sind und zudem entweder als Basis ein Putrescin oder 1,3-Diaminopropan aufweisen, siehe Abb. 1-4 (SUMPER et al., 2005). Von Prof. Dr. SUMPER wurde hypothetisiert, dass diese langkettigen Polyamine von Putrescin bzw. 1,3-Diaminopropan und dcSAM ausgehend von vermutlich einem Enzym, einer sogenannten Polyaminsynthase, zu Oktaminen hergestellt werden (persönliche Mitteilung, SUMPER). Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Hypothese nachgegangen und durch Klonierungen, heterologe Expression und Enzymtests überprüft, wobei eine Thermosperminsynthase gefunden und charakterisiert wurde, die zuvor von keiner Forschergruppe identifiziert und als solche beschrieben wurde.

Weiterhin wurde überprüft, ob die Thermosperminsynthase ausschließlich bei *T. pseudonana* vorkommt oder ob es bei anderen Organismen Thermosperminsynthasen gibt und ob eine Überexpression der Thermosperminsynthase in *T. pseudonana* einen Einfluss auf die Zusammensetzung der cytosolischen Polyamine in *T. pseudonana* hat.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung in H <sub>2</sub> O	Arbeitskonzentration	Selektion für:
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ ml	<i>E. coli</i>
Kanamycin	50 mg/ ml	50 µg/ml	<i>E. coli</i>
Nourseothricin	100 mg/ml	100 µg/ ml	<i>T. pseudonana</i>

Ampicillin-Natriumsalz und Kanamycinsulfat wurden von der Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) bezogen, Nourseothricindihydrogensulfat (Handelsname: ClonNat) wurde von der Fa. Werner-Bioagent (Jena) eingekauft.

#### 2.1.2. Medien

##### LB-Medium

5 g              Hefeextrakt

10g              Trypton

5 g              NaCl

(für Festmedien: 15 g Agar, optional: Antibiotika je nach Selektionswunsch)

ad 1 l H<sub>2</sub>O

##### LB-Medium für Blue/White-Screening

Zusammensetzung wie LB-Festmedium mit 0,5 mM IPTG (Stammlösung: 1 M in H<sub>2</sub>O, Lagerung: -20°C) und 40 µg/ ml X-Gal (Stammlösung: 50 mg/ml in N,N-Dimethylformamid, Lagerung bei -20°C).

Medium für *Thermus thermophilus* HB27

4 g	Hefeextrakt
8 g	Trypton
2 g	NaCl
ad 1 l	H <sub>2</sub> O

MW1-Medium (*T. pseudonana*, , *S. turris*)

20,8 g	NaCl
9,6 g	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O
3,5 g	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1,32 g	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
596 mg	KCl
28,4 mg	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> x 9H <sub>2</sub> O
47 mg	NaNO <sub>3</sub>
21 mg	SrCl <sub>2</sub> x 5H <sub>2</sub> O
25 mg	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
85 mg	KBr
5,58 mg	Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O
32,7 µg	ZnCl <sub>2</sub>
20,2 µg	CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O
126 µg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
475 µg	MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O
170 µg	CuCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
2,63 µg	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> x 5H <sub>2</sub> O
1,76 mg	FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O
3,0 mg	NaF
100 µg	Thiamin x HCl
4,0 µg	Cyanocobalamin
2,0 µg	D-Biotin
100 mg	NaHCO <sub>3</sub>
6,0 mg	Na <sub>2</sub> -Diglycerophosphat
ad 1 l	H <sub>2</sub> O, pH 8,0

MW5-Medium (*Cylindrotheka fusiformis*, *Nitzschia angularis*, *Cyclotella meneghiniana*)

0,6 g	Glycylglycin
23,6 g	NaCl
1,1 g	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
4,94 g	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
4,13 g	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O
0,46 g	KCl
0,15 g	KNO <sub>3</sub>
56,8 mg	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> x 9H <sub>2</sub> O
1,14 mg	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
6,05 mg	Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O
0,62 mg	ZnCl <sub>2</sub>
0,27 mg	CuCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
0,24 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
0,42 mg	CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O
0,97 mg	FeCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O
2,45 mg	Dinatriumtartrat-dihydrat
0,36 mg	MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O
0,5 mg	Thiamin x HCl
45,6 mg	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
ad 1 l H <sub>2</sub> O, pH 8,0	

Süßwassermedium (*Navicula pellicullosa*)

660 mg	Glycylglycin
20 mg	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
100 mg	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O
25 mg	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
13,5 mg	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
99,5 mg	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> x 9H <sub>2</sub> O
1,14 mg	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
6,05 mg	Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O
0,62 mg	ZnCl <sub>2</sub>

0,27 mg	CuCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
0,24 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
0,42 mg	CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O
0,97 mg	FeCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O
2,45 mg	Dinatriumtartrat-dihydrat
0,36 mg	MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O
0,2 mg	Thiamin x HCl
5 µg	D-Biotin
5 µg	Cyanocobalamin

### **2.1.3. Organismen**

Für Klonierungen verwendeter *E. coli*-Stamm:

*E. coli* Nova Blue Singles<sup>TM</sup> von Novagen

Für heterologe Genexpression verwendete *E. coli*-Stämme:

*E. coli* SG13001 (für pQE-Vektoren) von Qiagen und

*E. coli* Bl21 (DE3) (für pET-20b) von Novagen.

*E. coli* Tuner (für pET-Blue1) von Novagen

In dieser Arbeit wurden folgende Diatomeen untersucht:

*Thalassiosira pseudonana* CCMP1335, *Stephanopyxis turris*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Nitzschia angularis*, *Cyclotella meneghiniana* und *Navicula pelliculosa*. Die genannten Diatomeenarten waren am Lst. Biochemie I/ M. Sumper in Kultur erhältlich.

Zur Gewinnung von *Thermus thermophilus* DNA wurde im Rahmen dieser Arbeit *T. thermophilus* HB27 (DSM 7039) kultiviert. Die Bakterien wurden durch die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig) erhalten.

*A. thaliana* ecotype Columbia (Col-0) wurde von Dr. E. Glawischnig (TU München) bezogen.

DNA von *S. cerevisiae* strain W303 wurde von Dr. Joachim Griesenbeck (Lehrstuhl Biochemie III/Universität Regensburg) erhalten.

## 2.1.4. Vektoren

Für TA-Klonierungen wurde der pGEM-T-Klonierungsvektor von Promega verwendet.

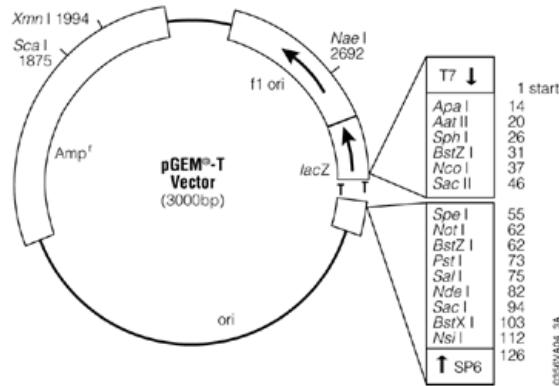


Abb.2-1: Plasmidkarte des pGEM-T-Vektors für TA-Klonierungen.  
(Quelle: Promega-Homepage)

Für heterologe Genexpression in *E. coli* Bl21 (DE3) unter Kontrolle eines T7-Promoters wurde der pET-20b Vektor von Novagen verwendet.

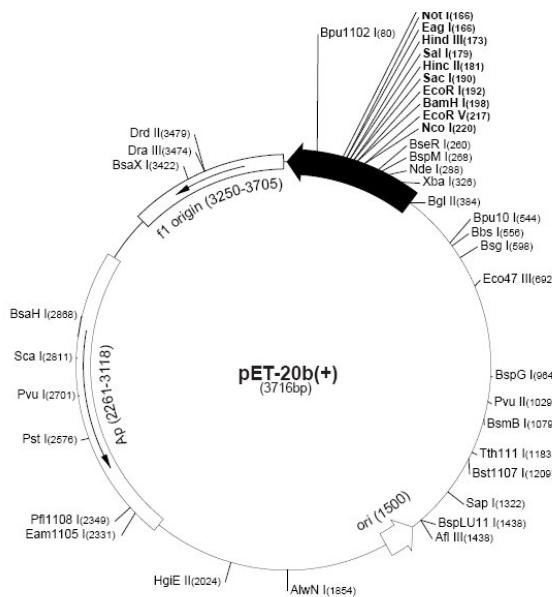


Abb.2-2: Plasmidkarte vom pET20-b Vektor.  
(Quelle: Technical Bulletin 037 12/98 von Novagen.)

Für heterologe Genexpression in *E. coli* Tuner verwendeter Vektor pET-Blue1 von Novagen.

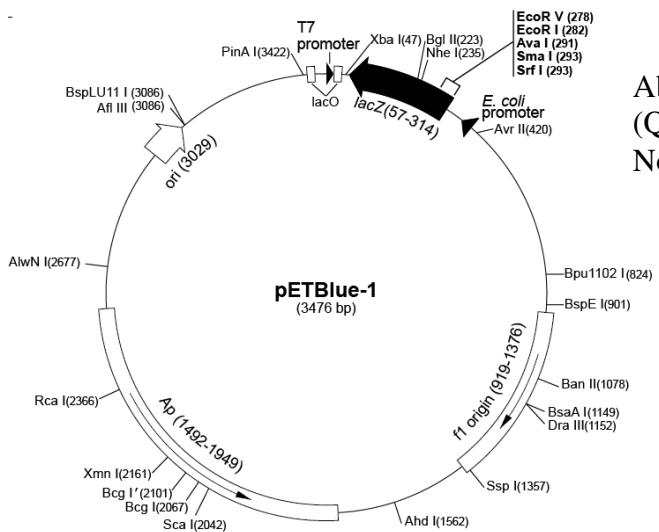


Abb.2-3: Plasmidkarte vom pETBlue-1.  
(Quelle: Technical Bulletin 258 12/99 von Novagen.)

Für heterologe Genexpression in *E. coli* SG13001 unter der Kontrolle eines T5-Promoters wurde der pQE-30 UA Vektor von Qiagen benutzt.

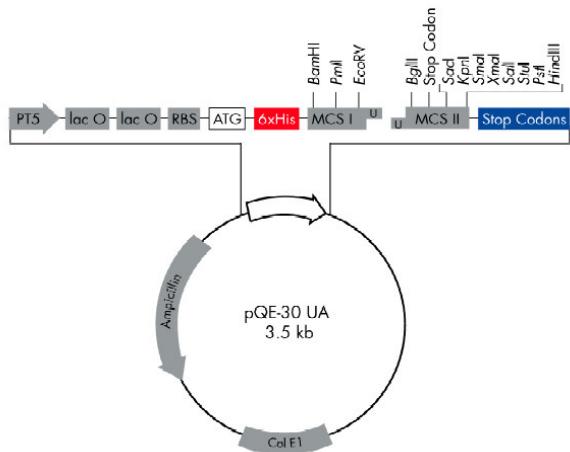


Abb.2-4: Plasmidkarte mit Klonierungsregion vom pQE-30 UA-Vektor.  
(Quelle: Homepage von Qiagen)

Für die induzierte Genexpression in *T. pseudonana* wurde der von POULSEN et al. (2006) konstruierte TpNR-Vektor verwendet. Die Genexpression steht unter der Kontrolle eines Nitratreduktase-Promotors von *T. pseudonana* und wird durch Anwesenheit von  $\text{NO}_3^-$  im Medium aktiviert bzw. durch Anwesenheit von  $\text{NH}_4^+$  im Medium supprimiert.

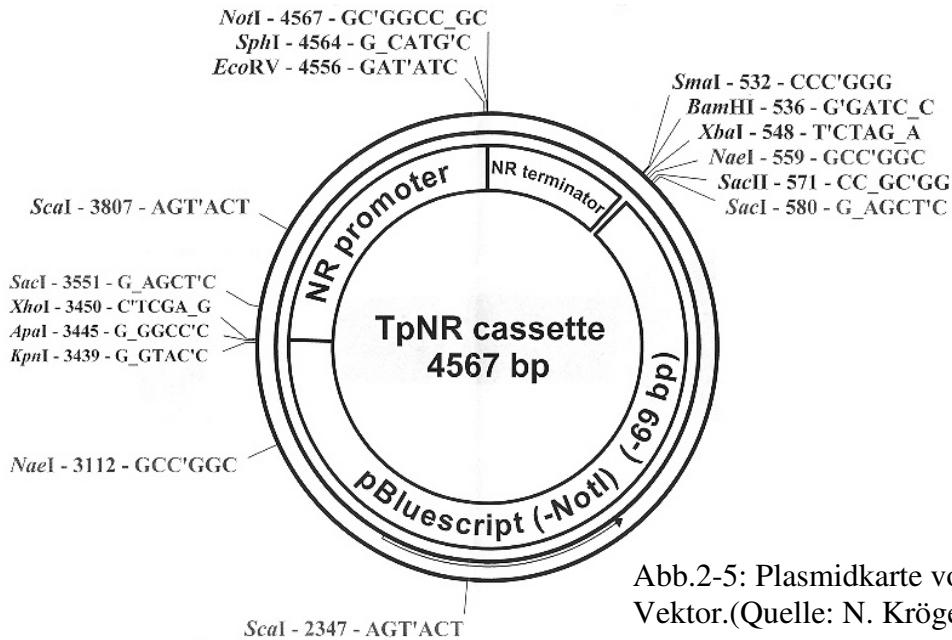


Abb.2-5: Plasmidkarte vom TpNR.-Vektor.(Quelle: N. Kröger)

Zur Selektion transformierter *T. pseudonana*-Zellen wurde ein von POULSEN et al. (2006) konstruiertes Plasmid, pBlue/TpfcpNat, verwendet, das eine Nourseothricin-resistenz vermittelt.

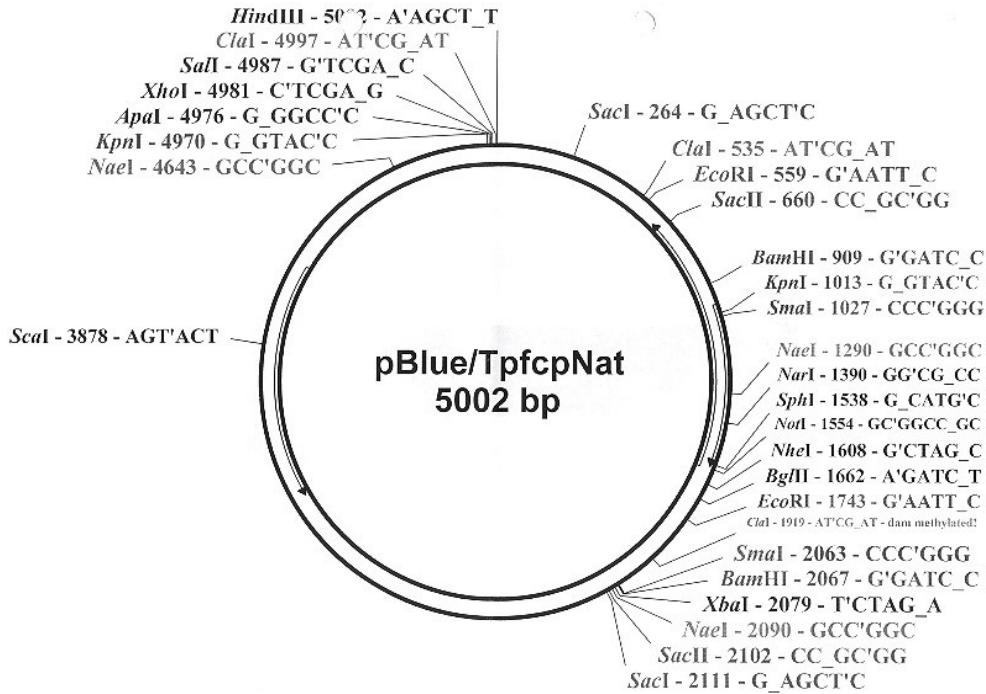


Abb.2-6: Plasmidkarte des pBlue/TpfcpNat-Vektors. (Quelle: N. Kröger)

### **2.1.5. Selbsthergestellte Lösungen und Puffer**

a) Für die Molekularbiologie:

RNase A-Lösung: 10 mg/ml RNase A in TE-Puffer, 15 min kochen und bei -20°C lagern.

TE-Puffer:

10 mM	Tris/HCl pH 7,5
1 mM	EDTA

Transformationspuffer 1 (Herstellung kompetenter Zellen):

30 mM	Kaliumacetat
50 mM	MnCl <sub>2</sub>
100 mM	KCl
15%	Glycerin

Mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen, sterilfiltrieren.

Transformationspuffer 2 (Herstellung kompetenter Zellen):

10 mM	MOPS/NaOH pH 7
75 mM	CaCl <sub>2</sub>
10 mM	KCl
15%	Glycerin

Sterilfiltrieren.

20x SSC (Southern-Blot):

3 M	NaCl
0,3 M	Na <sub>3</sub> Citrat
pH 7	

Denaturierungslösung (für Southern-Blot):

1,5 M	NaCl
0,5 M	NaOH

Neutralisierungslösung (für Southern-Blot):

1,5 M	NaCl
0,5 M	Tris/HCl, pH 7,2
1 mM	EDTA

100x Denhardts (Southern-Blot):

10 g	Ficoll 400
10g	Polyvinylpyrrolidon
10g	BSA Fraktion V

Methylenblaufärbelösung zum Anfärben der Nylonmembran:

0,04% (w/v)	Methylenblau
0,5 M	Na-Aacetat, pH 6

Southern-Blot-Waschpuffer 1: 1x SSC, 0,1% SDSSouthern-Blot-Waschpuffer 2: 0,1x SSC, 0,1% SDSPrä- und Hybridisierungslösung (ohne Formamid) für Southern-Blot:

Lösungen	Prähybridisierungslösung (ml)	Hybridisierungslösung (ml)
20x SSC	3	3
100x Denhardts	0,5	0,5
Salmon Sperm DNA (10 mg/ml)	0,1	0,1
10% SDS	0,5	0,5
0,5 M EDTA, pH 8	--	0,2
H <sub>2</sub> O	5,4	5,2
Gesamtvolumen	10	10

50x TAE-Puffer/ pH 8,5 (für Agarosegelektrophorese):

2 M	Tris
50 mM	EDTA
1 M	Essigsäure
H <sub>2</sub> O ad 1 l	

10x DNA-Ladepuffer (für Agarosegelektrophorese):

5 %	Glycerin
10 mM	EDTA
0,25%	Bromphenolblau

2x Bindepuffer für mRNA-Isolierung mit Oligo-dT<sub>25</sub>-Beads:

20 mM	Tris/HCl, pH 7,5
1 M	LiCl
2 mM	EDTA

Waschpuffer für mRNA-Isolierung mit Oligo-dT<sub>25</sub>-Beads:

10 mM	Tris/HCl, pH 7,5
150 mM	LiCl
1 mM	EDTA
0,1%	Triton-X100

DEPC-behandeltes H<sub>2</sub>O (für den Gebrauch mit RNA):

0,1% (v/v) DEPC in Millipore-H<sub>2</sub>O pipettieren und über Nacht rühren lassen und danach autoklavieren.

b) Für die Proteinbiochemie

5x SDS-Probenpuffer (für SDS-PAGE):

225 mM	Tris/HCl, pH 6,8
50%	Glycerin
5%	SDS
0,05%	Bromphenolblau
0,25 M	DTT

(für Native-PAGE: kein SDS/DTT verwenden)

Färbelösung (für PAGE-Gele):

500 mg	Coomassie R 250
454 ml	Methanol (98%)
454 ml	Wasser
92 ml	Essigsäure (100%)

Entfärbelösung (für PAGE-Gele):

1400 ml	Wasser
500 ml	techn. Ethanol
100 ml	Essigsäure (100%)

Laufpuffer für SDS-PAGE:

15,1 g	Tris
72,1 g	Glycin
5 g	SDS

(Native PAGE: kein SDS verwenden)

Zusammensetzung von SDS-PAGE-Trenn-und Sammelgel:

Gelzusammensetzung	Acrylamidkonzentration vom Trenngel	6%	8%	10%	12%	15%
1 M Tris/HCl, pH6,8 (ml)	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1
30% Acrylamid (ml)	1,5	2	2,6	3	3,75	
H <sub>2</sub> O (ml)	2,42	1,92	1,42	0,92	0,17	
SDS (ml)	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	
10% Temed (ml)	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	
15 mg/ml APS (ml)	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	

Sammelgel (5%)	
1 M Tris/HCl, pH6,8 (ml)	0,3
30% Acrylamid (ml)	0,42
H <sub>2</sub> O (ml)	1,58
SDS (ml)	0,025
10% Temed (ml)	0,075
15 mg/ml APS (ml)	0,1

(Native Gele: kein SDS verwenden)

His-Tag-Bindepuffer (für native Aufreinigung von His-Tag-Proteinen):

20 mM Tris/HCl, pH 8

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

0,05% Triton X-100

His-Tag-Waschpuffer (für native Aufreinigung von His-Tag-Proteinen):

20 mM Tris/HCl, pH 8

300 mM NaCl

20 – 60 mM Imidazol

0,05% Triton X-100

His-Tag-Elutionspuffer (für native Aufreinigung von His-Tag-Proteinen):

20 mM Tris/HCl, pH 8

300 mM NaCl

300 mM Imidazol

0,05% Triton X-100

Boratpuffer für Blotten auf PVDF-Membranen

50 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

10 % Methanol

Mit NaOH auf pH 9 einstellen

### **2.1.6. Verwendete Enzyme, Kits und Hilfsmittel für die Molekularbiologie**

#### Verwendete Größenbestimmungsstandards für Agarosegelektrophorese und PAGE

##### a) Für Agarosegelektrophorese

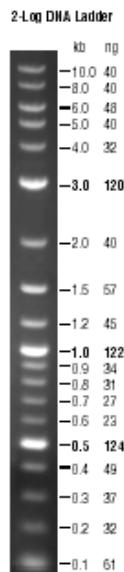


Abb. 2-7: 1 µg aufgetragene 2-Log DNA Leiter von NEB in einem 1%igen Agarosegel (Quelle: NEB).

##### b) Für SDS-PAGE

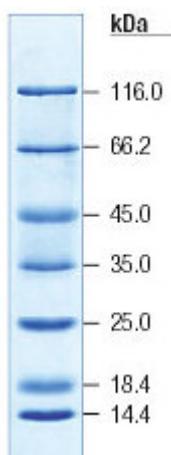


Abb. 2-8: Für die SDS\_PAGE verwendeter Proteinstandard von Fermentas (Quelle: Fermentas).

Abb.2-8: Für die SDS-PAGE verwendeter Proteinstandard von Fermentas (Quelle: Fermentas).

c) Für Native PAGE und Gelfiltration

Für die Native PAGE und die Gelfiltration wurde ein Protein Molekulargewichtstandard (12,42 bis 450 kDa) von Serva eingesetzt.

Materialien für die Biolistiktransformation

Wolframpartikel der Größe M17, Berstscheiben (1350 psi), Macrocarrier und die Stopping screens für die Diatomeen Transformation wurden von Biorad eingekauft.

Verwendete Enzyme für die Molekularbiologie:

Enzymbezeichnung	Hersteller
Taq-DNA-Polymerase	NEB
Phusion™-DNA-Polymerase	Finnzymes/NEB
Superscript III™ (Reverse Transkriptase)	Invitrogen
Klenow-Enzym	NEB
Alle Restriktionsenzyme	Fermentas
Calf Intestinal Phosphatase	Fermentas
T4-DNA-Ligase	USB
T4-Polynucleotid-Kinase	USB
RNAguard RNase Inhibitor	Amersham Biosciences/GE-Healthcare
RNAase A	Carl Roth GmbH & Co. KG
Terminale Desoxynucleotidyltransferase	Amersham Biosciences/GE-Healthcare

Verwendete Kits für die Molekularbiologie:

Kitbezeichnung	Funktion	Hersteller
NucleoSpinPlasmid-Kit (200)	Aufreinigung von Plasmid-DNA	Macherey - Nagel
Wizard® Genomic DNA Purification Kit	Aufreinigung von genomischer DNA	Promega
Quiaquick PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR-Amplifikaten	Qiagen
Quiaquick Gel Extraction Kit	Aufreinigung von DNA aus Agarose	Qiagen
pGEM-T Cloning Kit	Klonierung von PCR-Amplifikaten	Promega
pQE-30 UA Cloning Kit	Klonierung und Expression mit pQE-30 UA	Qiagen

**2.1.7. Chemikalien**

Chemikalien	Hersteller
IPTG	Fermentas
S-(5'-Adenosyl)-L-methioninchlorid	Fluka
dATP	Fermentas
dTTP	Fermentas
dCTP	Fermentas
dGTP	Fermentas
Putrescin	Acros Organics
Spermidin	Carl Roth
[ <sup>35</sup> S]-dATP	GE-Healthcare
[ <sup>14</sup> C]-Spermidin	GE-Healthcare
[ <sup>14</sup> C]-Putrescin	GE-Healthcare
[ <sup>14</sup> C]-Diaminopropan	American Radiolabelled Chemicals
Ni-NTA-Agarose (Resin)	Qiagen
HiS-Resin	Biorad
AG 50W X8 (Resin)	Biorad
Oligonukleotide	MWG

Alle weiteren Chemikalien für Medien und Pufferherstellung wurden von den Firmen Carl Roth, Fluka und Merck bezogen.

### **2.1.8. Oligonukleotide**

Siehe Anhang.

### **2.1.9. Geräte**

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav	LTA 32/25	Zirbus
Biolistikgerät	PDS-1000/He Particle Delivery System	Biorad
DNA/RNA-Photometer	GeneQuant II	Pharmacia Biotech
Falcon-Zentrifuge	Rotanta 460R	Hettich
GC-MS-Anlage	Varian Saturn 2110 T	Varian
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-4	Christ
Geltrockner	Modell 583	Biorad
HPLC-Detektor	HPLC-Detektor 430	Kontron Instruments
FPLC-Pumpsystem	LKB Pump P-500	Pharmacia Biotech
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417RD	Eppendorf
Laborfeinwaage	AT200	Mettler
Laborwaage		Sartorius
Magnetheizrührer	MR 3001	Heidolph
PCR-Maschine	GeneAmp PCR-System 9600	Perkin Elmer
Phosphoimager	Fujix BAS-1000 (20x40 cm)	Fuji
Phosphoimager-Screen	BASMS-2040	Fuji
Phosphoimager Eraser	Modell Eraser	Raytest
Photometer	Ultrospec 3300 pro	Amersham Biosciences
Rotationsverdampfer	Rotavapor R110	Büchi
Scintilisationsmeßgerät	LS 6500	Beckman Coulter
Spannungsquelle	Power Pac 200	Biorad
Thermoblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf
Ultraschallgerät	Sonifier Cell Disruptor B15	Branson
UV-Illuminator		Desaga
UV-Crosslinker	Stratalinker	Stratagene
Vakuum-Zentrifuge	Univapo 150H	UniEquip
Vortexer	Reax 2000	Heidolph
Wasserbad	Julabo U3	Julabo Labortechnik
Zentrifuge	Avanti J-20XP	Beckman Coulter

## **2.2. Allgemeine molekularbiologische Methoden**

### **2.2.1. Aufreinigung von Gesamt-RNA**

50 x 10<sup>7</sup> *T. pseudonana*-Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert und in 1 ml Tri-Reagent resuspendiert und für 5 min stehengelassen. Danach wurden 200 µl Chloroform zu der Lösung hinzugegeben und durch kurzes vortexen gemischt. Die Suspension wurde dann für 5-10 min stehengelassen bis eine klare Phasentrennung zwischen wässriger und organischer Phase zu erkennen war. Die Lösung wurde dann für 10 min bei 4°C in einer Eppendorf-Kühlzentrifuge bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der klare wässrige Überstand vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,8 Vol Isopropanol kurz gevortext. Die Lösung wurde für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann in einer Eppendorf-Kühlzentrifuge bei 4°C und 14000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet mit 70%igen Ethanol einmal gewaschen. Nach dem Entfernen des Ethanols wurde das Pellet bei Raumtemperatur kurz getrocknet bis keinerlei Ethanolgeruch im Reaktionsgefäß bemerkbar war. Das RNA-Pellet wurde in 20-100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Optional konnte, wenn eine längerfristige Lagerung notwendig war, die RNA-Lösung mit ½ Vol 10 M LiCl versetzt und bei -80°C gelagert werden.

### **2.2.2. Isolierung von mRNA**

Zur Gewinnung von reiner mRNA aus Gesamt-RNA wurden Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub> eingesetzt. Es wurden 30 µl Dynal-dT<sub>25</sub>-Beads aus der Vorratssuspension entnommen und zweimal mit 100 µl 2x Bindepuffer äquilibriert. Durch Anlegen eines speziellen Dynal-Magneten an dem Eppendorfreaktionsgefäß konnten die Beads aus der Suspension magnetisch an der Wand des Gefäßes festgehalten werden, während der Überstand mit einer Pipette abgenommen wurde.

Nach der Äquilibrierung wurden die Beads in 50 µl 2x Bindepuffer aufgenommen und dann mit 50 µl Gesamt-RNA vereinigt. Diese Suspension wurde bei 20°C und 1200 rpm auf einem Thermoblock mit Schüttelfunktion für 10 min inkubiert. Die Beads wurden mit einem Magneten danach fixiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die Beads mit zweimal 200 µl Waschpuffer gewaschen und in 20 µl 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8 resuspendiert. Die mRNA wurde in einem Thermoblock auf 80°C für 2 min erhitzt, um Wasserstoffbrückenbindungen aufzuschmelzen. Die Lösung wurde nach 2 min aus dem Thermoblock entnommen und die Beads wurden mittels Magneten von der mRNA-Lösung

getrennt. Der Überstand mit der reinen mRNA wurde entnommen und für die reverse Transkription weiterverwendet.

### **2.2.3. Aufreinigung von genomischer DNA**

a) aus *T. pseudonana*

Die genomische DNA von Diatomeen wurde mit dem Wizard® Genomic DNA Purification-Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt.

b) aus *T. thermophilus* (zur Gewinnung von DNA für die *SpeE*-Amplifikation)

10 ml einer *T. thermophilus*-Suspension wurden abzentrifugiert, in 0,5 ml TE-Puffer resuspendiert und mit 2-3 Impulsen mit einem Ultraschall-Gerät beschallt. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und der Überstand einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen. Der resultierende Überstand wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 1 ml 70%igen Ethanol gewaschen und in 50 µl Wasser aufgenommen.

### **2.2.4. Reverse Transkription**

Unter reverser Transkription versteht man das Umschreiben von RNA zu cDNA mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase.

Für diese Reaktion wurde verwendet:

10 pg – 5 µg Gesamt-RNA bzw. 10 pg – 500 ng mRNA

1 µl 100 mM DTT

1 µl RNase Inhibitor

4 µl 5x First Strand Buffer

1 µl 10 mM dNTP-Mix

50 pmol Oligo-dT<sub>25</sub> Primer

1 µl Superscript III (200 U/1µl)

Mit DEPC-behandeltem Wasser wurde das Reaktionsvolumen auf 20 µl eingestellt.

Die Reaktionsdauer betrug 1h und die Reaktionstemperatur war, wenn der Oligo-dT<sub>25</sub>-Primer verwendet wurde, 50°C, bei genspezifischen Primern wurde eine Reaktionstemperatur von 55°C verwendet.

Zur Inaktivierung der Superscript III wurde der Reaktionsansatz 15 min bei 70°C erhitzt.

#### **2.2.5. Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Minipräparation)**

Aus ÜN-Kulturen wurden 5-10 ml Zellsuspension entnommen und mit einer Hettich-Zentrifuge abzentrifugiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit dem Nucleo-Spin Plasmid-Kit von Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers.

#### **2.2.6. Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsreaktionen wurden in einem Volumen von 10-20 µl bei der jeweiligen vom Hersteller angegebenen Reaktionstemperatur angesetzt. Weiterhin wurde der vom Hersteller empfohlene Restriktionspuffer verwendet. Für die Enzymreaktion wurde die DNA in bidest. H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit 1x Restriktionspuffer gemischt. Nach der Zugabe von 2-10 U/µg DNA Restriktionsenzym wurde der Ansatz für 30-60 min in einem Heizblock inkubiert. Nach der Restriktion wurde der Ansatz entweder mit DNA-Ladepuffer direkt versetzt und eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt bzw. wurde die DNA mit dem Qiaquick PCR Purification Kit isoliert, sofern es für weitere enzymatische Reaktionen erforderlich war.

#### **2.2.7. Dephosphorylierung von linearer DNA**

Zur Vermeidung einer Rezirkularisierung von restringierter Plasmid-DNA wurde die DNA mit alkalischer Phosphatase (CIP) behandelt. Die linearisierte Plasmid-DNA wurde hierfür in einem Volumen von 20-50 µl in 1x CIP-Reaktionspuffer gelöst und 30-60 min bei 37°C inkubiert. Der Hersteller empfiehlt die Verwendung von 0,025 U pro ein pmol DNA-Ende.

#### **2.2.8. Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation zweier DNA-Fragmente diente der Herstellung rekombinanter Plasmide. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden die DNA-Fragmente in 1x Ligationsreaktionspuffer zu einem Volumen von 10-20 µl pipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von 2-5 U T4-DNA-Ligase zu dem Reaktionsansatz. Die Ligationsdauer von glatten DNA-Enden wurde über Nacht durchgeführt, die Ligationsdauer von überhängenden DNA-Enden wurde für mindestens 4 h gewährleistet.

### **2.2.9. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

DNA-Fragmente für enzymatische Reaktionen konnten direkt aus dem Agarosegel isoliert werden. Hierzu wurde nach abgeschlossener Agarosegelektrophorese das gewünschte DNA-Fragment wurde im UV-Licht (254 bzw. 366 nm) visualisiert und aus dem Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Anleitung des Herstellers. Die zu isolierende DNA konnte in einem Volumen von 30-50 µl mit Elutionspuffer eluiert werden.

### **2.2.10. Phosphorylierung von 5'-DNA-Enden**

Das Enzym T4-Polynukleotidkinase (PNK) phosphoryliert 5'-DNA-Enden unter ATP-Hydrolyse. Bei einer Ligation von PCR-Fragmenten in dephosphorylierte Klonierungsvektoren, die glatte Enden aufweisen, ist es unumgänglich die 5'-Enden der DNA vorher zu phosphorylieren, sofern man unphosphorylierte Oligonukleotide als Primer für die Amplifikation verwendet hat. Die Phosphorylierung wurde in einem Volumen von 20 µl in 1x PNK-A-Puffer mit 1 mM ATP und ca. 100- 500 ng DNA vorgenommen, dabei setzte man 10 U PNK ein.

### **2.2.11. Agarosegelektrophorese**

Die Agarosegelektrophorese diente der Analyse von Restriktionsreaktionen, der Mengen- und Größenabschätzung von DNA-Fragmenten, als auch zur präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten. Für die Herstellung eines Agarosegels wurde die gewünschte Menge Agarose abgewogen und in 100 ml 1x TAE-Puffer gelöst, das dann unter Aufkochen dieser Suspension vollständig in Lösung gebracht wurde. Nach dem Aufkochen wurde zu dem flüssigen Agarosegel 50 µg Ethidiumbromid pro 100 ml Agarosegel hinzugefügt, das dann in einem horizontalen Gelschlitten mit geeignetem Agarosegelkamm hineingegossen wurde. Nach dem Erstarren der Gelmatrix wurde diese mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die aufzutragenden DNA-Proben wurden mit 1/10 Vol 10x DNA-Ladepuffer versetzt und nach Entfernung des Gelkammes in die eingefüllten Agarosegeltaschen hineinpipettiert. Bei einer angelegten Spannung von 100-120 V betrug die Elektrophoresedauer 30-45 min. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Gelmatrix aus der Gelkammer entnommen und unter UV-Licht der Wellenlänge 254 bzw. 366 nm betrachtet.

Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid bindet an die dsDNA und wird durch UV-Licht zur Fluoreszenz gebracht. Für die Bilddokumentation wurde das Gel mit einer UV-Lampe angestrahlt und mit Hilfe eines Photodokumentsystems photographiert.

Zur Größen- und Mengenabschätzung der DNA-Probe wurde der 2-Log DNA-Standard (NEB) eingesetzt.

### **2.2.12. Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäurelösungen**

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch mit einer Quarzküvette und einem Photometer mit UV-Lampe. Nukleinsäurelösungen wurden entsprechend in H<sub>2</sub>O verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen. Es wird davon ausgegangen, dass eine reine DNA-Lösung ein OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub>-Verhältnis von 1,8-2,0 aufweist.

Die Konzentration wird durch folgende Formel berechnet:

$$c \text{ (\mu g/ml)} = OD \times V \times \text{Multiplikationsfaktor}$$

c = Konzentration der Lösung

V = Verdünnungsfaktor

M = Multiplikationsfaktor (50 für dsDNA, 40 für RNA, 33 für ssDNA, 20 für Oligonukleotide)

### **2.2.13. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen**

Eine 10 ml-Vorkultur von *E. coli* Nova Blue Single bzw. Bl21 (DE3) wurde angeimpft und über Nacht wachsen gelassen. Von dieser Kultur wurden 50 ml LB-Medium mit 1 ml Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,3 bis 0,4 kultiviert. Die Kultur wurde dann abzentrifugiert und in 15 ml Transformationspuffer I resuspendiert und für 2 h auf Eis stehengelassen. Danach wurden die Zellen bei 4°C abzentrifugiert und das Zellpellet vorsichtig in 2 ml Transformationspuffer 2 gelöst und für 15 min auf Eis inkubiert. Die im Puffer resuspendierten Zellen wurden dann in 60 µl-Aliqoute verteilt und in flüssigen N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.2.14. Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen**

Die tiefgefrorenen kompetenten Zellen wurden für ca. 5 min auf Eis aufgetaut. Danach erfolgte die Zugabe des Ligationsansatzes zu den kompetenten Zellen. Der so behandelte Ansatz wurde für 15 min auf Eis belassen und danach einer zweiminütigen Temperierung bei 42°C im Wasserbad unterzogen und erneut für zwei Minuten auf Eis gestellt. Danach wurden 250 µl SOC-Medium zu den Zellen hinzugegeben und der Transformationsansatz für 1h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dieser Inkubationsdauer wurden die Zellen zu Volumina von 100 µl bzw. 200 µl direkt auf LB-Agarplatten mittels eines Drigalski-Spatels ausplattiert und über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C bebrütet.

### **2.2.15. Amplifikation von DNA-Fragmenten**

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde mittels PCR durchgeführt. Es wurden hierzu jeweils 1 pg – 1 µg DNA mit 200 µM dNTP-Mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) je 25 pmol entsprechenden Primer und mit 1x PCR-Puffer in einem Reaktionsvolumen von 50 µl pipettiert. Die Reaktion wurde durch 2 U hitzes stabiler DNA-Polymerase (*Taq*-DNA-Polymerase oder *Phusion*-DNA-Polymerase) gestartet. Das PCR-Programm bestand aus 30-35 PCR-Zyklen. Ein PCR-Zyklus umfasst die Denaturierung der dsDNA (20-30 sec bei 94°C), wobei die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen aufgebrochen werden, einer Primer-Hybridisierung (20-30 sec bei primerspezifischer Schmelztemperatur), bei der ein sequenzspezifisches Oligonukleotid sich an einem Abschnitt des DNA-Stranges anlagert, und einer Elongationsphase bei 72°C (30-60 sec Elongationsdauer entsprechen ca. 1kb amplifizierte DNA), bei der die DNA ausgehend vom 3'-Ende des Primer in 5'→3' Richtung synthetisiert wird.

### **2.2.16. RACE-PCR**

Die RACE-PCR („Rapid Amplification of cDNA Ends“) ist eine Abwandlung der reversen Transkriptions-PCR, bei der die mRNA eines Gens in cDNA umgeschrieben und mittels PCR amplifiziert wird. Des Weiteren wird mit Hilfe der RACE-PCR eine unbekannte 5'- bzw. 3'-flankierende Gensequenz ausgehend von einem bekannten Gensequenzteil amplifiziert. Die Anwendung dieser PCR-Technik ermöglicht es vollständige cDNA-Sequenzen eines Gens zu erhalten.

### **2.2.16.1. Die 3'-RACE-PCR der Sequenz TPS 41289**

Die 3'-RACE-PCR wurde durchgeführt, wenn ausgehend von einem bekannten Sequenzteil die 3'-flankierende Sequenz unbekannt ist. Durch Verwendung eines genspezifischen Primers (3R412-1-Primer) und eines Oligo-dT<sub>25</sub> Primers (ONdT25-Primer) der zur poly(dA)-Sequenz der cDNA komplementär ist, wurde eine erste 3'-RACE-PCR durchgeführt. Nach dieser ersten PCR wurde eine zweite PCR, eine sogenannte „nested-PCR“ durchgeführt, um sicherzustellen, dass nur ein sequenzspezifisches PCR-Produkt amplifiziert wird. Hierzu verwendete man einen zweiten genspezifischen Primer (3R412-2) „downstream“ vom ersten genspezifischen Primer (3R412-1), sowie einen Primer, der komplementär zur Adaptersequenz des in der ersten PCR verwendeten Oligo-dT<sub>25</sub> Primers (ON644) ist.

Für die PCR-Reaktionen wurden verwendet (50 µl): 1x PCR-Puffer, 0,2 mM dNTP-Mix, 50-100 ng cDNA, jeweils 30 pmol der 3R412-1- und ONdT25- bzw. 3R412-2 und ON644-Oligonukleotide, 2 U *Taq*-DNA-Polymerase und 20 ng cDNA. Für die „nested“(zweite nachfolgende) PCR-Reaktion wurde 1 µl aus der ersten PCR-Reaktion entnommen und als Template für die nachfolgende PCR verwendet.

PCR-Programm:	Einmalig	2 min 94°C
	35 Zyklen	20 sec 94°C
		20 sec 50°C (20 sec 58°C für die „nested“ PCR)
		1-2 min 72°C
	Finale Elongation	5 min 72°C

Das entstandene Amplifikat wurde aus dem PCR-Ansatz aufgereinigt, in einem Klonierungsvektor kloniert und sequenziert.

### **2.2.16.2. Die 5'-RACE-PCR der Sequenz TPS 41289**

Die 5'-RACE-PCR wird verwendet, wenn die 5'-flankierende Sequenz eines Gens unbekannt ist. Bei der 5'-RACE ist es erforderlich das ein Homopolymerschwanz an das 5'-Ende der cDNA mit Hilfe der terminalen Desoxynucleotidyltransferase synthetisiert wird. Nach dieser Reaktion ist es möglich, dass unter Verwendung eines Primers der komplementär zum Homopolymerschwanz ist und eines genspezifischen Primers (5Race-1 und 5R(412)-1), eine

PCR durchzuführen. Wie bei der 3'-RACE wird eine nested PCR durchgeführt, damit möglichst nur ein spezifisches PCR-Amplifikat erhalten wird. Dazu wurde ein zweiter genspezifischer Primer verwendet, sowie ein Primer, der komplementär zur Adaptersequenz am Homopolymerschwanz des PCR-Amplifikats aus der ersten PCR-Reaktion ist (5Race-2 und 5R(412)-2).

Für das „homopolymer-tailing“ wurden verwendet (20 µl): 20 U Terminale Transferase, 0,2 mM dCTP, 10-100 ng cDNA, 1x Transferasepuffer. Die Reaktion wurde für 20 min bei 37°C inkubiert und dann mit dem Qiaquick PCR-Purification Kit aufgereinigt und in 30 µl Elutionspuffer eluiert.

### **2.2.17. Zielgerichtete Mutagenese durch Überhangverlängerung**

In einem Experiment sollte die Bindedomäne vom TPS\_41289 für das decarboxylierte S-Adenosylmethionin verändert werden, wobei die Aminosäurenabfolge statt **GGGE** zu **GGGD** ausgetauscht werden soll.

Um diesen Versuch durchzuführen, wurde eine Mutagenese durch Überhangverlängerung durchgeführt. Dabei wurden zwei Primerpaare (BA412VH1 und BA412VH2 bzw. BA412HH1 und BA412HH2) in zwei separaten PCR-Reaktionen benutzt, bei denen zwei sich überlappende PCR-Amplifikate synthetisiert werden. Beide PCR-Amplifikate wurden als Template für eine dritte PCR-Reaktion verwendet. Während der PCR-Reaktion entstehen im Mutationsbereich Hybride, aufgrund der Überlappung der zwei PCR-Fragmente. Der mutierte Hybriddoppelstrang wird aufgrund zweier äußerer Primer amplifiziert (BA412VH1 und BA412HH2). Die PCR wurde nach Standardprotokollen durchgeführt. Nach der ersten PCR wurden die zwei unterschiedlichen Amplifikate auf 1%iger Agarose aufgetrennt und mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit aufgereinigt. Die erhaltenen Eluate wurde 50x fach verdünnt und mit jeweils 1µl der DNA-Probe einer zweiten PCR-Reaktion zugeführt. Nach Abschluss der zweiten PCR-Reaktion wurde das gewonnene mutagenisierte PCR-Produkt mittels dem Qiaquick Gel Extraction Kit aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen *Sph*I und *Sac*I verdaut. Parallel dazu wurde ein pET-20b/41289-Vektor mit *Sph*I und *Sac*I verdaut und aufgereinigt. Durch eine Ligationsreaktion wurde das mutagenisierte Insert über die *Sac*I- und *Sph*I-Schnittstelle in den Zielvektor, pET-20b/41289, eingefügt und in kompetente *E. coli*

Bl21(DE3) -Zellen transformiert. Die Induzierung und die Durchführung des Enzymtestes erfolgten wie beschrieben.

### **2.2.18. DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Fa. MWG-Biotech (Martinsried) durchgeführt. Für die DNA-Sequenzierung war ca. 1 µg DNA pro Sequenzierung erforderlich, die durch DNA-Minipräparation erhalten wurde.

### **2.3. Transformation der TPS\_41289-Sequenz in *T. pseudonana***

Um eine Funktion der 41289-Sequenz für *T. pseudonana* abzuleiten, wurde versucht, die Sequenz in einem geeigneten Transformationsvektor für *T. pseudonana* zu klonieren und sie zu transformieren. Die Transformation der *TPS\_41289*-Sequenz sollte zu einer kontinuierlichen und verstärkten Expression führen, die von den transformierten Zellen nicht reguliert werden kann.

Nach erfolgreicher Transformation sollen die Transformanten mittels PCR- und Southern-Blot, Spermidin-N-Aminopropyltransferase-Enzymtest und MALDI-TOF analysiert werden, um den Erfolg der Transformation und bestimmte phänotypische Merkmale (Analyse der Polyamine) nachzuweisen.

#### **2.3.1. Transformation von *T. pseudonana* mittels Biolistik**

Die Biolistik ist eine Transformationsmethode bei der man Zellen mit stark beschleunigten Partikeln, gewöhnlich Gold- oder Wolframpartikel an denen DNA anhaftet, aus einer Partikelkanone beschießt. Diese Methode hat sich bereits bei der Transformation von verschiedenen Diatomeenarten bewährt (APT und GROSSMAN, 1996; POULSEN und KRÖGER, 2005; POULSEN et al. 2006).

Die Transformation von *T. pseudonana* wurde bereits von POULSEN et al. (2006) etabliert. Für die Cotransformation wurden zwei Plasmide, das Expressionsplasmid TpNR und das Resistenzplasmid pBlue/TpfcpNat, verwendet. Das pBlue/TpfcpNat-Plasmid verfügt über einen starken *T. pseudonana*-spezifischen Promoter für Fucoxanthin-Chlorophyll a/c-

bindendes Protein, welches Einfluss auf die stetige Expression des nat1-Gens hat, das für eine Nourseothricin N-Acetyl-Transferase codiert und somit gegen das Selektionsmittel Nourseothricin Resistenz vermittelt. Der TpNR-Vektor verfügt über einen Nitratreduktase-Promoter und –Terminator. Zwischen dem Promoter und Terminator gibt es eine kleine Klonierungsstelle, bei der gewünschte Sequenzen kloniert werden können. Die Expression solcher in TpNR klonierter Sequenzen ist induzierbar, wenn  $\text{NO}_3^-$  als alleinige Stickstoffquelle im Medium vorhanden ist (POULSEN et al., 2006).

### **2.3.2. DNA-Beschichtung der Wolfram-Partikel**

#### **a) Waschen der Wolfram-Partikel:**

10 mg Wolfram-Partikel der Größe M17 wurden in 500  $\mu\text{l}$  EtOH resuspendiert und danach 1 min zentrifugiert. Das Wolfram-Pellet wurde in 250  $\mu\text{l}$  EtOH aufgenommen und für 1-2 min gevortext. Die Suspension wurde danach für 1 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann jeweils 3x mit 250  $\mu\text{l}$  sterilem Wasser gewaschen, 1 min zentrifugiert, und nach diesem Waschvorgang in 150  $\mu\text{l}$  Wasser resuspendiert und in 50  $\mu\text{l}$ -Aliquoten aufgeteilt.

#### **b) Beschichtung der Wolfram-Partikel:**

Zu je 50  $\mu\text{l}$  wurden unter kontinuierlichem vortexen zugegeben: 5  $\mu\text{l}$  (5 $\mu\text{g}$  + 5 $\mu\text{g}$  Expressions- und Selektionsplasmid), 50  $\mu\text{l}$  2,5 M  $\text{CaCl}_2$ , 20  $\mu\text{l}$  0,1 M Spermidin (freie Base). Anschließend wurde 3 min lang gevortext, 10 sec zentrifugiert und der Überstand restlos entfernt. Das Pellet wurde dann in 250  $\mu\text{l}$  EtOH aufgenommen und nochmals für 1 min gevortext. Die Wolfram-Partikel wurden mittels 10 sec Zentrifugation pelletiert und in 50  $\mu\text{l}$  EtOH aufgenommen und bis zur Transformation auf Eis aufbewahrt. Pro Macrocarrier wurden 10  $\mu\text{l}$  (~600 ng Plasmid-DNA) Wolfram-Partikel in die Mitte des Carriers pipettiert.

### **2.3.3. Aufbau für die Biolistik-Transformation**

Der für die Biolistik-Transformation notwendige Aufbau wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt und wird schematisch durch die Abb. 2-7 wiedergegeben. Vor der Mündung des Gasbeschleunigungsrohrs wurde eine Berstscheibe (1350 psi) befestigt. Nachfolgend wurde ein Macrocarrier angebracht, auf dem die Wolframpartikel mit der zu transformierenden DNA platziert war. Zuletzt wurde ein Stopingscreen nachfolgend dem Macrocarrier angebracht.

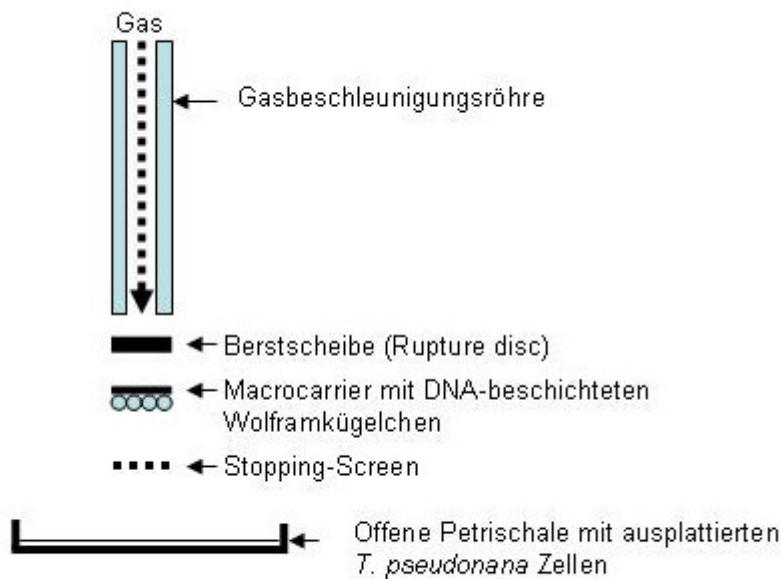


Abb.2-9: Schematischer Aufbau einer PDS-1000/He Particle Delivery System von Biorad.

### **2.3.4. Vorbereitung und Nachbehandlung der *T.pseudonana*-Zellen**

Ein Kolben (1000 ml) mit *T.pseudonana*-Zellen wurde angeimpft und bis zu einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml kultiviert.  $1 \times 10^8$  Zellen wurden abzentrifugiert und diese auf eine MW1-Agarplatte kreisförmig zu einem Rasen(d=5cm) ausplattiert. Nachdem die Zellen ausplattiert waren, konnten Sie für die Biolistik-Transformation verwendet werden.

Nach Beschuss der Zellen wurden diese mit etwas MW1-Flüssigmedium abgewaschen und in MW1/ $\text{NH}_4^+$ -Medium aufgenommen (Zelldichte:  $1 \times 10^6$  Zellen/ml). Nach 24h Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und auf eine MW1/ $\text{NH}_4^+$ /ClonNat-Agarplatte (Selektion: 100 µg Nourseothricin/ml) mittels einem Drigalski-Spatel ausplattiert. Nach ca. 8-10 Tagen waren die ersten Kolonien auf der Platte sichtbar. Die erhaltene Einzelkolonie wurde in 100 ml MW1/ $\text{NH}_4^+$ -Medium angeimpft und zu einer Zelldichte von 500.000 bis 1.000.000 Zellen kultiviert. Nachher wurde die Flüssigkultur abzentrifugiert und die genomische DNA der Transformante aufgereinigt. Durch PCR und Southern-Blot konnte der Erfolg der Transformation der gewünschten Expressionskassette nachgewiesen werden.

### **2.3.5. Induktion und Schnellnachweis der TpNR-Expressionskassette in der cDNA bzw. DNA von *T. pseudonana***

Um tatsächlich nachweisen zu können, dass die in *T. pseudonana* transformierte TpNR-Expressionskassette tatsächlich induzierbar war, wurde die *T. pseudonana* Flüssigkultur (200-500x 10<sup>5</sup> Zellen) in stickstofffreiem MW1 Medium umgesetzt. Nach 24 h wurde der Kultur NO<sub>3</sub><sup>-</sup> hinzugegeben. Nach weiteren 24 h wurde die Kultur abzentrifugiert und die mRNA von dieser Kultur aufgereinigt. Durch RT-PCR konnte mit einem geeigneten Primerpaar die Transkription der TpNR-Expressionskassette nachgewiesen werden. Zum Schnellnachweis der Transformante wurde das Primerpaar so ausgewählt, dass ein Primer komplementär zum Ende des Nitratreduktase-Promoters war und der Gegenprimer komplementär zur *TPS\_41289*- Sequenz. Die in der Transformante gebildete mRNA besitzt am 5'-Ende ein Stück UTR-Sequenz vom TpNR-Vektor die somit durch RT-PCR nachweisbar war und im Wildtyp mittels RT-PCR nicht amplifiziert werden konnte.

### **2.3.6. Southern-Blot**

Für Hybridisierungsexperimente wurde von SOUTHERN (1975) eine Methode etabliert, bei der DNA-Fragmente zunächst im Agarosegel aufgetrennt und dann auf eine Membran (Nitrocellulose bzw. Nylonmembran) transferiert werden. In der hier vorliegenden Arbeit sollte der Transformationserfolg einer TpNR-Expressionskassette in das Genom von *T. pseudonana* durch den Southern-Blot nachgewiesen werden. Hierzu wurden ca. 2-5 µg genomische DNA mit *Xba*I verdaut, in 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran (Hybond-N, GE Healthcare) mit 20x SSC-Puffer übertragen.

Der Aufbau des Kapillarblots erfolgte nach Standardprotokollen (G. SCHRIMPF 2002 bzw. SAMBROOK et al.). Für den Southern Transfer musste das Gel speziell behandelt werden: Zunächst wurde das Gel 15 min in 250 mM HCl depuriniert und anschließend für 30 min in einer Denaturierungslösung geschwenkt. Danach wurde das zu blottende Gel für zweimal 15 min in Neutralisierungslösung inkubiert. Der Southern-Transfer wurde über Nacht (ca. 16 h) durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die Membran 5-10 min bei 80°C getrocknet und dann mit einem Stratalinker UV-Licht bestrahlt (120.000 mJxcm<sup>2</sup>), das zum Ziel hatte, die DNA auf der Membran kovalent zu immobilisieren.

### **2.3.7. Anfärbung der Nylonmembran**

Damit im späteren Verlauf des Experimentes nachvollzogen werden kann, in welchem DNA-Fragment die radioaktive Sonde hybridisiert, wurde ein 2-Log-DNA Standard mitgeblottet. Um diesen auf der Membran sichtbar zu machen, wurde die Nylonmembran mit Methylenblaufarbelösung 10 min durch schwenken angefärbt und danach unter fließendem Wasser abgewaschen. Die einzelnen angefärbten Fragmentabstände des DNA-Längenstandards konnten mit dem Lineal vermessen werden.

### **2.3.8. Herstellung einer <sup>35</sup>S-markierten DNA-Sonde**

Das für die DNA-Sonde notwendige DNA-Fragment wurde mittels geeigneter Primer aus dem Plasmid TpNR-41289 bzw. amplifiziert. Die radioaktive Markierung der Sonde erfolgte durch eine sogenannte „Random priming“-Reaktion.

Hierzu wurden (Reaktionsvolumen: 20µl):

- 2 µl Zufallshexamer (OD<sub>260nm</sub>= 50)
- 200 ng PCR-Amplifikat zusammenpipettiert und die Komponenten für 3 min bei 95°C erhitzt und danach für 1 min auf Eis behalten.

Danach wurden 2µl 10x Klenow-Puffer und je 1 mM dGTP, dCTP, dTTP und 20 µCi α-(<sup>35</sup>S)-dATP, sowie 5 U Klenow-Enzym hinzugegeben und die Reaktion bei 30°C für 1h durchgeführt. Nach dieser Inkubation wurden der Reaktion 1mM dATP hinzugefügt und nochmals bei 30°C für 30 min inkubiert. Nach dem Random-priming wurde 1 µl für die Radioaktivitätsmessung entnommen und der verbleibende Rest der radioaktiv markierten Sonde mit dem Qiaquick-PCR-Purificationkit in einem Volumen von 50 µl aufgereinigt. Nach dem Reinigungsschritt wurde ebenfalls 1 µl für die Radioaktivitätsmessung entnommen.

### **2.3.9. Radioaktivitätsmessung**

Die Radioaktivitätsmessung von je 1 µl der <sup>35</sup>S-markierten Sonde erfolgte im β-Counter mit dem <sup>35</sup>S-Programm.

### **2.3.10. DNA-DNA-Hybridisierung mit $^{35}\text{S}$ -markierter DNA-Sonde**

Die geblottete Nylonmembran wurde in einem 50 ml-Falconrörchen überführt und mit 3 ml Prähybridisierungslösung bei 65°C für 6 h in einem Hybridisierungsofen gerollt. Nach der Vorhybridisierung wurde die Prähybridisierungslösung verworfen und durch 3 ml Hybridisierungslösung ersetzt. Die radioaktive Sonde wurde für 5 min bei 95°C denaturiert und dann auf Eis für 2 min gestellt. Es wurde pro Hybridisierung 6x  $10^6$  cpm denaturierte DNA-Sonde zur Hybridisierungslösung hinzugegeben und für 16-20 h bei 65°C hybridisiert.

Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Lösung verworfen und die Membran mit 25 ml Southern-Waschpuffer 1 abgespült, dann nochmals mit 25 ml Southern-Waschpuffer 1 bei Raumtemperatur für 15 min gewaschen. Der Waschpuffer wurde danach entfernt und durch den Southern-Waschpuffer 2 ersetzt mit dem für 15 min bei 65°C im Hybridisierungsofen ein zweites Mal gewaschen wurde. Nach diesen Waschschriften wurde die Membran zum Zweck der autoradiographischen Detektierung auf einen Phosphoimager-Screen (BAS-III, 20x40 cm) für 1-3 Tage aufgelegt und ausgewertet.

## **2.4. Proteinbiochemische Methoden**

### **2.4.1. Herstellung von decarboxyliertem S-Adenosylmethionin**

Die Präparation von decarboxyliertem S-Adenosylmethionin erfolgte, mit einigen Modifikationen, nach ZAPPIA et al. (1977). Es wurden für die Decarboxylierungsreaktion 10 µmol von kommerziell erhältlichem S-Adenosylmethionin mit 100 mM Tris/HCl, pH 7,5 und 0,5 mM DTT, 100 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,5) und 500 µl zellfreien Rohextrakt von überexprimierter S-Adensylmethionin-decarboxylase aus *E. coli* (MARKHAM et al. 1982) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Reaktion wurde der enzymatische Ansatz hitzedenaturiert (5 min, 95°C) und abzentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde mit 6 N HCl auf pH 4,5 eingestellt und bei 110°C für 1h erhitzt, um nicht decarboxyliertes S-Adenosylmethionin in MTA und Homoserin zu hydrolysieren. Nach der Hydrolyse wurde der Ansatz mit 1 M NaOH neutralisiert. Um das decarboxylierte S-Adenosylmethionin in reiner Form zu gewinnen, wurde der Ansatz mit 500 µl AG 50W X8 Resin vermischt und für 30-60 min bei 4°C geschüttelt, um eine gute Bindung an das Resin zu gewährleisten. Nach der Bindung wurde das Resin samt Überstand auf eine

Gravitationsdurchflußsäule gegeben. Das Resin wurde mit 10 Bettvolumen 100 mM NaCl gewaschen um Homoserin zu eluieren, danach wurde mit 10 Bettvolumen 2 N HCl gewaschen um MTA von dem Säulenmaterial abzutrennen. Reines decarboxyliertes S-Adenosylmethionin wurde durch das Eluieren mit 10 Bettvolumen 6 N HCl gewonnen. Die überschüssige HCl wurde quantitativ am Rotationsverdampfer abgezogen und das decarboxylierte S-Adenosylmethionin in ca. 300 µl H<sub>2</sub>O gelöst und mit NaOH auf pH 7 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### **2.4.2. SDS- und Native Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE bzw. Native PAGE)**

Die SDS-PAGE dient der denaturierenden Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht in Anwesenheit von SDS in einem elektrischen Feld (Laemmli 1970). Das anionische Tensid SDS bindet an das hitzedenaturierte Protein und sorgt dafür, dass die Eigenladung des Proteins überdeckt wird. Aufgrund dieser Tatsache ist die Ladungsverteilung der aufzutrennenden Proteine gleich.

Bei der Nativen PAGE werden hingegen Proteine aufgetrennt, die ihre natürliche Konformation beibehalten und deshalb Rückschlüsse auf Bildung von Proteinkomplexen liefern. Bei dieser Methodik wird das Protein anders als bei der SDS-PAGE nicht nur nach seiner Größe aufgetrennt, sondern nach der Proteineigenladung und Größe. Die Wahl des Puffersystems ist aus diesem Grund vom pI des zu analysierenden Proteins abhängig.

Für die PAGE wurden selbstgegossene Gele verwendet. Zuerst wurde ein Trenngel gefertigt, das eine Acrylamidkonzentration abhängig von der Größe des aufzutrennenden Proteins aufwies. Nach dem auspolymerisieren des Trenngels wurde ein Sammelgel mit Probentaschen gegossen, das zum Probenauftrag diente.

Die zu applizierende Proteinprobe wurde mit 1/5 Vol eines 5x SDS-Probenpuffers versetzt und hitzedenaturiert (3 min, 95°C), um Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen. Das im Probenpuffer enthaltene DTT sorgt zudem für eine effiziente Reduzierung etwaiger Disulfidbrücken. Die hitzedenaturierten Proteinproben wurden in die Probentasche des Sammelgels pipettiert und die Elektrophorese konnte mit einer Stromstärke von 30 mA für 1h durchgeführt werden. Für die Größenbestimmung von Proteinen wurde standardmäßig pro

SDS-Minigel 7,5 µl von einer Standard-Proteinleiter von Fermentas verwendet, die eine Größenbestimmung von 14,4-116 kDa zulässt.

Zur Sichtbarmachung von Proteinbanden wurde das Polyacrylamidgel mit Coomassie R 250 gefärbt, fixiert und anschließend zur Entfernung überschüssigen Farbstoffs in einer Entfärbelösung geschwenkt.

#### **2.4.3. Elektrophoretischer Proteintransfer auf eine PVDF-Membran**

Zum Zweck der N-terminalen Sequenzierung eines Proteins wurde das Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Polyvinylidendifluoridmembran übertragen: Eine PVDF-Membran und 6 Whatmanpapiere wurden auf Gelgröße zugeschnitten. Die Whatmanpapierstreifen wurde vor dem Transfer in Boratpuffer äquilibriert, während die PVDF-Membran zunächst 30 min in Methanol und dann nochmals 30 min in Boratpuffer äquilibriert wurde. Auf die Anodenplatte der Blotapparatur wurden luftblasenfrei zunächst drei Papierstreifen aufeinandergelegt, das SDS-Gel darauf platziert und mit der PVDF-Membran überdeckt. Zum Abschluss wurden auf die Membran nochmals drei Papierstreifen übereinander aufgelegt. Danach wurde die Kathodenplatte auf den Blotaufbau platziert und die Apparatur mit einer Stromstärke von 2 mA pro cm<sup>2</sup> Gelfläche für 1 h betrieben.

Danach wurde der Blot abgebaut und die Membran mit Coomassie-Färbelösung (0,1% Coomassie Brillant Blau R 250, 50 % Methanol) angefärbt. Der überschüssige Farbstoff wurde von der Membran mit 50 % Methanol/ 10 % Essigsäure entfernt und mit Wasser nachgespült. Die gewünschte Proteinbande wurde daraufhin sichtbar und konnte mit einem Skalpell ausgeschnitten und an die Arbeitsgruppe Deutzmann zur N-terminalen Proteinsequenzierung weitergereicht werden.

#### **2.4.4. Gelfiltration an Superose 6**

Das Molekulargewicht des gereinigten 41289-Proteins wurde durch Gelfiltration an einer Superose 6-Säule (3 x 30 cm) bestimmt. Die Äquilibrierung und Elution erfolgte mit 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 und 150 mM NaCl bei einer Flussrate von 0,4 ml/ min. Die Absorption des Durchflusses wurde bei A<sub>224nm</sub> bestimmt und mit einem angeschlossenen Schreiber aufgezeichnet. Zur Bestimmung von Molekulargewichten bei der Gelfiltration wurden die

Verteilungskoeffizienten ( $k_{AV}$ ) verschiedener Standardproteine bestimmt. Der Verteilungskoeffizient wurde folgendermaßen berechnet:

$$k_{AV} = (V_E - V_0) / (V_t - V_0)$$

$V_E$ = Elutionsvolumen des Proteins

$V_t$ = Ausschlussvolumen der Säule (Bestimmt mit Dextran-Blau 2000)

$V_0$ = Gesamtvolumen der Säule

#### **2.4.5. Proteinbestimmung von löslichem Protein nach Bradford**

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der von BRADFORD (1976) beschriebenen Methode.

Die Eichgerade wurde mit BSA in einem Bereich von 0 bis 20 µg erstellt. Das Probenvolumen von 20 µl wurde mit 1 ml Bradfordreagenz gevortext, 5 min bei Raumtemperatur stehengelassen und danach in einer Einmalküvette mit der Schichtdicke von  $d= 1 \text{ cm}$  gegen einen Leerwert die Extinktion bei 595 nm bestimmt.

#### **2.4.6. Gewinnung von zellfreien Rohextrakt aus Diatomeenzellen**

Mit Erreichen der postexponentiellen Wachstumsphase wurde 1 l Diatomeenkultur abzentrifugiert bzw. abgefiltert und pelletiert. Die Zellen wurde in 400 µl 100 mM Tris pH 8,0 aufgenommen und vorsichtig mit Glasperlen ( $d= 0,3 \text{ mm}$ ) gevortext bzw. geschüttelt, mit dem Ziel die Zellen zu öffnen. Das Zellysat wurde an einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert (4°C, 10 min, 14000 rpm) und der Überstand vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

#### **2.4.7. Gewinnung und Isolierung rekombinant exprimierter 6xHis-Tag-Proteine**

Die putativen N-Aminopropyltransferase-Sequenzen wurden entweder im pET-20b-Vektor bzw. im pQE-30 UA-Vektor kloniert und in den jeweilig passenden *E. coli*-Expressionsstamm transformiert und auf einer LB-Platte mit Selektionsdruck ausgestrichen. Eine Einzelkolonie

von einem Expressionsstamm wurde gepickt und in 10 ml LB-Vorkultur überimpft und bei 37°C über Nacht angezogen. 50 ml bzw. bis 1 l LB Medium wurde mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer  $OD_{600\text{ nm}} = 0,6$  kultiviert. Durch Zugabe von 1 mM IPTG erfolgte die Induzierung der Überexpression des rekombinanten Proteins für 15 h bei 18°C. Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert, entsprechend dem Kulturvolumen 100x fach in His-Tag-Bindepuffer aufkonzentriert und mit dem Ultraschallgerät lysiert. Die Zelltrümmer wurden vom Zellrohextrakt mit einer Zentrifuge abgetrennt. Für 50 ml Zellrohextrakt wurden 25 µl Ni-NTA-Agarose-Resin eingesetzt.

#### **2.4.8. Miniverfahren**

Die Bindung erfolgte in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß im Volumen von 1 – 2 ml für mindestens 1h bei 4°C unter langsamen Rollen des Gefäßes. Das Gefäß wurde zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dann wurde das Resin mindestens zweimal mit je 1 ml His-Tag-Waschpuffer (20 mM Imidazol) gewaschen, abzentrifugiert und entfernt. Die Elution des 6xHis-Tag-Proteins vom Resin erfolgte durch dreimaliges Waschen mit je 50 µl His-Tag-Elutionspuffer (300 mM Imidazol).

#### **2.4.9. Großverfahren**

Die Bindung erfolgte mittels einer Gravitationsdurchflußsäule mit einer Flussrate von 0,5 ml/min. Nach der Bindung wurde das Protein stufenweise mit 5 Bettvolumen 20 mM, 30 mM und 60 mM Imidazol His-Tag-Waschpuffer gewaschen und die Waschfraktionen gesammelt. Die Elution mit Elutionspuffer (300 mM Imidazol) erfolgte mit 5 Bettvolumen. 1/10 bis 1/20 Vol einer Fraktion wurde genommen und mit 1/10 Vol 100% Trichloressigsäure versetzt, um das Protein zu püzipitieren und aufzukonzentrieren und mittels SDS-PAGE auf Ausbeute und Reinheit hin zu untersuchen. Die Fraktionen, in denen das Protein besonders sauber vorhanden war, wurden gepoolt und aufkonzentriert.

#### **2.4.10. Umpufferung, Diafiltration und Aufkonzentrierung von Protein**

Kleine Volumina (100 µl) von Proteinlösungen konnten mittels Slide-A-Lyzer MINI-Dialysis Unit für 1 h gegen 1 l 20 mM Tris, pH 7,5 mit 5 mM β-Mercaptoethanol dialysiert werden.

Volumina von 300-500 µl Proteinlösung wurden mit einer HiTrap-Column (5 ml) gegen 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 mit 5 mM β-Mercaptoethanol umgepuffert.

Größere Proteinvolumen wurden mit einem iCON-Concentrator (7 ml capacity 20K MWCO) aufkonzentriert und gegen 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 mit 5 mM β-Mercaptoethanol diafiltriert und auf ein geeignetes Volumen aufkonzentriert.

#### **2.4.11. N-Aminopropyltransferasetest**

Zur Durchführung eines N-Aminopropyltransferasetests zum Nachweis einer N-Aminopropyltransferaseaktivität wurde das gereinigte Enzym in 100 mM Tris/ HCl, pH 7,5 mit decarboxyliertem S-Adenosylmethionin im Überschuss und 23,14 pmol (entspricht 5500 dpm) [1,4-<sup>14</sup>C]-Putrescin, [<sup>14</sup>C]Spermidin bzw. [<sup>14</sup>C]-Diaminopropan einem Volumen von 150 µl bei 30°C für 1 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzedenaturierung gestoppt (10 min, 95°C).

#### **2.4.12. Aufreinigung <sup>14</sup>C-markierter Polyamine aus dem Enzymansatz**

Die hitzedenaturierte Probe wurde abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Zu der Probe wurde 1 Vol Methanol/Chloroform (3:2) hinzupipettiert und gevortext. Zur besseren Phasentrennung wurde die Probe für 5 min mit einer Tischzentrifuge (14000 rpm) zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und an einer Speedvac mit angelegtem Vakuum wurde die Methanol-Wasserphase verdampft, so dass am Ende ein kleines Pellet übrig blieb. Das Pellet wurde in 100 µl Methanol aufgenommen, resuspendiert und auf eine Kieselgel-DC-Platten in einer Linie der Breite von 1,5 cm aufgetüpfelt.

#### **2.4.13. Dünnschichtchromatographie zur Identifizierung <sup>14</sup>C-markierter Polyamine**

Für die hier vorliegende Arbeit wurde eine DC-Methodik zur Identifikation radioaktiv markierter Polyamine verwendet, die von SHIRAHATA et al. (1983) entwickelt wurde. Zur Unterscheidbarkeit von Putrescin, Spermidin bzw. Spermin/Thermospermin wurde ein Butanol-Essigsäure-Pyridin-Wassergemisch (BAPW-Laufmittel) im Verhältnis 3:3:2:1 verwendet. Die Isomere Spermin und Thermospermin waren im BAPW nicht voneinander

unterscheidbar, jedoch aber in einem Butanol-Essigsäure-Pyridin-Formaldehydgemisch (BAPF-Laufmittel), das im Verhältnis 3:3:2:1 angesetzt wurde.

Für die DC wurden Kieselgel-DC-Platten verwendet. Der DC-Lauf war auswertbar sobald die Laufmittelfront 2/3 der DC-Plattenlänge erreichte. Die DC-Platte wurde nach dem Lauf trocken geföhnt und auf einen BASIII-Screen (20x40 cm) mind. 2h bis über Nacht aufgelegt.

#### **2.4.14. Isolierung von Polyaminen aus Zellextrakt von *T. pseudonana***

*T. pseudonana* wurde in MW1 in einem Volumen von 40 l angeimpft und mit Erreichen der stationären Phase geerntet. Im Durchschnitt wurde ein Nasszellgewicht von ca. 5-6 g Zellen erhalten. Das Zellpellet wurde in 5 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert, mit Ultraschallimpulsen behandelt und zusätzlich mit einem Vol 12 M HCl versetzt und über Nacht bei 110°C in einem Ofen inkubiert. Danach wurde das Zellysat abzentrifugiert und der Überstand in einem Rundkolben überführt und die HCl mittels Rotationsverdampfer entfernt. Der im Rundkolben zurückgebliebene Rückstand wurde in 10 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit NaOH neutralisiert und durch einen Papierfilter filtriert. Der neutralisierte und filtrierte Extrakt wurde mit 1 l H<sub>2</sub>O vermischt, um etwaig enthaltene Salze herunterzuverdünnen (zur Verbesserung der HiS-Bindung). Für die Bindung von Polyaminen wurde 0,4 ml HiS-Resin zur Lösung hinzugegeben und über Nacht bei 4°C gerührt. Das Resin wurde mit einem Schlauch und einer daran angeschlossenen Gravitationsflußsäule abfiltriert. Das isolierte HiS wurde dann mit 3 Bettvolumen H<sub>2</sub>O, 3 Bettvolumen 50 mM Ammoniumacetat gewaschen, die Eluierung der Polyamine erfolgte mit 3 Säulenvolumen 2 M NH<sub>3</sub>-Lösung. Das Eluat wurde mit 4 M Essigsäure neutralisiert. Zur Entfernung von Ammoniumacetat wurde das Reaktionsgefäß mit der Polyaminprobe in einer Gefriertrocknungsanlage bzw. in einer Vakuumzentrifuge exponiert.

**2.4.15. Perethylierung von Polyaminproben aus *T. pseudonana***

Die Polyamine wurden wie in Kap. 2.4.14. beschrieben isoliert und nach der Lyophilisierung mit 70 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl 500 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7), 10 µl 1 M NaCNBH<sub>3</sub> und 10 µl 1 M Acetaldehyd versetzt und die Perethylierungsreaktion über Nacht bei 25°C durchgeführt. Die Probe wurde danach zweimal mit 1 Vol CHCl<sub>3</sub> extrahiert, wobei die untere Phase gesammelt wurde. Mit offenem Deckel wurde das Reaktionsgefäß mit der Probe zugluft sicher stehengelassen, bis das CHCl<sub>3</sub> verdampft war. Danach wurde die perethylierte Polyaminprobe zur MALDI-TOF-Analyse an die Arbeitsgruppe DEUTZMANN weitergegeben

### **3. Experimente und Ergebnisse**

#### **3.1. Identifikation zweier N-Aminopropyltransferassequenzen aus dem Genom von *T. pseudonana***

Im Jahr 2004 wurde das Genom der Diatomee *T. pseudonana* durchsequenziert und die gewonnenen Daten in der Sequenzdatenbank von „Doe Joint Genome Institute (JGI)“ zur Verfügung gestellt (ARMBRUST et al., 2004). In dieser Datenbank konnte durch eine allgemeine Suchfunktion durch Eingabe der Begriffe „*spermidine synthase*“ bzw. „*spermine synthase*“ 21 Genmodelle mutmaßlicher Aminopropyltransferasen gefunden werden (Stand: 2004, siehe Anhang). Aufgrund der relativ hohen Anzahl dieser Genmodelle wurde hypothetisiert, dass es in *T. pseudonana* neben Spermidin- und Sperminsynthasen noch weitere Polyaminsynthasen geben könnte, die für die Synthese langkettiger Polyamine, welche in der Silikatschale gefunden wurden, zuständig sind. Diese 21 Sequenzen verfügen in der Datenbank über teilweise vollständige offene Leserahmen und besitzen in variabler Form das für Spermin- und Spermidinsynthasen typische Sequenzmotiv „GGGDG“, das als typisches Motiv verschiedener N-Aminopropyltransferasen gilt (KOROLEV et al., 2002).

##### **3.1.1. Datenbankanalyse**

Die erhaltenen Genmodelle wurden zunächst gegeneinander mit einem Alignmentprogramm verglichen, um nachzuweisen, ob bestimmte DNA-Sequenzen mehrfach unter verschiedener Genmodellbenennung vorhanden sind. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die vorher angenommenen 21 Genmodelle nur 10 unterschiedliche putative N-Aminopropyltransferasen in *T. pseudonana* entsprechen (siehe Abb. 3-1 und Anhang).

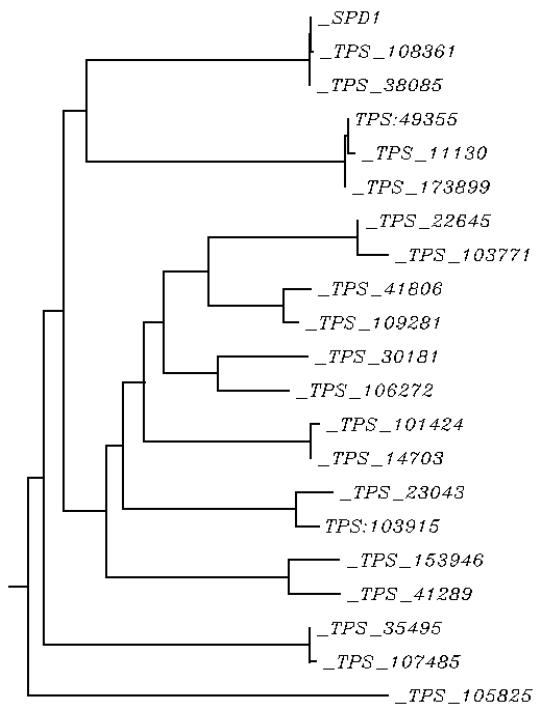


Abb. 3-1: Ergebnis des gegenseitigen Alignments der 21 Genmodelle putativer N-Aminopropyltransferasesequenzen zum Nachweis von Homologien.

### **3.1.2. Transkriptionsanalyse der putativen N-Aminopropyltransferasen durch RT-PCR**

Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurde geprüft, ob die gefundenen Genmodelle auch tatsächlich transkribiert werden. Hierfür wurde mRNA von *T. pseudonana* aufgereinigt, in cDNA revers transkribiert und damit eine PCR zum Nachweis der Existenz der Sequenzen auf Transkriptionsniveau durchgeführt. Durch die RT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass die Sequenzen *TPS\_108361*, *TPS\_41289*, *TPS\_101424*, *TPS\_106272*, *TPS\_41806*, *TPS\_11130*, *TPS\_22645*, *TPS\_35495* unter Kulturbedingungen transkribiert werden, jedoch nicht die Sequenzen *TPS\_23043* bzw. *TPS\_105825* (siehe Abb. 3-2).

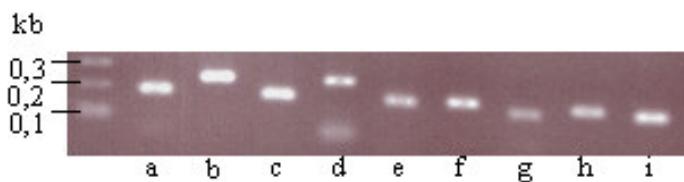


Abb. 3-2: Erhaltene PCR-Amplifikate nach durchgeföhrter RT-PCR zum Nachweis der Transkription. (a) *TPS\_108361*, (b) *TPS\_41289*, (c) *TPS\_101424*, (d) *TPS\_106272*, (e) *TPS\_41806*, (f) *TPS\_11130*, (g) *TPS\_22645*, (h) *TPS\_35489*, (i)  $\beta$ -Tubulingen (Positivkontrolle).

### **3.1.3. Multiples Alignment der putativen N-Aminopropyltransferasen mit bekannten Spermidin- und Sperminsynthasen auf Proteinebene**

Die auf Transkription hin positiv getesteten Sequenzen wurden dann gegen bekannte N-Aminopropyltransferasen auf Proteinebene verglichen, da anzunehmen war, dass einige der vermuteten N-Aminopropyltransferasesequenzen aus der Datenbank eine geringe Homologie zu den bekannten N-Aminopropyltransferasen aufweisen und vermutlich deshalb eine andere Funktion haben könnten als von der Sequenzdatenbank ursprünglich angegeben.

Mit dem Programm Clustalw (<http://align.genome.jp>) wurde ein Dendogramm erstellt, bei dem zu sehen ist, dass die Aminosäuresequenz *TPS\_41289* eine hohe Homologie zu der ACL5-Gruppe (mutmaßliche N-Aminopropyltransferasen mit Ähnlichkeit zu ACL5 aus *Arabidopsis thaliana*) aufweist (siehe Abb. 3-3).

Die Sequenz *TPS\_108361* hingegen zeigte eine verhältnismäßig hohe Homologie zu bekannten Spermidin- und Sperminsynthasen (Spermidin-/Sperminsynthasegruppe), wie zum Beispiel zu der Spermidinsynthase von *S. cerevisiae* (HAMASAKI-KATAGIRI et al., 1997 und 1998) und *C. elegans* (DUFE et al., 2005).

Die restlichen von der JGI-Sequenzdatenbank erhaltenen putativen Polyaminsynthasesequenzen wiesen relativ geringe Homologien zu bekannten N-Aminopropyltransferasen auf. Diese Sequenzen wurden, nachdem die ORF vollständig ermittelt wurden, heterolog überexprimiert und auf N-Aminopropyltransferaseaktivität hin getestet, wobei mit den zur Verfügung stehenden Substraten [<sup>14</sup>C]-Spermidin, [<sup>14</sup>C]-Putrescin, [<sup>14</sup>C]-1,3-Diaminopropan und dcSAM keinerlei Aktivität gemessen werden konnte (diese Daten sind hier nicht weiter aufgeführt).

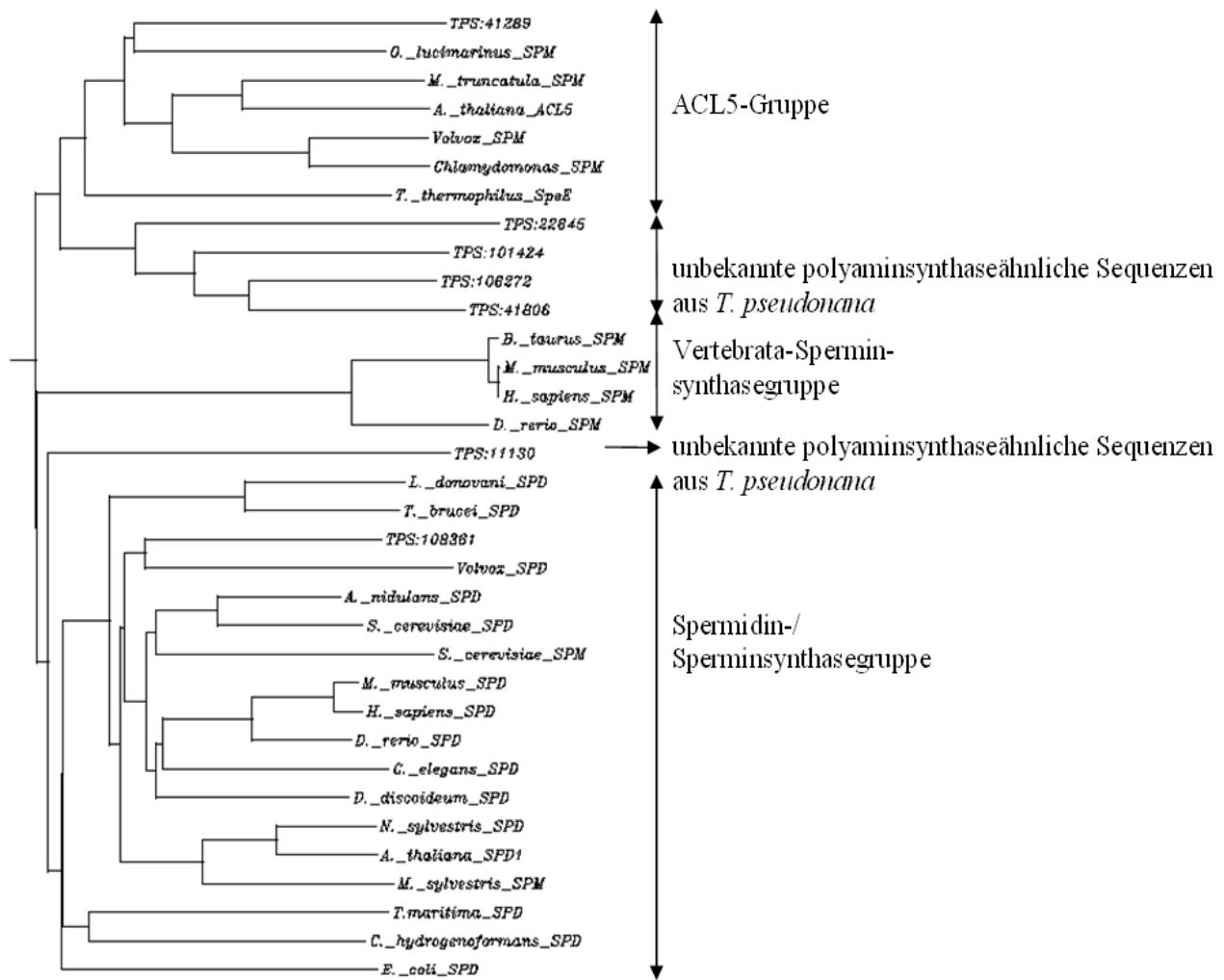


Abb. 3-3: Mit Clustalw erstelltes Dendrogramm zum Homologienachweis verschiedener N-Aminopropyltransferase-Aminosäuresequenzen (*Ostreococcus lucimarinus*\_SPM (Akzession: XP\_001418368), *Medicago truncatula*\_SPM (Akzession: ABE91714), *Arabidopsis thaliana*\_ACL5 (Akzession: BAB83652), *Volvox carteri*\_SPM (JGI-Homepage/Location: Volca1/scaffold\_43:3068-5049), *Chlamydomonas reinhardtii*\_SPM (JGI-Homepage/Location: Chlre3/scaffold\_3:2829617-2833126), *Thermus thermophilus*\_SpeE (Akzession: YP\_004447), *Bos taurus*\_SPM (Akzession: NP\_001030548), *Danio rerio*\_SPM (Akzession: CAA08902), *Mus musculus*\_SPM, *Homo sapiens*\_SPM, *Leishmania donovani*\_SPD (Akzession: AAG24612), *Trypanosoma brucei*\_SPD (XP\_827124), *Volvox carteri*\_SPD (JGI-Homepage/Location: Volca1/scaffold\_3:194980-197821), *Aspergillus nidulans*\_SPD (Akzession: AAL11443), *Saccharomyces cerevisiae*\_SPD (Akzession: AAC17191), *Saccharomyces cerevisiae*\_SPM (Akzession: AAC19368), *Mus musculus*\_SPD (Akzession: NP\_033298), *Danio rerio*\_SPD (Akzession: NP\_957328), *Caenorhabditis elegans*\_SPD (Akzession: CAC37332), *Dictyostelium discoideum*\_SPD (Akzession: AAD32851), *Nicotiana sylvestris*\_SPD (Akzession: BAA24535), *Arabidopsis thaliana*\_SPD1 (Akzession:

NP\_973900), *Malus sylvestris*\_SPM (Akzession: BAE19758), *Thermotoga maritima*\_SPD (Akzession: AAD35738), *Carboxydothermus hydrogenoformans*\_SPD (Akzession: YP\_360078), *Escherichia coli*\_SPD (Akzession: AP\_000782)).

### **3.1.4. Aminosäuresequenzanalyse von TPS\_108361 und TPS\_41289**

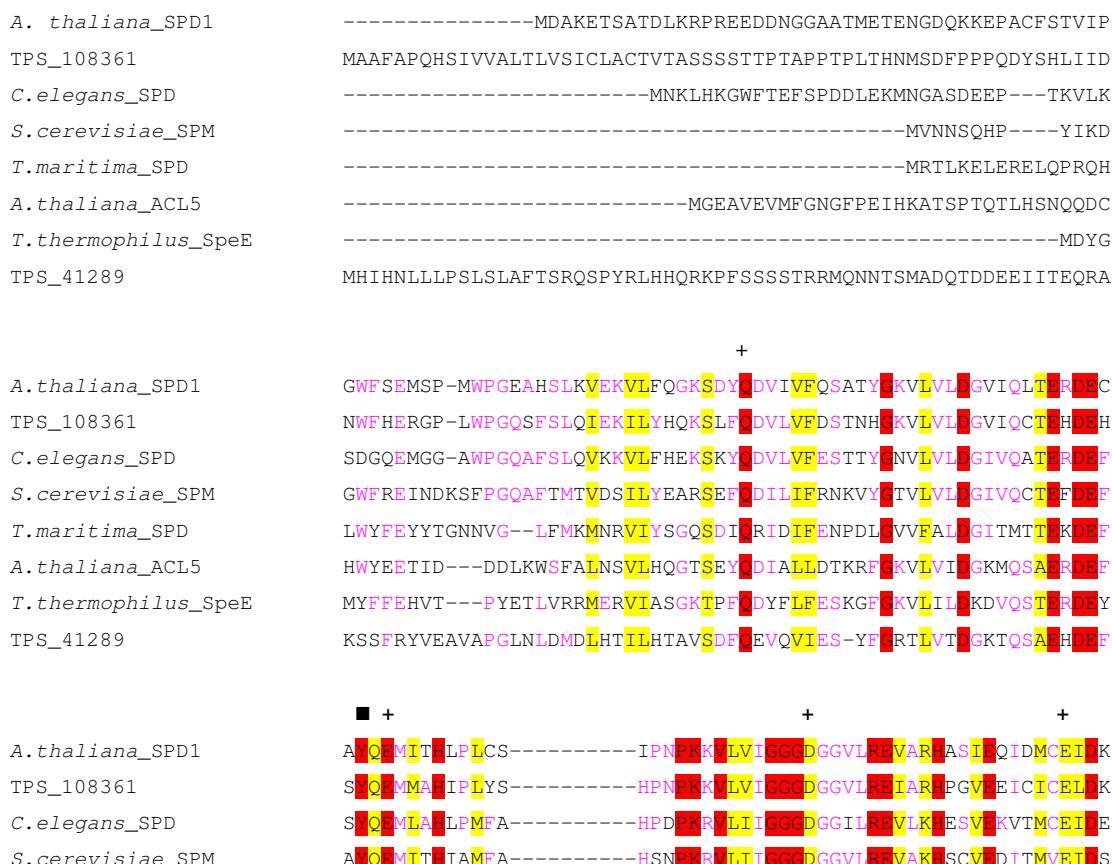
Das Genmodell der *TPS\_108361*-Sequenz weist einen vollständigen Leserahmen der Länge von 1032 bp auf und enthielt keine Introns (Nukleotidsequenz, siehe Anhang). Die tatsächliche Länge der *TPS\_108361*-cDNA wurde mit einer PCR überprüft, wobei die Vorhersage der Datenbank bezüglich der nicht vorhanden Introns und der tatsächlichen Länge der Sequenz positiv verifiziert wurde. *TPS\_108361* codiert für ein Protein mit der Länge von 343 Aminosäuren (siehe Anhang). Mit dem Online-Programm Swissprot ([http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)) wurde für das *TPS\_108361*-Protein eine theoretische molekulare Masse von 37748.37 Da und ein pI von 5,72 berechnet.

Die Nukleotidsequenz *TPS\_41289* war in der Genomdatenbank von *T. pseudonana* nur unvollständig durch zwei unterschiedliche Genmodelle, *TPS\_41289* und *TPS\_153946*, dargestellt (siehe Abb. 3-1). Das Genmodell *TPS\_41289* wies einen unvollständigen offenen Leserahmen von 864 bp auf, während das Genmodell *TPS\_153946* einen unvollständigen Leserahmen von 825 bp enthielt, das zudem 3 Introns aufwies. Mit der cDNA von *T. pseudonana* wurde eine 5'- und 3'-RACE-PCR durchgeführt, um eine vollständige *TPS\_41289*-cDNA-Sequenz zu erhalten. Hierbei wurde, im Gegensatz zu den Genmodellen, ein vollständiger offener Leserahmen von 1263 bp herausgefunden, welches ebenso wie die *TPS\_108361*-Sequenz keine Introns enthielt (siehe Anhang). *TPS\_41289* codiert für ein Protein mit 420 Aminosäuren mit einer theoretischen molekularen Masse von 46994,99 Da und einem pI von 5,49.

Es wurde weiterhin die Konsensussequenz der N-Aminopropyltransferasen, hier im Besonderen der Spermidin-/Sperminsynthasegruppe und die der ACL5-Gruppe miteinander verglichen, um Unterschiede und Gemeinsamkeiten der *TPS\_108361* und *TPS\_41289*-Sequenz zu zeigen.

KOROLEV et al. (2002) klärten die Struktur der Spermidinsynthase aus *T. maritima* im Komplex mit dem Inhibitor AdoDATO auf, wobei wichtige Sequenzmerkmale gezeigt werden konnten, die für die Substratbindung wichtig sind (siehe Einleitung).

In Abb. 3-4 wurde ein Vergleich zwischen den Sequenzen der SPDS/SPMS-Gruppe und der ACL5-Gruppe dargestellt. In der SPDS/SPMS-Gruppe liegt die glycinreiche Bindestelle für dcSAM ( $VL^V_IIGGGDGG-X-LRE$ ) nahezu konserviert in dieser Gruppe vor. In der ACL5-Gruppe hingegen variiert diese Erkennungssequenz ( $V-X-I-X-GGGE-X_4-RE$ ). In der ACL5- und SPDS/SPMS-Gruppe, damit bezogen auch auf die TPS\_41289 und TPS\_108361-Sequenz, liegen die für die Bindung des dcSAM notwendigen Aminosäuren konserviert vor (Kennzeichnung in Abb. 3-4: „+“). Ebenso findet sich bei den N-Aminopropyltransferasen das Aspartat konserviert vor, das für die Deprotonierung der zu aminopropylierenden Polyaminaminogruppe zuständig sein soll (Kennzeichnung in Abb. 3-4: „↓“). Weiterhin konnten die für die Polyaminbindung als wichtig erkannten Aminosäuren Tyrosin und Apartat auch bei den Sequenzen TPS\_108361 und TPS\_41289 identifiziert werden, die bei allen N-Aminopropyltransferasen konserviert vorkommen (Kennzeichnung in Abb. 3-4: „■“).



*T.maritima*\_SPD      M<sub>YHEMLA</sub>HVP<sub>MFL</sub>-----HPN<sub>EKKVLI</sub>I<sub>GGGDGGTL</sub>REV<sub>LKHD</sub>S<sub>VEKAILC</sub>EV<sub>DG</sub>

*A.thaliana*\_ACL5      I<sub>YHECLIP</sub>A<sub>PALLF</sub>-----HPN<sub>EKTVFIM</sub>GGGE<sub>GSAAREIL</sub>KHTTIE<sub>KVV</sub>MC<sub>DIQ</sub>

*T.thermophilus*\_SpeE      I<sub>YHETLVH</sub>P<sub>AMLT</sub>-----HPE<sub>EKRVLIV</sub>GGCE<sub>GATI</sub>REV<sub>LKHP</sub>VE<sub>KAVMV</sub>DI<sub>DG</sub>

TPS\_41289      V<sub>YHESLVP</sub>A<sub>LPAL</sub>FWSAILSGESGQGGAF<sub>KS</sub>VFIG<sub>GGCE</sub>LATA<sub>REVLR</sub>R<sub>STI</sub>ERCV<sub>MVDI</sub>DP

+    ■    ↓

*A.thaliana*\_SPD1      MVVDVS<sub>KQFFP</sub>DVAIG--YE<sub>DP</sub>RVN<sub>LVIGD</sub>GVAF<sub>LKN</sub>---AAEGS<sub>YDAVIV</sub>SSDP---

TPS\_108361      DVIDVS<sub>KKYL</sub>P<sub>FMAGK</sub>--FDDP<sub>RVKVHIMD</sub>GAKF<sub>ME</sub>----ENQSA<sub>FDIVIT</sub>TDSSDP---

*C.elegans*\_SPD      MVIDVAKKF<sub>LPGM</sub>SCG--F<sub>SHPKLD</sub>LFCG<sub>DGF</sub>E<sub>FLK</sub>---NHKNE<sub>FDIVII</sub>TDSSDP---

*S.cerevisiae*\_SPM      SVIELSRKFL<sub>PLTLSNGA</sub>-FDDER<sub>LIDLKLC</sub>DGF<sub>KFLQD</sub>IGASDVHK<sub>KFDVII</sub>TDSSDP---

*T.maritima*\_SPD      LVIEAARKY<sub>LKQTSCG</sub>--FDDP<sub>RAEIVI</sub>ANGAEY<sub>VR</sub>----KFKNE<sub>FDVIIID</sub>STDPT--

*A.thaliana*\_ACL5      EVVDFCRR<sub>FLTVNSD</sub>-A<sub>FCNK</sub>K<sub>LELV</sub>I<sub>DAKAE</sub>LE----KREEKF<sub>DIIIVG</sub>LA<sub>DPVE</sub>-

*T.thermophilus*\_SpeE      ELVEVA<sub>AKRHMPEWHQGA</sub>-FDDP<sub>RAVLVID</sub>DARAY<sub>LE</sub>----RTEERY<sub>DVVIID</sub>LTD<sub>DPVG</sub>E

TPS\_41289      AVVN<sub>VCKKYL</sub>P<sub>EWHQGA</sub>AVID<sub>HPKMEY</sub>IVG<sub>DAHKYL</sub>METN----EK<sub>FIVIME</sub>ISDP-IE

*A.thaliana*\_SPD1      IGP<sub>AKELFEKPF</sub>FFQ-SVARALRP<sub>G</sub>WVCTQ<sub>A</sub>--ESLWLHMDI<sub>I</sub>EDI<sub>S</sub>-----

TPS\_108361      VGP<sub>ASVLF</sub>ETPFY<sub>K</sub>-ALHGS<sub>LREG</sub>IICT<sub>QG</sub>--ECVWLHV<sub>DLIQPLIK</sub>-----

*C.elegans*\_SPD      VGP<sub>AESLFGQS</sub>YYE-LLRDALKED<sub>TI</sub>LSSQG--ESVWLH<sub>LPLIAHLV</sub>A-----

*S.cerevisiae*\_SPM      EGP<sub>AAFFQER</sub>Y<sub>FE</sub>-LLKD<sub>ALNP</sub>N<sub>QV</sub>VIM<sub>QSS</sub>-ENFWI<sub>NLEYL</sub>HD<sub>LN</sub>-----

*T.maritima*\_SPD      AGQGGH<sub>LFTEFFY</sub>Q-ACYDAL<sub>KED</sub>Q<sub>V</sub>FSAET--EDPFYD<sub>IGWF</sub>KL<sub>AYR</sub>-----

*A.thaliana*\_ACL5      GGP<sub>CYQLYTKSFY</sub>Q<sub>NIL</sub>KPKL<sub>SPN</sub>Q<sub>IFVT</sub>Q<sub>AGPAGIFT</sub>HKEVFTSIYN-----

*T.thermophilus*\_SpeE      DN<sub>PARYLTYVEFYR</sub>-LVKA<sub>HLNPG</sub>Q<sub>V</sub>MGM<sub>QAG</sub>-MILL<sub>THHRV</sub>H<sub>PVVHR</sub>-----

TPS\_41289      AGP<sub>GVALYTQE</sub>FY<sub>QRAAEVLNKPH</sub>Q<sub>V</sub>FVT<sub>QAGSADFVPH</sub>HF<sub>PEDE</sub>ND<sub>DDANKETCCFS</sub>

*A.thaliana*\_SPD1      NC<sub>REIFKG</sub>SVNYAWTSV<sub>P</sub>T<sub>YPSG</sub>V<sub>I</sub> FMLC<sub>STE</sub>GP<sub>D</sub>V<sub>D</sub>F<sub>K</sub>H<sub>P</sub>L<sub>N</sub>P<sub>I</sub>D-----

TPS\_108361      A<sub>I</sub>Q<sub>PLFT</sub>-T<sub>VE</sub>Y<sub>A</sub>Y<sub>CTI</sub>PS<sub>YPSG</sub>Q<sub>I</sub>G<sub>F</sub>I<sub>I</sub>AT<sub>KGG</sub>----KGCRN<sub>PVR</sub>-----

*C.elegans*\_SPD      FNR<sub>KIFP</sub>-AV<sub>T</sub>Y<sub>A</sub>Q<sub>SIV</sub>ST<sub>YPSG</sub>SM<sub>GY</sub>LICAKNANR<sub>DVTT</sub>PA<sub>RTLTA</sub>-----

*S.cerevisiae*\_SPM      TAK<sub>KVFP</sub>-NTE<sub>YCYTMV</sub>PT<sub>YTS</sub>G<sub>QLG</sub>LIVCSNNAN---IPLN<sub>I</sub>PQR-----

*T.maritima*\_SPD      RISK<sub>KVFP</sub>-ITRV<sub>YLG</sub>MT<sub>YPSG</sub>MWS<sub>YTF</sub>ASK<sub>GID</sub>---PIKDF<sub>D</sub>P-----

*A.thaliana*\_ACL5      TMKQ<sub>VFK</sub>---Y<sub>VKAYTAH</sub>V<sub>PSF</sub>AD<sub>TWG</sub>W<sub>VM</sub>AS<sub>DHE</sub>F<sub>D</sub>V<sub>E</sub>DEM<sub>DRR</sub>-----

*T.thermophilus*\_SpeE      TVREA<sub>FR</sub>---Y<sub>VRSYKNH</sub>I<sub>PGFF</sub>LNF<sub>G</sub>LLAS<sub>DAF</sub>D<sub>PA</sub>A<sub>F</sub>SE<sub>G</sub>VIE-----

TPS\_41289      PIKNT<sub>L</sub>GTVFDHA<sub>I</sub>P<sub>Y</sub>SCPIAS<sub>FGEDW</sub>Y<sub>VM</sub>A<sub>FNGDP</sub>S<sub>QGRKL</sub>AD<sub>L</sub>S<sub>RESV</sub>DEL<sub>IEERIR</sub>

*A.thaliana*\_SPD1      -----ESSSKS<sub>NGP</sub>I<sub>KFYNAEIH</sub>SAAF<sub>CLP</sub>S<sub>FAKKV</sub>I<sub>E</sub>SKAN-----

TPS\_108361      -----A<sub>PEE</sub>SV<sub>QKE</sub>I<sub>KYYTPD</sub>I<sub>HSAAF</sub>V<sub>LP</sub>A<sub>F</sub>A<sub>QRA</sub>I<sub>FGGLSK</sub>---

*C.elegans*\_SPD      -----EQ<sub>I</sub>KAL<sub>N</sub>--I<sub>RFYNS</sub>E<sub>VHK</sub>AA<sub>AFV</sub>I<sub>LP</sub>Q<sub>FVKNA</sub>LE-----

*S.cerevisiae*\_SPM      -----K<sub>I</sub>SE<sub>QE</sub>Q<sub>GK</sub>I<sub>KYYNPQ</sub>I<sub>HSSA</sub>F<sub>VL</sub>P<sub>TWAD</sub>K<sub>V</sub>INE-----

*T.maritima*\_SPD      -----E<sub>KV</sub>R<sub>KF</sub>N<sub>KE</sub>I<sub>KYYN</sub>E<sub>EVH</sub>V<sub>AS</sub>F<sub>AL</sub>P<sub>N</sub>F<sub>V</sub>K<sub>E</sub>L<sub>G</sub>LM-----

*A.thaliana*\_ACL5      -----IE<sub>EER</sub>-V<sub>NGE</sub>I<sub>MYLNAP</sub>S<sub>FV</sub>S<sub>A</sub>A<sub>T</sub>N<sub>KT</sub>I<sub>SLA</sub>LE<sub>KETEVYSE</sub>

*T.thermophilus*\_SpeE      -----A<sub>RIRER</sub>N<sub>LA</sub>I<sub>RHL</sub>T<sub>APY</sub>LE<sub>AM</sub>F<sub>VL</sub>P<sub>KD</sub>L<sub>LE</sub>AL<sub>E</sub>K<sub>ETMV</sub>STD

TPS\_41289      L<sub>VPGPVHRYRS</sub>KGV<sub>KRAIK</sub>GNEV<sub>GAEV</sub>I<sub>KHYDGVS</sub>H<sub>RRLF</sub>A<sub>TS</sub>K<sub>PLRE</sub>A<sub>MKS</sub>DERIMTE

<i>A.thaliana</i> _SPD1	-----
TPS_108361	-----
<i>C.elegans</i> _SPD	-----
<i>S.cerevisiae</i> _SPM	-----
<i>T.maritima</i> _SPD	-----
<i>A.thaliana</i> _ACL5	ENARFIHGHGVAYRHI---
<i>T.thermophilus</i> _SpeE	QNPFYVTPEGEARQAPYKG
TPS_41289	ANP IFMY-----

Abb. 3-4: Vergleich der Primärsequenz zwischen Spermidinsynthase 1 von *A. thaliana*, TPS\_108361 von *T. pseudonana*, Spermidinsynthase von *C. elegans*, Spermainsynthase von *S. cerevisiae*, Spermidinsynthase von *T. maritima*, ACL5 von *A. thaliana*, SpeE von *T. thermophilus* und TPS\_41289 von *T. pseudonana*. Die rot unterlegten Felder entsprechen stark konservierten Sequenzbereichen, die gelben Felder entsprechen konservierte Sequenzbereiche, die homologe Aminosäuren aufweisen. Die magentafarbenen Bereiche entsprechen Sequenzabschnitte, die bei mindestens drei von acht unterschiedlichen N-Aminopropyltransferasesequenzen konserviert vorliegen.

### 3.2. Klonierung und heterologe Genexpression von TPS 108361 und TPS 41289

#### 3.2.1. Klonierung von TPS 41289 in pET-20b

Die TPS\_41289 (1263 bp) wurde aus cDNA von *T. pseudonana* amplifiziert und in einem pGEMT-Klonierungsvektor zwischenkloniert, durchsequenziert und mit den Restriktions-enzymen *NdeI* und *XhoI* aus dem Vektor herausgeschnitten. Als Zielvektor wurde pET-20b verwendet. Dieser Vektor enthält einen T7-Promoter, nachfolgend eine *pelB*-Signalsequenz (für den periplasmatischen Transport exprimierter Proteine) und eine multiple Klonierungsstelle nachfolgend mit einer Sequenz codierend für einen Hexahistidintag. Durch Einsatz von *NdeI* und *XhoI* wurde die *pelB*-Sequenz aus dem pET-20b entfernt und das TPS\_41289-Insert in den Vektor ligiert und in kompetente *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Der neuentstandene Vektor codierte für ein Fusionsprotein mit C-terminalem Hexahistidintag, der unter Kontrolle eines T7-Promoters stand (siehe Abb. 3-5).

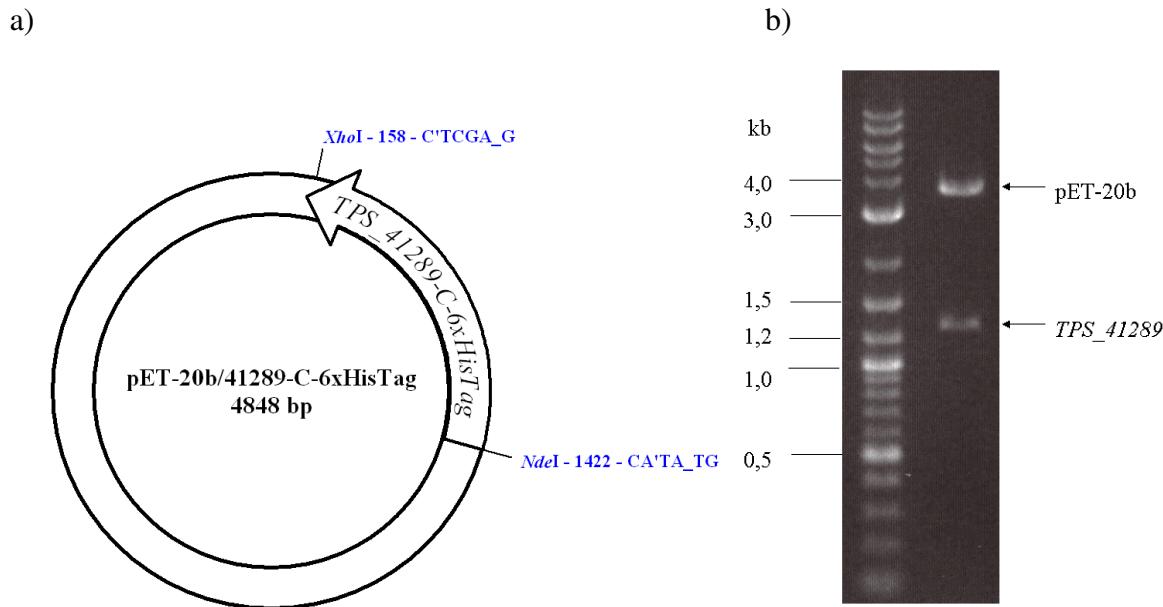


Abb. 3-5: a) Schematische Darstellung des konstruierten pET-20b/41289-C-6xHisTag-Vektors, mit eingezeichneter Klonierungsstelle *NdeI* und *XhoI*. b) Mit *NdeI* und *XhoI* restriktierte pET-20b/41289-C-6xHisTag-DNA im 1 %igen Agarosegel (pET-20b-Fragment = 3584 bp/TPS\_41289-Fragment = 1264 bp). Die Leserichtung des ORF wird durch Pfeil dargestellt.

### **3.2.2. Heterologe Überexpression von TPS 41289**

Durch Zugabe von 1 mM IPTG wird in *E. coli* Bl21 (DE3) T7-RNA-Polymerase gebildet, die spezifisch den T7-Promoter erkennt und diesen abliest, was zu einer starken Überexpression des unter der Kontrolle vom T7-Promoter stehenden Zielproteins führt.

Die heterologe Überexpression des 41289-Proteins wurde über Nacht bei 18°C mit 1 mM IPTG in LB-Medium durchgeführt. Die Fähigkeit zur Überexpression wurde zuerst mit 10 ml Flüssigkultur überprüft, bei der Zellen vor und nach der IPTG-Induktion abgenommen und für eine analytische SDS-PAGE aufgearbeitet wurden. Nachdem die Überexpression positiv bestätigt wurde, wurde die Überexpression in einem Maßstab von einem Liter LB-Medium fortgesetzt. Das rekombinante Protein wurde durch Metallaffinitätschromatographie aufgereinigt (siehe Abb. 3-6), aufkonzentriert und mit 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 mit 5 mM β-Mercaptoethanol und 1 mM EDTA diafiltriert. Das rekombinante Protein wurde mit einer Ausbeute von 3 mg pro 1L Kultur aufgereinigt.

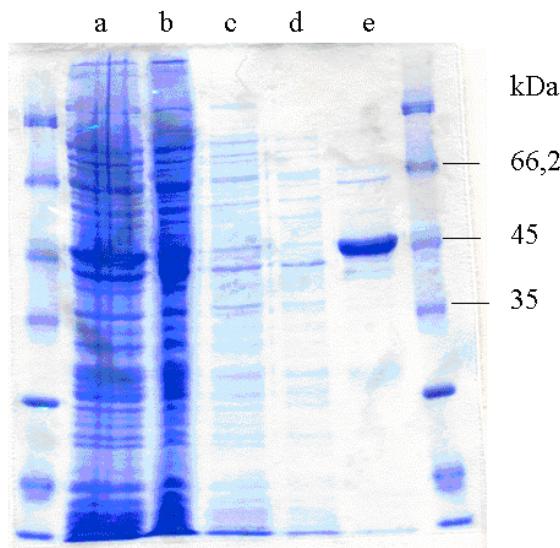


Abb. 3-6: Analytische 12%ige SDS-PAGE zum Nachweis der Ni-NTA-Aufreinigung des rekombinanten 6xHis-Tag Proteins (TPS\_41289) . a) Rohextrakt, b) Säulendurchfluss, c) 10 Säulenvolumen 10 mM Imidazol (Waschpuffer), d) 10 Säulenvolumen 20 mM Imidazol (Waschpuffer), e) 3 Säulenvolumen 250 mM Imidazol (Elutionspuffer).

### **3.2.3. Klonierung von TPS\_108361 in pQE-30 UA**

Zunächst wurde *TPS\_108361*, ähnlich wie bei der Klonierung von *TPS\_41289*, in den Zielvektor pET20-b kloniert, der vorher durch Einsatz von *NdeI* und *XhoI* linearisiert wurde. Die Expression von *TPS\_108361* funktionierte in diesem Vektorsystem nur teilweise, mit geringer Ausbeute an rekombinantem Protein. Durch N-terminale Sequenzierung des Proteins wurde herausgefunden, dass ein Teil des Proteins am N-Terminus vermutlich proteolytisch abgespalten wurde (Abb. 3-7).

#### **N-terminale Sequenzierung von TPS\_108361:**

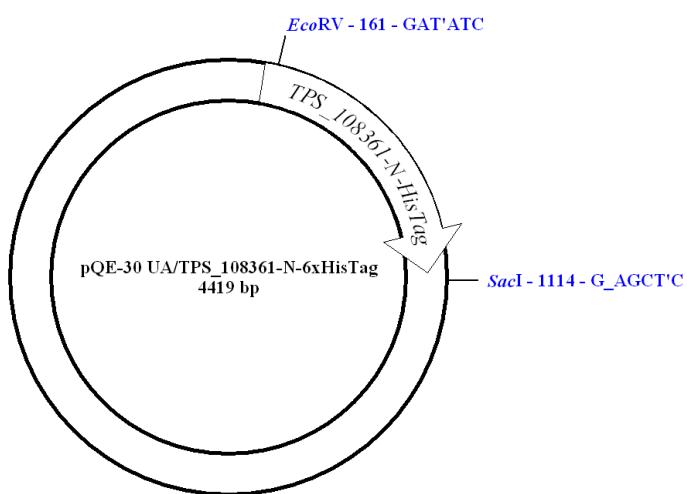
Original	MAAFAPQHSIVVALTIVSICLACTVTASSSTPTAPPTPLTHNMSDFPPPDYSHLIID
1. Sequenz	XXTVTASS
	*****
2. Sequenz	XXXFAPQX-I
	**** * *

Abb. 3-7: Ergebnis der N-terminalen Sequenzierung von *TPS\_108361* (Produkt von pET20-b/108361-C-6xHisTag): Durch die N-terminale Sequenzierung wurden zwei unterschiedliche Sequenzen erhalten, die an unterschiedlichen Stellen zur Originalsequenz übereinstimmten. X= Nichtidentifizierte Aminosäure.

Die Aminosäuresequenz von TPS\_108361 wurde mit einem Onlineprogramm (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), das Signalsequenzen vorhersagt, ausgewertet. Dabei konnte festgestellt werden, dass der N-Terminus von TPS\_108361 möglicherweise eine Signalsequenz darstellt. Vermutlich führte die mutmaßliche Signalsequenz von TPS\_108361 dazu, dass ein Teil der Sequenz durch eine Signalpeptidase erkannt und abgespalten wurde.

Es wurde deshalb die TPS\_108361 so amplifiziert, dass die ersten 40 N-terminalen Aminosäuren ausgeschlossen wurden. Die amplifizierte Sequenz wurde durch UA-Klonierung in dem linearisierten Vektor pQE-30 UA kloniert, der an seiner Klonierungsstelle 3'-Uracilenden aufwies. Dieser Expressionsvektor enthält einen T5-Promoter, an dem spezifisch bei IPTG-Induktion eine T5-Polymerase bindet und für eine starke Transkription sorgt. Nachfolgend des T5-Promoters, kommt ein Sequenzabschnitt codierend für einen N-terminalen Hexahistidintag und eine multiple Klonierungsstelle. Die multiple Klonierungsstelle enthält, wie bereits erwähnt, einen geschnittenen Doppelstrang an dem an den 3'-Enden Uracilreste hängen und für eine erleichterte Klonierung von Inserten mit 5'-Adenosyl-Überhängen dienen soll.

a)



b)

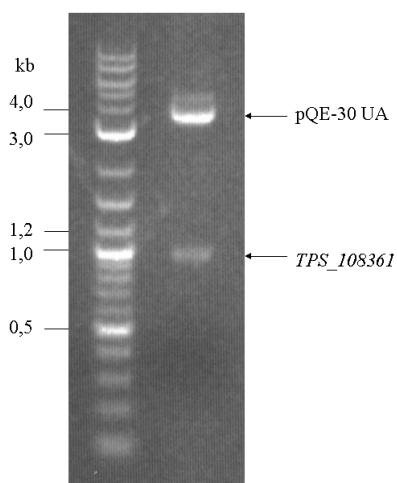


Abb. 3-8: a) Schematische Darstellung des pQE-30 UA/N-6xHisTag-108361-Vektors.

b) Zum Nachweis der erfolgreichen Klonierung wurde der Vektor mit *EcoRV* und *SacI* verdaut, um das klonierte *TPS\_108361* nachzuweisen.

### 3.2.4. Heterologe Überexpression von TPS\_108361

Der Vektor pQE-30 UA/TPS\_108361-N-6xHisTag wurde in kompetente *E. coli* SG13001-Zellen transformiert. Durch IPTG-Induktion bildet dieser *E. coli* Stamm T5-RNA-Polymerase die spezifisch den T5-Promoter erkennt und für eine starke Transkription der einklonierten Sequenz sorgt.

Die Überexpression des Proteins TPS\_108361 wurde überprüft, indem eine Vorkultur mit  $OD_{600\text{nm}} = 0,6$  mit 1 mM IPTG induziert und über Nacht bei 18°C inkubiert wurde. Die Zellen wurden danach abzentrifugiert und mit Ultraschall lysiert und der gewonnene Überstand einer analytischen 12%igen SDS-PAGE unterzogen. Wie in Abb. 3-11 zu sehen ist, konnte das Zielprotein überexprimiert und mit Ni-NTA-Agarose aufgereinigt (siehe Abb. 3-9). Die mittlere Ausbeute an TPS\_108361 betrug hierbei 8 mg pro 1L Kultur.

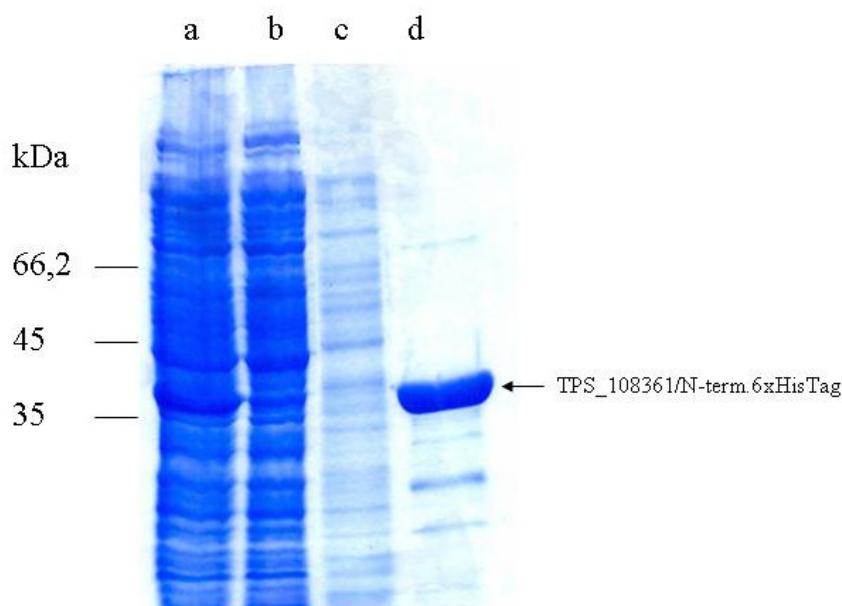


Abb. 3-9: Analytische 12%iges SDS-Gel zum Nachweis der Aufreinigung des rekombinanten TPS\_108361 mit N-terminalem Hexahistintag. a) Rohextrakt, b) Durchfluss, c) 20 mM Imidazol (Waschpuffer), d) 250 mM (Elutionspuffer).

### **3.3. Nachweis der N-Aminopropyltransferaseaktivität bei TPS\_108361 und TPS\_41289**

Wie aus Kap. 3.1.3. ersichtlich wurde, besitzt TPS\_108361 eine hohe Übereinstimmung zu bekannten N-Aminopropyltransferasen der SPDS/SPMS-Gruppe, während TPS\_41289 zu N-Aminopropyltransferasen der ACL5-Gruppe große Übereinstimmung zeigt. Im folgenden Experiment sollte daher experimentell nachgewiesen werden, ob sich tatsächlich eine N-Aminopropyltransferaseaktivität bei den zwei mutmaßlichen N-Aminopropyltransferasen aus *T. pseudonana* nachweisen lässt.

#### **3.3.1. Nachweis der Enzymaktivität bei TPS\_108361**

Das rekombinante überexprimierte TPS\_108361 wurde aus dem Rohextrakt von *E. coli* mit Ni-NTA-Agarose aufgereinigt, um eine mögliche Hintergrundaktivität der Spermidinsynthase von *E. coli* auszuschließen. Es wurde ein Standardenzymtest durchgeführt, bei dem die Enzymreaktion mit 100 mM Tris/HCl, pH 7,5 gepuffert wurde und die Reaktion bei 30°C für 1h inkubiert worden ist. Es wurden verschiedene [<sup>14</sup>C]-Polyamine als Substrat angeboten, wobei jeweils der zweite Reaktionspartner, dcSAM, als Aminopropyldonor zur Verfügung stand. Mit den Substraten [<sup>14</sup>C]-1,3-Diaminopropan und dcSAM war keinerlei Aktivität messbar. [<sup>14</sup>C]-Putrescin und dcSAM konnte hingegen vollständig zu Spermidin umgesetzt werden, worauf geschlossen werden konnte, dass es sich bei TPS\_108361 wahrscheinlich um eine Spermidinsynthase handelt (siehe Abb. 3-10). Wurde hingegen [<sup>14</sup>C]-Spermidin und dcSAM als Substrat angeboten, so konnte nur ein sehr schwacher Umsatz von Spermidin zu Spermin, wenn TPS\_108361 im Überschuss (10-20 µg) im Reaktionsansatz vorhanden war, aufgezeichnet werden.

Die Identifizierung von Spermidin erfolgte mit der von SHIRAHATA (1983) beschriebenen DC-Methode. Spermidin und Putrescin haben im BAPW-DC-Laufmittel unterschiedliche Rf-Werte und können damit voneinander unterschieden werden. Weiterhin stand kommerziell erhältliches radioaktives Putrescin und Spermidin zur Verfügung, das als Vergleichsstandard auf die DC mitaufgetragen wurde (vgl. Abb. 3-10).

#### **3.3.2. Nachweis der Enzymaktivität bei TPS\_41289**

Das heterolog überexprimierte Protein TPS\_41289 wurde ebenfalls aus dem Rohextrakt von *E. coli* mit Ni-NTA-Agarose aufgereinigt und in einem Standardenzymtest (gleiche Bedingungen

wie bei 3.3.1.) mit den Substraten dcSAM, [<sup>14</sup>C]-1,3-Diaminopropan, [<sup>14</sup>C]-Putrescin, [<sup>14</sup>C]-Spermidin getestet. Hierbei stellte sich heraus, das TPS\_41289 nur Spermidin zu Thermospermin, eine isomere Form von Spermin, umsetzen konnte, wobei die anderen genannten Polyamine nicht aminopropylert werden konnten. Die Identifikation von Thermospermin beruhte auf der von SHIRAHATA (1983) publizierten DC-Methode, wobei das DC-Laufmittel BAPF für die Isomeren Spermin und Thermospermin unterschiedliche Rf-Werte ergibt, während im BAPW-Laufmittel die Rf-Werte von Spermin und Thermospermin praktisch nicht unterscheidbar waren. Die genauere Produktidentifikation von TPS\_41289 erfolgte durch Dr. KNOTT (KNOTT et al., 2007).

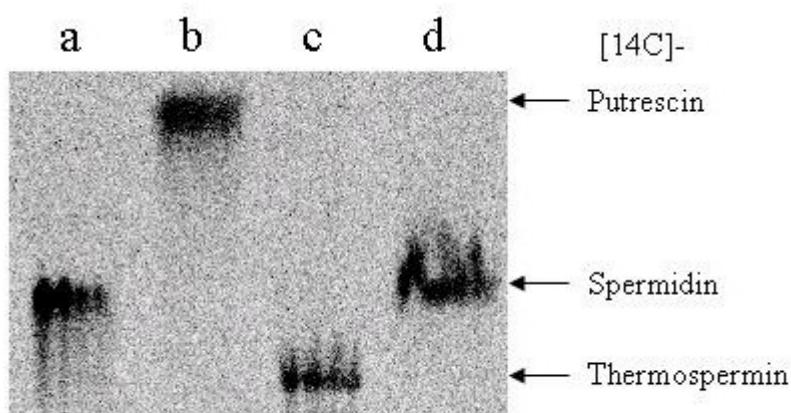


Abb. 3-10: Nachweis [<sup>14</sup>C]-markierter Polyamine, die durch BAPW-Laufmittel aufgetrennt und mit Autoradiographie (Phosphoimager) visualisiert worden. a) Kommerzielles [<sup>14</sup>C]-Spermidin als Standard, b) Kommerzielles [<sup>14</sup>C]-Putrescin als Standard, c) [<sup>14</sup>C]-Thermospermin (durch TPS\_41289 katalysierte Reaktion: dcSAM + Spermidin → MTA + Thermospermin), d) [<sup>14</sup>C]-Spermidin (durch TPS\_108361 synthetisierte Reaktion: dcSAM + Putrescin → MTA + Spermidin).

### **3.4. Proteinbiochemische Charakterisierung von TPS\_41289**

Das rekombinante Protein TPS\_41289 stellt den Prototyp einer bisher unbekannten Thermosperminsynthase dar, die bisher noch nicht näher charakterisiert worden ist. Es wurde deshalb das Protein hinsichtlich der Fähigkeit zur Oligomerisierung untersucht, sowie die optimalen enzymatischen Bedingungen hinsichtlich Temperatur, pH und Substratkonzentration bestimmt. Weitherhin wurde bei der TPS\_41289-Sequenz ein Basenaustausch vorgenommen, so dass die Aminosäure E156 gegen D156 ausgetauscht wurden, um nachzuweisen, ob es zu Änderungen in der Produktbildung kommt.

### **3.4.1. Ergebnis der N-terminalen Ansequenzierung vom rekombinanten TPS\_41289**

Zum Nachweis, dass tatsächlich das rekombinante Fusionsprotein, TPS\_41289 mit C-terminalem Hexahistidintag, aufgereinigt wurde, wurde das Protein auf eine PVDF-Membran geblottet und durch die Arbeitsgruppe Deutzmann N-terminal ansequenziert. Die erhaltene Sequenz entspricht der von den Basencodons abgeleiteten Primärsequenz (siehe Abb. 3-11).

41289-C-6xHistag	MXIXNLLLP
41289_Datenbank	MHIHNLLLP
	* * *****

Abb. 3-11: Ergebnis der N-terminalen Sequenzierung. Die obere Sequenz entspricht dem rekombinanten aufgereinigten Protein, die untere Sequenz entspricht der von den Basencodons abgeleiteten Primärsequenz von *TPS\_41289*. X= Unidentifizierte Aminoäure.

### **3.4.2. Molekulargewichtsbestimmung von TPS\_41289**

#### **3.4.2.1. Molekulargewichtsbestimmung durch denaturierende PAGE**

Mit einem SDS-Gel wurde das Molekulargewicht des monomeren TPS\_41289 bestimmt. Die Messung in einem SDS-Gel ist relativ genau, weil das SDS die Proteineigenladung überdeckt und die Proteine nur aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden.

In diesem Fall konnte für das TPS\_41289- Monomer ein mittleres Molekulargewicht von 48,44 kDa berechnet werden, das annähernd übereinstimmend mit dem theoretischen Molekulargewicht von 48,06 kDa ist (Abb. 3-12).

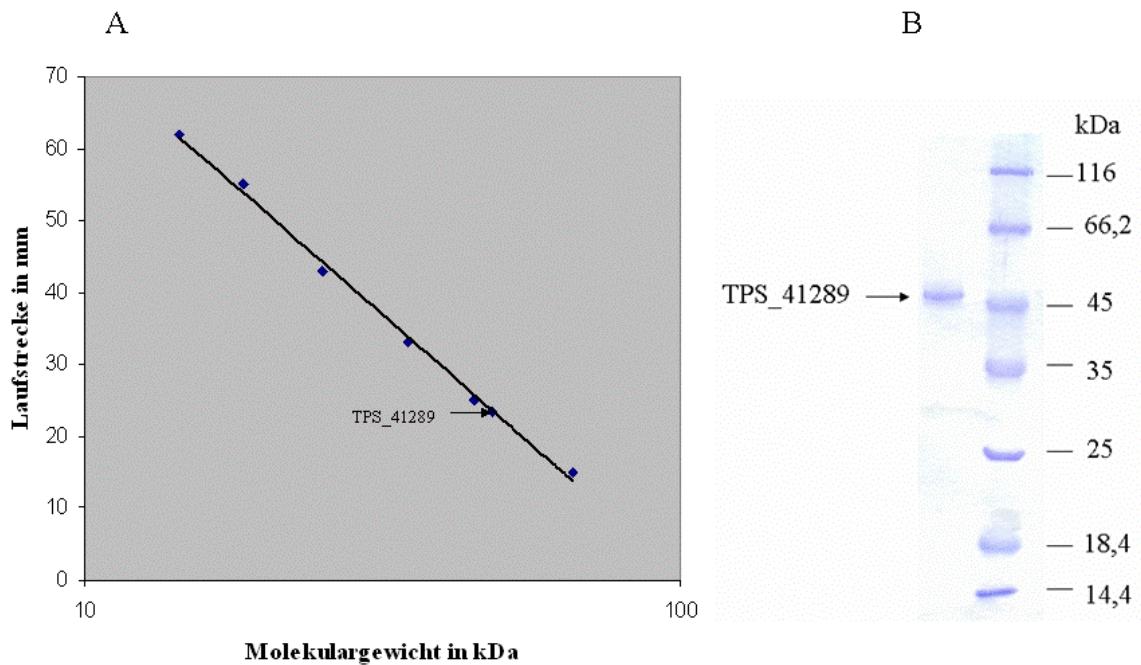


Abb. 3-12: Denaturierende Auftrennung von TPS\_41289 in einem 12 %igen SDS-Gel mit Abschätzung des Molekulargewichts. Die Eichgerade hat die Funktion  $y = -31,408 \ln(x) + 145,37$ . A) Erstellte Eichgerade von dem SDS-Gel aus Teilabbildung B. B) 12%iges denaturierendes Gel zur Größenabschätzung von TPS\_41289.

### 3.4.2.2. Molekulargewichtsbestimmung durch Native PAGE

Die Bestimmung des Molekulargewichts durch nicht denaturierende PAGE ergab ein apparentes Molekulargewicht von 187 kDa und deutet somit möglicherweise an, dass die native Form des Proteins aus vier Untereinheiten besteht ( $4 \times 48,06 \text{ kDa} = 192,24 \text{ kDa}$ ), (Abb. 3-13). In der Nativen PAGE ist das Wanderungsverhalten des aufzutrennenden Proteins nicht allein von seiner Größe abhängig, sondern auch von der Gesamtladung, womit diese Methode nicht sehr genau ist. Es wurde deshalb zur Bestimmung des Molekulargewichts noch eine Gelfiltration angeschlossen.

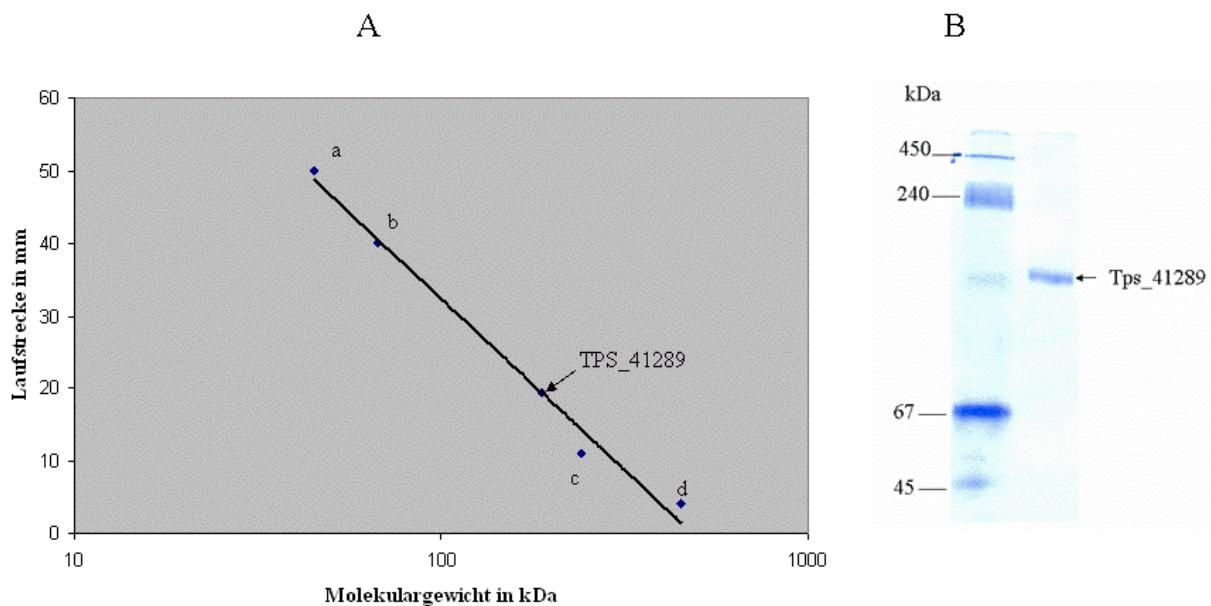


Abb. 3-13: Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von TPS\_41289 durch Native PAGE (10% Trenngel) mit dazugehöriger Eichgeraden.

**A** Erstellte Eichgerade von dem Nativen Gel aus Teilabbildung **B**: (a) Eialbumin, 45 kDa; (b) BSA 67 kDa; (c) Katalase, 240 kDa; (d) Ferritin, 450 kDa. Die Eichgerade entspricht der Gleichung  $y = -20,495 \ln(x) + 126,68$ .

**B** Abbildung eines 10%igen Nativen Gels zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von TPS\_41289.

### 3.4.2.3. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration

Es wurde eine Gelfiltration durchgeführt, um das Ergebnis der Nativen PAGE abzusichern. Der aus dem Elutionsvolumen der Proben errechnete Verteilungskoeffizient ergab für TPS\_41289 ein Molekulargewicht von 208 kDa (Abb. 3-14). Nimmt man für das rekombinante Fusionsprotein ein theoretisches Molekulargewicht von 48,06 kDa an, so handelt es sich bei dem rekombinanten His-Tag Protein vermutlich um ein homotetrameres Protein (theoretisches Molekulargewicht: 192,24 kDa).

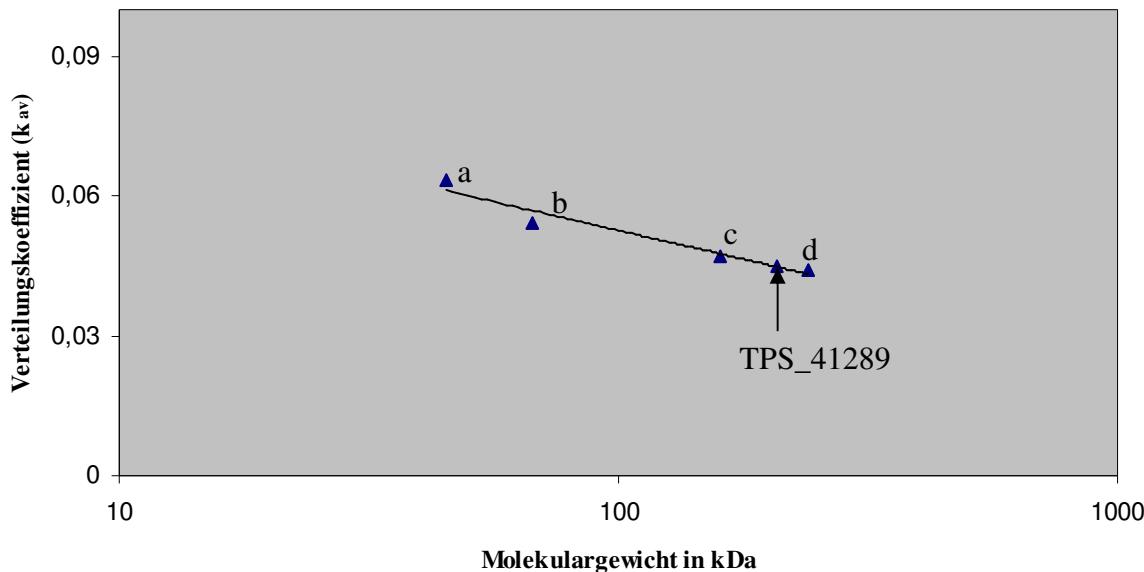


Abb. 3-14: Gelfiltration an einer Superose 6-Säule. Als Eichproteine wurden verwendet: (a) Eialbumin, 45 kDa; (b) BSA, 67 kDa; (c) Aldolase, 160 kDa; (d) Katalase, 240 kDa.

### **3.4.3. Bestimmung von inter- bzw. intramolekularen Disulfidbrücken**

Proteine können zwischen bzw. auch innerhalb ihrer Untereinheit Disulfidbrücken ausbilden. Diese Möglichkeit wurde bei TPS\_41289 untersucht. Nach Inkubation des Proteins in SDS-Ladepuffer mit und ohne DTT bei 95°C (3 min), wurden die Proben auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Proteine, deren Untereinheiten durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, können ohne Reduktionsmittel nicht voneinander getrennt werden. Liegen hingegen intramolekulare Disulfidbrücken vor, so besitzt die reduzierte Proteinprobe eine geringere Mobilität als die nichtreduzierte Proteinprobe, das dadurch erklärbar ist, dass aufgrund der vorhandenen intramolekularen Disulfidbrücke das Protein kompakter ist und deshalb schneller wandert.

Bei TPS\_41289, liegen weder intermolekulare noch intramolekulare Disulfidbrücken vor (siehe Abb. 3-15).

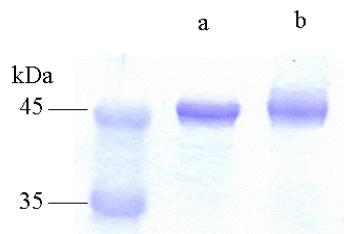


Abb. 3-15: Nachweis von intramolekularen Disulfidbrücken bei TPS\_41289 mit einer 12%igen SDS-PAGE: (a) ohne Reduktionsmittel, (b) mit Reduktionsmittel.

#### **3.4.4. Optimierung der Enzymaktivität bezüglich Temperatur und pH**

Die Temperatur- und pH-Bedingungen wurden für TPS\_41289 dahingehend optimiert, dass die Thermosperminsynthasereaktion den größtmöglichen Umsatz von Spermidin zu Thermospermin erbringt. Die optimalen Reaktionsbedingungen für die enzymatische Reaktion betrugen 55°C, pH 9,6 (siehe Abb. 3-16 und 3-17).

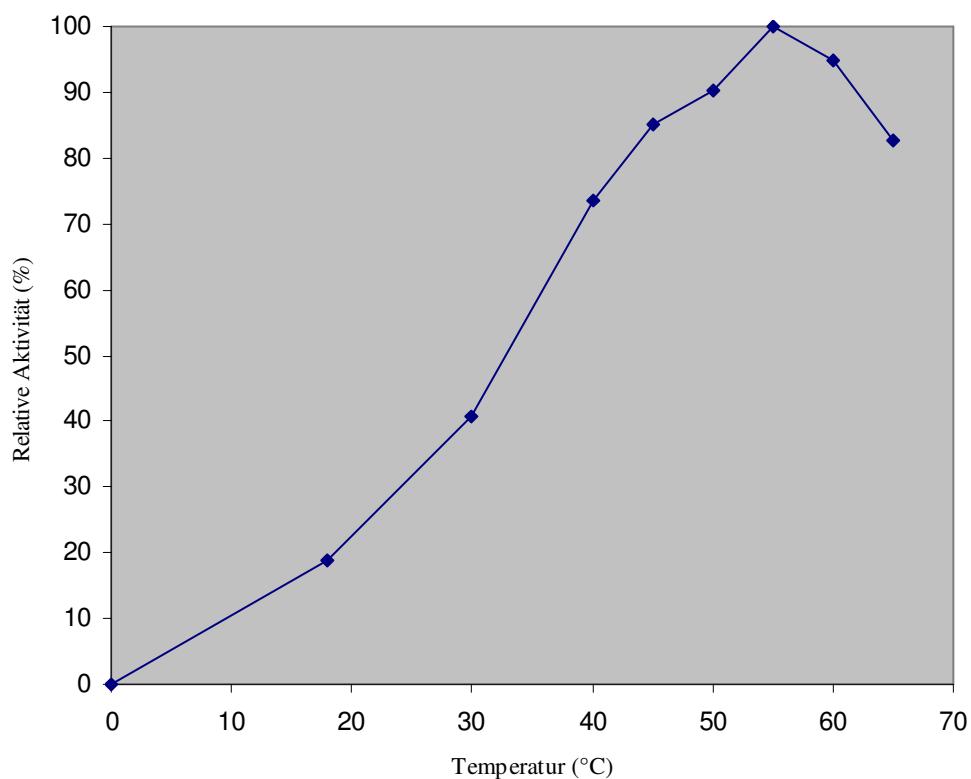


Abb. 3-16: Messung der Temperaturabhängigkeit der Thermosperminsynthasereaktion im Bereich von 0°C bis 65°C: Messbedingungen: 5 µg TPS\_41289, 100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 2 nmol dcSAM und 23 pmol [<sup>14</sup>C]-Spermidin (5500 dpm), Reaktionszeit: 15 min.

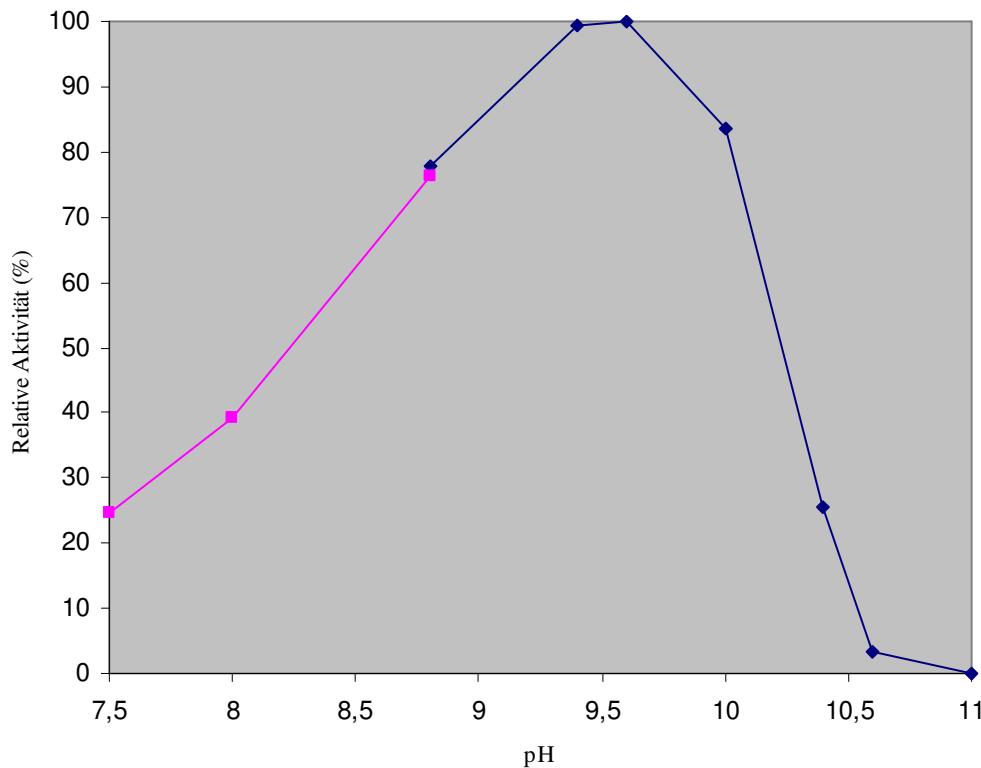


Abb. 3-17: Messung der pH-Abhängigkeit der Thermosperminsynthasereaktion im Bereich von pH 6,8 bis pH 10,6 (blaue Linie: Messung mit 100 mM Tris/HCl-Puffer zwischen pH 7,5 und pH 8,8/ magentafarbene Linie: Messung mit 100 mM Glycin/NaOH zwischen pH 8,8 und 11). Messbedingungen: 5 µg TPS\_41289, 55°C, 2 nmol dcSAM mit 23 pmol [<sup>14</sup>C]-Spermidin (5500 dpm).

### 3.4.5. $K_M$ -Bestimmung von dcSAM und Spermidin

Die Affinität der rekombinanten Thermosperminsynthase zu ihren Substraten (dcSAM und Spermidin) konnte durch die Michaelis-Menten-Konstante,  $K_M$ , bestimmt werden. TPS\_41289 zeigte zu den Substraten ein hyperpolisches Sättigungsverhalten. Für Spermidin wurde eine  $K_M$  von 103 µM gemessen und für dcSAM ein  $K_M$  von 91 µM bestimmt (Abb. 3-18 und 3-19). Liegen beide Substrate sättigend vor, so betrug die maximale spezifische Aktivität bei 313 nmol Thermospermin/ min x mg TPS\_41289.

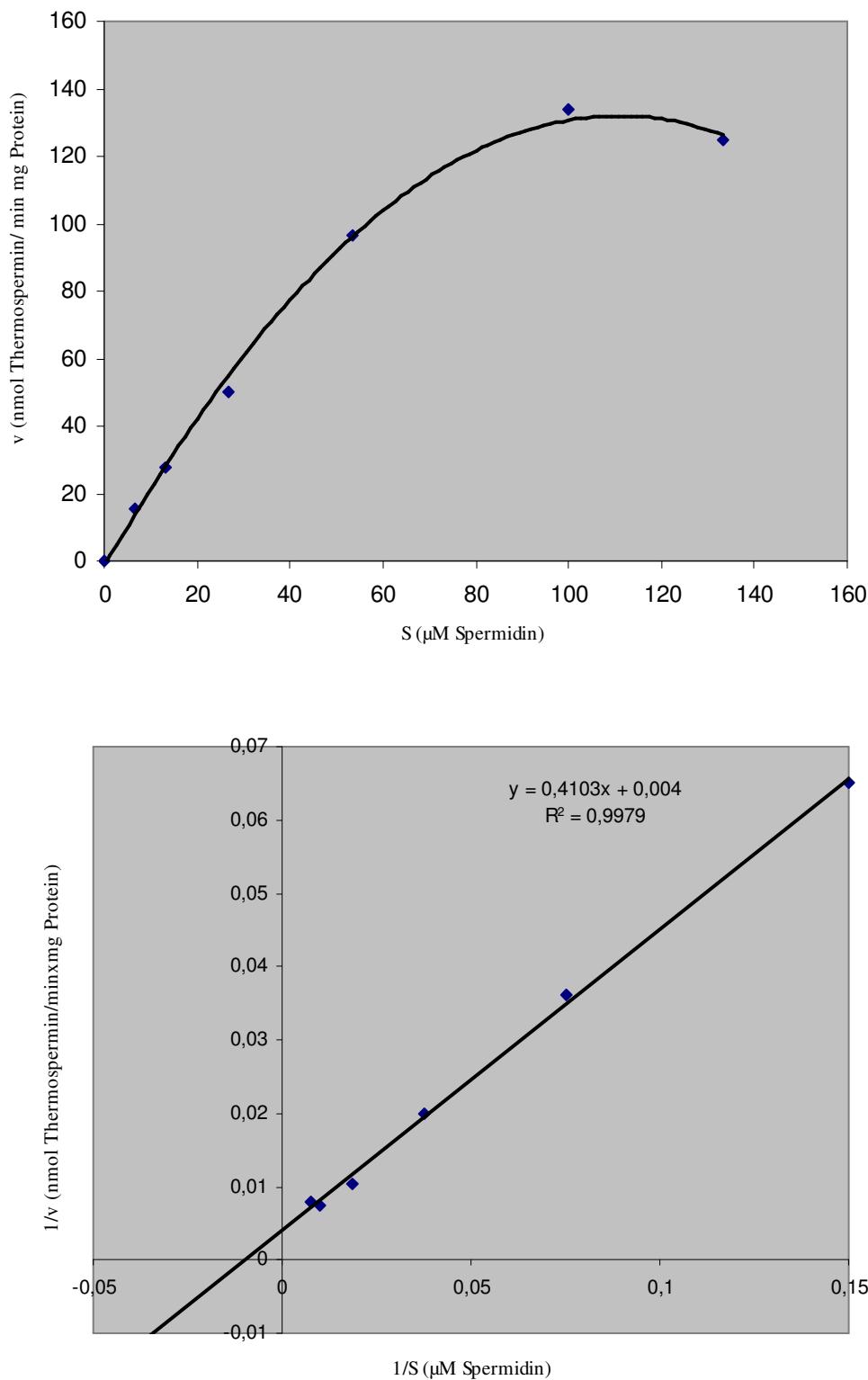


Abb. 3-18: Abhangigkeit der von TPS\_41289 katalysierten Thermosperminbildung von Spermidin (3 Messungen): A) Michaelis-Menten-Kinetik, B) Lineweaver-Burk-Diagramm (Messbedingungen: 100 mM Glycin/NaOH, pH 9,6, 240  $\mu\text{M}$  dcSAM, 0-133  $\mu\text{M}$  Spermidin, 55°C, 10 min).

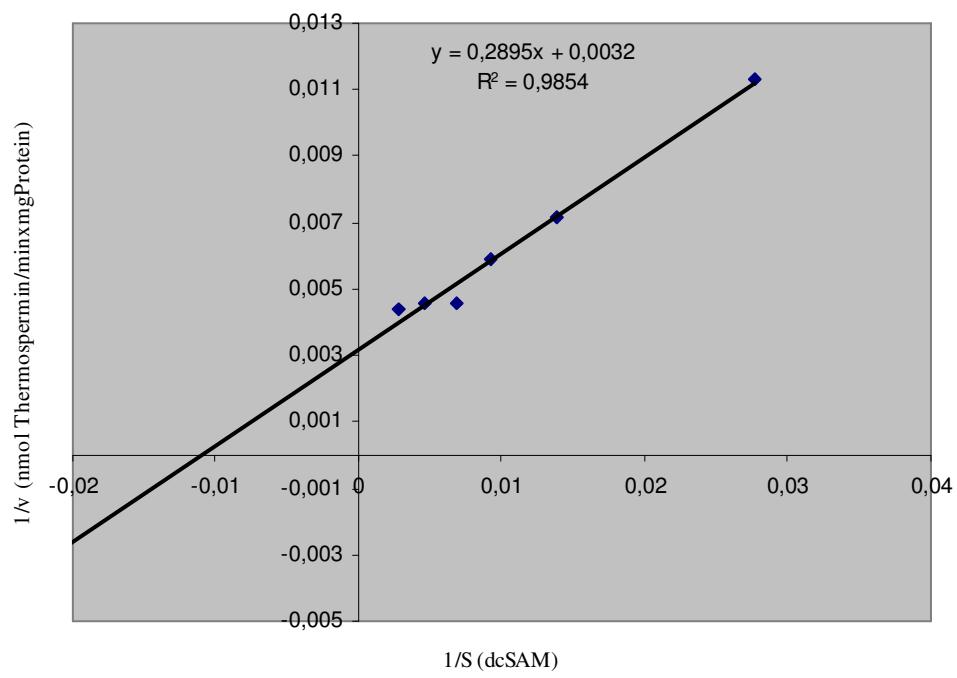
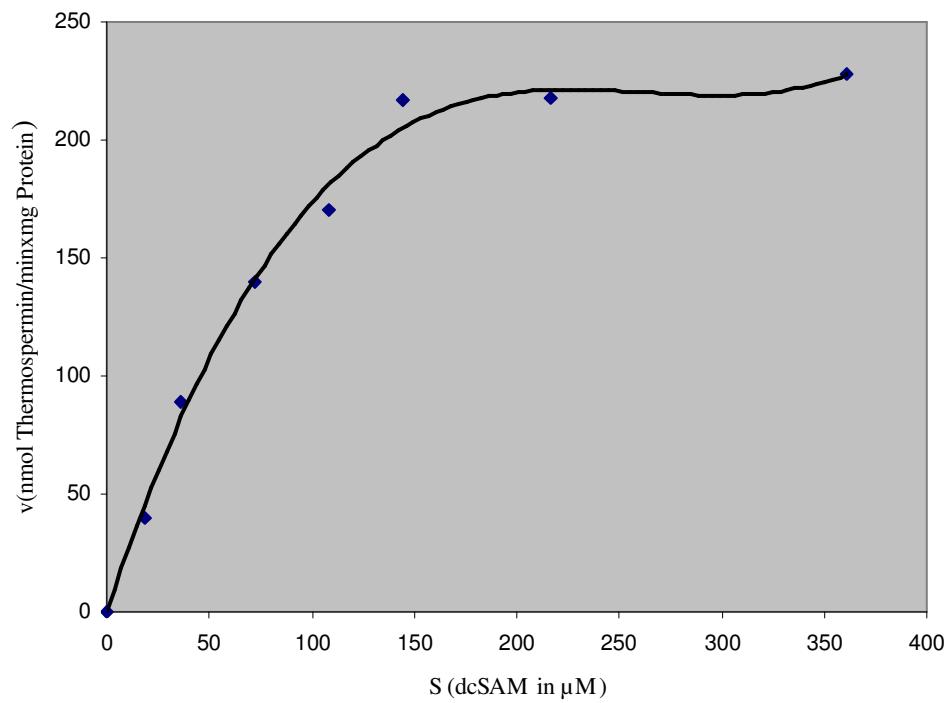


Abb. 3-19: Abhangigkeit der von TPS\_41289 katalysierten Thermosperminbildung von dcSAM (3 Messungen): A) Michaelis-Menten-Kinetik, B) Lineweaver-Burk-Diagramm (Messbedingungen: 100 mM Glycin/NaOH, pH 9,6, 0-360  $\mu\text{M}$  dcSAM, 333  $\mu\text{M}$  Spermidin, 55°C, 10 min).

### 3.4.6. Basenaustauschexperiment mit TPS\_41289

Wie aus Abb. 3-4 deutlich wurde, verfügen N-Aminopropyltransferasen der ACL5-Gruppe im Vergleich zu anderen Spermin- und Spermidinsynthasen über eine veränderte Form der glycinreichen Bindestelle für das dcSAM, bei dem Aspartat gegen ein homologes Glutamat ersetzt ist.

TPS\_41289, ein Vertreter der ACL5-Gruppe, wurde mittels zielgerichteter Mutagenese so verändert, dass statt dem E156 ein D156 translatiert wurde. Durch nachfolgenden Enzymtest mit den Substraten dcSAM und Spermidin sollte überprüft werden, ob es zu Veränderungen in der Produktbildung kommt, so z.B. statt Bildung von Thermospermin, Bildung von Spermin, stattfindet.

Die Mutagenisierung von *TPS\_41289* wurde vorgenommen und die Sequenz in den Zielvektor pET-20b kloniert und durchsequenziert, um den Erfolg des Basenaustauschs nachzuprüfen (siehe Abb. 3-20). *TPS\_41289* mit C-terminalem Hexahistidintag wurde durch Ni-NTA aufgereinigt und ein Enzymtest unter optimierten Bedingungen mit [<sup>14</sup>C]-Spermidin und dcSAM als Substrate durchgeführt, wobei die Reaktionsprodukte durch DC im BAPF-Laufmittel nachgewiesen worden, da hierbei eine Unterscheidung zwischen Spermin und Thermospermin möglich ist. Die Analyse der Reaktionsprodukte ergab, dass bei dem unveränderten *TPS\_41289* (E156) Spermidin vollständig zu Thermospermin umgesetzt wurde, während bei *TPS\_41289* (D156) Spermidin zu Thermospermin (anteilmäßig 96,5 %) und Spermin (anteilmäßig 3,5%) umgesetzt wurde (siehe Abb. 3-21), womit der Basenaustausch von E156 zu D156 einen begrenzten Einfluss auf die Bildung des Reaktionsprodukts hatte.

41289	YHESLVHPALFW SAILSGESGQGGAPKSVFIGGGELATAREVLRHSTIERCVMVDIDPA
Basenaustausch	YHESLVHPALFW SAILSGESGQGGAPKSVFIGGGDLATAREVLRHSTIERCVMVDIDPA
	*****:*****

Abb. 3-20: Erfolgsnachweis der Mutagenisierung von *TPS\_41289* (D156): Die von der Fa. MWG (Martinsried) erhaltene DNA-Sequenzierung wurde in Aminosäuresequenz translatiert. Die originale Sequenz (*TPS\_41289*) wurde gegen die Basenaustauschsequenz von *TPS\_41289* (BA) verglichen, um den Nachweis der Mutagenisierung zu erbringen.

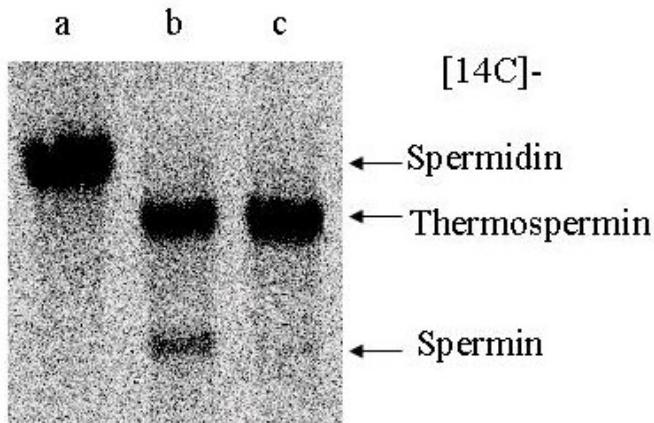


Abb. 3-21: Nachweis der Reaktionsprodukte mit DC und BAPF-Laufmittel bei (a) TPS\_41289 (E156), 95°/10 min (Negativprobe) und (b) TPS\_41289 (D156) und (c) TPS\_41289 (E156) (Reaktionsbedingungen: 5500 dpm [ $^{14}\text{C}$ ]-Spermidin, 2 nmol dcSAM, jeweils 3  $\mu\text{g}$  TPS\_41289, 55°C und 100 mM Glycin/NaOH, pH 9,6, Reaktionszeit: 30 min).

### **3.5. Unterscheidung der ACL5-Gruppe von der SPDS/SPMS-Gruppe bezüglich der Produktbildung**

Wie aus Abb. 3-3 ersichtlich wurde, können die N-Aminopropyltransferasen in unterschiedlichen Gruppen, wie der SPDS/SPMS- und ACL5-Gruppe, gegliedert werden. Die Beobachtung, dass es sich bei TPS\_41289 um eine Thermosperminsynthase handelt, ließ darauf schließen, dass vermutlich ACL5 von *A. thaliana* bzw. SpeE von *T. thermophilus* (u. a. Sequenzen, die dieser Gruppe angehören) ebenso Thermosperminsynthasen bzw. N-Aminopropyltransferasen sind, die hauptsächlich Thermospermin aus Spermidin und dcSAM bilden.

Um dieser Theorie nachzugehen und die Gliederung aus Dendrogramm Abb. 3-3 auch zu untermauern wurden, neben TPS\_41289, noch vier andere N-Aminopropyltransferasen in Expressionsvektoren kloniert, die sowohl der ACL5- als auch der SPDS/SPMS-Gruppe zugehörig sind.

Die *SpeE*-Sequenz von *T. thermophilus* wurde aus genomischer DNA amplifiziert und in den Klonierungsvektor pQE-30 UA kloniert. Das Sperminsynthasegen, *SPE4*, von *S. cerevisiae* wurde ebenso aus genomischer DNA amplifiziert und in pQE-30 UA eingebracht. Von *A.*

*thaliana* gibt es zwei unterschiedliche Spermidin-N-Aminopropyltransferasen, ACL5 und SPMS, die aus cDNA mittels PCR verstrtzt und in pQE-30 UA kloniert wurden.

Kompetente *E. coli* SG13001 wurden jeweils mit pQE-30 UA/*SpeE*, pQE-30 UA/*SPE4*, pQE-30 UA/*ACL5* bzw. pQE-30 UA/*SPMS* transformiert, mit IPTG induziert und der Rohextrakt aus den so induzierten Zellen gewonnen. Die enzymatischen Reaktionsbedingungen wurden bei allen Reaktion gleich behalten (100 mM Tris/HCl, pH 7,5 und 23 pmol Spermidin (5500 dpm), 2 nmol dcSAM bei 30°C fr 1h), bis auf die Temperatur, wobei SpeE, aufgrund thermophilen Ursprungs bei 75°C inkubiert wurde und TPS\_41289 bei der optimierten Temperatur (55°C).

Wie bereits erwht, knnen Spermin und Thermospermin im DC-Laufmittel BAPF aufgrund ihres unterschiedlichen Rf-Wertes unterschieden werden. In Abb. 3-22 ist zu sehen, dass es sich bei ACL5, SpeE und TPS\_41289 um Thermosperminsynthasen handelt, die aus Spermidin und dcSAM Thermospermin synthetisieren. Hingegen handelt es sich bei den N-Aminopropyltransferasen des SPDS/SPMS-Typs (*SPE4*, *SPMS*) eindeutig um Sperminsynthasen.

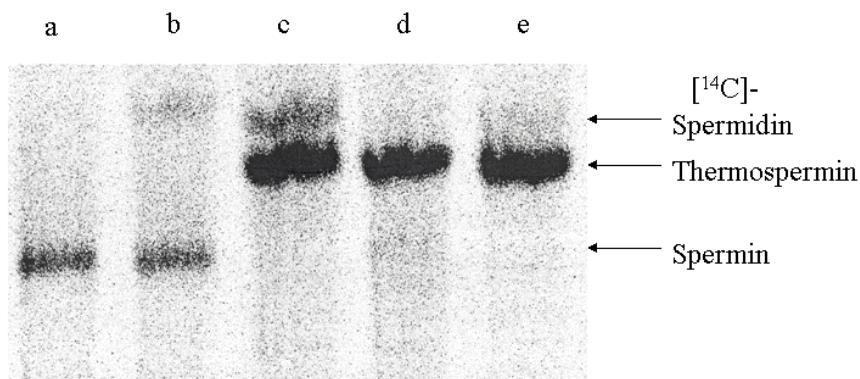


Abb. 3-22: Vergleich der Polyaminprodukte nach Reaktion verschiedener Spermidin-N-Aminopropyltransferasen mit Spermidin und dcSAM (autoradiographische Auswertung einer DC-Platte nach BAPF-Lauf): (a) SPE4 (*S. cerevisiae*), (b) SPMS (*A. thaliana*), (c) ACL5 (*A. thaliana*), (d) SpeE (*T. thermophilus*), (e)TPS\_41289.

### **3.6. Transformationsexperiment von TPS\_41289 in *T. pseudonana* mit anschließender Polyaminanalyse transformierter *T. pseudonana*-Zellen**

Die physiologische Funktion von TPS\_41289 in *T. pseudonana* ist unbekannt, weiterhin konnten in *T. pseudonana*-Zellen kein Thermospermin im Rohextrakt nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung Dr. KNOTT). Es wurde daher versucht TPS\_41289 in *T. pseudonana* überzuexprimieren, um mögliche von Thermospermin nachfolgende Polyaminprodukte nachzuweisen, die im Vergleich zu Wildtypzellen stärker akkumulieren könnten und somit eventuell nachweisbar wären.

Zur Exprimierung der TPS\_41289 war ein Transformationssystem erforderlich, bei dem das Gen stetig und stark genug exprimiert wird und nicht der Expressionskontrolle der betreffenden Transformantenzelle unterliegt. Die Transformation von *T. pseudonana* wurde bereits von POULSEN et al. (2006) etabliert. Für die Cotransformation wurden zwei Plasmide, das Expressionsplasmid TpNR und das Resistenzplasmid pBlue/TpfcpNat, verwendet. Das pBlue/TpfcpNat-Plasmid verfügt über einen starken *T. pseudonana*-spezifischen Fucoxanthin-Chlorophyll a/c bindendes Protein-Promoter, der Einfluss auf die stetige Expression des nat1-Gens hat, das für eine Nourseothricin N-Acetyl-Transferase codiert und somit gegen das Selektionsmittel Nourseothricin Resistenz vermittelt. Der TpNR-Vektor verfügt über einen Nitratreduktase-Promoter und -Terminator. Zwischen dem Promoter und Terminator gibt es eine kleine Klonierungsstelle, bei der gewünschte Sequenzen kloniert werden können. Die Expression solcher in TpNR klonierter Sequenzen ist induzierbar, wenn  $\text{NO}_3^-$  als alleinige Stickstoffquelle im Medium vorhanden ist (POULSEN et al., 2006 und Vergleich dazu OHRESSER et al., 1997).

Der offene Leserahmen von TPS\_41289 wurde mit dem für den Vektor erforderlichen 5'-Überhang (5'-ATAATCATA-3') amplifiziert und über glatte Enden in die EcoRV-Schnittstelle ligiert. Das so erschaffene TpNR/41289-Plasmid wurde in *T. pseudonana* mit dem Resistenzplasmid pBlue/TpfcpNat kotransformiert. Die transformierten Zellen wurden zwei Wochen lang auf einer MW1-Agarplatte mit Nourseothricinselektion selektiert, wobei nach der Selektion ca. 80 Transformanten erhalten wurden. Es wurden von den Selektionsplatten 10 Kolonien isoliert, von denen die genomische DNA gewonnen wurde.

### 3.6.1. Nachweis des Transformationserfolges auf Nukleinsäureebene

#### a) Schnellnachweis durch PCR mit genomischer DNA

Die von den Transformanten isolierte genomische DNA wurde einer PCR unterzogen, bei der ein Primerpaar verwendet wurde, das komplementär zu einem Sequenzstück von dem Nitratreduktase-Promoter, sowie zu einem Sequenzteil von *TPS\_41289* ist. Von Zellen die das TpNR/41289-Plasmid nicht aufgenommen haben, können somit keine Amplifikate erhalten werden, da im Wildtyp von *T. pseudonana* kein Nitratreduktase-Promoter dem ORF von *TPS\_41289* vorgelagert ist.

Der Schnellnachweis mit der beschriebenen PCR ergab, dass von den zehn untersuchten Transformanten sieben Transformanten das TpNR/41289-Plasmid tatsächlich aufgenommen haben (siehe Abb. 3-23).

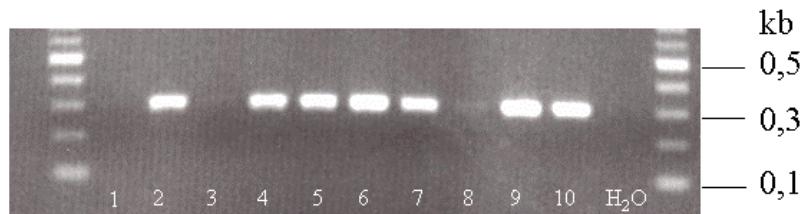


Abb. 3-23: Auswertung des Schnellnachweises mittels PCR mit genomischer DNA: Von zehn Transformanten wurde die genomische DNA isoliert und mittels einer PCR der Transformationserfolg geprüft. Wasser diente als Negativkontrolle, um DNA-Kontaminationen nachzuweisen.

#### b) Untersuchung des Transformationserfolges auf cDNA-Ebene (Nachweis durch RT-PCR)

Von einer Transformante (Transformante 2, siehe Abb. 3-23) wurde die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, um den Schnellnachweis mittels PCR mit genomischer DNA nochmals abzusichern, da der alleinige Schnellnachweis keine sichere Methodik ist sicherzustellen, ob das TpNR/41289-Plasmid tatsächlich in die genomische DNA integriert ist.

Weiterhin kann durch einen positiven RT-PCR-Test ausgesagt werden, dass die Expressionskassette mit dem einklonierten *TPS\_41289*-Plasmid funktionsfähig ist. Um der Schwierigkeit zu begegnen, dass eventuell *TPS\_41289* amplifiziert wird, die alleinig unter der

Kontrolle von dem TPS\_41289 spezifischen Promoter steht, wurde ähnlich wie bei Kap. 3.6.1. a) ein Primerpaar für die RT-PCR bereitgestellt, das komplementär für die 5'-UTR des TpNR/41289-Transkripts ist. Um weiterhin falschpositive PCR-Amplifikate auszuschließen, wurde die RNA von Transformanten aufgereinigt, die in MW1/ $\text{NH}_4^+$  bzw. in MW1/ $\text{NO}_3^-$  angewachsen sind. Aufgrund des Nitratreduktase-Promoters der die *TPS\_41289*-Expression steuert, war zu erwarten, dass nur Transformanten, die in MW1/ $\text{NO}_3^-$  gewachsen sind das TpNR/41289-Transkript bilden, das somit durch RT-PCR nachweisbar wird (vgl. dazu auch POULSEN et al., 2006).

Durch RT-PCR wurde der Nachweis erbracht, dass TpNR/41289 in Anwesenheit von Nitrat als alleinige Stickstoffquelle induzierbar ist, jedoch in Anwesenheit von Ammonium fast überhaupt nicht in der cDNA nachgewiesen werden konnte. Ein sehr schwaches Amplifikat ist in Abb. 3-24 (Spur a) zu sehen. Dieses Amplifikat kann allerdings von normaler *TPS\_41289*-cDNA herrühren, das durch teilweise Bindung des Primers schwach amplifiziert wurde (ein Primer war mit sechs Basen komplementär zur *TPS\_41289*-Sequenz). Zum Vergleich wurde  $\beta$ -Tubulin mit gleicher Menge cDNA amplifiziert und sehr deutlich in der gleichen cDNA-Präparation nachgewiesen (Spur b). Im Vergleich zur cDNA aus MW1/ $\text{NH}_4^+$ -gewachsenen Zellen, konnte das Transkript von TpNR/41289 sehr deutlich nachgewiesen werden, womit von einer Nitratinduktion von TpNR/41289 in transformierten *T. pseudonana*-Zellen ausgegangen werden kann.

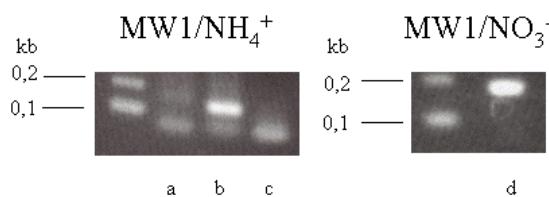


Abb. 3-24: RT-PCR zum Nachweis der  $\text{NO}_3^-$ -induzierten Bildung von TpNR/41289-Transkript: a) PCR zum Nachweis von TpNR/41289-Transkript (cDNA von Zellen gewachsen mit  $\text{NH}_4^+$ ), b)  $\beta$ -Tubulingen (Positivkontrolle/ gleiche cDNA wie bei a), c)  $\text{H}_2\text{O}$ , d) TpNR/41289-Transkript (cDNA von Zellen gewachsen mit  $\text{NO}_3^-$ ). Es wurden ungefähr gleiche cDNA-Mengen eingesetzt und eine PCR mit 35 Zyklen durchgeführt.

c) Nachweis einer zusätzlichen *TPS\_41289*-Kopie im Genom der Transformante durch Southern-Blot

Durch Southern-Blot mit anschließender DNA/DNA-Hybridisierung mit einer zur *TPS\_41289* komplementären [<sup>35</sup>S]-markierten Sonde sollte der Nachweis erbracht werden, dass eine zusätzliche Genkopie von *TPS\_41289* vorhanden ist.

Wie in Abb. 3-25 zu sehen ist, ist die [<sup>35</sup>S]-markierte Sonde spezifisch für die *TPS\_41289*-Sequenz, da eine deutliche Hybridisierung bei der (unverdauten) Positivkontrolle in Abb. 3-25 (a) zu erkennen ist. Im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3-25 (c)) verfügt die Transformante über mindestens zwei *TPS\_41289*-Kopien, die sich bei ca. 7 und 4 kb nachweisen lassen (Abb. 3-25 (b)). Hingegen konnte bei der mit *Xba*I-verdauten genomischen DNA des Wildtyps nur eine Kopie nachgewiesen werden, die bei der Fragmentlänge von 7 kb identifizierbar ist (Abb. 3-25 (c)).

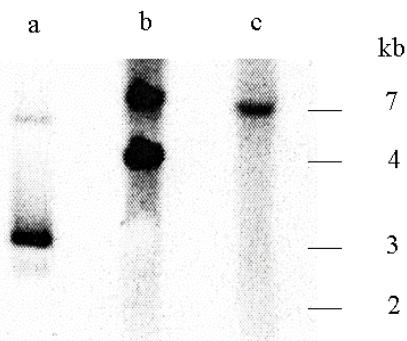


Abb. 3-25: Nachweis der zusätzlichen Genkopie von *TPS\_41289* im Genom von *T. pseudonana* durch DNA/DNA-Hybridisierung mit einer [<sup>35</sup>S]-DNA-Sonde: a) Positivkontrolle mit dem unverdauten Plasmid TpNR/41289 (50 attomol), b) *Xba*I verdaute genomische DNA von der transformierten *T. pseudonana*, c) *Xba*I verdaute genomische DNA von untransformierter *T. pseudonana*.

### **3.6.2. Nachweis der TPS\_41289-Überexpression durch Enzymtest im Rohextrakt**

In den vorangegangenen Experimenten wurde *TPS\_41289*, das unter Kontrolle von einem Nitratreduktasenpromoter steht, in genomischer DNA und auf Transkriptionsebene in der Transformante nachgewiesen. Weiterhin war es notwendig zu zeigen, dass *TPS\_41289* tatsächlich verstärkt translatiert wird. Zunächst wurde der zellfreie Rohextrakt von der

Transformante isoliert und gegen eine Referenz (untransformierte *T. pseudonana*-Zellen) einer analytischen SDS-PAGE unterzogen, mit dem Ziel, eventuell eine distinkte Proteinbande bei der Transformante zu identifizieren, die der Größe nach TPS\_41289 zuzuordnen wäre. Allerdings konnte keinerlei Unterschied zwischen dem Rohextrakt der Referenz und den im MW1/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> gewachsenen Zellen gefunden werden. Aufgrund dieser Tatsache wurde ein Enzymtest im Rohextrakt von *T. pseudonana* vorgenommen, wobei der Umsatz von Spermidin zu Thermospermin (in dpm) zwischen der Transformante und den untransformierten *T. pseudonana*-Zellen verglichen wurde. Dazu wurden mindestens drei voneinander unabhängige Messungen vorgenommen, bei denen die Proteinkonzentration, Temperatur, pH, Substratkonzentrationen und das Volumen, sowie die Inkubationszeit der Reaktion gleichbehalten wurde. Wie in Abb. 3-26 zu sehen ist, wurde mit dem Rohextrakt von in MW1/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> gewachsenen Transformantenzellen ein mehr als doppelt so hoher Umsatz von Spermidin zu Thermospermin gemessen, als dies im Rohextrakt der Kontrolle (untransformierte Zellen) der Fall war. Damit wurde gezeigt, dass tatsächlich eine stärkere Translation von TPS\_41289 in der Transformante stattfindet.

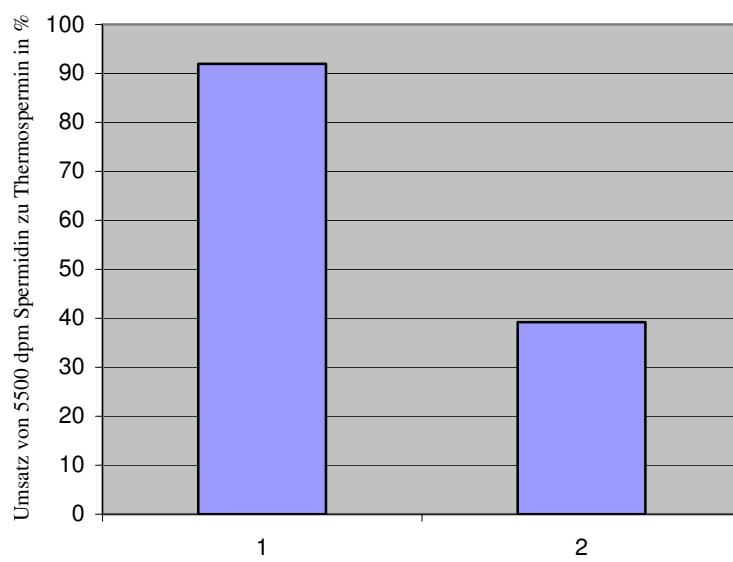


Abb. 3-26: Vergleichende Umsatzmessung von [<sup>14</sup>C]-Spermidin zu [<sup>14</sup>C]-Thermospermin zwischen Transformante (1) und Wildtypzellen (2) von *T. pseudonana* (Reaktionsbedingungen: 5500 dpm [<sup>14</sup>C]-Spermidin, 2 nmol dcSAM, 55°C, 100 mM Tris, pH 8,8, 1 h, 0,75 mg/ ml Protein, Volumen: 400 µl).

### **3.6.3. Vergleichende Polyaminanalyse zwischen Wildtyp und Transformante von *T. pseudonana***

Es wurden von transformierten bzw. untransformierten *T. pseudonana* cytosolische Polyamine aufgereinigt und perethyliert und mittels MALDI-TOF (Arbeitsgruppe DEUTZMANN) untersucht. Der Vergleich der perethylierten cytosolischen Polyamine von untransformierten bzw. transformierten *T. pseudonana*-Zellen sollte einen Hinweis geben, ob tatsächlich Spermidin *in vivo* als Substrat in *T. pseudonana* für TPS\_41289 in Frage kommt und ob eine Akkumulierung von Thermospermin zu sehen ist bzw. ob eventuell Reaktionsprodukte im Unterschied zu untransformierten *T. pseudonana*-Zellen auftauchen, die einen Hinweis für eine mögliche physiologische Funktion von TPS\_41289 geben könnten.

Die MALDI-TOF erbrachte für den Wildtyp ein Massenspektrum, das übereinstimmend ist mit Beobachtungen, die mit dem GC-MS durchgeführt wurden (eigene Beobachtungen und Untersuchungen von Dr. KNOTT). Hierbei konnten Spermidin ( $m/z$ : 286,3), Norspermidin ( $m/z$ : 272,3), einfache methylierte Norspermidin ( $m/z$ : 258,3), zweifach methylierte Norspermidin ( $m/z$ : 244,3), dreifach methylierte Norspermidin ( $m/z$ : 230,2) identifiziert werden (siehe Abb. 3-27 bzw. 3-28). Weiterhin gab es eine gewisse Anzahl von Signalen, die von ihrer Masse einem bestimmten Polyamin nicht zuzuordnen waren und die teilweise andererseits in der Leerprobe enthalten waren (und somit keine Polyamine sind).

Die Auswertung des Massenspektrums der Transformante (Abb. 3-28) im Vergleich zum Wildtyp ergab in Bezug auf das Norspermidin und seinen methylierten Derivaten keinen signifikanten Unterschied, weiterhin war das Thermosperminsignal ( $m/z$ : 371) bei beiden Proben nicht vorhanden bzw. nicht nachweisbar. Eine deutliche Änderung ergab sich bei Spermidin ( $m/z$ : 286,3), das in der Transformante nicht nachweisbar war- vermutlich durch die erhöhte Aktivität von TPS\_41289 (siehe Kap. 3.6.2.)- aber in der Probe der untransformierten *T. pseudonana* ein sehr deutliches Signal ergab. Im Unterschied zu der Probe aus den untransformierten *T. pseudonana*, enthielt das Massenspektrum der Transformante ein Signal von  $m/z$ : 357, das vermutlich von der Masse ein Norspermin ist und ein denkbare Zwischenprodukt für längerkettige Polyamine (Oktamine) sein könnte.

## Nachgewiesene Polyamine (Transformante und Wildtyp)

Polyamine	Struktur (ohne Perethylierung)	(m/z) mit Perethylierung
Spermidin	C <sub>4</sub> C <sub>3</sub>	286,3
Norspermidin	C <sub>3</sub> C <sub>3</sub>	272,3
Einfach methyliertes Norspermidin	C <sub>3</sub> C <sub>3</sub> -(CH <sub>3</sub> )	258,3
Zweifach methyliertes Norspermidin	C <sub>3</sub> C <sub>3</sub> -(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	244,3
Dreifach methyliertes Norspermidin	C <sub>3</sub> C <sub>3</sub> -(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	230,2
Norspermin	C <sub>3</sub> C <sub>3</sub> C <sub>3</sub>	357,4

Tab. 3-1: In *T. pseudonana* nachgewiesene cytosolische Polyamine mit Struktur (vereinfachte Schreibweise) und Masse im perethylierten Zustand.

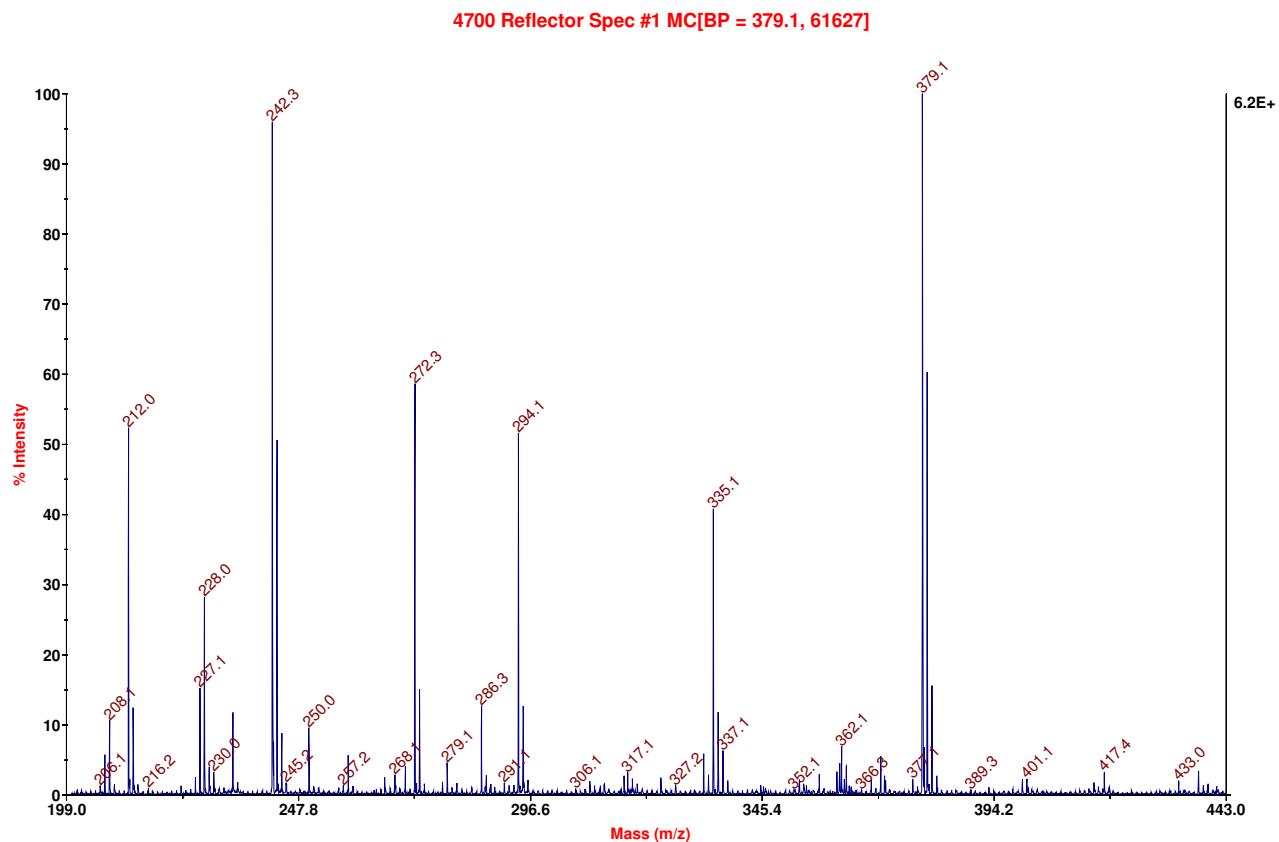


Abb. 3-27: Massenspektrum einer perethylierten Polyaminprobe aus untransformierten *T. pseudonana*.

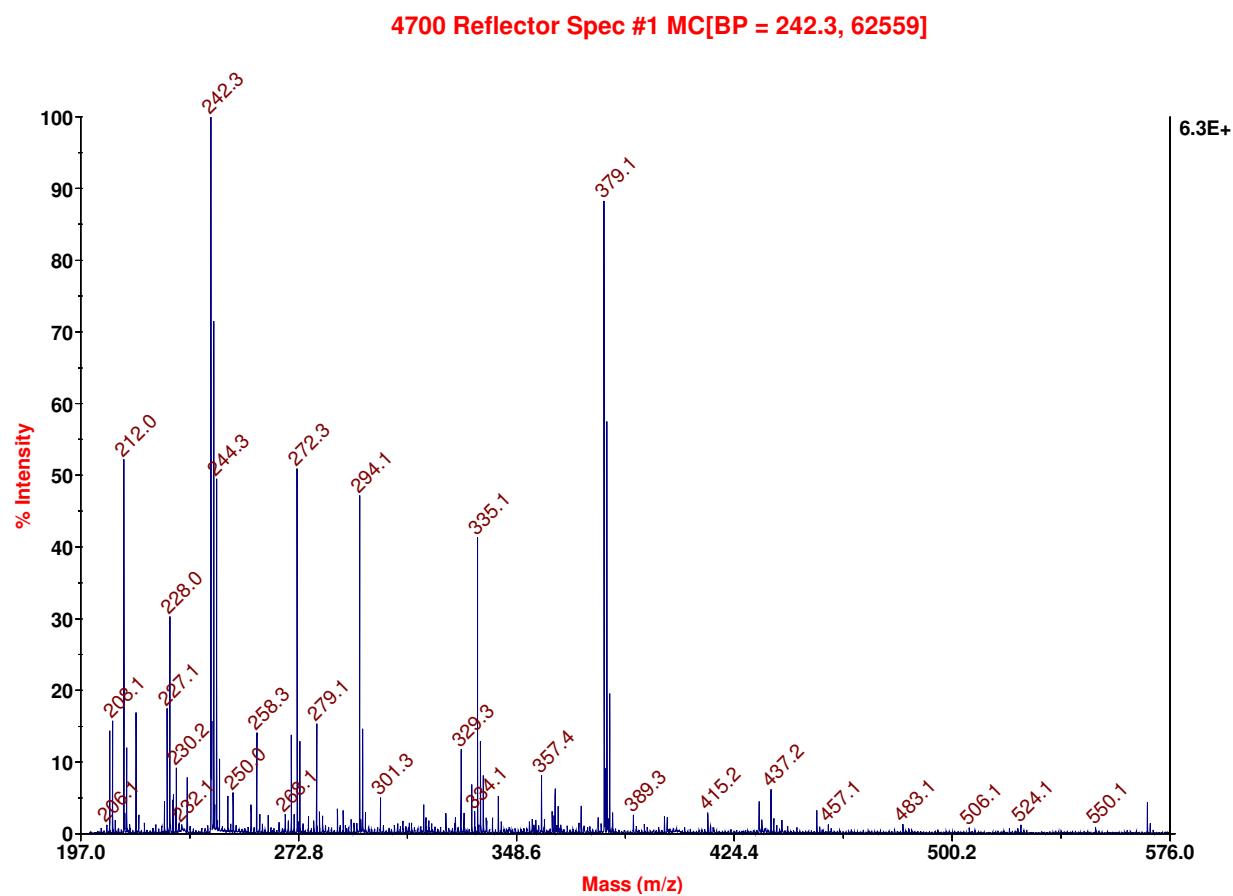


Abb. 3-28: Massenspektrum einer perethylierten Polyaminprobe aus *T. pseudonana*, mit Überexpression von *TPS\_41289*.

### **3.7. Nachweis einer Thermosperminsynthaseaktivität bei verschiedenen Diatomeenarten**

Es wurden zellfreie Rohextrakte von verschiedenen Diatomeenarten mit [<sup>14</sup>C]-Putrescin und [<sup>14</sup>C]-Spermidin mit dcSAM inkubiert, um nachzuweisen, ob die in *T. pseudonana* vorkommende Thermosperminsynthase (TPS\_41289) auch bei anderen Diatomeenarten vorkommt. Weiterhin sollte geprüft werden, ob in Verbindung mit Putrescin bzw. Spermidin und dcSAM bei verschiedenen Diatomeen andere Polyamine als Spermidin, Spermin bzw. Thermospermin entstehen.

Der Enzymtest mit dem Rohextrakt verschiedener Diatomeen ergab, dass eine Spermidinsynthaseaktivität bei allen untersuchten Diatomeen vorhanden ist. Die Inkubation von Putrescin mit dcSAM ergab bei allen untersuchten Diatomeen ein einziges Polyaminprodukt (Spermidin). Die Inkubation von Rohextrakt mit Spermidin und dcSAM erbrachte unterschiedliche Resultate. *T. pseudonana* (Positivkontrolle) und *Cyclotella meneghiana* verfügten über eine eindeutige Thermosperminsynthaseaktivität, während bei *Stephanopyxis turris* eine sehr schwache Sperminsynthaseaktivität zu beobachten war.

Bei den pennaten Diatomeen *Navicula pelliculosa*, *Nitzschia angularis* und *Cylindrotheca fusiformis* konnte eine Spermidin-N-Aminopropyltransferaseaktivität nach mehrmaligen Enzymtests nicht verzeichnet werden.

Artname	im Rohextrakt nachgewiesene Spermidin-N-aminopropyltransferaseaktivität	Spermidinsynthaseaktivität
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Thermosperminsynthaseaktivität	Spermidinsynthaseaktivität
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	Thermosperminsynthaseaktivität	Spermidinsynthaseaktivität
<i>Stephanopyxis turris</i>	Sperminsynthaseaktivität	Spermidinsynthaseaktivität
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	negativ	Spermidinsynthaseaktivität
<i>Navicula pelliculosa</i>	negativ	Spermidinsynthaseaktivität
<i>Nitzschia angularis</i>	negativ	Spermidinsynthaseaktivität

Tabelle 3-1: Überblick über die auf N-Aminopropyltransferaseaktivität untersuchten Diatomeen.

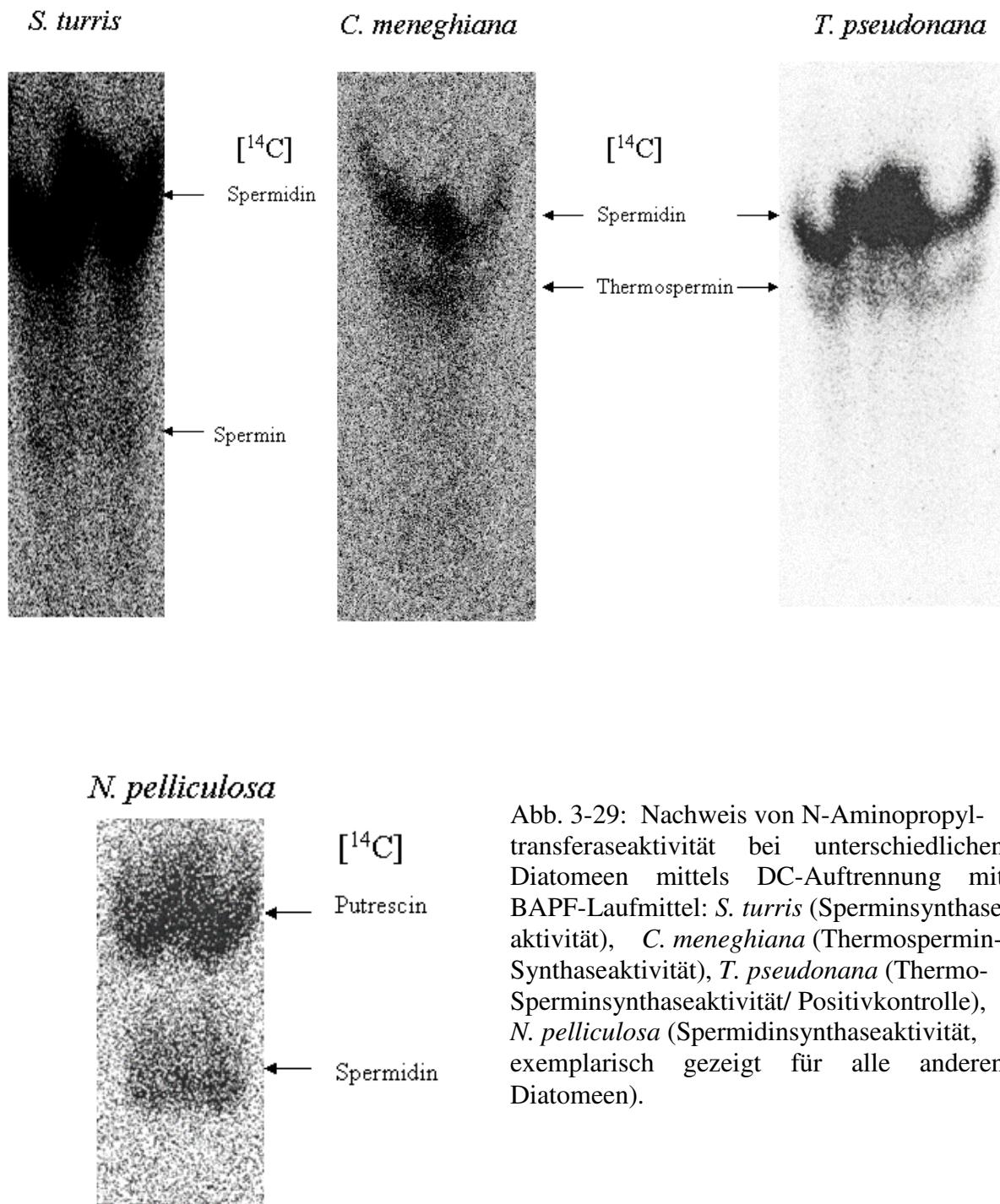


Abb. 3-29: Nachweis von N-Aminopropyltransferaseaktivität bei unterschiedlichen Diatomeen mittels DC-Auftrennung mit BAPF-Laufmittel: *S. turris* (Sperminsynthaseaktivität), *C. meneghiana* (Thermospermin-Synthaseaktivität), *T. pseudonana* (Thermo-Sperminsynthaseaktivität/ Positivkontrolle), *N. pelliculosa* (Spermidinsynthaseaktivität, exemplarisch gezeigt für alle anderen Diatomeen).

## 4. Diskussion

Polyamine haben eine wichtige Funktion in Bezug auf Nukleinsäurestabilisierung, Zellproliferation und Entwicklung. Von diesen Polyaminen sind Putrescin und Spermidin bei fast allen Organismen abundant, während Spermin zumeist nur bei Eukaryonten vorkommend ist. In den silikathaltigen Diatomeenschalen liegen längerkettige Polyamine vor, deren Syntheseweg völlig unbekannt ist.

Aufgrund der Kenntnis über den Syntheseweg von Spermidin bzw. Spermin, war es naheliegend nach N-Aminopropyltransferassequenzen bei der Diatomee *T. pseudonana*, deren Genom sequenziert vorliegt, zu suchen, die vermutlich an der Synthese von langkettigen Polyaminen beteiligt sind.

### 4.1. Identifizierung von N-Aminopropyltransferasen in *T. pseudonana*

Die Sequenzierung des Genoms der Diatomee *T. pseudonana* erlaubte es nach Genmodellen zu suchen, die für eine Polyaminsynthase codieren. Die Datenbanksuche nach spermidin- bzw. sperminsynthaseähnlichen Sequenzen erbrachte acht verschiedene Genmodelle, die vermutlich codierend für N-Aminopropyltransferasen waren. Von diesen Sequenzen wurde durch Klonierung, heterologe Genexpression und Enzymtest eine Spermidinsynthase (TPS\_108361) und eine Thermosperminsynthase (TPS\_41289) identifiziert, wobei bei den anderen sechs heterolog überexprimierten Proteinen keine N-Aminopropyltransferaseaktivität zu messen war.

Die *in vitro* gemessene Enzymaktivität mit den heterolog überexprimierten Proteinen war in Übereinstimmung mit vorhergehenden Untersuchungen von Dr. KNOTT, der beobachtet hat, dass in Gegenwart von dcSAM und Putrescin bzw. Spermidin und Rohextrakt aus *T. pseudonana*, ausschließlich Spermidin bzw. Thermospermin entsteht (persönliche Mitteilung, KNOTT und siehe Kap. 4.6.).

Eine breite unspezifische Aktivität der Spermidinsynthase (TPS\_108361) und Thermosperminsynthase (TPS\_41289) von *T. pseudonana* war weder im Rohextrakt, noch an gereinigten Enzymen nachweisbar. Die Thermosperminsynthase war sehr substratspezifisch für Spermidin und dcSAM, wobei Putrescin bzw. 1,3-Diaminopropan und Thermospermin nicht als Substrate angenommen wurden. Diese Beobachtung ist übereinstimmend mit der Untersuchung einer anderen Spermidin-N-Aminopropyltransferase (Sperminsynthase) aus *Bos taurus*, die eine hohe Substratspezifität für Spermidin und dcSAM zeigte (PAJULA et al.,

1979). Während die Spermidinsynthase von *T. maritima* (KOROLEV et al., 2002) eine breite unspezifische Aktivität für 1,3-Diaminopropan und einigen weiteren Polyaminen zeigte, war TPS\_108361 sehr substratspezifisch für Putrescin und dcSAM.

#### **4.2. Besondere biochemische Merkmale der rekombinanten Thermospermensynthase (TPS\_41289)**

Im Gegensatz zur Mehrheit der bekannten N-Aminopropyltransferasen, ist TPS\_41289 ein homotetrameres Protein. Eine Vielzahl von untersuchten Spermidin- und Sperminsynthasen sind hingegen Homodimere (PAJULA et al., 1979; DUFE et al. 2005; HAIDER et al., 2005). Außergewöhnlich scheint zudem zu sein, dass TPS\_41289 ein ungewöhnliches Temperaturoptimum von 55°C zeigt, bei dem die höchste Thermospermensynthaseaktivität zu verzeichnen war, obwohl der Ursprungsorganismus (*T. pseudonana*) ein psychrophiler Organismus ist, der bei geschätzten Temperaturen von 2-20°C (jahreszeitlich abhängig) im Meer vorkommt. Ein Fall von Tetramerisierung einer N-Aminopropyltransferase ist bei der Spermidinsynthase des thermophilen Bakteriums *T. maritima* beobachtet wurden (KOROLEV et al., 2002). Es wird dabei vermutet, dass es einen Zusammenhang zwischen der Thermostabilität und dem Oligomerisierungsgrad des Proteins gibt, wobei die Tetramerisierung gegenüber einer Dimerisierung eine bessere Thermostabilität gewährleistet. Damit würde aufgrund des besseren Oberflächen/Volumen-Verhältnisses weniger Proteinfläche in Kontakt mit dem (heißen) umgebenden Medium in Kontakt kommen (KOROLEV et al., 2002 und SALMINEN et al., 1996). Dieser Zusammenhang war auch bei (dem tetrameren) TPS\_41289 wahrzunehmen, dessen Aktivität bei Temperaturen deutlich über 55 °C, wahrscheinlich in Folge thermischer Denaturierung, nachließ. Die Enzymaktivität von TPS\_41289 ist unter Umweltbedingungen (2-20 °C) *in vivo* für die Diatomee möglicherweise völlig ausreichend, allerdings ist es auch vollkommen unbekannt ob TPS\_41289 in Proteinkomplexen, beispielsweise mit einer Ornithindcarboxylase oder Spermidinsynthase (oder anderen Proteinen) etc. vorliegt, wobei dies einen entscheiden Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit der N-Aminopropyltransferasereaktion nehmen könnte. Eine solche Form der Multiproteinkomplexbildung bzw. N-Amiopropyltransferasekomplexbildung wurde bei der Spermidinsynthase 1 bzw. Spermidinsynthase 2 mit der Sperminsynthase (SPMS) aus *A. thaliana* mittels *in vitro* und *in vivo* Experimenten gezeigt (PANICOT et al., 2002). Die Hauptvorteile einer solchen Multiproteinkomplexbildung sind einerseits dass eine unnötige Diffusion von

Zwischenprodukten in der Zelle vermieden werden kann und damit auch Intermediate geschützt werden können, die ansonsten durch kompetitive Reaktionswege verbraucht werden würden (PANICOT et al., 2002).

In Übereinstimmung mit allen anderen N-Aminopropyltransferasen verfügt TPS\_41289 über ein pH-Optimum im alkalischen Bereich (pH 9,4-9,6) und liegt bezüglich der spezifischen Aktivität in einer Ebene, die charakteristisch für Sperminsynthasen (6,2 bis 579 nmol pro mg Enzym pro min) ist (Vergleich dazu <http://www.brenda-enzymes.info/>).

#### **4.3. ACL5-ähnliche N-Aminopropyltransferasen und SPDS/SPMS-ähnliche N-Aminopropyltransferasen unterscheiden sich bezüglich des Reaktionsproduktes**

Die Gegenüberstellung von verschiedenen bekannten N-Aminopropyltransferasesequenzen aus unterschiedlichen Organismen zeigte, dass bestimmte N-Aminopropyltransferasen zwei voneinander abgegrenzte große Gruppen bilden, die als SPDS/SPMS-Gruppe (spermidinsynthase-/sperminsynthaseähnliche N-Aminopropyltransferasen) bzw. als ACL5-Gruppe (der *A. thaliana*-ACL5-ähnlichen N-Aminopropyltransferase) benannt wurde (KITASHIBA et al., 2005, KNOTT et al., 2007). Trotz dieser Abgrenzung wurde weitestgehend in früheren Publikationen stets angenommen, dass es sich bei allen diesen Sequenzen (ACL5-Gruppe und SPDS/SPMS-Gruppe), ausgenommen der Agmatin-N-Aminopropyltransferase (SpeE) von *T. thermophilus*, um Sperminsynthasen handelt (HANZAWA et al., 2000; KITASHIBA et al., 2005).

#### **4.4. SpeE aus *T. thermophilus* besitzt Thermospermmin synthaseaktivität**

Bereits 1979 wurde von OSHIMA (1979) das damals neuartige Polyamin Thermospermin aus *T. thermophilus* isoliert. Neben Thermospermin wurden später zudem noch 15 weitere Polyamine in *T. thermophilus* identifiziert. Durch Sequenzalignement verschiedener N-Aminopropyltransferasen wurden Homologien zwischen TPS\_41289-Sequenz und der SpeE-Sequenz von *T. thermophilus* gefunden, das eine Agmatin-N-Aminopropyltransferase-Aktivität besitzt (OHNUMA et al., 2005). Ob diese SpeE-Sequenz allerdings nur für die Aminopropylierung des Agmatins zuständig ist oder ob eventuell weitere N-Aminopropyltransferaseaktivitäten durch SpeE zustande kommen, konnte von OSHIMA und Kollegen bisher nicht beantwortet werden. Aufgrund der Kenntnis, dass TPS\_41289 eine Thermospermmin synthase ist, wurde vermutet, dass das Thermospermin in *T. thermophilus*

durch SpeE-Aktivität im Beisein von Spermidin und dcSAM entsteht, was im Rahmen dieser Arbeit als *in vitro* -Test bewiesen werden konnte.

#### **4.5. ACL5 aus *A. thaliana* ist eine Thermosperminsynthase (KNOTT et al., 2007)**

Dass ACL5 von *A. thaliana* vielmehr eine Thermosperminsynthase statt eine Sperminsynthase ist, liefert Erklärungsansätze für die von HANZAWA et al. (2000) und IMAI et al. (2004) beschriebenen Beobachtungen. Es wurde berichtet, dass *A. thaliana* zwei mutmaßliche Sperminsynthasen, SPMS und ACL5, hat, die, wenn man die Gene ausschaltet, unterschiedliche phänotypische Erscheinungen hervorrufen. Die *acl5*-Nullmutante und die *acl5/spms*- Doppelnullmutante zeigten einen Phänotyp mit Zwergenwuchs, hingegen führte die *spms*-Nullmutation zu einem Phänotyp, der kaum Trockenresistenz aufwies. Weiterhin konnte der *acl5*-Phänotyp aufgehoben werden, wenn *ACL5* unter Kontrolle eines Hitzechockpromoters in *acl5*-Nullmutanten transformiert wurde, wogegen eine Transformation von *SPMS* unter selbigen Bedingungen zu keinem Ergebnis führte. Der Vergleich des Polyamingehalts zwischen einer *acl5*-Nullmutante und einer *spms*-Nullmutante ergab, dass mit großer Wahrscheinlichkeit *in vivo* Spermin durch Enzymaktivität von SPMS gebildet wird, während zwischen Wildtyp von *A. thaliana* und *acl5*-Nullmutante keinerlei Unterschied in Bezug auf Spermingehalt in der Pflanze wahrgenommen werden konnte (IMAI et al., 2004).

Durch die Entdeckung, dass die vermeintliche Sperminsynthase ACL5 eine Thermosperminsynthase und SPMS tatsächlich eine Sperminsynthase ist, können die von HANZAWA et al. (2000) und IMAI et al. (2004) beschriebenen Effekte schlüssig erklärt werden. Möglicherweise führt die Trennung der Tetramine Spermin und Thermospermin dazu, dass bei jeweiliger Bildung eines bestimmten Tetramines ein bestimmter Effekt erreicht werden soll. Hierbei wird von YAMAGUCHI (2007) vermutet, dass Spermin in *A. thaliana* eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Ionenkanal modulierende Wirkung in der Stomatazelle hat, wobei Spermin den  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluss in die Stomatazelle fördert. Dies führt zu einer Depolarisierung der Stomatazelle, wodurch  $\text{K}^+$ -Ionen (Osmotika) aus der Schließzelle ausströmen und daraufhin der Turgor der Stomatazelle abnimmt, welches zu einer Schließung der Stomatazellen führt.

Experimente von IMAI et al. (2006) weisen dagegen daraufhin, dass ACL5 eine Rolle bei der Translationsaktivierung eines basischen loop-helix-loop-Proteins (bLHL-Protein) hat, das ein Transkriptionsfaktor bei *A. thaliana* im Zusammenhang mit Wachstumsprozessen sein soll.

#### **4.6. Der Aminosäureaustausch von E156 gegen D156 bei TPS\_41289 hatte geringen Einfluss auf die Produktbildung**

Die glycinreiche Bindedomäne (siehe Abb. 3-4) für S-Adenosylmethionin (SAM) bzw. dcSAM kommt bei allen untersuchten N-Aminopropyltransferasen bzw. Methyltransferasen vor, die S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonor bzw. dcSAM als Aminopropylodonor verwenden.

Methyltransferasen, wie die Putrescin-N-Methyltransferase bei *Nicotiana tabacum*, haben anstatt Glutamat oder Aspartat (bei den N-Aminopropyltransferasen) ein Isoleucin und können aufgrund dessen SAM binden (KOROLEV et al., 2002). N-Aminopropyltransferasen haben hingegen ein Glutamat (ACL5-Gruppe) bzw. ein Aspartat (SPDS/SPMS-Gruppe) und können aufgrund der Ladung der Aminosäurenkette nur dcSAM binden (KOROLEV et al., 2002). So nahmen beispielsweise WU et al. (2007) einen Basenaustausch in der Sequenz der menschlichen Spermidinsynthase vor, wodurch D101 gegen I101 ausgetauscht wurde, mit der Folge, dass sich der  $K_M$  für dcSAM 100fach vergrößerte.

Wie bereits ausgeführt wurde, lassen sich die N-Aminopropyltransferasen der ACL5- und SPDS/SPMS-Gruppe aufgrund des Unterschieds zwischen D bzw. E in der glycinreichen Bindedomäne leicht unterscheiden. Dieser Unterschied wurde bei einer typischen ACL5-Sequenz, TPS\_41289, durch zielgerichtete Mutagenisierung aufgehoben, indem E156 gegen ein D156 ausgetauscht wurde, um die Frage zu beantworten, ob allein dieser Aminosäurerest einen Einfluss auf die Produktbildung (Sperminbildung anstatt Thermosperminbildung) hat. Durch einen Enzymtest konnte gezeigt werden, dass TPS\_41289(D156) neben Thermospermin kleine Mengen Spermin synthetisiert. Damit wurde bewiesen, dass der o.g. Aminosäurerest nicht allein Einfluss auf die Spezifität der Produktbildung nimmt. Vielmehr müssten andere Faktoren eine Rolle spielen, die Einfluss auf die richtige Bindung von Spermidin nehmen, so dass spezifisch nur die  $^1N$ -Position oder  $^{10}N$ -Position des Spermidins aminopropyliert wird. Vermutlich spielen bei den Spermidin-N-Aminopropyltransferasen dabei Aminosäurereste eine Rolle, die spezifisch mit der  $^1N$ ,  $^5N$  und  $^{10}N$ -Position des Spermidins interagieren, so dass Spermidin so ausgerichtet wird, dass eine gerichtete Übertragung des Aminopropylrestes zum Spermidin möglich ist. Die Bildung kleiner Mengen von Spermin bei TPS\_41289(D156) ist möglicherweise dadurch zustandegekommen, dass die Topologie des Proteins so verändert wurde, dass eine teilweise Übertragung des Aminopropylrestes zur  $^{10}N$ -Position des Spermidins begünstigt wurde.

Das Ergebnis des Mutagenisierungsexperimentes wirft zudem die Frage auf, weshalb die vermuteten Thermosperminsynthasen ein konserviertes Glutamat anstatt eines Aspartats in ihrer glycinreichen Bindedomäne aufweisen, obwohl diese Aminosäure keinen entscheidenden Einfluss auf die Produktbildung hat. Vermutlich könnten Spermidin- und Sperminsynthasen getrennt von solchen N-Aminopropyltransferasen entstanden sein, die Thermosperminsynthaseaktivität zeigen. Obwohl die N-Aminopropyltransferasen der ACL5-Gruppe bzw. SPDS/SPMS-Gruppe in Eukaryoten (*A. thaliana*, *T. pseudonana*) koexistieren, vollzieht sich bei den Archaeen eine strikte Trennung. Hierbei enthalten alle Crenarchaeota N-Aminopropyltransferasen des ACL5-Typs, während Euryarchaeota N-Aminopropyltransferasen der SPDS/SPMS-Gruppe besitzen (persönliche Mitteilung, KNOTT).

#### **4.7. Thermospermin ist im cytosolischen Polyaminpool von *T. pseudonana* nicht nachweisbar**

Thermosperminsynthaseaktivität kann zwar im Rohextrakt von *T. pseudonana* nachgewiesen werden, allerdings zeigten Versuche mittels GC-MS-Nachweis, dass Thermospermin als Inhaltsstoff im cytosolischen Polyaminpool nicht vorkommt (eigene Untersuchungen und Untersuchungen von Dr. KNOTT). Diese Beobachtung kann unterschiedliche Ursachen haben: Einerseits war es denkbar, dass eventuell Spermidin nicht das wirkliche Substrat *in vivo* ist und dass damit die Thermosperminbildung zwar *in vitro* möglich ist, jedoch die Reaktion in dieser Form nicht in der Zelle abläuft. Andererseits kann TPS\_41289 in *T. pseudonana* in einem Multienzymkomplex vorkommen (siehe PANICOT et al., 2002), wobei Thermospermin als Intermediat entweder weiter aminopropyliert (beispielsweise zu einem Pentamin) wird bzw. durch eine Polyaminoxidase oxidiert wird (z.B. in 4-Aminobutanal und Norspermidin), siehe SEILER (2004).

Um den Nachweis zu erbringen, dass Spermidin tatsächlich *in vivo* das Substrat für TPS\_41289 ist und um mögliche Reaktionsprodukte von TPS\_41289 *in vivo* nachzuweisen, wurde versucht, cytosolische Polyamine aus der mit TpNR/41289-Plasmid transformierten *T. pseudonana* zu isolieren und mittels MALDI-TOF zu analysieren. Im Gegensatz zum Wildtyp von *T. pseudonana* enthielt die Transformante kein nachweisbares Spermidin, womit gezeigt werden konnte, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit Spermidin *in vivo* das Substrat für TPS\_41289 ist. Allerdings konnte weder im Wildtyp noch in der Transformante Thermospermin nachgewiesen werden. Aus diesem Grund muss angenommen werden, dass

Thermospermin unter *in vivo* Bedingungen in kleinsten Mengen hergestellt und in der Zelle wirksam ist oder dass Thermospermin als Intermediat für weitere Reaktionen zur Verfügung steht. Allerdings konnte eine Polyaminoxidaseaktivität im Rohextrakt mit Thermospermin nicht nachgewiesen werden (eigene nicht veröffentlichte Untersuchungen), noch konnten weitere längerkettige Polyaminprodukte, z.B. Pentamine, mit MALDI-TOF nachgewiesen werden, womit die Rolle einer Thermosperminsynthase in *T. pseudonana* nicht ausreichend erklärt werden kann. Eine andere Ursache für das fehlende Thermospermin in der Transformante könnte sein, dass überschüssiges Thermospermin aus der Zelle exkretiert und somit nicht nachgewiesen werden konnte, siehe NISHIBORI et al. (2001). Im Unterschied zu den Polyaminen aus untransformierten *T. pseudonana* enthält die Transformante geringe Mengen von Norspermin. Allerdings zeigten *in vitro*-Enzymreaktionen mit TPS\_41289 und ACL5 aus *A. thaliana*, dass diese N-Aminopropyltransferasen aus dcSAM und Norspermidin kein Norspermin herstellen können (persönliche Mitteilung, KNOTT).

#### **4.8. N-Aminopropyltransferase-Enzymtests mit zellfreien Rohextrakten aus Diatomeen ergaben als Produkte Spermidin, Spermin und Thermospermin**

Verschiedenen zellfreien Rohextrakten von pennaten (bilateralsymmetrischen) Diatomeen (*C. fusiformis*, *N. angularis*, *N. pelliculosa*) und centralen (rotationssymmetrischen) Diatomeen (*T. pseudonana*, *S. turris*, *C. meneghiniana*) wurden mit Putrescin bzw. Spermidin und dcSAM inkubiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass, wie erwartet, die Spermidinsynthase ubiquitär verbreitet ist und deshalb Spermidin wahrscheinlich auch bei Diatomeen eine wichtige Funktion in Bezug auf Produktion von Hypusin, Nukleinsäurestabilisierung usw. einnimmt. Hingegen besaßen pennate Diatomeen keinerlei Spermidin-N-Aminopropyltransferaseaktivität, womit die Frage gestellt werden kann, durch welchen Syntheseweg bei diesen Diatomeen langkettige Polyamine hergestellt werden.

Hingegen konnte bei den centralen Diatomeen der Klasse *Thalassiosiraceae* (*T. pseudonana* und *C. meneghiniana*) Thermospermin als Reaktionsprodukt von Spermidin und dcSAM nachgewiesen werden, wogegen bei *S. turris* eine sehr geringe Sperminsynthaseaktivität zu verzeichnen war, bei der nicht genau gesagt werden kann, ob diese Aktivität nicht vielleicht durch eine Nebenaktivität der Spermidinsynthase zustande kam. Obwohl diese Enzymtests nur eine kleine Auswahl von Diatomeen betreffen, ist ein gewisser Trend erkennbar, bei dem folgende Aussagen getroffen werden können: Spermidin-N-Aminopropyltransferaseaktivität scheint nur bei centralen Diatomeen vorzukommen, während die

Thermosperminsynthaseaktivität vermutlich nur bei centralen Diatomeen der Klasse *Thalassiosiraceae* nachweisbar ist und somit vielleicht ein taxonomisches (biochemisches) Merkmal der *Thalassiosiraceae* darstellen könnte. Weiterhin konnte die Theorie nicht erhärtet werden, die besagt, dass die in der Frustel nachgewiesenen langkettigen Polyamine von Putrescin bzw. Spermidin und dcSAM durch eine Polyaminsynthase synthetisiert werden, da ansonsten, wie BAGGA et al. (1995) mit Rohextrakten aus *Medicago sativa* nachwies, ausgehend von Putrescin und dcSAM Spermidin und längerkettige Polyamine nachweisbar wären.

#### 4.9. Ausblick

Durch die im Rahmen der Arbeit zur Polyaminbiosynthese von Diatomeen gemachten Untersuchungen konnte eine Spermidin-N-Aminopropyltransferase entdeckt werden, die Thermospermin synthetisiert. Die physiologische Funktion von Thermospermin für *T. pseudonana* ist bisher nicht bekannt, ebenso konnte Thermospermin im cytosolischen Polyaminpool nicht nachgewiesen werden. Um die physiologische Rolle von Thermospermin nachzuweisen, wäre es notwendig *TPS\_41289* zu inaktivieren bzw. die Translation durch Antisense-RNA zu blockieren und den daraus resultierenden Phänotyp hinsichtlich Schalenbildung, Polyamingehalt und Auswirkungen bei Stress zu analysieren.

Lohnend würde es auch sein den Wildtyp von *T. pseudonana* unterschiedlichen Bedingungen auszusetzen (Temperaturstress, Salzstress, Silikatmangelmedium) und mit Northern-Blot bzw. qPCR nachzuverfolgen, ob es vielleicht gewisse Änderungen im Transkriptionsverhalten von *TPS\_41289* im Vergleich zu normalen Bedingungen gibt, wobei dadurch eine Funktion abgeleitet werden kann.

Zur Frage der Synthese langkettiger Polyamine ist festzustellen, dass die Synthese wahrscheinlich über andere Substrate und Reaktionswege abläuft, als ursprünglich vermutet. Hierbei ist die Publikation von SRIVENUGOPAL und ADIGA (1980) zu erwähnen, die festgestellt haben, dass bei *Lathyrus sativa* es noch einen zweiten Polyaminsyntheseweg gibt. Dabei wurde eine Caboxyspermidinsynthase (Putrescin-Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd Schiffbase-Reduktase) gefunden, das die Schiffbase aus Putrescin und Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd mittels NADPH<sub>2</sub> reduziert, wobei Carboxyspermidin entsteht, welches wiederum durch eine Carboxyspermidin-decarboxylase zu Spermidin decarboxyliert wird. Der Sinn eines solchen Parallelweges wird damit erklärt, dass SAM in vielen biochemischen Prozessen zur

Anwendung kommt und deshalb eine Limitierung von dcSAM eintreten kann. Weiterhin ist die Synthese von SAM energieaufwendig und verbraucht zudem die Aminosäure Methionin. Der Paralellweg würde somit kein zusätzliches SAM/dcSAM und Methionin verbrauchen, sondern Aspartat, das als Aminosäure abundant sein soll (SRIVENUGOPAL und ADIGA, 1980). Dieser hier beschriebene Paralellweg könnte ebenfalls bei Diatomeen existieren, da die Herstellung von langkettigen Polyaminen in der Schale einen großen Verbrauch an SAM bedeutet, das eine kompetitive Wirkung auf andere physiologische Prozesse (z.B. Bildung von Hypusin, Methylgruppendonor) haben könnte. Allerdings konnte bisher kein passendes Genmodell für Carboxyspermidinsynthase bzw. Carboxyspermidin-decarboxylase in der Genomdatenbank von *T. pseudonana* gefunden werden, um diese Annahme zu unterstützen.

## 5. Zusammenfassung

Im Zusammenhang dieser Arbeit, bei der überprüft werden sollte ob langkettige Polyamine (Oktamine) von *T. pseudonana* über dcSAM und Putrescin bzw. Spermidin entstehen, wurden verschiedene cDNA-Sequenzen von mutmaßlichen N-Aminopropyltransferasen kloniert und enzymatisch auf N-Aminopropyltransferaseaktivität geprüft. Es stellte sich dabei heraus, dass es sich bei TPS\_108361 um eine Spermidinsynthase und bei TPS\_41289 um eine Thermosperminsynthase handelt. Die monomere Untereinheit von TPS\_41289 hatte ein molekulares Gewicht von ungefähr 48 kDa. Native PAGE und Gelfiltration wiesen auf einen homotetrameren Aufbau des Proteins hin. Die Thermosperminsynthase besaß zudem ein ungewöhnliches Aktivitätsoptimum bei 55°C und ein für N-Aminopropyltransferasen übliches Aktivitätsoptimum bei einem alkalischen pH (9,4 - 9,6). Der Sequenzvergleich zwischen verschiedenen Spermidin- und Sperminsynthasen zeigte, dass TPS\_108361 Homologien zur SPDS/SPMS-Gruppe aufwies, wogegen TPS\_41289 Homologien zu N-Aminopropyltransferasen der ACL5-Gruppe hatte. Enzymtests mit einer Auswahl von Vertretern der SPDS/SPMS-Gruppe (SPE4 von *S. cerevisiae*, SPMS von *A. thaliana*) und ACL5-Gruppe (TPS\_41289 von *T. pseudonana*, SpeE von *T. thermophilus* und ACL5 von *A. thaliana*) zeigten, dass Sperminsynthasen der SPDS/SPMS-Gruppe Spermin bildeten und N-Aminopropyltransferasen der ACL5-Gruppe Thermosperminsynthaseaktivität aufwiesen. Der Aminosäureaustausch von E156 (welches bei der ACL5-Gruppe konserviert vorkommt) zu D156 (konserviert bei der SPDS/SPMS-Gruppe) bei TPS\_41289 ergab neben Thermospermin auch kleine Mengen von Spermin als Reaktionsprodukt. Eine zusätzliche Kopie von TPS\_41289 unter Kontrolle eines Nitratreduktasepromoters erbrachte in NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-haltigem Medium eine höhere Thermosperminsynthaseaktivität im Rohextrakt des Transformanten. Zudem konnte durch Vergleich des cytosolischen Polyamingehalts zwischen Wildtyp und Transformante gezeigt werden, dass eine deutliche Abnahme von Spermidin bei der Transformante zu sehen war. Damit konnte bewiesen werden, dass unter *in vivo* Bedingungen Spermidin das tatsächliche Substrat für TPS\_41289 ist. Die Spermidinsynthaseaktivität war bei allen Vertretern einer kleinen Auswahl von pennaten und centralen Diatomeen nachweisbar, während eine Sperminsynthaseaktivität (*S. turris*) und eine Thermosperminsynthaseaktivität (*T. pseudonana*, *C. meneghiniana*) nur im Rohextrakt von centralen Diatomeen zu messen war.

## 6. Literaturverzeichnis

**Apt KE, Kroth-Pancic PG, Grossman AR.**

Stable nuclear transformation of the diatom Phaeodactylum tricornutum.

Mol Gen Genet. 1996 Oct 16;252(5):572-9.

**Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE, Bechner M, Brzezinski MA, Chaal BK, Chiovitti A, Davis AK, Demarest MS, Detter JC, Glavina T, Goodstein D, Hadi MZ, Hellsten U, Hildebrand M, Jenkins BD, Jurka J, Kapitonov VV, Kröger N, Lau WW, Lane TW, Larimer FW, Lippmeier JC, Lucas S, Medina M, Montsant A, Obornik M, Parker MS, Palenik B, Pazour GJ, Richardson PM, Rynearson TA, Saito MA, Schwartz DC, Thamatrakoln K, Valentin K, Vardi A, Wilkerson FP, Rokhsar DS.**

Science. 2004 Oct 1;306(5693):79-86.

The genome of the diatom Thalassiosira pseudonana: ecology, evolution, and metabolism.

**S. Bagga , J. Rochford , Z. Klaene , G. D. Kuehn , G. C. Phillips**

Plant Physiol. 1997 Jun ;114 (2):445-454 12223719

Putrescine Aminopropyltransferase Is Responsible for Biosynthesis of Spermidine, Spermine, and Multiple Uncommon Polyamines in Osmotic Stress-Tolerant Alfalfa.

**Bidle, KD; Azam, F**

Nature Vol. 397, no. 6719, pp. 508-512. 11 Feb 1999

Accelerated dissolution of diatom silica by marine bacterial assemblages

**Bradford M.**

Analytical Biochemistry 72, 248-254 (1976)

A Rapid and Sensitive Methode for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

**Burger PB, Birkholtz LM, Joubert F, Haider N, Walter RD, Louw AI.**

Bioorg Med Chem. 2007 Feb 15;15(4):1628-37. Epub 2006 Dec 13

Structural and mechanistic insights into the action of Plasmodium falciparum spermidine synthase.

**Chattopadhyay MK, Tabor CW, Tabor H.**

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Nov 25;100(24):13869-74. Epub 2003 Nov 14.

Spermidine but not spermine is essential for hypusine biosynthesis and growth in *Saccharomyces cerevisiae*: spermine is converted to spermidine in vivo by the FMS1-amine oxidase.

**Dufe VT, Luersen K, Eschbach ML, Haider N, Karlberg T, Walter RD, Al-Karadaghi S.**

FEBS Lett. 2005 Nov 7;579(27):6037-43. Epub 2005 Oct 5.

Cloning, expression, characterisation and three-dimensional structure determination of *Caenorhabditis elegans* spermidine synthase.

**Eloranta, P; Soininen, J**

Journal of Applied Phycology, Volume 14, Number 1 / Februar 2002

Ecological status of some Finnish rivers evaluated using benthic diatom communities.

**Haider N, Eschbach ML, Dias Sde S, Gilberger TW, Walter RD, Luersen K.**

Mol Biochem Parasitol. 2005 Aug;142(2):224-36.

The spermidine synthase of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: molecular and biochemical characterisation of the polyamine synthesis enzyme.

**Falkowski PG, Katz ME, Knoll AH, Quigg A, Raven JA, Schofield O, Taylor FJ.**

Science. 2004 Jul 16;305(5682):354-60. Review.

The evolution of modern eukaryotic phytoplankton.

**Hamana K, Niitsu M, Matsuzaki S, Samejima K, Igarashi Y, Kodama T.**

Biochem J. 1992 Jun 15;284 ( Pt 3):741-7.

Novel linear and branched polyamines in the extremely thermophilic eubacteria *Thermoleophilum*, *Bacillus* and *Hydrogenobacter*.

**Hamana K, Tanaka T, Hosoya R, Niitsu M, Itoh T.**

J Gen Appl Microbiol. 2003 Oct;49(5):287-93. Cellular polyamines of the acidophilic, thermophilic and thermoacidophilic archaeabacteria, *Acidilobus*, *Ferroplasma*, *Pyrobaculum*, *Pyrococcus*, *Staphylothermus*, *Thermococcus*, *Thermodiscus* and *Vulcanisaeta*.

**Hamana K, Matsuzaki S.**

J Biochem (Tokyo). 1985 Jun;97(6):1595-601.

Distinct difference in the polyamine compositions of bryophyta and pteridophyta.

**Hamana K, Uemiya H, Niitsu M.**

Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2004 Jan;137(1):75-9.

Polyamines of primitive apterygotan insects: springtails, silverfish and a bristletail.

**Hamasaki-Katagiri N, Tabor CW, Tabor H.**

Gene. 1997 Mar 10;187(1):35-43.

Spermidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: polyamine requirement of a null mutant of the SPE3 gene (spermidine synthase).

**Hamasaki-Katagiri N, Tabor CW, Tabor H.**

Gene. 1997 Mar 10;187(1):35-43.

Spermidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: polyamine requirement of a null mutant of the SPE3 gene (spermidine synthase).

**Hannonen P, Janne J, Raina A.**

Biochim Biophys Acta. 1972 Nov 10;289(1):225-31. No abstract available.

Partial purification and characterization of spermine synthase from rat brain.

**Hanzawa Y, Takahashi T, Michael AJ, Burtin D, Long D, Pineiro M, Coupland G,**

**Komeda Y.**

EMBO J. 2000 Aug 15;19(16):4248-56.

ACAULIS5, an *Arabidopsis* gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase.

**Ruiz-Herrera J, Ruiz-Medrano R, Domínguez A**

FEBS Letters, Volume 357, Issue 2, 3 January 1995, Pages 192-196

Selective inhibition of cytosine-DNA methylases by polyamines

**Ikeguchi Y, Wang X, McCloskey DE, Coleman CS, Nelson P, Hu G, Shantz LM, Pegg AE.**

Biochem J. 2004 Aug 1;381(Pt 3):701-7.

Characterization of transgenic mice with widespread overexpression of spermine synthase.

**Ikeguchi Y, Bewley MC, Pegg AE.**

J Biochem (Tokyo). 2006 Jan;139(1):1-9. Review.

Aminopropyltransferases: function, structure and genetics.

**Imai A, Akiyama T, Kato T, Sato S, Tabata S, Yamamoto KT and Takahashi T**

FEBS Letters, Volume 556, Issues 1-3, 2 January 2004, Pages 148-152

Spermine is not essential for survival of Arabidopsis

**Imai A, Hanzawa Y, Komura M, Yamamoto KT, Komeda Y, Takahashi T.**

Development. 2006 Sep;133(18):3575-85.

The dwarf phenotype of the Arabidopsis *acl5* mutant is suppressed by a mutation in an upstream ORF of a bHLH gene.

**Incze G, Tamaska L, Gyöngyösi J**

(1955) Dtsch Z Ger Med 43:517–523

Zur Blutplanktonfrage beim Tod durch Ertrinken.

**Khan AU, Mei YH, Wilson T.**

Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Dec 1;89(23):11426-7.

A proposed function for spermine and spermidine: protection of replicating DNA against damage by singlet oxygen.

**Kirino H, Kuwahara R, Hamasaki N, Oshima T.**

J Biochem (Tokyo). 1990 May;107(5):661-5.

Effect of unusual polyamines on cleavage of DNA by restriction enzymes.

**Kitashiba H, Hao YJ, Honda C, Moriguchi T.**

Gene. 2005 Nov 21;361:101-11. Epub 2005 Sep 22.

Two types of spermine synthase gene: MdACL5 and MdSPMS are differentially involved in apple fruit development and cell growth.

**Knott JM, Römer P, Sumper M**

FEBS Letters, Volume 581, Issue 16, 26 June 2007, Pages 3081-3086

Putative spermine synthases from Thalassiosira pseudonana and Arabidopsis thaliana synthesize thermospermine rather than spermine

**Korolev S, Ikeguchi Y, Skarina T, Beasley S, Arrowsmith C, Edwards A, Joachimiak A, Pegg AE, Savchenko A.**

Nat Struct Biol. 2002 Jan;9(1):27-31.

The crystal structure of spermidine synthase with a multisubstrate adduct inhibitor.

**Kröger N, Bergsdorf C, Sumper M**

Eur J Biochem. 239, 259-264 (1996)

Frustulins: domain conservation in a protein family associated with diatom cell walls.

**Kröger N, Deutzmann R, Sumper M.**

Science. 1999 Nov 5;286(5442):1129-32.

Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation.

**Kröger N, Wetherbee R.**

Protist. 2000 Oct;151(3):263-73.

Pleuralins are involved in theca differentiation in the diatom *Cylindrotheca fusiformis*.

**Kröger N,**

BIOspektrum . 6/2001 . 7. Jahrgang

Die Biogenes der Silikat-Zellwände von Diatomeen.

**Kröger N, Deutzmann R, Sumper M.**

J Biol Chem. 2001 Jul 13;276(28):26066-70. Epub 2001 May 10.

Silica-precipitating peptides from diatoms. The chemical structure of silaffin-A from *Cylindrotheca fusiformis*.

**Kröger N, Lorenz S, Brunner E, Sumper M.**

Science. 2002 Oct 18;298(5593):584-6.

Self-assembly of highly phosphorylated silaffins and their function in biosilica morphogenesis.

**Kröger N, Deutzmann R, Bergsdorf C, Sumper M.**

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Dec 19;97(26):14133-8.

Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology.

**Laemmli UK.**

Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

**Lee MJ, Huang CY, Sun YJ, Huang H.**

Protein Expr Purif. 2005 Oct;43(2):140-8.

Cloning and characterization of spermidine synthase and its implication in polyamine biosynthesis in *Helicobacter pylori* strain 26695.

**Markham GD, Tabor CW, Tabor H.**

J Biol Chem. 1982 Oct 25;257(20):12063-8.

S-adenosylmethionine decarboxylase of *Escherichia coli*. Studies on the covalently linked pyruvate required for activity.

**Miyamoto S, Kashiwagi K, Ito K, Watanabe S, Igarashi K.**

Arch Biochem Biophys. 1993 Jan;300(1):63-8.

Estimation of polyamine distribution and polyamine stimulation of protein synthesis in *Escherichia coli*.

**Nishibori, Naoyoshi; Yuasa, Akihiko; Sakai, Motosuke; Fujihara, Shinsuke; Nishio, Sachio**

Fisheries Science, Volume 67, Number 1, February 2001 , pp. 79-83(5)

Free polyamine concentrations in coastal seawater during phytoplankton bloom

**Ohnuma M, Terui Y, Tamakoshi M, Mitome H, Niitsu M, Samejima K, Kawashima E, Oshima T.**

J Biol Chem. 2005 Aug 26;280(34):30073-82. Epub 2005 Jun 27

N1-aminopropylagmatine, a new polyamine produced as a key intermediate in polyamine biosynthesis of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*.

**Ohresser M, Matagne RF, Loppes R.**

Curr Genet. 1997 Mar;31(3):264-71.

Expression of the arylsulphatase reporter gene under the control of the nit1 promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*.

**Oshima T.**

J Biol Chem. 1979 Sep 25;254(18):8720-2.

A new polyamine, thermospermine, 1,12-diamino-4,8-diazadodecane, from an extreme thermophile.

**Oshima T.**

.Amino Acids. 2007 Aug;33(2):367-72. Epub 2007 Apr 12.

Unique polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*.

**Pajula RL, Raina A, Eloranta T.**

Eur J Biochem. 1979 Nov;101(2):619-26.

Polyamine synthesis in mammalian tissues. Isolation and characterization of spermine synthase from bovine brain.

**Panicot M, Minguet EG, Ferrando A, Alcazar R, Blazquez MA, Carbonell J, Altabella T, Koncz C, Tiburcio AF.**

Plant Cell. 2002 Oct;14(10):2539-51.

A polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in *Arabidopsis*.

**Pingoud A, Urbanke C, Alves J, Ehbrecht HJ, Zabeau M, Gualerzi C.**

Biochemistry. 1984 Nov 20;23(24):5697-703.

Effect of polyamines and basic proteins on cleavage of DNA by restriction endonucleases.

**Poulsen N, Sumper M, Kröger N.**

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Oct 14;100(21):12075-80. Epub 2003 Sep 24.

Biosilica formation in diatoms: characterization of native silaffin-2 and its role in silica morphogenesis.

**Poulsen N, Kröger N.**

FEBS J. 2005 Jul;272(13):3413-23.

A new molecular tool for transgenic diatoms: control of mRNA and protein biosynthesis by an inducible promoter-terminator cassette.

**Poulsen N, Chesley PM, Kröger N**

J. Phycol. 42, 1059–1065 (2006)

Molecular Genetic Manipulation of the Diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae)

**Salminen T, Teplyakov A, Kankare J, Cooperman BS, Lahti R, Goldman A.**

Protein Sci. 1996 Jun;5(6):1014-25.

An unusual route to thermostability disclosed by the comparison of *Thermus thermophilus* and *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatases.

**Sambrook J et al. 2000.**

Cold Spring Harbor, New York

Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition)

**Schrimpf G**

Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer (3. Auflage/2002)

Gentechnische Methoden

**Seiler N.**

Amino Acids. 2004 Jun;26(3):217-33. Epub 2004 Apr 20. Review.

Catabolism of polyamines.

**Shirahata A, Takeda Y, Kawase M., Samejima K**

J. Chromatogr. 262 (1983), pp. 451–454.

Detection of spermine and thermospermine by thin-layer chromatography

**Srivenugopal KS, Adiga PR**

FEBS Lett. 1980 Apr 7;112(2):260–264.

Coexistence of two pathways of spermidine biosynthesis in *Lathyrus sativus* seedlings.

**Sumper M.**

Science. 2002 Mar 29;295(5564):2430-3.

A phase separation model for the nanopatterning of diatom biosilica.

**Sumper, M , Kröger, N**

(2004): J. Mater. Chem. 14, 2059-2065

Silica formation in diatoms: the function of long-chain polyamines and silaffins.

**Sumper, M , Brunner, E, Lehmann, G**

(2005): FEBS Letters 579, 3765-3769

Biomineralization in diatoms: characterization of novel polyamines associated with silica.

**Sumper, M, Lehmann, G**

(2006) ChemBioChem 7, 1419-1427

Silica pattern formation in Diatoms: Species-specific polyamine biosynthesis.

**Wallace HM, Fraser AV, Hughes A.**

Biochem J. 2003 Nov 15;376(Pt 1):1-14. Review.

A perspective of polyamine metabolism.

**Wang X, Ikeguchi Y, McCloskey DE, Nelson P, Pegg AE.**

J Biol Chem. 2004 Dec 3;279(49):51370-5. Epub 2004 Sep 30

Spermine synthesis is required for normal viability, growth, and fertility in the mouse.

**Wu H, Min J, Ikeguchi Y, Zeng H, Dong A, Loppnau P, Pegg AE, Plotnikov AN Biochemistry.**

2007 Jul 17;46(28):8331-9. Epub 2007 Jun 22.

Structure and mechanism of spermidine synthases.

**Xie QW, Tabor CW, Tabor H.**

Gene. 1993 Apr 15;126(1):115-7

Deletion mutations in the speED operon: spermidine is not essential for the growth of Escherichia coli.

**Yamaguchi K, Takahashi Y, Berberich T, Imai A, Takahashi T, Michael AJ, Kusano T.**

Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jan 12;352(2):486-90. Epub 2006 Nov 16.

A protective role for the polyamine spermine against drought stress in Arabidopsis.

**Yoon SO, Lee YS, Lee SH, Cho YD**

Biochim Biophys Acta. 2000 Jun 1;1475(1):17-26

Polyamine synthesis in plants: isolation and characterization of spermidine synthase from soybean (*Glycine max*) axes.

**Zappia V, Galletti P, Oliva A, de Santis A**

Anal Biochem. 1977 May 1;79(1-2):535-43

New methods for preparation and analysis of S-adenosyl-(5')-3-methylthiopropylamine.

## Anhang

### a) Genmodelle

#### **Vermeintliche Polyamin-Synthase Gene aus *T. pseudonana***

(Stand: 2004, Genmodelle erhalten aus der Online-Datenbank <http://genome.jgi-psf.org/Thaps3/Thaps3.home.html> bzw. von Prof. Dr. Sumper überreicht bekommen)

(vorhergesagte Exons: rot)

*SPD1*  
 CACAACCTGAAACCTCCTCTCAAACATTGATGGCTGCCTCGCCCCACAACACAGTATCGTGGTAGCATT  
 AACTTGGTCTCCATCTGTTGGCTGCACCGTCACTGCATCGTCATCAACAACGCCACGCCCG  
 CCAACGCCGCTGACCCACAACATGAGCGACTTCCTCCGCCGCAAGATTACTCGCACCTCATCATAGACA  
**ATTGGTTCCACGAACGTGGCTCTCTGGCAGGCCAATCCTCTCTCAAATCGAAAAGATACTCTA**  
 CCATCAAAAGTCTCTTCCAAGACGTGCTCGTGTGACTCGACCAACCAGCAAAGTGCTGGTATTG  
 GATGGAGTCATTCAATGCACCGAACATGATGAACACAGTTACCAAGAGATGATGGCGCACATTCTCT  
 ACTCTCATCAAATCCAAGAAGGTACTGGTCATCGGAGGCGAGACGGAGGTGTCCTACGCGAGATAGC  
 ACGTCATCTGGAGGTGAGGAGATTGCATCTGTGAGTTGGACAAGGATGTCATTGACGTATCCAAAAG  
 TACTGCCGTTCATGCCAAAGGGATTGACGATCCACCGTGTCAAAGTACACATTATGGACGGTGCCAAAT  
 TCATGGAGGAGAACCAATCTGCATTGATGTCATCGTTACGGACTCGTCGGATCTGTAGGACCAGCGAG  
 TGTCTTGTTGAGACTCCATTCTACAAGGCTTGATGGAAAGTTACGTGAGGGAGGAATCATTGACAC  
 CAGGGGAAATGTGTTGGCTTCACGTTGACTGATCAAACCGTTGATCAAGGCATTAGCCTCTATT  
 CGACTGTGGAGTACGCTTACTGCACGATTCCAGCTACGTGCACCAGAGGAGGTGTCAGAAGGAGTTAAAGT  
 TAAAGGTGAAAGGGGTGAGGAATCCAGTACGTGACGAGACTGTCACAGCGAGCTATTTCGGTGGTT  
 TACTCTCCGATATTCAATGTCAGCGTTGTGCTGCCCTGCGTTGACACAGCGAGCTATTTCGGTGGTT  
 TGCGAAGTAGAGATTGTGAGACTGCAAACATTGGAGGTTGTTGGTTGGTCTGGATGTCT  
 ATTTCGGCATGAATTATCTTGAAAGGATGTAATGGATTGGAAAGTAAAGCATTGGGGCGGGAAAGA  
 GTGGCGAAAGAACGTATCAATGCACGATATGAGTTGGATTAGATGTTT

IIDNWFHERGPLWPGQSFSLQIEKILYHQKSLFQDVLFSTNHGVVLVDVQIQCETEHDHSYQEMMAH  
 IPLYSHPNPKVLVI**GGGDG**GVLREIARHPGVEEICICELDKVIDVSKYLPFMAKGFDPRVKVHIMD  
 GAKFMEENQSAFDIVTDSSDPVGPASVLFETPFYKALHGLREGGIICTQGEVWLHVDLIQPLIKAIQ  
 PLFTTVEYAYCTIPSYPGQIGFIATKGKGCRNPVRAPEESVQKELKYTPDIHSAAFVLPFAQRAI

#### *TPS\_108361*

CTCTCCGTCTCTTGATTGGATTGTGACGGAAGGCATACGAGTTCTGGTGTGCAGGGTCTCGTCCC  
 TTCTCTTTGCTGCCTCCGCCGGTGCCTGCTCGTGGGATCTGGGTGTTGGCTTGTGTT  
 TGGCTGGCTGCCTTCGGCTGTCCTGGTACCCACAACCTGAAACCTCTCAAACATTG**ATGGCTGCCT**  
**TCGCCCCACAACACAGTATCGTGGTAGCATTAACCTGGTCTCCATCTGTTGGCTGCACCGTCACTGC**  
**ATCGTCGTATCAACAACGCCACCGCCCCCAACGCCGCTGACCCACAACATGAGCGACTTCTCCG**  
**CCGCAAGATTACTGCACCTCATAGACAATTGGTCCACGAACGTGGCTCTCTGGCCAGGCCAAT**  
**CCTCTCTCCAAATCGAAAAGATACTCTACCATCAAAGTCTCTTCCAAGACGTGCTGTGTTGA**  
**CTCGACCAACCAGGCAAAAGTGTGATTGGATGGAGTCATTCAATGCACCGAACATGATGAACACAGT**  
**TACCAAGAGATGATGGCGCACATTCTACTCTACATCCAAATCCAAGAAGGTACTGGTACCGAG**  
**GCGGAGACGGAGGTGCTCTACGCCGAGATAGCACGTACCTGGAGTTGAGGAGATTGACATCTGTGAGTT**  
**GGACAAGGATGTCATTGACGTATCCAAAAAGTACTTGGCTCATGGCAAAGGGATTGACGATCCACGT**  
**GTCAAAGTACACATTATGGACGGTCCAAATTGCAACCAAGGGTGGAAAGGGGTGAGGAATCCAGTACGTGACC**  
**CGGACTCGTCGGATCTGTAGGACCAAGCGAGTGTCTTGGAGACTCCATTCTACAAGGCTTGCATGG**  
**AAGTTACGTGAGGGAGGAATCTTGCACACAGGGGAATGTGTTGGCTTCACGTTGACTGATCCAA**  
**CCGTTGATCAAGGCATTAGCCTCTATTACGACTGTGGAGTACGCTTACTGCACGATTCCGAGCTATC**  
**CGAGTGGCAGATTGGGTTATTGCAACCAAGGGTGGAAAGGGGTGAGGAATCCAGTACGTGACC**  
**AGAGGAGAGTGTGACGAGGTAAAGTATTATACTCCGATATTGATAGCGAGCTTGTGCTGCCT**  
**GGCTTGCACAGCGAGCTATTTCGGTGGTTGTCAGTAGAGATTGTGTTGGACGAGACTGCAAACATT**  
**GGAGGTTGTTGGTTGGCTCTGGATGTCATTGGCATGAATTATCTTGAAGGATGAAATGG**  
**ATTGGGAAGTAAAGCATTGGGGGGAAAGAGTGGCGAAAGAACGTATGACGATATGAGTTGGA**  
**TTAGATGTTAAGTGGCTAATCCTATATCCTGACCTCGTCCCTGCCATTCTCGTTATGGATT**

GTTGCTTGAACAGTAGATTGTAAGCCTGTTCTGCCTTCTCCGGAAAGATCCAACGAAGCCTCGGGCTTACG  
CTTACACAAACATTCCCCTAGACGTTGTCAAGCGCTCGCTTGGAGACAACGCCGGGCTTCAAGTAT  
CTCGGACGAATGTGCCAACGACGTTGAAGAAGCCGGCTT

MAAFAPQHSIVVALTLVSICLACTVTASSSTTPTAPPTPLTHNMSDFPPPQDYSHLIIDNWFHERGPLW  
PGQSFLSQIEKILYHQKSLFQDVLVFDSTNHGKVLVDGVIQCTEHDHSYQEMMAHIPLYSHPNPKVL  
VIGGGDGVLRREIARHPGVEEICICELDKVIDVSKYLPFMKGFFDDPRVKVHIMDGAKFMEENQSAFD  
VIVTDSSDPVGPAVLFETPFYKALHSLREGGIICTQGEVWLHVDLIQPLIKAIQPLFTTVEYAYCTI  
PSYPSQIGFIATKGGKCRNPVRAPEESVQKELKYYPDIHSAAFVLPFAQRAIFGGLSK\*

*TPS\_38085*

CACAACACTGAAACCTCCTCTCAAACATTGATGGCTGCCTCGCCCCACAACACAGTATCGTGGTAGCATT  
AACTTTGGTCTCCATCTGTTGGCTGCACCGTCACTGCATCGTCGTCAACAAACGCCACCAGCCCCG  
CCAACGCCGCTGACCCACAACATGAGCGACTTCTCCGCCGCAAGATTACTGCACCTCATCATAGACA  
ATTGGTTCCACGAACGTTGCTCTGGCCAGGCCAATCCTCTCCAAATCGAAAAGATACTCTA  
CCATCAAAAGTCTCTCCAAAGACGTTGCTCGTGTGACTCGACCAACCAGGAAAGTGCTGGTATTG  
GATGGAGTCATTCAATGCACCGAACATGATGAACACAGTTACCAAGAGATGATGGCGACATTCCCTCT  
ACTCTCATCAAATCCAAGAAGGTACTGGTCACTGGAGGAGACGGAGGTGTCTACGCGAGATAGC  
ACGTCACTGGAGGAGTTGAGGAGATTGCACTGTGAGTTGGACAAGGATGTCATTGACGTATCCAAAAG  
TACTGCCGTTCATGGCAAAGGGATTGACGATCCACAGTGTCAAAGTACACATTATGGACGGTGCCAAAT  
TCATGGAGGAGAACCAATCTGCATTGATGTCATCGTACGGACTCGTGGATCCTGTAGGACCGAG  
TGTCTGTTGAGACTCCATTCTACAAGGCTTGCATGGAAGTTACGTGAGGGAGGATCATTGACA  
CAGGGGAAATGTGTTGGCTTCAGTTGACTGATCAAACCGTTGATCAAGGCGATTAGCCTCTATT  
CGACTGTGGAGTACGCTTACTGCACGATTCCGAGCTATCCGAGTGGGAGGATGGGTTCAATTGCAAC  
CAAGGGTGGAAAGGGGTGAGGAATCCAGTACGTGCAAGGAGAGTGTGAGAAGGAGTTAAAGTAT  
TATACTCCCATAATTCAATGTCAGCGTTGTGCTGCCTGCGTTGACACAGCAGCTATTTCGGTGGTT  
TGTGCAAGTAGAGATTGTGAGACTGCAAAACTGGAGGTTGTTGGTTGGATGGGAAAGTAAAGCATTGGGGGGAAAGA  
GTGGCGGAAAGAACGTATCAATGCACGATATGAGTTGGATTAGATGTTT

IIDNWFHERGPLWPGQSFLSQIEKILYHQKSLFQDVLVFDSTNHGKVLVDGVIQCTEHDHSYQEMMAH  
IPLYSHPNPKVLVIGGGDGVLRREIARHPGVEEICICELDKVIDVSKYLPFMKGFFDDPRVKVHIMD  
GAKFMEENQSAFDVIVTDSSDPVGPAVLFETPFYKALHSLREGGIICTQGEVWLHVDLIQPLIKAIQ  
PLFTTVEYAYCTIPSQIGFIATKGGKCRNPVRAPEESVQKELKYYPDIHSAAFVLPFAQRAI

*TPS\_22645*

CGTTGCTTTGGTTTGTATCGGCTGTATGACAAGGATCATCTTGATGCACAATTACAAGGGCAAT  
ATATCAAGGCTCCGTTCAAGAAATGGATGATAACAAACAGCTCCAGCGACGTCAAGCTTGTACCAACT  
ACCGGCACTTGGTCTCCATTCAATAACCAAGTGGCAGAGAAAGATGCACAGAGATGCGTCATATCACGAGT  
CCATCGTTCATCTGTCATGATTACTCACCCCAACCTAACGAGTTGCAATTGCGAGGAGATAAGGG  
GGCAACTCTCGGTGAAGTACTGAAACACAAAAGTGTGGAGAGTACAGCAATGTTGGTACCAAGTGAC  
TTCGTCGAGTTGGCAGAGAGTACTGCTCGAGTGGAGCGATTGCTCTGATATCACTGATAGTTCCAAGT  
GTTGCTTGACGATGAACGAGCTGAAGCAAGTTGATGACGTCGTGGAAAACTTCGTCGAAACGTTCTA  
CAATGACAACCTACAAGATATCAACGCGAAGATGAGTATGATATCATCATGGACACACTTGATCCA  
AACGATGGAGTGGTCGCAATCTATACAAATGGTCTATCACACTCCGGTATCTGGTTATACAAGTAA  
ACCGAGTACCTCTCATCAATGTTACGGAGAAGTTAGAAGAGGTTGGAGTCAGTCTATTGATGTACGA  
AGAACGCCACTACACTCCTCGTCTTGGTGCCTCAAGGACTACGAAACAGAGCAGACTG

YHESIVHPVIMTHPNPKRVAIVGGDKGATLREVLKHKTVESTAMFGTTSDFVELAREYLLWESDCSIDTD  
SSKCCFDDERAEAKYQREDEYDIIMTLDPNDG

*TPS\_35495*

CCGGCGGTGCTCTCCAAACGCCAAGGCGTCTGCCGAACCCGACATGCTCAATGACGACGACGAAGA  
AAGCTCCAGCGACGACGACGAAACAGTCGCTCCAGCAACCCCAACGCTCACCGCCTGGAAGAAGGG  
GAAGAAAAGCCCCCACCACATGCGAATGTAACCTAAACTCCCCGGTTAAAGACGCCGTATACGAAA  
CTCGCTCCTCTACCAAGAAGTGGCGTGGAGCGAGAACGCCAACAAACCGGACGTGTGCGATGAGTCG  
TGACATTCTACAGATTGTCATTGTCACCGTCCCCATTATCATGAACCATATGTTCATTCCCCGCTGCG  
TATATGAAGGATTACAAGCGAATTGTTATCGGAGGTTGGAGACGCCATGCTTTGCGATGAATGCTCA  
AGTATCCAAACGTTGGAGTTGGCTGGGTTGGAGCTCGATCAAAGGTTGCGTGAGAGTTGAAGCA  
TTCCATACGCGCTCATTCGAAGATCCTCGTGTCAAGTGGTTGGAGATGCTGCCAGTCAGT  
GCATTGTTGCCACGTGAGTGGTTGGTACATTGATTGGTCAAGTGGATTGAGTGAAGACGCCATGT

CCATCAGTGTGACGGACGATCTGATATCTCGGGCACTCTCCTATTGATGAAGCCTGAGGGAGTTT  
 CGTCAAGAATGAGTTGACTACGGTCAAATGTCAGCTTGCACCACAGTGTCTTGTACATGACT  
 GATTATCCCATTCTGTGATCAAGATTGGCCATGGGATCGAACAAAGGTGGACTTCTCCATCAGA  
 TTGAAGGAGGGTGGTGGAGCAGAACAAAATTGTAACCTTGAAATACAACCCCTCTGA

VYETRSFYQEVAWSENANKPDVCMSSLDDILQICHSYRPHYHEPYVHFPAAYMKDYKRIVFIGGDAMLLH  
 ESLKYPNVELVLGLELDQKVVRSLKHFTQPHFEDPRVQWWFGDAAKSLALLPREWFGTFDLVMVDLSE  
 TAMSISVTDDLDIFGALSLLMKPEGV

*TPS\_101424*

AGCTCGACATGTCGGCTGATACTTACAGAGGGCGAGCTTTGACTTGAAAAAGAACGTAGCCTCTGAAGA  
 AACAGACTATCAGCACGTAGACATCTACGGAGGTGATCAACCCCTCGCTATCGATCTATCGCACAGTACGAG  
 AAATCCCTCTCGTGACGGTTCTACGAGTCACCTCATCCAGAGTTCTACAAACCAGAT**CGACTTTAT**  
**ATTGGAAGGTATTCTGAGAGTCGTTGATGGCGAGACTTCTTACCATGAGGCACTCGTTCATCCAGC**  
**GATGCTTCTCATCTAACAAACGAGTTGCCATCGTTGGAGGAGGTGAGGGTCAACGCTCGTGAG**  
 GTAAGTTAACCATCAAAGCATTGTTAAATATCACCATCTCATATAATGATTGCTCCTCAC  
 CTTAAG**GTATTGAAGCATAAAACCGTGGATACAGTCGTCATGCTTGAGGTAAGTTGCAACAATTCTCATT**  
**TGCGTCGTTAACAGAGAGACGCTCATTCTTCTGCAGATCGATGAAAACAATGTAACATTTGA**  
**GACAACATCTCCTGAATGGTCGGACTGCGATGAGTTACCCCTCTCAATGAAATCTGCTTGACGATCC**  
**TCGAGCTGATGTCGATTGTCGACGCATTAAATGGTCACCAATAACTTGATATCAACAGTGTGAC**  
**AAATTGTCAAGGAAGATCGGTTGACGTAGTGTGAGTGGCTTGATTACTTCTGCGAGTTGTTG**  
 CACCTTACTAACCAACCAATGACGCCTGACTGCGTAGTATCATGGACGGTAGTACCATATGTTA  
 GACTGAATCCATCTGATCAATAGTTCTTCAGAACATCAATCTAACATTCTCACCGTCGTTATCAA  
 ATCAAGCGCTTGAATCTAACGACAAT

RLLYLEGILQSSLYGETSYHEALVHPAMLSHLNPKRAIAVGGEGLREVLKHKTVDVVMLEIDENNV  
 NILRQHLPEWSDCDELPSSMKSCFDDPRADVRFVDAFKWFTNNFDINSADKLSKEDRFDVV\*

*TPS\_103771*

CAATTTCACAAGGGCAATATATCAAGGCTCCGTCAGAAAATGGATGATATAACAAACAGCTCCAGCGAC  
 GTCAAGCTTGATACCACTACCGGCACCTTGGTCTCCATTCAATACCAGTGGCAGAGAAAG**ATGCACAGAG**  
**ATGCGTCATATCACGAGTCATCGTCATCTGTGATGATTACTCACCCAACCTAACGAGTTGCAAT**  
**TGCGGAGGAGATAAGGGGCAACTCTGCGTAAGTACTGAAACACAAAATGTGGAGAGTACAGCAATG**  
**TTGGTACCAAGTGAATTGCGTTGACGATGAACGAGCTGAAGCAAAGTTGATGACGTCGTGGAATA**  
**CTCGTCGAAACGTTACAATGACAACCTACAAGATATCAACCGAAGATGAGTATGATATCATCATC**  
**ATGGACACACTGATCAAACGATGGAGTTGCGTCCATCTACATCAATGTTACGGAGAAGTTAGAAGAGGTTGGATTG**  
**GTCATTGATGTGACGAAGAACGCCACTACATCACTCCTCGTCTTCTGGTTGCCTCAAGGACTAC**  
**GAAACAAGAGCAGACTGGTATCGAACGAGGCCAAGTGGAGATACACATCCAAAACGTCAGCGAT**  
**CCAAGCTGCAATCCTCTGTTGAGACTTTGACGGACCTACAATGATGGCTACCAGACTCCACCCAA**  
**AGCATTGAAACACATCTATTGTTGACGATCAGAAATATACCGGACGATTGCAAGTTGAGTTGAC**  
**GCCAAACATCGACGTATAATCCCTGTCACAGATTGAAAGTGCAGAAATAGTACCGTAGGAGAGCACGCTG**  
**GAAGAGGCATATTGCAATGCCATTGAAAGCTGGTCACTCTTGACCCAAGCGAAAATATGAAGAG**  
**TTTCATGTCCTGCCATCAACATGGCTGTTGAGTGTGAGGCGATGTCAGGATCCGAAGAAACTCGGTGGT**  
**GTTGAAACATTGACGGATACGGTTACGACTCAGTGTGTTGGTGGAGATCTTGCAGAGTGGCTTCT**  
**TTGGCTGGTGCATTGCAATTGACTCTCTTCACTTAATCTCTCTTCAAGGGTAAAC**  
**TTCACTATGCACTGGATTCTGGCATCATGCTCTCGCAAACCAACCGGTTGCAGGAAAGCTAAAACTTGG**  
 AGACATCAACGAAGACAGTGTGCTTACTGAAACGAATGTTGGCATTGATCAAGTCCAGACAAATTGAT

MHRDASYHESIVHPVMITHPNPKRAIAVGDKGATLREVLKHKTVESTAMFGTSDFVELAREYLLEWSD  
 CSDITDSSKCCFDDERAEEAKYQREDEYDIIMDTLDPNDFVQSIYNGLHSHGILVIQNAVPLINVTE  
 KLEEVGFESIHVYEERYHITPSSFLVAFKDYEYTRADWYRNEAEVEIHIQKRVKRSKSGNPLRYFDGPTM  
 MGYQTPPKAFAEHIYCLHQNPDDCSLQNELYAKHRRIPVTDLEVNSTVGEHAGRGIHALNAVEAGSLF  
 DPSENMKSFHVLPSTWAVIEAMSEVSEELGGVETFIDGYGYDSVLLVRSLQSGFFGWLHSCLTSFLSLN  
 LLLFQG\*

*TPS\_107485*

CGCTCTCGCACATCCAACCTCACGAACACAACGCACCATGAGATTGGCAGACGCTACCTCTCCTAAT  
 CGCCGCCACGGCAGGCCACTAACCCATCAAGCACCACCCATCAGCCACCCATTGCCACCGCCGAA

ACAGCTTCATGCCCGGGGTGCTCTCCAAACGCCGAAGCGTCTGCCGAACCCGAC**ATGCTCAATG**  
 ACGACGACGAAGAAAGCTCCAGCAGCACGAACCAGTCGTCGCTCCAGCAACCCAACGCTCACCG  
 CCTGGAAGAAGGGAGAAAAGCCCCCACCACATCGAATCGTACCTCAAACCTCCGGCTTAAAGAC  
 GCCGTATAACGAAACTCGCTCCTTCTACCAAGAAGTGGGTGGAGCGAGAACGCAACAAACCGGACGTGT  
 GCATGAGTCTCGATGACATTCTACAGATTGTCATTGTAACCGTCCCCATTATCATGAACCATATGTTCA  
 TTTCCCGCTCGTATATGAAGGATTACAAGCGAATTGTTATCGGAGGTGGAGACGCCATGCTTTG  
 CATGAATCGCTCAAGTATCCAAACGTGGAGTTGGTGTGGGTTGGAGCTCGATCAAAGGTTGCGTG  
 AGAGTTGAAGCATTCCATACGCGCCTACATCGAAGAATCCTCGTGTTCAGTGGGGTTGGAGATGC  
 TGCCAACTGACTGGCATGTCACGTGAGTGGTTGGTACATTGATTGGTATGGTGGATTGAGT  
 GAGACGGCCATGTCATCAGTGTACGGACGATCTGATATCTCGGGGACTCTCCTTATTGATGAAGC  
 CTGAGGGAGTTCTGTCAGAATGAGTTGACTACGGTCAAATGTCAGCCTCGGACACAGTGTCTT  
 TGTGTACATGACTGATTATCCATTCTGTGATCAAGATTGGGCATGGGATCGAACAAAGGTGGACTTT  
 CTCCATCCTCAGATTGAAAGGAGGGTGGTGGAGCAGAACAAAATCGTACCTTGAATACAACCCCTTG  
 AGGATGAGGAGGAGCATTACAAGTTATTAGGATTATCTCGCAATGATGCTAGGAAGCAGGGCAAGTG  
 CGGAGATTACGATGCTGAGGTTGAGGCTCGAAGAAGGGAGGGGGAGGAGAAGAAGGAGGTTGTCAAA  
 CCGAAGAGTCGGCGGGTGTGCTCATGGTTGAGGTCGAGAGTGGTGCAGGAGGTGTGGCTGCTGAGT  
 TGGAGGCCTCTCAACACAATCTGGAGAAGGAGGTATGCATCCTTGTGCCCCGGCCATGTCACAA  
 TCGAGCGAGGGAGATGCGTCTTGGCACTCTTATTGAATGGAGGAGGATACGTCATGCCACTT  
 TACCCCTCAAATCACACGTTGGTCTTGAGATTGTCCTGGTCTAAGATTGCAAAGCAGGATGATCTCC  
 GTACGGCCATTCTGGTGCATGGAGTGGATAAGACTTCTCAGTACCGTGTGATTACGGCGGTAT  
 GCTCGGTGCGAAGAAGTGGAGGATGTTGAGGCTGAGGACAGTTAAGAAGAAACTGCGTAACGT  
 GACCTGCTGCTAAGGCTGCTGAACCCCAGATTGAAAGGGACCCATTCCCTCAGCTACGTTAGTCGG  
 CTGTCGGCGCTTGTCACTCCTCCAAAAGATGGATAAGGTCGTTGCTGTTGGATCAA  
 GGATAAGCCTTGTGAGACTTGAATGCTCTGAGAAGAATAGCAAGGTTGACAAAATCGTGTCTTAC  
 TCTTGTCTGAGGGAGGTGCTGAGGGTGAGAAGAGTGGCAAGGATGATTGTTGTCCTGTTGACCACT  
 GCTCTGCTAAGGATTGAAAGCGTGTGCAAAGGCTGAGGAAGGTTCTAGTGGCTAATTATGGATCTGC  
 TGCGGAGGCGGACTCGTGGCAACATGCAAGGATGAGTTCTGCAAGAAGAAGGATGCTGGACAGCACGTT  
 CTCTTCGTGATCAGGTACCTCATGACTCAACTTCTAACGATGATGAGGAGATCTCTCAAGGGAT  
 GCACTCGTCAACTAATGAAGAAGATGGTGTACTAGTCGATCATTATTGACGGTTCATCTGAGTTGGG  
 AGTCATTCTCCGGCAACCCCTGGATTGTCAGCGTATTGCAAGTGGCCGAGGCTGTTGAGAAGAAG  
 ACTGGAGTCGTCAGTTATTGATAAGATGGTGGCGGGCTGTGCAACAGCAAAGAAACTACGATCCTG  
 AACACTACCCGCCAATGCAACGAGAGAGATGCTGAAACAGTACACCTATCAAGTGCCTCTGGC  
 TTGCGAG**AGTCTCTACCAGATTCAAGTGGCGATGAGAATGAAATCAAGTCGTTGGCTAGCATGATT**  
 AAGGATGCCCTCGATGCCGTTGCGGAAGCCCTAAGTCGCTGGTGCACAAACGTATTGATTTCAGTG  
 GTGAGATTGGAGACGGAGCTGTCAGCGCTGCAATCCTCGCTGCTGGACACATCATTGTTACGTGGGATGG  
 AGCTGGACGTTGTCACAATCAACACCATGACTTGGAGGACTTACGAACCTATTCCCTCCACCTCTGAT  
 GTGCGCTGATATGGTCTCTCGGAGCACAAGGACAACATTGTTGATGTTATGCGCAAGCTCCATCGT  
 CAACGTCTGTCGGTCTGAGCAGATGCCAAGGGGATCAAACCGTGTGCAACTCAAGAAGGATAT  
 CAATGCCATCCCTGGATGTAACCAACCACTTGTACCTTGTATGGACTTTGCTAAGGATGGTACTGTGAT  
 GATGAAGAGGAGCAGCCTGGATGCAAAGACTGTTCTCTTGTGAGTCAAATGGTACATTGATCAAATGGTAC  
 CCAAGTTTAAGTTGCTGGATTGAGTTAGGTGTTAACGAGTCGTTGTAATGTTAAGGAACAGT  
 CCATGCACTCTTAAGTTAATTAAAGGACATGATTGAGTTGATAACTCGTTGAAAAGACATCTTCCTT  
 TTCTTACTCTTCTCACGTGACGAGTGTGACTGAATTTCACGTGATATGAAGT

MLNDDDEESSDDDEPVVRSSNPNAHRLEEGEEKPPTCESYLKLPFKDAVYETRSFYQEVAWSENANK  
 PDVCMSSLDDILQICHSYRPHYHEPYVHFPAAYMKDYKRIVFIGGGDAMLLHESLKYPNVELVGLDQK  
 VVRESLKHFTQPHFEDPRVQWWFGDAAKSLALLPREWFGTFDLMVMDLSETAMSISVTDDLDIFGALSL  
 LMKPEGVFVKNELYYGQMSKLFDFHSVVFVYMTDYPILCDQDWAMGSNKVDLHFPQIEGGLVEQNKRIFTF  
 NPLEDEEEHYKLIKDSRNDARKQKGKCGDYDAEVEAAKKGGEEKKEVVKPSSAGVLMVVEVESVAEGV  
 AAELEASNLNTILEKEGMHPLAPAMSHNASEGDASLALFIGMEEGYVDAHFYPSKSHVGLEIVLWSKIAKQ  
 DDLRTAILGAMGVDKTSQYRVIGHGMLGAKNWKEDVEAVGPVKNLRNCDPAAKAAEPQIGKGPIPSAT  
 FSAAVSAALSLLPKKMDKVAVVCGSKDKPCETLNALEKNSVKDVKAIVIYSCPEGGAEGEKGSKDDLVSN  
 VYHCSAKDLKRAAKAEEGFSAVIMDPAAEADFVGNMQDEFCKKKDAGQHVLLRDQVTFMTQLSNDDEE  
 FKGCTRQLMCKMVRTSRIIDGSSELGVISSGNPFGVKRIVNLAEAVEKKTGVRTVIDKMSLYQIQVGDE  
 NEIKSVSASMIKDALDAVVAGSPKFAGAKRIDSFGEIGDGAVSAILAAGHIITWDGAGRVTINTMTLG  
 ETYEPPIPSTDVPDMVLSEHKDNIVDFMRKLPSSTSVPREQMPRGSRVNFKDINAIPGCTNHFDL  
 CMDFAKGDCDDEEQPWMQKYCSSLSCGTCDQMVPKF\*

TPS\_105825

TGTCTTACTAGGAGGGCCCCCTGACCTTTCTACGCCCTTGACACGACGGCTGTGGGCCGAT  
 CATCAGCCAACGCGGGCACACAGCGAACGCCACATACATTCTCATAACATCAATTGGACGATACGAT  
 AAGCCTATCATCACCCAAACAACAATACAACCAACCAATAGTCTCAATACATACCCAAACC**ATGGTCAGCA**

AGAAAGCCCTCAAGCTCGGAGCCGTCGGCCTCGCCATCGCCATCACCCCTCGGTCTCGGTCTCGGCCT  
 CGGATTGAAGAAGAATAACACTAACGATAAGTCTCTGCCGCCCTCAGCGCCGAGGAGACCTACGATGTC  
 TACTCTGACGGATGCCGTCGTGAGTTGGACGCCACTGCCGTTGTTGTCGGCTCCTCTAATGATGCCT  
 TCCAAGGAGATAGGAGGGCTCTCGTACTGATGCTATCAGGCAGCTGCGAAGGGAAGCAAGAGCAAGGG  
 ATCATCTGGTGCCTCTACAACGTGAGTTCTATCGTGTGTGTTAATCTGGTACTTAATATCCCGTG  
 ACGCTCGTCTATACCGTGATTATATCTTTATTGGCTGTGCTAGTATCCTAACCTCGCAATTGCTACTT  
 CTCACCACATCTGCTCTGCTCATGTCTCGTCACTTACAGTGTAGCAAGGGTCTCAAAGGAAAGTCTA  
**GCCAAGGAGGT** GTAAAGTGTCTACAACAACTAAATAGAACTCATTGATTGAAGAGATGTCTCACCCATCACT  
 TCACATTGACACAAACATAG**GACTTGTGTGCCCCATTGGCCCTGGTGGAGGAAAGGGCAAATCATCAA**  
 GGGATCTTCAACTCGGTTCTGACTCCAAGGAAAGTCTAGCAAGGGCAGCAACGTTGGTGTGGAGAG  
 TGACATGTATGGCTCCCCTGTAAGAGAGAACAGTCTCCAAGTCGGGAGGTGGTCTGAAAACCGTAAC  
 CTGGATCCAAGGAAAGCAACAAGTCTCCAAGTCGGGAGGTGGTCTGAAAACCGTAACGGAAAGGTGA  
 GACATGGAACAGCGATGGTACCGTCCAGTCGGTGGAAAGTGGATCCAACAAGTCAAGCAAGGGAAACCAAC  
 GTTGCTGGATCTGGAAGCAAGGGATCTAACAAAGTCATCCAAGGGTGTCTCTCCGTCATGGTCCAAGG  
 GAAAGTCATCCAAGGGCTCATCTCCGCTAATGGTCCAAGGGATCGAAAGGAAAGGGATCCAAGAGATTC  
 TCCCTGCTGATGGTCCAAGGGATCGAAAGGAAAGGGATCCAAGGGTCTCCGCTAATGGTCCAAGGG  
 TCCAAAGGAAAGGGATCCAAGGGCTCTCCGCTAATGGTCCAAGGGATCCAAGGAAAGGGATCCAAGG  
 GTCCTCCGCTAATGGTCCAAGGGATCCAAGGAAAGTCGAGCAAGGGAAAGTCCACCCCCCCTTGCACC  
 AGTCCTTGTAAAGTGTAAAAGAGGAAATATCTTCATGTGCTTACGGCATCATTCCGGGTGATACTTTAC  
 TAACTCATTGCTTTCTCCAACGTTCAAACAGGCCATGCGTCTCCTCTGCATCTCTCGAACCT  
 CGATCTGCGTCTATACCCCTCTCCACTGATTTCCACCCCTCTCCACTGCTCTCCTCGCATTAC  
 CACCGACGTCCCTACTCCATTCCCCACTGCTATGGCGTTACGATCGTACCTACCATGGGATC

MVSKKALKLGAVGLAVVAITLGLGLGLKKNNNTDKSLAASSAEETYDVYSDGCRRELDATGRLLSAPS  
 NDAFQGDRLRALRTDAIRQLSKGSKSKGSSGASYNCNSKGSKGSSQGDLCAPLAPGGKGKSSKGSFNFG  
 SDSKGKSSKGSNVGAGECTCMAPVNPGKSNSKGSNVAGSGSKGSNKSSKGSSPANGSKGSKGSKSSPADGSK  
 YAPVGGSGSNKSSKGTVAGSGSKGSNKSSKGVPVNGSKGKSSKGSSPANGSKGSKGSKSSKGSPPLAPVPCKLK  
 RGNIFHVLTASFRVILY\*

#### TPS\_14703

AGCTCGACATGTCGGCTGATACTTACAGAGGCGAGCTTTGACTTGAAAAGAACGTAGCCTCTGAAGA  
 AACAGACTATCAGCACGTAGACATCTACGAGGTGATCAACCCCTCGCTATCGATCTATCGCACAGTACGAG  
 AAATCCCTCTCGTGAACGGTTCTACGAGTCACCTACCCAGAGTTCTACAAACCAGAT**CGACTTTAT**  
**ATTGGAAGGTATTCTGCAGAGTCGTTGATGGCAGACTTCTACCATGAGGCACTCGTTACCCAGC**  
**GATGCTTCTCATCTTAATCCAAACGAGTGTGGATCAGTCGTCATGCTTGAGGTAAGTTGCAACAATTCTCATT**  
**CTTAAGGTATTGAAGCATAAAACCGTGGATACAGTCGTCATGCTTGAGGTAAGTTGCAACAATTCTCATT**  
**TGTCGCTTAAAGAGAGAGACGCTCATTCTTTCTGCAGATCGATGAAAACAATGTAACATTTGA**  
**GACAACATCTCCTGAATGGTCGGACTGCGATGAGTTACCCCTCTCAATGAAATCTGCTTGACGATCC**  
**TCGAGCTGATGTGCGATTGTCGACGCATTAAATGGTACCAATAACTTGTATCACAGTGTGAC**  
 AAATTGTCAAAGGAAGATCGGTTGACGTAGTGTGAGTGGCTTGATTACTTCTGTCGAGTTGTTG  
 CACCTTACTAATCCAAACCAATGACGCCTGACTGCGTAGTATCATGGACGGTAGTACCATATGTTA  
 GACTGAATCCATCTGATCAATAGTT

RLLYLEGIQSSLYGETSYHEALVHPAMLSHLNPKRAIVGGEGATLREVLKHKTVDVVMLEIDENV  
 NILRQHLPEWSDCDELPSSMKSCFDDPRADVRFVDAFKW

#### TPS\_49355

ATGAACCTCTGGCTTCCGACGAGGCAACAGTAATAGTCGCATGCAATCCTACTCATTCTGCCCTACT  
 TGTGCTACCATCAGCTATTGCACTGCCAACAAATCCACATCCGAGTCAAACGAGTCGACGAAGAGGAA  
 GAAGAAATCGGTACATTCAAACCCCTCTGCTAAACACTCCGGCCGTACCACGCTAAC**TCTACCTATC**  
**AAAAGATAGAAGTATATGAAAGTGTACACTTGGTAAAGTCTTCTATTGGATGATTGTTGCAATTGAC**  
**TGAGAGGGATGCTCCGCATTATAATGAGATGTGGCGATGTTCCGGTTATGGAGTATCTAGCTTCCAAT**  
**GCAGGAATTGATGAACAGTGGATATACTAGTAGTGGCGGTGGTATGGGTATGTAGTATCTGAACCT**  
**TGAAATATCCACATGTTGGATCGATAGATCATGTAGATTGGATGGTATGTGATTCTGTTCAAAGA**  
**TCATTTCCTGGCCAAGTCTGTTGGACAATGCGAAAGTGAATCTAGTGTAGGTGATGGTACACAG**  
**TTTGTAAAGGAGCAAGTGTAAAAGAACAAAAACTATCATGTACATACAAGATGCAAGTGTACCCCTCT**  
**GGATACGATATGATGGCTCTGTGTTATATTACCAAGTCATGTGTTATATGAAAGAAGGACTAACATACCCAGC**  
**TATACACAGGTTGTTAGAGGCCAAGAATGGAGTGTGATGTATCAAGCCGAGACTTACAATATACCCAGC**  
**AATCTGAAGGAGATTGCCAAATGGAGAAAGGTATTGAAAAGTATTGGATTGGTAGAGTCGCTATGGAA**

CGATCGCTATATCAACGTATCCTACTGGTCAGATTGGTTCTTGCCTCGCATGCTGGATACTATGATGA  
TCATGCATGTATTAATTCTGATGAGGCAACAGCTGACGCATTGTGAGTGAAATTGACAATCCTGAGATT  
ACGCTGAATGGATGGACTGGAAAAAAAGTGTGCAAGACACTTCATGATCTGGAAAGTACCAAGTACTACC  
ATCCTCGTATTACAGAAGGTAAGTTACTATTAT

STYQKIEVYEDHFGKVFLDDCLQLTERDAPHYNEMLAHPVMEYLASNAGIDEQLDILVVGGGDGYVV  
SELLKYPHVGSIDHVLDLGDVISVSKDHFPWAKSVWDNAKVNVLVVGDSQFVKEQVEKNKNYHVIQDAS  
DPFWIRYDGSVVILPSHVLYEEHFQRIHRLLEAKNGVLMYQAETYNIPSNLKEIAKWRKVLKSIGFGRV  
RYGTIAISTYPTGQIGFF

TPS\_11130

TATATCTCCTTCGAATGTGATGACCTTCAAGTGAGGGTCCTTCACAGCACACATGTGAATT  
TGAACGGCTATATTGGACGAAAATCATGAACCTTGTGAACCACAGCGAACCGAGAAGCAACGACTGCG  
GACGCGCACGAGAAAATCGATTGGCTGCAAAACACAACCCAAACAAAGAACCGAGTTGACA**ATGACTGACG**  
**TTCCCCTTAATGAACCTCTGGGCTCCGACGGCAACAGTAATAGTCGATGCAATCCTACTCATTCT**  
**TGCCTTACTTGTGCTACCACAGTATTGCACTGCCAACAAATCCCACATCCGAGTCCAAACGAGTCGAC**  
GAAGAGGAAGAAGAAATCGGGTACATTCAAACCCCTCGCTAACACACTCCGGCCGTACCACGCTAAACT  
CTACCTATCAAAGATAGAAGTATATGAAAGTGTACACTTGGTAAAGTCTTCTATTGGATGATTGTTT  
GCAATTGACTGAGAGGGATGCTCCGCAATTAAATGAGATGTTGGCGCATGTTCCGGTTATGGAGTATCTA  
GCTTCCAATGCAGGAATTGATGAAACAGTTGGATATACTAGTAGTAGGGCGGGTGTGATGGGTATGAGTAT  
CTGAACTCTGAAATATCCACATGTTGGATCGATAGATCATGTTGGATGGTGTGATTCTGT  
TTCCAAAGATCATTTCCCTGGGCAAGTCTGTTGGACAATGCGAAAGTGAATCTAGTTGAGGTGAT  
GGTCACAGTTGTAAGGAGCAAGTTGAAAAGAACAAAAACTATCATGTCATACAAAGATGCAAGTG  
ATCCCCTCTGGATACGATATGATGGCTCTGTTTATATTACCAAGTCATGTTATATGAAAGAACAGCA  
TTTCAACGTATAACACAGGTTAGAGGCAAGAACATGGAGTGTGATGTTCAAGCCGAGACTTACAAT  
ATACCCAGCAATCTGAAGGAGATGCCAAATGGAGAACAGTATTGAAAAGTATTGGATTGGTAGAGTTC  
GCTATGGAACGATCGCTATATCAACGTATCCTACTGGTCAGATTGGTTCTTGCATGCTGGATA  
CTATGATGATCATGCATGTATTAAATTCTGATGAGGCAACAGCTGACGATTGTGAGTGAAATTGACAAT  
CCTGAGATTACGCTGAATTGGATGGACTGGAAAAAAAGTGTGAAAGACTTTCATGATCTGAAAGTACCA  
AGTACTACCACCTCGTATTACAGAAGGTAAGTTACTATTATGTAACCTGCTGTTGATCTCCGGTTGGTGA  
TTGCTTATTGTCATTGTTGGCGTCATTGTTGGCAATAGCTCGTTGATCTCCGGTTGGTGA  
GAAGACCGTCTACAATGTCAAAAGAACATCTCAGATGAATAAGTAACGATTAAAGTATGATGATGATCTC  
ATGCTCAATGATATGCTCCAGT

MTDVPINELLGFRGNSSHAILLIALLVPSAIALPNNPTSESKRVDDEEEEIGYIQTLLNTPAVT  
TLNSTYQKIEVYEDHFGKVFLDDCLQLTERDAPHYNEMLAHPVMEYLASNAGIDEQLDILVVGGGDG  
YVSELLKYPHVGSIDHVLDLGDVISVSKDHFPWAKSVWDNAKVNVLVVGDSQFVKEQVEKNKNYHVIQ  
DASDPFWIRYDGSVVILPSHVLYEEHFQRIHRLLEAKNGVLMYQAETYNIPSNLKEIAKWRKVLKSIGF  
GRVRYGTIAISTYPTGQIGFFASHAGYYDDHACINSDEATADALCSEIDNPEITLNWMDWKKVSKTFHDL  
ESTKYYHPRIHRR\*

TPS\_23043

GAAGGGAGGATGGAAGAAGGGAGATCCTAGGTGGTTGATGAATGAGATGGCTAGTCCGGCGAGGCTTTG  
TTCTGATGGTACCTGATGGGGTTGTCTTGATGATGTCACAGTCATGCTTCACTCTCACAGAGTATTCTGATTCTCCGCAA**TTCCATGAGT**  
**CTCTCGTCCAACCTGCATGTCGCTCATCCATTCCAAGAACATGTCGCCATTGGAGGAGGAGAAGG**  
AGCCACTCTTGTGAGGTTCTCAAGCATGCTCGGTTGAAAAGGCTACAATGAAATTGATGCAACA  
ATGGTGGAGTTATGCAAGGAACACTGCGTCAAATGTCACACTGTTCTGATATTGTGGGGAGTGCACCTA  
GTGTTATGATGATAGGAGGACTGAGTTGGTATTGCGATGCCCTTCAGTACATCTGGATAAGAACAGC  
TGCATACGACGTCTGATTGAGACACCAAAGTGCCAGAACATGACACTGAATTACCGACGCAACGGTT  
GTCAATGCCATGGTAGACTCTTGACTTCAATGGAGTCATGGCAGTTCACATTGGCACTGCTCCTTCCA  
TACACGACCCCAAGGCTGATAAGGGAGTTACCCCAAGCGAGAGCTCCTCACCAATCTCTGAAAGTTAA  
CCCCAACATTGCATCCATTACAGTGGAGGACACGTTGGCTTGGAAACCACTTCCCTC  
GTCGCATGTCGCGACGTTCTGCAAGAACAGGTA

FHESLVQPAMFAHPFPKNVAIFGGGEGATLLEVLRHSVEKATMIEIDATMVELKEHLPMSNCSDIVG  
SAPSCYDDRTELVIADAFQYILDKKAAYDVLIVDTKVPEDHETDATVNVAMVDSLTSNGVM

TPS\_173899

ATGAACCTCTGGCTTCCGACGAGGCAACAGTAATAGTCGATGCAATCCTACTCATTCTGCCTTACT  
TGTGCTACCATCAGCTATTGCACTGCCAACAAATCCGAGTCCAAACGAGTCGACGAAGAGGAA

GAAGAAATCGGGTACATTCAAACCTCTGCTAACACTCCGGCCGTACCACGCTAAAC **TCTACCTATC**  
 AAAAGATAGAAGTATATGAAAGTGATCACTTGGTAAAGTCTTCTATTGGATGATTGTTGCAATTGAC  
 TGAGAGGGATGCTCCGCATTATAATGAGATGTTGGCATGTTCCGGTTATGGAGTATCTAGCTTCCAAT  
 GCAGGAATTGATGAACAGTGGATATACTAGTAGTGGCGGTGGTATGGGTATGAGTATCTGAACCT  
 TGAATATCCACATGTTGGATCGATAGATCATGTTAGATTGGATGGTATGTTCTGTTCCAAGA  
 TCATTTCCCTGGGCCAAGTCTGTTGGACAATGCGAAAGTGAATCTAGTTGAGGTGATGGTCACAG  
 TTTGTAAGGAGCAAGTGGAAAAGAACAAAAACTATCATGTCATCATACAAGATGCAAGTGA  
 GGATACGATATGATGGCTCTGTGTTATATTACCAAGTCATGTTATATGAGAAGAGCATTCAACG  
 TATACACAGGTTAGAGGCCAAGAATGGAGTGTGATGTTCAAGCGAGACTTACAATATACCCAGC  
 AATCTGAAGGAGATTGCCAAATGGAGAAGGTATTGAAAAGTATTGGATTGGTAGAGTCGCTATGAA  
 CGATCGCTATATCAACGTATCCTACTGGTCAGATTGGTTCTTGCTCGATGCTGGACTATGATGA  
 TCATGCATGTTAATTCTGATGAGGCAACAGCTGACGCATTGTTAGTGAATTGACAATCCTGAGATT  
 ACGCTGAATTGGATGGACTGGAAAAAGTGTGCAAGACTTTCATGATCTGGAAAGTACCAAGTACTACC  
 ATCCTCGTATTACAGAAGGTAAGTTACTAT

STYQKIEVYESDHFGKVFLDDCLQLTERDAPHYNEMLAHVPMELASNAGIDEQLDILVVGGGDGYVV  
 SELLKYPHVGSIDHVLDGDVISVKDHFPWAKSVWDNAKVNLLVGDGSQFVKEQVEKNKNYHVIQDAS  
 DPFWIRYDGSSVILPSHVLYEEHFQRIHRLLEAKNGVLMYQAETYNIPSNLKEIAKWRKVLKSIGFGRV  
 RYGTIAISTYPTGQIGF

*TPS\_153946*

TCCATCACCAAAAGAAAACCCTTCTCATCTAGTACAGACGAATGCAGAACACACCAGCATGGCAGA  
 CCAAACAGACGACGAAGAAATAATCACGGAGCAAAGAGCCAAGAGCTCCTCCGCTACGTCGAAGCCGTA  
 GCTCCCGGATTAACCTCGATATGGACCTGCACACAATCCTCCACACTGCCGTCTGTAT **TTCCAAGAGG**  
**TACAAGTATTGAAAGCTACTTGGACGAACGCTAGTCACTGATGGCAAGACGCAGAGTGCCGAACACGA**  
**TGAGTTGTATATCACGAGAGTTAGTCCACCCCTGCCTTATTCTGGTCTGCCATCCTCCGGCGAAAGC**  
 GGACAAGGAGGTGCACCAAATCTGCTTCATCGGAGGAGGCGAGAGTGGCCACTGCTCGTGAAGTCC  
 TCCGCCATTCCACCATCGAACGATGCGTCATGGTGCACATGCCCTGCCGTAGTCACGTATGCAAAA  
 GTACACTCCCCGAATGGGGCGGACAGGCTGTATCGACCAACCCAAAATGGAATACATTGTGGAGACGCT  
 CACAAATACCTCATGGAGACAAACGAGAAGTTCGACGTATCATCATGGACATTCGGATCCGATTGAGG  
 CAGGACCGGGAGTGGCACTGTACACACAAGAGTTCTACCAACGTGCCAGAGGTGTTGAACAAACCGCA  
 TGGAGTATTGTAACTCAAGCTGGAGTGCGGATTCTGTACCTCATCCGCATGCGTTCTGAGGATGAG  
 AATGACGACGATGCCAATAAGGAGACTTGTGTTAGTCCTATCAAGAATACATTGGTACGGTTTG  
 ATCATGCCATTCCGTATTCTGTCCTGATTGCTAGTTGGAGAGGATTGGGATATGTCATGGCTTTAA  
 TGGGGATCCTCTCAGGGGAGGAAGTGGCAGATTGTCCTGGAGAGTGTGGATGAGTTGAGGAG  
 CGTATTAGGGTGTCGCTGGCGTCTGTGCATAGGTATCGGAGTAAGGGAGTCAGAGGGCTATTAAAG  
 GAAATGAGGTGGCGCGAG **GTATTGAAGCATTATGATGGGTCAGTCAGGAGGTGTTGCTTGAG**  
**TAAACCGTTGAGGGAGGCGATGAAGAGTGTGAGAGGATTATGACAGAGGCCAATCCAATTTCATGTAT**  
 TAGAGGAGTTTACTAAAAGGAAGAGGTGATGAATTGGAGACGATATTGGACTGAATTGAGGGTTAACT  
 TAGGAAATGCTAGCAACGCAAATCTCTCAGAGTGTAGTATGCTTCAGTACCATTTACACCT  
 TCACAAAGGATCAATTCAACGTAGCACTGGATTACTATCGAATAA

FQEJVQIESYFGRTLVDGKTQSAEHDEFVYHESLVHPALFCGQGGAPKSVFIGGGELATAREVLRHST  
 IERCVMDIDPAVNVCCKYLPEWGGQAVIDHPKMEYIVGDAHKYLMETNEKFVIIMDISDPIEAGPGV  
 ALYTQEFYQRAAEVLNPKHGVFTVQAGSADFETCCFSPPIKNTLGTVDHAIPYSCPIASFGEDWGYVMAF  
 NGDPSQGRKLADLSRESVDELIEERIRLVLKHYDGVSHRRLFALKPLREAMKSDERIMTEANPI

*TPS\_41806*

ACAATGATCTGATAGATACGTGCTTACCAAATTGAACCACGATATCAAGACGCCATTGGTATCAACATC  
 AACTGAATATCAAACGTGATGTTGATGAGTTGTCATCCAAAGGAACGAGACATGCAATCTTACAAG  
 AAGTCACCTTCAGGAGACAACCTCTACGAAGCACAACATCCGGAACTATTGGTCAAAC **CGATTGCTGA**  
**TGCTGACGGTGTATTCAAAGCACTTGTGCGGTATGCTCGTATCACGAGTCCATCGTTACCCCTGC**  
**CATGTTACTCATTCAAACCCCTAAACGAGTTGCAATTGTTAGGAGGAGAAGGAGCAACGCTTGTGAA**  
**GTAATAAAACACGAAACTGTTGAGCGAGCAGTAATGATCGAAATAGACGAAAGTGTGAGTTGGCAA**  
 GAGAATATCTGCTGAGTGGAGCGATTGTTCTGATATCGATGCTAGTTCCGAGTGGTGTGTTGACGATGA  
 ACGAGCGGAGGCAAAGTTGAAGATGCCATGACATACTCGTCGATACGTTCTACAATGACAACCTGTCA  
**AGATATCAACCGCAAGATGAGTATGATATCATCATTATGGACGCACCTGATCCCAATGACGGCGTTGACT**  
**TCGCCACATATTGATCACAAAGTGTAGCTATATCCAATCTGTACAAAGGATTAACACAATCAGGAAT**  
**CTGGTTGACAGGTAGGAAGATCCCCGAAATCGAGCTCCTCAGATGAACTGGACCTTCGCCAAT**  
**CGTGCACATGATGATCAAGAAACTGGAAGAGGTTGGATCAAGTCACATTATGCTGAAGCACA**  
**CTGGCTCCTGCTCCATGGAGTACATTAGTTACTTCAGGACTACGAAACGAGAGCAGACTGGTATCG**

TAACGAGGC

RLLMLDGVIQSTLFGDASYHESIVHPAMFTHSNPKRAIVGGGEGATLREVLKHETVERAVMIEIDESVV  
ELAREYLPEWSDYAMTYFVDTFYNDNSARYQREDEYDIIIMDALPNDGVDFATLYLTSDSYIQSLYKGL  
TQSGILVVQVG

*TPS\_109281*

GTCATTCTTACAATGATCTTGATAGATACTGCTTACCAAATTGAACCACGATATCAAGACGCCATTGGT  
ATCAACATCAACTGAATATCAAACACTGTTGATGTATGAGTTGTCATCCAAAGGAACGAGACATGCAA  
TCTTACAAGAAGTCACTTCAAGGAGACAACCTACGAAGCACAAACATCCGAACTATTG**GGTCAAACC**  
**GATITGCTGATGCTTGACGGTGTATTCAAAGC**ACTTTGTCGGTATGCTTCGTATCACGAGTCCATCGT  
TCACCCCTGCCATGTTACTCATTCAACCCCAAACGAGTTGCAATTGTTAGGAGGAGGAAGGAGCAACG  
CTTCGTGAAGTACTAAAACACGAAACACTGTTGAGCGAGCAGTAATGATCGAAATAGACGAAAGTGTGTTG  
AGTTGGCAAGAGAATATCTGCCTGAGTGGAGCGATTGTTCTGATATCGATGCTAGTTCCGAGTGGTGCCT  
TGACGATGAACGAGCGAGGCAAAGTTGAAGATGCCATGACATACTCGTCGATACGTTCTACAATGAC  
AACTCTGCAAG**ATATCAACGCGAAGATGAGTATGATATCATCATTATGGACGCACTGATCCAAATGACG**  
**GCCTGACTCGCCACATATTG**TACACAAGTGTAGCTATATCCAATCTGTACAAAGGATTAACACA  
ATCAGGAATCTGGTTGTACAGGTAGGAGAGATCCCCGAAATCGAGCTCCAGATGAACATTGGGACC  
TTCGCCAATCGTGCAGTGTAGCAAGAAACTGGAAGAGGTTGATTCAAGTCACATTACATTTATGCTG  
AAGCACACTCTGGCTTCCATGGAGTACATTAGTTCAAGGACTACGAAACGAGAGCAGA  
CTGGTATCGTAACGAGGCCGAAAT

GPNRLLMDGVIQSTLFGDASYHESIVHPAMFTHSNPKRAIVGGGEGATLREVLKHETVERAVMIEIDE  
SVVELAREYLPEWSDCSDIDASSEWCFDDEERAKEFEDAMTYFVDTYQREDEYDIIIMDALPNDGVDF  
TYLYTSDSYIQSLYKGLTQSGILVVQVGEI

*TPS\_30181*

CACACAAACTACGTGGGTTAGAGAGGGATCGCTCCGGGTATGTCGCACAGCAATCCTCTGGATGG  
TGACTTGGGACGGTATGCTCTGGAAAGTTGGATTCGATCTAAAACACCCCTGATTCTACAAAGACG  
GAATTCCAGAGTGTGGATGTCTATGAACCTTGTATCCGAGGTTGCGAAATGCTGAATCC**TATCAAAGT**  
**CGTTGGAAGATAGGGATTCTTACA**ATACGAGAACCTGAGCTGTTGCTCCGATCGTGTGCTCTTTT  
GGATGGAGTTATTCAAGAGTACTCATTATGGCGATGCCCATACCATGAATCTATCGTACATCCAGCGATG  
ATTACTCATCAAACCCAAAACCGCGTTGCCATTGTTGGAGGAGGTGAGGGTGCTACGTTGCGTGAAGTGC  
TAAAGCATGGTCAGTGGAGAAAGCTACAATGATTGAAATTGACGAGGATGTTGGACATTCCAAGA  
GTCTTGCCAGAGTGGTCAATTGTCGGATATTGTCGGCAGTGCAGAGTGGTGCCTTGATGACGAAAGG  
GTGGATTCTAGGTTGAGGATGCCATGGAATTCAAGAGTGCATTGCAACAAAAACGTTAGCCCGGG  
CTTCTCTGATGAACGATTGACGTCAATTGATGCCCTGGATCCAATGATGAGGATTGAGATTGAGTTGC  
AGTGGAGTT

YQKSLEDRDSYEYENPELFAPDRVLFLDGVIQSTHYGDAPYHESIVHPAMITHSNPKRAIVGGGEGATL  
REVLKHGSVEKATMIEIDESVV

*TPS\_106272*

ATGGTGACTTGGGACGGTATGCTCTGGAAAGTTGGATTCGATCTAAAACACCCCTGATTCTACAAA  
GACGGAATTCCAGAGTGTGGATGTCTATGAACCTTGTATCCGAGGTTGCGAAATGCTGAATCCTATCAA  
AAGTCGTTGGAAGATAGGGATTCTTACGAATACGAGAACCTGAGCTGTTGCTCCGAT**CGTGTGCTCT**  
**TTTGGATGGAGTTATTCAAGAGTACTCATTATGGCGATGCCCATACCATGAATCTATCGTACATCCAGC**  
**GATGATTACTCATTCAAACCCAAAACCGCGTTGCCATTGTTGGAGGAGGTGAGGGTGCTACGTTGCGTGA**  
**GTGCTAAAGCATGGTCAGTGGAGAAAGCTACAATGATTGAAATTGACGAGGATGTTGGACATTCCA**  
AAGAGTTCTGCCAGAGTGTCAAATTGTCGGATATTGTCGGAG**TGCAGAGTGGTGCCTTGATGACGA**  
AAGGGTGGATTCTAGGTTGAGGATGCCATGGAATTCAAGAGTCGATTGCAACAAAAACGTTAGCC  
GCGGCTCTCTGATGAACGATTGACGTCAATTGATGCCCTGGATCCAATGATGAGGATTGAGTT  
TTGCAGTGGAGTTGTACCAAGAGTGTGAGCTTTATTGGATCACTGTACAAGGGATTGACTGACTCGGGTAT  
TTGGCAGTGCAGGTTGGAGAACACCCAGATCACTGTGATCCTCCGGACGAAGCAGATCAGTTGCCAAT  
AGCAGGTTATGCTGCAAAAGTTGCAAGATGTTGGATTAAAGAGCATTACATCTATACAGAATCGCACT  
CTGGATTCAATTGGGCTTGGAGTACACTGGGGCATTCAAGGACTACGAAACAAGGGCGAACTGGTACCG  
TAGTACTCC

RVLFLDGVIQSTHYGDAPYHESIVHPAMITHSNPKRAIVGGGEGATLREVLKHGSVEKATMIEIDESVV

DISKEFLPECAEWCFDDERVDSRFEDAMEYFKTAASSDERFDVI IMDALDPNDEIEFAVELYQSESFIGS  
LYKGLTDGILAVQVG

*TPS\_103915*

TATGCCAACTTATGCCGATGGTTGAAGGGAGGATGGAAGAAGGGAGATCCTAGGTGGTTGATGAATGAG  
ATGGCTAGTCGGCGAGGCTCTTGTCTTGATGGTACCTTGATGGTGGGTTTGCTTGTATGATGTA  
TCACAGTGCACATCATGCATCATTGCTCACCTCGTATTCCCTCACCTCTCACAGAGTATTCTG  
ATTCTTCCCGAATTCCATGAGTCTCTGCCAACCTGCCATGTCCTCATCCATTCCAAGAATGTC  
CGCCATTGGAGGAGAAGGAGCCACTCTTGAGGTTCTCAAGCATGTCGGTTGAAAAGGCT  
ACAATGATTGAAATTGATGCAACAATGGTGGAGTTATGCAAGGAACACTTGCCCTGAAATGTCCAACGT  
CTGATATTGGGGAGTGCACCTAGTTGTTATGATGATAGGAGGACTGAGTTGGTATTGCCATGCC  
TCAGTACATCTGGATAAGAAGGCTGCATACGACGTCTGATTGAGACACCAAAGTCCAAGAATCAC  
ACTGAATTACCGACGCAACGGTTGTCATGCCATGGTAGACTCTTGACTTCAATGGAGTCATGGCAG  
TTCACATTGGCACTGCTCCATACACGACCCCAAGGCTGATAAGGAGTTACCCCAAGCAGAGCT  
CCTCACCAATCTCTCGAAGTTAACCCCAACATTGCATCCATATTCAATT

SISDSFREFHESLVQPAMFAHPFPKNVAIFGGGEGATLLEVLRHSVEKATMIEIDATMVELCKEHLPEI  
APSCYDDRRTELVIADAFQYILDKKAAYDVLIIVDTKVP

*TPS\_41289*

ACTCGATGCACATCCACAACCTCTTTGCCATCACTTCACTGGCTTTACTTCCGTCATCTCCGTA  
CCGCCTCCATCACCAAAGAAAACCTTTCTCATCTAGTACCGAGCAATGCAAGAACACCCAGCATG  
GCAGACCAAACAGACGAGAATAATCACGGAGCAAAGAGCCAAGAGCTCCTCCGCTACGTCGAAG  
CCGTAGCTCCGGATTAACCTCGATATGGACCTGCACACAATCTCCACACTGCCGCTCTGATTCCA  
AGAGGTACAAGTGATTGAAAGCTACTTGGACGAACGCTAGTCAGTGGCAAGACGAGTGGCGA  
CACGATGAGTTGTATATCACGAGAGTTAGTCCACCTGCCTTATTCTGGTCTGCCATCCTCTCCGGCG  
AAAGCGGACAAGGAGGTGCACCCAAATCTGCTTCATCGGAGGAGGCGAGAGTTGGCCACTGCTCGTGA  
AGTCCTCCGCCATTCCACCACATCGAACGATGCGTCATGGTACATGACCCCTGCCGTAGTCACGTATGC  
AAAAAGTACCTCCCCGAATGGGGGGACAGGCTGTACCGACCCAAATGGAATACATTGGAG  
ACGCTCACAAATACCTCATGGAGACAAACGAGAAGTTCGACGTACATCATGGACATTCCGGATCCGAT  
TGAGGCAGGACCGGGAGTGGCACTGTACACACAAGAGTTCTACCAACGTGCCAGAGGTGTTGAACAAA  
CCGCATGGAGTATTGTAACTCAAGCTGGAGTGCCTACCTCATCCGATGCCGTGTTCTGAGG  
ATGAGAATGACGACGATGCCAATAAGGAGACTGTTTACTGCTATCAAGAATACTTGGGTACGGT  
GTTGATCATGCCATTCCGTATTCTGCTGATTGCTAGTTGGAGAGGATTGGGATATGTCATGGCT  
TTAATGGGGATCCTCTCAGGGAGGAAGTGGCAGATTGTCAGGGAGAGTGTGGATGAGTTGATTG  
AGGAGCGTATTAGGTTGGTGCCTGGCGTCTGTGCATAGGTATGGAGTAAGGGAGTCAAGAGGGCTAT  
TAAAGGAAATGAGGTGGCGGGAGGTATTGAAGCATTATGATGGGTCACTGGAGGTGTTGCT  
TTGAGTAAACCGTTGAGGGAGGCGATGAAGAGTGTAGGAGGATTGACAGAGGCCAATCCAATCTCA

YVEAVAPGLNLMDLHTILHTAVSDFQEVSYFGRTLVDGKTQSAEHDEFVYHESLVHPALFWSAI  
LSGESQGGAPKSVFIGGGELATAREVLRHSTIERCVMVIDPAVNVCCKYLPEWGGQAVIDHPKMEY  
IVGDAHKYLMEETNEKFDVIMDI SDPIEAGPGVALYTQEFYQRAAEVLNKPHGVFTQAGSADFVPHPA  
FPEDENDDDANKETCCFSPIKNTLGTVDHAIPYSCPPIASFGEDWGYVMAFNQDPSQGRKLADLSRESVD  
ELIEERI

**b) Vollständige cDNA-Sequenzen von TPS\_108361 und TPS\_41289**

*TPS\_108361*

ATGGCTGCCCTCGCCCCACAACACAGTATCGTGGTAGCATTAACCTTGGTCCATCTGTTGGCTTGACCGTC  
ACTGCATCGTCATCAACAACGCCCACCGCCCCGCAACGCCGCTGACCCACAACATGAGCGACTTCCCTCC  
CCGCAAGATACTCGCACCTCATCATAGACAATTGGTCCACGAACGTGGTCTCTGGCCAGGCCAATCCTTC  
TCTCTCAAATCGAAAAGATACTTACCATCAAAAGTCTCTCTTCAAGACGTGCTCGTGTGACTCGACCAAC  
CATGGCAAAGTGTGGTATTGGAGTGGAGTCATTCAATGCACCGAACATGATGAACACAGTTACCAAGAGATGATG  
GCGCACATTCCCTCTACTCTCATCCAAATCCAAGAAGGTTACTGGTCATGGAGGAGACGGAGGTGTCTTA  
CGCGAGATAGCAGTCATCTGGAGTTGAGGAGATTGACATCTGTGAGTTGGACAAGGATGTCAATTGACGTATCC  
AAAAAGTACTTGGCTCATGGCAAAGGGATTGACGATCCACGTGCAAAGTACACATTATGGACGGTGC  
TTCATGGAGGAGAACCAATCTGCATTGATGTCATGTTACGGACTCGTCGGATCCTGTAGGACCAGCGAGTGTC

TTGTTTGAGACTCCATTCTACAAGGCTTGCATGGAAGTTACGTGAGGGAGGAATCATTGCACACAGGGGGAA  
TGTGTTGGCTCACGGTACTGATCCAACCGTTGATCAAGGCGATTCAAGGCTCTATTACGACTGTGGAGTAC  
GCTTACTGCACGATTCCGAGCTATCCGAGTGGCAGATTGGGTCATTATTGCAACCAAGGGTGGAAAGGGGTGT  
AGGAATCCAGTACGTGCACCAGAGGAGAGTGTGCAGAAGGAGTTAAAGTATTATACTCCGATATTCAAGTGCA  
GCGTTTGTGCTGCCTGCCTTGCACAGCGAGCTATTTCGGTGGTTGCTGAAGTAG

MAAFAPQHSIVVALTLVSICLACTVTASSSTPTAPPTPLTHNMSDFPPPQDYSHLIIDNWFHERGPLWPGQSF  
SLQIEKILYHQKSLFQDVLVFDSTNHGVLDGVIQCTEHDHSYQEMMAHIPLYSHPNPKVILVIGGGDGGLV  
REIARHPVVEEICICELDKDVDSKKYLPFMAGFDPRVKVHIMDGAKFMEENQSAFDVIVTDSSDPVGPASV  
LFETPFYKALHGSLSREGGIICTQGECVWLHVDLIQPLIKAIQPLFTTVEYAYCTIPSYPSQQIGFIIATKGKGC  
RNPVRAPEESVQKELKYTPDIHSAAFVLPFAQRAIFGGLSK

TPS\_41289

ATGCACATCCACAACCTCCTTGCCATCACTTCACTGGTTTACTTCCGTCAATCTCCGTACCGCCTCCAT  
CACCAAAGAAAACCCTTCTCATCTAGTACCGAGACAATGCAGAACACACCAGCATGGCAGACCAAACAGAC  
GACGAAGAATAATCACGGAGCAAAGAGCCAAGAGCTCTCCACACTGCCGTCTGATTCCAAGAGGTACAAGTGTGAAAGCTAC  
CTCGATATGGACCTGCACACAATCTCCACACTGCCGTCTGATTCCAAGAGGTACAAGTGTGAAAGCTAC  
TTTGGACGAACGCTAGTCAGTGTGGCAAGACGCAGAGTGCCGAACACGATGAGTTGTATATCACGAGAGTTA  
GTCCACCCCTGCCTTATTCTGGTCTGCCATCCTCTCCGGCAAAGCGGACAAGGGAGGTGCACCCAAATCTGTCTTC  
ATCGGAGGAGGCGGAGAGTTGGCCACTGCTCGTAAGTCCTCCGCCATTCCACCATCGAACGATGCGTCATGGTT  
GACATCGACCCCTGCCGTAGTCACGTATGCAAAAGTACCTCCCCGAATGGGGCGGACAGGCTGTACATGACCAC  
CCCAAAATGGAATAACATTGTGGGAGACGCTCACAAATACCTCATGGAGACAAACGAGAACAGTTCGACGTACATCATC  
ATGGACATTGGATCCGATTGAGGCAGGACGGGAGTGGCACTGTACACACAAGAGTTCTACCAACGTGCCGA  
GAGGTGTTGAACAAACCGCATGGAGTATTGTAACTCAAGCTGGAGTGCAGGATTTGTACCTCATCCGATGCG  
TTCCCTGAGGATGAGAATGACGACGATGCCATAAGGAGACTTGTGTTAGTCCTATCAAGAATACTTGGGT  
ACGGTGTGATCATGCCATTCCGTATTCTGTGGATTGCTAGTTGGAGAGGATTGGGATATGTATGGCT  
TTAATGGGATCCTCTCAGGGAGGAAGTTGGCAGATTGTCTCAGGAGAGTGTGGATGAGTTGAGGAG  
CGTATTAGGGTGGTGCCTGGCGTCTGTGCATAGGTATCGGAGTAAGGGAGTCAGAGGGCTATTAAAGGAAT  
GAGGTGGGCGCGAGGTATTGAAGCATTATGATGGGTCACTGGAGGTTGCTTGAGTAACCGTTG  
AGGGAGGCGATGAAGAGTGTGAGAGGATTATGACAGAGGCCAATCCAATCTCATGTATTAG

MHIHNLLPLSLSLAFTSRQSPYRLHHQRKPFSSSSTRRMQNNTSMADQTDDEEIITEQRAKSSFRYVEAVAPGLN  
LDMDLHTILHTAVSDFQEVOVIESYFGRTLVDGKTQSAEHDEFVYHESLVPALFWSAILSGESQGGAPKSVF  
IGGGGELATAREVLRHSTIERCMVDIDPAVVNVCKYLPEWGGQAVIDHPKMEYIVGDAHKYLMETNEKFDVII  
MDISDPIEAGPGVALYTQEFYQRAAEVLNPKPHGVFVTQAGSADFVPHAFPEDENDDANKETCCFSPIKNTLG  
TVFDHAIPYSCPIASFGEDWGYVMAFNQNGDPSQGRKLADLSRESVDELIEERIRLVPGVPHRSKGVKRAIKGN  
EVGAEVLKHYDGVSHRLFALSKEPLREAMKSDERIMTEANPIFMY

### c) Verwendete Primer

Für die Amplifikation von *TPS\_41289*:

41289-1

5'-ATGCACATCCACAACCTCCT-3'

41289-2

5'-CTAATACATGAAGATTGGATTGGC-3'

Für die 5'-RACE-PCR von *TPS\_41289*

5Race-1

5'-GGCCACCGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3'

5Race-2

5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'

5R(412)-1

5'-CAATCACTGTACCTCTTGG-3'

5R(412)-2

5'-CATCGTCGTCAATTCTCAC-3'

Für die 3'-RACE-PCR von *TPS\_41289*

3R412-1

5'-AACCTTTCTTCATCTAGT-3'

3R412-2

5'-ACTTGGTACGGTGTGA-3'

ONDT25	5'-GCCGCCGAATTCCCAGTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
ON644	5'-GCCGCCGAATTCCCAGTT -3'
Für die Amplifikation von <i>TPS_108361</i>	
108361-1	5'-CATATGGCTGCCTCGCCCCAC-3'
10861-2	5'-CTACTTCGACAAACCACCG-3'
108-Alternativ	5'-CTGACCCACAACATGAGC-3'
Für das Basenaustauschexperiment mit <i>TPS_41289</i>	
BA-VH1	5'-CAAGAGCTCCTTCCGCTACG -3'
BA-VH2	5'-CGAGCAGTGGCCAAGTCTC-3'
BA412-HH1	5'-GAGACTTGGCCACTGCTCG-3'
BA412-HH2	5'-GTCGTCATTCTCATCCTCAGG-3'
Für die Amplifikation von <i>ACL5</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	
ACL5-1	5'-ATGGGTGAAGCCGTAGAGGTC-3'
ACL5-2	5'-TTAAATATGCCGGTACGCCACACC-3'
Für die Amplifikation von <i>SpeE</i> aus <i>Thermus thermophilus</i>	
TTH-SPD1	5'-ATGGACTACGGGATGTACTTCT-3'
TTH-SPD2	5'-CTACCCCTTGTAAGGGGC-3'
Für die Amplifikation von <i>SPMS1</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	
SPMS-1	5'-ATGGAGGGAGACGTGGAATAG-3'
SPMS-2	5'-TCAAGAAGCCAGAAGTGAAGCTAC-3'
Für die Amplifikation von <i>Spe4</i> aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
SC-1	5'-ATGGTTAATAATTACAGCATCCT-3'
SC-2	5'-TCATTCAATTGACCTTGTCTG-3'
Für die Amplifikation von <i>TPS_41289</i> für die TpNR-Expressionskassette	
412I-Trafo	5'-ATCATAATCATGCACATCCACAACCTCCT-3'
412II-Trafo	5'-CTAACATGAAGATTGGATTGGC-3'
Für die Kolonie-PCR von pGEMT	
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
SP6	5'-GCTATTTAGGTGACACTATAG-3'
Für die Kolonie-PCR von pQE-30 UA	
PQE-Start	5'-GTGAGCGGATAACAATTTCAC-3'
PQE-Ende	5'-GAGGTCAACTGGATCTAC-3'
Für die Amplifikation von <i>β-Tubulin</i> ( <i>T. pseudonana</i> )	
Tub-1	5'-CCGTTGTGGAGCCTTACAAT-3'
Tub-2	5'-AGCTGGTTGAGGTCTCCGTA-3'
Für die Amplifikation von <i>TPS_101424</i> (RT-PCR)	
101-1	5'-CGGCAAGTCTGTACCCAAAT-3'
101-2	5'-GGTCCATTGCGTAGGTAGGA-3'
Für die Amplifikation von <i>TPS_41289</i> (RT-PCR und Sonde für Hybridisierung)	
412-A	5'-GGTGCACCAAATCTGTCTT-3'
412-B	5'-TGATGACGTCGAACCTCTCG-3'
Für die Amplifikation von <i>TPS_108361</i> (RT-PCR)	
108-A	5'-GCCAAATTGAGGAGAA-3'
108-B	5'-TCAACGGTTGGATCAAGTCA-3'
Für die Amplifikation von <i>TPS_41806</i>	
418-A	5'-GGTCCAGAACCGAAGATGA-3'
418-B	5'-ATGTCTCGTCCCTGGGATG-3'
Für die Amplifikation von <i>TPS_106272</i>	
106-A	5'-GCAGAGTGGTGCTTGATGA-3'

---

106-B	5'-ACCTGCACTGCCAAATACC-3'
Für die Amplifikation von TPS_22645	
226-A	5'-TTGCTTGACGATGAACGAG-3'
226-B	5'-GGACGAACACTCCATCGTTT-3'
Für die Amplifikation von TPS_101424	
101-A	5'-CGGCAAGTCTGTACCCAAT-3'
101-B	5'-GGTCCATTGCGTAGGTAGGA-3'
Für die Amplifikation von TPS_11130	
111-A	5'-TCCAATGCAGGAATTGATGA-3'
111-B	5'-ACTTCGCATTGTCCCAAAC-3'
Für die Amplifikation von 35495	
354-A	5'-CGTCCCCATTATCATGAACC-3'
354-B	5'-TCAAACCTCTCACGCACAACC-3'
Für die Amplifikation von TPS_108361	
108-A	5'-GCCAAATTGAGGAGAA-3'
108-B	5'-TCAACGGTTGGATCAAGTCA-3'

## Danksagung



Ich bedanke mich bei allen Personen, die mich während meiner Doktorandenzeit unterstützt haben. Besonderen Dank verdienen:

- ✓ Herrn Prof. Dr. Manfred Sumper für die Aufnahme an seinem Lehrstuhl, für die Überlassung des Themas und seiner konstruktiven Kritik zu meiner Doktorarbeit, sowie für die gute Laborausstattung.
- ✓ Herrn Dr. Stephan Wenzl als Ansprechpartner für kleine Probleme.
- ✓ Herrn Dr. Jürgen Knott für die ständige Diskussionsbereitschaft zu wissenschaftlichen und allgemeinen Themen, die dem Fortschritt dieser Arbeit sehr dienlich waren, der netten Laboratmosphäre und für das bereitwillige Korrekturlesen dieser Arbeit .
- ✓ Dr. Nils Kröger und Dr. Nicole Poulsen für die uneigennützige Zusendung der für die *T. pseudonana*-Transformation notwendigen Vektoren.
- ✓ Frau Dr. Ingrid Weiss für die angenehme und freundliche Büroatmosphäre.
- ✓ Meiner Frau Annika Pienimäki-Römer für die gemeinsamen Mittagspausen und ihre Unterstützung im Alltag und meinem Sohn Florian für die vielen schönen Momente abseits der Arbeit.

## **Erklärung**

Mit dieser Erklärung versichere ich, dass die Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe von mir angefertigt wurde.

Regensburg, den 11.04.2008

Piero Römer